

리놀레인산 자동산화에 미치는 페놀계 산화방지제의 활성 및 잔존량 평가

- 연구노트 -

최승현 · 김재민 · 최선일 · 정태동 · 오지원 · 조봉연 · 이진하 · 이옥환

강원대학교 식품생명공학과

Assessment of Antioxidant Activity and Residue Level of Phenolic Antioxidants in Autoxidation of Linoleic Acid

Seung-Hyun Choi, Jae-Min Kim, Sun-Il Choi, Tae-Dong Jung, Ji-Won Oh, Bong-Yeon Cho, Jin-Ha Lee, and Ok-Hwan Lee

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

ABSTRACT This study assessed the antioxidant activity and residue level of phenolic antioxidants in autoxidation of linoleic acid. The antioxidant activity of phenolic antioxidants was measured based on peroxide value of linoleic acid at 50°C for 8 days. We further evaluated the residue level of phenolic antioxidants in the autoxidation period by HPLC-UV. The residue level of antioxidants changed with time starting on day 0 (100%) and was determined by 100-remaining of antioxidants (%). Our results showed that peroxide values ranged from 0.33 to 10.18 meq/kg in propyl gallate, from 0.67 to 11.01 meq/kg in dodecyl gallate, from 0.01 to 10.34 meq/kg in octyl gallate, from 0.01 to 4.17 meq/kg in butylated hydroxytoluene (BHT), from 1.00 to 5.85 meq/kg in butylated hydroxyanisole (BHA), from 0.33 to 4.18 meq/kg in 2,4,5-trihydroxybutyrophenone, and from 1.00 to 11.01 meq/kg in *tert*-butylhydroquinone (TBHQ). Among the residue levels of antioxidants, on day 8, BHT showed the highest level while TBHQ showed the lowest. BHT showed the highest correlation coefficient, whereas BHA showed the lowest. This study proves that the residual level of phenolic antioxidants has a good correlation with the degree of autoxidation in linoleic acid.

Key words: phenolic antioxidants, residue level, peroxide value, autoxidation, linoleic acid

서 론

대기 중의 산소는 유지에서 생성된 자유 라디칼과 반응하여 공액이중결합을 가진 화합물과 과산화물들을 생성하여 유지의 산화를 진행하는 것으로 알려져 있다(1). 유지의 산화는 식품의 영양성분 및 품질을 저하하며 산화된 식품의 섭취는 생체 내의 단백질, 지질, DNA 및 RNA 등과 반응하여 세포 내 조직에 피해를 주어 생체 방어 능력을 감소시켜 인체에 악영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(2).

유지의 산화는 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 낮은 온도에서 일어나는 자동산화와 극히 고온에서 일어나는 가열산화로 구분할 수 있다. 실온에서의 유지의 변패는 주로 낮은 온도에서 일어나는 자동산화에 의한 것이며, 유지의 자동산화는 수소 분자가 이탈되어 생성된 자유 라디칼에 산소 분자가 작용하여 과산화물을 형성하는 산화로 이 과정은 열, 빛, 과산화물, 효소, 금속이온 등에 의해 촉진되며 EDTA 같은 금속제거제나 각종 산화방지제는 이들 반응을 억제하

는 기능을 가진다(3,4). 가열산화는 고온에서 일어나는 산화로 일반적으로 자동산화보다 유지분자의 탄소-수소 결합을 끊을 충분한 에너지가 제공되기 때문에 낮은 온도에서보다 쉽게 수소가 이탈하여 산화속도가 빠르다(5). 유지를 고온에서 가열하면 지방질의 산화, 중합 및 분해 반응이 촉진되고 이로 인해 생성된 과산화물들이 기름 내 축적된다. 그리고 이들이 분해되어 알데하이드 및 케톤 등의 2차 산화 물질이 생성된다. 가열산화로 인해 식품의 색의 변화가 생기고 점도, 유리지방산 및 과산화물이 증가하며, 이로 인해 식품의 맛과 향기를 변화시키고 품질을 저하할 뿐 아니라 산화된 식품을 섭취 시 체내의 암, 동맥경화 및 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(6-9). 이렇게 지방질 성분은 다른 식품 성분들에 비하여 정제, 가공, 저장과정 중 변질이 매우 쉬우므로 유지의 산패를 억제하여 제품품질을 유지하고 식품의 변질을 막아서 저장기간을 늘리기 위해 산화방지제를 사용하고 있다(10,11).

우리나라에서는 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), *tert*-butylhydroquinone(TBHQ) 및 propyl gallate(PG) 등과 같은 페놀계 합성 산화방지제가 식품첨가물로 등재되어 있으며(12), 이들 산화방지제는 가열 시 열안정성이 감소하여 그 효력이 저하되고

Received 4 April 2016; Accepted 18 April 2016

Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6454

천연 산화방지제보다 안전성에 대한 단점을 가지고 있다 (13). 산화안정성에 관한 연구로 가열시간과 저장온도에 따른 산화안정성(14), 자동산화 및 가열산화 등에 대한 산화안정성(15), 산화방지제가 산화안정성에 미치는 영향 등이 보고되었다(16). 이처럼 폐놀계 산화방지제 중에서 국내에서 식품첨가물로 지정된 BHT, BHA, TBHQ 및 PG 등에 대하여 다양한 연구가 진행되었지만 아직 국내 식품첨가물로 지정되지 않은 dodecyl gallate(DG), octyl gallate(OG) 및 2,4,5-trihydroxybutyrophenone(THBP) 등에 대한 산화안정성 및 잔류량 분석 연구는 초기단계에 머물러 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 식품첨가물로 미지정된 산화방지제(DG, OG, THBP)에 대한 기초자료를 확보하고자 폐놀계 산화방지제 7종(PG, DG, OG, BHA, BHT, TBHQ, THBP)을 리놀레인산(linoleic acid) 기질에서 자동산화(50 °C) 하는 동안 이들 산화방지제에 의한 산화안정 효능 및 잔존량을 분석하여 산화방지제 손실률에 따른 산화안정성과의 상관관계를 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 리놀레인산 기질은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, propyl gallate(PG), dodecyl gallate(DG), octyl gallate(OG), butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), *tert*-butylhydroquinone(TBHQ)은 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하고, 2,4,5-trihydroxybutyrophenone(THBP)은 Synquest Lab, Inc.(Alachua, FL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 산화방지제의 구조는 Fig. 1과 같으며 그 이외의 HPLC 분석용 시약들은 모두 HPLC grade의 시약을 사용하였다.

시료 전처리 및 제조

리놀레인산 60 g에 산화방지제 7종(PG, DG, OG, BHA, BHT, TBHQ, THBP)을 각각 0.02% 농도로 첨가한 후 50

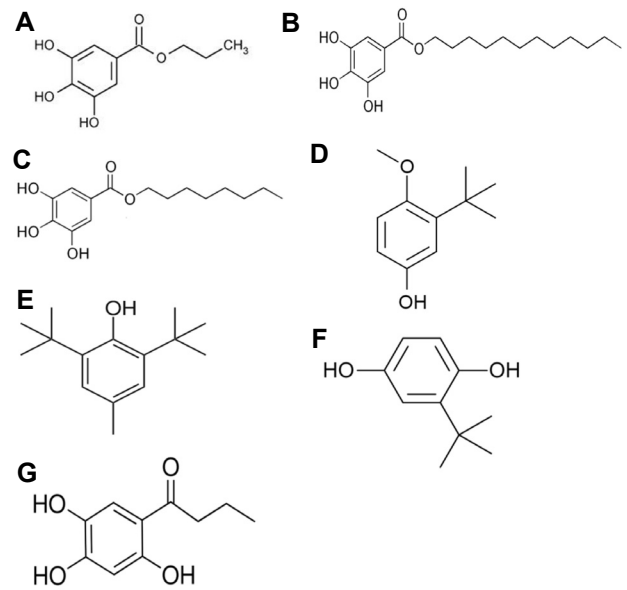


Fig. 1. Molecular structure of antioxidants. (A) propyl gallate (PG), (B) dodecyl gallate (DG), (C) octyl gallate (OG), (D) butylated hydroxyanisole (BHA), (E) butylated hydroxytoluene (BHT), (F) *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and (G) 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP).

°C의 dry oven에 8일간 저장하면서 자동산화 과정 중 2일마다 과산화물가를 측정하였고, 4일째에는 이들 산화방지제 잔존량을 분석하였다.

산화방지제 잔존량 분석

산화방지제의 잔존량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 식품공전(17)에 제시된 유지의 전처리법을 이용하여 비커에 시료 5 g을 취한 후 5 mL 헥산이 들어 있는 분액깔때기에 옮기고, 헥산 15 mL로 여러 번 나누어서 씻어 분액깔때기에 합친 다음 여기에 헥산포화아세트니트릴 50 mL로 3회 반복하여 추출하였다. 추출액을 분액깔때기에 합한 후 이 액을 농축플라스크에 옮겨 감압농축기를 사용하여 3~4 mL로 농축하여 10 mL 메스플라스크에 옮기고 씻어 전량을 5 mL로 한 다음, 이소프로판올 5 mL로 플라스크를 씻어 전량을 10

Table 1. HPLC condition for analysis of PG, DG, OG, BHA, BHT, TBHQ, and THBP

Instrument	Conditions
Apparatus	Sykam iLC 3300 HPLC system
Column	Capcell pak C18 UG120 (4.6×250 mm, 5.0 μm)
Column temp.	40°C
Mobile phase (gradient)	(A) 5% acetic acid in acetonitrile (B) 5% acetic acid in water (Initially (<2 min) 40% A followed by 50% A (2~7 min); 50% A followed by 70% A (10~15 min); 70% A followed by 82% A (20~23 min); 82% A followed by 40% A (28~31 min); and hold for 4 min)
Detector	Skyam S3250 UV/Vis Detector (280 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL
Run time	35 min

Table 2. Calibration curve of PG, DG, OG, BHA, BHT, TBHQ, and THBP

Antioxidants ¹⁾	Calibration curve	Correlation coefficient (R ²)
PG	Y=46.340x+136.68	0.999
DG	Y=28.575x+67.300	0.999
OG	Y=34.917x+94.882	0.999
BHA	Y=15.545x+43.532	0.999
BHT	Y=8.0463x+17.835	0.999
TBHQ	Y=16.738x+30.356	0.999
THBP	Y=52.767x+150.78	0.999

¹⁾Propyl gallate (PG), dodecyl gallate (DG), octyl gallate (OG), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP).

mL로 하였다. 이를 0.45 µm membrane filter(Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 여과한 후 시험용액으로 하였으며, HPLC 분석조건은 Table 1과 같다. 표준물질은 모두 6.25~200 µg/mL의 범위에서 검량선을 작성하였으며 검량식을 사용하여 정량하였다. 검량식은 Table 2와 같다.

과산화물가 측정

과산화물가(peroxide value, POV)는 AOCS의 Cd 8-53 법(18)을 변형하여 사용하였다. 100 mL 삼각플라스크에 시료 2 g을 취하여 acetic acid와 chloroform 혼합액(3:2, v/v) 10 mL를 이용하여 용해한 후 KI 포화용액 0.4 mL를 가하여 10분간 암소에 보관한 다음, 증류수 12 mL 및 1% 전분용액 0.4 mL를 차례로 첨가하여 진탕혼합시킨 후 0.01 N Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하여 생성된 과산화물의 mg 당량수로 구하였다.

$$POV \text{ (meq/kg)} = \frac{(S - B) \times N \times F}{\text{시료량}} \times 100$$

S=시료의 0.01 N Na₂S₂O₃ 적정량(mL)
 B=blank의 0.01 N Na₂S₂O₃ 적정량(mL)
 N=Na₂S₂O₃의 노르말농도

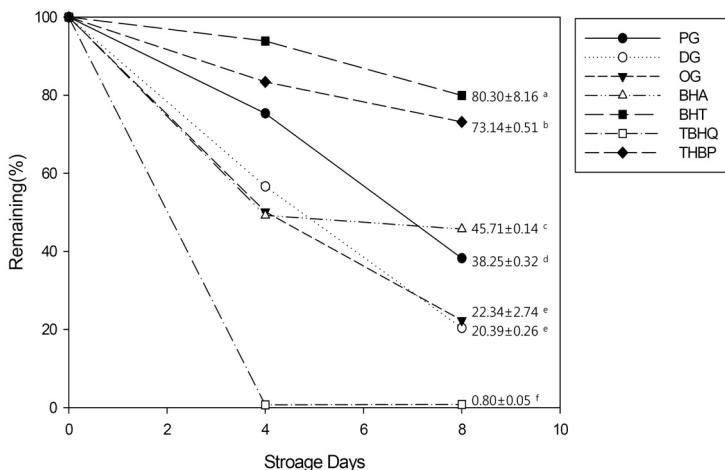


Fig. 2. Change of remaining antioxidants during storage at 50°C. Values are means±SD (n=3). Different letters (a-f) indicate significant differences at P<0.05. Propyl gallate (PG), dodecyl gallate (DG), octyl gallate (OG), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP).

F=Na₂S₂O₃의 역가

산화방지제 손실률과 산화안정성의 상관관계

산화방지제 손실률은 100-잔존량(%)으로 하여 계산하였으며, 산화안정성은 과산화물가를 통해 측정하였다. x축은 과산화물가, y축을 산화방지제 손실률로 하여 과산화물가에 따른 산화방지제 손실률을 나타내었고, 이들의 상관관계 (correlation coefficient, R²)를 구하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 수행하여 측정된 결과를 평균과 표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 통계적 유의성은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA 분석을 수행하였고, 평균값의 통계적 유의성은 P<0.05 유의수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

저장 중 산화방지제 잔존량 변화

각 실험군의 시간에 따른 산화방지제 잔존량은 0일째 (100%)를 기준으로 하여 저장기간에 따른 잔존량 변화를 계산하여 Fig. 2에 나타내었다. 4일째의 잔존량은 0.70~93.87%의 범위로 나타났으며, TBHQ 0.70%, BHA 49.21%, OG 50.16%, DG 56.64%, PG 75.35%, THBP 83.39%, BHT 93.87%로 나타나 TBHQ> BHA> OG> DG> PG> THBP> BHT 순으로 잔존량의 변화가 크게 나타났다. 8일째의 잔존량은 0.80~80.30%의 범위로 나타났으며, TBHQ 0.80%, DG 20.39%, OG 22.34%, PG 38.25%, BHA 45.71%, THBP 73.14%, BHT 80.30%로 나타나 TBHQ> DG> OG> PG> BHA> THBP> BHT 순으로 잔존량 변화가 크게 나타났으며, BHA를 제외한 다른 산화방지제들은 4일째의 결과와 같은 잔존량 변화 양상을 나타내었다. BHA의 경우 4일째의 잔존량이 49.21%에서 8일째의 잔존량이 45.71%로 다른 실험군들과 비교했을 때 잔존량의 변화율이 작게

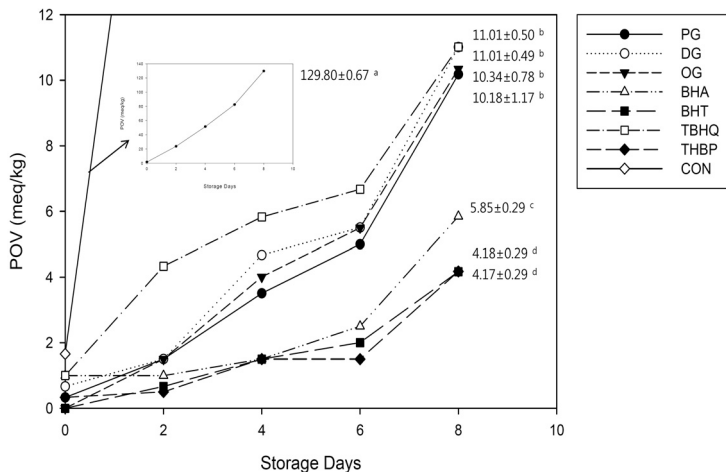


Fig. 3. Change of peroxide value of linoleic acid containing 0.02% antioxidants during storage at 50°C. Values are means±SD (n=3). Different letters (a-d) indicate significant differences at $P < 0.05$. Propyl gallate (PG), dodecyl gallate (DG), octyl gallate (OG), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP).

나타났다. Lee와 Kim(19)이 보고한 가열시간에 따른 BHA의 잔존량 변화를 관찰한 결과에서 BHA의 잔존량이 처음에는 급격히 감소하다가 잔존량이 50%에 가까워질수록 점점 완만한 감소율을 나타내었는데, 본 실험도 이와 유사한 결과를 나타낸 것으로 생각한다.

본 연구의 산화방지제 잔존량 변화 결과는 Irache 등(20)의 보고와 유사한 경향으로 마가린 기질에서의 시간에 따른 산화방지제 잔존량 변화율은 TBHQ > THBP > PG > BHA 순으로 나타났다. 다만 THBP의 경우에는 본 연구 결과와 다소 차이를 보였는데 이는 Son 등(12)의 연구에서 산화방지제들의 산화억제작용은 실험에 사용된 기질의 불포화도에 따라 다르게 나타나며, 이러한 기질 차이에 의한 산화억제작용 및 산화방지제 소모량은 저장 중 산화방지제의 잔존량 변화율에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

과산화물가

각 실험군의 과산화물가를 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 0일째부터 8일째까지의 과산화물가의 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 1.66~129.80 meq/kg으로 저장기간이 증가함에 따라 과산화물가도 증가하는 것으로 나타났다. 산화방지제를 처리한 리놀레인산의 과산화물가는 각각 PG군 0.33~10.18 meq/kg, DG군 0.67~11.01 meq/kg, OG군 0.01~10.34 meq/kg, BHT군 0.01~4.17 meq/kg, BHA군 1.00~5.85 meq/kg, THBP군 0.33~4.18 meq/kg, TBHQ군 1.00~11.01 meq/kg으로 나타났다. 8일째를 기준으로 과산화물가의 증가를 비교해볼 때 대조군 > TBHQ > DG > OG > PG > BHA > THBP > BHT 순으로 높게 나타났다. Son 등(12)은 참치유를 기질로 사용하여 과산화물가를 측정할 결과 대조군 > BHA > BHT > TBHQ 순으로 높은 과산화물가를 나타내었는데, 이와 비교하였을 때 대조군 > BHA > BHT 순으로 높은 과산화물가를 나타내어 유사한 양상을 보였으나 선행 연구에서 TBHQ가 가장 낮은 과산화물가를 나타낸 반면 본 실험에서는 가장 높은 과산화물가를 나타내었다. 이는 4일째의 TBHQ의 잔존량이 이미 0.70%로 0에 가까운

값을 나타내어 산화안정성이 낮아져 가장 높은 과산화물가를 나타낸 것으로 생각한다.

상관관계 분석

산화방지제 손실률과 과산화물가와의 연관성 분석은 Fig. 4에 나타내었다. 산화방지제 손실률과 과산화물가와의 연관성은 전체적으로 과산화물가가 증가함에 따라 산화방지제 손실률도 증가하며, 이들의 상관관계(correlation coefficient, R^2)는 0.3913~0.9963의 범위로 다양한 상관관계를 보였다. 특히 BHT의 산화방지제 손실률과 과산화물가와의 상관관계는 $R^2=0.9963$ 을 보이면서 가장 높은 연관성을 보였다. 그러나 BHA는 산화방지제 손실률과 과산화물가의 상관관계는 $R^2=0.3913$ 으로 다른 실험군에 비해 현저히 낮은 연관성을 보였는데, 이는 시간에 따라서 과산화물가는 계속 증가하였으나 4일째의 BHA 잔존량과 8일째에서의 잔존량은 각각 49.21 및 45.71%로 큰 차이가 없는 것에서 기인한 것으로 판단된다. 또한, TBHQ의 경우 4일째에서 손실률이 99.3%로 이미 100에 가까운 값을 나타내어 8일째에서의 손실률인 99.2%와 비교하였을 때 큰 차이가 없어 $R^2=0.7313$ 으로 다소 낮은 상관관계를 보였다. BHA와 TBHQ를 제외한 나머지 실험군들은 모두 $R^2=0.8769$ 이상의 높은 상관관계를 보였다. 이는 산화방지제가 리놀레인산의 과산화물가에 유의한 영향을 미치는 것으로 생각하며, 산화억제에 중요하게 작용하고 있어 산화방지제 잔존량이 감소함에 따라 산화안정성이 감소하는 것으로 생각한다.

요약

본 연구는 리놀레인산에 7종의 산화방지제를 각각 0.02% 농도로 첨가하여 50°C의 dry oven에서 8일간 자동산화 시키면서 이들 산화방지제의 잔존량 및 산화안정성을 측정하였다. 잔존량은 HPLC를 사용하여 측정하였으며, 산화안정성은 과산화물가를 이용하여 분석하였다. 잔존량은 0일째(100%)에서 시간에 따른 변화율을 측정하였고, 또한 잔존

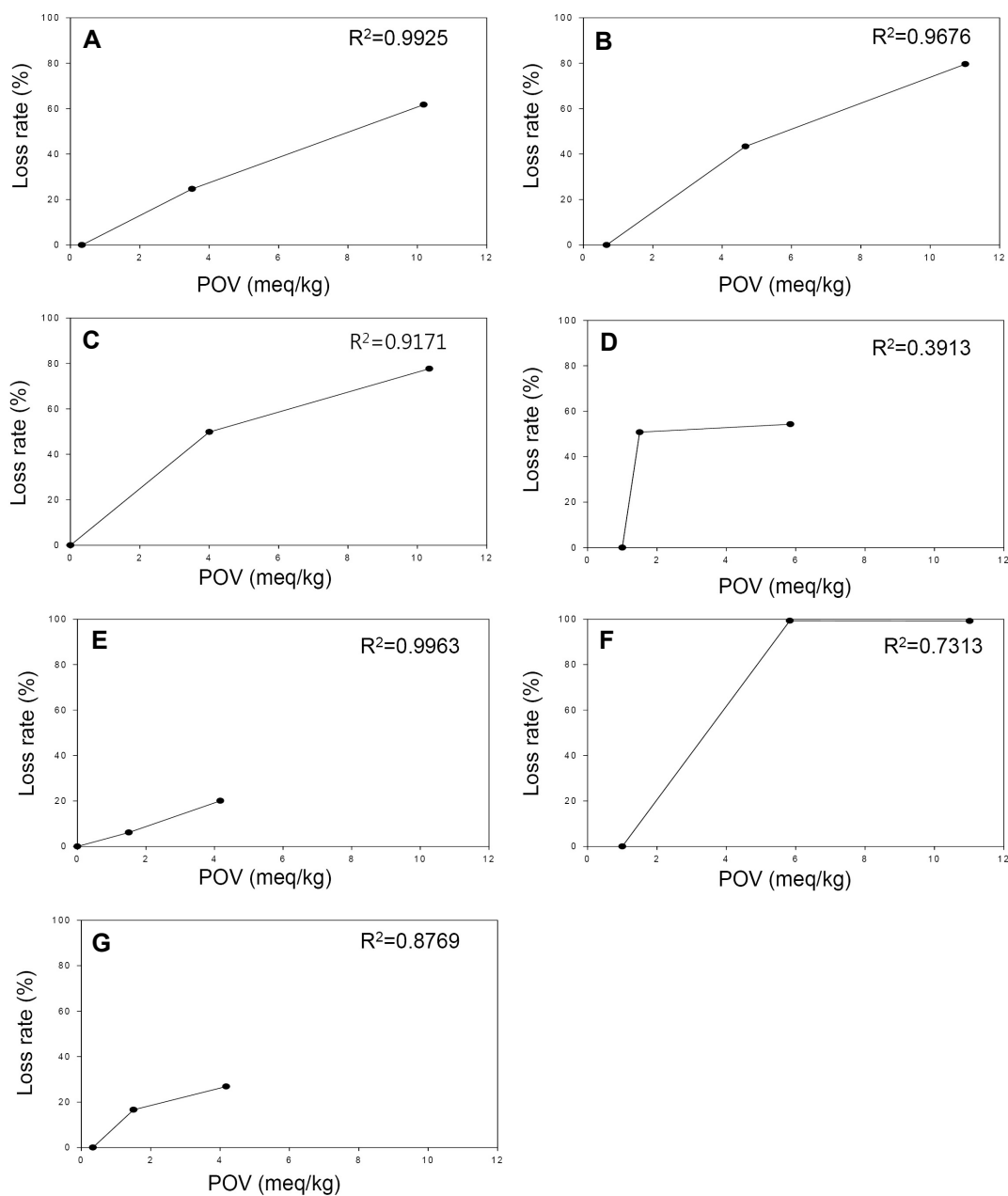


Fig. 4. Change of loss rate of antioxidants against the POV during storage at 50°C. (A) propyl gallate (PG), (B) dodecyl gallate (DG), (C) octyl gallate (OG), (D) butylated hydroxyanisole (BHA), (E) butylated hydroxytoluene (BHT), (F) *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), and (G) 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP).

량을 이용하여 100-잔존량(%)으로 손실률(%)을 계산하였다. 산화방지제 손실률과 과산화물가의 상관관계를 분석하여 연관성을 확인하였다. 잔존량 분석 결과 *tert*-butylhydroquinone(TBHQ) > dodecyl gallate(DG) > octyl gallate(OG) > propyl gallate(PG) > butylated hydroxyanisole(BHA) > 2,4,5-trihydroxybutyrophenone(THBP) > butylated hydroxytoluene(BHT) 순으로 낮은 잔존량을 나타내었으나, BHA 같은 경우 다른 실험군에 비해 8일째의 잔존량이 4일째의 잔존량에 비하여 감소량이 크지 않았으며 TBHQ는 4일째의 잔존량이 이미 0에 가까운 값을 나타내어 8일째

의 잔존량과 큰 차이가 없었다. 과산화물가 측정 결과 대조군 > TBHQ > DG > OG > PG > BHA > THBP > BHT 순으로 높은 과산화물가를 보였으며 산화방지제 손실률과 과산화물가의 상관관계 분석 결과 상관관계(correlation coefficient, R²)는 0.3913~0.9963의 범위로, 특히 BHT가 가장 높은 상관관계(R²=0.9963)를 보였다. BHA와 TBHQ를 제외한 대부분의 실험군에서 R² 값은 0.8769 이상의 높은 상관관계를 보였다. 본 연구에서 페놀계 산화방지제는 자동산화 과정에서 리놀레인산 기질 내 산화방지제의 잔존량과 기질의 산화안정성 간의 높은 상관관계를 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처의 연구개발비(14162MFDS971) 및 2015년도 강원대학교 학술연구조성비(520150117)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Choi H, Choe E. 2009. Comparison of autoxidative stability and minor compounds in oils extracted from bran and germ of *Keumkang* wheat and Dark Northern Spring wheat. *Korean J Food Sci Technol* 41: 628-635.
2. Summerfield FW, Tappel AL. 1984. Detection and measurement by high-performance liquid chromatography of malondialdehyde crosslinks in DNA. *Anal Biochem* 143: 265-271.
3. Chung HK, Choe CS, Lee JH, Chang MJ, Kang MH. 2003. Oxidative stability of the pine needle extracted oils and sensory evaluation of savored laver made by extracted oils. *Korean J Food Cult* 18: 89-95.
4. Kim M, Rhee SH, Cheigh HS. 1995. Effect of tocopherols and β -carotene on the oxidation of linoleic acid mixture in the solid model system. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 67-73.
5. Choe E, Min DB. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 8: 345-358.
6. Kim DS, Koo BS, Ahn MS. 1990. A study on the formation of trans fatty acids with heating and storage of fats and oils (I) - The change of physicochemical characteristics and total trans fatty acids content - . *Korean J Soc Food Sci* 6: 37-49.
7. Artman NR. 1969. The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv Lipid Res* 7: 245-330.
8. Husain S, Sastry GSR, Raju NP. 1991. Molecular weight averages as criteria for quality assessment of heated oils and fats. *J Am Oil Chem Soc* 68: 822-826.
9. Taylor SL, Berg CM, Shoptaugh NH, Traisman E. 1983. Mutagen formation in deep-fat fried foods as a function of frying conditions. *J Am Oil Chem Soc* 60: 576-580.
10. Gray JI. 1978. Measurement of lipid oxidation: A review. *J Am Oil Chem Soc* 55: 539-546.
11. Oh SH, Kim YW, Kim MA. 2005. The antioxidant activities of three solvent (ether, butanol, water) extracts from chestnut inner shell in soybean oil. *Korean J Food Cult* 20: 703-708.
12. Son JY, Rhim JH, Son HS. 1995. Effect of some synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of skip jack oil. *Korean J Food Nutr* 8: 88-92.
13. Ji CI, Byun HS, Kang JH, Lee TG, Kim SB, Park YH. 1992. The antioxidative activities of spices extracts on edible soybean oil. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 551-556.
14. Choe E. 1997. Effects of heating time and storage temperature on the oxidative stability of heated palm oil. *Korean J Food Sci Technol* 29: 407-411.
15. Moon JS, Lee OH, Son JY. 2005. The oxidation stability of virgin and pure olive oil on autoxidation and thermal oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 93-98.
16. Wang S, Choe E. 2011. Lipid oxidation and antioxidant changes in perilla seeds during heating. *Korean J Food Sci Technol* 43: 711-718.
17. MFDS. 2015. *Korean Food Standards Codex*. 9. General test methods. Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Korea.
18. AOCS. 1993. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. Cd 8-53, p 429-430.
19. Lee HS, Kim DH. 1979. Variation of antioxidant retention and some properties of soybean oil during simulated frying operations. *Korean J Food Sci Technol* 11: 86-92.
20. Irache JM, Diaz-Garcia JM, Vega FA. 1993. Stability of some phenolic antioxidants in fatty preparations. *Pharm Acta Helv* 68: 135-140.