

## High performance liquid chromatography에 의한 fructo 및 inulo올리고당의 정량

강수일\* · 한종인 · 김경연 · 오선진 · 김수일

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및  
농업생물신소재연구소, \*농업개발연구소

**초록 :** HPLC를 이용하여 fructose oligomer인 fructo올리고당(GF2-GF7) 및 inulo올리고당(F2-F4)의 분리, 정량을 실시하였다. TSK-gel amide 80 column과 acetonitrile-water(65 : 35; v/v) 용매를 사용하여 각 표준당들을 효과적으로 분리할 수 있었으며 이들의 retention time은 분석시마다 거의 변하지않아 재현성이 있었다. 각 당의 농도에 따른 peak면적을 이용하여 표준곡선을 작성한 결과 넓은 당량의 범위에 걸쳐 결정계수가 0.9884이상의 값을 보여 본 HPLC방법에 의한 정량법이 타당한 것으로 나타났다. 또한 기울기는 비슷하나 y축 절편 값이 당마다 크게 상이하여 몇가지 표준당들을 기준으로 하여 모든 당을 일률적으로 정량하는 것은 적합하지 않으며 각 당에 대한 표준곡선을 하나씩 작성하여 정량하여야함을 알 수 있었다(1993년 7월 2일 접수, 1993년 7월 28일 수리).

### 서 론

Fructose oligomer인 fructo올리고당(GFn) 및 inulo올리고당(Fn)은 descending paper chromatography,<sup>1-3)</sup> thin layer chromatography(TLC),<sup>4-8)</sup> adsorption chromatography,<sup>9)</sup> carbon-celite column chromatography,<sup>10)</sup> gel filtration chromatography,<sup>8,11-14)</sup> gas liquid chromatography<sup>15)</sup> 및 high performance liquid chromatography (HPLC) 등을 이용하여 분리, 정성 또는 정량되어져 왔으며, 이 중 HPLC가 당의 분리 및 정량에 빠르고 편리하며 정확한 방법으로 알려지고 있다. HPLC에 의한 fructose oligomer의 분리는 cation exchange column,<sup>8,16-18)</sup> Spherisorb-5-NH<sub>2</sub> column,<sup>19)</sup> anion exchange column,<sup>20,21)</sup> 또는 역상 column<sup>22)</sup>을 이용하여 행하여져 왔으나 이들을 정량한 것에 대해서는 발표된 논문이 별로 없다. Frehner 등,<sup>19)</sup> Cairns 등,<sup>8)</sup> Proud'homme 등,<sup>17)</sup> Bancal 등<sup>23)</sup>은 각각 다른 HPLC 조건에서 이들을 정량하였다고 발표하고 있으나 각 당의 peak 면적 및 양에 대한 표준곡선에 대해서는 언급이 없다. 이에 본 연구에서는 먼저 Bio-gel P2 column chromatography와 HPLC를 통해 fructose oligomer인 fructo올리고당(GF2-GF7) 및

inulo올리고당(F2-F4)을 순수하게 분리, 표준당을 제조하고 이를 사용하여 HPLC에 의한 fructo올리고당 및 inulo올리고당을 각각 신속하고 정확하게 분리, 정량하는 방법을 고안하였다.

### 재료 및 방법

#### Fructo올리고당 및 inulo올리고당의 제조

Fructo올리고당 시료는 돼지감자 괴경에 물을 1 : 1 (w/v)비율로 가해 마쇄, 65°C에서 30분간 추출하여 얻었으며, inulo올리고당 시료는 *Streptomyces* sp.S56에서 생산되는 endoinulase<sup>24)</sup> 10 units(5 units/ml)를 5.6% inulin(0.1M sodium acetate buffer, pH 5.5)용액 18 ml에 첨가, 40°C에서 5시간 반응시켜 얻었다. 이들 시료는 Bio-gel P2 column chromatography와 HPLC를 실시하여 각 당을 순수하게 분리, 정제하였다. Bio-gel P2 chromatography는 강 등<sup>25)</sup>의 방법에 따라 행하였다. 즉, 65°C로 유지한 Bio-gel P2(Bio-rad, 200-400mesh) column (210 × 1.2 cm)에 당용액 1 ml(200mg/ml)를 주입한 후, 0.1 ml/min로 용출, 1 ml/tube로 분획하였으며 각 분획은 총 당을 정량한 후 TLC로 분석하였다.

Key words : High performance liquid chromatography (HPLC), quantitation, fructo-oligosaccharides (GF2-GF7), Inulo-oligosaccharides (F2-F4)

Corresponding author : S.-I. Kim

HPLC

HPLC는 TOSOH SC 8010 HPLC에서 TSK-gel Amide-80(4.6×250 mm) column을 사용, acetonitrile-water(65:35;v/v) 용매를 유속 1.0 ml/min로 통과시켜 행하였다. 당 검출은 refractive index detector(RI8012, TOSOH)로 하였으며 column 온도는 70°C를 유지하였다. Fructose, glucose, sucrose, fructo올리고당(GF2-GF7) 및 inulo올리고당(F2-F4) 등 각 표준당을 각 농도별로 20, 50 또는 100μl loop에 주입하여 검출하였으며 각 농도에 따른 peak면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

분석 방법

총당은 fructose를 표준으로한 anthrone 방법<sup>26)</sup>에 의해 정량하였으며, TLC는 하등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 행하였다.

결과 및 고찰

Fructo올리고당 및 inulo올리고당의 제조

HPLC정량용 올리고당 표준물질을 제조하기 위해 먼저 Bio-gel P2 column chromatography를 실시하였다. 돼지감자 괴경의 물추출물인 fructo올리고당시료에서는 10개의 당 peak가 검출되었다(Fig. 1). 각 peak의 당조성을 TLC로 확인한 결과 glucose, fructose는 서로 분리되지 않았으나 sucrose와 GF2부터 GF7까지는 분리되었으며 중합도가 높은 inulin은 제일 먼저 용출되는

peak에서 검출되었다(Fig. 2). Inulin의 endoinulase 가수분해물인 inulo올리고당 시료에서는 7개의 당 peak가 검출되었다(Fig. 3). 각 peak의 당조성을 TLC로 확인한 결과 1, 2, 3번 peak가 각각 F2, F3, F4를 함유하고 있

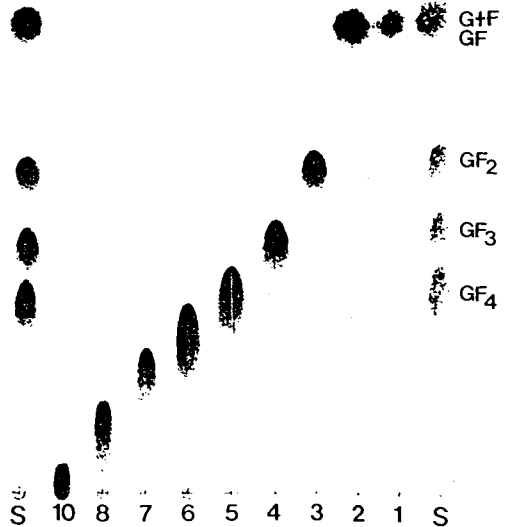


Fig. 2. Thin layer chromatogram of water soluble carbohydrates from Jerusalem artichoke tuber fractionated on Bio-gel P2 column. 1~10, Peak No.; S, Standard (fructose, glucose, sucrose, GF2, GF3 and GF4)

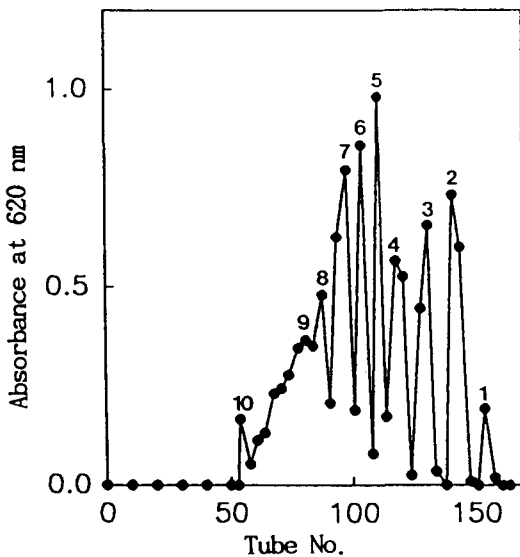


Fig. 1. Bio-gel P2 column chromatogram of water soluble carbohydrates from Jerusalem artichoke tuber. 1~10: Peak No.

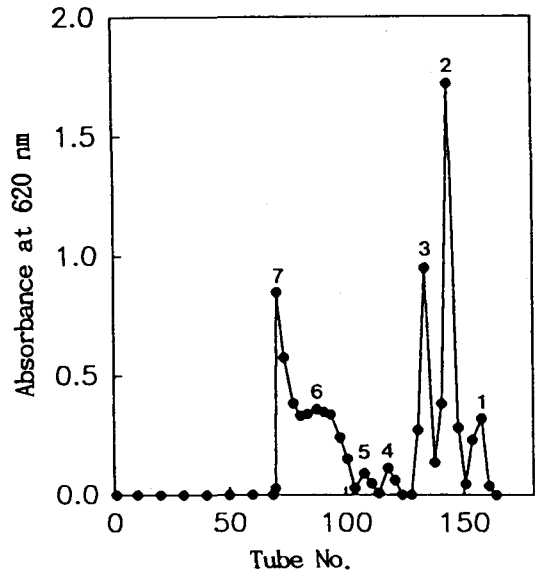


Fig.3. Bio-gel P2 column chromatogram of inulin by drolysate reacted with endoinulase from Streptomycetes sp. S56. 1~7: Peak No.

으며 이들이 Bio-gel P2로 분리됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 fructo올리고당과 inulo올리고당 모두 한번에 완전히 순수하게 분리할 수는 없어 rechromatography를 실시하였으며 이로부터 얻은 각 올리고당들을 다시 HPLC를 통해 순수하게 정제하였다.

**HPLC에 의한 표준당들의 표준곡선 작성**

먼저 TSK-gel amide-80 column과 acetonitrile-water (65 : 35; v/v) 용매를 사용하여 돼지감자 괴경의 물추출물인 fructo올리고당 시료를 용출시킨 결과 fructose, glucose, sucrose 및 fructo 올리고당들이 모두 잘 분리되었다(Fig. 5). F2, F3 및 F4 등 inulo 올리고당의 경우 F2는 sucrose와 같은 retention time에서 F3는 sucrose와

GF2사이에서 F4는 GF2와 GF3사이에서 분리되어 나타났다(Table 1). F2와 sucrose를 분리하는 것은 좀 더 비극성인 용매조건, 예를 들면 acetonitrile-water(75 : 25; v/v)에서 가능하였다. HPLC에 의하여 분리된 각 표준당들의 당량 및 peak 면적에 대한 표준곡선을 작성한 결과는 종합하여 Table 1에 나타내었다. 표준당들의 retention time은 4.85~17.82 min이었으며 각 당의 retention time은 5번씩 주입, 분석하였을 때 편이도가 F4(1.789%)를 제외하고는 0.068~0.247%로 나타나 재현성이 있었다. Sensitivity는 매주입시 detector noise의 2배에 해당되는 signal을 보이는 시료의 농도를 나타낸 것으로

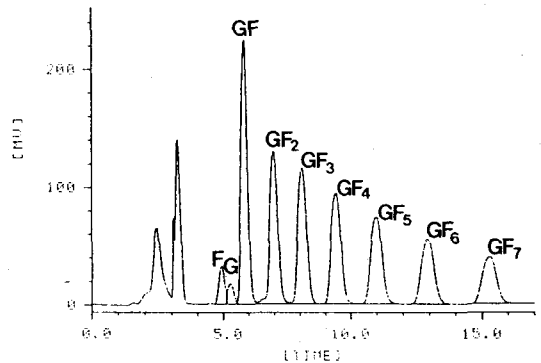
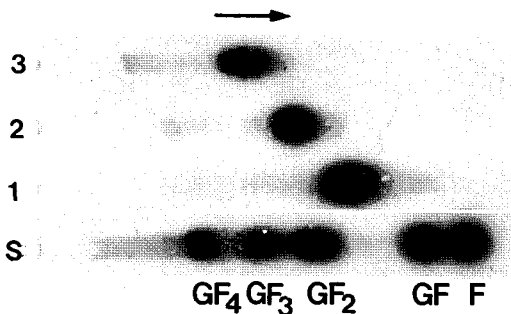


Fig. 4. Thin layer chromatogram of inulin hydrolysate fractionated on Bio-gel P2 column. 1~3, Peak No.; S, Standard (fructose, sucrose, GF2, GF3 and GF4)

Fig. 5. High performance liquid chromatogram of water soluble carbohydrates from Jerusalem artichoke tuber

Table 1. Linearity and sensitivity of the quantitative method for fructose, glucose, sucrose, fructo-(GF2-GF7) and inulo-oligosaccharides(F2-F4)

Analyte	Retention time(min)		Sensitivity (µg)	Slope (area/µg)	Intercept (area)	coefficient of determination	Range of analyte amount (µg)
	Mean*	CV**					
Fructose	4.85	0.186	5.00	33.97	4.534	0.9978	5.00~995.00
Glucose	5.26	0.247	4.64	31.03	227.87	0.9950	4.64~538.25
Sucrose	5.92	0.068	4.90	35.50	-45.732	0.9966	4.90~548.50
GF2	7.29	0.192	4.98	32.89	-67.795	0.9948	4.98~507.50
GF3	8.66	0.092	5.06	29.85	59.942	0.9976	5.06~1018.00
GF4	10.28	0.126	5.14	30.30	-3.025	0.9982	5.14~1029.00
GF5	12.27	0.090	4.88	29.68	42.724	0.9982	4.88~200.00
GF6	14.77	0.074	3.92	29.94	-40.318	0.9998	3.92~196.15
GF7	17.82	0.081	4.02	30.23	129.40	0.9884	4.02~163.65
F2	5.92	0.068	3.84	21.54	137.04	0.9983	3.84~384.00
F3	6.91	0.072	6.61	26.91	296.00	0.9982	6.61~661.00
F4	8.05	1.789	5.47	29.91	136.51	0.9995	5.47~547.00

\*Mean of 5 determinations

\*\*Coefficient of variation

모든 당들에 대해 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 최소자승직선회귀(least square linear regression)를 사용하여 기울기(slope), y축 절편(intercept), 결정계수(coefficient of determination)를 계산하였다. 기울기는 21.52~33.97로 각 당에 대해 큰 차이가 없었으나 y축 절편은 -45.732에서 296.00으로 당에 따라 큰 차이를 보였다. 이러한 차이는 Frehner 등,<sup>19)</sup> Cairns 등,<sup>8)</sup> Proud'homme 등<sup>17)</sup> Bancal 등<sup>23)</sup>이 제안한 몇 가지 표준당들을 기준으로 하여 모든 당들의 양을 일률적으로 정량하는 방법은 적합하지 않다는 것을 의미하는 것으로 각 당을 정확하게 정량하려면 결국 각 당에 대한 표준곡선을 하나씩 작성하여 그 결과를 가지고 정량하는 것이 정확한 정량방법임을 의미한다. 한편 결정계수는 0.9884이상의 높은 값을 보였으며 결정계수에 대한 t-검정결과 모든 표준당에 대해 상관이 유의( $p < 0.001$ )함을 알 수 있어 본 HPLC방법에 의한 정량이 타당한 것으로 나타났다. 또한 각 당은 넓은 당량의 범위에 걸쳐 linearity를 보였다. 이상의 결과들로 볼때 본 HPLC방법은 fructose oligomer인 fructo올리고당 및 inulo올리고당을 분리,정량하기에 신속, 정확한 방법임을 알 수 있었다. 본 방법은 이러한 fructose oligomer들이 함유되어 있는 돼지감자 등의 식물체 및 식음료 중의 당조성을 신속, 정확하게 조사하는 데 유용할 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 1992년도 산학협동재단 지원과 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 부분적 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Pontis, H. G.: Arch. Biochem. Biophys. 116 : 416 (1966)
2. Edelman, J. and Dickerson, A. G.: Biochem., J. 98 : 787(1966)
3. Tognetti, J. A., Calderón, P. L. and Pontis, H. G.: J. Plant. Physiol. 134 : 232(1988)

4. Karlsson, G.: J. Chromatogr., 44 : 413(1969)
5. Collins, F. W. and Chandorkar, K. R.: J. Chromatogr., 56 : 163(1971)
6. Schnyder, H. and Nelson, C. J.: Plant Physiol., 85 1: 548(1987)
7. Wagner, W. and Wiemken, A.: Plant Physiol., 85 : 706(1987)
8. Cairns, A. J. and Pollock, C. J.: New Phytol., 109 : 399(1988)
9. Labourel, G. and P aud-Leonel, C.: Chem. Zvesti., 23 : 765(1969)
10. Shiomi, N., Yamada, J. and Izawa, M.: Agric. Biol. Chem., 40 : 567(1976)
11. Pointis, H. G.: Anal. Biochem., 23 : 331(1968)
12. Darbyshire, B. and Henry, R. J.: New Physiol., 81 : 29(1978)
13. Pollock, C. J.: Phytochemistry, 21 : 2461(1982)
14. Blacklow, W. M., Darbyshire, B. and Pheloung, P.: Plant Sci. Lett., 36 : 213(1984)
15. Pollock, C. J., Hall, M. A. and Roberts, D. P.: J. Chromatogr., 171 : 411(1979)
16. Scobel, H. D. and Brobst, K. M.: J. Chromatogr., 72 : 51(1981)
17. Prud'homme, M. P., Gastal, F., Belanger, G. and Boucaud, J.: New Phytol., 123 : 255(1993)
18. Nagamatsu, Y., Yahata, M., Fukada, T. and Hanataka, C.: Agric. Biol. Chem., 54 : 1291(1990)
19. Frehner, M., Keller, F., Wiemken, A. and Matile, Ph.: J. Plant Physiol., 16 : 197(1984)
20. Chatterton, N. J., Harrison, P. A., Thornley, N. R. and Bennett, J. H.: Plant Physiol. Biochem., 27 : 289(1989)
21. Shiomi, N., Onodera, S., Chatterton, N. J. and Harrison, P. A.: Agric. Biol. Chem., 55 : 1427(1991)
22. Bancal, P., Carpita, N. C. and Gaudillere, J. P.: New Phytol., 120 : 313(1992)
23. Bancal, P. and Gaudillere, J. P.: Plant Physiol. and Biochem., 27 : 745(1989)
24. 김수일, 하영주: 산업미생물학회지, 20 : 551(1992)
25. 강수일, 김수일: 산업미생물학회지, 21 : 36(1993)
26. Weiner, J.: J. Inst. Brew., 84 : 222(1978)

**Quantitation of fructo- and inulo-oligosaccharides by high performance liquid chromatography**

Su-Il Kang<sup>1</sup>, Jong-In Han, Kyoung-Youn Kim, Sun-Jin Oh, and Su-Il Kim\* (Department of Agricultural chemistry and Research center for New Bio-materials in Agriculture, <sup>1</sup>Institute of Agricultural science and Development, College of Agriculture and Life science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

**Abstract** : High performance liquid chromatographic method using a TSK-gel amide 80 column and isocratic elution with acetonitrile-water (63 : 35 ;v/v) mixture was used for the separation and the quantitation of fructo (GF2-GF7)- and inulo-oligosaccharides (F2-F4). Retention time of each standard carbohydrate was highly reproducible. Standardization curves obtained by plotting the peak areas against the amounts of each carbohydrate showed very high coefficient of determination ( $\geq 0.9884$ ) and similar slopes, and a wide range of y-intercepts. Our results suggest the use of each pure oligosaccharide for its own standardization curve instead of using a certain carbohydrate as an internal standard.