

근적외선 분광분석법을 이용한 타우린의 정량 분석

조창희 · 김효진^{*} · 맹대영^{*} · 서상훈^{*} · 조정환^{**}

동덕여자대학교 약학대학, *유한양행 품질관리부, **숙명여자대학교 약학대학

(Received August 1, 1998)

Quantitative Analysis of Taurine Using Near Infrared Spectrometry (NIRS)

Chang Hee Cho, Hyo Jin Kim*, Dae Young Meang*,
Sang Hun Seo* and Jung Hwan Cho**

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul, 136-714, Korea

*Yuhan Co. Quality Control, 27-3 Tangjeong-dong, Kunpo-shi, Kyonggi-do, Korea

**College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, 140-742, Korea

Abstracts—Near Infrared transmittance Spectroscopy (NIRS) was used to evaluate and quantify the pharmaceutical active compounds. In this paper, taurine (2-Aminoethanesulfonic acid) was quantitatively analyzed in commercial pharmaceutical preparations. For calibration a central composite factorial design was used to determine concentrations of ingredients in reference samples. For the quantitative analysis of taurine, the most suitable data analysis method includes the calculation of second derivatives and a partial least squares regression (PLSR) model. By NIR spectrometry, combined with PLSR, the taurine concentration was successfully predicted with a relative standard error of prediction (SEP) lower than 1.04%.

Keywords □ Near Infrared transmittance spectroscopy, Taurine, Central composite factorial design, Partial least squares method.

Taurine(2-Aminoethanesulfonic acid, $\text{NH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$)은 대부분의 척추동물 세포에 과량 존재하는 β -아미노산의 일종으로써, 그 이름은 1901년 Hammarsten이 황소의 담즙으로부터 분리하여 붙여졌다.¹⁾ Taurine은 뇌,^{2,3)} 심장,⁴⁾ 신장,⁵⁾ 안구⁶⁾ 등 여러 분야에서 다양한 기능을 가지고 있으며 최근에는 항산화 작용⁷⁻¹¹⁾ 이 보고됨에 따라 관심이 점점 높아지면서 그 활용도가 폭넓게 확대되어지고 있다. 이러한 taurine에 대한 정량법으로는 주로 HPLC를 사용하고 있으나, 5~6시간이라는 장시간의 전처리 과정에 의해서 시료의 손실과 이에 따른 정확도의 저하 등 많은 문제점을 지니고 있다. 따라서 보다 신속하고 효율적인 분석방법이 요구되는데,

본 연구에서는 전처리가 거의 필요없는 근적외선 분광분석법(Near Infrared Spectroscopy: NIRS)을 적용하고자 하였다.¹²⁾ 근적외선 분광분석법은 700~2,500 nm의 영역에서 검체를 분석하며 IR 영역에서 유래되는 -CH, -NH, -OH 등의 기본 분자진동 에너지의 결합대(combination band)와 1차에서 4차 배음대(1st~4th overtone band)에 의한 에너지의 흡수를 이용한다. 근적외선 분광기기는 1960년대 초 Karl Norris에 의해 농업분야¹³⁾에서 처음으로 실용화된 이후 식품, 사료 및 고분자 분야에서 많은 적용이 되어 왔으며, 의약업계에서도 그 용성이 확대되어지고 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾ 근적외선 분광분석법에서의 정량분석은 Beer의 법칙을 사용하여 측정검체의 투과도 및 반사도를 가지고 선형방정식을 얻어 사용하는데, 약물 검체를 수집 선택하여 검체에 조사된 빛의 산란효과를 보정 후 회귀분석을 시행하여 검량선을 유도

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-940-4525 (팩스) 02-943-9578

하고 이를 검증 후에 적용하는 것이다. 근적외선 분광분석법은 전처리가 최소화되기 때문에 정량의 재현성 및 정확도의 증가, 공정 중 직접분석, 검체 및 분석시간의 절감 등 많은 이점을 제공한다. 근적외선 분광분석법의 장점은 대량의 시약, 용매 등을 사용하는 기존의 분석법에 비해 시약 및 용매 등을 거의 필요로 하지 않으며 검체의 조제가 간편하고, 신속한 측정 및 여러 성분을 동시에 분석할 수 있으며 반복 측정이 가능한 비파괴적 분석법이라는 것이다. 또한 단시간에 연속 측정이 가능하여 on-line 분석도 할 수 있어서 공정의 최적화를 통한 생산성의 극대화를 꾀할 수 있어 그 가치는 크다고 할 것이다. 따라서 본 연구는 드링크류 내 함유되어 있는 taurine의 함량을 근적외선 분광분석법으로 검토하여 새로운 분석법의 응용 가능성을 제시하고자 하였다.

실험방법

재료 및 시약 – Taurine[(2-Amonoethanesulfonic acid): C₂H₇NO₃S]이 하나의 활성물질로 함유된 드링크제인 Yuton액(제조원: 유한양행)이 사용되었다. 제품 내 활성물질인 taurine의 함유량은 2 g/100 ml이며, 이 표시량을 100%로 설정하였다. 그리고, 타 주성분 및 기타성분으로는 DL-carnitine HCl, inositol, thiamin mononitrate, riboflavin sodium phosphate, pyridoxine HCl, nicotinamide 100% DC, caffeine anhydrous, sodium benzoate, sucrose, fructose, stevioside 50, citric acid, malic acid, sodium citrate, ethanol, mix fruits, pineapple essence, honey flavor 그리고 정제수가 함유된다. 이 placebo들의 총함유량은 0.863 g/100 ml이며, 이 표시량을 100%로 하였다. 본 실험에서 사용되는 모든 원료들은 유한양행에서 공급받았다.

시료 전처리 – Taurine의 제품 공정상 허용 기준은 90~130%이며 검량식 작성을 위한 calibration set는 변수들간의 상관관계를 보다 효과적으로 설명할 수 있는 실험설계로서 central composite factorial design¹⁹⁾을 이용하여 농도를 결정하여 조제하였다. Table I에서와 같이 3개의 level(80, 100, 120%)에서 2개의 factor(taurine, placebo)로 설계된 calibration set는 32 factorial design으로써 9개의 검체들과 2개의 100% 검체들을 추가하여 11개의 검체를 가진다. 결과 확인을 위한 validation set는 90~110%

Table I – Experimental design for quantitative analysis by NIRS for taurine drink ((a) as calibration set using a central composite factorial design and (b) as validation set)

(a)

Sample number	Taurine (%)	Placebo (%)
1	80.17	80
2	80.09	100
3	80.07	120
4	100.09	80
5	100.01	100
6	100.24	100
7	100.06	100
8	100.27	120
9	120.09	80
10	120.02	100
11	120.06	120

(b)

Sample number	Taurine (%)	Placebo (%)
1	90.07	90
2	110.09	100
3	110.08	110
4	95.06	95
5	95.04	100
6	95.04	105
7	105.14	95
8	105.10	100
9	105.04	105
10	90.09	110
11	100.47	110

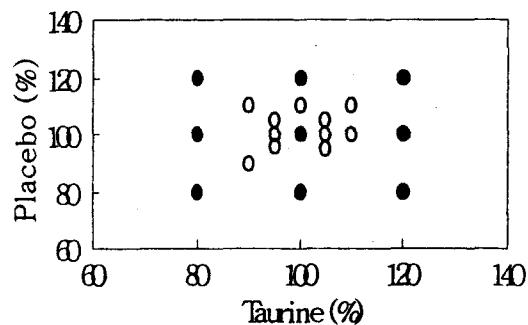


Fig. 1 – Experimental design for quantitative analysis by NIRS for taurine drink. (● as the Calibration set and ○ as the Prediction set)

범위의 taurine 함량을 갖도록 조제하였다. Fig. 1은 Table I에서 나타낸 시료의 조성에 관한 그림이다. 별도의 검체 전처리는 요구되지 않으며 활성물질과 기타 성분을 모두 혼화한 placebo를 정해진 농도에 따라 잘 섞는다.

기기 – Spectrum은 transmittance module을 설치한 NIRSystems 6500 spectrophotometer(Foss NIR-System, MD, USA)로 peristaltic pump에 연결된

flow cell에 검체를 넣고 단색광을 투사하였다. 투과된 빛은 1100~2500 nm 범위에서 1 scan당 32회전, spectrum 당 700 data points를 수집하도록 설정하였으며 log 1/T absorbance data는 Foss NIRSystems Inc.의 NSAS® software를 이용하여 기록되었다. 또한 모든 과정은 25°C의 온도 하에서 실시되었다.

Chemometrics – 본 실험에서는 데이터 처리를 위해 통계기법 중 부분 최소 제곱회귀법(partial least squares regression)²⁰⁾을 이용하였다. 이 때 수학적 변형(second derivative)이 데이터 분석에 사용되었으며 모든 통계적 처리는 VISION® software(Foss NIRSystem, USA)을 이용하였다.

HPLC와의 비교 – Taurine 정량분석을 위해 기존에 사용하고 있던 HPLC 데이터와 NIR 데이터를 비교, 검토하였다. 용액 중 검체인 taurine 농도를 HPLC로 측정하기 위한 전처리 방법은 다음과 같다. Standard solution은 STD 20 ml를 취해 50 ml로 만들었으며, sample solution은 검체 10 ml를 취해 50 ml로 하고, 이 용액의 5 ml를 취하여 50 ml로 만들었다. 그리고, 0.5 M-탄산나트륨 용액 300 μl에 이 검액과 표준품을 각각 500 μl 섞고, 반응 시액 2 ml를 혼합한 후, 60°C 수욕 중에서 1시간 동안 반응시킨 후 방냉하였다. 이 때의 반응 시액은 단실클로라이드 30 mg에 아세톤을 넣어 20 ml가 되게 하였다. 위의 용액을 2 ml 취하여 60°C에서 감압 건고하여 잔사에 용해액 4 ml를 가하여 용해시켰다. 이 용액을 0.45 μm filter에서 여과한 후 HPLC에 주입하였다. HPLC의 분석조건으로써 working co-

lumn은 Lichrosorb RP C₁₈을 사용하였으며 이동상의 비율이 270 : 730 CH₃CN : 0.1N-초산나트륨워터(pH 7.5)인 용액을 사용하였다. Flow rate는 1.0 ml/min의 속도로 하였으며, 검출기 파장은 320 nm를 사용하였다.

결과 및 고찰

Fig. 2는 80~120% 함량의 taurine을 근적외선분광기로 측정하여 log 1/T 형태의 흡광도로 나타난 스펙트럼이다. 스펙트럼의 경우 일반적인 적외선 흡수파장과는 달리 1450과 1940 nm 사이에 매우 큰 물에 의한 피이크가 나타났으며 이외의 주피크는 육안상 확인되지는 않는다. 여러 가지 농도를 함유한 타우린 시료를 함께 측정하였으나 역시 피이크상에는 큰 차이를 나타내지는 않았으며 그 이유는 수분에 의한 OH peak의 흡수가 워낙 크기 때문이다. 이러한 O-H band로 인한 산란효과를 감소시키기 위해 원래의 스펙트럼(Fig. 2)을 20 nm moving window 단위로 이차 미분하였으며 그 스펙트럼을 Fig. 3에 나타내었다. 이차미분 스펙트럼상에서도 농도별 흡광도의 변화가 거의 없는 것으로 보이지만 부분 확대하여 보면 Fig. 4과 같이 2200~2350 nm 범위에서 taurine의 피크를 관찰할 수 있으며, 그 농도에 따라 비례적인 변화를 확인할 수 있다. 이러한 영역을 보다 정확히 알아내기 위하여 통계적인 처리 방법인 PLSR을 적용하였을 때 1100~1430, 1560~1850 그리고 2150~2300 nm 범위가 가장 유의하였다.

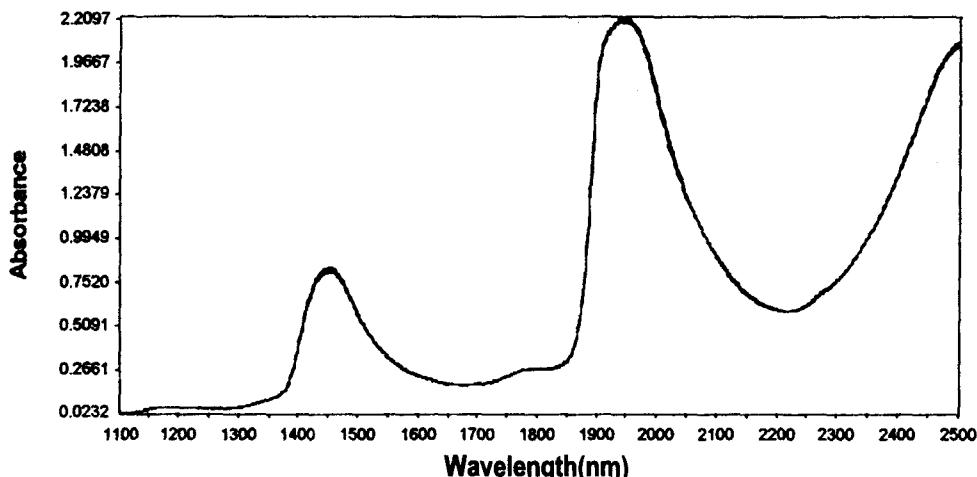


Fig. 2 — Raw spectra of taurine drinks with different concentration of taurine by NIRS at 1100~2500 nm.

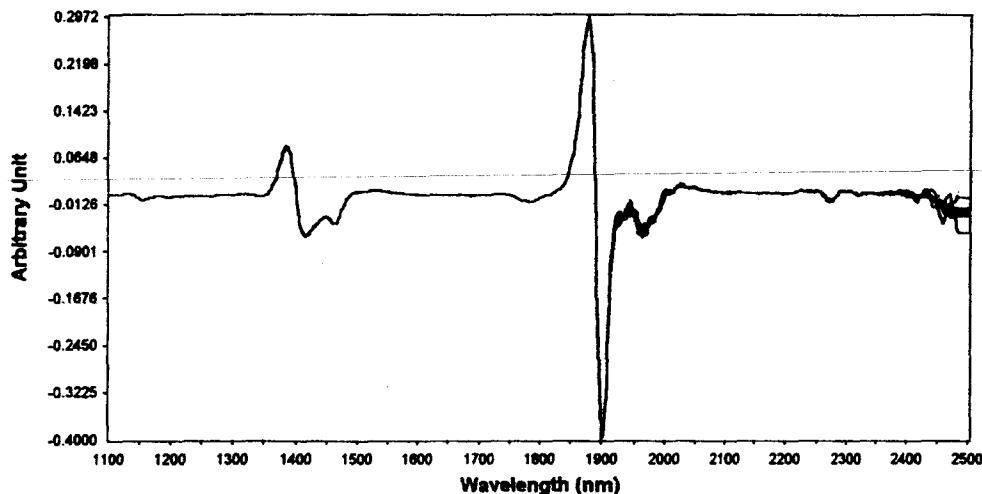


Fig. 3 — Second derivative spectra of taurine drink with different taurine concentration by NIRS at 1100~2500 nm.

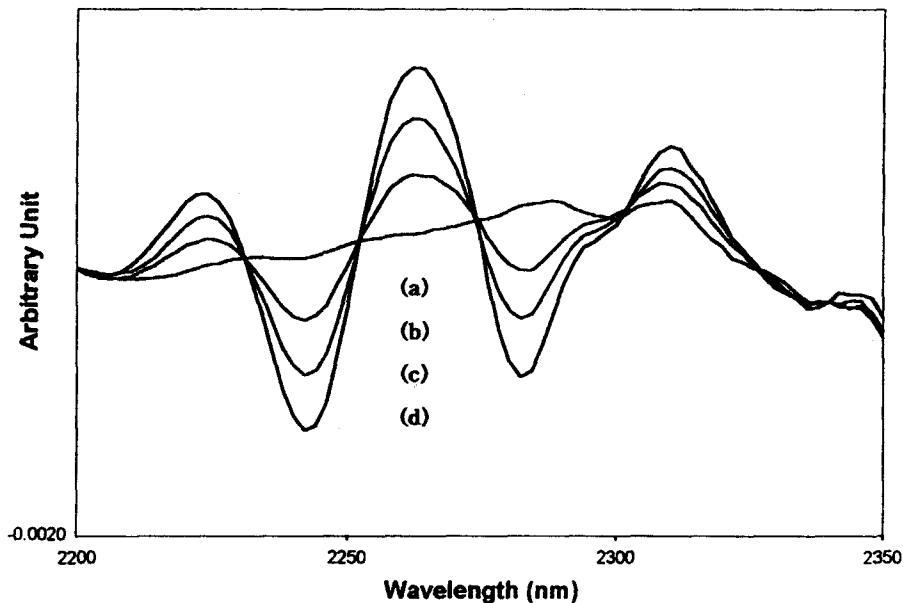


Fig. 4 — Spectral region of taurine. As (a) 147.5% Taurine (b) 99.3% Taurine (c) 51.8% Taurine and (d) pure water.

여기서 1100~1430과 1560~1850 nm의 흡수밴드는 각각 second overtone과 first overtone이며, 2150~2300 nm 대역은 combination band이다. 1100~1430 nm에서는 C-H stretching의 second overtone과 1740 nm에서 S-H stretching의 first overtone의 정보를 가지며 2150~2300 nm는 N-H stretching과 C-H stretching에 의한 흡수밴드가 나타나는 영역이다.

PLS regression은 다변량 회귀분석법의 한 방법으로

최적의 factor수를 정하기 위해 cross validation을 실행한다. Cross validation은 data를 정량 data와 validation data로 나누어 PRESS(predictive residual error-sum of squares)를 계산한다. Fig. 5는 PRESS를 plot하여 조사한 그림으로 그 최소값을 확인할 수 있었다. Factor 수에 따른 PRESS와 SEC 등의 상관성은 Table II에 나타내었다. Factor가 증가할 수록 R값은 0.764에서 0.999로 증가하였으며 SEC(standard error of calibration) 값도 감소하였으나, 통계적인 방법

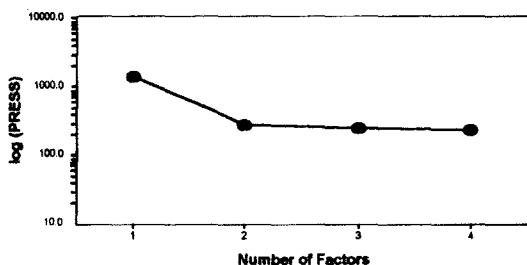


Fig. 5 — Diagram for PRESS of taurine content using transmittance mode by NIRS at 1100~2500 nm.

Table II — Calibration results for taurine drink with the different factors using PLSR in the range of 1100~1430, 1560~1850 and 2150~2300 nm

Factor	R	SEC ¹⁾ (%)	PRESS ²⁾	STD Err ³⁾
1	0.76	6.91	2401.74	16.34
2	0.93	4.02	381.97	6.52
3*	0.99	1.58	124.79	3.72
4	0.99	0.40	87.54	3.12

* Selected factor number

1) Standard Error of the Calibration

2) Prediction Residual Error-Sum of Squares

3) Standard Error of X Validation.

에 의한 overfitting의 우려가 있으므로 본 연구에서는 3개의 factor를 사용하였다.

Fig. 6는 실제 시료의 측정을 위하여 검량곡선을 작성하는 과정을 나타낸 것으로 calibration set(Fig. 6a)은 실험실에서 조제한 시료의 함량을 X축으로, NIR 분광분석법으로 측정한 결과를 Y축으로 나타낸 것이다. 시료

조제 함량의 범위는 일반적으로 검량곡선을 측정하기 위하여 사용하는 0에서 100%까지의 농도를 사용하는 것이 아니라 통계적으로 유의성 있는 결과를 나타낼 수 있는 범위를 실제 시료의 함량 허용 범위인 100%에서 factorial design에 의하여 78%에서 121%사이에서 78%, 100%, 121%의 시료를 각각 3개씩 조제한 후 이를 측정하였다. 이때 얻어진 결과는 R(correlation coefficient) 및 SEC 값이 0.99 및 1.58 %의 양호한 직선성과 상관성을 얻을 수 있었다. 이 때 검량식이 정량 모델 자체에 적용되었을 때의 그 SEC는 다음과 같이 실제값과 근적외선 분광분석법으로 분석한 값과의 차이인 residual f로부터 계산된다.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum f_i^2}{N-K-1}}$$

이 때 N은 검체의 개수이고, K는 파장이나 factor의 개수이다.

Fig. 6a에서 구한 검량식을 이용하여 실제 미지시료를 분석하여 정확도를 측정한 결과를 Table III에 비교하였다. 시료는 모두 11종으로 농도범위는 90~110%이다. Validation set의 검증을 실행한 x축은 실제 함유된 값이며 y축은 근적외선 분광분석법을 이용하여 분석한 결과이다. 실제값과 측정값의 차이는 절대값을 기준으로 할 때 최대 1.82에서 최소 0.21%의 오차를 나타내었다. 이 때의 SEP는 다음과 같이 설명된다.

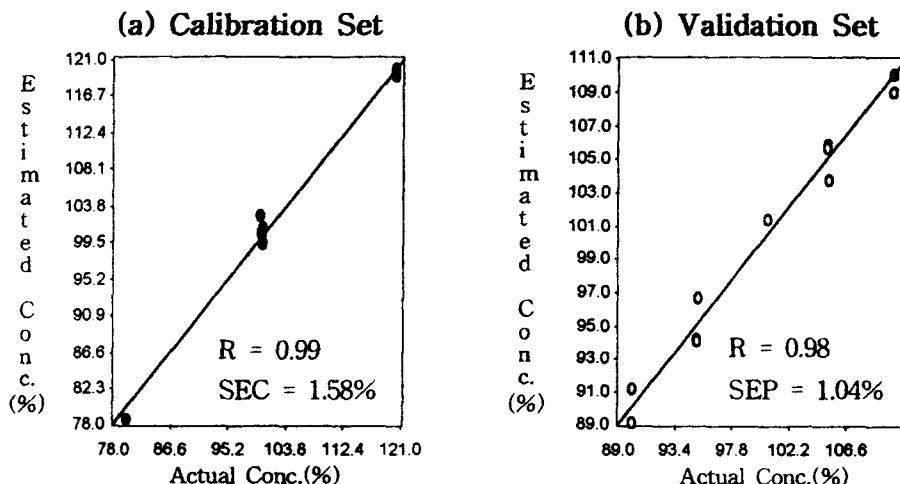


Fig. 6 — Diagram for calibration and validation (prediction) of taurine content using transmittance mode by NIRS at 1100~2500 nm.

Table III—Results obtained in the validation of the contents of taurine included in the prediction set by using the PLSR with second-derivative data

Sample	Actual ¹⁾ (%)	Estimated ²⁾	Residual
1	90.07	90.86	-0.79
2	110.09	109.71	0.38
3	110.08	108.58	1.50
4	95.06	96.34	-1.28
5	95.04	93.72	1.32
6	95.04	93.80	1.24
7	105.14	103.32	1.82
8	105.10	105.31	-0.21
9	105.04	105.51	-0.47
10	90.09	88.75	1.34
11	100.47	101.04	-0.57

¹⁾ Actual concentration

²⁾ Estimated concentration (NIR value).

Table IV—Comparison between NIR and HPLC data for quantitative analysis of taurine

Sample	HPLC	NIR value	Residual
1	94.40	97.00	-2.6
2	95.60	98.08	-2.48
3	96.20	97.77	-1.57
4	96.00	98.28	-2.28
5	97.20	97.77	-0.57
6	96.00	99.45	-3.45
7	98.50	99.24	-0.74
8	98.90	100.36	-1.46
9	99.70	100.73	-1.03
10	99.20	101.84	-2.64
11	100.10	100.82	-0.72
12	100.20	99.42	0.78
13	101.10	100.06	1.04
14	100.60	99.37	1.23
15	101.10	99.32	1.78
16	100.40	98.21	2.19
17	100.80	98.34	2.46
19	101.80	103.28	-1.48
20	103.10	103.57	-0.47
21	102.90	101.35	1.55
22	103.50	101.35	2.15
23	104.20	101.68	2.52
24	108.90	105.07	3.83

$$SEP = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(c_{actual} - c_{estimated})^2}{n}}$$

이 때 c_{actual} 은 조제한 실험실 표준품의 농도이고, $c_{estimated}$ 은 NIR로 계산된 농도이다. 그리고, n은 검증 set에서의 검체수이다. 이 결과를 Fig. 6b에 나타내었으며 SEP 값은 1.04%로 낮은 오차와 correlation 0.98의 좋은 직선성을 얻었다. 이것은 근적외선 분광분석법을 이용할 경우 기존의 분석방법인 HPLC법에 비

하여 전처리 없이 매우 신속하게 taurine을 정량 할 수 있음을 보여준다.

근적외선법에 의하여 측정된 값과 현재 기준 분석법으로 사용되고 있는 HPLC 값을 비교하기 위하여 실제 시료 24종을 사용하여 각각을 측정하였다. 농도범위는 94%에서 110%이었으며 그 결과를 Table IV에 나타내었다. HPLC 값을 기준으로 NIR 측정값과의 차이는 모두 4% 미만이었다.

결 론

근적외선 분광분석법을 이용하여 taurine의 성분을 전처리 없이 측정할 수 있었다. 근적외선 스펙트럼인 경우 일반적인 스펙트럼상에서의 농도에 따른 변화는 육안으로 관찰할 수 없을 정도이었지만 다변량 검량식인 PLS regression 방법을 적용하여 측정하였을 때 오차의 척도인 SEP는 1.0%로 매우 좋은 결과를 얻었다. 근적외선 분광법과 기준분석법인 HPLC 법을 동일시료를 사용하여 비교 측정하였을 때 총 24개의 검체중 한 개를 제외하고는 4%미만의 오차를 나타내었다. 따라서 근적외선 분광법은 기존의 HPLC법보다 필요한 전처리나 분석시간이 현저하게 줄어들어 실험에서뿐만 아니라 제품을 제조하는 과정의 공정상에서도 on-line 또는 at-line 측정으로 신속하고 효율적인 품질관리법이 될 수 있을 것이다.

문 헌

- 1) Kim, H. W. : Taurine의 수송체 특성과 생체 내 기능. *Pharmworld* 26(1), 3 (1997).
- 2) Gottschallpass, K. T., Gorecki, D. K. J., Patterson, P. G. : Effect of Taurine Deficiency on Tissue Taurine Concentrations and Pregnancy Outcome in the Rat. *Canadian J. Physiology & Pharmacology* 73(8), 1130 (1995).
- 3) Roser, W., Duc, C. O., Steinbrich, W., Radue, E. W. : Dangerous Increase of Taurine in the Human Brain after Consumption of an Energy Drink? *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 3 (1998).
- 4) Takahashi, K., Azuma, M., Taira, K., Baba, A., Yamamoto, I., Schaffer, S. W., Azuma, J. : Effect of Taurine on Angiotensin II-Induced Hy-

- pertrophy of Neonatal Rat Cardiac Cells. *J. Cardi. Pharm.* **30**(6), 725 (1997).
- 5) Mozaffari, M. S., Azuma, J., Patel, C., Schaffer, S. W. : Renal Excretory Responses to Saline Load in the Taurine-Depleted and the Taurine-Supplemented Rat. *Biochem. Pharm.* **54**(5), 619 (1997).
- 6) Marc, R. E., Murry, R. F., Basinger, S. F. : Pattern Recognition of Amino acid Signatures in Retinal Neurons(Review). *J. Neurosci.* **15**(7/2), 5106 (1995).
- 7) Park, E., Schuller-Levis, G. and Quinn, M. R. : Taurine Chloramine Inhibits Production of Nitric Oxide and TNF-alpha in Activated raw 264.7 cells by Mechanisms that involve Transcriptional and Translational events. *J. Immunol.* **154**(9), 4778 (1995).
- 8) Folkes, L. K., Candeias, L. P., Wardman, P. : Kinetics and Mechanisms of Hypochlorous acid Reactions. *Archives of Biochem. & Biophy.* **323**, 120 (1995).
- 9) Thomas, E. L., Bozeman, P. M., Jefferson, M. M., King, C. C. : Oxidation of Bromide by the Human Leukocyte Enzymes Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase-Formation of Bromamines. *Journal of Biological Chemistry* **270**(7), 2906 (1995).
- 10) Wettstein, M., Haussinger, D. : Cytoprotection by the Osmolytes Betaine and Taurine in Ischemia-Reoxygenation Injury in the Perfused Rat Liver. *Hepatology* **26**(6), 1560 (1997).
- 11) Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., Keppler, D. : Transport of Glutathione, Glucuronate, and Sulfate Conjugates by the MRP Gene-Encoded Conjugate Export Pump. *Cancer Research* **56**(5), 988 (1996).
- 12) Burns, D. A. and E. W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York (1992).
- 13) William, Phil and Norris, Karl : Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industry. American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, p. 201 (1987).
- 14) Emil, W. and Ciurczak : Pharmaceutical Mixing Studies Using Near-Infrared Spectroscopy. *Pharm. Tech.* **15**(9) (1991).
- 15) Buchanan, B. R., Baxter, M. A., Chen, T. S., Qin, X. Z., Robinson, P. A. : Use of Near-Infrared Spectroscopy to Evaluate an Active in a Film coated tablet. *Pharm. Research* **13**(4), 616 (1996).
- 16) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S. and Pezuela, C. de la : Effect of Data Preprocessing Methodes in Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy for the Determination of the Active Compound in a Pharmaceutical Preparation. *Appl. Spectroscopy* **51**(2), 240 (1997).
- 17) Yalvac, E. D., Seasholtz, M. B., Beach, M. A. and Crouch, S. R. : Real-Time Analysis of Light Alkenes at Elevated Temperatures and Pressures by Fiber-Optic Near-Infrared Spectroscopy. *Appl. Spectroscopy* **51**(10), 1565 (1997).
- 18) Zhou, X. J., Hines, P. A., White, K. C., Borer, M. W. : Gas Chromatography as a Reference Method for Moisture Determination by Near-Infrared Spectroscopy. *Anal. Chem.* **70**(2), 390 (1998).
- 19) Morgan, E. : *Chemometrics: Experimental Design* p. 24 (1991).
- 20) Martens, H. and Naes, T. M. : *Multivariate Calibration*, John Wiley and Sons, New York p. 116 (1989).