

Gas Chromatography에 의한 血清中 遊離糖의 測定

朴 相 潤

Determination of individual monosaccharides in blood serum by Gas Chromatography

Park Sang Yun

目 次

| | |
|---------|--------------|
| I. 緒 論 | 4. 測定法 |
| II. 實 驗 | 5. 實驗結果 및 考察 |
| 1. 試 藥 | III. 結 論 |
| 2. 機 器 | 參考文獻 |
| 3. 分析條件 | |

Abstract

By the gas chromatographic analyses of trimethylsilylated monosaccharides individual monosaccharides in blood serum of normal healthy men were determined.

As a result, individual monosaccharides of fructose, α -glucose, β -glucose, mannit and inosit were found in blood serum by using OV-1, OV-17, SE-30, QF-1 and XE-60.

I. 緒 論

糖類 測定法으로서는 在來에 還元力測定法 分別醱酵法 比旋光度法 等이 있었다. 이러한 測定法에 依해서 糖을 測定할 경우에 試料의 量이 너무나 적으면 測定하기가 대단히 곤란하므로 이

와 같은 測定法은 多量의 試料를 일시적으로 必要로 한다. 또 生體에서 얻어지는 糖은 극히 微量이므로 血清 속의 遊離糖을 微量 測定하려면 더욱 銳敏하고 또한 特異的인 새로운 測定法이 要求된다.

이 새로운 測定法으로서는 比色定量分析法¹⁾이 많이 利用되고 있다. 이 새로운 比色定量分析法를 利用하여 血清속의 遊離糖을 測定하려면 試料糖 이외에 반드시 溶媒 및 使用된 試藥에 對한 空試驗을 實施해야 되고 同時에 이미 알고 있는 濃度の 糖 溶液에 對해서도 同一條件으로 操作해야 하며, 多量의 糖 이외에 有機物이 試料에 混在할 경우에는 酸탄으로써 糖이 着色될 수가 있는지 疑問點을 갖는다. 또 發色劑를 包含하지 않는 酸탄을 加한 對照試驗도 實施하지 않으면 안된다. 이러한 여러가지 操作상의 많은 煩雜이 있으므로, 比色定量分析法은 血清속의 遊離糖 測定에는 잘 利用되지 않고 있다.

近年에는 生體中の 微量의 糖을 測定하는 方法으로서 Gas Chromatography法이 나왔고, 現在 이 方法이 많이 利用되고²⁾ 있다. 糖의 Gas Chromatography測定을 最初로 報告한 사람은 Bishop³⁾ (1958)이고, 이 때에는 15% Apiezon M의 column으로 完全 methyl化시킨 Arabinose, Galactose, Glucose, Mannose, Xylose를 分離하여 測定하였다. 이 測定法은 1960年 이후부터 利用되었고, Gas Chromatography를 利用하여 生體中の 微量의 糖을 分析하기 爲해서는 먼저 試料糖을 methyl, acetyl 또는 TMS(trimethylsilyl) 등으로 糖의 水酸基를 置換시켜야 할 必要가 있으며, 이 세가지 置換法中에서, TMS 誘導體로 糖의 水酸基를 置換시키는 것이 더욱 간편하다는 報告⁴⁾가 있다. 그러므로 著者は TMS 誘導體로서 糖의 水酸基를 置換시켜 가지고 Gas Chromatography 機器로 測定하는 方法에 依해서 健康한 男性의 血清 속에 包含된 微量의 糖을 測定하고 그 結果를 여기에 報告한다.

I. 實 驗

1. 試 藥

Benzene은 無水亞硝酸을 넣어서 脫水시킨 후에 여과시키고 증류해서 사용하였다. Pyridine은 수산화나트륨을 넣고 가열하여 還流시켜 가지고 증류해서 사용하였다. 과염소산은 0.3g/ml로 희석시켜서 사용하였다. 탄산칼륨, 클로로포름, Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Rhamnose hydrate, Mannit, Inosit 등등은 Tokyo Kasei Chemical Industrial Co Ltd 製品 G. R. Grade를 그냥 사용하였다.

TMS (trimethylsilyl ether 化劑)는 Shimadzu Seisakusho Ltd 製品을 그대로 使用하였다.

2. 機 器

Shimadzu Gas Chromatography GC-1 Type 機器를 利用하여 測定 記錄하였다.

3. 分析條件

Column ; OV-1 2% on chromosorb W 80-100 mesh
 OV-17 2% on chromosorb W 80-100 mesh
 SE-30 1.5% on chromosorb W 80-100 mesh
 XE-60 1.5% on chromosorb W 80-100 mesh
 QF-1 1.5% on chromosorb W 80-100 mesh
 0.3mmφ × 2m stainless steel 鋼管

Carrier gas ; Nitrogen(N_2)

Detector ; FID

Detector temp ; 270°C

Injection temp ; 250°C

Column temp ; 175°C ~ 320°C

上昇溫度 ; 2°C/min

溫度, 入口壓은 目的한 試料의 分離가 좋은 상태로 적당히 조절하였다.

4. 測定法

1) 血清 2ml를 取하고 過鹽素酸 (0.3g/ml) 1ml를 加하여 蛋白質을 침전시키고, 그 침전물을 여과해서 除去¹⁾시킨다. 이 濾液에 炭酸칼륨을 0.5~1gr 넣고 혼든 뒤에 다시 여과하여 침전물을 除去한다.

2) 이 濾液을 (純品の 糖은 이상과 같은 조작은 하지않음) Amberlite IRC 50 (carboxylic acid resin, H^+ 型) 3ml과 Amberlite IR-4B (phenol amine resin, OH^- 型) 3ml를 길이 60cm, 內徑 1.2cm의 Glass 管에 充填시킨 이온交換樹脂管에 다시 通過시키고, 여과하고 그 濾過液量의 約 10배 가량의 증유수로써 이온交換樹脂管을 잘 洗淨하고 congo red paper를 利用하여 濾液이 完全히 脫酸되었는가를 확인한다.²⁾

3) 다음에 全濾過液을 約 50°C로 加溫하여 물을 減壓留去시킨 뒤에 無水Benzene 少量을 加하고 흔들면서 蒸發乾固시켜 물을 完全히 除去하고, 남은 殘渣에 無水 Pyridine 1ml를 加하여 約 80°C로 加溫하고 完全히 溶解시킨 뒤에 冷却시킨다.

4) 이것에 Hexamethyldisilazane 0.2ml과 Trimethyl-chlorosilane 0.1ml 加하고 約 60~70°C로 加溫하여 5~10分間 反應시키면 Trimethylsilyl 化가 完結된다.

5) 이것을 질소 氣流中에서 溶劑를 留去시킨 뒤 클로로포름을 넣고 회석시켜 가지고 Gas Chromatography에 注入하여 測定한다.

5. 實驗結果 및 考察

1) 純粹한 各種 糖 混合物의 分離

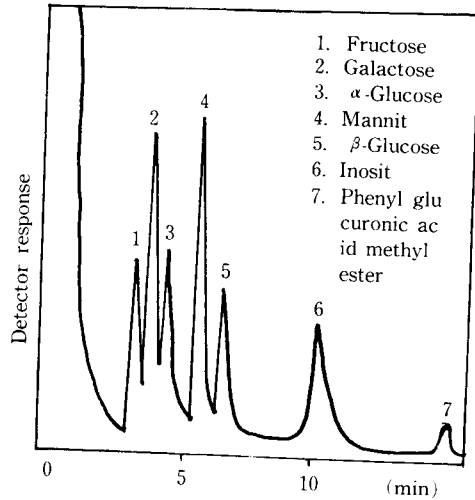


Fig. 1 Gas Chromatogram mixed pure monosaccharides.

1% SE-30; 180°C; N₂, 50ml/min.

純粹한 糖 混合物의 分離分析에 있어서 Arabinose와 Rhamnose는 保持時間이 서로가 매우 비슷하고 또 Peak의 중복이 나타났으므로 위 混合物 分離分析에서 除外시켰다. 따라서 주어진 同一條件下에서 各各 별도로 保持時間을 測定하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

內部標準物質인 Phenyl glucuronic acid methyl ester와 Peak 面積은 1.00으로 基準을 삼고 各種의 純粹한 糖의 Peak 面積과 比較하면 다음과 같다.

內部標準에 對한 Peak面積比

| | |
|-------------------------------------|------|
| Arabinose | 1.60 |
| Rhamnose | 1.55 |
| Fructose | 1.49 |
| Galactose | 1.84 |
| Glucose | 1.77 |
| Mannit | 1.90 |
| Inosit | 2.14 |
| Phenyl-glucuronic acid methyl ester | 1.00 |

(內部標準)

內部標準物質을 利用하여 定量分析을 할 때에는 機器에 注入시킬 試料의 量이 一定한 量이 아니더라도 좋았으며, 또 測定條件이 다소 變동되어도 條件의 變동이 內部標準物質과 試料의 Peak에는 똑 같은 影響을 주기 때문에 定量值에는 큰 誤差가 없었다.

各種 糖類의 Peak 面積을 縱軸으로 그리고 注入한 試料量을 橫軸으로 取하여 作成된 標準檢量線은 Fig. 2와 같다.

純粹한 Fructose, Galactose, Glucose, Mannit, Inosit 및 Phenyl-glucuronic acid methyl ester를 各各 4mg씩 混合시키고 前記 4의 測定操作法에 따라 分析하여 얻어진 糖 混合物의 分離는 Fig 1과 같다.

Phenyl-glucuronic acid methyl ester의 保持時間은 19.4分에서 Peak가 나타났으며, 그 이외의 糖들은 10分 이내의 保持時間으로 나타났다. 그리고 保持時間이 비슷한 곳에서는 Peak의 중복이 나타날 가능성이 많고, 또 保持時間이 비슷한 곳의 어떤 Peak 1個를 基準으로 정하고, 各 Peak와의 面積比를 計算하면 誤差가 있으므로, Fig. 1에서 나타난 결과에 따라 phenylglucuronic acid methyl ester를 內部標準物質으로 정하였다.

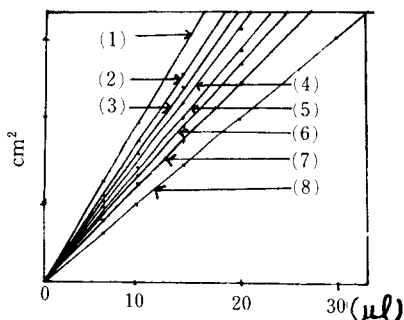


Fig. 2 Calibration curves 2% OV-17, 175°C, 60ml/min.

1. Inosit, 2. Mannit, 3. Galactose, 4. Glucose, 5. Arabinose, 6. Rhamnose, 7. Fructose, 8. Phenyl glucuronic acid methyl ester (Internal standard)

Column 충전제 중 Silicone系 液相인 無極性液相으로서 OV-17(methyl-silicone)과 SE-30(methyl-silicone) 그리고 有極性液相으로서 OV-17(methyl phenyl silicone), XE-60 (cyan oethyl-methyl-silicone) 및 QF-1(trifluoropropyl-methyl silicone)을 각각 Stainless steel 鋼管에 채워서 純粹한 糖인 Arabinose, Rhamnose, Fructose, Galactose, Glucose, Mannit, Inosit 및 Phenyl glucuronic acid methyl ester를 前記 4의 測定法에 依하여 전처리한 것을 Gas Chromatography에 注入시켜 分析하였다. 여기서 얻어진 결과는 Table 1과 같다.

2) Column 충전제와 保持時間(Retention time)

Column 충전제 중 Silicone系 液相인 無極性液相으로서 OV-17(methyl-silicone)과 SE-30(methyl-silicone) 그리고 有極性液相으로서 OV-17(methyl phenyl silicone), XE-60 (cyan

Table 1. Retention time (min)

| Compounds | Column | | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| | 2% OV-1 RT* | 2% OV-17 RT | 1.5% QF-1 RT | 1.5% SE-30 RT | 1.5% XE-60 RT |
| Arabinose | 1.45 | 1.18 | 1.30 | 1.30 | 1.03 |
| α -Rhamnose | 1.60 | 1.47 | 1.20 | 1.34 | 1.05 |
| β - " | 4.65 | 1.95 | 1.56 | 1.82 | 1.27 |
| Fructose | 3.46 | 3.30 | 2.17 | 2.75 | 1.80 |
| α -Galactose | 4.10 | 4.45 | 2.70 | 3.17 | 2.26 |
| β - " | 4.90 | 5.55 | 3.27 | 3.82 | 2.70 |
| α -Glucose | 4.60 | 5.40 | 2.82 | 3.64 | 2.70 |
| β - " | 6.80 | 8.68 | 4.38 | 5.20 | 3.75 |
| Mannit | 5.68 | 5.10 | 3.45 | 4.45 | 2.60 |
| Inosit | 10.60 | 11.00 | 7.40 | 8.00 | 4.84 |
| Phenyl glucuronic acid methyl ester | 23.00 | 46.20 | 59.90 | 19.40 | — |
| Column temp | 170°C | 144°C | 130°C | 170°C | 170°C |
| Flow rate(ml/min) | 70 | 80 | 70 | 80 | 80 |
| Carrier gas | Nitrogen | | | | |

RT* Retention time

Table 1에 의하면 無極性液相에서는 試料成分의 비등점 순으로 試料가 溶出하였지만 有極性液相에서는 試料成分의 비등점 순으로 試料가 잘 溶出되지 아니 하였다. 그리고 SE-30과 QF-1의 依液相 충전제를 利用하면 低溫에서 單糖類 및 二糖類의 分離가 잘 된다는 보고⁶⁾가 있었고 또 본실험에서도 그 것이 확인되었다. 또 본 실험에서 사용된 그밖의 Column 충전제도 糖의 定量分析에 利用될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

3) 男性의 血清中 遊離糖의 分析

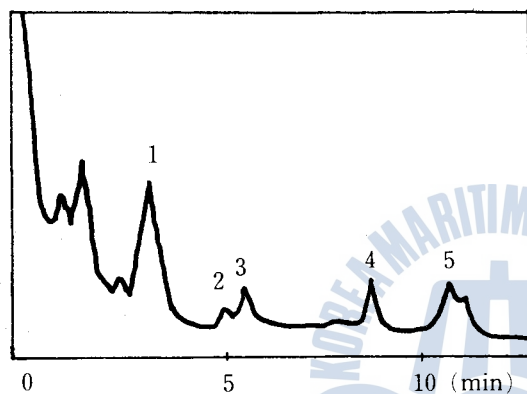


Fig. 3 Gas Chromatogram of individual monosaccharides in blood serum of a healthy man.

2% OV-17, 144°C, N₂, 55ml/min.

1. Fructose, 2. Mannit, 3. α -Glucose,
4. β -Glucose, 5. Inosit

건강한 男性의 血液을 5cc 採血하여 遠心分離管에 넣고 회전속도 3,000 r. p. m으로 10分 동안 作動시킨 뒤 靜止하여 沈殿物인 血장을 除去시키고 남은 血清 2ml를 取하여 前記 4의 測定操作法에 따라 전처리하여 얻어진 試料를 Gas Chromatography에 注入시켜서 측정된 결과는 Fig 3과 같다. 전처리 조작과정에서 TMS 化 反應이 완전히 형성되었는가 아닌가를 확인하기 위하여서는 赤外線 Spectrum을 利用하였다. 糖의 OH⁻基가 TMS 誘導體와 완전히 置换되지 아니하고 OH⁻基가 殘存하면 赤外線 吸收帶中 3,500cm⁻¹ 부근에 吸收曲線이 나타났으며, 또 완전히 TMS化가 이루어졌을 때에는 吸收曲線이 消失되고 없음을 확인하였다. Fig. 3에 의하면 男性의 血清中 糖의 定性으로서는

Fructose, Mannit, α -Glucose, β -Glucose 및 Inosit만이 包含되어져 있음을 구명하였다. 또 定量值로서는 血液 100cc中의 糖量을 표시하면 다음과 같다.

血液 100cc中 糖量

| | 최고값(mg) | 최저값(mg) |
|---------------------------------|---------|-----------|
| Fructose. | 132.0 | 90.0 |
| Mannit | 13.0 | 9.0 |
| α -Glucose } (D-Glucose) | 38.0 | 27 } (71) |
| β -Glucose } | 61.0 | |
| Inosit | 192.0 | 135.0 |

血清中 糖量은 採血時間에 따라 各各 다른 값을 나타내었다. D-Glucose는 100~70mg 범위내로 나타났으며 Mannit는 少量이었으나 Fructose와 Inosit는 D-Glucose 보다 많이 나타났다.

Ⅲ. 結 論

健康한 男性 血清中の 糖의 OH-基를 TMS化하고, 여러가지 Column 충전제를 使用해서 Gas Chromatography로 測定한 結果 다음 結論을 얻었다.

1. Column 충전제인 OV-1, OV-17, QF-1, SE-30 및 XE-60 모두가 糖分析時에 精量적으로 사용할 수가 있다.
2. 血清中 遊離糖으로써 Fructose, Mannit, α -Glucose, β -Glucose, 및 Inosit가 나타났다.
3. 血清中 遊離糖은 採血할 때마다 定量値가 各各 다르게 나타났다.

References

- 1) Weils, W. W., Biomedical Applications of Gas Chromatography, P. 169, Plenum Press(1964)
- 2) Bishop, C. T., Methods of Biochemical Analysis, Vol. 10, P. 1, Interscience Publ. (1961)
- 3) N, Nelson, J. Biol. Chem., 153, 375 (1944)
- 4) Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M. & Wells, W. W., J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963)
- 5) Neuberger, C., Arch. Biochem. 4, 104 (1944)
- 6) W. J. A. VandenHeuvel, E. C. Horning., Biochem. Biophys. Res. Comm., 4, 399 (1961)

