

## 멍게 껍질로부터 분리정제한 적색 Carotenoprotein의 특성

### 2. Carotenoid의 화학구조

강옥주\* · 서명자\*\* · 이안중 · 김세권†

부산수산대학교 화학과  
동주여자전문대학 식품영양과\*  
부산대학교 식품영양학과\*\*

## Purification and Characterization of the Red Carotenoprotein from the Skin of Ascidian, *Halocynthia roretzi* 2. Chemical Structure of Carotenoid

Ok-Ju Kang\*, Myung-Ja Suh\*\*, An-Jong Lee and Se-Kwon Kim†

Dept. of Chemistry, Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea  
Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-ju Women's Junior College, Pusan 604-080, Korea\*  
Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 608-735, Korea\*\*

### Abstract

Carotenoids liberated from the red carotenoprotein from the skin of ascidian(*Halocynthia roretzi*) were developed on TLC, and two bands were obtained with different R<sub>f</sub> values. Their chemical reactivities and spectroscopic properties were studied and elucidated as astaxanthin diester and astaxanthin monoester. After saponification of carotenoid ester, GC analysis was performed. The carotenoid ester contained oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid as 50% of total amount, and had higher content of unsaturated fatty acid including eicosapentanoic acid than saturated fatty acid.

*Key words* : red carotenoprotein, chemical reactivity, spectroscopic property

### 서 론

Carotenoids는 생체내에서 지질 및 단백질과 회합함으로써 carotenoprotein의 복합체를 형성하여 존재하는 것으로 알려져 있으나 동물의 착색반응에 관여하는 대사기구, 결합의 본성, 체내의 순환, 생리적인 조절기능과 작용 메카니즘은 아직도 확실히 밝혀져 있지 않다. 그러나 carotenoids가 단백질과 결합되어 안정한 구조를 이룰 때 분광학적 특성에 영향을 주는 인자로서는 편광화, enol화 및 polyene 사슬의

비틀림 등 몇 가지 이론이 제시되고 있다.

Carotenoprotein의 구성성분인 carotenoid에 관한 연구로서 Shone 등<sup>1)</sup>은 불가사리(*A. rubens*)에서 분리한 적색 carotenoprotein의 carotenoid 성분으로 astaxanthin과 그 acetylenic carotenoid인 7,8-dihydroastaxanthin 및 7,8,7',8'-tetrahydroastaxanthin 등 3종류를 확인하였고, Cheesman과 Prebble<sup>2)</sup>는 게(*H. tridens*)의 알과 난소에서 적색 carotenoprotein을 분리하였는데 단백질의 보호그룹으로 작용하는 물질이 astaxanthin이라고 하였다. 또한

† Corresponding author

Milicua 등<sup>3)</sup>은 가재 껍질(*A. leptodactylus*)로부터 분리한 노란색 carotenoprotein의 보결분자단으로 astaxanthin과 zeaxanthin이 1 : 1 비로 존재한다고 하였고, Zagalsky 등<sup>4)</sup>은 해양무척추동물의 carotenoprotein을 구성하는 carotenoid는 주로 astaxanthin 및 그유도체로 이루어져 있다고 보고한 바 있다.

본 연구는 우리나라 근해에서 생산되는 멧게 껍질에 존재하는 carotenoprotein의 구성성분, 즉 단백질과 회합하고 있는 carotenoids를 여러가지 화학반응(NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원반응, I<sub>2</sub>에 의한 광학 이성질화반응, 아세틸화반응, 에폭시기 확인 등)과 UV/Vis, IR, NMR 및 MS 측정 등으로 그 구조를 밝혔다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

본 실험에 사용한 멧게는 부산 충무동 공동어시장에서 구입하여(평균중량 205g, 평균각장 11.5cm, 평균각고 6.2cm) 빙장상태로 저온실(0±4℃)에 운반 후 수도물로 씻고, 육과 껍질을 분리하여 껍질만을 채취한 시료를 전보<sup>5)</sup>에서와 같은 방법으로 정제한 carotenoprotein을 -20℃에 냉동 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

#### Carotenoid의 추출

Khare 등<sup>6)</sup>의 방법을 변형하여 carotenoprotein으로부터 carotenoid를 추출하였다. 즉 정제된 carotenoprotein의 인산염 완충용액에 3배량의 acetone을 가하고 균질기로 교반하여 단백질로부터 carotenoid를 유리시켰다. 모든 실험은 광선을 피하여 4℃냉암소의 어두운 적색등 밑에서 수행하였다. 단백질이 색깔을 띠지 않을 때까지 위의 조작을 반복한 다음 carotenoid의 추출액을 모두 합쳤다. 이 추출액을 분액여두로 옮긴 다음 여기에 석유에테르를 추출액과 1 : 2 (v/v) 비로 가하여 친천히 흔들어 주고 30분간 방치시켜 carotenoid를 분리하였으며, 하층액을 2차 분액여두로 옮겨 석유에테르로 전용하는 과정을 3회 반복하여 얻어진 상층액과 합친 후, 탈이온수로 여러번 세척하여 carotenoid를 석유에테르 층으로 옮긴 다음, 이 용액에 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(30g)를 처리하여 여과하였고, 그 여액을 질소기류하에서 회전진공 농축기로 감압농축하여 총 carotenoid를 얻었다. 총 carotenoid의 함량은 McBeth<sup>7)</sup>의 방법에 따라 흡광계수 E<sup>1%<sub>1cm</sub></sup> =

2,500으로 하여 451nm에서 석유에테르를 용매로 흡광도를 측정하여 계산하였다.

#### Carotenoid의 분리 및 정제

다량의 시료 분취용으로 silica gel G가 2mm 두께로 코팅된 Merck사 제품의 유리 TLC판(20×20cm)을 사용하였고 화학반응의 확인용으로는 0.25mm의 알루미늄 TLC판(20×20cm)을 각각 사용하였다. 상법에 따라 TLC판은 110±5℃의 전기오븐 속에서 활성화시켜서 사용하였고 1차 전개 용매로서는 acetone / petroleum ether(3 : 7, v/v)용매, 2차는 benzene / diethyl ether / methanol(17 : 2 : 1)용매를 각각 사용하였다. TLC상에 1차로 분리된 carotenoid를 유리섬유를 단단히 긴 감압분취장치로 끊어낸 다음 methanol로 carotenoid를 용출하였다. 용출된 carotenoid들은 40℃ 이하에서 감압농축시킨 다음 질소층진하에 초저온 냉동고(-80℃)에 보관해 두고 실험에 사용하였다.

#### Carotenoid의 화학 반응성

##### (1) NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원반응

Walton 등<sup>8)</sup>의 방법에 따라서 ethanol에 녹인 carotenoid용액 1ml에 1mg NaBH<sub>4</sub>를 가하여 1 시간 동안 환원 반응시켰다. 색깔의 변화로 반응의 진행을 확인한 다음에 소량의 증류수를 가하고 diethyl ether로 색소를 추출한 다음 농축하였다. 환원생성물은 ethanol에 용해하여 앞서와 같은 TLC법으로 반응 전후의 TLC거동과 최대 흡수파장(350nm~600nm)의 영향을 관찰하였다.

##### (2) I<sub>2</sub>에 의한 광학적 이성질화반응

Chapman 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라서 petroleum ether에 녹인 carotenoid용액에 0.1% I<sub>2</sub> / petroleum ether용액을 한방울 넣고 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 색깔의 손실을 관찰한 다음 가시부 흡수 스펙트럼(350nm~600nm)을 측정하였다.

##### (3) 아세틸화반응

분자내 1차 또는 2차 hydroxyl group이 존재하는지를 확인하기 위하여 Schiedt 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라서 아세틸화 반응을 시행하였다. 즉 pyridine에 녹인 carotenoid용액 1ml에 acetic anhydride 1ml를 넣고 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 차가운 증류수를 가하여 반응을 정지시킨 다음

diethyl ether로 색소를 추출하여 앞서와 같은 TLC법으로 에스테르반응을 확인하였으며 pyridine 용액에서 흡광도 (350nm~600nm)를 측정하였다.

(4) Epoxy group의 확인

Carotenoid 분자들이  $\beta$ -ionone 고리의 5,6- 또는 7,8- 위치에 epoxy group을 갖고 있는지의 여부를 조사하기 위하여 Karrer<sup>11)</sup>의 방법에 따라서 실험하였다. 즉 일정량의 carotenoid를 녹인 diethyl ether용액을 진한 염산과 반응시킬 때 청색으로 변화하는지를 관찰한 다음 ethanol용액에서 흡광도(350nm~600nm)를 측정하였다.

(5) Allylic hydroxyl group의 확인

Carotenoid 분자속에 있는 allylic hydroxyl group의 확인은 Liaaen- Jensen 등<sup>12)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉 carotenoid의 diethyl ether용액에서 용매를 날려 보내고 실온에서 0.01N HCl / methanol로 2시간 동안 반응시킨 다음 앞서와 같은 TLC법으로 TLC상에서 R<sub>f</sub>값의 차이를 비교하였다.

(6) 비누화반응

일정량의 carotenoid ester에 5% KOH / 90% methanol용액을 가하여 실온으로 암소에서 1시간동안 비누화시키고 diethyl ether로 추출하여 반응 전후의 특성을 앞서와 같은 TLC법으로 조사하였다.

UV/Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR 및 MS 분석

Carotenoprotein을 구성하고 있는 carotenoid의 구조를 결정하기 위하여 UV/Vis spectrophotometer는 Shimadzu U-3210 (Tokyo, Japan)을, 적외선 흡수 spectrum는 Shimadzu IR-408 (Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 수소 핵자기 공명 spectrum은 Bruker AM-300(300MHz)을 사용하여 측정하고 내부표준물질로 tetramethylsilane을 사용하였고, GC/MS는 Shimadzu GC-14A spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

지방산 분석

Esterified carotenoid를 TLC로 순수하게 분리하여 검화시킨 다음, 10% BF<sub>3</sub>-MeOH 3ml를 가하여 95°C에서 15분간 환류가열하여 지방산 methyl ester를 조제한 후 gas chromatography(Shimadzu GC-14A, Tokyo, Japan)로 분

석하였다. 그리고 각 지방산의 동정은 표준 지방산 methyl ester의 retention time과의 비교 및 지방산의 이중 결합수와 retention time과의 상관그래프를 이용하였다.

결과 및 고찰

Carotenoids 분리 및 정제

전보<sup>5)</sup>에서 분리정제한 carotenoprotein을 저온(4°C)에서 acetone으로 처리하여 단백질을 변성시키고 유리된 carotenoid를 TLC상에서 전개용매 acetone / petroleum ether(3 : 7, v/v)를 사용하여 분리하였을 때 Fig. 1과 같이 R<sub>f</sub>=0.80, R<sub>f</sub>=0.54 위치에 2종류의 색소 band(CA-1, CA-2)를 얻을 수 있었다. 1차로 분리된 이 band를 감압 분취장치로 끊어내어서 methanol로 용출시킨 다음 농축하고 다시 전개용매 benzene / diethyl ether / methanol(17 : 2 : 1, v/v)로 바꾸어 각각 재 전개하였을 때 triacylglycerol과 인지질은 완전히 제거되었고 band는 더 이상 분리되지 않아 단일 band로 나타났다. 색소 band CA-1과 색소 band CA-2는 각각 총 carotenoids의 45%와 55%로 나타났다. 추출과 분리과정에서 부분 정제되어 다소 지질이 혼재되어 있을 때는 색소들이 어느 정도 안정하였으나 순수하게 분

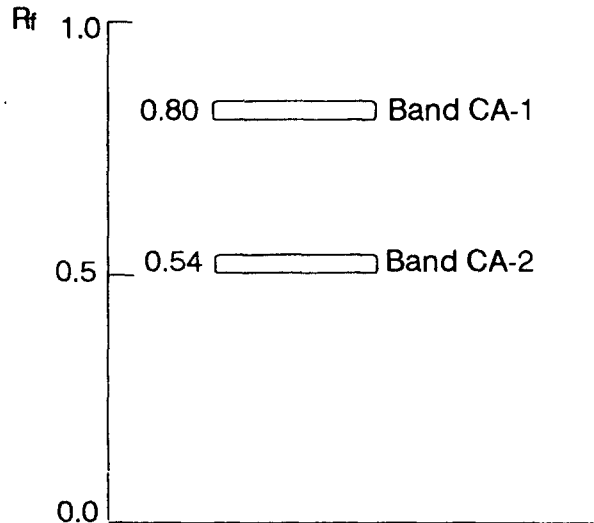


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of carotenoid liberated from the skin carotenoprotein in *Halocynthia roretzi* on silica gel G. Developing solvent : acetone/petroleum ether(3 : 7, v/v).

리 정제되면 색깔이 쉽게 소실되는 현상이 관찰되었다. 따라서 이들은 지질과 단백질 사이에서 상호 보호그룹임을 추측할 수 있었다.

**Carotenoids의 동정 및 구조결정**

**CA-1의 화학구조**

Ethanol 등 여러가지 용매에 대한 색소반점의 가시부 흡수 스펙트럼 특성은 Table 1 및 2와 같다. Ethanol용매

에서 색소반점은  $\lambda_{max}$  475nm이고 NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 생성물의 흡수파장은 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이  $\lambda_{max}$  418nm,  $\lambda_{max}$  448nm 및  $\lambda_{max}$  472nm였으며 최대파장이 단파장영역으로 27nm 이동하였다. 이 결과는 연어 알에서 분리정제한 astaxanthin을 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰을 때 diphenol end group을 가진 crustaxanthin으로 변환되어 최대 흡수파장이 단파장쪽으로 이동된 것과 동일하였다.<sup>13)</sup>

Table 1. The UV/Vis-spectral property of the carotenoids from carotenoprotein of *Halocynthia roretzi*

Property	Carotenoid band( $\lambda_{max}$ , nm)	
	Band CA-1	Band CA-2
R <sub>f</sub> value(TLC)*	0.80	0.54
Absorption maxima(nm)		
in ethanol	475	475
n-hexane	465	464
petroleum ether	470	470
benzene	488	487
chloroform	485	483
carbon disulfide	504	503
methanol	473	472

\*Developing solvent : acetone/petroleum ether(3 : 7, v/v).

Table 2. The UV/Vis-spectral property of the carotenoids from carotenoprotein of *Halocynthia roretzi* by organic reactions

Property	Carotenoid band( $\lambda_{max}$ , nm)	
	Band CA-1	Band CA-2
Partition behaviour (P.E.* /90% methanol)		
before saponification	epiphasic(84 : 16)	epiphasic(90 : 10)
after saponification	hypophasic(30 : 70)	hypophasic(32 : 68)
Reduction(in ethanol)	418, 448(S), 472	418, 448(S), 472
Photoisomerization by I <sub>2</sub> (in P.E.)	470, 487(S)	488(S), 498
Acetylation(in pyridine)	471, 485(S) <sup>#</sup>	471, 485(S)
Acetylation(TLC)	R <sub>f</sub> =0.80(negative)	R <sub>f</sub> =0.80(positive)
Epoxide test	negative	negative
Allylic test	negative	positive
Product by methanolic KOH (in benzene)	491	490

\*P.E. : petroleum ether

#S : strong

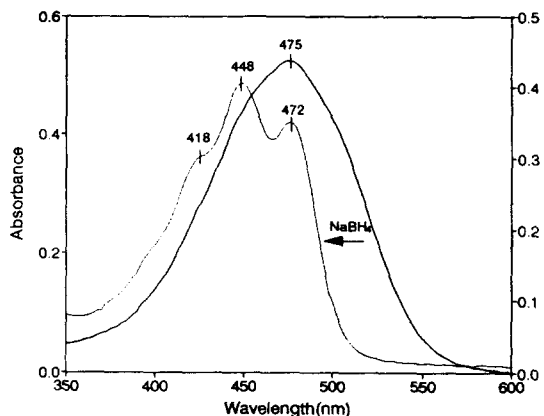


Fig. 2. Visible absorption spectrum of carotenoid CA-1 (—) and its reduction product(·····) in ethanol.

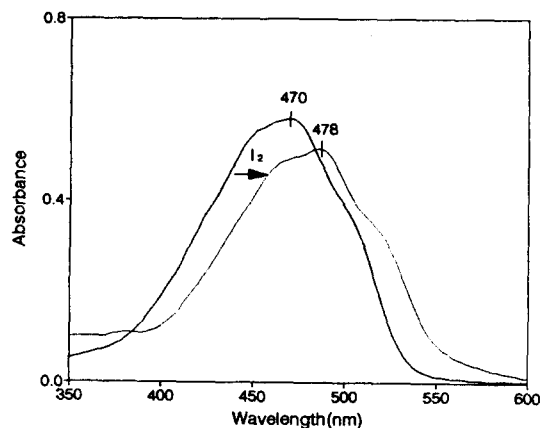


Fig. 3. Visible absorption spectrum of carotenoid from CA-1(—) and its I<sub>2</sub> photoisomerization product(·····) in petroleum ether.

Table 2에 나타난 것과 같이 이 색소 band CA-1의 분배계수를 시험한 결과, 비누화반응 전에는 epiphasic하였고 TLC상에서 R<sub>f</sub>=0.8로 약한 흡착력을 가졌으나 비누화 후에는 R<sub>f</sub>=0.35로 흡착력이 2.3배 증가되었으며 petroleum ether와 90% methanol간의 분배계수도 30 : 70으로 hypophasic하였다. 비누화반응 전의 아세틸화반응과 에폭시 시험 결과는 모두 음성이었다. 비누화 생성물을 다시 아세틸화시키면 R<sub>f</sub> 값이 0.35에서 0.80으로 되어 비누화반응 전의 R<sub>f</sub> 값과 완전히 일치하였다. 이러한 사실로 미루어 보아 이 색소 band CA-1은 astaxanthin의 diester형임을 알 수 있었다.

분자속에 allylic hydroxyl group의 존재를 확인하기 위하여 carotenoid를 methanol에 녹인 다음 여기에 0.01N HCl / methanol용액 2방울을 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 색소를 petroleum ether층으로 옮기고 TLC 상에서의 R<sub>f</sub>값의 증가를 관찰한 결과 음성이었다. I<sub>2</sub>에 의한 광학적 이성질화반응의 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 이 색소 band는 methanol성 KOH로 비누화시킨 다음 n-hexane층으로 분배시킬 때 두 용매층의 경계면에 붉은색의 염을 형성하였고, 이것을 빙초산으로 처리하여 추출한 생성물은 astaxanthin의 산화생성물인 astacene의 λ<sub>max</sub>와 일치하는 흡광도를 보였다.

이 색소 band CA-1의 IR 흡수 스펙트럼은 Fig. 4와 같다. ν<sub>max</sub> (CHCl<sub>3</sub>) 2954, 2917 및 2849cm<sup>-1</sup>에 강한 C-H

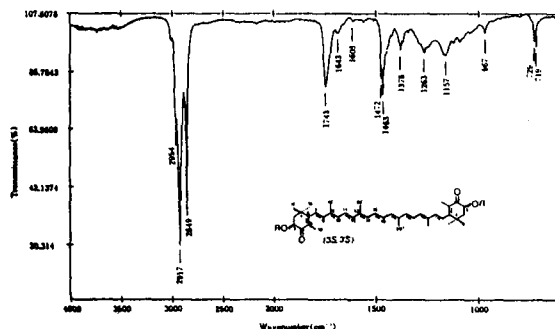


Fig. 4. Infrared absorption spectrum of astaxanthin diester(carotenoid from CA-1).

stretching, 1743cm<sup>-1</sup>에 ester형의 >C=O 기, 1643cm<sup>-1</sup>에 짝지은 >C=O 기, 1605, 1570cm<sup>-1</sup> 근방에 짝지은 C=C, 1472와 1463cm<sup>-1</sup>에 CH<sub>2</sub> 기, 1378 과 1370cm<sup>-1</sup>에 gem. dimethyl 기, 1305, 1263, 1157, 990 및 967cm<sup>-1</sup>에 trans and/or cis CH=CH 기의 흡수띠가 잘 나타나 있다. 여기서 3,300cm<sup>-1</sup> 근방에서 강한 O-H stretching이 관찰되지 않는 점으로 미루어 이 색소는 diester형임을 확인할 수 있었다. 또한, proton NMR 특성은 Fig. 5와 같다. δ=1.23 (C-1과 C-1' methyls. eq.), 1.35(C-1과 C-1' methyls. ax.), 1.60(H<sub>2</sub>O), 2.01(C-9와 C-9' methyls), 10 (C-5와 C-5' methyls), 2.35(ester or C-2, C-2' protons), 2.90 (ester), 4.15(C-3 과 C-3' protons), 5.40ppm(ester or

C-3, C-3' protons). MS spectrum 측정결과 Mt=654, m/e M<sup>+</sup>(M-18, M-28, M-58, M-92, M-105, M-154, M-167, M-204, M-219, M-233)이었다.

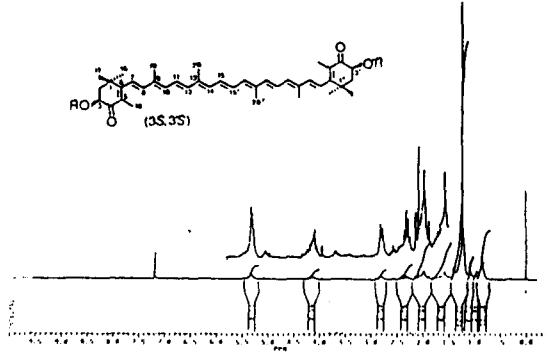


Fig. 5. <sup>1</sup>H-NMR spectrum(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) of astaxanthin diester(carotenoid from CA-1).

이상의 여러가지 화학반응성과 분광학적 분석자료로부터 이 색소 band CA-1은 astaxanthin diester로 밝혀졌으며 이것의 지방산을 분석한 결과(Table 3), monoene산이 전체지방산 함량 중 45.8%로 가장 많았고 다음으로 polyene산(37.4%) 및 포화산(22.4%) 순이었다. 양적으로 많은 지방산으로는 oleic acid가 24.9%로 가장 높았고, palmitic acid가 15.2%, palmitoleic acid가 12.4%, eicosapentaenoic acid가 9.8%이었다.

#### CA-2의 화학구조

Ethanol 등 여러가지 용매에 대한 색소 band CA-2의 가시부 흡수 스펙트럼 특성은 Table 1 및 2와 같다. Ethanol용매에서 이 색소 band는 λ<sub>max</sub>가 475nm이며 전형적인 keto group을 가진 형태의 것으로 약한 피크로 나타났고 NaBH<sub>4</sub>로 환원시킨 결과는 Fig. 6에 보인 바와 같이 색소 band CA-1의 특성과 일치하고 있다. 환원반응이 진행됨에

Table 3. Fatty acid composition of astaxanthin diester and astaxanthin monoester from carotenoprotein occurring in *Halocynthia roretzi*

Fatty acid		Composition(%)	
		astaxanthin diester	astaxanthin monoester
Myristic	C <sub>14</sub> :0	4.8	3.5
Palmitic	C <sub>16</sub> :0	15.5	11.6
Arachidic	C <sub>20</sub> :0	2.1	6.8
Σ Saturates		22.4	21.9
Myristoleic	C <sub>14</sub> :1(n-5)	3.1	2.1
Palmitoleic	C <sub>16</sub> :1(n-7)	12.4	15.7
Oleic	C <sub>18</sub> :1(n-9)	24.9	21.8
Gadoleic	C <sub>20</sub> :1(n-11)	1.9	1.2
Erucic	C <sub>22</sub> :1(n-9)	3.5	4.8
Σ Saturates		45.8	45.6
Linoleic	C <sub>18</sub> :2(n-6)	2.1	1.5
γ-Linolenic	C <sub>18</sub> :3(n-6)	2.4	1.8
Linolenic	C <sub>18</sub> :3(n-3)	2.1	3.8
Arachidonic	C <sub>20</sub> :4(n-6)	3.9	2.5
Eicosapentaenoic	C <sub>20</sub> :5(n-3)	9.8	10.5
Docosapentaenoic	C <sub>22</sub> :5(n-3)	3.7	3.2
Docosaheptaenoic	C <sub>22</sub> :6(n-3)	7.2	8.1
Σ Polyenes		37.4	31.4

따라 짙은 오렌지색에서 노란색으로 변화되었다. 환원생성물의 가시부 흡수 스펙트럼에서는 448nm와 418nm에서 변곡이, 그리고 475nm에서는 보조의 파장을 갖고 있었다. 결국 최대 흡수파장에서 단파장으로 27nm 이동하였다. 이러한 결과는 scottish salmon에서 분리한 astaxanthin과 일치하였다<sup>14)</sup>.

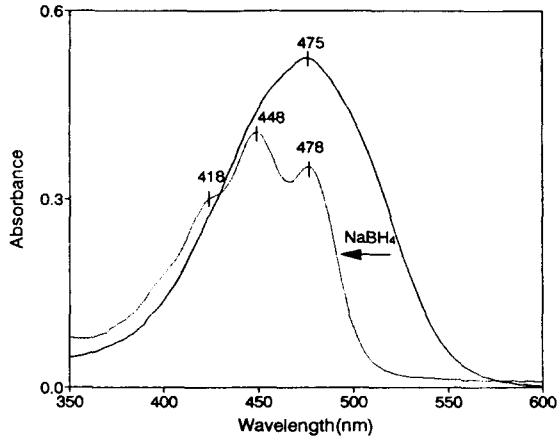


Fig. 6. Visible absorption spectrum of carotenoid CA-2 (—) and its reduction product(.....) in ethanol.

Table 2에서와 같이 petroleum ether와 90% methanol간의 분배계수 시험에서 비누화반응 전에는 이 색소가  $R_f=0.54$ 로 epiphasic하던 것이 비누화 후에는  $R_f=0.34$ 로 흡착력이 1.6배 증가하였으며 hypophasic하여서 32 : 68로 분배되었다. 이러한 사실로 미루어 이 carotenoid에는 hydroxyl group이 최소한 1개 이상이 존재하는 것으로 추정하였다. 또한 아세틸화반응에서도 반응 전에는  $R_f=0.54$ 이던 것이  $R_f=0.80$ 으로 증가하였다. 이 실험 결과는 monoester형이던 carotenoid의 hydroxyl group이 ester화되어서 diester로 변하였기 때문이라고 추측되었다. 그러나 carotenoid 분자내에 한개 혹은 더 많은 hydroxyl group이 있어도 흡수파장에는 큰 변화가 없으며, hydroxyl group이 아세틸화 되어도 가시부 흡수파장에는 큰 변화가 없거나 있어도 5nm정도 변하는 것이 일반적인 이론이다<sup>13)</sup>. KOH로 처리하였을 때 색깔이 점차 진해지는 것이 관찰되었고 생성물의 흡수 스펙트럼은 장파장 영역으로 이동되었는데

이와 같은 현상은 astaxanthin이 astacene으로 변화될 때 이중결합이 2개 더 형성되었기 때문이라고 판단된다<sup>13)</sup>.

분자내에 allylic hydroxyl group이 존재하는지를 알아보기 위하여 0.01N HCl/methanol용액에 carotenoid를 녹이고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 TLC거동을 조사하였을 때 양성이었으며, 예폭시 실험 결과 음성으로 나타나 분자내 예폭시기가 존재하지 않음을 확인하였다.  $I_2$ 에 의한 광학적 이성질화반응의 결과는 Fig. 7에 나타내었다.

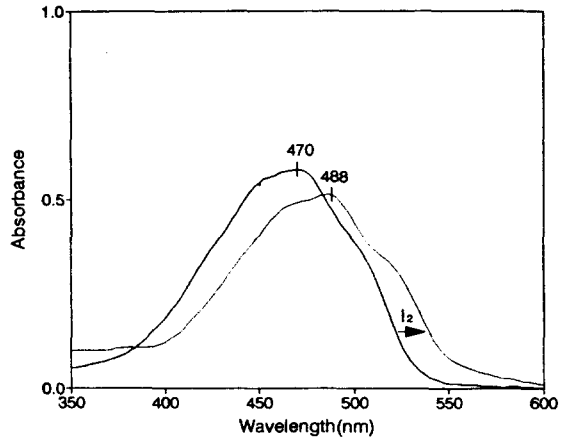


Fig. 7. Visible absorption spectrum of carotenoid CA-2 (—) and its  $I_2$  photoisomerization product (.....) in petroleum ether.

이 색소 band CA-2의 IR 흡수 스펙트럼은 Fig. 8과 같다.  $\nu_{max}$  ( $CHCl_3$ ) 3398 $cm^{-1}$ 에 강한 O-H stretching, 2970, 2930 및 2849 $cm^{-1}$ 에 C-H stretching, 1742 $cm^{-1}$ 에 ester 형태인  $>C=O$  기의 흡수띠, 1643 $cm^{-1}$ 에 짝지은  $>C=O$  기의 흡수띠가 관찰되었다. 1605, 1595 및 1559 $cm^{-1}$ 에는 짝지은 C=C, 1463과 1436 $cm^{-1}$ 에  $CH_2$ , 1377과 1370 $cm^{-1}$ 에 gem, dimethyl 기, 1377, 1305, 1280, 1255, 1233, 1130, 990 및 959 $cm^{-1}$ 에 trans CH=CH 기의 흡수띠가 잘 나타나 있다. 또한 1057(S)과 1033(m) $cm^{-1}$ 에서는 allylic -OH 기의 흡수띠가 관찰되었다. 이 IR 스펙트럼은 astaxanthin monoester의 것과 일치함을 보였다<sup>14)</sup>. 색소 band CA-2의 proton NMR 특성은 Fig. 9와 같다.  $\delta = 1.21$ (C-1과 C-1' methyls. eq.), 1.32(C-1과 C-1' methyls. ax.), 1.50( $H_2O$ ), 1.90(C-2와 C-2' protons ax.),

1.95(C-5와 C-5' methyls), 2.05(C-9와 C-9' methyls), 2.30(ester or C-2, C-2' protons eq.), 2.90(ester proton), 3.75(-OH), 5.35(C-3과 C-3' proton ax.). 이 NMR 결과는 astaxanthin monoester의 결과와 일치하였다<sup>15)</sup>. MS spectrum 측정결과 Mt=608, m/e M<sup>+</sup>(M-18, M-57, M-92, M-105, M-154, M-167, M-206, M-221, M-233)이었다.

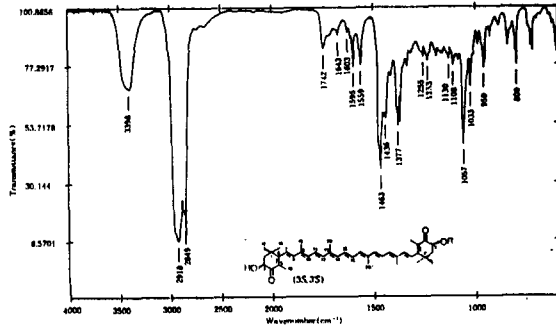


Fig. 8. Infrared absorption spectrum of astaxanthin monoester(carotenoid from CA-2).

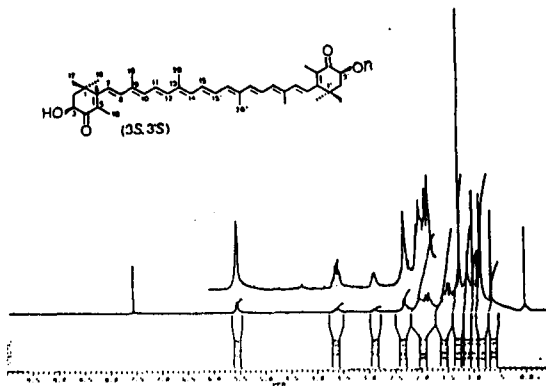


Fig. 9. <sup>1</sup>H-NMR spectrum(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) of astaxanthin monoester(carotenoid from CA-2).

이상의 여러가지 화학반응성과 분광학적 분석자료로부터 이 색소 band CA-2는 astaxanthin monoester로 밝혀졌으며 이것의 지방산 함량을 분석한 결과, oleic acid가 21.8%로 가장 높았고, palmitoleic acid가 15.7%, palmitic acid가 11.6%, eicosapentaenoic acid가 10.5%이었으며 포화지방산 보다는 불포화지방산의 함량이 많았다(Table 3).

## 요 약

명게 껍질에 존재하는 carotenoprotein으로부터 분리한 carotenoid는 TLC상에서 R<sub>f</sub>값이 다른 두 종류(band CA-1과 band CA-2)의 band가 얻어졌고 이들의 화학 반응성과 UV/Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR 및 MS 등 분광학적인 분석자료로부터 band CA-1은 astaxanthin diester, band CA-2는 astaxanthin monoester로 밝혀졌으며 이들 ester형 carotenoid의 지방산을 분석한 결과 oleic acid, palmitic acid 및 palmitoleic acid의 함량이 전체의 50%를 차지하였으며, 특히 eicosapentaenoic acid를 포함한 고도불포화지방산의 함량이 높았다.

## 참 고 문 헌

1. Shone, C. C., Britton, G. and Goodwin, T. : The violet carotenoprotein of the starfish, *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 507(1979)
2. Cheesman, D. F., Prebble, J. : Astaxanthin ester as prosthetic group ; A carotenoprotein from the hermit crab. *Comp. Biochem. Physiol.*, 17, 929(1966)
3. Millicua, J. C. G., Arberas, I., Barbon, P. G., Garate, A. M. and Gomez, R. : A yellow carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B(3), 615(1986)
4. Zagalsky, P. F. : Invertebrate carotenoproteins, In *Methods in Enzymology*, Vol. III, J. H. Law and H. C. Rilling ed. Academic Press, Inc., London, pp. 216 ~ 247(1985)
5. Kim, S. K., Lee, A. J., Suh, M. J. and Kang, O. J. : Purification and Characterization of the Red Carotenoprotein from the Skin of Ascidian, *Malocynthia roretzi*. *Korean J. Life Science*, 5(4), 171(1995)
6. Khare, A., Moss, G.P., Weedon, B.C.L. and Matthews, A.D. : Identification of astaxanthin in scottish salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, 971(1973)
7. McBeth, J.W. : Carotenoid from nudibranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B, 55(1972)
8. Walton, T.J., Britton, G., Goodwin, T.W., Diner, B. and Moshier, S. : The structure of siponaxanthin. *Phytochemistry*, 9, 2545(1970)
9. Chapman, D.J. : Three new carotenoids isolated from algae. *Phytochemistry*, 5, 1331(1966)
10. Schiedt, K., Leuenberger, F.J. and Vecchi, M. : Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin



5. Ex wild salmon (*Salmo salar* and *Oncorhynchus*). *Helv. Chimica Acta*, 64, 449(1981)
11. Karrer, P. : Carotenoid-epoxyde und furanoide oxyde von carotinoidfarbstoffen. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 5, 1(1948)
12. Liaaen-Jensen, S. and Hertzberg, S. : Selective preparation of the lutein monomethyl ethers. *Acta Chem. Scand.*, 20, 1703(1966)
13. Kim, J. W., Min, T. J. and Lee, T. Y. : Subunits and composition of carotenoproteins from *Salmo salar* eggs. *J. Kor. Chem. Soc.*, 32, 377(1988)
14. Khare, A., Moss, G. P., Weedon, B. C. L. and Matthews, A. D. : Identification of astaxanthin in scottish salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B, 971(1973)
15. Widmer, E., Zell, R., Lukac, T., Casadei, M., Schholzer, P. and Broger, E.A. : Technische verfahren zur synthese von carotenoiden und verwandten verbindungen aus oxo-isophoron. I. Modifizierung der Kienzle-Mayer-Synthese von (3S, 3 S)-astaxanthin. *Helv. Chimica Acta.*, 64, 2405(1981)