

홍경천에 포함된 미백성분의 분리 및 성능검사

최 두 영 · 안 소 영 · 이 승 기 · 한 정 선 · 김 은 철 · 이 향 복 · ¹신 정 현 · 김 은 기 · † 노 경 호
초정밀생물분리기술연구센터, 인하대학교, ¹인하대병원 피부과
(접수 : 2003. 11. 20., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Separation and Performance Test of Whitening Agent in *Rhodiola Sachalinensis*

Du Young Choi, So Young Ahn, Seung Gi Lee, Jung Sun Han, Eun Chul Kim, Hyang-Bok Lee, Jeong Hyun Shin¹,
Eun-Ki Kim, and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹Department of Dermatology, Inha University Hospital, Incheon 402-711, Korea

(Received : 2003. 11. 20., Accepted : 2004. 6. 24.)

The *Rhodiola sachalinensis* 5 g were mixed and extracted with methanol 150 ml at the room temperature for 12 h. The effluents were collected and grouped into the two. In this experimental condition, the mobile phase composition were linearly changed as follows; water/methanol ; 90/10 - 30/70 (vol. %, for 5 min), 30/70 - 10/90 (vol. %, for 15 min) and an analytical column (3.9 × 25 cm, 15 μm particle size, and 300 Å pore size) was utilized. The performance of the extracted *Rhodiola sachalinensis* as a whitening agent was not favorable, so it classifies the *Rhodiola sachalinensis* extractions with two fractions and collects each fraction for whitening agent assay. For the in-vivo melanin production ratio assay that used melanin-a cell in 10 ppm concentration, it was 58.6%, the first fraction of the effluents collected between 1.0 and 4.0 min, while it was 60% between 10.4 and 17.6 min for the second fraction, which were more efficient than that of arbutin, 45.6%.

Key Words : *Rhodiola sachalinensis*, HPLC, melan-a, melanin production ratio, tyrosinase inhibitory activity

서 론

홍경천(*Rhodiola sachalinensis*)은 오래전부터 중국의 민간 요법 중에 미백 작용을 하는 약초로 알려져 있다. 과산화수소 유도세포에 대한 독성, 티로시나제 (tyrosinase) 활성 및 멜라닌 합성을 억제에 우수한 홍경천 추출물은 그 유효 성분을 미백 조성물에 사용할 수 있다. 여러 해 풀인 홍경천의 중요한 약용부위는 뿌리와 줄기이고, 분류상에서 피자식물문 (*Angiospermae*), 돌나물과 (*Crassulaceae*), 돌꽃 (*Rhodiola*)에 속한다(1). 우리나라 북부지방의 백두산, 포태산, 낭림산의 산꼭대기 부근 바위틈에서 자라며, 특히 백두산의 해발 180~2300 m 사이의 이끼 낀 원시림 속 자작나무숲과 협곡의 바위틈에서 많이 자란다. 홍경천은 온도가 낮고 건조하며 산소가 결핍되고 강한 자외선이 비치며

낮과 밤의 온도차이가 큰 해발 2,000~5,000 m의 악조건에서 생존 할 수 있는 특수한 적응성을 가지고 있다(2).

최근에 홍경천은 인삼, 가시오가피 이후에 발견한 약용 식물의 일종으로 백혈구의 증감, 혈당 등, 생리적 기능 회복에 도움을 주고, 피로 회복 작용, 집중력 및 기억력증강, 신경 쇠약, 혈액결핍성 산소결핍에 대한 뇌조직과 심근의 저항력을 강화한다. 또한, 난소 내 분비기능을 촉진해 자궁각막의 수정작용을 증가한다. 파상풍류 독소 등, 항독작용으로 면역반응을 개선한다. 항산화 작용으로 고혈압, 암 등을 방지하며 각종 질병을 예방한다. 기타작용으로 강심, 항염증 및 조혈작용을 촉진하고 진정 작용을 한다(3). 홍경천의 중요한 성분은 사리드로시드 (salidroside) 및 배당체 티로솔 (tyrosol)이다. 이외에도 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라보노이드 화합물 등 15종의 아미노산이 함유되어 있다. 그리고 생물 활성을 가지고 있는 무기 원소 17종이 있는데, 그 중 7종은 인체 필수 미량원소이다(4).

일반적으로 피부색은 멜라닌의 함량, 분포 등에 따라 색이 결정된다. 세포내 멜라노사이트(melanocyte)에서 생성된 후 세포 외부로 방출되는 멜라노솜(melanosome)의 수와 분

† Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr.

포에 연관되어 있다. 피부의 과 색소 침착은 피부의 염증 반응 이후의 체내 호르몬 이상, 유전질환 및 자외선 조사 등 여러 요인에 의해 발생할 수 있는데, 주된 요인은 멜라닌 색소 합성 이상 및 분포 이상에 의한 것이다. 멜라닌의 주요한 기능은 산소 라디칼을 제거하여 이에 의한 손상으로부터 피부를 보호하는 것이다. 그러므로 멜라닌이 많다는 것은 물리적, 화학적 독성 물질로부터 피부를 보호하기 위한 효과적인 대응체계를 가지고 있다는 것을 의미한다(5).

피부에서의 색소침착 방지는 주로 다음의 세 가지 관점에서 연구될 수 있다. 첫째로, 멜라닌 합성의 주효소인 타이로시나제 활성을 조절하기 위하여 타이로시나아제 합성 저해물질이나, 타이로시나아제의 기질에 대한 길항물질(antagonist)을 개발한다. 둘째로, 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째로, 도파(dopa)의 산화방지를 위해 도파 환원 물질을 개발한다. 마지막으로, 멜라닌 생성기구인 제 1효소 타이로시나아제와 도파 크롬(DOPA chrome)에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 제 2효소인 DOPA chrome tautomerase 또는 DHICA에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로의 변환을 촉매하는 제 3의 효소의 활성을 동시에 감소시킨다(6).

멜라닌의 생합성은 주로 타이로시나아제 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되었지만, 1980년대 이후 생체 내에서 dopachrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPA chrome tautomerase 작용에 의해 DHICA(5,6-di-hydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 밝혀졌다. DOPA chrome에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 독성이 있는 생성 중간 대사물질로부터 자신을 보호하기 위한 파생 경로로 추정되고 있다(7, 8).

과도한 멜라닌의 침착은 피부 등의 병리적 문제에 원인이 되기도 하지만, 기미, 주근깨, 점, 검버섯과 같은 미용적인 측면의 문제로 인식되고 있다. 따라서 멜라닌 형성을 억제할 수 있는 미백제에 대한 관심이 증가되고 있으며 많은 연구가 진행되고 있다. 기존에는 멜라닌의 생성과정을 억제하기 위하여, 종래에는 아스כול빈산(ascorbic acid), 코직산, 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone) 등이 미백원료로 사용되어 왔다. 그러나 대표적 미백원료인 코직산이나 알부틴의 경우 강한 미백효과에도 불구하고 제품 안전성이 낮다는 문제가 있다(9).

본 연구는 민간요법으로 오랫동안 사용되던 천연식물의 추출물을 이용한 미백원료가 인체에 안전함을 인정받음에 따라, 미백제의 원료로 각광을 받고 있는 홍경천의 추출물을 크로마토그래피를 통해 분리, 정제하고, 그 미백성분의 성능을 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기기

미백 성분 분리

본 실험에서 사용한 건조된 홍경천은 중국에서 수입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PTFE 0.2 μ m,

Advantec MFS Inc.)를 이용해 전 처리를 하였다. 이동상으로 이용한 메탄올은 덕산화학(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Korea)에서 구입하였고, 물은 감압 펌프(Division of Millipore, Waters, Milford, MA 01757, USA)와 필터(HA-0.5 μ m, Division of Millipore, Waters Co., USA)를 이용하여 여과한 증류수를 사용하였다. 실험에서 사용한 분석용 HPLC 장치는 영린기기의 M930D solvent delivery module, UV 730D detector, Rheodyne 7725i loop injector (20 μ l sample loop)와 영린기기 M930 solvent delivery pump, UV 720 absorbance detector, 영린기기 Autochro data module을 사용하였다.

미백 성분 측정

Tyrosinase 저해활성 측정으로, dopa oxidase의 활성은 L-dopa를 기질로 하여 생성된 dopachrome의 흡광도 microplate reader (VERSA max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 세포는 C57BL/6J mouse를 기원으로 하는 Murine melan-a melanocyte로서 태평양에서 분양받아 사용하였다. 배양 배지로는 RPMI 1640 배지에 10% (vol/vol) FBS (fetal bovine serum), 1%의 항생제(Penicillin 및 streptomycin)를 첨가하여 만들고, 이에 200 nM의 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가하여 완전한 멜라닌 세포 배양액을 사용하였다. Optical density 측정에 사용된 spectrophotometer (UV-160A, SHIMADZU)는 475 nm에서 사용하였다.

실험 방법

미백 성분 추출 및 분리

홍경천 5 g과 메탄올 50 ml을 혼합하여 상온에서 12시간 추출 후, 추출액을 걸러내고 남은 찌꺼기를 다시 메탄올 50 ml로 추출하는 과정을 총 3번하여 시료를 준비한다. 시료는 입자 크기 15 μ m, 세공 크기 100, 300 Å인 물질로 충전된 분석용 컬럼(3.9 × 25 cm)에 20 μ l가량의 부피로 주입하여 분리하였다. 실험적으로 결정된 이동상 조성은 첫 번째, 물/메탄올; 90/10~30/70 (vol. %, 5분), 30/70~10/90 (vol.%, 15분), 두 번째; 100/0~70/30 (vol. %, 10분), 70/30~30/70 (vol.%, 10분), 30/70~0/100 (vol.%, 10분)이었다.

미백 성분 측정

1) Tyrosinase 활성 저해실험

Tyrosinase 저해활성 측정은 dopa oxidase의 방법을 변형하여 이용하였으며, dopa oxidase의 활성은 L-dopa를 기질로 하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 DOPA chrome을 흡광도 492 nm에서 측정하였다. 반응구는 40 μ l의 25 mM L-dopa와 80 μ l의 67 mM phosphate buffer (pH 6.8), 40 μ l의 mushroom tyrosinase (125 U)와 40 μ l의 시료를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 저해율을 구하였다(10).

$$\text{저해율 (\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 O.D.}}{\text{대조구의 O.D.}} \times 100 \quad (1)$$

2) DPPH 소거활성 측정

각 물질의 항산화 효과는 Blois의 방법에 따라 일정 농도의 각 시료에 0.1mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액을 첨가하여 강하게 vortex한 후 37°C에서 30분간 반응시킨다. Proton-radical scavenger에 의하여 DPPH가 탈색되므로 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 DPPH의 광흡수 정도로 항산화 효과를 알 수 있다. 따라서 대조구와 실험구의 흡광도 차를 대조구 흡광도로 나눈 값을 백분율로 하여 소거율을 계산하고 이를 다시 농도와의 상관관계로 50%의 소거율을 나타내는 RC₅₀ 값을 산출하였다(11).

3) 멜라닌 세포 배양

분양받은 멜라닌 세포는 상기의 완전 배지를 이용하여 37°C의 10% CO₂의 조건하에서 3~6일마다 계대한 후 세포 배양용 24well plate에 각 well 당 2 × 10⁵가 되도록 분주하고 같은 조건하에서 24시간 배양하였다. 멜라닌 세포의 수는 배양세포의 일정량을 취하여 trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. 24시간 배양 후 각 세포가 담긴 well로부터 새로운 배지로 교환해주고 시험에 사용될 시료 (홍경천의 분획)를 final 농도 10 ppm, 100 ppm으로 처리한 후 37°C 배양기에 10% CO₂의 조건으로 2~3일간 배양하였다. 대조구로서는 시료를 첨가하지 않은 배지를 이용하였으며 표준물질로는 arbutin (Sigma, St. Louis, Mo, USA)을 사용하였다(12).

4) 멜라닌 함량 측정

배양된 멜라닌 세포로부터 멜라닌을 얻어내기 위하여 3일간 배양한 세포를 PBS로 세척하여 오래된 배지 및 세포의 부산물 등을 제거하고, Trypsin/EDTA를 이용하여 부착된 세포를 모아 RPMI 1640 배지로 세척한 후 1500 rpm으로 원심분리하여 세포를 수거하였다. 이 세포들은 다시 PBS로 세척하여 10%의 DMSO가 담긴 1 N NaOH를 첨가하여 90°C 항온수조에서 10분간 멜라닌을 용해시킨 후 반응을 정지시키고, spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 optical density를 측정하였다.

멜라닌 생성 저해율(%) =

$$\frac{\text{대조구의흡광도} - \text{시료첨가구의흡광도}}{\text{대조구의흡광도}} \times 100 \quad (2)$$

반응구의 각 well 당 전체 멜라닌의 양을 Absolute melanin으로 표기하고, 다시 세포수당 멜라닌 함량은 relative melanin으로 표기하였다.

5) 세포의 viability determination

멜라닌 세포의 수는 일정량을 취하여 trypan-blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. 멜라닌 세포를 seeding하고 시료를 첨가한 후 배양 3일 후 대조구의 세포수와 시료를 첨가한 처리구의 세포수를 비교 검토하여, 대조구의 세포수를 기준으로 하여 % control로 데이터화하였다.

결과 및 고찰

홍경천 추출물의 분리

기존의 고성능 액체 크로마토그래피(high-pressure liquid chromatography; HPLC)에서는 컬럼에 충전된 흡착제와 이동상간의 확산, 입자사이의 흡착과 탈착의 메커니즘으로 분리가 되는데 사용되는 흡착제의 대부분은 다공성 입자이다. 큰 흡착능력, 큰 표면적이 좋기 때문에 결과적으로 미세한 구멍이 많이 필요하다. 흡착질 분자는 흡착제 입자 밖에서 들어오고, 입자 안쪽으로 확산되어 사용할 수 있는 흡착자리를 가득 채운다. 흡착제 구조에 의존하는 확산메커니즘의 몇몇 다른 형태가 지배적이 되고 때때로 둘 또는 세 가지가 경쟁적으로 흡착한다. 그 지배적 메커니즘은 또한 흡착제와 흡착질의 조합과 온도, 농도 범위 같은 흡착조건에 의존한다(13, 14). HPLC에서 사용되는 입자의 세공크기는 100, 300 Å으로 최적 이동상 조성을 찾아 홍경천의 추출물을 분리하였다.

홍경천 추출물을 0.2 μm 마이크로 필터로 여과한 후 분석용 컬럼 (3.9 × 25 cm, C₁₈, 15 μm, 100 Å)에 20 μl를 주입하였다. 이때 이동상 조성은 선형구배용매조성법을 이용하여 물/메탄올; 100/0 - 70/30 (vol. %, 10분), 70/30 - 30/70 (vol.%, 10분), 30/70 - 0/100 (vol.%, 10분)이었다. Fig. 1에서 알 수 있듯이, 홍경천 추출물을 4개의 피크로 분리할 수 있었다. 각 피크에 대한 정성 분석과 미백효과를 측정하기에 효과적이지 못했다. 그래서 체류시간에 따라 4개의 피크를 두 부분 (#1, #2)으로 나누게 되었다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 결과를 얻게 되었다. 이때 이동상 조성은 단계구배용매조성법을 이용하였고 물/메탄올 ; 90/10 - 30/70 (vol. %, 5분), 30/70 - 10/90 (vol.%, 15분)이었다. HPLC 장치의 과부하 압력 방지와 수집 효율을 고려하여 분석용 컬럼 (3.9 × 25 cm, C₁₈, 15 μm, 300 Å)에 세공크기가 300 Å인 충전물을 충전하여 사용하였고, 이동상 조성도 비교적 간단하게 실험적으로 변형하였다.

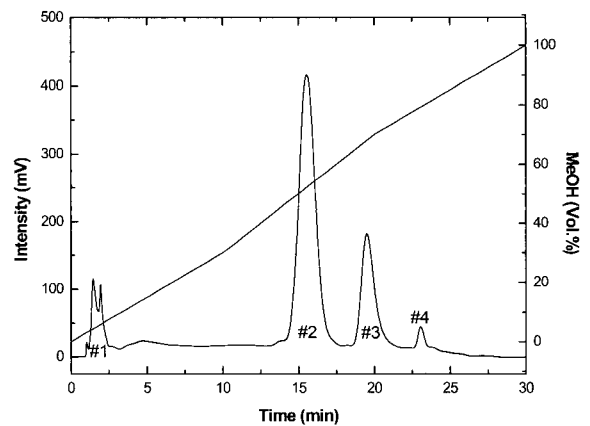


Figure 1. Separation of extraction of *Rhodiola Sachalinensis* by RP-HPLC (Mobile phase : Water/MeOH = 100/0-70/30 (10 min), 70/30-30/70 (10 min), 30/70-0/100 (10 min), packing size : 15 μm, pore size: 100 Å, inject. vol.: 20 μl, wavelength: 365 nm).

분획물 #1, 2에 대한 tyrosinase 효소 활성 및 멜라닌 세포에 대한 영향

Fig. 2와 같이 4개의 피크를 시간에 따라 2부분으로 분류하였다. 주입량을 20서 150 μl 까지 늘려서 분취하고 각 수집된 #1, 2를 회전식 증발기(BÜCHI Rotaevapor R-200)로 농축하였다. 각 부분에 대해서는 in-vitro (cell-free)에서 수행한 tyrosinase 효소의 저해활성 결과는 나타나지 않았다. 그러나 멜라닌 합성을 비교실험에서는 Fig. 3과 같이 알부틴이 45.6%의 멜라닌 합성 저해를 한 반면 10 ppm의 같은 농도에서 #1과 #2는 각각 58.6%와 60%로 비슷한 수준에서 멜라닌 합성 저해를 보였다. 특히 알부틴의 경우 독성으로 인해 세포 성장을 저해하는데 비해 #2는 세포 성장을 저해하지 않는 것으로 판단되었고, 세포당 멜라닌의 양도 31%로 굉장히 작은 것을 알 수 있었다.

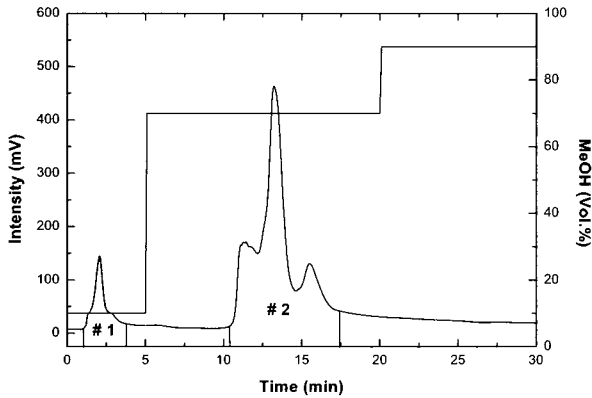


Figure 2. Separation of extraction of *Rhodiola Sachalinensis* by RP-HPLC (Mobile phase: Water/MeOH = 90/10-30/70 (5 min), 30/70-10/90 (15 min), packing size: 15 μm , pore size: 300 Å, inject. vol.: 20 μl , wavelength: 365 nm).

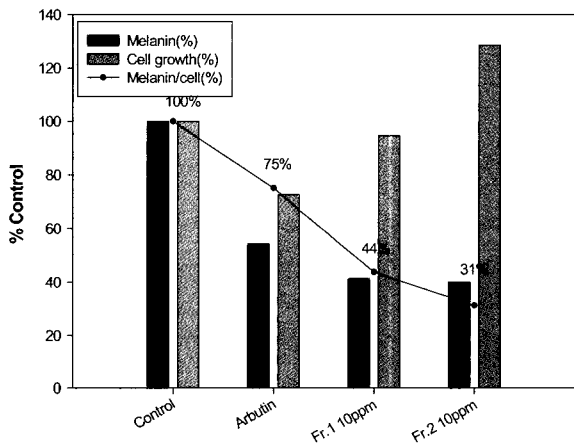


Figure 3. The effect of #1 and #2 of *Rhodiola sachalinensis* on melanogenesis.

홍경천 추출물의 tyrosinase 효소 활성 및 멜라닌 세포에 대한 영향

건조된 홍경천 5 g을 메탄올 50 ml로 상온에서 12시간 추

출하는 공정을 3번 반복하여 150 ml 추출액을 준비하였다. Tyrosinase 효소의 저해활성을 확인한 Fig. 4의 결과, 2 mg/ml (400 ppm) 이상의 고농도에서 효소저해활성이 50% 이상으로 나타났다. 이전의 tyrosinase 효소 저해활성 실험에서 결과를 얻지 못했던 것은 #1, 2를 400 ppm 이상의 고농도로 할 수 없었기 때문이다. 홍경천 추출물을 멜라닌 세포에 적용하였다. 멜라닌 세포의 배양액에 최종농도가 10 ppm 및 100 ppm 이 되도록 처리하여 3일 후 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 것처럼 10 ppm의 농도에서 세포의 성장이 7.52%이고 멜라닌 합성이 32.75% 저해받아 미백 효과가 있음을 알 수 있었다. 반면 100 ppm 농도의 처리구에서 멜라닌이 85.3%로 매우 크게 저해되었으나, 세포의 성장 역시 80.45%로 저해를 받아 세포 당 멜라닌의 합성율이 효과적이지 못하였으며 또한 세포의 독성이 있는 것으로 생각된다.

홍경천의 추출물을 미백 성분이 함유된 기능성 화장품의 원료로 사용하고자 할 때 실험의 결과에 따르면, 이동상 조성을 물/메탄올; 90/10 - 30/70 (vol. %, 5분), 30/70 - 10/90 (vol.%, 15분)으로 하여 #1, 2로 분리하여 #2를 분취, 농축하여 사용하는 것이 가장 효율적인 것을 알 수 있었다.

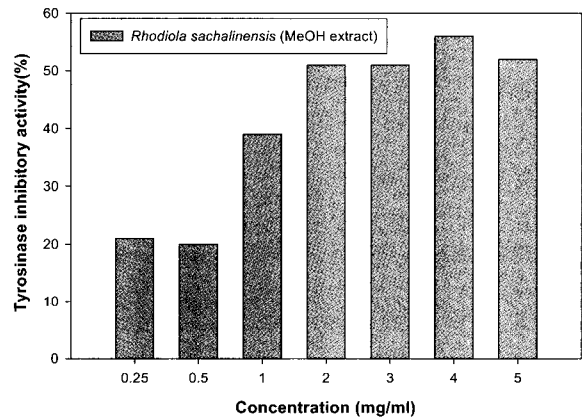


Figure 4. The effect of extractions of *Rhodiola sachalinensis* on the tyrosinase inhibitory activity at several concentration, in vitro.

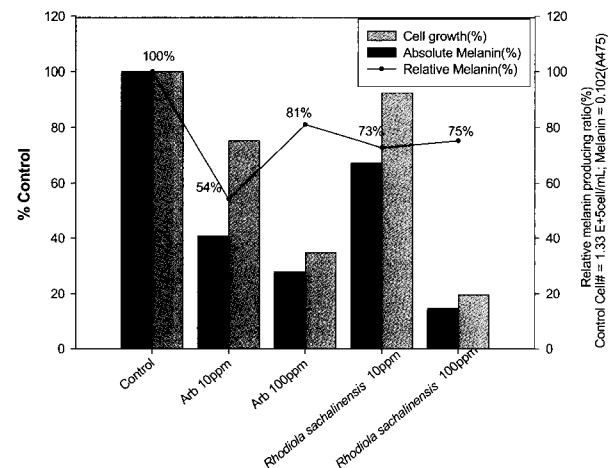


Figure 5. The effect of total extract of *Rhodiola sachalinensis* on melanogenesis (Control, 10 ppm, 100 ppm of Arbutin and *Rhodiola sachalinensis* respectively).

요 약

홍경천 5 g과 메탄올 150 ml을 혼합하여 상온에서 12시간 추출한 시료를 체류시간에 따라 2부분으로 분류하였다. 이때의 이동상 조성은 다음과 같으며 물/메탄올; 90/10 - 30/70 (vol. %, 5분), 30/70 - 10/90 (vol.%, 15분), 분석용 컬럼 (3.9 × 25 cm, C₁₈, 15 μm)에 세공크기가 300 Å인 충전물을 충전하여 사용하였다. 홍경천 추출물을 이용한 미백성능 측정에서는 알부틴에 비해 효율적인 결과를 얻지 못했지만, 체류 시간에 따라 2부분으로 분리하여 각 부분에 대한 미백성능 검사 결과, melanin-a를 이용하여 in-vivo에서 수행한 멜라닌 합성을 비교한 실험에서 10 ppm의 농도를 기준으로 하는 경우, 알부틴의 45.6%보다 1.0~4.0분 동안 수집한 #1과, 10.4~17.6분 동안 수집한 #2가 각각 58.6%, 60%로 우수하게 멜라닌 합성을 저해하는 것을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터 (인하대학교) 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Han, Y. K. (1999), Chemical Composition of *Rhodiola sachalinensis* and its Pharmacological Action, M. S. Thesis, Dept. of Agriculture & Life sciences, Seoul National University, Seoul.
- <http://www.nanum.pe.kr/nh4fr/fr050129.htm>
- <http://my.netian.com/~asia-co/a01.html>
- <http://asiacom.mytripod.co.kr>
- Park, K. C., Y. Choi, S. K. Kim (2003), Whitening composition containing *Rhodiolasachalinensis* a. bor extraction, application No. 1020010046636.
- Son, A. R. and S. J. Lee (2000), A survey of certifying the effectiveness and efficiency of whitening cosmetics, *J. Kor. Soc. Cosmetol.* **6**, 239-254.
- Totsune, H., C. Ohno, Y. Kambayashi, M. Nakano, Y. Ushijima, S. Tero-Kubota, and Y. Ikegami (1999), Characteristics of chemiluminescence observed in the horseradish peroxidase-hydrogen peroxide-tyrosine System, *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 233-242.
- Nikiforos, K., Robert, M., SayreLisa, Z., and Chedekel, M. R. (1991), New trends in photobiology : Photoprotection by melanin, *J. Photochem. Photobiol. B* **9**, 135-160.
- Jung, K. H. (2002), Study on Mechanism of Melanogenesis Inhibition by CMI-3 in B16 Mouse Melanoma Cells, M. S. Thesis, Dept. of Microbiology, Konkuk University, Seoul.
- Laskin, J. D. and Piccinini, L. A. (1986), Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma, *J. Biol. Chem.* **261**, 16226-16235.
- Blosi, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-200.
- Lee, S. H., S. Y. Chol, H. C. Kim, J. S. Hwang, B. G. Lee, J. J. Gao, and S. Y. Kim (2002), Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1045-1048.
- Roper, D. K. and E. N. Lightfoot (1995), Separation of biomolecules using adsorptive membranes, *J. Chromatography A* **702**, 3-26.
- Koo, Y. M. and K. H. Row (2000), Separation technology of biopolymers by high-performance membrane chromatography, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **11**, 807-815.