

HPSEC를 이용한 β -glucan 평균분자량 측정

박희정[†] · 정현상 · 김광엽

충북대학교

I. 서 언

β -glucan은 식물체 배유세포벽 특히, 호분층에 다량으로 존재하는 비전분 다당류로 생리활성이 우수한 건강 기능성 소재로 현재 널리 각광 받고 있다. β -glucan은 식 후 혈당 및 인슐린 농도를 낮추고, 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키며, 대장암을 예방하고, 면역 관련 세포를 활성화시켜 면역을 증진시키는 등 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 이러한 생리활성은 β -glucan 용액의 점도, glucose 결합방식, 분자량, 용해성 뿐 아니라 섭취 후 대장내에서의 미생물에 의한 발효정도 등 여러 가지 요인과 관련되어 있다. 이 중 분자량은 점도를 상승시킴으로써 장내에서 glucose 및 콜레스테롤과 결합하거나 가두어 체내 흡수속도를 저하시키고 체외로 배출시키며, lipase 등의 효소의 작용을 낮추어 지방분해를 지연시키는 주요인으로 이해되고 있으므로, 분자수준에서 β -glucan의 생리활성을 이해하는데 중요한 특성이라할 수 있다.

화합물의 분자량을 분석하는 방법에는 GC-MS, NMR 등을 이용한 분석법과 GPC(gel permeation chromatography)를 이용하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. GC-MS 방법은 화합물을 가스상으로 전환시켜 분자량을 측정하므로 휘발성 물질일 경우 분석이 용이하나 비휘발성 물질인 경우에는 휘발성을 갖는 유도체 물질로 전환이 필요하므로, 이에 따른 숙련된 기술과 긴 분석시간이 뒤따르게 된다. NMR 방법은 순도 높은 시료일 때 정확한 분석이 가능하므로 복잡한 정제 과정이 필수적이며, GPC 방법은 분획과정 중에 정제할 수 있다는 장점이 있으나 역시 분석시간이 긴 단점을 갖고 있고, β -glucan 분자량 분석법으로 주로 이용되어 왔다. HPSEC를 이용한 β -glucan의 분자량 분석법은 정제나 전처리를 필요로 하지 않고 신속한 분석이 가능하며, 기타 고분자 물질의 분자량 분석에도 쉽게 적용할 수 있는 기술이므로 이에 소개하고자 한다.

II. 분석방법

1. 장치 및 기구

1) HPSEC(High Performance Size Exclusion Chromatography)

[†]Corresponding author: (Phone) +82-043-261-2570 (E-mail) hjoeng@hanmail.net

- 2) 항온기
- 3) 실린지 filter(0.2 μ m)

2. 시약

- 1) 분자량 표준품(dextran 또는 pullulan standard)
- 2) sodium azide
- 3) 0.1M-NaNO₃
- 4) 증류수: HPLC용

3. 조작

- 1) 시료를 0.15~0.3% 정도의 농도가 되도록 0.02%(w/v) sodium azide를 함유하고 있는 0.1M-NaNO₃ 용매에 녹인다(항온기에서 수시간).
- 2) 표준물질도 시료와 동일한 방법으로 용해한다.
- 3) 실린지 filter에 여과하여 이물질 제거한다.
- 4) 표준용액과 시료용액 20 μ l를 HPSEC에 주입하여 분석한다.
- 5) HPSEC 상에서 얻은 분자량 표준품의 크로마토그램을 이용하여 3차식의 검량선을 작성한다.

: 검량선의 예(Fig. 1 및 2 참조)

$$\log[M_w] = A + BX + CX^2 + DX^3$$

- 6) 시료의 피크면적을 적분한 후 검량선에 적용하여 평균분자량($\overline{M_w}$)을 얻는다.
- 7) HPSEC를 이용한 분자량 분석조건의 예.

4. 비교

- 1) HPSEC를 이용하여 화합물의 분자량을 분석하고자 하는 경우 컬럼의 선택이 매우 중요

Table 1. Instrument and operating conditions of HPSEC for the average molecular weight of oat β -glucan.

Instrument	Young Lin Co.
Detector	RI(Waters 410 differential refractometer detector)
Column	Ultrasphere TM mixed bed linear column (7.8 \times 300 mm, Waters)
Mobile Phase	0.1 M-NaNO ₃
Oven Temp.	35°C
Flow Rate	0.7 mL/min

하다. 예를 들면, 분석물질이 수용성일 때와 지용성 일 때 각기 다른 컬럼을 선택해야 하고, 용해성이 동일한 컬럼일 경우에도 분자량 범위에 따라서 다양한 컬럼이 있으므로 컬럼 선택시 충분한 검토가 요구된다.

- 따라서, 대략적인 분자량의 범위를 알고 정확한 분석에 들어가는 것이 유리하다. 대략적인 분자량 구간을 알고자 할 때, β -glucan의 경우에는 mixed bed linear column(ex. 10,000~2,000,000)을 사용하여 대략적인 분자량 범위를 파악할 수 있다.

5. 결과 해석

- Dextran 분자량 표준품의 크로마토그램 예.

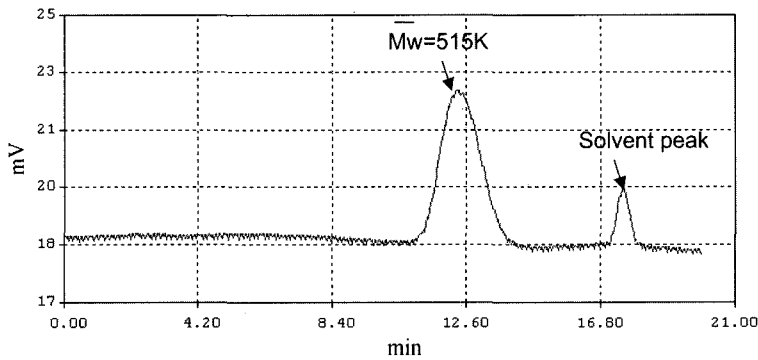


Fig. 1. High-performance size-exclusion chromatography of dextran standard.

- Dextran 분자량 표준품을 이용하여 얻은 검량선의 예.

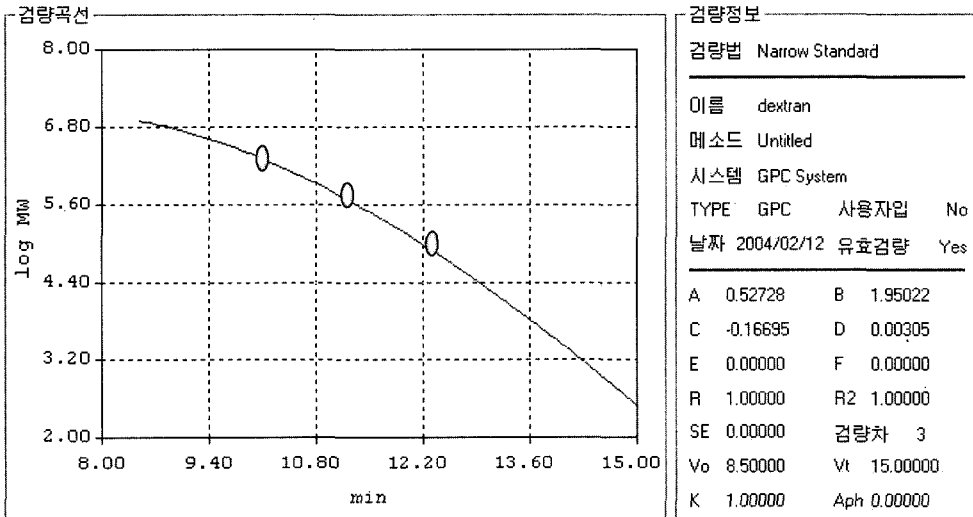


Fig. 2. Calibration curve using high-performance size-exclusion chromatography of dextran standards.

3) 귀리 β -glucan의 크로마토그램 예(Park, 2004)

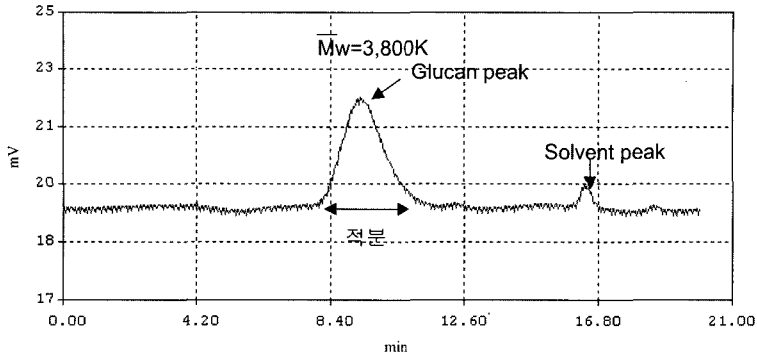


Fig. 3. High-performance size-exclusion chromatography of β -glucan (about 90%) from oat bran.

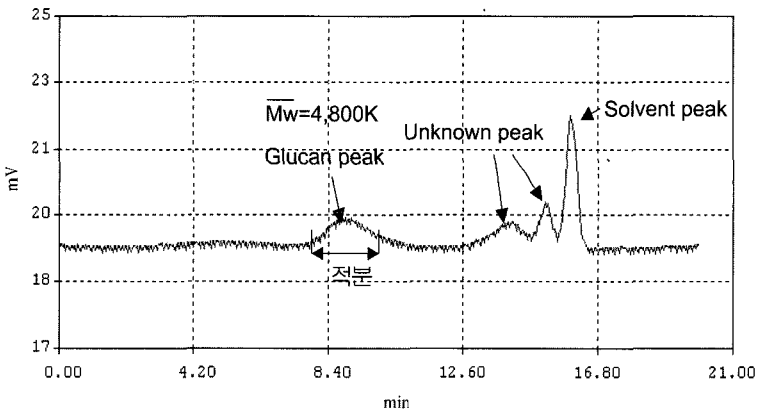


Fig. 4. High-performance size-exclusion chromatography of crude β -glucan (about 30~40%) from oat bran.

참고문헌

1. Klofendtein, C. F. 1988. The role of cereal β -glucans in nutrition and health. *Cereal Food World*. 33 : 865-869.
2. Wood, P. J., J. Weisz, P. Fedec and V. D. Burrows. 1989. Large-scale preparation and properties of oat fractions enriched in (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan. *Cereal Chem*. 66 : 97-103.
3. Skendi, A., C. G. Biliaderis, A. Lazaridou and M.S. Izydorczyk. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *J. Cereal Sci*. 38 : 15-31.
4. Izydorczyk, M. S., C. G. Biliaderis, L. J. Macri and A. W. Macgregor. 1998. Fractionation of oat (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and characteristics of the fractions. *J. Cereal Sci*. 27 : 321-325.

5. Wood, P. J., Weisz, J. and W. mahn. 1991. Molecular characterization of cereal β -glucans. II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. Cereal Chem. 68 : 530-536.
6. Park, H. J. 2004. Extraction optimization and biological functions of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan from oat bran. Desertation of pH D. Chungbuk National University.
7. Lim, H. S. and P. J. White. 1997. Comparision of molecular weight distribution of commercially purified oat and barley β -glucans. Foods and Biotech. 6 : 26-29.

Estimation of Average Molecular Weight of β -glucan with HPSEC

Park, H.J.[†], Jeong, H.S. and K.Y. Kim

*Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University
+82-43-261-2570, hjoeng@hanmail.net*