

## 기체 Chromatograph를 이용한 체액내 Volatile Free Acid 의 분석연구

김 경 레 · 한 미 경

성균관대학교 약학대학

(Received November 7, 1987)

### Volatile Free Acid Profiling of Body Fluids by Gas Chromatography

Kyoung Rae Kim and Mi Kyoung Hahn

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 170, Korea

**Abstract**—A gas chromatographic method is described for the determination of volatile free acids(VFAs) in body fluids. VFAs were trace enriched from body fluids by liquid-solid extraction using Chromosorb P as the solid sorbent and ether as the eluant. The enriched VFAs were injected in splitless injection mode onto a HP-20M fused silica capillary column. The flame ionization detector was used as the detector. The present method was applied to the profiling of VFAs in body fluids from patients suffering from the infectious disease, hepatitis. The VFAs concentrations were high in saliva of hepatitis patients and isobutyric acid detected in sera of hepatitis patients compared to healthy subjects.

여러가지 감염성 질환중 주로 virus, 세균, 약  
물등에 의해 발병이 되는 간염은 간세포의 피사  
를 유발하는 간의 염증성 질환으로 최근 우리나  
라에서도 제 I종 법정 전염병으로 지정되었다.  
특히 B형 간염에 의해 발병이 되는 B형간  
염<sup>1-4)</sup>에 대한 공포는 날이 갈수록 증대되고 있  
으므로 치료를 소홀히 하여 안정도 안하고 방치  
해 두면 간경화나 간암으로 발전할 수 있다는  
것이 요사이 큰 문제로 부각되고 있는 바 간염  
에 대한 연구가 다각적으로 수행되고 있다.<sup>5-8)</sup>

한편 질병으로 인해 생체에 이상이 생길 경우  
동시에 생체액의 화학적 조성에 많은 변화가 일  
어나며 이 정보는 질병진단에 커다란 지표가 된  
다. 따라서 현재 여러가지 대사이상에 의한  
metabolites의 변화를 질병진단의 지표로 사용하  
는 분석연구<sup>9-16)</sup>가 보고되고 있다. 특히 간은  
체내 metabolism에 중요한 기관이므로 간대사에  
장애가 일어날 경우 생체의 전체적인 metabolites  
에 변화가 생긴다. 따라서 정상인과 간염환자의  
노중 비휘발성 유리산(nonvolatile free acids)의  
차이를 확인한 연구<sup>17)</sup>가 보고 되었고, 그의 생

체액에 존재하는 비휘발성 유리산의 차이를 간  
염의 진단에 응용한 예<sup>18,19)</sup>가 계속 연구되고  
있다.

그 중 심한 악취를 내고, 점막에 독성을 유발  
시키는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>의 free fatty acids는 간의 대사에  
장애가 있을 경우 환자의 생체액(호흡, 혈액)에  
존재한다는 연구도 보고되었다.<sup>20)</sup> 그러나, 간염  
이 발병하였을 경우 변화되는 휘발성 유리산  
(volatile free acids : 이하 VFAs라 약함)의 pro-  
file에 대한 연구는 거의 시도되지 않은 상태이  
므로 본 연구에서는 간염이 발병했을 경우 C<sub>2</sub>-  
C<sub>5</sub>의 VFAs profile의 변화를 조사하고자 실험을  
시도하였다. 특히 B형 간염은 타액으로 30~  
50%, 혈액이나 산도로부터 10~50% 감염되므  
로 정상인과 환자의 타액, 뇨, 혈청을 대상으로  
실험하였다.

체액의 대사물들은 고성능 기체 및 액체 크로  
마토그래피(GC, HPLC)의 고감도 검출기 개발  
과 GC/MS의 발전으로 현재 pg/ml의 낮은 농  
도까지 분석 검출될 수 있다. 그러나 모든 미량  
분석의 성공은 혼합물체로부터 원하는 성분들을

분리농축하는 방법에 크게 좌우되므로 시료 전처리 기술이 분석화학의 중요한 분야로서 위치하고 있으며, 기기분석에 앞서 혼합물체로부터 분해, 오염없이 신속히 분리농축하는 방법의 개발이 가장 큰 문제로 대두되고 있다.

이 목적으로 사용되어온 유기용매 추출법(liquid-liquid extraction)<sup>21)</sup> 대신 적당한 고정흡착제에 흡착시켜 원하는 성분들만을 선택적으로 적절한 유기용매로 용출시키거나 혹은 방해되는 성분들을 먼저 씻어낸 후에 용출시키는 liquid-solid extraction(LSE) 방법<sup>22,23)</sup>이 최근에 널리 이용되고 있다. 이는 흡착 크로마토그래피 원리를 이용한 것으로서 실리카(Porasil), 알루미나, 다공성중합체(XAD, Porapak), 고령토(Chromosorb P, W), 이온교환수지등과 같은 고정흡착제로 충전된 흡착컬럼을 사용한다. 특히 Chromosorb P(80/100)는 pink diatomite로서 표면적(20m<sup>2</sup>/g)이 상당히 큰 친수성 고정흡착제로 GC의 고정 지지체로 사용되고 있으며, 최근에 식물 잎 중의 성장ホルモン인 indole-3-acetic acid<sup>24)</sup> 그리고 미생물 균주 배양액으로부터 휘발성 유리산의 분리농축<sup>25)</sup>에 Chromosorb P를 전처리 과정에서 고정흡착제로 사용한 것이 보고되고 있다.

저자는 본 연구실에서 개발된 Chromosorb P를 사용한 LSE 분리농축방법을 최적화하여 정상인과 간염환자의 체액중 VFAs profile을 분석하여 비교조사 하는데 적용하였다.

## 실 험 방 법

**시약**—본 실험에서 사용한 시약들은 모두 특급 또는 시약급이었다. VFAs는 미국의 Analabs사의 LPK-005, Volatile Fatty Acids Kit를 사용하였고, Chromosorb P/A.W.(80/100mesh)는 미국의 Supelco 사제의 시약급이었다.

Diethyl ether 역시 미국의 Tedia사제의 특급시약을 사용하였다.

**시료**—강남구 소재 강남병원과 용산구 소재 금강병원에 입원중인 B형 간염환자중 성인여자 5인의 타액, 뇨, 혈청을 공복시 채취하여 시료

분석 전까지 냉동보관 하였다.

정상인의 체액은 자원한 건강한 사람으로부터 채취하였다.

**기기 및 분석조건**—Gas chromatograph는 FID가 부착된 Shimadzu Model GC 9A였고 digital integrator (Shimadzu chromatopac Model C-R-2AX)를 사용하여 자료 처리하였다. 사용된 컬럼은 HP-20M flexible fused silica capillary column (WCOT, 50m×0.25mm I.D.  $d_f$ : 0.25  $\mu$ m, Hewlett-Packard Avondale Division, Pennsylvania, USA)이었다.

시료주입은 splitless injection방법을 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다.

컬럼온도 30도에서 시작하여 1분당 5도씩 상승시켜 100도로 유지시켰다. 운반기체로 사용한 헬륨의 유속은 약 1ml/min였으며 injector port와 detector온도는 150도였다. 또한 FID sensitivity는 2<sup>5</sup>mV/full scale (32mV/fs)였으며, 시료 1 $\mu$ l를 정확히 주입하였고 내부 표준물질로 n-octadecane ( $n$ -C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>)을 사용하여 정량하였다.

**LSE 분리농축방법**—당 실험실에서 개발된 LSE 분리농축장치<sup>24)</sup>를 사용하여 질소 압력하에서 검액 1ml, 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2ml, sod. chloride 0.4g의 혼합물을 Chromosorb P로 충전된 U형 glass column (6mm id, 8mm od)에 흡착시킨 후 Ether 3ml를 통과시켜 추출한 추출액 1ml중 1 $\mu$ l를 GC로 분석하였으며, 재현성을 조사하기 위해 동일 검체에 대해 5회 반복실험을 하였다. 특히 본 추출조건을 최적화하기 위해서 Chromosorb P의 양 2.0g, 2.3g, 2.6g, 시료 흡착시간 1분, 2분, 3분, 또한 추출시간 0.8분, 1분, 1.5분에 대해 추출회수율을 조사하였다.

## 실험결과 및 고찰

**컬럼의 선택 및 효율**—극성이 큰 VFAs를 유도체화 하지않고 직접 분석할 경우 발생하는 문제점들<sup>26)</sup>을 해결하기 위하여 Hewlett-Packard사에서 특별히 개발한 HP-20M컬럼을 사용하였다.

Fig. 1. 은 VFAs를 분석한 전형적인 chromatogram을 보여주고 있으며, 컬럼의 효율을 검토

Table I—Evaluation of the capillary column

Compound	Resolution	Separation number	Total plates	Retention time(min)
Acetic acid			1,500	2.2±0.04
Propionic acid	14.2	11.1	35,000	3.9±0.04
Isobutyric acid	11.0	8.3	16,000	5.0±0.01
Butyric acid	5.4	3.6	15,000	5.9±0.01
Isovaleric acid	7.4	5.2	22,000	7.3±0.01
Valeric acid	6.9	4.8	31,000	8.5±0.04
n-C <sub>18</sub>			22,000	9.6±0.03

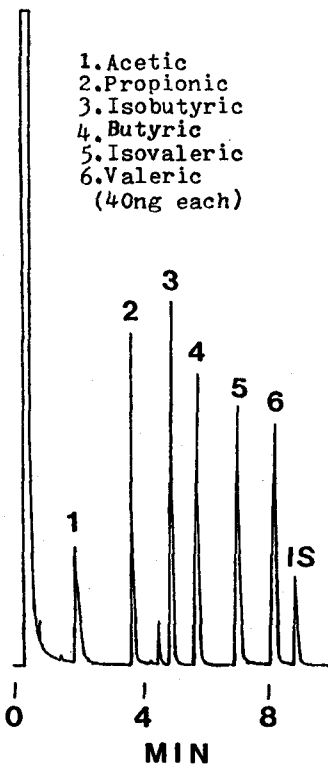


Fig. 1—Typical chromatogram of VFAs. Column, fused silica capillary column HP-20M (Carbowax 20M) 50m×0.25mm i.d.×0.25μm film; He carrier flow rate, 1.0ml/min; 1μl injection in splitless mode; temperature, 30°C programmed to 100°C at 5°C/min; injector and detector temperature, 150°C; FID sensitivity, 2<sup>5</sup>mV/full scale

하기 위하여 resolution, separation number 및 이론단수를 측정하였다(Table I). 이는 본 연구

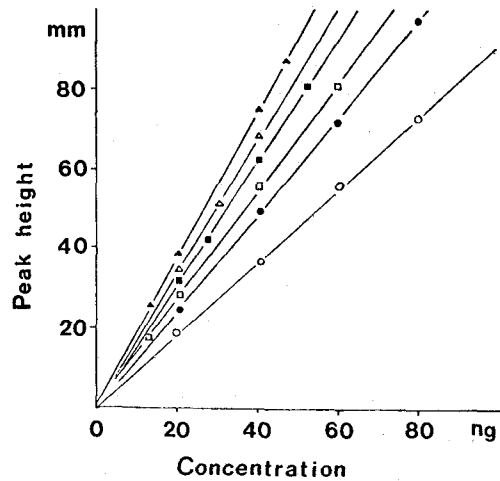


Fig. 2—Calibration curves for acetic(○-○) propionic(△-△), isobutyric(■-■), butyric(□-□), isovaleric(●-●) and valeric acid(▲-▲).

실에서 VFAs분석을 위해 사용했던 S.S. Capillary Column<sup>25)</sup>보다 효율이 상당히 우수함을 보여주고 있다. 그 이유는 fused silica capillary column은 그 자체가 화학적으로 inert하며, coating이 uniform할 뿐 아니라 내경(0.5mm id)이 작아졌고, 길이(30m)도 길어졌으므로 효율이 증가함을 볼 수 있다.

또한 각 acid의 calibration curve가 Fig. 2에 나타나 있으며, 각각 acid의 correlation coefficient는 0.93이었다.

시료 주입방법의 선택—GC에 시료를 주입할 때는 신속해야 하며, 재현성이 좋아야 하고, plug injection이어야 하며 차별분할이 일어나지

않아야 하고, 시료가 분해되어서는 않된다.<sup>27)</sup> capillary column을 사용하는 경우는 주입되는 시료의 양이 극히 미량으로 특히 주의를 요해야 한다.

그 방법으로는 split injection<sup>28)</sup>, splitless injection<sup>29-31)</sup>과 on-column injection<sup>25,32,33)</sup> 등이 있다. 이중 split injection방법은 시료의 성상에 따라 차별분할이 일어나므로 미량분석에는 적합하지 않으며, 시료 주입방법중 가장 좋은 on-column injection방법으로 분석한 결과 septum의 particle이 컬럼 내벽에 산재되어 분석에 지장을 초래했을 뿐 아니라 valve를 사용하지 않고 시린지를 사용할 경우 시료 주입 속도가 조금만 늦어도 (즉 plunger depression) 시린지의 needle에 시료가 부착되어 시료의 손실이 일어났으며 또한 비점이 높은 화합물을 주입할 경우 컬럼의 첫부분에 시료가 검은 deposit로 부착되어 남게 되므로 컬럼의 효율이 떨어졌다.

따라서 본 실험에서는 시료의 성상에 따라 차별분할이 크게 일어나지 않는 splitless injection 방법을 선택하여 GC의 최적조건을 검토하였다.

**LSE 분리농축 조건의 검토**—본 실험에서의 Chromosorb P를 흡착제로 사용하는 liquid-solid extraction방법은 그 과정이 매우 간편하며, 신속하고 효율적이라는 것을 알 수 있었다.

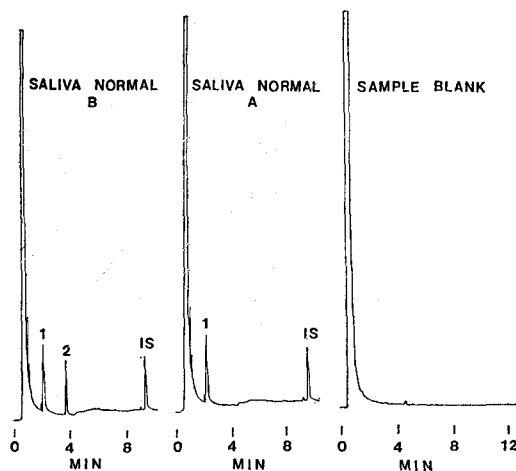
이와 같은 liquid-solid extraction방법은 거대한 양의 시료를 취급할 수 있으며, 사용되는 용매량이 적고 용매의 불순물에 의한 오염을 방지할 수 있으며, 자동화가 가능하다는 장점을 지니고 있다.

한편 본 분리농축 조건의 최적화를 시도한 결과 추출 회수율에 큰 차이를 발견할 수 없었으므로 흡착컬럼의 Chromosorb P 충전량은 2.3g, 흡착시간 및 추출시간은 각각 1분으로 실험하였다.

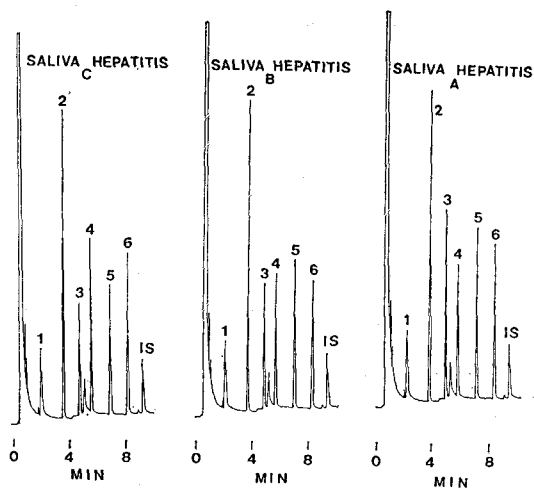
**회수실험**—LSE 분리농축법의 효능을 알아보기 위해 회수실험을 한 결과는 Table II와 같다. 재현성은 1.2%에서 2.7%이며, 회수율도 초산을 제외하고 모두 80% 이상을 나타내었다. 초산은 다른 지방산에 비해 휘발성이 커서 sampling하는 동안 휘발되어 손실되는 양이 많았고,

**Table II**—Efficiency of the sampling procedure

Acid	Recoveries of Acids(%)	
	Mean±S.D.	RSD
Acetic acid	36.4±1.0	2.7
Propionic acid	82.5±1.9	2.3
Isobutyric acid	90.3±1.2	1.3
Butyric acid	94.8±1.8	1.9
Isovaleric acid	91.2±1.3	1.4
Valeric acid	95.6±1.2	1.2



**Fig. 3**—Chromatograms of VFAs in saliva of normal subjects A and B  
Conditions as Fig. 1



**Fig. 4**—Chromatograms of VFAs in saliva of hepatic patients A, B and C

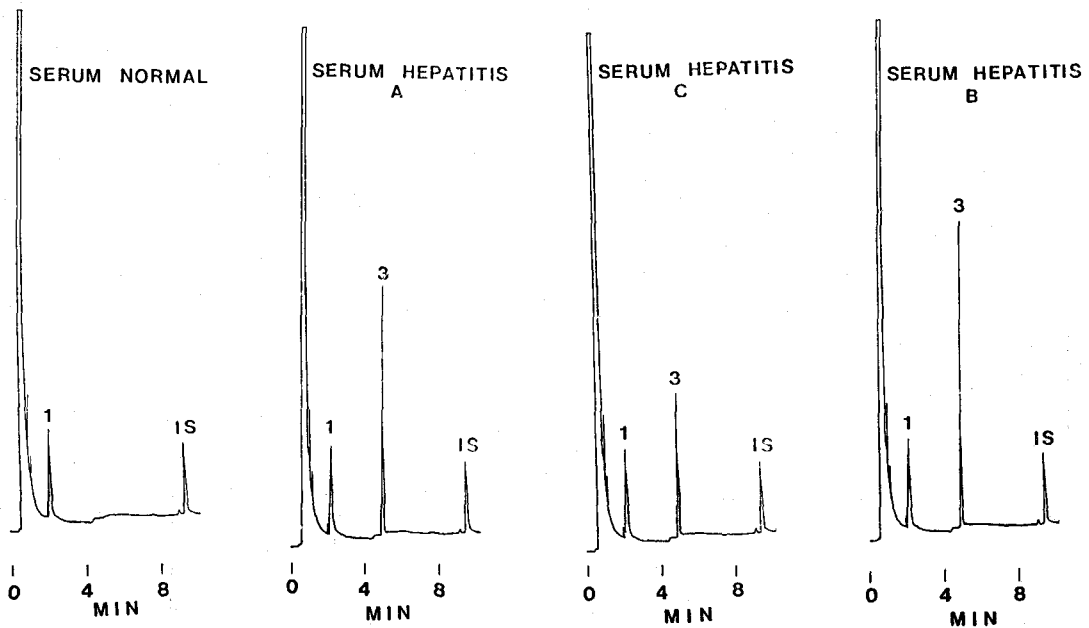


Fig. 5—Chromatograms of VFAs in sera of normal subject and hepatic patient A

Fig. 6—Chromatograms of VFAs in sera of hepatic patients B and C

Table III—Levels of VFAs in saliva samples

Samples	$\mu\text{g/ml}$					
	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid
Saliva normal A	44.0	*	*	*	*	*
Saliva normal B	44.0	10.2	*	*	*	*
Saliva hepatitis A	48.0	71.1	49.1	40.8	50.6	45.7
Saliva hepatitis B	46.0	70.5	30.9	39.2	47.3	40.0
Saliva hepatitis C	46.0	70.5	28.1	51.7	41.8	51.8

\* not detectable

Table IV—Levels of VFAs in serum samples

Samples	$\mu\text{g/ml}$					
	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid
Serum normal	44.0	*	*	*	*	*
Serum hepatitis A	50.0	*	48.4	*	*	*
Serum hepatitis B	48.0	*	57.5	*	*	*
Serum hepatitis C	45.0	*	27.4	*	*	*

\* not detectable

또한 물에서의 해리상수가 가장 크므로 가장 낮은 회수율을 나타내었으리라 사료된다.

응용—간은 신체대사에 있어 가장 중요한 역할을 하는 기관이므로 질병으로 인한 간의 대사에 장애가 일어날 경우 체액의 화학적 조성에 많은 변화가 나타날 것이다.

따라서 본 실험에서는 감염으로 인한 간괴사로 야기되는 간대사 이상에 의한 체액의 각종 대사산물 변화중 VFAs의 변화를 조사하고자 정상인과 감염 환자의 체액을 채취하여 최적조건인 LSE 방법을 적용하여 검액을 전처리하고 고성능 capillary column으로 분석하였다.

그 결과는 Fig. 3, 4, 5, 6에 나타나 있고, 정량 결과는 Table III, IV와 같다.

## 결 론

Chromosorb P를 사용한 LSE분리농축법을 전처리 과정에서 사용하고, fused silica capillary column을 이용하여 정상인과 감염 환자의 체내 수용성 복합시료중의 VFAs를 고성능 capillary GC로 분리분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Capillary column을 사용하여 분석한 결과 resolution은 5.0이상이었으며, separation number는 3.6이상이었으며, 이론단수는 22,000이상이었으므로 VFAs를 분석함에 있어서 지장을 초래하지 않았다.

2) Injection technique으로서는 splitless injection 방법을 사용하였으며, 5회 주입한 결과 1.8%의 좋은 재현성을 나타냈다.

3) 분리농축법의 조건을 최적화한 결과 Chromosorb P 충전량은 2.3g, 시료 흡착 및 추출시간은 각각 1분이었다.

4) Chromosorb P를 사용하여 표준수용액중의 VFAs를 분석한 결과 2~80ng/ml의 농도 범위에서 peak의 높이비와 농도사이에 직선성이 있었으며, 각각 acid의 회수율은 초산을 제외하고는 모두 80% 이상이었으며, 재현성은 1.2%에서 2.7%의 결과를 얻었다.

5) 정상인과 감염 환자의 타액, 뇨, 혈청에 유리해 있는 VFAs를 분석하여 profile을 확인한 결

과 뇨에서는 정상인과 감염환자사이에 전혀 차이를 발견할 수 없었다. 타액에서는 정상인에게서 검출되지 않은 isobutyric, butyric, isovaleric, valeric acid가 감염환자에게서 각각 25.0 $\mu$ g/ml, 39.0 $\mu$ g/ml, 40.0 $\mu$ g/ml, 40.0 $\mu$ g/ml 이상 검출되었으며 propionic acid는 정상인에 비해 약 6배 이상(70.0 $\mu$ g/ml) 검출되었다. 혈청에서도 정상인에게에는 나타나지 않은 isobutyric acid가 감염환자의 경우 40.0 $\mu$ g/ml 이상 검출되었다.

따라서 본 방법이 VFAs profile의 변화와 감염증세의 상관성을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있으리라 사료된다.

## 문 헌

- 1) Dankert, J., Uitentuis, J., Houwen, B., Tegzess, A.M., and G.K. van der Hem.: Hepatitis B surface antigen in environmental samples from hemodialysis units. *J. Infect. Dis.* 134(2), 123(1976).
- 2) Bondarenko, B.N., Sinyak, K.M., Sokol, A.S., and Orgel, M. Ya.: Composition of neutral blood plasma lipids in viral hepatitis. *Vrach. Delo* 9, 148(1976).
- 3) McMahon, Brian, J., Wallace, L.M., Almard, David B., Hall, William L., Heyward, Thomas R. Bender, Donald P. Francis, and James E. Maynard: Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J. Infect. Dis.* 151(4), 599(1985).
- 4) Maria Buti, Rafael Esteban, Rosendo Jardi, Juan-Ignacio Esteban, and Jaime Guardia: Serological diagnosis of acute delta hepatitis. *J. Medical Virology* 18, 81(1986).
- 5) Hartmann, L., Ollier, M.P., Fiessinger, J.N.: Molecular anomalies of alpha-lipoproteins (HDL) during benign viral hepatitis. *Rencontre Biol.*, 187(1976).
- 6) Koichev, K., Vurbanov, G.: Level of deviations in the serum lipids and higher fatty acids of patients with liver cirrhosis and chronic hepatitis. *Vutr. Boles.* 16, 65(1977).
- 7) Yamaguchi, Yoshihisa Seki Tokuchiro and Wa-

- tanabe Shinichiro: Simple enzymatic detection method for urinary sulfated 7-hydroxy bile acids in normal subjects and in patients with acute hepatitis. *J. Chromatogr.* 273, 87(1983).
- 8) Wieland G.E. Hoizel: Intra-individual variation of analytes in serum from patients with chronic liver diseases. *Clin. Chem.* 33, 1133(1987).
  - 9) Hartmut M. Liebich, Ossama Al-Babbili, Albert Zlatkis, and Kyoung Kim: Gas-chromatographic and Mass-spectrometric detection of low-molecular-weight aliphatic alcohol in urine of normal individuals and patients with diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 21, 1294(1975).
  - 10) A.W. Lis, D.I. McLaughlin, R.K. McLaughlin, E.W. Lis, and E.G. Stubbs: Profiles of ultraviolet absorbing components of urine from autistic children, as obtained by high-resolution ion-exchange chromatography. *Clin. Chem.* 22, 1528(1976).
  - 11) Egil Jellum: Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using gas chromatography and mass spectrometry, with special reference to organic acids. *J. Chromatogr.* 143, 427(1977).
  - 12) Abbott, R., Anbar, M., Faden, H., McReynolds, J., Rieth, W., Scanlon, M., Verkh, L., and Wolff B.: *Clin. Chem.* 26, 1443(1980).
  - 13) Anbar Michael and Kim Kyoung Rae: Manifestation of metabolic aberration in rat urine following hypothalamic lesions. *Arch. Pharm. Res.* 7, 101(1984).
  - 14) Hartmut M. Liebich and Andreas Pickert: Gas chromatographic profiling of phenolic acids in urine of patients with cirrhosis of the liver. *J. Chromatogr.* 338, 25(1985).
  - 15) Michael Y. Tasi, Charissa Olphant and Mark W. Josephson: Identification of metabolites diagnostic for organic acidurias by simultaneous dual-column capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 341, 1(1985).
  - 16) L. Ludwig-Koehn and H.V. Henning: *J. HRC & CC.* 9, 35(1986).
  - 17) Anbar Michael, Dyer Robert, L., and Scolnick Martin, E.: *Clin. Chem.* 22, 1503(1976).
  - 18) Gabr, Y., Mahfouz, M., Mohammed, Y.S.: Fatty acid composition of serum lipids in bilharzial hepatic fibrosis and chronic active hepatitis. *Acta Biol. Med. Ger.* 34, 45(1975).
  - 19) Baran, V.M.: Content of nonesterified fatty acids in the blood in viral hepatitis and jaundice of other etiology. *Zdravookhr. Beloruss.* 2, 86(1978).
  - 20) Annison, E.A., Hill, K.J. and Lewis, D.: *Biochem. J.* 66, 592(1957).
  - 21) Holdeman, L.V., Cato, EP. and Moore W.E.C.: "Anaerobe Laboratory Manual", 47th Ed. 1, Virginia Polytech. Inst. and State Univ., Blackburg, Virginia, 1977.
  - 22) Frei, R.W. and Brinkman, Th. U.A.: Solid-surface sample handling techniques in organic trace analysis. *Trends in Anal. Chem.* 1, 45(1981).
  - 23) Yago L.: Automates sample preparation using sorbent extraction. *Int. Lab.* Nov/Dec, 40(1985).
  - 24) Kim Kyoung R, Albert Zlatkis, Weisner S., Kim J.H. and Choi K.S.: Trace enrichment of indole-3-acetic acid from leaf matrix. *J. Chromatogr.* 325, 127(1985).
  - 25) 김경례 · 최동미: 수용성 매체로부터 휘발성 유리 지방산의 미량 농축에 관한 연구, 대한화학회지 31, 244(1987).
  - 26) Cochrane, G.C.: A review of the analysis of free fatty acids. *J. Chromatogr. Sci.* 13, 440(1975).
  - 27) Schomburg, G., Behlau, H., Dielmann, R., Weeke, F. and Husmann, H.: Sampling techniques in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 142, 87(1977).
  - 28) K. Grob. Jr. and Neukom, H.P.: Dependence of the splitting ratio on column temperature in split injection capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 236, 297(1982).
  - 29) Yang Frank J., Brown Arthur C., III and Stuart P. Cram: Splitless sampling for capillary-column gas chromatography. *J. Chromatogr.* 158, 91(1978).
  - 30) K. Grob. Jr. and Romann A.: Sample transfer in splitless injections in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 214, 118(1981).
  - 31) Schomburg. G. and Hausig U.: Application of the

- “Cooled Needle” technique to split and splitless sampling onto capillary columns. *J. HRC & CC.* 8, 572(1985).
- 32) K. Grob. Jr.: Peak broadening or splitting caused by solvent flooding after splitless or cold on-column injection in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 213, 3(1981).
- 33) Wang F.S., Shanfield H., and A. Zlatkis: On-column injector for capillary gas chromatography. *Anal. Chem.* 54, 1886(1982).