

## 초임계 이산화탄소/에탄올을 이용한 감초의 Glycyrrhizic acid 추출

<sup>1,2</sup>김 현 석 · <sup>2</sup>김 병 용 · <sup>1,3</sup>이 상 윤 · <sup>3</sup>김 우 식 · <sup>4</sup>이 은 규 · <sup>1</sup>유 종 훈 · † <sup>1</sup>임 교 빈  
<sup>1</sup>수원대학교 화학공학과, <sup>2</sup>경희대학교 식품공학과, <sup>3</sup>연세대학교 화학공학과, <sup>4</sup>한양대학교 화학공학과  
(접수 : 2003. 3. 7. 게재승인 : 2003. 8. 16.)

### Extraction of Glycyrrhizic Acid from Licorice using Supercritical Carbon Dioxide/Aqueous Ethanol

Hyun-Seok Kim<sup>1,2</sup>, Byung-Yong Kim<sup>2</sup>, Sang-Yun Lee<sup>1,3</sup>, Woo-Sik Kim<sup>3</sup>, Eun-Kyu Lee<sup>4</sup>,  
Jong-Hoon Ryu<sup>1</sup>, and Gio-Bin Lim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Hwasung, Kyunggi 445-743, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Kyunghee University, Yongin, Kyunggi 449-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

<sup>4</sup>Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan, Kyunggi 425-791, Korea

(Received : 2003. 3. 7. Accepted : 2003. 8. 16.)

The extraction of glycyrrhizic acid from licorice using supercritical carbon dioxide (SCCO<sub>2</sub>) was investigated with respect to the effects of extraction parameters such as the kind and amount of modifier, temperature, pressure, and extraction time. The conventional organic solvent extraction was also conducted for a quantitative comparison. The content of glycyrrhizic acid in crude extracts was analyzed by HPLC and the yield of glycyrrhizic acid was computed as a weight percent recovery. The optimal pressure and temperature for SCCO<sub>2</sub> extraction were found to be 40 MPa and 80°C, respectively, when SCCO<sub>2</sub> was modified with 70% aqueous ethanol. Under the same pressure and temperature, the highest recovery was attained to be 104.57% in the first 60 min when the concentration of 60% aqueous ethanol in SCCO<sub>2</sub> was 15%.

**Key Words** : Supercritical carbon dioxide, modifier, glycyrrhizic acid, licorice

### 서 론

초임계 유체 추출법 (supercritical fluid extraction)은 추출용매로 초임계 상태의 유체를 이용하는 추출법으로 전통적인 추출방법을 대체할 수 있는 환경친화적인 추출기술로 각광 받고 있다(1, 2). 최근 초임계 유체 추출기술에서 추출용매로 이산화탄소가 가장 널리 이용되고 있는데, 이는 이산화탄소의 낮은 임계 온도와 임계압력으로 온화한 조건에서 추출을 수행할 수 있으며, 독성, 가연성, 추출대상물질과의 반응성 및 부식성이 없고, 시중에서 고순도의 이산화탄소를 쉽게 구할 수 있기 때문이다(3). 이와 같은 장점으로 최근 초임계 이산화탄소를 추출용매로 하여 천연물로부터 생리활성 성분을 추출하려는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 높은 극성을 가

지는 생리활성 성분들에 대한 비극성 초임계 이산화탄소의 극히 적은 용해성으로 이들의 추출이 용이하지 않다(4). 이와 같은 극성성분에 대한 초임계 이산화탄소 추출의 제한성을 극복하기 위해 알코올류와 같은 극성의 보조용매 (co-solvent 또는 modifier)를 초임계 이산화탄소에 첨가하여 이산화탄소의 극성과 용해성을 증대시킴으로써 추출효율을 증대시키기도 한다(5, 6). Floch(7) 등은 methanol을 보조용매로 사용하여 phenol 화합물을, Boo(8, 9) 등은 methanol과 ethanol을 보조용매로 사용하여 대두로부터 genistein과 daidzein을 회수하였고, Suh(10) 등은 methanol을 사용하여 주목으로부터 taxol을 추출하였다. Lin(11) 등은 70% methanol을 이산화탄소에 첨가하여 flavonoid류들, Janicot(12) 등은 물과 methanol 혼합물을 이산화탄소에 첨가하여 식물체로부터 alkaloid류를 추출하였으며, Choi 등(13)은 10% diethylamine을 포함하는 methanol과 물을 보조용매로 이용하여 alkaloid 류를 추출하였다. 이들 모두 초임계 이산화탄소만 사용하였을 때 추출이 되지 않거나 극히 적은 수율을 나타내던 성분들로 소량의 극성 보조용매 첨가에 의해 수율을 증가시킬 수 있었다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea  
Tel : +82-31-220-2243; Fax: +82-31-220-2528  
E-mail : gblim@mail.suwon.ac.kr

한편, 감초 (*Glycyrrhiza glabra*)는 콩과 (*Leguminosae*)의 다년생 식물로, 주로 뿌리 부분이 한약의 원료로 중국, 일본 및 한국 등지에서 널리 이용되고 있다(14). Glycyrrhizic acid는 감초의 주요 생리활성 성분이며, 일반적으로 뿌리에 calcium과 potassium 염의 형태로 존재하고, 높은 감미 (설탕의 50-60배), 풍미증화력, 기포력과 기포안정성 등의 식품 기능학적인 특성과 항게양성, 항알레르기성, 항진균성 및 항암성 인자의 억제 등 많은 생리활성 때문에 식품공업과 의약품공업에서 널리 사용되고 있다(15-18). 감초로부터 glycyrrhizic acid의 추출에 사용되는 전통적인 추출방법들은 많은 양의 유기용매 사용, 추출물 내의 독성 용매 잔존, 긴 추출시간 등의 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 추출할 수 없는 감초의 glycyrrhizic acid의 추출수율 증대를 위해 추출온도, 추출압력, 추출시간 및 보조용매의 종류와 첨가량에 대해 최적 추출조건을 조사하고자 하였다.

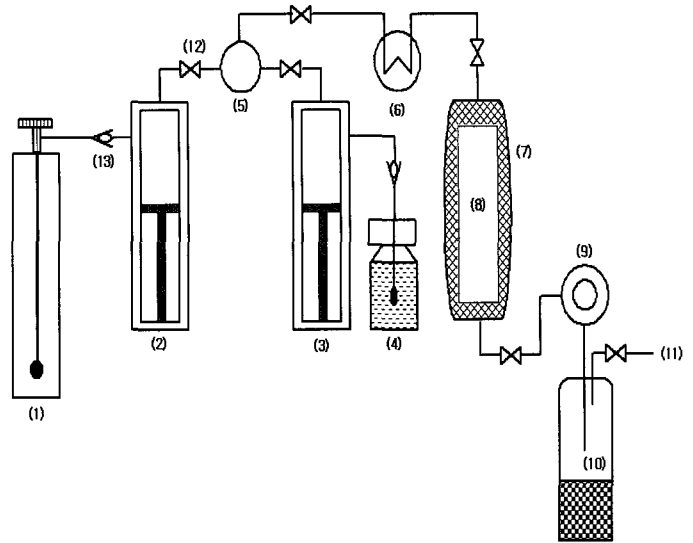
## 재료 및 방법

### 실험재료

감초 (*Glycyrrhiza glabra*)는 우즈베키스탄산을 사용하였고, 박편상의 감초는 Warring blender (Dynamic Corp., Hartford, USA)로 분쇄한 후 표준체를 이용하여 일정크기 (250~600  $\mu$ m)로 분류하였다. 99.995% 고순도 이산화탄소 ((주)동민특수 가스, 경기도), 보조용매, 유기용매추출 및 HPLC 분석에 사용한 용매는 모두 HPLC급 (Fisher, USA)으로 구입하였다. 그 밖에 ammonium glycyrrhizinate, phosphoric acid 및 propylene glycol 등은 Sigma사 (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 초임계 이산화탄소 추출

초임계 유체 추출은 초임계 유체 추출기 (SFX 3560, ISCO, Lincoln, USA)를 사용하여 감초로부터 glycyrrhizic acid의 추출에 대한 추출온도, 추출압력 및 보조용매의 종류와 첨가량을 보조용매와 이산화탄소를 3 mL/min의 유속으로 일정 시간 동안 흘려주면서 조사하였다. 초임계 유체 추출장치는 초임계 유체용과 보조용매용 syringe pump (260D & 100DX, ISCO, USA), 두 pump를 통제하는 controller와 유속 조절을 위한 restrictor, 고압 chamber 및 추출물의 수집부로 구성된 본체로 되어있다(Fig. 1). 일정량의 시료를 10 mL cartridge에 넣고, 일정 추출온도의 고압 chamber에 장착한다. 액체 이산화탄소와 보조용매는 각각의 syringe pump에서 가압된 후 mixing zone에서 혼합된다. 일정 압력과 온도로 조절된 초임계 추출용매는 고압 chamber 내의 cartridge를 흐르면서 추출을 수행하고, 추출물을 포함하는 초임계 추출용매는 restrictor에서 대기압 상태로 배출된다. 배출된 추출물을 포함한 추출용매는 대기 중으로 방출되고 추출물은 수집 vial의 유기용매에 용해되어 포집되었다. 포집된 추출액은 HPLC를 사용하여 분석하였고 회수율 (recovery, wt%)로 나타내었다. 회수율은 유기용매추출법에 의한 최고 수율에 대한 초임계 유체 추출법에 의한 수율의 비로서 계산하였다.



**Figure 1.** Schematic flow diagram of ISCO SFX 3560 ((1) Liquid CO<sub>2</sub> storage tank, (2) syringe pump for CO<sub>2</sub>, (3) syringe pump for co-solvent, (4) co-solvent tank, (5) mixing zone, (6) pre-heating exchanger, (7) high pressure chamber, (8) extraction cartridge, (9) restrictor, (10) collection vial, (11) CO<sub>2</sub> venting, (12) valve, (13) check valve).

### 유기용매추출

초임계 유체 추출법과 비교하기 위해 예비실험으로 선정된 추출조건하에서 유기용매추출을 수행하였다. 즉, 시료에 30배의 추출용매를 넣어 40°C에서 교반하면서 6시간 동안 용매를 2번 교체하면서 추출하였다. 추출물은 3000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하고 상등액을 취해, HPLC를 이용하여 추출액 내의 glycyrrhizic acid를 분석, 정량하였다. 또한, 다양한 농도 (0~100%, v/v)의 aqueous methanol과 ethanol을 추출용매로 사용하여 최적의 추출용매를 선정하였으며, 이때의 추출수율을 회수율 (wt%) 계산에 사용하였다.

### 추출물 내 glycyrrhizic acid 분석

Glycyrrhizic acid의 함량은 HPLC로 분석하였고 표준곡선으로부터 그 함량을 계산하였다. HPLC (M616LC system, Waters Co., USA)는 616 controller, 996 photodiode array detector (254 nm), 515 HPLC pump, TM 717 plus autosampler로 구성되어 있다. Column은 CAPCell PAK C18 UG120 S-5  $\mu$ m (4.6 mm  $\times$  250 mm, Shiseido, Japan)을 사용하였고, 20  $\mu$ l의 추출물과 phosphoric acid를 이용하여 pH 2.5로 조절된 이동상 (water : acetonitrile = 62 : 38)은 1.2 mL/min의 유속으로 column을 흐르게 하였으며, column 온도의 온도는 40°C를 유지하였다.

## 결과 및 고찰

### 유기용매 농도에 따른 glycyrrhizic acid 추출

가장 높은 수율의 glycyrrhizic acid를 얻을 수 있는 추출용매를 알아보기 위하여 다양한 농도 (0~100% (v/v))의 aqueous methanol과 ethanol을 추출용매로 용매추출을 수행하였다. 결과는 Fig. 2에 보였고, 대부분 aqueous methanol로 추

출하였을 때 aqueous ethanol을 사용하였을 때보다 더 높은 수율을 나타내었다. 한편, 30% (v/v) aqueous methanol로 추출하였을 때 45.51 mg/g으로 가장 높은 수율을 보였으며, 30~70% (v/v) aqueous methanol 농도 범위에서 추출수율은 45.06~45.51 mg/g의 범위로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 30% (v/v) aqueous methanol을 추출용매로 사용한 경우의 수율을 본 연구의 회수율 계산에 사용하였다.

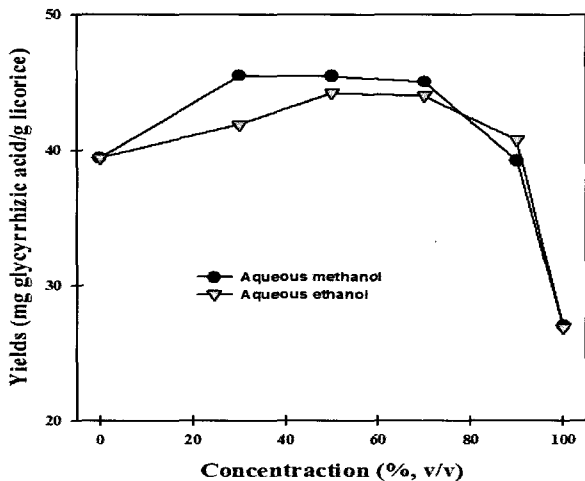


Figure 2. Effect of a variety of aqueous methanol and ethanol concentrations for the yield of glycyrrhizic acid from licorice. Operation conditions were 50 MPa, 60°C, 3 ml/min, and 10% (v/v) of modifier. The extraction time was 120 min dynamic extraction.

다양한 보조용매의 효과

50 MPa, 60°C에서 순수한 초임계 이산화탄소를 3 mL/min의 유속으로 120 동안 흘려주면서 추출을 수행하였고, 0.35 wt%의 glycyrrhizic acid를 회수하였다. 이와 같이 극히 낮은 회수율은 극성 성분에 대한 비극성 초임계 이산화탄소의 극히 적은 용해성으로 극성이 큰 glycyrrhizic acid를 추출할 수 없었던 것으로 사료된다(6). 이와 같은 초임계 이산화탄소의 제한성을 극복하기 위하여 다양한 보조용매를 초임계 이산화탄소에 10% (v/v) 농도로 첨가하여 동일 조건에서 추출하였고, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 보조용매로 99.9% methanol, ethanol과 isopropanol의 첨가는 추출수율 증대에 큰 영향을 미치지 않았으나, 70% (v/v) 농도의 aqueous methanol, ethanol, isopropanol과 물의 첨가는 각각 96.62, 78.62, 38.83과 32.65 wt%의 최종 회수율을 나타내었고, 70% (v/v) aqueous methanol이 가장 높은 회수율을 나타내었다. 이는 70% aqueous methanol을 보조용매로 초임계 이산화탄소에 첨가하여 식물체로부터 flavonoid를 추출하였을 때 원액의 methanol을 보조용매로 사용하였을 때보다 추출수율을 2배 이상 증가시킬 수 있었고 극성이 큰 flavonoid를 선택적으로 추출할 수 있었다고 보고한 Lin(11) 등과 유사한 결과이다. 따라서 보조용매 내 물의 첨가가 초임계 이산화탄소의 극성과 용해성을 증가시켜 추출수율이 증가한 것으로 사료된다. 그러나 감초 추출물이나 glycyrrhizic acid를 식품공업 및 의약품공업에 적용하기 위해서는 methanol보다 독성이 적은 ethanol을 보조용매로 사용하는 것이 더 타당하기 때문에

aqueous ethanol을 보조용매로 사용하였을 때 초임계 이산화탄소 추출조건을 알아보았다.

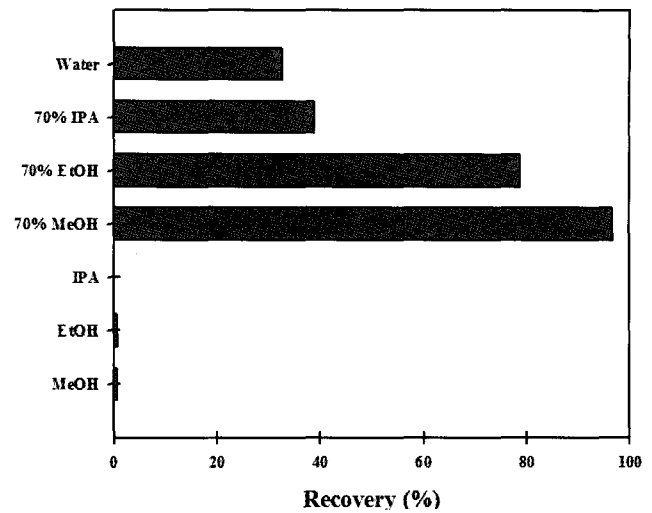


Figure 3. Effects of a variety of modifiers for extraction of glycyrrhizic acid from licorice. Operation conditions were 50 MPa, 60°C, 3 ml/min, and 10% (v/v) of modifier. The extraction time was 120 min dynamic extraction.

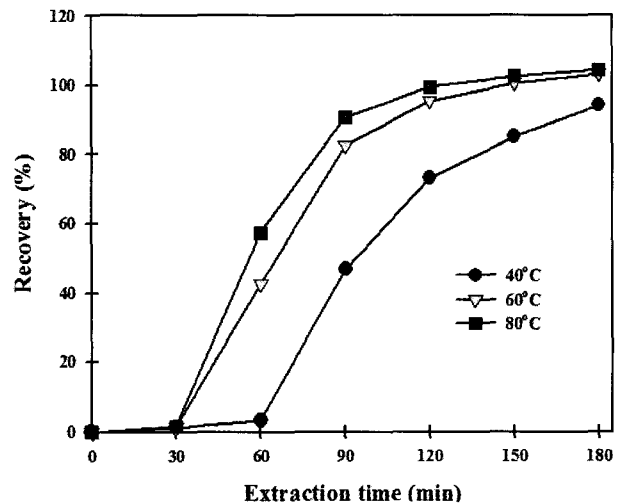


Figure 4. Changes in the yield of extraction with dynamic extraction time from different extraction temperatures (40, 60, and 80°C). Operation conditions were 50 MPa, 3 ml/min and 10% (v/v) of 70% (v/v) aqueous ethanol. The extraction time was 180 min dynamic extraction.

추출온도의 효과

50 MPa에서 보조용매로 70% (v/v) aqueous ethanol을 초임계 이산화탄소에 10% (v/v) 농도로 첨가하여 3 mL/min의 유속으로 180 min 동안 각각 40, 60와 80°C의 추출온도에서 추출을 수행하였고, 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 추출온도가 증가함에 따라 최종 회수율은 94.24, 103.27, 104.38 wt%로 증가하였고, 최종 회수율에 있어 60°C와 80°C의 경우에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 40°C에서 80°C로 온도가 증가함에 따라 추출이 더 빨리 진행되었다. 추출온도가 증가할수록 추출시간이 단축되고 수율도 증가한다고 보고

한 Floch(7) 등과 유사하다. 이는 일정 압력에서 온도가 상승하면 초임계 유체의 밀도는 감소하지만, 시료 조직으로부터 목적성분의 탈착을 용이하게 하여 추출수율과 추출속도를 증가시켰기 때문인 것으로 보인다.

**추출압력의 효과**

추출압력이 추출수율에 미치는 효과를 조사하기 위해 30~50 MPa 압력범위에서 위와 같은 조건으로 80℃에서 수행하였고, 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 조사된 추출압력 범위에서 최종 회수율은 98.55~103.58 wt%의 범위를 보였으며, 40 MPa의 경우가 103.58 wt%로 가장 높은 회수율을 나타내었고 다른 압력조건보다 추출이 더 빨리 됨을 알 수 있었다. 이는 식물체로부터 유효성분을 추출하는데 있어 최적 추출압력이 존재한다고 보고한 Pathumthip(19) 등과 Lin(11) 등의 연구와 유사한 결과이다.

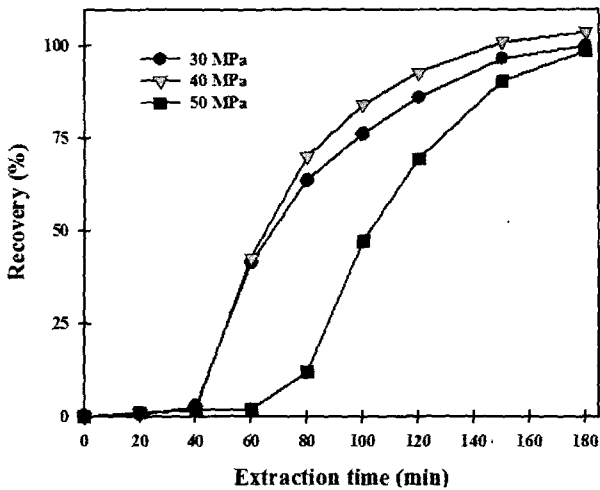


Figure 5. Changes in the yield of extraction with dynamic extraction time from different extraction pressures (30, 40, and 50 MPa). Operation conditions were 80℃, 3 ml/min and 10% (v/v) of 70% (v/v) aqueous ethanol. The extraction time was 180 min dynamic extraction.

**보조용매 aqueous ethanol의 농도에 대한 영향**

Aqueous ethanol을 다양한 농도 (50-90% (v/v))로 제조하여 선정된 최적의 온도와 압력 조건하에서 각각 초임계 이산화탄소에 10% (v/v) 농도로 첨가하였을 때 glycyrrhizic acid 추출효율에 미치는 효과를 알아보았고, 결과는 Fig. 6에 나타내었다. Aqueous ethanol의 농도가 50~90% (v/v)로 증가함에 따라 최종 회수율은 각각 56.51, 104.33, 100.31, 61.00과 2.11 wt%였고, 60% (v/v) aqueous ethanol이 104.33 wt%로 가장 높은 최종 회수율을 나타내었으며, 다른 농도의 경우보다 가장 빠른 추출속도를 나타내었다. Janicot(13) 등은 식물체로부터 alkaloid류를 추출하기 위하여 물과 methanol 혼합물을 이산화탄소에 첨가하였으며, 일정 수준까지 물의 첨가량이 증가함에 따라 추출수율이 증가되었다고 보고하였다.

**보조용매 첨가량에 대한 효과**

초임계 이산화탄소에 대한 보조용매 첨가량의 효과를 알아보기 위하여 60% (v/v) aqueous ethanol을 보조용매로 초임계

이산화탄소에 5%, 10%와 15% (v/v)을 첨가하여 위와 같은 조건에서 추출을 수행하였고, 추출시간에 따른 회수율의 변화는 Fig. 7에 나타내었다. 10% (v/v)와 15% (v/v)을 첨가한 경우 각각 104.57 wt%와 104.11 wt%의 최종 회수율을 나타내었고, 두 경우의 최종 회수율 사이에는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 15% (v/v) 첨가한 경우가 10% (v/v) 첨가한 경우보다 더 빠른 추출속도를 나타내 60분 내에 최고 수율에 도달할 수 있었다.

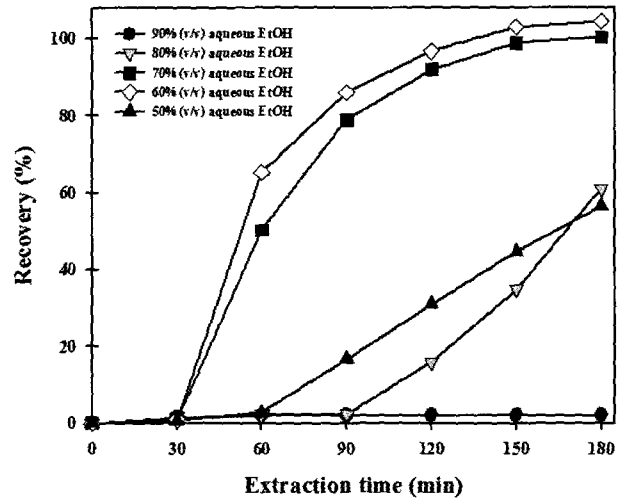


Figure 6. Changes in the yield of extraction with dynamic extraction time from different concentrations of aqueous ethanol as a modifier (50-90% (v/v)). Operation conditions were 40 MPa, 80℃, 3 ml/min and 10% (v/v) of modifier. The extraction time was 180 min dynamic extraction.

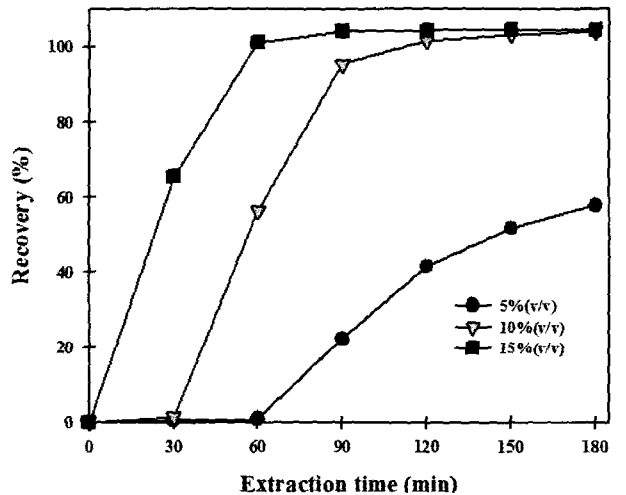


Figure 7. Changes in the yield of extraction with dynamic extraction time from different concentrations of 60% (v/v) aqueous ethanol added to CO<sub>2</sub>. Operation conditions were 40 MPa, 80℃ and 3 ml/min. The extraction time was 180 min dynamic extraction.

**요약**

초임계 이산화탄소를 이용하여 감초의 glycyrrhizic acid를

추출하기 위하여 일정 유속 (3 mL/min)에서 추출온도와 압력 보조용매의 종류와 첨가량에 대한 효과를 조사하여 보았다. 순수한 초임계 이산화탄소만을 사용해서 감초로부터 glycyrrhizic acid를 거의 추출할 수 없었다. 99.9% methanol, ethanol과 isopropanol을 보조용매로 초임계 이산화탄소에 첨가하여 추출한 경우, 추출수율의 증대에 큰 영향을 미치지 않았으나, 70% (v/v) aqueous methanol, ethanol과 isopropanol을 이산화탄소에 10% (v/v)으로 첨가한 경우에는 급격한 수율의 증대를 볼 수 있었고, 70% (v/v) aqueous methanol을 첨가하였을 때 96.62 wt%로 가장 높은 회수율을 나타내었다. 한편, 70% (v/v) aqueous ethanol을 보조용매로 사용한 경우의 가장 높은 회수율과 빠른 추출속도를 나타낸 추출압력과 추출온도는 각각 40 MPa과 80°C였고, 이 조건하에서 다양한 농도의 aqueous ethanol (50~90% (v/v))을 보조용매로 사용하였을 때 60% (v/v) aqueous ethanol을 보조용매로 첨가한 경우가 104.11 wt%로 가장 높은 회수율과 빠른 추출속도를 나타내었다. 또한 이산화탄소에 대한 60% (v/v) aqueous ethanol의 첨가량은 15% (v/v)을 첨가하였을 때 60분 내에 최고 회수율 (104.57 wt%)에 도달하였다.

### 감 사

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 수원대학교 환경정기기술연구센터의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Chester, T. L., J. D. Pinkston, and D. E. Raynie (1996), Supercritical fluid chromatography and extraction, *Anal. Chem.* **68**, 487-514.
- Palmer, M. V. and S. S. T. Ting (1995), Applications for supercritical fluid technology in food processing, *Food Chem.* **52**, 345-352.
- Rizvi, S. S. H., A. L. Benado, J. A. Zollweg, and J. A. Daniels (1986), Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods, *Food Technol.* **June**, 55-65.
- Charlotta, T., W. K. Jerry, and M. Lennart (2001), Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis, *J. Chrom.* **936(A)**, 215-237.
- Lang, Q. and C. M. Wai, (2001), Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review, *Talanta* **53**, 771-782.
- William, K. M., A. M. Dulcie, and W. R. Mark (1996), Analytical supercritical fluid extraction of natural products, *Phytochem. Anal.* **7**, 1-15.
- Floch, F. L., M. T. Tena, A. Rios, and M. Valcarcel (1998), Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves, *Talanta* **46**, 1123-1130.
- Boo, S. J. and S. Y. Byun (1999), Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of genistein from soybean, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 490-494.
- Boo, S. J. and S. Y. Byun (2001), Ethanol modified supercritical CO<sub>2</sub> extraction of daidzein from soybean, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 95-98.
- Suh, J. H., B. K. Cho, S. Y. Byun, and K. H. Kim (1996), Studies on the supercritical fluid extraction of taxol from yew tree, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 71-76.
- Lin, M. C., M. J. Tsai, and K. C. Wen (1999), Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix*, *J. Chrom.* **830(A)**, 387-395.
- Janicot, J. L., M. Caude, and R. Rosset (1990), Extraction of major alkaloids from poppy straw with near critical mixtures of carbon dioxide and polar mixtures, *J. Chrom.* **505(A)**, 247-256.
- Choi, Y. H., J. Kim, Y. C. Kim, and K. P. Yoo (1999), Selective extraction of Ephedrine from *Ephedra sinica* using mixtures of CO<sub>2</sub>, diethylamine, and methanol, *Chrom.* **50**, 187-193.
- Fenwick, G. R., J. Lutomski, and C. Nieman (1990), Licorice, *Glycyrrhiza glabra* L.-composition, uses and analysis, *Food Chem.* **38**, 119-143.
- Celine, A. C., J. C. Laurence, M. P. Francoise, and M. R. H. Yannick (1998), Mono-ammonium glycyrrhizinate stability in aqueous buffer solutions, *J. Sci. Food Agri.* **77**, 566-570.
- Dehpour, A. R., M. E. Zolfaghari, T. Samadian, F. Kobarfard, M. Faizi, and M. Assari (1995), Antiulcer activities of licorice and its derivatives in experimental gastric lesion induced by ibuprofen in rats, *Int. J. Pharma.* **119**, 113-138.
- Paolini, M., J. Barillari, M. Broccoli, L. Pozzetti, P. Perocco, and G. Cantelli-Forti (1999), Effect of licorice and glycyrrhizin on rat liver carcinogen metab-olizing enzymes, *Cancer Lett.* **145**, 35-42.
- Dimitrova, D., K. Varbanova, L. Paeva, S. Angelova, and Y. Guteva (1994), A study on in vitro cultivation of *Glycyrrhiza glabra*, *Plant Genetic Resources Newsletter* **100**, 12-13.
- Pathumthip, T., C. Supaporn, D. Peter, and L. Wilai (2001), Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of nimbin from neem seeds - an experimental study, *J. Food Eng.* **47**, 289-293.