

초임계유체 추출을 이용한 포도씨 tocotrienol 추출조건 최적화

김경미 · 우관식¹ · 황인국 · 이연리 · 이준수 · 정현상*

충북대학교 식품공학과, ¹작물과학원 품질관리과

Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Tocotrienol from Grape Seed

Kyeong-Mi Kim, Koan Sik Woo¹, In Guk Hwang, Youn Ri Lee, Junsoo Lee, and Heon Sang Jeong*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

¹Crop Post-Harvest Technology Division, National Institute of Crop Science

Abstract In this study, supercritical carbon dioxide extraction (SFE) was utilized for the extraction of tocotrienol from grape seeds. The optimal conditions for vitamin E and tocotrienol extraction were determined via response surface methodology (RSM). Central composite design was utilized to assess the effects of oven temperature (30-50°C, X1), operating pressure (17-25 MPa, X2), and extraction time (1-5 hr, X3) of supercritical fluid extraction. Vitamin E and tocotrienol contents were 8.65 mg/100 g and 7.88 mg/100 g at 40°C, 20 MPa and 5 hr, respectively. The predicted extraction condition was validated via actual experimentation. The predicted extraction conditions were 40°C, 3.8 hr, and 20.7 MPa. The vitamin E and tocotrienol contents under these conditions were 8.20 mg/100 g and 7.42 mg/100 g, respectively. The vitamin E and tocotrienol contents of solvent extraction with hexane were 8.18 mg/100 g and 7.24 mg/100 g, respectively.

Key words: grape seed, supercritical fluid extraction, response surface methodology, vitamin E, tocotrienol

서 론

포도(*grape, Vitis vinifera* L.)는 세계 과일 생산량의 약 30%를 차지하며, 국내 생산량은 연간 40만 톤에 이르고 있다. 포도는 포도주 생산에 가장 많이 이용되고 있지만 국내에서는 주로 생과로 이용되고 있어 부가가치를 높이기 위한 가공제품의 개발이 필요하다. 포도씨는 포도 가공공정에서 과육으로부터 분리되며 포도 중량의 3-5%를 차지한다(1,2). 포도씨에는 polyhydroxy flavan 3-ol unit의 폴리페놀 화합물이 함유되어있어 혈관계 질환의 예방, 자유라디칼 소거 및 과산화 이온 형성의 저하에 관여하여 항산화작용, 항암작용 및 항균작용 등 여러 가지 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다(3-5). 특히 포도씨에 많이 함유되어 있는 tocotrienol은 암세포의 확산을 방지하거나 사멸시키는 작용을 하며, 산화로 인하여 일어나는 자유라디칼과 과산화지방의 생성으로 세포막과 세포 내 생체막의 생리활성 상실, 세포기능의 약화 및 괴사 등을 억제하여 노화를 저지시키는 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다(6,7).

포도씨로부터 생리활성 성분을 추출하기 위해서 용매추출법이나 열수추출법(8,9) 등이 연구되고 있으나 추출효율이 낮거나 추출물의 안정성, 운영비용 등에서 개선되어야 할 점들이 지적되고 있으며, 이러한 문제점들의 극복을 위해 사용하는 방법이 초임계

유체 추출법이다(10-12). 포도씨에 대한 연구는 주로 포도씨 기름에 대하여 이루어 졌으며, 그중 vitamin E인 α -tocopherol에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 최근 국내에서 포도즙 및 와인 제조산업이 활성화됨에 따라 부산물로 대량 얻어지는 포도씨의 효율적인 이용방안이 요구되고 있으며, 용매추출 및 화학적 정제법에 의하여 고품질의 포도씨유를 제조하고, 그 기능성을 알아보는 연구가 진행되고 있다(3). 또한 마이크로웨이브 추출 및 초임계 이산화탄소를 이용하여 resveratrol을 다량 함유한 포도씨유를 제조하는 연구(11,13)등이 보고되고 있으나 포도씨로부터 tocotrienol 추출에 초임계유체 추출을 이용한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 포도주나 포도즙 생산 시 부산물로 발생하는 포도씨에 함유된 기능성물질인 tocotrienol을 효과적으로 추출할 수 있는 추출조건을 확립하고자 초임계유체 추출법을 통하여 추출온도, 압력, 추출시간에 대한 추출특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 포도씨는 (주)와인코리아(Yeongdong, Korea)에서 포도즙 및 와인 제조과정에서 부산물로 얻어진 포도씨를 제공받아 사용하였다. 즉, 포도과피와 과육이 혼합된 포도씨를 수돗물로 여러 번 세척한 후 정선하여 자연 탈수한 다음 37°C에서 12시간 건조한 후 -20°C에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. Tocopherol kit(α -, β -, γ 및 δ -tocopherol) 및 tocotrienol kit(α -, β -, γ 및 δ -tocotrienol)는 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였으며, 이들 표준품은 0.01% BHT를 포함하는 n-hexane에 녹여 -20°C 이하의 냉동에서 보관하면서 정성 및 정량 분석용으로 사용하였다.

*Corresponding author: Heon-Sang Jeong, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Tel: 82-43-261-2570

Fax: 82-43-271-4412

E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

Received August 22, 2008; revised September 23, 2008

accepted September 23, 2008

실험계획

초임계추출에 의한 tocopherol 및 tocotrienol 추출조건 최적화를 위하여 중심합성계획법(central composite design)으로 실험설계를 실시하였다. 추출에 영향을 미치는 요인인 추출온도, 추출압력 및 추출시간을 주요 독립변수로 설정하여, Cochran과 Cox(14)의 방법에 따라 설계하였다(Table 1). 독립변수인 추출온도(30-50°C, X_1), 추출압력(17-25 MPa, X_2) 및 추출시간(1-5 hr, X_3)이 종속변수인 Y(tocopherol 및 tocotrienol 함량)에 영향을 주는 요인으로 가정하여 실험 모델 설정하였다.

초임계유체 추출

본 실험에 사용된 초임계유체 추출장치(Model 880-81, Jasco, Japan)는 이산화탄소 주입부(Model 880-81 B.P.R), 가압부(Model PU-980) 및 추출기(Model CO-965 column)로 구성되었으며, 최대 압력은 35 MPa, 추출용기는 10 mL 용량을 사용하였다. 이산화탄소는 99.9999%의 고순도 가스를 사용하였다. Vitamin E의 회수율을 높이기 위하여 hexane으로 포집하였으며, 분말화된 포도씨 5 g을 추출 vessel에 넣어 추출하였다. 포집된 추출물은 질소가스로 완전하게 농축하였으며, 추출수율을 측정한 후 n-hexane 50 mL로 정용하여 분석용 시료로 사용하였다.

용매추출

초임계 이산화탄소 추출과 용매추출과의 추출율을 비교하기 위하여 동일시료 5 g을 hexane을 이용하여 전보(15)에서 선정된 추출온도 40°C, 추출시간 3 hr 3반복 및 교반속도 200 rpm의 조건에서 진탕추출(Jeio Tech., Daejeon, Korea) 하였다. 추출물은 여과 후 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 완전농축 하여 추출수율을 측정한 후 n-hexane 50 mL로 정용하여 분석용 시료로 사용하였다.

Tocopherol 및 tocotrienol 함량 분석

각각의 추출조건에서 50 mL로 정용된 추출물 2 mL을 시험관에 취한 후 질소가스로 완전하게 농축한 후 1 mL의 n-hexane에 녹인 다음 불순물을 제거하기 위하여 0.22 µm nylon membrane

filter(MSI, Westboro, MA, USA)로 여과한 다음 순상 HPLC (Younglin Inc., Seoul, Korea)로 분석하였다. Column은 LiChrosphere Diol 100(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였고 검출기는 fluorescence detector(Linear instruments, Thermo Separation Products Inc, USA)로 파장은 E_{λ} 290 nm, $E_{m\lambda}$ 330 nm에서 검출하였으며, 이동상은 n-hexane과 isopropanol을 99:1(v/v)로 혼합하여 1.0 mL/min의 속도로 20 µL를 주입하여 분석하였다. 각각의 유도체를 분리 및 정량하여 mg/100 g으로 나타내었다.

통계처리

Tocopherol 및 tocotrienol의 추출에 미치는 독립변수의 영향은 통계프로그램(Statistical Analysis System 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 반응표면 분석과 분산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Vitamin E 및 tocotrienol 추출에 미치는 추출조건의 영향

포도씨로부터 vitamin E 및 tocotrienol 추출조건 최적화를 위하여 초임계 이산화탄소 추출에 영향을 미치는 추출온도, 추출압력 및 추출시간을 변수로 처리한 처리구에 대한 vitamin E 및 tocotrienol 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 추출조건에 대한 RSM 구간 설정은 예비실험결과 선정되었으며, 각각의 처리조건 중 40°C, 20 MPa 및 5 hr으로 추출한 구간에서 vitamin E는 8.65 mg/100 g 그리고 tocotrienol은 7.88 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 초임계 이산화탄소 추출을 이용한 추출조건별 tocotrienol 함량에 대한 반응표면 분석결과를 Fig. 1-3에 나타내었다. 추출 온도와 압력에 대한 tocotrienol 함량의 영향을 나타낸 Fig. 1을 보면 추출온도와 압력이 증가할수록 tocotrienol 함량도 증가하는 경향을 나타내었다. 추출온도 40-45°C 범위에서 그리고 압력 21-23 MPa 범위에서 6.59-7.88 mg/100 g으로 높게 나타났으며, 추출온도 50°C 이후에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 온도를 상승시키면 열역학적으로 matrix 내부에서 용질로의 열전달이 보다 강렬해지고, 용질의 증기압이 높아져 초

Table 1. Values of independent variables and treatment conditions by the central composite experimental design

Treatment No.	Coded and real values*			Vitamin E (mg/ 100 g)	Tocotrienol (mg/ 100 g)
	X_1	X_2	X_3		
1	-2(30)	0(21)	0(3)	5.52±0.13	4.93±0.16
2	-1(35)	-1(19)	-1(2)	4.63±0.13	4.25±0.24
3	-1(35)	-1(19)	+1(4)	6.69±0.28	5.95±0.24
4	-1(35)	+1(23)	-1(2)	5.42±0.35	4.81±0.26
5	-1(35)	+1(23)	+1(4)	7.35±0.22	6.59±0.15
6	0(40)	-2(17)	0(3)	5.16±0.04	4.60±0.05
7	0(40)	0(21)	-2(1)	2.58±0.07	2.30±0.06
8	0(40)	0(21)	0(3)	7.26±0.15	6.60±0.28
9	0(40)	0(21)	0(3)	7.05±0.16	6.38±0.22
10	0(40)	0(21)	+2(5)	8.65±0.21	7.88±0.16
11	0(40)	+2(25)	0(3)	5.23±0.33	4.70±0.28
12	+1(45)	-1(19)	-1(2)	4.18±0.43	3.74±0.30
13	+1(45)	-1(19)	+1(4)	5.89±0.39	5.22±0.38
14	+1(45)	+1(23)	-1(2)	5.39±0.09	4.77±0.04
15	+1(45)	+1(23)	+1(4)	7.30±0.06	6.48±0.04
16	+2(50)	0(21)	0(3)	5.28±0.62	4.67±0.54

* X_1 : Temperature (°C), X_2 : Pressure (MPa), X_3 : Time (hr)
Values are mean±SD of triplicate analyses.

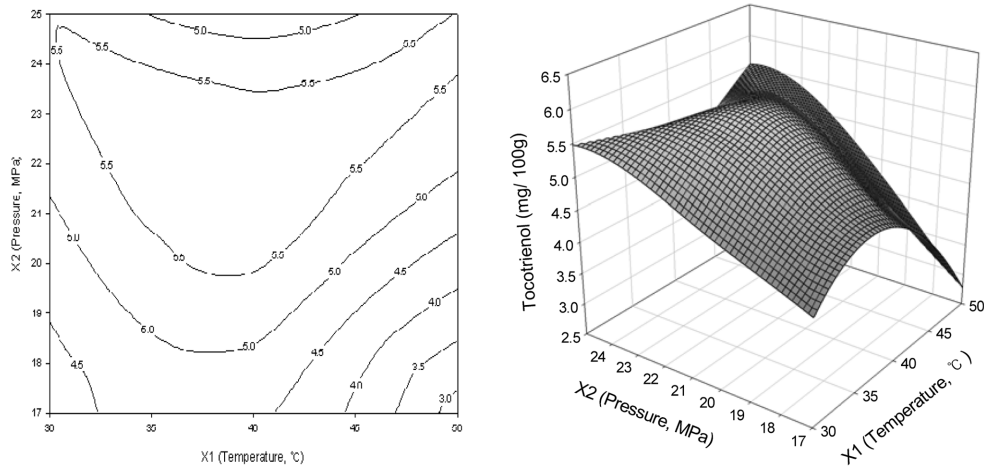


Fig. 1. Contour plot and response surface curve on the predicted response surface of tocotrienol content as a function of temperature (°C) and pressure (MPa).

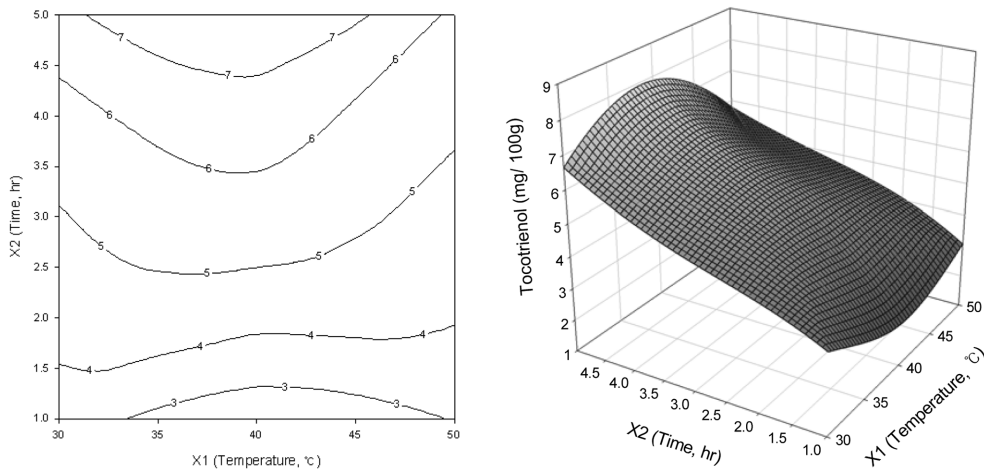


Fig. 2. Contour plot and response surface curve on the predicted response surface of tocotrienol content as a function of temperature (°C) and time (hr).

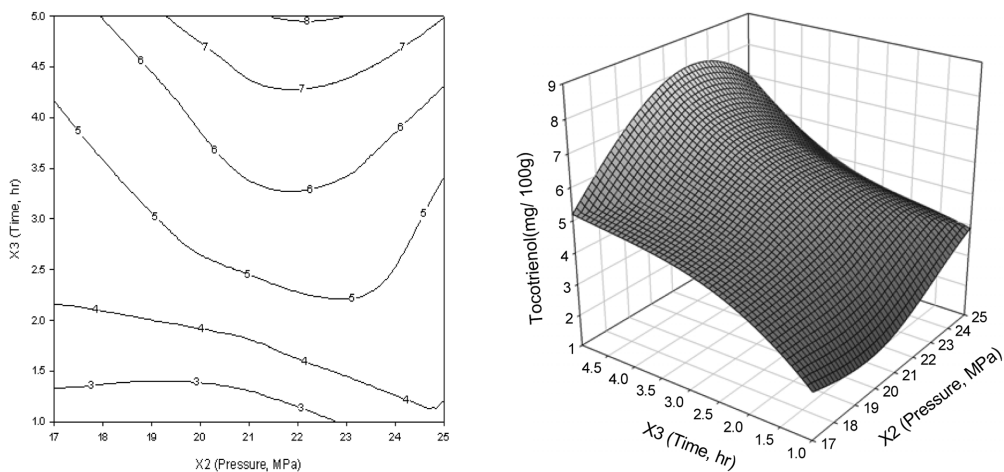


Fig. 3. Contour plot and response surface curve on the predicted response surface of tocotrienol content as a function of pressure (MPa) and time (hr).

임계 이산화탄소에서 보다 쉽게 용해되지만(10), 일정 압력에서 온도가 증가할 때 초임계 이산화탄소의 밀도는 감소하므로 초임계 이산화탄소의 용해도는 감소한다고 보고되어 지고 있다(16).

이러한 온도에 따른 영향에 의해서 초임계 이산화탄소에서 tocotrienol의 용해도는 감소되기 때문이라 생각된다. 추출온도와 추출시간에 대한 영향을 나타낸 Fig. 2를 보면 추출온도 40-45°C,

Table 2. Comparison between predicted and experimental values at optimum extraction conditions

	Variable			Vitamin E (mg/100 g)	Tocotrienol (mg/100 g)
	X ₁	X ₂	X ₃		
Predicted value				8.20	7.42
Real value	40	20.7	3.8	8.42±0.28	7.62±0.29

Values are mean±SD of triplicate analyses

Table 3. Comparison of vitamin E and tocotrienol content between solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction

Extraction methods	Vitamin E (mg/100 g)	Tocotrienol (mg/100 g)
Solvent extraction	8.18±0.30	7.24±0.21
Supercritical fluid extraction	8.65±0.21	7.88±0.16

Values are mean±SD of triplicate analyses

추출시간 4-5 hr 사이에서 tocotrienol 함량은 5.22-7.88 mg/100 g으로 높게 나타났다. 추출시간의 증가에 따라 추출량이 빠르게 증가하는 것으로 볼 때 추출온도 보다 추출시간이 추출수율에 많은 영향을 주는 것으로 판단되었다. 압력과 추출시간에 대한 영향을 나타낸 Fig. 3을 보면 추출압력이 증가하고 추출시간이 길어질수록 tocotrienol 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 추출압력 21-23 MPa, 추출시간 4-5 hr 사이에서 tocotrienol 함량은 6.48-7.88 mg/100 g으로 높은 함량을 나타내었다. 일정온도에서 초임계 이산화탄소의 압력을 증가시키면 초임계의 밀도와 용해도가 증가하게 되는데 초임계 이산화탄소의 밀도는 온도와 압력에 가장 큰 영향을 받고 압력이 커질수록 그리고, 온도가 낮아질수록 밀도가 커지는 것으로 알려져 있다(17). 그 결과 압력의 증가에 따라 tocotrienol의 밀도가 증가하게 되므로 그 함량이 증가함

을 알 수 있었다. 이러한 결과는 이 등(18)의 보고와 일치하는 결과이고, Johanssene 등이 60°C의 일정 온도에서 200-350 bar로 압력 변화시켰을 때 지용성 vitamin들의 용해도가 증가하였다는 보고와 일치한 결과이다(16).

추출조건 최적화

각각의 추출조건에서 실험값과 반응표면 분석결과의 예측값 그리고 각각의 최적조건을 Table 2에 나타내었다. 각각의 추출조건에 따라 예측된 정상점에서의 최적 추출조건은 40°C, 20.7 MPa 및 3.8 hr으로 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 각각 8.20 mg/100 g 및 7.42 mg/100 g으로 나타났다. 이와 같은 예측결과에 대한 모델의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건에서 추출한 결과 vitamin E 및 tocotrienol 함량 각각 8.42 mg/100 g 및 7.62 mg/100 g으로 예측값 보다 약간 높게 나타났다. Vitamin E 및 tocotrienol 함량에 대한 실측값은 통계적 예측값의 각각 99.27-106.10% 및 96.09-106.60%로 나타나 추출조건의 유효성이 인정되었다.

초임계 유체추출과 응매추출과의 tocotrienol 함량 비교

초임계 이산화탄소 추출방법을 이용한 최대 추출조건은 추출 온도, 추출압력 및 추출시간이 각각 40°C, 21 MPa 및 5 hr으로 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 각각 8.65 mg/100 g 및 7.88 mg/

Table 4. Analysis of variance between vitamin E and tocotrienol contents and independent variables

Variables	DF	Vitamin E		Tocotrienol	
		Sum of squares	F-value	Sum of squares	F-value
Temperature, °C	4	10.41	10.53***	9.70	11.45***
Pressure, MPa	4	15.38	15.56***	13.14	15.51***
Time, hour	4	80.42	81.37***	65.66	77.52***

***Values are significantly different ($p < 0.001$).

Table 5. Coefficients of the quadratic regression model for the determination of total vitamin E and tocotrienol contents

Effects	DF	Vitamin E		Tocotrienol	
		Coefficient	t-value	Coefficient	t-value
Intercept	1	7.16	37.74***	6.47	36.83***
X ₁	1	-0.11	-1.57	-0.12	-1.78
X ₂	1	0.26	3.68***	0.23	3.48***
X ₃	1	1.24	17.21***	1.12	16.80***
X ₁ ²	1	-0.44	-6.12***	-0.42	-6.35***
X ₂ ²	1	-0.49	-6.83***	-0.46	-6.91***
X ₃ ²	1	-0.39	-5.38***	-0.35	-5.26***
X ₁ *X ₂	1	0.15	1.44	0.14	1.44
X ₁ *X ₃	1	-0.04	-0.44	-0.04	-0.40
X ₂ *X ₃	1	0.01	0.08	0.04	0.40
		r ² = 0.9075		r ² = 0.9045	

***Values are significantly different ($p < 0.001$).

100 g으로 나타났다. Hexane 추출과 비교하여 추출효율을 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 유기용매 추출은 hexane을 이용하여 40°C에서 3시간 3회 추출한 결과 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 각각 8.18 mg/100 g 및 7.24 mg/100 g으로 초임계 이산화탄소 추출보다 적은 추출량을 나타내었다. 포도씨로부터 tocotrienol은 초임계 이산화탄소 추출법이 용매 사용의 절약효과와 더불어 비용절감과 환경오염방지에 기여한다고 보고되고 있다. 초임계 이산화탄소 추출은 원하는 유용성분의 선택적 추출은 가능하게 하는 방법이며, 이산화탄소와 미량의 보조 용매를 사용하기 때문에 용매추출법에 비해 유해성 용매의 잔존 위험이 적다. 또한 낮은 온도에서 추출이 이루어지기 때문에 열에 민감한 물질의 추출에 유용한 방법이다(10). 이러한 결과를 종합해 볼 때, 추출 시 장시간이 소요되고 고가의 비용이 들며 용매의 사용량이 많은 용매추출보다는 초임계 이산화탄소 추출법을 이용하는 것이 더 효과적으로 vitamin E 및 tocotrienol을 추출할 수 있을 것으로 판단되었다.

통계분석

추출 조건에 따른 vitamin E 및 tocotrienol 함량에 대한 분산분석 결과와 반응표면 회귀식의 상수값을 Table 4 및 5에 나타내었다. 분산분석 결과 vitamin E 함량에 대한 온도, 압력 및 시간의 F값은 각각 10.41, 15.38 및 80.42($p < 0.001$)으로 모든 변수가 유의성이 있는 것으로 나타났다. Tocotrienol 함량에 대한 영향도 F값이 각각 9.70, 13.14 및 65.66($p < 0.001$)으로 모든 변수가 추출에 영향을 미치고 있으며, 추출시간에 대한 영향이 가장 크게 나타났다. 반응표면분석 결과 vitamin E 및 tocotrienol 추출에 미치는 독립변수의 영향은 일차항 가운데 온도에 의한 영향은 유의성이 없었으며, 추출압력과 추출시간은 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 또한 2차항에 대한 영향도 매우 유의적으로 나타났다($p < 0.001$). 각각의 반응표면분석 결과 반응 회귀식에 대한 결정계수 값은 vitamin E에서는 0.9075 그리고 tocotrienol에서 0.9045로 나타났다.

요 약

포도가공 시 발생하는 부산물인 포도씨로부터 유용성분인 vitamin E 및 tocotrienol을 초임계 유체추출방법으로 최적화 하였다. 추출 온도(30-50°C, X_1), 추출압력(17-25 MPa, X_2) 및 추출시간(1-5 hr, X_3)을 변수로 반응표면 분석법으로 vitamin E 및 tocotrienol 함량을 측정하였다. 초임계 이산화탄소상에서 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 추출온도, 압력 및 시간이 증가함에 따라 증가하였다($p < 0.001$). 각각의 추출조건 가운데 40°C, 20 MPa 및 5 hr에서 vitamin E는 8.65 mg/100 g 그리고 tocotrienol은 7.88 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 반응표면분석에 의한 최적추출조건은 40°C, 20.7 MPa 및 3.8 hr으로 나타났으며, 이 때의 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 각각 8.20 mg/100 g 및 7.42 mg/100 g으로 나타났다. Vitamin E 및 tocotrienol 함량에 대한 실측값은 통계적 예측값의 각각 99.27-106.10% 및 96.09-106.60%로 나타나 추출조건이 유효성이 인정되었다. 또한 유기용매 추출시 vitamin E 및 tocotrienol 함량은 각각 8.18 mg/100 g 및 7.24 mg/100 g이었다. 따라서 용매추출법과 초임계 이산화탄소 추출법을 비교했을 때 초

임계 이산화탄소 추출법을 이용하는 것이 더 효과적으로 vitamin E 및 tocotrienol을 추출할 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 농림부의 핵심전략기술개발사업(과제번호: 605001-45-2-HD130) 예산으로 추진된 연구의 일부로서 연구비를 지원하여 주신 농림부에 감사드립니다.

문 헌

- Lee EJ, Kwon JH. Characteristics of microwave-assisted extraction for grape seed components with different solvent. Korean J. Food Preserv. 13: 216-222 (2006)
- Kim YK, Lee HY, Oh DH. Changes in antioxidative activity and total polyphenols of crude and defatted grape seed extract by extraction condition and storage. Korean J. Food Preserv. 11: 455-460 (2004)
- Choi SW, Chung US, Lee KT. Preparation of high quality grape seed oil by solvent extraction and chemical refining process. Korean J. Food Preserv. 12: 600-607 (2005)
- Park SJ, Lee HY, Oh DH. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from campbell early grape (*Vitis labruscana* B.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 115-118 (2003)
- Jang JK, Han JY. The antioxidant ability of grape seed extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 524-528 (2002)
- Lee DJ, Lee JY. Tocopherols and tocotrienol in cereal grains. Korean J. Crop Sci. 48: 1-12 (2003)
- Park KY, Kang CS, Lee YS, Lee YH, Lee YS. Tocotrienol and tocopherol content in various plant seeds. Korean J. Crop Sci. 49: 207-210 (2004)
- Pekic B, Kovac V, Alonso E, Revilla E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. Food Chem. 61: 201-206 (1998)
- Jang JK, Han JY. The antioxidant ability of grape seed extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 524-528 (2002)
- Shin MK, Hong JH, Hur SS, Choi YH. Extraction of β -carotene in co-solvent induced SFE process. Food Eng. Prog. 6: 301-307 (2002)
- Ju YW, Son MH, Lee JS, Byun SY. Supercritical CO₂ extraction of sesame oil with high content of tocopherol. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 20: 210-214 (2005)
- Lee WY, Chang KS, Choi YH. Extraction of phenolic compounds from grape seed using supercritical CO₂ and ethanol as a Co-solvent. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 7: 177-183 (2000)
- Woo MJ, Seo JW, Byun SY. Extraction of resveratrol containing grape seed oil with supercritical carbon dioxide. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 20: 383-386 (2005)
- Cochran WG, Cox GM. Experimental designs. 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc. New York. London. (1950)
- Kim KM, Choi SG, Lee JS, Jeong HS. Effects of extraction conditions on the tocotrienol content of grape seed extract. J. Agr. Life Sci. 41: 25-31 (2007)
- Juncheng L, Wei W, Ganzuo L. A new strategy for supercritical fluid extraction of copper ions. Talanta. 53: 1149-1154 (2001)
- Kim SJ, Kim YJ, Chang KS. Optimization of sesame oil extraction from sesame cake using supercritical fluid CO₂. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 431-437 (2005)
- Lee H, Chung BH, Park YH. A fundamental study of supercritical fluid extraction process for concentrating tocopherols from soybean sludge. Korean chem. Eng. Res. 29: 206-210 (1991)