

NIRS를 이용한 삼지구엽초의 이카린 함량 분석

김용호*† · 최병열** · 백홍영*** · 이영상*

* 순천향대학교 생명과학부, ** 경기도 농업기술원, *** 정우약품

Quantification of Icariin Contents in *Epimedium koreanum* N. by Using a Near Infrared Reflectance Spectroscopy

Yong Ho Kim*†, Byoung Ryoul Choi**, Hum Young Baek***, and Young Sang Lee*

* Div. of Life Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan, 336-745, Korea

** Crop Div. Kyounggi ARES, Hwasong, 445-972, Korea

*** Jung Woo Pharmaceutical Co., Asan, 336-880, Korea

ABSTRACT : Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has become widely accepted for rapid quantitative analysis of components in some crops. Our object was to determine icariin contents in whole plant of *Epimedium koreanum* by using an NIRS system. Total 150 plant samples previously analyzed by HPLC were scanned by NIRS and 68 samples were selected for calibration and validation equation. A calibration equation calculated by MPLS(modified partial least squares) regression technique was developed and a coefficient of determination in calibration and validation sets were 0.95 and 0.82, respectively. A comparison between NIRS estimation and HPLC value was performed with the remaining samples not included in the calibration and validation sets. Most of samples also showed a positive correlation like a validation set. Our results demonstrate that this developed NIRS equation can be practically used as a mass screening method for rapid quantification of icarin contents in *Epimedium koreanum* N.

Key words : NIRS, *Epimedium koreanum*, icariin, HPLC, MPLS regression

서 언

삼지구엽초는 매자나무과에 속하는 다년생초본식물이다. 이 식물의 지상부(잎과 줄기)를 말려 조제한 것을 음양곽(淫羊藿 *Epimedium Herb*)이라 하여 옛날부터 동양에서는 강장, 거풍강정, 이뇨 및 신경성 강장제로 귀히 여겨 온 약재이다. 이 생약의 주효성분으로는 icariin 등의 flavonoid, 휘발성 정유, cholesterol 등이 밝혀져 있다. 따라서 이들 성분 함량의 분석을 통해서 삼지구엽초의 품질을 평가할 수 있겠으나 아직 이들을 정량화함으로써

쉽게 품질을 구분할 수 있는 기반은 미미한 형편이다.

NIRS(근적외선분광분석기)는 작물의 품질 특성을 파괴 없이 있는 그대로 신속하게 정성 및 정량분석을 함으로써 다량의 시료를 단시간내에 정확하게 분석할 수 있어 최근 각 분야에서 다양하게 쓰이고 있는 분석기기이다 (Velasco et al. 1996; 조 와 김, 1995; Daun et al. 1994; Clarke et al. 1992; Williams et al. 1991).

NIRS를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIR(근적외선) spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도한다. 검량식은 다양한 수처리 방법(1차에서 4차 미

† Corresponding author (Phone) : Young Sang Lee, 041-530-1287, E-mail : mariolee@sch.ac.kr

Received 3 September 2002 / Accepted 28 November 2002

분, 회귀분석 : MLR, PLS 등)을 통하여 산출하는데, 잘 유도된 검량식은 안정된 결과로서 재현성 및 정확도가 좋고, 그렇지 않은 경우는 불안정하며 따라서 보정이 필요하다(Shenk et al. 1991). 검량식이 얻어지면 이 검량식의 적용평가에 퍼센트 예측 프로그램과 일상분석에서 이를 확인하여 유도된 검량식을 실제 분석에 사용한다. 즉 NIR spectrum 획득 → 검량선 유도 → 검량선 확인 → 정량분석의 단계를 거쳐 미지의 성분 함량을 신속 편이하게 분석할 수 있게 된다. 이밖에 NIRS를 이용하여 분석된 기지의 시료 성분 함량을 자료화하여 library를 구축한 후, 새로운 제품의 스펙트럼과 대조, 평가를 함으로써 제품의 품질 평가를 할 수 있어 NIRS의 control chart를 이용하여 시료의 일정한 품질관리를 항상 관측할 수 있는 기술도 개발이 가능하다.

국내에서도 NIRS를 이용한 성분 함량 분석에 관한 보고(Choung et al. 2001; Lee et al. 2001; Jung et al. 1998; Kim et al. 1995)가 계속해서 발표되고 있다. 특히 NIRS는 전처리가 필요없는 비파괴분석이 큰 장점이므로 삼지구엽초의 분말상태에서 주요 성분 함량을 분석할 수 있다면 삼지구엽초의 품질 평가를 위한 많은 시간과 노력을 줄일 수 있다. 따라서 본 연구에서 삼지구엽초에 함유되어 있는 icariin 함량을 신속하게 추정하기 위하여 NIRS를 이용한 분석 방법을 검토하였기에 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

공시 재료는 1994년 경기도 및 강원도 일원에서 수집되어 1995년부터 경기도 농업기술원에서 5년간 재배 및 분리된 삼지구엽초 유전자원 150계통을 사용하였다.

삼지구엽초의 이카린 분석

건조된 삼지구엽초 지상부를 0.5mm mesh를 이용하여 분말로 마쇄하였다. 마쇄 시료 2g과 10% EtOH 70ml를 냉각관이 연결된 농축 플라스크에 넣어 90°C 수조에서 4시간 가열 추출한 후 Whatman No. 6 로 감압 여과하고 다시 10% EtOH를 사용하여 100ml로 정량하였다. 정량된 추출액 5ml와 증류수 75ml를 분액 여두에 넣어 회석하고 dichloromethane 100ml를 가하여 층 분리한다. 여기에 Ethylacetate 100ml를 가하여 다시 층 분리 한 후 Na₂SO₄를 통과시켜 탈수 여과하고 진공 농축기에서 60°C로 증발·건조시켰다. 건조시료를 100% methanol 5ml에 다시 용해한 후 0.45µm syringe filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석은 Lichrosorb RP-18(10µm, 25cm x 46 mm i.d., 40°C) 컬럼을 이용하였

다. Flow rate는 1.5ml/min, injection volume은 10µl로 하였으며 mobile phase gradient는 time(min)-H₂O(%)-MeOH(%)를 (0-50-50), (10-40-60), (15-30-70)로 조정하였다. 검출기는 UV/Vis. Detector (350nm, sensitivity : 0.01 au)를 사용하여 정량화 하였으며 3반복으로 수행되었다. 통계 분석은 SAS program을 이용하여 5% 유의수준에서 DMRT에 따른 처리 평균을 비교하였다.

NIRS 분석

NIRS를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIRS spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도하여야 한다. NIRS spectrum 은 가시광선 및 근적외선 대역(400~2,500 nm)에서 마쇄된 삼지구엽초의 분말 상태로 스캐닝하여 수집하였으며, HPLC에서 분석된 이카린 함량치와 비교 검토하여 검량식을 작성하였다. 분석에 이용된 기기는 NIR System model 6500(Foss NIR Systems)이었다. 검량식은 우선 spectrum을 4가지 수처리 방법을 통하여 1차적으로 noise와 bias를 줄였다. 수처리 (math treatment)는 1차미분법을 이용한 1, 4, 4, 1(1st derivative, 4nm gap, 4 points smooth, and 1 pont second smooth)조건, 1, 10, 10, 1 조건과 2차미분을 이용한 2, 4, 4, 1 조건 및 2, 10, 10, 1 조건을 사용하였다. 수처리된 spectrum은 회귀분석을 통하여 검량식을 작성하였다. 회귀분석은 Step-up, Step-wise, 그리고 MPLS(Modified Partial Least Squares)법을 사용하여 검량식을 산출하였으며, 작성된 검량식을 상호 비교 분석한 후 적정의 검량식을 도출하였다.

결과 및 고찰

전체 공시 재료인 삼지구엽초 유전자원 150 계통을 HPLC를 이용하여 이카린 함량을 분석하고 NIRS에서 스펙트럼을 수집하였다. NIRS 스펙트럼에 HPLC 분석치를 적용시켜 NIRS 검량식 작성을 위한 calibration set(42계통) 와 validation set(26계통)를 분류한 결과가 표1이다. Calibration 과 validation을 위한 집단은 NIRS의 프로그램인 Winisi를 이용하여 스펙트럼에 중복성이 나타나는

Table 1. Laboratory reference value statistics for icariin content based on *Epimedium koreanum*

Sample set	n	Mean(%)	Range(%)	SD
Calibration	42	0.424	0.12~0.67	0.135
Validation	26	0.418	0.24~0.65	0.125

계통들을 배제시킨 후 구분하였다.

다양한 유전자원을 분석 재료로 이용한 까닭에 HPLC에서 성분함량들의 변이가 크게 나타났으며, 이런 결과는 NIRS를 이용하여 이카린 성분 분석을 함에 있어 유리하게 작용할 수 있었다. Calibration set와 validation set에 상관없이 이카린 함량은 평균 0.42% 정도를 나타내었으며 변이 폭은 calibration 집단이 validation set에 비해 넓은 것으로 구분되었다.

삼지구엽초의 분말을 NIRS를 이용하여 NIR 대역(1,100~2,500 nm)에서 스펙트럼을 구하였는데 그림 1의 결과와 같이 NIR 스펙트럼은 다양하게 나타났다. 그림 1은 실험실에서 HPLC를 이용하여 분석된 이카린 함량 최고 및 최저치 시료가 나타내는 스펙트럼 중에서 두 시료간 폭이 가장 크게 나타난 특정 파장 대역의 스펙트럼이다. 이카린 함량은 1,883 nm 와 1,914 nm 근처에서 최고치와 최저치 시료간 스펙트럼 차이 폭이 크게 나타났다. 따라서 이러한 대역이 이들 성분분석을 위한 중요 파장 범위임을 짐작할 수 있겠으나 앞으로 좀더 세밀한 검토가 요구된다.

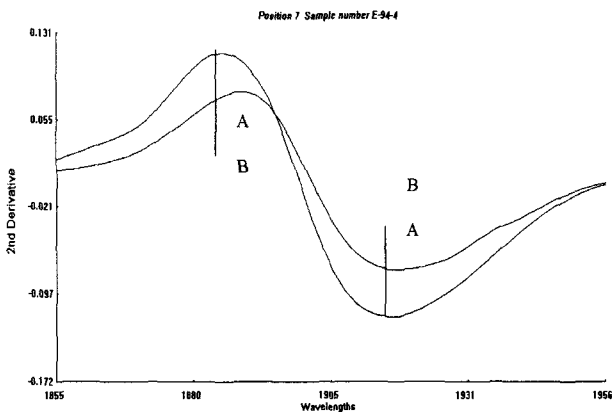


Fig. 1. Second derivative of high(A) and low spectra(B) in the region 1,855~1,956 nm of icariin samples.

표2는 이카린 함량을 NIRS를 이용하여 검량식을 작성한 결과이다. 회귀분석법은 step-wise, step-up 및 MPLS 방법을 이용하였으며 수처리(math treatment)는 1차미분 및 2차미분을 이용하는 4가지 방법을 사용하였다. 즉 1차미분법을 이용한 1, 4, 4, 1(1st derivative, 4nm gap, 4 points smooth, and 1 point second smooth) 조건, 1, 10, 10, 1 조건과 2차미분을 이용한 2, 4, 4, 1 조건 및 2, 10, 10, 1 조건을 사용하였다. 그러나 분석 결과 R² 및 SEC 값으로 판단할 때 MPLS 방법이 기타 방법(step-wise 및 step-up)보다 우수한 것으로 판단

되었다. 따라서 표에서는 MPLS의 4가지 수처리 방법에 따른 검량식을 나타내었다.

이카린 함량은 R² 및 SEC 수치로 볼 때 2차 미분한 검량식이 1차 미분시 보다 우수한 것으로 나타났다. 그러나 NIRS 이용시 유용한 검량식을 얻기 위해서는 validation file을 작성한 후 calibration file에서 얻어진 검량식을 적용하여 봄으로써 그 유효성을 판단하여야 한다. 본 실험의 경우 validation file의 상관계수(r²)가 1차 미분에서는 수처리에 관계없이 0.84 정도를 나타내었으며 2차 미분에서는 각각 0.82 와 0.86을 나타내었다. 따라서 validation set에서는 1차 및 2차 미분의 차이점이 크게 나타나지 않는 것으로 사료되었다.

Table 2. Calibration parameters for icariin content according to MPLS analysis with four mathematical treatments in *Epimedium koreanum*

Math treatment	R2	SEC	SECV	r2
1.4.4.1	0.897	0.069	0.085	0.844
1.10.10.1	0.900	0.077	0.096	0.842
2.4.4.1	0.951	0.049	0.093	0.816
2.10.10.1	0.931	0.063	0.091	0.859

Math treatment a, b, c, d : a = derivative function ; b = gap ; c = smooth ; d = second smooth
 R2 = squared coefficient of multiple determination in calibrations
 SEC = standard error of in calibrations
 SECV = standard error of cross validation

그러나 표2를 종합하여 볼 때 이카린 함량의 경우 2차미분 수처리 2,4,4,1이 NIRS 이용시 적당한 검량식으로 판단되었다. NIRS가 성분 함량 분석에 유용하게 이용되기 위해서는 분석 시료의 성분함량 폭이 가장 넓은 유전자원들이 고른 분포도로 검량식 작성에 사용되어야 한다. 이런 면에서 볼 때 삼지구엽초의 이카린 함량 분석은 추후 지속적인 유전자원 수집과 함께 검량식 보정이 필요하리라 판단된다.

그림 2는 HPLC에서의 이카린 함량 분석치와 삼지구엽초 분말 상태의 NIRS 검량식(2,4,4,1)에서 도출한 분석치와의 상관관계를 나타낸 것이다.

이와 같이 삼지구엽초의 분말 상태에서도 NIRS를 이용하여 이카린 함량을 분석할 수 있음을 알 수 있었다. NIRS 분석의 장점은 시료의 전처리 없이 비파괴분석이 가능하다는 점이다. 이런 관점에서 볼 때 분말 상태에서의 여러 가지 성분 함량치의 분석은 앞으로 NIRS를 응용하는 여러 가지 분석법 개발이 가능하다는 것을 시사

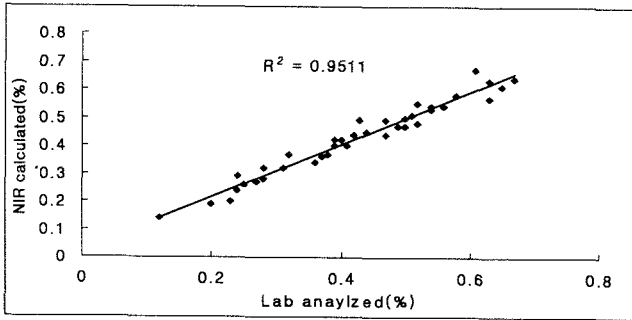


Fig. 2. Correlation between HPLC and NIRS measurement for quantification of icariin contents in *Epimedium koreanum*

하는 것이라 생각한다. 특히 약용작물의 경우 목표 성분치의 함량이 미량일 뿐만 아니라 분석을 위한 실험이 완료된 후에는 분석에 사용된 시료를 다시 회수할 수 없다는 점을 감안할 때 NIRS의 연구는 앞으로 다각적으로 검토되어야 할 것으로 생각한다.

사 사

본 논문은 2001년도 순천향대학교 학술연구개발비 지원에 의하여 일부 수행되었다.

적 요

삼지구엽초에 함유되어 있는 icariin 함량을 신속하게 추정하기 위하여 NIRS(근적외선 분광분석기)를 이용한 분석 방법을 검토하였다.

HPLC를 이용하여 분석된 삼지구엽초 유전자원 150계통에 대한 이카린 함량치를 NIRS 스펙트럼에 적용시켜 42개의 calibration set 와 26개의 validation set를 구분하였다. NIRS의 검량식을 몇가지 방법에 의하여 비교 분석한 결과 2차미분된 스펙트럼을 MPLS(Modified Partial Least Squares)를 이용한 회귀식에 이용하는 것이 가장 적합하였다. HPLC를 이용한 유전자원들의 이카린

함량은 평균 0.424%(0.12~0.67%)이었으며, NIRS에서 도출된 검량식과의 상관계수는 0.951을 나타내었다. 따라서 삼지구엽초의 이카린 함량은 NIRS를 이용하여 신속 편리하게 분석할 수 있음이 인정되었다.

LITERATURE CITED

- 조규채, 김용호 (1995) 근적외선 분광분석법을 이용한 작물품질분석법. 작물 품질 관련 정밀기기 작동방법, p. 143~183.
- Choung MG, Baek IY, Kang ST, Han WY, Shin DC, Moon HP and Kang KH. (2001) Non-destructive method for selection of soybean lines contained high protein and oil by near infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 46(5) : 401~406.
- Clarke MA, Arias ER and McDonald-Lewis C. (1992) Near infrared analysis in the sugarcane factory. Sugary Azucar. pres. at Ruspam Commun. Inc. USA.
- Daun JK, Clear KM and Williams P. (1994) Comparison of three whole seed near-infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. JAOCS, 71(10) : 1063~1068.
- Jung CS, Kim BJ, Kwon YC, Han WY and Kwack YH (1998) Analysis of protein and moisture contents in Pea using near-infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 43(2) : 101~104.
- Kim YH, Yun HT, Chung WK and Kim SD. (1995) Determination of seed component contents in whole soybean seeds by Near Infrared Spectroscopy analysis. RDA J. Agric. Sci. 37(2) : 91~94.
- Lee HB, Choi BR, Kang CS, Kim YH and Choi YJ. (2001) Determination of seed protein and oil concentration in Kidney Bean by near infrared spectroscopic analysis. Korean J. Crop Sci. 46(3) : 248~252.
- Shenk JS and Westerhaus MO. (1991) Population structuring of Near Infrared Spectra and Modified Partial Least Squares Regression. Crop Science 31 : 1548~1555.
- Velasco L, Fernandez-Martinez J and Haro AD. (1996) Screening ethiopian mustard for erucic acid by near infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 36 : 1068~1071.
- Williams PC, Cordeiro HM and Harnden MFT. (1991) Analysis of oat bran products by Near Infrared reflectance Spectroscopy. Cereal Foods World. 36(7) : 571~574.