

Application News

No. 01-00334-K

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

Food Metabolomics of Alcoholic Beverage Using Single-Quadrupole Mass Spectrometer

사용자 활용 포인트

- ◆ 단일 사중극자 LC/MS를 사용하여 식품 대사체학을 쉽게 수행할 수 있다.
- ◆ 아미노산, 유기산, 핵산 대사체 및 기능성 성분을 포함한 143개 화합물을 동시에 분석할 수 있다.
- ◆ 대사체학에 경험이 없는 사용자도 Multi-omics Analysis Package를 사용하여 쉽게 다변량 분석을 수행할 수 있다.

■ 서론

최근 생체 내 대사체의 종합적인 분석으로 정의되는 대사체학 기술이 주목받고 있다. 대사체학(metabolomics)은 세포활동으로 생성된 아미노산, 유기산 등 저분자량을 갖는 대사체를 종합적으로 분석하여 다양한 시료군 간의 차이를 명확히 하는 학문이다. 대사체학 기술을 식품에 적용하는 것은 '식품 대사체학'이라 불리며 이는 식품의 품질 평가, 품질 예측, 제조 및 저장 공정 개선, 기능성 평가와 같이 다양한 목적으로 활용되고 있다. 식품에는 매우 많은 양의 대사체가 존재하고 맛, 품질 및 기능성과 관련된 상당수의 대사체는 선행연구를 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.

이 뉴스레터에서는 단일 사중극자 LC/MS 시스템을 사용한 식품 대사체학의 사례를 소개한다. 삼중 사중극자 LC/MS 시스템에 비해 단일 사중극자 LC/MS 시스템은 더욱 저렴하고 간편한 분석조건을 제공하므로 질량 분석에 익숙하지 않은 사용자도 대사체 분석을 쉽게 수행할 수 있다.

■ 시료 정보와 전처리

시료는 알코올과 무알코올 맥주 6종을 준비하였다. 시료의 세부 정보를 표 1에 나타내었다. 시료 희석 시 내부표준물질로 2-모르폴리노에탄선폰산(MES) 1 µmol/L 를 첨가하였다.

표 1. 시료 정보

시료	정보
맥주 1	라거 맥주 (하면발효)
맥주 2	에일 맥주 (상면발효)
저맥아 맥주	무퓨린
맥주 3	콩단백질을 원료로 사용
무알코올 맥주 1	일본산
무알코올 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. 이러한 기능은 광범위한 물리적 특성을 가진 대사체를 분석하는 대사체학에서 특히 유용하다.



그림 1. Nexera™ XR과 LCMS-2050

HPLC 및 MS 분석 조건은 표 2와 같고, 단일 사중극자 LC/MS를 이용한 동시 분석 조건을 개발하기 위해 LC/MS/MS Method Package for Primary Metabolites Ver.3에 포함된 ion-pair-free LC/MS/MS 분석법의 분석 조건을 참고하였다. 이를 통해 식품 분석에 중요한 아미노산, 유기산, 뉴클레오사이드, 뉴클레오티드 등 친수성 대사체 143 개를 동시에 분석할 수 있다.

표 2. 분석조건

HPLC 조건 (Nexera XR)	
Column	Shim-pack™ GIST PFPP*1 (2.1 mmI.D. x 150 mmL., 3.0 µm)
Mobile Phases	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	Gradient elution
Flow rate	0.25 mL/min (17 to 19 min, 0.5 mL/min)
Injection Volume	3 µL
MS 조건 (LCMS-2050)	
Ionization	ESI/APCI (DUIS), Positive and negative mode
Mode	SIM (143 Events)
Nebulizing Gas Flow	3.0 L/min
Drying Gas Flow	5.0 L/min
Heating Gas Flow	7.0 L/min
Desolvation Temp.	500 °C
DL Temp.	250 °C

*1 P/N:227-30858-07

■ 다변량 분석

친수성 대사체를 동시 분석한 결과, 82종의 화합물이 검출되었고 주요 대사체는 아미노산, 유기산, 뉴클레오사이드 대사체였다. 표 3은 각 시료에서 검출된 대사체의 수를 나타내었다. 맥주1, 맥주2, 무알코올 맥주2에서 70개 이상의 화합물이 검출됐지만 저맥아 맥주에서는 22개 화합물이 검출되어 다른 경향을 보였다.

표 3. 시료 내 검출된 화합물의 수

맥주 1	맥주 2	저맥아 맥주	맥주 3	무알코올 맥주 1	무알코올 맥주 2
76	78	22	57	44	77

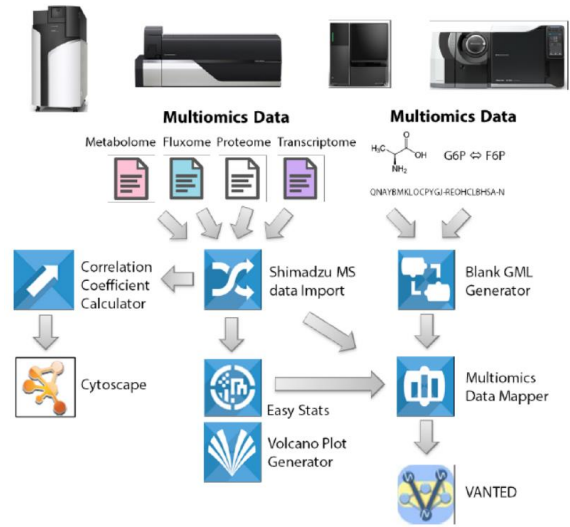


그림 2. Multi-omics Analysis Package

Multi-omics Analysis Package는 대사공학 소프트웨어로, metabolomics, proteomics, flux 분석 분야의 방대한 양의 질량 분석 데이터를 기반으로 다양한 데이터 분석과 대사경로를 파악 할 수 있다(그림 2). Multi-omics Analysis Package는 대사체 데이터 분석 수행의 효율성을 높여주고, 데이터의 직관적인 시각화로 약물 발견, 기능 강화 식품, 생명 공학 및 기타 생명 과학 연구 분야에 많은 도움을 제공할 수 있다. Multi-omics Analysis Package는 데이터 분석을 위한 가젯(소프트웨어 도구)과 데이터 처리를 위한 가젯이 연결되어 하나의 소프트웨어 프로그램을 사용하는 것처럼 다양한 다변량 분석작업을 간편하게 수행할 수 있다.

그림 3은 주성분 분석(PCA) 결과를 보여준다. 스코어 플롯(score plot)에서 저맥아 맥주와 무알코올 맥주 1은 서로 가깝게 표시되어 있으며, 친수성 화합물의 양에 대해 서로 유사한 경향을 보였다. 다른 맥주와 무알코올 맥주는 명확히 분류되었고 서로 다른 특징을 갖는 것으로 보인다. 제1 주성분(PC1)은 2개 군(A군: 저맥아 맥주, 무알코올맥주 1, 맥주 3; B군: 무알코올 맥주 2, 맥주 1, 맥주 2)으로 구분되었다. 즉, PC1은 맥주에 사용되지 않는 성분이 A군에 사용되고 맥주에 사용된 성분은 B군에 사용되기 때문에 성분의 차이를 보여준다.

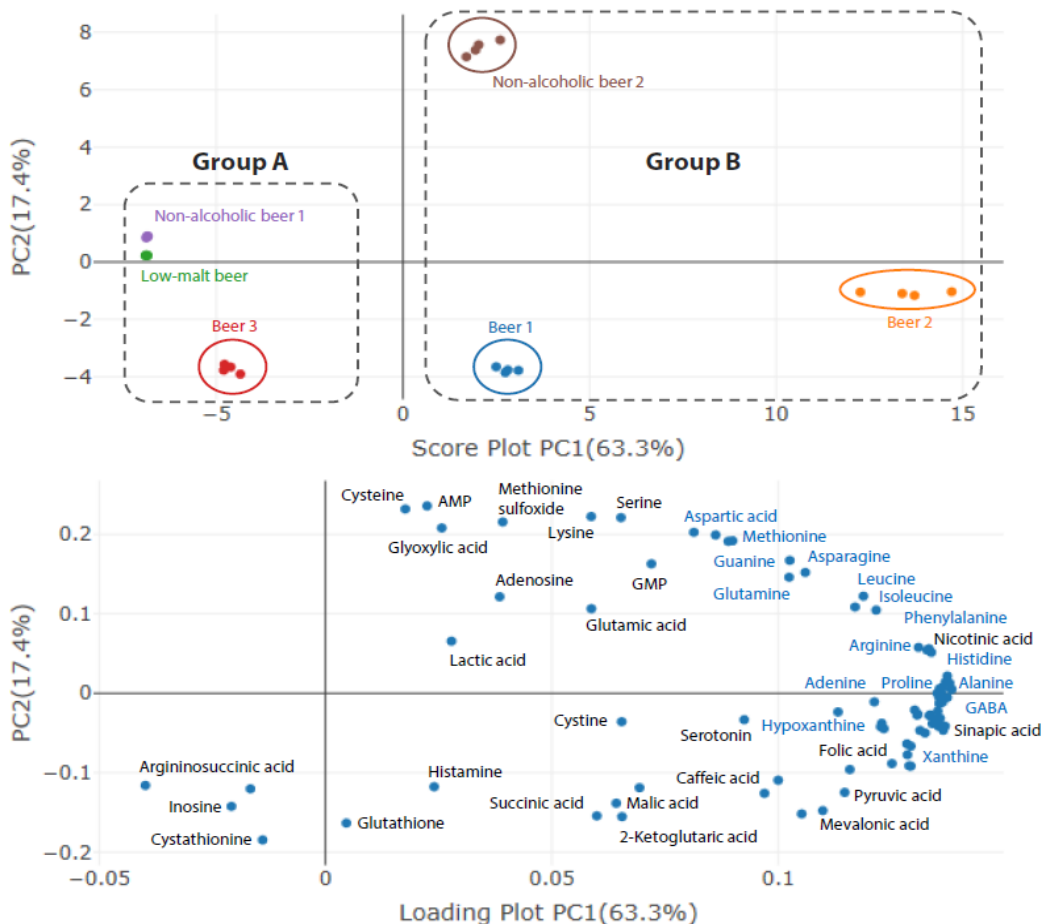


그림 3. 주성분 분석 결과

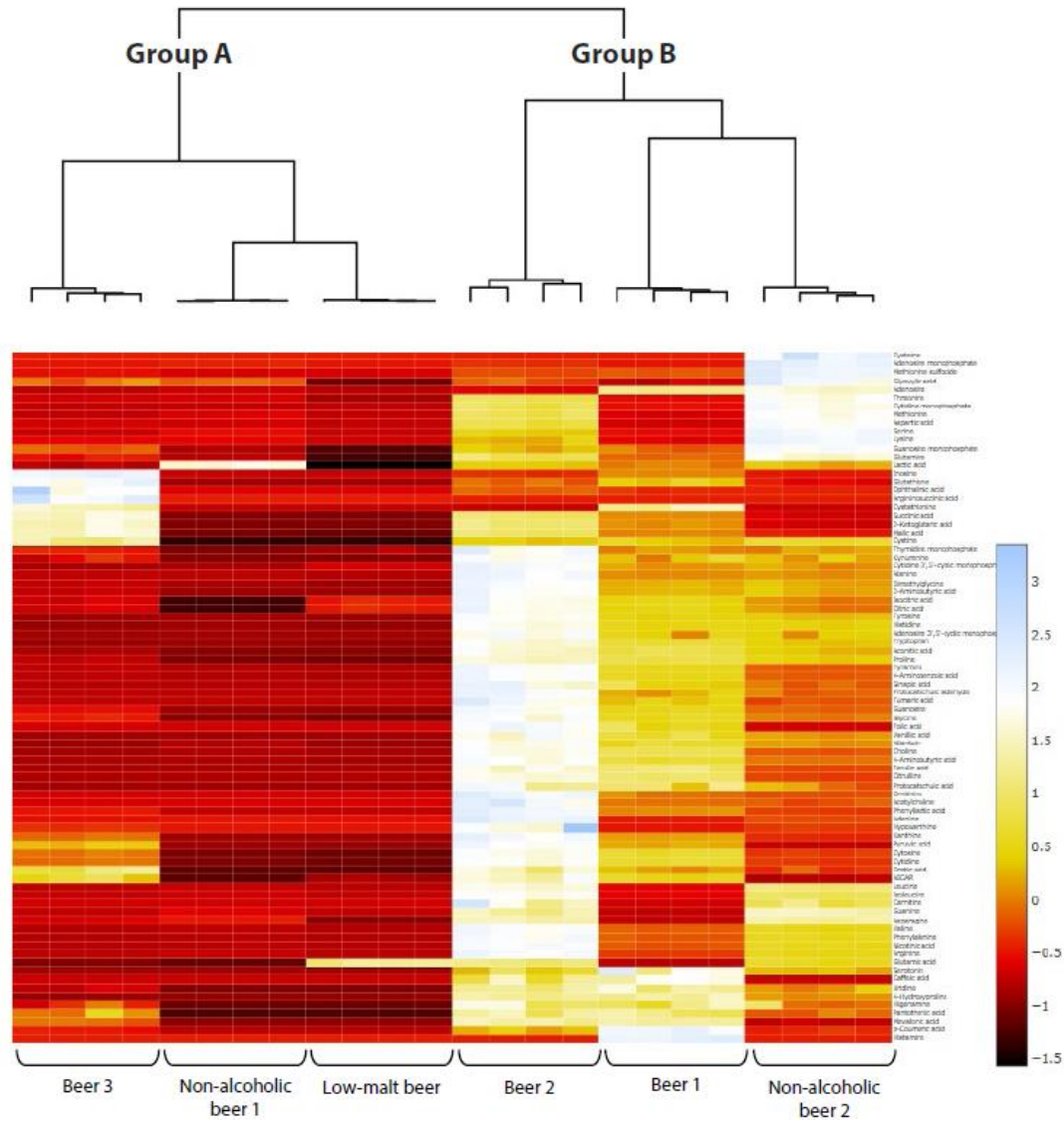


그림 4. 계층적 군집분석 결과

로딩 플롯(loading plot)에서 각 시료에 포함된 특징적인 화합물이 확인되었다. 맥주 2는 푸른색으로 표시된 바와 같이 아미노산과 뉴클레오타이드 대사체가 많이 함유되어 있다. PCA를 사용하면, 각 시료를 특징 별로 분류하고 차이점을 나타내는 화합물을 쉽게 찾을 수 있다.

그림 4에는 계층적 군집분석(HCA) 결과를 나타내었다. 이는 PCA 결과와 유사하고, HCA는 시료를 두 개의 군(A군: 저맥아 맥주, 무알코올 맥주1, 맥주 3; B군: 무알코올 맥주 2, 맥주 1, 맥주 2)으로 분류했다. 무알코올 맥주 1과 무알코올 맥주 2는 같은 무알코올 맥주이지만, 서로 다른 군으로 분류되었다. 일본산 무알코올 맥주1은 발효시키지 않고 맛을 내서 제조한다. 독일산 무알코올 맥주2는 맥주와 같은 성분으로 제조하지만 알코올 생성을 억제하는 방식으로 발효시킨다. 이는 성분과 제조 공정의 차이가 무알코올 맥주에서 친수성 화합물의 경향성에 영향을 미친다는 것을 의미한다. 맥주 1과 무알코올 맥주2는 유사한 군으로 분류되었다. 이는 맥주1과 무알코올 맥주2의 성분이 맥주를 기반으로 하고, 하면 발효에 의해 만들어지기 때문인 것으로 예상된다. HCA는 각 시료의 화합물 간 유사도에 대한 시각적 이해를 도와준다.

■ 퓨린 관련 성분

PCA와 HCA의 결과는 뉴클레오타이드 대사체에서 유의미한 차이를 보였기 때문에 각 시료에서 퓨린과 관련된 화합물을 비교하였다. 아데닌, 아데노신, 고리형 아데노신 모노포스페이트, 아데노신 모노포스페이트, 이노신, 하이포잔틴, 잔틴, 구아닌, 구아노신, 구아노신 모노포스페이트가 검출되었다. 그림 5는 각 화합물의 피크 면적비의 합을 나타내었다. 맥주 2에는 퓨린과 관련된 화합물이 가장 많이 함유되어 있으며, 저맥아 맥주, 맥주 3, 무알코올 맥주 1에는 거의 함유되어 있지 않은 것으로 나타났다. 특히 이들 화합물은 저맥아 맥주(무퓨린)에서는 거의 검출되지 않았다.

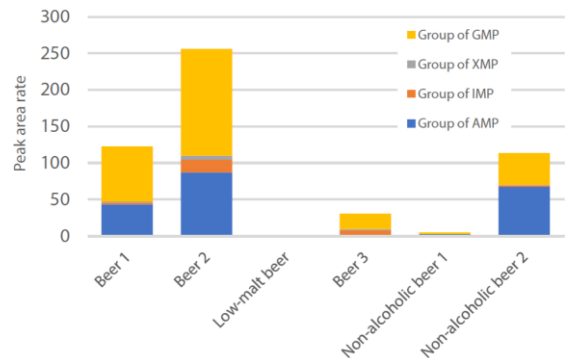


그림 5. 맥주 시료 내 퓨린

시료 간의 잔틴의 차이를 정량화 하였다. 그림 6은 잔틴의 표준용액을 이용하여 얻은 검정곡선이며, 0.1 - 50 $\mu\text{mol/L}$ 의 검정곡선 범위에서 결정계수(R^2)가 0.999의 우수한 직선성을 보였다. 표 4는 각 시료의 잔틴의 농도이며, 맥주 2에는 잔틴 (102 $\mu\text{mol/L}$)이 가장 많이 함유되어 있다.

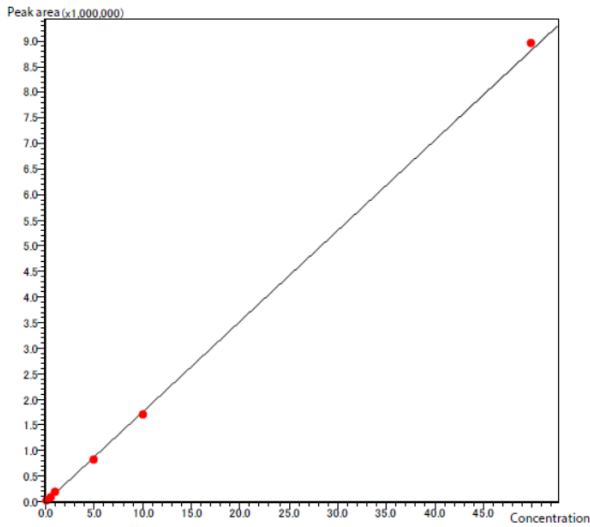


그림 6. 잔틴의 검정곡선

표 4. 맥주 시료 중 잔틴의 농도 ($\mu\text{mol/L}$)

맥주 1	맥주 2	저맥아 맥주	맥주 3	무알코올 맥주 1	무알코올 맥주 2
47	102	N.D.	33	N.D.	27

■ 기능성 성분

아미노산, 유기산, 뉴클레오사이드 대사체 외에도 각 시료에서 기능적 특징을 갖는 성분들이 검출되었다. 예를 들어 혈압 개선, 스트레스 해소, 피로감소 효과가 있는 것으로 알려진 γ -아미노뷰티르산(GABA)와 항산화 효과가 있는 페룰산, 바닐린산, 시나핀산, 카페인산이 검출됐다. 이 기능성 성분의 피크 면적의 비를 비교하였으며, 그림 7에 나타난 바와 같이, 맥주 1, 맥주 2, 무알코올 맥주 2는 기능성 성분이 풍부하였다. 페룰산과 바닐린산는 맥주의 주요 항산화제로 맥아에 함유되어 있는 것으로 알려졌다. 이러한 기능성 성분이 더 많이 검출된 이유는 맥주 1, 맥주 2, 무알코올 맥주 2의 성분에서 맥아의 비중이 높기 때문으로 추정된다.

■ 결론

이 뉴스레터는 단일 사중극자 LC/MS를 이용한 식품 대사체학 사례를 소개하였다. 일반적으로 표적 대사체학에서 삼중 사중극자 LC/MS 시스템을 사용하지만, 단일 사중극자 LC/MS 시스템도 표적 대사체학에 대한 충분한 잠재력을 가지고 있음을 확인했다. 삼중 사중극자 LC/MS 시스템에 비해 단일 사중극자 LC/MS 시스템은 비교적 저렴하고 작동이 쉽기 때문에 질량 분석에 익숙하지 않은 연구자도 간편하게 분석을 수행할 수 있다. 단일 사중극자 LC/MS를 이용한 식품 대사체학의 확산은 식품 산업의 기술 및 제품의 추가적인 발전으로 이어질 것으로 기대된다.

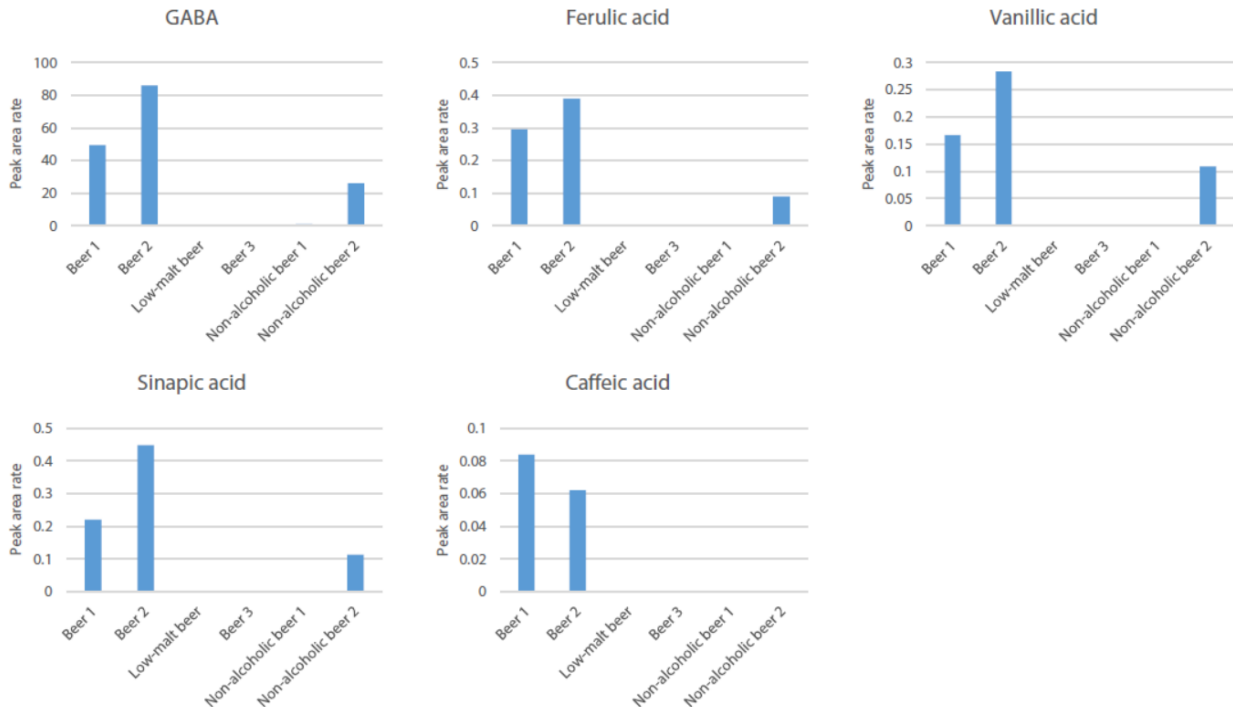


그림 7. 맥주 시료 내 기능적 특성을 가진 성분

