

라만 분광법을 이용한 아크릴레이트 하이드로젤 확산 연구

이몽룡 · 왕혁식 · 송기국[†]

경희대학교 정보전자신소재공학과, 영상정보소재기술연구센터
(2017년 5월 16일 접수, 2017년 6월 9일 수정, 2017년 6월 9일 채택)

Diffusion Studies of Acrylate Hydrogel Using Raman Spectroscopy

Mongryong Lee, Hyuck Sik Wang, and Kigook Song[†]

Department of Advanced Materials Engineering for Information and Electronics, Materials Research Center for Information Display,
Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi-do 17104, Korea

(Received May 16, 2017; Revised June 9, 2017; Accepted June 9, 2017)

초록: 아크릴레이트로 광경화한 하이드로젤에서의 확산을 조사하기 위하여 단백질 bovine serum albumin(BSA)의 시간과 거리에 따른 하이드로젤 내 분포를 Raman 분광법을 이용하여 측정하였다. Poly(ethyleneglycol diacrylate) (PEGDA)의 함량과 아크릴레이트 경화도를 조절한 하이드로젤 내 네트워크의 조밀한 정도가 BSA의 확산에 미치는 영향을 조사하였다. PEGDA 하이드로젤 시료 형상에 따라 단백질 분자의 확산 정도가 차이를 보였고, 동일 시료에서 두께 방향으로 확산 속도가 빠른 것을 하이드로젤의 팽윤도를 측정하여 조사하였다.

Abstract: Raman spectroscopy has been used to investigate effects of time and distance on diffusion properties of bovine serum albumin (BSA) in a hydrogel photo-cured with acrylates. Diffusion of BSA in the poly(ethyleneglycol diacrylate) (PEGDA) hydrogel was studied by changing the density of crosslinking networks which are modified by controlling the amount of PEGDA and degree of curing. The diffusion rate of BSA is affected by the measurement direction in the hydrogel sample as well as the shape of the sample. It was found by determining the swelling rate of the hydrogel sample that the diffusion rate is faster along the thickness direction of the sample.

Keywords: Raman, spectroscopy, acrylate, hydrogel, diffusion.

서 론

하이드로젤(hydrogel)은 수용성 고분자가 수소결합, van der Waals, 소수성 상호작용 등의 물리적, 화학적 결합에 의해 3차원의 가교를 형성하는 네트워크 구조로서, 수용액 상에서 다량의 물을 내부에 함유하여 팽윤(swelling)할 수 있는 3차원 망상구조를 갖는 물질이다.¹⁻⁶ 하이드로젤의 네트워크 가교도, 기공의 크기와 양, 수분 함유량, 강도 등의 물리적 성질은 하이드로젤의 특성을 결정짓는 중요한 역할로 작용하기 때문에 이러한 물리적 특성을 사용하고자 하는 용도에 맞추어 적절하게 조절하는 기술이 중요하다.^{3,7,8} 하이드로젤 내 분자의 확산은 크게 자기확산과 상호확산으로 나눌 수 있는데,⁹ 자기확산 계수는 농도 차가 없고 용매들이 균일하게 분포되어 있는 계에서 브라운 운동을 통하여 확산될 때 얻어질 수

있다. 상호확산은 Fick's law를 따르는 확산으로, 확산하는 분자의 양은 두 물질 사이의 농도 차가 클수록 그리고 계면에서 거리가 가까울수록 증가하며, 하이드로젤의 구조 및 네트워크 가교도에 따른 기공 변화에 크게 영향을 받는다.^{3,8}

하이드로젤 상호확산 연구에서 시간과 위치에 따른 확산 변화를 NMR imaging,¹⁰ fluorescence,⁸ neutron transmission,¹¹ vibrational spectroscopy¹²⁻¹⁵ 등을 이용하여 측정할 수 있어 이러한 실험 방법들을 이용하면 분자의 확산분포와 상호확산 계수 등의 중요한 정보를 얻을 수 있다. 이 가운데 분자의 진동운동을 측정하는 라만(Raman) 분광실험은 수용액을 사용하는 바이오 시스템에서의 연구와 고분자 계면에서 또는 하이드로젤 네트워크 내에서 확산되는 분자들의 변화를 시료에 변형을 가하지 않고 *in-situ*로 측정하는 연구에서 매우 유용한 실험방법이다. 라만 스펙트럼에서는 H₂O 때문에 나오는 피크들의 세기가 매우 약해서, 수용액 상에서 확산하는 분자들의 피크를 물 때문에 나타나는 피크들의 간섭 현상 없이 측정할 수 있어, 수용액 상태에서 실험을 진행하는 하이드로젤 연구에서는 매우 중요한 실험 방법이다.⁹ 그리고 시료 형

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ksong@khu.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

태를 변형하기 매우 어려운 하이드로젤 시료를 라만 분광실험에서는 시료 형태 그대로 비접촉 방법으로 실험을 진행할 수 있어, 시료 형태를 변형하거나 일부 극소량의 시료를 분리해야 하는 다른 분광실험 방법들에 비하여 하이드로젤 연구에는 매우 중요한 분광실험 방법이다.

아크릴레이트의 광반응으로 제조한 하이드로젤 내에서 확산되는 단백질 분자의 라만 스펙트럼을 얻기 위하여 형광현상이 없는 석영기판으로 cell type과 circle type의 두 가지 시료를 제작하여 라만 분광실험을 수행하였다. 본 연구에서는 소수성의 물질로 생체거부 반응이 없고, 단백질이 흡착하지 않는 특성이 있는 poly(ethyleneglycol diacrylate)(PEGDA)를 하이드로젤 네트워크를 구성하는 물질로 사용하였다.¹⁶ PEGDA의 광반응 아크릴레이트 관능기를 이용해 네트워크 구조를 형성하고, 아크릴레이트 경화도를 조절하여 하이드로젤 네트워크 가교도를 변화시킴으로써 단백질의 상호확산 변화를 유도하고 라만 분광실험으로 측정할 수 있었다. 단백질 분자가 하이드로젤 내부로 확산되는 속도를 시간과 위치에 따라 라만 실험으로 측정하여 하이드로젤 내에서의 상호확산 현상을 조사하고, 또 라만 분광실험을 이용하여 단백질 분자의 하이드로젤 확산을 연구할 때 장점과 주의해야 할 문제점들에 대하여 조사하였다.

실 험

하이드로젤 매트릭스로 사용한 분자량 400 g/mol PEGDA는 Sigma-Aldrich에서, 광반응 개시제는 Ciba Irgacure 2959를, 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 삼전화학에

서, 단백질인 bovine serum albumin(BSA)은 Merck에서 구매하여 사용하였다. PEGDA를 증류수에 녹여 pre-gelled(8, 12, 16 wt%) 용액을 만들었고, Irgacure 2959 10 wt%를 DMSO에 섞어 광개시제 용액을 그리고 BSA를 10 wt%로 증류수에 녹여 BSA 용액을 만들었다. 1 mL의 pre-gelled PEGDA 용액에 10 µL의 개시제 용액을 첨가한 후 Figure 1의 cell과 circle type 두 가지 형태의 하이드로젤 시료를 제작하였다. Figure 1(a)에 보이는 cell type 하이드로젤 시료는 700 µm 두께의 polydimethyl siloxane 스페이서(spacer)를 두 장의 석영기판 사이에 놓고 한 쪽 끝을 에폭시로 막아 cell을 제작하였다. 개시제를 첨가한 pre-gelled 용액을 cell의 틈에 주입한 후 365 nm UV를 조사하여 하이드로젤 시료를 제작하였다. Figure 1(b)의 circle type 시료는 스페이서 간격을 1 mm 이상으로 충분히 넓힌 후 pre-gelled 용액을 주입하고 UV를 조사하여 하이드로젤을 만들었다. 제작한 하이드로젤을 지름이 mm인 몰드를 이용하여 원통 형태로 자른 후 BSA 수용액에 넣어서 라만 분광실험을 진행하였다. 라만 분광실험은 Renishaw의 Invia Raman 1000 system을 이용하여 측정하였는데, 0.3 mW의 785 nm 레이저 광원과 CCD 검출기를 사용하였고, 하이드로젤 시료는 micrometer sample stage 위에서 위치를 옮겨가며 측정하였다. 모든 라만 스펙트럼은 30초 동안 10번씩 측정하였다.

결과 및 토론

PEGDA 네트워크로 이루어진 하이드로젤 내로 확산되는 단백질 분자 BSA의 분포를 조사하기 위하여 UV 광반응 전

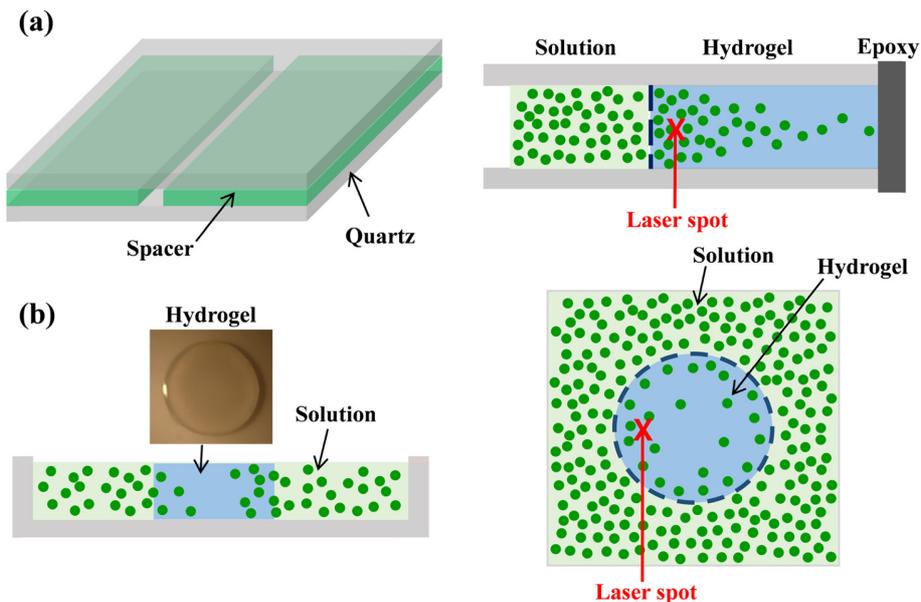


Figure 1. Schematic pictures of (a) cell type; (b) circle type hydrogel samples for Raman experiment.

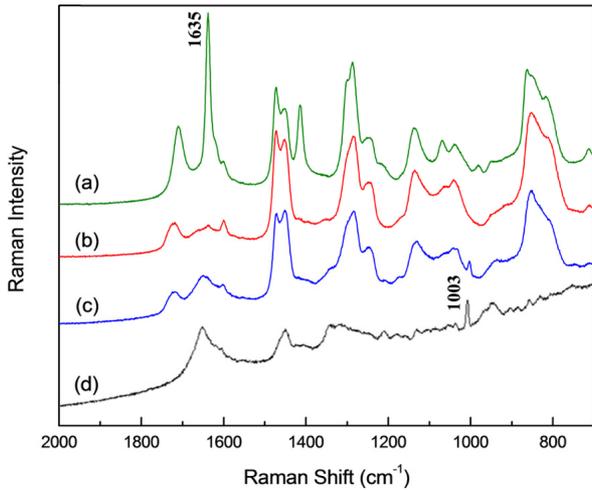


Figure 2. Raman spectra of (a) PEGDA before curing; (b) PEGDA after curing; (c) PEGDA hydrogel with diffused BSA; (d) BSA in water.

후 달라지는 PEGDA 라만 스펙트럼과 BSA의 특성 피크를 조사하였다. 하이드로젤 매트릭스를 구성하는 PEGDA pre-gelled 수용액에 UV를 쬐어주면 개시제 반응에 의해 형성된 라디칼이 PEGDA 아크릴레이트 C=C 결합을 공격하여 결합이 끊어지면서 경화반응이 진행된다. FTIR 분광실험과는 다르게 라만 스펙트럼에서 매우 강하게 보이는 Figure 2(a)의 아크릴레이트 이중결합 1635 cm⁻¹ 피크는 경화반응과 함께 세기가 작아지다가 사라지므로, 이 피크의 세기 변화를 이용하여 PEGDA 경화도와 이에 따른 하이드로젤 네트워크의 조밀한 정도를 쉽게 측정할 수 있다. Figure 2(d)의 BSA 수용액 스펙트럼에서는 단백질 특성의 amide I band가 1654 cm⁻¹에서, 그리고 helix, antiparallel β-sheet, random 등 구조에 민감한 amide III band 3개가 936~990 cm⁻¹ 사이에서 중첩되어 나오는 것과 더불어 1003 cm⁻¹에서 뾰족한 phenylalanine 피크가 관측되는 것을 스펙트럼에서 확인할 수 있다.¹⁵ BSA 수용액을 경화된 PEGDA 하이드로젤 내로 확산시킨 후의 라만 스펙트럼 Figure 2(c)를 보면 BSA 스펙트럼 Figure 2(d)와 UV 경화반응으로 아크릴레이트 1635 cm⁻¹ 피크가 사라진 후의 PEGDA 스펙트럼 Figure 2(b)가 합쳐진 상태로 보인다. PEGDA 피크들과 크게 겹치지 않는 BSA 특성피크들 가운데 1003 cm⁻¹에서 나타나는 뾰족한 피크를 PEGDA 하이드로젤 내에서 확산되는 BSA 분자의 분포를 조사하는 특성피크로 이용하였다.

BSA 분자의 PEGDA 하이드로젤 내 확산은 초기에는 급격하게 증가하다가 시간이 흐르며 확산 속도가 점차 줄어드는 것을 Figure 3의 라만 분광실험으로 측정된 확산 시간과 거리에 따른 BSA 1003 cm⁻¹ 피크의 세기 변화에서 알 수 있다. 하이드로젤 내부로 확산을 시작하는 경계면에서 거리가 멀어질수록 BSA의 확산 정도가 작아 농도가 감소하는데, 이

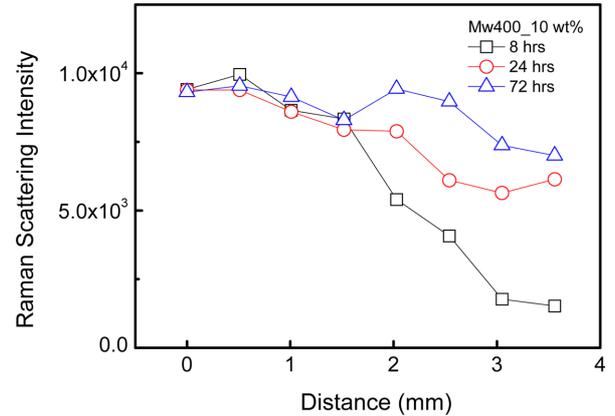


Figure 3. Raman intensity changes of BSA peak of 1003 cm⁻¹ as a function of distance from the interface of PEGDA hydrogel at various diffusion times.

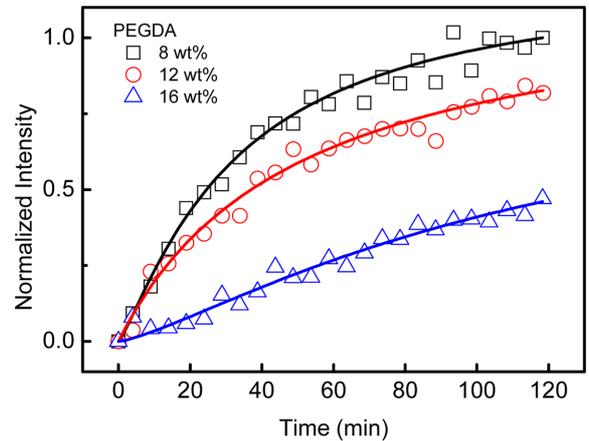


Figure 4. Normalized Raman intensity changes of BSA 1003 cm⁻¹ band measured at 1 mm point from the interface of the hydrogel (cell type) with different PEGDA concentrations.

러한 분포 변화는 확산 시간이 길어질수록 작아지고 있다. 하이드로젤 내 분자들의 확산은 상호확산에 의하여 BSA 분자들이 농도 구배에 따라 하이드로젤 내부로 움직일 때 하이드로젤 네트워크를 구성하는 PEGDA 분자와 확산되는 BSA 분자 사이 상호작용하는 힘에 의하여 결정된다고 생각한다. 하이드로젤 네트워크를 구성하는 PEGDA의 농도(8, 12, 16 wt%)를 다르게 경화하여 하이드로젤 시료(cell type)를 제조할 때 PEGDA 농도가 클수록 하이드로젤 내부 네트워크가 더욱 조밀하게 이루어져 네트워크를 구성하는 PEGDA 분자와 그 사이로 확산되어 움직이는 BSA 분자 사이 상호작용이 증가하게 된다. 그러므로 Figure 4에서 보듯이 확산 시간에 따른 BSA 특성피크의 세기 변화는 PEGDA 농도가 작은 8 wt% 용액의 하이드로젤에서 가장 빠르게 나타나는 것을 볼 수 있는데, 이는 PEGDA와 BSA 사이 상호작용이 작기 때문

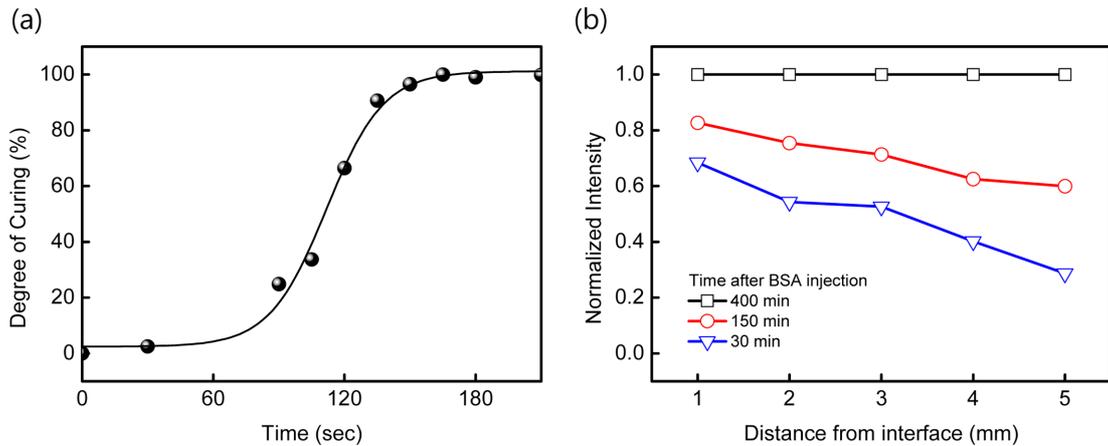


Figure 5. (a) Degree of curing of PEGDA with UV exposure time determined using Raman 1635 cm^{-1} band intensity; (b) normalized Raman intensity changes of BSA 1003 cm^{-1} band as a function of distance from the hydrogel interface at various diffusion times.

으로 여겨진다. 경화반응에 참여하는 PEGDA의 농도가 증가할수록 상대적으로 조밀한 구조의 하이드로젤 네트워크가 형성되어 동일한 부피의 하이드로젤 내부에 PEGDA 네트워크가 차지하는 부피가 커지게 된다. BSA 분자가 확산될 때 PEGDA 네트워크 때문에 나타나는 steric hindrance와 분자 사이 상호작용이 증가하므로 하이드로젤 내 PEGDA 네트워크 농도가 증가하면 BSA의 확산속도가 감소하게 된다. Figure 4를 보면 PEGDA 8 wt%와 12 wt% 하이드로젤의 경우에 초기에는 BSA 확산이 빠르게 일어난 후 서서히 속도가 감소하는 반면, 16 wt% 용액인 경우는 하이드로젤 네트워크의 조밀한 정도가 충분히 커서 BSA 분자의 확산이 느리고, 시간에 따라 확산되는 BSA 농도 증가도 선형으로 서서히 증가하는 것을 볼 수 있다.

하이드로젤 네트워크의 조밀한 정도는 PEGDA 아크릴레이트의 광경화 정도에 따라서도 조절할 수 있다. 라만 분광 실험의 PEGDA 스펙트럼에서 강하게 나오는 아크릴레이트 C=C 진동운동 1635 cm^{-1} 피크는 하이드로젤 UV 경화반응 정도를 측정할 수 있는 좋은 피크이다. Figure 5(a)는 UV에 의한 PEGDA 아크릴레이트 그룹의 반응 정도를 광조사 시간에 따른 1635 cm^{-1} 피크 세기 변화로부터 계산한 경화도를 보여준다. UV 조사를 시작하면 광개시제 반응에 의해 형성되는 라디칼들이 PEGDA 아크릴레이트 광경화 반응을 유도하기 시작하는데, 초기에는 1635 cm^{-1} 피크 세기의 변화가 없다가 90초 이후 급격한 변화가 나타나고 180초 이후에는 다시 변하지 않고 일정하게 유지되어 PEGDA의 광경화가 종료되었다는 것을 나타내고 있다. 그러므로 UV 조사 시간을 적절하게 조절하면 아크릴레이트의 경화도를 임의로 선택할 수 있어, PEGDA를 이용한 하이드로젤 내 네트워크의 가교도가 조절된 시료들을 정량적으로 쉽게 제작할 수 있게 된다. PEGDA의 경화도에 따라 제조한 하이드로젤 내 BSA의 확

산 변화는 앞의 PEGDA 농도를 변화시켜(8, 12, 16 wt%) 제조한 하이드로젤 결과와 비슷한 경향을 보여주었다. 그러므로 PEGDA 농도 대신 경화 정도를 조절한 하이드로젤 시료를 이용하면 BSA와 같은 단백질 분자의 확산 속도를 임의로 조절하는데 훨씬 효율적인 하이드로젤 시료의 제조가 가능하리라 생각한다. Figure 5(b)는 PEGDA의 광반응을 60% 진행하여 하이드로젤 네트워크로 경화한 후 BSA를 확산하였을 때 경계면에서 거리에 따른 BSA 분포를 확산 시작 후 30, 150, 400분 후에 라만 분광실험을 이용하여 측정된 결과이다. 예상대로 경계면에서 거리가 멀어질수록 BSA 양이 적고, 확산 시간이 많이 지날수록 하이드로젤 내에 균일하게 분포되는 것을 알 수 있다. 이와 같이 하이드로젤 내 단백질 분자의 확산에 관한 연구를 라만 분광법을 이용하여 조사하게 되면 시료의 형태에 관계없이 정량적으로 시간과 위치에 따라 확산 분포에 관한 정보를 손쉽게 측정할 수 있는 것을 알 수 있다.

서로 다른 모양의 하이드로젤 형태가 단백질 분자의 확산 정도에 미치는 영향을 조사하기 위해 12 wt% PEGDA 용액을 광경화하여 cell type과 circle type의 두 가지 모양의 시료를 제작하였다(Figure 1). 두 시료 모두 BSA 용액의 하이드로젤 계면으로부터 1 mm 떨어진 지점에서 하이드로젤 내 BSA의 라만 특성피크(1003 cm^{-1}) 세기를 측정하여 시료 모양에 따른 확산 분포 영향을 비교하였다. Figure 6의 시간에 따른 BSA 농도 변화를 보면 하이드로젤 시료 형상에 따라 BSA 분자의 확산에 많은 차이를 보이는데, cell type으로 제작한 시료에서의 BSA 확산 속도가 circle type으로 제작한 하이드로젤 시료보다 낮게 나타났다. 직육면체 형태의 cell type 경우에는 BSA 용액이 주입되는 한 쪽 면을 제외한 모든 방향이 둘러싸여 막혀있는 반면에 원통 형태의 circle type 경우에는 하이드로젤을 경화한 후 원통 형태로 절단하여 제조하

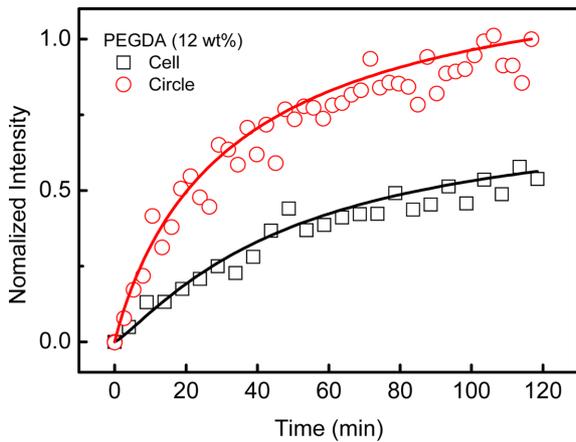


Figure 6. Normalized Raman intensity changes of BSA 1003 cm^{-1} band measured at 1 mm point from the hydrogel interface with two different types of hydrogel samples (cell and circle types).

여 BSA 수용액에 넣었으므로 BSA 용액과 맞닿아 있는 하이드로젤 경계면이 시료의 두께 방향을 포함하여 더 많기 때문이라고 생각된다.

하지만, circle type 하이드로젤 시료를 12시간 물에 담근 후 팽윤 정도를 측정하였을 때, 기판과 수직인 시료의 두께 방향으로 12.5% 팽창한 반면, 기판과 평행한 지름 길이 방향으로 2.9% 팽창하였다. 이와 같이 방향에 따라 팽윤율이 다르게 나타나는 것은 하이드로젤 내 PEGDA 네트워크를 형성하는 사슬 사이의 경화반응이 기판과 평행 방향으로 많이 이루어지기 때문으로 여겨진다. 네트워크를 형성하는 PEGDA의 경화반응은 사슬들이 서로 연결되는 가교 반응이어서 가교가 형성되는 방향으로 시료가 팽창하기 매우 어렵지만, 가교가 없는 방향으로 사슬들 사이에 van der Waals 힘 등 분자간 상호작용만이 존재하여 물 분자가 사슬들을 쉽게 밀어내며 팽창할 수 있게 된다. PEGDA 광경화를 위하여 UV를 쬐어줄 때 하이드로젤 시료 바로 위에서 빛의 전기장 방향이 기판과 평행하게 진행하므로, 하이드로젤 내 PEGDA 아크릴레이트 그룹 중 빛의 전기장 방향과 평행한 그룹들이 우선적으로 광반응을 진행하게 된다. 그러므로 UV 전기장의 방향, 즉 기판과 평행 방향으로의 광반응 가교가 많이 일어나 하이드로젤 내에 광경화 반응의 이방성이 진행되는 것이다. 하이드로젤 시료 내 방향에 따라 경화 정도, 즉 네트워크 사슬의 가교도가 다르므로 Figure 5의 가교도 효과에서 설명하였듯이 BSA 단백질 분자의 확산 속도는 가교도가 적은 하이드로젤 시료의 두께 방향으로 더 빠르게 진행하리라 본다. 본 연구를 통하여 하이드로젤 내에서 분자 확산에 대한 연구를 수행할 때는 하이드로젤 시료의 광경화 방향, 시료의 형태, 그리고 측정하는 방향 등에 따라 상대적으로 다른 결과 값을 가질 수 있으므로 이러한 조건들을 유의하여 라만 실험을 수행할 필요가 있는 것을 알 수 있었다.

결론

본 연구에서는 아크릴레이트 관능기를 가지고 있는 PEGDA 수용액을 UV 광경화하여 cell type과 circle type 두 가지 형태의 하이드로젤 시료를 제작하였다. 하이드로젤 매트릭스를 형성하는 PEGDA의 양에 따라 네트워크의 조밀한 정도가 달라져 BSA 단백질 분자의 확산 시간 및 분포가 달라졌는데, 이러한 변화는 PEGDA의 광경화 반응 정도를 조절하여서도 비슷한 결과를 유도할 수 있었다. 하이드로젤 네트워크가 조밀하면 네트워크를 구성하는 PEGDA 분자와 네트워크 사이로 확산되는 BSA 분자 사이 상호작용이 증가하는데, 네트워크 때문에 나타나는 steric hindrance와 분자 사이 인력의 증가에 의하여 확산속도가 감소하게 된다.

하이드로젤 시료 형상에 따라 BSA 단백질의 확산 정도가 약간 차이를 보이는데, cell type으로 제작한 시료에서의 BSA 확산은 circle type으로 제작한 하이드로젤 시료보다 느리게 보여졌다. 또한 같은 형태의 하이드로젤 시료라 해도 시료 내 확산 방향에 따라 속도가 다르게 나타났다. Circle type 하이드로젤 시료의 팽윤은 시료의 두께 방향으로 12.5% 팽창한 반면, 지름 길이 방향으로 2.9% 팽창하였다. 이와 같이 방향에 따라 팽윤 정도가 다르게 나타나는 것은 하이드로젤 내 네트워크를 형성하는 PEGDA 사이의 경화반응이 기판과 평행 방향으로 많이 이루어져 기판에 수직인 두께 방향으로 가교가 적어 사슬 사이 간격이 쉽게 벌어질 수 있기 때문이다. 하이드로젤 내 단백질 분자의 확산에 관한 연구를 라만 분광법을 이용하여 조사하게 되면 시료의 형태에 관계없이 정량적으로 그리고 *in-situ* 상태로 위치와 시간에 따른 확산 분포에 관한 정보를 쉽게 측정할 수 있지만, 하이드로젤 시료 광경화 방향, 시료의 형태, 측정 방향 등에 따라 상대적으로 다른 결과 값을 가질 수 있으므로 이러한 실험 조건에 유의하여 결과를 해석할 필요가 있다.

감사의 글: 이 논문은 산업통상자원부 및 산업기술평가관리원 전략핵심소재기술개발사업의 지원을 받아 수행된 결과입니다(과제번호: 10053627).

참고 문헌

1. Y. L. Lee, M. Gulfam, and B. G. Chung, *Polym. Sci. Technol.*, **22**, 454 (2011).
2. A. C. Jen, M. C. Wake, and A. G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 357 (1996).
3. T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, **49**, 1993 (2008).
4. S. C. Song, J. K. Cho, and C. J. Chun, *NICE*, **28**, 171 (2010).
5. A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 18 (2012).
6. E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.*, **6**, 105 (2015).
7. C. Y. Cha, S. Y. Kim, L. Cao, and H. J. Kong, *Biomaterials*, **31**,

- 4864 (2010).
8. C. Khoury, T. Adalsteinsson, B. Johnson, W. C. Crone, and D. J. Beebe, *Biomed. Microdevices*, **5**, 35 (2003).
 9. S. J. Kwak and M. Lafleur, *Appl. Spectrosc.*, **57**, 768 (2003).
 10. C. A. Fyfe and A. I. Blazek, *Macromolecules*, **30**, 6230 (1997).
 11. L. Bosio, G. P. Johari, M. Oumezzine, and J. Teixeira, *Chem. Phys. Lett.*, **188**, 113 (1992).
 12. M. T. A. Ende and N. A. Peppas, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 1289 (1999).
 13. M. B. Mellott, K. Searcy, and M. V. Pishko, *Biomaterials*, **22**, 929 (2001).
 14. A. A. Naddaf and H. J. Bart, *Macromol. Symp.*, **306-307**, 150 (2011).
 15. G. Meng, J. C. K. Chan, D. Rousseau, and E. C. Y. Lichan, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 845 (2005).
 16. Z. A. A. Hamid and K. W. Lim, *Procedia Chem.*, **19**, 410 (2016).