

기체크로마토그래피법에 의한 타액내 유기산의 신속한 스크리닝

김경례[†] · 김정환* · 박영준* · 김정옥

성균관대학교 약학대학, *연세대학교 공과대학

(Received April 4, 1995)

Rapid Gas Chromatographic Screening of Saliva Samples for Organic Acids

Kyoung Rae Kim[†], Jung Han Kim*, Young Joon Park* and Jung Ok Kim

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

*College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract—Rapid gas chromatographic profiling method was applied to saliva from healthy subjects for the analysis of free organic acids. Saliva samples were first saturated with NaHCO₃ and extracted with diethyl ether. The aqueous phase was solid-phase extracted using Chromosorb P as the adsorbent and diethyl ether as the eluent after the acidification and NaCl saturation, followed by triethylamine treatment. The resulting triethylammonium salts of acids were directly converted into stable *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, with subsequent analysis by dual-capillary column gas chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry. From the ten saliva samples studied, twenty eight free organic acids including various fatty acids, hydroxy acids, dicarboxylic acids, and aromatic acids were tentatively identified. Among the acids identified, the concentration of lactic acid was highest for five saliva samples while α -hydroxyisocaproic acid was most abundant for one sample, and succinic acid and glycolic acid for two samples, respectively. When the GC profiles were simplified to the corresponding acid retention index spectra of bar graphical form, they presented characteristic patterns for each individual.

Keywords □ Saliva, organic acids, solid-phase extraction, TBDMS derivatives, retention index spectra

생체 세포 내에서 일어나는 다양한 대사과정을 통해서 생합성되는 수 많은 유기대사물들은 생체액내에 일정한 농도를 유지하고 있다. 그러나 질병에 걸리거나 주요 기관의 기능장애가 오게 되면 대사과정에 스트레스 혹은 불균형이 일어나고 특정 대사물의 농도변화가 나타난다. 그러므로 유기대사물의 축적 및 배설에 대한 연구가 임상학적으로 매우 활발히 진행되고 있다¹⁻⁹⁾. 생체내 유기대사물중에서도 특히 생리적 대사과정의 중요한 지표가 되는 유기산의 프로파일링 분석이 각종 선천성 대사 병 조기진단, 스크리닝 및 치료목적등에 이용되고 있다.^{1,2,4,7)} 구조적으로 상이한 유기산의 프로파일링 분석은 대부분 고성능 캐필러리 기체크로마토그래피법

(GC)에 의해서 이루어지고 있다.¹⁰⁾ GC 분석에 앞서 유기산은 복합 생체액 시료로부터 선택적으로 분리 농축된 후 휘발성 유도체로 전환되어야 한다.¹¹⁾ 본 연구실에서는 이미 수용성시료로부터 휘발성, 비휘발성 유기산을 동시분석하고 동정하기 위해서 고상추출/*tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) 유도체화/dual-capillary column GC system의 신속한 프로파일링 분석법을 개발하여 보고한 바 있다.¹²⁻¹⁵⁾ 이제까지 대부분의 유기산 대사물 프로파일링 연구는 뇨시료에 대해서 주로 수행 되어왔으나 생체액중에서 타액도 뇨시료처럼 검시자의 몸을 침해하지 않고 손쉽게 채취할 수 있는 소위 "비침해성" 시료라는 장점을 가지고 있다.^{16,17)} 더욱이 타액내 스테로이드 홀몬¹⁶⁾과 유기산 프로파일¹⁷⁾이 임상학적 연구에 중요한 지표가 된다는 보고가 있었으나 뇨

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

시료만큼 큰 연구대상이 되어오지 못했다. 본 연구에서는 흡연에 의한 유기산 대사과정에 대한 영향을 조사하는 첫 단계로서 본 분석실의 유기산 프로파일링 분석법을 적용하여 건강한 남자들의 타액시료내 유기산 분석을 시도하였다. 얻어진 GC 프로파일을 간단한 유기산 retention index (RI) 스펙트럼으로 단순화시켜¹⁸⁻²⁰⁾ 정상인 타액의 유기산 패턴을 서로 비교하였다.

실험방법

재료 및 시약 - 본 연구에서 분석한 시료는 30대의 특별한 질병이 없는 10명 남자의 타액으로서 채취 전 날 저녁 양치를 하게 한 후 다음날 아침 공복 시에 받아 즉시 냉동보관하며 사용하였다. 유도체화 시약으로 사용된 silylation grade의 N-methyl-N-(*tert.*-butyl-dimethylsilyl) trifluoroacetamide (MTBSTFA)은 Pierce (Rockford, IL., USA)로부터 구입하여 사용하였다. 동양 화학공업 (Seoul, Korea)에서 구입한 diethyl ether는 potassium hydroxide상에서 연속증류한 후, 과량의 sodium sulfate를 넣어 4°C에서 저장하면서 사용하였다. Sodium chloride는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. *n*-Hydrocarbon standards (C_{10} - C_{28} , even number only)는 Polyscience (Niles, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 고상추출용 컬럼으로서 Chromosorb P (80/100 mesh, Supelco, Bellefonte, USA) 2.0 g을 유리 컬럼에 기밀하게 충전한 후 1 N H_2SO_4 용액, methanol, acetone, dichloromethane 그리고 정제된 diethyl ether의 순서로 씻고 진공하 150°C에서 활성화시킨 후 사용하였다.

GC 및 GC-MS 분석조건 - RI 값을 비교하여 유기산 유도체를 확인하기 위해 2개의 flame ionization detector (FID)와 split/splitless injection port가 장착된 HP-5890A gas chromatograph (Hewlett-Packard, Avondale, USA)에 HP-5895A GC Workstation을 연결하여 사용하였다. 유기산 분석시 사용한 column은 5%의 phenyl기와 95%의 methyl기가 있는 polysiloxane이 immobilized된 비극성의 DB-5 column과 50%의 phenyl기와 50%의 methyl기가 있는 polysiloxane이 immobilized된 중간 극성의 DB-17 column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μ m d_f , J & W Scientific, Rancho, USA)을 Chromfit Y splitter

(0.25 mm I.D., Unimetrics, USA)를 이용하여 guard column으로 사용된 deactivated fused silica tubing (1 m × 0.25 mm I.D.)에 연결시킨 dual-capillary column system을 사용하였다. 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지한 후 분당 4°C로 상승시켜 280°C에서 10분간 유지하였다. FID와 injector의 온도는 각각 300°C와 260°C였다. Splitless injection mode로서 isooctane에 희석시킨 포화탄화수소 혼합 표준용액 (n - C_{10} ~ C_{28})과 함께 0.5 μ l의 시료를 주입하였다. 이 때 purge delay time은 60초로 고정하였다. 분리된 유기산 피크의 각 컬럼에서 측정된 RI 값을 본 연구실에서 작성한 유기산 RI library (ACIDSL.L)와 비교하여 동정하고 동정된 각 피크는 면적비 비교법으로 재확인하였다. DB-5 컬럼의 정량분석자료를 이용하여 내부표준물질인 *t*-cinnamic acid에 대한 각 동정된 유기산 피크 면적비를 계산하였다. GC로 동정된 유기산을 재확인하기 위해서 HP-5890A series II gas chromatograph와 HP-59940A MS ChemStation이 연결된 HP-5970B MSD를 사용하였다. GC-MS분석시 사용한 column은 5%의 phenyl기와 95%의 methyl기가 있는 polysiloxane이 immobilized된 Ultra-2 silica capillary column (12 m × 0.20 mm I.D., 0.32 μ m d_f , Hewlett-Packard, Avondale, USA)을 사용하였다. 컬럼 온도는 80°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. Split injector의 온도는 260°C, split ratio는 30:1 이었다. 70 eV의 EI (electron impact) mode이며 interface 온도는 280°C로 유지하였다. GC-MS의 mass spectrum은 미리 작성한 MS library (TBDMS.L)와 비교하여 확인하였다.

타액내 유기산의 고상추출 및 TBDMS 유도체화 - 타액 시료들을 먼저 $NaHCO_3$ 를 가한 후 2 ml의 diethyl ether로 3회 추출하고 추출액은 버렸다. 수용액 중에서 1 ml를 취하여 내부 표준물질로서 methanol에 10 ppm 농도로 용해된 *t*-cinnamic acid 용액을 가하고 진한 황산을 가해 pH 1 이하로 산성화시키고 NaCl로 포화시켰다. 이 수용액을 solid phase extractor (Supelco, Bellefonte, USA)를 이용하여 Chromosorb P 컬럼에 loading시킨 후 diethyl ether로 유기산을 선택적으로 용출시켜 얻은 약 4 ml의 ether층에 triethylamine (TEA) 10 μ l를 가하고 질소기류에서 농축시켰다. 이어서 MTB-STFA 10 μ l와 isooctane 30 μ l를 가하여 60°C에서 5시간 반응시킨 후

Table I—Organic acids found in saliva samples from ten healthy subjects

No	Acid	Amount(% Normalized area ratio)										% Normalized mean area ratio
		Subject										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	Tiglic	0.15	2.50	0.82	0.30	0.11	trace	0.25	0.85	0.50	0.15	0.74
2	Enanthic	0.18	0.51	1.99	0.71	0.88	0.98	0.28	0.89	1.12	0.39	1.04
3	Lactic	24.24	78.15	100.00	100.00	100.00	41.82	100.00	100.00	63.58	53.23	100.00
4	Glycolic	38.45	100.00	8.60	14.89	27.64	100.00	26.54	31.35	45.72	24.85	54.93
5	Phenylacetic	8.92	44.02	80.44	8.87	18.05	48.54	6.91	37.50	58.75	30.69	45.03
6	Oxalic	1.03	2.43	7.73	1.60	0.47	1.30	2.43	3.15	6.87	0.24	3.58
7	Nonanoic	0.39	1.21	3.37	0.31	0.72	2.00	0.72	1.25	2.66	0.52	1.73
8	α -Hydroxyisovaleric	7.05	3.66	6.34	0.74	2.90	4.46	19.72	3.27	16.98	6.14	9.36
9	α -Hydroxyvaleric	0.41	1.59	0.44	0.45	0.76	3.11	0.66	1.84	0.39	0.15	1.29
10	α -Hydroxyisocaproic	15.97	71.99	54.91	3.99	7.51	25.20	1.87	34.07	100.00	24.85	44.72
11	Succinic	100.00	31.36	80.35	3.88	36.29	17.93	9.11	30.65	99.22	100.00	66.86
12	Methylsuccinic	1.87	3.74	3.85	0.39	0.69	4.18	0.76	1.46	3.51	1.71	2.91
13	Undecanoic	0.29	1.18	1.62	0.50	0.34	1.42	3.47	5.19	2.19	0.39	2.18
14	Galutaric	1.68	2.07	3.91	0.54	1.23	2.20	1.14	2.30	2.07	0.85	2.36
15	5-phenylvaleric	0.27	1.87	0.81	0.21	0.15	2.22	trace	0.61	trace	0.14	0.82
16	α -Hydroxyphenylacetic	0.22	0.80	0.58	0.07	0.09	2.85	0.64	0.46	0.70	0.16	0.86
17	3,4-Dimethoxybenzoic	0.43	1.20	0.77	0.06	0.26	1.23	1.61	0.52	0.59	0.17	0.90
18	Adipic	0.89	0.86	1.14	0.17	0.27	1.84	0.65	1.20	trace	0.14	0.94
19	Tridecanoic	0.34	0.72	1.07	0.10	0.20	0.53	0.61	0.86	1.14	0.20	0.76
20	Pimelic	1.07	0.84	0.53	0.14	0.16	0.71	trace	0.62	0.44	0.18	0.62
21	Myristic	0.88	1.34	3.85	0.62	0.41	1.45	1.02	1.77	0.66	0.66	1.66
22	Malic	0.31	0.29	0.83	0.07	0.16	0.15	0.26	0.51	2.46	0.22	0.69
23	p-Hydroxyphenylacetic	1.77	4.60	7.95	8.36	11.15	6.93	7.58	11.38	8.06	20.34	11.58
24	p-Hydroxybenzoic	0.51	1.70	1.37	0.20	1.48	1.39	2.71	1.81	1.51	0.73	1.76
25	Azelaic	0.21	0.50	0.63	0.23	0.35	0.81	0.55	1.34	0.83	0.20	0.74
26	Sebacic	0.19	0.33	0.39	0.08	0.20	0.39	0.40	2.60	0.92	0.10	0.74
27	Oleic	0.41	1.45	2.54	0.63	0.63	1.69	2.19	5.39	3.50	0.78	2.52
28	p-Hydroxyphenyllactic	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc

nc = not calculable due to incomplete resolution from n-C₂₆

GC와 GC-MSD로 분석하였다.

유기산 RI spectrum 작성 - DB-5 컬럼으로 얻어진 GC chromatogram에서 확인된 유기산의 피크 면적비를 가장 큰 유기산 피크 면적비에 대한 백분상대치인 % normalized area ratio를 계산하였다. 유기산의 RI 값에 대한 계산된 각 유기산의 % normalized area ratio를 기록하여 RI spectrum을 작성하였다.

결과 및 고찰

본 연구실의 유기산 프로파일링 분석법을 타액시료에 적용하였을 때 문헌에 보고된 방법보다¹⁷⁾ 훨씬 적은 양의 시료 (1 ml)로부터 재현성이 큰 GC 프로파일을 얻을 수 있었다. DB-5와 DB-17 컬럼에서 동시에 분석된 dual-chromatograms (Fig. 1)는 전형적인 1 ml 타액의 유기산 프로파일을 보여주고 있다. 각 피크에 대한 computer RI library matching 법을¹³⁻¹⁵⁾ 적용하여

총 28가지 유기산을 스크리닝 하였다. 각 동정된 유기산의 구조는 GC-MS 분석에 의해서 재확인하였다.

1 ml 타액시료에서 검출된 유기산은 8종의 fatty acids, 5종의 hydroxy acids, 8종의 dioic acids, 7종의 aromatic acids로 구성되어있다 (Table I). 보고된 문헌의¹⁷⁾ 50 ml 타액시료에서 발견된 유기산보다 본 연구에서 20종이 더 새로이 발견되었다. Fatty acids를 제외하고 발견된 비질소 유기산은 대부분 아미노산의 대사중간체 혹은 최종대사산물이다¹⁷⁾. DB-5 chromatogram의 정량 분석데이터를 이용하여 10명의 타액에서 발견된 각 유기산을 % normalized area ratio로서 서로 비교하였다 (Table I). p-Hydroxyphenyllactic acid는 DB-5컬럼에서 n-C₂₆와 완전 분리가 안되므로 정밀하게 정량할 수 없었다. 10명 시료중 C, D, E, G, H 시료인 경우에는 lactic acid의 함량이 가장 높고, succinic acid의 함량은 A, J 시료에서, glycolic acid는 B, F 시료인 경우에, I 시료에서는 α -hydroxy-

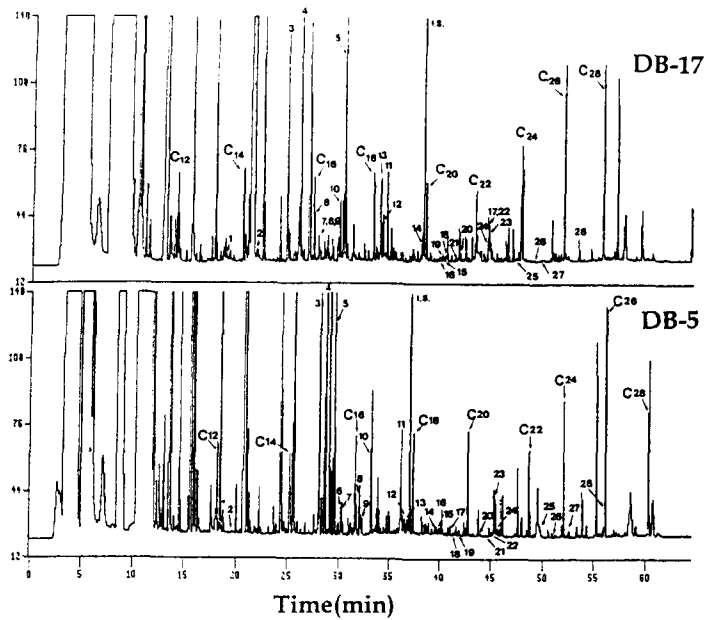


Fig. 1—Typical dual-chromatograms of salivary organic acids from a healthy subject, separated on DB-17 and DB-5 (both 30 mm×0.25 mm I.D. and 0.25 μm film thickness) dual-capillary column system. GC conditions are as described in the text. Peak numbers correspond to those in Table I.

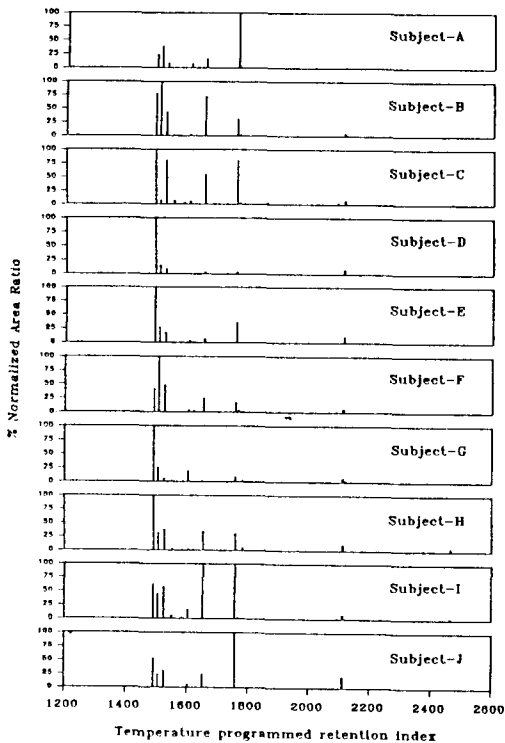


Fig. 2—Retention index spectra of salivary organic acids from ten different subjects.

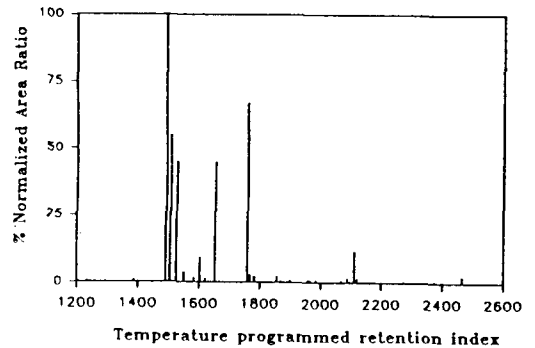


Fig. 3—Average retention index spectra of salivary organic acids from ten different subjects.

isocaproic acid의 농도가 높음을 알 수 있다. 모든 시료를 평균한 경우에는 % normalized area ratio가 lactic acid, succinic acid, glycolic acid, phenylacetic acid, α-hydroxyisocaproic acid의 순서로 감소하고 있다. 정상인 사이에 개인별 큰 차이를 내는 유기산이 많으며 특히 malic acid, sebacic acid, tiglic acid, 5-phenylvaleric acid가 가장 큰 농도 차이를 내고 있다. 각 타액시료에서 확인된 유기산들의 RI 값에 대한 % normalized area ratio 들을 기록했을 때¹⁸⁻²¹⁾ 원치 않는 피크는 (용매, 시약, 미확인된 성분들) 모두

제거되므로 복잡한 GC 프로파일이 막대그래프 형태의 간단한 RI spectra로 단순화 되었다. 얻어진 RI spectra는 각 시료의 독특한 패턴을 보여주므로(Fig. 2) GC 프로파일보다 각 개인별 타액의 차이를 좀 더 잘 비교해 주고 있다. C, D, E, G, H의 시료가 서로 유사하고 B는 F시료와 A는 I, J시료와 비슷한 패턴을 가지고 있으며 평균 RI spectrum (Fig. 3)과 비교할 때 A, I, J시료의 패턴이 다른 시료와 뚜렷이 상이함을 쉽게 확인할 수 있다.

본 연구실의 유기산 분석법은 신속히 적은 양의 다양한 생체액시료로부터 재현성있는 유기산 GC 프로파일을 얻은 후 미지의 유기산을 스크리닝하는데 매우 유용하므로 널리 이용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 복잡한 GC 프로파일을 막대그래프 형태의 유기산 조성만을 나타내도록 단순화시킨 RI spectra는 시료의 유기산 패턴을 구별하는 목적에 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 현재 본 유기산 분석법을 흡연자의 타액 및 뇨 시료에 적용하여 흡연에 의한 유기산 대사과정에 대한 영향을 조사하고 있다.

감사의 말씀

본 논문은 성균관대학교의 1993년도 성균관학술연구비에 의하여 연구되었으므로 감사드립니다.

문헌

- 1) Tsai, M.Y., Oliphant, C. and Joshepson, M.W. : Identification of metabolites diagnostic for organic acidurias by simultaneous dual-column capillary gas Chromatography. *J. Chromatogr.* **341**, 1(1985).
- 2) Holland, J.F., Leary, J.J. and Sweeley, C.C. : Advanced instrumentation and strategies for m-etabolic profiling. *J. Chromatogr.* **379**, 3-26(1986)
- 3) Niwa, T. : Metabolic profiling with gas chromatography-mass spectrometry and its application to clinical medicine. *J. Chromatogr.* **379**, 313 (1986).
- 4) Jellume, E., Kvittingen, E.A., and Stokke, O. : Mass spectrometry in diagnosis of metabolic disorders. *Biom. Envir. Mass Spec.* **16**, 57-62(1988).
- 5) Lefevere, M.F., Verhacghe, B.J., Declerck, D. M. and De Leenhee, A.P. : Automated profiling of urinary organic acids by dual-column gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spec.* **16**, 311 (1988).
- 6) Liebich, H.M. and Foerst, C. : Basic profiles of organic acids in urine. *J. Chromatogr.* **525**, 1-14 (1990).
- 7) Matsumoto, M., Kuhara, T., Inoue, Y., Shinka, T., Matsumoto, I. and Kajita, M. : Mass spectrometric identification of α -hydroxydecanoic acid and its homologues in urine from patients with hopantenate therapy during clinical episode. *Biom. Envir. mass spectrometry* **19**, 171-175 (1990).
- 8) Shoemaker, J.D. and Elliott, W.H. : Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J. Chromatogr.* **562**, 125-138(1991).
- 9) M-Augenstein, W., Hoffmanm, G.F., Holmes, B., Jones, J.L., Lyhan, W.L., and Sweetman, L. : Use of thick-film capillary column for the analysis of organic acids in body fluids. *J. Chromatogr.* **615**, 127-135 (1993).
- 10) Liebich, H.M. : *Glass capillary chromatography in clinical medicine and pharmacology* ed. by Jaeger, H., Marcel Dekker, Inc., New York, p. 419-440 (1985).
- 11) Liebich, H.M. : Sample preparation for organic acids in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, **236**, 121-130 (1990).
- 12) Kim, K.R., Hahn, M.K., Zlatkis, A., Horning, E. C. and Middleditch, B.S. : Simultaneous gas chromatography of volatile and nonvolatile carboxylic acids as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Ch-romatogr.* **468**, 289 (1989).
- 13) Kim, K.R., Kim, J.H. and Park, H.K. : Trace analysis as TBDMS derivatives of organic acids in aqueous samples. *J. Korean Chem. Soc.* **34**(4), 352 (1990).
- 14) 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. Soc.* **12**, 87 (1991).
- 15) Kim, K.R., Kim, J.H., Park, H.K. and Oh, C. h. : Dualcapillary column system for the qualitative gas chromatography: 2. comparison between splitless and on-column injection modes. *Bull. Korean Chem. Soc.* **14**(2), 250 (1993).
- 16) Gould, V.J., Turkes, A.O., and Gaskell, S.J. : Gas chromatography-mass spectrometric analysis of salivary testosterone with reference to diethylstilbestrol treated prostatic cancer patients. *J. Steroid Biochem.* **24**, 563-567(1986).
- 17) Ward, M.E., Politzer, I.R. and Laseter, J.L., and Alam, S.Q. : Gas chromatographic mass spectrometric evaluation of free organic acids in human saliva. *Biomedical Mass Spectrometry* **3**, 77-80(1976).
- 18) Kim, J.H., Kim, K.R., Chai, J.Y., Oh, C.H. and Park, H.K. : Rapid gas chromatographic screening of vegetable oils for free fatty acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 373 (1993).
- 19) Kim, J.H., Kim, K.R., Chai, J.Y., Park, H.K. and Choi, K.S. : Rapid gas chromatographic screening of alcoholic beverages for volatile and nonvolatile organic acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 162-166(1994).
- 20) Kim J.H., Kim K.R., Chai J.Y., Oh C.H., Park H.K. and Chai K.S. : Rapid gas chromatographic screening of dairy products for volatile and nonvolatile organic acids. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 665-669 (1994).