

# Comprehensive 2D-LC를 이용한 다양한 종류의 맥주 fingerprinting 분석

Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution

## 응용 자료

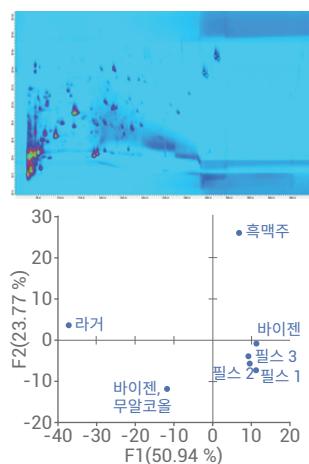
식품 검사 및 농업

### 저자

Sonja Krieger  
Agilent Technologies, Inc.  
Waldbronn, Germany

### 개요

맥주는 매우 복잡한 조성을 지닌 알코올 음료로, 물, 보리 및 밀의 맥아, 흡 등의 재료를 이용해 생산합니다. 맥주 특유의 쓴맛은 주로 맥아즙을 끓이는 과정에서 iso- $\alpha$ -acid가  $\alpha$ -acid를 형성하며 생겨납니다. 이 응용 자료에서는 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션을 이용해 다양한 맥주를 Comprehensive 2D-LC로 분석하는 것에 대해 다루고 있습니다. C18 컬럼을 이용해 알칼리성과 산성 PH 값이 각각 1차와 2차인 우수한 직교성이 달성되었습니다. 맥주의 쓴맛을 내는 화합물 식별은 표준 물질과의 비교 분석 및 MS 검출로 진행하였습니다. 표적 없는 다중 시료 분석(fingerprinting 분석)은 분석 대상이 된 여러 맥주의 분류를 가능하게 하였습니다.



Agilent Technologies

## 소개

맥주는 전분의 당화 작용 및 당의 발효에 의해 생성된 알코올 음료입니다. 맥주의 주원료는 둘, 보리 또는 밀의 맥아, 그리고 대부분 맥주에 들어가는 흡입니다<sup>1,2</sup>. 맥주 생산은 맥아 제조, 양조, 발효, 숙성의 4단계로 이루어집니다. 맥주는 800개 이상의 유기 화합물을 포함하고 있어 그 조성이 매우 복잡합니다. 다양한 맥주가 지닌 각각의 독특한 맛은 물의 미네랄 성분과 사용된 재료의 차이, 양조법의 차이 등에서 비롯됩니다. 발효 과정에서는 2가지의 고전적인 맥주 종류가 나누어지는데 그중 하나는 상부 발효를 통해 만들어지는 에일과 독일 바이젠 맥주이고, 다른 하나는 하부 발효 방식을 택하는 라거와 독일 필스 맥주입니다<sup>1</sup>.

맥주의 쓴맛은 보통 맥아즙을 끓이는 과정에서 첨가되는 흡(Humulus lupulus L.) 덩어리, 조각 또는 추출물로 인해 생겨납니다. 흡은  $\alpha$ -acid(humulones)과  $\beta$ -acid(lupulones)를 포함하고 있는데 이들은 보통 *n*-, co- 및 ad-homologs의 형태로 존재합니다. 맥아즙을 끓이는 도중에 대개 그 자체로는 아무 맛이 없는  $\alpha$ -acid가 맥주의 쓴맛과 맥주 거품의 안정성을 책임지는 iso- $\alpha$ -acid(isohumulones)로 변환됩니다. Iso- $\alpha$ -acid는 가볍고 민감한 물질로, 빛에 노출되면 맛이 사라지게 됩니다(약하게 뜯 쓰는 맛이 남음)<sup>3-5</sup>. 이로 인해 업계에서는 맥주의 빛 안정성과 거품 안정성 향상을 위해 tetrahydroiso- $\alpha$ -acid와 같은 reduced iso- $\alpha$ -acid를 사용해왔습니다. 독일에서는 맥주 순수령에 의해 reduced iso- $\alpha$ -acid의 첨가가 금지되어 있기 때문에 오직 자연산 흡 화합물만을 첨가할 수 있습니다<sup>4</sup>.

자외선(UV) 또는 질량분석(MS) 검출법과 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하면 흡 제품 내  $\alpha$ -acid과  $\beta$ -acid 및 맥주 내 iso- $\alpha$ -acid와 reduced iso- $\alpha$ -acid에 대해 고성능 분석이 가능합니다<sup>3-5</sup>. 맥주 내 iso- $\alpha$ -acid와 reduced iso- $\alpha$ -acid의 정량화는 이전 응용 자료에서 다룬 바 있습니다<sup>6</sup>.

흡에는  $\alpha$ -acid과  $\beta$ -acid 뿐 아니라 polyphenolic 화합물도 포함되어 있는데, 이들 중 일부 종류 역시 맥주의 쓴맛을 내는데 일조합니다. 가장 중요한 polyphenolic 화합물은 xanthohumol류의 prenylflavonoid로, 여기에 해당하는 물질로는 xanthohumol, isoxanthohumol, desmethylxanthohumol 등이 있습니다<sup>3,5</sup>.

그림 1은 iso- $\alpha$ -acid, reduced iso- $\alpha$ -acid, xanthohumol류 prenylflavonoid의 구조를 보여줍니다.

맥주의 매우 복잡한 조성으로 인해, 높은 피크 성능을 보유한 comprehensive 2차원 액체 크로마토그래피(comprehensive 2D-LC)가 맥주의 통합 분석에 적합합니다. 이 응용 자료에서는 분석된 맥주 시료를 중심으로 맥주 분류를 가능하게 하는 다양한 맥주에 대한 fingerprinting 분석에 대해 다루고 있습니다.

## 실험

### 기기

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션은 다음과 같은 모듈로 구성되었습니다.

- 2개의 Agilent 1290 Infinity Binary Pumps(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기(G4226A), Agilent 1290 Infinity 온도 조절 장치(G1330B) 포함
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment(G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A), 2-position/4-port 듀오 밸브 포함(2D-LC valve head, 1,200 bar(p/n 5067-4214), 2개의 60- $\mu$ L 루프 장착
- Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector(G4212A), Max-Light 60-mm 카트리지 셀(G4212-60007)

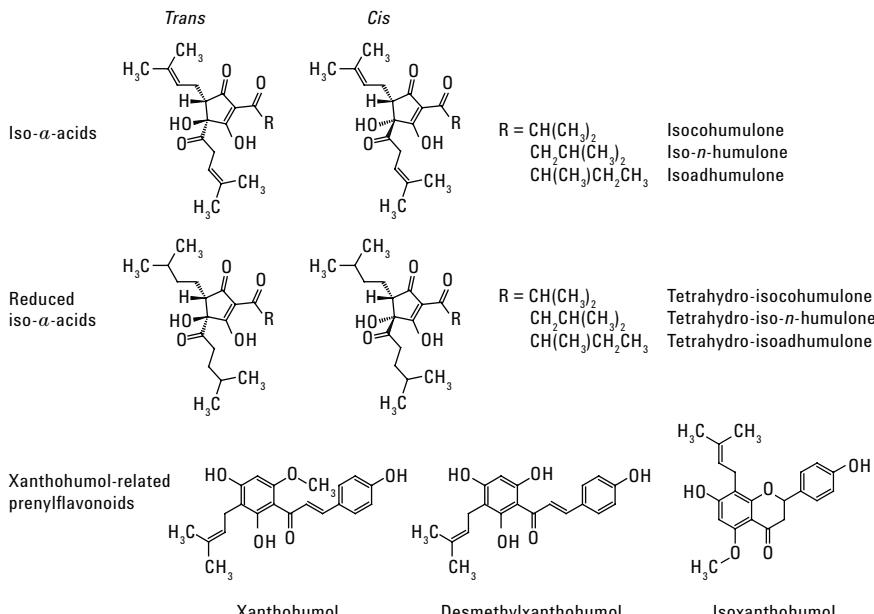


그림 1. iso- $\alpha$ -acid, reduced iso- $\alpha$ -acid, xanthohumol류 prenylflavonoid의 구조

Agilent Jet Stream ESI 소스(G1958-65538)를 장착한 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템이 질량분석에 사용되었습니다.

## 소프트웨어

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition rev. C.01.06 [61] 및 Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition Software product version A.01.01 [26]
- Agilent MassHunter Workstation Software, LC/MS 데이터 분석용 Agilent 6200 series TOF/6500 series Q-TOF version B.05.01, 정량 분석 version B.06.00
- 2D-LC 데이터 분석에 GC Image LLC., Lincoln, NE, USA에서 출시한 GC Image LCxLC-HRMS Edition 소프트웨어

## 컬럼

### 1차원

Agilent ZORBAX Extend-C18 Narrow-Bore RR, 2.1 × 100mm, 3.5 $\mu$ m(p/n 761753-902)

### 2차원

Agilent Poroshell HPH-C18, 4.6 × 50mm, 2.7 $\mu$ m(p/n 699975-702)

## 화학품

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용했으며 Acetonitrile 및 ethanol은 Merck 제약회사(Darmstadt, 독일)에서 구입했습니다. 초순수는 0.22 $\mu$ m membrane point-of-use cartridge를 장착한 Milli-Q Integral 시스템 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)에서 얻었습니다. DCHA-ISO, ICS-I3(*trans*-iso- $\alpha$ -acid의 dicyclohexylamine 염을 정화 전처리한 형태) 및 Tetra ICS-T2(tetrahydroiso- $\alpha$ -acid를 정화 전처리한 형태로 *cis*- and *trans*-isomers를 모두 포함)는 스위스 Zurich에 위치한 Labor Veritas AG에서

구입하였습니다. Ammoniumacetate은 독일 Steinheim에 위치한 Sigma-Aldrich, Ammonia Solution은 독일 Darmstadt에 있는 Merck로부터 구입했습니다. Formic acid은 Agilent 제품(p/n G2453-85060)입니다.

## 시료 및 시료 전처리

다양한 종류의 맥주를 독일의 현지 상점에서 구입하였습니다. 맥주 시료는 잘 저은 후(10분) 초음파 처리(10분)를 해 기체를 제거했습니다. 시료는 HPLC 시스템에 주입 전, 1mL의 플라스틱

시린지와 Captiva Premium Syringe Filters Regenerated Cellulose, 15mm, 0.45 $\mu$ m(p/n 5190-5109)를 이용해 필터 처리되었습니다.

1차 및 2차 농도 구배는 그림 2에 나와 있습니다.

## 항온 컬럼 장치

- 오른쪽에 있는 1차 컬럼은 25°C입니다.
- 왼쪽의 2차 컬럼은 30°C입니다.

## Comprehensive 2D-LC 분석법

### 1차 펌프

용매 A	5mM Ammonium acetate 수용액, ammonia를 이용해 pH 9.95로 조절
용매 B	Acetonitrile/Ethanol(60/40; v/v)
유량	0.075mL/분
Gradient	0분 – 2%B 10분 – 2%B 40분 – 40%B 60분 – 50%B 61분 – 95%B 70분 – 95%B

중지 시간 70분

실행 시간 15분

### 2차 펌프

용매 A	물 + 0.25% formic acid
용매 B	Acetonitrile + 0.25% formic acid
유량	4.0mL/분
Gradient 및 gradient 모듈레이션	0.00분 5%; 20분 5%; 43분 30%; 44분 70%; 49분 70%; 50분 55%; 0.24분 40%; 20분 40%; 43분 85%; 44분 92%; 0.25분 5%; 20분 5%; 43분 30%; 44분 70%; 49분 70%; 50분 55%; 0.35분 5%; 20분 5%; 43분 30%; 44분 70%; 49분 70%; 50분 55%

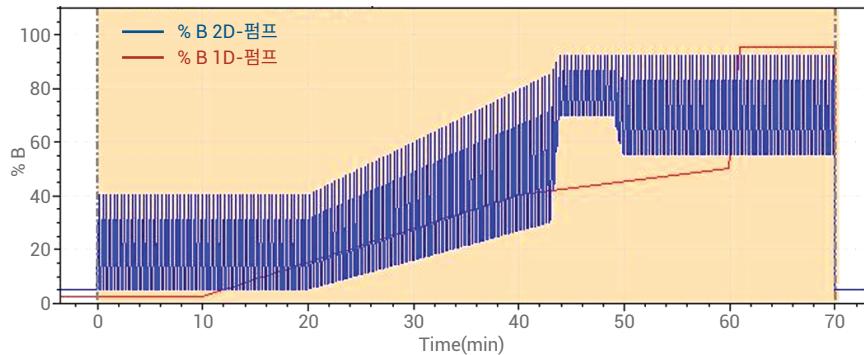


그림 2. 1차 및 2차 gradient

## 2-position/4-port 듀오 밸브

2-position/4-port 듀오 밸브는 21초간의 각 2차 모듈레이션 후 자동으로 전환되었습니다. 루프는 동방향 방식으로 사용되었습니다(동일한 흐름 방향으로 루프가 채워지고 용출됨).

## 자동 시료 주입기(Autosampler)

주입량	10µL
시료 온도	6°C
니들 세척	methanol에서 6초

## 다이오드 어레이 검출기

검출 전에 2차 컬럼의 용출액이 T-piece를 이용해 DAD와 MS가 7:1의 비율이 되도록 분리되었습니다. T-piece와 MS의 연결은 0.075mm id 모세관(길이 340mm)을 이용하여 피크 넓어짐 현상을 최소화했습니다.

파장	270nm/4nm, 기준 395nm/10nm
Data rate	80Hz

## 질량 분석기

6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템이 10 spectra/초의 수집 비율로 음이온화 모드 및 다음과 같은 Jet Stream ESI 조건에서 작동되었습니다.

가스 온도	300°C
가스 유량	9L/분
Nebulizer	50psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	12L/분
모세관	-3,000V
노즐	-1,000V

## 결과 및 토의

다양한 종류의 맥주 fingerprinting 분석을 위한 comprehensive 2D-LC 분석법을 정립하였습니다. 1차 분리는 이전에 설명한 맥주 내 iso- $\alpha$ -acid 및 reduced iso- $\alpha$ -acid 분석에서처럼, 알칼리성 pH에서 Agilent ZORBAX Extend-C18 컬럼을 이용해 진행되었습니다<sup>4</sup>. 2차 분리에서 Agilent Poroshell HPH-C18 컬럼은

산성 pH 조건에서 사용되어, 1차와 2차 분리의 pH 차이로 인한 선택성 차이를 성취하고 결과적으로 직교성을 증가시킬 수 있었습니다. 모든 모듈 주기마다 알칼리성 1차 용출액을 2차 컬럼에 주입하였기 때문에 2차에서는 알칼리성 조건에서 안정적일 수 있는 컬럼을 사용했습니다.

이렇게 개발된 comprehensive 2D-LC 분석법을 통해 7개 맥주 시료(3종류의 독일 필스, 1개의 독일 바이젠, 1개의 독일 무알코올 바이젠, 1개의 아이리시 흑맥주, 1개의 미국 라거 맥주)가 3회 반복 분석되었습니다. 그림 3은 1개의 독일 바이젠, 1개의 독일 필스, 1개의 미국 라거 맥주가 270nm UV 검출로 분석된 크로마토그램을

보여주고 있습니다. 1차와 2차 분리의 알칼리성 및 산성 pH 조건에서 각각 C18 컬럼을 이용해 훌륭한 2차 분리 구역이 성취되었음을 알 수 있습니다. 또한 3종의 맥주에 따라 피크 패턴(fingerprint)의 차이가 관찰될 수 있었습니다.

그림 3에서는 iso- $\alpha$ -acid와 reduced iso- $\alpha$ -acid에 해당하는 피크가 뚜렷하게 관찰됩니다. 식별은 표준품 비교 분석(trans-iso- $\alpha$ -acid의 혼합물, cis- and trans 형태의 reduced iso- $\alpha$ -acid 혼합물이 분석됨)을 기반으로 MS 검출을 통해 진행되었습니다. 그림 4는 cis- and trans 형태의 reduced iso- $\alpha$ -acid 혼합물 표준품 피크(A)와 미국 라거 맥주 분석(B)에서의

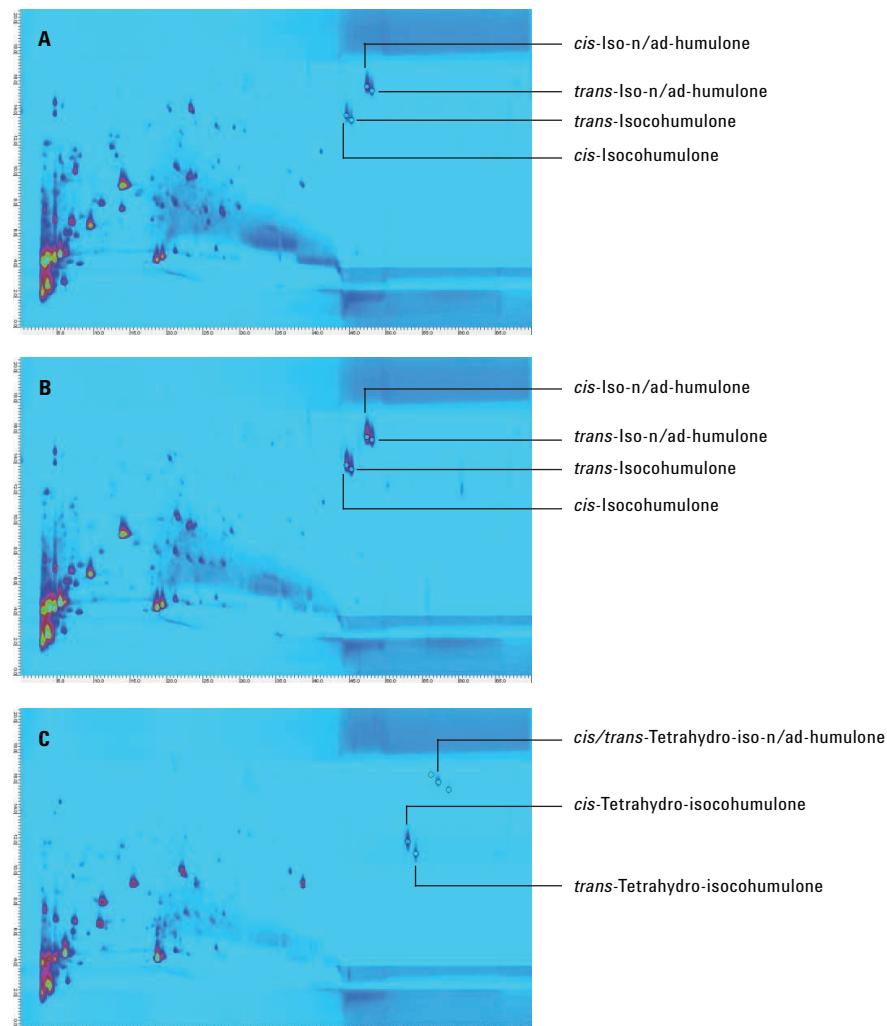


그림 3. 여러 맥주 시료의 UV 검출(270nm) 크로마토그램. A) 독일 바이젠 맥주, B) 독일 필스 맥주, C), 미국 라거 맥주

*cis*-tetrahydro-isocohumulone 질량분석 피크를 예시로 보여주고 있습니다. 질량분석 결과는 매우 유사하며, [M-H]<sup>-</sup> 피크는 표준품과 미국 라거 맥주 분석에서 각각 0.9ppm과 0.6ppm의 질량 차이를 나타냈습니다.

분석된 독일 맥주와 아일랜드 흑맥주에서는 모두 iso- $\alpha$ -acid가 검출되었으나 reduced iso- $\alpha$ -acid는 검출되지 않았으며, 이는 독일 맥주 순수령(오직 자연산 흡화합물만 사용 허용)으로 인해 예상된 결과였습니다. 이와 반대로 미국 라거 맥주는 reduced iso- $\alpha$ -acid를 포함하고 있었으나, iso- $\alpha$ -acid는 포함하고 있지 않았습니다.

다양한 시료의 비교 및 분류를 위해 각 시료의 모든 성분을 비교하는 비 표적 다중 시료 분석은 이전 응용 자료에서 설명했듯이 LCxLC 소프트웨어를 사용해 수행할 수 있습니다<sup>7</sup>. 이러한 비 표적 다중 시료 분석에는 우수한 유지 시간 재현성과 피크 부피가 필요하며, Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution은 이러한 조건을 충족합니다<sup>8</sup>.

여러 종류의 맥주를 비교 분석해 분류하기 위해 comprehensive 2D-LC 분석과 270nm에서의 UV 검출법이 사용되었습니다. 각 크로마토그램을 baseline 교정으로 전처리하고 LCxLC 소프트웨어를 이용한 피크 검출을 한 후, Image Investigator 소프트웨어 (LCxLC 소프트웨어의 일부)로 교차 시료 특징 비교를 수행했습니다. 이 과정에서 모든 크로마토그램이 정렬되었고 통합

크로마토그램이 생성되었습니다. 통합 크로마토그램에는 모든 크로마토그램의 모든 피크가 포함되어 있으며, 이는 피크 구역 특징을(특정적 구역) 정의하는데 사용됩니다. 각 크로마토그램에 정의된 특정적 구역의 반응 퍼센티지가 계산되었습니다. 특정적 구역과 각각의 반응 퍼센티지는 분석된 여러 종류의 맥주 비교 및 분류에 사용될 수 있습니다.

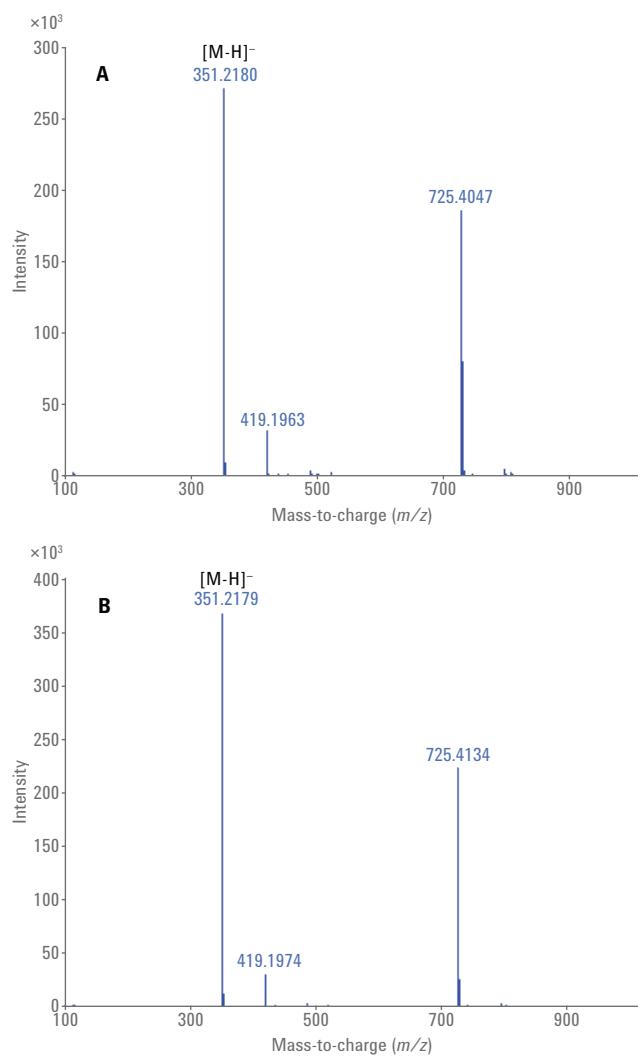


그림 4. reduced *cis*- and *trans*-iso- $\alpha$ -acid 표준품 분석(A) 및 미국 라거 맥주 분석(B)에서 생성된 *cis*-tetrahydro-isocohumulone 질량분석 스펙트럼의 피크

분석된 맥주 시료 분류는 주성분 분석(PCA)을 통해 진행되었습니다. 이 목적을 위해 3회씩 반복 분석된 모든 맥주 시료의 각 특징적 구역의 평균 퍼센티지 반응이 계산되었습니다. 맥주 시료들은 그림 5에서 볼 수 있듯, PCA를 이용해 각각의 타입에 따라 분류되었습니다. 첫 3개의 주성분(F1~F3)에 대해서 대략 88%의 데이터 분산이 산출되었습니다. 미국산 라거 맥주, 아일랜드산 흑맥주, 무알코올 바이젠 맥주는 F1과 F2를 이용해 명백하게 구별되었으며, 이들은 3개의 필스 맥주 그룹 및 바이젠 맥주와도 두렷하게 차이를 나타냈습니다. F3은 서로 관련도가 높은 바이젠 맥주와 필스 맥주 사이의 차이를 드러냈습니다.

## 결론

이 응용 자료에서는 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션을 이용해 다양한 맥주를 comprehensive 2D-LC로 분석하는 것에 대해 다루고 있습니다. C18 컬럼을 이용해 알칼리성과 산성 PH 값이 각각 1차와 2차인 우수한 직교성이 성취되었습니다. 맥주의 쓴맛을 결정짓는 화합물의 식별(iso- $\alpha$ -acid 및 reduced iso- $\alpha$ -acid)은 표준품 비교 분석 및 MS 검출을 통해 이루어졌습니다. LCxLC 소프트웨어 사용 및 주성분 분석으로 진행된 통한 비표적 다중 시료 분석은 여러 종류의 맥주 분류를 가능하게 했습니다.

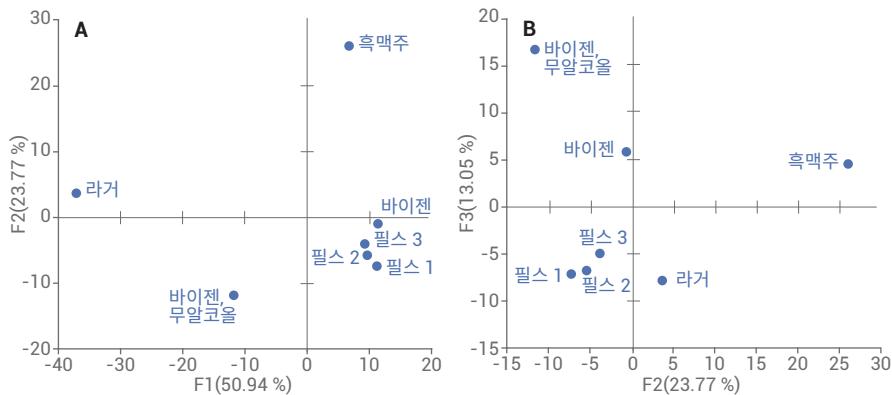


그림 5. 7개의 맥주 시료 주성분 분석. 첫 3개 주성분(F1~F3)은 약 88%의 데이터 분산을 나타냅니다.

## 참고문헌

- Araujo, A. S; et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst* **2005**, 130, pp 884-889.
- Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Beer> (accessed October 15, 2014)
- Intelmann, D; et al. LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, pp 1172-1182.
- Vanhoenacker, G; et al. Analysis of iso-alpha-acids and reduced iso-alpha-acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1035, pp 53-61.
- Ceslova, L.; et al. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, pp 7249-7257.
- S. Schneider, Onsite Quality Control of Beer, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-3474EN, **2013**.
- S. E. Reichenbach, E. Naegele, 2-Dimensional separation of polyphenols in beverages using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution and software-assisted 2D-LC data analysis for comparison of ingredients, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-1455EN, **2013**.
- E. Naegele, Performance evaluation of the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0138EN, **2012**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
2015년 2월 1일, 한국에서 발행  
5991-5521KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)



Agilent Technologies