

포도씨유 및 추출물의 카테킨류 측정방법 개선

문성옥 · 이준영 · 김은정¹ · 최상원*

대구가톨릭대학교 식품영양학과, ¹식품의약품안전청 약품규격과

An Improved Method for Determination of Catechin and Its Derivatives in Extract and Oil of Grape Seeds

Sung-Ok Moon, Jun-Young Lee, Eun-Jung Kim¹ and Sang-Won Choi*

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu

¹Division of Drug Standardization, Korea Food and Drug Administration

An improved method in place of a conventional vanillin spectroscopic method (CVSM) was developed for determination of catechin and its derivatives in extract and oil of grape seeds. For the CVSM, grape seed extracts had relatively high catechin content in the range of 17-43% (g/100 g of extract), while grape seed oils had relatively smaller catechin content in the range of 30-40 mg% (mg/100 g of oil). For the improved vanillin spectroscopic method (IVSM) using a polyamide cartridge, catechin content of grape seed extracts was in the range of 4.0-7.5%, while that of grape seed oils was below 5 ppm. Meanwhile, the quantities of catechin and its derivatives were determined by HPLC in the grape seed extracts and oils. Four major catechins [(+)-catechin, procyanidin B₂, (-)-epicatechin, and epicatechin gallate] were detected from grape seed extracts, and the ranges of concentrations were as follows: (+)-catechin, 1.35-2.60%; procyanidin B₂, 0.77-1.36%; (-)-epicatechin, 2.35-4.59%; (-)-epicatechin gallate, 0.06-0.30%. In contrast, four catechins were barely detectable in the grape seed oils. The reproducibility of four major catechins in grape seed extracts, given as coefficient of variation, was below 5%, and the recovery close to above 95%. The achieved detection level of four catechins was 1-5 ppm. Additionally, the contents of catechin compositions in grape seed extract were also determined by HPLC in relation to different cultivars and producing areas. Thus, HPLC method and IVSM using polyamide cartridge can be used as alternative to CVSM for determination of catechin and its derivatives in extract and oil of grape seeds.

Key words: catechins determination, grape seed extract and oil, vanillin spectroscopic method, HPLC

서 론

포도(*Vitis vinifera*)는 당, 유기산 및 독특한 향기를 함유하고 있을 뿐만 아니라 페놀산, flavonoids(flavonols, flavan-3-ols, flavanonols 및 anthocyanins) 및 resveratrol 등 항암, 항고혈압 및 항산화성 페놀화합물을 함유하고 있어 최근 포도주스 및 포도주 등 포도 가공식품의 선호도가 크게 증가하고 있다⁽¹⁻⁵⁾.

한편, 포도씨에는 단백질,식이성섬유소, 식물성스테롤 뿐만 아니라 oleic acid 및 linoleic acid 와 같은 불포화지방산을 다량 함유하고 있으며, 또한 tocopherols 및 catechin류 [(+)-catechin, (-)-epicatechin 및 그들의 oligomeric procyanidins]와 같은 항산화성 페놀물질들을 많이 함유하고 있어 기능

성 신소재로서 각광을 받고 있다⁽⁶⁻⁸⁾. 특히 포도씨의 catechin 류는 항암, 항돌연변이, 항간독, 항고혈압 및 항염증 등 여러 가지 생리적 작용^(9,10)을 지니고 있으며, 아울러 활성산소의 포착제 및 금속착염제로써 지질과산화반응을 효과적으로 억제하는 대표적인 천연항산화물질^(8,11,12)로서 잘 알려져 있다. 반면, catechin류는 포도주스 및 와인 등 포도 가공식품의 관능적인 특성(색상, 향기, 떫은 맛 및 쓴맛 등)에 영향을 줄 뿐만 아니라 산화적 및 효소적 갈변반응에 의해 쉽게 산화되어 품질에 악영향을 미친다⁽¹³⁻¹⁵⁾. 따라서 포도씨추출물 뿐만 아니라 포도 가공식품의 기능적 및 관능적 품질 척도로써 catechin류의 분석은 필수적이다.

지금까지 국외에서는 포도씨 catechin류의 분리 및 동정에 관한 연구⁽¹⁶⁻¹⁹⁾와 더불어 HPLC를 이용한 catechin류의 정량 분석에 관한 많은 연구가 수행되어져왔다⁽²⁰⁻²⁴⁾. Ricardo da Silva 등⁽²⁰⁾은 polyamide column chromatography와 HPLC를 이용하여 포도 및 와인으로부터 catechin monomers [(+)-catechin, (-)-epicatechin 및 (-)-epicatechin 3-O-gallate] 뿐만 아니라, dimeric 및 trimeric procyanidin 성분들을 효과적으로

*Corresponding author : Sang-Won Choi, Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Hayang 712-702, Korea
 Tel: 82-53-850-3525
 Fax: 82-53-850-3504
 E-mail: swchoi@cu.ac.kr

정량분석할 수 있는 방법을 제시한 이후 몇몇 과학자들에 의해 그와 유사한 방법으로 포도씨의 여러 catechin류를 측정한다^(12,21-24) 바가 있다. 그러나 Fuleki 및 Ricardo da Silva⁽²⁴⁾의 보고를 제외한 대부분 연구에서는 포도씨의 catechin 성분을 정확하게 정량분석하기 보다는 그들 성분의 함유 비율을 측정하는 데 지나지 않는다. 그리고 Fuleki 및 Ricardo da Silva⁽²⁴⁾가 제시한 포도씨의 catechin류 정량방법에 있어서도 polyamide column chromatography 실시 중 혼합용매 사용에 따른 분석절차가 복잡한 단점이 있다. 따라서 포도씨의 catechin류를 간단하고 정확하게 정량분석할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

한편, 포도씨의 catechin류의 함량 및 구성성분의 비율은 포도의 품종, 수확시기, 산지 및 가공방법에 따라 상당히 다를⁽²¹⁻²⁴⁾ 뿐만 아니라 catechin류는 추출, 분리 및 정제과정 중에 쉽게 자동산화되어 polymer를 형성하기 때문에 그들의 함량을 정확하게 분석하는 데 어려움이 많다⁽²⁵⁾. 또한, 압착법, 용매추출법 및 초임계 CO₂ 추출법으로 생산된 포도씨유에는 미량의 catechin류 이외 여러 색소, 지방 및 정유성분들이 함께 존재하기 때문에 catechin류를 순수 분리하는 것이 용이하지 않는 실정이다⁽²⁶⁻²⁹⁾. 따라서 포도씨유 및 추출물의 catechin류 함량 분석방법의 개발이 필요하다.

현행 식품공전 및 식품첨가물공전에서 포도씨유 및 추출물의 catechin류 정량분석방법으로 바닐린비색법이 널리 사용되고 있다^(30,31). 이 방법은 flavan-3-ol 화합물의 benzene A-링의 메타-치환체를 지니고 있는 catechin monomers 뿐만 아니라 그의 polymer인 여러 procyanidin 성분들을 특이적으로 발색시키기 때문에 catechin류의 정성 및 정량분석법으로 널리 사용되고 있다^(32,33). 그러나 이 방법에 사용되고 있는 바닐린 시약은 catechin monomer 보다 그것의 polymer를 더욱 강하게 발색시키며, 또한 flavonoid의 벤젠 A-링의 메타-치환체를 지니고 있지 않는 procyanidin 성분과 C-5 탄소에 hydroxyl group 대신에 keto group을 지니고 있는 procyanidin 성분들은 발색시키지 못하는 결점이 있다. 아울러 catechin 성분 이외 고급알코올 성분이나 steroid 및 정유성분의 발색이 가능하다⁽³⁴⁾. 따라서 바닐린비색법은 포도씨의 총 catechin 함량 측정방법으로서는 의의가 있으나 포도씨 catechin 구성성분의 조성 및 비율을 측정하는 방법으로는 부적당하다. 그리고 바닐린비색법으로 catechin 함량을 측정할 경우 시료의 탁도 유무, 추출 용매 종류 및 검량선 작성에 이용되는 catechin의 종류에 따라 catechin 함량이 상당히 차이를 나타낸다^(32,34). 게다가 비색분광법으로서는 포도씨 이외 catechin 성분을 함유하고 있는 녹차, 수수 및 메밀 등 여러 식물추출물을 혼합하여 제조된 여러 기능성 건강보조식품에 있어서 포도씨추출물의 사용여부를 올바르게 판단해 줄 수 없다. 따라서 현재 사용되고 있는 바닐린비색분광법을 개선함과 동시에 보다 신속하고 정확하게 그리고 재현성 있게 포도씨유 및 추출물의 catechin류를 분석할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구는 포도씨유 및 추출물의 품질규격 설정시 기초자료로서 활용하기 위해 현행 식품공전 및 식품첨가물공전에서 catechin 정량분석법으로 이용되고 있는 바닐린비색법의 단점을 보완한 개량형 바닐린비색법의 개발과 더불어 보다 신속하고 정확하며 재현성 있게 포도씨유 및 추출물의 카테

킨류를 분석할 수 있는 HPLC 방법을 개발하였다. 그리고 바닐린비색법, 개량 바닐린비색법 및 HPLC에 의해 측정된 catechin 함량을 비교하였으며, 아울러 개발된 HPLC 방법을 이용하여 품종별 및 산지별 포도씨의 catechin 조성 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에 사용한 이탈리아(올리타리아) 및 스페인(Salamanca)산 포도씨유는 시중에서 구입하였으며, 한국산 포도씨유는 상주모동영농조합에서 생산한 것을 사용하였다. 또한, 포도씨 열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤추출물 제조용 포도는 경상지역에서 생산된 Campbell early, Sheridan, MBA (Muscat bailey A) 및 Gerbong 품종을 사용하였으며, 그 이외에도 영동, 상주 및 김천에서 생산된 Campbell early 품종을 사용하였다.

시약

Catechin류 분석을 위한 (+)-catechin 및 (-)-epicatechin은 Fluka(Büchs, Switzerland), procyanidin B₂ [epicatechin-(4β → 8)-epicatechin] 및 (-)-epicatechin gallate는 Iwai Chemical Co.(Tokyo, Japan), 그리고 o-vanillin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을, 그리고 HPLC용 메탄올 및 acetonitrile은 Merck(Darmstadt, Germany) 제품을 각각 사용하였으며, 그 이외 시약은 특급 또는 1급 시약을 사용하였다.

또한, 시료 전처리용 polyamide cartridge는 polyamide C-200(75~150 μm, Wako Pure Ind. Ltd. Osaka, Japan)를 Alltech vacuum manifolds에 장착하여 사용하였다. 또한 HPLC 분석용 C₁₈ 이외 8가지 Sep-Pak cartridge는 Alltech (Deerfield, IL, USA) 제품을, 0.45 μm membrane filter (Supor-450)는 Pall 사(USA)것을, 그리고 3가지 다른 analytical reversed phase HPLC column은 ODS-5(Nomura, Japan), μBondapak C₁₈(Waters, USA) 및 Pro C₁₈(YMC, USA)을 각각 사용하였다.

포도씨추출물 조제

포도 과즙과 과피를 제거한 Campbell early 포도씨만을 분리하여 수세 건조한 후 분말화하여 열수, 에탄올, 메탄올 및 75% 수용성 아세톤 용액으로 상온에서 2시간 동안 ultrasonic cleaner(Bransonic 5210R-DTH, USA)에서 2회 추출한 후 여과 및 감압·농축하여 열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤 분말추출물을 각각 얻었다.

바닐린비색법에 의한 포도씨유 및 추출물의 catechin류 정량

바닐린비색법에 의한 포도씨유 및 추출물의 catechin 함량은 식품공전⁽³⁰⁾에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 먼저 포도씨유 0.2 g을 test tube에 넣고 메탄올 10 mL을 가한 후 voltex mixer로 4분간 잘 혼합시킨 다음 3000 rpm에서 1시간 원심분리(Brushless D.C Motor Centrifuge VS-4000, Vision Sci. Co., LTD, Korea)하여 얻어진 상층액을, 그리고 포도씨

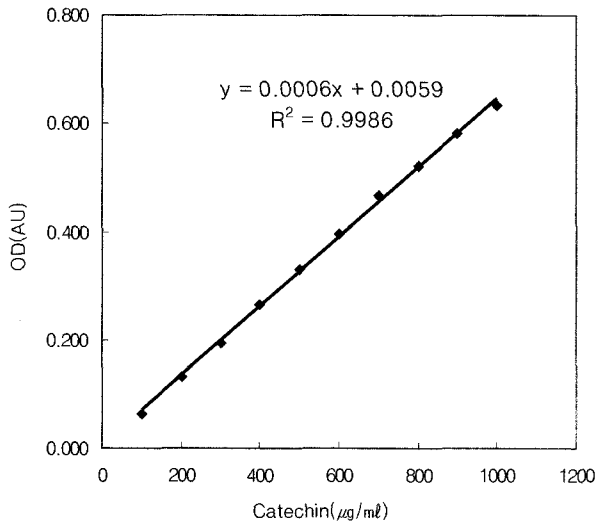


Fig. 1. Calibration curve of (+)-catechin by vanillin spectroscopic method.

추출물(열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤) 0.2 g에 80% 수용성 메탄올 100 mL을 가하여 녹인 후 여과하여 얻어진 여액을 각각 바닐린비색법 시험용액으로 사용하였다. 다음, 포도씨유 및 추출물로부터 얻어진 시험용액 각각 1 mL에 발색시약 (*o*-vanillin 1 g을 메탄올 100 mL에 용해시키고 따로 메탄올의 8%가 되도록 진한 염산을 혼합하여 시험전에 vanillin 용액 과 염산용액을 1:1로 혼합한 것) 5 mL를 넣고 30°C에서 20 분간 반응시킨 후 UV/vis spectrophotometer(Digital ultraviolet spectrophotometer Cecil, cambridge, UK)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액 [(+)-catechin을 메탄올에 녹여서 100~1,000 μg/mL로 한 것]은 위와 동일한 방법으로 실시하여 검량선(Fig. 1)을 작성한 후 시험용액중의 catechin 농도(μg/g)를 구한 후 다음 식에 따라 시료중의 catechin 함량(mg/100 g)을 구하였다. 이때 모든 data는 3회 반복하여 측정된 값을 평균하여 나타내었다.

$$\text{Catechin 함량 (mg/100 g)} = C \times (V \times N / W) \times 10 / 100$$

C: 시험용액중의 카테킨의 농도 (μg/g)

W: 시료채취량 (g)

V: 시험용액의 전량 (mL)

N: 시험용액의 희석배수

개량 바닐린비색법에 의한 포도씨유 및 추출물의 catechin 류 정량

포도씨유 및 추출물의 catechin 함량을 바닐린비색법으로 측정할 때 catechin 함량 산출에 큰 영향을 미치는 미확인 다량의 polymeric procyanidin 성분 및 갈변물질을 배제하기 위해 위에서 얻어진 포도씨유 메탄올추출물 및 4가지 포도씨 추출물을 polyamide cartridge에 통과시켰다. 즉, 포도씨유 메탄올추출물 및 포도씨추출물 각 1 mL를 증류수(4 mL)로 희석한 후 미리 20% 수용성메탄올 용액으로 평형화시켜 놓은 polyamide vacuum manifolds(1.5 g, 1×4 cm)에 흡착시킨 후 같은 용액(20 mL)으로 먼저 수세한다. 다음 80% 수용성 메

Table 1. HPLC conditions for determination of catechin contents in grape seed oils and extracts

| Item | Operation condition |
|------------------|---|
| HPLC | Gilson 506B HPLC system equipped with 170 UV-vis detector and 231XL autosampler |
| Column | YMC-Pack Pro C18 (5 μm, 4.6 I.D. × 250 mm, YMC Inc., USA) |
| Mobile phase | Linear gradient elution from solvent A (4.5% formic acid in H ₂ O) to solvent B (90% CH ₃ CN containing 10% solvent A) for 50 min |
| Detection | UV _{280 nm} |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Sensitivity | 0.01 AUFS |
| Injection volumn | 10 μL |
| Temperature | 30°C |

탄올용액(50 mL)으로 흡착된 catechin류를 용출시킨 다음 농축하여 10 mL로 정용한 것을 개량 바닐린비색법 시험용액으로 사용하여 위의 방법에 따라 catechin 함량을 측정하였다.

HPLC에 의한 포도씨유 및 추출물의 catechin류 정량분석

HPLC에 의한 포도씨유 및 포도씨의 열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤추출물의 catechin류 정량분석은 Ricardo da Silva의 방법⁽²⁰⁾을 변형하여 다음과 같이 실시하였다.

(1) 시료용액의 조제: 포도씨유 0.2 g에 MeOH 10 mL를 가한 후 ultrasonic cleaner에서 1시간 동안 추출한 후 원심분리 (3,000 rpm, 1시간)하여 얻은 상층액을 rotary evaporator로 농축한 다음 다시 추출물을 MeOH로 용해하여 얻은 1 mL를 0.45 μm membrane filter에 통과시킨 후 HPLC 분석에 이용하였다. 다음, 4가지 포도씨추출물 0.2 g을 80% 수용성메탄올로 용해시킨 후 100 mL로 정용하였다. 이 중 2.0 mL에 초순수 6.0 mL를 가하고 미리 20% 수용성메탄올용액으로 평형화시켜 놓은 polyamide cartridge에 흡착시킨 후 같은 용액 (20 mL)으로 수세한다. 다음, 80% 수용성메탄올용액(50 mL)으로 흡착된 catechin류를 용출시킨 다음 농축한 후 여기에 내부표준물질로서 catechol(catechol 0.2 mg을 MeOH 1 mL에 녹인 액) 1 mL와 MeOH 1 mL 혼합액을 가하여 용해한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 Table 1의 조건에서 HPLC로 분석하였다.

(2) 표준검량선 작성: 4가지 표준물질, (+)-catechin, procyanidin B₂, (-)-epicatechin, 및 (-)-epicatechin gallate 각 10 mg을 MeOH 10 mL에 용해시켜 stock solution으로 하였으며, 내부표준물질은 catechol을 사용하였다(Fig. 2). 두 표준액을 일정량씩 취하고 MeOH를 가하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 mg/mL가 되게 조정 한 후 HPLC를 행하여 검량선(Fig. 3)을 작성하였다. 그리고 회수 실험을 위해 포도씨 메탄올 추출물 0.2 g을 80% 수용성메탄올로 용해한 후 100 mL로 정용하였다. 이 액 10 mL씩을 3개 취하여 MeOH 0.2 mL, MeOH 0.1 mL와 5가지 표준물질(0.2 mg/10 mL MeOH) 용액 0.1 mL의 혼합액, 그리고 표준물질(0.2 mg/10 mL MeOH) 용액 0.2 mL를 각각 가하여 polyamide cartridge에 loading한 후 위와 같

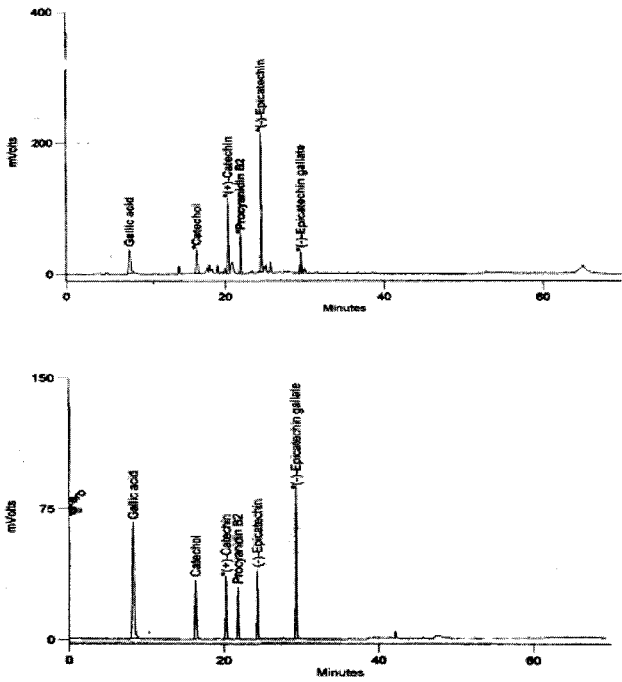


Fig. 2. HPLC chromatogram of methanol extract from Campbell early grape seed and catechin standards. A, methanol ext.; B, catechin standards.

은 방법으로 실시하여 4가지 catechin 화합물의 회수율을 각각 구하였다.

Table 2. Yield of grape seed extracts prepared with four different solvents¹⁾

| Extract | Yield (%) |
|---------------|------------|
| Boiling water | 8.8 ± 0.73 |
| Ethanol | 7.9 ± 0.54 |
| Methanol | 8.6 ± 0.51 |
| Acetone | 9.7 ± 0.91 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

결과 및 고찰

포도씨 용매추출물의 수율

포도씨 용매추출물의 catechin 함량을 바닐린비색법 및 HPLC로 정량하기 전에 4가지 용매추출물의 수율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 포도씨 용매추출물 중 75% 수용성 아세톤추출물의 수율이 9.7%로서 가장 높았으며, 그 다음으로 열수추출물(8.8%), 메탄올추출물(8.6%), 및 에탄올추출물(7.9%) 순으로 나타났다. 이러한 결과는 포도씨의 catechin 성분 중 거의 대부분을 차지하고 있는 polymeric proanthocyanidin 성분이 75% 수용성아세톤에 잘 추출된다는 전보의 연구결과⁽²⁰⁾와 일치하는 경향을 나타내었다.

HPLC에 의한 포도씨추출물의 catechin류 분석

포도씨 추출물을 polyamide cartridge로 정제한 후 HPLC를 실시한 결과 Fig. 4와 같이 polyamide cartridge를 사용하지 않을 때(Fig. 5) 보다 안정한 base line을 갖는 매우 양호

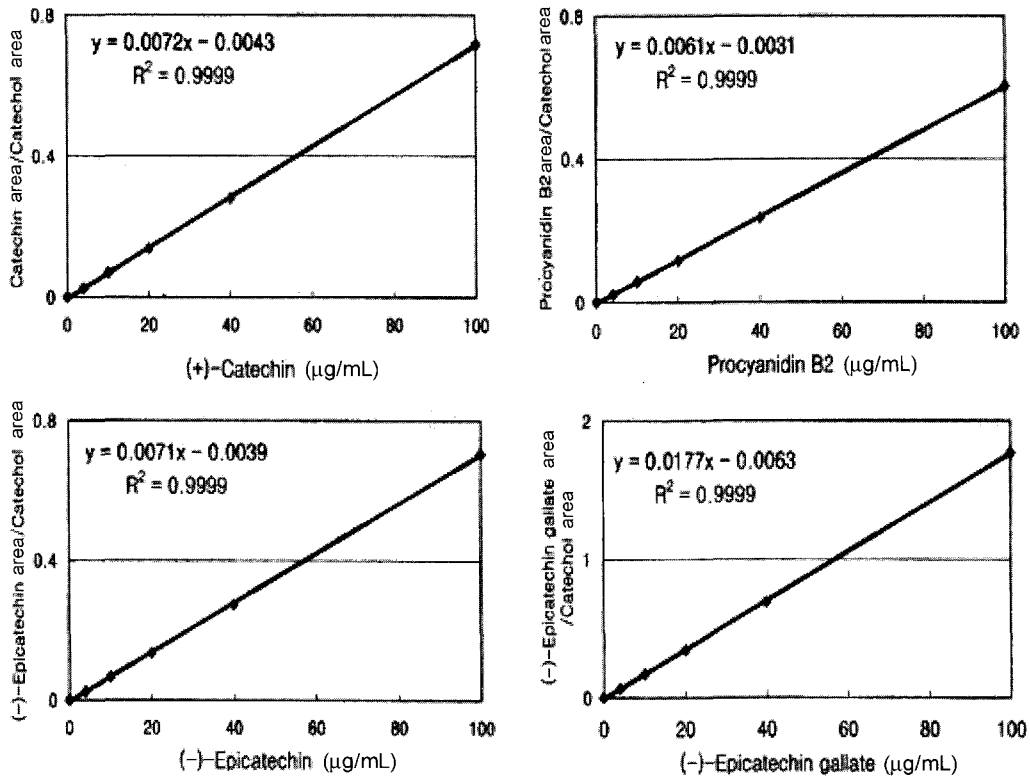


Fig. 3. Calibration curve of four catechin derivatives by HPLC method.

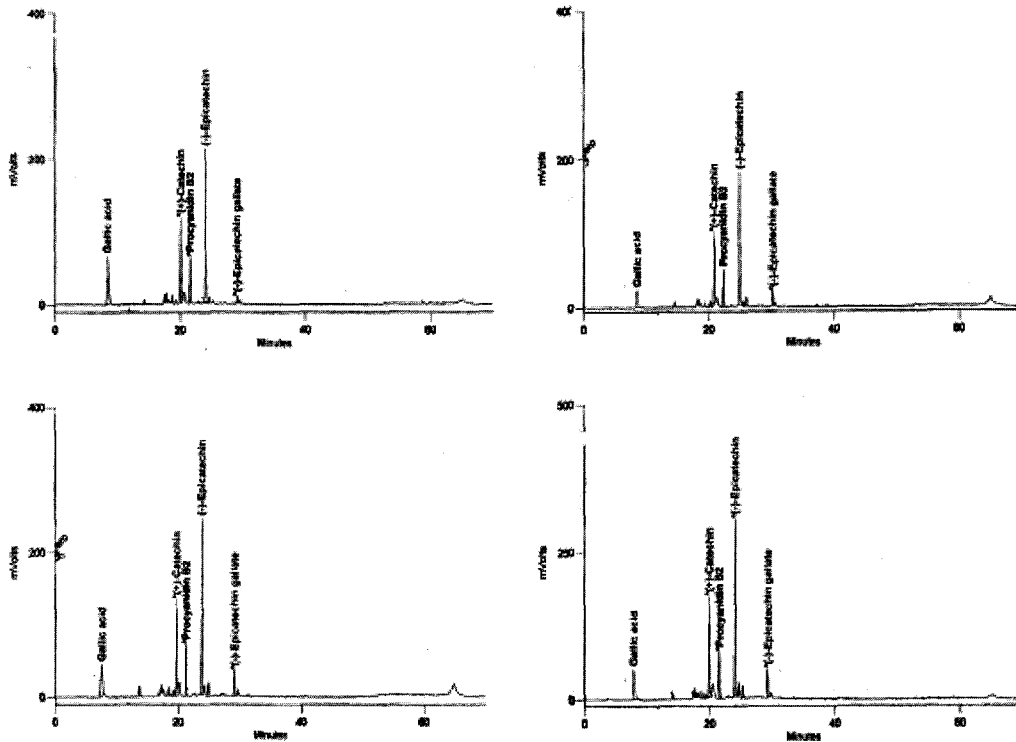


Fig. 4. HPLC chromatogram of catechin derivatives in hot water, ethanol, methanol and 75% acetone extracts (80% aqueous methanol eluate from the polyamide cartridge) from Campbell early grape seed. A, hot water ext.; B, ethanol ext.; C, methanol ext.; D, 75% acetone ext.

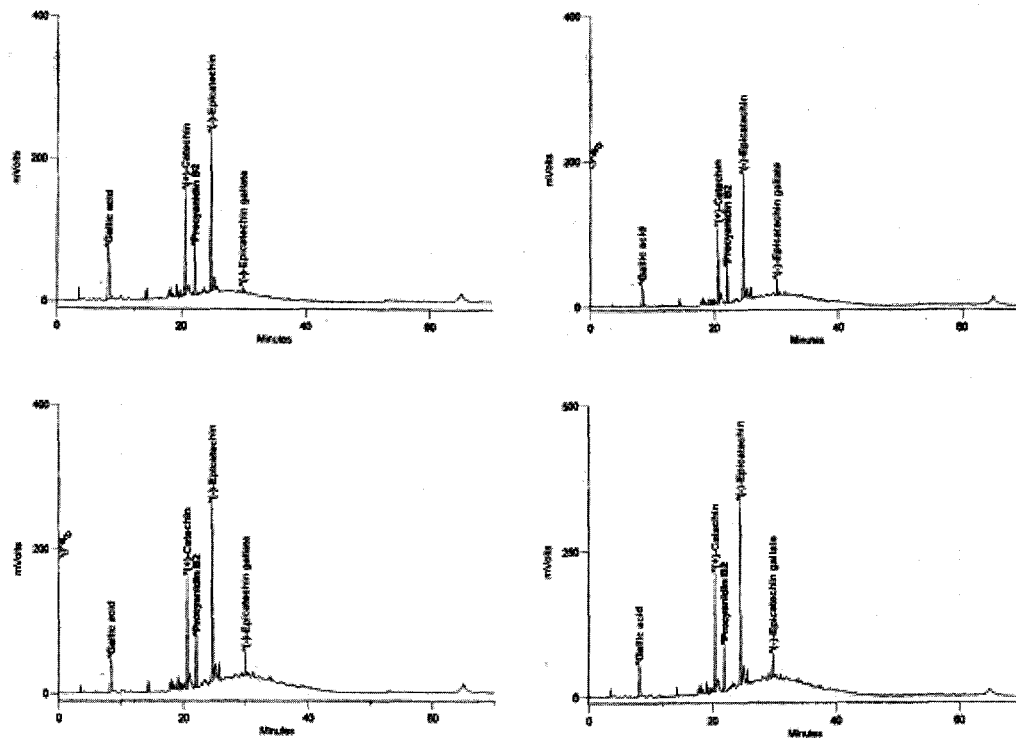


Fig. 5. HPLC chromatogram of catechin derivatives in hot water, ethanol, methanol and 75% acetone extract from Campbell early grape seeds. A, hot water ext.; B, ethanol ext.; C, methanol ext.; D, 75% acetone ext.

한 분리패턴을 나타내었다. 그리고 이때 4가지 catechin 성분의 회수율을 구하기 위해 각 catechin 성분을 포도씨 메탄올

추출물에 첨가하여 앞의 실험방법에 따라 polyamide cartridge를 통과시킨 후 HPLC 실시하였다. 그 결과 Table 3에서 보

Table 3. Recovery rate and detection threshold of four catechin derivatives (80% aqueous methanol eluate from the polyamide cartridge) in methanol extract from Campbell grape seed by HPLC¹⁾

| Catechins | Before addition (mg/100 g) | Added amount (mg/100 g) | After addition (mg/100 g) | Recovery (%) | Detection threshold (mg/L) |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|----------------------------|
| (+)-Catechin | 210 | 495 | 687 | 97.5 | 1~5 |
| Procyanidin B ₂ | 110 | 250 | 346 | 96.0 | 1~5 |
| (-)-Epicatechin | 321 | 583 | 918 | 101.5 | 1~5 |
| (-)-Epicatechin gallate | 26 | 567 | 568 | 95.7 | 1~3 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses. Standard deviations are omitted for simplicity.

Table 4. Reproducibility of four catechins quantification in methanol extract from Campbell grape seeds by HPLC¹⁾

| Catechins | Retention time (min) | Average area | Corresponding amount (g/100 g) | Standard deviation | Variation coefficient (%) |
|----------------------------|----------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------|
| (+)-Catechin | 20.50 ± 0.001 | 1997002 ± 11956 | 1.899 | 0.0113 | 1.2 |
| (-)-Epicatechin | 24.53 ± 0.014 | 3437743 ± 19502 | 3.312 | 0.0188 | 1.1 |
| (-)-Epicatechin gallate | 29.65 ± 0.001 | 583662 ± 4433 | 0.227 | 0.0017 | 1.5 |
| Procyanidin B ₂ | 21.98 ± 0.007 | 1059211 ± 68116 | 1.189 | 0.0243 | 4.1 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

Table 5. Comparison of catechin contents in three different grape seed oils available in Korean market by conventional vanillin- and improved vanillin-spectroscopic, as well as HPLC methods¹⁾

| Products | Catechin content (mg/kg oil) | | |
|----------|--|--|---------------------------|
| | Conventional vanillin spectroscopic method | Improved vanillin spectroscopic method ²⁾ | HPLC method ³⁾ |
| Korea | 323.56 ± 55.20 | Tr ⁴⁾ | Tr ³⁾ |
| Spain | 356.78 ± 70.45 | Tr | Tr |
| Italy | 391.67 ± 117.86 | Tr | Tr |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

²⁾Catechin content was determined by vanillin spectrophotometric method using polyamide cartridge.

³⁾(+)-Catechin+procyanidin B₂+(+)-epicatechin+(+)-epicatechin gallate.

⁴⁾Trace (<5 mg/kg).

는 바와 같이 포도씨의 4가지 주된 catechin 성분의 회수율은 모두 95%이상으로 양호하였으며, 검출한계는 1~5 mg/kg (건조 포도씨 기준)을 나타내었다. 그리고 4가지 화합물의 variation coefficient는 5% 내외로서 매우 양호한 재현율을 나타내었다(Table 4). 이와같이 polyamide cartridge는 포도씨의 catechin 성분을 HPLC로 정량분석할 때 HPLC chromatogram의 base line 안정화에 방해되는 물질을 제거하는 데 유효할 뿐 아니라 포도씨추출물의 주된 페놀성분으로 알려진 미지의 polymeric proanthocyanidin 성분을 제거하는데도 효과적이다. 따라서 바닐린비색법이나 HPLC 방법에 의한 포도씨 추출물의 catechin 성분을 정량분석하기 위해서는 조추출물을 polyamide cartridge에 통과시키는 것이 필요하며, 이는 포도 및 와인의 catechins 정량분석시 polyamide column을 사용한 Ricardo da Silva의 결과⁽²⁰⁾와 유사하였다.

바닐린비색법, 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법에 의한 포도씨유의 catechin 함량 측정

먼저 시중에 유통되고 있는 포도씨유의 catechin 함량을 바닐린비색법, 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법으로 측정할 결과는 Table 5와 같다. 비색법으로 측정된 포도씨유의 총

catechin 함량은 300~400 mg/kg 범위로서 포도씨유 종류에 따라 별로 차이가 없었으며, 현재 식품공전상에서 표시된 포도씨유 규격(30.0 mg/kg 이상)에 적합하였다. 그러나 바닐린비색법으로 포도씨유의 catechin 함량을 측정할 때는 포도씨유의 catechin을 추출하는 용매종류와 기름을 분리하기 위해 사용하는 원심분리방법 및 시료의 탁도 유무에 따라 catechin 함량이 다소 큰 차이를 나타내었다. 다음, 포도씨유 메탄올 추출물을 polyamide cartridge에 통과시킨 후 바닐린비색법으로 catechin 함량을 측정(이하 개량 바닐린비색법으로 칭함)한 결과 바닐린비색법과 달리 3종류의 포도씨유 모두 catechin 함량이 미량(5 ppm 이하)으로 나타났다. 한편, HPLC에 의한 포도씨유의 catechin류를 정량분석한 결과 3가지 포도씨유 모두 포도씨의 주된 4가지 catechin 성분은 거의 확인할 수 없었다. 이와같이 polyamide cartridge를 사용한 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법으로는 포도씨유의 catechin 함량이 거의 미량으로 측정된 데 비해 바닐린비색법에서는 상당히 많은 양의 catechin 성분이 측정된 것은 포도씨유의 메탄올추출물에 포도씨의 주된 catechin류로서 바닐린 발색에 크게 관여하는 미량의 미확인 polymeric procyanidin 성분이 polyamide cartridge에 흡착되었기 때문으로 생각된다^(12,19). 따라서 포도

Table 6. Comparison of catechin contents in boiling water, ethanol, methanol and acetone extract powders from Campbell early grape seeds by conventional vanillin- and improved vanillin-spectroscopic as well as HPLC methods¹⁾

| Extract | Catechin contents (g/100 g extract powder) | | |
|---------------|--|--|---------------------------|
| | Conventional vanillin spectroscopic method | Improved vanillin spectroscopic method ²⁾ | HPLC method ³⁾ |
| Boiling water | 16.93 ± 1.77 | 6.17 ± 0.82 | 5.90 ± 0.013 |
| Ethanol | 24.26 ± 2.47 | 5.12 ± 0.12 | 4.60 ± 0.039 |
| Methanol | 32.09 ± 1.53 | 7.88 ± 0.31 | 6.91 ± 0.009 |
| Acetone | 42.76 ± 4.83 | 8.98 ± 0.42 | 8.85 ± 0.015 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

²⁾Catechin content was determined by vanillin spectrophotometric method using polyamide cartridge.

³⁾(+)-Catechin+procyanidin B₂+(-)-epicatechin+(-)-epicatechin gallate.

Table 7. Comparison of four catechins contents in boiling water, ethanol, methanol and acetone extract powders from Campbell early grape seeds by HPLC analysis¹⁾

| Extract | Contents (g/100 g dry powder) | | | |
|---------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|
| | (+)-Catechin | Procyanidin B ₂ | (-)-Epicatechin | (-)-Epicatechin gallate |
| Boiling water | 1.72 ± 0.017 | 1.10 ± 0.002 | 3.02 ± 0.012 | 0.06 ± 0.004 |
| Ethanol | 1.35 ± 0.055 | 0.77 ± 0.011 | 2.35 ± 0.081 | 0.13 ± 0.008 |
| Methanol | 1.96 ± 0.014 | 1.19 ± 0.005 | 3.53 ± 0.031 | 0.23 ± 0.001 |
| Acetone | 2.60 ± 0.021 | 1.36 ± 0.006 | 4.59 ± 0.033 | 0.30 ± 0.002 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

씨와 같이 미지의 polymeric procyanidin 성분을 다량 함유하고 있는 시료를 바닐린비색법으로 정량할 때는 가능한 polyamide cartridge를 사용하여 미지의 polymeric procyanidin 성분들은 흡착시키고 측정 가능한 catechin monomers 및 그들의 procyanidin 성분들을 용출하여 정량하는 것이 바람직하다고 사료된다.

또한, 품종별 및 추출방법에 따라 달리 얻어진 포도씨유의 catechin 함량을 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법으로 측정한 결과 포도씨유의 catechin 함량은 위의 결과와 유사하게 거의 미량으로 존재함을 확인할 수 있었다⁽³⁵⁾. 이와같이 전보⁽³⁵⁾에서 실시한 포도씨유의 TLC 결과와 polyamide cartridge를 이용한 개량 바닐린비색법 및 HPLC 결과로부터 포도씨유에는 catechin 성분이 거의 함유되어 있지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 현행 식품공전에서 사용되고 있는 바닐린비색법에 의한 포도씨유 catechin 함량 분석은 품질 규격 사항으로 제외되는 것이 바람직하다고 생각된다.

바닐린비색법, 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법에 의한 포도씨추출물의 catechin 함량 측정

먼저 포도씨의 4가지 용매(열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤)추출물의 catechin 함량을 바닐린비색법, 개량 바닐린비색법 및 HPLC 방법으로 각각 측정한 결과는 Table 6과 같다. 먼저 바닐린비색법으로 측정한 포도씨추출물의 catechin 함량을 보면 아세톤추출물(42.76%, 추출물 기준)이 가장 높았으며, 그 다음으로 메탄올추출물(32.09%), 에탄올추출물(24.26%) 및 열수추출물(16.93%) 순으로 나타났다. 다음, 개량 바닐린비색법에 의해 catechin 함량을 측정한 결과 아세톤추출물(8.98%)이 가장 높았으며, 그 다음으로 메탄올추출물(7.88%), 열수추출물(6.17%) 및 에탄올추출물(5.12%) 순으로 나타났다.

이와같이 바닐린비색법 측정 결과와 달리 개량 바닐린비색법으로 측정한 4가지 포도씨추출물의 catechin 함량은 앞의 포도씨유와 유사하게 크게 감소하였으며, 아울러 열수추출물의 catechin 함량은 오히려 에탄올추출물 보다 높은 것을 알 수 있었다. 한편, HPLC 방법으로 포도씨 추출물의 catechin 함량을 측정한 결과 아세톤추출물(8.85%)이 가장 높았으며, 그 다음으로 메탄올추출물(6.91%), 열수추출물(5.90%) 및 에탄올추출물(4.60%) 순으로 나타나 개량 바닐린비색법과 HPLC 방법으로 측정한 catechin 함량은 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. Escribano-Bailon 등⁽²²⁾과 Fuleki 및 Ricardo da Silva⁽²⁴⁾는 포도씨에는 pentamer 이상의 미확인 polymeric procyanidin 성분이 총 catechin 함량의 60% 이상 차지하고 있으며, 이들 성분들은 polyamide resin에 효과적으로 흡착될 수 있음을 보고하였다. 또한, polyamide resin은 포도씨의 산화 갈변생성물을 잘 흡착한다⁽³⁵⁾. 따라서 이러한 결과로부터 polyamide cartridge는 포도씨의 주된 catechin 성분으로 알려진 미지의 polymeric procyanidin 성분 뿐만 아니라 포도씨추출물의 제조 과정에서 catechin 성분의 자동산화에 의해 생성된 갈변색소 성분을 효과적으로 흡착하여 실질적으로 측정 가능한 포도씨의 catechin 성분을 정량하는 데 유효함을 알 수 있었다.

다음, HPLC에 의한 포도씨추출물(열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤)의 4가지 주된 catechin류 조성 함량을 측정한 결과는 Table 7과 같다. 4가지 catechin 성분 중 (-)-epicatechin 성분 함량(2.35~4.59%)이 가장 높았으며, 그 다음으로 (+)-catechin(1.35~2.60%), procyanidin B₂(0.77~1.36%) 및 (-)-epicatechin gallate(0.06~0.30%) 순으로 나타났다. 이러한 결과는 포도씨의 catechin 조성은 품종 따라 다르나 보통 3가지 주된 catechin monomers [(+)-catechin, (-)-epicatechin 및 (-)-epicatechin gallate]와 procyanidin B₂가 차지하고 있다는 보고⁽²²⁻²⁴⁾

Table 8. Contents of four catechin derivatives in methanolic extracts from seeds of four different grape cultivars by HPLC analysis¹⁾

| Cultivar | Contents (g/100 g dry base) | | | |
|----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|
| | (+)-Catechin | Procyanidin B ₂ | (-)-Epicatechin | (-)-Epicatechin gallate |
| Campbell | 0.211 ± 0.0205 | 0.111 ± 0.0081 | 0.322 ± 0.0134 | 0.026 ± 0.0057 |
| Gerbong | 0.928 ± 0.0184 | 0.201 ± 0.0020 | 0.645 ± 0.0163 | 0.046 ± 0.0035 |
| Sheridan | 0.313 ± 0.0028 | 0.130 ± 0.0035 | 0.305 ± 0.0028 | 0.012 ± 0.0014 |
| MBA | 0.120 ± 0.0064 | 0.039 ± 0.0014 | 0.171 ± 0.0078 | 0.024 ± 0.0011 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

Table 9. Contents of catechin derivatives in methanolic extracts from seeds of Campbell early grape harvested in different areas in Korea¹⁾

| Area | Contents (g/100 g day base) | | | |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|
| | (+)-Catechin | Procyanidin B ₂ | (-)-Epicatechin | (-)-Epicatechin gallate |
| Youngdong | 0.229 ± 0.0085 | 0.140 ± 0.0010 | 0.387 ± 0.0021 | 0.032 ± 0.0011 |
| Gimcheon | 0.197 ± 0.0084 | 0.101 ± 0.0073 | 0.366 ± 0.0023 | 0.028 ± 0.0057 |
| Gyeongsan | 0.211 ± 0.0205 | 0.110 ± 0.001 | 0.322 ± 0.0134 | 0.026 ± 0.0057 |
| Sangju | 0.222 ± 0.0071 | 0.140 ± 0.001 | 0.396 ± 0.0028 | 0.029 ± 0.0064 |

¹⁾All data are means of triplicate analyses.

와 유사하였다.

한편, 포도씨 메탄올추출물을 polyamide column chromatography를 실시할 경우 40% 수용성메탄올 용액(용출용매로서)으로부터 catechin monomers가, 80% 수용성메탄올용액으로부터 dimeric 및 trimeric procyanidins이, 그리고 75% 수용성 아세톤 용액으로부터 polymeric procyanidins이 각각 용출됨을 선행 연구결과⁽²⁴⁾와 비교분석을 통해 알 수 있었다⁽³⁵⁾. 그런데 여기서 75% 수용성 아세톤 용액으로 용출된 polymeric procyanidin 성분들은 아직까지 국외에서도 확인되지 않은 미지의 catechin 성분이기 때문에 본 연구에서는 제외하였으며, 다만 80% 수용성메탄올에 용출되는 포도씨의 3가지 주된 catechin monomers 및 dimeric procyanidin B₂ 성분만 HPLC로 정량 분석을 실시하였다.

품종별 및 산지별 포도씨 메탄올추출물의 4가지 주된 catechin류 조성 함량 측정

HPLC에 의한 포도 품종별 및 산지별 포도씨 메탄올추출물의 4가지 주된 catechin류 조성 함량을 측정한 결과는 Table 8 및 Table 9와 같다. 먼저 품종별 포도씨 메탄올추출물의 catechin 조성을 보면 Gerbong과 Sheridan은 (+)-catechin 함량이 각각 0.928% 및 0.313%로 가장 높고 다음 (-)-epicatechin 함량이 높았다. 반면, Campbell과 MBA는 (-)-epicatechin 함량이 각각 0.322% 및 0.171%로 (+)-catechin 함량(0.211% 및 0.12%)보다 높았다. 그 외 procyanidin B₂ 및 (-)-epicatechin gallate의 함량은 (+)-catechin 및 (-)-epicatechin 함량에 비해 상대적으로 낮았다. 이와같이 포도 품종마다 4가지 catechin류 조성 및 그 함량이 다름을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 포도씨의 주된 catechin 성분이 포도 품종에 따라 상이하다는 전보의 연구결과⁽²²⁻²⁴⁾와 유사하였다.

다음, HPLC에 의한 산지별 캠벨 포도씨 메탄올추출물의 4가지 주된 catechin류 조성 함량을 측정한 결과는 Table 9와 같다. 캠벨 포도 산지별 포도씨 메탄올추출물의 catechin 조

성을 보면 4개 지역별 동일하게 (-)-epicatechin 함량(0.322~0.396%)이 가장 높았으며, 그 다음으로 (+)-catechin(0.197~0.229%), procyanidin B₂(0.101~0.140%) 및 (-)-epicatechin gallate(0.026~0.032%) 순으로 나타났다. 이와같이 포도 산지별 4가지 catechin류 조성 및 그 함량은 앞서 품종별과는 달리 크게 차이가 나지 않음을 알 수 있었다.

이러한 결과를 종합해볼 때 포도씨유 및 포도씨추출물의 catechin 함량을 단순히 바닐린비색법으로 측정할 때는 포도씨에 대부분 차지하고 있는 미지의 polymeric proanthocyanidin 성분이 발색에 크게 관여하여 catechin 함량이 과다하게 산출되는 모순이 있다. 따라서 포도씨에 다량 존재하는 미지의 polymeric proanthocyanidin 성분과 갈변색소를 제거하는데 유효한 polyamide cartridge를 사용한 개량 바닐린비색법이나 HPLC 방법으로 보다 실질적인 포도씨의 catechin 함량 및 그 조성을 측정하는 것이 바람직하다. 그리고 포도씨의 catechin 성분과 유사한 catechin 성분을 함유하고 있는 다른 식품(녹차, 수수, 메밀, 콩, 사과 및 배 등)추출물을 포도씨추출물에 첨가했을 때 바닐린비색법으로는 실질적으로 포도씨추출물의 혼합 여부를 판단할 수 없다. 그러나 HPLC 방법을 사용하면 그 문제를 해결할 수 있다. 즉, HPLC 방법에 의하면 포도씨에는 두 가지 주된 catechin 성분 [(+)-catechin 및 (-)-epicatechin]이 다량으로 비슷한 비율로 존재하며, 아울러 (-)-epicatechin gallate 및 procyanidin B₂ 성분이 함께 함유되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 catechin 함유 식품으로 잘 알려진 수수, 보리 및 메밀은 (+)-catechin 성분이 주체로 되어 있는 반면, 녹차의 catechin 성분은 거의 대부분 (-)-epicatechin과 그 유도체로 구성되어 있기 때문에 쉽게 HPLC 분석을 통해 포도씨 추출물의 존재 여부를 확인하거나 구별해 낼 수 있다⁽³⁵⁾.

이와같이 본 연구에서 제시된 개량 바닐린비색법은 현행 바닐린비색법의 단점을 개선할 수 있으며, 나아가 HPLC 방법을 통하여 보다 신속하고 정확하게 catechin 함량을 정량

할 수 있었기에 이 두 가지 방법은 현행 식품공전 및 식품첨가물공전에서 포도씨유 및 추출물의 catechin 정량방법으로 사용되고 있는 바닐린비색법을 대체할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 특히 본 연구에서 정립된 HPLC에 의한 포도씨 catechin 정량분석 방법은 향후 포도씨 관련 기능성식품의 품질 규격 설정이나 품질 관리체계 시스템 구축에 필요한 기초자료로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

현재 식품공전 및 식품첨가물 공전에서 포도씨유 및 추출물의 catechin 함량 측정방법으로 널리 사용되고 있는 바닐린비색법을 polyamide cartridge를 사용함으로써 개선하였고 보다 정확하며 재현성 있게 catechin 함량을 측정할 수 있는 HPLC 방법을 개발하였다. 포도씨유 및 용매(열수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤)추출물의 catechin 함량을 바닐린비색법으로 측정된 결과 각각 30~40 mg% (g/포도씨유 100 g) 및 17~43%(g/추출물 100 g) 범위를 차지하였다. 반면, polyamide cartridge를 사용한 개량 바닐린비색법으로 위의 포도씨유 및 추출물의 catechin 함량을 측정된 결과 각각 미량(1~5 ppm) 및 4.0~7.5% 차지하였다. 한편, HPLC 방법으로 포도씨유의 catechin 함량을 측정된 결과 포도씨의 주된 4가지 catechin 성분[(+)-catechin, procyanidin B₂, (-)-epicatechin 및 (-)-epicatechin gallate]은 거의 확인할 수 없었다. 그러나 포도씨 용매추출물의 catechin 함량을 측정된 결과 4가지 주된 catechin 성분을 확인할 수 있었으며, 그 중 (+)-catechin 및 (-)-epicatechin 함량이 각각 1.35~2.60% 및 2.35~4.59% 범위로서 상당히 높은 반면, procyanidin B₂ 및 (-)-epicatechin gallate 함량은 각각 0.77~1.36% 및 0.06~0.30% 범위로서 상대적으로 낮았다. 또한, HPLC에 의해 국내의 포도 품종별 및 산지별 포도씨의 catechin 조성 함량을 측정하였다. 이와같이 위에서 정립된 HPLC 방법에 의한 포도씨의 4가지 주된 catechin 성분의 회수율은 95% 이상으로 높았으며, 재현율은 모두 5% 미만의 편차를 나타내어 분리효율이 우수하였다. 그리고 4가지 catechin 성분의 검출한계는 1~5 ppm 범위를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청에서 시행한 2002년도 용역연구개발사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Renauds, S. and Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart diseases. *Lancet* 339: 1523-1526 (1992)
2. Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* 4: 85-89 (1993)
3. Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, J.E. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric Food Chem.* 42: 64-69 (1994)
4. Tanahashi, H., Suwa, Y., Toyoda, Y. and Itakura, H. Clinical and component studies on antioxidant ability of red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 405-409 (1995)
5. Clare, M.H. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.* 52: 63-70 (1998)
6. Kinsella, J.E. Properties of oil of grapeseed and toher seeds in cosmetics. *Cosme. Toiletries* 91: 19-24 (1976)
7. Kamel, B.S., Dawson, H. and Kakuda, Y. Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 881-883 (1985)
8. Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P. and Sakariah, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.* 73: 285-290 (2001)
9. Gali, H.U., Perchellet, E.M., Gao, X.M., Karchesy, J.J. and Perchellet, J.P. Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric, and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis *in vivo*. *Planta Med.* 60: 235-239 (1994)
10. Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuno, A. and Del Rio, J. 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 (2000)
11. Ricardo, J.M., Darmon, N., Fernandez, Y. and Mitjavila, S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous model of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1549-1552 (1991)
12. Koga, T., Moro, K., Nakamori, K., Yamakoshi, J., Hosoyama, H., Kataoka, S. and Ariga, T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1892-1897 (1999)
13. Oszmianski, J., Sapis, J.C. and Macheix, J.J. Changes in grape seed phenols as affected by enzymic and chemical oxidation *in vitro*. *J. Food Sci.* 50: 1505-1506 (1985)
14. Romeyer, F.M., Macheix, J.J. and Sapis, J.C. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* 25: 219-221 (1986)
15. Robichaud, J.L. and Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* 53: 343-353 (1990)
16. Rigaud, J., Perez-Ilzarbe, J., Ricardo da Silva, J.M. and Cheynier, V. Micro method of proanthocyanidin identification using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 540: 401-405 (1991)
17. Ricardo da Silva, J.M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A. and Moutounet, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30: 1259-1264 (1991)
18. Escribano-Bailon, T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1794-1799 (1992)
19. Prieur, C., Rigaud, J., Cheyner, V. and Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36: 781-784 (1994)
20. Ricardo Da Silva, J.M. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 53: 85-92 (1990)
21. Dumon, M.C., Michauder, J. and Masqueller, J. Determination of procyanidins of grape seeds of red and white varieties from the Bordeaux region. *Bull. O. I. V.* 64: 5322-542 (1991)
22. Escribano-Bailon, T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del pais grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1794-1799 (1992)
23. Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E.M., and Escribano-Bailon, T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.* 53: 197-201 (1995)

24. Fuleki, T. and Ricardo da Silva, J.M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1156-1160 (1997)
25. Macheix, J.J., Sapis, J.C. and Fleuriet, A. Phenolic compounds and polyphenol oxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 441-48 (1991)
26. Kallirakser, S., Viguera, C.G., Bridle, P. and Bakker, J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem. Anal.* 6: 265-267 (1995)
27. Kang, H.C., Park, W.J., Kim, S.D. and Park, J.C. Characterization of grape seed oil. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 578-582 (1998)
28. Lee, W.Y., Cho, Y.J., Oh, S.L., Park, J.H., Cha, W.S., Jung, J.Y. and Choi, Y.H. Extraction of grape seed oil by supercritical CO₂ and ethanol modifier. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 174-178 (2000)
29. Kang, M.H., Chung, H.K., Song, E.S. and Park, W.J. Improved method for increasing of the oil yields in grape seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 931-934 (2002)
30. KFDA. Food Code, pp. 330-331. Korea Food and Drug Administration, Moonyoungsa, Seoul, Korea (2000)
31. KFDA. Food Additives Code, pp. 967-968. Korea Food and Drug Administration, Moonyoungsa, Seoul, Korea (2001)
32. Butler, L.G., Price, M.L. and Brotherton, J.E. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1087-1089 (1982)
33. Butler, L.G. Relative degree of polymerization of sorghum tannin during seed development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1090-1094 (1982)
34. Price, M.L., Scoyoc, S.V. and Butler, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26: 1214-1218 (1978)
35. Choi, S.W. Studies on an improved methodology for analysis of catechin derivatives in processed foods containing grape seed oils. Final report, 2002 Research project, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2002)

(2003년 3월 25일 접수; 2003년 6월 8일 채택)