J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
31(6), 1092~1096(2002)

포도종실 에탄올 추출물의 순차 용매 분획에 따른 항산화 활성

정하열† · 윤수정
한경대학교 식품공학과 및 식품생물산업연구소

Antioxidant Activity of Grape Seed Ethanol Extract According to Serial Solvent Fractionation

Ha-Yull Chung† and Soo-Jung Yoon

Dept. of Food Science & Technology and Food & Bio-industrial Research Center, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

Abstract

Ethyl acetate and butanol fractions among the serial solvent fractions of grape seed ethanol extract contained the catechin at the levels of 35.7 mg/g and 20.2 mg/g, respectively. However, the POV increasing patterns of two linoleic acid samples containing each solvent fraction were so similar that the difference in antioxidant activity by the catechin content of each solvent fraction could not be found. Each solvent fraction was fractionated on C18 cartridges into three subfractions which were mono-, dimers fraction (FI), oligomers fraction (FII) and polymers fraction (FIII) to examine the effect by the difference in degree of polymerization of proanthocyanidin. The catechin contents of ethyl acetate subfractions (E-F) were in the order of E-FI (26.0 mg/g) > E-FII (18.6 mg/g) > E-FIII (13.7 mg/g) but the three subfractions showed nearly similar antioxidant activities, by the POV measurement at 1,000 ppm concentration. Also the catechin contents of butanol subfractions (B-F) were in the order of B-FI (35.3 mg/g) > B-FII (30.8 mg/g) > B-FIII (22.7 mg/g) but similar antioxidant activities were observed in all subfractions. In this study, similar antioxidant activities of each solvent subfraction in spite of different catechin contents inform that the degree of polymerization of proanthocyanidin as well as the total catechin content should be considered in quality control of grape seed extract produced for natural antioxidant.

Key words: antioxidant activity, grape seed ethanol extract, serial solvent frationation, peroxide value (POV), degree of polymerization

서 론

식품산업의 지속적인 발전 및 가공식품의 시장 확대에 따라 합성 식품첨가물의 사용량은 증가하고 있지만 이들의 과다한 섭취가 인체에 미치는 부정적인 영향에 대한 사회적 우려로 인하여 식용 식물체에 존재하는 성분으로부터 안전성과 효과가 우수한 천연 첨가물을 찾기 위한 노력은 꾸준히 진행되어 왔다(1). 이러한 과정에서 포도종실 추출물은 인간이 오랜 기간동안 상식해온 과실의 구성 성분이 나타내는 항산화성을 이용한 천연 항산화제로 개발되었으며(2) 국내에서도 1998년 5월에 천연 첨가물 신규 기준규격에 등재되어 사용에 대한 허가가 되어 있는 실정이다(3). 특히 최근에는 천연 항산화제로서 뿐만 아니라 건강식품 소재 및 영양제로서의 사용이 제안되기도 하였다(4). 포도 종실에는 프로안토시아니딘이란 축합형 탄닌이 함유되어 있는데(5) 관능적으로는 떫거나 쓴맛을 나타내며 가공처리 과정에서는 혼탁의 유발이나 단백질 성분과 반응하여 침전을 일으키는 원인 물질로 알려져 있기도 하다. 반면에 생체 내에서는 산소 유리 라디칼 포착기능에 의한 항산화 작용(6), 혈중 콜레스테롤 저하(7), 동맥경화 예방(8) 뿐만 아니라 항산화 작용에 의해 피부의 노화를 방지하여 유연성, 탄력성의 부여(9)와 같은 바람직한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 식품산업에 있어서도 프로안토시아니딘이 나타내는 항산화 효과가 중요한 의미를 지니는데 이미 포도나 와인 등에 함유된 페놀화합물의 항산화 작용에 관해서는 잘 알려져 있으며(10-13), 그 효과는 비타민 C나 E보다 우수한 것으로 보고되고 있다(14).

포도종실 추출물에 함유된 프로안토시아니딘은 (+)-카테킨이나 (-)-에피카테킨, (-)-에피카테킨 3-O-갈레이트와 같은 단량체 페놀화합물 뿐만 아니라 이들이 C_4-C_8 혹은 C_4-C_6 결합에 의해 연결되어 있는 다량체 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(15). 특히 프로안토시아니딘을 이루고 있는 카테킨의 함량과 중합도가 포도종실 추출물이 나타내는 이화학적 특성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐에 따라 Prieur 등(15)은 포도종실 추출물에 함유된 프로안토시아니딘을 분취용 순상 HPLC

†Corresponding author. E-mail: chunghyl@hitel.net
Phone: 82-31-670-5156, Fax: 82-31-670-5015

를 사용하여 중합도가 다른 5개의 분획으로 분리하였는데 이들의 중합도는 각각 2.3, 3.6, 5.4, 7.8, 14.4이었으며 각 분획의 중합도가 증가함에 따라 갈레이트의 에스테르화 정도도 13.2%에서 30.2%로 늘어났다고 하였다. 이처럼 포도종실 추출물은 카테킨의 중합도 및 이화학적 조성이 서로 다른 프로안토시아니딘이 혼합되어 있으므로 그 함량뿐만 아니라 조성 비율이 항산화 활성에도 영향을 미칠 것으로 예측되나 아직 구체적인 내용은 보고되어 있지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 포도종실 에탄올 추출물을 순차 용매 분획하여 카테킨의 함량과 중합도가 다른 용매 분획물을 얻고 각 용매 분획물을 다시 중합도에 따라 소분획 한 후 리놀산 모델계에서 항산화 효과를 측정함에 의해 각 용매 분획물의 카테킨 함량 및 중합도에 따른 항산화 활성의 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

포도종실은 국내 포도가공업체에서 포도 음료 제조 시 수거된 것을 세척, 건조 후 분쇄하고 밀봉하여 냉장실(2~8°C)에서 보관하며 사용하였으며 실험에 사용한 모든 시약 및 표준품은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

포도종실 에탄올 추출물

포도종실 에탄올 추출물은 Chung과 Lee(2)의 공정에 따라 제조하였다. 즉 미세하게 분쇄한 포도종실 분말 300 g을 소포대에 담아 증류수 2 L와 함께 미리 가온된 가압살균솥에 넣고 1시간 동안 증숙한 후, 증숙된 시료에 약 5배 중량의 80% 에탄올을 사용하여 2시간 동안 2회 환류 추출하였다. 80% 에탄올 조추출물은 Whatmann No. 5 여과지로 여과하여 불용성 잔사를 제거하였으며 여액은 헥산으로 세척하여 잔류하는 지방질 성분을 제거한 후 진공 감압 농축기로 농축하고 동결건조하여 얻은 15 g의 분말을 시료로 사용하였다. 시료로 제조된 포도종실 에탄올 추출물은 정제 정도에 따라 프로안토시아니딘 함량이 다르게 되므로 품질 수준이 일정하도록 평균 프로안토시아니딘 함량을 15%로 조절한 후 실험에 사용하였다. 프로안토시아니딘 함량은 식품 첨가물 공전의 방법에 따라 포도종실 에탄올 추출물 중 카테킨 함량을 구하고 이를 시료 채취량에 대한 백분율로 표시하여 프로안토시아니딘 함량(%)을 구하였다(3).

포도종실 에탄올 추출물의 순차용매 분획

포도종실 에탄올 추출물을 순차 용매 분획하기 위해 포도종실 에탄올 추출물 20 g에 증류수를 넣어 1 L로 하고 이 용액 100 mL씩을 분액 여두에 나누어 넣은 다음 헥산 350 mL로 각각 3회씩 추출하여 얻은 헥산 층을 농축하여 헥산 분획물로 하였다. 헥산 분획 후 남은 하층부를 클로로포름 350 mL로 3회 추출하고 농축하여 클로로포름 분획물로 하였다. 에틸아세테이트와 부탄올을 사용하여 동일한 방법으로 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물을 얻었으며 최종적으로 부탄올 분획물을 얻은 후 남은 하층부를 수층 분획물로 하였다. 각 순차 용매 분획물은 건물량 기준으로 수율 측정 후 항산화 효과 측정 시료로 사용하였다.

순차용매 분획물의 중합도에 따른 소분획

Sun 등(16)의 방법에 따라 에틸아세테이트 분획물 0.3 g을 0.1 N 수산화나트륨 용액이나 0.1 M 인산용액에 의해 pH 7.0으로 조절된 증류수 10 mL로 용해시킨 후 메탄올로 활성화된 C18 카트리지에 흡착시키고 통과된 용출물은 제거하였다. C18 카트리지에 흡착된 페놀산을 세척하기 위해 증류수(pH 7.0) 20 mL를 통과시킨 후, 질소가스로 카트리지에 존재하는 수분을 제거하였다. C18 카트리지에 흡착된 단량체-이량체 분획과 올리고량체 분획을 용출하기 위해 에틸아세테이트 50 mL을 용출시킨 다음, 메탄올 50 mL로 용출하여 얻은 다량체 분획물을 E-FIII라 하였다. 혼합된 단량체-이량체 분획과 올리고량체 분획을 분리하기 위해 25°C에서 감압 농축한 후 증류수 10 mL(pH 7.0)로 용해시켜 C18 카트리지에 흡착시키고 질소가스로 건조하였다. 이 후 C18 카트리지에 디에틸 에테르 50 mL을 용출시켜 얻은 단량체-이량체 분획물을 E-FI이라 하였으며 다시 메탄올 50 mL을 용출시켜 얻은 올리고량체 분획물을 E-FII라 하였다. 이 때 에틸아세테이트 분획물(0.3 g)의 건물량에 대한 각 소분획물의 중량을 측정하여 소분획물 수율을 %로 나타내었다. 잔류 용매를 제거시킨 부탄올 분획물 0.3 g을 취하여 에틸아세테이트 소분획물과 동일한 방법으로 C18 카트리지를 이용하여 단량체-이량체 분획물(B-FI), 올리고량체 분획물(B-FII), 다량체 분획물(B FIII)을 얻었다. 이때 부탄올 분획물의 건물량 (0.3 g)에 대한 각 소분획물의 중량을 측정하여 수율을 %로 나타내었다.

POV 측정

순차용매 분획 및 중합도에 따라 분리된 각각의 용매 분획물과 E-FI, E-FII, E FIII, B-FI, B FII, B-FIII를 리놀산이 10 g씩 들어 있는 시험관에 1,000 ppm의 농도로 첨가한 후, 시료를 10분간 혼합 유화하여 용해시킨 다음 마개를 닫고, 60°C 수욕조에서 저장하면서 12시간 동안 2시간 간격으로 POV를 측정하였다. POV는 시료 1 g을 시험관에 취한 다음 아세트산-클로로포름(3 : 2) 혼합용액 6 mL을 첨가하여 교반한 후, KI 0.1 mL을 넣고 다시 교반한 후 5분간 방치하였다. 여기에 6 mL 증류수와 0.2 mL 1% 전분용액을 넣어 전분에 의한 착색이 소실될 때까지 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 용액으로 적정한 후 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{Peroxide value} = (A-B)\times 0.01\times F\times 1000 / S$$

A: 시료에 대한 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 표준 용액 사용량(mL)
B: 공시험구에 대한 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 표준 용액 사용량(mL)
F: 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 표준 용액의 역가, S: 시료 채취량(g)

소 분획물의 TLC 및 HPLC 분석

분리된 소분획물은 실리카겔 60 F_{254} TLC 판에 점적한 후,

톨루엔/아세톤/초산 (3 : 3 : 1, v/v/v)로 전개하고, 10% 바닐린 용액으로 발색시켜 R_f치를 비교하였으며 HPLC 분석은 용매이송펌프에 컬럼(Lichrospher Si100 5 μm particle size, 250×4 mm, Merck, Germany)을 장착하고 자외선 검출기(M720, Younglin Instrument Co., Korea)를 280 nm에서 사용하였다. 이동상 A는 디클로로메탄-메탄올-증류수-트리플로로아세트산(10 : 86 : 2 : 0.005)으로, 이동상 B는 디클로로메탄-메탄올-증류수-트리플로로아세트산(82 : 18 : 2 : 0.005)으로 하고 이동상 A를 50분까지는 0에서 40%로, 그 다음 5분은 40%에서 55%로, 그 다음 5분은 55%에서 100%로 하여 1 mL/min의 유속으로 용출시켰다.

결과 및 고찰

순차 용매 분획물의 항산화효과

포도종실 에탄올 추출물을 순차 용매 분획한 결과, Fig. 1과 같이 추출에 사용한 용매의 극성도가 증가함에 따라 분획물의 수율이 증가하였으나 각 분획물의 총 카테킨 함량을 (+)-카테킨을 표준물질로 하여 측정한 결과, 포도종실 에탄올 추출물의 카테킨 함량은 15.1 mg/g이었으며 헥산, 클로로포름 분획물에는 거의 없었고, 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에는 각각 35.7 mg/g과 20.2 mg/g 그리고 증류수 층에는 1.3 mg/g이 함유되어 있었다(Fig. 2). 회수된 에틸아세테이트와 부탄올 분획물을 1,000 ppm의 농도로 리놀산 10 g에 용해시킨 후, 60°C 수욕상에서 12시간 저장하며 POV를 측정한 결과는 Fig. 3과 같았다. 무첨가구의 POV는 저장 기간 중 지속적으로 증가하여 10시간 경과 시에 약 6 meq/kg oil을 나타낸 반면에 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물 첨가구의 POV는 2 meq/kg oil을 나타내어 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물은 리놀산의 산화에 대한 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. Lim 등(17)은 소목, 백작약, 산수유 등의 약용 식물 추출물은 추출 용매의 극성이 커질수록 수율이 증가하였고, 순차 분획에 따라 항산화 효과가 증가하는 결과를 보고하였으나 본 연구에서는 포도종실 에탄올 추출물을 순차 분획하여 얻은 에틸아세테이트와 부탄올 분획물을 첨가한 시료의 POV 증가 경향은 유사하여 카테킨의 함량에 따른 차이를 확인할 수 없었다. 조카테킨의 항산화력은 첨가량을 증가시킴에 따라 증가하는 경향을 나타내며(18) 또한 본 연구자들이 전보에서 확인한 바와 같이(19) 리놀산에 대한 포도종실 에탄올 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 산화 억제효과가 증가되어 포도종실 에탄올 추출물의 항산화 효과가 실험구간 내에서 농도 의존적인 경향을 나타내므로 오히려 카테킨 함량이 부탄올 분획물보다 높은 에틸아세테이트 분획물이 상대적으로 강한 항산화 활성을 나타낼 것으로 예견하였으나 POV 측정에 따른 활성의 차이가 없었다. 일반적으로 카테킨이 단량체로 존재할 때보다는 다량체 형태의 프로안토시아니딘으로 존재하는 경우가 항산화 효과가 강한 것을 고려할 때(4) 부탄올 분획물에는 에틸아세테이트 분획물보다 카테킨의 절대 함량이 적지만 다량체 형태로 존재하는 프로안토시아니딘이 많음으로 인해 에틸아세테이트 분획물과 대등한 항산화 효과를 나타낸 것으로 예측할 수 있었다.

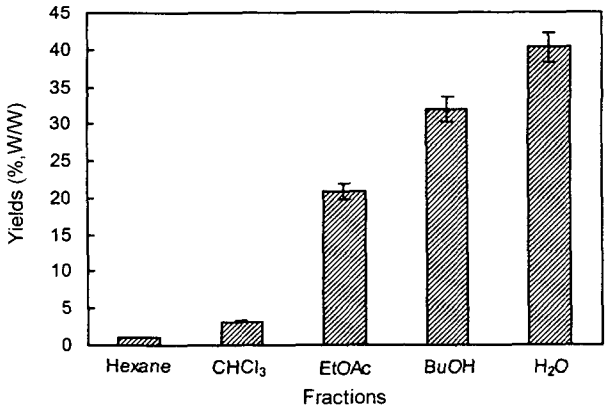

Fig. 1. Yields of serial solvent fraction of grape seed ethanol extract.

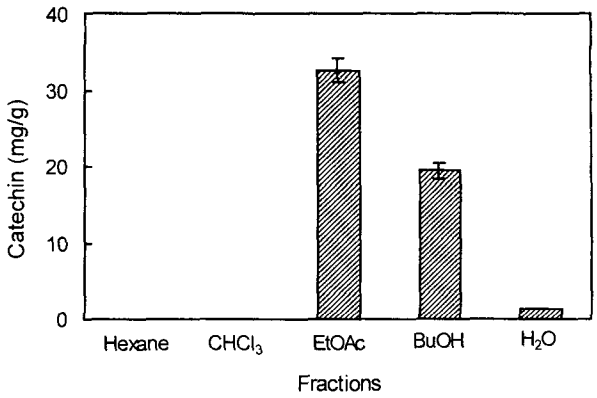

Fig. 2. Amounts of catechin contained in serial solvent fraction of grape seed ethanol extract.

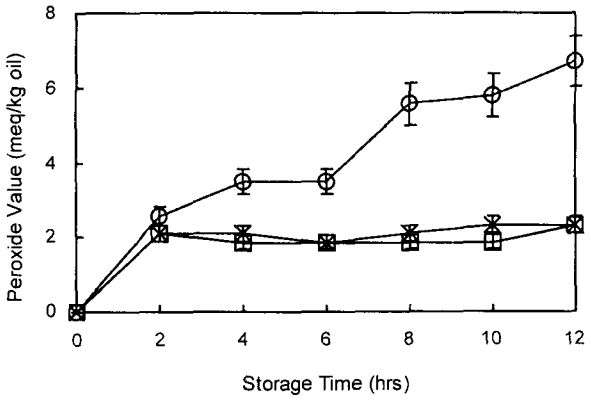

Fig. 3. Changes of the peroxide value of linoleic acid containing ethyl acetate and butanol fraction of grape seed ethanol extract during storage at 60°C.
-○-: control, -□-: ethyl acetate fraction 1,000 ppm, -×-: butanol fraction 1,000ppm.

순차 용매 분획물의 중합도에 따른 분리 및 확인

순차 용매 분획물에 함유된 프로안토시아니딘을 이루고 있

는 카테킨의 중합도에 따른 영향을 조사하기 위하여 각 용매 분획물을 C18 카트리지로 소분획하여 카테킨의 단량체-이량체 분획(FI)과 올리고량체 분획(FII) 및 다량체 분획(FIII) 등의 세가지 그룹으로 분리하였다. 에틸아세테이트 분획물은 소분획 후 회수된 건물량을 기준으로 할 때 단량체-이량체 분획인 E-FI이 45.5%, 올리고량체 분획인 E-FII가 38.1%, 다량체 분획인 E-FIII가 16.4%의 조성으로 이루어져 있어 저분자체 중심의 프로안토시아니딘으로 구성되어 있음을 알 수 있었으며(Table 1), 부탄올 분획물은 단량체-이량체 분획인 B-FI이 20.5%, 올리고량체 분획인 E-FII가 34.2%, 다량체 분획인 E-FIII가 45.3%의 조성으로 이루어져 있어 고분자체 중심으로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Table 1). 따라서 에틸아세테이트와 부탄올 분획물의 대등한 항산화 효과는 에틸아세테이트 분획물에 비해 부탄올 분획물이 카테킨의 절대 함량은 적으나 카테킨의 중합도가 큰 올리고량체 및 다량체 형태 중심의 프로안토시아니딘에 의한 것으로 이해할 수 있었다. Prieur 등(15)도 HPLC 이동상의 극성을 증가시키면서 카테킨의 중합도가 높은 프로안토시아니딘 분획을 얻었는데 본 연구에서도 추출 용매의 극성이 증가함에 따라 카테킨의 중합도가 높은 프로안토시아시아니딘이 용출됨을 확인할 수 있었다. C18 카트리지를 사용하여 카테킨의 중합도에 따라 분리된 각 프로안토시아니딘 소분획은 TLC에 의해 대략적으로 조성을 확인할 수 있었는데 단량체-이량체 분획인 FI은 확연히 분리되었으나, 삼량체 이상의 올리고량체가 혼합되어 있는 FII는 Sun 등(16)의 보고와는 달리 중합도에 따른 분리는 어려웠으며 그 이상의 중합도를 지닌 다량체로 이루어져 있는 FIII는 전개 과정 중에 테일링 현상이 나타나서 중합도가 서로 다른 프로안토시아니딘이 혼재하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 HPLC에 의한 FI 분획의 조성 분석에서 Sun 등(16)의 결과에서와 같이 동일한 시료에 (+)-카테킨 표준 시료를 스파이킹하여 플라반 3-올의 단량체 임을 확인할 수 있었기에, F-I분획이 카테킨을 포함하는 단량체 이량체 분획임을 알 수 있었다(Fig. 4). 반면에 확실히 분리가 되지 않은 20분대의 흡수대는 TLC에서 확인한 바와 같이 혼재하고 있는 올리고량체에 의한 것으로 보이며 다량체의 경우에는 30분대에 이후에 나타난 흡수대로 보이나 보다 정확한 분석을 위해서는 겔 침투 크로마토그래피에 의한 정제가 필요하였다.

Table 1. Composition of ethyl acetate and butanol soluble fraction of grape seed ethanol extract

Fractions[1)]	Ethyl acetate		Butanol	
	Composition (%,w/w)	Catechin (mg/g)	Composition (%,w/w)	Catechin (mg/g)
F-I	45.5±1.1[2)]	26.0±0.5	20.5±0.5	35.3±0.7
F-II	38.1±0.9	18.6±0.4	34.2±0.8	30.8±0.6
F-III	16.4±0.4	13.7±0.2	45.3±1.1	22.7±0.5

[1)]F-I: fraction of mono-, dimeric proanthocyanidins, F-II: fraction of oligomeric proanthocyanidins, F-III: fraction of polymeric proanthocyanidins.
[2)]All values are mean±SD (n=5).

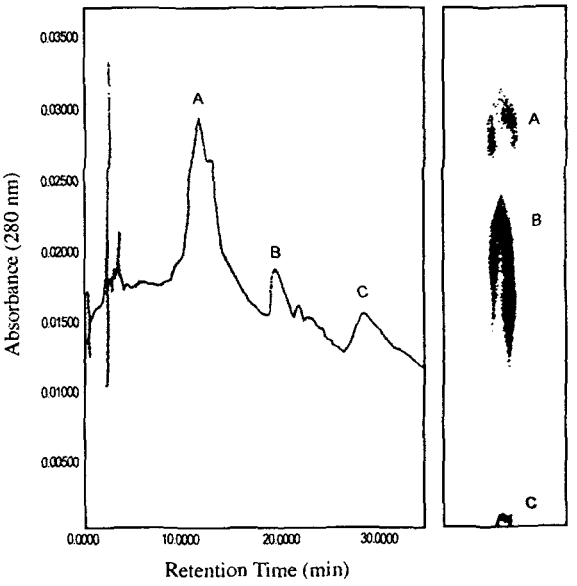

Fig. 4. HPLC and TLC chromatogram of FI, FII and FIII fraction of grape seed ethanol extract.
A: fraction I, B: fraction-II, C: fraction-III.

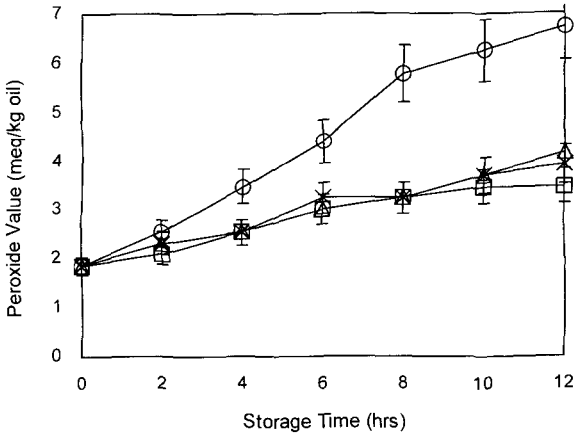

Fig. 5. Changes of the peroxide value of linoleic acid containing ethyl acetate sub fractions of grape seed ethanol extract during storage at 60°C.
-□-: Control, -□-: E-FI 1,000 ppm, -×-: E-FII 1,000 ppm, -△-: E-FIII 1,000 ppm.

중합도에 따라 분리된 소분획물의 항산화 효과

카테킨의 중합도에 따라 분리된 프로안토시아니딘 소분획물들의 카테킨 함량을 측정한 결과 에틸아세테이트 분획물에서는 E-FI(26.0 mg/g) > E-FII(18.6 mg/g) > E-FIII(13.7 mg/g)의 순서로 카테킨 농도가 높았으나(Table 1) 각각을 기질에 동일한 농도로 첨가한 POV 측정 결과에서는 POV 증가 경향이 비슷하였다(Fig. 5). 마찬가지로 부탄올 분획물에서도 소분획물들의 카테킨 함량을 측정한 결과 B-FI(35.3 mg/g) > B-FII (30.8 mg/g) > B-FIII(22.7 mg/g)의 순서로 카테킨 농도가 높았음에도 불구하고(Table 1) 기질에 동일한 농도로 첨가한 POV 측정 결과에서는 큰 차이가 없었다(Fig. 6).

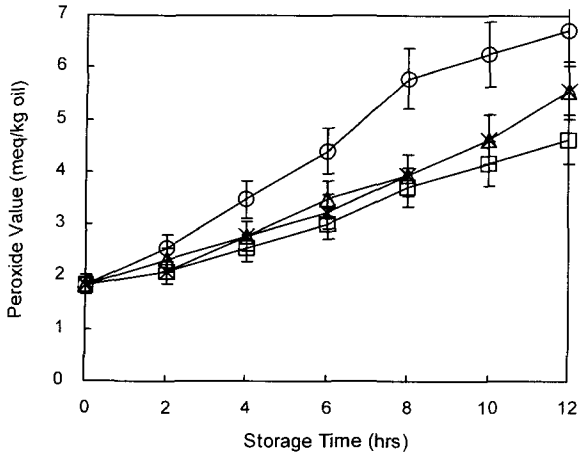

Fig. 6. Changes of the peroxide value of linoleic acid containing butanol sub fractions of grape seed ethanol extract during storage at 60°C.
-□-: Control, -△-: B-FI 1,000 ppm, -×-: B-FII 1,000 ppm, -△-: B-FIII 1,000 ppm.

일반적으로 카테킨의 항산화력은 첨가량에 비례하여 증가함에도 불구하고 각 용매 분획물의 항산화 효과에서 차이가 없었던 것은 포도종실 에탄올 추출물의 순차용매 분획물의 항산화 활성을 비교해 볼 때 총 카테킨의 함량 뿐만 아니라 프로안토시아니딘을 이루고 있는 카테킨의 중합도에 따른 영향을 받고 있으므로 천연 항산화제로서 제조되는 포도종실 추출물의 품질 관리에 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

요 약

포도종실 에탄올 추출물의 순차 용매 분획물 중에서 에틸아세테이트와 부탄올 분획물의 총 카테킨 함량은 각각 35.7 mg/g, 20.2 mg/g이었으나 두 용매 분획물을 첨가한 시료의 POV 증가 경향은 유사하여 카테킨의 함량에 따른 차이를 확인할 수 없었다. 두 용매 분획물에 함유된 프로안토시아니딘을 이루고 있는 카테킨의 중합도에 따른 영향을 조사하기 위하여 각 용매 분획물을 C18 카트리지로 소분획하여 카테킨의 단량체-이량체 분획(FI)과 올리고량체 분획(FII) 및 다량체 분획(FIII) 등의 세가지 그룹으로 분리하였다. 에틸아세테이트 분획물에서는 E-FI(26.0 mg/g) > E-FII(18.6 mg/g) > E-FIII(13.7 mg/g)의 순서로 카테킨 함량이 높았음에도 불구하고 각각을 1,000 ppm 농도로 첨가한 시료의 POV 증가 경향은 유사하였다. 또한 부탄올 분획물에서도 B-FI(35.3 mg/g) > B-FII(30.8 mg/g) > B-FIII(22.7 mg/g)의 순서로 카테킨 함량이 높았음에도 불구하고 항산화 효과에서는 차이가 없었다. 일반적으로 카테킨의 항산화력은 첨가량에 비례하여 증가함에도 불구하고 본 연구에서 각 용매 분획물의 항산화 효과에서 차이가 없었던 것은 포도종실 에탄올 추출물의 항산화 활성이 총 카테킨의 함량 뿐만 아니라 프로안토시아니딘을 이루고 있는 카테킨의 중합도에 따른 영향을 받고 있으므로 천연 항산화제로서 제조되는 포도종실 추출물의 품질 관리에 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

문 헌

1. Shin DH. 1997. Research trend and direction of natural antioxidants. *Food Science and Industry* 30: 14-21.
2. Chung HY, Lee JH. 2001. Processing method of grape seed extract containing natural antioxidant activity. *Korean Patent* 0298512.
3. Korea Foods Industry Association. 1998. 161. grape seed extract. In *Food Additive Revolution*. Korea Foods Industry Association, p 942-943.
4. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 73: 285-290.
5. Teresa EB, Yolanda GF, Julian CR, Celestino SB. 1992. Characterisation of procyanidins of *Vitis vinifera* varity Tinta del pais grape seeds. *J Agric Food Chem* 40: 1794-1799.
6. Ricardo da Silva JM, Darmon N, Fernandez Y, Mitjavila S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J Agric Food Chem* 39: 1549-1552.
7. Tebib K, Bitri L, Besancon P, Rouanet J. 1994. Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chemistry* 49: 403-406.
8. Tebib K, Besancon P, Rouanet J. 1994. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue-lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J Nutrition* 124: 2451-2457.
9. Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, Borel JP. 1983. Non-enzymatic degradation of acid soluble calf skin collagen by superoxide ion; Proactive effect of flavanoids. *Biochem Pharm* 32: 53-58.
10. Kanner J, Frankel EN, Granit R, German B, Kinsella JE. 1994. Natural antioxidant in grapes and wines. *J Agric and Food Chem* 42: 64-69.
11. Frankel EN, Waterhouse AL, Tussedre PL. 1995. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. *J Agric and Food Chem* 43: 890-894.
12. Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German JB. 1996. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J Sci Food Agric* 70: 55-61.
13. Mayer AS, Yi OS, Person DA, Waterhouse, AL, Franke EN. 1997. Inhibition of human LDL oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J Agric and Food Chem* 45: 1638-1643.
14. Walker M. 1991. Antioxidant properties of pycnogenol. *Townsend Letters for Doctors* Aug./Sep. 616-619.
15. Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36: 781-784.
16. Sun B, Leandro C, Ricardo da Silva JM, Spranger I. 1998. Sepration of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric and Food Chem* 46: 1390-1396.
17. Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korean J Food Sci Technol* 28: 77-82.
18. Rhi JW, Shin HS. 1993. Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J Food Sci Technol* 25: 759-763.
19. Chung HY, Yoon SJ. 2002. Antioxidant activity of grape seed ethanol extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 893-898.

(2002년 8월 19일 접수; 2002년 11월 5일 채택)