

초임계 CO₂를 이용한 *Camptotheca acuminata*에서 Camptothecin 및 10-hydroxycamptothecin 추출

부성준·† 변상요
아주대학교 공과대학 화학·생물공학부
(접수 : 2001. 2. 13., 게재승인 : 2001. 2. 21.)

Supercritical CO₂ Extraction of Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata*

Sung Jun Boo and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea
(Received : 2001. 2. 13., Accepted : 2001. 2. 21.)

Factors affecting the supercritical carbon dioxide extraction of camptothecin(CPT) and 10-hydroxycamptothecin(HCPT) from the dried powder of *Camptotheca acuminata* were studied. Only a few amount of CPT and HCPT was extracted with pure supercritical carbon dioxide. Methanol and ethanol were efficient modifiers to extract CPT and HCPT. At 40°C, 250 bar, 1 mL/min flow rate, 41% of CPT and 35% of HCPT were extracted with supercritical carbon dioxide modified with 16% of methanol. The diffusion effect of HCPT on extraction efficiency was studied in this solid-fluid system. Round matrix hot-ball model assumption revealed that the value of D/r^2 was 0.0072 min^{-1} which was higher than that of solvent extraction with methanol.

Key Words : supercritical carbon dioxide, camptothecin, 10-hydroxycamptothecin, modifier, *Camptotheca acuminata*

서론

최근 청정기술로 각광받고있는 초임계유체 추출(supercritical fluid extraction, SFE)은 추출용매로서 임계 온도나 임계 압력 이상의 초임계유체를 이용한다. 초임계유체는 기체와 액체의 장점을 모두 갖는 특성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100배 정도 크게 나타난다. 따라서 높은 용해도와 빠른 물질전달속도를 나타냄으로서 추출에 있어서 기존 용매추출보다 우수한 특성을 가진다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조용매(modifier)를 사용함으로써 용해력(solvent power)을 자유자재로 조절할 수 있어 목적물을 선택적으로 분리할 수 있는 장점이 있다. 현재 초임계유체로는 이산화탄소를 가장 많이 이용하는데, 이것은 임계조건이 낮아 열에 불안정한 물질의 분리정제에 유리하기 때문이다. 또한 초임계유체는 추출 후 용매가 추출물로부터 쉽게 분리

제거될 수 있으므로 유기용매 추출 시 문제되는 환경오염을 방지할 수 있어 환경 친화적인 방법이라 할 수 있다. 또한 이산화탄소는 그 가격이 저렴하여 경제적인 추출방법이라 할 수 있다(1-4).

회수라고 불리는 *Camptotheca acuminata* Dence.(Nyssaceae)는 주로 중국에서 발견되는 나무로 줄기와 수피에는 여러 종류의 alkaloid가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 강한 항암효과를 나타내는 이차대사산물인 camptothecin(CPT)이 함유되어 있다(5). 중국에서는 주로 암치료를 위한 한약재로 사용되는데 회수의 뿌리, 줄기, 잎, 과실의 ethyl alcohol 추출액은 각종 암세포에 대해 항암작용을 나타내며, 황색포도구균, 녹농균에 대한 항균작용도 있다(6). Cytotoxic한 quinoline계 alkaloid인 CPT는 1966년 Wall과 동료연구원에 의해 *C. acuminata* Dence. 줄기와 껍질에서 처음으로 추출에 성공되었지만, 그 이후 severe toxic effects로 인해 실험이 중단되었다. CPT의 antitumor 작용 mechanism은 기존의 여러 항암제의 작용과는 달리 DNA 복제시 DNA를 감고 푸는 작용을 하는 DNA topoisomerase I의 작용을 방해하여 DNA가 풀려지는 것을 방해함으로써 DNA와 RNA 합성의 강력한 억제제로 작용하기 때문에 결국은 단백질 합성이 방해가 된다(10). 이 mechanism은 triple complex의 안정화되는 정도에 따라 항암 활성이 좌우되며, 특히 lactone ring(E ring)이 여기에 관여한

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918
E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

다. 암세포는 정상적인 세포에 비해 성장과 복제가 훨씬 빠르기 때문에 결과적으로 topoisomerase가 억제되면 성장을 하지 못하게 된다.

하지만 CPT는 모든 세포에 대하여 강한 독성을 나타내기 때문에 이를 극복하고자 구조-활성간의 유도체 연구가 활발히 진행되었다. 1990년대부터 이러한 부작용이 없으면서 강력한 항암작용을 하는 CPT와 유도체를 합성하기 위한 많은 연구가 진행되어 그 유도체들이 최근 FDA 승인을 받아 활용되고 있다. 가장 대표적인 예로서 Topotecan은 10-hydroxycamptothecin(HCPT)의 analogue로써 SmithKline Beecham Pharmaceuticals에서 발견되었으며 FDA로부터 난소암의 치료제로 승인받았다. 또한 다른 유도체인 CPT-11(Irinotecan)은 일본에서 난소암 치료제로 사용되고 있다. 임상실험을 통해 Topotecan은 난소암을 포함한 다양한 암에 대해 activity를 보였으며 Phase III 단계에서는 기존의 치료를 통해 회복되지 않은 환자들 중 10~15%가 치료가 가능하였다. 한 연구에서는 taxol이 12%의 완치율을 나타내는 반면 topotecan은 20%의 완치율을 나타내는 것으로 보고되었다(7-9). 그리고 CPT 유도체는 간단한 반합성으로 CPT에서 쉽게 만들어질 수 있기 때문에 결국 유망한 암 치료제로 주목받게 될 것이다. 따라서 이를 위한 CPT 생산 또는 추출에 대한 관심이 높아지고 있다.

초임계 유체 추출의 장점은 천연물로서 인간에게 유용한 생리활성물질 추출에 매우 유용한 방법이라 할 수 있을 것이다. 특히 유기용매 추출에 비해 용매비용과 추출 시간이 적게 들고 추출 후 용매를 쉽게 제거할 수 있으며 압력, 온도, 보조용매의 특성을 바꿔가며 추출의 선택성을 조절할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 회수(*C. acuminata*)로부터 CPT 및 HCPT를 추출하고자 한다. 기본적으로는 온도, 압력, 유속, 추출시간 등과 같은 초임계유체 추출 조건을 최적화하고, 보다 효율을 높이기 위한 보조용매를 적용하는 실험과 동시에, 본 시스템에서 추출 확산 특성도 연구하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 연구에서 사용된 시료는 회수(*C. acuminata*)의 줄기와 잎을 건조시킨 후 ball mill로 갈아서 미세 분말로 입자화 시킨 후 사용하였다. 추출 용매로는 99.9%의 순도를 갖는 이산화탄소를 사용하였으며 분석용매, 보조용매, 추출물의 포집을 위한 용매 등은 고순도를 갖는 HPLC급 이상의 고순도 용매를 사용하였다.

초임계 CO₂유체를 이용한 추출

실험에 이용된 초임계추출장치는 압력이 자동 조절되는 back pressure regulator가 장착되어 정압 하에서 온도, 유량 등의 인자를 정밀하게 조절할 수 있는 것이 특징이다. 액체 상태의 이산화탄소를 cooling head가 부착된 HPLC펌프(PU-980, JASCO Co., Japan)에 공급하여 원하는 압력으로 가압할 수 있다. 또한 보조용매는 동일한 HPLC펌프(PU-980, JASCO Co., Japan)를 이용하여 공급되며 이산화탄소와 보조

용매는 밸브에 의해 공급이 조절된다. Air driven oven (CO-965 column oven, JASCO Co., Japan)내에 설치되어 있는 혼합기에서 공급된 이산화탄소와 보조용매가 완전히 혼합되며, 예열기에서 보다 정확한 초임계 상태가 보장된다. 이후 injector를 통과하고 6-way를 지나 추출기에 공급된다. 이때 이용한 고체 시료용 추출기는 10-50 mL의 부피를 가지며 양쪽 끝부분에 frit이 존재하여 고체시료 분말이나 추출물 중 고형물이 빠져나가지 못하도록 되어있다. 추출기에서 배출된 추출물은 UV 검출기를 지나 back pressure regulator (880-01, JASCO Co., Japan)에서 압력이 조절되어 포집기에 모이게 된다. 이때 back pressure regulator에는 막힘 현상을 방지하기 위한 heater가 설치되어 있다. 초임계 추출시 영향을 주는 인자에 대한 연구를 진행하기 위해 모든 조건은 동일하게 하고 영향인자만을 변화시켜 주어 추출경향을 살펴보았다. 본 실험장치를 이용한 추출은 시료 총 2 g을 사용하였고, bead는 총 3 g을 사용하였다. 추출기는 부피가 10 mL인 것을 사용하였으며, 충전 방법은 시료 1 g과 bead 1.5 g을 번갈아가면서 추출기에 충전시켰다. 이렇게 충전된 추출기를 초임계 장치에 장착한 후 초임계 유체를 연속적으로 통과시키면서 초임계 추출을 수행하였다. 추출되어 나온 물질은 80% methanol에 다시 녹여 포집하였다. 추출 효율은 유기용매를 이용하여 추출되는 추출량에 대한 비교치로서 백분율로 표시하였다.

추출 및 분석방법

건조 미세 분말로 부터의 CPT 추출은 분말에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출을 한 뒤, H₂O와 chloroform을 1:1(v/v)로 partitioning하여 chloroform 층을 따로 취한 뒤 진공 감압하여 증발시킨다. 다시 methanol로 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석하였다. 초임계 추출물은 이미 methanol에 포집되어 있으므로 상기 조건과 같이 chloroform으로 partitioning 후 methanol에 녹여 HPLC 분석한다. Camptothecin(CPT)과 10-hydroxycamptothecin(HCPT) 분석은 HPLC system을 이용하였는데 mobile phase로는 0.075 M ammonium acetate buffer(ion pairing agent로 1mM tetrabutylammonium phosphate)와 acetonitrile의 적절한 조합으로 분석하였다. Buffer:acetonitrile의 비율이 처음 15분동안 78:22(v/v)의 일정비율로 유지하다가 15분에서 20분까지 78:22에서 50:50으로 linear gradient로 바꾸고 다시 20분에서 30분까지 50:50의 일정비율로 만들어 주었다. 사용된 컬럼은 C-18 column (vydac reversed phase)이며, 유속은 1.2ml/min으로 하였다. 검출기로서 형광검출기를 이용하였는데, 검색 파장은 350 nm(ext)와 450 nm를 이용하였다(9).

결과 및 고찰

초임계 조건이 camptothecin 추출에 미치는 영향

초임계 이산화탄소를 이용하여 CPT와 HCPT 추출 실험을 한 결과, 이들은 각각 유기용매 추출에 비교하여 3, 2% 밖에 추출되지 않았다. 이러한 결과는 두 가지 이유로 설명할 수 있는데 첫째는 추출 용매로 쓰인 이산화탄소가 비극성의 성질이 있기 때문에 극성 성질을 갖는 용질에 대한 용해력은

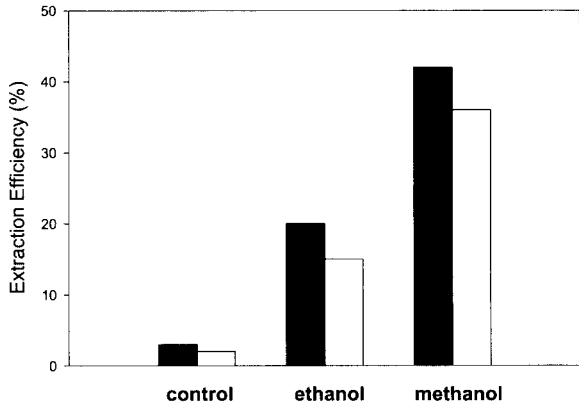


Figure 1. Effect of the various modifiers on extraction efficiency of CPT and HCPT in supercritical CO₂ system. Operating conditions were 1 ml/min, 250 bar, 40°C, 18% of modifier, and extraction for 30 min. Symbols, ■: CPT; □: HCPT.

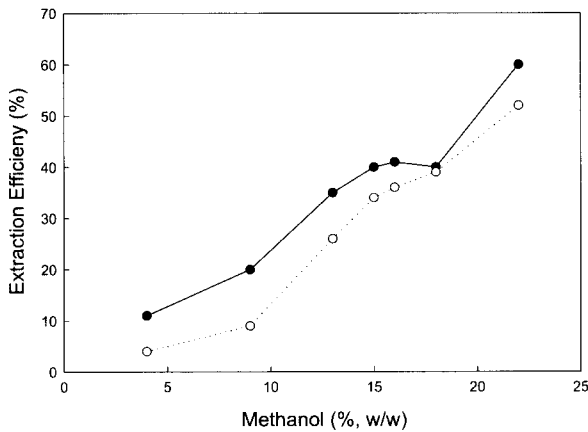


Figure 2. Effect of the modifier concentration on extraction efficiency of CPT and HCPT in methanol modified supercritical CO₂ system. Operating conditions were 1 ml/min, 250 bar, 40°C, and extraction for 30 min. Symbols, ●: CPT; ○: HCPT.

제한을 받거나, 둘째는 용질이 시료의 matrix에 강하게 결합되어 있기 때문이다. 이러한 용해력의 제한을 보완해주기 위해 보조용매를 초임계유체에 넣어주는데 주로 alcohol류가 많이 사용된다. 보조용매 사용시 초임계 유체의 용해력 증가는 용질과 보조용매 사이에 강한 결합이 형성되고, 보조용매에 의하여 초임계 유체의 밀도가 증가하기 때문이다(11). 본 연구에서는 메탄올과 에탄올을 보조용매로 이용하여 추출하고 결과를 비교해 보았다.

figure 1에서 보는 것처럼 보조용매로 메탄올과 에탄올을 이용하여 CPT와 HCPT를 추출하면 추출 효율이 상승됨을 확인할 수 있었다. 특히 에탄올 보다 메탄올이 효율이 좋았다. 따라서 보조용매 적용에 관련된 여러 조건들을 최적화 하였다. 메탄올을 보조용매로 사용하여 이것의 영향을 밝히기 위하여, 250 bar, 40°C, 추출시간 30분, 유량 1 mL/min 조건으로 추출하며 에탄올을 보조용매로 이용하여 이들의 농도를 변화시키면서 CPT와 HCPT의 추출 효율을 살펴보고 그 결과를 figure 2에 나타내었다. 메탄올을 보조용매로 사용하는 경우에 보조용매의 농도가 증가할수록 추출수율도 비례하여

증가하였고 16% 이상에서는 추출 효율이 완만하게 증가하였다. 보조용매 농도가 20% 이상부터는 보조용매 농도가 증가할수록 다시 CPT와 HCPT의 추출이 증가하는 경향을 나타내는데, 이는 초임계유체에 의한 추출 효과에 유기용매에 의한 추출 효과가 가미된 것으로 생각된다(12). 추출 수율과 함량을 고려해볼 때에 16% 메탄올 농도가 최적의 보조용매 농도라 여겨진다. 또한 추출은 온도에 따라 크게 영향을 받지 않았으나 온도에 따라 약간 증가하는 경향을 보였다(data not shown). 초임계 추출에서 압력의 영향을 살펴본 결과 250 bar 까지 압력이 증가할수록 추출 효율은 증가하였다. 이와 같은 결과는 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도 증가로 인해 용해력이 증가하기 때문에 나타난 결과로 여겨진다. 또한 초임계 추출에서 추출되는 용질의 성질에 따라 ion pairing agent의 영향을 많이 받기도 한다. 본 실험에서도 acetate ion을 공급하여 추출 실험을 수행하였으나 CPT나 HCPT 모두 ion pairing agent의 영향은 없는 것으로 나타났다(data not shown).

초임계 유체 추출에서 확산의 영향

본 시스템과 같은 solid/fluid 추출 시스템에서 추출 효율에 영향을 크게 미치는 요소로서 용해도, 확산, 및 matrix를 들 수 있는데 이들은 서로 중요한 상관관계를 갖는다. 먼저 용해도를 들면, 이는 초임계 추출이 성공하기 위해서는 용질이 충분히 녹을 수 있어야 한다는 개념이다. 추출은 매우 빠른 속도로 일어날 때에 이 요소는 추출이 시작되었을 때에 무척 중요하다. 많은 경우 이것은 단지 threshold pressure 위에 있는 상태를 의미한다. 또한 용해도를 조절함으로써 단계별 추출이 가능하기도 하다. 두 번째로 용질은 자신이 포함되어있는 matrix로부터 확산에 의하여 충분히 빠른 속도로 이동하여야 한다. 확산에는 용질의 확산 또는 matrix 안에서의 유체의 확산이 있고 아마도 이어서 표면에서 용매에 의한 용질분자의 대체가 일어난다. 확산에 대한 시간의 크기는 확산계수(diffusion coefficient)와 matrix 또는 matrix 입자의 형태와 직경에 의해서 좌우된다. 작은 입자직경이 확산에 유리하며 이 값의 제곱에 확산시간은 좌우되며 일반적으로 1 mm 이하가 추출 효율에 유리하다. 만약 용해도에 제한이 없다면 추출속도를 결정하는 요인은 matrix 밖으로의 확산 속도이다. 여기서 effective diffusion coefficient(D)를 계산할 때에 초기에 matrix 안에 용질이 균일하게 분배되어있고 matrix 표면에 용질의 농도는 0으로 가정한다. 여러 기하학적 모델로 구분하여 D 값을 계산할 수 있는데, 한 예로서 matrix가 구형인 hot-ball model로 계산할 수 있다. 초기에 matrix 안에 있는 용질의 농도를 m₀로 놓고 주어진 시간 후의 농도를 m으로 하여 ln(m/m₀) 와 time(min) 간의 그래프를 그리면 직선부분의 기울기 -1/t_c로부터 t_c(characteristic time)를 계산할 수 있다. Characteristic time t_c는 t_c=r²/π²D (r: matrix의 반지름)로 나타낼 수 있으므로 이로서 확산계수 D를 구할 수 있다(13). 세 번째 요소는 matrix이다. matrix 영향의 의미는 시료에 들어있는 일부 성분은 matrix 안에 갇혀있거나 표면에 너무 강하게 결합되어 있기 때문에 추출이 거의 불가능하다. 예를 들자면 중합체로부터 올리고머의 추출은 올리고머가 matrix 안에 갇혀있기 때문에 초임계 유체에 의한 추출은 유기용매

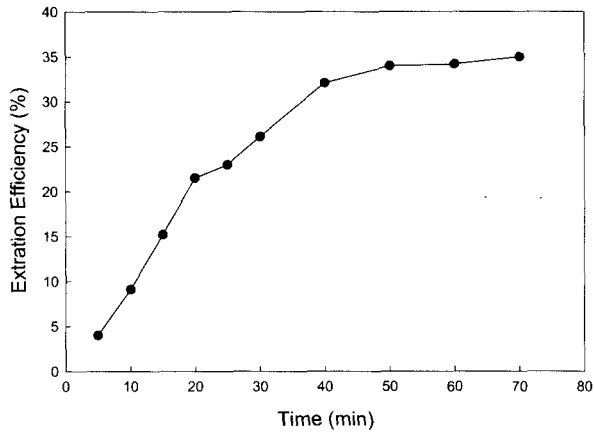


Figure 3. Effects of the diffusion and extraction time on extraction efficiency of HCPT in methanol modified supercritical CO₂ system. Operating conditions were 1 ml/min, 250 bar, 40°C, and 16% of methanol as modifier.

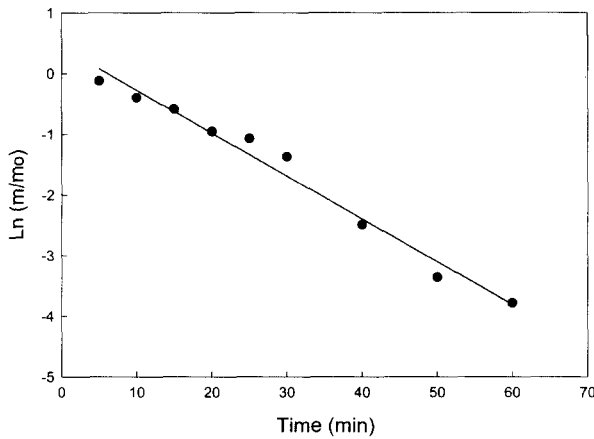


Figure 4. Continuous extraction curve based on the hot-ball model for methanol modified supercritical fluid extraction of HCPT. Operating conditions were 1 ml/min, 250 bar, 40°C, and 16% of methanol.

에 의한 추출보다는 낮은 효율을 나타낸다. 이와 유사한 예는 흡착성 matrix에서 발생한다. 상기 세 요소 중 matrix의 영향은 아직 완전히 알려져 있지 않으며 최근에는 확산에 관심이 집중되고 있다. 왜냐하면 대부분의 경우 용질은 matrix 안에 적은 양으로 존재하고 유체와 추출 상태는 용질이 어느 정도 녹을 수 있는 용해도를 갖는 상태로 선택될 수 있기 때문이다. 또한 용해도는 추출의 빠른 속도로 일어나고 유체에 용질이 용해도 이하로 존재하는 경우 추출 시작될 시기에만 중요하다(13).

메탄올을 보조용매로 이용하는 초임계 이산화탄소를 이용하여 HCPT를 추출할 때 확산 특성을 알아보았다. 16% 메탄올을 보조용매로 하며, 250 bar, 40°C, 1 mL/min 유량 조건으로 추출을 시작한 후 매 5분 간격으로 샘플링하여 추출된 HCPT 양을 측정하였다. figure 3은 추출시간에 따른 추출 효율을 나타낸 그래프이다. 추출 후 50분에 이르러 더 이상 추출되지 않는 포화상태에 도달하였고 이때의 추출 효율이 35%이었다. 이 같은 효율은 용매의 용해도 특성에도 기인

하겠지만 용질(HCPT)과 matrix 간의 강한 상호 결합 관계도 하나의 큰 영향을 미치는 요인이라 여겨진다. figure 3의 자료를 이용하여 hot-ball model을 적용하였다. figure 4와 같이 $\ln(m/m_0)$ 와 time(min)의 그래프를 그리고 기울기를 계산하여 t_c 값을 계산하여 14.1 min 을 얻었고, 이를 이용하여 D/r^2 값은 0.0072 min^{-1} 임을 알 수 있었다. 여기서 적용한 확산 특성은 HCPT중 matrix에 bound되지 않고 메탄올을 보조용매로 하는 초임계 이산화탄소에 의하여 추출 가능한 HCPT양을 m_0 로 한 것으로 matrix의 영향이 고려된 확산계수를 구하였다고 볼 수 있다. 같은 실험을 메탄올만 이용하는 유기용매 추출에도 적용해보았다. 그 결과 t_c 값은 15.0 min 을 얻었고, 이를 이용한 D/r^2 값은 0.0067 min^{-1} 을 얻었다. 따라서 보조용매를 포함하는 초임계 유체도 초임계 유체의 특성에 따라 액체 유기용매 추출보다 확산계수가 크며 이는 곧 추출속도 및 경제성과 연관되는 효율 향상으로 이어진다고 본다.

요 약

순수한 초임계 이산화탄소를 이용하여 camptothecin(CPT)와 10-hydroxy camptothecin(HCPT) 추출 실험을 한 결과, 이들은 각각 유기용매 메탄올 추출에 비교하여 3%와 2% 밖에 추출되지 않았다. 보조용매로 메탄올과 에탄올을 이용하여 CPT와 HCPT를 추출하면 추출 효율이 상승됨을 확인할 수 있었다. 특히 에탄올 보다 메탄올이 효율이 좋았다. 따라서 보조용매 적용에 관련된 여러 조건들을 최적화 하였다. 메탄올을 보조용매로 사용하는 경우에 보조용매의 농도가 증가할수록 추출 효율도 증가하였고 16% 이상에서는 추출 효율이 완만하게 증가하였다. 또한 추출은 온도에 따라 크게 영향을 받지 않았으나 온도에 따라 약간 증가하는 경향을 보였다. 초임계 추출에서 압력의 영향을 살펴본 결과 250 bar까지 압력이 증가할수록 추출 효율은 증가하였다. Acetate ion을 공급하여 추출 실험을 수행하였으나 CPT나 HCPT 모두 ion pairing agent의 영향은 없었다. 본 시스템과 같은 solid/fluid 추출 시스템에서 추출 효율에 영향을 크게 미치는 3가지 요소 (용해도, 확산, 및 matrix)중 확산의 영향을 살펴보았다. 여러 기하학적 모델 중 matrix가 구형인 hot-ball model로 확산계수를 계산하였다. 본 시스템에서 보조용매를 포함한 초임계 유체의 D/r^2 값은 0.0072 min^{-1} 로서 순수한 메탄올 유기용매 추출보다 큰 값을 보였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Roy, B.C., M. Goto, A. Kodama, and T. Hirose (1996), Supercritical CO₂ extraction of essential oils and cuticular waxes from peppermint leaves, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **67**, 21-26.
2. Zhong, M., B. Han, and H. Yan (1996), Solubility of stearic acid in supercritical CO₂ with cosolvent, *J.*

- Supercrit. Fluids*, **10**, 113-118.
3. Hills, J.W. and H.H. Hill (1994), Carbon dioxide supercritical fluid extraction of incinerator fly ash with a reaction solvent modifier, *J. Chromatogr.*, **679**, 319-328.
 4. Rizvi, S.S.H. (1994), *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*, 1st ed., p 82, Chapman & Hall, London.
 5. Hengel, A. J., M. P. Harkes, H. J. Wichers, P. G. M. Hesselink, and R. M. Buitelaar (1992), Characterization of callus and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **28**, 11~18.
 6. Perdue, R. E., R. L. Smith, M. E. Wall, J. L. Hartwell, and B. J. Abbott (1970), *Camptotheca acuminata Decaisne (Nyssaceae)*, source of camptothecin, an antileukemic alkaloid, Technical Bulletin, No. 1415, U.S. Department of Agriculture, *Agricultural Research Service*, Washington, D.C.
 7. Brodelius, P. (1985), The potential role of immobilization in plant cell biotechnology, *Trends Biotechnol.*, **3**, 330~337.
 8. Su, W. W., E. C., Asali, and A., E., Humphrey (1994), *Anchusa officinalis* : Production of rosmarinic acid in perfusion cell culture, *Biotechnol. Agric. Forest.*, **26**, 1~19.
 9. Song, S. H., S. Y. Byun (1999) Characterization of cell growth and camptothecin production in cell cultures of *Camptotheca acuminata*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**(6), 631~638.
 10. Wall, M. E. and M. C. Wani (1995), Camptothecin and Taxol : Discovery to Clinic-Thirteenth Bruce F. Cain in Memorial Award Lecture, *Cancer Research*, **55**, 753~760.
 11. Nicollier, G.F. and A.C. Thompson (1982), Separation and quantification of estrogenic isoflavone from clovers by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **249**, 399-402.
 12. Boo, S.J. and S.Y. Byun (1999), Supercritical CO₂ extraction of genistein from soybean, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(4), 490-494
 13. Clifford, A.A. (1993), Extraction controlled by diffusion out of the matrix, In *Supercritical Fluid Extraction and its Use in Chromatographic Sample Preparation*, S.A. Westwood ed., p7, Blackie Academy & Professional, Boca Raton, Florida.