

초임계 CO₂를 이용한 Saw palmitto로부터 전립선 비대 유효 성분의 추출 조건

류병호* · 조경자¹

경성대학교 식품공학과
¹생활경영학과

Process conditions of valuable compound for benign prostatic hyperplasia(BPH) from saw palmitto by supercritical CO₂

Beung Ho Ryu* and Kyung Ja Cho¹

Department of Food Science and Biotechnology,

¹Department of living management, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract

Supercritical CO₂ extraction was applied to extraction of the valuable compound for benign prostatic hyperplasia from saw palmitto. Three levels of parameters, temperature (35~60°C), pressure 22~30 Mpa and ethanol modified solvent concentration, were used as the independent variables of central composite to rotate the design. The extracting pressure and temperature interaction was significantly affected the extraction of valuable compounds. The ethanol was an efficient modifier to extract valuable compound by supercritical carbon dioxide. The optimal processing conditions were extracting pressure, 30 Mpa, extracting temperature, 60°C, ethanol modifier, 15% for extracts of the valuable compounds from saw palmitto. In conclusion, it was found that supercritical CO₂ extraction can successfully be applied to extract high quality extracts from saw palmitto.

Key words – Supercritical CO₂, Benign prostatic hyperplasia, Saw palmitto.

서 론

전립선비대증(Benign Prostatic Hyperplasia, BPH)은 남성의 요도를 둘러싸고 있는 전립선이 내분비계의 장애에 의해 비대해지면서, 요도를 압박하게 되어 심각한 배뇨장애를 유발하는 질병이다. 최근의 통계에 의하면 40대에 접어들면서부터 이 BPH가 등장하게 되고 50대 이상의 남성

의 50% 이상이 그리고 70대 이상의 남성의 80% 이상이 이 질병으로 고통받고 있다고 알려져 있다. BPH의 정확한 총체적인 발병기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않으나 크게 2가지의 발병요인을 들 수 있는데[2], 첫째는 dihydrotestosterone(DHT)의 영향이다.

전립선이 정상적으로 성장하고 분화되기 위해서는 항상 적정량의 testosterone level이 유지되어야 한다. 따라서 과량의 serum testosterone은 전립선 내에서 5 α -reductase에 의해 DHT로 대사되는데, 바로 이 DHT가 전립선 세포의 과성장을 촉진시키는 강력한 androgen인 것이다[4]. 두 번

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-4712, Fax : 051-622-4986
E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

제 요인으로서의 남성은 나이가 들면서, 여러 가지 내분비계 균형을 유지하기 위해, 전립선 세포에 androgen 수용체가 서서히 증가하기 시작하여, 이 수용체에 DHT가 binding 하면 전립선의 transition zone 구성 세포들의 과도성장으로 인해 증가하게 되어, 전체적인 비대현상이 야기되는 것이다[8]. 이상과 같이 복합적이고 복잡한 발병 원인 중에 가장 핵심 역할을 하고 있는 것이 바로 5 α -reductase이며, 치료제 개발을 위한 target으로 이 효소를 들 수 있다[5].

지금까지 전립선 비대증에 유효한 saw palmitto(일명, serenoa repens)을 포함한 천연성분의 추출은 에탄올, 메탄올과 같은 유기용매를 이용하여 추출하였고, 추출된 천연물의 정제는 chromatography 방법이 주로 이용되어 왔다. 유기 용매 추출은 효율은 좋으나 천연성분이 선택적으로 추출되지 않기 때문에 정제 공정을 필요로 한다. 또한 추출용매의 잔류문제로 인하여 그 부산물의 재활용이나 재처리 비용이 추가로 필요로 하는 등의 문제를 수반한다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 추출 공정개발이 절실히 요구되어 왔다.

최근 청정기술로 각광받고 있는 초임계 유체 추출(super-critical fluid extraction, SFE)은 추출 용매로서 임계 온도나 임계 압력이상의 초임계 유체를 이용한다[9,10,13]. 초임계 유체는 기체와 액체의 장점을 모두 갖는 특성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100배정도 크게 나타난다. 따라서 높은 용해도와 빠른 물질 전달속도를 나타냄으로서 추출에 있어서 기존용매 추출보다 우수한 특성을 가진다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시키거나 보조 용매(modifier)를 사용함으로써 용해력을 자유자재로 조절할 수 있어 목적물을 선택적으로 분리할 수 있는 장점도 있다[15,16]. 현재 초임계 유체로는 이산화탄소를 가장 많이 이용하는데, 이것은 임계조건이 낮아 열에 불안정한 물질의 분리 정제에 유리하기 때문이다. 또한 초임계 유체는 추출 후 용매가 추출물로부터 쉽게 분리 제거될 수 있으므로 유기용매 추출 시 문제되는 환경오염을 방지할 수 있어 환경친화적인 방법이라 할 수 있다. 초임계 유체 추출의 장점은 천연물로서 인간에게 유용한 생리 활성물질 추출에 매우 유용한 방법이다. 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 saw palmitto로부터 천연물을 추출하였다. 기본적으로는 온도, 압력, 유속, 추출 시간 등과 같

은 초임계 유체 추출 조건을 최적화하고, 보다 효율을 높이기 위한 보조용매를 이용하는 공정도 최적화 하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 Saw palmitto Berry는 Newzland에서 수입하여 재료로 사용하였다. 이산화탄소는 순도 99.9%의 식품용이었으며, 분석에 사용된 시약은 특급 시약이었다.

초임계 이산화탄소 추출장치

초임계 이산화탄소를 사용한 Serenoa repens의 추출에 대한 장치는 Fig. 1에 나타내었다. 추출탑은 내경 2.9 cm, 150 mL 용량인 고압용 stainless steel을 사용하였고 흐름 Line은 1/4' 1/8'의 stainless steel pipe (316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 51.7 Mpa의 용량을 가진 Milton Roy Pump는 추출탑으로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 Pumping하였고, 보조용매인 에탄올(99%)을 정량적으로 주입시킬수 있는 보조용매 pump Solvent Delivery pump (Young-lin scientific Co., model NO.:930)를 사용하였다. 고압 상태로 추출탑에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도를 측정하는 digital temperature measuring (Wavetek 사, Model No.:461 -112020) 장치와 추출탑의 압력은 정확도가 높은 Heise Gauge에 의해 측정되었다. System내의 압력은 2개의 back pressure regulator로 조절하였고 추출탑 내의 미세한 압력은 metering valve와 needle valve로 조절하였다. 초임계 이산화탄소의 흐름공정은 초임계 이산화탄소와 지질을 분리하는 separator, 압력을 조절하는 metering valve와 needle valve, 온도를 조절하는 열 교환기, 추출탑에 유입되는 초임계 이산화탄소의 사용된 양을 측정하는 flow meter (Sinagawa사, model No.: DC-2A)로 구성되어 있다.

초임계 이산화탄소 추출장치를 이용한 추출방법

실험에 사용된 초임계 추출 장치는 추출탑의 크기를 변경할 수 있도록 제작되었으며 실험방법은 포화압력상태인 이산화탄소가 cylinder로부터 냉각기(-18℃)를 통과하여 이산화탄소내에 존재하는 기포가 제거된 후 고압 metering

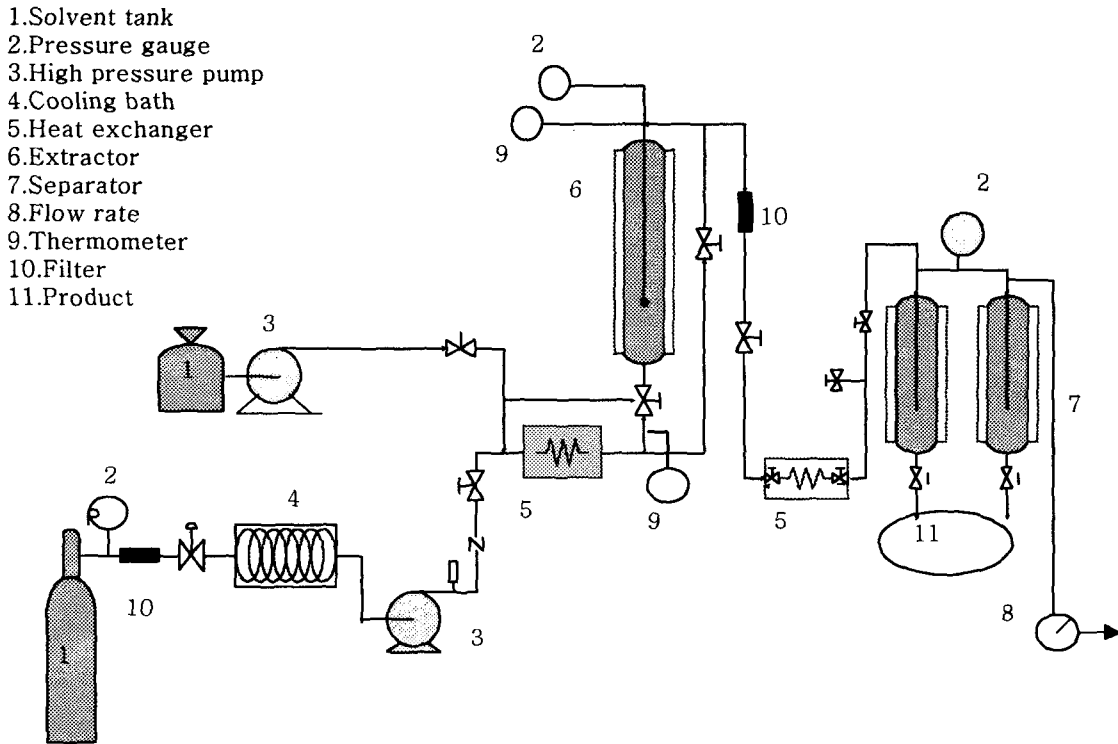


Fig. 1. Flow diagram of supercritical fluid process.

pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 system내의 설정 압력까지 수행되어졌다. 고압 펌프로부터 추출탑에 유입되기 전에 추출 용매로 작용하는 CO₂와 보조용매 pump로부터 유입되어지는 에탄올은 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해서 미리 예열되어진다. 그리고, 추출탑 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출온도를 조절하게 되며 반응기 외부에 단열재를 부착시켜 반응기 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다. System내의 전체 압력은 2개의 압력조절기를 부착시켜 반응기 내부의 온도를 일정하게 유지시켰으며, 2개의 압력 조절기를 부착시켜 순간 압력 변화로 인한 system내의 추출 조건변화를 방지하였다. 고압pump와 압력 조절기 앞에 7 micron filter를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 CO₂와 고체시료 입자에 의한 system의 흐름이 중단되는 것을 방지시켰으며 safety valve를 부착시켜 system내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system 내의 고압으로 인한 압력의 역류로 고압 펌프의 손상을 방지하기 위하여 고압펌프 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 추출탑내의 시료로부터 지질을 추출하여 낮은 압력상태로 분리기

내에 유입되어 용제와 용매를 쉽게 분리시킨다. 이때 추출 공정 동안 사용된 CO₂의 양은 CO₂가 gas meter를 통과함으로써 측정되며 gas meter 통과 후 대기로 방출된다. 추출 효율은 유기용매를 이용하여 추출되는 추출량에 대한 비 교치로서 백분율(%)을 표시하였다.

결과 및 고찰

초임계 유체 추출시의 추출속도 및 수율

본 연구에서 행하여진 온도(35, 55℃) 및 압력(30, 22 Mpa) 범위에서 초임계 유체로 추출된 saw palmitto 추출물의 수율을 사용된 이산화탄소의 양(누적량)에 대하여 나타내었다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출 속도는 추출 초기에는 일정하였으나 추출이 계속됨에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 다른 식물체에 있어서 초임계 유체에 의한 정유성분 추출에서도 나타나고 있으며[8], saw palmitto에 존재하는 가용성 물질들이 추출에 의하여 감소의 원인으로 생각된다.

추출 수율은 30 Mpa, 35℃와 30 Mpa, 55℃의 경우 각각

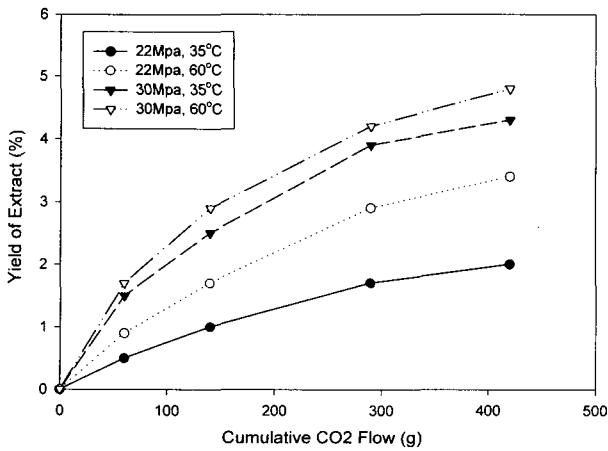


Fig. 2. Extraction of supercritical CO₂ as a function of pressure extracts temperature.

4.2%와 4.7%이었으며 22 Mpa, 35°C와 22 Mpa, 55°C에서 각각 3.4% 및 1.7%이었다. 이러한 실험결과는 일정한 온도에서는 압력이 증가할수록 추출속도가 증가하였다. 이에 반하여 22 Mpa에서는 온도가 증가함에 따라 추출속도가 감소하였으며 30 Mpa에서는 온도가 증가함에 따라 다소 증가하였다. 이러한 현상은 용매의 밀도와 용질의 휘발성 성분간의 경쟁적 관계에 기인한 것으로, 용매밀도의 감소 시 추출상의 용질 분자와 용매 분자간에 작용할 확률이 감소되어 용해도가 감소한 것으로 추정된다[11]. 반면에 용질의 휘발성의 증가는 용질이 응축 상으로부터 탈출하려는 경향을 증가시켜 용해도를 증가시킨다. 즉, 30 Mpa에서는 온도 증가가 밀도에 미치는 영향은 적었으나 용질의 휘발성 증가는 컸던 까닭에 용해도의 증가가 초래되어 추출속도가 증가한 것으로 볼 수 있다[6].

초임계 유체 추출물의 물리적 특성 및 관능검사

Table 1은 초임계 유체로 추출하여 얻어진 추출물의 물

리적 상태, 색상, 이취 여부를 나타내었다. 30 Mpa에서 얻어진 추출물은 상온에서 액체 상태이었으며, 22 Mpa에서 얻어진 추출물은 모두 고체 상태이었다. 본 실험결과로 보아 이산화탄소의 밀도가 높은 초임계 추출조건 중 30 Mpa에서는 용해력이 작아서 휘발성이 큰 향기성분들이 주로 추출되어 액체상태가 되는 것으로 생각된다.

또한 색깔의 경우에도 이산화탄소의 용해력이 큰 30 Mpa, 35°C의 경우에 색소가 추출됨에 따라 가장 짙은 노란색을 나타내었고, 반면에 22 Mpa에서 얻어진 추출물의 경우는 거의 무색이었다. 이는 올리브유, 호프의 초임계 추출 시 이산화탄소의 용해력이 높을수록 색상이 더욱 더 진하여졌다는 보고와 거의 비슷하였다[3]. 이에 반하여 추출물의 냄새는 압력보다는 온도에 더 큰 영향을 받아서 30 Mpa, 55°C에서 얻어진 추출물의 경우 냄새가 다소 강하게 느껴졌으나 22 Mpa, 55°C의 경우에는 약간의 냄새가 느껴졌다. 유기용매 추출물의 경우 느껴지는 냄새가 탄 냄새에 가까운 특성을 가지는 반면에, 55°C 초임계 추출물에서의 냄새는 불쾌치로서 산화취와 서로 다른 특성을 가지고 있었다. 그러나 22 Mpa 35°C에서 얻어진 초임계 추출물의 경우는 이취가 전혀 없는 천연 그대로의 냄새가 느껴졌다. 따라서 이들 2개의 시료와 유기용매 추출물을 관능 검사한 결과 22 Mpa, 35°C에서의 초임계 추출물이 유기용매 추출물보다 차이가 없는 것으로 나타났다.

초임계 추출 조건이 saw palmito 추출에 미치는 영향 초임계 추출장치를 이용하여 saw palmito로부터 유효성분의 추출 실험을 한 결과, 유기 용매 추출에 비하여 추출 효율이 좋지 않았다. 이러한 결과는 추출 용매로 쓰인 이산화탄소가 비극성의 성질이 있으므로 극성 성질을 갖는 용질에 대한 용해력은 일정한 한계점에 도달하거나, 용질

Table. 1 Physical characteristics of saw palmito obtained by supercritical CO₂

SCE conditions		Color* (Yellow)	Off-flavor	Physical state at room temperature
Temperature (°C)	Pressure (MPa)			
35	30	3	absent	liquid
	22	1	absent	solid
55	30	3	strong	liquid
	22	2	weak	solid

*High value means more yellowish in color.

이 시료의 담체에 강하게 결합되어 있기 때문이라고 판단된다. 이러한 용해력의 제한을 보완해주기 위한 보조 용매를 초임계 유체에 넣어 추출하는데 주로 에탄올이 많이 사용된다[10]. 보조 용매 사용 시 초임계 유체의 용해력 증가는 용질과 보조 용매 사이에 강한 결합이 형성되고, 보조 용매에 의하여 초임계 유체의 밀도가 증가하기 때문이다[12].

초임계 추출 조건에서 보조 용매가 추출 효율에 큰 역할을 하므로 본 연구에서는 보조 용매로서 15%에탄올과 에탄올을 사용하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 30 Mpa, 60 °C에서 보조 용매를 사용하여 추출한 결과 15% 에탄올을 3ml/min 처리 하였을 때 추출이 43%정도 상승하였다. 추출 수율과 함량을 고려해 볼 때에 15% 에탄올 농도가 최적의 보조 용매 농도라 여겨진다. 에탄올을 보조 용매로 사용하는 경우에 보조 용매의 농도가 증가할수록 추출 수율도 비례하여 증가하였고, 에탄올 15% 이상에서는 추출 효율이 완만하게 증가하였다. 보조 용매 농도가 20% 이상부터는 보조 용매 농도가 증가할수록 다시 천연 성분의 추출이 증가하는 경향을 나타내는데, 이는 초임계 유체에 의한 추출 효과에 유기 용매에 의한 추출 효과가 가미된 것으로 생각된다[7].

일반적으로 spice, herb, frutis, citrus 등 식물체에서 얻어진 추출물은 대부분이 alcohol 및 ester 상태로 존재하는 경우가 많다[3]. Table 2에서 얻어진 지방산 및 sitosterol들은 35°C, 30Mpa에서 지방산, 지방산알코올, β-sitosterol 및 total sterol이 각각 91.0, 3,2, 2.4 및 3.4%로 상당한 양이 추

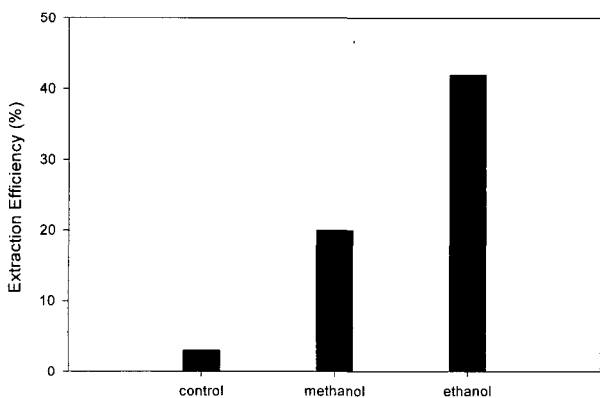


Fig. 3. Effects of the various modifiers on extraction efficiency in supercritical CO₂ system. Operating conditions were 3 ml/min, 30 Mpa, 60°C, 15% ethanol of modifier, and extraction for 30 min.

Table 2. Relative percentage of various classes of compounds in extracted oil obtained either by supercritical extraction

Compound classes	Supercritical extraction			
	35°C		60°C	
	22Mpa	30Mpa	22Mpa	30Mpa
Fatty acid	94.7	91.0	93.8	93.0
Alcoholic fatty acid	2.0	3.2	2.2	2.6
β-sitosterol	1.3	2.4	2.0	2.3
Total sterol	2.0	3.4	2.0	2.1

출되었으나 용해력이 낮은 60°C, 22 Mpa에서는 알코올 지방산, β-sitosterol 및 total sterol의 함량이 다소 낮았다.

또한 추출은 온도에 따라 크게 영향을 미치지 않았으나, 온도에 따라 약간 증가하는 경향을 보였다. 초임계 추출에서 압력의 영향을 살펴본 결과 30 Mpa까지는 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도 증가로 인해 용해력이 증가하기 때문에 나타난 결과로 여겨진다[9].

예비실험에서 에탄올을 보조 용매로 이용하여 유효 성분을 추출하면 추출 효율이 상승됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 보조 용매의 적요에 관련된 여러 조건들을 최적화 하였다. 우선 최적 온도와 압력조건 탐색 실험을 하였다. 초임계 유체 추출 조건은 추출 시간 30분, 유량 3ml/min, 에탄올 15%로 유지하였고, 최적온도 탐색을 위하여 압력은 30 Mpa로 유지하며 온도를 30°C에서 70°C까지 변화시키며 추출효율을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이

에탄올을 보조 용매로 사용한 경우 온도가 증가할수록 유효 성분의 추출효율도 다소 증가하여 60°C에서 58%까지 증가하였다. 추출물에서 유효 성분 함량은 온도의 변화에 따른 영향이 거의 없었다. 온도의 증가에 따른 초임계 용매 밀도의 감소에도 불구하고 추출 효율이 다소 증가한 이유는 용해도는 용매의 밀도와 용질의 휘발성간의 경쟁적인 관계에 기인하기 때문이라고 생각된다. 낮은 압력 하에서는 온도의 증가에 따라 밀도가 크게 작아지게 되어 휘발성의 증가에 의한 용해도의 증가보다 더 큰 영향을 끼치게 된다. 반대로 높은 압력에서는 온도의 증가에 따른 밀도 변화가 적기 때문에 온도의 증가에 의한 용질의 휘발성 증가가 용해력에 더 영향을 주어서 위와 같은 실험 결과를 나타낸 것으로 여겨진다.

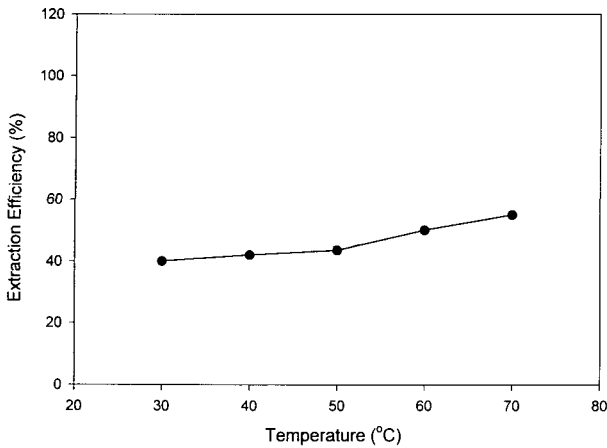


Fig. 4. Effects of the temperature on extraction efficiency of extracts in ethanol modified supercritical CO₂ system. Operating conditions were 3 ml/min, 30 Mpa, 15% ethanol, and extraction for 30 min.

최적 압력탐색은 온도를 60°C로 유지하며 압력을 각각 10, 20, 25, 30 Mpa로 변화시키며 추출 효율을 측정하였다. Fig. 5와 같이 보조 용매를 이용하는 초임계 추출에서 압력의 영향을 살펴본 결과 압력이 증가할수록 추출 효율은 증가하였다. 이와 같은 결과는 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도 증가로 인해 용해력이 증가하기 때문에 나타나 결과로 여겨진다.

Fig. 6에서는 30 Mpa, 60°C, 15%(w/w) 에탄올 보조 용매, 용매 유량 3ml/min의 추출조건에서 추출 시간에 따른

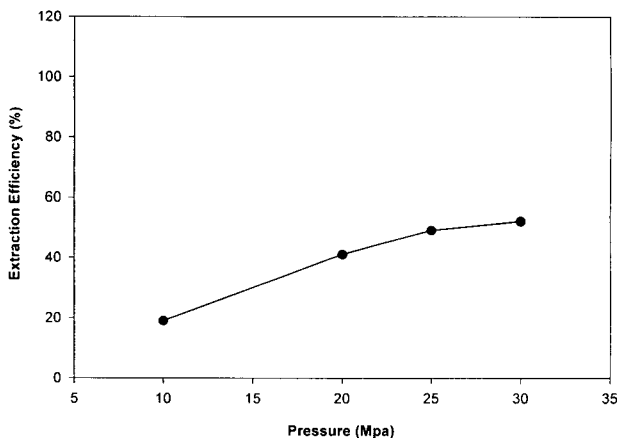


Fig. 5. Effects of the pressure on extraction efficiency of extracts in ethanol modified supercritical CO₂ system. Operating conditions were 3 ml/min, 60 °C, 15% ethanol, and extraction for 30 min.

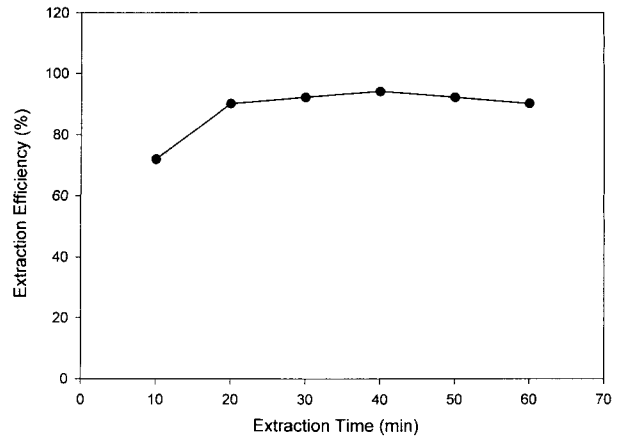


Fig. 6. Effects of the extraction time on extraction efficiency of extracts in ethanol modified supercritical CO₂ system. Operating conditions were 3 ml/min, 30 Mpa, 60°C, and 15% of ethanol.

추출 효율의 변화를 나타내었다. 에탄올을 보조 용매로 사용하는 경우 초기에는 추출 효율이 급격히 증가하다가 후반부터는 완만하게 증가하는 즉 포화 현상을 나타내었다. 어느 시점까지는 추출 시간이 증가할수록 추출 효율이 증가하는 경우가 많다. 하지만 그 후 추출 시간을 더 연장하여 추출한다면 추출 효율증가는 완만해 질 것이다. 추출이 완전히 이루어질 때까지 추출하는 것은 추출 시간과 초임계 유체의 소모량을 고려 할 때 경제성이 없기 때문에 단위 초임계 유체당 추출량 등을 고려하여 추출 시간을 결정해야 한다. 추출 시간에 따른 추출된 유효 성분 함량의 변화는 뚜렷한 경향은 없으나, 대체적으로 추출 시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 유효 성분의 함량을 높이기 위해서는 적당한 추출시간을 선택하여야 할 것이다.

요 약

초임계 이산화탄소를 이용하여 saw palmitto로부터 전립선 비대증 치료를 위한 유효성분을 효율적으로 추출하기 위하여 초임계 유체의 압력(22, 30 Mpa), 온도 (35°C, 60 °C), 및 보조용매의 농도, 및 추출시간에 따른 효율을 조사하였다. 보조 용매로는 메탄올보다는 에탄올이 효과적이었고. 보조용매의 농도가 증가할수록 유효성의 추출 효율은 증가하였고 15% 에탄올 농도에서 효율이 가장 높았다.

15%에탄올 농도에서 초임계유체의 최적 추출조건은 압력은 30 Mpa, 온도는 60℃이었고, 추출시간에 따른 추출효율은 추출시간이 증가할수록 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 초임계 이산화탄소의 추출조건으로 saw palmitto로부터 전립선 비대 치료를 위한 유효물질을 추출할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 중기청과 바이넥스(주)의 컨소시엄의 지원으로 연구가 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Clifford, A. A. 1994. Reaction in Supercritical Fluids, in supercritical Fluids Fundamentals for application, E. Kiran and J.M.H. Levelt Sengers, Eds., p449. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
2. Cooper, J. W. and R. W. Piepho. 1998. Cost-effective management of Benign Prostatic Hyper-plasia. *Drug Benefit Trends*. 7, 10-22.
3. Eskin, N. A. M. 1979. Terpenoids and flavonoids. pp. 65-93. In: Plant pigments, Flavors and Textures : The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds. Academic Press, New York, U.S.A.
4. Keetch, D. W. 1997. Medical therapy for Benign Prostatic Hyperplasia. *Infect. Urol.* 10, 54-60.
5. Lepor, H. 1996. The efficacy of etrazosin, finasteride, or both in BPH. *N Engl. J. Med.* 335, 533-538.
6. Liang, J. H. and A. I. Yeh. 1991. Process conditions for separating fatty acid esters by supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 687-693.
7. Metacalf, L. D., A. A. Schmitz. and J. R. Palka. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipid for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38, 514-515.
8. Nixon, P. 1997. New clinical trial of medical therapy for Benign Prostatic Hyperplasia. *Drug Benefit Trends*. 9, 44-45.
9. Novotny, M., S. R. Springton, P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted and M. L. Lee. 1981. Capillary Supercritical Fluid Chromatography, *Anai. Chem*, 53, 407A-414A.
10. Peaden, P. A. and M. L. Lee. 1982. Supercritical Fluid Chromatography: methods. and principles, *J. Liq. Chromatogr.* 5, 179-221.
11. Rizvi, S. S. H., S. Lim, H. Nikoopour, M. Sin and Z. Yu. 1989. Supercritical fluid processing of milk fat. pp. 145-158. In: Engineering and Food, Vol. 3. Advanced Processes. Spiess, W.E.L. and Schubert, H. eds. Elsevier Applied Science. New York, USA.
12. Rizvi, S. S. H. Supercritical fluid processing of foods and biomaterials, Ist. ed., P82, chapman & Hall, London.
13. Saito, M., Y. Yamauchi and T. Okuyama. 1994. Fractionation by packed column SFC and SFE, VCH Publishers, Inc., New York.
14. Spackmann, D. H., W. H. Stein and S. Moore. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190-1206.
15. Stahl, E., K. W. Quirin and D. Geraed., A. Dense. 1988. Gases for Extraction and Refining, P. 176, Springer-Verlg, New York.
16. Taylor, L. T. 1996. Supercritical Fluid Extraction, Pl, JOHN WILEY & SONS, INC. New York.

(Received June 30, 2003; Accepted September 30, 2003)