

열분해질량스펙트럼에 의한 황금의 원산지 판별법 연구

이진균* · 박민석 · 임요한¹ · 박정일 · 권성원

서울대학교 약학과, ¹서울대학교 통계학과

Multivariate Analysis of Pyrolysis Mass Spectra of *Scutellaria baicalensis* to Identify its Origin

Jin Gyun Lee*, Min Seok Park, Johan Lim¹, Jeong Hill Park and Sung Won Kwon

Department of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Department of Statistics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract – To overcome the limit of morphological method for classification of herbal drug, a novel method to discriminate its origin using pyrolysis mass spectrometry-multivariate analysis was developed. This method was applied successfully to *Scutellaria baicalensis* Georgi, one of the most popular herbal drug in oriental countries. The ethylacetate soluble fractions were prepared by sonication from pulverized roots of *S. baicalensis* which were collected from various regions including Korea and China, and subjected to direct insertion probe (DIP) mass spectrometry to achieve mass spectra of pyrolyzates of extracts. The probe temperature was elevated from 30°C to 320°C at increasing rate 64°C/min, and the average mass spectrum calculated from total ion chromatography (TIC) was obtained. The relative peak intensities versus m/z were subjected to SAS program, and the training set (9 from Korea origin and 22 from China origin) was clustered two groups as its origin. In the test set, 11 samples among total 13 test sample were successfully classified according to their origin by developed method with accuracy of 85%.

Key words – Multivariate analysis, *Scutellaria baicalensis*, Pyrolysis mass spectrometry

황금(黃芩; root of *Scutellaria*)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 다년생 초본식물인 *Scutellaria baicalensis* Georgi의 뿌리를 이용한 생약으로, baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside 및 neobaicalein과 같은 다수의 플라본(flavones) 화합물을 주요성분으로 함유하고 있으며,¹⁻³ 항염증, 항알러지, 항균 등의 여러 약리효과가 보고되었다.⁴⁻⁶ 주로 한국, 중국, 몽골 및 시베리아 동부 지역에 걸쳐 분포되어 있으며, *S. viscidula* Bge., *S. amoena* C. H. Wright, *S. rehderiana* Diels, *S. ikonnikovii* Juz., *S. likiangensis* Diels., *S. hypericifolia* Levl. 등의 여러 동속식물도 역시 약용으로 사용되고 있다. 그러나, 대개의 경우 생약은 그 산지 및 재배환경의 차이에 따라 외형은 비슷할지라도 화학적 성분의 패턴에는 다소 차이가 있을 수 있으며, 이러한 성분의 차이는 곧 약효의 차이로 직결된다. 따라서, 일정한 약효를 기대할 수 있도록 생약을 표준화하기 위해서는 그 기원을 추

적할 수 있는 시스템을 갖추어야 하며, 특히 황금과 같이 재배 범위가 매우 넓은 경우 산지 판별법을 개발하는 것은 매우 중요한 과제라고 할 수 있다.

생약종의 판별법은 일반적으로 외형, 맛, 냄새 등에 의한 관능적 평가법에 의존해 왔으나, 절편, 분말화 또는 추출물의 형태로 가공되었을 경우에는 이러한 관능적 평가에 의한 구분이 매우 어렵다. 이러한 전통적 판별법의 한계를 극복하기 위하여, 생약의 기원에 따른 화학적 성분의 차이에 대한 함수관계를 통계적 연산법으로 해석하는 패턴인식법(pattern recognition)에 의한 판별법이 개발되고 있다. 패턴인식법은 각종 분석기기로부터 얻어지는 데이터를 토대로 하여 화학적으로 의미 있는 정보를 도출하는 데에 유용한 도구로 사용되고 있으며, 다양한 분야에서의 응용이 이루어지고 있다.⁷⁻¹¹ 최근 크로마토그래피 기기를 이용하는 다변량 분석법(multivariate analysis)이 주로 연구되어 왔는데,¹²⁻¹⁵ 이는 여러 성분을 분리 또는 정량함으로써 구성화합물과 그 함량에 관한 함수관계를 이용하여 그 산지 및 종을 구분하는 판별법에 활용되고 있다.

*교신저자(E-mail): gown1@snu.ac.kr
(Tel): +82-2-880-7880

황금은 플라본 배당체를 주요 성분으로 함유하고 있으며, 산지와 수확시기에 따라 함량의 편차를 보이는 것으로 보고되었다. 소수의 성분 함량 차이를 이용하여 산지 구분에 대한 규칙성을 찾기는 어려우므로, 최근 HPLC와 같은 기기분석으로부터 얻어진 다수 성분의 함량차이를 패턴인식 방법으로 해석하여 산지구분을 시도한 연구가 보고된 바 있다. 그러나, 크로마토그래피에 의하여 다양한 성분을 효과적으로 분리하기 위해서는 일정한 측정 시간을 필요로 하는데, 시료의 개수가 매우 많을 경우 데이터를 얻는 과정에서 적지 않은 시간을 요구하게 된다. 강 등은 핵자기공명분광법 (NMR; nuclear magnetic resonance)을 도입하여 STOCSY (statistical total correlation spectroscopy spectrum)를 이용한 황금의 산지 구분법에 대하여 연구하였다.¹⁶⁾ 이는 전처리 절차가 단순하며 시료의 농도가 높을 경우 정해진 시간 내에 보다 많은 개수의 시료를 분석할 수 있다는 장점이 있는 반면, 그 특성상 많은 양의 시료를 필요로 하게 되므로 여전히 분석상의 경제성이 떨어지는 단점이 있다.

이러한 단점들을 극복하기 위하여 질량분석법을 도입할 수 있으나, 단백질 등의 고분자를 많이 함유하고 있을 경우 이에 대한 응용범위는 매우 제한적이다. 그러나, 열분해 (pyrolysis) 질량분석의 경우, 그 분자량에 관계 없이 일정 조건 하에서 열분해에 의해 생성되는 열분해산물(pyrolyzate)에 대한 스펙트럼을 매우 신속하게 얻을 수 있으며, 이를 다변량 분석법에 적용할 경우 분자구조에 대한 종합적 정보를 얻을 수 있게 된다. 본 연구에서는 산지가 명확한 다수의 황금 시료의 에칠아세테이트(ethyl acetate) 추출물을 대상으로 열분해질량분석을 시행하고, 여기서 얻어진 분자량 정보가 다변량 분석에 의한 황금의 산지 판별법 개발에 활용될 수 있는지에 대한 여부를 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 판별법 설정을 위한 training set의 황금 시료는 총 36종(국산 13종 및 중국산 23종)으로, 산지에서 직접 채취하였으며, 실제 판별 분석을 위한 test set의 황금 시료는 총 13종(국산 11종 및 중국산 2종)으로 서울 제기동 소재 경동시장에서 구입하였다. 구입한 황금은 절편으로 썰지 않은 것을 구입하여 관능적 평가에 의하여 종을 확인하였으며, 동덕여자대학교 약학대학에서 감별을 시행하였다.

시약 및 기기 - 황금 추출액의 열분해질량스펙트럼(pyrolysis mass spectra)은 Jeol MStation JMS-700 mass spectrometer (Japan)을 이용하여 측정하였다. 통계분석에는 연구목적으로 이용되는 일반적인 사양의 IBM compatible PC (Intel Pentium 4 2.4 GHz, 1GB system memory)를 사용하였으며, Microsoft Windows XP 기반의 SAS release 9.1을 이용하였다. 황금의 추출에 사용된 에칠아세테이트는

시그마 (USA)사로부터 구입하였으며, 이외에 언급되지 않은 모든 시약은 특급을 사용하였다.

시료전처리 - 채취한 황금은 통풍이 잘되는 그늘에서 자연 건조시켰으며, 완전히 건조한 뒤 분쇄기를 이용하여 균질하게 분말화하였다. 원심분리관에 황금 분말 약 200 mg을 정밀히 달아 넣고, 여기에 에칠아세테이트 1 mL을 가한 뒤 30분간 초음파 추출하였다. 추출액을 200 × g에서 원심분리 한 후 그 상정액을 열분해질량스펙트럼 측정하였다.

열분해질량스펙트럼의 측정 - 황금 추출액 미량을 DIP (direct insertion probe)를 이용하여 MS에 주입한 후 다음과 같은 조건 하에서 열분해질량스펙트럼을 얻었다. Probe의 초기 온도를 30°C로 시작하여 64°C/분의 급격한 속도로 320°C까지 승온시켜서 total ion chromatogram (TIC)을 얻은 뒤, 관찰되는 전체 봉우리의 면적에 대한 평균적인 질량스펙트럼을 얻었다. 이 때 이온화에너지(ionization energy)는 70 eV로 하였다.

다변량분석 - 열분해질량스펙트럼의 원시자료를 통계학적 분석에 이용하기 위하여, 분자량 (m/z)에 따른 피크의 강도를 수치화 한 뒤, 적절한 방법으로 missing value를 처리하고 변수를 선택하였다. 시료의 주입량 또는 질량분석기의 측정조건에 따른 시료 별 편차를 배제하기 위하여, 상용 spreadsheet 소프트웨어를 이용하여 스펙트럼 상 최대 피크의 크기에 대한 % 강도를 구하여 각 데이터를 표준화 (scaling)하였다. 통계분석에 사용할 대상 변수는 m/z 50 ~ 449 범위의 피크에 대한 상대적 강도로 하되, 총 400개의 분자량값에 대하여, 23종의 중국산 검체의 평균값과 13종의 국산 검체의 평균값 간 t-test를 실시하여, 두 군을 구분 지을 수 있는 피크를 선별하였으며, p-value가 0.2 이하로 유의성 있는 것만을 추려서 변수로 사용하였다.

또한 변수 중 상대적 강도가 1이하인 것은 변수로써의 의미가 적었으므로 제외하였다. 원산지가 명확한 36가지의 검체에 대하여 m/z 값을 행으로, 검체의 이름을 열로 하여 SAS에 적용할 최종 training data set을 작성하고, 이로부터 군집분석(cluster analysis)을 시행하였다. 본 판별법에 대한 타당성을 검증하기 위하여, 실제 시중에서 구입한 13종의 황금 시료를 적용하여 판별분석(discriminant analysis)을 시도하였다

결과 및 고찰

생약 시료와 같은 복합혼합물의 양적 관계는 이를 구성하는 개개 성분의 농도들의 합과 측정 가능한 물리화학적 성질 사이의 함수관계로 설명될 수 있다. 이러한 시스템은 단일독립변수 보다는 복수의 독립변수에 대한 복수의 종속변수의 함수관계로 보는 것이 타당하며, 다변량 시스템 (multivariate system)을 가진 생약 시료의 경우에는 다변량

분석법에 의해 분석되어야 한다. 즉, 기원이 서로 다른 생약의 여러 화학적 성분의 차이는 다변량 분석을 거쳐 그 기원을 추적할 수 있는 단서를 제공한다. 본 연구에서는 황금의 에칠아세테이트 추출물의 열분해 질량스펙트럼으로부터 얻어진 다변량 변수를 기초로 그 산지를 추적하는 판별법을 개발하고자 하였다. 황금은 baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside 등의 다소 극성이 적은 플라본 화합물을 주요 지표성분으로 함유하고 있는데, 이들은 에칠아세테이트에 의해 비교적 용이하게 추출되므로 열분해질량분석법에 의해 이들 화합물에 대한 종합적인 분자량 정보를 신속하게 얻을 수 있다.

먼저 원산지가 명확한 36종의 황금에 대하여 (Fig. 1)과 같은 열분해 질량스펙트럼을 얻었는데, 육안으로 보더라도 산지에 따라 질량분석스펙트럼의 패턴이 서로 다른 것을 알 수 있다. 질량분석결과와 정보를 SAS에 도입하기 위해서는 적절한 데이터의 전처리 과정이 요구되는데, raw data 파일의 데이터베이스화, missing value의 처리, scaling, 변수의 선택과정 순으로 구성된다. 대부분의 생약에서 m/z 50 이하의 분자량은 매우 중첩이 심해 변별력을 잃게 되므로, 유효 질량 범위를 m/z 50~449로 설정하였고, 불필요한 연산량의 증가를 피하기 위하여 t-test를 통하여 총 400개의 변수 중 유의성이 있는 20개의 변수만을 선별하였다. 선별된 변수를 대상으로 SAS를 이용하여 설정된 code에 따라 군집분석을

시도한 결과, (Fig. 2)와 같이 산지에 따라 2개의 군집으로 구분됨을 확인하였다. 결과에는 나타나지 않았지만, SAS의 결과출력물을 통해 eigenvalue가 1 이상인 factor가 모두 총 20개이며 그들의 cumulative는 99%임을 확인하였는데, 이는 본 판별분석에 유효한 적절한 크기의 변수가 있음을 의미하는 것이다.

총 35종의 시료 중 4종 (A1, A4, A12, A21)을 제외하고, training set에 포함된 31종의 시료가 산지 별로 구분됨으로써, 설정된 판별 함수가 황금의 산지 구분에 적절함을 확인하였다. 별도로 시중에서 구입한 13종의 시료를 본 판별법에 적용하여 그 타당성을 고찰하였다. 그 결과, 중국산 2종 및 국산 11종으로 구성된 13종의 황금 시료에 대하여 11가지 시료가 산지에 따라 국산과 중국산으로 구분되었는데, (Fig. 3) 일부 황금이 그 원산지가 다르게 표시된 것은 본 판별법의 정확도에 의한 것일 수 있겠으나, 정확도를 더욱 향상시키기 위해서는 training set에 포함된 시료의 개수와 산지의 범위를 더욱 확대하여, 보다 많은 변별력 있는 변수를 추출하는 과정이 필요하다고 여겨진다.

이상의 결과로부터 질량분석스펙트럼의 다변량 값은 원산지 추적을 위한 통계적 판별법에 적절한 변수로 적용됨을 알 수 있으며, 특히 질량분석에 열분해 과정을 도입함으로써 함유 성분에 대하여 보다 종합적인 정보를 얻을 수 있으므로 변별력이 높은 다수의 변수를 얻을 수 있다. 또한 본

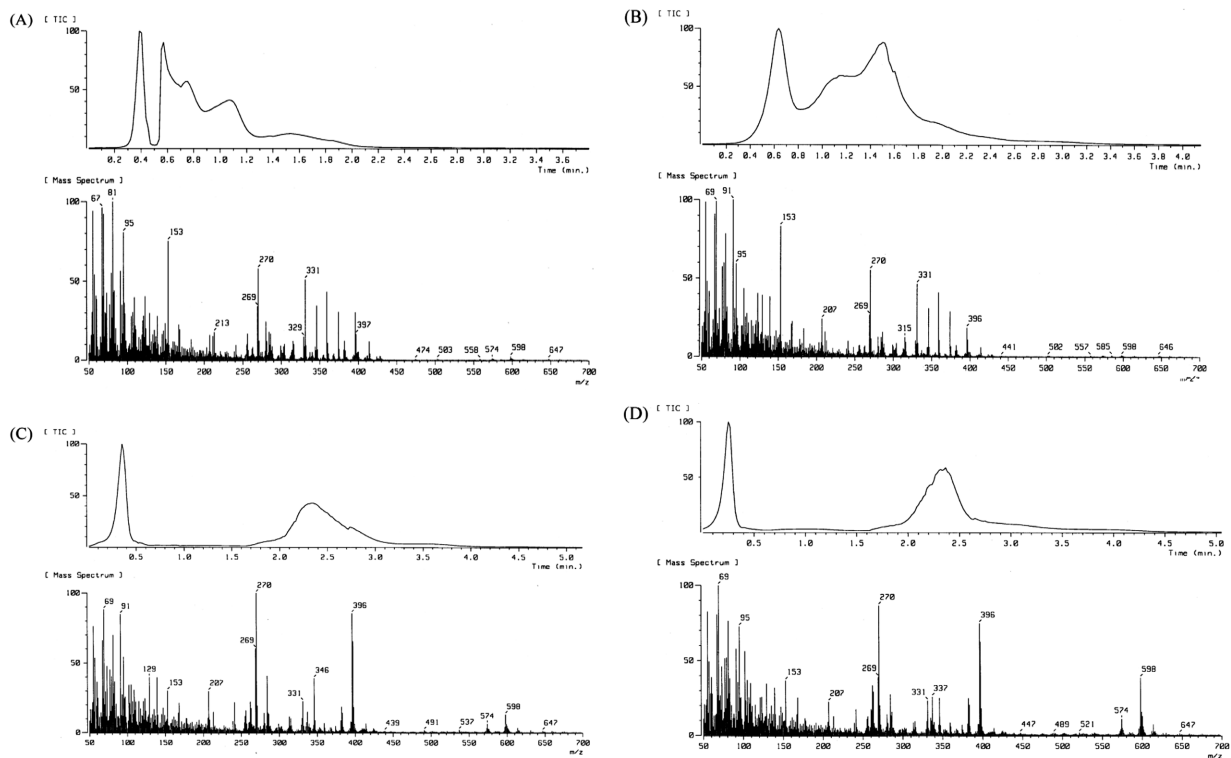


Fig. 1. Representative TIC and pyrolysis MS spectra of ethylacetate soluble fraction of *S. baicalensis*, collected from Korea (A, B) and China (C, D).

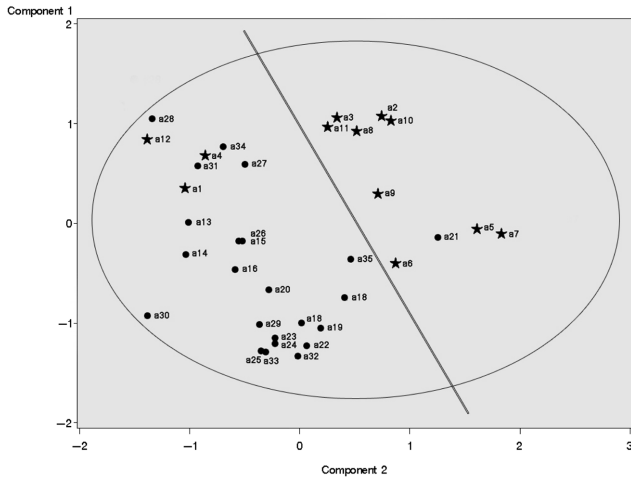


Fig. 2. The discriminant analysis of training set by SAS (★: Korea origin, ●: China origin).

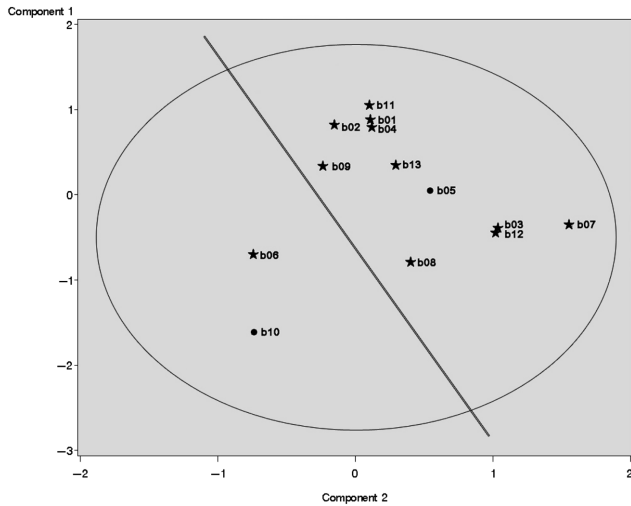


Fig. 3. The discriminant analysis of test set by SAS (★: Korea origin, ●: China origin).

산지 판별법은 추출액 전체에 대한 평균질량스펙트럼을 이용하는 것으로, 크로마토그래피에 의한 다변량 분석법과는 달리 시료의 전처리법 및 측정 과정이 매우 간편하고 신속하므로, 많은 수의 검체에 대한 데이터를 용이하게 얻을 수 있다는 장점이 있다. 결론적으로 이 판별법은 황금 뿐 아니라, 여러 근연 동속 식물이 혼재되어 유통되는 생약재에도 적용할 수 있을 것으로 사료되며, 보다 경제성 있고 객관적인 산지 추적 시스템을 구축하는 데에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 2009년도 정부재원(교육과학기술부 일반연구 자지원사업)의 지원을 받아 연구되었음(2009-0073442).

인용문헌

- Li, H. B., Jiang, Y. and Chen, F. (2004) Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *J. Chromatogr. B* **812**(1-2): 277-290.
- Li, H. B. and Chen, F. (2005) Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1074**(1-2): 107-110.
- Wu, S., Sun, A. and Liu, R. (2005) Separation and purification of baicalin and wogonoside from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1066**(1-2): 243-247.
- Li, B. Q., Fu, T., Gong, W. H., Dunlop, N., Kung, H. F., Yan, Y., Kang, J. and Wang, J. M. (2000) The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology* **49**(3): 295-306.
- Kim, E. H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J. S., Yu, Y. B. and Chun, M. (2009) Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *J. Ethnopharmacol.* **126**(2): 320-331.
- Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., Ko, S. G., Choi, H. Y., Oh, M. S. and Park, W. (2009) Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **125**(2): 286-290.
- Valcarce, R. V., Smith, G. G., Torell, J. M. and Evans, J. O. (1989) Differentiation of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) accessions based on chemical constitution using Curie-point pyrolysis-mass spectrometry-pattern recognition. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **17**(1): 5-24.
- Neidig, K. P., Saffrich, R., Lorenz, M. and Kalbitzer, H. R. (1990) Cluster analysis and multiplet pattern recognition in two-dimensional NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **89**(3): 543-552.
- Sarker, M., Graham Glen, W., Yin, L. B., Dunn Iii, W. J., Scott, D. R. and Swanson, S. (1992) Comparison of SIMCA pattern recognition and library search identification of hazardous compounds from mass spectra. *Anal. Chim. Acta* **257**(2): 229-238.
- Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2001) Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **39**(1): 1-40.
- Shin, E. J., Hajaligol, M. R. and Rasouli, F. (2003) Characterizing biomatrix materials using pyrolysis molecular beam mass spectrometer and pattern recognition. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **68-69**: 213-229.
- Nijhuis, A., de Jong, S. and Vandeginste, B. G. M. (1997) Multivariate statistical process control in chromatography. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **38**(1): 51-

- 62.
13. Garc, M. C., Torre, M. and Marina, M. L. (2000) Characterization of commercial soybean products by conventional and perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography and multivariate analysis. *J. Chromatogr. A* **881**(1-2): 47-57.
14. Rodriguez-Nogales, J. M., Garcia, M. C. and Marina, M. L. (2006) Development of a perfusion reversed-phase high performance liquid chromatography method for the characterisation of maize products using multivariate analysis. *J. Chromatogr. A* **1104**(1-2): 91-99.
15. Tianniam, S., Tarachiwin, L., Bamba, T., Kobayashi, A. and Fukusaki, E. (2008) Metabolic profiling of *Angelica acutiloba* roots utilizing gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for quality assessment based on cultivation area and cultivar via multivariate pattern recognition. *J. Biosci. Bioeng.* **105**(6): 655-659.
16. Kang, J., Choi, M. Y., Kang, S., Kwon, H. N., Wen, H., Lee, C. H., Park, M., Wiklund, S., Kim, H. J., Kwon, S. W. and Park, S. (2008) Application of a ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines. *J. Agric. Food Chem.* **56**(24): 11589-11595.
- (2010. 7. 9 접수; 2010. 10. 5 심사; 2010. 10. 11 게재확정)