

## 산머루 과피에서 분리한 proanthocyanidin 획분의 항산화 특성

이혜련 · 황인욱 · 정호철<sup>1,2</sup> · 정우식<sup>3</sup> · 김영찬<sup>4</sup> · 정신교\*  
경북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>경북대학교 식품생물산업연구소, <sup>2</sup>중국 요녕농업대학,  
<sup>3</sup>인제대학교 식품생명과학부, <sup>4</sup>한국식품연구원

### Antioxidant Properties of Proanthocyanidin Fraction Isolated from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Peel

Hye-Ryun Lee, In-Wook Hwang, Hu-Zhe Zheng<sup>1,2</sup>, Woo-Sik Jeong<sup>3</sup>, Young-Chan Kim<sup>4</sup>, and Shin-Kyo Chung\*

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

<sup>1</sup>Food and Bio-industry Research Institute, Kyungpook National University

<sup>2</sup>Liaoning Agricultural College, China

<sup>3</sup>Food Science Institute, School of Food and Life Science, Inje University

<sup>4</sup>Korea Food Research Institute

**Abstract** The proanthocyanidin fraction was isolated from the wild grape (*Vitis amurensis*) peel and its antioxidant capacities were examined to promote the utilization of wild grape by-products. The 70% acetone crude extract of the wild grape peel was fractionated with hexane, ethyl acetate, and water. The ethyl acetate fraction was applied to a Sephadex LH-20 column chromatograph, which was eluted with 50% methanol, 75% methanol, and 75% acetone. The proanthocyanidin characteristics and contents of the isolated fractions were investigated by the vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and BuOH-HCl methods. Fraction 6 had the highest proanthocyanidin content (49.35±2.75 g%) among the isolated fractions. The antioxidant activities of the proanthocyanidin fraction were examined by DPPH radical scavenging, FRAP assay, and total phenolic contents. The FRAP values and total phenolic contents of the fractions ranged from 3.54 to 32.25 mmol/kg and from 4.48 to 50.80 g/100 g, respectively. The proanthocyanidin contents was strongly correlated with DPPH radical scavenging activities, FRAP values, and total phenolic contents.

**Key words:** antioxidant activity, proanthocyanidin, Sephadex LH-20 column chromatography, wild grape (*Vitis amurensis*) peel

## 서 론

산머루(*Vitis amurensis*)는 갈매나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 동북아시아 지역, 중국 및 한국 북반구의 해발 100-1,300 m 부근에 자생하며 포도와 형상이 비슷하나 내한성과 내병성이 있다. 우리나라에서는 2008년도에 재배면적이 500 ha, 농가 수 16,600호, 생산량 850 M/T 정도로 매년 조금씩 재배 면적과 생산량이 늘어나고 있다(1). 산머루는 포도에 비하여 짙은맛과 신맛이 강하여 주로 주스나 술로 가공되고 있다. 산머루에 관한 연구로는 개량 머루주의 감산에 관한 연구(2), 머루즙과 머루주의 이화학적 분석(3), 머루를 이용한 발효 제품의 제조(4) 등이 있으나 연구 자료가 비교적 많지않다. Proanthocyanidin은 포도 과피와 씨에 많이 함유되어 있으며(5), 또한 항산화활성(6), 항염증(7), 심장혈관 보호 작용(8), 항종양(9),

시토크롬(cytochrome) P450 효소 저해(10) 등의 효과가 있다고 보고되고 있다. 포도를 가공할 때 약 15%의 포도 과피와 3%정도의 씨가 부산물로 버려지므로 이들 중에서 proanthocyanidin의 소재화를 위한 논문들이 최근 보고되고 있다(11-13). 본 연구진도 선형연구(6)에서 가공 부산물 중 산머루씨에서 proanthocyanidin 성분을 분리하여 구조적 특성과 항산화활성을 확인한 바 있다. 이어서 금번에는 산머루 과피에서 proanthocyanidin 획분을 분리하고 그 화학적 특성을 확인하고, 항산화 활성을 검정하고 관련 성분 간의 상관성을 조사하였으므로 국내의 건강기능소재의 개발에 일익을 더할 수 있도록 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용한 산머루(*Vitis amurensis*) 과피는 2006년도 11월 경남 함양군에 있는 두레마을(Doorae Inc., Hamyang, Korea)에서 착즙하고 남은 과피를 제공받아서 그늘에서 말린 후 냉동 보관(-20°C)하면서 시료로 사용하였다.

### 기구 및 시약

UV-Vis 분광광도계는 Shimadzu사(UV 1601 PC, Kyoto, Japan) 제품, TLC(thin layer chromatography) plate(Silica gel 60, Art5721

\*Corresponding author: Shin-Kyo Chung, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Tel: 82-53-950-5778

Fax: 82-53-950-6772

E-mail: kchung@mail.knu.ac.kr

Received February 25, 2010; revised April 13, 2010;

accepted May 6, 2010

Darmstadt, Germany)는 Merck사 제품, Sephadex LH-20(Uppsala, Sweden)은 Amersham Pharmacia Biotech사 제품을 사용하였으며, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ), Folin-Ciocalteu's 시약, (+)-catechin, vanillin과 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid(Trolox) 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고 모든 유기용매는 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다.

### Sephadex LH-20 chromatography에 의한 proanthocyanidin 획분의 분리

Proanthocyanidin 획분의 분획은 선행된 산머루 씨의 방법(6)에 준하여 추출, 분리하였다. 즉, 산머루 과피 100g에 70% 아세톤을 가하여 2회 추출한 후 여과하고 rotary vacuum evaporator(Eyela, N-N series, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 이를 hexan, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차적으로 용매 분획하였다. 에틸아세테이트 분획물(523 mg)은 Sephadex LH-20 gel slurry를 칼럼(40×400 mm)에 충전 하였다. 칼럼 안을 이동상으로 치환한 후 시료를 겔에 흡착시키고, 이동상으로 50% 메탄올, 75% 메탄올, 75% 아세톤 순으로 300 mL씩 용출하여 각 획분을 얻었다. TLC의 조건은 Andriambeloston 등(14)의 방법을 변용하였으며, 분리한 획분을 silica plate에 spotting한 후 toluene/acetone/formic acid(6:6:1, v/v/v)의 혼합용매로 전개하였다. 발색제로 70% hydrochloric acid에 녹인 1% vanillin 용액을 사용하여 (+)-catechin을 표준품으로 하여 확인하였다.

### Proanthocyanidin 분석

Proanthocyanidin 정량은 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법(15)으로 측정하였다. 시료 200 µL에 1.2% vanillin 용액 500 µL와 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 500 µL를 가하여 실온에서 20분간 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며 proanthocyanidin함량은 g catechin equivalents(CE)/100 g로 나타내었다. 그리고 분획 시료 500 µL에 BuOH/HCl(95:5)용액 300 µL와 2% FeSO<sub>4</sub> 용액 100 µL를 가한 다음 혼합하여 95°C 항온 수조에 40분 동안 방치한 후 450-600 nm에서 흡수 패턴을 조사하였다(16).

### Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay

FRAP 방법은 Benzie와 Strainin(17)의 방법을 변용하였다. 반응 용액(stock solution) 23 mM acetate buffer(pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1의 비율로 혼합하여, 실험 전까지 37°C를 유지하였다. 이 용액에 시료용액 25 µL과 stock solution 175 µL를 혼합하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 mmol trolox equivalents(TE)/kg로 나타내었다.

### DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거 활성은 Blois(18)의 방법에 따라서 시료 100 µL와 DPPH용액(100 µM) 900 µL을 실온, 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었다.

### 총 페놀 함량

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법(19)에 의하여 측정하였다. 시료 100 µL에 2 N Folin-ciocalteu's 시약 50 µL를 가하여 발색시키고, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 300 µL를 가하여 15분 동안 실온에서 방치시켰다. 그리고 방치 후 1 mL 중류수를 넣은 다음 725 nm에서 측

정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid equivalents(GAE) g/100 g로 나타내었다.

### 통계처리

모든 실험은 3 반복으로 측정하여 측정치를 평균치±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검정은 SAS(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)에 의한 분산분석과 Duncan의 다중검정법으로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### Proanthocyanidin 획분 분리 및 화학적 특성

현재 한국에는 머루(*Vitis coignetiae*), 왕머루(*V. amurensis*), 새머루(*V. flexuosa*), 까미귀머루(*V. thunbergii* var. *sinuata*) 및 개머루(*Ampelopsis heterophylla*)의 5종의 머루가 자생하고 있으며, 이밖에 야생머루와 포도주용 포도인 콩코드와 교배하여 육성한 개량머루가 있다(20). 본 연구진의 선행연구(6)에 준하여 70% 아세톤으로 산머루 과피를 추출하고 다시 아세톤 조추출물은 hexan, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차적으로 분획하여 그 중 에틸아세테이트 획분을 Sephadex LH-20 칼럼으로 분리하여 9개의 획분을 얻었다. Table 1에 Sephadex LH-20 칼럼 분획물의 수율과 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법으로 측정된 proanthocyanidin함량을 나타내었다. Fr. 3은 분홍색, Fr. 6, 7, 8은 갈색의 용출액을 얻었다. 그리고 Fr. 8이 가장 진한 갈색을 나타내었으며 수율이 34.66%로 가장 높았다. Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법은 proanthocyanidin을 빠르게 정량하기 위해 일반적으로 사용되는 방법(21)으로서 catechin monomers 뿐만 아니라 그의 polymer인 여러 proanthocyanidin 성분들을 특이적으로 발색시키기 때문에 catechin류의 정성 및 정량분석법으로 널리 사용되고 있다. Proanthocyanidin은 산성 하에서 vanillin과 결합하여 적색을 띠게 된다(21). Sephadex LH-20 column chromatography에서 분리한 분획물의 proanthocyanidin 함량은 2.81-49.35 g/100 g이었으며, 그 중 Fr. 4와 Fr. 6에서 유의적으로 높은 함량을 보였다( $p<0.05$ ). Xu 등(22)은 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법으로 측정하여 포도 씨와 과피에서 proanthocyanidin 함량이 각각 6.13 g/100 g, 0.74 g/100 g에 이르는 것으로 보고하였고, Cosme 등(5)은 포도씨는 3.48-9.19 g/100 g, 과피는 0.11-0.59 g/100 g, 와인인 0.74-1.23 g/L의 함량으로 보고하였다. 한편 산머루 과피의 proanthocyanidin 함량은 포도 부

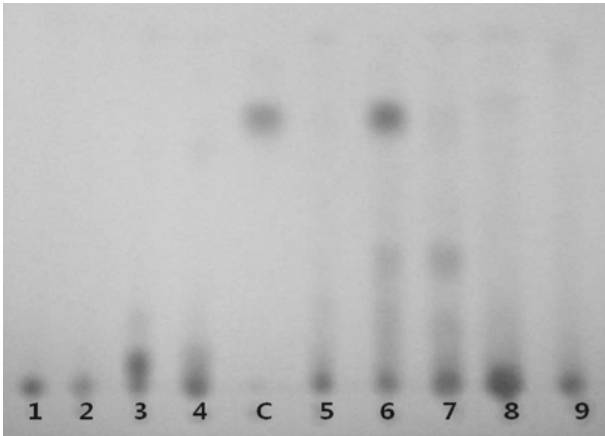
**Table 1. The yields and proanthocyanidin contents of Sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) peel**

Fractions	Yield (%)	Proanthocyanidin contents (g CE <sup>1)</sup> /100 g <sup>2)</sup>
Fr. 1	0.67 <sup>a3)</sup>	2.81±0.38 <sup>a</sup>
Fr. 2	19.49 <sup>b</sup>	3.46±0.48 <sup>a</sup>
Fr. 3	5.90 <sup>c</sup>	31.81±1.94 <sup>a</sup>
Fr. 4	5.88 <sup>c</sup>	49.00±4.38 <sup>a</sup>
Fr. 5	7.97 <sup>d</sup>	23.62±3.10 <sup>d</sup>
Fr. 6	12.63 <sup>e</sup>	49.35±2.75 <sup>a</sup>
Fr. 7	5.37 <sup>f</sup>	33.35±3.07 <sup>c</sup>
Fr. 8	34.66 <sup>a</sup>	41.37±3.06 <sup>b</sup>
Fr. 9	0.75 <sup>e</sup>	34.74±2.26 <sup>c</sup>

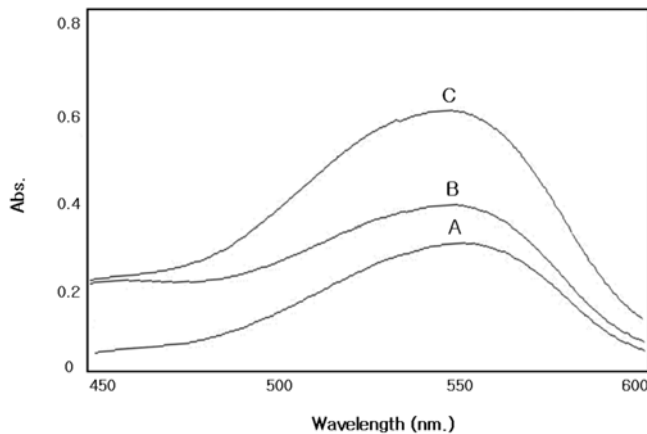
<sup>1)</sup>CE, catechin equivalents.

<sup>2)</sup>The concentration of test solution was 1,000 ppm.

<sup>3)</sup>Means with different superscripts within the column are significantly different ( $p<0.05$ ).



**Fig. 1.** TLC chromatogram of Sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) peel. The spots were visualized by spraying with a 1% vanillin solution in 70% hydrochloric acid. C, (+)-catechin; 1-9, Fr. 1-9.



**Fig. 2.** UV-Vis absorption spectra for BuOH-HCl reaction of Sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) peel. A, Fr. 6; B, Fr. 7; C, Fr. 8.

산물이나 씨, 과피 등의 함량보다 약 5-100배 높은 함량이었으며, 산머루씨의 함량(6)도 포도보다 높았다. 분리한 산머루 과피의 proanthocyanidin획분을 TLC로 확인하여 Fig. 1에 나타내었다. Fr. 5-8은 선명한 적색을 나타내었고 Fr. 6은 catechin과 동일한 위치 ( $R_f$  0.55)에서 band가 확인되었으며, Fr. 7, 8에는 수종의 미세한 spot이 확인되었다. BuOH-HCl 방법을 이용하여 수율과 proanthocyanidin 함량이 높은 Fr. 6, 7, 8의 450 nm에서 600 nm까지의 흡수스펙트럼 특성을 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. BuOH-HCl 방법은 proanthocyanidin의 중합을 분해하는 산 촉매반응으로 낮은 pH에서 적색을 띠는 anthocyanin 색소의 특성을 이용하는 방법이다(16). 따라서 획분 중 Fr. 6, 7, 8에서 모두 550 nm 부근의 흡수대가 확인되었으며, Fr. 8의 흡광도가 가장 높았다.

#### Proanthocyanidin획분의 항산화 활성

최근 활성산소종의 발생을 억제하고 질병 예방이나 노화 억제와 관련된 다양한 식품의 건강기능성분에 대하여 많이 연구되고 있으며, 그 중 채소 및 과일류의 생체 항산화 성분의 하나인 proanthocyanidin에 관하여 관심이 커지고 있다(23). 산머루 과피에서 분리한 proanthocyanidin 획분의 DPPH radical 소거 활성과 FRAP 방법에 의한 항산화 활성을 Table 2에 나타내었다. DPPH

**Table 2.** The DPPH radical scavenging activities, FRAP values and total phenolic contents of Sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) peel

Fractions	DPPH radical scavenging activities	FRAP values (mmol TE <sup>7</sup> /kg) <sup>3)</sup>	Total phenolic contents (g GAE <sup>8</sup> /100 g) <sup>4)</sup>
	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/g) <sup>2)</sup>		
Trolox <sup>5)</sup>	6.25±0.39 <sup>6)</sup>	-	-
Fr. 1	370.67±45.79 <sup>d)</sup>	6.21±0.16 <sup>f)</sup>	6.91±0.38 <sup>f)</sup>
Fr. 2	390.67±29.85 <sup>d)</sup>	3.54±0.97 <sup>g)</sup>	4.48±0.97 <sup>f)</sup>
Fr. 3	90.92±5.94 <sup>c)</sup>	17.14±1.03 <sup>e)</sup>	22.75±0.68 <sup>c)</sup>
Fr. 4	70.31±2.44 <sup>bc)</sup>	32.25±1.49 <sup>a)</sup>	32.99±0.62 <sup>d)</sup>
Fr. 5	40.43±3.87 <sup>b)</sup>	30.98±0.95 <sup>a)</sup>	37.47±0.29 <sup>e)</sup>
Fr. 6	20.73±0.57 <sup>a)</sup>	31.08±0.19 <sup>a)</sup>	44.04±0.97 <sup>b)</sup>
Fr. 7	30.36±1.84 <sup>b)</sup>	22.98±0.16 <sup>c)</sup>	38.65±0.58 <sup>c)</sup>
Fr. 8	30.53±3.70 <sup>b)</sup>	25.43±0.35 <sup>b)</sup>	50.80±3.74 <sup>a)</sup>
Fr. 9	40.55±2.09 <sup>b)</sup>	20.91±0.89 <sup>d)</sup>	43.62±3.11 <sup>b)</sup>

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub> represents the concentration of a sample for 50% scavenging activity of the DPPH radical.

<sup>2)</sup>The concentrations of test solutions were measured at 100 ppm

<sup>3)</sup>The concentrations of test solutions were measured at 100 ppm

<sup>4)</sup>The concentrations of test solutions were measured at 1,000 ppm.

<sup>5)</sup>Trolox was used as positive control.

<sup>6)</sup>Means with different superscripts within the column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>7)</sup>TE, trolox equivalents

<sup>8)</sup>GAE, gallic acid equivalents.

**Table 3.** The correlation coefficients between proanthocyanidin contents and DPPH radical scavenging activities, FRAP values and total phenolic contents of the Sephadex LH-20 fraction

	DPPH radical scavenging activities	FRAP values (mmol of TE <sup>2</sup> /kg)	Total phenolic contents (g GAE <sup>3</sup> /100 g)
Proanthocyanidin contents (g CE <sup>1</sup> /100 g)	0.829	0.865	0.836

<sup>1),2),3)</sup>The same as Table 1 and 2.

radical 소거 활성은 각 획분 중 75% 메탄올로 용출시킨 Fr. 5부터 유의적으로 높은 활성을 보였으며 그 중 Fr. 6의 IC<sub>50</sub>값이 20.73 μg/g으로 가장 강한 활성을 보였다. FRAP 방법에 의한 항산화 활성 측정법은 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine(Fe<sup>3+</sup>-TPTZ)복합체가 환원성 물질(antioxidant)에 의해서 청색의 ferrous tripyridyltriazine(Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) 복합체로 산화되는 원리를 이용하는 방법이다(17). FRAP값은 Fr. 4-6에서 다른 획분보다 높은 함량이 나타났으며, 대개 방법 별로 75% 메탄올, 75% 아세톤으로 분리한 획분의 항산화 활성이 높게 나타났으며 이들 획분은 proanthocyanidin의 함량도 높았다. 산머루 과피에서 분리한 각 획분의 총 페놀 함량을 측정된 결과 4.48-50.80 g/100 g이었으며 Fr. 8이 50.80 g/100 g으로 가장 높았다. 한편 Yoo 등(11)은 포도 과피 추출물의 총 페놀 함량이 10-30 mg/100 g로 보고하였으며, Negro 등(24)은 포도씨와 과피의 총 페놀 함량이 각각 0.29 g/100 g, 0.11 g/100 g 정도로 보고한 바 있다. 산머루 과피에서 분리한 각 획분의 proanthocyanidin 함량과 총 페놀 함량, DPPH radical 소거 활성, FRAP값 간의 상관계수를 구하여 Table 3에 나타내었다. Proanthocyanidin 함량과 DPPH radical 소거 활성 및 FRAP값과의 상관계수는 각각 0.829, 0.865 이었으며 총 페놀함량과는 0.836

으로 비교적 높은 상관관계를 보였다. 따라서 여러 방법으로 측정된 식물 추출물 중의 항산화 활성과 proanthocyanidin 함량 사이에 상관성이 높다는 보고(25)와 같이 산머루 과피의 항산화 활성을 나타내는 주요 성분은 proanthocyanidin 성분일 것으로 추정된다.

본 연구에서 산머루 과피로부터 Sephadex LH-20 칼럼으로 분리한 proanthocyanidin 함량이 높은 획분은 항산화 건강기능성 소재로 활용성이 클 것으로 사료되며 추후 동물실험에 의한 효용 검증과 제품화 연구가 요망된다.

## 요 약

산머루 부산물을 기능성 소재로 이용하기 위하여 산머루 과피에서 proanthocyanidin 획분을 분리하고 그 항산화 특성을 조사하였다. 산머루 과피의 70% 아세톤 조추출물을 헥산, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차적으로 분획하였으며, 에틸아세테이트 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography에 의하여 50% 메탄올, 75% 메탄올, 75% 아세톤으로 용출하여 9개의 획분을 얻었다. Proanthocyanidin 특성 및 함량은 BuOH-HCl 방법과 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법을 이용하여 측정하였으며 Fr. 6의 proanthocyanidin 함량(49.35±2.75 g%)이 가장 높았다. 각 획분의 FRAP값과 총 페놀 함량은 각각 3.54-32.25 mmol/kg과 4.48-50.80 g/100 g이었으며 proanthocyanidin 함량은 DPPH radical 소거활성, FRAP값, 총 페놀 함량과 높은 상관성을 나타내었다. 산머루 가공 부산물 중의 proanthocyanidin 획분은 향후 항산화성 건강기능 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 농림기술개발사업으로 수행한 결과로서 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Woo SG, Lee JH, Song JK, Sohn JH, Kim BG, Choi JH, Koh SH. Farm business performances of minor horticultural crops. Res. Rep. Rural Development Administration, Suwon, Korea. pp. 113-119 (2008)
2. Kim SK. Deacidification of new wild grape wine. Korean J. Food Nutr. 9: 265-270 (1996)
3. Choi SY, Cho HS, Kim HJ, Ryu CH, Lee JO, Sung NJ. Physicochemical analysis and antioxidative effects of wild grape (*Vitis coignetiea*) juice and its wine. Korean J. Food Nutr. 19: 311-317 (2006)
4. Ji SH, Han WC, Lee JC, Kim BW, Jang KH. Fermentation characteristics of moru wine fermented with *Rose rugosa* Thun. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 186-190 (2009)
5. Cosme F, Ricardo-da-Silva JM, Laureano O. Effect of various proteins on different molecular weight proanthocyanidin fractions of red wine during wine fining. Am. J. Enol. Viticult. 60: 74-81 (2009)
6. Lee HR, Bak MJ, Jeong WS, Kim YC, Chung SK. Antioxidant properties of proanthocyanidin fraction isolated from wild grape (*Vitis amurensis*) seed. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52: 539-544 (2009)
7. Hughes-Formella B, Wunderlich O, Williams R. Anti-inflammatory and skin-hydrating properties of a dietary supplement and topical formulations containing oligomeric proanthocyanidins. Skin Pharmacol. Physiol. 20: 43-49 (2007)
8. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. Toxicology 148: 187-197 (2000)
9. Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. Dent. Mater. J. 23: 67-74 (2004)
10. Ray SD, Parikh H, Bagchi D. Proanthocyanidin exposure to B6C3F1 mice significantly attenuates dimethylnitrosamine-induced liver tumor induction and mortality by differentially modulating programmed and unprogrammed cell deaths. Mutat. Res. 579: 81-106 (2005)
11. Yoo MA, Chung HK, Kang MH. Optimal extract methods of antioxidant compounds from coat of grape dreg. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 134-140 (2004)
12. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. J. Agr. Food Chem. 50: 7548-7555 (2002)
13. Hwang IW, Lee HR, Kim SK, Zheng HZ, Choi JU, Lee SH, Lee SH, Chung SK. Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. Korean J. Food Preserv. 15: 859-863 (2008)
14. Andriambelason E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. J. Nutr. 128: 2324-2333 (1998)
15. Beart JE, Lilley TH, Haslam E. Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalyzed decomposition; observation on some polymeric proanthocyanidins. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2: 1439-1443 (1985)
16. Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry 25: 223-230 (1986)
17. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76 (1996)
18. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)
19. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult. 28: 49-55 (1977)
20. Kim SY, Kim SK. Winemaking from new wild grape. Korean J. Food Nutr. 10: 254-262 (1997)
21. Baoshan S, Jorge MR, Isabel S. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J. Agr. Food Chem. 46: 4267-4274 (1998)
22. Xu C, Zhang Y, Cao L, Lu J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. Food Chem. 119: 1557-1565 (2010)
23. Yu J, Ahmedna M, Goktepe I, Dai J. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. J. Food Compos. Anal. 19: 364-371 (2006)
24. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresource Technol. 87: 41-44 (2003)
25. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. J. Agr. Food Chem. 50: 5042-5047 (2002)