

이온성 액체를 사용한 꽃게 껍질에서 아스타크산틴 추출 조건의 최적화

이유진, 이유리, 당보곤, 노경호*

Optimization of Extraction of Astaxanthin from *Portunus trituberculatus* by Ionic Liquids

Yu Jin Lee, Yu Ri Lee, Baokun Tang, and Kyung Ho Row*

접수: 2013년 7월 22일 / 게재승인: 2013년 8월 28일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Astaxanthin is one of the carotenoid with strong antioxidant. The conditions of extraction of astaxanthin from *Portunus trituberculatus* were optimized in this work. Six factors of conditions such as, extraction method, extraction solvent, ratio of solvent to raw material, temperature, and time, were investigated. For the increase of the extraction yield, ionic liquids were used as additives in the extraction solvent. The optimum extraction conditions were found: heat reflux extraction, Dichloromethane/methanol (25:75, v/v) as solvent, 1:30 of the ratio of solvent raw material, 80°C, 90 min, and ionic liquid as additive. As a result, 45.81 µg/g of astaxanthin was extracted from waste.

Keywords: *Portunus trituberculatus*, Astaxanthin, Ionic liquids, Extraction, High Performance Liquid Chromatography

1. 서론

꽃게 (*Portunus trituberculatus*)는 수심 20~30 m의 바닷가 모래 바닥에 서식하며, 낮에는 보통 모래펄 속에 숨어 지내다가 밤이 되면 활발한 먹이활동을 하는 야행성이다. 전 세계적으로 해마다 생산되는 갑각류(게 및 새우)의 폐기물 양은 약 1.44×10^6 톤에 이르고 이러한 폐기물은 환경오염원이 될 우려가 있으나 경제적 활용 측면에서 아스타크산틴은 화장품, 제약, 식

품/사료 산업에 우수한 원료로 이용될 수 있다 [1].

아스타크산틴 (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione)은 갑각류나 연어류의 해양생물에서 발견되는 주황색 또는 분홍색을 띠는 주요 카로티노이드의 하나로 xanthophyll의 일종의 색소이다 (Fig. 1). 비타민 A의 전구체로 이소프렌 단위가 8개 결합하여 형성된 테트라테르펜 (tetraterpene)류로서 분자 내에 13개의 공역이중결합을 가지는 구조적 특성을 가지고 있다. 양식 어류 속살의 붉은 색상을 보충하여 품질향상 및 생존율증가를 위한 사료첨가제로도 사용된다 [2-4].

많은 연구에서 아스타크산틴은 세포 내에 생성되는 유해한 산화적 반응을 개시하는 과산화물 또는 활성산소인 일중항산소 담금질 (quenching) 함으로써 항산화 효과를 가진다고 Kobayashi 등은 보고하였다. 아스타크산틴은 in vitro 실험에서 O_2 (singlet oxygen)에 대한 포획 능력이 강하여 알파토코페롤에 비해 80배 정도 강한 것으로 보고되었다. 또한 베타카로틴, 비타민 C, 비타민 E보다 항산화 효과가 뛰어나다고 알려져 있다. 그리고 Tanaka 등은 아스타크산틴이 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)에 대한 항암성을 발표하였고, 면역강화작용을 하고 자외선으로부터 피부를 보호하며 실명의 원인이 되는 노인황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)을 방지하는 데 유용하다 [5-6].

아스타크산틴은 1938년에 바다가재에서 처음 확인되었고

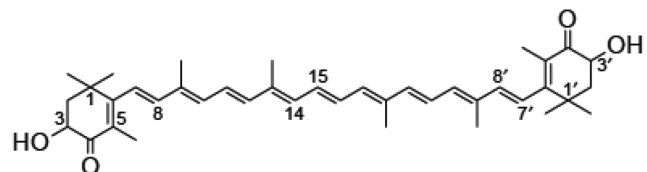


Fig. 1. The structures of Astaxanthin.

인하대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-701, Korea
Tel: +82-32-860-7470, Fax: +82-32-872-0959
e-mail: rowkho@inha.ac.kr

그 후, 유기용매로 다양한 원료에서 아스타크산틴을 추출하기 위해 많은 연구가 진행되었다. 그러나 기존의 용매 추출 공정은 많은 양의 독성이 있는 유기 용매가 필요하고, 여러 단계의 추출 과정이 요구되어 많은 시간이 필요로 한다 [7]. 이렇듯 유기용매는 오늘날 다양한 화학 산업에서 흔히 쓰이지만 강한 독성에 의한 공해로 환경오염에 심각한 영향을 끼치고 있으며 이러한 유기용매를 대체할 청정용매로서 이온성 액체 (Ionic liquid, IL)가 주목 받고 있다. 이온성 액체는 일반적으로 재활용으로 유기합성에 사용될 수 있어 “Green solvent”라고도 불리며 거대한 헤테로 고리 양이온과 BF₄⁻, PF₆⁻와 같이 무기 음이온으로 이루어져 있고 일반적인 유기용매와 달리 증기압이 거의 없고 낮은 용해점, 높은 이온전도성, 높은 열적 안정성을 지닌 액체 염이다. 이러한 특성으로 액체-액체 추출 용매, 흡수식 열펌프, 촉매 등 다양한 산업 분야에 쓰이며 양이온과 음이온의 종류와 그 조합의 결과에 따라 무수한 이온성 액체를 합성할 수 있고 합성된 이온성 액체는 각기 다른 물성을 지닐 것으로 예상되어 보다 다양한 산업 분야에 응용할 수 있다 [8-10].

본 연구에서는 버려지는 꽃게 폐기물로부터 천연 아스타크산틴을 추출하고, 그 수율을 높이기 위한 수단으로 사용하는 1-methylimidazole series ILs (1-MIM series ILs)를 합성해 첨가함으로써 아스타크산틴을 추출하는 최적의 조건을 확립하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 꽃게는 인천 연안부두 (Incheon, Korea)에서 구입하였으며, 연평도 (Incheon, Korea)에서 2012년 10월에 잡힌 암 꽃게를 사용하였다. 표준시료 아스타크산틴은 Sigma (St. Louis, Mo., USA)에서 구입하였으며, 추출과 이동상에 사용된 물, 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트, 아세토나이트릴, 디클로르메탄은 DUKSAN Pure Chemical CO., LTD (Ansan, Korea)의 HPLC grad를 사용하였다. 실험에 사용된 Ionic Liquids (ILs)는 1-Methylimidazole, n-alkyl bromide, sodium tetrafluoroborate (NaBF₄), hexafluorophosphoric acid (HPF₆), lithium bis (trifluoromethylsulfonyl)imide (Li(Tf₂N))은 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다. 이온성 액체를 적가하는데 사용한 디에틸 에테르는 OCI CO., LTD (Seoul, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 필터 (MFS-25, 0.45 μm TF, Whatman, USA)를 이용하여 여과하였다.

2.2. HPLC analysis

본 연구에 사용된 분석용 HPLC는 Waters 616 liquid chromatograph (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A) 기기를 사용하였고 검출기는 2487 UV를 사용하였다. 사용된 칼럼은 RS tech (Deajeon, Korea) 제품으로 C₁₈ (5 μm, 250 × 4.6 mm)칼럼

을 사용하였다. 이동상은 메탄올/디클로르메탄/아세토나이트릴/물 (85/5.5/5/4.5, v/v/v/v)로 하였고, 표준시료 및 검체시료 주입량은 10 μL, 검출기 파장은 480 nm, 유량은 1.0 mL/min로 하여 실험하였다.

2.3. 표준용액의 준비

실험에 사용된 표준용액은 표준시료 아스타크산틴을 5 mg을 10 mL의 메탄올/디클로르메탄 (75/25, v/v)에 녹여 표준원액으로 제조하였고 그 후, 표준원액을 희석하여 0.5, 0.25, 0.05, 0.025 mg/mL 농도로 표준액을 제조하여 검량선을 만들고 이를 토대로 시험용액을 분석하였다.

2.4. 아스타크산틴의 추출

꽃게껍질을 분쇄하여 고운 분말을 만들고 용매에 따른 아스타크산틴의 추출수율을 측정하여 메탄올/디클로르메탄 (75/25, v/v) 추출 용매로 사용하였고, 추출 방법으로는 가열 방법을 사용하였다. 용매 비의 변화 (1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40)에 따른 실험을 용매 비 1:30, 추출시간 30분으로 조건을 고정시켜 실시하고 추출온도 변화 (30, 50, 80, 100°C)에 따른 실험을 실시해 용매비율 1:30, 추출온도 80°C로 조건을 고정하였으며 추출시간 변화 (30, 60, 90, 120, 150, 180분)에 따른 아스타크산틴의 추출 수율을 90분에서 측정하였다.

2.5. 1-Methylimidazole series 이온성 액체의 준비

1-Methylimidazole series ILs는 다음과 같은 방법으로 합성하였다. 1:1:300의 몰 비율 (mole ratio)로 1-Methylimidazole/n-alkyl bromide/ methanol을 반응시킨다. 1-Methylimidazole/n-alkyl bromide/ methanol을 1:1:300의 비율로 혼합한 혼합용액을 교반기에서 15시간 동안 70~80°C로 가열한 다음 냉각한다. 비이커에 디에틸 에테르 100 mL를 넣고 냉각시킨 혼합물을 디에틸 에테르에 떨어뜨려 (drop wise) 적가하였다. 비이커 바닥에 하얀색 침전물이 생길 때까지 실온에서 건조한다. 하얀색 침전물을 여과하여 사용한다.

음이온 효과에 사용될 이온성 액체 Br⁻를 포함한 NaBF₄

Table 1. 1-methylimidazole series ILs in this study

Abbreviation	Structure of cation	Anion
[EMIM][Br]		Br ⁻
[BMIM][Br]		
[HMIM][Br]		
[OMIM][Br]		
[DMIM][Br]		
[TMIM][Br]		BF ₄ ⁻
[EMIM][BF ₄]		
[EMIM][PF ₆]		
[EMIM][Tf ₂ N]		

(BF₄), Li(Tf₂N), HPF₆(PF₆)는 다음과 같은 방법으로 합성한다. 50 mL의 플라스크에 0.1 g 이온성 액체와 0.3 g의 BF₄, Tf₂N, PF₆를 넣고 10 mL의 정제수를 첨가한다. 정제수와 이온성 액체가 잘 혼합되도록 12시간 동안 교반시켜 준다. 그 다음, 메탄올로 세척하여 사용한다.

2.6. 1-Methylimidazole series 이온성 액체의 추출

플라스크 (50 mL)에 꽃게분말 1 g과 합성한 ILs 첨가하여 추출 용매 30 mL를 넣고 추출온도 80°C, 추출시간 90분으로 추출 조건을 고정시켜 추출한다. 추출한 후 남아있는 꽃게분말을 제거하기 위해 0.2 µm 필터로 여과한 다음 HPLC로 분석한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 꽃게껍질에서 아스타크산틴 추출

3.1.1. 추출 방법

먼저, 추출 방법은 침전, 초음파, 가열의 세 가지 방법으로 수행하였다. 추출 조건은 용매 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)을 5 mL에 꽃게파우더 0.5 g을 첨가하여 추출 시간 30분으로 고정시켜 추출하였다. 침전과 초음파방법은 위의 조건 하에서 상온으로 추출을 진행하였고, 가열 방법은 추출 온도 80°C에서 추출을 진행하였다. 그 결과 세 가지 다른 추출 방법에서 각각 다른 양의 아스타크산틴이 추출되었다. 침전 방법이 9.62 µg/g, 초음파방법이 15.61 µg/g, 가열 방법이 19.17 µg/g으로 침전 방법과 초음파 방법보다 가열방법에서 많은 양의 아스타크산틴이 추출된 것을 확인하였다 (Table 2). 그러므로 가열 방법을 선택하여 다음 실험부터 적용하였다. 다음으로 추출 용매의 선택은 정제수, 에탄올, 엔-헥산, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v) 여섯 가지로 수행하였다. 추출 조건은 위와 같고 다만 추출 방법은 가열 방법으로 추출 온도 80°C로 고정해 추출하였다. 추출 결과, 물은 0.50 µg/g, 에탄올은 12.54 µg/g, 엔-헥산은 0.57 µg/g, 디클로로메탄은 3.29 µg/g, 에틸아세테이트는 2.59 µg/g, 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)은 19.17 µg/g의 아스타크산틴의 추출 수율을 나타내었다. 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)에서 가장 많은 양의 아스타크산틴이 추출되었는 것을 알 수 있다. [11]. 이는, 아스타크산틴의 구조적 특성에 의한 것으로 추측된다. 구조적으로 이중결합을 가진 아스

타크산틴은 불포화화합물로서 열과 빛에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소한다. 그리고 지용성 물질이기 때문에 에스터 결합 구조를 가지고 있어 물에 대한 용해도가 낮다 [12-13]. 아스타크산틴은 물, 에틸 아세테이트에는 잘 녹지 않았다. 이것으로 아스타크산틴이 물에 잘 녹지 않는 난용성 물질이라는 것을 확인하였다. 대신 아스타크산틴은 비공유결합으로 속박되어 있어 에탄올이나 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)같은 유기용매로 처리할 때 쉽게 용해되어 추출할 수 있다 [14].

3.1.2. 최적의 추출 조건

아스타크산틴을 추출하기 위한 최적의 조건을 갖추기 위한 실험으로 추출물에 대한 용매의 비율과 온도 변화 그리고 시간의 경과에 따른 아스타크산틴의 추출 수율을 측정하는 실험을 진행하였다. 고정된 추출 조건은 추출 방법으로 가열방법으로 용매 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v) 그리고 온도 80°C에서 30분간 진행되었다. 먼저, 추출물에 대한 용매의 비율의 실험에서 1:30 (g/mL)의 비율이 37.22 µg/g으로 다른 비율에 비해 아스타크산틴이 많이 추출된 것을 확인하였다 (Fig. 2). 그래서 다음에 진행될 실험에서 추출물과 용매의 비율을 1:30 (g/mL)으로 선택하여 진행하였다. 온도 변화에 따른 실험은 앞선 실험과 추출 조건은 동일하되 추가로 선택된 추출물과 용매비율 1:30 (g/mL)을 적용하여 실험을 진행하였다. 추출 온도의 변화는 30, 50, 80, 100°C로 추출 결과를 Fig. 3에 나타내었고, 80°C에서 아스타크산틴의 추출 수율이 가장 높았다. 그래프에서 보는 것과 같이 30°C에서 80°C까지는 아스타크산틴의 양이 점차 증가하다가 100°C에서부터 아스타크산틴의 양에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 설명한 것과 같이 아스타크산틴이 열과 빛에 의해 쉽게 파괴되는 것과 관련이 있는 것으로 추측된다 [11]. 다음으로 진행된 실험은 시간의 경과에 따른 아스타크산틴의 추출 수율을 측정하는 실험으로 수율의 차가 많지는 않았지만 90분에

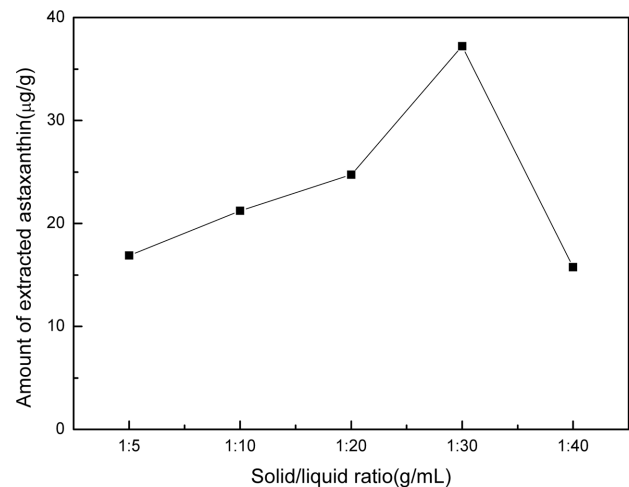


Fig. 2. Effect of extraction solid/liquid ratio. (Extraction method: heating, time: 30 min, Temperature: 80°C, solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v)).

Table 2. Effect of extraction method

Extraction method	Temperature (°C)	Amount of Astaxanthin (µg/g)
Dipping	Room temperature	9.62
Ultrasonic-assisted	Room temperature	15.61
Heating	80°C	19.17

(Extraction time: 30 min, Solid/Liquid ratio (g/ml): 1:10 (0.5 g/5 ml), Solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v))

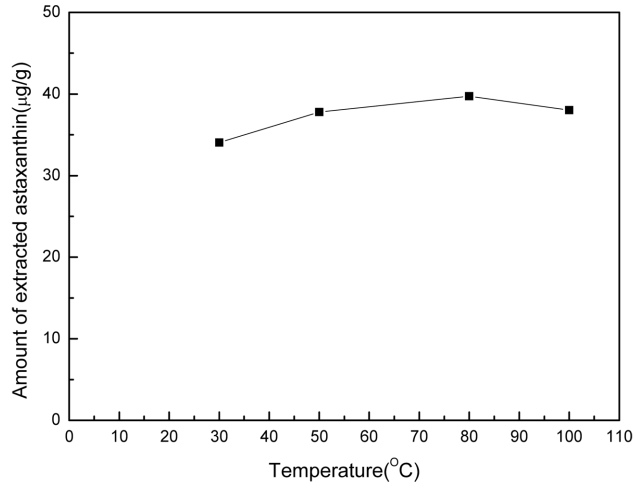


Fig. 3. Effect of extraction heating temperature (°C). (Extraction method: heating, time: 30 min, solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v), solid/liquid ratio: 1:30 (1 g/30 ml)).

서 많은 아스타크산틴이 추출된 것을 확인할 수 있었다. 위의 실험들을 종합하면 최적의 추출조건은 가열방법으로 추출 온도 80°C에서 용매는 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)을 사용하여 추출물과 용매의 비율을 1:30 (g/mL)으로 하고 90분간 추출하는 것이 가장 많은 양의 아스타크산틴을 추출할 수 있다.

3.2. 이온성 액체의 아스타크산틴 추출 효과

3.2.1. 양이온의 효과

이온성 액체의 구조적 특성 즉, 양이온의 알킬 사슬의 길이는 목적 물질의 추출 효율에 물리, 화학적 영향을 끼친다 [15]. 그래서 이번 연구에서는 서로 다른 알킬 사슬을 가지는 양이온이 추출 효율에 끼치는 영향에 대해 실험하였다. 음이온은 동일하게 [Br-]을 사용하였다. 실험은 앞선 실험에서 검증된 최적의 추출방법으로 실행되었으며 그 조건은 가열방법으로 추출 온도 80°C에서 용매는 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)을 사용하여 추출물과 용매의 비율을 1:30 (g/mL)으로 90분간 추출하는 것이다. 실험의 결과는 Table 3에 나타내었고, [EMIM][Br]이 45.81 µg/g으로 가장 많은 양의 아스타크산틴 추출 수율을 보였다. [EMIM][Br]부터 [OMIM][Br]까지 아스타크산틴의 양이 증가했지만 [DMIM][Br]에서 아스타크산틴의 양이 감소하였고, [TMIM][Br]에서 다시 증가하는 추세를 보였다. 이와 같은 결과는 alkyl chain의 길이와 [Br-] 이온성 액체의 물 혼화성 (miscibility)과 관련이 있고, 이 속성이 추출 효율에 영향을 끼치는 것으로 추측된다 [16].

3.2.2. 음이온의 효과

양이온뿐만 아니라 음이온 또한 목적 물질의 추출 효율에 영향을 끼치기 때문에 1-ethyl-3-methylimidazolium ([EMIM]) ILs에 4가지 다른 음이온 Br-, BF₄-, PF₆-, Tf₂N-을 선택해 실험을 진행하였다 [17]. 그 중에서 [EMIM][Br]이 아스타크산틴

Table 3. Effect of cation ion

Cation	Anion	Amount of Astaxanthin (µg/g)
[EMIM]	[Br]	45.81
[BMIM]		36.55
[HMIM]		36.43
[OMIM]		33.67
[DMIM]		29.40
[TMIM]		36.37

(Extraction method: heating, solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v), solid/liquid ratio: 1:30 (1 g/30 mL), Temperature: 80°C, Time: 90 min, Concentration of ionic liquid: 16.66 mg/mL)

추출 수율이 가장 높았다 (Fig. 4). 이것은 [EMIM]Br 용액이 강한 소수성 성질을 가지고 π-π 결합을 포함한 ionic/charge-charge, alkaloids와 수소결합 등 강력한 다중 상호 작용을 했기 때문일 것이다 [16]. 그러므로 [EMIM][Br]은 후속 실험에서 꽃게 폐기물에서 아스타크산틴을 추출하는 최적의 첨가제로 선택되었다.

3.2.3. 이온성 액체의 농도 효과

이온성 액체의 농도 또한 꽃게 폐기물에서 아스타크산틴 추출하는데 추출 효율에 영향을 미치므로 추출 최적의 조건을 갖추는데 필요한 조건이다 [18]. 본 실험에서 각각 다른 농도 (0.0, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 g)의 이온성 액체를 첨가해 아스타크산틴을 추출하였다. 그 결과 이온성 액체 0.5 g에서 아스타크산틴의 양이 가장 많이 추출되었다 (Fig. 5). 이것은, 다른 이온성 액체 보다 [EMIM][Br]의 친수성이 강하여 이온성 액체의 양이 증가할수록 용매의 극성이 증가해 소수성인 아스타크산틴의 추출 효율이 감소되는 것으로 예측한다 [16]. 다른 연구에서 추출 수율 34.4 g/100 g에서 전체 카로티노이드의 양이 11 µg/g이 검출되었고 이 중, 아스타크산틴이 23.6%이 검출되었다. 즉, 2.59 µg/g (11 µg/g × 0.236)의 아스타크산틴이

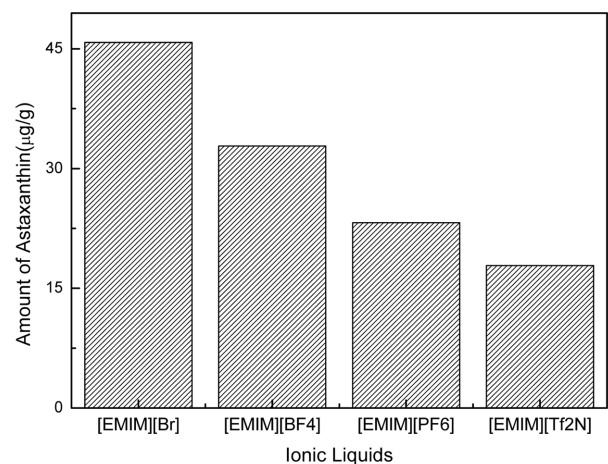


Fig. 4. Effect of anion ion. (Extraction method: heating, solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v), solid/liquid ratio: 1:30 (1 g/30 ml), Temperature: 80°C, Time: 90 min, Concentration of ionic liquid: 16.66 mg/mL).

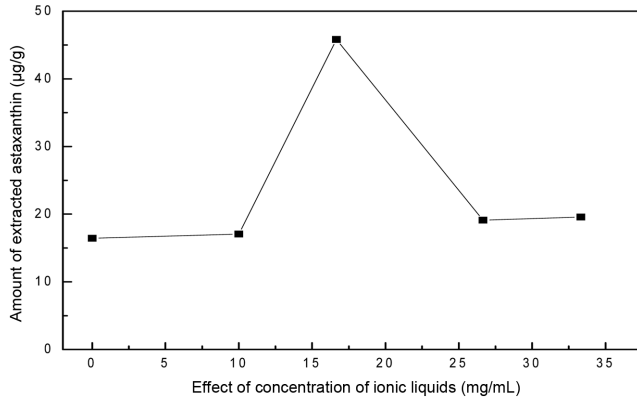


Fig. 5. Effect of concentration of ionic liquids (mg/mL). (Extraction method: heating, solvent: Dichloromethane/methanol (25:75, v/v), solid/liquid ratio: 1:30 (1 g/30 ml), Temperature: 80°C, Time: 90 min, Ionic liquids: [EMIM][Br]).

추출된 것으로 보여진다 [19]. 본 연구와 비교했을 때, 추출 수율의 차이가 있었다.

4. 결론

이온성 액체를 이용하여 꽃게 폐기물로부터 아스타크산틴을 추출하는 것은 아스타크산틴의 추출 수율을 높이는 데 있어서 유용하다. 이온성 액체를 이용하여 꽃게 폐기물로부터 아스타크산틴의 최적의 추출 조건은 가열방법으로 추출 온도 80°C에서 용매 디클로로메탄/메탄올 (25:75, v/v)을 사용하여 용매 비 1:30으로 90분간 추출하는 것이다. 이러한 추출 조건에서 이온성 액체 [EMIM][Br]을 0.5 g 첨가했을 때, 아스타크산틴의 추출 수율은 45.81 µg/g으로 실험적으로 구하였다. 같은 조건 하에서 이온성 액체를 첨가하지 않았을 때, 추출 수율이 38.7 µg/g이므로 이온성 액체를 첨가했을 때 추출 수율이 높은 것을 확인하였다. 이를 통해 본 연구가 아스타크산틴을 추출공정에서 최적추출조건을 미리 예상해 공정 분야 기초 분야에 많은 도움을 줄 것으로 생각한다.

감사

본 연구는 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 고순도 분리 연구실에서 수행되었습니다 (경기씨그랜트사업).

REFERENCES

- No, H. K. and M. Y. Lee (1995) Isolation of Chitin from crab shell waste. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 105-113.
- Yoon, C. H., H. S. Bok, D. K. Choi, and K. H. Row (2012) Opti-

- mization condition of astaxanthin extract from shrimp waste using response surface methodology. *Korean Chem. Eng. Res.* 50: 545-550.
- Kim, H. C., S. J. Park, J. K. Kim, Y. R. Kim, W. S. Park, Y. U. Cho, H. J. Cho, J. H. Kim, and Y. L. Ha (2001) Effect of the egg yolks from laying hens intubated astaxanthin on the macrophage activity, Hemagglutinintiter and Hemolysintiter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 1283-1286.
- Kim, H. C., S. J. Park, J. K. Kim, C. W. Park, Y. U. Cho, H. J. Cho, and Y. L. Ha (2002) Effect of egg yolks from laying hens intubated astaxanthin on the oxidation of liver microsome of mouse. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 155-159.
- Kim, H. and J. O. Kang (1998) Determination of astaxanthin, α -tocopherol and tbars in the liver and muscle of rainbow trout supplemented with red yeast containing astaxanthin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 935-939.
- R. Todd Lorenz and Gerald R. Cysewski (2000) Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.
- Lim, G. B., S. Y. Lee, E. K. Lee, S. J. Haam, and W. S. Kim (2002) Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *J. Biochemical Eng.* 11: 181-187.
- Oh, S. Y., J. W. Kang, B. H. Park, and K. S. Kim (2012) Thermodynamic properties of imidazolium ionic liquids. *Korean Chem. Eng. Res.* 50: 708-712.
- R. Jakub., J. Vondrák, J. Michálek, Z. Míčka (2006) Ternary polymer electrolytes with 1-methylimidazole based ionic liquids and aprotic solvents. *Electrochimica Acta.* 52: 1398-1408.
- Ngo, H. L., K. L. Compte, L. Hargens, and A. B. McEwen (2000) Thermal properties of imidazolium ionic liquids. *Thermochim. Acta.* 97: 357-361.
- Valenzuela, L. F., I. H. Ciapari, and F. G. Valencia (2001) Supercritical cojethanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste. *J. Food Process Eng.* 24: 101-112.
- Kim, S. Y., E. Cho, J. M. Yoo, M. J. In, and H. J. Chae (2008) Solubility and storage stability of astaxanthin. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 546-550.
- Chen, X., R. Chen, Z. Y. Guo, C. Li, and P. Li (2007) The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* 101: 1580-1584.
- Lee, S. K. and J. W. Kim (1994) Purification and characterization of a carotenoprotein from *Penaeus orientalis*. *J. Korean Chem. Soc.* 38: 608-615.
- Bi, W., M. Tian, J. Zou, K. H. Row (2010) Task-specific ionic liquid-assisted extraction and separation of astaxanthin from shrimp waste. *J. Chromatogr. B.* 878: 2243-2248.
- Ma, W. Y., Y. B. Lu, R. L. Hu, J. H. Chen, Z. H. Zhang, and Y. J. Pan (2010) Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three alkaloids N-normuciferine, O-normuciferine, and nuciferine from lotus leaf. *Talanta* 80: 1292-1297.
- Lu, Y. B., W. Y. Ma, R. L. Hu, X. J. Dai, and Y. J. Pan (2008) Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J. Chromatogr. A.* 1208: 42-46.

18. Rostagno, M. A., M. Palma, and C. G. Barroso (2007) Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Anal. Chim. Acta.* 588: 274-282.
19. Sachindra, N. M., N. Bhaskar, and N. S. Mahendrakar (2005) Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *Lebens Wiss und-Technol.* 38: 221-225.