SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.M301K

Gas Chromatography

GCMS™ 및 GC-SCD를 사용한 장내 미생물이 생성하는 휘발성 가스 분석의 새로운 접근

장내 세균은 다양한 휘발성 물질을 생성하며 인간의 건강과 질병에 많은 관련이 되어 있습니다. 또한, 휘발성 물질을 해석해 바이오 마커 탐색 등의 연구도 행해지고 있습니다. 이번 어플리케이션 뉴스에서는 무균 생쥐 및 일반 균 정착 생쥐의 분변샘플에서 발생하는 가스를 분석하여 비교 검토를 실시하였습니다. 발생 가스 전체를 분석하기 위해서 GCMS를, 황화합물계 가스를 분석하기 위해서 GC-SCD를 사용하였습니다.

■ 시료와 분석 조건

무균 및 일반균 정착 생쥐의 분변을 그대로 헤드스페이스 바이알에 넣고 혐기성 가스를 주입 후 밀봉하여 24간 배양 하였습니다. 그 후 헤드스페이스 샘플러에 셋팅하고 발생 가스를 GCMS, GC-SCD를 통해 분석했습니다.

본 실험의 GCMS 장치 구성 및 분석 조건을 Table.1에, GC-SCD 장치 구성 및 분석 조건을 Table.2에 나타냈습니다.

Table.1 GCMS 장치 구성 및 분석 조건

Model	: HS-20 Trap / GCMS-QP2020 NX		
HS-20 Trap			
Mode	: 트랩 (트랩관:Tenax®GR)		
Multi Injection Time	: 5회	Oven Temp.	: 37 °C
Sample Line Temp.	: 80 °C	Transfer Line Temp.	: 90 °C
Trap Cooling Temp.	: -10 °C	Trap Heating Temp.	: 280 °C
Trap Waiting Temp.	: 25 °C	Vial Pressure	: 60kPa
Dry Purge Pressure	: 60kPa		
Vial Pressurization Time	: 1분		
Vial Pressurization Equilibrating Time	: 0.1분		
Loading Pressurization Time	: 0.1분		
Loading Time	: 1분	Dry Purge Time	: 10분
Injection Time	: 1분	Needle Flush Time	: 5분
GC			
Injection Mode	: Split		
Split Ratio	: 1:3		
Carrier Gas	: He		
Carrier Gas Control	: 선속도 방식 25.cm/초		
Column	: DB-WAXetr (60 m×0.25 mm I.D, 0.25um.)		
Column Temp.	: 40 °C (5min) - 3 °C/min – 240 °C (15min)		
MS			
Ion Source Temp.	: 200 °C		
Interface Temp.	: 200 °C		
Ionization Mode	: EI		
Measurement Monde	: Scan (*m/z* 10~350)		
Event Time	: 0.3초		

Table.2 GC-SCD 장치 구성 및 분석 조건

Model	: HS-20 / GC-2030 /. SCD-2030		
HS-20			
Mode	: 루프		
Oven Temp.	: 37 °C	Sample Line Temp.	: 80 °C
Transfer Line Temp.	: 90 °C	Vial Pressure	: 60kPa
Vial Heat-retention Time: 180분		Vial Pressurization Time : 1분	
Vial Pressurization Equilibrating Time	: 0.1분		
Loading Time	: 1분		
Loading Pressurization Time	: 0.1분		
Injection Time	: 1분	Needle Flush Time	: 5분
GC			
Injection Mode	: Split		
Split Ratio	: 1:3		
Carrier Gas	: He		
Carrier Gas Control	: 선속도 방식 25.cm/초		
Column	: DB-WAXetr (60 m×0.25 mm I.D, 0.25um.)		
Column Temp.	: 40 °C (5min) - 3 °C/min – 240 °C (15min		

HS-20 Trap / GCMS-QP™2020 NX

HS-20 / Nexis™ GC-2030 / SCD-2030

■ **분석 결과 ① (무균 생쥐와 일반균 정착 생쥐 비교)**

Fig.1은 GCMS의 토탈 이온 크로마토그램(TIC), Fig.2는 GC-SCD의 크로마토그램을 나타냅니다.

휘발성 물질을 전체적으로 분석한 TIC (Fig.1)와 유황계 휘발성 물질을 분석한 크로마토그램(Fig.2) 모두 무균 생쥐 샘플보다 일반 균 정착 생쥐 샘플 쪽이 휘발성 물질의 검출 수 및 발생량(피크 면적 값)이 많다는 것을 확인하였습니다. 이는 장내 세균이 다수의 휘발성 물질 생성에 깊이 관여하고 있음을 시사합니다.

GCMS (전체 휘발성 물질 분석)

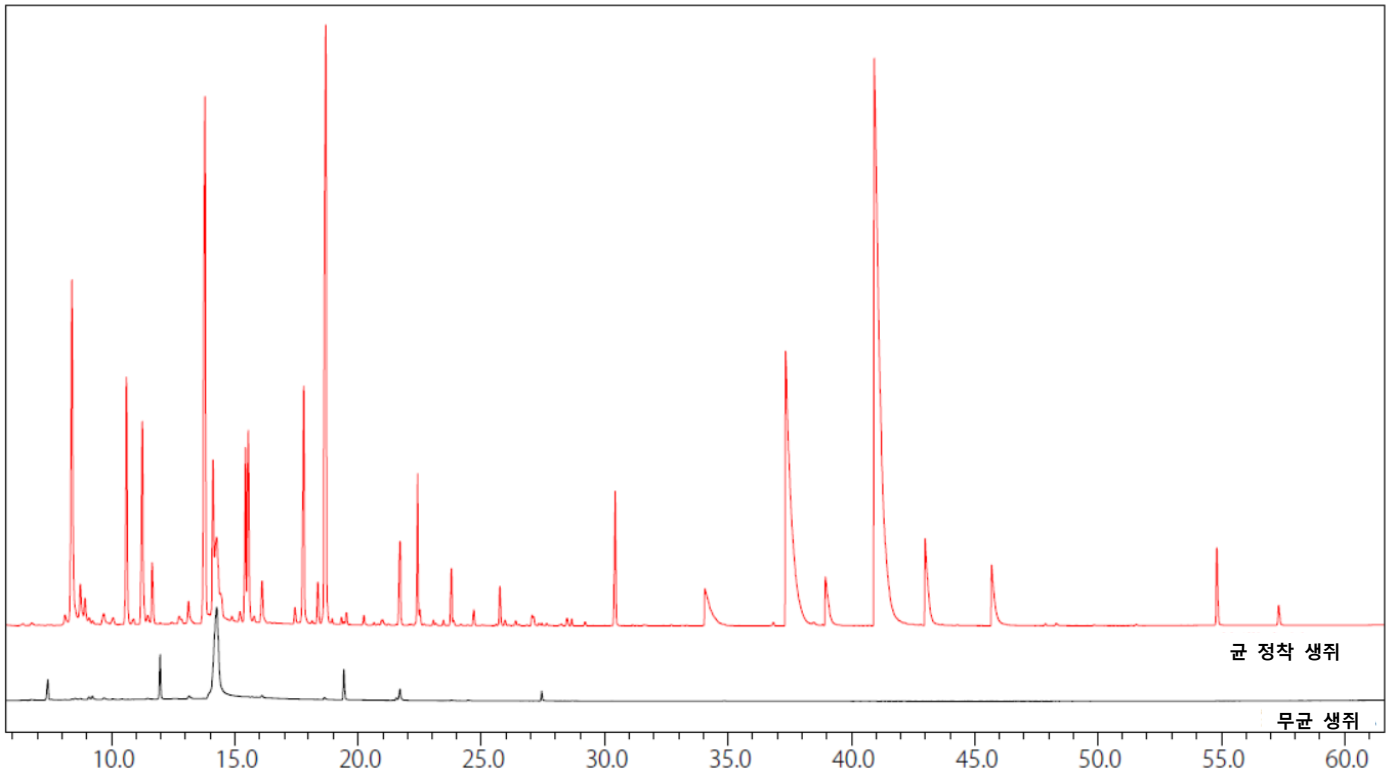

Fig.1 GCMS의 토탈 이온 크로마토그램

GC-SCD (유황계 휘발성 물질의 선택적 분석)

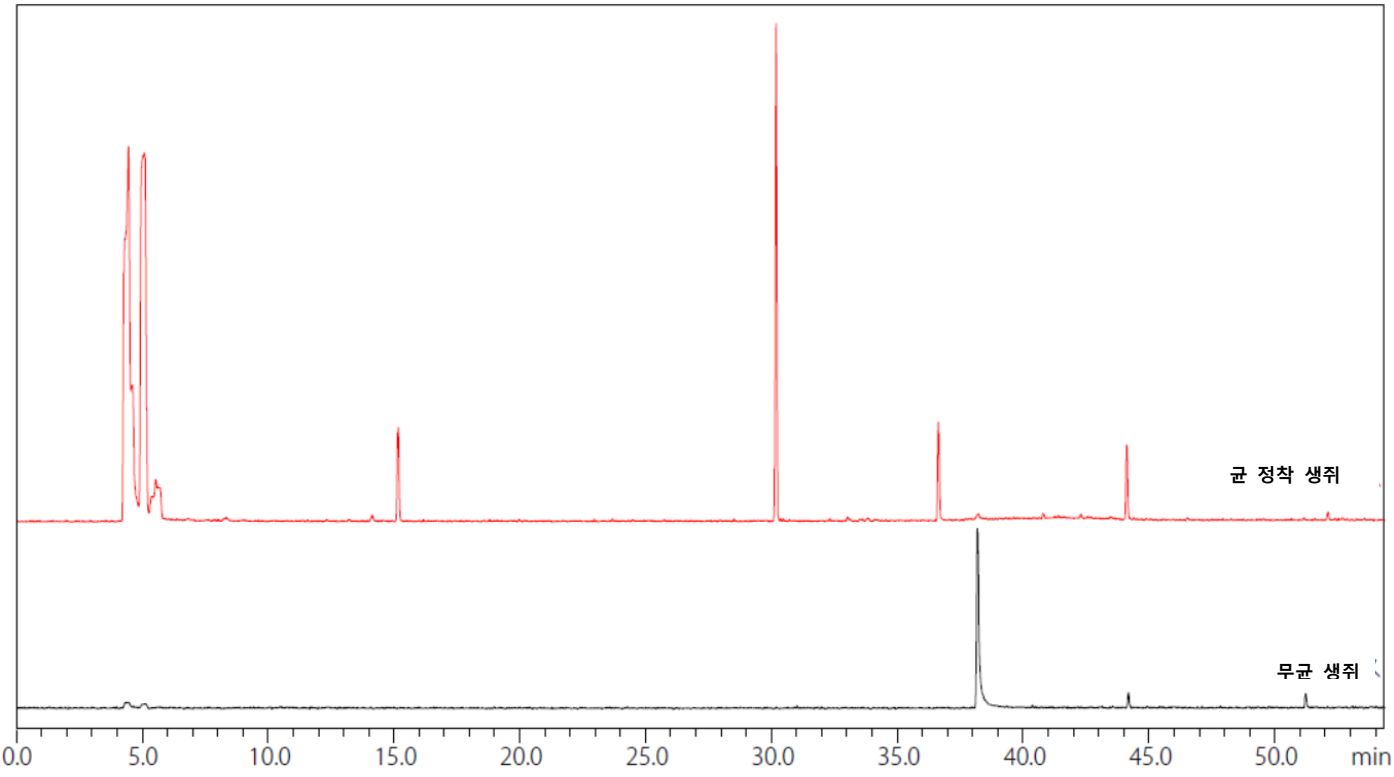

Fig.2 GC-SCD의 크로마토그램

SCD 및 GCMS의 크로마토그램 비교를 Fig.3에 나타냈습니다. 데이터 분석 결과 GC-SCD의 크로마토그램에서 GCMS의 TIC에서는 다른 화합물과 피크가 겹쳐 놓치고 있던 H2S를 검출-동정할 수 있었습니다. 또한, GC-SCD에서 GCMS에서는 피크 강도가 작아 간과하고 넘어갈 가능성이 높은 유황 화합물: Ethanol, 2-(methylthio) - 및 1-Propanol, 3-(methylthio) 역시 검출-동정할 수 있었습니다.
GC-SCD와 GCMS의 데이터를 조합함으로써 유황 화합물 동정이 더욱 쉬워 질 수 있었습니다.

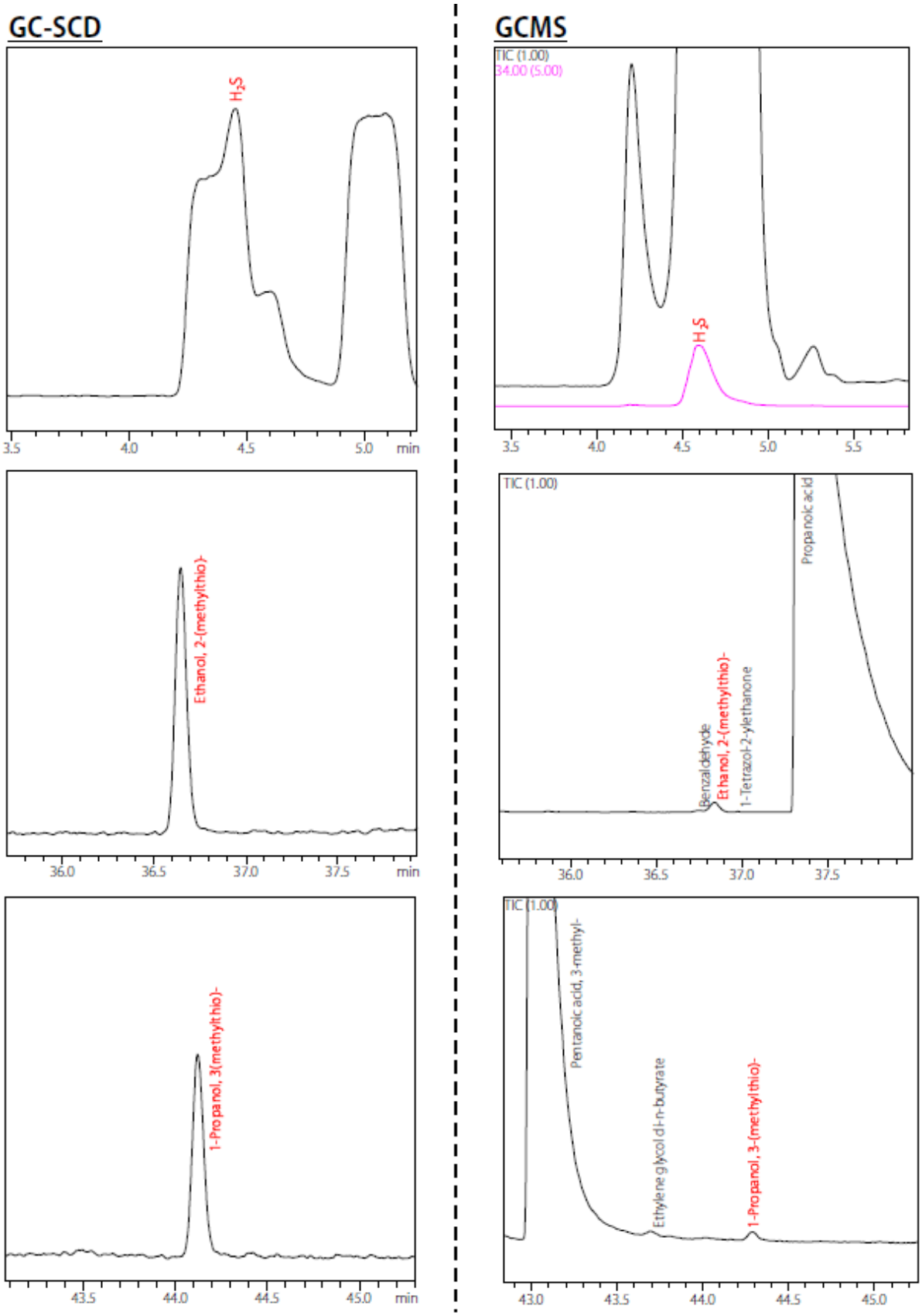

Fig.3 SCD 및 GCMS 크로마토그램(빨간색이 유황 화합물)

■ **분석결과 ② (통상 균 정착 생쥐의 개체 비교)**

균 정착 생쥐 6마리에서 각 2회씩 샘플을 회수하여 GCMS 분석으로 얻은 TIC를 Fig.4에 나타냈습니다.

또한, 그로부터 얻은 합계 121종류의 화합물 데이터를 이용하여 다변량 해석 소프트웨어: SIMCA®15 (Infocom)로 주성분 분석을 실시했습니다. 그 결과의 스코어 프로토콜을 Fig.5에 나타냈습니다. 스코어 프로토콜상에서 동일 개체 유래 샘플이 최소 클러스터를 형성하고, 개체 간에는 떨어지는 경향이 인정되었습니다. 이러한 결과로부터 본 해석은 장내 세균 유래 휘발성 물질의 개체차를 검출할 수 있음이 밝혀지고 질병 모델 생쥐 등을 이용하여 새로운 바이오마커의 탐색 등에 응용될 것으로 기대됩니다.

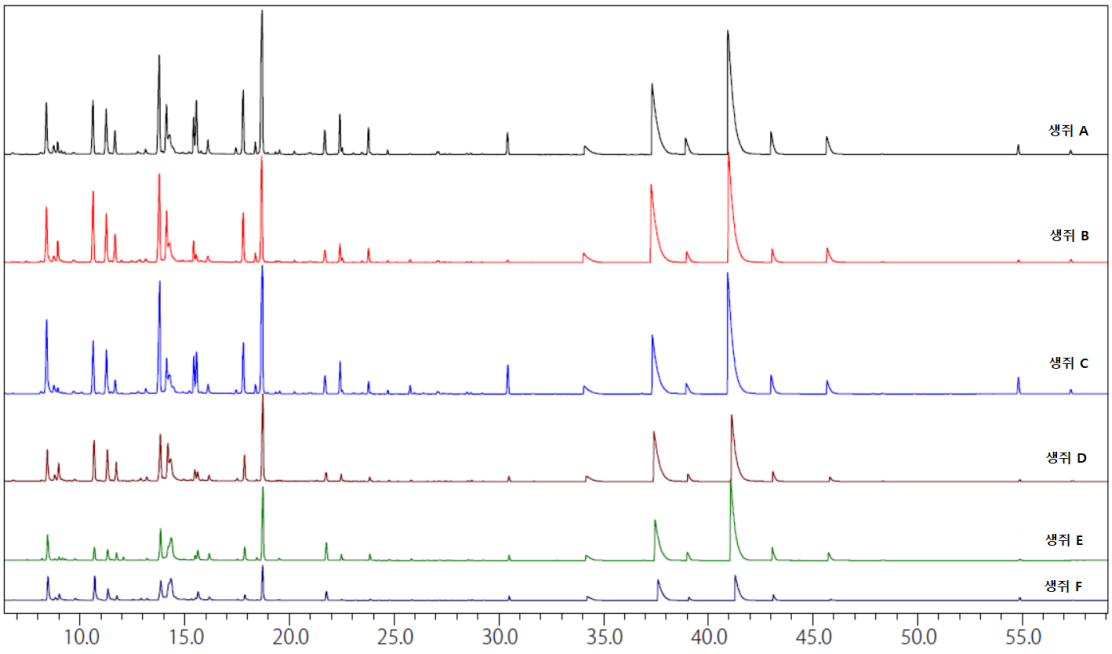

Fig.4 균 정착 생쥐 샘플의 토탈 이온 크로마토그램

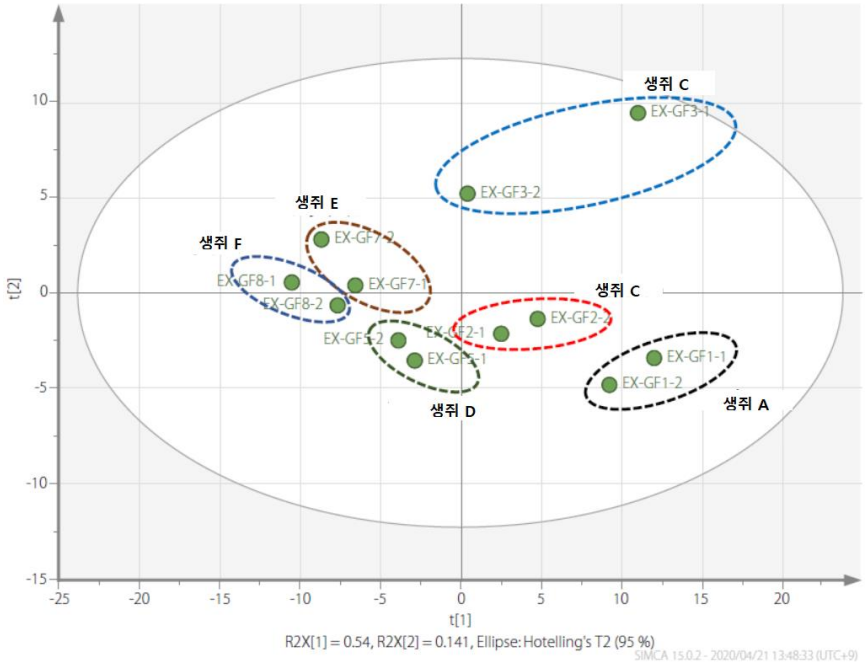

Fig.4 균 정착 생쥐 샘플의 토탈 이온 크로마토그램

■ 결론

GCMS와 GC-SCD를 사용하여 전처리 없이 장내 세균생성의 휘발성 가스를 분석할 수 있었습니다. GCMS에서는 화합물 전체 분석, GC-SCD에서는 GCMS에서는 검출이 어려운 황화합물 성분을 분석할 수 있었습니다. 또한 일반 균 정착 생쥐의 샘플에서 발생하는 휘발 성분에는 개체차가 있는 것을 확인할 수 있어 바이오마커 탐색의 가능성을 확인할 수 있었습니다.

본 사 TEL.02)540-5541 FAX.02)541-2163 대전사무소 TEL.042)864-1161 FAX.042)864-1164 부산사무소 TEL.051)301-5400 FAX.051)301-5405 광주사무소 TEL.062)263-1293 FAX.062)263-1295
서울사무소 TEL.02)540-5061 FAX.02)3442-6737 대구사무소 TEL.053)746-5541 FAX.053)746-5560 울산사무소 TEL.052)249-5541 FAX.052)249-2163 전주사무소 TEL.063)273-5540 FAX.063)273-5547
기술연구소 TEL.02)540-5960 FAX.02)540-5980 천안사무소 TEL.041)910-5670 FAX.041)910-5672 여수사무소 TEL.061)921-5542 FAX.061)921-5543 스 펙 크 롬 TEL.02)540-0078 FAX.02)540-1278