

산·학·연·논·단

신기능성 생리활성 천연물의 분리

정 하 숙

덕성여자대학교 자연과학대학

Isolation of New Bioactive Phytochemicals from Natural Products

Ha Sook Chung

College of Natural Sciences, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

서 론

과거 수십년간 건강식품에 관한 관심 및 산업화가 계속되고, 현재까지도 놀랄만한 성장을 하고 있으며 이와 관련된 제품들이 개발·시판되어지고 있다. 이들 제품들은 영양학적 측면 뿐 아니라 의약품 측면에서도 중요한 의미를 갖게 한다. 건강식품 및 건강 지향형 기능성 식품들에 존재하는 생리활성 화학성분들은 식품내에 극미량 존재하므로 “천연 미량 영양성분(natural micro-nutrients)”으로도 불리워지고 있으며, 의약품과 유사한 효과를 나타내기도 한다. 우리나라의 경우, 식품 섭취를 통한 질병의 예방 및 치료 효능에 관하여는 비교적 최근부터 관심을 가지게 되었으며, 이들 식물화학성분(phytochemicals)이 특정 질병의 진행을 억제하거나 지연시킨다는 사실이 확인되고 있으며 천연재료를 이용한 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다(1-2). 이들 생리활성 성분들은 대부분 2차 대사산물(secondary metabolites)로서 어느 특정생물에만 분포되어 있으며 식물체 생합성 과정 중 소량씩 생성되는데, 지방산 관계 화합물, flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, quinone, tannin, peptide, indole, coumarin 및 plant sterol 등이 포함된다(3). 이 화합물들은 매우 적은 양으로도 고유의 생리활성을 나타내며, 식품에 존재하는 생리활성 성분을 분자레벨에서 보면 분자의 크기상 천연 유기화합물인 2,000 이하의 저분자 물질로부터 수만 이상의 고분자 물질로 구분된다(4).

천연물에서 기인된 생리활성 연구는 유효성분 검색에서부터 출발하는 것이 일반적이다. 천연물의 screening 실험 및 유효성분의 순수분리 단계까지는 실험목적에 알맞은 *in vitro* bioassay법을 활용하는 것이 바람직하다. 동물을 이용한 실험인 *in vivo* bioassay법은 바람직하지 않은

데 이는 동일한 동물의 strain 확립이 어려울 뿐만 아니라, 통계적으로 유의성이 있는 data를 얻기 위해서는 필요 이상의 다수의 동물이 수회의 반복실험을 위해 사용되기 때문이다.

이러한 방법으로 유효성분이 순수 분리된 후에는 이화학적 방법을 통한 구조결정이 요구되며, 분리된 유효성분의 함량이 동물실험용으로 부족한 경우에는 이미 확립된 방법에 준하여 대량분리하거나 합성을 통해 대량생산한 후 안전성 검사를 거쳐 제품화 단계로 이어진다(Fig. 1). 이때 구명된 생리활성물질이 새로운 구조가 아니고 이미 알려진 기지물질인 경우도 있겠으나, 그 활성이 처음으로 밝혀진 경우에는 신물질 창출 연구를 위한 선도화합물(Lead compound)의 역할을 충분히 할 수 있게 된다.

생리활성 천연물의 분리

Identification of Availability (유효성 검증)

천연물로부터 생리적으로 유용한 화학성분을 구명하기

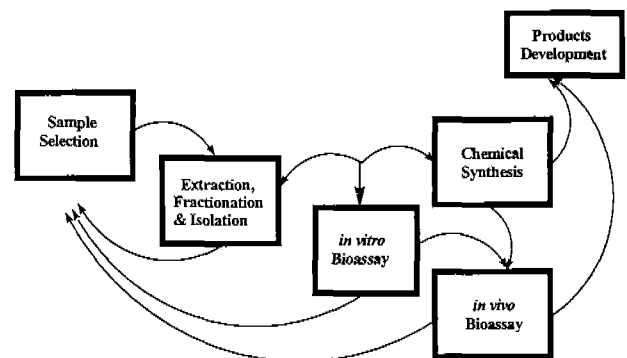


Fig. 1. Interrelationships of research established for the discovery of new bioactive components from natural sources.

위해서는 상당한 시간과 노력이 요구되므로 이미 과학적으로 입증된 자료 확인이 매우 중요하다. 즉 실험을 시작하기 전에 어떤 생리활성 또는 어떤 활용가능성이 있는지 면밀히 검토하고, 분류학적·식물 부위별 유효성분들의 물리적, 화학적 특성을 확인하므로써 실험의 중복성을 미리 방지할 수 있게 된다(5).

· **실험재료** : 일반적으로 실험재료는 문헌조사나 민간요법 등을 통해 얻은 자료를 근거로하여 유효성분 또는 생리활성별로 구분하여 선별하게 된다. 다음으로는 실험재료에 관한 정확한 감정이 필요하며, 연구결과 신물질을 분리했거나 또는 기지물질이라도 어느 특정식물에서 처음 분리했을 경우 식물감정을 의뢰하여 확실히 해두는 것이 좋다. 뿐만 아니라 국제적으로 공인된 식물표본실에 저장해 두는 것도 좋다(3). 식물성분을 연구하려면 원칙적으로 신선한 식물조직을 사용해야 하며, 식물성분을 추출하기 전에 식물을 건조시키기도 하는데 이 경우 재료에 함유된 유효성분이 건조로 인해 화학변화를 받지 않도록 주의를 기울여야 하며, 가능한 빨리 실온~30°C 이하의 저온, 통풍이 잘 되는 그늘진 곳에서 건조시키는 것이 좋다. 실제로 열풍건조된 재료를 사용하여 유효성분을 분리한 결과 원재료에는 함유되지 않은 인조산물(artefact)이 분리된 예가 있으므로 주의해야 한다(6). 실험재료는 저장기간 중 바이러스, 세균, 곰팡이 등에 감염되지 않도록 잘 보관해야 한다. 감염된 재료에서는 미생물의 대사산물이 검출될 우려가 있을 뿐 아니라 그 고유의 성분이 미생물에 의하여 분해되어 원재료에 존재하지 않은 물질이 분리될 가능성이 있기 때문이다(7). 또한 재료를 원상태로 보관하기 어려운 경우에는 alcohol이나 물 추출 후 농축하거나 동결건조하면 성분의 변화없이 장기간 보관이 가능하다.

Determination of the Extraction Method (추출방법 결정)

· **추출** : 사용하는 재료의 부위, 수분함량 및 어떤 종류의 생리활성물질을 추출하느냐에 따라 추출방법이 달라진다. 이미 문헌조사 및 예비실험 결과 특정 생리활성물질이 확인된 경우에는 분리하려는 활성물질의 화학구조에 적합한 추출용매를 선정하는 것이 실험진행에 도움이 된다(Table 1). 신선한 식물재료를 추출할 때는 일반적으로 식물내 존재하는 효소에 의해 식물성분이 산화 또는 가수분해되는 것을 방지하기 위하여 식물조직을 불활성화시킬 필요가 있다. 추출용매로서 alcohol이 주로 사용되며 때 2~3시간씩 수욕상에서 추출한 후 뜨거울 때 여과하며, 추출 횟수는 재료 및 추출용매의 함량에 따라 다르나 일반적으로 3~5회 반복하게 되는데, 잎의 경우에는 alcohol로 용출하여 나오는 색의 농도에 따라 결정하기도 한다. 보통의 경우 alcohol은 methanol을 주로 사용하나, 시료 추출

Table 1. Organic components extracted in solvents

Solvents	Bioactive phytochemicals
Et ₂ O	Fat · Wax · Resin · Alkaloid · Essential oil · Chlorophyll
CHCl ₃ /CH ₂ Cl ₂	Gum
EtOAc	Phenolic compounds
Alcohol	Saponin · Glycoside · Organic acid · Tannin · Alkaloid
H ₂ O	Saccharide · Peptide · Tannin · Glycoside · Mucus · Protein · Salt

물을 관능검사로 사용해야 하는 경우에는 ethanol을 사용하기도 한다(8). 건조된 식물재료를 추출할 때는 분말 상태나 적당한 크기로 자른 다음 용매의 극성이 낮은 순서부터 점차적으로 극성이 높은 순서대로 순차적으로 추출한다(Fig. 2). 일반적으로 사용하고 있는 계통적 추출법은 *n*-hexane, ether(Et₂O), chloroform(CHCl₃), ethylacetate (EtOAc), alcohol(*n*-BuOH, MeOH, EtOH), H₂O의 순서대로 추출한다. 그러나 실제로 이 방법으로 추출할 때 추출성분이 어느 확분에 완전 분리되는 것보다는 몇 개의 용매분획에 걸쳐서 추출되므로 주의해야 하며 Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용하여 용매별 추출성분의 유사성 여부를 확인해야 한다. 한편 열에 불안정하거나 추출시 화학구조가 변할 우려가 있는 천연물 추출은 초임계유체(supercritical fluid extraction: SFE)를 사용하면 좋은 효과를 얻을 수 있다. 비록 장비가 고가이기는 하지만 실온에서 기체인 CO₂, NO₂, NH₃ 등에 압력을 가하여 유체상태로 하고 소량의 물 또는 methanol을 첨가하여 사용하며 커피의 caffeine, 향신재료, 기호식품 추출시 널리 사용되고 있다(Table 2) (9-12).

Fractionation · Isolation · Purification (분획 · 분리 · 정제)

Alcohol로 추출한 식물 extract는 유효성분별로 적합한 용매분획, 분리 및 정제과정을 수행하게 된다. 주로 대규모 분리시 용매분획이 진행되며 이어서 유효성분의 순수분리가 행해진다. 각 용매분획에는 화학구조와 물성이 유사한 다수의 물질이 혼재되어 있어서 순수분리가 어려운 것은 사실이지만 chromatography와 같은 분리방법을 잘

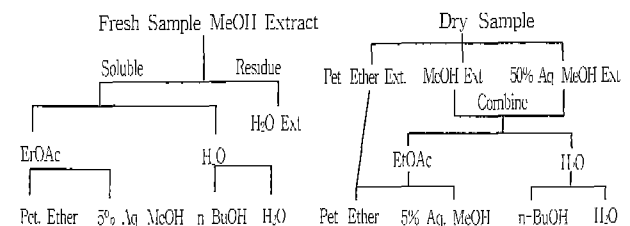


Fig. 2. General extraction and initial partitioning sequence of crude samples for both fresh collections and dried materials.

Table 2. Commercial applications of SFE of natural products

Natural product	Location	Start-up year	Company
Various Coffee	United States	1979	Phasex
	Germany	1979	HAG-General Foods
Hops	Australia	1982	Carlton & United
Hops, Spices	Germany	1982	SKW Chemicals
Hops, Spices	England	1983	English Hops
Hops	United States	1984	Pfizer
Hops	Germany	1985, 1988	Barth
Tca	Germany	1986	SKW Chemicals
Coffee	United States	1988	General Foods

활용하므로써 분리가 가능하다. Chromatography는 고정상(stationary phase)과 이동상(mobile phase)간의 흡착(adsorption) 또는 분배(partition)를 이용한 분리법이며 일반적으로 고정상이 고체인 것은 흡착형, 액체인 경우는 분배형이다. Fig. 3과 4는 천연물 분리시 널리 사용되는 액체 이동상 chromatography의 종류와 실제 모형을 보여 주고 있다.

· 농축 : 각 유기용매 분획물을 추출한 후에는 여과 후 rotary evaporator를 사용하여 감압하에서 농축한다. 농축 과정 중 농축액을 방치해 둘 때 결정(crystals)이 생성되는 경우가 있는데 이때는 우선 TLC로 단일물질 여부를 확인한다. 단일물질인 경우에는 재결정하여 정제하고 이화학적 성질을 확인한 후 화합물의 구조를 결정한다. 이때 결정을 돕기 위해서 농축액을 냉장 또는 냉동보관 하기도 한다. 식물체내에 비교적 다량 함유된 화합물이 위 방법에 의해 결정화되어 비교적 단기간에 화학구조가 결정되기도 한다(13). 그러나 대부분의 경우 결정을 얻기가 어렵고, 결정상태 일지라도 여러 종류의 성분이 혼합되어 있으므로 다시 용매에 녹인 후 적합한 방법에 따라 재분리를 시도해야 한다. 뿐만 아니라 TLC상으로는 1개의 spot일지라도 단일성분이 아닌 경우가 있으므로 반복적이며 정교한 실험을 통해 순수분리를 시도해야 한다(14,15).

· 분획·분리·정제 : 추출한 alcohol extract를 유기용매의 유전률에 따라 분획한 후 생리활성이 있는 용매분획을 확인, 다시 농축한 후 화합물의 특성에 따라 TLC용 분리용매를 선정한다. TLC는 흡착제를 균일한 박층(0.1~0.25 mm thickness)으로 만들어 사용하는 방법으로 흔히 silica gel 박층을 사용하며 극성이 매우 높은 화합물인 경우 C₁₈, polyamide와 cellulose 박층이 사용된다(Table 3). TLC는 분해능이 좋으며 분석 소요시간이 짧고 전개용매와 발색시약에 제한이 없으므로 여러 종류의 물질분석에 이용할 수 있다. Fig. 5와 6은 가장 기본적인 1,2차원 TLC 전개를 보여주고 있으며, 서로 다른 용매를 사용한

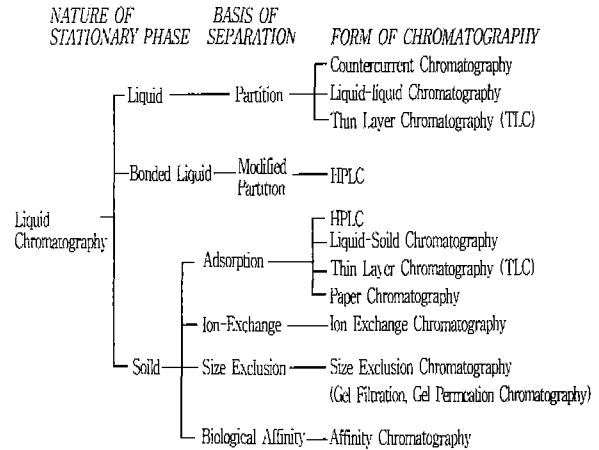


Fig. 3. Classification of liquid chromatography (LC) systems.

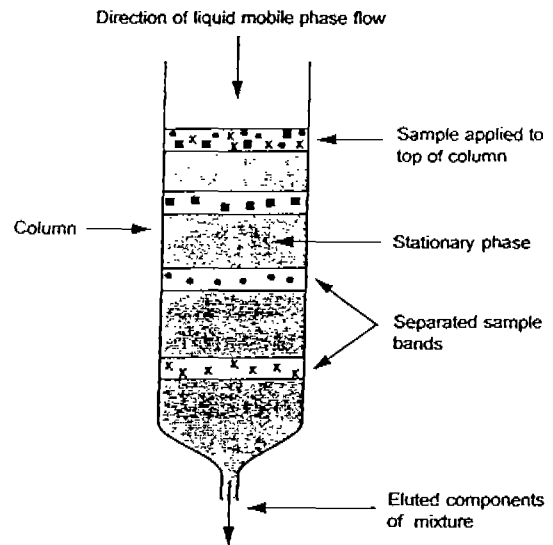


Fig. 4. Much preparative chromatography is carried out as a form of liquid chromatography with a column of solid packing material (stationary phase) over which is passed a liquid (mobile phase) containing the samples.

2차원 전개를 통해 물질 분리능이 증가하게 된다. 또한 TLC 전개 도중에 흔히 발견되는 "edge effects"(Fig. 7)는 전개용매가 완전히 포화되지 않거나 균일하게 혼합되지 않은 경우 발생하기 쉬운데, 미리 TLC tank에 여과지를 넣어서 전개용매가 완전히 포화된 것을 확인한 후에 전개시키면 이러한 현상을 방지할 수 있다(16). 반복적인 TLC 전개를 통해 단일물질이 확인되면 순수 정제를 하게 된다. 주로 alcohol이 사용되나, 물질의 물리·화학적 특성에 따라 난용성/가용성 용매를 적절하게 사용하여 결정이 생성되도록 유도한다.

Identification of bioactive compounds (생리활성물질의 구명) 순도가 높은 결정이 생성되면 기기분석에 의해 정확하

Table 3. Simple systems for TLC

Solvent system	Sorbent	Notes
Hexane : Ethyl acetate (EtoAc)	Silica gel	Universal system.
Petroleum : Diethyl ether (Et ₂ O)	Silica gel	A universal system for relatively nonpolar metabolites. Excellent for terpenes and fatty acids.
Petroleum : Chloroform (CHCl ₃)	Silica gel	Useful for the separation of cinnamic acid derivatives, particularly coumarins.
Toluene : EtoAc : Acetic acid (TEA)	Silica gel	Vary the composition, e.g., 80 : 18 : 2 or 60:38:2—excellent for acidic metabolites.
CHCl ₃ : Acetone	Silica gel	A general system for medium-polarity products.
Benzene : Acetone	Silica gel	Useful for the separation of aromatic products.
Butanol : Acetic acid : Water	Silica gel	A polar system for flavonoid and glycosides.
Butanol : Water : Pyridine : Toluene	Silica gel	Sugar analysis system. Try 10 : 6 : 6 : 1.
Methanol : Water	C ₁₈	Start with 100% MeOH to determine if metabolite will move from the origin. Increase water concentration to slow migration of metabolites. The addition of small amounts of acid or base may improve chromatography.
Acetonitrile : Water	C ₁₈ /C ₂	A universal simple reverse phase system.
Methanol : Water	Polyamide	Universal.
Methanol : Water	Cellulose	Used for the separation of highly polar compounds such as sugars and glycosides.

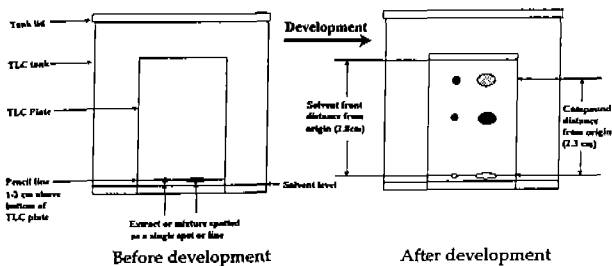


Fig. 5. Simple TLC equipment and procedure.

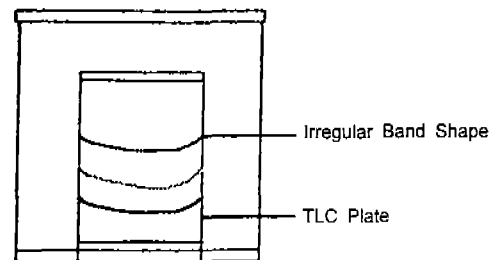


Fig. 7. Irregular band shape resulting from "edge effects".

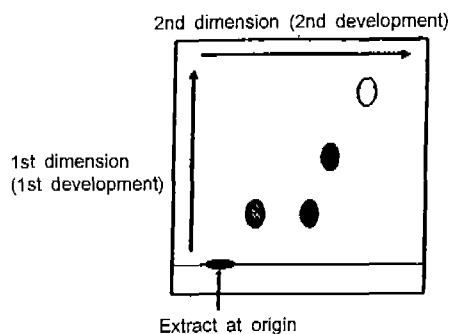


Fig. 6. Two-dimensional TLC plate after two developments.

계 구조를 결정할 수 있다. 우선적으로 간단한 발색방법으로 화합물의 특징을 검색한 후 (Table 4), 질량분석기로 분

자량과 분자식 확인이 가능하고, UV, IR, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR Spectroscopy 등을 통해 화합물의 관능기와 결합형태를 확인할 수 있다. 또한 분석에 적합한 크기의 순수 결정물을 얻는 경우 X-Ray Crystallography 방법을 이용하여 입체구조 구명이 가능하다(17,18). 분리된 물질이 기지 화합물인 경우, 문헌 및 대조 화합물과의 co-TLC를 이용하여 구조 확인이 용이하나, 신물질이거나 복잡한 구조의 화합물인 경우에는 일반적으로 몇 단계의 2차원 NMR Spectroscopy를 이용하여 구조결정을 하게 된다 (Fig. 8) (19).

Biological Assays (생리활성 실험)

Bioassay-guided fractionation 및 isolation 방법으로 순수

Table 4. Some simple spray reagents for natural products TLC visualization

Detection spray	Recipe	Treatment	Notes
(1) Vanillin/Sulfuric acid	Dissolve vanillin (4 g) in con. H ₂ SO ₄ (100 mL)	Heat at 100°C.	A universal spray. Many terpenes give red and blue colors.
(2) Phosphomolybdic acid (PMA)	Dissolve PMA in ethanol to make a 5% (w/v) solution.	Heat at 100°C.	Useful to detect many terpenes as blue spots on a yellow background.
(3) Ammonium molybdate (VI)	Dissolve ammonium molybdate (VI) (10 g) in con. H ₂ SO ₄ (100 mL).	Spray onto plate and heat at 100°C.	A universal spray. Many diterpenes give a blue color.
(4) Antimony (III) chloride	Dissolve antimony (III) chloride in a mixture of glacial acetic acid (20 mL) and chloroform (60 mL).	Spray onto plate and heat at 100°C for 2~5 min.	Di- and triterpenes give a red-to-blue coloration.
(5) Tin (IV) chloride	Add tin (IV) chloride (10 mL) to a mixture of chloroform (80 mL) and glacial acetic acid (80 mL).	Spray onto plate and heat for 5 min at 100°C.	Useful for the detection of flavanoids and terpenes.
(6) Dragendorff's Reagent	Add 10 mL of 40% aq. solution of KI to 10 mL of solution of 0.85 g of basic bismuth subnitrate in acetic acid (10 mL) and distilled water (50 mL). Dilute the resulting solution with acetic acid and water in the ratio 1:2:10.	Generally no heat is required, but if reaction is not spontaneous, heat. The procedure may be enhanced by decolorizing the plate with concentrated ammonia vapor.	Traditional method for alkaloid detection. Although some non-alkaloids such as iridoids and some flavonoids give a positive reaction. Alkaloids give a dark orange-to-red coloration.
(7) 2,4-Dinitrophenylhydrazine	Dissolve 2,4-dinitrophenylhydrazine (0.2 g) in 2 N HCl (50 mL).	Generally no heat is required, but if reaction is not spontaneous heat.	Detects aldehydes and ketones with a yellow-to-red coloration.
(8) Perchloric acid	A 20% (w/v) aq. perchloric acid solution.	Heat.	Especially useful for steroids and triterpenes.
(9) Borntrager Reagent	A 10% (w/v) ethanolic solution of KOH.	Heat.	For the detection of coumarins and anthraquinones.
(10) Ninhydrin	Add ninhydrin (0.3 g) to a mixture of butanol (100 mL) and acetic acid (3 mL).	Heat at 100°C.	Especially useful for amino acids, amines, and as a general alkaloid spray. Alkaloids appear as a red coloration.
(11) Ehrlich Reagent	Spray first with solution of 1 g 4-dimethylamino benzaldehyde in 100 mL 36% HCl/MeOH (3:1), then dimethylamino benzaldehyde in 100 mL ethanol.	Place for 5 min in tank saturated with HCl vapour (or spray with 25% HCl). Gently warm.	Detection of amines, indoles, ergot alkaloids.
(12) Anisaldehyde/Sulfuric acid	Add 1 mL conc. H ₂ SO ₄ to 50 mL acetic acid containing 0.5 mL anisaldehyde.	Heat at 100°C.	Detection of many compounds, especially terpenes, sugars, phenols, and steroids.
(13) Bial's Reagent (Orcinol-ferric chloride)	Add 10 mL 10% H ₂ SO ₄ containing 1 g ferric chloride to 1 mL 6% orcinol/ethanol.	Heat at 100°C for 10~15 min.	Particularly useful for detection of sugars.
(14) Triphenyl-tetrazolium chloride	Add 10 mL 4% triphenyl-tetrazolium chloride/MeOH to 10 mL 1 N NaOH.	Heat at 100°C.	Detection of reducing sugars, corticosteroids.
(15) Fluorescein	0.01% fluorescein/ethanol.	Heat gently, then spray lightly with water or treat with steam.	Detection of lipids.
(16) Ferric chloride	5% ferric chloride in 0.5 N HCl.	Generally no heat required, or heat gently.	Detection of phenolics.

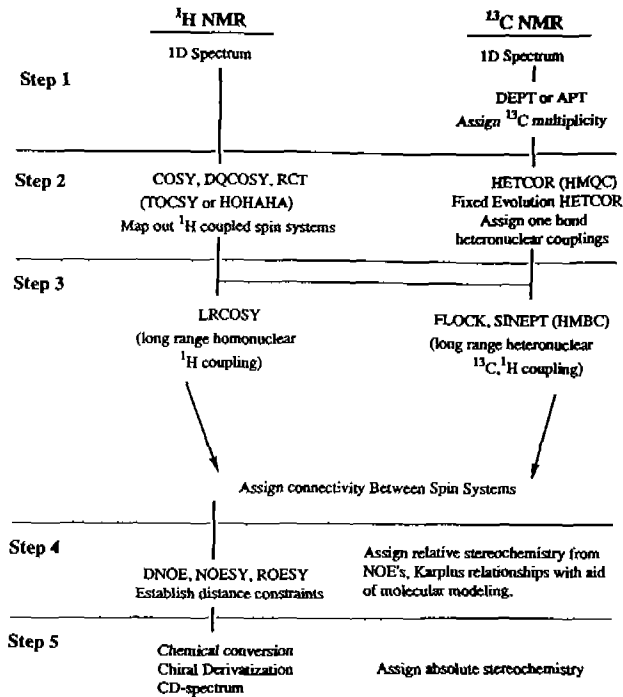


Fig. 8. General strategy for the application of NMR in structure elucidation of new natural products.

분리된 화합물은 이어서 생리활성 검색이 요구되는데, 이 실험법은 간편하고 경제적이어야 하며 단시간에 완료되어야 하고 또한 미량의 검체로 실험진행이 가능해야 한다(20). *In vivo* bioassay의 경우, 동물의 균일한 모집단 구성이 어려우며, data의 재현성 확보가 어렵고, 생리활성을 정량적으로 표현하기가 용이하지 않으며 시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 비용이 많이 든다. 따라서 활성물질을 순수 분리하는 과정은 분자 또는 세포수준의 *in vitro* bioassay법을 활용하고, 분리된 활성물질의 생리활성 효과를 최종적으로 확인하는 과정은 *in vivo* bioassay법으로 평가 확인하는 것이 연구의 속도를 가속시킬 수 있는 방법이라고 볼 수 있다(21). 천연물의 유효성분 연구는 생리활성 검색 연구에서 시작하는 것이 일반적이므로 검색연구의 기본적인 목적은 유효성분 연구에 뜻을 둔 것이라고 볼 때 검색연구로만 끝나고 유효성분 연구가 뒤따르지 않은 예가 많으므로, 이와같은 현상을 되풀이하지 않도록 하기 위하여 생리활성을 연구하는 group과 성분화학을 연구하는 group이 하나의 team으로 연결되어 시행하는 것이 바람직하다고 볼 수 있다.

Safety Research and Standardization (안전성 검사 및 표준화)

동물실험 결과 분리된 화합물질의 생리학적 효능이 확인되면, 급성, 아급성 및 만성 독성 등의 실험방법을 이용한 안전성 검사가 시행되어야 한다. 이 단계에서는 식물

추출물 및 단일 화학성분의 투여량 및 투여기간별로 실험이 행해지게 된다.

Development of products (제품개발)

건강에 대한 관심 및 건강을 지속하기 위한 노력이 더욱 증가하고 있는 상태에서 의약품 뿐만 아니라 건강 보조식품 등 부작용이 없는 식품의 개발이 필수적으로 요구되고 있다(22). 천연자원을 이용한 수종의 가공식품, 건강식품, 첨가물 및 향신료 등이 제품화되어 시판되고 있으며, 이들 제품들은 비교적 독성이 적고 구입이 용이할 뿐 아니라 농가소득 증진에도 일익을 담당하고 있다. 이에 따라 bioassay-guided fractionation 및 isolation 방법을 이용하여 유효성분을 분리한 후 화학구조가 구명되고 이들 성분이 함유된 고기능성 신제품이 개발되므로서 건강증진을 위한 인류의 지속적인 연구에 도움이 되리라 기대된다.

결론

최근들어 약용·식용식물에 대한 생리활성물질 검색이 활발히 이루어지고 있으며, 특히 근 수년 사이에 천연물 추출방법과 구조결정에 발전이 거듭되고 있지만 여전히 단일 화학성분이 아닌 추출물 범위에서 유효성분에 관한 연구가 이루어지고 있는 경우가 많다. 일반적으로 우리나라의 경우에는 실험 처음부터 *in vivo* bioassay법을 많이 사용하기 때문에 유효활성 화합물을 분리하고 구조를 구명하기가 힘든 것이 주지의 사실이다. 그러나 점차적으로 유효성분 분리 및 화학구조 결정에 대한 필요성이 꾸준히 증가하고 있는 현실점에서 볼 때, 서로 다양한 학제간 연구를 통해 비교적 부작용이 적고 생물활성이 높은 고기능성 신제품 개발이 가능하리라 생각된다(23-24). 이를 통해 부가가치가 높은 새로운 천연자원의 우수성을 국내는 물론 국외에 알릴 수 있는 과학적인 자료 확립이 가능할 뿐 아니라, 신제품 개발에 관한 연구의욕을 증진시킬 수 있으며 농가수입 증진도 기대된다.

참고문헌

1. Kitty, B.: The phytochemical renaissance. The status on known health benefits. *Food Proc.*, Nov. 44 (1999)
2. King, A. and Young, G.: Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.*, 213 (1999)
3. 우원식: 천연물화학 연구법(개정판). 서울대학교 출판부 (2001)
4. 식품중의 생체기능조절물질연구법: 생물화학실험법. 카와키시 순료 위음, 기능성식품소재연구회 옮김, 한림원 (1996)
5. Loub, W.D., Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D. and Quinn, M.L.: NAPRALERT computer handling of natural pro-

- duct research data. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **25**, 99 (1985)
6. Woo, W.S., Shin, K.H., Chung, H.S., Lee, J.M. and Shim, C.S. : Isolation of an unusual aloenin-acetal from *Aloe*. *Kor. J. Pharmacog.*, **25**, 307 (1994)
 7. Banthorpe, D.V. : Classification of terpenoids and general procedures for their characterization. In *Methods in Plant Biochemistry*, Dey, P.M. and Harborne, J.B. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 7 (1991)
 8. Chung, H.S., Woo, W.S. and Lim, S.J. : Dentalactone. A Sesquiterpene from *Ixeris dentata*. *Phytochem.*, **35**, 1583 (1994)
 9. Bruno, T.J. and Ely, J.F. : Supercritical fluid technology. In *Modern Theory and Applications*, CRC, Boca Raton (1991)
 10. McHugh, M.A. and Krukonis, V.J. : *Supercritical fluid extraction, Principles and Practice*. Butterworth, Boston (1994)
 11. Yalpani, M. : New separation tools offer opportunities for food/beverage products. *Genet. Eng. News*, **2**, 10 (1992)
 12. Johnston, K.P. : *New directions in supercritical fluid science and technology*, ACS Symp. Ser., **406**, Am. Chem. Soc., Washington, D.C. (1989)
 13. Chung, H.S., Chang, L.C., Lee, S.K., Shamon, L.A., van Breemen, R.B., Mehta, R.G., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D. : Flavonoid constituents of *Chorizanthe diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 36 (1999)
 14. Seong, B.W., Yook, C.S., Chung, H.S. and Woo, W.S. : New *cis*-khellactone esters from *Angelica flaccida*. *Planta Med.*, **57**, 496 (1991)
 15. Shin, K.H., Woo, W.S., Lim, S.S., Shim, C.S., Chung, H.S., Kennelly, E.J. and Kinghorn, A.D. : Elgonica-dimers A and B, two potent alcohol metabolism inhibitory constituents of *Aloe arborescens*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 1180 (1997)
 16. Simon, G. and Alexander, I.G. : Isolation by planar chromatography. In *Natural Products Isolation*, Richard, J. P.C. (ed.), Humana press, New Jersey, p.209 (1998)
 17. Stout, G.H. and Jensen, L.H. : *X-ray structure determination. A practical guide*, Macmillan, New York (1968)
 18. Jones, P.G. : Crystal structure determination : a critical view. *Chem. Soc. Rev.*, **13**, 157 (1984)
 19. Chen, S. and Snyder, J.K. : General strategy for the structure determination of saponins : Molluscicidal saponins from *Allium vineale*. In *Bioactive natural products. Detection, Isolation and Structural Determination*, Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. (eds.), CRC Press, p.349 (1993)
 20. 한병훈, 서대연 : 한국의 천연물 생물활성 연구. 한국의 천연물과학 연구. 서울대학교 천연물과학연구소 편. 서울대학교 출판부 (1996)
 21. 생명과학분야의 협동연구 유도를 촉진하기 위한 국내 Bioassay법 및 연구인력에 관한 조사 연구. 한국생물활성검정총람, 한림 연구보고서 6, 한국과학기술한림원 (1997)
 22. Kottke, M.K. : Scientific and regulatory aspects of nutraceutical products in the United States. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 1177 (1998)
 23. Willett, W.C. : Micronutrients and cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **59** (suppl 5), 1162s (1994)
 24. Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L. and Sigman, C.C. : Progress in cancer chemoprevention : development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.*, **130** (2S suppl), 467s (2000)