J. Fd Hyg. Safety 10(3), 189 - 197(1995)

Citrus Fruits, 드링크류, 소변 중 Synephrine과 Octopamine의 분석에 관한 연구

노동석* · 이정애 · 김승기 · 정현숙 · 유보경 · 박종세
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

Analysis of Synephrine and Octopamine in Citrus Fruits, Drinks, and Human Urine

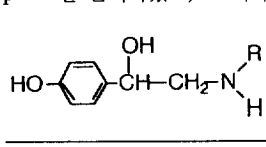
Dong-Seok Lho*, Jeong-Ae Lee, Seung-Ki Kim, Hyeon-Sook Jung, Bo-Kyung Yoo and Jong-Sei Park
Doping Control Center Korea Institute of Science and Technology
P. O. Box 131. Cheongryang, Seoul, Korea

ABSTRACT—Analytical method for synephrine and octopamine in citrus fruits, drinks containing citrus fruit, and human urine was developed using gas chromatography / mass spectrometry(GC/MS). Silylation with MSTFA, acetylation with MBTFA, and trimethylsilylation with MSTFA followed by trifluoroacetylation with MBTFA were compared. The selective derivatization of synephrine and octopamine was optimized with two derivatizing reagents ; MSTFA and MBTFA. The ion at m/z 267 was monitored to characterize the benzyl group of the both compounds. Synephrine was detected in the concentrations of 0.46~1.88 μg/g for citrus fruits and 1.2~8.1 μg/ml for drinks. The urinary excretion data of synephrine showed the highest concentration at the period of 8-20 hours after drinking orange juices and total amounts of its urinary excretion calculated as a parent compound was 11-14% of a dose during 48 hours. Octopamine was not detected in citrus fruits, drinks, and human urine.

Kew Words □ Synephrine, Octopamine, Citrus fruits, Urine, Drinks, Quantitation

Synephrine은 1927년 독일에서 처음으로 합성[1]된 이후 교감신경 흥분제,[1] 항 히스타민제,[2,3] 기관지 확장제,[4] 그리고 혈관수축 및 혈압상승제[4]등으로 사용되어왔다.

Synephrine과 norsynephrine(octopamine)은 식물, 즉 citrus의 잎과 열매에서 처음으로 분리[5,6]된 이후 tangerine, orange, grapefruit, pumelo, shaddock등에서 분리, 확인되었다.[7-9] 동양권에서는 citrus species를 포함하는 Chinese medicinal drugs인 Aurantii nobilis Pericarpium(Japanese name, "Chinpi"), Aurantii fructus Immaturus("Kijitsu"), "Kikoku" and "Seihi"로부터 adrenergic β_2 activity[9]를 나타내는 synephrine을 분리하였고,[11-13] 이와같이 synephrine은 Chinese medicinal drugs에서 중요한 약효성분중의 하나임을 고려하여 이들의 품질을 평가할때 표지성분중의 하나로 설정하였다.[14]



R = CH_3 : synephrine
R = H : octopamine

*Author to whom correspondence should be addressed.

Norsynephrine은 Erspamer[15,16]에 의해서 처음으로 생체물질, 즉 Octopus vulgaris 의 타액선(salivary glands)에서 분리되어 octopamine이라고 명명되었고, synephrine은 Kamimoto등[17,18]에 의해서 처음으로 사람의 소변에서 확인된 이후 다른 포유동물의 뇌, 조직 및 소변에서도 synephrine과 octopamine을 분리하였다는 많은 보고가 발표되었다.[19-23] Synephrine과 octopamine의 생합성 메카니즘은 tyramine이 β-hydroxylation에 의해서 norsynephrine로 변환된 다음, 생성된 norsynephrine은 화학구조적으로 norepinephrine과 비슷하기 때문에 norepinephrine-epinephrine 의 전환효소와 동일한 *N* -methylation transferase에 의해서 synephrine으로 메틸화된다고 제안하였다.[17,24,25] 그 이후 생체물질에서의 synephrine과 octopamine에 대한 연구가 활발하게 진행되어 미량으로 존재하는 synephrine과 octopamine의 이성질

체(*o*-, *m*-, *p*-)들이 정상인의 소변에서 분리되었고,[26] 이때 이들 이성질체중에서 *o*-와 m-octopamine, m-synephrine은 처음으로 사람의 소변에서 확인된 화합물이다.

식물, 즉 citrus에서 synephrine과 octopamine의 분석방법에 관한 보고로서는, citrus의 열매와 잎으로부터 *l-synephrine*과 *l-octopamine*은 paper chromatography와 in-frared spectrophotometry에 의해서 분리 및 확인되었다.[5,23,27] 일본 등의 동양권에서는 citrus species를 포함하는 Chinese medicinal drugs의 추출물로부터 synephrine을 분리하여 high performance liquid chromatography(HPLC)방법으로 분석하였고,[11,12,28,29] 최근에 Hashimoto등[13]은 Ion-pair HPLC방법을 이용하여 Chinese medicinal drugs으로부터 synephrine의 분석방법을 개선하였다.

생체물질에서 synephrine의 분석방법으로는 ion exchange column, two-dimensional paper chromatography, paper electrophoresis, color reaction, spectrophotometry-fluorometry를 이용한 방법[17,18]이 보고되었다. 생체물질중에는 synephrine과 octopamine이 비교적 미량으로 존재하기 때문에 개선된 분석방법 즉, Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)방법으로 포유동물의 조직에서 octopamine과 synephrine의 이성질체들을 분석한 결과 *o*-octopamine,[30] *m*-octopamine,[21,31,32] *m*-synephrine,[9,33] *p*-synephrine[9]을 확인하였고, GC/MS electron impact 방법보다 10~100배[12,27]의 감도를 갖는 electron capture negative chemical ionization(NCI-GC/MS)방법으로 octopamine과 synephrine의 모든 이성질체들(*o*-, *m*-, *p*-)을 확인하였다.[26,34,35]

Synephrine과 octopamine은 비교적 극성이 큰 hydroxyl group과 amino group때문에 GC에 대한 성질 즉, sensitivity 및 selectivity가 좋지않다. 이와 같은 문제점들을 해결하기 위한 방법으로 이들 화합물들의 극성을 감소시키는 유도체화과정이 필요하다.

그러므로 본 연구에서는 synephrine과 octopamine의 hydroxyl group과 amino group을 유도체화하는 최적조건을 확립하여 국내에서 시판되는 citrus fruits, citrus fruits으로 제조된 음료수, 정상인의 소변, 그리고 음료수를 복용한 정상인의 소변에 대하여 synephrine과 octopamine을 분석하고, 또한 정상인 800여명을 대상으로 소변을 채취하여 역시 synephrine과 octopamine을 분석하였다.

재료 및 방법

실험방법

가수분해 — 유리마개가 있는 15 m*l* 원심분리관에 소변시료 5 m*l*를 취하여 6 N 염산 1 m*l*와 cysteine 10 mg을 첨가한후 이 혼합용액을 105 °C에서 30분 동안 가열한다. 시료가 쥬스류인 경우 소변과 동일한 양을 취하고, 과일인 경우에는 균일하게 분쇄하여 5 g을 취한다.

추출 — 가수분해된 혼합용액을 상온으로 냉각하여 추출용매 diethyl ether 5 m*l*를 첨가한 후 유리마개로 막고 20분 동안 흔들어 준다. 이 혼합용액을 원심분리기에서 2,500 rpm으로 5분동안 원심분리시켜 용매층은 버린다. 남아있는 수층에 내부표준물질인 pseudoephedrine의 농도가 2 μg/m*l*이 되도록 첨가한 다음 붕산 완충용액으로 pH가 9.6이 되도록 조절한다. 그리고 추출수율을 높이기 위하여 *t*-butanol/water(90 : 10)용액 0.5 m*l*를 가한다음 몇초동안 vibro-mixing 시켜준다. Diethyl ether 5 m*l*와 무수황산나트륨 3 g을 시료용액에 첨가한 후 20분동안 흔들면서 추출한다. 다시 원심분리기에서 diethyl ether층과 수층을 5분동안 분리시켜 diethyl ether층은 유리마개가 달린 다른 원심분리관으로 옮긴다. 진공회전증발기를 이용하여 용매를 날려보낸 다음 P_2O_5와 KOH가 들어있는 진공데시케이터에서 완전히 건조시킨다.

유도체화 — · Trimethylsilylation : 완전히 건조된 잔유물에 methylorange-CH_3CN/CF_3CO_2H 혼합용액 50 μ*l*를 첨가하여 다시 녹인 후에 MSTFA 90 μ*l*를 가하면 붉은색에서 노란색으로 변하게된다. 이 반응용액은 80 °C에서 5분동안 반응시킨다.

· Trifluoroacetylation : 완전히 건조된 잔유물에 CH_3CN 50 μ*l*를 첨가하여 다시 녹인 후에 MBTFA 50 μ*l*를 가하여 60 °C에서 15분동안 반응시킨다.

· Selective derivatization : 완전히 건조된 잔유물에 methylorange-CH_3CN/CF_3CO_2H 혼합용액 50 μ*l*를 첨가하여 다시 녹인 후에 MSTFA 70 μ*l*를 가하면 붉은색에서 노란색으로 변하게된다. 이 반응용액을 80 °C에서 5분동안 가열한 후 MBTFA 10 μ*l*를 가하고 다시 80 °C에서 10분동안 가열한다. 위의 유도체화과정에서 반응용액의 색깔이 다시 붉은색으로 변하면 silylation상태가 안정화되도록 1~2방울의 MSTFA를 첨가하여야한다.[26] 이 결과용액의 2 μ*l*를 GC/MS에 주입하여 분석한다.

분석기기 및 장비

분석기기로는 Hewlett Packard(HP) 5890A Gas Chromatograph(GC)에 direct interface로 연결된 5970B Series Mass Selective Detector(MSD)를 사용하였고, 모든 시료는 HP 7673A Autoinjector를 이용하여 GC에 주입하였다. Data system으로는 HP 7946 Disc Drive가 연결된 HP 59970B Mass ChemStation을 사용하였고, 크로마토그람과 질량스펙트럼은 HP 2934A Printer로부터 얻었다.

추출장비로서 진탕기는 Buhler 7400 Tubingen(Edmund사 제품, 독일)을, 원심분리기는 Varifuge F Centrifuge (Heraeus사 제품, 독일)을 사용하였다. 가수분해 및 유도체화과정에서 반응용액의 온도는 Bielefeld-14(Gebr Liebisch, 독일)의 heating block으로서 조절하였다.

시약

DL-Synephrine, DL-octopamine, trifluoroaceticacid(TFA), N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA)와 N-methyl-*bis*-trifluoroacetamide(MBTFA)는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 구입하였다. Acetonitrile, diethyl ether, methanol은 크로마토그라피용으로서 Merck Co.(독일) 제품을 사용하였고, hydrochloric acid, cysteine, anhydrous sodium sulfate, potassium hydroxide, boric acid, methylorange는 Junsei Chemical Co.(일본)에서 구입하여 사용하였다. GC insert liner의 충진물로는 Serva제품(독일)의 silanized glass beads(125~200 μ, 80~120 mesh)를 사용하였고, GC/MS에 사용한 운반가스는 순도 99.999%인 헬륨(Union Carbide, U.S.A.)을 사용하였다.

용액의 제조

· Synephrine과 octopamine의 표준용액 : synephrine과 octopamine을 각각 10 mg을 10 m*l*의 methanol에 녹여 만든 후 필요에 따라 적당한 농도로 묽혀서 사용하였다.

· 붕산완충용액 : 10 N KOH 500 m*l*에 붕산 84 g을 녹여 만들었다.

· Methylorange-CH_3CN/CF_3CO_2H 혼합용액 : CH_3CN 60 m*l*와 CF_3CO_2H 40 m*l*의 혼합용액에 methylorange 20 mg을 녹여 만들었다.

분석시료

귤, 오렌지, 자몽은 시중에서 구입하여 분쇄기로 갈아서 사용하였고, 쥬스류는 오렌지과즙이 함유된 것으로서 서로 다른 회사의 제품을 구입하였다. 소변은 건강한 성인 남자의 소변으로서 오렌지쥬스류의 750 m*l*를 2시간동안 2회 복용한 후 일정한 시간 간격으로 48시간동안 채취하였다.

검량선

Synephrine의 표준용액을 시료의 종류에 따라 각각 다른 농도로 첨가하여 검량선을 작성하였다. 예비실험을 통하여 synephrine이 잔류하지 않은 시료를 선정하여 과일의 경우에는 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 μg/g, 쥬스인 경우에는 0, 1.0, 3.0, 7.0, 10.0, 20.0 μg/m*l*, 소변인 경우에는 0, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0 μg/m*l*이 되도록 각각의 시료에 synephrine을 첨가하였다. 위에서 언급한 실험방법에 따라 각각의 시료를 전처리한 후 얻어진 용액을 GC/MS에 주입하여 내부표준물질에 대한 synephrine의 피이크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였다. Octopamine은 채취한 모든 시료에서 검출되지 않았으므로 검량선을 작성하지 않았다.

회수율 시험

과일류와 오렌지쥬스류는 시중에서 구입하고, 소변시료는 정상인의 것을 채취하여 예비실험을 통하여 synephrine과 octopamine이 검출되지 않은 각각의 시료 즉, 과일류에는 1.0 μg/g, 쥬스류에는 2.0 μg/m*l*, 그리고 소변시료에는 0.5 μg/m*l*의 농도로 synephrine과 octopamine의 표준용액을 첨가하고 위에서 언급한 실험방법에 따라 각각의 시료를 전처리한 후 얻어진 용액을 GC/MS에 주입하여 내부표준물질에 대한 synephrine의 피이크 면적비에 의해 회수율을 계산하였다.

GC/MS parameters

- GC : HP 5890A
- MS : HP 5970B Mass Selective Detector
- Data system : HP 59970 MS ChemStation
- Analyzer : Quardruple mass filter(203 mm)
- Ionization mode : Electron impact
- Ionizing potential : 70 eV
- Column : Fused silica capillary SE-30, 17 m × 0.2 mm × 0.33 μm
- Oven temperature
  - · initial temperature : 140 °C
  - · ramp temperature : 20 °C/min.
  - · final temperature : 300 °C
- Injector temperature : 280 °C
- Transfer line temperature : 300 °C
- Split ratio : 1/10
- Septum purge : 7 m*l*/min.
- Flow rate of carrier gas(He) : 0.89 m*l*/min.

결과 및 고찰

Synephrine과 octopamine은 비교적 극성이 큰 hydroxyl group과 amino group을 가지고 있을 뿐 아니라, 휘발성이 낮아 GC/MS에 대한 감도가 낮고, 크로마토그람상에서 피이크의 꼬리끌림현상이 나타나기 때문에 정량분석에서 오차를 유발할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 이 두 화합

물의 극성을 감소시키고 휘발성을 높이기 위하여 hydroxyl group과 amino group을 여러가지 방법, 즉 silylation, acetylation, 선택적 유도체화반응등의 방법으로 유도체화시켜 각각의 결과를 비교 검토하여 최적유도체화반응조건을 확립하고자 한다.

유도체화 반응

Trimethylsilylation(TMS) : Synephrine과 octopamine의 hydroxyl group과 amino group을 trimethysilylation시키기 위하여 MSTFA와 반응시켰다. 예상되는 synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TMS와 octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TMS은 형성되었지만 반응이 정량적으로 진행되지않았고, 특히 octopamine의 경우에는 primary amino group을 갖고 있어 octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-(TMS)$_2$가 생성되었다. Synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TMS와 octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-(TMS)$_2$의 질량스펙트럼을 Fig. 1에서 살펴보면, m/z = 116와 m/z = 174은 공통적으로 각 유도체의 α-cleavage에 의해서 생성된 iminium ion으로서, 이들은 resonance에 의해서 안정화되어 있으므로 각 유도체의 base peak로 나타나게된다. 그리고 m/z = 267은 benzyl group에 해당하는 공통적인 fragment이고, m/z = 368과 m/z = 426은 각 유도체의 [M$^+$-15]에 해당하는 이온이다. 이와같이 silylation반응은 각 유도체의 mass fragmentation pattern을 연구하는데는 도움이 되지만, GC chromatogram상에서 긴 머무름시간을 가질 뿐 아니라, amino group의 구조에 따라 side product가 생성되기 때문에 실제 시료를 정량분석하는데는 좋은 방법이 되지 못한다.

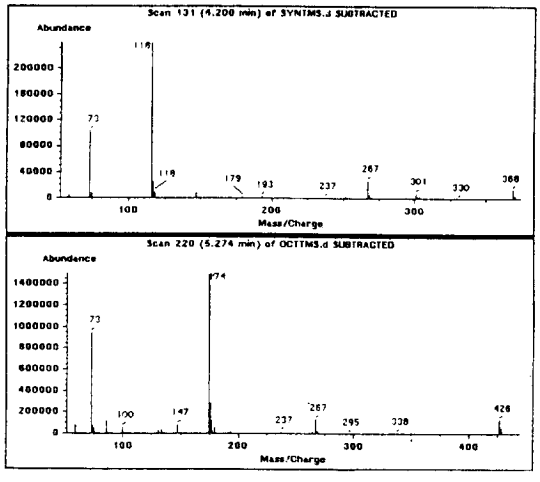


Fig. 1. Mass spectra of synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TMS and octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-(TMS)$_2$.

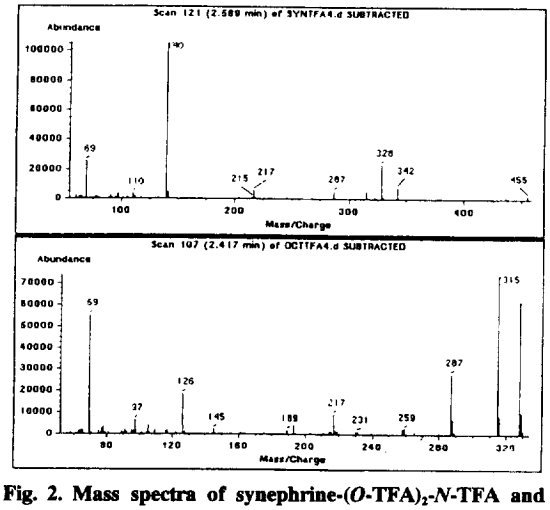


Fig. 2. Mass spectra of synephrine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA and octopamine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA.

Trifluoroacetylation(TFA) : Synephrine과 octopamine을 acetylating agent인 MBTFA와 반응시키면 주생성물로서 synephrine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA와 octopamine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA가 생성된다. 각 유도체의 질량스펙트럼을 Fig. 2에서 살펴보면, synephrine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA의 경우에는 synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TMS와 같이 α-cleavage에 의해서 생성된 iminium ion (m/z = 140)이 질소원자에 있는 CH_3 group의 electron donating에 의해서 resonance effect가 일어나 안정화되기 때문에 base peak로 나타나지만, octopamine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA의 경우에는 primary amino group을 가지고 있기 때문에 synephrine-(*O*-TFA)$_2$-*N*-TFA에서 처럼 electron donating에 의한 resonance effect가 일어나지 않고 benzyl group의 fragment가 base peak(m/z = 315)로 나타난다. 이와같이 trifluoroacetylation은 amino group의 구조에 따라 서로 다른 base peak를 나타내기 때문에 GC/MS-SIM분석을 위하여 두 유도체들의 공통이온을 찾을 수 없을 뿐 아니라, side product가 많아 TMS유도체와 같이 정량분석을 하는데는 좋은 방법이 되지 못한다.

Selective derivatization(*O*-TMS-*N*-TFA) : Synephrine과 octopamine은 앞 절에서 기술한 것 처럼 phenolic hydroxyl 및 benzylic hydroxyl group과 amino group을 동시에 갖고 있는

Phenolalkylamine $\xrightarrow[80\,^{\circ}C.\ 5\ min]{MSFFA}$ Phenolalkylamine-TMS-*N*-TMS-(1)

Phenolalkylamine-*O*-TMS-*N*-TMS $\xrightarrow[80\,^{\circ}C.\ 5\ min]{MBTFA}$ Phenolalkylamine-*O*-TMS-*N*-TFA-(2)

phenolalkylamine류의 화합물로서 silylation반응의 경우 O-Si 결합은 back-bonding에 의해서 비교적 안정한 결합을 하고 있지만 N-Si결합은 비교적 약한 결합을 하고 있기 때문에 강한 acetylating agent인 MBTFA에 의해서 쉽게 치환반응이 일어나서 안정한 *N*-TFA amide유도체를 생성한다.[36]

Synephrine과 octopamine을 반응식 (1)과 (2)에서 처럼 먼저 MSTFA를 사용하여 해당하는 *O*-TMS-*N*-TMS유도체로 만든 후 계속해서 *N*-acetylation에 선택성이 좋은 MBTFA와 반응시키면 synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA와 octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA가 생성되고, 이 반응에서는 Fig. 3과 4의 total ion chromatogram에서 나타난 것 처럼 side product가 없고, 대칭적인 피이크를 얻을 수 있었으며, 또한 resolution도 좋기 때문에 silylation과 acetylayion 반응만에서의 단점을 극복할 수 있었다. 이 유도체의 질량스펙트럼을 살펴보면 α-cleavage에 의해서 생성된 benzyl group의 fragment(m/z = 267)가 공통적으로 base peak로 나타났으며 각 유도체의 [M$^+$-15]도 역시 특징이온으로 나타났다. 그러므로 실제시료는 synephrine과 octopamine의 선택적 유도체들의 공통적인 이온인 m/z = 267을 monitoring ion으로 선택하여 GC/MS-SIM mode에 의해서 분석하였다.

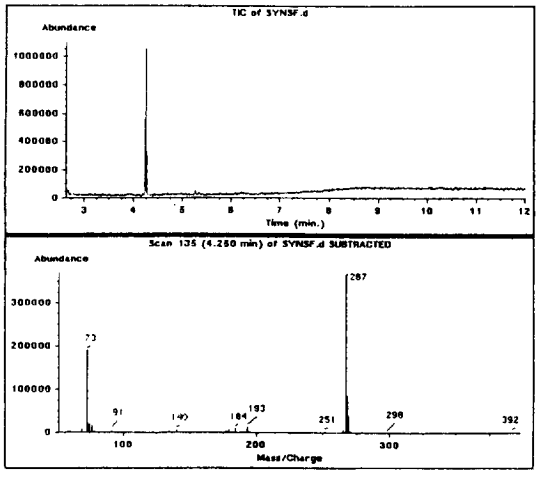


Fig. 3. Total ion chromatogram and mass spectrum of synepyhrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA.

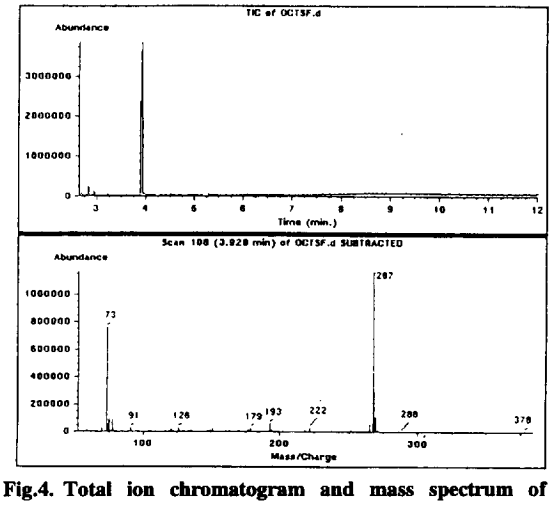


Fig.4. Total ion chromatogram and mass spectrum of octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA.

실제시료의 분석

Citrus fruits으로 제조된 음료수, 그리고 정상인의 소변내에 존재하는 synephrine과 octopamine을 동시에 분석하였다. 선택적으로 유도체화된 synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA와 octopamine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA의 base peak로서 공통적으로 존재하는 m/z = 267과 내부표준물질인 pseudoephedrine-*O*-TMS-*N*-TFA의 특징적인 이온인 m/z = 179를 monitoring ion으로 선택하여 GC/MS-SIM mode로 모든 과일류, 쥬스류 및 소변시료들을 분석하였다.

시료를 정량분석하기 위한 검량선은 과일의 경우 y = 1.53x + 0.009(r = 0.988), 쥬스인 경우에는 y = 1.67x + 0.007(r = 0.994), 그리고 소변의 경우에는 y = 1.88x + 0.003(r = 0.999)로서 직선성이 좋았다. 각각의 시료에서의 검출한계는 GC/MS에서 SCAN mode인 경우 0.2 μg/m*l*이며, SIM mode인 경우에는 0.001 μg/m*l*이다.

Table 1에서는 국내에서 시판되는 과일류들을 분석하여 이미 보고된 분석데이타와 비교하였다. 그 결과를 보면 synephrine은 자몽과 레몬에서는 검출되지 않았지만, 귤과 오렌지에서는 각각 0.78~1.55 μg/g과 0.46~1.88 μg/g이

Table 1. Concentrations of synephrine and octopamine in citrus fruits

Citrus fruits	Concentration(μg/g)			
	Synephrine		Octopamine	
	Domestic	Reported[a]	Domestic	Reported[a]
Tangerine	0.78~1.55	–	<0.001	–
Orange	0.46~1.86	0.016	<0.001	0.160
Grapefruit	<0.001	0.008	<0.001	0.009
Lemon	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

· a : data adoptted from reference 32, 33, and 44.
· limit of detection : 0.001 μg/g.
· mean of 3 determinations (5 samples/citrus fruit).

검출되어 오렌지의 경우에는 0.016 μg/g으로 검출된 외국의 경우[32,33,44]보다 30~100배의 많은 양이 검출되었다. 그러나 octopamine은 외국의 경우[32,33,44]에는 0.008 μg/g의 미량이 검출되었지만 국내에서 수집한 모든 시료에서는 검출되지 않았다.

Table 2에서는 국내산 오렌지 쥬스류를 시중에서 수집하여 분석한 결과를 요약하였고, Fig. 5와 Fig. 6에서는 대표적으로 synephrine이 검출된 D-1와 검출되지 않은 D-7시료의 total ion chromatogram들과 ion chromatogram들을 나타내었다. 외국에서 분석한 시료와 동일한 제품의 오렌지쥬스인 D-1시료에서 검출된 synephrine의 농도는 1.5~3.2 μg/ml로서, 이미 보고[32,33,44]된 외국 제품에서의 농도인 4.8~16.0 μg/ml보다 3~5배 정도의 낮은 농도를 보였다. D-7과 D-8에서 synephrine은 검출되지 않았으며, D-1~D-6에서는 1.2~8.1 μg/ml의 농도로 검출되었다. Octopamine의 경우 외국에서는 0.16 μg/ml의 미량으로 검출되었다는 보고[32,33,44]가 있었지만 국내에서 수집한 쥬스류에서는 전혀 검출되지 않았다.

Table 3에서는 국내에서 시판되는 오렌지쥬스류를 정상인

Table 2. Concentrations of synephrine and octopamine in drinks containing citrus fruits

Citrus fruits	Concentration(μg/ml)			
	Synephrine		Octopamine	
	Domestic	Reported[a]	Domestic	Reported[a]
D-1	1.5-3.2	4.8-16.0	<0.001	0.16
D-2	4.2-8.1	–	<0.001	–
D-3	4.1-7.2	–	<0.001	–
D-4	2.2-5.3	–	<0.001	–
D-5	1.5-3.7	–	<0.001	–
D-6	1.2-5.1	–	<0.001	–
D-7	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
D-8	<0.001	–	<0.001	–

· a : data adoptted from reference 32, 33, and 44.
· limit of detection: 0.001 μg/ml.
· mean of 3 determinations(5 samples/drink).

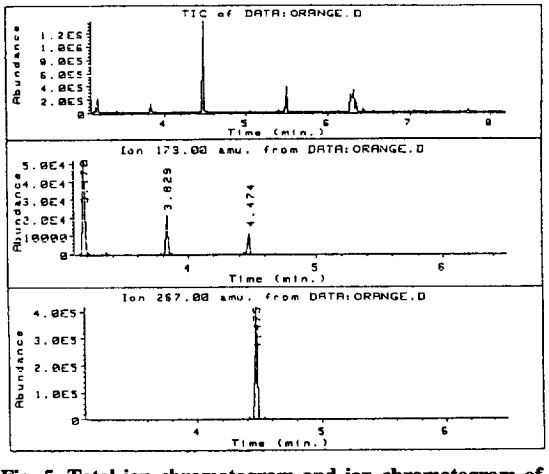


Fig. 5. Total ion chromatogram and ion chromatogram of the derivatized ether extract of the sample D-1.

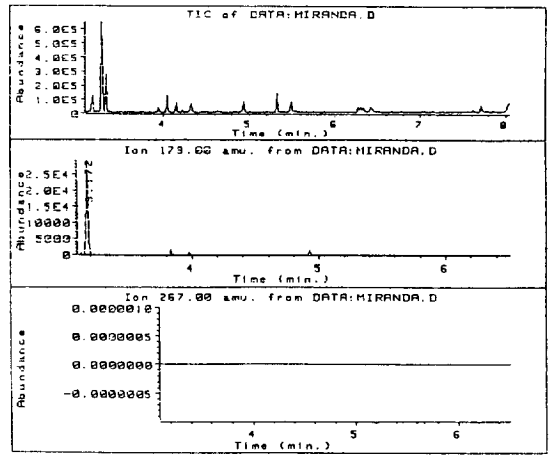


Fig. 6. Total ion chromatogram and ion chromatogram of the derivatized ether extract of the sample D-7.

Table 3. Urinary excretion of synephrine

Excretion (hour)	D-1		D-2		D-3	
	conc. (μg/ml)	amount (μg)	conc. (μg/ml)	amount (μg)	conc. (μg/ml)	amount (μg)
0	<0.001	–	<0.001	–	<0.001	–
3 – 4	0.11	16	0.18	54	0.49	147
5 – 6	0.29	87	0.56	140	0.32	112
7 – 2	0.27	80	0.79	237	0.29	100
13 – 22	0.21	52	0.75	225	0.78	234
23 – 27	0.60	34	0.08	75	0.50	125
28 – 32	0.03	11	0.05	19	0.06	43
33 – 48	<0.001	–	<0.001	–	<0.001	–
Total	28 (11.7%)		750 (12.4%)		761 (14.1%)	

· limit of detection : 0.001 μg/ml
· mean of 3 determinations
· amounts of administration — D-1: 2.4 g, D-2: 6.0 g, D-3: 5.4 g

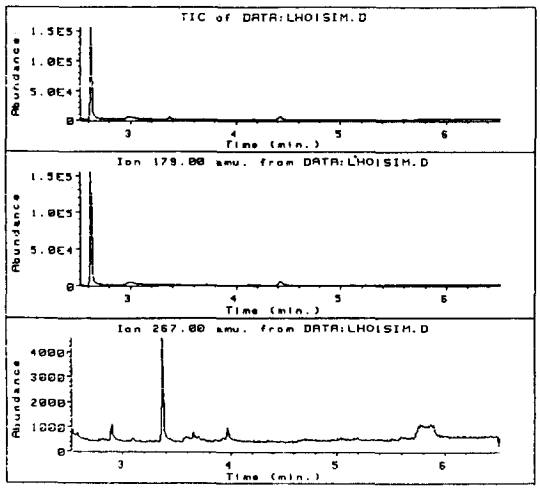


Fig. 7. Total ion chromatogram and ion chromatogram of the blank urinary extract.

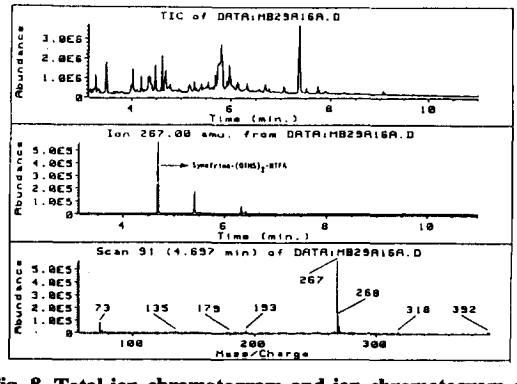


Fig. 8. Total ion chromatogram and ion chromatogram of the derivatized urinary extract of a volunteer who has taken 5 cans of the sample D-1 and mass spectrum of synephrine-(*O*-TMS)$_2$-*N*-TFA.

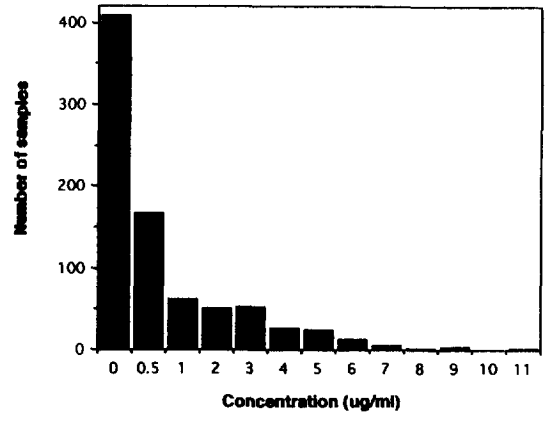


Fig. 9. Distribution of synephrine-detected samples vs concentration.

이 섭취한 후 소변으로 배설되는 synephrine을 분석한 결과를 요약하였고, Fig. 7와 Fig. 8에서는 synephrine이 검출되지 않은 뇨시료와 검출된 뇨시료에 대한 각각의 크로마토그람과 질량스펙트럼을 나타내었다. D-1과 D-2의 경우 복용한 후 8~12시간에서, 그리고 D-3의 경우 12~22시간에서 가장 많은 양이 배설되었고, 48시간 동안 소변으로 배설된 synephrine의 양은 복용한 전체량의 11~14%를 나타내었다. 그러나 octopamine은 모든 소변시료에서 검출되지 않았다.

Fig. 9에서는 1989년 8월에서 1990년 1월사이에 접수된 816개 소변시료에서 농도별로 synephrine이 검출된 시료들의 분포도를 나타낸 것이다. Synephrine이 검출되지않은 시료가 408개(50%)로 가장 많았고, 0.0~0.5 μg/m*l*이하로 검출된 시료는 167개(20%), 1~5 μg/m*l*으로 검출된 시료는 216개(26%)로서 대부분의 시료가 5 μg/m*l*이하로 검출되었다. 예상외로 7-10 μg/m*l*의 많은 양이 검출된 시료는 12개(1%)로서 이와 같은 많은 양이 어디서 유래되었는지는 앞으로 좀더 깊은 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

국문요약

Synephrine이나 octopamine과 같은 phenolalkylamine류의 화합물을 GC/MS로 분석하기 위하여 비교적 극성이 큰 hydroxyl기와 amino기를 선택적으로 phenolalkylamine-*O*-TMS-*N*-TFA로 유도체화시킬 수 있는 방법을 확립하였다. Synephrine과 octopamine의 선택적유도체의 공통질량이온인 m/z=267을 monitoring ion으로 하여 GC/MS-SIM mode로 citrus fruit와 citrus fruit을 포함하는 드링크류를 분석한 결과, synephrine의 경우 citrus fruit에서는 0.46~1.88 μg/g, 드링크류에서는 1.2~8.1 μg/m*l*이 검출되었지만 octopamine의 경우에는 모든 시료에서 검출되지 않았다. 그리고 드링크류를 섭취한 정상인의 urinary excretion은 synephrine의 경우 8~20시간에 가장 많은 양이 배설되었고, 48시간동안 소변으로 배설된 양은 복용한 양의 11~14%를 나타내었다.

참고문헌

1. H. Legerlotz: β-Alkylamino compounds of hydroxyphenylethanols, *U. S. Patent* 1,932,347(1933).
2. P. G. Stecher, M. J. Finkel, O. H. Siegmund. and B. M. Szafranski (Editors), *The Merck Index of Chemicals and Drugs*, Ed. 7, Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., p541(1960).
3. V. A. Drill, *Pharmacology in Medicine*, McGraw-Hill Book Co., New York, p26/128(1954).
4. U. Sankawa: Pharmacology, chemistry and biochemistry of "Chin- pi", *J. Trad. Sino-Jap. Med.*, **5**, 52(1984).
5. Ivan Stewart, William F. Newhall, Gorge S. Edwards: The isolation and identification of l-synephrine in leaves and fruit of citrus, *J. Biol. Chem.*, **239**, 930- 932(1964).
6. Ivan Stewart and T. A. Wheaton: *l*-Octopamine in citrus: isolation and identification, Science, **145**, 60-61(1964).
7. I. Stewart: An ephedra alkaloid in citrus juices, Proc. *Florida State Hort. Soc.*, **76**, 242-245(1963).
8. H. J. Weber and L. D. Batchelor, *Citrus Industry(University of Calfornia Press, Berkely)*, **1**, 400(1948).
9. D. A. Durden, A. V. Juorio, and B. A. Davis: Thin-layer chromatographic and high resolution mass spectrometric determination of β-hydroxyphenyle-thylamines in tissues as dansyl-acetyl derivatives, *Anal. Chem.*, **52**, 1815-1820(1980).
10 K. Miyamota and T. Furukawa: Blood pressure regulating mechanism and sulfur-containing amino acids, . *Med. Pharm. Soc.* Wakan-Yaku, **5**, 462(1988).
11. T. Kinoshita, M. Sameshima, and U. Sankawa: Isolation of a sympathomimetic substance from Chinese medicinal drugs originated from Citrus species, *Shoyakugaku Zasshi*, **33**, 146 (1979).
12. T. Namba, I. Araki, M. Mikage, and M. Hattori: Fundamental studies on the evaluation of crude drugs. VIII. Monthly variations in anatomical characteristics and chemical components of the dried fruit peels of *Citrus unshiu C. aurantium and C. natsu daidai, Shoyakugaku Zasshi*, **39**, 52(1985).
13. Kohko Hashmoto, Takaaki Yasuda, and Keisuke Ohsawa: Determination of synephrine from Chinese medicinal drugs originating from Citrus species by ion-pair high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **623**, 386-389(1992).
14. K. Hosoda, M. Noguchi, T. Kanaya, and M. Higuchi: Studies on the preparation and evaluation of Kijitsu, the immature citrus fruits. III. Relation between diameter of Kijitsu and synephrine content, *Yakugaku Zasshi*, **110**, 82-84(1990).
15. V. Erspamer and G. Boretti: Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine, and allied substances in extracts of postenor salivary glands of Octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates, *Arch. Int. Pharmacodynamie*, **88**, 296-332(1951).
16. V. Erspamer: Enteramine and 5-methoxytryptamine, *Nature (London)*, **169**, 375(1952).
17. John J. Pisano, John A. Oates, Jr., Artheur Karmen, Albert Sjoerdsma, and Sidney Udeneriend: Identification of *p*-hydroxy-(methylaminomethyl) benzyl alcohol (synephrine) in human urine, *J. Biol. Chem.*, **236**(3), 898-901(1961).
18. Yasuo Kamimoto and Marvin D. Armstrong: The phenolic amines of human urine, *J. Biol. Chem.*, **237**, 208-214(1962).
19. J. J. Pisano: A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine, Clin. *Chim. Acta.*, **5**, 406(1960).
20. Y. Kamimoto and M. D. Armstrong, *Federation Proc.*, **19**, 295 (1960).
21. T. J. Danielson, A. A. Boulton, and H. A. Robertson: m-Octopamine, p-octopamine, and phenylethanolamine in rat brain: a sensitive, specific assay and the effects of some drugs, *J. Neurochem.*, **29**, 1131-1135(1977).
22. Perry Molinof and Julius Axelrod: Octopamine: Normal occurrence in sympathetic nerves of rats, *Science*, **164**, 428-429 (1969).
23. Yasuo Kamimoto and Marvin S. Armstrong: On the identification of octopamine in mammals, *J. Biol. Chem.*, **237**, 422-426(1962).
24. M. Ishimoto, S. Mizushima, S. Minakami, T. Oshima, and H. Wada, "Metabolic Maps", p 42-43, 2nd Ed., Kyoritsu Publishing Company Ltd., Tokyo. 1973.
25. Alan A. Boulton and P. H. Wu: Biosynthesis of cerebral phenolic amines. I. *In vivo* formation of *p*-tyramine, octopamine, and synephrine, *Canadian J. Biochem.*, **50**, 261-267(1972).
26. Kamal E. Ibraham, Margart W. Couch, and Clyde M. Williams: Quantitative measurement of octopamine and synephrine in urine using capillary column gas chromatography negative chemical ionization mass spectromrtry, *Anal. Chem.*, **56**, 1695-1699(1984).
27. I. Stewart: Determination of ornithine, lysine, arginine, ci-

trulline, and histidine, *J. Chromatogr.*, **10**, 404(1963).

28. Z. Hongjun, L. Yuanfeng, and Z. Yuanyao, *Zhongcaoyao*, **14**, 200 (1983).
29. R. G. H. Downer and R. I. Martin: Analysis of monoamines and their metabolites by high performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection, *Life Sci.*, **41**, 833-836 (1987).
30. M. I. James, J. M. Midgley, and C. M. Williams: The metabolism and biosythesis of (±)-*o*-octopamine and (±)-*o*-synephrine in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 559-565(1983).
31 H. A. Robertson, J. C. David, and T. J. Danielson: Effects of denervation on the levels of *p*-octopamine, *m*-octopamine (norphenylephrine), and phenylethanolamine in rat salivary gland, *J. Neurochem.*, **29**, 1137-1139(1977).
32. C. M. Williams and M. W. Couch: Identification of *ortho*-octopamine and *meta*-octopamine in mammalian adrenal and salivary gland, *Life Sci.*, **22**, 2113-2120(1978).
33. J, M. Midgley, M. W. Couch, J. R. Crowley, and C. M. Williams: *m*-Synephrine: normal occurrence in adrenal gland, *J. Neurochem.*, **34**, 1225-1230(1980).
34. G. P. Cartoni, M. Ciardi, A. Giarusso, and F. Rosati: Detection of phenolalkylamines by capillary column gas chromatography- negative chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **330**, 315-321(1985).
35. N. Shafi, J. M. Midglay, D. G. Watson, R. Strang, and R. G. Macfarlane: Analysis of biogenic amines in the brain of the American cockroach(*Periplaneta americana*) by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **490**, 9-19(1989).
36. D. R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatzation Reactions*, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York (1979).