

膠囊錠狀食品中辛弗林檢驗方法研究

侯嘉華 吳白玟 蔡瑩潔 林汝青 廖家鼎 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

辛弗林(synephrine)是一種生物鹼，天然存在於柑橘類植物，尤其在苦橙(bitter orange, *Citrus aurantium*)中為主要且具活性之物質。辛弗林因結構與被禁用之麻黃素類似，故取而代之並常用於減肥及增強運動表現的膳食補充品。衛生福利部針對苦橙中辛弗林於102年訂有食用限量，爰擬建立膠囊錠狀食品中辛弗林之檢驗方法，以供各界參考。本研究將均質樣品添加去離子水以超音波振盪萃取後，以超高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器進行分析，採用分析管柱為Pursuit 5 PFP (4.6 × 150 mm, 5 μm)，定量波長為220 nm。於自製類似膠囊基質之空白樣品中分別添加p-辛弗林(*p*-synephrine)及m-辛弗林(*m*-synephrine)各5、25及50 mg/100 g進行確效試驗，結果顯示*p*-辛弗林及*m*-辛弗林之同日間回收率範圍分別為90.6 - 103.8%及88.5 - 103.0%，變異係數範圍分別為0.40 - 3.77%及1.27 - 6.41%，異日間回收率範圍分別為92.7 - 101.3%及89.5 - 98.7%，變異係數分別為1.43 - 3.57%及1.63 - 6.51%，符合食品藥物管理署食品化學檢驗方法之確效規範要求。繼而檢測網路販售商品計10件，*p*-辛弗林檢測範圍為低於定量極限至6487 mg/100 g，*m*-辛弗林檢測範圍為低於定量極限至164 mg/100 g，有3件產品之建議攝食量超過衛生福利部公告之每日食用限量，其中超量最高者達約5倍，顯示此類產品需加強查察其攝取量是否符合現行規範，不合格產品均已移請相關權責單位進行後續查處，以維護國人健康。

關鍵詞：辛弗林、苦橙、每日食用限量

前 言

p-辛弗林是柑橘類植物之特有成分、最具活性的腎上腺素生物鹼(adrenergic alkaloid)，同時也是一種擬交感神經胺(sympathomimetic amine)，具興奮腎上腺素受體之作用⁽¹⁾。Jame等人提到依辛弗林結構推測可能有3種異構物，且有不同代謝途徑及效果⁽²⁾，2017年荷蘭國家公共衛生及環境研究院(National Institute for Public Health and the Environment, RIVM)針對辛弗林之風險評估報告中亦提及，辛弗林

除苯環上的氫氧基位置不同有*para* (*p*-)、*meta* (*m*-)及*ortho* (*o*-)之異構物外，分別各存在2種旋光異構物(optical isomer，亦稱鏡像異構物)⁽³⁾。柑橘屬果實存在*p*-辛弗林或*m*-辛弗林，其中最被廣泛研究的是苦橙(bitter orange, *Citrus aurantium*)品種。鮮有文獻探討*o*-辛弗林，亦缺乏研究指出該物質存在於苦橙⁽⁴⁻⁷⁾。

歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)曾提及膳食補充品使用苦橙做為原料，若其含有*p*-辛弗林或*m*-辛弗林，則有攬假(adulteration)疑慮⁽⁸⁾。美國植物委員

會(American Botanical Council, ABC)於2005年亦提到苦橙只含

-辛弗林，不含m-辛弗林，食用苦橙會提升血壓及心跳速率，增加心血管的風險，係因含有m-辛弗林所導致⁽⁹⁾。然而Roman等人以購自美國國家標準與技術研究所(National Institute of Standard and Technology, NIST)的冷凍乾燥苦橙粉末及苦橙果肉萃取粉末、美國進口商Nuratech的乾燥未成熟苦橙全果粉末及苦橙萃取粉末(含30%辛弗林)，及其他市售產品進行實驗，其結果顯示，無論是果實經乾燥後製成之粉末、萃取粉末，或是市售錠狀及膠囊狀等產品均檢出m-辛弗林，惟其含量均低於定量極限(Limit of quantitation, LOQ) 600 ppm⁽¹⁰⁾。Santana等人彙整資料顯示⁽⁶⁾，含苦橙之膳食補充品中辛弗林存在型式包括僅含有

-辛弗林^(11,12)，m-辛弗林^(13,14)，或同時存在

-辛弗林及m-辛弗林^(4,5)。

苦橙常被聯想為減重產品，主要是其含有成分辛弗林之結構與被禁用之麻黃素(ephedrine)類似^(15,16)，為交感性腎上腺素劑(sympathetic adrenergic agonist)，可刺激α及β腎上腺素受體(adrenoreceptors)分別引起血管收縮(Vasoconstriction)及血管擴張(Vasodilation)作用^(17,18)。辛弗林與咖啡因形成之加成作用，阻斷人體中抑制體內過度分解脂肪作的回饋機制⁽¹⁹⁻²¹⁾。

衛生福利部於102年10月16日以部授食字第1021350767號公告對使用原料「苦橙(*Citrus aurantium L.*)」之有容器或包裝食品之規範，包括兒童、孕婦、哺餵母乳者、老年人及具心血管疾病者不宜使用，不得與咖啡因產品同時食用，及服用藥物者，在使用前須先諮詢醫療人員等標示外，添加苦橙之產品，苦橙所含成分「synephrine」濃度為6%以下，每日食用限量20 mg以下⁽²²⁾。針對此項規範，爰擬建立食品中辛弗林之檢驗方法，以供各界參考。

近年來，國際間分析辛弗林之檢驗方法以逆相高效液相層析法較為常見，搭配使用的檢

出器有紫外光(Ultraviolet)⁽¹⁰⁾、光二極體陣列(Photodiode array)及質譜儀(Mass spectrometer)^(6,23)等。本研究參考多篇文獻，更秉持以快速、簡單、便宜、有效及安全之精神進行檢驗方法開發，以供各界參考使用。

材料與方法

一、樣品

網購標示含苦橙之產品共計10件，其原產地均為臺灣。除序號S-003係桃園市政府衛生局送驗且購自「蝦皮購物」外，其餘均由食品藥物管理署購自「yahoo!奇摩超級商城」，產品類別為膠囊狀或錠狀食品。

二、試驗藥品

(一)試藥及溶劑

甲醇(methanol)及乙腈(acetonitrile)均採用高效液相層析級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。磷酸(phosphoric acid, 85%)、硼酸(boric acid)、氫氧化鉀(potassium hydroxide)、己烷磺酸鈉(sodium 1-hexanesulfonate)、甲酸(formic acid)及醋酸銨(ammonium acetate)均採用試藥級，購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)。去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ · cm以上)。

(二)對照用標準品

p-辛弗林(*p*-synephrine, (\pm)-synephrine, CAS NO. 94-07-5, 純度99%)及*m*-辛弗林(*m*-synephrine, (R)-(-)-phenylephrine, CAS NO. 59-42-7, 純度100%)對照用標準品，均購自美國Sigma-Aldrich公司。

三、儀器與設備

(一)旋渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)

- (二)超音波振盪器(Delta Sonicator DC300H，力明儀器有限公司，Taiwan)
- (三)去離子水製造機(Millipole Milli-Q SP Advantage A10 System，Millipore，USA)
- (四)離心機(Allegra 25R Centrifuge，Beckman Coulter，Taiwan)。
- (五)高效液相層析儀
1. 輸液系統(Acquity UPLC® H-class，Quaternary Solvent Manager，Waters，USA)
 2. 自動進樣器(Acquity UPLC® H-class，Sample Manager-FTN，Waters，USA)
 3. 層析管柱控溫器(Acquity UPLC® Column Manager，Waters，USA)
 4. 光二極體陣列檢出器(Acquity UPLC® PDA e λ Detector，Waters，USA)
 5. 層析管柱
 - (1)Poroshell HPH-C18，2.7 μm，內徑3.0 × 100 mm (Agilent，USA)
 - (2)Pursuit 5 PFP，5 μm，內徑4.6 × 150 mm (Agilent，USA)
 6. 儀器控制軟體(Empower™ 3，Waters，USA)

四、溶劑之調製

- (一)0.5 M氫氧化鉀溶液：稱取氫氧化鉀7 g，以去離子水溶解使成25 mL。
- (二)10%甲醇溶液：取甲醇10 mL，加去離子水使成100 mL。
- (三)20 mM硼酸溶液：稱取硼酸1.2 g，以去離子水溶解使成1,000 mL，以0.5 M氫氧化鉀溶液調整pH值至8.2 ± 0.05。
- (四)0.1%磷酸溶液：取85%磷酸1.18 mL，加去離子水使成1,000 mL。
- (五)20%乙腈硼酸溶液：取乙腈200 mL，加20 mM硼酸溶液使成1,000 mL。
- (六)移動相溶液A：稱取醋酸銨0.77 g，以去離子水溶解使成1,000 mL，經濾膜過濾，

取濾液供作移動相溶液E。

- (七)移動相溶液B：稱取醋酸銨0.77 g，以甲醇溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液F。

五、標準溶液之配製

取p-辛弗林及m-辛弗林對照用標準品各約25 mg，精確稱定，分別以10%甲醇溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷藏避光儲存^(註)。臨用時，取適量各標準原液混合，以去離子水稀釋至1 - 50 μg/mL，供作標準溶液(儲存期限為1週)。

六、檢液之調製

將樣品研磨混勻後，取約1 g，精確稱定，加入去離子水20 mL，超音波振盪30分鐘，於10°C以5000 × g離心5分鐘，收集上清液。殘渣加入去離子水20 mL，重複上述步驟萃取1次，合併上清液，以去離子水定容至50 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

七、高效液相層析儀分析條件

- (一)以移動相溶液A液與B液之比例進行梯度分析(表一)。
1. 流速：0.5 mL/min
 2. 層析管柱：Pursuit 5 PFP，5 μm，內徑4.6 × 150 mm
 3. 光二極體陣列檢出器：定量波長220 nm
- (二)層析管溫度：35°C
- (三)樣品槽溫度：10°C

表一、移動相溶液A液與B液之分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 10	90 → 80	10 → 20
10.0 → 10.1	80 → 10	20 → 90
10.1 → 15	10 → 10	90 → 90
15.0 → 15.1	10 → 90	90 → 10
15.1 → 20	90 → 90	10 → 10

(四)樣品注入量：10 μL

八、鑑別試驗與含量測定

精確量取檢液及標準溶液各10 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出樣品中辛弗林之含量(mg/100 g)：

樣品中辛弗林之含量(mg/100 g) =

$$\frac{\Sigma C \times V \times F}{M \times 10}$$

C : 由標準曲線求得檢液中p-辛弗林或m-辛弗林之濃度(μg/mL)

V : 樣品最後定容之體積(mL)

M : 取樣分析樣品之重量(g)

F : 稀釋倍數

九、確效試驗⁽²⁴⁾

(一)專一性試驗

自行配製類似樣品基質之空白樣品，以標準品、添加及不添加標準品之空白樣品分別進行分析比對，確認空白樣品無待測物。前述基質與錠狀及膠囊狀類似，其配方比例如表二。

(二)標準曲線

至少包括5種不同濃度，線性回歸方程式之相關係數不低於0.99，且檢液中待測物濃度均在標準曲線之線性範圍內。為避免低濃度之偏差，進行低濃度添加回收試驗

表二、空白樣品配方

成分名稱	重量(g)	百分比(%)
玉米澱粉	64	32
澱粉	64	32
乳糖	64	32
硬脂酸鎂	4	2
二氧化矽	4	2

時，使用加權線性回歸($1/x$)進行校正，以提高低濃度數值之準確性。

(三)準確度及精密度

1. 將適量之待測物標準品添加於類似樣品基質之空白樣品中，計算其回收率(%)。添加量包括定量極限及定量極限5與10倍等3種濃度，依檢驗方法分析步驟，各進行5重複之檢測。

2. 樣品所含待測物之濃度及其回收率(%)應符合表三規範。

3. 精密度之評估包括重複性及中間精密度。將適量之待測物標準品添加於類似樣品基質之空白樣品中，進行5重複之檢測。添加量包括定量極限及定量極限5與10倍等3種濃度，依檢驗方法分析步驟，各進行5重複之檢測。

(1)重複性係以同一人員於同一批次執行檢驗方法，所得結果進行評估。

(2)中間精密度係以同一人員於3日不同日期，所得結果進行評估。

4. 樣品所含待測物之濃度及其變異係數(CV, %)應符合表四規範。

(四)定量極限

1. 訊號與雜訊比(Signal-to-noise ratio, S/N ratio)，含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析途中待測物波峰之訊號/雜訊比 ≥ 10 。

2. 評估含有已知量待測物之低濃度樣品，

表三、待測物濃度與回收率規定

濃度範圍(ppm)	回收率(%)
≥ 100	85 - 110
$> 10 - 100$	80 - 115
$> 1 - 10$	75 - 120
$> 0.1 - 1$	70 - 120
$> 0.01 - 0.1$	70 - 120
$> 0.001 - 0.01$	60 - 125
≤ 0.001	50 - 125

表四、待測物濃度與變異係數規定

濃度範圍(ppm)	變異係數(CV, %)	
	重複性	中間精密度
≥ 1	10	14
> 0.1 - 1	15	18
> 0.01 - 0.1	20	22
> 0.001 - 0.01	30	32
≤ 0.001	35	36

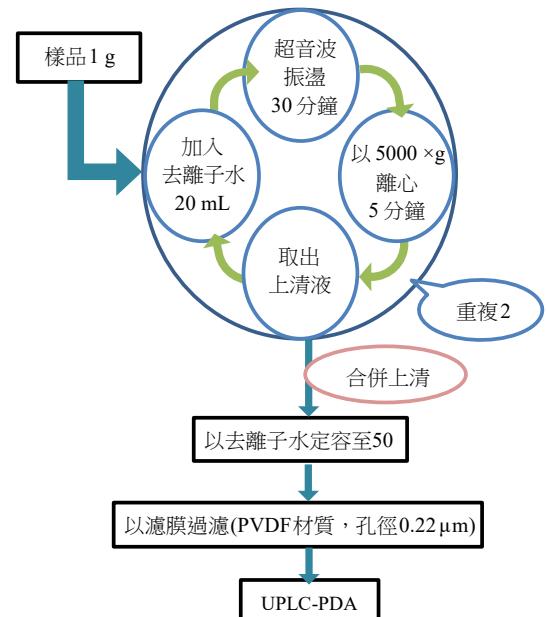
其回收率及重複性符合要求。

結果與討論

一、最適條件探討

(一)前處理步驟

本研究所使用方法主要參考 Santana 等人方法⁽⁶⁾，同樣選擇汙染程度較低的水做為萃取溶劑，超音波萃取時間為30分鐘，共計萃取2次，取樣量提升為1 g，以減少含多種萃取物之檢體取樣不均狀況。定容體積與樣品重量比先採最低比值(50 mL : 1 g)、增加轉速且縮減離心時間($5000 \times g$ 離心5分鐘)，詳如材料與方法第七節所述，



圖一、檢液調製流程

檢液調製流程圖如圖一。以此條件進行準確度及精密度試驗，發現均能符合確效規範要求(表五)。

(二)層析條件

參考綜合多篇文獻之層析條件^(6,10,23)，並

表五、辛弗林於同日間及異日間之回收率、變異係數及訊號與雜訊比

添加量 (mg/100 g)	同日間 ^a						異日間 ^b		訊號與雜 訊比
	第一日		第二日		第三日		回收率	變異係數	
	回收率 (%)	變異係數 (%)	回收率 (%)	變異係數 (%)	回收率 (%)	變異係數 (%)	(%)	(%)	
<i>p</i> -辛弗林									
5	98.9	3.47	103.8	3.77	101.3	2.03	101.3	3.57	29.0
25	92.2	0.40	94.8	0.57	94.7	0.90	93.9	1.43	
50	90.6	1.04	93.6	0.52	93.9	0.81	92.7	1.81	
<i>m</i> -辛弗林									
5	97.1	6.41	103.0	6.02	96.1	5.96	98.7	6.51	12.5
25	91.3	1.44	90.9	1.50	92.6	1.64	91.6	1.63	
50	88.5	1.38	89.3	1.53	90.7	1.27	89.5	1.67	

^a n = 5

^b n = 15

經多次試驗，最後以研究方法第八(一)節所述條件進行層析，結果顯示分離效果相當良好(圖二)。進一步以網購樣品編號S-008進行測試，發現大部份雜質滯留時間在3 - 4分鐘，*p*-辛弗林約在7分鐘出峰，*m*-辛弗林則約在8.5分鐘出峰，亦呈現良好分離且近無干擾狀況(圖二)，後續以此條件進行確效試驗及檢測其餘網購樣品。

二、專一性

經檢閱樣品標示之成分，參考膠錠食品中常見基質及估詢比例範圍，採材料與方法第十(一)節所列配方調製空白樣品。依材料與方法第七節所述取得之檢液，進行專一性試驗。結果顯示*p*-辛弗林及*m*-辛弗林波峰無其他干擾物質(圖二)。食品業者所製之市售樣品常添加多種植物萃取物或其他機能性成分，倘出現應加以確認或排除干擾狀況，可以全波長光譜圖、質譜儀或串聯式質譜儀進行確認，再加以定量分析。

三、標準曲線

以UPLC-PDA檢測*p*-辛弗林及*m*-辛弗林之混合標準溶液，所得層析圖譜及全波長圖譜資料如圖三所示。*p*-辛弗林及*m*-辛弗林於濃度1 - 50 µg/mL對應製作而成之標準曲線，其決定係數(Coefficient of determination, R²)分別為0.9999及0.9998，顯示*p*-辛弗林及*m*-辛弗林於此濃度範圍內均能呈現良好線性關係。

四、準確度及精密度

取空白樣品1 g，加入3種濃度之混合標準溶液，均勻混合並靜置30分鐘，使其濃度分別為5、25及50 mg/100 g，依材料與方法第七節所述進行萃取，供作檢液，各進行五重複及三天連續試驗，並同時進行空白試驗。*p*-辛弗林及*m*-辛弗林之同日間回收率分別介於90.6 -

103.8%及88.5 - 103.0%之間，變異係數則分別介於0.40 - 3.77%及1.27 - 6.41%之間；異日間回收率分別介於92.7 - 101.3%及89.5 - 98.7%之間，變異係數則分別介於1.43 - 3.57%及1.63 - 6.51%之間(表五)，均符合確效規範要求。

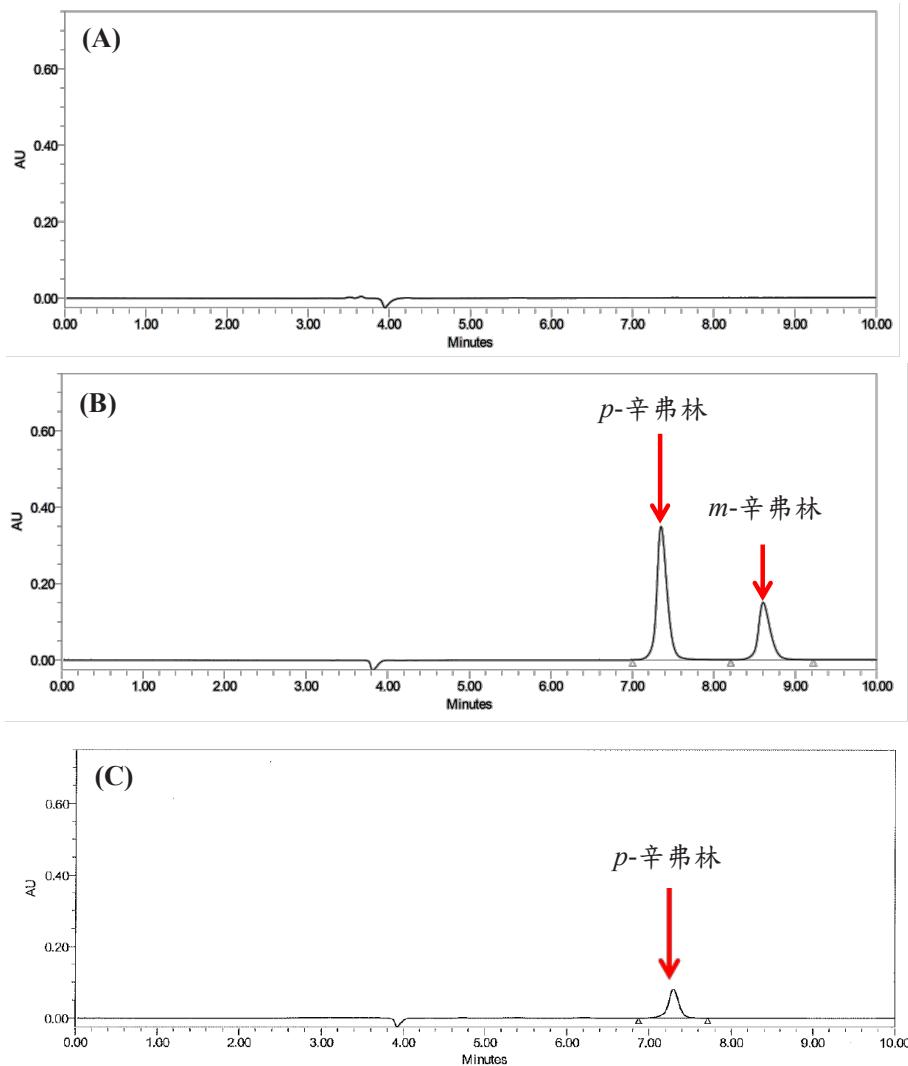
五、定量極限

取空白樣品1 g，加入不同濃度之混合標準溶液，均勻混合並靜置30分鐘，依材料與方法第七節所述進行萃取，供作檢液，分別注入高效液相層析儀，就所得波峰之訊號強度計算其訊號與雜訊比值(S/N)，以S/N大於或等於10之最低濃度做為檢驗方法之定量極限。結果顯示*p*-辛弗林及*m*-辛弗林於樣品濃度為5 mg/100 g時，其S/N分別為29.0及12.5，且回收率及重複性如表五所示，均符合材料與方法第十四節進行定量極限評估要求，故將定量極限訂為5 mg/100 g。

六、小型網購產品辛弗林含量檢測結果

本研究供檢測標示含苦橙之膠囊狀食品9件及錠狀食品1件，共計10件產品，樣品編號為S-001至S-010。樣品均執行三重複試驗，且依材料與方法第七節所述進行萃取，以供作檢液。檢驗結果未能符合法規規範者，由另一名檢驗人員進行複驗確認。

樣品檢測結果如表六所示，食品業者針對自家產品之建議攝食量超過衛生福利部公告之每日食用限量者計有3件，分別為樣品編號S-008、S-009及S-010，其中超量最嚴重者為樣品編號S-008，該產品*p*-辛弗林檢測值為6487 mg/100 g，以其產品重量每粒428 mg及建議每日攝取量1 - 4粒計算，且若僅計算*p*-辛弗林含量，其每日攝取量範圍為28 - 111 mg，最高超量值約為每日食用限量(20 mg)之5倍多。依本研究結果顯示，食品業者應於生產此類產品時，除需配合相關標示規定外，可參考本檢



圖二、*p*-辛弗林、*m*-辛弗林對照用標準品濃度及樣品之高效液相層析圖譜

註：(A)空白樣品，(B)*p*-辛弗林及*m*-辛弗林對照用標準品濃度為50 $\mu\text{g/mL}$ 及(C)網購樣品編號S-008濃度稀釋100倍之高效液相層析圖

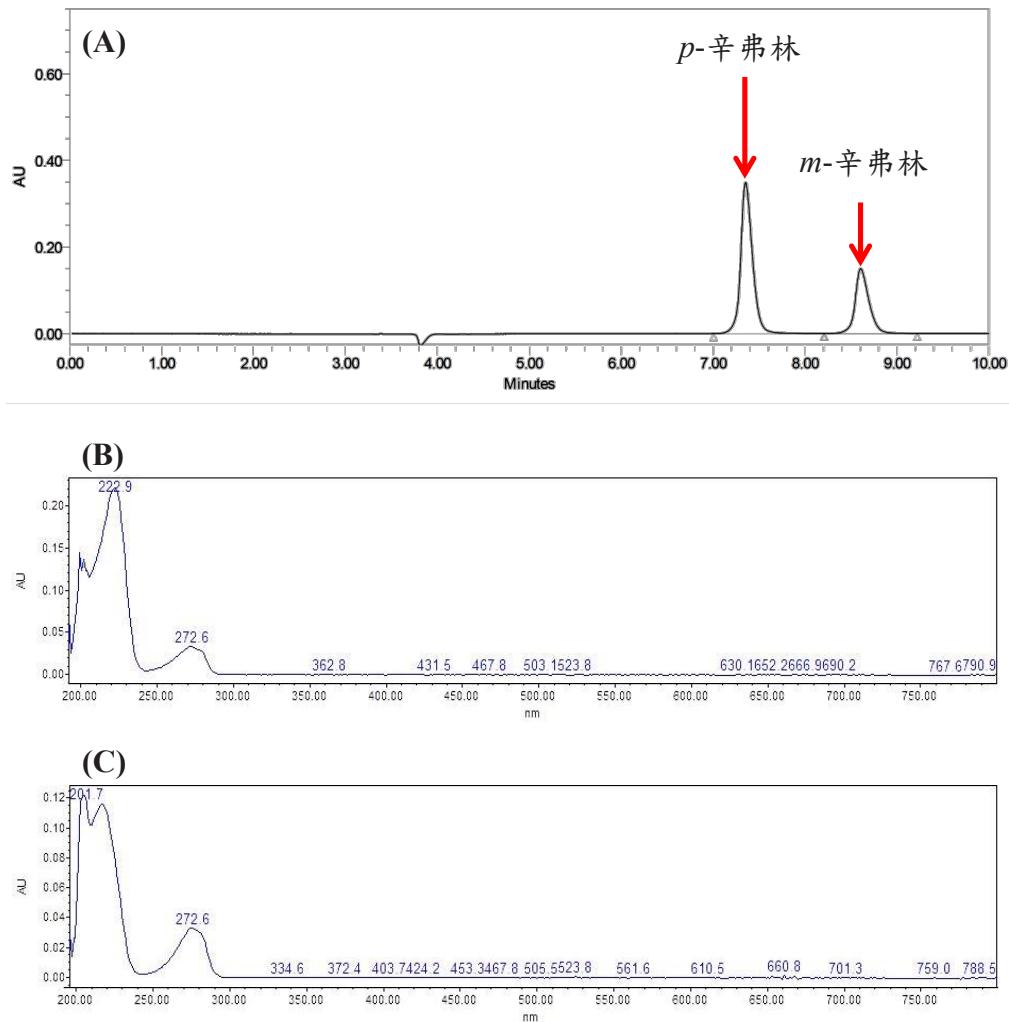
驗方法進行該成分含量檢測，實施自主管理，評估其攝取量是否符合衛生福利部現行規範，而政府單位亦應加強查察此類產品，以維護及保障國人健康。前述不合格產品檢測結果均已轉予衛生相關權責單位進行後續查處。

另，於檢測過程中，發現樣品編號S-004

無法順利離心分層，主要係因為該產品成分添加許多膠類物質，造成凝膠現象產生，故將該樣品取樣量調整至0.2 g即改善凝膠困擾。

檢視產品包裝標示時，亦發現部份業者疑有未符合衛生福利部公告要求之警語。

對於*p*-辛弗林含量高可能產生萃取不完



圖三、*p*-辛弗林及*m*-辛弗林對照用標準品圖譜

註：(A) *p*-辛弗林及*m*-辛弗林對照用標準品濃度為50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之高效液相層析圖、(B) *p*-辛弗林全波長光譜圖及(C)*m*-辛弗林全波長光譜圖

全之疑慮，以本次檢測樣品所含*p*-辛弗林濃度最高者之樣品編號S-008，連續進行5次萃取試驗，收集定容供作5份檢液，以研究方法第八(五)節所述條件進行層析，前述試驗重複2次，結果顯示*p*-辛弗林及*m*-辛弗林於第1次及第2次萃取液合併計算後，樣品濃度已達總值99.5%以上(表七)，即樣品殘留狀況已相當低微，故

最終仍以萃取2次做為前處理條件。

結 論

本研究建立之食品中辛弗林檢驗方法，結果符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，適用於食品中辛弗林之檢驗，可作為監

表六、網購食品辛弗林含量檢測結果

樣品 編號	包裝	食用方式	檢測結果		
			平均內容物重量 (mg/100 g)	p-辛弗林含量 (mg/100 g)	m-辛弗林含量 (mg/100 g)
S-001	90顆/瓶，600 mg/顆	每日1顆	486 mg/顆	2,225	27
S-002	90粒/盒，600 mg/粒	每日3粒	496 mg/粒	8	N.D.
S-003	60顆/瓶，515 mg/顆	每日2次，每次1顆	519 mg/顆	1,418	N.D.
S-004	30顆/盒，540 mg/顆	每日1-2次，每次1顆	450 mg/顆	N.D.	N.D.
S-005	60顆/盒，505 mg/顆	每日1次，每次2-3顆	458 mg/顆	1187	164
S-006	20粒/盒，500 mg/粒	每日2粒	452 mg/粒	21	N.D.
S-007	60顆/瓶，600 mg/顆	每日1-2顆	877 mg/顆	14	N.D.
S-008	60粒/瓶，400 mg/粒	每日1-2次，每次1-2粒	428 mg/粒	6,487	125
S-009	60粒/盒，550 mg/粒	每日2次，每次1粒	496 mg/粒	2,869	69
S-010	90顆/瓶，700 mg/顆	每日3次，每次1顆	526 mg/顆	1,498	N.D.

表七、樣品編號S-008中辛弗林經連續5次萃取之檢測結果

檢測次數	p-辛弗林			m-辛弗林		
	樣品濃度 (mg/100 g)	樣品含量百分比 (%)	相對差異 百分比 (%)	樣品濃度 (mg/100 g)	樣品含量百分比 (%)	相對差異 百分比 (%)
RE1	6,202	96.08	0.15	143	100	0.0
RE2	237	3.67	3.68	N.D.	-	-
RE3	16	0.25	3.49	N.D.	-	-
RE4	N.D.	-	-	N.D.	-	-
RE5	N.D.	-	-	N.D.	-	-

測保健食品品質之參考。

參考文獻

- Wheaton, T.A. and Stewart, I. 1970. The distribution of tyramine, N-methyltyramine, hordenine, octopamine, and synephrine in higher plants. *Lloydia* 33: 245-254.
- James, M.I., Midgley, J.M. and Williams, C.M. 1983. The metabolism and biosynthesis of +/-o-octopamine and +/-o-synephrine in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 35: 559-565.
- National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). 2017. Risk assessment of synephrine. [<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2017-0069.pdf>].
- Allison, D.B., Cutter, G., Poehlman, E.T., Moore, D.R. and et al. 2005. Exactly which synephrine alkaloids does Citrus aurantium (bitter orange) contain? *Int. J. Obes.* 29: 443-446.
- Haaz, S., Fontaine, K.R., Cutter, G., Limdi, N. and et al. 2006. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes. Rev.* 7: 79-88.
- Santana, J., Sharpless, K.E. and Nelson, B.C.

2008. Determination of para-synephrine and meta-synephrine positional isomers in bitter orange-containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chem.* 109: 675-682.
7. Rossato, L.G., Pinho, P.G., Silva, R., Carmo, H. and et al. 2010. Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of para and meta-synephrine in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52: 721-726.
8. EFSA Scientific Cooperation (ESCO) Working Group on Botanicals and Botanical Preparations. 2009. Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements, based on real case studies on request of EFSA. *EFSA J.* 7(9): 280.
9. American Botanical Council. 2005. Bitter orange peel and synephrine: Part 2. [http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Bitter_Orange_Peel_and_Synephrine.pdf?docID=221].
10. Roman, M.C., Betz, J.M. and Hildreth J. 2007. Determination of synephrine in bitter orange raw materials, extracts, and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *J. AOAC. Int.* 90(1): 68-81.
11. Avula, B., Upparapalli, S.K. and Navarrete, A. 2005. Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *C. aurantium*, various citrus species, and dietary supplements by liquid chromatography. *J. AOAC. Int.* 88: 1593-1606.
12. Tang, F., Tao, L., Luo, X., Ding L. and et al. 2006. Determination of octopamine, synephrine and tyramine in citrus herbs by ionic liquid improved 'green' chromatography. *J. Chromatogr. A* 1125: 182-188.
13. Bent, S., Padula, A. and Neuhaus, J. 2004. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. *Am. J. Cardiol.* 94: 1359-1361.
14. Penzak, S. R., Jann, M.W., FCP, Cold, J.A. and et al. 2001. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *J. Clin. Pharmacol.* 41: 1059-1063.
15. Haller, C.A. and Benowitz, N.L. 2000. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. *New Engl. J. Med.* 343: 1833-1838.
16. Fugh-Berman, A. and Myers, A. 2004. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Exp. Biol. Med.* 229: 698-704.
17. Brown, C.M., McGrath, J.C., Midgley, J.M., Muir, A.G.B. and et al. 1988. Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on alpha-adrenoceptors. *Brit. J. Pharmacol.* 93: 417-429.
18. Stohs, S.J. and Ratamess, N.A. 2011. Effects of p-synephrine alone and in combination with selected bioflavonoids on resting metabolism, blood pressure, heart rate and self-reported mood changes. *Int. J. Med. Sci.* 8: 295-301.
19. Daly, P.A., Krieger, D.R., Dulloo, A.G., Young, J.B. and et al. 1993. Ephrine, caffeine and aspirin: safety and efficacy for treatment of human obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17(1): S73-S78.
20. Colker, C.M., Kalman, D., Torina, G.C. and Perlis T. 1999. Effects of *Citrus aurantium*

- extract, caffeine, and St. John's wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in overweight health adults. Curr. Ther. Res. 60: 145-153.
21. Haaz, S., Fontaine, K.R., Cutter, G., Limdi, N. and et al. 2002. Citrus aurantium as a thermogenic, weight-reduction replacement for ephedra: an overview. J. Med. 33: 247-264.
22. 衛生福利部。2013。使用原料苦橙(Citrus aurantium L.)之有容器或包裝食品應標示警語。102.10.16部授食字第1021350767號公告。
23. He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G. and et al. 2011. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. Food Chem. 127: 880-885.
24. 衛生福利部食品藥物管理署。2019。檢驗機構實驗室品質系統基本規範-附件一食品化學檢驗方法之確效規範。108 年3 月13 日核定，108 年7 月1 日生效。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=10908>]。

Determination of Synephrine in Foods in Tablet and Capsule Form

JIA-HUA HOU, PAI-WEN WU, YING-JIE TSAI, NU-CHING LIN,
CHIA-DING LIAO, YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Synephrine is a predominant active alkaloid found in bitter orange (*Citrus aurantium*) fruit, as well as in other citrus species. It is similar in structure to ephedrine, which is banned in dietary supplements for weight loss and sport performance. The Ministry of Health and Welfare amounted the daily synephrine intake in bitter orange in 2013, while there was no corresponding test method published yet. Therefore, this study aimed at the development of a determination method for testing synephrine in foods by using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with photodiode array detection (PDA). Sample was ground to fine powders and extracted with ultrasonic assistant. The separation was done by using the UPLC system with an Agilent Pursuit 5 PFP column (4.6 mm × 15 cm, 5 µm) and connected to a photodiode array detector. The quantitative wavelength was set at 220 nm. The method validation was performed by spiking blank samples with *p*-synephrine and *m*-synephrine at the levels of 5, 25 and 50 mg/100 g. The average recoveries of *p*-synephrine and *m*-synephrine for intra-day analysis were 90.6 - 103.8% and 88.5 - 103.0% with coefficients of variation 0.40 - 3.77% and 1.27 - 6.41%, respectively. The average recoveries of *p*-synephrine and *m*-synephrine for inter-day were 92.7 - 101.3% and 89.5 - 98.7% with coefficients of variation 1.43 - 3.57% and 1.63 - 6.51%, respectively. The results showed that the method offered high precision and accuracy. The surveillance results consisted of ten commercial foods in capsule and tablet form showed that three samples exceeded the limit of daily synephrine intake. One of the violate sample contained synephrine five times higher than the regulation limit. All the illegal products had reported to relative authorities for further administration.

Key words: synephrine, bitter orange, limit of daily intake