

GC 및 GC/MS를 이용한 주요 분변 부패산물 신속분석법

박 규 용 · 김 민 철 · 우 강 웅 · 이 나 경 · †백 현 동
경남대학교 생명과학부
(접수 : 2003. 1. 8., 게재승인 : 2003. 2. 26.)

Rapid Analysis of Major Putrefactive Metabolites by GC and GC/MSD

Kyu-Yong Park, Min-Chul Kim, Kang-Lyung Woo, Na-Kyoung Lee, and Hyun-Dong Paik†
Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea
(Received : 2003. 1. 8., Accepted : 2003. 2. 26.)

A simple, reproducible, and rapid gas chromatographic method for putrefactive metabolite determination in feces was developed. The method involves the direct injection of fecal supernatants into the gas chromatograph, without pretreatment. The mass spectra of these metabolites were obtained using an HP 5971 mass selective detector operated in electron impact (EI) ionization mode. This method produced sharp peaks and allowed the simultaneous determination of fecal putrefactive metabolites.

Key Words: Gas chromatography, putrefactive metabolite, feces, indole, skatole, p-cresol

서 론

인간 및 동물의 장내에는 100 여종 이상의 미생물들이 균형을 이루며 서식하고 있다. 장내 균총을 이루고 있는 미생물들은 크게 유익한 작용을 하는 미생물 군과 유해한 영향을 미치는 부패 및 병원성균 등으로 나눌 수 있다. 이 중에서 유해균들은 숙주에게 유해한 부패산물, 독소, 발암물질 등을 생성하여 동맥 경화, 암, 면역성 감소, 노화의 원인을 제공하기도 한다(1, 2). 이러한 상기 원인물질로서 대표적으로 알려진 부패산물로는 암모니아, 아민류, 페놀류, indole, skatole, p-cresol 등이 있다. 부패세균들은 장내에서 미흡수된 단백질, 아미노산 및 요소 등으로부터 인체에 해로운 상기 물질들을 형성하며, 보통 세포 독성을 가지게 된다. 이들 물질 중 p-cresol은 tyrosine으로부터 생성이 되고(3), indole과 skatole은 tryptophan으로부터 tryptophanase에 의해 발생하게 되는데(4), 분노 등에 포함된 단백질 성분이 분해될 때 대사과정에서 생성되는 성분들이며, 각종 오수 및 축산 폐수 등에서 악취의 원인이 되기도 하는 유해한 물질들이다(5). 악취 원인물질로 p-cresol이 가장 높은 농도를 차지한다는 보고가 있으며(6,7), indole, skatole, p-cresol 등의 대표적인 부패산물들은 장내의 부패 정도를 측정하는 척도로서 이용되기도 한다(2). 현재까

지 상기 악취 원인물질의 형성 기전과 생성량 제어가 어떠한지 명확히 알려져 있지 않으며, 저급 탄화수소 계열 악취 원인물질은 주로 장내 미생물 또는 체외 미생물 대사에 의하여 생성될 가능성이 높고, 사료 측면에 있어 소화 이용률이 낮은 에너지원이 다량 급여되거나, 에너지 단백질 균형이 파괴될 때, 그리고 가축이 질병 상태에 있을 때 이러한 물질들이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그리고 방향족 아미노산, 핵산 등의 물질들이 과잉 공급될 때 phenol, indole, skatole 같은 물질의 생성량이 증가하고, 유전적 또는 대사성 단백질 소화 결함이 발생한 경우에도 이러한 부패 산물의 생성량이 증가한다는 보고가 있다(3, 7-9). 또한, 장내 세균총과 암과의 관계에서 발암에 관계하는 위험인자로 손꼽히는 것이 바로 이러한 indole 및 아미노산 대사 생성물들이다(2).

본 연구에서는 이러한 분변에 존재하는 대표적인 부패산물을 정량하기 어려운 점들을 개선하여, GC 및 GC/MSD를 이용한 보다 간단하고 신속한 분석을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

분변 채취 및 시약

건강한 성인 남녀(남자 10명, 여자 10명)로부터 약 10 g씩의 분변을 채취하였으며, 채취한 분변은 CO₂로 충전한 후, 즉시 혐기적으로 처리를 하여 밀봉하고, -20℃에서 보관하면서 실험을 진행하였다. 또한 내부 표준물질인 4-isopropylphenol과 표준물질인 indole, skatole, p-cresol 등은 Aldrich사(Milwaukee, USA)로부터 구입하였다.

† Corresponding Author : Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea
Tel : +82-55-249-2689, Fax : +82-55-243-8133
E-mail : hdpaik@kyungnam.ac.kr

분석방법

대표적인 분변 부패산물들인 indole, skatole, p-cresol 등은 HP 5890 gas chromatograph(Hewlett Packard Co., USA)를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 본 실험에 사용한 컬럼은 DB-17 capillary column(J&W Scientific Co., USA)이었으며, GC 분석조건은 Table 1에 요약하였다. 측정을 위한 분변 시료는 다음과 같이 제조하였다. 실험 지원자들로부터 회수된 분변을 2 g씩 신속히 채취하여, NaOH로 pH 9.0으로 조정된 증류수에 넣어 10 mL로 정용하였다. 이 때 내부 표준물질인 4-isopropylphenol을 50 ppm 농도로 분변과 함께 첨가하였다(2). 정용한 용액을 20분간 sonication 후에 현탁액을 vortexing하여 균질화시킨 후 1 mL을 회수하여 4℃에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리한 다음 상등액을 깨끗한 eppendorf tube로 옮긴 다음, 상등액 1 µL를 컬럼에 직접적으로 주입하여 부패산물을 분석하였다. 표준물질 용액은 indole, skatole, p-cresol을 NaOH로 pH 9.0으로 조절된 증류수로 50 ppm 농도로 만들고 10 mL를 취한 후, 그 이후 과정은 분변시료 처리 경우와 동일하게 하였다.

부패산물 동정은 HP 5971 mass selective detector(Hewlett Packard Co. USA)를 이용하여 EI mode(70 eV)로 시료를 분석하였고, carrier gas의 유속은 0.9 mL/min이었으며, 나머지 조건은 GC와 같다(10).

Table 1. The conditions of gas chromatography for analysis of fecal putrefactive metabolites

GC	HP 5890 series H plus gas chromatograph (Hewlett Packard Co., USA)
Column	DB-17 capillary column (J&W Scientific Co., USA), 30 m×0.32 mm, thickness 0.25 µm
Carrier gas	H ₂
Flow rate	Flow rate 1.2 mL/min(Electron Pressure Control)
Splitless	Inlet valve OFF for 0.1 min after injection Inlet valve ON for remaining time
Make up gas	30 mL/min
Detector	FI
Initial temp.	80℃
Final temp.	175℃
Temp. programming	5℃/min
Injection temp.	260℃
Detector temp.	260℃

결과 및 고찰

대표적 부패산물들인 indole, skatole, p-cresol 등의 표준 물질들에 대한 chromatogram과 실험 지원자로부터 채취한 분변으로부터 분석한 chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다. 표준물질들은 완전히 분리되었고, 분변 시료 중 부패산물들도 3가지 다 검출되었으며, 불순 peak도 거의 없이 분리되었다. Table 2에 각 표준 물질의 상대 물 반응과 상대 표준 편차값을 나타내었다. 상대 표준 편차값이 skatole을 제외하고는 5% 이내로 정밀도가 매우 높았고, skatole도 5.67%로 정밀도가 상당히 좋은 편으로 나타나, 본 실험의 정밀도들은 매우 좋은 것으로 확인되었다. 장내에서 indole을 생성하는 균으로는 *E. coli*, *Proteus*, 그리고 일부 *Bacteroides*와 *Clostridium* 등

이 있다는 보고가 있으며(11), p-cresol과 phenol은 장내 세균에 의하여 tyrosine, phenylalanine으로부터 대사 생성된다(12).

Table 2. Relative molar response(RMR) and relative standard deviation(RSD) of standard putrefactive metabolites

Putrefactive metabolites	RPR*	RSD(%)
Indole	1.04±0.03	2.55
Skatole	0.71±0.04	5.67
p-Cresol	0.94±0.03	2.62

Values are relative to 4-isopropylphenol=1, n=3
*Mean±S.D.

Table 3. Concentration of putrefactive metabolites in the human fecal samples

Putrefactive metabolites	Concentration*
Indole	40.20±25.44
Skatole	33.59±7.37
p-Cresol	175.68±128.43

n=20 *ppm±S.D.

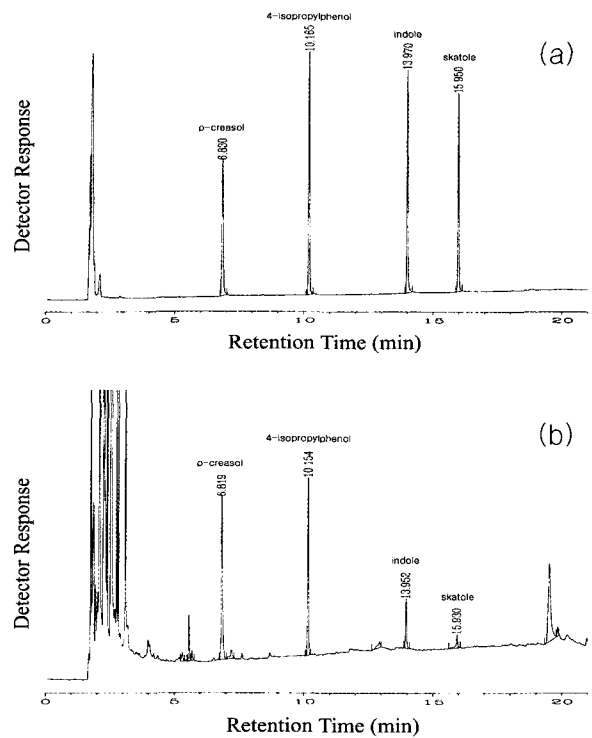


Figure 1. Gas chromatogram of fecal putrefactive metabolites. (a) a standard mixture, (b) a fecal supernatant

Table 3에 분변 시료 중 부패 산물의 검출 농도를 나타내었다. 본 실험에서 p-cresol과 indole의 경우, 분변 시료에서 검출되는 횟수와 농도가 아주 높게 나타내는 경향을 보였고, skatole은 낮은 농도를 보였다. 본 실험에서 사람에게 대한 분변 부패산물의 농도가 매우 큰 편차를 나타내었는

데, indole 분포 범위는 10~90 ppm 수준을 보였으며, skatole의 경우에는 사람에 따라 검출되지 않는 경우가 많았고 통상 약 40 ppm 수준이었다. *p*-Cresol은 모든 분변으로부터 검출되었으며, 30~300 ppm 정도로 분포 범위가 아주 넓었다. Indole, skatole, *p*-cresol 등은 액체크로마토그래피법(HPLC)으로 연구가 여러 차례 이루어져 왔고(11), GC에 의해서도 수십년 간에 걸쳐 분석되어 왔으며(9,13,14), 또 다른 방법인 spectrophotometric 법에 의해서도 연구가 진행되었었다(15). 본 연구에서는 GC(Fig. 1) 및 GC/MSD를 이용하여 분변 중 대표적인 부패산물들인 indole, skatole, *p*-cresol 등을 간단하고 신속하게 동시적으로 정량할 수 있었다. 최근의 연구 중 Shin 등(1996)은 상기 물질들을 GC를 이용하여 분석하였는데(2), 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다. 그러나, 본 연구에서는 전처리 과정이 많이 생략되었기 때문에 상기의 연구 결과보다 높은 수준으로 그리고 간편하게 부패산물들이 검출되었음이 확인되었다.

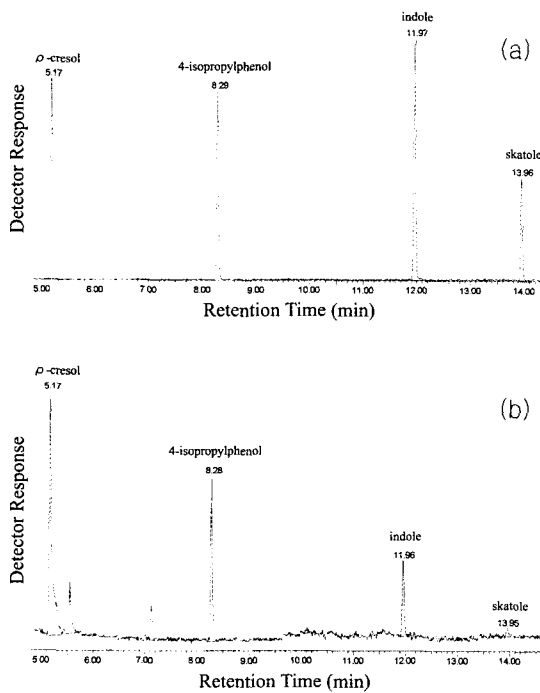


Figure 2. Total ion chromatogram of GC/MSD of putrefactive metabolites. (a) a standard, (b) a fecal sample

Fig. 2에 GC/MSD로 표준물질과 시료 중 부패산물을 분석한 total ion chromatogram을 나타내었고, Fig. 3에 각 부패산물의 표준물질들과 시료 중의 부패산물의 EI mass spectra를 비교하여 나타내었다. 표준물질의 spectrum과 시료 중 spectrum이 거의 일치하고 있어 분변 중 대표적인 부패산물들인 indole, skatole, *p*-cresol을 정성적으로 확인할 수 있었다.

따라서 DB-17 capillary 컬럼을 이용하여 GC 및 GC/MSD에서 여러 전처리 과정에서 소실될 수 있는 분석 시료 양을 배제하고, 아주 쉽고 빠르게 indole, skatole, *p*-cresol 등을 분석할 수 있었다.

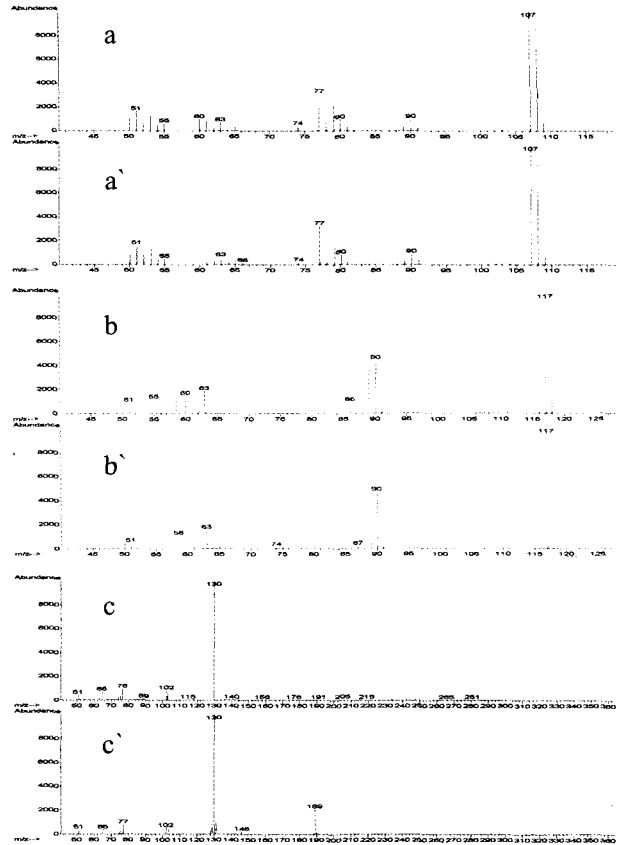


Figure 3. EI mass spectra of putrefactive metabolites. a, *p*-cresol in a standard; a', *p*-cresol in a sample; b, indole in a standard; b', indole in a sample; c, skatole in a standard; c', skatole in a sample

요 약

대표적인 부패산물들로 잘 알려진 indole, skatole, 그리고 *p*-cresol 등을 측정하기 위한 방법으로 HPLC, spectrophotometric 법, 그리고 GC 및 GC/MSD 방법이 있으며, 수십년 간에 걸쳐 이러한 물질들의 분석이 이루어져 왔다. 본 연구에서는 많은 전처리 과정을 생략하여 분석물의 손실을 최소화하면서 GC 및 GC/MSD를 이용하여 쉽고 빠르게 측정할 수 있는 조건과 방법을 확립하였다. 측정시료는 건강한 성인 남녀의 분변이었으며, 내부 표준물질로 4-isopropylphenol을 사용하였으며, 분변 중 indole의 함량은 10~90 ppm 수준이었으며, skatole의 경우에는 약 40 ppm 정도로 검출되었다. 또한, *p*-cresol은 30~300 ppm 수준으로 그 분포 범위가 아주 넓게 나타났었다. GC/MSD를 이용하여 시료 중 상기 물질들을 정성적으로 정확히 확인할 수 있었다. DB-17 capillary 컬럼을 이용하여 시료의 전처리 과정을 생략하여도 분석하려는 부패산물의 정성 및 정량에 방해되는 불순 peak는 없었고, 분리능도 매우 우수하였으므로 보다 빠르고 신속하게 상기 물질들을 확인할 수 있었다. 향후 본 연구를 통해 개발된 신속분석법이 분변에 존재하는 주요 부패산물들의 정량에 유용하게 사용되리라 판단된다.

감 사

본 연구는 2002학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Paik, H.-D., M.-Y. Jung, H.-Y. Jung, W.-S. Kim, and K.-T. Kim (2002), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**, 73-78.
2. Shin, M. S., Y. J. Kim, H. S. Bae, and Y. J. Baek (1996), Effects of the lactic acid bacteria administration on fecal microflora and putrefactive metabolites in healthy adults, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 254-260.
3. Hammond, E. G., C. Heppener, and R. J. Smith (1989), Odors of swine waste lagoons, *Agric. Ecosys. Environ.* **25**, 103-110.
4. Yokoyama, M. T. and J. R. Carlson (1979), Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole, *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 173-178.
5. Williams, A. G. (1984), Indicators of piggery slurry odour offensiveness, *Agric. Wastes* **10**, 15-36.
6. Schaefer, J. (1977), Sampling, characterization and analysis of malodours, *Agric. Envir.* **3**, 121-127.
7. Spoelstra, S. F. (1980), Origin of objectionable odorous components in piggery wastes and the possibility of applying indicator components for studying odour development, *Agric. Envir.* **5**, 241-260.
8. Mackie, R. I. (1994), Microbial Production of Odor Components, In *Processings of International Round Table on Swine Odor Control*, p18, Ames, USA.
9. Yasuhara, A. and K. Fuwa (1977), Odor and volatile compounds in liquid swine manure. I. Carboxylic acids and phenols, *Bull. Chem. Soc. Japan* **50**, 207-214.
10. Woo, K. L. (1993), Determination of 22 protein amino acids as N(O)-tert-butyltrimethylsilyl derivatives by gas chromatography, *J. Chromatogr.* **638**, 97-107.
11. Yoo, I. J., Y. S. Kim, W. M. Park, and C. H. Kim (1996), Determination of skatole and indole in backfat of Korean pigs by HPLC, *Kor. J. Food Sci. Ani. Res.* **16**, 180-187.
12. Mitsuoka, T. (1978), *Intestinal Bacteria and Health*. Harcourt Brace Jovanovich, Tokyo.
13. Yoshihara, I. (1979), Simultaneous gas chromatographic microdetermination of indole, skatole, and p-cresol in gastrointestinal contents of domestic animals, *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1985-1987.
14. Wilkins, C. K. (1990), Analysis of indole and skatole in porcine gut contents, *Int. J. Food Sci. Technol.* **25**, 313-317.
15. Mortensen, A. B. and S. E. Sorensen (1984), Relationship between Boar Taint and Skatole Determined with a New Analysis Method, In *30th European Meeting of Meat Research Workers*, p394, Bristol, UK
16. Zhi, C., and L. R. Gregory (1996), Photolithotrophic cultivation of *Laminaria saccharina* gametophyte cells in a bubble-column bioreactor. *Enzyme and Microbial Technol.* **18**(4), 291-299.