

재배 조건에 따른 바위솔의 총페놀함량 및 항산화효과

유은애* · 이성중* · 이상경* · 강진호** · 신성철*

*경상대학교 자연과학대학, **경상대학교 생명과학연구원

Total Phenol Contents and Antioxidant Activity in *Orostachys japonicus* A. Berger Grown under various Cultivation Conditions

Eun Ae Yu*, Sung Joong Lee*, Sang Gyeong Lee*, Jin Ho Kang**, and Sung Chul Shin*†

*Depart. of Chemistry & Research Institute of Life Sci., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, 660-701, Korea.

**College of Agriculture & Research Institute of Life Sci., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, 660-701, Korea.

ABSTRACT : Changes in the contents of total phenolic compounds in as *Orostachys japonicus* well as their antioxidant capacity according to the control of night-break, day-length control, variation in luminosity and amount of fertilizer used were examined. The results were compared with those obtained from wild *Orostachys japonicus*. The contents of the total phenolic compounds in *Orostachys japonicus* were roughly proportional to the increasing level of irradiation and nitrogen fertilization. The total content of phenolic compounds in the wild *Orostachys japonicus* was higher than cultivated under various conditions. The antioxidant capacities of the *Orostachys japonicus* were increased roughly with increasing level of irradiation and nitrogen fertilization. Overall, the total content of phenolic compounds of *Orostachys japonicus* and their antioxidant capacity were not significantly affected by the amount of phosphorus and potassium fertilizer used.

Key Words : *Orostachys japonicus*, polyphenol, flavonol, folk medicine, antioxidant, anti-cancer activity

서 언

폴리페놀은 적어도 한 개 이상의 하이드록시기이 치환되어 있는 이차 대사 생성물이다. 폴리페놀에는 페놀산과 같은 간단한 분자로부터 탄닌과 같이 고분자화된 화합물들이 그 범주에 포함된다. 이들은 주로 한 개 이상의 당잔기가 하이드록시기에 결합되어 있는 배당체 형태로 존재한다. 당의 결합 없이 유리된 형태의 폴리페놀도 매우 많은 식물들에서 관찰된다 (Harborne *et al.*, 2000). 이들은 항산화효과 (Frankel *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1996), 항암작용 (Huang *et al.*, 1983), 혈관확장제로서의 작용 (Cheng *et al.*, 1993), 항응혈작용 (Liu *et al.*, 2005; Gryglewski *et al.*, 1987), 항염증성 (Bisset *et al.*, 1994), 관절염 치료 (Newal *et al.*, 1996)와 같은 건강 증진효과 때문에 관심을 끌고 있다. 역학 연구에 의하면 폴리페놀 항산화제의 소비 증가와 심혈관계 질환 (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1997; Hertog *et al.*, 1995) 및 암 발병의 감소 (Hertog *et al.*, 1995; Hertog *et al.*, 1994) 사이에 서로 상관관계가 있다.

바위솔 (*Orostachys japonicus* a. Berger)은 한국에서 오랫동안 암의 치료제로써 민간에서 사용하고 있다. 바위솔은 다량 액의 형태로 소비된다. 최근 바위솔의 재배는 소득의 증가를 바라는 농민들에게 매력적인 작물이 되어가고 있다. 그러나 재배된 바위솔과 자연산 바위솔은 9월초에 동시에 시장에 출하되므로 출하시기에 가격이 폭락된다. 이를 막기 위해서는 출하시기를 조절할 필요가 있다 (Kang *et al.*, 1995, 1996; Shin *et al.*, 1994).

최근, 강 진호 등은 night-break, 일장조절 및 동절기 온도 조절 등을 통하여 바위솔의 개화를 지연시키는 연구를 수행하였다 (Kang *et al.*, 1995, 1996). 이들은 바위솔의 개화를 지연시키면 농민이 원하는 시기에 재배 바위솔을 출하시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나 약초로서 품질을 보장받기 위해서는 재배된 바위솔이 건강에 도움이 되는 약효성분들의 함량이 자연산 보다 낮으면 안된다.

최근 우리는 여러 가지 조건 하에서 재배된 바위솔의 약효 성분들의 분포를 조사하였으며 이들 중 일장조절과 night-break 실험조건하에서 재배된 바위솔에 포함되어 있는 폴리페

†Corresponding author: (Phone) +82-55-751-6022 (E-mail) scshin@nongae.gsnu.ac.kr
Received May 23, 2006 / Accepted July 28, 2006

놀-페놀산, 플라보놀 아글리콘 및 플라보놀 배당체의 함량변화를 추적하고 이를 보고하였다 (Jang *et al.*, 2005).

본 논문에서 우리는 여러 가지 조건 하에서 재배된 바위솔에 포함되어 있는 총 페놀 함량의 분포와 이들의 항산화 효과에 대해서 수행된 연구의 결과에 대해 보고한다.

재료 및 방법

1. 시약

Folin & Ciocalteu's phenol 시약, butylated hydroxytoluene (BHT), ascorbic acid 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma Chemical Co (USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 그 밖에 시중의 특급 용매와 시약을 사용하였다.

2. 바위솔 시료의 수확

자연산 개화 후를 제외한 모든 시료는 2005년 개화 직전에 채취하였다.

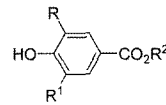
3. 총 페놀함량의 결정

채취된 바위솔 생체 시료 각 50 g 씩을 정량적인 추출과 분석을 위해 동결 건조한 다음 믹서기를 이용하여 분말로 만들었다. 바위솔 분말 10 g을 메탄올 용매에 넣고 50°C에서 10시간 동안 추출하였다 (200 ml × 3회). 회전식 증발농축기를 이용하여 메탄올 용액을 농축한 다음 감압 하에서 건조시켜 1.3 g의 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물은 -20°C에서 저장하였다. 총페놀 함량은 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 조사하는 Folin-Ciocalteu의 방법으로 분석되었다 (Singleton *et al.*, 1965). 즉 추출물의 200 ppm 메탄올 용액 1 ml을 실온에서 1 ml의 Folin & Ciocalteu 시약과 혼합하고 3분간 방치한 다음 2% Na₂CO₃ 1 ml로 처리하였다. 여기에 적당량의 메탄올을 가하여 용액의 부피를 정확하게 5 ml로 조절하여 농도가 500 ppm이 되게 하였다. 총 페놀 함량은 caffeic acid로부터 얻어진 검량곡선과 비교함으로써 평가되었다.

4. DPPH 시험

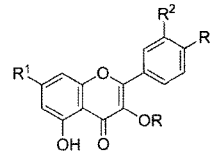
DPPH 시험은 Blois의 방법 (Blois, M.S., 1958)을 수정하여 실시하였다. 즉 여러 가지 농도 (250, 500, 1000 ppm)의 추출물, BHT 또는 ascorbic acid의 에탄올 용액 2 ml에 DPPH (0.76 mM) 에탄올 용액 2 ml을 가하였다. 이 혼합액을 빛을 차단하고 30°C에서 15분간 방치한 다음 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 525 nm의 흡광도 감소를 측정하였다. DPPH 용액은 사용시 조제하여 빛이 차단된 4°C의 플라스크에 저장하면서 사용하였다. 모든 측정은 3회 실시되었다. 전자공여능은 100-[(시료첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도) × 100]로 나타내었다.

페놀산류



R = R¹ = R² = H: 4-hydroxybenzoic acid
 R = R² = H, R¹ = OH: 3,4-dihydroxybenzoic acid
 R = R¹ = OH, R² = H: gallic acid
 R = R¹ = OH, R² = CH₃: methyl gallate

폴리페놀류



R = β-D-glucosyl, R¹ = R³ = OH, R² = H: kaempferol-3-O-β-D-glucoside
 R = β-D-galactosyl, R¹ = R³ = OH, R² = H: kaempferol-3-O-β-D-galactoside
 R = α-L-rhamnosyl R¹ = R³ = OH, R² = H: kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside
 R = α-L-rhamnosyl, R¹ = O-α-D-glucosyl, R² = H, R³ = OH: 3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-β-D-glucosylkaempferol
 R = β-D-glucosyl, R¹ = R² = R³ = OH: quercetin-3-O-β-D-glucoside
 R = α-L-rhamnosyl R¹ = R² = R³ = OH: quercetin-3-O-α-L-rhamnoside
 R = H, R¹ = O-β-D-glucosyl, R² = R³ = OH: quercetin-7-O-β-D-glucoside
 R = D-lyxosyl, R¹ = R² = R³ = H: flavonol-3-O-D-lyxoside

Fig. 1. Phenolic acid and polyphenols in *Orostachys japonicus*.

결과 및 고찰

1. 재배조건에 따른 바위솔의 총 페놀 함량변화 조사 및 자연산 바위 솔에 포함된 총 페놀 함량과의 비교

식물의 2차 대사산물 중 퇴행성 질병을 지연시키는 것으로 가장 잘 알려진 부류가 폴리페놀류이다. 지금까지 바위솔에서 분리되어 구조가 밝혀진 폴리페놀류에는 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 및 methyl gallate의 네 종류의 벤조산 유도체와 페놀산류 4종과 kaempferol, quercetin, kaempferol-3-O-β-D-glucoside, kaempferol-3-O-β-D-galactoside, kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside, by night-break, day-length control, variation in luminosity and amount of fertilizer used. 3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-β-D-glucosylkaempferol, quercetin-3-O-β-D-glucoside, quercetin-3-O-α-L-rhamnoside, quercetin-7-O-β-D-glucoside, flavonol-3-O-D-lyxoside 플라보놀류 8종이 있다 (Fig. 1) (Park *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2000).

식물에 포함되어 있는 페놀 화합물은 각각에 특징적인 생물학적 활성을 가질 수 있지만 항산화효과는 총 페놀 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Ra *et al.*, 1997). 본 연구에서는 먼저 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 조사하는 Folin-Ciocalteu의 방법으로 총 페놀 함량을 조사 비교하였다 (Singleton *et al.*, 1965). 결과를 종합하면 Table 1과 같다.

Table 1. Contents of total phenolic compounds in *Orostachys japonicus* cultivated under various conditions

시료	mg/100 g ^a ± SD	시료	mg/100 g ^a ± SD
Night-break ^b		N20 ^f	703.80 ± 0.01
7/2	649.94 ± 0.02	인비료 처리	
8/25	545.59 ± 0.01	P5 ^f	562.42 ± 0.02
일장조절 ^c		P10 ^f	663.40 ± 0.01
13 : 11	272.95 ± 0.01	P20 ^f	538.86 ± 0.02
16 : 8	774.48 ± 0.01	칼륨비료 처리	
광도변화 ^d		K5 ^f	518.67 ± 0.01
무 처리 ^e	589.35 ± 0.02	K10 ^f	771.12 ± 0.01
35%	309.97 ± 0.01	K20 ^f	538.86 ± 0.01
55%	272.95 ± 0.01	자연산	
질소비료 처리		개화 전	701.80 ± 0.00
N5 ^f	525.40 ± 0.01	개화 후	783.00 ± 0.02
N10 ^f	565.4 ± 0.01		

a: weight of freeze-dried *Orostachys japonicus*, b: experimental day one, c: day:night, d: shielding ratio of light, e: not light-shielded in green house, f: fertilization (kg/ha); SD: standard deviation

여러 가지 용매를 사용하여 추출 효율을 비교한 예비실험에서 메탄올 용매를 이용한 경우가 가장 효과적이었기 때문에 모든 추출 실험을 메탄올 용매에서 수행하였다. 자연산 개화 후의 시료를 제외한 모든 시료는 개화 직전에 수확하였다.

본 연구의 여러 가지 조건에서 재배된 바위솔의 총 페놀함량은 272.95 ± 0.01 mg/100 g (일장조절 13 : 11 및 광도변화 55%)에서 783.00 ± 0.02 mg/100 g (개화 후)의 분포를 보여주었다. Night-break 실험에서 실험 시작 시점이 7/2 (7월 2일)에서 8/25 (8월 25일)로 늦어짐에 따라 총 페놀 함량이 15.4% 감소하였다. 일장조절 실험에서 낮 : 밤의 비가 13 : 11에서 16 : 8로 변함에 따라 즉 낮의 길이가 증가함에 따라 총 페놀 함량은 184% 증가 하였다. 광도변화 실험에서 무 처리의 경우에는 589.35 ± 0.02 mg/100 g의 총 페놀 함량을 보여주는 반면 비닐하우스 내에서 빛을 33%에서 55% 차단함에 따라 총 페놀 함량은 12% 감소되었다. 자연산 바위솔에서 총 페놀 함량은 빛의 총 조사량이 더 많은 개화 후가 개화 전보다 11% 증가되었다.

이와 같이 바위솔 총 페놀 함량은 조사된 빛의 양과 밀접한 관계가 있으며 빛의 양이 증가되면 총 페놀 함량도 증가하는 것으로 관찰되었다. 현재의 결과는 최근 폴리페놀 계 및 배당체 지표물질들의 함량과 빛의 대략적 비례관계에서 우리가 관찰하였던 경향과 일치한다 (Jang *et al.*, 2005).

바위솔 총 페놀 함량은 질소 비료의 시비량과도 밀접한 관계를 보여주었다. 즉, 질소 비료의 시비량이 N5 (kg/ha)에서 N10, N20으로 증가하면 총 페놀 함량은 각각 8% 및 34% 증가되었다. 질소비료의 경우와는 달리 인 및 칼륨 비료의 시비량은 총 페놀함량과 밀접한 관계가 없는 것으로 보여 졌다. 인 비료의 경우에는 P5와 비교하여 페놀 함량이 P10은 18% 증가한 반면 P20은 4% 가량 감소하였다. 칼륨 비료에서는

K5와 비교하여 K10일 경우 49% 증가한 반면 K20은 4% 증가함을 보였다.

또 총 페놀 함량은 여러 가지 조건하에서 인공적으로 재배된 바위솔보다 자연산 바위솔에서 높은 것으로 조사되었다. 자연산의 경우 개화 후의 총 페놀 함량이 개화 전의 총 페놀 함량보다 높았다.

2. 재배조건에 따른 바위솔의 항산화능 (DPPH에 대한 전자공여능)의 조사 및 자연산 바위솔의 항산화능의 비교

일반적으로 항산화능은 자유 라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력을 평가하는 방법이 이용되고 있다 (Davy *et al.*, 1990). 이와 같은 방법에는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자 공여능력 (Blois, 1958), β -carotene linoleate를 이용하는 항산화력 평가 (Miller, 1971), Yen 및 Duh 등의 환원력 측정 (Yen *et al.*, 1993) 등이 있다. 이들 중 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법이 항산화능을 평가하는데 가장 일반적으로 이용된다.

본 연구에서도 이 방법을 이용하여 재배조건에 따른 바위솔의 항산화능을 조사하고 자연산 바위솔의 항산화능과 비교하였다. 500 ppm의 추출물 농도를 사용하여 실험한 결과를 종합하면 Table 2와 같다.

Night-break 실험에서는 실험 시작 시점이 7/2 (7월 2일)에서 8/25 (8월 25일)로 달라져도 항산화능에 큰 변화를 보여주지 않았다 (각각 $75.46 \pm 0.02\%$ 와 $71.58 \pm 0.01\%$). 일장조절 실험에서 낮 : 밤의 비가 13 : 11에서 16 : 8로 변함에 따라 즉 낮의 길이가 증가함에 따라 항산화능이 122%로 크게 증가하였다. 광도변화 실험에서 무 처리의 경우에 비닐하우스 내에서 빛을 33% 또는 55%로 차단하면 항산화능이 각각 64% 및 45%로 감소되었다. 자연산 바위솔에서는 개화 전과 개화

Table 2. Antioxidant activity of methanol extractant of *Orostachys japonicus* cultivated under various conditions.

시료	DPPH 전자공여능 (%) \pm SD	시료	DPPH 전자공여능 (%) \pm SD
Night-break ^b		인산비료 처리	
7/2	75.46 \pm 0.02	P5 ^f	61.55 \pm 0.04
8/25	71.58 \pm 0.01	P10 ^f	69.64 \pm 0.04
일장조절 ^c		P20 ^f	53.10 \pm 0.04
13 : 11	41.58 \pm 0.04	칼륨비료 처리	
16 : 8	92.51 \pm 0.01	K5 ^f	41.51 \pm 0.03
광도변화 ^d		K10 ^f	67.37 \pm 0.04
무 처리 ^e	58.93 \pm 0.02	K20 ^f	53.78 \pm 0.02
35%	21.04 \pm 0.06	자연산	
55%	18.84 \pm 0.07	개화 전	96.67 \pm 0.02
질소비료 처리		개화 후	94.86 \pm 0.01
N5 ^f	53.25 \pm 0.02	ASA	51.12 \pm 0.02
N10 ^f	75.48 \pm 0.01	BHT	89.18 \pm 0.01
N20 ^f	76.36 \pm 0.06		

^a: weight of freeze-dried houseleeks, ^b: experimental day one, ^c: day:night, ^d: shielding ratio of light, ^e: not light-shielded in green house, ^f: fertilization (kg/ha), SD: standard deviation, ASA: Ascorbic acid, BHT: Butylated hydroxytoluene

후의 항산화능이 비슷한 것으로 조사되었다.

질소 비료의 시비량이 N5에서 N10 및 N20으로 증가하면 바위솔 항산화능은 각각 53.25 \pm 0.02%에서 42% 및 43% 씩 증가된다. 인산 및 칼륨비료에서는 시비량과 항산화능 사이에 별 상관관계가 없어보였다. 자연산의 경우에도 개화 전 시료와 개화 후의 시료 사이에 항산화능의 큰 차이가 발견되지 않았다.

바위솔의 항산화능도 바위솔에 조사된 빛의 양과 관계가 있으며 빛의 양이 증가하면 대략적으로 항산화능도 증가하는 것으로 조사되었다. 그러나 최근 폴리페놀 계 및 배당체 지표물질에서 관찰되었던 결과 (Jang *et al.*, 2005) 와 본 연구의 총페놀 함량 변화에서 조사되었던 것과는 달리 항산화능과 빛의 양 사이의 상관관계는 크지 않았다.

적 요

바위솔 총 페놀 함량은 조사된 빛의 양 및 질소비료의 시비량과 밀접한 관계가 있으며 빛의 양이 증가될수록 질소비료의 시비량이 증가할수록 총 페놀 함량이 증가하는 경향이 관찰되었다. 총 페놀 함량은 여러 가지 조건하에서 인공적으로 재배된 바위솔보다 자연산 바위솔에서 높은 것으로 조사되었다. 자연산의 경우 개화 후의 총 페놀 함량이 개화 전의 총 페놀 함량보다 높았다. 바위솔의 항산화능은 바위솔에 조사된 빛의 양 및 질소비료의 시비량과 관계가 있으며 빛의 양 및 질소비료의 시비량이 증가하면 대략적으로 항산화능도 증가하는 것으로 조사되었다. 인산 및 칼륨비료의 시비량과 총페놀 함량과 항산화능 사이에는 별 큰 상관관계가 없는 것으로 관찰되었다.

사 사

본 논문은 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원(204042-03-2-SB010)으로 수행된 연구결과와 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Bisset NG, Phillipson JD, Czygan FC, Frohne D, Holtzel D, Nagell A, Pfander HJ, Willuhn G, Buff W (eds) (1994) Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis. CRC Press: Boca Raton. 486-489.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 26:1199-1200.
- Cheng JT, Hsu FL, Chen HF (1993) Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma candidum*. *Planta Med*. 59:405-407.
- Davy D, Gautier R (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem. Pharmacol.* 39:399-405.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 341:454-457.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 36:317-321.
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55:481-504.
- Hertog MGL, Feskens EJM (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*. 342:1007-1011.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH (1994) Dietary

- Flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutr. Cancer*. 22:175.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C** (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155:381.
- Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D** (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65:1489.
- Huang MT, Ferraro T** (1983) Phenolic compounds in food and cancer prevention. In: *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II. Antioxidants and Cancer Prevention*, eds M.-T. Huang MT, Ho CT and Lee CY, American Chemical Society, USA, p. 220-238.
- Jang SH, Kang DM, Kang JH, Park JC, Lee SG, Shin SC** (2005) Changes in Flavonol Glycoside Contents of *Orostachys Japonicus* a. Berger according to Cultivation Conditions. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(6):250-254.
- Kang JH, Park JS, Kim JW** (1995) Effect of long-day night-break treatments on growth and anthesis of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J. Crop Sci.* 40(5):600-607.
- Kang JH, Ryu YS, Cho BG** (1996) Effect of night-break period on growth and anthesis of *Orostachys japonicus*. *Korean J. Crop Sci.* 41(2):236-242.
- Shin DY, Lee YM, Kim HJ** (1994) Anatomy and artificial seed propagation in anti-cancer plant *Orostachys japonicus*. *Korean J. Crop Sci.* 39(2):146-157.
- Liu R, Ye M, Guo H, Bi K, Guo D** (2005) Liquid chromatograph/el-trospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19:1557-1565.
- Miller HE** (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidant. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 18:439-452.
- Newal CA, Anderson LA, Phillipson JD** (1996) *Herbal Medicines*, The Pharmaceutical Press: London. 96-97.
- Park HJ, Moon HS, Park KY, Choi JS** (1991) Antimutagenic Effect of *Orostachys japonicus*, Yakhak Hoeji. 35(4):253-257.
- Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, Park KY, Cho HW, Kim MS** (2000) Phenolic Compounds from *Orostachys japonicus* having Anti-HIV-1 Pretense Activity, *Natural Product Sciences.* 6(3):117-121.
- Ra KS, Suh HJ, Chung SH, Son JY** (1997) Antioxidant activity of solvent extract from onion skin. *J. Food Sci. Technol.* 29: 595-600.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:33-956.
- Singleton VL, Rossi JA** (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16:144-158.
- Yen GC, Duh PD** (1993) Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 70:383-386.