

# 수용액 내 자동 시료 전처리에 의한 포유류 분변 내 짧은 사슬 지방산 (SCFAs)의 GC/MS 측정

## 저자

Takeshi Furuhashi and  
Genki Ishihara Anicom  
Specialty Medical Institute  
Inc., 8-17-1, Nishi Shinjuku,  
Shinjuku-ku, Tokyo, Kuniyo  
Sugitate, Agilent Technologies  
Japan

## 개요

이 응용 자료는 Agilent 7890B GC와 Agilent 7693A 자동 시료 주입기를 장착한 Agilent 5977B GC/MSD를 이용한 포유류 분변 내 짧은 사슬 지방산(Short Chain Fatty Acids, SCFA)의 프로파일링법을 소개합니다. 분변 내 SCFA의 프로파일링 및 정량이 매우 중요함에도 불구하고, SCFA의 휘발성과 친수성으로 인해 분석의 기술적 어려움이 여전히 존재합니다. 본 응용자료에서는 시료 건조 없이 수용액 내에서 isobutyl chloroformate/isobutanol에 의한 유도체화를 사용하였습니다. 이 프로토콜을 이용하여 C1~C7 지방산(formic acid부터 heptanoic acid까지)에 대한 분석법을 개발하였으며, GC/MS를 통해 포유류 분변 내 7종 이상의 SCFA를 성공적으로 식별 및 정량하였습니다.

## 소개

짧은 사슬 지방산(Short Chain Fatty Acids, SCFA)의 프로파일링은 장내 세균 연구의 주요한 주제입니다<sup>1,2</sup>. 그러나 SCFA는 높은 휘발성과 친수성으로 인해 분석이 까다롭습니다. 휘발성 화합물 검출에 유리한 GC/MS가 적합한 기술이 될 수 있지만, 극성이 높은 이 화합물들의 정확한 GC/MS 분석을 위해서는 유도체화가 필요합니다.

유도체화에는 실릴화(trimethylsilyl, TMS)<sup>3</sup>, 알킬화<sup>4</sup>, 에스테르화<sup>5</sup> 등이 포함될 수 있습니다. 많은 유도체화 프로토콜은 반응 전 생체 시료로부터 물을 제거해야 하는 비수용성 조건을 필요로 합니다. 그러나 SCFA는 건조 과정이 오히려 부정적인 영향을 미쳐, 부정확한 결과를 초래하게 됩니다. 이전의 연구에서는 수용액 조건에서의 유도체화를 위해 propyl chloroformate/propanol을 이용한 에스테르화 방법을 적용하였습니다<sup>6</sup>. 안타깝게도, 이 유도체화 시약은 크로마토그래피 분석에서 포름산과 분리되지 않아, 포름산의 검출 및 식별이 어려웠습니다.

Isobutyl chloroformate/isobutanol를 이용해 보다 향상된 GC/MS 유도체화 프로토콜을 개발하였으며, 이 감도 높은 GC/MS 분석을 통해 14종의 SCFA를 완벽하게 분리, 식별 및 검출할 수 있었습니다. 본 응용 자료에서는 GC/MS를 이용한 포유류 분변 시료 내 SCFA 프로파일링 플랫폼을 소개하고 있습니다.

## 실험

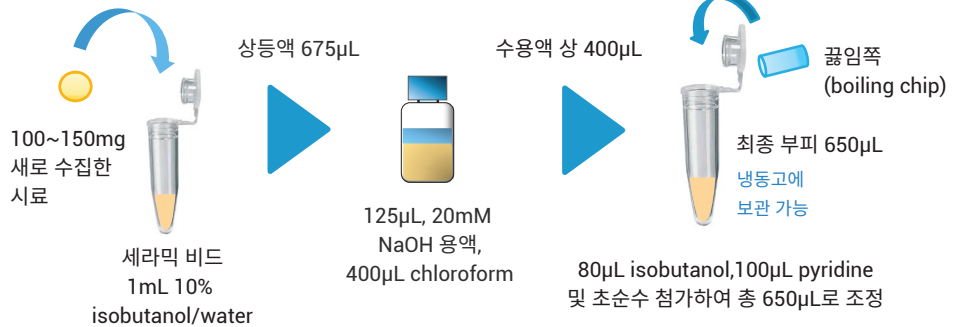
분변과 같은 지질이 많이 포함된(lipid-rich) 생체 시료에서 전처리가 특히 더 중요한 이유는, 지질이 유도체화 과정에 영향을 미칠 수 있기 때문입니다. 그러므로 유도체화 전, 상 분리(phase separation)를 통해 생체 시료 내 다수의 친지질성(친유성) 화합물을 제거해야 합니다. 이 과정은 오염물로 인해 유도체화가 방해받는 것을 방지하고, GC 크로마토그램에서 오염물 피크를 제거하는데 도움이 됩니다.

### 시료 전처리

새로 수집한 분변 시료(인간 및 고양이, 수집 직후 중량 100~150mg)를 세라믹 비드가 포함된 2mL 스크루 캡 튜브에 담았습니다(KT03961-1, Bertin Technologies, France). 10% isobutanol 1mL 첨가 후,

6,000rpm으로 20초간 2회(30초 간격) 균질화하였습니다(Precellys Evolution; Bertin Technologies, France). 그 후 각 시료를 21,000g으로 5분간 원심분리하고, 상등액 중 675μL를 새 튜브로 옮겼습니다. 회수율 모니터링을 위해 20μg의 3-methylpentanoic acid도 상등액에 첨가하였습니다. 그 다음 20mM NaOH 수용액 125μL와 chloroform 400μL를 튜브에 첨가한 후 시료를 볼텍스 처리하고, 다시 21,000g으로 2분간 원심분리하였습니다. 400μL의 상부 수용액 층을 새 튜브로 옮긴 후, isobutanol 80μL와 pyridine 100μL를 첨가한 다음 초순수로 총 부피 650μL가 되도록 하였습니다. 거품 생성을 최소화하기 위해 튜브에 1개의 끓임쪽(boiling chip)을 추가하였습니다. 시료는 이 단계 후 냉동고에 보관할 수 있습니다.

### 시료 전처리



### 유도체화

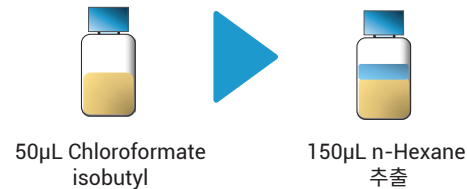


그림 1. 시료 전처리 및 유도체화 과정

## 검량 표준물질 전처리

원하는 농도의 SCFA 표준물질과 20mM NaOH 125μL, pyridine 100μL 및 isobutanol 80μL를 튜브에 넣고 혼합한 뒤, 초순수로 최종 부피 650μL가 되도록 조정하였습니다. 거품 생성을 방지하기 위해 튜브에 1개의 끓임칩(boiling chip)을 추가하였습니다.

## 유도체화 과정

검량 표준물질과 시료에 대해 모두 동일한 유도체화 절차를 거쳤습니다. Isobutyl chloroformate 50μL를 650μL의 시료 또는 표준 용액에 조심스럽게 첨가하였습니다. 반응에 의해 생성된 기체를 방출하기 위해 튜브 뚜껑을 1분간 열어놓은 후 다시 닫고 볼텍스 처리하였습니다. 그 다음, 150μL의 hexane을 첨가하여 튜브를 21,000g에서 2분간 원심분리하였습니다. 상부 hexane-isobutanol 용액층을 GC/MSD 분석용 자동 시료 주입기 바이알로 옮겼습니다. 이산화탄소 가스가 생성되므로 Preslit screw cap(p/n 5185-5824)의 사용을 권장합니다.

그림 2는 이 과정의 반응 메커니즘을 나타냅니다.

## 기기

Agilent 7890B GC 및 Agilent 7693A 자동 시료 주입기가 장착된 Agilent 5977B GC/MSD 단일 사중극자 질량분석기를 통해 SCFA의 정량분석을 수행하였습니다. 표 1에 GC/MS 분석 조건이 정리되어 있습니다.

## 결과 및 토의

### 크로마토그래피 분리

표 2에 모니터링된 14개의 SCFA와 각각의 머무름 시간 및 정량 이온이 정리되어 있습니다.

그림 3과 4는 수정된 유도체화 과정을 통해 유도체화 시약이 조기 용리되는 SCFA(formic acid 및 acetic acid)와 완전히 분리된 것을 보여줍니다.

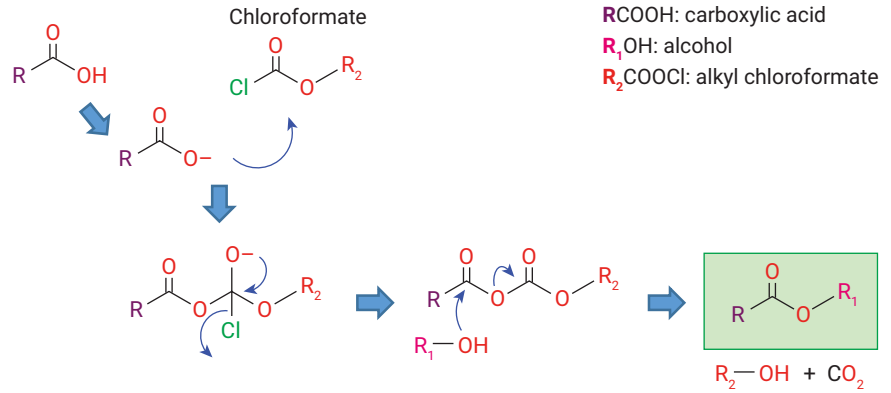


그림 2. 유도체화 반응 메커니즘

표 1. GC/MS 분석법

파라미터	값
GC/MS 시스템	Agilent 7890B GC/5977 MSD
컬럼	VF-5ms 30m × 0.25mm, 0.5μm (p/n CP8963)
컬럼 유량	1.0mL/min
라이너	Ultra Inert liner, Universal, Low PSI drop, Wool (p/n 5190-2295)
주입 모드	Split (50:1)
주입구 온도	260°C
오븐 온도	40°C에서 5분간 유지, 10°C/min으로 310°C까지 승온
이송 라인 온도	280°C
MS 모드	스캔
스캔 범위	m/z 30~350
이온화원 온도	250°C
Quad. 온도	150°C

표 2. 분석 물질, 물질별 머무름 시간 및 정량 이온 리스트

번호	화합물	RT(min)	m/z
1	Formic acid	4.28	56
2	Acetic acid	7.30	56
3	Propionic acid	9.83	57
4	Isobutanoic acid	10.88	71
5	Butanoic acid	11.75	71
6	2-Methylbutanoic acid	12.67	85
7	Isovaleric acid	12.75	85
8	Pentanoic acid (valeric acid)	13.59	85
9	3-Methylpentanoic acid (IS)	14.26	99
10	Isocaproic acid	14.58	99
11	Hexanoic acid (caproic acid)	14.67	99
12	2-Methylhexanoic acid	15.23	113
13	4-Methylhexanoic acid	15.70	113
14	Heptanoic acid	16.33	113

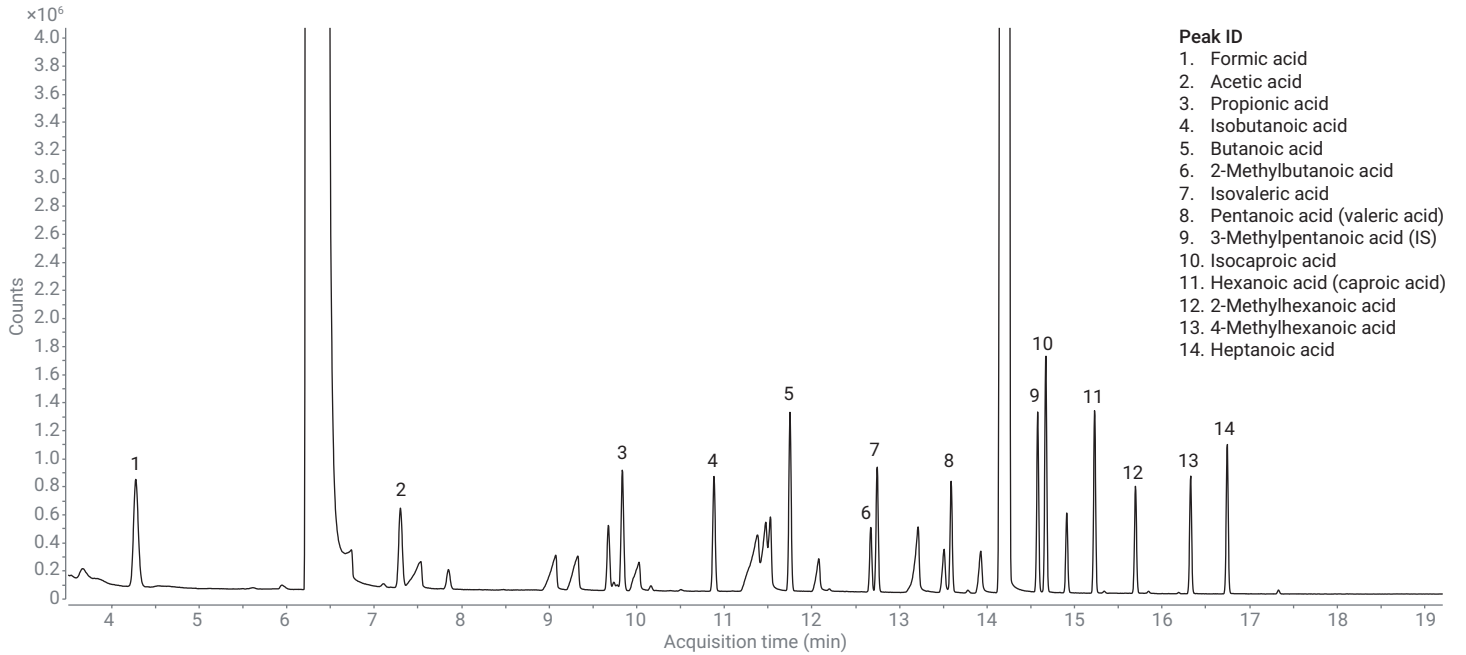


그림 3. SCFA의 총 이온 크로마토그램(Total ion current chromatogram, TIC)

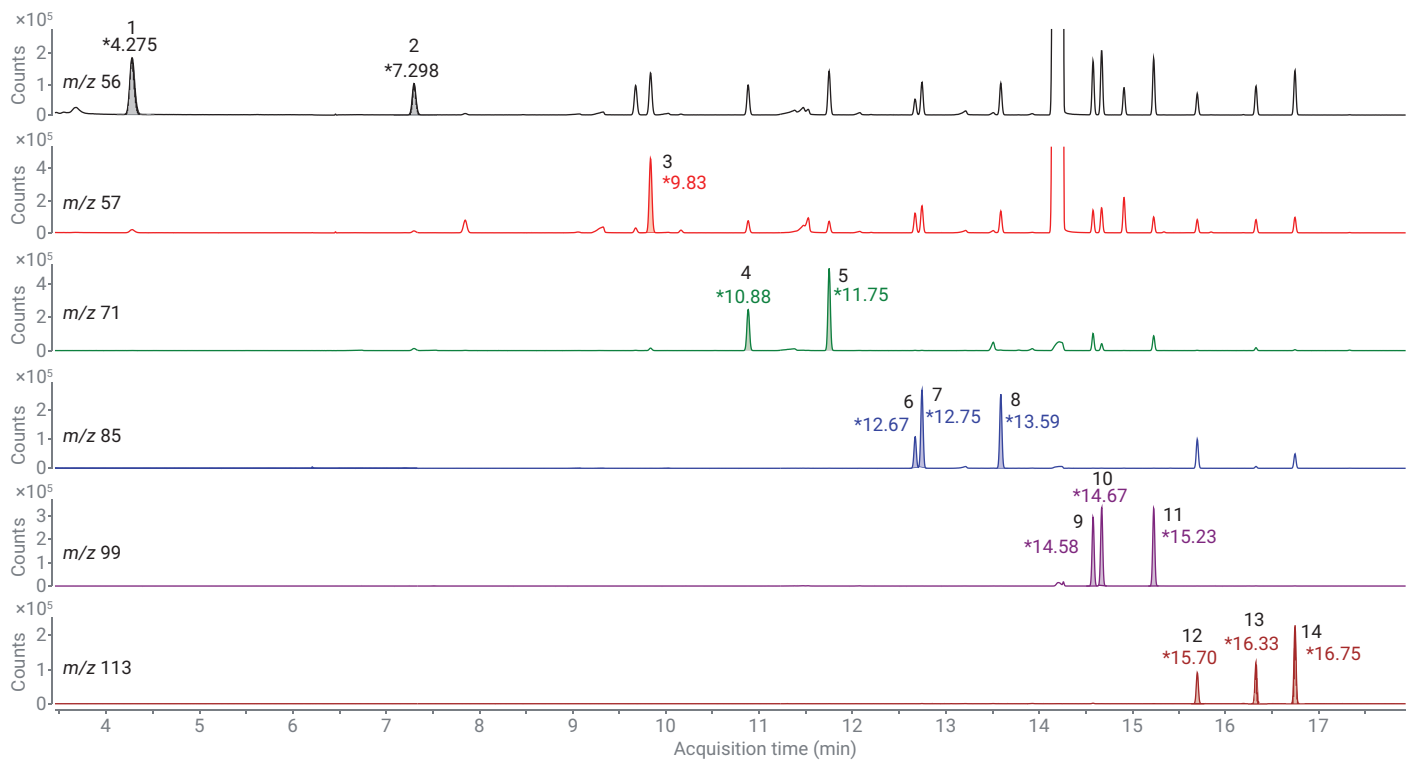


그림 4. 정량 이온에 대한 추출 이온 크로마토그램(EIC)

6.5분 및 14.3분 부근에 나타나는 큰 피크들이 유도체화 시약에서 유래된 것입니다. 그러나 이는 SCFA의 정확한 식별과 정량을 방해하지 않습니다.

### 정량 성능

포유류 분변에서 자연적으로 발생하는 SFCA 농도를 측정하기 위해 검량을 수행하였습니다. 생체 시료 내의 C1~C4 SFCA는 더 많은 탄소 수를 가진 SCFA보다 훨씬 높은 농도로 검출되기 때문에, 조기 용리 분석 물질에 대한 검량은 후기 용리 화합물보다 높은 농도에서부터 시작하였으며, 모든 범위에서 탁월한 직선성을 관측하였습니다.

### 시료분석 결과

위에서 서술한 기법을 이용하여 척추동물의 분변 시료를 테스트한 결과, 모든 시료에서 acetic acid (C2), propionic acid (C3) 및 butanoic acid (C4)가 검출되었습니다. Acetic acid는 모든 분변에서 가장 우세한 SCFA였습니다.

Chloroformate를 이용한 isobutylation 프로토콜을 통해 분변을 포함한 각종 생체 시료의 신속한 SCFA 프로파일링이 가능합니다. 이 향상된 프로토콜은 장내 세균 발효 과정에 대한 연구를 용이하게 합니다.

### 결론

Chloroformate를 이용한 에스테르화를 수용액 내에서 수행할 수 있습니다. 비수용성 용액 내의 에스테르화(예를 들어, methanol 내의  $\text{BF}_3$  또는  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )<sup>5</sup>와 비교했을 때, 이 프로토콜은 쉽고 실용적입니다. 실험은 자동 시료 주입기로 유도체화 단계를 자동화하여 수행할 수 있습니다. 이 프로토콜은 일상적인 측정에 적용할 수 있는 가능성이 있습니다.

표 3. 자연적으로 발생하는 고농도 및 극미량 농도 범위 모두에서 탁월한 검량 결과 획득

번호	화합물	범위 (on-column)	R <sup>2</sup>
1	Formic acid	40 pg~1 ng	0.9963
2	Acetic acid	20 pg~1 ng	0.9979
3	Propionic acid	20 pg~1 ng	0.9992
4	Isobutanoic acid	10 pg~1 ng	0.9993
5	Butanoic acid	10 pg~1 ng	0.9993
6	2-Methylbutanoic acid	10 pg~1 ng	0.9987
7	Isovaleric acid	10 pg~1 ng	0.9985
8	Pentanoic acid (valeric acid)	10 pg~1 ng	0.9995
9	3-Methylpentanoic acid (IS)	-	-
10	Isocaproic acid	4 pg~1 ng	0.9995
11	Hexanoic acid (caproic acid)	4 pg~1 ng	0.9996
12	2-Methylhexanoic acid	4 pg~1 ng	0.9987
13	4-Methylhexanoic acid	4 pg~1 ng	0.9990
14	Heptanoic acid	4 pg~1 ng	0.9996

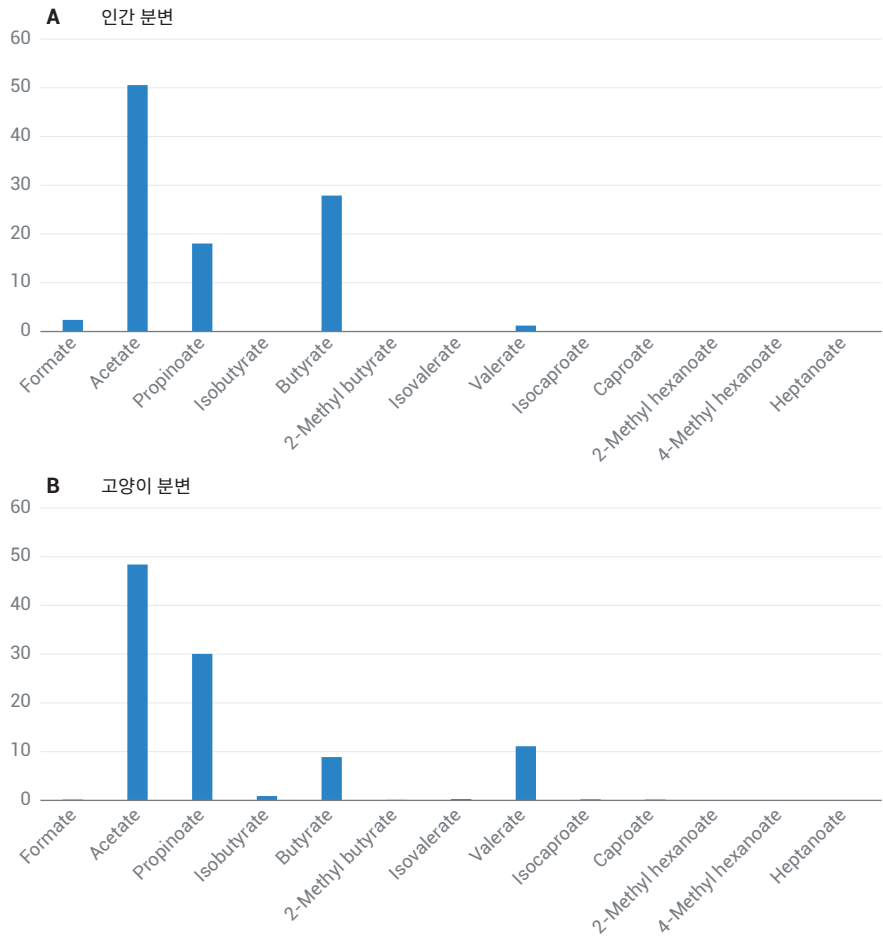


그림 5. 포유류 시료 분석 결과

## 참고문헌

1. Matsumoto, M.; *et al.* Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports* **2012**, 2(233), 1-10.
2. Primec, M.; Mi eti -Turk, D.; Langerholc, T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry* **2017**, 526, 9-21.
3. Olsen, M. A.; Mathiesen, S. D. Production rates of volatile fatty acids in the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) forestomach. *British Journal of Nutrition* **1996**, 75, 21-31.
4. Pons, A.; *et al.* Sequential GC/MS Analysis of Sialic Acids, Monosaccharides, and Amino Acids of Glycoproteins on a Single Sample as Heptafluorobutyrate Derivatives. *Biochemistry* **2003**, 42, 8342-8353.
5. Hallmann, C.; van Aarssen, B. G. K.; Grice, K. Relative efficiency of free fatty acid butyl esterification. Choice of catalyst and derivatization Procedure. *J. of Chromatog. A* **2008**, 1198-1199, 14-20.
6. Zheng, X.; *et al.* A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids. *Metabolomics* **2013**, 9(4), 818-827.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018  
2018년 3월 21일, 한국에서 인쇄  
5991-9103KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)