

수용성 매체로부터 휘발성 유리 지방산의 미량 농축에 관한 연구

金京禮[†] · 崔東美

성균관대학교 약학대학 약학과

(1986. 11. 27 접수)

Trace Enrichment of Volatile Free Acids from Aqueous Samples

Kyoung-Rae Kim[†] and Dong-Mi Choi

Department of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea

(Received November 27, 1986)

요 약. 미생물의 대사산물 중에서 각각의 균주에 특징있게 생성되는 탄소수 C₂-C₅인 휘발성 유리산의 정성 정량 분석자료는 혐기성 미생물을 확인하는 정보를 준다. 수용성 매체에 용해되어 있는 미생물의 대사산물을 처리함에 있어서 흡착제로 Chromosorb P를 사용한 liquid-solid extraction² 방법에 대하여 조사 검토하였다. Chromosorb P는 친수성인 흡착제이므로 그 표면에 간섭물질인 수용성 성분들이 흡착되어 남아있는 반면에 비이온화성인 휘발성 유리산들은 ether에 의해서 정량적으로 회수가 된다. 이와같이 신속하며 효율적으로 처리된 시료를 5% Carbowax 20M/0.75% H₃PO₄로 coating된 stainless steel capillary column으로 정성 정량분석하였다.

ABSTRACT. Liquid-solid extraction technique was applied to enrich volatile free acids (VFAs) from aqueous matrices. Chromosorb P was found to be an efficient solid sorbent. The unionized VFAs could be quantitatively recovered from the Chromosorb P column with ether while interfering watermiscible components were retained in the adsorbed water on the surface of Chromosorb P. The method of simple and efficient isolation-enrichment of VFAs, followed by the quantitative analysis employing stainless steel capillary column coated with Carbowax 20M containing phosphoric acid has been applied to the determination of VFAs in several aqueous samples.

서 론

미생물의 발효 대사과정 중에서 각 균주는 특색있게 알코올류, 지방류, 아민류, 에스테르류, 알데히드류 및 케톤류의 휘발성 대사산물을 생성한다. 이러한 대사산물 중 미생물 각 균주에 특징있게 생성되는 탄소수 C₂-C₅인 휘발성 유리산의 정성 및 정성 분석자료는 혐기성 미생물을 확인하는 정보를 준다.¹⁻³ 따라서 임상, 환경 위생학, 의학, 생화학 및 식품발효 연구에서 휘발성 유리산(volatile free acids: 이하 VFAs라 약함)의 분석이 널리 이루어지고 있다.⁴⁻⁹

미생물 대사산물인 VFAs의 분석법으로는

high performance liquid chromatography^{10,11} 및 gas chromatography(이하 GC라 약함)¹²⁻¹⁶ 등이 보고 되고 있으나, GC에 의한 분석법이 가장 민감한 분석법으로 이용되고 있다. 그러나 GC 분석에 앞서서 미생물 배양액, 혈액, 뇨, 관절액 및 척수액 등과 같은 수용성 복합시료로부터 좀 더 간편하고 신속하며 효율적으로 VFAs를 분리하여야 하는데 이 전처리 방법으로는 유기용 매추출법(liquid-liquid extraction)보다는 적당한 고정흡착제를 이용한 liquid-solid extraction 방법¹⁷이 널리 이용되고 있다.

고형 흡착제로는 silica, alumina, boron nitride, carbon, graphitized carbon black 및 Chro-

mosorb 등이 사용되고 있다. 이중 Chromosorb Chromosorb은 규조토로서 Chromosorb A, G, P, W와 T가 있다. 이중 Chromosorb P (80/100 mesh)는 pink diatomite로서 표면적(20m²/g)이 상당히 큰 친수성 고흥흡착제로서 GC의 고정 지지체로 사용되고 있으며 최근에 나뭇잎에 있는 indole-3-acetic acid¹⁸에 대한 연구에 Chromosorb P를 전처리 과정에서 고흥 흡착제로 사용한 것이 보고 되었다. 그러므로 Chromosorb P를 고흥흡착제로 사용하여 VFAs를 신속 정확하게 분리하여, 이를 인산을 함유한 Carbowax 20M으로 coating된 stainless steel capillary column을 이용하여 분리분석하였다. 이와 같이 개발된 방법을 미생물 배양액과 사람의 타액등에 적용시켜 분석을 시도한 결과 좋은 지견을 얻었기 이에 보고하고자 한다.

실 험

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

미생물 배양액은 성균관대학교 농과대학에서 배양한 배양액을 사용하였다.

사용한 기기는 Pye Unicam GCV Chromatograph와 AR-55 Linear Recorder이었으며 column은 5% Carbowax 20M/0.75% H₃PO₄로 coating된 capillary column으로 column 온도는 100도에서 시작하여 1분당 5도씩 상승시켜 150도에서 5분간 유지시켰다. 불꽃 이온화 검출기를 사용하였으며, 그 온도는 250도였고, sensitivity는 2×10⁻¹⁰ AFS이었다. 캐리어 가스로는 질소를 사용하였으며, 유속은 10ml/min이었다. 시료는 on-column injection²⁰ 방법으로 1μl 주입하였다. 내부 표준물질로 n-octadecane(n-C₁₈H₃₈)을 사용하여 정량하였다.

실험 방법 Fig. 1의 장치를 이용하여 시료를 조제하였다. Kimax tube를 변형시킨 용기에 검액 1ml, 50% H₂SO₄ 0.2ml, sod. chloride 0.4g을 넣고, 질소 15 psig 하에서 Chromosorb P 2.3g을

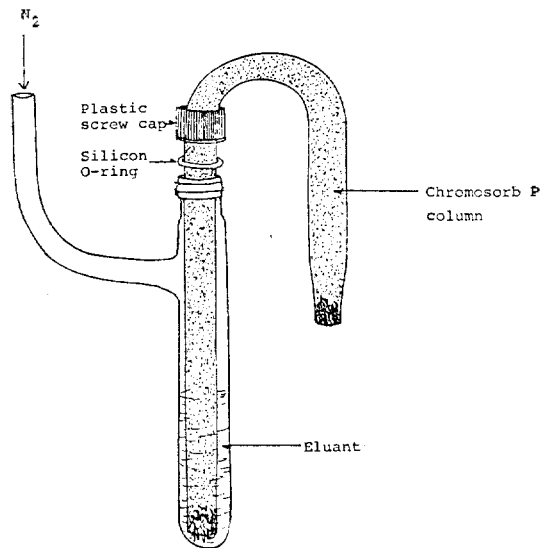


Fig. 1. Sampling apparatus.

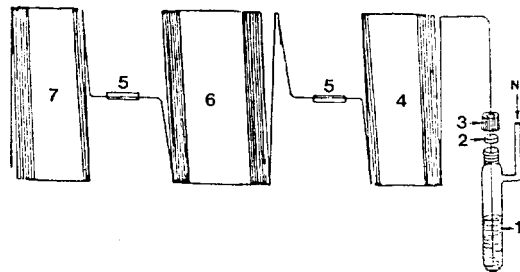


Fig. 2. Dynamic coating apparatus

1. Coating solution; 2. Septum; 3. Cap; 4. Pre-column; 5. Zero-dead volume union; 6. Analytical column; 7. Postcolumn.

충진시킨 U형 glass column(6mm id, 8mm od)에 흡착시킨 후, ether 3ml로 질소 15 psig 하에서 추출하였다. 동일 검체에 대해 5회 반복 추출한 각각의 추출액을 1ml씩 정확히 취하여 GC로 분석하였다.

실험에 사용된 capillary column은 그 내벽에 고정상을 얇고 균일한 film으로 분포시키기 위해 Fig. 2의 장치를 이용하여 dynamic coating²¹ 방법으로 coating하였다.

결과 및 고찰

고정상의 선택. VFAs 분석에 있어서 발생피

Table 1. Evaluation of the capillary column

Compound	Resolution	Separation number	Total plates	Retention time(min)
Acetic acid	3.5	2.0	2800	2.8±0.10
Propionic acid				
Isobutyric acid	1.5	0.2	9400	3.4±0.05
Butyric acid	4.4	2.8	11000	3.6±0.05
Isovaleric acid	2.3	1.0	14000	4.2±0.08
Valeric acid	3.9	2.3	8100	4.6±0.12
n-C ₁₈			8100	6.1±0.12

는 문제점들¹⁴을 해결하기 위해 극성이 큰 Carbowax 20M을 선택하였으며, 또한 비휘발성 산인 인산을 가하여 지지체나 column 자체에 존재하는 활성부위를 제거함으로써 수소결합을 억제시켜 peak tailing을 방지하였다.

Column의 선택. VFAs 분석에 사용되는 10% PEG 6000이 packing된 glass packed column과 5% Carbowax 20M이 coating된 stainless steel capillary column을 사용하여 column의 efficiency를 검토한 결과는 Fig. 3, 4와 같았다. 이 결과를 보면 capillary column을 사용한 결과 분석 시간이 10분으로 단축되었으며, detection limit도 VFAs 각각 약 3ng 정도로 크게 감소되었으므로 sensitivity가 증가되었음을 알 수 있었다.

본 실험에서는 resolution, separation number 및 이론단수를 검토하여 (Table 1) column efficiency가 좋은 capillary column을 선택하여 GC 최적 조건을 검토하였다.

Injection 방법의 선택. GC에 시료를 주입할 때는 신속해야 하며, 재현성이 좋아야 하고, plug injection이어야 하며, 차별분할이 일어나지 않아야 하며, 시료가 분해되어서는 안된다.²²

Capillary column을 사용하는 경우는 주입되는 시료의 양이 미량으로 특히 주의를 요해야 한다. 그 방법으로는 split injection²³, splitless injection²⁴과 on-column injection 등이 있다. 이 중 split injection 방법은 시료의 성상에 따라 차별분할이 일어나므로 미량분석에는 적합하지 않으며, splitless injection 방법 (split ratio=1:

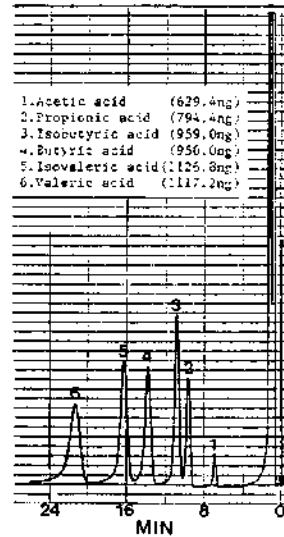


Fig. 3. Typical chromatogram of VFAs Glass column (150cm×4mm id) 10% PEG 6000 on shimalite TPA (60/80 mesh) Col. Temp.: 160°C. Inj. Temp.: 150°C. Det. Temp.: 300°C. Carrier gas: N₂ at 50ml/min. FID Sens.: 4×10⁻¹⁰ AFS. Sample size: 1 μl (on-column inj.). Chart speed: 0.25cm/min.

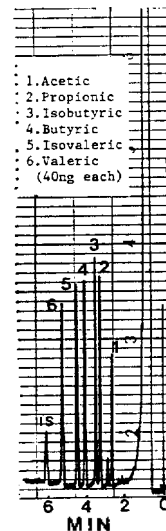


Fig. 4. Chromatogram of VFAs. S.S. WCOT (30m×0.5mm id). 5% Carbowax 20M/0.75% H₃PO₄. Col. Temp.: 100°C, @5°C/min 150°C. Inj. Temp.: Room temp. Det. Temp.: 250°C. Carrier gas: N₂ at 10ml/min. Sample size: 1 μl (on-column inj.). Chart speed: 0.5cm/min.

12)으로 분석한 결과 ghosting peak가 생성되었으므로 VFAs 분석에 부적합함을 알았다.

본 실험에서는 on-column injection port를 사용하여 정량 결과가 정확하며, 시료의 성상에 따른 차별분할이 일어나지 않으며, capillary column 내로 직접 시료를 주입하는 on-column injection 방법을 선택하여 GC의 최적조건을 검토하였다.

추출방법의 선정. 수용성 매체내 VFAs의 전처리를 liquid-liquid extraction method와 liquid-solid extraction method로 검토하였다. liquid-liquid extraction method에 의한 전처리 방법은 시간이 약 20분 가량 소요되며, 그 과정도 5단계로 복잡하며, ether 자체에 함유되어 있는 수분을 제거하기 위해 ether 추출액에 무수 염화칼슘을 넣어줘야 하므로 매우 번거로운 방법임을 알수 있었다.

본 실험에서 개발한 방법인 Chromosorb P를 흡착제로 사용하는 liquid-solid extraction method로 처리한 결과 시간은 약 5분이 소요되었으며, 2단계 과정이므로 liquid-liquid extraction method에 비해 매우 간편하며, 신속하고, 효율적이라는 것을 알수 있었다.

이와같은 liquid-solid extraction method는 거대한 양의 시료를 취급할 수 있으며, 사용되는 용매량이 적으며, 용매의 불순물에 의한 오염을 방지할 수 있으며, 자동화가 가능하다는 장점을 지니고 있다.

회수실험. 추출방법의 효능을 알아보기 위해 회수실험을 한 결과는 Table 2와 같았다. Liquid-liquid extraction method에 비해 liquid-solid extraction method에 의한 회수율이 좋음을 알 수 있었다. 초산은 가장 극성이 높은 저분자

량의 지방산으로 ether와 물 사이에서의 해리상수가 다른 고분자량의 지방산에 비해 낮아서 물과 공비 혼합물을 형성하지 않으므로 가장 낮은 회수율을 나타내었다.

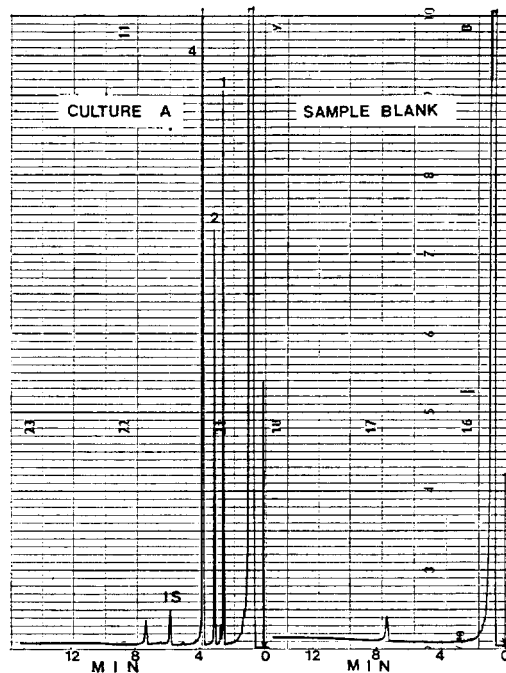


Fig. 5. Chromatograms of sample blank and culture A.

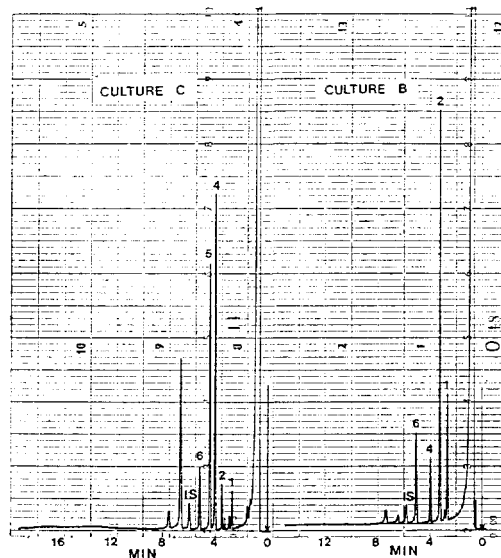


Fig. 6. Chromatograms of culture B and culture C.

Table 2. Efficiency of the sampling procedures

Acid	Recoveries of Acids (%)	
	Conventional sampling	New sampling
Acetic acid	22.2±3.5	25.4±5.1
Propionic acid	60.4±2.5	75.5±6.8
Isobutyric acid	62.6±2.9	85.5±3.9
Butyric acid	61.0±2.0	84.2±2.6
Isovaleric acid	71.0±2.2	97.6±3.6
Valeric acid	62.6±2.3	89.5±5.1

Table 3. Levels of VFAs in aqueous samples

Sample	$\mu\text{g/ml}$					
	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid
Culture A	569	280	*	>600	*	*
Culture B	225	469	*	79	*	126
Culture C	54	42	*	318	250	70
Saliva A	72	25	*	9	*	*
Saliva B	5	2	*	*	*	*

*not detectable.

응용. 미생물의 발효대사중에 생성되는 VFAs의 profiles를 분석하기 위해 liquid-solid extraction method로 검액을 전처리하여 capillary column으로 분석한 chromatograms는 Fig. 5와 6과 같았다. 그 결과 culture A는 *Megasphaera elsdenii* 4PM2이며, culture B는 *Selenomonas ruminantium* 5FS1이며, culture C는 *Fusobacterium necrophorum* 7NB2의 균주임을 각각 확인할 수 있었다.

임상에 있어서는 감염성 질환에 의해 VFAs가 생성되며 생성된 VFAs가 사람의 타액 성분에

영향을 미칠 것이라 사려되므로, 건강한 사람의 타액을 채취하여 상기 실험방법으로 분석하여 얻은 Chromatogram는 Fig. 7과 같았다. 그리고 미생물 배양액과 타액의 정량 결과는 Table 3과 같았다.

결론

Chromosorb P를 고정매체로 사용하였고 capillary column을 사용하여 수용성 매체로 부터 VFAs를 분리 분석하여 다음의 결론을 얻을 수 있었다.

1. Capillary column을 사용하여 분석한 결과 resolution은 1.5 이상이었고, separation number는 0.2 이상이었으며, 이론단수는 2800 이상이었으므로 VFAs를 분석함에 있어서 지장을 초래하지 않았다.

2. On-column injection port를 사용함으로써 ghosting 현상이 발생하지 않았으며, 5회 주입한 결과 RSD는 2.3%이었다.

3. Chromosorb P를 이용한 전처리 방법으로 수용액중의 VFAs를 분석한 결과 3~100ng/ml의 농도 범위에서 피크의 높이비와 농도 사이에 직선성이 있었으며, 초산을 제외하고 75.0% 이상의 회수율을 얻었으며, 재현성도 좋았다.

4. 미생물 배양액을 확인 정량하였으며, 타액을 분석하여 profiles를 확인한 결과 앞으로 임상에서 감염성 질환의 조기진단에 본 실험에 의한 방법이 적용될 수 있으리라 사려된다.

인용문헌

1. Holdeman L.V. Cato. EP and Moore W.E.C.,

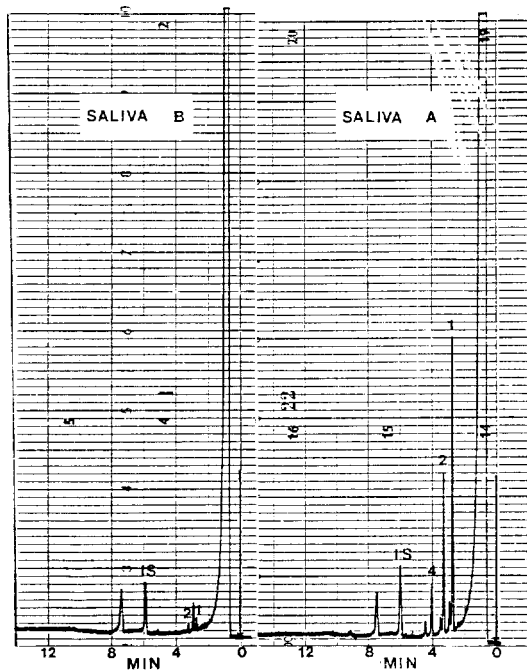


Fig. 7. Chromatograms of saliva A and saliva B.

- "Anaerobe Laboratory Manual", 47th Ed., 1, Virginia Polytech. Inst. and State Univ., Blackburg, Virginia, 1977.
2. Per Fammet and Jens Knudsen, *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**(3), 617 (1984).
 3. Jonathan D. Berg, Richard G. Mills, and David J. Coleman, *J. Clin. Pathol.*, **38**, 108 (1985).
 4. K. MacNamara, *J. HRC & CC*, **7**, 641 (1984).
 5. Hanns G. Henkel, *J. Chromatogr.*, **58**, 201 (1971).
 6. J. G. Winchester and E. J. H. Ford, *J. Chromatogr.*, **105**, 179 (1975).
 7. Gy. Vigh, Hlavay, Z. Varga-Puchony, and T. Welsch, *J. HRC & CC*, **5**, 124 (1982).
 8. J. P. Salanitro and P. A. Murihead, *Appl. Microbiol.*, **29**(3), 374 (1975).
 9. J. Pörschmann, T. Welsch, W. Engewald and Gy. Vigh, *J. HRC & CC*, **7**, 509 (1984).
 10. C. P. Tsai, A. Sahil, J. M. McGuire, B. L. Karger, and Paul Vouros, *Anal. Chem.*, **58**(1), 2 (1986).
 11. Alan W. Reed, Hilton C. Deeth and Donald E. Clegg, *J. Assc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 718 (1984).
 12. M. H. Henderson and T. A. Steedman, *J. Chromatogr.*, **244**, 337 (1982).
 13. Antonio Di Corcia and Roberto Samperi, *Anal. Chem.*, **46**(1), 140 (1974).
 14. G. C. Cochrane, *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 440 (1975).
 15. K. MacNamara and N. Burke, *J. HRC & CC*, **8**, 853 (1985).
 16. D. M. Ottenstein and D. A. Bartley, *Anal. Chem.*, **43**(7), 952, (1971).
 17. R. W. Frei and U. A. Th. Brinkman, *Trends in Anal. Chem.*, **1**, 45 (1981).
 18. K. R. Kim, A. Zlatkis, Shary Weisner, J. H. Kim, and K. S. Choi, *J. Chromatogr.*, **325**, 127 (1985).
 19. Jan Hrivnák, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 602 (1970).
 20. F. S. Wang, H. Shanfield, and A. Zlatkis, *Anal. Chem.*, **54**, 1886 (1982).
 21. Milton L. Lee and Bob W. Wright, *J. Chromatogr.*, **184**, 235 (1980).
 22. G. Schomburg, H. Behlau, R. Dielmann, F. Weeke, and H. Husmann, *J. Chromatogr.*, **142**, 87 (1977).
 23. K. Grob Jr. and H. P. Neukom, *J. Chromatogr.*, **236**, 297 (1982).
 24. K. Grob Jr. and B. Schilling, *J. Chromatogr.*, **260**, 265 (1983).