

근적외선 분광분석법을 이용한 관상엽 화학성분 평가

한영림^{*1} · 한정호¹ · 이호근¹ · 제병권¹ · 강광원¹ · 이기열² · 어성제²

¹KT&G 연구원, ²태아산업(주)

(2013년 11월 8일 접수 ; 2013년11월 21일 수정 ; 2013년 11월 29일 승인)

Evaluation of Chemical Composition in Reconstituted Tobacco Leaf using Near Infrared Spectroscopy

Young-Rim Han^{*1}, Jungho Han¹, Ho-Geon Lee¹, Byong-Kwon Jeh¹,

Kwang-Won Kang¹ Ki-Yaul Lee² and Seong-Je Eo²

¹KT&G Research Institute, ²TAE-A Industrial Co. LTD.

(Received Nov 8, 2013; Revised Nov 21, 2013; Accepted Nov 29, 2013)

ABSTRACT : Near InfraRed Spectroscopy(NIRS) is a quick and accurate analytical method to measure multiple components in tobacco manufacturing process. This study was carried out to develop calibration equation of near infrared spectroscopy for the prediction of the amount of chemical components and hot water solubles(HWS) of reconstituted tobacco leaf. Calibration samples of reconstituted tobacco leaf were collected from every lot produced during one year. The calibration equation was formulated as modified partial least square regression method (MPLS) by analyzing laboratory actual values and mathematically pre-treated spectra. The accuracy of the acquired equation was confirmed with the standard error of prediction(SEP) of chemical components in reconstituted tobacco leaf samples, indicated as coefficient of determination(R^2) and prediction error of sample unacquainted, followed by the verification of model equation of laboratory actual values and these predicted results. As a result of monitoring, the standard error of prediction(SEP) were 0.25 % for total sugar, 0.03 % for nicotine, 0.03 % for chlorine, 0.16 % for nitrate, and 0.38 % for hot water solubles. The coefficient of determination(R^2) were 0.98 for total sugar, 0.97 for nicotine, 0.96 for chlorine, 0.98 for nitrate and 0.92 for hot water solubles. Therefore, the NIRS calibration equation can be applicable and reliable for determination of chemical components of reconstituted tobacco leaf, and NIRS analytical method could be used as a rapid and accurate quality control method.

Key words : near infrared spectroscopy, chemical components, reconstituted tobacco leaf

*연락처 : 305-805, 대전광역시 유성구 가정로 30, KT&G 연구원

*Corresponding author : KT&G Research Institute, 30 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea
(phone : 82-42-866-5353; fax: 82-42-866-5509; e-mail: yrhan@ktng.com)

관상엽은 잎담배 가공 중 발생하는 주맥과 엽설, 제조과정 중 발생하는 엽맥편, 각초설 등을 사용하여 담배잎과 유사한 품질을 가지는 시트상의 제품으로 제조하여 담배제조 시 잎담배와 함께 사용되는 원료이다. 관상엽을 시트상으로 제조하기 위해 제지식과 슬러리식 제조공법이 적용되며 현재는 가공성이 높은 제지식 공법을 주로 사용하고 있다. 제지식 공법은 다양한 종류의 원료들을 물과 함께 펄핑하고 추출액과 섬유소를 분리하여 처리한 다음 초지에 농축 추출액을 도포하는 과정을 거친다. 원료 종류별, 원료 산지별 화학성분 차이를 반영하여 다양한 원료를 일정비율 배합하여 관상엽 제품을 생산함으로써 최종 제품 화학성분을 균일하게 관리하는 것은 제품담배 품질 균일성과 직접 관련된다. 즉, 농축 추출액 도포 공정은 관상엽 화학성분을 결정하는 중요한 공정으로, 최종 제품의 화학성분을 실시간으로 모니터링 하여 농축 추출액 도포량을 제어할 수 있어야 품질편차를 감소시킬 수 있다. 따라서 쉽고 빠르며 재현성 있는 모니터링 방법이 필요하게 되었다. 하지만 기존의 습식 분석 방법은 정확도와 재현성은 높으나 분석 소요 시간이 길어 공정 품질관리에 빠르게 feed-back하여 제어하기 어려운 실정이다. 따라서 현재 다양한 산업 분야에서 응용되고 있는 근적외선 분광분석법을 적용해보고자 한다.

근적외선 분광분석법(NIRS : Near InfraRed Spectroscopy)은 시료 분자(-CH, -NH, -OH 등)에 의해 흡수되는 근적외선 흡광 특성을 이용하여 시료를 분석하는 방법이다. 기존 이화학 분석 방법에 비해 간편한 시료 전처리와 빠른 측정 속도와 그리고 동시에 여러 성분 분석이 가능한 장점을 가지고 있어 제조 공정의 품질 관리 제어에 유용하게 활용되고 있다. 1960년대 초 미국 농무성의 Karl Norris에 의해 개발된 근적외선 분광분석법은 컴퓨터 산업 발전에 힘입어 처음으로 농산물 성분 분석을 실용화(Osborne과 Fearn, 1986)한 후에 응용범위가 확대되어 농업, 식품 및 사료 분야 뿐만 아니라 담배, 화학, 생화학, 화장품, 의학, 제약 및 제지 산업 분야(Bense 등, 1983; Delac 등, 1990; Hamid 등 1978; McClure 등

1977; Pandeya 등 1978; Osborne 등, 1993; 한 등, 2010)에 널리 보급되어 사용되고 있다. 국내 담배 분야에서도 원료엽의 화학성분과 관별 분석 등에 적용한 연구가 보고되었다(김 등, 1995, 1998, 1999, 2005; 조 등 1994; 장 등, 1998). 근적외선 분광분석법으로 관상엽 화학성분을 분석하기 위해서는 관상엽 사용 원료인 엽설, 주맥 및 제조공장 원료 등 다양한 종류에서 기인되는 모든 변이를 포함하는 검량식(calibration equation)이 개발되어야 분석 정확도와 재현성이 높아진다. 그러나 기존 담배 분야에서 개발된 검량식은 관상엽 시료 특성 차이와 변이를 포함하고 있지 않아 분석 정확도와 재현성이 낮아서 활용하기 어려운 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 관상엽 주요 품질 평가 항목인 니코틴, 전당 등 화학성분을 제조 현장에서 빠르고 쉽게 분석 가능하도록 근적외선 분광분석법을 적용하여 관상엽 시료의 근적외선 스펙트럼 측정을 통하여 재현성과 정확도가 높은 검량식을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

관상엽 시료의 분석

본 시험에 사용된 관상엽은 08년 ~ 09년도 생산된 제품 330점을 생산일자별로 제조 공정에서 수집하였다. 수집된 시료는 50 °C에서 건조하여 사이클론 분쇄기(Cyclotec, model 1093, Foss, Sweden)를 이용하여 시료 입자에 대한 스펙트럼 변이를 최소화하기 위해 0.45 mm이하로 분말화하여 분석에 사용하였다. 검량식 작성과 검증 시료의 실험실 분석 값은 자동분석법(Bran+Luebbe, Autoanalyzer II)을 이용하여 니코틴, 전당, nitrate, 염소 성분을 정량 분석하였으며, Hot Water Solubles(HWS)는 관상엽의 추출액 도포량 수준을 평가하는 품질 관리 항목으로 온수추출법을 이용하여 분석하였다. HWS는 분쇄 시료 1 g을 취하여 증류수 100 mL를 첨가한 후 100°C에서 1 시간 동안 추출한 다음 여과된 잔사 무게를 측정하여 수용성 성분 함량을 백분율로 표시한다. 제지식 관상엽의 추출액 도포량 수준 관리는 화학성분 함량, 키크미 및 물리성 등에 모두 영향을

미치므로 중요한 품질관리 항목 중 하나이다.

관상엽 시료의 NIRS 스펙트럼 측정 및 스펙트럼 전처리

분쇄한 시료는 수분에 따른 변이를 보정해주기 위해 상대습도 45 %, 55 % 및 65 %에서 조습처리한 후 동일한 방법으로 근적외선 분광기(NIRS, model 6500, Foss, Sweden)의 rectangular sample cup에 채우고 파장 400 nm ~ 2500 nm 범위에서 확산 반사 스펙트럼을 얻었다. 이 근적외선 스펙트럼을 ISI 3 software (Infrasoft International, 1992) NIR 통계 프로그램을 이용하여 first derivative 스펙트럼으로 변형한 다음 PCA (Principle Component Analysis) 기법을 활용하여 모집단을 형성하고 모집단과 특성이 상이한 시료 (mahalanobis distance 3.0 이상)는 제외하였다. Select sample 방법으로 검량식 작성을 위한 표준군(calibration group) 시료 30점과 모델 적합성을 판단하기 위한 검증군(validation group) 시료 30점으로 나누었다. 검량식 작성은 스펙트럼을 1차 미분하고 파장 8 nm 간격으로 4개점을 normalization 한 후, 스펙트럼을 산란보정(standard normal variant and detrend)하여 시료를 4개 상호확인그룹(cross validation groups)으로 나누어 각 그룹의 주성분 점수(principal component score)와 기존 분석 성적을 수정부분최소자승(MPLS, modified partial least square)방법에 의해 성분별로 작성하였다. 작성된 검량식의 정확도 판단을 위해 검량식 작성 시료의 실험실 분석 값과 NIR 예측 값 간의 표준오차(SEC, standard error of calibration)와 결정계수(R^2 , coefficient of determination)로 나타내었다. 또한 개발된 검량식의 예측정확도 검증에 위해 검량식 작성에 사용되지 않은 30개의 시료를 실험실 분석값과 NIR 예측값 간의 표준오차(SEP, standard error of prediction)를 포함한 결정계수로 나타내었다.

결과 및 고찰

동일한 관상엽 시료를 상대습도 45 %, 55 % 및 65 %에서 조습하여 시료 수분을 달리한 다음

근적외선 스펙트럼을 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 상대습도가 낮아(RH 45 %) 제품 수분이 낮을 때 보다 상대습도가 높아 제품 수분이 높을 때 물분자의 O-H band 흡수영역인 1450 nm, 1950 nm 대 흡광도가 높음을 알 수 있다. 이는 관상엽 주요성분인 질소계 N-H band에 영향을 줌으로써 관상엽 시료의 스펙트럼 특성을 나타내는 데 저해요인이 될 수 있다. 시료 수분 변화에 따른 근적외선 스펙트럼 변이가 나타난 것은 분자 간 또는 분자 내 O-H stretch와 O-H bending 진동 모드 결합의 흡수밴드에 영향을 주어 스펙트럼 shift가 일어나는 것으로 문헌에서도 보고된 바 있다(Nagarajan 등, 2006). 따라서 시료 수분 함량에 따른 스펙트럼 변이를 보정해주기 위해서 시료 분석 시 실제 수분 범위를 고려하여 동일 시료에 대해 변동 가능한 수분 범위(8~15%)를 포함하도록 조습 처리하여 3 반복 측정하였다.

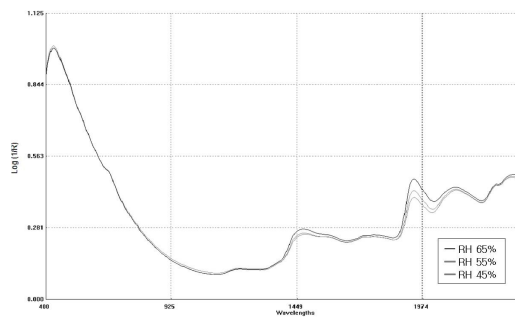


Fig. 1. Overlaid spectra of reconstituted tobacco leaf samples with different moisture content.

검량식 작성에 사용된 시료들의 근적외선 스펙트럼을 1차 미분한 결과는 Fig. 2와 같다. 흡광 산란 노이즈가 큰 400 nm ~ 1098 nm의 파장 범위는 제외하고, 결합대(combination band)와 배음대(overtone band)가 존재하는 근적외선 영역인 1100 nm ~ 2498 nm의 스펙트럼 영역을 검량식 작성에 사용하였다. 그리고 낮은 흡광도를 가지는 근적외선 스펙트럼인 N-H band 등의 시료 특성을 잘 나타내기 위해 원시 스펙트럼을 1차 미분

하여 사용하고, 미분화된 스펙트럼의 노이즈를 제거하기 위해 스펙트럼을 산란 보정하였다.

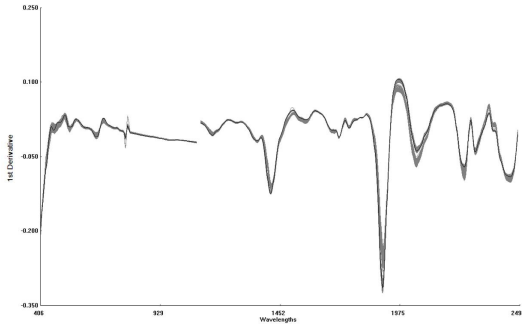


Fig. 2. NIR first derivation spectra of reconstituted tobacco leaf samples.

관상엽 시료별 스펙트럼과 실제 실험실 분석값으로 검량식을 작성한 결과는 Table 1과 같다. 수집한 스펙트럼의 주성분 분석을 통해 검출된 유의적 스펙트럼의 수가 화학성분별로 863 ~ 890 개로 관상엽 제품의 화학성분 변이가 충분히 반영되었다. 검량식 작성을 위한 MPLS chemometrics 결과와 검량식 작성 시료의 실험실 분석 값 간의 분석 항목별 표준오차(SEC), 결정계수(R^2) 및 표준오차를 실험실 분석 값 평균과 나눈 값의 백분율은 전당 0.18 %, 0.98, 0.02 %, 니코틴 0.02 %, 0.97, 0.03 %, 염소 0.02 %, 0.98, 0.02 %, nitrate

0.12 %, 0.98, 0.08 %, HWS 0.37 %, 0.92, 0.01 %로 나타났으며 표준오차가 작고 결정계수(R^2)가 높은 검량식 결과를 얻었다.

검량식의 정확도를 검증하고자 개발된 검량식을 이용하여 검량식에 사용되지 않은 관상엽 시료에 대해 실험실 분석을 하고 그 시료의 근적외선 스펙트럼을 측정하여 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 근적외선 분광분석 결과와 실험실 분석결과값 간의 표준오차로 미지시료 측정 시 예측되는 표준오차(SEP), 결정계수(R^2) 및 표준오차를 실험실 분석값 평균과 나눈 값의 백분율은 전당 0.25 %, 0.98, 0.03 %, 니코틴 0.03 %, 0.97, 0.04 %, 염소 0.03 %, 0.96, 0.03 %, nitrate 0.16 %, 0.98, 0.10 %, HWS 0.38 %, 0.92, 0.01 %로 나타났으며 관상엽 시료의 근적외선 분광분석값과 실험실 분석값 간의 표준오차가 작고 결정계수(R^2)가 높아 정확도가 높은 검량식으로 검증되었다.

Table 2의 검량식 검증시료를 각 화학성분별로 NIR 예측 값과 실험실 분석 값을 비교하여 직선 회귀식(linear regression)으로 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. 각 화학성분별로 낮은 함량 시료부터 높은 함량 시료까지 회귀식에 근접하여 실제 분석정확도가 높게 나타났으며, 시료 측정 시 나타날 수 있는 기기적 편차나 시료 전처리 재현성의 지표인 bias가 0에 가까워 bias 조정 없이 현장 적용 분석이 가능할 것으로 판단된다.

Table 1. The calibration statistics for chemical components in reconstituted tobacco leaf samples

Component	Number of samples	Mean ¹⁾ (%)	SEC ²⁾ (%)	SEC/Mean (%)	R^2 ³⁾
Total sugar	890	9.42	0.18	0.02	0.98
Nicotine	883	0.73	0.02	0.03	0.97
Chlorine	863	1.12	0.02	0.02	0.98
Nitrate	885	1.43	0.12	0.08	0.98
HWS	881	41.9	0.37	0.01	0.92

1) mean of standard laboratory analytical result

2) standard error of calibration 3) coefficient of determination

Table 2. The prediction statistics for chemical components in reconstituted tobacco leaf samples

Component	Mean ¹⁾ (%)	SEP ²⁾ (%)	SEP/Mean (%)	Slope	Bias	R ² ³⁾
Total sugar	9.35	0.25	0.03	1.034	0.116	0.98
Nicotine	0.68	0.03	0.04	1.012	0.014	0.97
Chlorine	1.02	0.03	0.03	1.082	0.014	0.96
Nitrate	1.64	0.16	0.10	1.023	0.076	0.98
HWS	42.1	0.38	0.01	1.035	0.125	0.92

1) mean of standard laboratory analytical result
 2) standard error of prediction 3) coefficient of determination

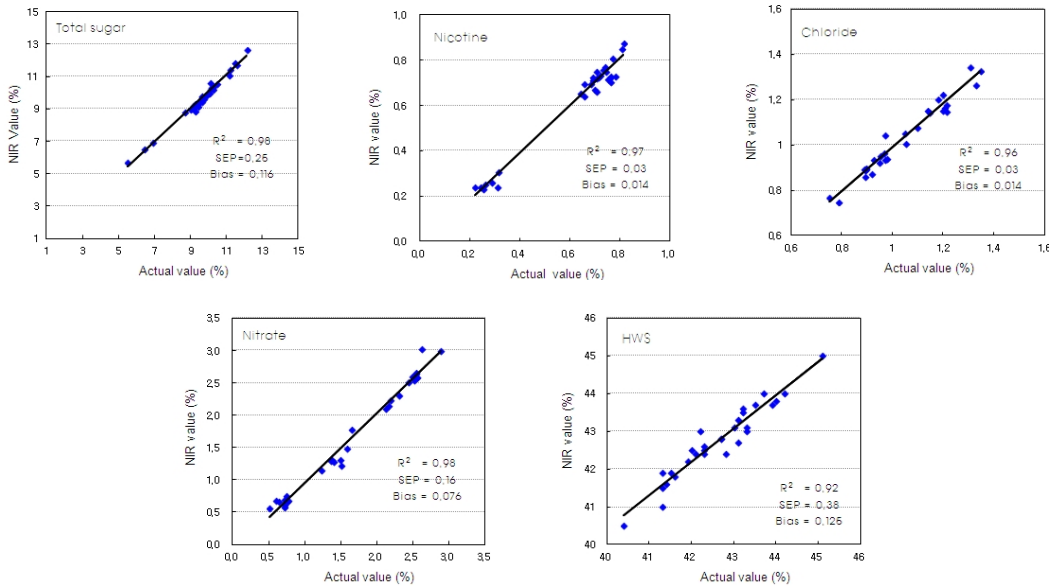


Fig. 3. Linear regression of NIR predicted values and actual values for chemical components in unknown reconstituted tobacco samples.

결론

본 연구에서는 근적외선 분광분석법을 이용하여 제조공정 중 관상엽 화학성분을 신속히 분석하여 feed-back할 수 있는 분석법을 확립하였다. 근적외선 분광분석법으로 검량식을 작성한 결과, 관상엽 화학성분 및 HWS 항목의 표준오차(SEC)

는 전당 0.18 %, 니코틴 0.02 %, 염소 0.02 %, nitrate 0.12 %, HWS 0.37 %로 나타났으며 결정 계수(R²)는 전당 0.98, 니코틴 0.97, 염소 0.98, nitrate 0.98, HWS 0.92로 표준오차가 작고 결정 계수가 높은 검량식을 얻었다. 또한, 검량식의 정확도를 검증한 결과, 표준오차(SEP)는 0.03 ~ 0.38 %, 결정계수(R²)는 0.92 ~ 0.98, 표준오차를

실험실 분석 평균값과 나눈 값의 백분율은 0.01 ~ 0.10 %를 보여 검량식 정확도가 높음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 검량식을 적용하여 관상엽 생산 품질 관리에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Bense, T. and Gastellu C. (1983) Estimation of total volatile bases in tobacco by near infrared (NIR) reflectance spectrophotometry, *Tob. Sci.* 27: 92-94.
- Delac, S. (1990) Determination of total alkaloids and total nitrogen by near infrared reflectance spectroscopy, 7-11th International Coresta Symposium, Kallithea, Halkidiki, Greece.
- Hamid, A., McClure W. F. and Weeks W. W. (1978) Rapid spectrophotometric analysis of the chemical composition of tobacco. part 2; total alkaloids, *Beitrage zur Tabakforschung* 9: 267-274.
- McClure, W. F. and Norris K. H. (1977) Rapid spectrophotometric analysis of the chemical composition of tobacco, Part 1; total reducing sugar, *Beitrage zur Tabakforschung* 9: 13-18.
- Nagarajan R., Parul Singh, and Ranjana Mehrotra (2006) Direct determination of moisture in powder milk using near infrared spectroscopy. *J. Auto. M.* 2006: 1-4.
- Osborne, B. G. and T. Fearn (1986) Near infrared spectroscopy in food analysis. p. 1-182, 1st ed., B. G. Osborne and T. Fearn Ed., Longman Scientific & Technical, Harlow Essex, U.K.
- Osborne B. G., Fearn T, and Hindle P. H. (1993) Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis, p. 227, Longman Scientific & Technical, Essex, England.
- Pandeya, R. S., Nestorrosa F. H. W. and Elliot J. M. (1978) Rapid estimation of some flue-cured tobacco chemical characteristics by infrared-reflectance spectroscopy, *Tob. Sci.* 22: 27-31.
- 김용욱, 정한주, 백순옥, 김기환 (1995) 근적외선 분광법을 이용한 버어리 토스트엽의 화학성분 분석, *한국연초학회지* 17(2): 177-183.
- 김용욱, 이경구, 장기철, 김기환 (1998) 근적외 분광분석법을 이용한 황색종 잎담배의 화학성분 분석, *한국연초학회지* 20(2): 183-190.
- 김용욱, 장기철, 이경구 (1999) 근적외 분광분석법을 이용한 버어리종 잎담배 화학성분 분석, *한국연초학회지* 21(1): 95-101.
- 김용욱, 장기철, 이철희, 정한주 (2005) 근적외 분광분석법을 이용한 담배 중 전취발성 염기 분석, 27(2): 207-211.
- 장기철, 김용욱, 이경구 (1998) 근적외 분광분석법을 이용한 한국산과 미국산 잎담배의 판별분석, *한국연초학회지* 20(2): 191-197.
- 조래광, 이경희, 이정환, 권영길 (1994) 근적외 분광분석법에 의한 잎담배의 품질측정 자동화, *한국농화학회지* 37(5): 349-355.
- 한윤희, 신용민, 박성배, 남성운, 김효진 (2010) 근적외선 분광분석을 이용한 종이기록물의 비파괴 특성평가 연구, *Ana. Sci. & Tec.* 23(3): 304-311.