

새우의 Carotenoid成分에 관한 考察

李 仁 吉

서울保健專門大學

Studies the Carotenoids in the Viscera of the Brine Shrimp (*Penaeus Orientalis Kishinouye*)

In Kil Lee

Seoul Health Junior College

ABSTRACT

The studies on the carotenoids in the viscera the brine shrimp(*Penaeus Orientalis Kishinouye*) have been carried out. The brine shrimps were caught around the western coastal area of Korea from Aug. to Oct.

The individual carotenoids in the acetone extracts were separated and purified by the silica gel TLC. Two isolated carotenoids were investigated and identified by epoxide test, partition test, alkaline hydrolysis, reduction with sodium borohydride and visible absorption spectrophotometry.

As the results of the series of experiments, esterified Astaxanthin was discovered as one of main pigments of *Penaeus Orientalis Kishinouye*.

I. 緒 論

黃色 또는 赤色色素인 Carotenoids는 動·植物에 널리 分布되고 있어, 일찌기 Karrer⁹⁾, Kuhn¹⁴⁾, Zechmeister^{11,13)} 등의 實驗으로 이들의 構造가 밝혀졌으며, Karrer⁹⁾ 등은 β -carotene을 合成하였다.

1960年以後 TLC, Vis, UV, IR, Mass, 高分解能 NMR 및 GC 등의 分析法의 發展으로 Carotenoids의 構造가 解明 및 修正되었다.

最近 甲殼類 및 invertebrates에서 carbonyl, hydroxyl 基를 갖는 Carotenoids의 研究가 活發하다. Fox⁶⁾는 말미잘類인 *Meridium*의 卵과 內臟에서 高級脂肪酸의 Astaxanthin ester, Zeaxanthin ester를 分離·同定했고, Gilchrist는 *Chirocephalus diaphanus*에서 Astaxanthin ester을, *Branchipus stagnalis*와 *Branchinecta packardi*에서 Astacene을, *Tanyastix lacumae*에서 Astacene과 Astaxanthin ester를 分離·同定했다. 또한 Astaxanthin ester과 Astacene은 *Artemia salina*

na (brine shrimp)에서는 없고, *Artemia salina*에게純粹한 β -carotene을 주어 *Echinon*이中間物質이 되어 *Canthaxanthin*이最終物質로 되는生體內合成機作을 C-14을利用해서 糾明했다.⁴⁾ *Labidocera acutifrons*에서 *Astaxanthin*을包含한靑色 carotenoprotein을分離·精製한報告¹²⁾가 있으며 Lee¹⁰⁾, Ahn¹¹⁾은貝類에서 몇가지 Carotenoids를分離·同定했으나,本研究의主題인 *Penaeus orientalis* *Kishinouye*는報告된 사실이 없다.

本研究에서는 새우內臟中赤色部分에含有的 Carotenoids에서 *Astaxanthin ester*를確認하여報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料 및 試藥

實驗材料인 새우(*Penaeus Orientalis* *Kishinouye*)는西海岸에서 8~10月 사이에 잡히는 것을韓國冷藏에서 購入해서 冷凍器에서 24時間 얼면서 使用했고, 試藥은 E. Merck製 *Kieselgel nach stahl* (SiO_2 G)과 日本 cica製 벤젠, *n*-헥산, 에탄올, 에테르, 아세톤, 메탄올, 초산, 에틸을 使用했고, 測定器機는 Varian Techtron 635 Spectrophotometer를 利用해서 visible spectrum을 얻었고, Fischer Scientific Rotary Evaporator로 減壓蒸溜하였다.

分離는 冷凍狀態에서 새우內臟을 分離後靑色部位를 除外한赤色部位만을 아세톤으로 暗所에서 溶出시켰다(24時間以上).

아세톤 混濁液을 Büchner funnel로 濾過後 減壓蒸溜하여 얻어진 黑赤色 液體를 少量의 *n*-헥산에 녹여 使用했다. TLC板은 유리판(20×20cm)에 silica gel을 蒸溜수로 乾후 applicator로 0.5mm 두께로 입힌 후 drying oven에서 105°C로 30分間 活性化시킨 후 使用했다. 이때 사용한 전개용매는 Table 1과 같다.

Table 1. Chromatographic developing solvents.

Code	Ratio of the solvent (V/V)
Solvent A	<i>n</i> -Hexane (45) : Benzene (45) : MeOH (2)
Solvent B	Acetone (4) : <i>n</i> -Hexane (6)
Solvent A	Benzene (70) : Et-acetate (25) : MeOH (5)

2. 化學的 方法

Epoxide test (Karrer⁹⁾) : 試驗管에서 各色素의 ether溶液 1m^l와 진한 鹽酸 0.5m^l를 混合後 鹽酸層의靑變與否를 觀察하였다.

알칼리 加水分解 : 分離된 Carotenoids 溶液들을 마개가 있는 試驗管에 넣고 減壓下에서 溶媒를 蒸發시킨後 10% KOH-EtOH 溶液을 加하고, 暗所에서 12時間 放置한 후 分액갈때기로 ether 抽出하였다. 이때 少量으로 鹽析하여 加水分解된 色素를 ether層으로 完全 移動시킨 후 이를 물로 2回 洗滌하고 無水 Na_2SO_4 로 完全 脫水한 후 濃縮하여 TLC로 再次 展開했다.

分配試驗 (Zechmeister¹³⁾) : 少量의 色素를 마개가 있는 9m^l들이 試驗管에 넣고 질소개스로 溶媒를 除去한 후 미리 *n*-헥산으로 飽和시킨 95% MeOH를 4m^l 넣고 溶解시켰다. 여기에 95% MeOH로 飽和시킨 *n*-헥산을 4m^l 더 加하여 密封한 후에 上下로 20回 서서히 뒤집어 흔들어서 色素를 두 溶媒 사이에 分配시킨 다음 上下 2層을 各 溶媒의 最大吸收波長에서 分配比를 計算했다.

還元 : 分離한 色素를 에탄올溶液에서 NaBH_4 와 1時間 反應시킨 후, 이를 少量의 물과 함께 分액갈때기에 옮기고 ether로 抽出했다. 이때 少量의 물로 鹽析시켜, 色素가 包含된 ether層을 물로 洗滌하고, 이 ether層을 無水 Na_2SO_4 로 脫水後 減壓 濃縮했다.

Ⅲ. 結果 및 考察

새우 內臟 抽出液을 溶媒 A로 展開하여 얻은 結果는 Table 2와 같았다. Rf 値가 적은 것을 0으로 하고 Rf 値의 增加順으로 番號를 주었다.

Table 2. The results of the pigment extract from the viscera.

No.	Rf	Color
0	0.00	yellowish-brown
1	0.12	pale pink
2	0.40	orange
3	0.55	reddish purple
4	0.68	dark orange
5	0.78	pale yellow

展開된 色素띠를 유리分取器具로 끊어내어, 색소 3, 4, 5는 n-헥산으로, 0, 1, 2는 아세톤으

로 溶出시켰다. 이들의 吸收 spectrum과 epoxide test 結果는 Table 3과 같다.

Table 3. Spectral data of the isolated carotenoids from the viscera.

Pigments	Absorption maxima(nm)		Epoxide test		
	EtOH	n-Hexane			
0	666*	605	668	—	
1	666	472*	666	456*	—
2	479	470	470	—	—
3	472	461	461	—	—
4	482	471	471	—	—
5	460	450-472	450-472	—	—

* main

分離된 모든 色素를 보다 精製하기 爲해 溶媒 B로 再展開시켜 Table 4와 같은 結果를 얻었다.

가장 많은 色素로 推定되는 4-2와 4-3 色素에 對한 spectrum과 分配試驗結果는 Table 5와 같다.

Table 4. TLC data of the shrimp pigments separated by solvent B.

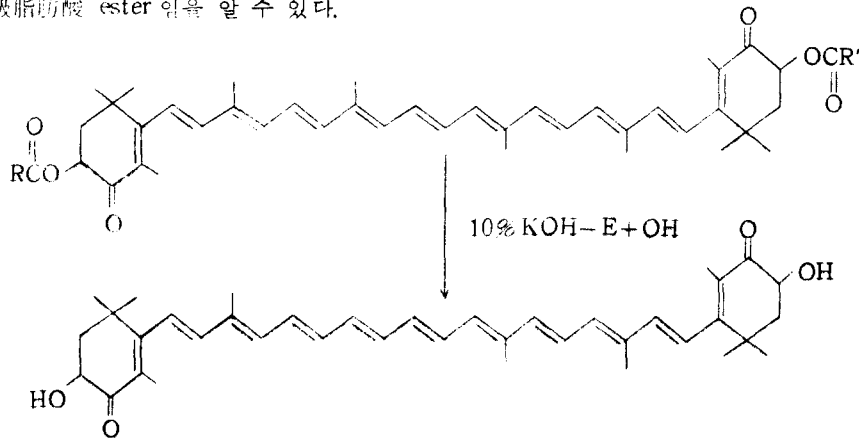
Pigments	Rf	Color	備	考
0	0.00	yellowish brown	不 動	
	0.52*	yellow	띠폭 넓음 : 1, 2, 3, 4의 微量色素와 類似	
1	0.00*	yellowish brown	不 動	
	0.45	pink	띠폭 넓음 : 0에서는 보이지 않음	
	0.52	yellow		
2	0.00	yellowish brown		
	0.50	yellow		
	0.56*	orange	0, 1, 3, 4, 5 : 보이지 않음	
3	0.00	yellow		
	0.57	yellow		
	0.60	pale red	매우 적음	
4	0.00	yellow		
	0.55	yellow		
	0.66	dark red	} 分離分明·同形의 진한 赤色	
	0.70	dark red		
5	0.80	yellow	單一色素	

Table 5. Spectral data of the isolated pigments.

Pigments	Absorption maxima(nm)				Partition test
	CHCl ₃	C ₆ H ₆	EtOH	n-C ₆ H ₁₄	n-C ₆ H ₁₄ : 95% MeOH
4-2	490	488	482	472	97:3
4-3	491	458	482	471	98:2

특히 spectrum 은 Fox⁶⁾의 Astaxanthin ester와 매우 類似하며 特有的 幅이 넓은 左右 對稱인 單一 peak였다. Table 5의 結果를 통하여 高級脂肪酸 ester임을 알 수 있다.

이 色素들을 10% KOH-EtOH 溶液으로 12時間 加水分解시켜 ether抽出한 후 물로 洗滌해서 前과 같이 乾燥·減壓濃縮시켰다.



다시 溶媒 C로 TLC 展開하여 各各 2가지 band를 얻었는데 Rf 값이 작은 band를 4-2-A-0과 4-3-A-0, Rf 값이 큰 band를 4-2-A-1과 4-3-A-1로 定하고 溶媒系를 利用하여 Fox⁶⁾와 Davies⁶⁾가 報告한 Astaxanthin의 Rf 値와 比較 검토한 결과 Rf 値가 큰 것들만이 Astaxanthin이라고 推定할 수 있으므로 이들만을 대상으로 하여 spectrum

과 分配試驗을 하였다(Table 6, Fig. 1).

이러한 結果로 보면 4-2-A-1과 4-3-A-1과 4-3-A-1은 거의 同一物質로 Astaxanthin이라고 推定할 수 있었다.

다시 이들 두 色素를 還元시켜, 即 Astaxanthin을 NaBH₄-EtOH로 還元시킨 4-2-A-1-R과 4-3-A-1-R(3, 4, 3', 4'-tetrahydroxy-β-carotene으로 推定)은 λ_{max}

Table 6. Comparison of the properties of 4-2-A-1 and 4-3-A-1 with Astaxanthin.

Pigments	Absorption maxima (nm)				Partition test
	CHCl ₃	C ₆ H ₆	EtOH	n-C ₆ H ₁₄	n-C ₆ H ₁₄ : 95% MeOH
4-2-A-1	490	482	477	470-472	4:96
4-3-A-1	489	482	477	470-471	5:95
Astaxanthin	488 ^{a)}	—	—	470-475 ^{b)}	—

a) Fox b) Zagalsky

이 約 24-26 nm에서 靑色으로 移動되는데 이것은 4-hydroxy- β -carotene과 Echinonon에서는 約 8 nm의 靑色移動된 結果와 많은 差를 나타내는데, 이는 3,3'에 있는 hydroxy group의 영향으로 推定할 수 있겠다.

以上の 結果로 볼 때 4-2-A-1-R과 4-

3-A-1-R은 確實히 同一物質이고, 4-2-A-1과 4-3-A-1도 同一物質로서, Astaxanthin이라고 할 수 있으므로 4-2와 4-3의 色素는 各其 脂肪酸만 다른 同一系列의 Astaxanthin ester임을 알 수 있다.

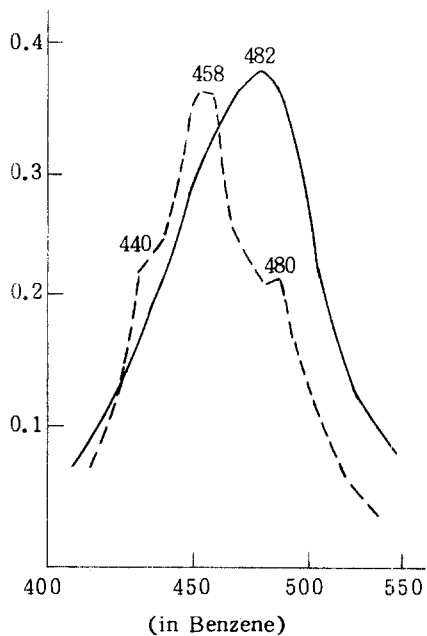
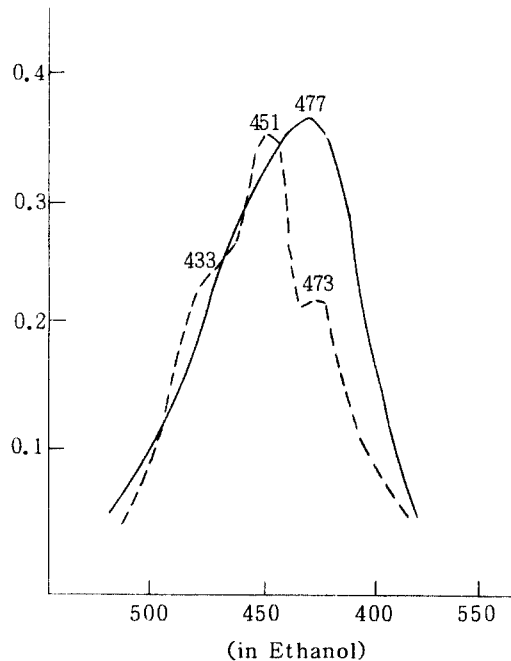
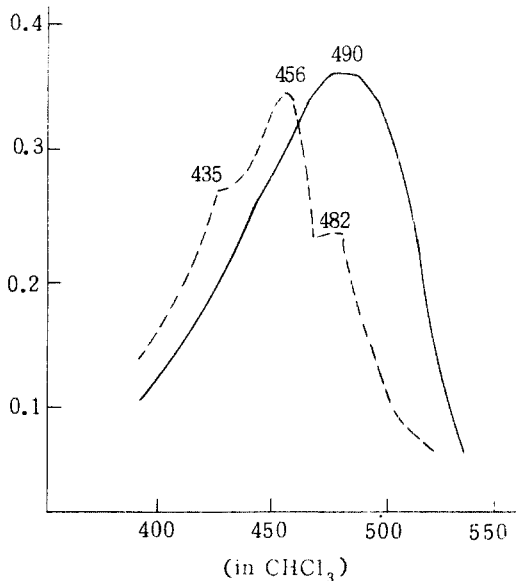


Fig. 1. Visible absorption spectra of the pigments 4-2-A-1 (—line) and reduced 4-2-A-1 (4-2-A-1-R) (.....line)

* The visible absorption spectra of 4-3-A-1 and reduced 4-3-A-1 (4-3-A-1-R) were the same data.

IV. 結 論

새우의 內臟을 아세톤으로 抽出한 液을 TLC로 分離·精製한 후 epoxide test, 알칼리 加水分解, NaBH_4 還元, 分配試驗, Vis·spectrum을 利用하여 色素를 確認하였다.

實驗結果 主 色素는 Astaxanthin ester 이라고 사료되며 적어도 2가지 以上の 脂肪酸 ester 이 存在한다는 것이 糾明되었다.

參 考 文 獻

- 1) Ahn, S.Y. : J. Korean Agricultural Chemical Society, 17: 4(1974).
- 2) Cheesman, D. F, Lee, W. L. & Zagalsky P. F. : Biol. Rev. 42(1967).
- 3) Choi, K.S. : Studies on the Carotenoids in the *Mytilus edulis* (1975).
- 4) Davies, B.H, Hsu, W.J. & Chichester: Comp. Biochem. Physiol., 33, 601 - 615 (1970).
- 5) Egon Stahl : TLC, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. (1969).
- 6) Fox, D. L., Crozier, G.H. & Smith, V. E. : Comp. Biochem. Physiol., 22, 177 - 188 (1967).
- 7) Fox, D.L. : *ibid.* 44, 953-962 (1973).
- 8) Hsu, W.J. Chichester, C.O. & Davies, B.H. : *ibid.* 32, 69-79 (1970).
- 9) Karrer, P. & Jucker, E : Carotenoids, Birkhauser Basle, 1948, Eng. transl. by E.A. Braude Elsevier Amsterdam (1950).
- 10) Lee, T.Y. : Unpublished.
- 11) Petracek, F.J. & Zechmeister, L : Anal. Chem. 28, 1484 (1956).
- 12) Zagalsky, P.E. & Herring, P.J. : Compd. Biochem. Physiol., 41B, 397-415 (1972).
- 13) Zechmeister L. : Carotenoids, Springer, Berlin (1934).
- 14) Kuhn., Lederer : Ber. 64. 1349 (1931).