

포도종자 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 카테킨 화합물의 항산화 및 지질과산화 억제효과

김난영 · 박성진 · 오덕환[†]

강원대학교 바이오산업공학부

Antioxidant and Lipid Peroxidation Inhibition Effects of Catechin Compounds Isolated from Ethyl Acetate Fraction of Grape Seed Ethanol Extract

Nan-Young Kim, Sung-Jin Park and Deog-Hwan Oh[†]

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study evaluated the isolation and identification of biologically active compounds from the ethyl acetate fraction of grape seed extract (*Campbell early*). Ethyl acetate fraction was further purified with sephadex LP-20 column chromatography. Each biologically active compound for free radical scavenging effect and lipid peroxidation inhibition was isolated and identified with ¹H and ¹³C-NMR. Major compounds were identified as (+)-catechin and (-)-epicatechin respectively. The amounts of (+)-catechin and (-)-epicatechin in grape seed were 45.7% and 35.1%, respectively. The purified (+)-catechin and (-)-epicatechin showed more strong free radical scavenging effects ($RC_{50} = 11.1 \mu\text{g/mL}$ and $10.4 \mu\text{g/mL}$) than ethyl acetate fraction ($RC_{50} = 15.4 \mu\text{g/mL}$). However, ethyl acetate fraction showed much stronger lipid oxidative inhibition effect than the purified (+)-catechin and (-)-epicatechin.

Key words: grape seed extract, *Campbell early*, (+)-catechin, (-)-epicatechin, free radical scavenging effect, lipid peroxidation inhibition

서 론

최근 경제 발전에 따른 환경 변화와 더불어 과거에 비하여 육류와 지방의 소비가 늘어나면서 현대인의 질병, 즉 노화, 심장병, 동맥경화, 암 그리고 면역기능의 약화 등이 현대인들의 주요 관심 사항이 되었으며 그에 따라서 건강하게 오래 사는 것에 대한 욕구는 더욱 증가하게 되었다.

포도(*Grape/Vitis vinifera*)는 갈매나무목 포도과의 낙엽성 덩굴식물로 포도라는 명칭은 유럽종의 원산지인 중앙아시아지방의 어원에서 유래한 것으로 알려져 있다. 포도는 난온대지대에서 온대에 걸쳐 약 60종이 알려져 있고, 8000년 전부터 경작되기 시작하여 현재는 총 15만여 품종이 생산되고 있다. 우리나라에서는 *Campbell early*종이 전체면적의 69% 내외를 차지하여 주품종을 이루고 있다. 미네랄이 풍부한 포도는 알카리성 식품으로 전화당, 주석산, 구연산, 칼륨, 철분 등을 비롯하여 비타민 A, B₁, B₂, D 등으로 영양이 풍부하며 피로회복, 피부미용, 소화불량, 식욕부진에 좋은 효과를 나타낸다. 동의보감에서는 ‘포도 열매는 배고픔을 달래 주고 기운이 나게 하며 추위를 타지 않게 하고 이뇨 작용이

있어 오줌을 잘 나오게 하고 기혈과 근골을 보강하며 비위와 폐신을 보하여 몸을 튼튼하게 한다’고 기록되어 있다(1,2).

포도종자는 풍부한 (+)-catechin 등의 폴리페놀 화합물을 함유하고 있으며 이를 화합물은 포도가공품에 color, clarity, taste 그리고 stability 등에 영향을 미친다. 이러한 폴리페놀 화합물들은 혈관에서 흡수되어 항산화(3), free radical 소거(4), 항궤양(5), 항암(6,7), DNA 재생(8) 그리고 항독성(9) 효과 등의 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 한편, 포도 전체의 폴리페놀 화합물 존재 비율을 살펴보면 과육에 2~5%, 과피에 25~50%, 그리고 종자에 50~70% 정도의 폴리페놀 화합물이 존재하고 있는데, 이미 포도 종자유의 경우에는 기능성 식품의 소재로 사용되고 있으며 Kang 등 (10)은 각 품종별 포도 종자의 지방질을 정량하여 참깨 및 들깨 유지와 비교하여 높은 항산화력과 산화 안정성을 보고하였다.

그러나 식용 및 여러 가공품의 원료로서 많은 양이 이용되고 있으나, 가공 중에 발생하는 포도 종자에 대한 생리활성에 관한 연구는 국내에서 거의 보고가 이루어지지 않았으며, 저자 등은 거봉 포도종자와 캠벨 포도종자 추출물 및 분획물

[†]Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457. Fax: 82-33-250-6457

에 대한 생리활성을 대하여 보고하였고(11-14) 이중 캠벨 포도종자 에틸아세테이트 분획물에서 가강 강한 생리활성을 나타내었기에 본 연구에서는 캠벨 종자 에틸아세테이트 분획물로부터 생리활성을 나타내는 물질을 분리하고 이에 대한 항산화 및 지질과산화 억제효과를 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 포도종자는 춘천시의 한 포도원에서 재배되어 주스로 가공되는 중 부산물로 발생하는 캠벨종 (*Campbell early*)의 종자부를 전조·분쇄하여 사용하였다.

추출 및 분획

포도종자는 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 flask와 water bath를 이용하여 분말시료에 시료중량의 10배량의 99.5% ethanol 용액을 가하여 78°C에서 12시간동안 2회 추출한 후 이를 동결 전조하였다. 또한 ethanol 추출물은 극성이 다른 용매를 이용하여 순차적으로 분획하였다. 즉, ethanol 추출물과 hexane, 증류수를 1:10:9의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotatory vacuum evaporator로 농축하여 hexane 분획물을 얻고, 수증은 다시 chloroform, ethyl acetate 및 butanol로 분획여두에서 순차적으로 용매 분획한 다음 각 분획물을 농축하여 동결전조한 후 밀봉하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

에틸아세테이트 분획물로부터의 생리활성 물질분리

Sephadex LP-20에 의한 흡착 chromatography :

Ethyl acetate 분획물로부터 활성 물질을 분리하기 위하여 sephadex LP-20에 의한 column chromatography를 실시하였다. Sephadex LP-20을 50% 메탄올로 20시간 팽윤시킨 다음 column(2×60 cm)에 충진하고, 시료를 소량의 50% 메탄올에 녹여 column에 charge한 후, MeOH/H₂O을 50:50-100:0으로 MeOH농도를 단계별로 10%씩 증가시키는 step-wise법에 의하여 용출·분획하였다(15). 이렇게 얻어진 활성획분(GSE 1)을 정제하기 위해 sephadex LP-20에 의한 2차 column chromatography를 실시하였다(Fig. 1). 즉 Sephadex LP-20을 MeOH/H₂O 혼합액(25:75 v/v)으로 20시간 팽윤시킨 다음 column(1.5×60 cm)에 충진하고, 시료를 소량의 동일용매계로 녹인 다음 MeOH/H₂O을 25:75, 35:65, 45:55, 55:45, 65:35, 75:25, 100:0(v/v)으로 MeOH농도를 증가시켜 용출하였다. 그리고 column에서 떨어지는 용출액은 fraction collector(Gilson FC 200)를 이용하여 순차적으로 시험관에 받은 후, TLC로 확인하여 같은 종류의 화합물을 함께 모으는 과정을 반복하였다. 한편 화합물의 분리 여부를 확인하기 위하여 1차원 TLC를, 단리된 화합물이 순수한 것인지를 확인하기 위하여 2차원 TLC를 시행하였다. Cellulose 박판(Merck, DC-plastikfolien cellulose Art. 5577)

에 전개용매로 solvent A는 TBA(butanol-AcOH-H₂O, 3:1:1 v/v/v)용액을, solvent B는 6% AcOH를 사용하였다. Solvent B에 먼저 전개한 후 다시 solvent A에 전개하여 가열건조하고, UV램프(365 nm, 254 nm)에서 확인한 후 발색제(vanillin-HCl-EtOH, 60:0.15:6 v/v/v)를 TLC판에 분무하여 가열건조 후에 나타나는 spot을 확인하였다.

분리물질의 동정

에탄올 추출물 ethyl acetate 분획물로부터 분리된 화합물의 정확한 동정을 위하여 nuclear magnetic resonance(NMR, Bruker 400MHz DPX-400, 9.4T)를 사용하여 분석을 시행하였다. 시료는 methanol-d₄에 용해시키고 ¹H-NMR와 ¹³C-NMR의 분석을 실시하였다.

분리물질 정량 분석

캠벨종 종자 ethyl acetate 분획물에서의 단리된 화합물의 농도를 확인하기 위하여 HPLC(Shimadzu LC-10AD)를 이용하여 정량하였다(Table 1). 조건은 Bondapak ODS column (3.9×300 mm, 15~20 μm, Waters, USA), 280 nm UV detector, 그리고 1.0 mL/min 유속 하에서 solvent A(2.5% AcOH in H₂O)와 solvent B(80% CH₃CN in A)를 gradient 용출법(60 min)에 의하여 분석하였다.

분리물질의 생리활성 검색

Free radical 소거능 활성 : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 free radical 소거 활성을 검증하기 위하여 여러 농도의 시료를 4 mL의 메탄올에 녹여 1.5×10⁻⁴ M DPPH 메탄올 용액 1 mL를 첨가한 후, 30분간 상온에 방치

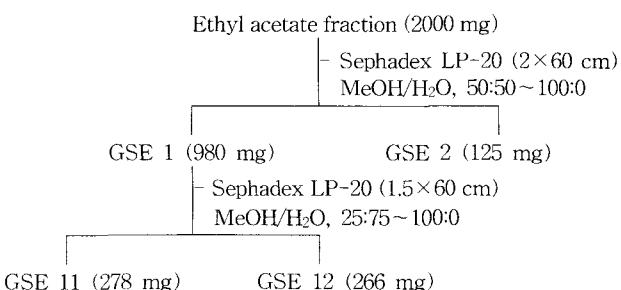


Fig. 1. The isolation procedure of active compounds from ethyl acetate fraction of grape seed ethanol extract.

Table 1. Operating conditions for the analysis of ethyl acetate fraction from grape seed ethanol extract by HPLC

Instrument	Shimadzu LC-10AD
Detector	Shimadzu
Wavelength	280 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Column	Bondapak ODS column (3.9×300 mm, 15~20 μm)
Injection volume	20 μL
Mobile phase	Solvent A: 2.5% HOAc in H ₂ O Solvent B: 80% CH ₃ CN in A

하고 517 nm에서 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(μg)을 reduction concentration(RC_{50})으로 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α -tocopherol(Sigma)의 항산화 활성을 평가 비교하였다(16).

지질파산화 측정 : 간장 조직의 지질파산화는 TBARS(thiobarbituric acid reacting substance)방법을 이용하여 측정하였다(17). 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 시료에 microsome 100 μL , 1.7 mM ADP 20 μL , 0.1 mM FeCl_3 20 μL 를 가한 후 0.1 mM NADPH 100 μL 를 첨가하여 37°C shaking water bath에서 60분간 지질파산화를 유도한 후 20 mM EDTA 100 μL 를 가해 반응을 정지시켰다. TBA-TCA-HCl(2% BHT포함)용액 2 mL를 가하여 95°C에서 10분간 끓인 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상단액의 흡광도를 535 nm에서 측정하여 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다.

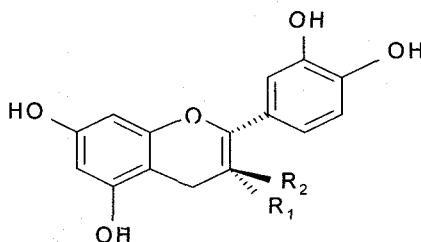
결과 및 고찰

분리물질의 동정

전보(12)에서 포도 캠벨종의 종자로부터 에탄을 추출물 및 유기용매 분획물을 이용하여 항산화, 지질파산화 억제, 항암작용 등의 생리활성 효능을 탐색한 결과, ethyl acetate 분획물에서 가장 강한 생리활성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 캠벨종 종자의 에탄을 추출물을 극성에 따라 순차분획하여 ethyl acetate 분획물(2000 mg)을 얻었으며 이 분획물로부터 생리활성 화합물 GSE11(278 mg), GSE12(266 mg)을 각각 분리하였다. 한편, GSE11은 셀룰로오스 2D-TLC에서의 R_f 값은 0.27(solvent A), 0.31(solvent B)로 나타났으며 GSE12의 R_f 값은 0.39(solvent A), 0.42(solvent B)이었고, 이들 모두 UV램프에서는 갈색으로 보였으며 발색제에 적색으로 반응하였다. 또한 이들을 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 사용하여 분석한 결과, GSE11은 (-)-epicatechin으로, GSE12는 (+)-catechin으로 확인되었다(Fig. 2).

(+)-Catechin(*trans*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan)

: 화합물의 구조해석을 위해 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행한 결과, proton 2종의 signal이 5.85 ppm과 5.92 ppm에서 검출되었으며 두 개의 doublet은 H-6과 H-8을 나타내는 peak로서 서로



(+)-catechin: $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OH}$, (-)-epicatechin: $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$

Fig. 2. Structure of (+)-catechin and (-)-epicatechin.

meta coupling^o므로 J 값은 2.16 Hz와 2.13 Hz이다. 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 signal을 보이고 있다. 2.50 ppm에서 나타나는 double doublet signal은 H-4의 axial 수소로서 vicinal 수소인 H-3에 의해서 8.14 Hz의 J 값과 geminal 수소인 H-4의 equatorial 수소에 의해서 16.12 Hz의 J 값을 갖는다. 2.84 ppm의 double doublet signal은 H-4의 equatorial 수소로서 역시 vicinal 수소인 H-3에 의해서 5.45 Hz의 J 값과 geminal 수소인 H-4의 axial 수소에 의해서 16.13 Hz의 J 값을 나타내고 있다. 3.97 ppm의 복잡한 peak는 H-3의 수소로서 인접한 H-2와 H-4ax, H-4eq수소에 의해 multiplet을 보이고 있다. 또한 H-2는 H-3과의 coupling으로 4.56 ppm에서 doublet signal을 보이고 있으며 이때 J 값은 7.48 Hz였다. H-2'는 6.83 ppm에서 H-6'과의 coupling으로 doublet signal을 나타내고 있으며 J 값은 meta coupling^o이기 때문에 1.50 Hz이었다. 그리고 H-5'은 H-6'과의 ortho coupling으로 6.76 ppm에서 J 값 8.08 Hz의 doublet signal을 보여주고 있다. 6.71 ppm의 double doublet signal은 H-6'의 peak로서 인접한 H-2'과 H-5'의 영향으로 각각 1.69 Hz, 8.16 Hz의 J 값을 나타내고 있다. 이상은 이 화합물이 catechol B환 형태를 가지고 있음을 보여주고 있다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 분석결과, 28.50 ppm값은 전형적인 flavan-3-ol의 C-4 peak로서 flavonoid가 갖는 carbonyl기가 치환되어 있지 않음을 알 수 있다. 68.80 ppm과 82.83 ppm의 peak들은 각각 C-3과 C-2에 해당되는 것으로서 flavan-3-ol의 C환의 전형적인 signal을 나타내고 있다. B환의 구조는 catechol의 형태로서 146.21 ppm과 146.23 ppm에서 수산기가 결합된 C-3'과 4의 signal이 나타나고 있으며 수산기가 결합되어있지 않은 C-2, C-5 그리고 C-6은 각각 115.24, 116.07, 120.03 ppm에서 나타나고 있다. 이것은 전형적인 catechol B환의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 peak를 보여주고 있다. 또한 phloroglucinol A환의 수산기가 결합되어 있는 C-6과 C-8은 각각 96.27, 95.48 ppm에서 전형적인 peak를 보이고 있으며, 나머지 C-5, C-7 그리고 C-9는 157.81, 157.56, 156.90 ppm에서 나타나고 있다.

(-)-Epicatechin(*cis*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan)

: 이 화합물은 (+)-catechin과 함께 가장 많이 알려진 화합물로서 축합형 탄닌을 구성하는 기본 화합물중의 하나로 그 차이점은 C-2에 치환된 방향환과 C-3에 결합된 수산기가 A 및 C환의 평면에 대해 나란히 뒤로 결합된 cis의 구조를 이루고 있다.

$^1\text{H-NMR}$ 분석을 행한 결과, (+)-catechin과 거의 유사하지만 C-3의 수산기 위치의 차이에 의해 약간 다른 signal을 보였다. 먼저 6.97 ppm에서는 H-2'의 signal^o broad singlet으로 나타나고 있으며 6.89 ppm에서는 H-5'의 signal이 H-6'과의 ortho coupling으로 doublet으로 나타나고 있으며 J 값은 8.23 Hz이었다. 6.75 ppm에서는 H-6'이 broad doublet을 보여주고 있으며 J 값은 8.13 Hz이다. 5.94 ppm과 5.92 ppm에서는 phloroglucinol A환의 H-8과

H-6의 전형적인 signal을 보여주고 있으며 특히 H-2와 H-3은 (+)-catechin과 달리 약간씩 upfield되어 각각 4.81 ppm과 4.17 ppm에서 broad singlet signal을 나타내고 있다. 이것은 H-2와 H-3이 cis형태임을 나타내는 증거이다. 또한 H-4의 axial과 eqatorial 수소는 2.73 ppm과 2.86 ppm에서 double doublet signal을 보이고 있으며 J 값은 axial 수소가 2.38 Hz, 16.77 Hz \circ 이고 eqatorial 수소가 4.48 Hz, 16.80 Hz이다.

^{13}C -NMR 스펙트럼 역시 (+)-catechin과 거의 유사한 형태를 보이고 있다. 먼저 C-4는 29.25 ppm에서 나타나고 있으며 이것은 C-4에 carbonyl기가 결합되어 있지 않음을 보여주고 있다. 특히 79.86 ppm과 67.47 ppm의 signal은 각각 C-2와 C-3의 peak로서 (+)-catechin보다 약간 upfield되어 나타난다. 이것은 2,3-cis형태임을 의미하며 (+)-catechin과 가장 잘 구분되는 signal들이다. 그리고 나머지 signal들은 (+)-catechin과 거의 유사한 형태를 보여주고 있다.

분리물질의 정량 분석

Fig. 3은 캠벨종 포도 종자 ethyl acetate 분획물로부터 분리한 (+)-catechin과 (-)-epicatechin의 HPLC chromatogram을 나타내었다. (+)-catechin의 retention time은 12.99분이었으며, (-)-epicatechin의 retention time은 22.81분이었다. 각 화합물의 함량을 산출한 바, (+)-catechin은 45.7%, (-)-epicatechin은 35.1%의 함량을 나타내었는데, 이 결과는 Ramila 등(18)의 그리스 원산 포도 종자의 각종 폴리페놀 화합물의 함량 결과에서 (+)-catechin과 (-)-epicatechin은 각각 49.8%와 26.0%였다는 보고와 비교할 때 (+)-catechin은 비슷한 함량을 나타내었으나 (-)-epicatechin은 본 연구에서 사용한 포도종자가 더 많이 함유된 것으로 나타났다. 연구결과, 포도종자 ethyl acetate 분획물에서 분리한 (+)-catechin과 (-)-epicatechin의 oligomer인 procyanidin 등의 기타 활성 물질들을 분리하지 못하였으나, 캠벨종 종자 ethyl acetate 분획물이 높은 함량의 (+)-catechin과 (-)-epicatechin을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

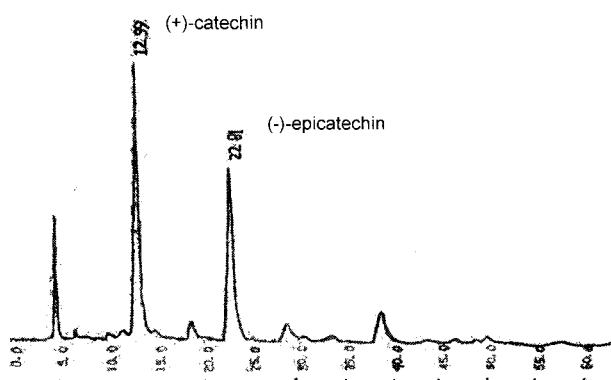


Fig. 3. HPLC chromatogram of (+)-catechin and (-)-epicatechin isolated from *Campbell early* grape seed ethyl acetate fraction at 280 nm.

분리물질의 생리활성 검색

DPPH에 의한 free radical 소거능: Fig. 4는 (+)-catechin과 (-)-epicatechin을 단독 또는 병용 처리 시 free radical 소거 활성을 나타낸 결과이다. (+)-catechin과 (-)-epicatechin 각각의 소거활성은 $RC_{50} = 11.1 \mu\text{g/mL}$ 과 $RC_{50} = 10.4 \mu\text{g/mL}$ 으로 높은 free radical 소거 활성을 나타내었다. 전보(11,12)에서 캠벨종 포도종자 에틸아세테이트 분획물이 높은 free radical 소거능을 나타낸 것은 분획물에 함유되어 있는 폴리페놀 화합물에 의한 것으로 보고하였는데 본 연구결과 포도종자 ethyl acetate 분획물에서 높은 free radical 소거 활성은 (+)-catechin과 (-)-epicatechin에 기인한 것으로 사료된다. Heo 등(19)도 녹차 catechin의 DPPH radical 소거활성이 vitamin E에 비해서 훨씬 높은 효과를 나타냈다고 보고하였다.

지질과산화 억제 효과: Fig. 5는 (+)-catechin과 (-)-epicatechin을 단독 또는 병용 처리 시 지질과산화물을 비교한 것이다. (+)-catechin과 (-)-epicatechin은 포도종자 에탄올

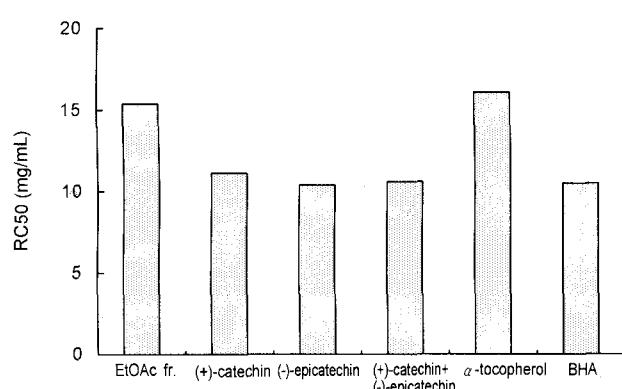


Fig. 4. Free radical scavenging effect of (+)-catechin and (-)-epicatechin isolated from *Campbell early* grape seed ethyl acetate fraction either alone or in combination on DPPH.

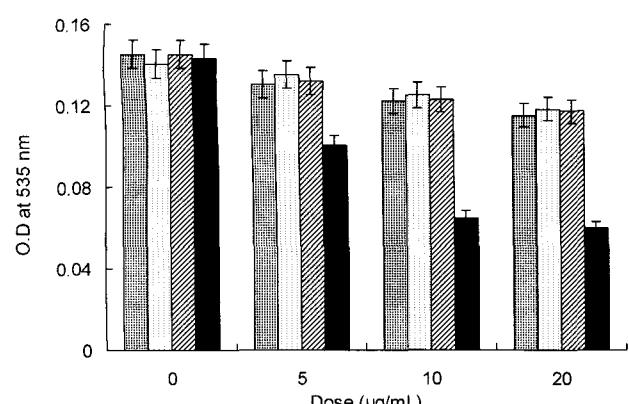


Fig. 5. Effect of lipid peroxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin isolated from *Campbell early* grape seed ethyl acetate fraction either alone or in combination.
 ■ (+)-catechin, □ (-)-epicatechin,
 ▨ (+)-catechin+(-)-epicatechin, ▲ EtOAc fraction.

추출물 ethyl acetate층에 비하여 지질 과산화물 억제효과가 적은 것으로 나타났으며, (+)-catechin과 (-)-epicatechin의 단독 또는 병용 처리 시 free radical 소거 활성에서 차이로 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 지질 과산화물 생성 억제는 free radical 소거 활성과 달리 ethyl acetate 분획물에서 높게 나타나는 것은 (+)-catechin과 (-)-epicatechin보다는 ethyl acetate 분획물에 함유된 다른 물질들의 상호작용에 기인되는 것으로 사료된다. Bonilla 등(20)은 유지류의 저장 중 유지의 산폐방지에 있어서 포도 부산물에 존재하는 gallic acid와 propyl gallate 성분이 BHT 및 BHA 보다 뛰어나다는 것을 보고하였으며, (+)-catechin과 (-)-epicatechin 역시 BHT, BHA와 비슷한 저장기간 연장의 효과를 보여 천연 항산화제로서의 이용가치를 시사한바 있다. 지질과산화물의 억제 및 조절은 노화와 관련된 여러 질병의 예방적 차원에서 고려해 볼 때 현재 포도농가 및 가공업체에서 부산물로 버려지고 있는 포도종자의 기능성식품소재로서 개발은 매우 의미있는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 캠벨종 포도 종자 ethyl acetate 분획물로부터 생리활성 물질을 분리·동정하고 분리물질의 생리활성을 검토하기 위하여 수행되었다. 캠벨종 종자 ethyl acetate 분획물로부터 sephadex LP-20 column chromatography를 이용하여 활성물질을 단리하고 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석을 통하여 (+)-catechin과 (-)-epicatechin을 동정하였다. HPLC를 이용하여 정량 분석한 결과, (+)-catechin은 45.7%의, (-)-epicatechin은 35.1%의 함량을 나타내었으며 이들 화합물이 포도종자 중의 주요한 생리활성물질로 사료된다. 이들 화합물의 단독 또는 병용 처리 시 항산화 활성, 지질과산화 억제 효과 및 자외선 차단 효과를 살펴본 결과, DPPH free radical 소거 활성에서는 (+)-catechin과 (-)-epicatechin 모두가 $\text{RC}_{50}=11.1 \mu\text{g/mL}$ 와 $\text{RC}_{50}=10.4 \mu\text{g/mL}$ 으로 높은 free radical 소거 활성을 나타내었으나, 지질과산화 억제는 (+)-catechin이나 (-)-epicatechin 단독처리보다는 ethyl acetate 분획물에서 훨씬 효과가 좋은 것으로 나타났다.

문 현

- 허준. 1994. 동의보감. 남산당, 서울. p 116, 710.
- 김창민. 1998. 중약대사전. 정답출판사, 서울. 9권, p 5875-5877.
- Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Del Rio JA. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 1738-1745.
- Maffei FR, Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R. 1994. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyandines from *Vitis vinifera*. A mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung* 44: 592-601.
- Vennat B, Gross D, Pourrat H, Pourrat A, Bastide P, Bastide J. 1989. Anti-ulcer activity of procyandins preparation of water-soluble procyandin-cimetidine complexes. *Pharm Acta Helv* 64: 316-320.
- Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ, Bagchi D. 1999. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem* 196: 99-108.
- Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology* 155: 83-90.
- Ray SD, Parikh H, Hickey E, Bagchi M, Bagchi D. 2001. Differential effects of IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a DNA repair modulator 4-aminobenzamide on liver microsomal cytochrome 4502E1-dependent aniline hydroxylation. *Mol Cell Biochem* 218: 27-33.
- Bagchi D, Ray SD, Patel D, Bagchi M. 2001. Protection against drug- and chemical-induced multiorgan toxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Drugs Exp Clin Res* 27: 3-15.
- Kang HC, Lee SH, Kim JB. 2001. Quantification and physicochemical properties of grape seed lipids. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 173-178.
- Park SJ, Lee HY, Park BG, Oh DH. 2002. Screening biological activities of grape seed and skin extracts of Campbell early (*Vitis labruscana* B.). *Nutraceuticals and Food* 7: 231-237.
- Park SJ, Lee HY, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from Campbell early grape (*Vitis labruscana* B.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 115-118.
- Park SJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 121-124.
- Park SJ, Park BG, Lee HY, Oh DH. 2002. Biological activities of ethanol extracts and fractions of black olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Preserv* 9: 338-344.
- Park KH, Park JD, Hyun KH, Nakayama M, Yokota T. 1994. Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci Biotech Biochem* 58: 2240-2243.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
- Cho SY, Taylor LT. 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J Chromatogr A* 849: 117-124.
- Ramila G, Stamatina K, Dimitris PM, Panagiotis K. 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extract: Correlation with antiradical activity. *Food Chem* 89: 1-9.
- Heo MY, Yun YP, Park JB. 2001. Protective effects of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate on reactive oxygen species induced oxidative stress. *J Pharm Soc Korea* 45: 101-107.
- Bonilla F, Mayen M, Merida J, Medina M. 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem* 66: 209-215.

- (2005년 9월 22일 접수; 2005년 11월 28일 채택)