

## 밤 삼피의 페놀산 조성 and 항산화 활성

김영찬 · 김미연 · 정신교\*

경북대학교 식품공학과

(2002년 3월 22일 접수, 2002년 8월 9일 수리)

밤 삼피의 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 검토하기 위하여 밤 삼피로부터 유리형(FPA), 에스테르형(EPA), 결합형(BPA) 페놀산획분을 분리하였다. 각 획분의 수율은 유리형 0.794%, 에스테르형 1.236%, 결합형이 1.937%였으며 이중 페놀성 화합물의 함량은 에스테르형이 65.19%로 가장 높았다. Gas chromatography로 각 획분의 페놀산의 조성 and 함량을 조사한 결과 유리형 획분에서 gallic acid(4.63%), ellagic acid(3.49%), salicylic acid(3.19%), gentisic acid(1.5%)가, 에스테르형 획분에서 gallic acid(13.4%), ellagic acid(11.6%), protocatechuic acid(0.9%)가 주요 페놀산으로 확인되었으며, 결합형 획분에서는 gallic acid는 확인되지 않고 다른 획분에 비하여 sinapic acid(1.33%)가 높은 함량을 보였다. 이들 획분의 항산화성을 DPPH 라디칼 소거능, hydroxyl radical 소거능, 지질과산화물 생성 억제 시험으로 조사한 결과 유리형, 에스테르형, 결합형 획분의 순으로 항산화 활성이 우수한 것으로 조사되었다.

**Key words:** 밤 삼피, 페놀산 조성, 항산화 활성

### 서 론

밤나무속(*Castanea miller*) 식물은 아시아, 유럽, 북아메리카, 북부아프리카 등 주로 온대 지방에 13여종이 분포하고 있으며 한국밤, 일본밤, 중국밤, 유럽밤, 미국밤이 과실로서 이용되고 있다. 국내에서는 조생종인 단택, 중생종인 촉과, 은기, 만생종인 안근, 만적 등이 주로 재배되고 있으며 연간 100,000 M/T 정도가 생산되고 있다. 이중 55%는 생과용으로, 45%는 간밤, 통조림 형태의 가공용으로 소비되고 있다. 밤 가공 중에 발생하는 밤의 속껍질(삼피)과 겉껍질(귀피)은 현재 전량이 현장에서 폐기되고 있는 실정이다.

최근 지구 부존자원의 한계성과 환경공해 문제 등으로 이러한 농산가공 부산물의 재활용과 기능성 소재화에 대한 관심이 높아지고 있다. 값싼 천연항산화제의 자원으로서 감자피<sup>1)</sup>, 포도껍질·씨<sup>2,3)</sup>, 올리브 껍질, 올리브박의 항산화 활성이 동물실험을 통해 보고되었고<sup>4)</sup>, 사과박<sup>5)</sup>, 감귤피·씨<sup>6)</sup>, cocoa 부산물<sup>7)</sup>로부터 폴리페놀화합물들이 분리·동정 되었다. 본 연구실에서도 밤의 귀피에서 항산화 물질과 페놀산 함량<sup>8)</sup>을 보고한 바 있다. Caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, ellagic acid와 같은 일부 페놀산은 항산화성, 항돌연변이원성, 항암성 등의 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다<sup>9-13)</sup>. 특히 페놀산의 항산화성은 그들의 화학구조에 따라 벤젠고리에 치환된 hydroxyl기나 methoxy group의 수가 증가할수록 항산화성이 우수한 것으로 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

따라서 본 연구는 밤 가공과정 중 다량으로 발생하는 삼피를 천연항산화기능성 소재로서 이용하고자 삼피로부터 유리형,

에스테르형, 결합형 페놀산 획분을 분리하고 각각의 페놀산 조성 및 함량을 조사하였다. 또한 이들의 항산화 활성을 지용성 모델계와 수용성 모델계에서 검정하였다.

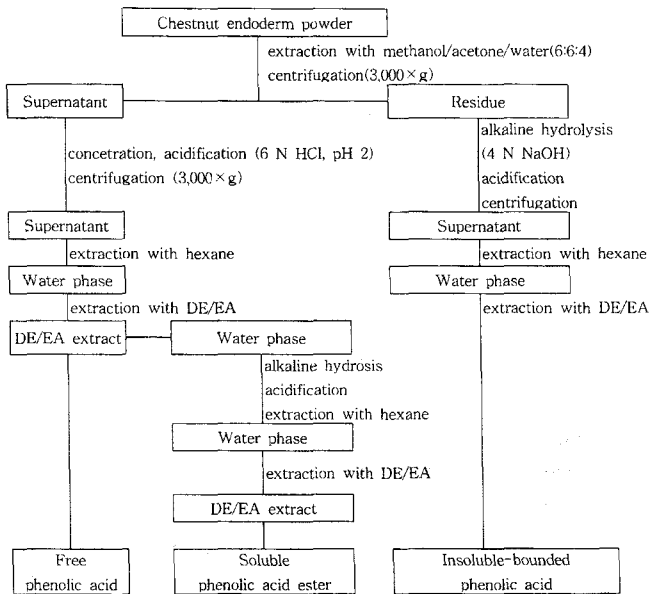
### 재료 및 방법

**재료 및 시약.** 본 실험에 사용한 밤은 2000년 10월에 경남 함천군에서 구입한 은기 품종의 삼피를 분리한 후 음건하여 실온에서 보관하면서 사용하였다. DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl), 2-deoxyribose, ferric chloride, linoleic acid,  $\alpha$ -tocopherol, BHA 및 Gas chromatography(GC) 분석용 표준 페놀산은 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였고, 기타 시약류는 분석용 특급시약을 사용하였다.

**메탄올 조추출물 및 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분의 분리.** 메탄올 조추출물은 건조 삼피 분말에 20배의 메탄올을 가하여 12시간동안 2회 진탕 추출·여과하여 감압, 농축하였다. 밤 삼피로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분은 Krygier 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 분리하였다. 탈지 삼피 분말에 methanol/acetone/water(6/6/4, v/v/v)의 혼합용매를 가하여 상온에서 12시간씩 3회 반복 추출하여 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액은 유리형, 에스테르형 페놀산 분석에 사용하였고, 잔사는 결합형 페놀산 분리 시료로 사용하였다. 위에서 분리한 상정액을 농축하여 6 N HCl로 pH 2로 조정하여 여기에 동량의 *n*-hexane을 가하여 3회 세척한 후 diethyl ether/ethyl acetate(1/1, v/v)를 가하여 유리형 페놀산을 추출하였다. 남은 물층은 4 N NaOH를 가하여 4시간 동안 실온에서 가수분해 한 후 6 N HCl로 pH 2로 조정하여 *n*-hexane으로 세척 후 에스테르형 페놀산을 diethyl ether/ethyl acetate(1/1, v/v)로 추출하였다. 결합형 페놀산은 원심 분리후 남은 잔사를 4 N NaOH로 4시간동안 실온에서 가수분해 후

\*연락처

Phone: 82-53-950-5778; Fax: 82-53-950-6772  
E-mail: kchung@knu.ac.kr



**Fig. 1.** Procedure for the extraction and separation of free, esterified and bounded phenolic acid from chestnut endoderm. DE/EA means mixture of diethyl ether and ethyl acetate (1 : 1).

에스테르형 페놀산과 동일한 방법으로 분리하였다.

**페놀성 화합물 함량.** 페놀성 화합물의 총 함량은 Prussian blue법<sup>17)</sup>으로 측정하였다. 시료 1 g에 60% 메탄올 100 ml를 가하여 2회 환류 추출하여 여과하여 50 ml로 정용한 여액을 시험용 시료로 사용하였다. 시험용액 100 μl에 증류수 3 ml, 0.016 M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1 ml, 0.01 M FeCl<sub>3</sub>/0.1 N HCl 1 ml를 넣고 혼합한 후 15분간 실온에서 방치한 후, stabilizer(H<sub>2</sub>O : 1% gum arabic : 85% phosphoric acid = 3 : 1 : 1, v/v/v)를 5 ml 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀성 화합물의 총 함량은 gallic acid로 작성한 검량곡선에 준하여 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

**GC에 의한 페놀산 분석.** 건조 시료 10 mg에 *N, O*-bis-(trimethylsilyl)-acetamide/acetonitrile(1/4, v/v) 1 ml를 가하여 80°C hot plate상에서 15분간 반응시켜 TMS 유도체를 조제하였다. 유도체화된 시료는 ZB-50 capillary column(0.25 mm × 30 m, Phenomenex Co., USA)을 사용하여 GC-17A(Shimadzu Co., Japan)로 분석하였다. 분석조건은 초기온도 120°C(3분간 유지)에서 250°C까지 분당 6분씩 승온하고 250°C에서 3분간 유지하였다. 주입구의 온도는 230°C, 검출기 온도는 260°C였으며 flame ionization detector로 검출하였다. 운반가스는 질소를 분당 1 ml로 흘렸으며 split ratio는 1 : 50이었다. 분리된 페놀산은 표준 페놀산의 retention time과 비교하였으며, 각 페놀산의 함량은 표준 페놀산의 peak area로부터 표준곡선을 작성하여 구하였다.

**DPPH radical 소거능 시험.** DPPH(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 Blois 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 시험하였다. 에탄올 적정량에 시험액 0.2 ml와 4 × 10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 0.8 ml를 가하여 10초간 혼합한 후 10분간 실온에서 방치후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소

거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음과 같이 계산하였다.

**Hydroxyl radical 소거활성 시험.** Hydroxyl radical(·OH) 소거능은 2-deoxyribose oxidation법<sup>19)</sup>에 따라 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>/0.1 mM EDTA · 2Na 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 시료액 0.2 ml, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 ml를 혼합한 후 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 ml를 가하고 37°C에서 4시간 반응시킨 후 2.8% trichloroacetic acid(TCA)용액 1 ml를 가하여 반응을 증지시키고, 1% thiobarbituric acid(TBA)/50 mM NaOH 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

**지질과산화물 생성 억제 시험.** Nakatani 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 80% 에탄올에 녹인 시료액 120 μl를 2.51% linoleic acid 2.88 ml, 40 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합한 후 40°C에서 incubation하였다. 경시적으로 시료액 0.1 ml를 75% 에탄올 9.7 ml에 희석한 후 30% ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml를 가하고 3분 후 20 mM FeCl<sub>3</sub>/3.5% HCl 0.1 ml씩을 가하여 강하게 진탕시킨 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하여 생성되는 과산화물량을 대조구와 비교하였다. 항산화능은 대조구의 흡광도에서 시료구의 흡광도를 제한 값을 대조구의 흡광도로 나누어 백분율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**페놀성 화합물의 함량 및 수율.** 밤 삼피의 메탄올 조추출물과 유리형(free phenolic acid, FPA), 에스테르형(soluble phenolic acid ester, EPA), 결합형(insoluble bounded phenolic acid, BPA) 페놀산 획분의 수율 및 페놀성 화합물의 총함량은 Table 1과 같다. 메탄올 조추출물의 수율은 33.55%였으며 페놀성 화합물의 총 함량은 6.56%로 조사되었다. 이 등<sup>21)</sup>이 조사한 바에 따르면 국내산 식물성 식품 중 건물을 기준으로 곡류 0.14~0.98%, 채소류 0.15~1.67%, 과일류의 경우 0.10~4.55%의 페놀성 화합물을 함유한 것으로 나타나 밤 삼피의 경우 매우 높은 페놀성 화합물의 함량을 보였다. 결합형태에 따른 페놀산 획분의 수율은 유리형 0.794%, 에스테르형 1.236%, 결합형 1.937%로 결합형 페놀산 획분의 수율이 가장 높게 나타났다. 그러나 각각의 페놀성 화합물의 함량은 에스테르형이 65.19%로 가장 높게 나타났고, 결합형이 48.15%로 가장 낮았다. 이를 환산하면 유리형의 경우 0.48 g, 에스테르형 0.8057 g, 결합형이

**Table 1.** Total phenolic compound contents and yields of free, soluble ester and insoluble phenolic acids in chestnut endoderm

	Yield (%)	Total phenolic compounds (%)
MeOH extract	33.55	6.56
FPA <sup>1)</sup>	0.794	60.65
EPA	1.236	65.19
BPA	1.937	48.15

<sup>1)</sup>FPA: Free phenolic acids.

EPA: Soluble phenolic acid esters.

BPA: Insoluble bounded phenolic acids.

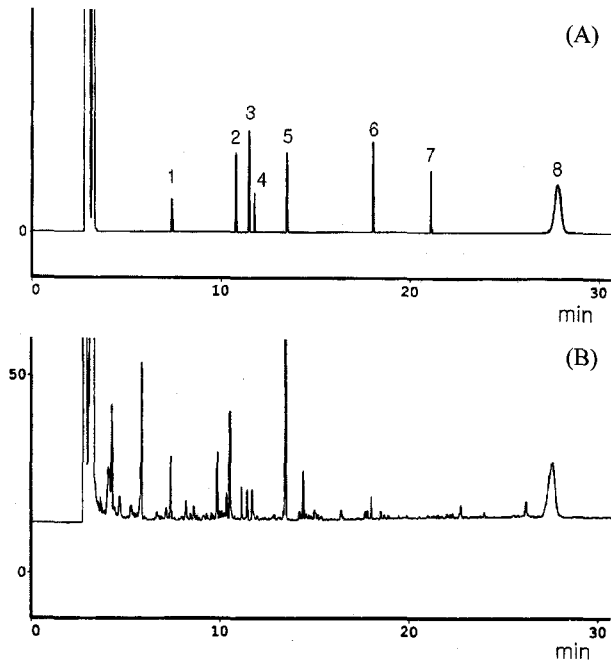


Fig. 2. GC chromatogram of authentic phenolic acid (A) and free phenolic acid fraction (B). 1: salicylic acid; 2: gentisic acid; 3: protocatechuic acid; 4: vanillic acid; 5: gallic acid; 6: ferulic acid; 7: sinapic acid; 8: ellagic acid.

0.9326 g의 페놀성 화합물을 포함한 것으로 메탄올 조추출물 (2.2 g)과 유사한 함량을 보였다.

**GC에 의한 페놀산의 정량.** 식물체내에서 페놀산은 유리형, ester형 또는 amide 결합형태로 존재한다. 페놀산을 분석하는 방법으로는 UV, GC, TLC, HPLC 등이 주로 사용되고 있으며, 페놀산은 분석시 추출용매나 가수분해 조건에 영향을 받는 것으로 알려져 있다<sup>22-26</sup>. Newby 등<sup>27</sup>은 alfalfa 뿌리로부터 유리형과 결합형 페놀산을 분리하였으며, Krygier 등<sup>16</sup>은 *Brassica napus*와 *Brassica campestris* 종자로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산을 정량하여 보고하였다.

밤 삼피로부터 분리된 각 페놀산 획분을 TMS 유도체로 만들어 GC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분으로부터 salicylic acid, gentisic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, ellagic acid 및

phenyl propanoid인 ferulic acid와 sinapic acid가 분리되었다. Ferulic acid는 유리형에서만 확인이 되었고 결합형의 경우에는 gallic acid는 분리되지 않았다. 각 페놀산의 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 유리형의 경우 gallic acid가 유리형 100 g당 4,638.36 mg으로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 ellagic acid(3,471.69 mg), salicylic acid(3199.59 mg)의 순이었다. 이외에도 protocatechuic acid, vanillic acid, ferulic acid, sinapic acid 등이 소량으로 함유되어 있었다. 에스테르형의 경우에는 gallic acid와 ellagic acid가 다른 획분에 비해 매우 높게 나타나 전체 페놀산 함량 중 90% 이상을 차지하였다. 밤나무는 가수분해형 탄닌으로 알려진 ellagitannin이 주요 페놀화합물로서 castalin, castslagin, vescalagin, vescalagin 등이 동정되었다<sup>28</sup>. Ellagitannin은 산이나 알칼리하에서 쉽게 가수분해가 일어나 ellagic acid와 gallic acid로 분해된다. 따라서 밤 삼피에도 상당량의 ellagitannin이 존재하는 것으로 생각되며 에스테르형 페놀산 획분의 경우 알칼리 가수분해에 의해 ellagic acid와 gallic acid가 유리되어 나온 것으로 생각된다. 결합형 페놀산 획분의 경우 전반적으로 페놀산 함량이 낮게 나타났으며 gallic acid는 검출되지 않았다. 반면 phenyl propanoid 중 가장 널리 분포되어 있는 hydroxycinnamic acid인 sinapic acid의 함량이 다른 두 획분보다 월등히 높게 나타났다. Hydroxycinnamic acid는 중합되어 lignin, lignan, coumarin의 전구물질이 되며 이들 화합물과 ester 결합 형태로 존재한다. 따라서 결합형의 경우 methanol/acetone/water 혼합용매에 추출되지 않은 잔사를 알칼리 가수분해 시킴으로써 sinapic acid가 유리되어 나온 것으로 생각된다. 이들 페놀산의 함량을 밤 삼피의 건물량을 기준으로 환산하면 gallic acid > ellagic acid > salicylic acid > sinapic acid의 순으로 나타났다. 이중 gallic acid와 ellagic acid가 전체 페놀산의 70% 이상을 차지하는 것으로 나타났다. Gallic acid와 ellagic acid는 항산화활성, 항암성, 항균성 등의 다양한 활성이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>11,13,29</sup>. 따라서 gallic acid와 ellagic acid를 다량 함유한 밤 삼피는 생리활성 기능성 소재로서 이용 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

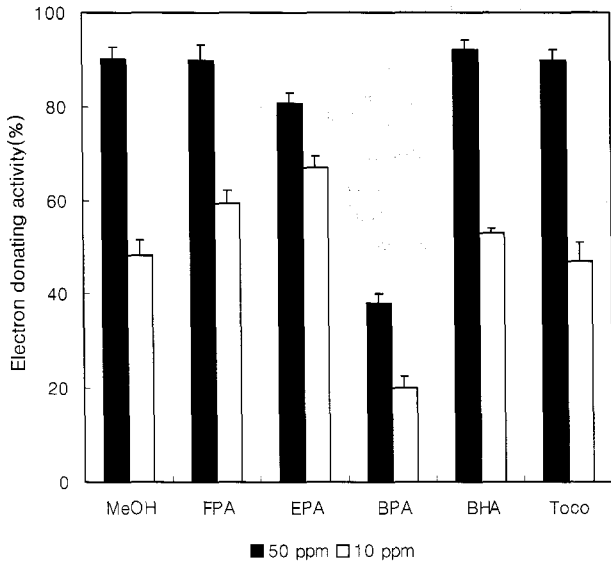
**페놀산 획분의 항산화성.** 메탄올 조추출물, 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분의 항산화성을 시험한 결과는 Fig. 3~5에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능 활성은 50 ppm 농도에서는 메탄올 조추출물, 유리형, 에스테르형이  $\alpha$ -tocopherol과

Table 2. Phenolic acids contents in free, esterified and bounded phenolic acid fractions from chestnut endoderm (mg/100 g)

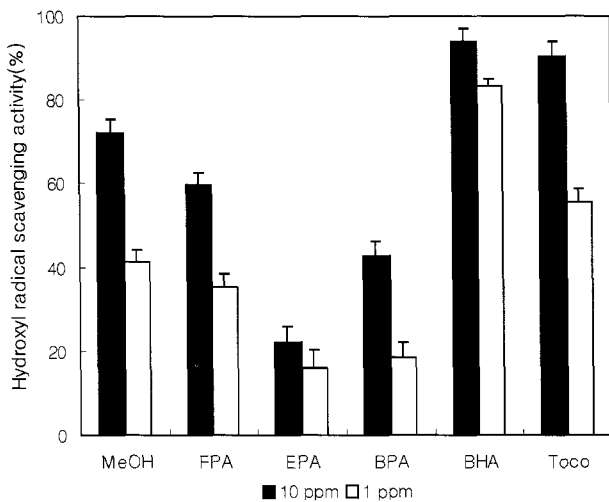
Phenoic acid	FPA <sup>1)</sup>	EPA	BPA	Sum	mg/100 g of endoderm
Salicylic acid	3199.59	448.33	426.33	4,074.25	39.20
Gentisic acid	1516.12	311.83	586.32	2,414.27	27.24
Protocatechuic acid	411.92	934.22	88.57	1,434.71	16.53
Vanillic acid	469.44	269.64	430.36	1,169.44	15.39
Gallic acid	4638.36	13404.03	-	18,042.39	202.50
Ferulic acid	385.09	<sup>2)</sup>	-	383.09	3.057
Sinapic acid	254.24	195.44	1333.03	1,782.71	30.25
Ellagic acid	3499.59	11690.98	142.24	15,332.81	174.82
Sum	14,375.35	27,252.47	3,006.85	44,633.67	508.98

<sup>1)</sup>See foot note of Table 1.

<sup>2)</sup>- means not detected.

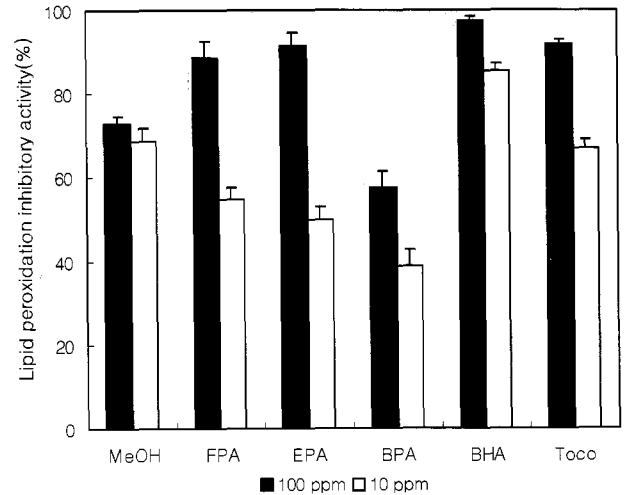


**Fig. 3. Electron donating abilities of free, esterified and bounded phenolic acids fraction from chestnut endoderm.** MeOH: Methanol extract, FPA: Free phenolic acid, EPA: Soluble phenolic acid, BPA: Insoluble bounded phenolic acid, BHA: Butylated hydroxyanisole, Toco:  $\alpha$ -tocopherol.



**Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging abilities of free, esterified and bounded phenolic acids fraction from chestnut endoderm.** The abbreviation is same as Fig. 3.

BHA와 대등한 활성을 보였고, 10 ppm에서는 에스테르형, 유리형의 경우 동일 농도의  $\alpha$ -tocopherol과 BHA보다 다소 높은 활성을 보였다. 결합형의 경우 40% 이하의 비교적 낮은 활성을 보였다. Hydroxyl 라디칼에 의해 2-deoxyribose로부터 생성된 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)를 측정할 결과 메탄올 조추출물, 유리형, 결합형, 에스테르형의 순으로 TBARS의 생성을 억제하여 메탄올 조추출물이 가장 높은 hydroxyl 라디칼 소거능을 보였다. Hydroxyl 라디칼 소거능의 경우 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나 DPPH 라디칼 소거능은 농도 의존성을 보이지 않았다. Linoleic acid를 이용한 지질과산화물 생성억제 활성을 조사한 결과 유리형과 에스테르형에서 과산화물 생성을 90% 정도 억제하였고, 메탄올 조추출



**Fig. 5. Lipid peroxidation inhibitory abilities of free, esterified and bounded phenolic acids fraction from chestnut endoderm.** The abbreviation is same as Fig. 3.

물과 결합형은 60~70% 정도 억제하였다. 유리형이 세가지 실험 모두에서 가장 좋은 결과를 보였으며, 결합형이 다소 낮은 항산화 활성을 보였다. 에스테르형의 경우에는 hydroxyl 라디칼의 소거활성에서만 특이하게 가장 낮게 나타났다. 이는 각 페놀산획분의 페놀산의 조성 및 함량의 차이에서 기인된 것으로 생각되며, 실험방법에 따른 차이가 있는 것으로 생각된다. 항산화성을 측정하는 방법으로 유리라디칼의 소거나 지질 peroxy 라디칼의 환원, 과산화물의 생성 억제 또는 금속이온의 킬레이팅 능력 등이 사용되고 있으며, 이들은 각각 다른 메커니즘들이 관여한다. Maillard-Peyrat<sup>30)</sup> 등은 DPPH법을 사용하여 antiradicalar power(ARP)를 측정하였을 때 gallic acid, gentisic acid, caffeic acid, sinapic acid 순으로 높은 활성이 있고, salicylic acid와 syringic acid는 활성이 거의 없는 것으로 보고하였다. 그러나 Chalas 등<sup>31)</sup>은 caffeic acid, sinapic acid, gallic acid, ferulic acid의 순으로 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 것으로 보고하였다. 페놀산의 철이온( $Fe^{3+}$ )에 대한 환원력과 철이온에 의해 유도되는 deoxyribose의 개열을 방지하는 효과에서도 gallic acid, caffeic acid가 우수한 것으로 보고되고 있다.<sup>32)</sup> Methyl linoleate의 자동산화에 대한 페놀산의 효과를 시험한 결과 caffeic acid와 sinapic acid가  $\alpha$ -tocopherol과 거의 유사하게 과산화물의 생성을 억제하였지만, methyl linoleate emulsion에서는 ferulic acid와 sinapic acid가 효과가 있고 bulk 상태와는 달리 caffeic acid는 거의 효과가 없었다<sup>12)</sup>. 유리형의 경우 gallic acid와 ellagic acid 외에 salicylic acid와 gentisic acid가 에스테르형과 결합형에 비하여 월등히 많이 포함되어 있다. 에스테르형은 gallic acid와 ellagic acid의 비율이 90% 이상을 차지하며 결합형의 경우에는 gallic acid가 검출되지 않았다. 따라서 페놀산의 조성에 따른 상승효과도 이들 페놀산획분의 항산화성에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 이로 인해 에스테르형과 결합형 페놀산획분이 유리형 페놀산획분에 비하여 상대적으로 항산화성이 낮은 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 농림기술개발사업(관리번호: 296076)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Sotillo, R., Hadley, M. and Holm, E. T. (1994) Phenolics in aqueous potato peel extract, extraction, identification and degradation. *J. Food sci.* **59**, 649-651.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J. and Medina, M. (1999) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidant. *Food chem.* **66**, 209-215.
- Karakaya, S. and Nehir, S. (1999) Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food chem.* **66**, 289-292.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F. F. and Galli, C. (1999) Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3397-3401.
- Lu, Y. and Foo, L. Y. (1997) Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food chem.* **59**, 187-194.
- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. and Berset, C. (1998) Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extract. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2123-2129.
- Azizah, A. H., Nik Ruslawati, N. M. and Swee Tee, T. (1999) Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chem.* **64**, 199-156.
- Kwon, E. J., Kim, Y. C., Kwon, M. S., Kim, C. S., Kang, W. W., Lee, J. B. and Chung, S. K. (2001) Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidative compound from chestnut husk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 726-731.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. (2001) Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* **39**, 1205-1210.
- Croft, K. D. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**, 435-442.
- Nakamura, E. S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Pastore, F. Jr. (2002) Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters* **177**, 119-124.
- Pekkarinen, S. S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M. and Hopia, A. I. (1999) Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. and Food Chem.* **47**, 3036-3043.
- Panizzib, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L. and Morelli, I. (2002) *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J. Ethnopharmacology* **79**, 165-168.
- Chen, J. H. and Ho, C. T. (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374-2378.
- Dziedric, S. Z. and Hudson, B. J. F. (1984) Phenolic acid and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* **14**, 45-51.
- Krygier, K., Sosulski, F. and Lawrence, H. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. I. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 330-334.
- Graham, H. D. (1982) Modified prussian blue assay for total phenolic compound. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 801-805.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997) Hydroxyl radical-scavenging effect of spice and scavenger from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 118-123.
- Nakatani, N. and Kikuzaki, H. (1987) A new antioxidative glucoside isolated oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2727-2732.
- Lee, J. H. and Lee, S. R. (1994) Analysis of phenolic substances content in korean plant food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 310-316.
- Inoue, K. H. and Hagerman, A. E. (1988) Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry* **169**, 363-369.
- Castele, K., Pooter, H. and Sumere, C. F. (1976) Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. *J. chromatography A* **121**, 49-63.
- Escott-Watson, P. L. and Marais, J. P. (1992) Determination of alkali-soluble phenolic monomers in grasses after separation by thin-layer chromatography. *J. chromatography A* **604**, 290-293.
- Hakkinena, S., Heinonen, M., Karenlampid, S., Mykkanena, H., Ruuskanene, J. and Torronen, R. (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research Internation* **32**, 345-353.
- Schieber, A., Keller, P. and Carle, R. (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. chromatography A* **910**, 265-273.
- Newby, V. K., Sablon, R. M., Synge, R. L. M., Castele, K. V. and Sumere, C. F. (1980) Free and bound phenolic acids of lucerne (*Medicago sativa* cv Europe). *Phytochemistry* **19**, 651-657.
- Tang, H. R. and Hancock, R. A. (1995) Studies of vegetable tannins. Complete structural determination of two chestnut tannins-vescalagin and castalagin using nuclear magnetic resonance spectroscopic methods. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* **79**, 181-187.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. and Iwatsuki, K. (2001) Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 487-491.
- Maillard-Peyrat, M. N., Bonnely, S. and Berset, C. (2000) Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta* **51**, 709-716.
- Chalas, J. Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A. and Lindenbaum, A. (2001) Effect of ethyl esterification of phenolic acid on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother* **55**, 54-60.

32. Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J. and Becana, M. (1997) Complexes for iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine* **22**, 861-870.

---

**Phenolic Acid Composition and Antioxidative Activity of Chestnut Endoderm**

Young-Chan Kim, Mi-Yeon Kim and Shin-Kyo Chung\* (*Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*)

**Abstract:** Free, soluble esterified and insoluble bounded phenolic acids were separated from Eungi chestnut endoderm. The composition and contents of phenolic acid were analyzed by gas chromatography, and their antioxidant activity was examined by DPPH assay, 2-deoxyribose oxidation, and ferric thiocyanate method. Gallic, ellagic, salicylic, and gentisic acids in free phenolic acid fraction, gallic, ellagic, and protocatechuic acids in soluble esterified fraction, sianpic and gentisic acids were the major phenolic acids in insoluble bounded fraction. Marked differences were observed in the phenolic acid composition and contents among the fractions. Free phenolic acid fraction showed the strongest antioxidant activity. Results revealed chestnut endoderm could be a potential antioxidant source containing gallic and ellagic acids.

---

Key words: chestnut endoderm, phenolic acid composition, antioxidative activity

\*Corresponding author