

용규 추출물의 항산화 활성 탐색

김아람¹, 김동현¹, 변수민², 정강원², 권재환², 여충원², 이정석², 정귀택^{1*}

Antioxidant Activities of Extracts of *Solanum nigrum* L.

A-Ram Kim¹, Dong-Hyun Kim¹, Soo Min Pyeun², Gangwon Jeong², Jae Hwan Gwon², Chung Won Yeo², Jung-Seag Lee², and Gwi-Taek Jeong^{1*}

Received: 16 October 2014 / Accepted: 20 November 2014

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the antioxidant activities of fractions (methanol, hexane, methylene chloride, butanol, ethyl acetate and water) of *Solanum nigrum* L. extract was investigated. The contents of total phenolic compounds of each fractions of methanol, butanol, methylene chloride, ethyl acetate, hexane and water are 4.41±0.23%, 5.57±0.35%, 9.89±0.19%, 9.86±0.19%, 1.89±0.04%, and 3.18±0.06%, respectively. For assay of antioxidant activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, reducing power and nitrite scavenging activity are evaluated. In DPPH radical scavenging activity, the highest effect was obtained from the fraction of ethyl acetate. Reducing power is ordered as ethyl acetate > methylene chloride > methanol. In nitrite scavenging activity, the highest activity was 5.5% (butanol fraction), whereas hexane fraction did not detected. Overall, antioxidant activities are closely related the content of phenolic compound in extracts of *S. nigrum* L.

Keywords: *Solanum nigrum* L., Antioxidant activity, Phenolic compounds

1. INTRODUCTION

지구상에 존재하는 생물체 또는 무생물체로부터 인간의 건강과 생활에 필요한 많은 자원을 얻고 있다. 특히 동·식물로부터 다양한 생리활성을 가지는 성분들에 대한 연구가 오랫동안 진행되어 오고 있다 [1-8].

본 연구에서는 용규로부터 추출물을 확보하여 항산화 활성을 연구하고자 하였다 [2-5]. 용규는 가지과 (*Solanaceae*)에 속하는 까마중 (*Solanum nigrum* Linne)의 전초로서, 우리나라 각지에 흔히 자라는 1년 초이다. 또한 아시아, 미주, 유럽, 아프리카 등 온대에서 열대에 이르는 폭넓은 지역에 분포하고 있다 [2-5]. 주요 약리성분으로는 알칼로이드 (solanine, solasonine, solamargin 등)와 diosgenin, tigenin이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다 [3]. 용규의 약리활성으로 혈당, 혈압 강하, 항염증, 항암 및 항전이, 면역조절, 간 보호, 신장 세포 보호, 중추신경계 진정, 항위궤양, 항산화 작용 등에 대하여 보고되었다 [2,3].

인체는 에너지를 생산하는 과정에서 활성산소를 생성하며, 이러한 활성산소는 인체의 각 구성물질에 대하여 산화적 스트레스를 가하고, 이로 인하여 인체 내의 구성성분들에 대한 비선택적/비가역적인 변형을 일으킨다. 이러한 변형은 인체의 여러 질병의 원인이 된다고 알려져 있다 [1,8-10]. 또한 식품의 가공 및 저장에 있어서 공기 중의 산소에 의한 성분의 산화에 의해 발생하는 유리기 발생이나 산화의 진행 및 식품의 변질 (산패에 의한 이미, 이취, 변색, 독성 발현 등)이 일어난다 [11].

현재 일반적으로 알려져 있는 항산화 물질로는 천연 항산화제 (ascorbic acid, tocotrienol, flavonoid, glutathione, carotenoid 등)와 합성 항산화제 (dibutyl hydroxy toluene (BHT), bu-

¹부경대학교 생물공학과

¹Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863

e-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

²해운대고등학교

²Haeundae High School, Busan 612-818, Korea

tylated hydroxyanisole (BHA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-Ca,Na, EDTA-Na₂, dl- α -tocopherol, nordihydroguaiaric acid (NDGA), propyl gallate, erythorbic acid, isopropyl citrate, resin guaiac, sodium erythorbate 등)가 있다 [1]. 이러한 항산화제는 활성산소의 작용을 억제하고, 식품의 품질저하를 야기하는 산화반응을 차단하기 위해 널리 이용되고 있으나, 합성 항산화제의 안전성 문제 대두로 새로운 항산화 물질의 개발이 요구되고 있다 [1,8,12,13].

본 연구에서는 적용한 항산화 활성 측정법으로는 시료 중의 항산화 물질과 반응하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 정색성 소실의 특성을 이용하는 DPPH radical 소거능 측정법, 항산화 활성과 밀접한 관계를 가지고 있다고 알려져 있는 환원력, 그리고, 아질산염에 대한 소거능력을 사용하여 용규 추출물의 항산화능을 비교하고자 하였다 [1,6-8].

본 연구는 국내에서 자생하는 식물 중 용규 (*S. nigrum* L.)로부터 얻은 6가지의 용매 추출 분획물 (hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water, methanol)의 항산화 효과를 조사하여 생리활성 물질 개발의 원료로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

실험에 사용한 용규 (*S. nigrum* L.)는 백장생 (경기도 포천시 용규면에서 2014년 채집)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 항산화 활성 실험에 사용한 DPPH, ascorbic acid, gallic acid는 Sigma-Aldrich Co. (USA) 제품을, Na₂CO₃와 DMSO는 Kanto chemical (Japan), 그리고 Folin-Ciocalteu reagent는 Wako pure chemical Co. (Japan)의 것을 사용하였다 [1].

2.2. 추출 및 분획

항산화 활성 측정에 사용하기 위하여 용규 추출물은 다음과 같은 방법으로 얻었다. 건조된 용규 절편 150 g에 80% methanol 용액 2 L를 첨가한 후, shaking incubator를 이용하여 50°C, 150 rpm의 조건으로 2일간 추출한 후 추출액을 분리하였다. 다시 80% methanol 용액 2 L를 첨가하여 추출하는 과정을 2회 더 반복한 후 얻은 추출물들을 여과지로 여과하여 고형물을 제거하였다. 고형물이 제거된 methanol 추출물을 evaporator를 사용하여 메탄올을 제거하였다. 메탄올이 제거된 추출물을 methanol extract로 명명하였고, methanol extract로부터 각각 2 L의 유기용매 (n-hexane, ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol)를 사용하여 각각의 유기용매 분획을 순차적으로 얻었다. 각각의 유기용매로 분획 후 남은 용액은 water 분획으로 명명하였다. 얻어진 각각의 유기용매 분획은 evaporator를 이용하여 유기용매를 제거하였다. 각각의 유기용매 및 물 분획 건조물은 건조중량 기준으로 일정 농도 (0.1~10 mg/mL)가 되도록 DMSO에 녹여 각각의 분획 시료로 하

여 항산화 실험에 사용하였다.

2.3. 항산화 활성

용규 추출물의 항산화 활성을 비교하기 위하여 추출물의 DPPH radical 소거능, 환원력, 아질산 소거능을 측정하여 대조구 (ascorbic acid)와 비교하였다.

2.3.1. DPPH radical 소거능

본 실험에 사용한 DPPH radical 소거능 측정법은 김 등 [1]의 방법을 이용하여 아래와 같이 측정하였다. 각각의 용규 추출물 시료를 1~10 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. DPPH 용액은 3 mg의 DPPH를 에탄올 15 mL에 녹인 용액 1.5 mL에 에탄올 3 mL와 DMSO 0.5 mL를 혼합하여 제조하였다. DPPH radical 소거능은 시료 50 μ L와 DPPH 용액을 혼합하여 상온에서 10분간 반응한 후 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 대조구는 시료 대신 50 μ L의 DMSO를 첨가하여 반응 후 얻은 흡광도 값을 사용하였다. DPPH의 전자공여능 (electron donating ability, EDA)은 $EDA (\%) = (B - A) / B \times 100$ (A: 시료의 흡광도, B: 대조구의 흡광도)로 계산하였다. 천연 항산화제인 ascorbic acid를 사용하여 시료의 항산화 활성을 비교하였다 [1,6-8].

2.3.2. 환원력 (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

본 실험에 사용한 환원력 측정법은 김 등 [1]의 방법을 이용하여 아래와 같이 측정하였다. 0.2 mL의 시료에 0.2 mL의 200 mM sodium phosphate (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide 혼합액을 혼합하여 50°C에서 20분간 반응하였다. 0.2 mL의 10% trichloroacetic acid를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리 (10,000 rpm, 10분) 하였다. 상등액 0.5 mL에 0.5 mL의 0.1% ferric chloride 용액을 혼합한 후 분광광도계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 [1,2]. Ascorbic acid를 사용하여 시료와의 항산화 활성을 비교하였다. 흡광도의 값이 클수록 항산화능이 높음을 의미한다 [1,6,7].

2.3.3. 아질산 소거능

본 실험에 사용한 아질산 소거능 측정은 김 등 [1]의 방법을 이용하여 아래와 같이 측정하였다. 추출물 시료 0.4 mL에 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL를 첨가하고, 0.2 M 구연산 완충용액 (pH 6)을 사용하여 반응액의 pH를 조정하여 다음 반응액의 최종부피를 10 mL로 맞추었다. 반응액을 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액 1 mL에 2% acetic acid 5 mL와 Griess reagent 0.4 mL를 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 15 분간 정치하여 반응하여 얻은 생성물의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 측정하였다. 아질산 소거능은 다음과 같이 계산하였다.

아질산 소거능 (%) = $[1 - \{(시료첨가군의 흡광도 - 대조군$

의 흡광도) / 시료무첨가군의 흡광도} × 100 [1,6,7]

2.4. 총 페놀성 화합물의 함량

시료 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.1 mL에 2배 희석된 Folin-Ciocalteu phenol reagent 1 mL를 혼합하여 실온에서 3분간 반응하였다. 반응 후, Na₂CO₃ 포화용액 1 mL를 혼합하고 실온에서 1시간 동안 반응하여 얻은 상등액의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 725 nm에서 측정하였다. 페놀성 화합물의 표준물질로 gallic acid를 사용하였다 [1,6-8].

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출 및 분획

용규 추출물 분획은 건조된 *S. nigrum*-용규에 80% methanol을 이용하여 메탄올 추출물을 얻은 후 메탄올을 제거하여 얻은 추출물을 용규 extract로 명명하였고, 용규 extract로부터 유기용매 (n-hexane, ethyl acetate, methylene chloride, n-butanol)를 사용하여 각각의 분획을 순차적으로 얻었다. 총 6종의 시료를 실험에 사용하였다. 유전율 (dielectric constant)에 따라 용매의 극성이 구분되는데 [1], 본 실험에서는 n-hexane (유전율 1.89), ethyl acetate (6.02), methylene chloride (9.08), n-butanol (17.8)을 사용하였다.

3.2. 총 페놀성 화합물의 함량

용규 추출물 중의 총 페놀성 화합물의 함량을 변형 Folin-Denis법을 이용하여 측정한 결과 (Table 1), 시료 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 각각 80% methanol 4.41±0.23%, hexane 1.89±0.04%, ethyl acetate 9.86±0.19%, methylene chloride 9.89±0.19%, n-butanol 5.57±0.35%, water 3.18±0.06%로 나타났다. Ethyl acetate와 methylene chloride 분획에서 가장 많은 양의 페놀성 화합물이 측정되었다. 정과 이[4]에 의하면 카마중-에탄올 추출물 중 잎에서 13.2 mg/g (1.32%)로 뿌리와 열매에 비하여 25배와 30배 함량이 높았다고 보고하였다.

3.3. 항산화 활성

3.3.1. DPPH radical 소거능

본 연구에서는 시료 중의 항산화 물질과 반응하여 DPPH 자체의 정색성이 소실되는 특성을 이용하는 DPPH radical 소거

Table 1. Contents of phenolic compounds on the fractions of *Solanum nigrum* L.

| Solvent | Phenolic compounds content (%) |
|--------------------|--------------------------------|
| 80% methanol | 4.41±0.23 |
| Hexane | 1.89±0.04 |
| Ethyl acetate | 9.86±0.19 |
| Methylene chloride | 9.89±0.19 |
| n-Butanol | 5.57±0.35 |
| Water | 3.18±0.06 |

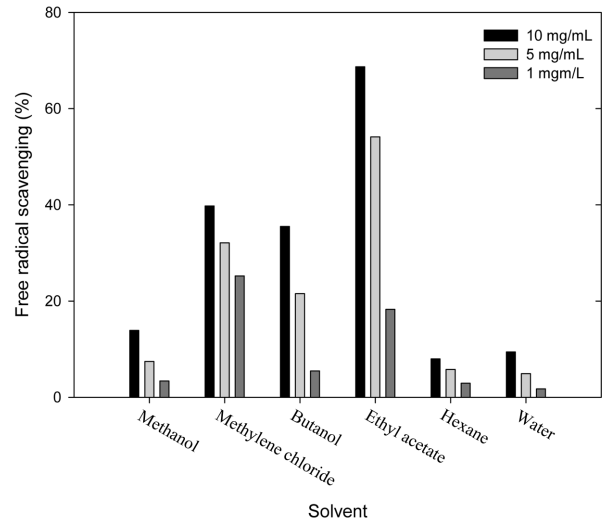


Fig. 1. Effect of *S. nigrum* L. extracts on the DPPH radical scavenging activity.

능 측정법을 사용하여 용규 추출물의 항산화능을 비교하였다 [1,6-8]. 시료의 농도를 1-10 mg/mL로 조절하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 실험에 사용한 추출물 분획 모두에서 대조구로 사용한 ascorbic acid에 비하여 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 모든 추출물 분획에서 시료의 농도가 증가할수록 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였다. 이는 김과 정 [1]의 보고와도 유사한 경향을 나타낸 것이다. 6가지의 분획 중 ethyl acetate 분획에서 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 다음으로는 butanol과 methylene chloride의 순으로 항산화 활성을 나타내었다. 가장 높은 활성을 보인 ethyl acetate 분획의 경우에는 10 mg/mL의 시료에서 68.7%의 활성을 보인 반면에, 대조구로 사용한 ascorbic acid의 경우에는 1 mg/mL와 5 mg/mL에서 각각 89.99%와 97.06%의 항산화능을 나타내었다. 또한 0.1 mg/mL의 ascorbic acid에서는 48.54%의 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 1 mg/mL의 농도에서 ethyl acetate 분획의 항산화능은 ascorbic acid의 약 38%에 해당하는 값을 나타내었다. 임 등 [5]은 까마중의 부위별 DPPH free radical 소거활성은 뿌리, 줄기, 전부위, 열매, 잎 그리고 꽃 순으로 높게 나타났고, 전 식물체의 환류 추출한 ethyl acetate 추출물 분획에서 항산화 물질을 분리한 결과 대부분이 phenolic 화합물이었다고 보고하였다. 김 등 [6]은 미역 열수추출물에 대한 DPPH radical 소거능 연구에서 5 mg/mL 이하의 시료 농도에서는 낮은 항산화능 (2.9%)을 보고하였다. 또한 김 등 [7]은 다시마 열수추출물에서 약 6~30% (1~10 mg/mL) 소거능을 보고하였다. 정 등 [8]은 소리쟁이의 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과, ethyl acetate 분획에서 항산화제로 사용되고 있는 BHA나 ascorbic acid와 비슷한 활성을 보고하였다.

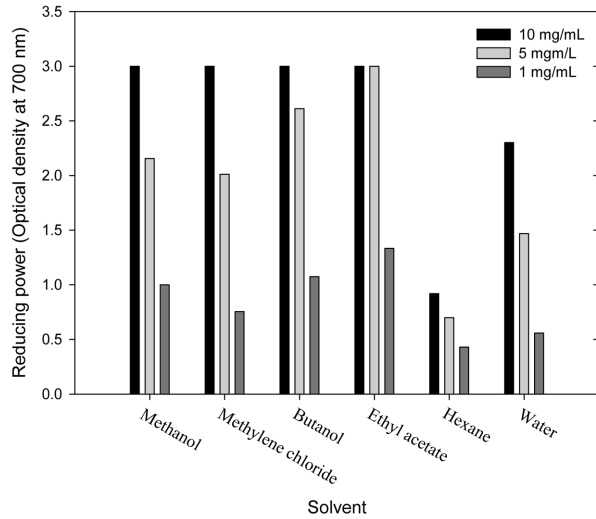


Fig. 2. Ferric reducing antioxidant power assay of *S. nigrum* L. extracts.

3.3.2. 환원력 (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

Fig. 2에 시료 분획의 농도에 따른 환원력을 비교하였다. 실험에 사용된 모든 추출물 분획에서 대조구로 사용한 ascorbic acid (1~10 mg/mL 범위에서 OD 3.000)에 비하여 낮은 환원력을 나타내었다. 시료의 농도가 높아질수록 환원력도 증가하는 경향을 나타내었다. 추출물 분획 중에서는 ethyl acetate 분획이 가장 높은 환원력을 나타내었으며, methylene chloride 분획과 methanol 추출물이 높게 나타났다. 이는 앞의 DPPH radical 소거능 실험 결과에서 ethyl acetate 분획에서 가장 높았고, butanol과 methylene chloride의 순으로 높게 나타난 것과는 일부 상이한 결과이다. 이는 butanol 분획과 water 분획 중의 항산화성을 나타내는 물질의 차이라고 판단된다. 김 등 [6]은 미역 열수추출물을 이용하여 환원력을 측정한 결과, 50 mg/mL에서 5 mg/mL의 경우보다 약 3배 높은 환원력을 보고하였으나, ascorbic acid에 비하여 낮았다.

3.3.3. 아질산 소거능

용규 추출물 분획의 아질산 소거능을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 사용한 시료의 농도는 1 mg/mL이었다. Butanol 분획에서 가장 높은 소거능(5.5%)을 나타내었고, hexane 분획에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 대조구로 사용한 ascorbic acid가 1 mg/mL의 농도에서 93.9%의 높은 소거능의 나타낸 것에 비하면 상당히 낮은 값이다. 본 연구와 비교할만한 결과로는 미역 열수추출물의 아질산 소거능에서 1 mg/mL까지는 거의 활성을 보이지 않은 반면, 5 mg/mL에서는 30.1%의 소거능을 보였고, 5 mg/mL 이상의 ascorbic acid에서 거의 100%의 소거능을 보고하였다 [6]. 또한 정과 이 [4]에 의하면 카마중-에탄올 추출물 중 뿌리와 열매의 아질산염 소거능은 8% 이하로 낮았으며, 잎은 62% (pH 1.2)

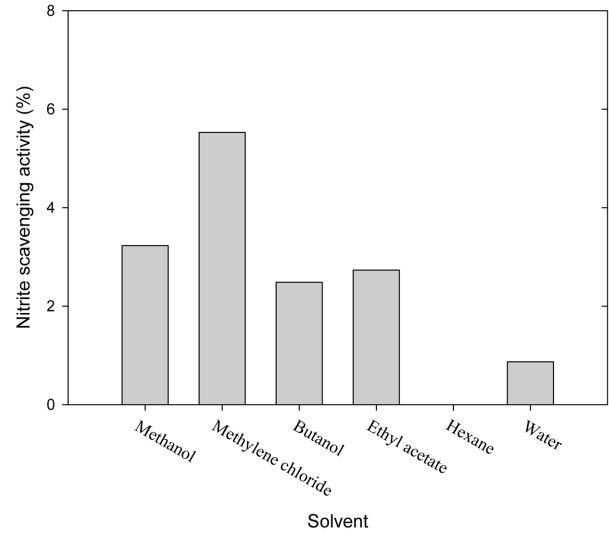


Fig. 3. Nitrite scavenging activity of *S. nigrum* L. extracts.

의 활성을 보고하였다.

3.3.4. 페놀성 화합물의 함량과 항산화 활성의 관계

식물 중의 페놀성 화합물은 천연 항산화 기능이 알려져 있다 [1,4,8]. 본 연구에서 용규 추출물의 페놀성 화합물의 함량과 항산화 활성과의 관계를 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(A)에는 각 분획별로 5 mg/mL 농도 시료의 DPPH radical 소거능과 총 페놀성 화합물 함량과의 관계를 나타낸 것이다. 일반적으로 methylene chloride 분획을 제외한 경우에 페놀성 화합물의 농도가 높을수록 DPPH radical 소거능도 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 methylene chloride 분획에서는 페놀성 화합물의 농도가 가장 높음에도 DPPH radical 소거능은 낮은 경향을 나타내었다. 이는 methylene chloride 분획 중의 페놀성 성분 중 일부는 DPPH radical 소거능을 나타내지 않은 결과로 판단된다. Fig. 4(B)는 각 분획별로 1 mg/mL 농도 시료의 총 페놀성 화합물 함량과 환원력의 관계를 나타낸 것이다. 일반적으로 페놀성 화합물의 농도가 높을수록 환원력도 증가하는 경향을 나타내었다. Fig. 4(C)는 각 분획별로 1 mg/mL 농도 시료의 총 페놀성 화합물 함량과 아질산염 소거능의 관계를 나타낸 것이다. 페놀성 화합물의 농도와 아질산염 소거능과의 확실한 상관관계는 확인되지 않았다. 임 등 [5]은 까마중 전 식물체의 환류 추출한 ethyl acetate 추출물 분획 중의 항산화 활성을 가지는 물질이 대부분이 phenolic 화합물이었다고 보고하였다. 김 등 [7]은 다시마 열수추출물의 총 페놀성 화합물의 함량이 증가함에 따라 환원력의 증가 경향을 보고하였다. 또한 정 등 [8]은 소리쟁이 추출물 분획의 항산화 활성과 페놀성 화합물 함량과의 상관관계를 조사한 결과, 추출물의 항산화 활성은 페놀성 화합물의 함량과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 총괄적으로 본 연구에서 용규 추출물 중의 총 페놀성 화합물의 함량이 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

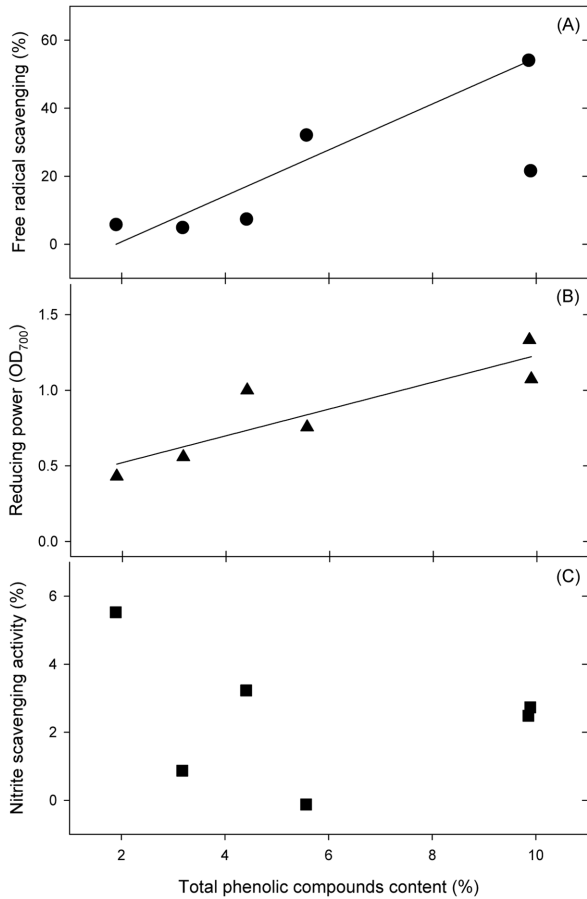


Fig. 4. Correlation of total phenolic compound content with antioxidant activities of *S.nigrum* L. extracts. (A) DPPH radical scavenging activity, (B) reducing power, (C) nitrite scavenging activity.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 용규 (*S. nigrum* L.) 추출 분획물 (hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water, methanol)의 항산화 효과를 조사하였다. 용규 추출물 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 80% methanol 4.41±0.23%, hexane 1.89±0.04%, ethyl acetate 9.86±0.19%, methylene chloride 9.89±0.19%, n-butanol 5.57±0.35%, water 3.18±0.06%로 나타났다. 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH radical 소거능, 환원력, 아질산 소거능에 대한 실험을 수행한 결과, ethyl acetate 분획에서 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 다음으로는 butanol과 methylene chloride의 순이었다. 환원력 실험에서는 ethyl acetate 분획이 가장 높았으며, methylene chloride 분획과 methanol 추출물이 높게 나타났다. 아질산 소거능 실험에서는 butanol 분획에서 가장 높은 소거능 (5.5%)을 나타내었고, hexane 분획에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 총괄적으로 용규 추출물의 항산화 활성은 시료 중의 페놀성 화합물의 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되었다. 위의 연구결과로부터 용규 추출물의 생리활성 물질 개발의 원료

로서의 가능성을 확인하였다.

Acknowledgements

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2014 Year).

REFERENCES

- Kim, D. H. and G. T. Jeong (2014) Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine greenalgae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* 29: 92-97.
- Jung, J. H. (2012) *Evaluation of the anticancer activity of Solanum nigrum MeOH extract*. MS Thesis. Dong-Eui University, Busan, South Korea.
- Jeong, H. D. (2009) *Anti-inflammatory effects of Solani nigri Herba*. Ph.D. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, South Korea.
- Jeong, G. S. and N. G. Lee (2009) Functional properties and antioxidant effects of *Solanum nigrum*-ethanol extract. *J. Environ. Sci.* 18: 1207-1214.
- Lim, J. K., G. Y. Chung, and H. J. Jeong (2001) Evaluation of the antioxidant potential and identification of active principles of *Solanum nigrum* L. on antioxidant defense systems. *Korean J. Life Sci.* 11: 509-516.
- Kim, Y. S., H. G. Nam, H. J. Shin, M. S. Na, M. H. Kim, C. W. Lee, J. S. Kim, Y. L. Piao, and W. S. Cha (2011) Effect of hot water extract of *Undaria pinnatifida* on the activities of antioxidant and nitrite scavenging. *KSBB J.* 26: 151-156.
- Kim, Y. S., C. O. Kang, M. H. Kim, W. S. Cha, and H. J. Shin (2011) Contents of water extract for *Laminaria japonica* and its antioxidant activity. *KSBB J.* 26: 112-118.
- Jeong, G. T., K. M. Lee, and D. H. Park (2006) Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem. Eng. Res.* 44: 81-86.
- Aruoma, O. I. (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32: 671-754.
- Davies, K. F. and A. L. Goldberg (1987) Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* 262: 8227-8261.
- Naver Knowledge Encyclopedia, Nutrition Dictionary. <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=366403&cid=42413&categoryId=42413> (2014).
- Korean society of food science and technology (2008) *Encyclopedia of food science and technology*, Gwangil munhwasa, South Korea.
- Choe, S. Y. and K. H. Yang (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxy anisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14: 283-288.