

# 6Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS와 Mass Profiler Professional을 이용한 위스키 내 비휘발성 물질의 UHPLC/MS 프로파일링

## 응용 자료

식품

### 저자

Thomas S. Collins, Susan E. Ebeler  
Department of Viticulture &  
Enology and the Food Safety and  
Measurement Facility  
University of California  
Davis, CA  
USA

Jerry A. Zweigenbaum  
Agilent Technologies, Inc.  
Wilmington, DE  
USA

### 개요

UHPLC와 accurate-mass Q-TOF 질량분석기의 연결, 그리고 다변량 통계 분석과의 조합은 위스키 프로파일링에 있어 유망한 도구임이 입증되어 왔습니다. 이러한 기법을 통해 위스키 종류, 버번 생산업체, 위스키 숙성 기간에 따른 판별을 할 수 있게 하는 화합물을 식별할 수 있습니다.



**Agilent Technologies**

## 소개

미국 위스키 산업이 산지의 지역 경제 및 전 미국 경제에 미치는 영향이 높기 때문에, 생산업체들은 위조를 비롯한 각종 사기 수법에 공격받기 쉽습니다. 프로세스 최적화 또한 위스키 생산업체들의 핵심 동력입니다. 위스키의 화학적 조성 및 그 변화 요인들에 대한 상세한 이해는 고품질 제품의 효율적 생산을 촉진하고 각종 사기행위로부터 제품을 보호하는 데 도움이 될 수 있습니다.

위스키 조성 연구를 위해 다양한 분석적 접근을 사용해왔습니다. 위스키 분석법은 복잡한 시료 전처리 과정 없이 빠르게 진행될 수 있어야 함과 동시에 다수의 화합물 분리 및 식별이 가능해야 합니다. Quadrupole time-of-flight (Q-TOF) MS를 이용한 초고압 액체 크로마토그래피/질량 분석기 (UHPLC/MS)가 바로 그러한 요건을 충족시키는 분석법입니다.

이 응용 자료에서는 63종의 버번, 호밀, 테네시 및 기타 미국산 위스키 내 비휘발성 성분에 대한 비표적 UHPLC/Q-TOF MS 분석을 사용하는 발표된 연구를 설명합니다[1]. 이 분석법을 Mass Profiler Professional (MPP)을 이용한 다변량 통계 분석과 결합하여 다양한 위스키 종류를 판별할 수 있는 화합물을 최적으로 검출할 수 있습니다. Agilent 6530 Q-TOF LC/MS는 화학식 결정에 필요한 질량 정확도를 제공하며, 다수의 관심 대상 화합물에 대한 구조를 규명할 수 있는 탠덤 질량 분석기(MS/MS) 성능을 제공합니다. 이 접근법을 통해 위스키 종류, 버번 생산업체, 위스키 숙성 기간에 대한 판별 정보를 제공하는 화합물 세트(세트당 대략 40개 화합물로 구성)를 식별하였습니다. 이 분석법에서는 시료 전처리가 필요하지 않으며, 12분만에 크로마토그래피 분리가 완료되므로 프로세스 최적화 및 품질 관리에 적합합니다.

## 실험

### 위스키

본 연구에서는 버번 37종, 호밀 위스키 13종, 테네시 위스키 6종, 기타 미국산 위스키 7종 등 시판 중인 63종의 위스키 시료를 분석하였습니다. 분석은 미개봉 순수(아무 것도 타지 않은) 위스키를 대상으로 진행 하였습니다. 각 시료에 대해 무작위 순서로 UHPLC/MS 분석을 3회 반복 수행하였으며, 시료 마다 프로파일링을 위한 비표적 MS 분석과 마커 화합물 식별을 위한 Auto MS/MS 분석을 수행하였습니다.

### 시약 및 표준물질

시약 및 참조 표준물질은 문헌에 설명된 것과 같이 구하여 사용하였습니다[1].

## 실험 기기

이 프로파일링 접근법은 Agilent 1290 Infinity LC 시스템과 Agilent 6530 Q-TOF LC/MS를 연결하여 개발하였습니다. HPLC와 MS 분석 조건은 표 1에 정리되어 있습니다.

표 1. 기기 분석 조건

### LC 조건

|       |   |     |     |
|-------|---|-----|-----|
| 컬럼    | Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18, 5cm × 2.1mm, 1.8µm (p/n 959757-902) |     |     |
| 컬럼 온도 | 60°C  |     |     |
| 주입량   | 5µL   |     |     |
| 이동상   | A) 0.1 % Acetic acid in water<br>B) 20 % A/80 % Methanol                  |     |     |
| 유량    | 0.6mL/분   |     |     |
| 그라디언트 | 시간(분)   | % A | % B |
|       | 0.00  | 97  | 3   |
|       | 1.00  | 97  | 3   |
|       | <b>선형 그라디언트</b>   |     |     |
|       | 9.00  | 0   | 100 |
| 10.00 | 0   | 100 |     |
| 11.00 | 97  | 3   |     |
| 12.00 | 97  | 3   |     |

총 분석 시간 12분

### Q-TOF MS 조건

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| 이온화 모드                  | ESI, 음이온           |
| 수집 모드                   | Profile 및 centroid |
| 수집 속도                   | 3 spectra/초        |
| 질량 범위                   | m/z 75-1,500       |
| N <sub>2</sub> 건조 가스 온도 | 350°C              |
| N <sub>2</sub> 건조 가스 유량 | 10L/분              |
| 분무기 압력                  | 45 psig            |
| Sheath 가스 온도            | 400°C              |
| Sheath 가스 유량            | 11L/분              |
| 캐필러리 전압                 | 3,000V             |
| 노즐 전압                   | 1,000V             |

### Q-TOF Auto MS/MS 조건

|                  |  |
|------------------|--|
| 수집 속도            | MS 및 MS/MS에 대해 3 spectra/초                   |
| 질량 범위            | m/z 75-1,500(단일 MS),<br>m/z 50-1,450(MS/MS)  |
| Octopole 1 RF 전압 | 750V   |
| Skimmer 전압       | 65V  |
| Fragmentor 전압    | 175V   |
| 충돌 에너지           | 20eV   |
| 분리 폭             | 전구 이온 왼쪽으로 0.3 Da, 전구체 이온의 오른쪽으로 3.7 Da (중간) |
| 전구 이온 선택         | 최대 존재비에서 2, 임계값 200 cps                      |
| Active exclusion | 2 spectra 및 0.1분 후                           |

## 데이터 분석

LC/MS 데이터의 초기 처리에는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어(6.00 버전)를 사용하였으며, 화합물은 소프트웨어의 Molecular Feature Extractor(MFE) 도구를 사용해 밝혀냈습니다. 세트 내 시료의 질량과 머무름 시간 데이터를 정렬하고, 주성분 분석(PCA)을 포함한 시료 프로파일링에 필요한 통계 분석을 수행하기 위해 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 소프트웨어(12.6.1 버전)를 사용하였습니다. MS/MS 스펙트럼에 기반한 화합물 식별에는 Agilent Metlin Metabolite Personal Compound Database & Library (PCDL, 5.0 버전)를 사용하였습니다.

## 결과 및 토의

### 위스키 종류를 판별할 수 있는 화합물의 식별

모든 위스키 시료는 3회 반복 분석하였습니다. MFE를 이용한 피크 식별 및 MPP를 이용한 질량과 머무름 시간 정렬을 통해, 모든 위스키 시료에 약 7,600종의 화합물이 존재함을 밝혀냈습니다. 한 시료의 모든 반복 분석에서 검출되지 않은 화합물을 제외시킨 결과, 그 수가 3,100종으로 줄어들었습니다. 다음 스크리닝 단계에서 적어도 한 위스키 종류의 모든 시료에 존재하지 않는 화합물을 제외시킨 결과, 총 266종의 화합물이 남았습니다. 최소 피크 존재비 수준인  $\geq 1 \times 10^6$  카운트를 충족하는 화합물만을 선택하면, 세트는 43종으로 줄어들게 됩니다. 분산 분석(ANOVA)을 통해  $p < 0.05$  수준에서 변이를 보이는 화합물들로 제한한 결과, 최종적으로 40종의 화합물 세트가 남았으며, 이들을 대상으로 이후의 통계 분석을 수행하였습니다.

## 버번, 테네시, 호밀 위스키의 비교

버번, 호밀, 테네시 위스키의 판별을 위해 PCA 분석을 수행하였습니다. 미국식 블렌딩 및 수제 위스키는 다른 위스키와의 차이가 확연하여, 이 시료 세트에서 제외하였습니다(그림 1). 대부분의 테네시 위스키는 버번 및 호밀 위스키와 구별되었으나 몇 종은 테네시 위스키가 다른 종류와 뚜렷하게 구분되는 것을 막으며 분리되지 않았습니다. 호밀 위스키는 버번 위스키에 대해 일부가 구별 되었으며, 버번 위스키와 잘 구별된 호밀 위스키는 주로 호밀 위스키에 중점을 둔 소규모 생산업체들의 것이었습니다. 반대로 호밀 위스키와 버번 위스키를 모두 생산하는 업체의 호밀 위스키에서는 버번 위스키와 구별이 잘 되지 않는 양상이 나타났습니다.

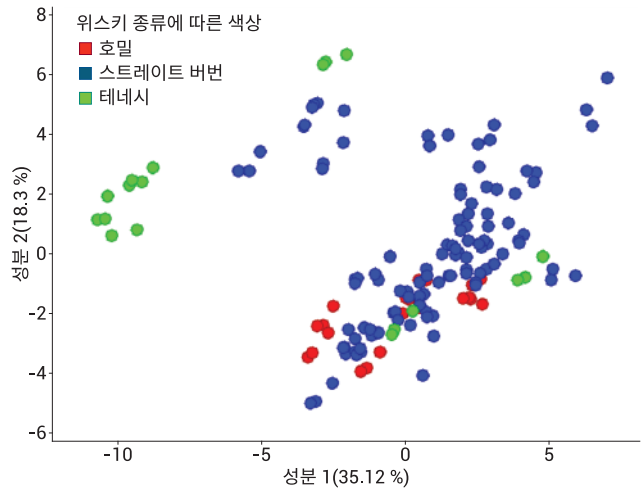


그림 1. MPP로 생성한 60종의 버번, 호밀 및 테네시 위스키에 대한 2차원(2D) PCA 도표. 테네시 위스키와 호밀 위스키 사이의 부분적인 구별이 나타남

## 여러 생산업체의 버번 비교

주요 버번 생산업체의 위스키 특성 규명에 가장 적합한 화합물을 사용하기 위해, 이 생산업체들의 35가지 위스키를 MPP로 다시 분석하였습니다. 이 시료들은 총 원본 시료 세트와 동일한 방법으로 필터링하였습니다. 2D PCA 도표는 4번 생산업체의 버번 위스키만이 나머지 5개 주요 생산업체의 제품과 뚜렷하게 구별되었다는 것을 그래프로 나타냈습니다(그림 2).

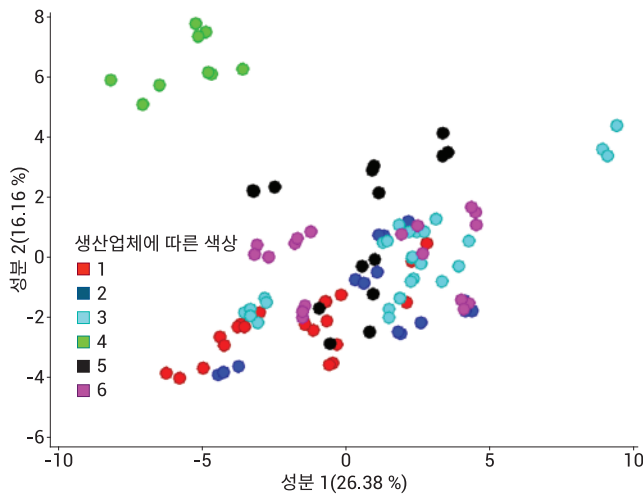


그림 2. MPP로 생성된 버번 생산업체 6곳의 35개 위스키에 대한 2D PCA 도표, 4번 생산업체의 나머지 위스키 생산업체에 대한 뚜렷한 구별을 보여줌

## 위스키 숙성 기간 판별

주요 생산업체의 33가지 위스키를 숙성 기간에 따라 4년 이하, 4 ~ 8년 및 8년 이상의 3개 카테고리로 분류하였습니다. 그림 3은 각 위스키의 3회 분석 평균값을 이용한 PCA 결과를 보여줍니다. 숙성 기간이 중간(4 ~ 8년)인 위스키들은 숙성 기간이 최장인 위스키들과 완벽하게 구별되지 않은 반면, 숙성 기간이 가장 짧은 그룹(4년 이하)의 위스키들은 나머지 위스키들과 구별되었습니다. 숙성 기간을 완벽하게 구별할 수 없었던 이유 중 일부는 여러 제품의 정확한 숙성 기간 정보를 얻는 것이 어렵기 때문일 수 있습니다. 특히, 일부 8년 이상 숙성된 위스키는 여러 숙성 기간의 위스키들을 혼합한 제품일 수 있습니다.

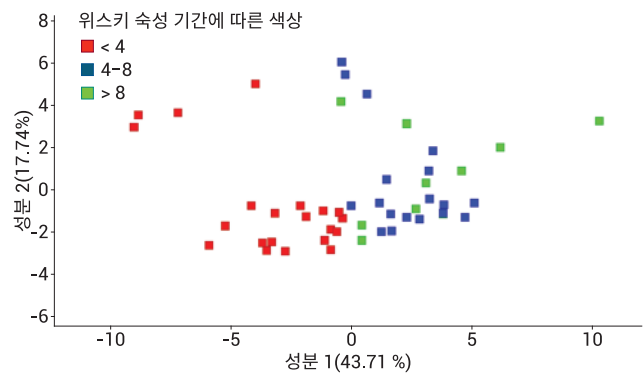


그림 3. MPP로 생성된 다양한 숙성 기간의 위스키에 대한 2D PCA 도표. 4년 이상 숙성된 위스키와 4년 이하 숙성된 위스키 간 구별 가능

표 2는 위스키 숙성 기간과 관련이 있는 화합물을 보여줍니다. 위스키 시료의 Auto MS/MS 스펙트럼은 Metlin PCDL에 대한 MS/MS 라이브러리 검색 및 문헌상 스펙트럼과 MS/MS 스펙트럼의 비교를 통해 식별하였습니다[2]. 예상한 대로, 나무와 관련된 화합물들이 각 위스키 숙성 기간 카테고리과 연관되어 있었습니다. 가장 짧은 숙성 기간의 위스키들은 짧은 사슬(C8-C12)의 지질 및 지방산에 의해 특성이 규명되었고, 가장 긴 숙성 기간의 위스키들은 긴 사슬(C18, C20)의 지방산과 연관되어 있었습니다.

표 2. 위스키 숙성 기간과 관련된 화합물

| 화합물   | Accurate mass | RT (분) | 식별 기준             |
|---|---------------|--------|-------------------|
| <b>숙성 기간이 상대적으로 짧은 위스키</b>                    |               |        |                   |
| Octanoic acid                                 | 144.1097      | 7.30   | Metlin MS/MS*     |
| Decanoic acid                                 | 172.1459      | 8.56   | Metlin MS/MS      |
| Coniferaldehyde                               | 178.0502      | 4.08   | Metlin MS/MS      |
| Diferulic acid                                | 386.094       | 3.54   | Metlin MS/MS      |
| <b>숙성 기간이 상대적으로 긴 위스키</b>                     |               |        |                   |
| Syringaldehyde                                | 182.0548      | 3.53   | Metlin MS/MS      |
| Ellagic acid                                  | 302.0035      | 4.52   | Metlin + standard |
| Octadecanoic acid, dihydroxy- 또는 hydro-peroxy | 346.2327      | 7.25   | Metlin MS/MS      |
| Dodecanoic acid                               | 200.1791      | 5.39   | MacNamara†        |
| Vanillin                                      | 152.0473      | 3.14   | MacNamara         |
| 미지 성분   | 518.3223      | 8.02   | MacNamara         |

\* Agilent Metlin Personal Compound Data Base and Library (PCDL)

† 참고문헌 2 참조

## 결론

Agilent Infinity 1290 LC 시스템의 UHPLC 성능과 Agilent 6530 Q-TOF LC/MS의 높은 질량 정확도, 고분해능 질량 분석을 결합한 비표적 분석 접근은 버번, 호밀, 테네시 및 기타 미국산 위스키의 프로파일링에 효과적입니다. MPP를 이용한 다변량 통계 분석은 서로 다른 위스키 종류를 판별하고 서로 다른 위스키 생산업체들과 숙성 기간이 다른 위스키들의 특성을 규명할 수 있습니다. 이는 해당 접근법이 다양한 종류의 위스키에 대한 진위 확인에 유용할 수 있음을 시사합니다. MS/MS 분석 및 Agilent Metlin PCDL을 포함하는 스펙트럼 라이브러리의 활용으로 위스키 판별에 사용되는 화합물을 식별할 수 있었습니다. 이들 화합물은 또한 품질 관리 프로그램의 일상적 모니터링을 위한 마커로서 사용될 수 있습니다.

## 참고문헌

1. T. S. Collins, J. Zweigenbaum, S. Ebeler. "Profiling of novolatiles in whiskeys using ultra high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF MS)." *Food Chem.* **163**, 186-96 (2014).
2. K. MacNamara, D. Dabrowska, M. Baden, N. Helle. "Advances in the ageing chemistry of distilled spirits distilled in oak barrels." *LC/GC* **14**, 6-22 (2011).

## 자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다.  
애질런트 제품에 대한 더 자세한 정보를 알아보시려면  
[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)을 방문하십시오.

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

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2014  
2014년 11월 25일  
한국에서 인쇄  
5991-5328KO

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**