

전복(*Haliotis discus hannai*) 內臟의 Carotenoid에 關한 研究

安 承 堯

서울대학교 家政大學 食品營養學科

(1974년 11월 15일 수리)

Studies on the carotenoids in the viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*)

Seung-yo Ahn

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Economics, Seoul National University

(Received Nov. 15, 1974)

Summary

The studies on the carotenoids in the viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*) have been carried out. The pigments were extracted with acetone-methanol mixture (4 : 1) from the viscera of abalones which were caught around the coastal water of Korea from March to August.

The individual carotenoid in the extracts was separated and purified by the silica gel TLC, Mg(OH)₂ impregnated paper chromatography and Mg₂(OH)₂CO₃ TLC. The isolated eleven carotenoids were investigated and identified by epoxide test, partition test, reduction with sodium borohydride, alkaline hydrolysis, co-chromatography and comparative test with reference carotenoids and electronic and IR absorption spectrophotometry.

α -Carotene, β -carotene, lutein, zeaxanthin, siphonaxanthin, siponein, fucoxanthin, loroxanthin-like and fucoxanthinol-like have been identified among the eleven carotenoids isolated. It has been found that fucoxanthin, on alkaline treatment, was transformed to the product of which chromophore was the same one as fucochrome and semifucoxanthol. Among the identified nine carotenoids siphonaxanthin, siponein, fucoxanthin, loroxanthin-like and fucoxanthinol-like have not been reported previously to be contained in the shellfish.

緒 論

動植物界에 黃色 또는 赤色の 色素로서 널리 分布되어 있는 carotenoid의 化學構造와 生理的 意義에 대해서는 일찍부터 많은 사람들의 關心의 對象이 되어왔다.

carotenoid의 研究는 그 研究方法과 問題의 着眼點에 따라 크게 4期로 나눌 수 있다. 19世紀의 研究는 주로 色素의 分離와 그의 特殊한 吸光現

象의 解釋에 注力되었다. 1900~1930년까지의 제2期에는 分離한 carotenoid의 實驗式的 測定 및 光合成과의 關係에 集中되었던 期間이라고 할 수 있다. 1930~1950년까지의 제3期에는 純粹單離와 그 化學構造의 決定에 관한 研究가 활발히 進行된 時期이다. 1950年 以後부터는 carotenoid의 全合成이 可能하게 되었고 thin-layer chromatography(TLC)와 같은 새로운 方法이 導入되면서 分離方法이 刷新되었다. 한편 IR, 高分解能의 NMR,

mass spectrometer와 같은 機器들이 carotenoid 研究에 登場되어 以前까지 論爭의 對象이 되어왔던 여러가지 모호한 carotenoid의 化學構造가 解明되는 한편 그릇되게 決定된 構造들이 修正될수 있었다. 이어서 많은 種類의 carotenoid가 發見되어 1948년까지는 80種이 알려졌으나 現在로는 300種 以上이 알려져 있다.

carotenoid에 關한 始初의 綜說은 1922年 Palmer⁽¹⁾에 의하여 出版되었으며 그後 1934년에 Zechmeister⁽²⁾의 著書가 紹介되었다. Zechmeister는 그안에 1934년까지 이루어놓은 化學構造와 自然界에서의 그 分布를 수록하고 있다. 1948年 Karrer와 Jucker⁽³⁾는 當時까지 이루어놓은 carotenoid들의 化學構造, 性質 및 反應에 關한 知識들과 함께 自然界에서의 分布와 生物學의 意義에 關한 內容을 담은 “Carotenoide”라는 방대한 單行本을 내놓았다.

1971년에 Isler⁽⁴⁾ 등은 전문分野別로 分擔하여 執筆한 “Carotenoids”를 編著해냈다. 이안에는 carotenoid의 分布, 反應, 分光學, 立體化學, 化學合成, 生合成, 代謝等 여러 分野에 걸친 最新의 知識들이 담겨져 있다.

生物體로부터 carotenoid의 分離는 Tswett⁽⁵⁾의 adsorption column chromatography의 發明에 의하여 本格的인 軌道에 올랐다고 할수있겠다. 初期研究에서는 全的으로 이것에 依存하였을뿐만 아니라 오늘날에도 大規模로 carotenoid를 分離精製하기 위해서는 이 吸着劑를 채운 column chromatography가 必須的인 手段이 되고 있다. carotenoid 分離에 利用되는 吸着劑 및 展開溶媒들은 Karrer⁽³⁾, Strain⁽⁶⁾, Goodwin⁽⁷⁾, Davies⁽⁸⁾ 등에 의하여 상세히 紹介되고 있다.

1960年 以後 carotenoid分離에 새로 導入된 準微量 方法으로서의 TLC^(9,10,11)는 그의 露出된 넓은 表面에서 分離된 carotenoid가 破壞될 뿐만 아니라^(12,13) 異性質化된다는⁽¹⁴⁾ 缺點은 있으나 迅速하고도 우수한 分離能때문에 널리 利用되고 있다.

化學的인 方法에 의한 carotenoid의 構造研究에 는 各種 有機化學的인 方法이 利用되고 있다. 水素添加에 의하여 二重結合의 數가 測定되고^(15,16) 결사슬에 結合된 methyl 基는 alkali 溶液中에서 permanganate 또는 chromate로 酸化될때 生成되는 acetic acid가 檢出되어 測定된다^(17,18). carbonyl 基에 대해서는 LiAlH₄ 또는 NaBH₄^(19,20)에 의한 환원方法이 쓰여진다. epoxy group의 檢出은 ether 溶液을 濃鹽酸과 함께 흔들때 生成되는 呈色反應

에 따르고 있다. hydroxy 基는 ester을 만들어 試驗한다든지⁽²¹⁾ CHCl₃-HCl로 脫水시켜⁽²²⁾ 얻어지는 生成物의 色 또는 그 spectrum을 調査하여 그 位置와 數를 確認할 수 있다.

위에 列擧한 여러가지 化學的 方法과 더불어 最近 carotenoid의 構造研究에 導入된 各種 分光學 機器들이 構造解明의 手段이 되고 있다. 可視部 및 紫外部 吸收 spectrum은 polyene의 二重結合의 數, 置換基의 種類와 位置, cis-trans isomer의 識別等 carotenoid의 構造 研究에 큰 도움이 되고 있다.

赤外線 spectrophotometer는 過去에는 carotenoid 研究에 利用된 일이 없으나 最近에는 acetylene 및 allene 構造等 特殊한 官能基의 解明에 좋은 手段이 되고 있다.

NMR spectroscopy는 Weedon⁽²³⁾ 등이 처음으로 carotenoid研究에 利用한 以來 carotenoid化學에 있어서 分子構造의 確認에 자주 利用되고 있다. 特別히 mass spectrometry⁽²⁴⁾는 carotenoid의 分子量, 元素組成 및 構造에 對한 有力한 資料를 提供해 왔다.

지금까지 이루어진 carotenoid 研究中에서 植物의 carotenoid에 對한 研究 論文은 많이 볼 수 있으나 動物體中에 含有된 carotenoid에 對한 研究는 比較的 그 數가 많지 않다. 그중에도 貝類의 carotenoid研究는 極히 드물다. Goodwin⁽²⁵⁾은 *Anodonta cygnea* 조개로부터 β-carotene, echinenone, cryptoxanthin, zeaxanthin, violaxanthin, auroxanthin을 分離 確認하였다. Campbell⁽²⁶⁾은 *Mytilus edulis* 및 *Mytilus californianus* 두 種類의 조개에는 主 carotenoid로서 alloxanthin, 그 以外에 mytiloxanthin, lutein, zeaxanthin, diatoxanthin, mutatoxanthin等 9種이 含有되어 있었다고 報告하고 있다.

Shimizu 등은 다음 4種類의 雙殼貝類에 들어있는 몇가지 carotenoid들을 alumina 및 Sephadex LH-20 column chromatography로 分離 確認하였다. Shortnecked clam⁽²⁷⁾에는 β-carotene, zeaxanthin 및 flavoxanthin이 含有되어 있다고 하였고. hard clam⁽²⁸⁾에는 lutein, β-carotene 및 zeaxanthin類似物과 그밖에 몇 種類의 未確認 carotenoid가 含有되어 있다고 報告하였다. 그리고 Ark shell⁽²⁹⁾에서 8種의 carotenoid를 分離하였으나 그중 lutein, β-carotene 만을 確認하였으며 Pecten⁽³⁰⁾에서는 9種의 carotenoid를 分離하고 이 중에서 lutein과 β-carotene

판을 確認하였음을 報告하고 있다. Ohta⁽³¹⁾는 Carb shell 中에서 6種의 carotenoid를 分離하고 中 lutein, lutein ester, β -carotene 및 taraxanthin類 似物 등 4種을 確認하였다.

李⁽³²⁾ 등은 조개 *Mytilus edulis* 中에서 β -carotene, lutein, zeaxanthin 및 astaxene을 分離 確認하였다 고 報告하였다. 李⁽³³⁾ 등은 野生굴 및 養殖굴에는 siphonin, siphonaxanthin, hydroxyechinenone, lutein, diadinoxanthin類 似物, zeaxanthin類 似物 및 α -cryptoxanthin 등이 含有되어 있다고 하였다.

위에 列擧한바와 같은 雙殼貝類의 carotenoid에 對한 報告는 있으나 전복(*Haliotis discus*)과 같은 單殼貝類에 關하여는 lipid⁽³⁴⁾ protein⁽³⁵⁾, hemocyanin⁽³⁶⁾ 등을 비롯하여 그밖에 다른 成分의 研究가 있을뿐 carotenoid의 研究는 찾아볼 수 없다.

전복中에 含有되어 있는 carotenoid의 組成을 究明하기 위하여 本 研究에서는 우리나라 沿岸에서 4월부터 8월까지 사이에 採取되는 전복의 內臟에 含有되어 있는 carotenoid에 關한 研究를 試圖하고 TLC, Mg(OH)₂ 피복과지 chromatography로 11種의 carotenoid를 分離하여 其中에서 9種의 carotenoid를 確認하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

實驗에 使用한 전복(*Haliotis discus hannai*)은 우리나라 沿岸에서 4월부터 8월까지 사이에 採取되어 販賣되는 것으로서 東大門市場에서 購入即時 色素가 集中되어 있는 內臟部分만을 切除하여 使用하였다. 이 內臟部分에는 消化管을 위시하여 生殖器 및 循環系 등의 各種 器官이 포함되어 있다.

2. 色素의 抽出과 分劃

水分을 많이 含有하는 臟器 500g을 1l의 acetone에 浸漬하여 脫水와 同時에 色素를 抽出한 다음 500ml의 acetone-methanol(4:1) 混合溶媒와 함께 blender로 磨碎하였다. 이 磨碎液을 Büchner 깔대기를 通하여 吸引 濾過하였다. 殘渣는 500ml의 acetone-methanol(4:1) 混合溶媒中에 懸濁시켜 때때로 교반하면서 20分間 放置하였다가 吸引 濾過하였다. 이 操作을 濾過液이 거의 無色이 될때까지 반복하였다. 濾過液을 40°C以下에서 rotary evaporator로 減壓蒸發시킨 다음 300ml의 95% methanol에 溶解시켰다.

이 95% methanol용액을 分液깔대기에 옮기고 Fig. 1과 같이 每回마다 50ml의 hexane으로 4回

抽出하였다. hexane 抽出液을 모두 용아 分液깔대기에 넣고 每回마다 30ml의 95% methanol로 3回 抽出하여 앞의 95% methanol용액에 합쳤다. hexane劃分을 F-I 그리고 methanol劃分을 F-II의 記號로 區別하고 40°C以下에서 減壓蒸發시켜 hexane 용액으로 만들었다.

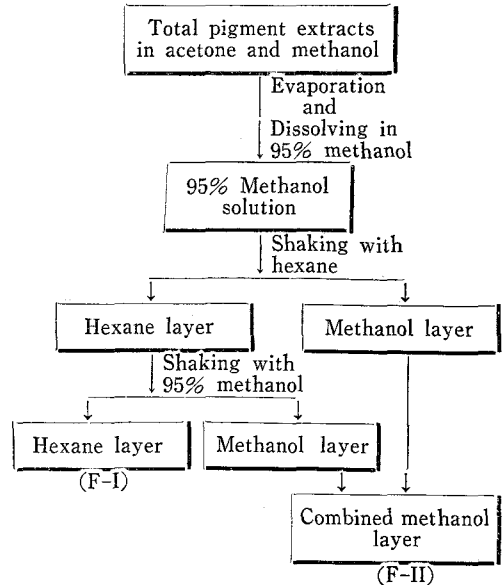


Fig. 1. The diagram of the fractionation of extracts.

3. 色素의 分離 및 精製

3-1. Thin-layer chromatography

F-I 및 F-II안에 含有되어 있는 carotenoid를 一次적으로 分離하고자 silica gel thin-layer chromatography(TLC)를 施行하였다. TLC板은 常法에 따라 silica gel G(E. Merck)를 물에 반죽하여 0.4~0.7mm두께로 피복하여 110°C oven안에서 2時間 活性化시켜 使用하였다.

色素溶液을 TLC板의 한쪽 2cm되는 거리에 帶狀으로 塗付하고 용매가 증발한다는 Stahl⁽³⁷⁾이 처음으로 carotenoid의 TLC에 使用하였던 溶媒系를 變更시켜 Table 1의 Solvent A로 展開시켜 分離하였다. 展開가 完了되면 Fig. 2에서와 같이 F-I에서는 3個의 色素帶가 얻어지고 F-II에서는 5個의 色素帶가 얻어지는데 F-II의 色素帶들을 밑에서부터 B-1, B-2, B-3, B-4, B-5로 番號 붙였다. F-I에서 분리된 세 色素帶中 下部의 두 色素帶는 各 各 F-II의 B-3, B-5와 一致함으로 이것들은 제쳐 놓고 上部의 色素帶만을 F-II의 번호에 이어서 B-6로 번호붙였다.

F-1의 分離에 사용했던 上記한 Solvent A는 含有된 色素를 調査하는 目的으로만 사용하였을 뿐 실제로 F-1의 色素分離에 使用한 溶媒는 hexane 이었다.

TLC板에서 分離된 各 色素帶들을 各 各 유리섬 유를 단단히 끈 갈대기에 걸어내었다. 그리고 F-II의 色素帶들은 acetone-methanol(4:1) 혼합용매로 溶出하고 F-1에서 分離한 B-6는 acetone으로 溶出하였다. 色素溶出液들은 40°C 以下에서 減壓 蒸發시켜 hexane에 녹였다.

Table 1. Chromatographic developing solvents.

Code of developing solvent system.	Ratio of the solvent
Solvent A	Ethyl acetate-CH ₂ Cl ₂ (17:83)
Solvent B	Hexane-benzene-acetone (50:40:10)
Solvent C	Hexane-acetone-isobutyl alcohol(85:15:2)

3-2. Mg(OH)₂ 濾過紙 Chromatography

silica gel TLC로 分離하여 얻은 各 色素帶들에 含有되어 있는 色素들을 더욱 精製하기 위해서 Mg(OH)₂를 피복한 濾過紙로 chromatography 分離하였다.

Mg(OH)₂ 피복 濾過紙는 李⁽³⁸⁾의 方法을 變更시켜 다음과 같이 만들었다. 20cm×30cm로 자른 Toyo No. 514濾過紙 10枚를 1l의 15% MgSO₄·5H₂O 용액이 담긴 바트안에 담가서 30分間 放置했다가 바트를 기울여 용액을 따라냈다. 濾過紙를 경사시킨 바트에 붙여서 約 1時間 放置해 두었다가 1l의 6% ammonia용액이 담긴 바트에 1枚씩 잠겨서 매 때로 흔들면서 12시간 放置하여 반응시켰다.

ammonia처리를 한 濾過紙는 遊離 ammonia가 없어질 때까지 물로 씻어서 줄에 매달아 室溫에서 12시간 건조시켰다. 건조된 Mg(OH)₂피복 濾過紙는 KOH粒이 들어 있는 desicator에 저장해 두고 使用하였다.

20cm×30cm되는 Mg(OH)₂ 피복여 과지의 한쪽 2cm되는 距離에 silica gel TLC로 分離한 各 色素 溶液을 幅 5~7mm의 帶狀으로 塗付하고 B-1에서 B-5까지는 Table 1의 Solvent C로 展開하고 B-6는 別塗로 hexane으로 展開하였다.

分離된 各 色素帶들은 Fig. 3에서와 같이 各 各 밀에서부터 차례로 番號붙였다. 濾過紙上에 分離된 各 色素帶를 오려내어 methanol 또는 methanol-acetone(1:1) 混合溶媒로 溶出하여 濃縮한 다음 hexane溶液으로 만들었다.

3-3. Mg₂(OH)₂CO₃ Thin-layer Chromatography

Mg(OH)₂ 피복 濾過紙 chromatography로 分離한 各 色素帶 中에는 아직도 이웃하는 色素들이 混入되어 있으므로 Nitsche⁽³⁹⁾ 등이 carotenoid의 異性體들의 分離에 使用하였던 Mg₂(OH)₂CO₃(5829, E. Merck)를 피복한 TLC에 依하여 더욱 精製하였다. Mg₂(OH)₂CO₃ TLC板은 다음과 같이 제작하였다. Mg₂(OH)₂CO₃ 粉末을 물로 반죽하여 유리板에 0.25mm 두께로 피복하여 室溫에서 24時間 건조시켰다.

Mg(OH)₂ 濾過紙 chromatography로 分離한 各 色素帶들의 溶液을 Mg₂(OH)₂CO₃ TLC 板에 帶狀으로 塗付하여 Table 1의 Solvent A 또는 Solvent B로 展開시켜 精製하였다.

4. 標準 Carotenoid의 單離

authentic carotenoid들을 얻기 위하여 所在가 明確한 天然植物들로 부터 fucoxanthin, lutein, zeaxanthin, α-carotene 및 β-carotene을 單離하였다.

4-1. Fucoxanthin의 單離

新鮮한 미역(*Undaria pinnatifida*) 200g을 500ml의 acetone-methanol(4:1) 混合溶媒와 함께 blender로 磨碎하여 吸引濾過하였다. 殘渣를 다시 blender로 옮기고 acetone-methanol 混合溶媒와 함께 磨碎하여 抽出液을 吸引濾過하였다. 濾過液을 모두 모아 40°C에서 減壓下에 蒸發시켰다.

濃縮物을 100ml의 95% methanol에 녹여 分液 갈대기로 옮긴 다음 每回마다 30ml의 hexane으로 3回 抽出하였다. hexane抽出液은 버리고 methanol層을 減壓下에 濃縮하여 acetone에 녹였다. 이 acetone溶液을 3-1의 方法에 따라 silica gel TLC로 分離하여 Rf值 約 0.2되는 자리에 朱黃色의 色素帶를 얻었다.

TLC板에 分離된 朱黃色의 色素帶를 걸어내어 acetone-methanol(4:1) 混合溶媒로 溶出하였다. 이 色素溶液을 濃縮하여 3-2의 方法에 따라 Mg(OH)₂ 피복濾過紙 chromatography로 分離하였다. 濾過紙上에 分離된 朱黃色의 色素帶를 오려내어 methanol로 溶出하였다. 이 溶出液을 減壓下에 濃縮한 다음 acetone에 녹여 3-3의 方法에 따라 더욱 精製하였다. 이 精製된 色素에 대하여 partition test, epoxide test, 吸收 spectrum測定等의 試驗을 거쳐 fucoxanthin임을 確認하였다.

4-2. Lutein의 單離

200g의 시금치 잎을 500ml의 10% KOH ethanol

과 함께 blender로 잘 마쇄한 다음 흡인여과하였다. 殘渣를 다시 200ml의 acetone-hexane(3:1) 혼합 용매에 浸漬하여 때때로 교반하면서 30分間 放置하였다가 吸引濾過하였다. 이 조작을 色素가 거의 抽出되지 않을 때까지 반복하였다. 색소용액을 모두 모아 40°C 이하에서 감압하여 약 50ml로 농축한 다음 여기에 150ml의 물을 가하고 추출액이 무색이 될때까지 매회마다 25ml의 ethyl ether-hexane(1:1) 혼합용매로 여러번 추출하였다. ether추출액을 모두 모아 농축하고 3-1의 방법에 따라 silica gel TLC로 분리하였다. TLC板위 R_f 值 0.26되는 자리에 分離된 色素帶를 긁어내서 acetone-methanol(4:1) 혼합용매로 용출하였다. 이 색소용출액을 농축하여 3-2의 방법에 따라 Mg(OH)₂ 여과지로 분리하였다.

여과저상에 분리된 黃色의 색소대를 오려내어 methanol로 용출하였다. 이 용출액을 농축하여 3-3 방법으로 다시 정제하였다. 이 精製색소에 대하여 partition test, epoxide test, 吸收 spectrum 측정 등의 試驗을 하고 lutein임을 확인하였다.

4-3. Zeaxanthin의 單離

신선한 옥수수粒 200g을 500ml의 10% KOH ethanol용액과 함께 blender로 마쇄하였다. 시금치에서와 같은 조작으로 얻은 ether色素 추출용액을 3-1의 방법에 따라 silica gel TLC로 분리하여 R_f 值 0.25되는 자리에 位置한 朱黃色의 色素帶를 긁어내어 acetone-methanol(4:1) 혼합용매로 용출하였다. 이 용출액을 농축하여 3-2의 방법에 따라 Mg(OH)₂ 피복여과지로 분리하였다. 濾過紙上에 R_f 值 0.30의 位置의 紅赤色 色素帶를 오려내어 methanol로 용출하였다. 이 溶液을 濃縮하여 3-3의 방법에 따라 더욱 精製하였다. 이 精製색소에 대해서 partition test, epoxide test, 吸收 spectrum 測定 등의 시험을 거쳐 zeaxanthin임을 確認하였다.

4-4. α -Carotene 및 β -Carotene의 單離

500g의 당근(우리나라에서 널리 재배되는 “긴도기” 품종)을 4-2와 같은 조작을 거쳐 얻은 ether추출액을 3-1의 방법과 같이 silica gel TLC로 분리하였다. TLC板의 溶媒先端에 分離된 朱黃色의 色素帶를 긁어내서 acetone으로 용출하였다. 이 용출액을 농축하여 다시 silica gel TLC板에 塗付하고 hexane으로 전개하여 R_f 值 0.45되는 자리에 分離된 黃朱色の 色素帶를 긁어내서 acetone으로 용출하였다. 이 용출액을 농축하여 3-2의 방법에 따라 Mg(OH)₂ 피복여과지에 塗付하고 hexane으로 진

개하였다. 濾過紙上에 分離된 두 色素帶를 각각 오려내서 acetone으로 용출하였다. 이 두 色素에 대하여 partition test, epoxide test 및 吸收 spectrum 測定 등의 試驗을 통하여 吸着이 강한 色素는 β -carotene, 吸着이 弱한 色素는 α -carotene임을 確認하였다.

5. Electronic 및 IR Absorption Spectrum의 測定

分離精製한 各 個別 carotenoid를 可視部 및 赤外部에서 吸收 spectrum을 測定하였다. 各 carotenoid를 hexane, ethanol, benzene, 二氯化炭素등 네가지 용매에 녹여 Beckman DK-2 spectrophotometer로 自動記錄하여 spectrum을 얻었고 精密을 要할때는 Beckman DU spectrophotometer에 의해서 各波長에서 吸光度를 測定하여 spectrum을 얻었다.

B-2-2 및 B-1-1 色素만은 hexane에서 結晶을 얻어 KBr pellet를 만들어 Beckman IR-4 spectrophotometer로 赤外線 spectrum을 測定하였다.

6. 分配試驗(Partition Test)

各 個別 carotenoid에 대하여 hexane-95% methanol과 hexane-85% methanol사이에 分配比를 Zechmeister⁽⁴⁰⁾의 방법에 의하여 다음과 같이 測定하였다.

各 個別 carotenoid의 acetone溶液을 15ml드리 나사마개 試驗管에 넣고 減壓下에 용매를 蒸發시켰다. 그리고 질소 개스를 통하여 痕跡의 용매를 철저히 제거한 다음 여기에 미리 hexane으로 포화시킨 95% methanol 또는 85% methanol을 5ml 넣고 흔들어 녹였다. 이 시험관에 95% methanol 또는 85% methanol로 미리 포화시킨 hexane을 5ml 가하고 나사마개로 密封한 다음 20회 上下로 서서히 뒤집어 色素를 두 溶媒間에 分配시켜 두층으로 나누어지도록 정치하였다. 그리고 上下層을 각각 445nm에서 吸光度를 測定하여 兩層의 分配比를 計算하였다.

7. Epoxide Test

各 carotenoid들이 epoxy group을 가지고 있는지 여부를 조사하기 위하여 Karrer⁽³⁾의 방법에 따라 다음과 같이 實施하였다. 精製한 carotenoid의 ether용액 2~3ml를 시험관에 담고 濃鹽酸을 0.5~1ml 가하고 흔들어 鹽酸層이 靑變하는지 여부를 관찰하였다.

鹽酸層이 靑變하는 色素에 對하여는 다음과 같은 試驗을 더 하였다. Curl⁽⁴¹⁾의 방법에 따라 epoxide 定性試驗이 陽性인 색소용액을 시험관에 넣

어 減壓下에서 용매를 증발시킨 다음 10ml의 Methanol-濃鹽酸(9:1) 혼합용액을 넣고 용해시킨 다음 2分間 放置하였다. 여기에 過量的 KOH methanol용액을(5ml의 20%용액) 加한 다음 50ml의 물로 分液깔대기에 씻어 옮겼다. 이 용액을 10ml의 ethyl ether과 함께 흔들어 色素를 抽出하였다. ether층을 증류수로 4~5回 씻은 다음 無水 ethanol을 10ml 加하고 減壓下에 증발시켰다. 殘渣를 benzene에 녹혀 Mg(OH)₂ 피복濾過紙에 塗付하고 Solvent C로 전개 분리하였다. 분리된 색소대를 각각 따로 올려내서 ethanol에 녹여 吸收 spectrum을 測定하였다.

8. Alkali 處理

分離된 各 carotenoid용액들을 나사마개 시험관에 취하고 減壓下에 용매를 증발시킨다음 10% KOH ethanol용액을 加하였다. 이 시험관에 질소 gas를 채워 마개를 닫은 다음 暗所에 12時間 放置하였다. alkali처리한 ethanol용액을 적은 分液깔대기에 少量의 물로 옮기고 5ml의 ether과 함께 흔들어 색소를 抽出하였다. ether 용액을 물로 2~3回 씻은후 감압농축하여 Mg(OH)₂ 피복여과지에 帶狀으로 塗付하여 分離하였다. 分離된 色素帶를 올려내서 ethanol溶液으로 만들어 吸收 spectrum을 測定하였다.

9. 環 元

분리정제된 색소를 Walton⁽⁴²⁾의 方法에 따라 ethanol용액 중에서 NaBH₄와 1시간 반응시켰다. 이것을 소량의 물로 分液깔대기에 옮기고 ether로 색소를 추출하였다. 이 ether추출액을 농축하여 3-2의 方法에 따라 Mg(OH)₂ 여과지 chromatography로 分離하였다. 여과지상에 분리된 색소대를 올려내서 ethanol로 용출하여 吸收 spectrum을 測定하였다.

10. 個別 Caratenoid의 含量比率

전복 內臟의 acetone-methanol 抽出液을 減壓下에서 濃縮한다음 silica gel TLC板에 帶狀으로 塗付하여 Solvent A로 展開分離하였다. TLC板에 分離된 各色素帶를 유리섬유층을 낀 깔대기에 끓여낸 다음 acetone-methanol(4:1) 混合溶媒로 10ml 容量의 flask에 溶出하여 一定量으로 만들었다.

이 各 溶出液中的 1ml를 피펫으로 取하여 Mg(OH)₂ 피복 여과지에 定量的으로 塗付하고 Solvent C로 展開시켰다. 종이위에 分離된 各色素帶를 올려내서 시험관에 넣고 ethanol을 5ml 加하여 色素가 용출되도록 約 1時間 방치하였다.

얻어진 各 色素의 ethanol溶液을 Spectronics 20 colorimeter(Bausch & Lomb)로 波長 445nm에서 吸光度를 測定하고 百分比를 계산하였다.

B-6에 含有된 α- 및 β-carotene은 共存하는 無色脂質의 除去없이는 Mg(OH)₂ 피복濾過紙 chromatography로 分離되지 않기 때문에 다음과 같은 操作을 거쳐 α- 및 β-carotene을 分離하여 그 比率를 測定하였다. silica gel板에서 溶出した 色素溶液 5ml를 silica gel TLC板에 塗付하고 hexane으로 展開시켜 chlorophyll과 脂質을 除去시켰다. TLC에 의하여 精製된 二 carotene을 acetone에 녹여 Mg(OH)₂ 피복여과지에 塗付하고 hexane으로 展開시켜 α-carotene과 β-carotene을 分離하였다. 이 二 carotene의 分離帶를 각각 올려내어 앞의 方法과 같이 試驗管에 넣고 5ml의 acetone으로 溶出시켰다. 이 溶出液을 比色計로 吸光度를 測定하여 比率를 계산하였다.

結果 및 考察

전복 內臟으로부터 抽出한 carotenoid들을 hexane-95% methanol 間에 分配시키면 Fig. 2에서와 같이 hexane fraction(F-I)으로는 B-6色素(α- 및 β-carotene), chlorophyll誘導體, 微量의 B-5色素 및 微量의 B-3色素(lutein 및 zeaxanthin) 등이 移行되었고, 95% methanol fraction(F-II)으로는 極性이 큰 色素들이 移行되었다.

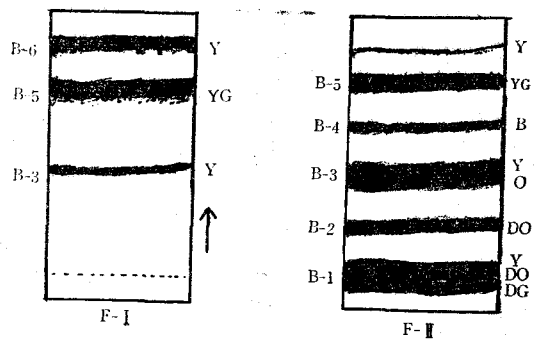


Fig. 2 Thin-layer chromatograms of pigment extracts of viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*). Developing solvent: 17% ethyl acetate in methylene chloride. Y; yellow, YG: yellow green, B: brown, O: orange, DO: dark orange, DG: dark green.

두 fraction에 들어있는 carotenoid들을 silica gel TLC로 分離하면 Fig. 2에서와 같이 F-I으로부터는 3個의 色素帶, F-II로부터는 5個의 色素帶가

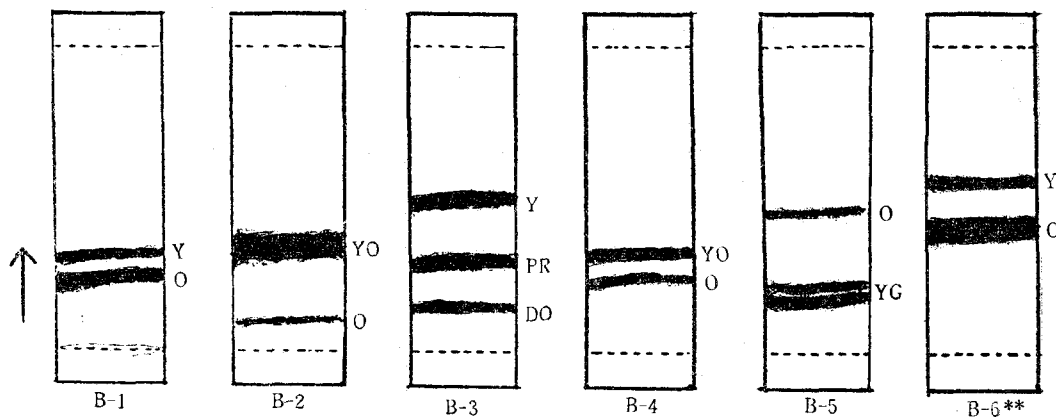


Fig. 3 $Mg(OH)_2$ paper chromatograms of the abalone pigments separated by silica gel TLC. Developing solvent: Hexane-Acetone-isoBuOH(85:15:2) and **Hexane. Y: yellow, O: orange, YO: yellow orange, PR: pink red, DO: dark orange, YG: yellow green.

얻어졌다.

앞에서 말及된바와 같이 F-I 으로부터 얻어진 두 색소帶 B-3 및 B-5는 F-II 으로부터 얻어진 두 색소帶와 一致하였다. 따라서 F-I 에서는 B-3와 B-5 두 색소를 無視하고 B-6 색소만을 얻기 위하여 展開溶媒로서 Solvent A를 使用하는 代身 hexane을 使用하였다. F-1을 hexane으로 展開하면 chlorophyll 誘導體들과 B-3 및 B-5 색소들은 原點에 吸着되고 無色脂質의 大部分은 溶媒先端으로 上昇하였다. 그리고 carotene들은 中央에 좁은 띠를 이루고 分離되었다.

silica gel TLC로 分離한 各色素들을 $Mg(OH)_2$ 피복 濾過紙 chromatography를 하면 Fig. 3와 같이 B-1으로부터 2個, B-2로부터 2個, B-3로부터 3個, B-4로부터 2個, B-5로부터 1個 및 B-6로부터 2個의 색소帶가 分離되어 모두 12個의 색소帶가 얻어졌다.

各色素帶들을 $Mg(OH)_2$ 피복 濾過紙 chromatography로 分離할 때 모두 共通의 原點 또는 그보다 조금 위에 chlorophyll 誘導體들이 吸着되어 있었고 그 위에는 微量의 carotenoid 색소帶들이 位置하고 있었다. 이것들 微量의 색소帶들은 silica gel TLC로 分離할 때 이웃하는 색소가 混入된 것이거나 또는 그때 生成된 異性體들이라고 생각된다. 이와같은 事實은 이미 여러사람들에 의하여 報告되고 있다.

Strain⁽¹⁴⁾은 여러가지 吸着劑들을 利用하여 chloroplast色素를 分離할 때 chromatography 展開 및 乾燥中에 이들 색소들이 異性質化된다는 試驗結果를 報告하였다. 그는 silica gel G, celite 545 및

kieselguhr 등 12種의 吸着劑를 試驗하였는데 그 中에도 silica gel이 色素의 異性質化를 가장 촉진하였다고 報告하였다. Zechmeister^(43,44)는 carotenoid溶液을 室溫에 數時間 放置하면 꽤 많은 量이 異性質化되며 特히 溶液을 끓이면 急速하게 異性質化된다는 實驗觀察을 報告하였다.

이와같은 事實에 비추어보아 本實驗에 있어서 不可避하였던 操作들인 抽出液의 濃縮, silica gel TLC 및 乾燥, 色素, 溶液의 放置 등은 모두 天然狀態의 carotenoid들을 異性質化시킨 要因이었다고 생각된다. $Mg(OH)_2$ 피복 濾過紙로 分離한 各色素들 中에는 이웃色素 또는 分離操作中에 生成된 異性體들이 含有되어 있었는데 이 不純色素들은 $Mg_2(OH)_2CO_3$ TLC로 쉽게 除去되었다.

silica gel TLC, $Mg(OH)_2$ 피복 濾過紙 chromatography 및 $Mg_2(OH)_2CO_3$ TLC 등을 거쳐 單離精製된 各 carotenoid들의 electronic absorption spectrum의 吸收 極大波長들을 Table 2에, 그리고 partition test와 epoxide test의 結果 및 R_f 值 등을 Table 3에 실어놓았다. B-1-1, B-2-2, B-3-1, B-4-1 및 B-4-2 등 5種의 色素는 KOH 및 $NaBH_4$ 處理에 의하여 變化를 받았고 그 中에 B-1-1 및 B-2-2 2種은 鹽酸處理에 의하여도 變化를 받았다. 이들 處理에 의하여 얻어진 生成物들의 特性은 뒤에서 個別的으로 論議될 것이다.

1. β -Carotene의 確認

B-6-1 色素는 Table 4에서와 같이 epoxide test, alkali 處理, $NaBH_4$ 處理 등에 있어서 變化를 받지 않았다. 그리고 partition test에서 hexane層으로 完全히 移行하였다. 당근에서 分離한 β -carotene과

Table 2. Spectral data of the isolated carotenoids from viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*).

Pigments	Absorption maxima (nm)			
	Hexane	Ethanol	Benzene	CS ₂
B-1-1	428, 450, 478	451		
B-1-2	422, 444, 474	426, 450, 476	435, 459, 486	475, 505
B-2-1		455		480
B-2-2	427, 450, 478	450	462	480, 507
B-3-1	449, 476	453	461	477
B-3-2	450, 478	454, 479	465, 490	484, 510
B-3-3	422, 444, 474	(426), 449, 475	459, 486	475, 505
B-4-1	449, 476	453	461	477
B-4-2	452, 478	455	465	481
B-5	449, 477	453	463	479
B-6-1	450, 477	453, 478	464, 490	485, 509
B-6-2	423, 444, 473	(426), 449, 475	460, 487	477, 505

Table 3. Partition ratio, epoxide test and R_f value of the isolated carotenoids from viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*).

Pigments	Partition ratio		R _f value			Epoxide test
	Hexane-95% Methanol	Hexane-85% Methanol	Silica gel	TLC**	Mg(OH) ₂ P.C.***	
B-1-1	0:100	0:100	0.02		0.12	Positive
B-1-2	0:100	3:97	0.04		0.15	Negative
B-2-1	0:100	9:91	0.15		0.04	Positive
B-2-2	0:100	6:94	0.14		0.35	Positive
B-3-1	3:97	15:85	0.30		0.08	Negative
B-3-2	7:93	29:71	0.25		0.30	Negative
B-3-3	6.7:93.3	31:69	0.27		0.50	Negative
B-4-1	3:97	13:87	0.30		0.08	Negative
B-4-2	11:89	37:63	0.38		0.15	Negative
B-5	33:67	74:26	0.75		0.30	Negative
B-6-1	100:0	100:0	0.45*		0.22*	Negative
B-6-2	100:0	100:0	0.45*		0.56*	Negative

* Developing solvent: Hexane

** Developing solvent: 17% ethyl acetate in methylene chloride

*** Developing solvent: Hexane-Acetone-isobutyl alcohol (85 : 15 : 2)

co-chromatography를 하면 R_f값이 일치하였다. 이 색소의 흡수 spectrum은 Fig. 4와 같이 당근에서分離한 β-carotene과 hexane용액 중에서 그 모양 및 흡수 peak가 同一하였을 뿐만 아니라 Table 4에서와 같이 ethanol용액 중에서도 일치하고 있다. 이와같은 여러가지 結果로 미루어 보아 이 B-6-1 색소는 β-carotene임을 알 수 있다.

2. α-Carotene의 確認

B-6-2 색소는 Table 4에서 같이 epoxide test, alkali處理, NaBH₄處理 등에 있어서 變化를 받지

않았다. 그리고 partition test에 있어서 hexane層으로 완전히 이행하였다. 당근에서分離한 α-carotene과 co-chromatography를 하면 R_f값이 일치하였다.

흡수 spectrum에 있어서도 당근에서分離한 α-carotene과 同一하게 hexane 溶液中에서 423, 444, 474nm에 ethanol 溶液中에서 (426), 449, 475nm에 흡수 peak를 가지고 있다. (Fig. 5, Table 4) 이와같은 몇가지 試驗結果로 미루어 보아 이 B-6-2 색소는 α-carotene임을 알 수 있다.

Table 4. Comparison of the properties of the abalone carotenoids and the authentic carotenoids.

Test	Pigment			
	B-6-1	β -Carotene	B-6-2	α -Carotene
Absorption maxima (nm)				
in Hexane	450, 477	450, 478	423, 444, 473	423, 444, 474
in Ethanol	453, 478	453, 478	(426) 449, 475	(426) 449, 475
Epoxide test	negative	negative	negative	negative
Partition ratio				
Hexane-95% Methanol	100 : 0	100 : 0	100 : 0	100 : 0
Hexane-85% Methanol	100 : 0	100 : 0	100 : 0	100 : 0
Rf value				
Silica gel TLC	0.45	0.45	0.45	0.45
Mg(OH) ₂ PC	0.22	0.22	0.56	0.56
KOH treatment	not reacted	not reacted	not reacted	not reacted
NaBH ₄ treatment	not reacted	not reacted	not reacted	not reacted

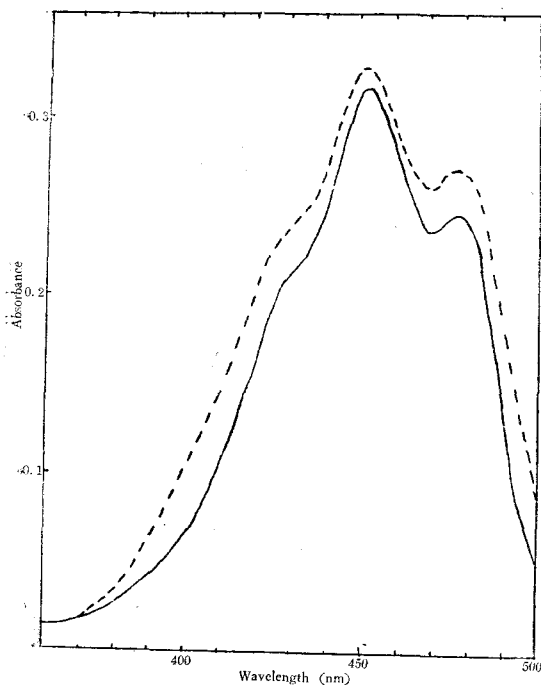


Fig. 4. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).
—; B-6-1; β -carotene

3. Zeaxanthin의 確認

B-3-2 色素는 Table 5에서와 같이 NaBH₄處理 및 alkali處理에 의하여 變化되지 않았다. 그리고 Fig. 6과 같이 吸收 spectrum의 모양 및 吸收 peak에 있어서 hexane 및 ethanol溶液中에서 모두 β -carotene과 同一하다. 이 事實은 이 色素의 chro-

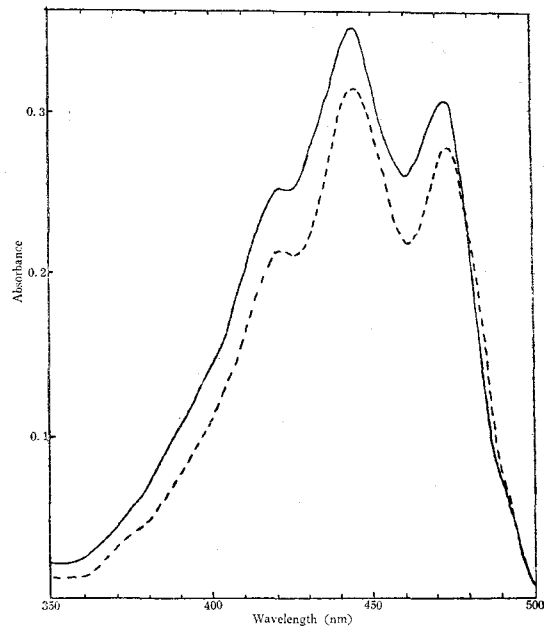


Fig. 5. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).
—; B-6-2; α -carotene

mophore가 β -carotene의 그것과 同一하다는 것을 말하여 준다. 그러나 partition test에서 보면 β -carotene보다는 훨씬 極性이 크다는 것을 알 수 있다(Table 5).

옥수수로부터 얻은 zeaxanthin과 co-chromatography를 하면 Rf值가 一致하였을 뿐만 아니라

Table 5. Comparison of the properties of the abalone carotenoids and the authentic carotenoids.

Test	Pigment			
	B-3-2	Zeaxanthin	B-3-3	Lutein
Absorption maxima (nm)				
in Hexane	450, 478	450, 478	422, 444, 474	422, 444, 474
in Ethanol	454, 479	454, 480	(426), 449, 475	(426), 449, 475
Epoxide test	negative	negative	negative	negative
Partition ratio				
Hexane-95% Methanol	7 : 93	7.5 : 92.5	6.7 : 93.3	8 : 92
Hexane-85% Methanol	29 : 71	30 : 70	31 : 69	30.2 : 69.8
Rf value				
Silica gel TLC*	0.25	0.25	0.27	0.27
Mg(OH) ₂ PC**	0.30	0.30	0.50	0.50
KOH treatment	not reacted	not reacted	not reacted	not reacted
NaBH ₄ treatment	not reacted	not reacted	not reacted	not reacted

Developing solvent: * 17% Ethyl acetate in methylene chloride

** Hexane-Acetone-isoButyl alcohol (85:15:2)

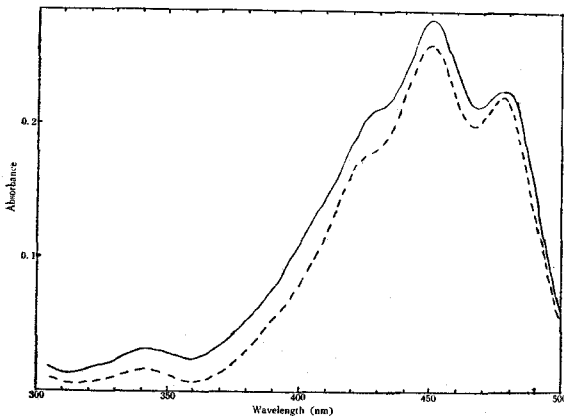


Fig. 6. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).

—; B-3-2 ; Zeaxanthin

Fig. 6. 과 같이 吸收 spectrum의 모양과 吸收 peak의 波長들이 同一하였다. 그리고 partition ratio를 보면 zeaxanthin과 거의 一致하는 것을 알 수 있다. 이와같은 結果들로 부터 이 B-3-2 色素는 OH 基 두個를 갖으면서 β -carotene과 同一한 chromophore를 갖고 있는 zeaxanthin임을 確認할 수 있다.

4. Lutein의 確認

B-3-3 色素도 B-3-2 色素와 같이 epoxide test에 陰性이고 alkali處理에 의하여 變化를 받지 않았으며 NaBH₄에 의하여 吸收 spectrum에 아무런 影響을 받지 않았다(Table 5). 이 色素는 Fig. 7에서와 같이 hexane溶液에서 422, 444, 474nm에 吸

收 peak를 갖고 있다. 그리고 다른 溶媒에서도 微細構造의 spectrum은 變함이 없었다(Table 2).

이 B-3-2 色素의 吸收 spectrum은 당근에서 分離한 α -carotene과 同一한 形態를 갖으면서 同一한 波長에 吸收 peak를 갖고 있다. 그러나 Table 5에서와 같이 partition test에 있어서는 α -carotene보다 훨씬 極性이 크다는 것을 알 수 있다.

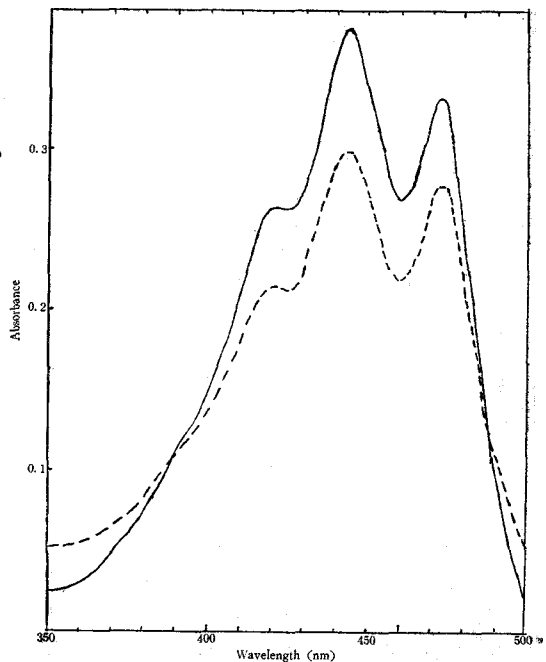


Fig. 7. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).

—; B-3-3. ; Lutein

지금까지에서 얻은 lutein과 co-chromatography를 하면 Table 5에서와 같이 同一한 Rf値를 갖는다. 따라서 이 B-3-3 色素는 α -carotene과 同一한 chromophore를 갖이면서 두개의 OH基를 갖고 있는 lutein이라고 確認할 수 있다.

5. Siphonaxanthin의 確認

B-3-1 및 B-4-1 두 色素를 精製하여 TLC 或은 $Mg(OH)_2$ 濾過紙로 co-chromatography를 하면 同一한 Rf値를 갖는다(Table 3). 그리고 이 두 色素의 吸收 spectrum은 여러가지 溶媒에서 同一한 形態를 갖이면서 同一한 波長에 吸收 peak로 갖는다. (Fig. 8, Table 2). 이와같은 結果로 미루어 보아 이 두 色素는 silica gel TLC板上에서 이웃하는 色素帶에 나누어져 있었다는 것을 알 수 있다.

Table 3에서와 같이 이들 色素는 epoxide test에서 陰性이며 partition test結果에 있어서 OH基를 두개 갖는 lutein이나 zeaxanthin보다도 더 極性

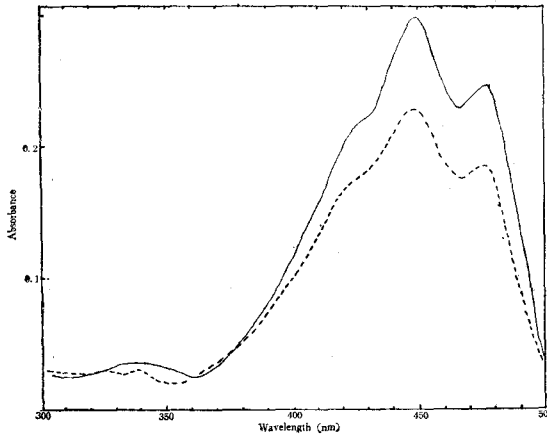


Fig. 8. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).
—; B-3-1; B-4-1

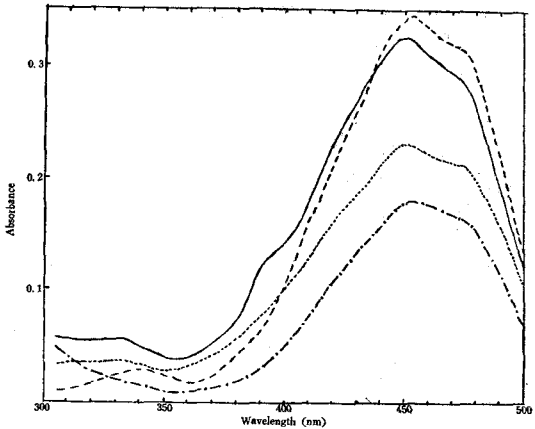


Fig. 9. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in ethanol).; B-1-1
—; B-2-2 — —; B-4-2 — · —; B-4-1

이 크다. 이 結果는 이 色素分子가 OH基를 적어도 3個以上 갖고 있다는 것을 示唆하여 주는 것이다.

이 色素는 hexane 溶液中에서 449, 476nm에 peak를 갖는 微細構造의 spectrum이 얻어지나 ethanol 溶液中에서는 Fig. 9에서와 같이 453nm에 ketocarotenoid의 特徵的인 單一 peak의 單한 吸收 spectrum이 얻어지는 것으로 보아 conjugate된 carbonyl基를 갖고 있다는 것을 알 수 있다.

이 色素를 $NaBH_4$ 로 還元시키면 Table 6에서와 같이 吸着이 強해지고 그의 吸收 spectrum은 26nm 短波長으로 吸收 peak의 移動(hypsochromic shift)이 이어난다. 이 還元生成物은 Fig. 10과 같이 ethanol 溶液中에서 405, 427, 456 nm에 吸收 peak를 갖는 微細構造의 吸收 spectrum을 갖는다. 이 事實은 主 chromophore와 conjugate된 carbonyl基가 消失되었음을 말하여주는 것이다.

Table 6. The chemical and physical data of B-3-1 (B-4-1) and B-4-2 pigment

Test	pigment	
	B-3-1 (B-4-1)	B-4-2
Absorption maxima (nm)		
in Hexane	449, 476	452, 478
in Ethanol	453	455
Reduced product by $NaBH_4$		
Absorption maxima in ethanol (nm)	405, 427, 456	406, 428, 456
Rf value by $Mg(OH)_2PC$	0.04	0.07
Product formed by KOH treatment		
Absorption maxima in ethanol (nm)	468	460
Rf value by $Mg(OH)_2 PC$	0.05	0.04

上記한 바와같은 여러가지 實驗結果를 綜合해 보면 이 色素는 Walton⁽⁴²⁾ 등이 構造를 決定한 siphonaxanthin과 같음을 알 수 있다. Walton에 의하면 siphonaxanthin의 吸收 spectrum은 約 448 nm에 單一 peak를 갖고 있으며 NaBH₄로 還元시켜 얻어진 生成物은 27nm hypsochromic shift가 일어나고 397, 421, 450nm에 吸收 peak를 갖는 微細構造의 spectrum을 갖는다고 報告하였다.

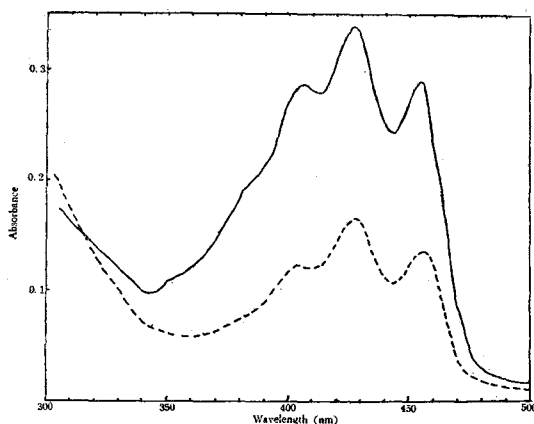
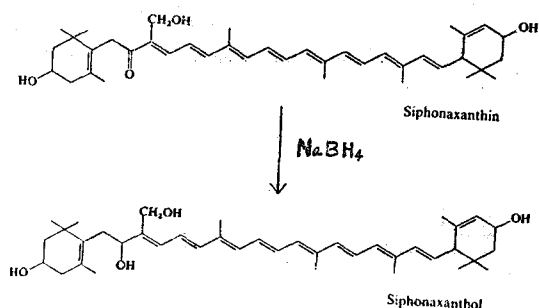


Fig. 10. Absorption spectra of the reduced pigments (in ethanol).

—; B-4-1; B-4-2

이 B-3-1 (B-4-1) 色素를 還元시키면 26nm의 hypsochromic shift가 이러나는 것은 다음과 같이 conjugate되었은 carbonyl基의 消失에서 오는 結果였으며 還元에 의하여 生成된 siphonaxanthol이 Table 6에서와 같이 siphonaxanthin보다 吸着이 強해지는 것은 當然한 結果였다고 해석된다.



이 色素를 KOH로 處理하면 變化를 받는데 이때 얻어진 生成物은 Table 6에서와 같이 吸着이 強해지고 Fig. 11의 吸收 spectrum과 같이 ethanol 溶液中에서 468nm에 單一 peak를 갖는다. Siphonaxanthin을 alkali로 處理하면 왜 15nm의 bathochromic shift가 이러나는지 그 mechanism에 關한 報告는 아직 없다.

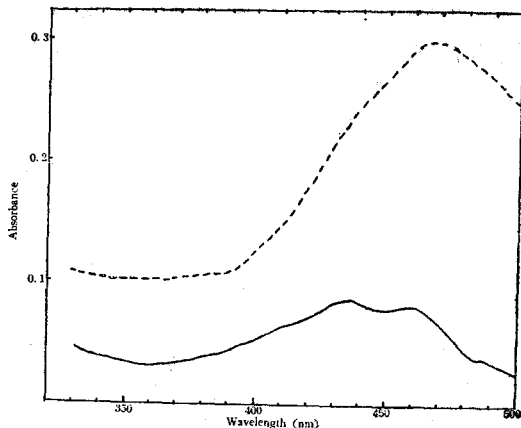


Fig. 11. Absorption spectra of the KOH treated pigments (in ethanol).

—; B-4-2; B-4-1

6. Siphonein의 確認

B-4-2 色素는 hexane 溶液中에서 452, 478nm에 吸收 peak를 갖이나 ethanol 溶液中에서는 單一 peak의 spectrum을 갖는다(Fig. 9, Table 6). 그리고 B-4-1(siphonaxanthin)보다는 여러가지 溶媒에 있어서 2~4nm씩 長波長部에 吸收 peak를 갖는다.(Table 2).

이 色素는 epoxide test에서 陰性이고 NaBH₄로 還元시키면 Table 6에서와 같이 B-4-1 色素를 환원시켜 얻은 siphonaxanthol보다 Rf值가 若干 크다. 이 色素의 還元生成物은 Fig. 10에서와 같이 406, 427, 456nm에 吸收 peak를 갖는 미세구조의 spectrum을 갖는다. 이 吸收 spectrum은 siphonaxanthin(B-4-1)을 환원시켜 얻은 siphonaxanthol의 吸收 spectrum과 꼭 같다.

Partition test의 結果를 보면 (Table 3) siphonaxanthin(B-4-1)보다 훨씬 極性が 弱하다는 것을 알 수 있다. KOH로 處理하여 Mg(OH)₂ 濾過紙 chromatography를 하면 두 斑點이 얻어진다. 그中 下部의 斑點은 B-4-1을 KOH로 處理하였을 때 生成되는 斑點과 같이 紅赤色을 띠며 이것을 ethanol로 溶出하여 吸收 spectrum을 測定하여 보면 Fig. 11과 같다.

KOH處理의 結果는 해석이 않되나 그밖에 여러 가지 結果로 미루어보아 이 B-4-2 色素는 siphonaxanthin의 脂肪酸 ester인 siphonein임을 알 수 있다.

이 B-4-2 색소가 siphonein이라면 왜 siphonaxanthin(B-4-1)과 chromophore가 同一하면서도 그것

보다 吸收 peak의 波長이 2~4nm씩 클까하는 疑問이 생긴다. 이 現象은 여러 사람들에 의하여 오래 동안 論議되여온 問題이나 Kleinig⁽⁴⁵⁾는 이 現象을 다음과 같이 해석하고 있다. siphonaxanthin分子는 C-9에 結合된 hydroxymethyl基의 遊離 OH基가 이웃에 있는 carbonyl 酸素原子와 hydrogen bonding을 通하여 chelate를 만들기 때문에 carbonyl group의 二重結合性이 部分的으로 상실되기 때문이라고 說明하였다. 그러나 siphonein分子는 C-9에 結合되여 있는 hydroxymethyl基가 高級脂肪酸과 ester 結合을 하고 있기 때문에 siphonaxanthin과 같이 分子內 hydrogen bonding을 形成할수 없게 된다. 이와같은 事實은 siphonaxanthin이 triacetate유도체로 되면 吸收 peak가 siphonein과 같어진다는 Walton⁽⁴²⁾의 研究結果에 의하여도 잘 支持되고 있다.

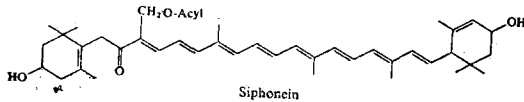


Table 6과 같이 이 siphonein의 환원물이 siphonaxanthin(B-4-1)보다 吸着力이 弱한것은 이 환원물은 아직도 CH₂-OH group에 acyl group이 結合되여 있기 때문이라고 해석된다. 그리고 siphonein(B-4-2)이 hexane-methanol system을 利用한 partition test에 있어서 siphonaxanthin(B-4-1)보다 hexane層으로 더 많이 移行되였든 것도 siphonein分子中에는 acyl group이 結合되여 있기 때문이라고 해석된다.

7. Fucoxanthin의 確認

B-2-2 色素는 Fig. 12와 같이 hexane용액에서 427, 450, 478nm에 吸收極大의 spectrum을 가지나

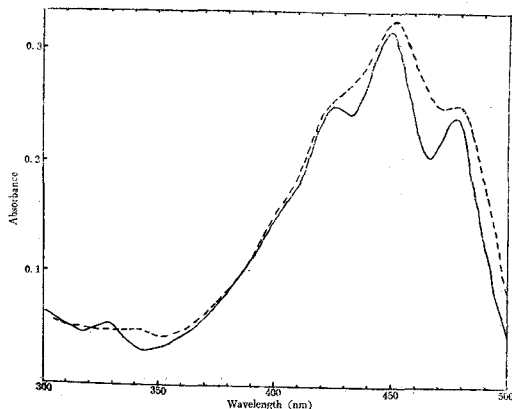


Fig. 12. Absorption spectra of the isolated carotenoids. (in hexane).
—; B-2-2 ·····; B-2-1

ethanol 용액에서는 單一peak(451 nm)의 ketocarotenoid 特有的 둔한 spectrum을 갖는다(Fig. 9).

partition test에 있어서는 hexane-95% methanol system에서 완전히 methanol층으로 移行하는 것으로 보아 OH基를 3個以上 가지고 있으리라고 추측된다.

이 色素를 NaBH₄로 환원시키면 Table 7에서와 같이 환원產物은 極성이 커지고 또 이것의 吸收 spectrum은 Fig. 13과 같이 400, 424, 451nm에 peak를 갖는다.

또 KOH로 處理하여 Mg(OH)₂ 여과지로 分離하면 Table 7에서와 같이 吸着力이 強해지며 이것을 ethanol에 녹여 測定한 吸收 spectrum은 Fig. 14와 같이 400, 424, 450nm에 吸收 peak를 갖는다. alkali處理에 의하여 일어지는 產物은 如前히 epoxide test에 陽性인 것으로 보아 分子內에 아직

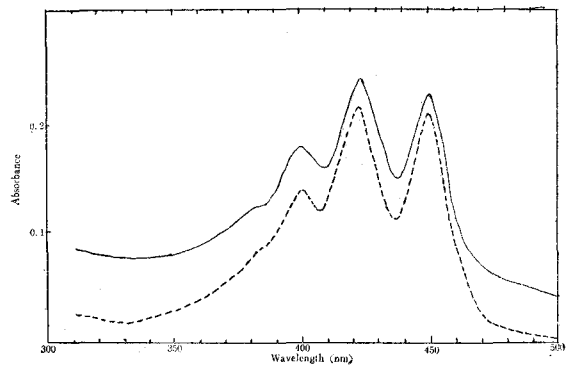


Fig. 13. Absorption spectra of the reduced pigments (in ethanol).
—; B-1-1, ·····; B-2-2.

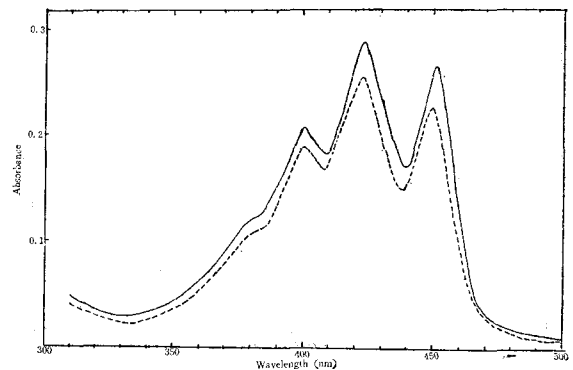


Fig. 14. Absorption spectra of the KOH treated pigments (in ethanol).
—; B-1-1, ·····; B-2-2.

Table 7. The chemical and physical data of B-1-1 and B-2-2 pigment.

Test	pigment	
	B-1-1	B-2-2
Absorption maxima (nm)		
in hexane	428, 450, 478	427, 450, 478
in ethanol	450	451
Reduced product by NaBH ₄		
Absorption maxima in ethanol (nm)	400, 424, 451	400, 424, 451
R _f value by Mg(OH) ₂ PC	0.02	0.02
Product formed by HCl treatment		
Absorption maxima in ethanol (nm)	401, 424, 451	401, 424, 451
Product formed by KOH treatment		
Absorption maxima in ethanol (nm)	400, 424, 451	400, 424, 450
R _f value by Mg(OH) ₂ PC	0.08	0.08

epoxy group을 갖고 있다고 생각된다.

Fig. 16에서와 같이 이 색소의 IR spectrum은 3615cm⁻¹에 OH-stretching band, 1740cm⁻¹에 ester 결합의 carbonyl group의 stretching band, 1660 cm⁻¹에 conjugate된 carbonyl band 및 1927cm⁻¹에 allene 결합에 의한 absorption band를 가지고 있다.

이 색소는 epoxide test에 양성이며 염산처리에 의하여 얻어진 產物을 Mg(OH)₂ 피복濾過紙 chromatography로 分離하면 原點 가까이에 吸着된 主 產物이 얻어진다. 이것을 ethanol 溶液으로 만드려 absorption spectrum을 測定하면 Fig. 15에서와 같이 401, 424, 451nm에 예민한 peak를 갖는다. 염산처리에 의한 27nm의 hypsochromic shift는 siphonaxanthin(B-4-1)을 還元시키면 carbonyl group의 消失에서 오는 波長變動과 매우 近似하다. 따라서

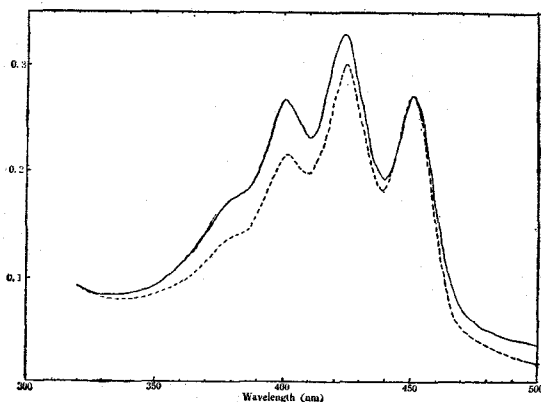


Fig. 15. Absorption spectra of the HCl treated pigments (in ethanol).
; B-1-1, —; ; B-2-2,

이 색소도 염산처리에 의하여 5,6-epoxide가 5,8-furanoid oxide로 變換될때 (46) carbonyl group이 消失이 되었다고 생각된다.

Curl⁽⁴⁴⁾ 등은 antheraxanthin(5,6-epoxide)이 염산처리에 의하여 mutatoxanthin(5,8-furanoid oxide)으로 變換될때 19nm의 波長變動이 있었고 violaxanthin(5,6,5',6'-diepoxide)이 mutatoxanthin으로 變換될때 14nm의 波長變動이 있었다고 報告하였다. antheraxanthin이나 violaxanthin에서 mutatoxanthin이 生成될 때는 conjugate된 一個의 二重結合이 消失되기 때문에 波長變動이 적었지만 B-2-2색소의 경우에는 conjugate된 carbonyl group의 消失에 起因되기 때문에 波長移動이 컸던 것으로 해석된다.

이 B-2-2 색소를 미역에서 分離한 fucoxanthin과 co-chromatography를 하면 silica gel TLC 및 Mg(OH)₂ 濾過紙 chromatography에 있어서 完全히 同一한 R_f值를 얻을 수 있었으며 absorption spectrum도 미역 fucoxanthin과 一致하였다.

위에서 들은 여러가지 實驗結果를 종합해보면 이 색소分子는 C-8炭素에 主 chromophore와 conjugate된 carbonyl group을 갖고 있고 5,6-epoxide group 및 allene 결합을 갖고 있는 fucoxanthin임을 알 수 있다.

fucoxanthin을 NaBH₄로 還元시키면 Jensen⁽⁴⁷⁾이 처음 確認한바와 같이 semifucoxanthol이 生成되기 때문에 hypsochromic shift가 이러났던 것으로 생각된다. NaBH₄에 의한 환원은 LiAlH₄와는 달리 더 선택적으로 反應하기 때문에 Bonett⁽⁴⁸⁾ 등이 fucoxanthin을 LiAlH₄로 환원시켜 얻은 fuco-

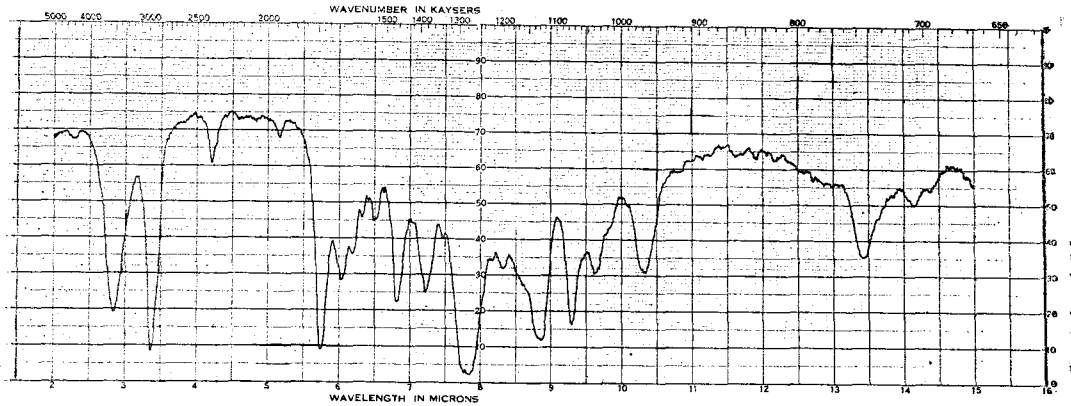
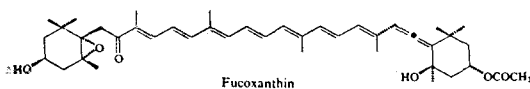


Fig. 16. IR Spectrum of B-2-2 (in KBr pellet).

xanthinol과는 달리 ester group은 환원되지 않고 conjugate된 carbonyl基團이 환원된 semifucoxanthol이 생성되는 것으로 해석된다.

Fucoxanthin을 alkali로 처리하면 HCl로 처리했을 때와 같이 hypsochromic shift가 일어나는 것은 일찌기 Heilbron⁽⁴⁹⁾에 의하여도 報告되고 있다. 그는 fucoxanthin을 alkali로 처리하면 aldol type의 反應이 일어날 것이라고 시사했을 뿐 이것을 立證하지는 못했다.

本實驗에서도 Fig. 14와 같이 alkali처리에 의하여 hypsochromic shift가 일어남을 觀察하였는데 그 反應 mechanism은 OH ion에 의하여 carbonyl group에 대하여 α-位置에 있는 水素原子가 먼저 공격받을 것이라고 생각되지만 그 다음단계 反應은 어떻게 進行되는지 分明치 않다.



그러나 fucoxanthin의 alkali處理에 의하여 얻어진 產物의 吸收 spectrum이 鹽酸이나 NaBH₄處理에 의하여 얻어진 產物의 吸收 spectrum과 同一하다는 것은 興味있는 일이다(Table 7, Fig. 13, 14, 15). fucoxanthin의 鹽酸處理에 의하여 얻어지는 fucoxanthin이 NaBH₄에 의한 還元으로 얻어지는 semifucoxanthol과 構造가 다르듯이 alkali處理에 의하여 얻어지는 產物의 構造도 다를 것이라고 생각되나 이것들 세 產物의 chromophore의 構造가 同一할 것이라는 것은 疑心할 餘地가 없다.

8. Fucoxanthinol類似物의 確認

전복 內臟에 함유된 carotenoid중에서 吸着力이

가장 강한 B-1-1 色素는 親水性이 커서 抽出중에 水層은 移行되어 상실되기 쉬웠다. 實驗中에 試料를 다룰 때마다 抽出液中에 이 色素의 濃度는 變化가 심하였다. epoxy test에서 陽性을 띠고 hexane-85% methanol 사이의 分配試驗에서 methanol層으로 완전히 移行하였다(Table 3). 이 色素의 吸收 spectrum의 모양과 吸收 peak는 B-2-2 色素의 吸收 spectrum과 같다. hexane 용액중에서는 Fig. 17에서와 같이 428, 450, 478nm에 吸收 peak를 갖는 미세구조의 예리한 spectrum이 얻어지나 ethanol 용액중에서는 Fig. 9에서와 같이 450nm에 單一 peak를 갖는 ketocarotenoid 特有의 spectrum이 얻어진다. 그리고 이 色素의 IR spectrum은 B-2-2 色素의 IR spectrum에서와 같이 1927cm⁻¹에 allene結合에 의한 吸收 band를 가지고 있다.

이 色素를 鹽酸으로 處理한 다음 Mg(OH)₂ 여과지 chromatography를 하면 出發物質 보다 Rf 値가 적은 主 色素帶를 얻을 수 있었다. 이것의 吸收 spectrum은 ethanol용액 중에서도 Fig. 15에서와 같이 401, 424, 451 nm에 吸收 peak를 갖는다. NaBH₄로 환원시키면 Table 7에서와 같이 出發物 보다 極性이 커지고 또 그 吸收 spectrum은 ethanol 용액 중에서도 Fig. 13에서와 같이 400, 424, 451m μ 에 吸收 peak를 갖는다. KOH로 處理하여 Mg(OH)₂ 여과지로 分離하면 原點附近에 강하게 吸着되는 主 色素帶가 얻어지며 이것의 吸收 spectrum은 ethanol 용액 중에서도 Fig. 14에서와 같이 400, 424, 451nm에 吸收 peak를 갖는다.

上記한 바와 같은 試驗結果들은 fucoxanthin (B-2-2)에서 얻은 結果들과 一致하고 있으나 Table 3의 silica gel TLC 및 Mg(OH)₂ 濾過紙 chromatography 들의 Rf 値와 partition test의 結

果로 보면 이 B-1-1 色素는 fucoxanthin (B-2-2) 보다도 極性이 顯著하게 크다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 點으로 보아 이 B-1-1 色素는 fucoxanthinol이라고 推定된다.

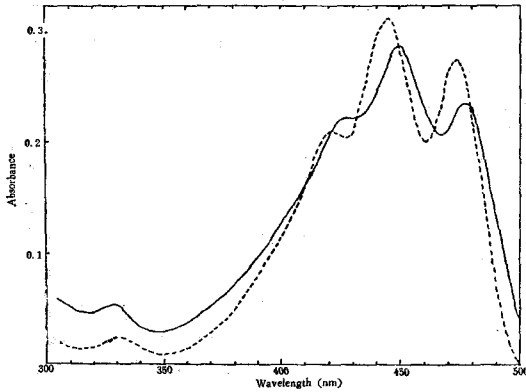
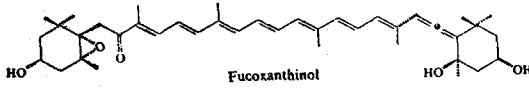


Fig. 17. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).
—; B-1-1 ; B-1-2

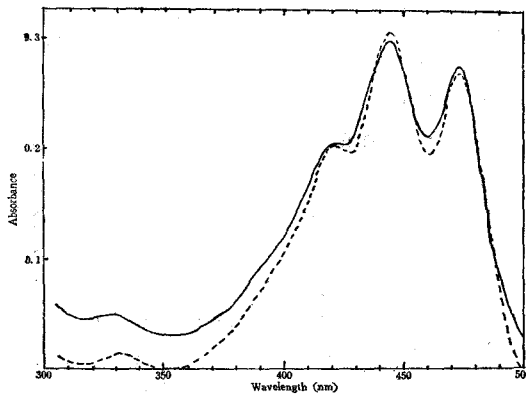


Fig. 18. Absorption spectra of the isolated carotenoids (in hexane).
—; B-3-3 ; B-1-2

9. Loroxanthin類似物의 確認

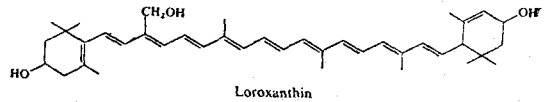
B-1-2 色素는 epoxide test에서 陰性이고 鹽酸處理, alkali處理 및 NaBH_4 處理 등에 의하여 아무 영향을 받지 않았다.

이 色素는 Fig 17에서와 같이 hexane용액에서 422, 444, 474 nm에 吸收 peak를 가지며 ethanol

용액에서도 Table 2에서와 같이 426, 450, 476nm에 吸收 peak를 갖는 것으로 보아 ketocarotenoid는 아니라고 생각한다.

이 色素의 吸收 spectrum은 Fig. 18에서와 같이 lutein의 spectrum과 그 모양 및 吸收 peak가 同一하고 Table 2에서 보면 여러가지 용매에서 lutein 및 α -carotene의 吸收 peak와 같다는 것을 알 수 있다. 따라서 이 色素의 chromophore는 α -carotene이나 lutein의 chromophore와 同一하다는 것을 알 수 있다.

上記한 바와 같은 試驗結果들 만으로 미루어 보면 α -carotene이나 lutein과 區別이 없되지만 chromatography Rf 值 및 partition test의 結果들을 보면 이 B-1-1 色素는 lutein 보다도 越等하게 極性이 크다는 것을 알 수 있다 (Table 3). 이와 같은 試驗結果는 Aitzemüller 等⁽⁵⁰⁾이 Chlorella에서 分離한 loroxanthin에 대한 試驗結果와 一致하고 있다. 그럼으로 이 B-1-1 色素는 lutein과 chromophore는 同一하고 OH 基 3 個를 가지고 있는 loroxanthin이라고 推定된다.



10. 전복 內臟의 構成 carotenoid

전복 內臟에서 分離된 11種의 carotenoid들 中 確認된 9種의 carotenoid와 그 含量比率은 Table 8과 같다.

動物體로 부터는 tunaxanthin⁽⁵¹⁾, crustaxan-

Table 8. The ratio of the content and identification of the isolated carotenoids in the viscera of abalone (*Haliotis discus hannai*).

Pigment	Identification	Relative ratio of pigment (%)
B-1-1	Fucoxanthinol-like	5.8
B-1-2	Loroxanthin-like	2.6
B-2-1	Unknown	Trace
B-2-2	Fucoxanthin	7.5
B-3-1	Siphonaxanthin	1.3
B-3-2	Zeaxanthin	14.3
B-3-3	Lutein	19.3
B-4-1	Siphonaxanthin	2.2
B-4-2	Siponein	3.1
B-5	Unknown	Trace
B-6-1	β -Carotene	39
B-6-2	α -Carotene	4.3

thin⁽⁵²⁾, fucoxanthinol, paracentrone,⁽⁵³⁾ isofucoxanthin⁽⁵⁴⁾ 등과 같은代謝産物들이 發見되고있으나 本研究에서 確認된 carotenoid들은 fucoxanthinol類似物(B-1-1)을 除外하고는 모두 海藻들 中에 含有되어 있다고 報告된 것 들이다^(55,56). 따라서 전북 內臟에 含有된 이들 carotenoid는 大部分이 바다에서 攝取한 먹이로 부터 由來된 것이라고 생각된다.

要 約

전북(*Haliotis discus hannai*)의 內臟에 含有되어 있는 carotenoid에 關하여 試驗하였다. 우리나라 近海岸에서 採取된 전북의 內臟을 acetone-methanol (4 : 1) 混合溶媒로 抽出하고 이 抽出液 中의 carotenoid를 silica gel TLC, Mg(OH)₂ 濾過紙 chromatography 및 Mg₂(OH)₂CO₃ TLC에 의 하여 分離精製하였다.

分離精製한 11種의 carotenoid에 對하여 epoxide test, partition ratio 測定, NaBH₄에 의한 還元, 알카리處理, 標準carotenoid와 比較試驗, electronic absorption spectrophotometry, 및 infrared spectroscopy 등 여러가지 試驗을 하였다.

確認된 carotenoid는 α -carotene, β -carotene, lutein, zeaxanthin, siphonaxanthin, siphonein fucoxanthin, lodoxanthin 類似物 및 fucoxanthinol 類似物等 9種이며 이 밖에 2種의 微量 carotenoid는 確認되지 못했다. fucoxanthin은 特히 KOH處理에 의하여 fucoxanthin이나 semifucoxanthin과 同一한 chromophore를 갖는 產物로 變換됨을 發見하였다. 전북 內臟에서 確認된 色素들 가운데 siphonaxanthin, siphonein, fucoxanthin, lodoxanthin 類似物 및 fucoxanthinol 類似物 등은 지금까지 貝類에서 發見되었다는 報告가 없다.

끝으로 本 研究遂行에 있어서 始終 指導鞭撻하여 주신 李泰寧 博士님께 깊은 感謝를 드립니다.

引 用 文 獻

1. Palmer L.S.: Carotenoids and related pigment. Amer. Chem. Soc. Monograph Ser. (Chemical Catalog, New York 1922).
2. Zechmeister L.: Carotenoide, Springer, Berlin 1934.
3. Karrer P. and Jucker E.: Carotenoide, Birkhauser Basle, 1948. English translation by E.A. Braude, Elsevier,

- Amsterdam (1950)
4. Isler O. (Editor): Carotenoids, F. Hoffman La Roche & Co. Ltd. Basle, Switzerland. Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart 1971.
5. Tswett M., Mer. Deut. Botan. Ges. 24, 316, 384, (1906) 26, 88 (1908)
6. Strain H.H.: Chloroplast pigments and Chromatographic Analysis, Pennsylvania. 1958
7. Goodwin T.W.: in Modern Methods of Plant Analysis, Edited by K. Peach and Tracey M.V. Springer, Heidelberg 1955 p. 273
8. Davies B.H.: in Chemistry and Biochemistry of plant pigments, Edited by Goodwin T.W. Academic Press London 1965 p. 489
9. Stahl E.: Chemiker-Zeitung 82, 323 (1958)
10. Bobbit J.M.: Thin Layer Chromatography, Reinhold, New York 1963.
11. Bolliger H.R. and König A.: in Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook Edited by Stahl E. 2nd Ed. Springer, Heidelberg 1969. p. 266
12. Strain H.H., Sherma J. and Grandolfo M.: Anal. Biochem. 24, 54 (1968)
13. Nelson J.W. and Livingston A.L.: J. Chromatography 28, 465 (1967)
14. Strain H.H., Sherma J. and Grandolfo M.: Anal. Chem. 39, 926 (1967)
15. Karrer P. and Jucker E.: Helv. Chim. Acta 28, 300 (1945)
16. Kuhn R. and Möller E.F.: Angew. Chem. 47, 145 (1934)
17. Kuhn R. Winsterstein A. and Karlovitz L.: Helv. Chim. Acta 12, 64 (1929)
18. Kuhn R. and Ehmann L.: Helv. Chim. Acta 12, 907 (1929)
19. Aasen A.J. and Liaaen-Jensen S.: Acta Chem. Scand. 20, 1970 (1966)
20. Leftwick A.P. and Weedon B.C.L.: Chem. Commun. 1967, 49
21. Hertzberg S. and Liaaen-Jensen S., Phytochem. 8, 1259 (1969)
22. Entschel R. and Karrer P.: Helv. Chim. Acta 41, 402 (1958)
23. Barber M.S., Davis J.B., Jackman L.M. and Weedon B.C.L.: J. Chem. Soc. (C) 1960,

24. Budzikiewicz H, Djerassi C, and Williams D.H.: *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, San Francisco. 1967.
25. Goodwin T.W.: *Biochem. et Biophys. Acta* **10**, 114 (1953).
26. Campbell S.A. *Comp. Biochem. Physiol.* **32**, 97 (1970).
27. Shimizu Toshi Uchida K.: *Nippon Suisan Gakkaishi* **34**, 154 (1968)
28. Shimizu Toshi, Monma Reiko.: *Nippon Suisan Gakkaishi* **34**, 159 (1968).
29. Shimizu Toshi: Narahara Teruko: *Nippon Suisan Gakkaishi* **34**, 503 (1968)
30. Shimizu Toshi and Oda Ai: *Nippon Suisan Gakkaishi* **34**, 627 (1968).
31. Ohta, Yohko: *Nippon Suisan Gakkaishi* **34**, 210 (1968).
32. Lee Kang-Ho and Kim Chong-Bae: *Chayon Kwahak* **11**, 57 (1971).
33. Tae-Young Lee: Unpublished
34. Hayashi K., Yamada M.: *Nippon Suisan Gakkaishi* **38**, 255 (1972).
35. Konosu S., Mori T.: *Nippon Suisan Gakkaishi* **25**, 153 (1959-60).
36. Michael E.Q. Piloson: *Biol. Bull.* **128**, 459 (1965).
37. Stahl E.: *Thin-layer chromatography* p-268, 2nd Edition Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, New York (1969).
38. Tae-Young Lee: *Bull. Sci. Res. Inst.* **2**, 1 (1957).
39. Nitsche H. and Egger K.: *Phytochem.* **8**, 1577 (1969).
40. Petracek F.J. and Zechmeister L.: *Anal. Chem.* **28**, 1484 (1956).
41. Curl A.L. and Bailey G.F.: *J. Agr. Food Chem.* **2**, 685 (1954).
42. Walton T.J., Britton G. and Goodwin T.W.: *Phytochem.* **9**, 2545 (1970).
43. Zechmeister L. and Tuzson P.: *Biochem.* **32**, 1305 (1938).
44. Zechmeister L. and Polgar A.: *J. Amer. Chem. Soc.* **65**, 1522 (1943).
45. Kleinig H. and Egger K.: *Phytochem.* **6**, 1681 (1967).
46. Karrer P.: *Helv. Chim. Acta* **28**, 474 (1945).
47. Jensen A.: *Acta Chem. Scand.* **18**, 840 (1964)
48. Bonnett R., Mallams A.K., Spark A.A., Tee J.L. and Weedon B.C. L.: *J. Chem. Soc.(C)* 1969, 429.
49. Heilbron I.M. and Phipers R.F.: *Biochem. J.* **29**, 1369 (1935).
50. Aitzetmüller K., Strain H.H., Svec W.A., Grandolfo M. and Katz J.J.: *Phytochem.* **8**, 1761 (1969).
51. Crozier G.F. and Wilkie D.W.: *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 801 (1966).
52. Czygan F.C.: *Z. Naturforsch. B* **23**, 1367 (1968).
53. Hora J., Toube T.P. and Weedon B.C.L.: *J. Chem. Soc. (C)* 1970. 241
54. Jensen A.: *Poultry Sci.* **42**, 912 (1963).
55. Strain H.H., and Sherma J.: *J. Chromatography* **73**, 371 (1972).
56. Jeffrey S.W.: *Biochem. J.* **80**, 336 (1961).