

기체크로마토그래피법에 의한 알코올 음료내 휘발성 및 비휘발성 유기산의 신속한 스크리닝

김정한 · 김경례* · 채정영 · 박형국 · 최경숙**

연세대학교 식품생물공학과, *성균관대학교 약학대학, **연세대학교 산업기술연구소

Rapid Gas Chromatographic Screening of Alcoholic Beverages for Volatile and Nonvolatile Organic Acids

Jung-Han Kim, Kyoung-Rae Kim*, Jeong-Young Chai, Hyung-Kook Park and Kyoung-Sook Choi**

Department of Food and Biotechnology, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

**Engineering Research Institute, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract

A rapid gas chromatographic (GC) profiling method for the simultaneous analysis of volatile and nonvolatile organic acids was applied to alcoholic beverages (white wine, red wine, brandy, and beer). It involves the solid-phase extraction of organic acids using Chromosorb P as the sorbent and diethyl ether as the eluent with subsequent triethylamine treatment. The resulting triethylammonium salts of acids were directly converted to volatile *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, which were analyzed by dual-capillary column GC and GC-mass spectrometry. From the alcoholic beverages studied, more than 29 organic acids were detected. When the simplified retention index (RI) spectra of organic acids, and the direct comparisor method between alcoholic beverages and a test sample were attempted to identify a test sample, it was quickly recognized to be a red wine with the 998 ppt match quality value.

Key words: organic acids, solid-phase extraction, alcoholic beverages, gas chromatographic profiles, pattern recognition.

서 론

식품속에 존재하는 유기산은 식품이 색, 맛, 향 등의 관능적 특성을 부여하고 식품의 조직과 식품의 생물학적 안정성에 영향을 미치고 있다⁽¹⁾. 특히 유기산이 중요한 알코올 음료에서는 제조과정과 속성과정에서의 속성도, 당농도, 온도에 의해 생성되는 유기산의 조성과 양이 차이나며, 이러한 차이에 의해 알코올 음료에 대한 기호가 결정된다^(2~4).

포도주 제조시 발효과정중에 당이 모두 소모되기 전에 알코올발효중에 생성된 caprylic acid, capric acid 및 lauric acid가 효모의 생육을 저해하여 알코올발효가 중지되고 젖산균이 활성화되어 포도주의 산도를 증가시키는 문제점이 보고되고 있다⁽⁵⁾. 포도주의 속성단계에서는 malic acid가 lactic acid로 변하는 정도에 따라 포도주의 맛에 큰 차이가 있으므로 포도주 속성시 malic acid의

양을 측정하여 속성의 정도를 판단할 수 있다고 한다⁽⁵⁾. 빌효단계에서 생성되는 지방산중 저급지방산인 caproic acid와 caprylic acid의 함량이 4~10 mg/l일 때 가장 좋은 포도주가 만들어지며⁽³⁾, 포도주의 품질은 malic acid⁽⁶⁾, caproic acid, caprylic acid, capric acid들^(3,5)에 의해 주로 결정된다.

맥주에서는 고급지방산 등이 향을 부여하는데 특히 속성과정시 linoleic acid와 linolenic acid가 효소와 자유라디칼반응에 의해 휘발성이 강한 알데히드, 케톤, 유기산 등으로 산화, 분해되어 맥주에 쓴 맛과 강한 향을 부여한다고 한다⁽⁷⁾. 특히 호프추출물의 tetrahydroiso-(8), trihydrooctadecenoic acid는 맥주의 품질을 저하시키는 주요 향기성분으로 보고되고 있다⁽⁹⁾.

따라서 유기산은 알코올 음료의 제조공정을 살펴보는 한 지표이자, 최종제품인 알코올 음료의 품질을 결정하는 중요한 물질이므로 이러한 유기산의 조성과 함량을 신속하고 정확하게 분석하는 것은 매우 중요한 일이다.

일반적으로 식품속의 유기산 조성을 조사하기 위해서

Corresponding author: Jung-Han Kim, Department of Food and Biotechnology, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

는 액체-액체 추출법과 음이온 교환수지법이 널리 이용되고 있으며^[4,9,10], 분리된 유기산의 정성, 정량분석은 high performance liquid chromatography(HPLC)^[1,7,8]와 gas chromatography(GC)^[11~14] 분석방법을 많이 사용하고 있다. 그러나 액체-액체 추출법과 음이온 교환수지방법 등은 다량의 용매사용으로 시료가 오염될 확률이 높고, 전처리시간이 길기 때문에 유기산의 손실이 커서 알코올음료 제조공정 중의 유기산을 정확하고 신속하게 정량하기 어려운 점이 있다.

본 연구실에는 이미 수용성 및 지용성 시료로부터 다양한 휘발성, 비휘발성 유기산을 동시 분석하고 동정하기 위해서 고체상 추출법/*tert*-butyldimethylsilyl(TB-DMS) 유도체화/dual-capillary column GC system의 신속한 분석법을 개발하여 보고한 바 있다^[12~14]. 본 연구에서는 이 분석법을 유기산의 함량과 조성이 제품의 질에 큰 영향을 미치는 알코올 음료(적포도주, 백포도주, 브랜디, 맥주)에 적용하여 휘발성과 비휘발성 유기산들을 신속히 프로파일링하고 스크리닝하였다. 또한 임의의 시료와 4개의 알코올 음료들의 유기산에 대하여 Pearson의 상관분석법을 응용한 Direct comparison법을 시도하여 본 분석방법의 시료판정에 대한 유사도를 평가하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 분석한 알코올 음료(백포도주, 적포도주, 브랜디, 맥주)는 모두 시중에서 구입하여 냉장보관하면서 사용하였다. 추출용 용매로는 시약급 diethyl ether(Duk-san, Korea)를 potassium hydroxide 상에서 연속 증류한 후 과량의 sodium sulfate를 넣어 4°C에 저장하면서 사용하였다. Silylation 시약인 N-methyl-N-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce(Rockford, USA)로부터, 포화탄화수소 표준물질들($C_8 \sim C_{30}$)은 Polyscience(Niles, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 고체상 추출용 흡착제인 Chromosorb P(AW, 80~100 mesh)는 Supelco (Bellefonte, USA)의 시약급이었으며, 황산, 소금, isoctane은 Junnsei(Japan), sodium bicarbonate는 Yakuri(Japan)회사의 제품을 사용하였다.

기기분석

RI값 비교에 의한 유기산 동정의 목적으로 본 연구실의 dual capillary column system을^[14] 사용하였다. 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지한 후 분당 4°C로 상승시켜 280°C에서 30분간 유지하였다. FID의 온도는 300°C였으며 on-column injector를 사용하여 0.2 μl의 시료를 포화탄화수소 혼합 표준용액(isoctane에 100 ppm의 $C_8 \sim C_{30}$)과 함께 주입하였다. 면적비(AR)를 계산하기 위해서 내부표준물질로서 methyl linolate를 사용하였다. GC로 동정된 유기산의 재확인은 HP-5890 series II

GC와 HP-35741 MS chemstation data system이 연결된 HP-5970B MSD를 사용하였으며, 컬럼은 HP-5(25m × 0.20 mm I.D., 0.31 μm d_f, Hewlett-Packard, Avondale, USA)를 사용하였고, 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. Split injector의 온도는 260°C, split ratio는 10 : 1이었다. 70 eV의 EI(electron impact) mode로 interface 온도는 280°C로 유지하였다.

알코올 음료의 동정: 본 연구실에서 보고한 방법^[14]에 의해 4가지 알코올 음료를 NaHCO₃로 포화시킨 후 diethyl ether로 추출하여 ether층을 버렸다. 수용액층에서 1.0 mL를 취하여 진한 황산을 몇 방울씩 떨어뜨려 pH 1이하로 산성화시키고 NaCl로 포화시킨 후, Chromosorb P 컬럼에 loading 시켰다. Diethyl ether로 유기산들을 선택적으로 용출시켜 얻은 약 4 mL의 ether 용출액에 triethylamine(TEA) 20 μL를 가하고 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 후 ether를 휘발 농축시키고 MTBSTFA 20 μL와 isoctane 60 μL를 가하여 60°C에서 5시간 반응시킨 뒤 GC 및 GC-MS로 분석하였다.

분리된 유기산 peak들의 RI값을 본 연구실에서 작성한 유기산 RI library(ACIDO.L)의 RI값과 비교하여 동정하였다. 동정된 각 피크들은 면적비 비교법으로 재확인하였으며 GC-MS의 mass spectrum들은 미리 작성한 MS library(TBDMS.1)와 비교하여 확인하였다.

유기산 RI spectrum 작성 및 신뢰도와 유사도 평가 : DB-5 컬럼으로 얻어진 GC chromatogram에서 유기산들의 피크 면적을 mass spectrum처럼 각 유기산들의 RI 값에 대한 백분 상대치 변화로 표시하여 RI spectrum을 작성하였다. 또한 가장 피크면적이 큰 유기산의 피크면적에 대한 백분상대치로 계산하여 임의의 시료와 4개의 알코올 음료들의 유기산에 대하여 Pearson의 상관분석법을 응용한 Direct comparison법을 시도하여 본 분석방법에 의한 임의시료 판정에 대한 유사도를 평가하였다.

결과 및 고찰

알코올 음료로부터 유기산의 동정

두 단계의 고체상 추출법을 사용하여 복합물체 시료인 알코올 음료로부터 유기산만을 선택적으로 분리하여 백포도주, 적포도주, 브랜디, 맥주 4종류 음료 각각의 유기산 peak들을 dual capillary column system으로 신속, 정확하게 동정하였고 이를 GC-MS로 확인하였다(Table 1). 이를 알코올 음료들의 유기산을 고체상 추출법으로 분리, 농축시 1시간 정도가 걸리며, Chromosorb P의 사용으로 알코올의 간섭없이 미량의 유기산까지 분리해 낼 수 있었다. 이를 통해 고체상 추출법이 알코올 음료의 유기산 분리시 사용되던 액체-액체 추출법과 음이온 교환수지법보다 효과적임을 알 수 있었다. 또한 알코올 음료의 향에 중요한 휘발성 유기산이 triethylammonium

Table 1. Organic acids in the alcoholic beverages identified by GC-RI, GC-AR comparison and GC-MS matching

Peak No.	Acid	Identification			Alcoholic Beverages			
		GC-RI	GC-AR	GC-MS	White wine	Red wine	Brandy	Beer
1	Formic			+				+
2	Acetic	+	+	+	+	+	+	+
3	Propionic	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>i</i> -Butyric	+	+	+		+		+
5	Butyric	+	+	+	+	+		+
6	<i>i</i> -Valeric	+	+	+		+	+	+
7	Caproic	+	+	+	+	+	+	+
8	Caprylic	+		+	+	+	+	+
9	Lactic	+	+	+	+	+	+	+
10	Benzoic	+		+	+	+	+	+
11	Glycolic	+	+	+	+	+	+	+
12	Phenyl acetic			+	+		+	+
13	α -Hydroxy- <i>i</i> -valeric	+	+	+	+		+	
14	α -Hydroxy- <i>i</i> -caproic	+	+	+	+			
15	Succinic	+	+	+	+	+	+	+
16	Methyl succinic	+	+	+				+
17	Glutaric	+	+	+	+	+		+
18	Methyl glutaric	+	+	+	+	+		+
19	Salicylic	+			+		+	
20	Adipic	+	+	+	+			
21	Itaconic	+				+		+
22	Fumaric	+		+			+	
23	Malic			+	+	+		+
24	Palmitic	+	+	+		+	+	+
25	Stearic	+	+	+				+
26	Linolenic	+	+	+				+
27	cis-Aconitic	+	+	+			+	+
28	Tartaric			+	+	+		+
29	Citric			+	+	+		+

염의 형태로 되어 손실없이 농축되므로 비휘발성 및 휘발성 유기산 모두를 동시에 분리해낼 수 있었다. 분리된 유기산들을 TBDMS 유도체화하여 기존의 methyl ester나 TMS 유도체의 GC 분석에서는 분리되지 않은 formic과 acetic acid가 완전히 분리되어 한 컬럼에서 전체 유기산의 동시분석이 가능하게 되었다.

백포도주의 경우 17가지의 유기산을 DB-5와 DB-1701 컬럼에서의 RI값으로 동정할 수 있었으며, 이 중 caprylic, benzoic, salicylic acid를 제외한 13가지 유기산은 AR값 비교로 확인되었다. Caprylic과 benzoic acid는 DB-5 컬럼에서 분리가 안되어 서로 겹치며 DB-1701 컬럼에서는 완전히 분리되어 AR값으로는 확인이 안되었으나 두 컬럼에서의 RI값이 정확하게 일치되므로 이들 유기산들이 존재함을 알 수 있었다. Salicylic acid로 판정한 peak는 AR값의 상대오차가 96%로 확인이 안되었으나 이 유기산이 포도에 존재함이 보고된 문헌이 있었으며⁽¹⁵⁾, 그 양이 적어 GC-RI로는 동정하기 어려웠던 phenyl acetic, malic, tartaric, citric acid가 GC-MS로 백포도주에 존재하고 있음을 알 수 있었다⁽²⁶⁾. 따라서 백포도주에서는 총 21가지의 유기산을 동정할 수 있었으며 그 외의 동정안된

유기산들은 TBDMS유도체화한 유기산들의 library 외의 유기산들이므로 비교, 동정할 수 없었다. 적포도주에서는 GC-RI로 12가지의 유기산을 확인하였으며 백포도주와 같이 benzoic acid와 itaconic acid는 AR값으로 확인이 안되었다. GC-RI로 확인된 12가지 유기산 외에 GC-MS로 아주 적은 양이지만 *i*-butyric, butyric, *i*-valeric, phenylacetic, malic, tartaric, citric acid를 동정하였다.

포도주와 같은 원료로 만든 종류주인 브랜디의 경우 모두 13가지의 유기산이 동정되었으며 이중에서 10가지는 GC-RI로 동정되었고 이중 salicylic acid는 AR값으로 확인되지 않았고 3가지 유기산은 GC-MS로 동정되었다.⁽⁷⁾ 맥주는 포도주와는 다소 다르게 탄소수가 많은 고급불포화 지방산이 동정되었다. 맥주주의 GC-RI와 AR로 동정된 16가지 유기산 모두가 GC-MS로 확인되었고 새로이 formic acid가 동정되었다. Salicylic acid는 불순물과 겹쳐 AR값과 GC-MS로 확인할 수 없었으나, 이는 극성이 또 다른 컬럼을 하나 더 사용하거나 온도조절을 바꿔 분석하면 해결될 수 있으리라 본다.

이상과 같은 알코올 음료의 유기산분석 결과, 총 29

Table 2. Organic acids found in alcoholic beverages

Peak No.	Acid	White wine	Red wine	Brandy	Beer	Test
1	Formic	0.00	0.00	0.00	(a)	0.00
2	Acetic	100.00	100.00	100.00	90.20	100.00
3	Propionic	6.08	2.13	14.02	14.72	1.73
4	<i>i</i> -Butyric	0.00	0.48	0.00	0.68	0.39
5	Butyric	1.50	0.46	1.75	1.72	0.37
6	<i>i</i> -Valeric	0.00	0.63	14.32	0.94	0.51
7	Caproic	1.22	0.77	4.00	1.49	0.63
8	Caprylic	0.00 ^(b)	0.00 ^(b)	0.00 ^(b)	0.00 ^(b)	0.00
9	Lactic	89.45	99.19	44.80	100.00	80.56
10	Benzoic	2.70	7.40	29.95	5.77	6.02
11	Glycolic	1.23	10.50	20.99	5.27	8.53
12	Phenyl acetic	2.38	7.14	0.00	0.00	5.80
13	α -Hydroxy- <i>i</i> -valeric	2.66	0.00	3.05	0.00	0.00
14	α -Hydroxy- <i>i</i> -caproic	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00
15	Succinic	7.84	17.95	3.90	10.10	14.58
16	Methyl succinic	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00
17	Glutaric	69.82	41.33	0.00	0.00	33.57
18	Methyl glutaric	14.75	8.94	0.00	0.00	7.27
19	Salicylic	0.36	0.00	7.88	0.00	0.00
20	Adipic	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
21	Itaconic	0.00	1.65	0.00	0.00	1.34
22	Fumaric	0.00	0.00	0.00	1.45	0.00
23	Malic	0.39	0.58	0.00	0.00	0.48
24	Palmitic	0.00	4.09	1.65	9.22	3.32
25	Stearic	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00
26	Linolenic	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00
27	cis-Aconitic	0.00	0.00	7.12	1.97	0.00
28	Tartaric	0.54	2.55	0.00	0.00	2.07
29	Citric	0.19	0.68	0.00	0.00	0.55

^aPeak area can not measured because of co-elution with solvent. Degree of freedom of benzoic acid is 28.

^bThe peaks of benzoic and caprylic acids are not separated, therefore the value of benzoic acid is the sum of benzoic and caprylic acids.

가지의 유기산을 동정할 수 있었다. 29가지 유기산은 그 종류가 fatty acid, dioic acid, hydroxy acid, aromatic acid류들로 동정되었고, 같은 원료로 만들어지는 포도주와 브랜디에서는 유기산의 종류는 비슷하나 그 양적인 차이가 있음을 알 수 있었다. 알코올 음료 속의 유기산들은 음료에 따라 다를 뿐 아니라 같은 음료에서도 질에 따라 다르며 발효, 숙성과정 시 계속 변하므로, 음료로부터 유기산을 선택적으로 빨리 분리하여 신속하게 profile을 살펴보고 동정하는 이 분석방법은 알코올 음료의 제조 과정 및 품질관리에 이용될 수 있으리라 본다.

알코올 음료의 RI spectra 비교와 유사도

각 음료의 유기산 패턴을 비교하여 상이성을 찾기 위하여 DB-5 컬럼에 의해 분리, 동정된 유리 지방산과 유기산 피크들만을 선택적으로 확대하여 막대 그래프 형태의 RI spectra로 단순화시켰다. RI 값의 차이가 적어서 구별 안되는 피크들은 다시 확대하여 임의시료의 RI spectrum과 알코올음료들을 비교해 본 결과, 적포도

주입을 쉽게 알 수 있었다(Fig. 1).

작성된 RI spectrum들의 유사도를 측정하기 위해 Pearson의 상관분석법을 응용한 Direct comparison 법을 이용하여 match quality (ppt)를 계산하였다. 각 표준시료에 대한 임의시료의 match quality는 적포도주(998), 백포도주(969), 맥주(938), 브랜디(845)순이었다.

요약

Gas chromatography를 이용한 profiling과 신속한 동정을 여러 알코올 음료(적포도주, 백포도주, 맥주, 브랜디) 속에 존재하는 휘발성 및 비휘발성 유기 산의 동시분석에 적용하여 보았다. 흡착제로 Chromosorb P와 용출용매로 diethyl ether를 사용하는 고체상추출법을 이용하여 알코올 음료로부터 유기산을 분리한 후, triethylammonium 염으로 만들었다. 그 후 유기산을 *tert*-butyldimethylsilyl 유도체로 만들어 극성이 다른 DB-5와 DB-1701 두 컬럼으로 동시분석하였다. 두 컬럼에서 분리된 유기산 피

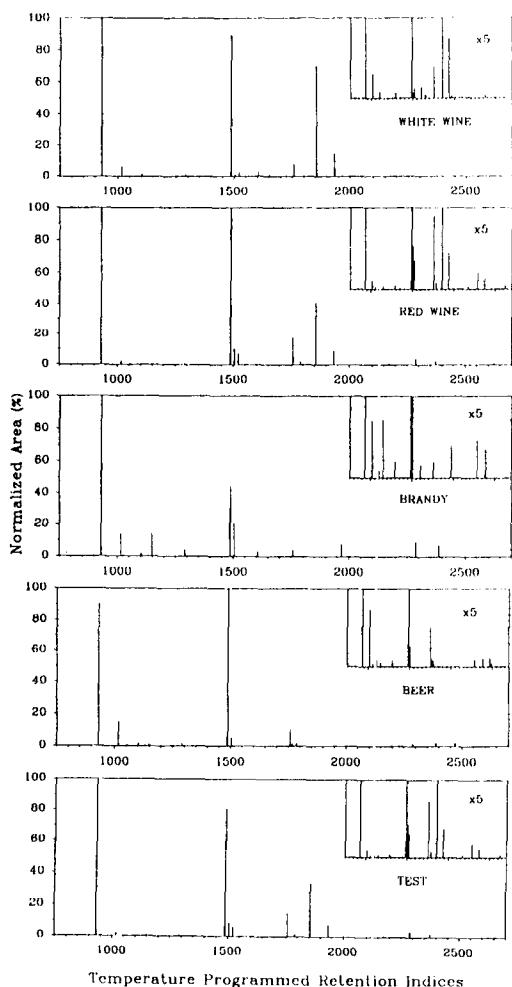


Fig. 1. Temperature programmed retention index spectra of free organic acids from alcoholic beverages

크들을 dual capillary column system의 retention index (RI) library 탐색과 면적비(AR) 비교로, 신속하고 정확하게 동정할 수 있었으며 이들을 GC-MS로 확인하였다. 알코올 음료들의 유기산 분석결과, fatty acid, dioc acid, hydroxy acid, aromatic acid 등 29가지의 유기산이 동정되었고 각 음료의 종류에 따라 특징적인 유기산 GC profile을 나타내었다. 각 음료의 GC profile의 유기산 조성만을 단순화시킨 RI spectra로 표현한 결과, 각 음료의 유기산 패턴의 분별이 매우 용이하였으며, Direct comparison법을 시도해 본 결과, 998 ppt의 match quality값을 나타내어 임의의 시료가 적포도주임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 일부 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥

재단의 자유공모과제 학술연구조성비 지원으로 수행되었음.

문 헌

1. Marce, R.M., Calull, M., Olucha, J.C., Borrull, F. and Rius, F.X.: Optimized isocratic separation of major carboxylic acids in wine. *J. Chromatogr.*, **542**, 277(1991)
2. Kupina, S.A., Pohl, C.A. and Gannotti, J.L.: Determination of tartaric, malic, and citric acids in grape juice and wine using gradient ion chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**(1), 1(1991)
3. Shinohara, T.: Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(7), 2211 (1985)
4. Hawthorne, D.B., Kavanagh, T.E. and Clarke, B.J.: Determination of low molecular weight organic compounds in beer using capillary gas chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**, 23(1987)
5. Calull, M., Borrull, F., Marce, R.M. and Zamora, F.: HPLC analysis of fatty acids in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**(3), 268(1991)
6. Garcia De Maria, C., Munoz, T.M., Mateos, A.A. and Garcia De Maria, L.: Enzymatic determination of free L(-)-malic acid in must and wine by stopped-flow flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, **247**, 61(1991)
7. Hirotaka, K., Yukinobu, K., Minoru, K., Toshihiko, O. and Shunro, K.: Analysis of long chain fatty acids in beer by HPLC-fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1363(1990)
8. Hay, B.A. and Homiski, J.W.: Efficient one step preparation of the beer additive tetrahydroiso α -acids. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1732(1991)
9. Hamberg, M.: Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: Qualitative and Quantitative Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1568(1991)
10. Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. and Drawert, F.: Identification and determination of volatiles constituents in wines from different vine cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 927(1986)
11. Beare-Rogers, J.L. and Diffenbacher, A.: Determination of n-3 and n-6 unsaturated fatty acid in vegetable oils and fats by capillary gas liquid chromatography. *Pure and Appl. Chem.*, **62**(4), 795(1990)
12. 김경례, 김정한, 박형국 : TROMS 유도체로서 수용액 시료중의 유기산 미량 분석 연구. 대한화학회지, **34**, 352(1990)
13. Kim, K.R., Kim, J.H., Park, H.K. and Oh, C.H.: Dual capillary column system for the qualitative gas chromatography: 1.Comparison between split and splitless injection modes. *Bull. Korean Chem.*, **12**, 87(1991)
14. 김정한, 김경례, 채정영, 오창환, 박형국 : 기체크로마토그래피법에 의한 식물성 유지내 유리지방산의 신속한 스크리닝. 한국식품과학회지, **24**, 373(1993)
15. Takashi, S. and Masazumi, W.: Effect of fermentation conditions and aging temperature on volatile ester contents in wine. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2645(1981)