

HPLC 에 의한 밀전분 지방질의 정량분석

신 명 곤

(식량시스템연구실)

I. 서 론

곡물속에 함유되어 있는 지방질은 비전분 지방질 (nonstarch lipid)과 전분 지방질 (starch lipid)로 구분할 수 있는데, 비전분 지방질은 일반 추출용매로 상온에서 추출이 가능하나, 전분 지방질은 아밀로스 혹은 아밀로펙틴과 단단한 결합을 이루고 있어, 고온에서 포화부탄올(water saturated n-butanol) 같은 특수 용매로만 추출이 가능하다¹⁻⁸⁾.

밀전분의 경우 전분 지방질 함량은 약 1% 정도이며, 2~6% 중성지방질, 11~16% 당지방질, 그리고 81~83% 인지지방질로 구성되어 있다^{6,7)}. 특히 lysophosphatidyl choline(LPC) 및 lysophosphatidyl ethanolamine(LPE)은 총 전분 지방질 함량의 60~70% 및 8~10%를 각각 나타내고 있다⁶⁾. 이와 같이 전분 지방질은 전분속에서 아밀로스 혹은 아밀로펙틴과 특수한 결합을 하고 있을 뿐만 아니라⁹⁾ 대부분이 lysophosphatidyl choline 으로 구성되어 있어, 전분 지방질은 전분가공시 중요한 역할 수행 및 천연 유효제로써 이용 가능성을 보여 주고 있다.

전분 지방질의 분리 및 정량분석은 현재까지 silicic acid column chromatography 및 thin layer chromatography 등의 방법에 의해 이루어졌으나^{1,6,7,10)}, 신속성 및 정확성에서 많은 제약을 받고 있다. 그리고 high performance liquid chromatography(HPLC) 방법은 지방질의 chromophore 결핍과 sensitive detector 가 없어 전분 지

방질의 정량분석에 활발히 활용되고 있지 않는 실정이다.

본 연구에서는 밀전분 지방질로부터 표준 lysophosphatidyl choline(LPC) 및 lysophosphatidyl ethanolamine(LPE)을 분리하여 표준곡선을 만든 후, HPLC-UV 방법에 의해 밀전분 지방질에 함유된 LPC 및 LPE의 정량분석을 각각 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 밀전분의 제조

Hard red winter(HRW) 밀인 Victory 와 Mustang, Durum 밀인 Vic, 그리고 Soft red winter(SRW) 밀인 Caldwell, Cardinal 및 Titan 등 6가지 품종을 시료로 사용하였다. Buhler laboratory mill을 이용하여 72%로 밀을 제분한 후, Wolf의

표 1. Composition of wheat starches from six cultivar

Sample	Wheat class	Moisture content (%)	Protein (%)	Ash (%)
Victory	HRW	10.8	0.3	0.19
Mustang	HRW	7.6	0.4	0.15
Vic	Durum	9.6	0.3	0.12
Caldwell	SRW	8.8	0.4	0.11
Cardinal	SRW	9.2	0.4	0.06
Titan	SRW	9.0	0.5	0.13

방법에 의해 밀가루로부터 전분을 조제하였으며¹¹⁾, 상법에 의해 분석한 각 밀전분의 일반성분은 표 1과 같다.

2. 전분 지방질의 추출

밀전분 40g에 n-propanol-water(3:1, v/v) 용액 640ml를 첨가한 후, 20°C에서 4시간 동안 교반하여 surface 전분 지방질을 제거하였으며, surface 전분 지방질이 제거된 밀전분 시료에 n-propanol-water(3:1, v/v, 16ml/g starch) 용액을 다시 첨가한 후 100°C의 중탕에서 12시간 동안 교반한 다음 실온에서 감압여과로 추출액을 회수하였으며, 추출액은 감압농축하에서 용매를 휘발시켜 조건전분 지방질을 얻었다.

조건전분 지방질은 Siakotos 등의 방법¹²⁾에 의해 Sephadex G-25 column을 사용하여 정제하였으며, 정제된 지방질 성분은 Rouser 등의 방법¹³⁾에 따라 Silicic acid(15g)로 충전한 판크로마토그래피(250×10mm)에 의해 중성지방질, 당지방질 및 인지지방질로 각각 분획하였다.

3. 전분 지방질의 HPLC 분석

전분 지방질의 정성 및 정량분석은 HPLC에 의해 이루어졌으며, 그 조작조건은 다음과 같다. HPLC 시스템은 Hewlett Packard Model HP 1090 liquid chromatograph, loop injector(50 μ l), UV detector(210nm), silicic acid column(10 μ m, 200×4.6mm, Hewlett Packard) 및 Bio-Sil, HP-10 guard column(40×4.6mm, Bio-Rad) 등을 사용하였다. column에 의한 전분 지방질의 분리를 위해 n-hexane/2-propanol/water 용출액을 이용하였는데, 처음 5분 동안은 41:54:5의 조성비, 5분부터 20분까지 41:54:5에서 39:52:9의 linear gradient, 20분부터 80분까지 39:52:9의 용출액 조성비를 각각 사용하였다.

4. 표준 LPE 및 LPC의 제조

밀전분 지방질에 함유된 LPE 및 LPC를 정량하

기 위해 HRW 밀전분 지방질로부터 표준 LPE 및 LPC를 분리 및 제조하였다. 130°C에서 2시간 동안 활성화한 silicic acid 30g을 충전한 판크로마토그래피에 의해 chloroform(500ml), acetone(500ml), methanol-chloroform(1:1, v/v, 100ml), methanol-chloroform(2:1, v/v, 250ml), methanol-chloroform(3:1, v/v, 250ml), 그리고 methanol(250ml)을 연속적으로 용출시킨 후, 각 분획을 감압 건조하여 TLC 및 HPLC에 의해 각 분획의 지방질 성분을 동정하였다.

Silica gel G(E. Merck, Germany, 두께: 0.25 mm)로 피막된 glass TLC plate를 130°C에서 2시간 동안 활성화 시킨 후 사용하였고, 전개용매로는 chloroform-methanol-acetic acid-water(25:15:4:2, v/v) 혼합용매를 사용하였다. 50% 황산용액을 분무하여 TLC에 의해 분리된 각 반점을 표준품의 Rf 값과 비교 확인하였고, LPE를 선별적으로 동정하기 위해 ninhydrin 용액을 분무하여 반점의 색깔을 관찰하였다^{14,15)}.

5. 지방산의 조성

각 지방질 분획을 14% BF₃-methanol을 사용하여 지방산 methyl ester로 만든 다음¹⁶⁾, GLC(Perkin-Elmer, Model Sigma 1)로써 분석하였으며, 분석조건은 칼럼: 9% silar 10C glass column(3×1,800mm), carrier gas: 질소(20ml/min), 칼럼온도: 190°C, 그리고 검출기 온도: 250°C 이었다.

III. 결과 및 고찰

1. 밀전분 지방질의 조성

6가지 밀 품종에 대한 internal 전분 지방질의 함량 및 각 분획의 조성은 표 2와 같다. 정제 전분 지방질의 함량은 0.9~1.03%의 범위를 보였으며, 각 품종의 지방질 조성은 중성지방질 1.3~6.0%, 당지방질 11.0~16.3%, 그리고 인지지방질 80.6~83.5%의 범위로, Hargin 등의 연구결과와 비슷한 경향을

표 2. Content of starch lipid in internal wheat starches and their principal lipid fractions

Wheat starch sample	Crude starch ^(a) lipid content (%)	Pure starch ^(a) lipid content (%)	Fraction of lipid (%) ^(b)		
			Non-polar lipid	Glycolipid	Phospholipid
Victory	1.07	0.90	3.2	13.9	82.9
Mustang	1.04	0.94	5.5	11.0	83.5
Vic	1.17	1.02	6.0	13.4	80.6
Caldwell	1.06	0.94	2.0	16.3	81.7
Cardinal	1.04	0.92	1.3	16.3	82.4
Titan	1.18	1.03	3.0	15.8	81.2

(a) Crude starch lipid content was weight after solvent removed, whereas pure starch lipid content was calculated from the lipid recovered when the crude lipid was purified through a Sephadex G-25.

(b) Average of two determinations.

보여 주었다¹⁾.

한편 상온에서 추출한 surface 전분 지방질 함량은 0.08~0.15%의 범위를 나타내었으며, victory 밀전분의 surface 전분 지방질의 경우 36% 중성지방질, 31% 당지방질 및 33% 인지지방질로 각각 구성되어 있어 internal 전분 지방질의 조성과는 많은 차이를 보여 주었다.

2. HPLC 에 의한 밀전분 지방질의 분리

밀전분 지방질의 HPLC 크로마토그램은 그림 1과 같다. 표준지방질의 머무름 시간과 비교한 결과 중성지방질 및 당지방질은 10분 이내에, 인지지방질은 20~60분 사이에 용출되었으며, 밀전분 지방질의 주성분인 LPE 및 LPC는 각각 다른 지방질과 쉽게 분리할 수 있었다.

203nm 에서 인지지방질의 흡광계수는 각 성분의 불포화도에 따라 달라지기 때문에¹⁷⁾ 밀전분 지방질의 LPE 및 LPC를 정량하기 위해서 밀전분 지방질로부터 LPE 및 LPC의 분리를 시도하였다.

Methanol-chloroform(2:1, v/v) 분획에서 얻어진 지방질을 TLC로 확인한 결과 구입한 표준 LPE와 같은 Rf 값(0.41)을 보여 주었고, ninhydrin 발색에 의해서도 선택적으로 붉은색 반응을 나타내었다. 그리고 HPLC에 의한 실험결과도 표준 LPE

와 동일한 머무름 시간을 보여주어 methanol-chloroform(2:1, v/v) 분획으로부터 밀전분 지방질 LPE를 분리할 수 있었다. 특히 이 분획의 HPLC 결과, 한 봉우리만 보여 주어 순수한 LPE가 분리되었음을 알 수 있었다.

한편 methanol 분획에서 얻어진 지방질을 TLC 및 HPLC로 동정한 결과 표준 LPC와 동일한 Rf 값(0.08) 및 머무름 시간, 그리고 한 봉우리만 보여 주어 methanol 분획으로부터 순수한 밀전분 지방질 LPC를 분리할 수 있었다(그림 2).

3. HPLC 에 의한 LPE 및 LPC 정량

HRW 밀전분 지방질로부터 순수 분리한 LPE 및 LPC로부터 HPLC-UV 표준곡선을 만들었으며, 150 μ g 까지 linear 한 상관을 보여 주었다.

HRW 밀전분 지방질에서 분리한 LPE 및 LPC의 표준곡선을 다른 밀 품종에 적용하기 위해 각 시료의 LPE 및 LPC에 대해 지방산 조성을 각각 비교하였다. 표 3에서 보는 바와 같이, 각 품종의 LPE 및 LPC에 있어서 리놀레산 및 팔미트산이 각각 주요 성분으로서, LPE가 LPC보다 리놀레산 함량이 다소 높았으나 밀 품종간에는 지방산 조성 차이가 미미하였다.

한편 HPLC에 의한 각 LPE 및 LPC의 peak responses는 각각 5.5 \pm 0.3 및 19.5 \pm 0.5 로써 품종간

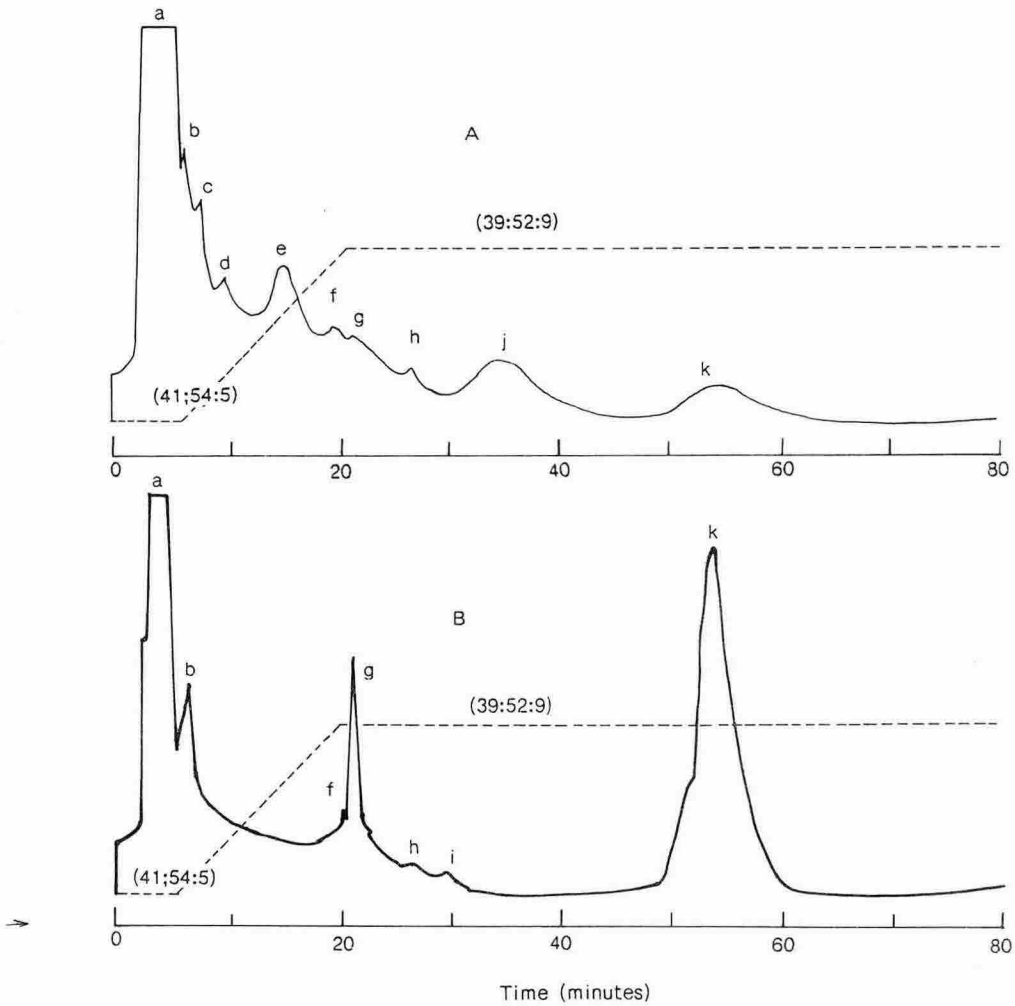


그림 1. HPLC-UV chromatogram of HRW wheat surface starch lipid(A) and internal starch lipid(B). Chromatogram(—) and eluting gradient(· · · · ·) of n-hexane/2-propanol/water(v/v).

a: solvent peak, non-polar and glycolipid, b: digalactosyl diglyceride(DGDG), c and d: unidentified components, e: phosphatidyl ethanolamine(PE), f: lysophosphatidyl glycerol(LPG), g: lysophosphatidyl ethanolamine(LPE), h: lysophosphatidyl inositol(LPI), i: lysophosphatidyl serine(LPS), j: phosphatidyl choline(PC), k: lysophosphatidyl choline(LPC).

큰 차이를 보여 주지 않았다(표 4).

표 3 및 표 4의 결과로부터 HRW 밀전분 지방질로부터 확립한 LPE 및 LPC 표준곡선은 밀전분 지방질에 함유되어 있는 LPE 및 LPC 정량분석에 이용이 가능함을 보여 주었다. HPLC-UV 방법의

해 정량한 각 시료의 LPE 함량 범위는 $7.5 \pm 0.1 \sim 9.6 \pm 0.2\%$, LPC의 경우 $61.3 \pm 1.2 \sim 68.1 \pm 1.5\%$ 를 각각 보여 주었다(표 5). 결론적으로 앞에서 확립한 HPLC-UV 방법은 밀전분 지방질의 LPE 및 LPC 함량을 신속하고 정확하게 분리 정량할 수 있었다.

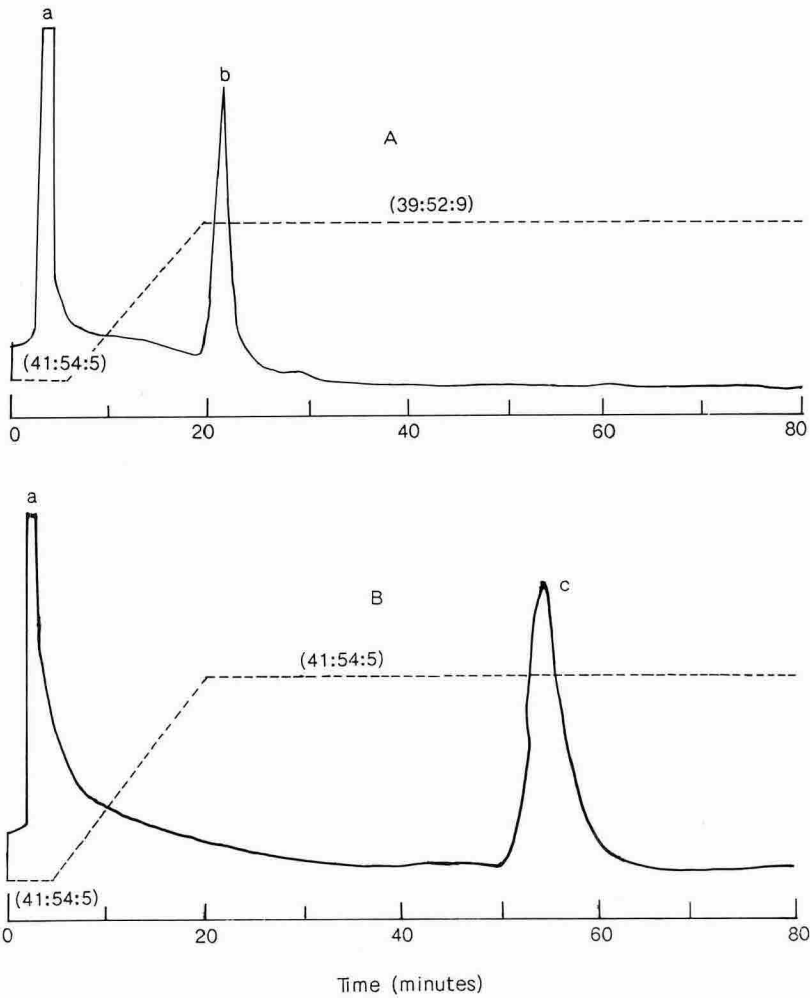


그림 2. HPLC-UV chromatogram of lysophosphatidyl ethanolamine(A) and lysophosphatidyl choline(B) isolated by preparative silicic acid column chromatography of HRW wheat starch lipids, respectively(see Experimental).

a: solvent peak, b: lysophosphatidyl ethanolamine(LPE), C: lysophosphatidyl choline(LPC), eluting gradient(.....).

IV. 요약

6가지 밀품종에 대한 전분 지방질의 함량은 0.9~1.03%의 범위를 보였으며, 지방질 조성은 중성 지방질 1.3~6.0%, 당지방질 11.0~16.3%, 그리

고 인지지방질 80.6~83.5%의 범위를 각각 나타내었다. HPLC-UV 방법을 이용하여 밀전분 지방질의 주성분인 LPE 및 LPC를 정량하기 위해 HRW 밀전분 지방질로부터 순수한 LPE 및 LPC를 분리하여 LPE 및 LPC의 표준곡선을 작성하였다.

표 3. Fatty acid composition of LPE and LPC^(a) in the six wheat starch lipids

Samples	Fatty acid (%) ^(b)				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
LPE					
Victory	28.1	0.2	4.2	61.5	6.0
Mustang	29.7	0.4	3.6	60.8	5.5
Vic	23.9	0.7	5.9	64.9	4.6
Caldwell	24.4	0.4	3.6	65.0	6.6
Cardinal	26.2	0.8	7.2	60.4	5.4
Titan	27.3	0.9	5.0	60.8	6.0
LPC					
Victory	31.9	1.2	7.7	54.7	4.5
Mustang	34.3	0.8	7.4	53.6	3.9
Vic	30.6	1.7	7.3	56.9	3.5
Caldwell	30.3	0.8	4.8	58.4	5.7
Cardinal	31.7	1.5	6.3	55.3	5.2
Titan	33.7	1.4	7.0	53.1	4.8

(a) LPE and LPC were obtained by a preparative silicic acid open column chromatography(see Experimental).

(b) Average of two determinations.

표 4. HPLC peak responses^(a) for LPE and LPC isolated from six wheat starch lipids

Samples	Peak response (arbitrary unit $\times 10^6$)	
	LPE	LPC
Victory	5.4	19.3
Mustang	5.1	19.0
Vic	5.8	20.2
Caldwell	5.7	19.9
Cardinal	5.5	19.2
Titan	5.2	19.1
Mean + S.D.	5.5 \pm 0.3	19.5 \pm 0.5

(a) Average of two determinations. Each injection(50 μ l) contained 25 μ g of LPE or 100 μ g of LPC.

품종별 LPE 및 LPC에 대한 지방산 조성 및 HPLC peak responses는 시료간 큰 차이를 보여

표 5. Levels^(a) of LPE and LPC in wheat starch lipids determined by HPLC-UV

Samples	Content (%)	
	LPE	LPC
Victory	8.6 \pm 0.1	61.3 \pm 1.2
Mustang	9.1 \pm 0.2	62.2 \pm 0.9
Vic	7.5 \pm 0.1	64.4 \pm 1.3
Caldwell	9.8 \pm 0.2	66.7 \pm 1.6
Cardinal	8.9 \pm 0.3	68.1 \pm 1.5
Titan	9.4 \pm 0.1	67.9 \pm 1.0

(a) Mean \pm S.D. based on three determinations.

주지 않아, HRW 밀전분 지방질로부터 만든 LPE 및 LPC의 HPLC-UV 표준곡선은 밀전분 지방질에 함유되어 있는 LPE 및 LPC의 함량을 신속하고 정확하게 정량하는데 이용할 수 있음을 보여 주었다.

V. 참고 문헌

- Hargin, K.D., and Morrison, W.R.: The Distribution of Acyl Lipids in the Germ, Aleurone, Starch and Non-starch Endosperm of Four Wheat Varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 877(1980)
- Soulaka, A.B., and Morrison, W.R.: The Amylose and Lipid Contents, Dimension and Gelatinization Characteristics of Some Wheat Starches and Their A- and B- Granule Fractions. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 709(1985)
- Morrison, W.R., and Coventry, A.M.: Extraction of Lipids From Cereal Starches with Hot Aqueous Alcohols. *Stärke*, **37**, 83(1985)
- Acker, L., and Becker, G.: New Research on the Lipids of Cereal Starches. II. The Lipids of Various Types of Starch and Their Binding

to Amylose. *Staerke*, **23**, 419(1971)

5. Kugimiya, M., and Donovan, J.W.: Calorimetric Determination of the Amylose Content of Starches Based on Formation and Melting of the Amylose-Lysolecithin Complex. *J. Food Sci.*, **46**, 765(1981)

6. Morrison, W.R., Mann, D.L., Wong, S., and Coventry, A.M.: Selective Extraction and Quantitative Analysis of Nonstarch and Starch Lipids from Wheat Flour. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 507(1975)

7. Morrison, W.R., Tan, S.L., and Hargin, K. D.: Methods for the Quantitative Analysis of Lipids in Cereal Grains and Similar Tissues. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 329(1980)

8. Morrison, W.R.: Starch Lipids: a Reappraisal. *Staerke*, **33**, 408(1981)

9. Kugimiya, M., Donovan, J.W., and Wong, R.Y.: Phase Transitions in Amylose-lipid Complexes in Starches; a Calorimetric Study. *Staerke*, **32**, 265(1980)

10. Wren, J.J., and Merryfield, D.S.: Firmly-bound Lysolecithin of Wheat Starch. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 254(1970)

11. Wolf, M.J.: Wheat Starch. Methods in Carbohydrate Chemistry(Whistler, R.L. Ed), Vol. IV Starch, Academic Press, New York, 1964, pp.6-9

12. Siakotos, A.N. and Rouser, G.: Analytical Separation of Nonlipid Water Soluble Substances and Gangliosides other Lipids by Dextran Gel Column Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 913(1965)

13. Rouser, G., Kritchersky, G., and Yamamoto, A.: Silicic acid Column Chromatography. *Lipid Chromatographic Analysis*(Marinetti, G.V., Ed), Vol. 3, 2nd ed, Marcel Dekker, Inc., New York, 1976, pp.703-734.

14. Citterm, J.C., and Lester, R.L.: A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-layer Chromatograms. *J. Lipid Res.*, **5**, 126(1964)

15. Lepage, M.: The Separation and Identification of Plant Phospholipids and Glycolipids by Two-dimensional Thin-layer Chromatography. *J. Chromatog.*, **13**, 99(1964)

16. Official and Tentative Methods of AOCS, Vol. 1, 3rd ed., Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Ill. (1964). Ce 2-66, Preparation of Methyl Esters of Long-chain Fatty Acids

17. Geurts Van Kessel, W.S.M., Hax, W.M. A., Demel, R.A., and DeGier, J.: High Performance Liquid Chromatographic Separation and Direct Ultraviolet Detection of Phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta*, **486**, 524(1977)