

## 밀도구배 초임계 CO<sub>2</sub> 크로마토그래피에 의한 Eicosapentaenoic Acid (EPA) 정제

유 병 삼 · 변 상 요

아주대학교 공과대학 화학·생물공학부  
(접수 : 1998. 11. 27., 게재승인 : 1999. 2. 24.)

### Purification of Eicosapentaenoic Acid (EPA) by Density Gradient Supercritical CO<sub>2</sub> Chromatography

Byoung Sam Yoo and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
(Received : 1998. 11. 27., Accepted : 1999. 2. 24.)

Supercritical CO<sub>2</sub> chromatography was applied for purification of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) from fish oil. Various supercritical CO<sub>2</sub> pressures were tested to find out the pressure effects on solubility and selectivity of low fatty acids in the silver nitrate column. The solubility of low fatty acids was increased as the supercritical CO<sub>2</sub> pressure increased. However, the selectivity between low fatty acids and EPA was decreased. Stepwise density gradient method was applied to increase the purification efficiency of EPA. Low fatty acids were easily separated at the early elution steps with low CO<sub>2</sub> densities. Successive fractions containing 92.1~97.8% of EPA were collected. The average concentration of three purified fractions was 95.6% with the recovery rate of 30%.

Key Words : Supercritical fluid chromatography, EPA, DHA, density gradient

#### 서 론

미국립보건원(National Institutes of Health)에서는 어유(fish oils)와 같은 식품 속에 많이 함유된  $\omega$ -3 지방산의 cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5 $\omega$ 3) 및 cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid(DHA, 22:6 $\omega$ 3) 그리고 다른 고도 불포화 지방산(polyunsaturated fatty acids)들이 심장순환계 질병 및 특정한 중앙의 발육 억제 등에 치료효과가 있다는 연구결과를 발표하고있다(1, 2). EPA는 생선을 많이 먹는 그린랜드 에스키모인들이 심장병에 의한 사망이 적다고 하는 점으로부터 그 생리활성 기능이 주목받기 시작하였으며 면역조사에서도 항혈전 작용, 항지혈 작용, 혈압저하 작용, 항염증 작용, 항알러지 작용 등 수많은 생리기능이 보고되었고, DHA는 뇌에 많이 존재하며 학습능력에 영향을 미친다는 연구결과 등에 의하여 이들 물질들은 그 동안 주로 식품에 첨가되어 활용되어 왔으나, 근래에 들어 의약품으로 이용하기 위하여 이들의 고순도 정제가 요구되고 있다(3). 이들을 정제할 수 있는 방법들에는 high-performance

liquid chromatography(HPLC), silver resin chromatography, urea crystallization, vacuum distillation 그리고 supercritical fluid extraction(SFE) 및 chromatography(SFC) 등이 있다. 그런데 crystallization 이나 distillation과 같은 방법들은 고순도 정제가 힘들고, HPLC 방법은 정제 비용이 비싸다는 단점이 있다. 그러나 초임계유체를 이용하는 SFC 방법은 위의 문제점들을 해결할 수 있는 방법으로 최근 큰 관심과 함께 많은 연구가 진행되고 있다(2).

SFC의 정제 원리는 일반적인 HPLC와 같으며, 단지 이동상으로서 임계온도(critical temperature, T<sub>c</sub>)와 임계압력(critical pressure, P<sub>c</sub>)의 부근이나 그 이상의 상태인 초임계유체를 이용한다는 점이 다르다. 초임계유체는 기체와 액체의 물성을 결충한 특성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100 배정도 크게 나타난다(4). 따라서 높은 용해도와 빠른 물질전달 속도를 나타낸다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조용매(modifier)의 사용으로 용매력(solvent power)을 자유자재로 조절할 수 있으므로 목적물을 선택적으로 분리할 수 있다. 일반적으로 사용되고 있는 초임계유체로 이산화탄소를 꼽을 수 있는데, 이것은 임계온도가 낮아서 열에 불안정한 물질의 분리 정제에 용이하다. 한편, 초임계유체 용매는 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있으므로 유기용매 추출시 문제가 되는 환경오염을 방지할 수 있고 또한 그 가격이 저렴하므로 SFC는 매우 환경친

† Corresponding Author ; School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-214-8918  
e-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

화적이며 경제적인 추출방법이라고 할 수 있다(5).

초임계 유체를 이용한 EPA 및 DHA의 분리정제와 관련된 기존의 연구결과들은 국내의 경우 SFE 방법을 응용한 것이 대부분이고 따라서 EPA 및 DHA의 순도가 90% 미만의 수준에 그치고 있으며(1, 6), 국외의 경우는 SFC 방법을 응용한 실험들에서 90% 이상까지 순도를 증가시키는 결과를 얻었지만 반면에 낮은 회수율이 문제가 되고 있다(3, 7). 본 연구에서는 고순도 EPA 및 DHA 대량생산의 첫 단계로 실험실 규모의 SFC 시스템을 이용하여 가능성을 조사하였다. 먼저 분리정제의 주요 핵심부분인 컬럼은 질산은(silver nitrate)으로 코팅된 실리카겔을 충전하여 제조한 것으로 알칸류(alkanes) 지방산들로부터 우리가 원하는 cis-알켄류(alkenes) 지방산들의 분리를 더욱 용이하게 하였다. 그 이유는 cis-알켄류 지방산들은 silver와 킬레이팅 화학결합을 형성하고, 이러한 작용은 알칸류 지방산들보다 더 강하게 고정상에 흡착하는 결과를 나타내기 때문이다(7). 한편 앞에서 설명된 바와 같이, 초임계 유체조건에서 유체의 밀도는 특히 임계압력 근처의 저압조건에서 작은 압력 증가에 따라 큰 폭으로 증가한다는 사실을 문헌에서 찾아볼 수 있다(5). 그런데 초임계 유체의 용해력은 밀도 증가에 따라 비례적으로 증가되고, 따라서 SFC 방법으로 복잡한 혼합물을 분리할 때 위의 초임계 유체와 압력과의 상관관계에 대한 원리를 응용할 수 있다. 그 예로 일정한 추출압력 범위 내에서 시간에 따라 압력을 일정하게 증가시킴으로써 용해력을 증가시키는 방법을 사용할 수 있다. 이 기술을 밀도구배(density gradient)방법이라고 한다. 또한 이와 유사한 방법이지만 압력변화를 시간이 아닌 혼합물에 포함된 각 성분들의 분리시점을 기준으로 할 수도 있다(3). 본 실험에서는 EPA 및 DHA를 정제하기 위하여 어유에 포함된 저지방산들, EPA 그리고 DHA 성분들의 질산은 컬럼에서의 압력(밀도) 변화에 의한 분리 특성을 연구하였다. 특히 고순도의 EPA를 얻기 위한 단계별 밀도구배(stepwise density gradient) 조건에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### Supercritical Fluid Chromatography(SFC) 장치

Figure 1은 다양한 조절밸브를 통하여 추출과 고순도 정제를 연속적으로 할 수 있는 SFE와 SFC가 온라인으로 연결된 장치이다. 또한 전자식 back-pressure regulator (880-01, JASCO Co., Japan)에 의해 초임계유체의 압력을 조절함으로써 광범위한 용매특성을 나타내게 할 수 있다. 이 시스템은 다음과 같이 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 첫 번째 부분인 fluid delivery module은 CO<sub>2</sub>를 가압하여 임계압력 이상으로 만들어 주는 cooling head가 장착된 HPLC pump (PU-980, JASCO Co., Japan)와 보조용매(modifier)를 공급하는 또 다른 HPLC pump로 구성되어 있다. 두 번째 부분인 chromatography module에서는 injector를 통하여 주입된 샘플을 air-driven oven (CO-965 column oven, JASCO Co., Japan)내에 설치되어 있는 고순도 정제용 흡착 컬럼에 흡착시키고 elution 시키는 기능을 수행한다. 컬럼 effluent는 UV-VIS detector(UV-975, JASCO Co., Japan)에서 monitoring 된다. 세 번째 부분인 fractionation module에서는 back-pressure regulator를 통하여 흘러나오는 effluent가 대기압으로 감압되면서 그 속에 들어있는 초임계

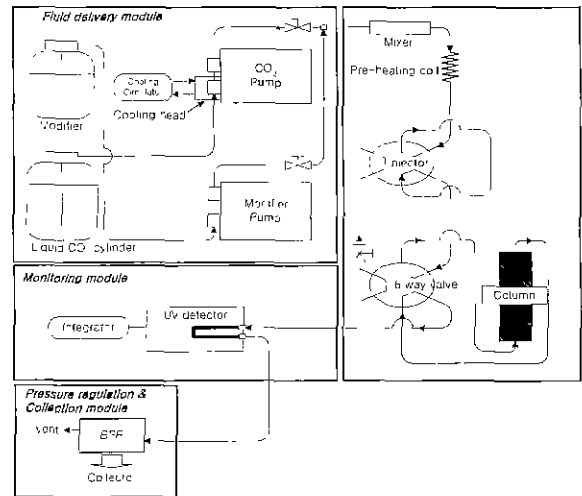


Figure 1 Schematic flow diagram of SFC system

유체는 대기 중으로 제거되고 용질들은 용해도(solubility)가 거의 사라지면서 수집용기에 포집된다.

### 시료 및 시약

SFC의 이동상인 초임계 CO<sub>2</sub>의 원료로 고순도 액체 CO<sub>2</sub>(99.95%)를 사용하였다. 분리정제에 사용된 원료물질인 어유에는 다양한 지방산들이 포함되어 있으므로 전처리과정으로 요소부가(urea crystallized)방법을 사용하였다. 이 방법은 요소 성분이 포화지방산 또는 단일 이중결합 불포화지방산(monounsaturated fatty acid)들과 선택적으로 반응하여 침전을 일으킴으로서 원료에 포함되어 있는 불포화지방산의 농도를 증가시킬 수 있다(8). 이와 같은 방법으로 얻어진 불포화지방산들은 methyl esters 형태로 제조하여 실험에 사용하였다. 보조용매, 추출물의 포집을 위한 용매 등은 99.8% 이상의 순도를 갖는 HPLC용 용매 (Fisher, U.S.A)를 사용하였다.

### SFC 운전조건

초기 압력이 C20 미만 지방산들의 용해도에 미치는 영향을 조사하기 위한 SFC 조건으로 오븐온도는 40℃, CO<sub>2</sub> 유속은 4 mL/min으로 유지하였고, 초임계 CO<sub>2</sub>의 압력은 각각 83, 85, 87 bar로 변화시키면서 실험하였다. 단계별 밀도구배(stepwise density gradient) 실험을 위한 SFC 조건으로 오븐 온도는 40℃, CO<sub>2</sub> 유속은 1 mL/min로 유지하였고, 초임계 CO<sub>2</sub> 압력 조건은 0~270 min 동안 92 bar 등압조건을 유지하다가 270~420 min 동안에는 30 min당 1 bar 씩 증가시켰으며, 그 후 111 bar로 증가시켰다. 분리정제에 사용된 컬럼은 질산은으로 코팅된 실리카겔(10 μm, 100 Å)을 stainless steel 컬럼에 충전하여 사용하였다. 샘플 주입량은 50 μL 였으며, SFC 동안 effluent 내에 포함된 지방산들은 15 min 간격의 분획(fraction) 조건으로 by-passed ethanol에 의해 용해시켜 수집하였다.

### 지방산 분석

각각의 분획내에 포함된 성분들은 FID detector를 이용한 gas-liquid chromatography(Model DS6200, DONAM, Korea) 방법으로 측정하였고, 분석용 컬럼은 EC-5(SE-54, 30m length

× 0.25mm ID., Alltech) 모세관 컬럼을 사용하였다 분석조건은 injector와 detector 온도를 각각 300°C와 310°C로 하였고, 오븐 온도는 200°C에서 260°C까지 7°C/min의 승온조건을 유지하는 온도변화 프로그램을 사용하였다. 이동 가스로 헬륨을 사용하였고, split ratio는 1:60으로 유지하였다.

**분획내의 EPA 및 DHA 회수를 계산**

각각의 분획(fraction)들을 증발농축 후 에탄올 200 µL에 녹였다. SFC에 사용된 샘플은 33%-EPA와 22%-DHA 순도를 갖는 것이며, 시료 주입량 50 µL (447 mg)을 기준으로 할 때, 샘플에 포함된 EPA 및 DHA 질량은 각각 14.75와 9.83 mg 이다. 따라서 회수율(recovery, %)은 다음 식으로 계산된다.

$$\text{recovery}(\%) = \frac{\text{분획내에 포함된 EPA 및 DHA 질량}}{\text{시료에 포함된 EPA 및 DHA 질량}} \times 100$$

**결과 및 고찰**

**SFC 압력변화가 지방산의 용해도 및 분리도에 미치는 영향**

요소부카(urea crystallized)에 의하여 마련된 시료의 지방산 함량은 EPA와 DHA가 각각 33%, 22% 이었고, 19.9%가 C16:4 ω3, C18:4 ω3 또는 EPA와 구조가 다른 C20 지방산(C20:1 ω9, C20:4 ω3, C20:4 ω6)으로 구성되어 있었다. 따라서 본 연구에서는 우선 19.9%를 차지하는 이들 지방산 혼합물(이하 저지방산, low fatty acids)과 EPA, DHA를 분리할 수 있는 SFC 압력 조건에 대한 연구를 수행하였다. 질산은 칼럼온도 40°C와 초입계 CO<sub>2</sub> 유속 4 mL/min의 동일 조건하에서 입력조건을 83, 85, 87 bar로 변화시키며 SFC를 운전한 결과, 압력 증가에 따라 저지방산의 elution 시간이 단축됨을 알 수 있었다. Figure 2는 SFC를 운전하며 약 10분 단위로 분획(fraction)을 받은 뒤 각 분획 내의 저지방 및 EPA 함량을 분석하여 elution 시간 별로 나타낸 그래프이다. 초입계 CO<sub>2</sub>의 압력이 증가할수록 저지방산의 용해도(solubility)는 증가되는 경향을 나타내었다. 그러나 C20의 불포화지방산인 EPA와의 분리도(selectivity)는 용해도가 최대였던 87 bar에서 오히려 저조하였다. Figure 2에서 보듯이 87 bar의 조건에서 저지방산의 elution 시간에 따른 농도변화가 100%에서 머무름 없이 급격히 감소하는 결과를 나타내었는데, 이는 EPA가 저지방산과 분리되지 못한 채 초입계 CO<sub>2</sub>에 의해 용해되어 나왔기 때문 이었다. 그러나 85와 83 bar의 조건에서는 저지방산의 농도가 100%에 가까운 농도를 약 한시간 동안 유지하다가 급격히 떨어지는 경향을 보였고 이와 동시에 EPA의 농도는 급격히 증가되는 결과를 얻었는데, 이는 EPA에 대한 저지방산의 선택적 분리가 매우 향상되었음을 나타내는 결과였다. Borch-Jensen의 연구(9)에 의하면, 지방산들의 용해도는 낮은 CO<sub>2</sub> 밀도 범위에서 밀도증가에 따라 급격히 증가하지만, 밀도 범위가 어느 정도의 한계를 넘으면 점차적으로 일정하게 유지된다고 하였다. 또한 낮은 압력 범위로 갈수록 성분들간의 분리도는 증가한다고 하였다. 따라서 용해도와 분리도를 동시에 만족할 수 있는 압력 조건을 찾기 위해서는 지방산들의 용해도가 급격히 변화하는 CO<sub>2</sub> 밀도 구간 내에서 찾아야 할 것이다. Borch-Jensen은 이러한 CO<sub>2</sub> 밀도 조건을 70°C, 130 bar의 실험조건에서 얻어진 0.4 g/mL 이라고 하였다. 즉, 이 조건에서는

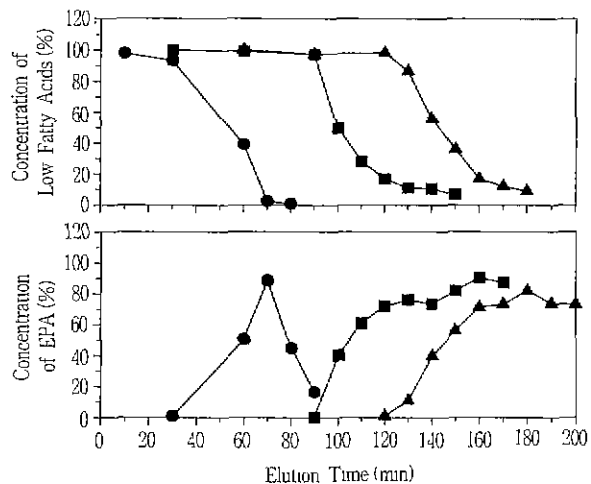


Figure 2. Effects of supercritical CO<sub>2</sub> pressure on the solubility of low fatty acids and the selectivity between low fatty acids and EPA. The SFC was operated with 4mL/min of CO<sub>2</sub> flow rate, 40°C of column temperature, and various CO<sub>2</sub> pressures of 83 bar(▲), 85 bar(■), 87 bar(●).

만족할 만한 용해도를 갖음은 물론, C16, C18, C20, 그리고 C22 지방산들에 대한 충분한 분리력을 갖는다고 하였다 우리가 적용한 압력 조건인 87, 85, 그리고 83 bar는 40°C에서 CO<sub>2</sub> 밀도를 각각 0.405, 0.357 그리고 0.319 g/mL로 유지 시켜 주었다 그리고 87 bar 보다 약간 낮은 85와 83 bar의 조건에서 지방산들의 용해도는 감소하지만, 반면에 보다 높은 분리도를 얻을 수 있었다. 여기서 중요한 결론은 우리가 원하는 정도의 용해도를 나타낼 수 있는 CO<sub>2</sub> 밀도는 비교적 낮은 압력 범위에서 결정될 수 있고, 이러한 범위 내에서 압력의 미세한 조정에도 지방산들 간의 분리도는 크게 변한다는 것이다

**단계별 밀도구배(stepwise density gradient)에 의한 EPA 및 DHA의 분리**

앞의 실험에서 저지방산들과 C20이상인 ω-3 계통의 고도 불포화지방산들을 선택적으로 분리가 가능함을 알 수 있었다. 그 다음 단계로 우리가 목표로 하는 EPA 및 DHA의 선택적 분리 정제를 위한 실험을 수행하였다 그런데 시료에는 EPA와 유사한 분자구조를 갖는 C20:1 ω9, 20:4 ω3, C20:4 ω6 등과 더불어 DHA와 유사한 분자구조를 갖는 C22:5 ω3 등이 포함되어 있으므로 EPA와 DHA의 고순도 분리정제에 큰 장애가 되고 있다. 즉, 등압조건에서 SFC를 운전하는 방법으로는 EPA와 DHA의 고순도 분리정제가 힘들었다. 따라서 단계별 밀도구배 조건을 적용하여 각각의 지방산들에 대한 분리도를 변화시킴으로서 EPA 및 DHA의 분리경계 효율을 증가시키는 실험을 하였다. 단계별 밀도구배 조건을 최적화하기 위해서는 단계 수와 각 단계별 압력을 최적화해야 하는데 이는 엄청난 최적화 실험을 위한 경우의 수를 필요로 한다. 반복된 실험을 통하여 Figure 3과 같은 단계별 압력구배 조건이 분리정제 효율이 우수함을 알 수 있었다. Figure 3과 같이 샘플 주입 후 270 분까지의 추출 압력은 92 bar의 등압(isobaric)조건을 유지하였고, 이 후부터 420 분까지는 30 분당 1 bar씩 단계적으로 압력을 증가시키는 단계별 밀도구배 조건을 적용하였으며, 420 분 이후 111 bar로 압력

을 급상승 시켰다. SFC 동안 온도는 40°C 등온조건. CO<sub>2</sub> 유속은 1 mL/min의 등속조건을 유지하였다. 이러한 조건하에서 SFC 운전 결과, 375 분까지 저지방산이 완전히 분리되었고, 375분부터 420 분까지의 동안에는 92.1~97.8%의 EPA 순도를 갖는 분획(fraction)들을 얻었다. 또한 420 분 이후에는 50~54%의 DHA 순도를 갖는 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 4). 그리고 Figure 5에서는 각각의 분획들의 회수율을 비교하여 보았다. 이와 같은 결과들에서 단계별 밀도구배 조건이 끝나지 않은 7번 분획에서 EPA 순도가 64.6% 임에도 불구하고 가장 높은 회수율을 나타내었는데, 이러한 원인은 EPA 순도가 가장 높게 나타난 4번과 5번 분획의 압력조건인 98 bar 조건에서 분리시간을 더욱 연장하여 EPA를 완전히 분리시키지 못했기 때문으로 생각된다. 이번 연구 결과를 Saito의 연구결과(7)와 비교해볼 때, 그들은 EPA의 순도가 93%인 분획에서 21%의 회수율을 얻은 반면, 본 연구에선 4, 5, 6번 분획들을 더할 경우 평균순도 95.6%에서 30%의 회수율이라는 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

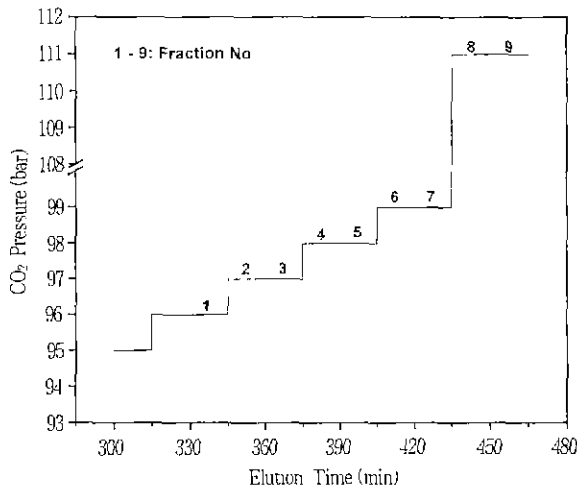


Figure 3. Pressure programming schemes used for stepwise density gradient.

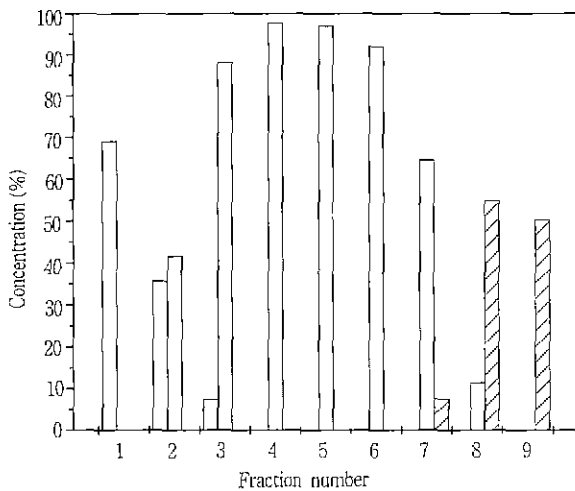


Figure 4. Concentration of low fatty acids(□), EPA(□) and DHA(▨) in the fractions collected by stepwise density gradient SFC operated with 1 mL/min of CO<sub>2</sub> flow rate and 40°C of column temperature.

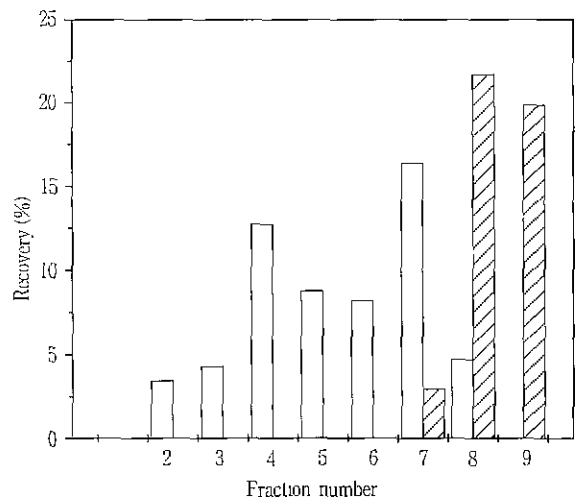


Figure 5 Recovery rate of EPA(□) and DHA(▨) in the fractions collected by stepwise density gradient SFC operated with 1 mL/min of CO<sub>2</sub> flow rate and 40°C of column temperature.

이번 연구에서 저지방산, EPA 그리고 DHA가 완전히 분리되는 압력조건은 찾지 못하였지만 Figure 4의 결과를 고찰해 볼 때, 저지방산만 미리 분리시킬 수 있는 압력조건은 1번 분획의 압력조건인 96 bar 이하에서 찾을 수 있고, 그 다음으로 EPA와 DHA를 완전히 분리시킬 수 있는 압력조건은 96 bar로부터 DHA가 분리되기 시작하는 6번 분획의 압력조건인 99 bar 사이에서 찾을 수 있을 것이다. 이와 같은 좁은 압력범위 내에서도 지방산들 간에 높은 분리도 결과를 나타낼 수 있었던 것은 초임계 CO<sub>2</sub>가 작은 압력변화에도 그 밀도는 큰 폭으로 변한다는 특성 때문이었다. 즉 작은 압력변화에도 초임계 CO<sub>2</sub>의 용매력은 크게 변하기 때문에 혼합 지방산 내에서 지방산들의 선택적 분리가 매우 탁월한 것이다. 따라서 단계별 밀도구배 조건의 최적화에 따라 지방산들의 분리도는 더욱 증가할 것이다. 그런데 저지방산들이 모두 분리될 때까지 소요된 시간은 총 375분으로 매우 비경제적인 결과를 나타내었다. 앞의 실험결과에서 비록 EPA와의 분리도는 크지 못하였지만 CO<sub>2</sub> 유속이 4 mL/min 일 때, 압력 85 bar에서 저지방산들이 모두 분리되는 시간은 약 150 분으로 더 짧았다. 따라서 완전한 분리도를 나타내는 압력조건을 결정할 때, 동시에 CO<sub>2</sub> 유속을 최적화 한다면 분리시간을 더욱 단축시킬 수 있을 것이다. 즉, SFC 동안 단계적인 CO<sub>2</sub> 유속 변화는 고순도 EPA 및 DHA 분리정제에 소요되는 분리시간을 단축시키는데 매우 효율적인 조건이 될 것이다. 한편, SFC에 의한 분리정제 과정을 보다 정교하게 분석관찰하기 위해 FID detector가 장착된 GC와 온라인으로 연결하여 사용할 수도 있는데 (10), 이 시스템은 단계별 밀도구배 조건의 최적화를 더욱 쉽게 할 것으로 기대된다.

요 약

이산화탄소를 용매로하는 초임계유체 크로마토그래피 (SFC) 방법을 이용하여 어유로부터 EPA 및 DHA를 고순도로 분리정제하는 연구를 하였다. 질산은 칼럼을 이용하는 초임계 이산화

탄소의 초기 압력조건 변화가 저 지방산의 용해도 및 분리도에 미치는 영향을 조사하였는데 압력이 증가될수록 저지방산의 용해도는 증가되었고, 반면에 EPA와의 분리도는 감소하는 경향을 나타내었다. EPA의 분리정제 효율을 높이기 위해 초임계 이산화탄소에 대한 단계별 밀도구배 방법을 적용하였다. 적용 결과 초기에 저지방산이 먼저 분리되었고, 계속해서 92.1~97.8% EPA 순도를 갖는 분획들을 얻을 수 있었다. 순도가 높은 3개의 분획의 평균 순도는 95.6%이었고 회수율은 30%에 달하였다.

### 참 고 문 헌

1. Yoon, J. R. (1993), Extraction of EPA and DHA from Tuna Oil Using Supercritical Carbon Dioxide, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(3), 288-294
2. Lee, R. S. and M. Karel (1990), Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease, pp.201-208, Marcel Dekker Inc, New York
3. Nilsson, W. B., E. J. Gauglitz, Jr and J. K. Hudson (1989), Supercritical Fluid Fractionation of Fish Oil Esters Using Incremental Pressure Programming and a Temperature Gradient, *JAOCs*, 66(11), 1596-1600
4. Stahl, E., K. W. Quirin, and D. Gerard (1988), Dense Gases for Extraction and Refining, p.176, Springer-Verlag, New York.
5. Taylor, L. T. (1996), Supercritical Fluid Extraction, pp. 1-27, JOHN WILEY & SONS, INC., New York.
6. Lim, S. B., M. K. Jwa, and D. J. Song (1998), Concentration of Polyunsaturated Fatty Acids from Anchovy Oil by Supercritical Carbon Dioxide, *Korean J. Food Sci Technol.*, 30(4), 848-854.
7. Sakae, H., Y. Yamauchi, and M. Saito (1990), Enrichment of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid esters from esterified fish oil by programmed extraction-elution with supercritical carbon dioxide, *Journal of Chromatography*, 515, 295-303
8. Sumerwell, W. N. (1957), Liquid-Solid Countercurrent Distribution of Fatty Acids with Urea, *J Am Chem. Soc.*, 79, 3411-3416.
9. Borch-Jensen, C., O. Henriksen, and J. Mollerup (1997), Supercritical Recovery of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid from Fish Oil, Supercritical Fluids, ACS Symposium series 670, pp90-100, American Chemical Society.
10. Luque de Castro, M. D., M. Valcárcel, and M. T. Tena (1994), Analytical Supercritical Fluid Extraction, p 216, Springer-Verlag, Berlin.