

# Application News

No. 01-00420-K

## LCMS-2050 High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer 단일 사중극자 질량분석기를 이용한 알코올성 음료의 식품대사체학 -올리고당과 다당류 프로파일링-

Food Metabolomics of Alcoholic Beverage Using Single-Quadrupole Mass Spectrometer -Oligosaccharide and Polysaccharide Profiling-

### 사용자 활용 포인트

- ◆ 단일 사중극자 LC/MS 시스템은 나노그램 수준에서 올리고당의 고감도 분석을 제공한다.
- ◆ LCMS-2050 시스템의 넓은 질량분석 범위는 알코올 음료에서 올리고당과 다당류의 폭넓은 프로파일링을 제공한다.
- ◆ Multi-omic Analysis Package를 이용하면 익숙하지 않은 사용자도 다변량 분석을 쉽게 수행할 수 있다.

### ■ 서론

식품 대사체학은 식품에 대사체학 기술을 적용한 것을 의미한다. 최근 식품 대사체학은 식품의 품질 평가, 품질 예측, 제조 및 저장 공정 개선, 기능성 평가와 같이 다양한 목적으로 사용되기 시작했다. 식품에는 엄청난 양의 대사체가 포함되어 있고 맛, 품질 및 기능성과 관련된 대사체의 상당수는 선행 연구를 통해 밝혀졌다. 이러한 이유로, 식품 대사체학은 일반적으로 이미 알려진 관심 성분을 대상으로 분석한다. 중요한 구성 성분에 초점을 맞추고 철저한 분석을 수행하는 것이 유용한 결과를 얻기 위한 효율적인 접근 방식이다. 이전 뉴스레터인 '01-00334-EN'에서는 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 사용하여 주로 아미노산, 유기산 및 핵산 대사체의 표적 분석을 수행한 식품 대사체학의 사례를 설명하고 있다.

이 뉴스레터에서는 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 사용하여 올리고당 및 다당류 성분의 포괄적인 분석 및 프로파일링을 수행한 사례를 설명하고자 한다. 삼중 사중극자 LC/MS 시스템에 비해 단일 사중극자 LC/MS 시스템은 더욱 저렴하고 간편한 파라미터를 제공하므로 질량분석에 익숙하지 않은 사용자도 쉽게 대사체 분석을 수행할 수 있다.

### ■ 시료 정보와 전처리

표 1에 분석된 라거 맥주(맥주 1), 에일 맥주(맥주 2), 저맥아 맥주(*happoshu*) 1종, 신유형 맥주(*daisan*) 1종, 무알콜 맥주 2종을 나타내었다. 시료는 각 음료를 증류수로 10배 희석하여 준비하였다.

표 1. 시료 정보

| 시료                         | 정보             |
|----------------------------|----------------|
| 맥주 1                       | 라거 맥주 (하면 발효)  |
| 맥주 2                       | 에일 맥주 (상면 발효)  |
| 저맥아 맥주 ( <i>happoshu</i> ) | 무설탕과 무퓨린       |
| 신유형 맥주 ( <i>daisan</i> )   | 콩단백질을 원료로 사용   |
| 무알콜 맥주 1                   | 무설탕과 무퓨린 (일본산) |
| 무알콜 맥주 2                   | 독일산            |

### ■ 분석조건

Nexera™ XR HPLC 시스템과 LCMS-2050 단일 사중극자 질량분석기로 분석하였다(그림 1). LCMS-2050 단일 사중극자 질량 분석기는 소형이지만 사용이 간편하고 성능이 뛰어나다.

LCMS-2050은 전자분무 이온화 (ESI) 방법과 대기압 화학 이온화 (APCI) 방법의 장점을 결합한 DUIS™ 이중 이온 소스가 장착되어 있으며,  $m/z$  2 - 2000 의 범위를 지원한다. 일반적으로 이러한 기능은 광범위한 물리적 특성을 가진 대사체를 분석하는 대사체학에서 특히 유용하다.



그림 1. Nexera™ XR과 LCMS-2050

HPLC 및 MS 분석 조건은 표 2에 나타내었다. 이 분석은 맥주에서 발견될 가능성이 있는 말토올리고당 및 다당류를 대상으로 했으며, 선택 이온 모니터링(SIM) 모드는 최대 40개의 단당류 단위가 있는 분자를 동시에 분석할 수 있게 설정하였다. 분자량이 1500 이상인 성분은 측정 가능한 질량 범위와 감도를 고려하여 다가 이온(multivalent ion)으로 분석되었다.

표 2. 분석조건

| HPLC 조건 (Nexera XR) |                                                                                                     |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column              | Shodex Asahipak NH2P-40 3E (250 mm x 3.0 mm I.D., 4.0 μm)                                           |
| Flowrate            | 0.3 mL/min                                                                                          |
| Mobile Phases       | A) 2.5 mmol/L Ammonium bicarbonate aq.<br>B) 25 mmol/L Ammonium bicarbonate aq. /Acetonitrile=10:90 |
| Time Program        | 70% B (0 min) → 40% B (25 min) → 70%B (25.01-30 min)                                                |
| Mixer               | 20 μL                                                                                               |
| Column Temp.        | 40 °C                                                                                               |
| Injection Volume    | 5 μL                                                                                                |

MS Condition (LCMS-2050)

|                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| Ionization          | ESI/APCI (DUIS), Negative mode |
| Mode                | SIM (40 Events)                |
| Nebulizing Gas Flow | 3.0 L/min                      |
| Drying Gas Flow     | 5.0 L/min                      |
| Heating Gas Flow    | 7.0 L/min                      |
| Desolvation Temp.   | 400 °C                         |
| DL Temp.            | 150 °C                         |

■ 혼합 표준용액 분석

그림 2는 10 mg/L의 말토올리고당의 혼합용액(G1 - G10 mix, BC-GM, 올리고당 표준물질, Senshu Scientific Co., Ltd.)에 대한 MS 크로마토그램을 나타내었다. 올리고당 DP1 - DP10과 마찬가지로, 다당류는 최대 24개의 단당류 단위로 검출되었다. 고감도의 LCMS-2050을 검출기로 사용하여 LC로는 검출할 수 없는 극소량의 올리고당 및 다당류의 검출이 가능했다.

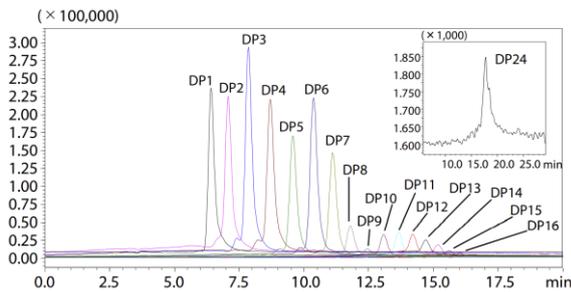


그림 2. 말토올리고당 혼합물의 MS 크로마토그램

검량선은 포도당 및 말토올리고당 DP2 - DP7의 혼합 표준물질을 준비하여 작성하였다. 전 성분 검량선의 결정계수  $r^2$  는 0.995 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 그림 3과 4는 검량선에서 가장 낮은 농도의 말트트리오스와 말토펀타오스의 MS 크로마토그램을 나타내었다. 표 3은 검량선에 대한 농도 범위, 결정 계수 및 가장 낮은 농도 포인트에 대한 반복성(%RSD, n=6)을 정리하였다. 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 검출기로 사용하면 굴절률 검출기(RID), 증기화 광산란 검출기(ELSD) 또는 하전 에어로졸 검출기(CAD)를 사용할 때 어려울 수 있는 나노그램 수준의 고감도 분석이 가능하였다.

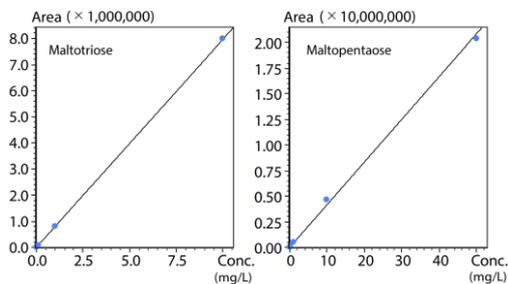


그림 3. 검량선

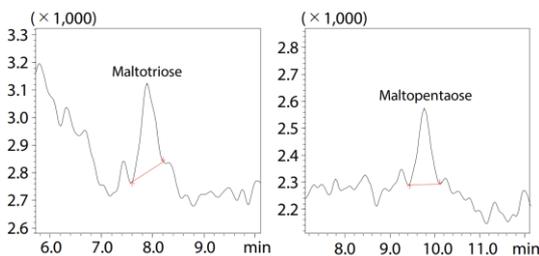


그림 4. 검량선의 최저농도 데이터 포인트의 MS 크로마토그램

표 3. 검량선에 대한 농도 범위, 결정 계수 및 반복성

| 성분명           | 농도범위 (mg/L) | $r^2$ | %RSD (R.T.) | %RSD (Peak Area) |
|---------------|-------------|-------|-------------|------------------|
| Glucose       | 0.05-100    | 0.998 | 0.25        | 4.49             |
| Maltose       | 0.05-10     | 0.999 | 0.20        | 5.09             |
| Maltotriose   | 0.01-10     | 0.999 | 0.40        | 8.33             |
| Maltotetraose | 0.01-50     | 0.995 | 0.36        | 6.46             |
| Maltopentaose | 0.01-50     | 0.997 | 0.52        | 5.66             |
| Maltohexaose  | 0.05-50     | 0.997 | 0.23        | 4.35             |
| Maltoheptaose | 0.05-100    | 0.997 | 0.37        | 6.65             |

■ 맥주시료 분석

각 맥주시료에서 검출된 올리고당 및 다당류의 수를 표 4에 나타내었다. 저맥아 맥주와 무설탕으로 표기된 무알코올 맥주 1에서는 올리고당 또는 다당류가 거의 검출되지 않았다. 대조적으로, 맥주 1, 맥주 2, 무알코올 맥주 2에서는 맥아당, 기타 말토올리고당 및 포도당 중합체로 추정되는 다당류가 다수 검출되었다. 그림 5는 맥주 2의 MS 크로마토그램을 보여준다. 최대 36개의 단당류 단위 (평균 분자량: 5855.09)를 갖는 다당류는 3가 이온 ( $m/z$  1949.63)으로 검출되었다. 이 정도로 큰 분자량을 가진 다당류 검출이 가능했던 것은 넓은 질량 범위 분석 가능한 소형 단일 사중극자 LC/MS인 LCMS-2050 시스템을 사용하였기 때문이다.

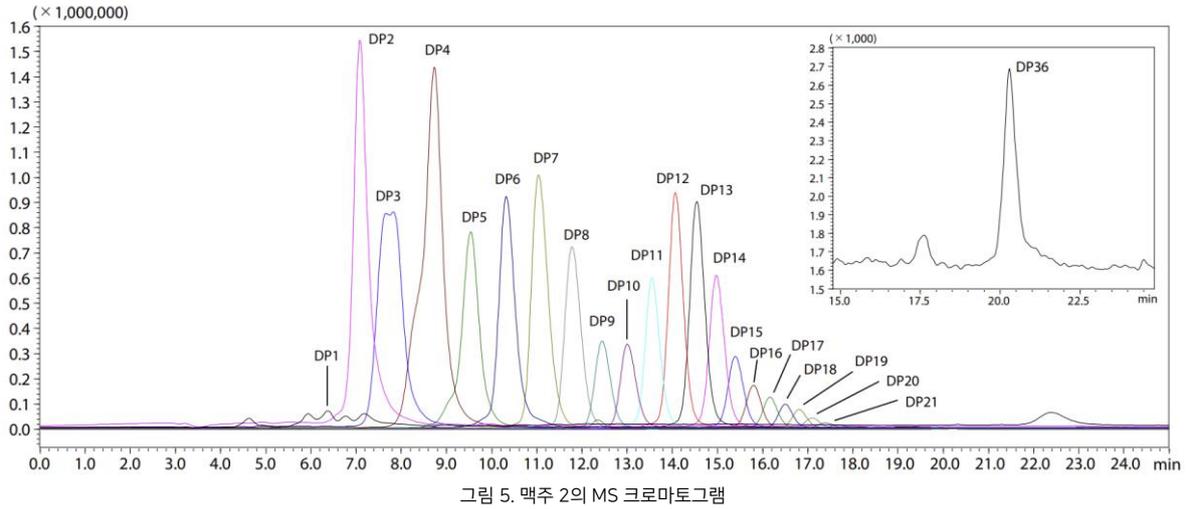
표 4. 검출 성분의 수

| 맥주 1 | 맥주 2 | 저맥아맥주 | 신장르맥주 | 무알콜맥주 1 | 무알콜맥주 2 |
|------|------|-------|-------|---------|---------|
| 36   | 36   | 4     | 36    | 15      | 36      |

Multi-omics Analysis Package를 이용하여 각 성분의 피크 면적을 통해 주성분 분석을 수행하였다 (그림 6). Multi-omics Analysis Package는 대사 경로 중에 생성되는 metabolomics, proteomics, fluxomic 분석의 대용량 데이터를 자동으로 나타내주고 다양한 다변량 분석을 수행할 수 있는 대사 공학 소프트웨어이다. Multi-omics Analysis Package의 간편한 워크플로우 및 데이터 시각화는 데이터에 대한 직관적인 이해를 가능하게 하며 특히 약물 발견, 진단, 생명 공학 및 기타 생명 과학 연구 분야에 유용하다. Multi-omics Analysis Package는 하나의 통합된 소프트웨어를 사용하는 것과 유사한 방식으로 사용이 가능하며 데이터 분석 기능(소프트웨어 도구)과 각 분석 데이터와 연결된 데이터 처리 기능을 포함하고 있다.

주성분 분석 결과는 그림 7과 같다. 그림 7 (a)의 Score plot은 맥주 1과 맥주 2가 서로 가까이 밀집되어 있는 것과 마찬가지로 저맥아 맥주와 무알코올 맥주 1이 밀집되어 있는 것을 보여주며 이는 서로 유사한 구성성분을 갖는 특성을 나타낸다.

그림 7 (b)의 Loading plot은 제1 주성분(PC1)에 대하여 좌측에 플롯팅된 다수의 올리고당 및 다당류를 나타낸 것이다. 이는 제1 주성분 축이 원료에서 맥아의 비율을 나타낸다는 것을 시사한다. 이러한 방식으로 주성분 분석을 사용하면 시료를 구별하고 각 시료의 특성을 쉽게 이해할 수 있다.



각 올리고당 및 다당류의 상대적인 피크 면적을 보여주는 히트 맵 (heat map)은 임의의 시료에서 분석된 성분의 최대 피크 면적을 100을 기준으로 작성되었다(표 5). 히트 맵에 따르면 맥주 1과 맥주 2는 맥아에서 유래한 것으로 추정되는 올리고당과 다당류를 다량 함유하고 있는 반면, 무알코올 맥주 1과 무알코올 맥주 2는 같은 종류의 음료임에도 불구하고 매우 다른 특성을 보였다. 일본산 무알코올 맥주 1은 맥아를 향료로 사용하여 발효시키지 않았다.

독일산 무알코올 맥주2는 일반 맥주와 동일한 원료를 사용하여 알코올 생성을 줄이는 방식으로 발효되었다. 이러한 생산 공정은 비알코올 맥주 2에 존재하는 맥아에서 유래된 것으로 추정되는 많은 양의 올리고당 및 다당류가 원인일 가능성이 있다. 또한 무알코올 맥주 2에는 DP1(포도당)과 DP2(말토스)가 다량 함유되어 있는데, 이는 또한 알코올 발효를 감소시키는 생산 공정으로 인해 용액에서 포도당과 말토스가 전환되지 않은 상태로 남게 된 원인일 수 있다.

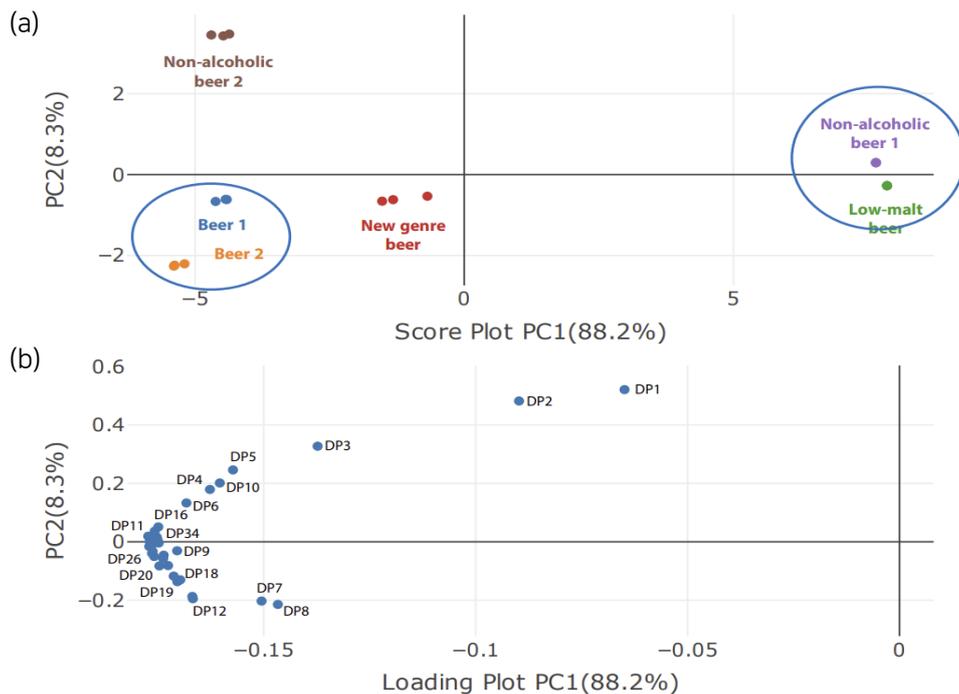
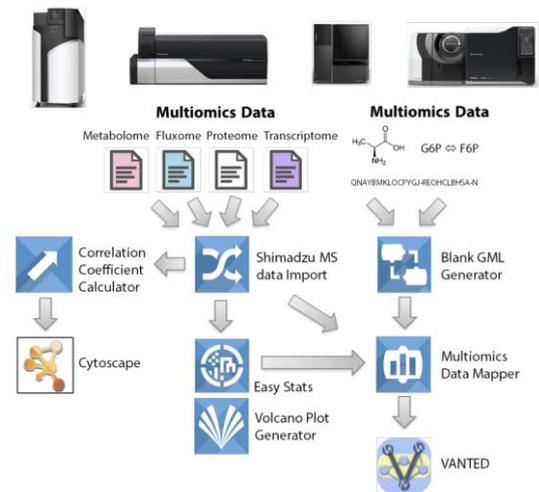
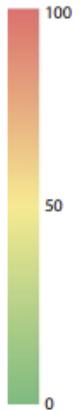


그림 7. 구성성분 분석의 원리 결과  
(a) Score Plot (b) Loading Plot

표 5. 각 맥주시료 내 올리고당과 다당류의 상대량

|      | Beer 1 | Beer 2 | Low-malt beer | New genre beer | Non-alcoholic beer 1 | Non-alcoholic beer 2 |
|------|--------|--------|---------------|----------------|----------------------|----------------------|
| DP1  | 4.0    | 2.6    | 1.5           | 3.9            | 3.9                  | 100                  |
| DP2  | 25.2   | 22.2   | 0.2           | 31.9           | 24.3                 | 100                  |
| DP3  | 75.8   | 31.1   | 0.3           | 51.8           | 15.1                 | 100                  |
| DP4  | 95.2   | 56.4   | 0.2           | 57.3           | 3.8                  | 100                  |
| DP5  | 79.5   | 47.5   | N.D.          | 47.1           | 2.2                  | 100                  |
| DP6  | 82.0   | 69.0   | N.D.          | 77.6           | 2.5                  | 100                  |
| DP7  | 73.0   | 94.3   | N.D.          | 100            | 1.9                  | 49.6                 |
| DP8  | 70.8   | 90.6   | N.D.          | 100            | 1.6                  | 45.1                 |
| DP9  | 72.7   | 100    | N.D.          | 87.2           | 1.8                  | 86.7                 |
| DP10 | 53.2   | 64.3   | N.D.          | 64.6           | 1.3                  | 100                  |
| DP11 | 94.6   | 100    | N.D.          | 68.1           | 1.0                  | 98.2                 |
| DP12 | 80.3   | 100    | N.D.          | 55.3           | 0.6                  | 51.6                 |
| DP13 | 71.8   | 100    | N.D.          | 55.9           | 0.5                  | 52.6                 |
| DP14 | 68.0   | 100    | N.D.          | 61.3           | 0.4                  | 65.6                 |
| DP15 | 73.1   | 100    | N.D.          | 60.2           | 0.3                  | 90.1                 |
| DP16 | 83.9   | 99.1   | N.D.          | 52.5           | N.D.                 | 100                  |
| DP17 | 95.0   | 100    | N.D.          | 46.2           | N.D.                 | 80.5                 |
| DP18 | 88.0   | 100    | N.D.          | 44.1           | N.D.                 | 62.4                 |
| DP19 | 80.4   | 100    | N.D.          | 46.8           | N.D.                 | 61.2                 |
| DP20 | 80.3   | 100    | N.D.          | 54.2           | N.D.                 | 72.6                 |
| DP21 | 83.8   | 100    | N.D.          | 57.9           | N.D.                 | 91.4                 |
| DP22 | 91.4   | 100    | N.D.          | 54.3           | N.D.                 | 99.3                 |
| DP23 | 95.0   | 100    | N.D.          | 48.5           | N.D.                 | 89.8                 |
| DP24 | 95.8   | 100    | N.D.          | 48.7           | N.D.                 | 78.6                 |
| DP25 | 95.2   | 100    | N.D.          | 47.9           | N.D.                 | 73.5                 |
| DP26 | 98.5   | 100    | N.D.          | 72.8           | N.D.                 | 92.1                 |
| DP27 | 88.1   | 100    | N.D.          | 68.5           | N.D.                 | 95.5                 |
| DP28 | 93.0   | 100    | N.D.          | 61.6           | N.D.                 | 92.8                 |
| DP29 | 95.8   | 100    | N.D.          | 57.9           | N.D.                 | 81.7                 |
| DP30 | 92.6   | 100    | N.D.          | 58.0           | N.D.                 | 83.5                 |
| DP31 | 95.7   | 100    | N.D.          | 60.1           | N.D.                 | 85.8                 |
| DP32 | 100    | 98.7   | N.D.          | 70.5           | N.D.                 | 92.2                 |
| DP33 | 100    | 94.9   | N.D.          | 77.8           | N.D.                 | 92.5                 |
| DP34 | 100    | 90.4   | N.D.          | 78.9           | N.D.                 | 94.5                 |
| DP35 | 100    | 98.0   | N.D.          | 80.1           | N.D.                 | 95.7                 |
| DP36 | 98.7   | 100    | N.D.          | 79.1           | N.D.                 | 97.3                 |



■ 결론

이 뉴스레터는 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 이용하여 맥주와 무알코올 맥주에 존재하는 올리고당 및 다당류를 프로파일링 하여 식품 대사체학의 사례를 설명하였다. 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 사용하였기 때문에 올리고당 및 다당류에 대한 고감도의 분석이 가능하였다. 이 뉴스레터에서 설명한 바와 같이 아미노산, 유기산 및 핵산 대사체(뉴스레터 01-00334-EN)를 대상으로 하는 대사분석 및 올리고당 및 다당류의 프로파일링과 결합하여 종합적인 식품대사분석을 수행할 수 있다.

일반적으로 표적 대사체학에서 삼중 사중극자 LC/MS 시스템을

사용하지만 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 사용하여 수행할 수도 있다. 삼중 사중극자 LC/MS 시스템과 비교하여 단일 사중극자 LC/MS 시스템은 더 저렴하고 더 간편한 파라미터를 제공하므로 질량 분석법에 익숙하지 않은 사용자도 쉽게 시스템을 다룰 수 있다. 식품 대사학에서 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 통한 분석은 앞으로 식품 분야의 기술 발전과 제품 개발을 달성할 수 있게 도울 수 있다.

Use this QR code to access the introduction and the instructional videos for Multi-Omics Analysis Package

<https://www.shimadzu.com/labcamp/multiomics5.html>

