

## 코코아 폴리페놀 성분의 *in vitro* 항산화 활성

정창호 · 최귀남 · 광지현 · 김지혜 · 최성길 · 심기환 · 허호진<sup>†</sup>  
경상대학교 농업생명과학대학 식품공학과, 농업생명과학연구원

### *In vitro* Antioxidant Activities of Cocoa Phenolics

Chang-Ho Jeong, Ji-Hyun Kwak, Ji-Hye Kim, Gwi-Nam Choi, Sung-Gil Choi,  
Ki-Hwan Shim and Ho-Jin Heo<sup>†</sup>

Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Agriculture and Life Science,  
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

#### Abstract

The contents and antioxidant activities of various polyphenolic fractions from commercial cocoa powder were investigated. Total phenolics extracted by 0.01 M HCl, ethyl acetate, and acidic methanol, from an 80% (v/v) methanolic extract of cocoa, were 19.25, 202.24, and 295.83 mg/g, respectively. Each fraction was capable of scavenging DPPH radicals in a concentration-dependent manner. Among the various fractions, the acidic methanol fraction had the highest ABTS radical scavenging ability. The reducing power of the 0.01 M HCl, ethyl acetate, and acidic methanol fractions were 0.44, 3.15, and 3.87, respectively, at 1,000 µg/mL. Antioxidant activities, as assessed by β-carotene bleaching and linoleic acid autoxidation, of the various phenolic fractions from cocoa decreased in the order acidic methanol > ethyl acetate > 0.01 M HCl. Inhibition of β-carotene bleaching mediated by the acidic methanol fraction was similar to that of the ethyl acetate fraction. The values were 60.18% and 58.97%, respectively, at 1,000 µg/mL. Therefore, cocoa and cocoa-containing products may contain natural antioxidants useful in prevention of diseases associated with aging.

**Key words** : cocoa polyphenol, antioxidant

#### 서 론

산소는 지구상에서 많은 비중을 차지하고 있는 원소로서 호기성 생물은 이렇게 풍부한 산소를 전자수용체로 하는 호흡을 통하여 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소지만 안정한 분자상태인 기저 삼중항 산소(<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광학반응 등의 각종 물리적, 화학적 요인 등에 의해 superoxide radical(O<sup>2-</sup>), hydroxyl radical(HO·), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 일중항 산소(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다(1). 즉, 이들 활성산소

는 세포구성성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적으로 손상을 미침으로써 암(癌)을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병 및 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다(2,3). 이와 같이 free radical을 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제물질과 같은 항산화 물질들은 이들 산화물들에 의하여 야기되는 각종 질환 치료제 및 노화억제제로서 기대가 되고 있다. 식품의 대표적인 기능성으로 알려져 있는 항산화 활성은 생체 내에서 위와 같은 다양한 질병의 원인과 관련성이 있는 free radical에 의한 여러 가지 손상을 방지함으로써 생체를 보호하는 중요한 기능성으로 주목받고 있다(4,5). 총 페놀 및 플라보노이드 화합물은 천연식품 자원에 많이 함유되어 있는 성분으로 이들의 주요 생리적 역할로서 자유 라디칼을 소거하는 항산화성 연구가 많이

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : hjher@gnu.ac.kr,  
Phone : 82-55-751-5476, Fax : 82-55-753-4630

보고되고 있으며, 또한 이들 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총 페놀함량은 DPPH/ABTS 라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 중요한 인자로 작용을 한다(6).

초콜릿은 테오브로마 카카오나무(*Theobroma cacao*)의 종실에서 얻은 원료에 다양한 식품원료 등을 가하여 가공한 것을 총칭하는 것으로 독특한 풍미와 향기를 가지는 기호식품으로 넓은 연령대에서 선호되는 식품 중의 하나이다(7). 최근 코코아 및 관련 가공품들에 대한 영양학적 가치와 생리적 기능성이 재인식되고 있고, 많은 연구를 통해 관련 가공 식품의 섭취가 건강에 유익한 영향을 준다고 보고하고 있으며, 그 소비 또한 증가하고 있는 추세이다. 코코아 및 초콜릿 가공품 등에 관련된 주요 연구는 폴리페놀 함량(8,9), 항산화 활성(10,11), 항염증 효과(12) 및 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포 보호효과(13,14) 등이 간헐적으로 보고되고 있으나, 국내에서는 분말을 첨가하여 제조한 초콜릿에 관한 연구(7,15,16)만 되어 있을 뿐 코코아 소재 자체에 대한 연구 및 관련 가공품의 생리활성 성분에 관한 연구는 상대적으로 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 코코아에 함유되어 있는 주요 생리 활성물질인 수용성 성분, non-anthocyanin류 그리고 anthocyanin류 화합물을 각각 분리·분획하여 제조한 후 다양한 *in vitro* 항산화 활성을 비교·연구하고, 이를 노화 방지 연구 등에 필요한 다양한 기능성 연구의 기초자료로 활용하고자한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 코코아 분말은 2009년 2월에 경남 진주시에 위치한 코코아 전문 판매장에서 (주)제원이터내셔널에서 수입한 프랑스산 코코아 분말(제품명 : 반호튼코코아)을 구입하여 사용하였다. 항산화 활성 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu's reagent, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), potassium persulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride, β-carotene, linoleic acid, α-tocopherol, ascorbic acid는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

용매분획물의 제조

시판 코코아 분말 100 g에 헥산 500 mL를 첨가하여 24시간 동안 3회 반복하여 탈지하였으며, 이 탈지한 코코아 분말에 80% 메탄올 500 mL 첨가하여 2시간 동안 환류냉각 추출한 후 추출액을 진공회전농축기를 이용하여 10 °Brix가 되도록 농축하였다. 이 농축물 1 mL를 에틸아세테이트,

메탄올 및 0.01 N 염산으로 미리 활성화시킨 2개로 연결된 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 흡착시켰다. 흡착된 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 0.01 N 염산 10 mL로 용출시킨 후 질소가스를 이용하여 10분 동안 건조하였고, 에틸아세테이트 및 산성 메탄올(0.1% 염산함유)도 0.01 N 염산과 같은 방법으로 용출한 후 용매분획물을 제조하였다(17) (Fig. 1). 0.01 N 염산분획에는 당, 산 및 수용성 화합물들이 용해되고, 에틸아세테이트 분획에는 non-anthocyanin 화합물인 hydroxycinnamic acid, coumaric, caffeic, ferulic 및 cinapic acid 화합물들이 용해되며, 마지막으로 산성메탄올 분획물에는 anthocyaninidins 및 유도체들이 용해되는 원리를 이용하여 분획하였다.

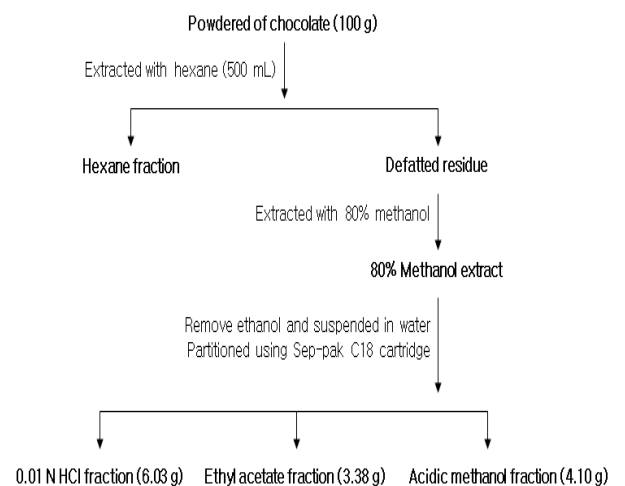


Fig. 1. Fractionation using Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge of 80% methanol extract from cocoa powder.

총 페놀화합물 함량 분석

총 페놀화합물 함량을 측정하기 위하여 Folin-Ciocalteu's 방법을 이용하였다(18). 분획물 1 mL에 3차 증류수 9 mL를 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응용액에 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 10 mL를 넣어 다시 혼합한 다음 3차 증류수로 25 mL로 정용하였다. 이 혼합 용액을 23°C에서 2시간 동안 정치한 후 760 nm에서 absorbance를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 검량선을 작성하여 총 페놀 함량을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

여러 농도의 용매분획물 1 mL에 에탄올로서 1.5×10<sup>-4</sup> M 농도가 되게 한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였으며, positive control로는 ascorbic acid와 α-tocopherol을 사용하였다(19).

### ABTS 라디칼 소거활성

7 mM ABTS 5 mL와 140 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 88 μL를 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol 과 약 1 : 88 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 20 μL와 ABTS solution 980 μL를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2.5분간 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(20).

### 환원력

여러 농도의 추출물 2.5 mL에 sodium phosphate buffer (2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50℃에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

### β-carotene bleaching activity

β-carotene-linoleate system을 이용한 항산화 효과의 측정 은 Elzaawely 등의 방법을 변형하여 측정하였다(22). Chloroform 50 mL에 β-carotene 50 mg을 용해하여 β-carotene용액을 만든 후 β-carotene 용액 10 mL를 100 mL round bottom flask에 취하고 40℃ rotary evaporator에서 진공상태로 하여 chloroform을 제거하였다. Chloroform을 제거한 100 mL round flask에 linoleic acid 40 mg, tween 40 400 mg 및 증류수 100 mL를 첨가하여 격렬히 진탕하여 emulsion용액을 제조하였다. 이 emulsion용액 4 mL에 분획물(시료첨가구), 에탄올(대조구) 및 positive control인 α-tocopherol 용액 0.2 mL를 첨가하여 50℃ incubator에서 저장하였다. 저장기간 중 0분에서 120분 동안 15분 간격으로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0' - A_t'} \right) \times 100$$

A<sub>0</sub> : 시료첨가 후 최초 emulsion용액의 흡광도

A<sub>0</sub>' : 시료대신 에탄올 첨가 후 최초 emulsion용액의 흡광도

A<sub>t</sub> : 시료첨가 후 120분 경과한 emulsion용액의 흡광도

A<sub>t</sub>' : 시료대신 에탄올 첨가 후 120분 경과한 emulsion용액의 흡광도

### 자동산화 억제활성

Cap test tube에 각 용매분획물(1 mL), linoleic acid(0.13 mL), 99.9% 에탄올 용액(10 mL) 및 0.2 M phosphate buffer

용액(pH 7.0, 10 mL)을 첨가한 뒤 증류수를 이용하여 총 부피가 25 mL가 되도록 조정하여 반응용액으로 사용하였다. 각 반응용액은 40℃에서 배양시킨 뒤 0.2 mL를 취하여 75% 에탄올 용액(9.4 mL), 30% ammonium thiocyanate 용액(0.2 mL) 및 20 mM ferrous chloride-3.5% HCl 용액(0.2 mL)을 가하고 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

### 통계처리

통계처리는 Window 용 SAS 8.0 version을 이용하여 분산 분석(analysis of variance)을 실시하였으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 페놀화합물 함량

코코아 용매분획물의 총 페놀화합물 함량을 측정한 결과 0.01 N 염산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 산성 메탄올 분획물에서 각각 19.25, 202.24 및 295.83 mg/g이 함유되어 있었다. 코코아에 함유되어 있는 주요 폴리페놀 화합물은 catechin, epicatechin 및 procyanidin류이며, 그 중에서도 epicatechin이 35%로 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 그 외에도 methylxanthine류와 theobromine도 함유되어 있는 것으로 보고되어지고 있다(24-27). 반면 Gu 등(9)은 코코아 분말에 함유되어 있는 catechin류와 procyanidin류의 함량을 측정한 결과 catechin류(catechin과 epicatechin) 2.36~3.48(0.61~0.90과 1.58~2.58) mg/g과 procyanidin류 32.19~48.70 mg/g로 catechin류 보다 procyanidin류의 함량이 높게 나타났다고 보고하여 차이를 보였는데 이는 재배환경 및 채취시기와 같은 여러 가지 요인에 의한 차이로 생각된다.

### DPPH 라디칼 소거활성

코코아 용매 분획물을 이용하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같이 분획물의 첨가농도가 증가함에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 에틸아세테이트와 산성메탄올 분획물은 농도 500 μg/mL의 농도로 첨가하였을 때 각각 84.52와 85.85%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. 반면 0.01 N 염산 분획물에서는 12.16%로 매우 낮은 활성을 보였는데, 이는 여러 연구결과에서와 같이 DPPH 라디칼 소거활성은 총 페놀성 화합물의 함량과 매우 연관성이 높은 것으로 보고되고 있으며, 또한 이와 같은 폴리페놀 화합물들은 천연식물자원에 존재하는 2차 대사산물로서 폴리페놀 함량이 높을수록 높은 항산화 활성을 나타낸다고 보고하고 있다(28,29).

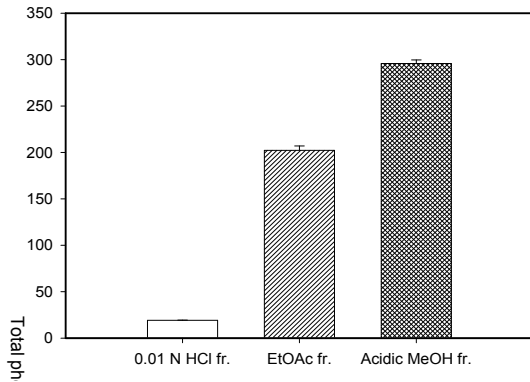


Fig. 2. Total phenolics content of various solvent fraction from cocoa powder.

All values are mean±SD (n=3).

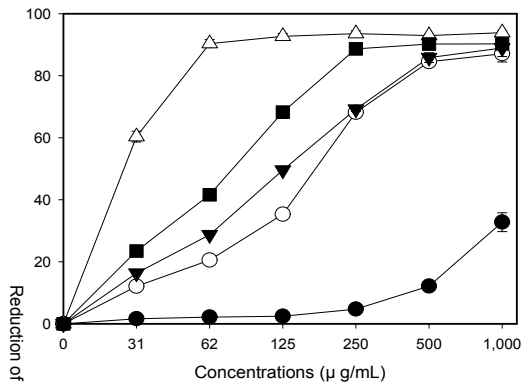


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of various solvent fractions from cocoa powder.

All values are mean±SD (n=3).

● : 0.01 N HCl fr., ○ : EtOAc fr., ▼ : Acidic MeOH fr.,  
△ : Ascorbic acid, ■ : α-Tocopherol.

**ABTS 라디칼 소거활성**

코코아 용매분획물을 이용하여 ABTS 라디칼 소거활성을 측정된 결과 positive control로 사용한 ascorbic acid 및 α-tocopherol 보다는 낮은 라디칼 소거활성을 보였지만 DPPH 라디칼 소거활성과 유사하게 농도의존적인 경향을 보였다(Fig. 4). 특히 에틸아세테이트 분획물과 산성 메탄올 분획물의 경우 농도 500 µg/mL에서 ascorbic acid 및 α-tocopherol과 유사하게 각각 91.29와 96.96%로 매우 높은 활성을 보인 반면 0.01 N 염산 분획물에서는 20% 이하의 매우 낮은 소거효과를 보였다. 이는 코코아에 함유되어 있는 주요 폴리페놀 화합물인 catechin, epicatechin 및 procyanidin류에 의한 것으로 생각되며, Lee 등(12)은 코코아 폴리페놀 분획물을 이용하여 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과 농도의존적인 경향을 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보였다.

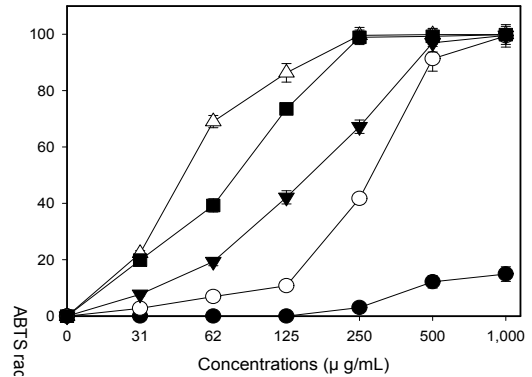


Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of various solvent fractions from cocoa powder.

All values are mean±SD (n=3).

● : 0.01 N HCl fr., ○ : EtOAc fr., ▼ : Acidic MeOH fr.,  
△ : Ascorbic acid, ■ : α-Tocopherol.

**환원력**

코코아 용매 분획물의 농도를 달리하여 첨가한 후 금속 이온을 환원시키는 환원력을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 추출물의 농도가 점차적으로 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 산성 메탄올 분획물에서 가장 강한 환원력을 나타내었고, 다음으로 에틸아세테이트 및 0.01 N 염산분획물 순이었다. 산성 메탄올 분획물의 경우 농도 500 µg/mL에서 흡광도가 2.15로 positive control로 사용된 α-tocopherol 2.03 보다 높은 환원력을 보였다. 따라서 위의 결과에서 나타난 코코아 용매 분획물에 함유되어 있는 주요 활성 물질 즉, catechin, epicatechin 및 procyanidin류의 함량과 조성에 대한 HPLC와 LC-MS 등의 기기 분석도 필요할 것으로 생각된다. Othman 등(30)은 각국 코코아 에탄올 및 물 추출물로 ferric reducing/antioxidant power(FRAP) 실험을 진행한 결과 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 높은 환원력을 나타내었으며, 이와 같은 결과는 물 추출물과 비교하여 알코올성 용매 추출물에 많은 페놀성 화합물이 존재

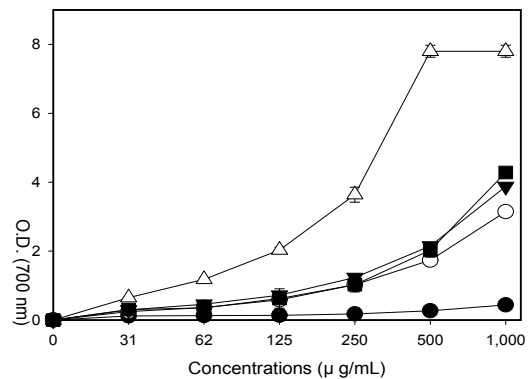


Fig. 5. Reducing power of various solvent fractions from chocolate.

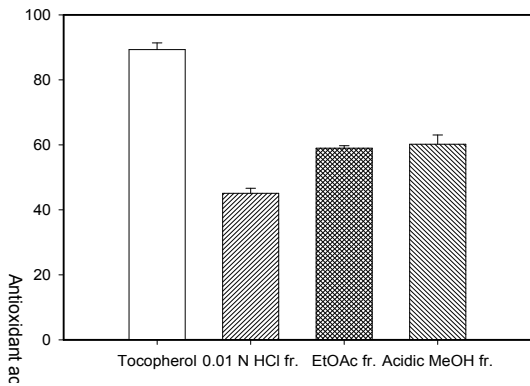
All values are mean±SD (n=3).

● : 0.01 N HCl fr., ○ : EtOAc fr., ▼ : Acidic MeOH fr.,  
△ : Ascorbic acid, ■ : α-Tocopherol.

하기 때문이라고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

**β-carotene bleaching 저해활성**

β-carotene-linoleate system을 이용하여 코코아 용매분획물의 항산화 효과를 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 1,000 μg/mL의 농도에서 positive control로 사용한 α-tocopherol은 87.55%의 저해활성을 보였고, 0.01 N 염산, 에틸아세테이트 및 산성 메탄올 분획물에서 각각 45.09, 58.97 및 60.18%의 저해활성을 보였으나 positive control로 사용된 α-tocopherol보다는 매우 낮은 활성을 보였다. Othman 등(30)은 여러 나라에서 생산된 코코아를 에탄올 및 물로 추출한 후 그 추출물로 β-carotene-linoleate bleaching 저해활성을 측정한 결과 실험에 사용된 모든 추출물이 positive control로 사용된 BHT보다 낮은 활성을 보였으며, 그 중 말레이시아산 코코아 추출물에서 가장 높은 저해활성을 보였다고 보고하였다.



**Fig. 6. Antioxidant activities of various solvent fraction from cocoa powder against β-carotene bleaching system at a dose of 1,000 μg/mL.**

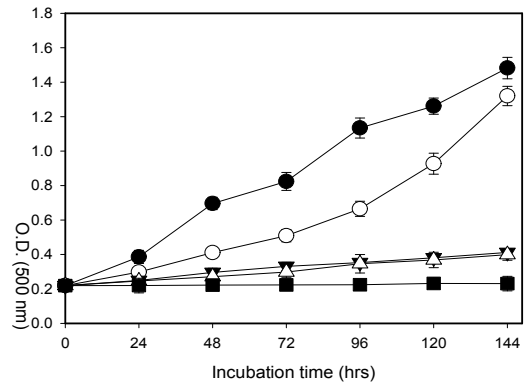
All values are mean±SD (n=3).

**자동산화억제력**

코코아 용매 분획물을 농도 1,000 μg/mL로 linoleic acid에 첨가하여 과산화지질의 생성억제효과를 측정한 결과 대조구는 저장 24시간 이후부터 급격한 산화가 진행되었으며, 이에 비하여 코코아 용매 분획물에서는 과산화지질의 생성을 억제하는 효과를 나타내었고, 특히 에틸아세테이트와 산성 메탄올 분획물에서는 positive control로 사용된 α-tocopherol과 유사하게 저장기간 144시간이 경과할 때까지 과산화지질의 생성을 억제하여 높은 항산화 활성을 보였다 (Fig. 7).

Sanbongi 등(31)은 카카오에서 분리한 7개의 화합물을 이용하여 지질과산화 억제활성을 측정한 결과 clovamide가 가장 높은 저해활성을 보였으며, epicatechin > catechin > quercetin > quercetin 3-glucoside, quercetin 3-arabioside, dideoxy-clovamide순이었다고 보고하였다. 또한 Heo와

Lee(12)도 코코아 및 코코아에서 분리한 catechin과 epicatechin은 강한 항산화 및 항암효과를 지니고 있으며, 알츠하이머와 같은 신경질환을 예방하는데 많은 도움이 된다고 보고하였다. 이와 같은 코코아 및 코코아 관련 가공품에 함유되어 있는 항산화 활성을 나타내는 주요성분은 catechin류 및 procyanidin류로 증명되고 있고, 이를 활용한 다양한 기능성 가공제품을 개발함에 따라 만성질환 및 노화와 관련된 질병 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.



**Fig. 7. Antioxidant activities of various solvent fractions from chocolate on the autoxidation of linoleic acid at a dose of 1,000 μg/mL.**

All values are mean±SD (n=3).

● : Control, ○ : 0.01 N HCl fr., ▼ : EtOAc fr., △ : Acidic MeOH fr. ■ : α-Tocopherol

**요 약**

본 연구에서는 국내에서 시판되는 코코아 분말로부터 polyphenol 분획물의 다양한 *in vitro* 항산화활성을 조사하였다. 코코아 80% 메탄올 추출물로부터 분리한 0.01N 염산, 에틸아세테이트 및 산성 메탄올 분획물의 총 페놀화합물 함량은 각각 19.25, 202.24 및 295.83 mg/g이었다. 코코아 용매분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 농도의존적인 경향을 보였으며, ABTS 라디칼 소거활성은 산성 메탄올 분획물에서 가장 높은 활성을 보였다. 0.01 N 염산, 에틸아세테이트 및 산성메탄올 분획물의 농도 1,000 μg/mL에서 환원력은 각각 0.44, 3.15 및 3.87이었다. β-carotene 표백저해 및 자동산화억제에 대한 코코아 용매분획물의 활성은 산성 메탄올, 에틸아세테이트 및 0.01 N 염산 분획물 순이었으며, 에틸아세테이트와 산성 메탄올 분획물의 농도 1,000 μg/mL에서 β-carotene 표백저해활성은 각각 58.97과 60.18%로 유사한 활성을 보였다. 따라서 이 실험의 결과로 볼 때, 코코아 함유 제품은 내재 polyphenol 성분으로부터 기인되는 우수한 항산화 활성으로 인해 노화관련 질병을 예방/억제할 수 있는 매우 유용한 식품 소재로서 그 활용가능성이 우수할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (KRF-2008-521-F00074) 결과로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Fridovich, I. (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-11
2. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84
3. McBride, T.J., Preston, B.D. and Loeb, L.A. (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*, 30, 207-213
4. Dean, R.T., Gieseg, S. and Davies, M.J. (1993) Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 437-441
5. Jung, S.J., Lee, J.H., Song, H.N., Seong, N.S., Lee, S.E. and Beak, N.I. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 47, 135-140
6. Kaur, C., Kapoor, H.C. (2001) Antioxidants in fruits and vegetables - the millenium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 36, 703-725
7. Yoo, K.M., Lee, K.W., Moo, B.K. and Hwang, I.K. (2005) Antioxidant characteristics and preparation of chocolate added with sohyngryong-tang (Oriental medicinal plants extract). *Korean J. Food Cookery Sci.*, 21, 585-590
8. Kim, H. and Keeney, P.G. (1984) (-)-Epicatechin contents in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.*, 49, 1090-1092
9. Gu, L., House, S.E., Wu, X., Ou, B. and Prior, R.L. (2006) Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4057-4061
10. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. and Lee, C.Y. (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7292-7295
11. Miller, K.B., Stuart, D.A., Smith, N.L., Lee, C.Y., Mchale, N.L., Flanagan, J.A., Ou, B. and Hurst, W.J. (2006) Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of elected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United states. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4062-4068
12. Lee, K.W., Kundu, J.K., Kim, S.O., Chun, K.S., Lee, H.J. and Surh, Y.J. (2006) Cocoa polyphenol inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF-KB and MAPKs in mouse skin in vivo. *J. Nutr.*, 136, 1150-1155
13. Heo, H.J. and Lee, C.Y. (2005) Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid  $\beta$  protein induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1445-1448
14. Ramiro-Puig, E., Casadesús, G., Lee, H.G., Zhu, X., McShea, A., Perry, G., Pérez-Cano, F.J., Smith, M.A. and Castell, M. (2009) Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *Eur. J. Nutr.*, 48, 54-61
15. Lee, J.Y., Seo, J.S., Bang, B.H., Jeong, E.J. and Kim, K.P. (2003) Preparation of chocolate added with *Monascus* barley koji powder and quality characteristics. *Korean J. Food Nutr.*, 16, 116-122
16. Yoo, K.M., Lee, C.H. and Hwang, I.K. (2008) Preparation of chocolate added with Yuza(*Citrus junos* Seib ex TANAKA) and its antioxidant characteristics. *Korean J. Food Cookery Sci.*, 24, 222-227
17. Kim, D.O. and Lee, C.Y. (2002) Extraction and isolation of polyphenolics. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolatad, R.E.(Editor), John Wiley & Sons Press, New York, USA, p.II.2.1-II.2.12.
18. Kim, D.O., Jeong, S.W. and Lee, C.Y. (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemical from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81, 321-326
19. Blois, M.A. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-2000
20. Fellegrin, N., Ke, R., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.*, 299, 379-389
21. Yen, G.H. and Chen, H.Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 27-32
22. Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. and Tawata, S. Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT. aerial parts. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 2225-2230
23. Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. (2004) Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from

- Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. J. Ethnopharmacol., 93, 409-415
24. Wollgast, J. and Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res. Int., 33, 423-447
25. Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K. and van Leeuwen, P.A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr., 74, 418-425
26. Porter, L.J., Ma, Z. and Chan, B.G. (1991) Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. Phytochemistry, 30, 1657-1663
27. Pura Naik, J. (2001) Improved highperformance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. J. Agric. Food Chem., 49, 3579-3583
28. Jeong, C.H., Choi, G.N., Kim, J.H., Kwak, J.H., Choi, S.G. and Heo, H.J. (2009) Characterization of antioxidant activities from chestnut inner skin extracts. Food Sci. Biotechnol., 18, 1218-1223
29. Jeong, C.H., Choi, G.N., Kim, J.H., Kwak, J.H., Kang, S.T., Choi, S.G. and Heo, H.J. (2009) In vitro antioxidant properties and phenolic composition of Korean commercial vinegars. Food Sci. Biotechnol., 18, 1258-1262
30. Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A. and Adenan, I. (2007) Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chem., 100, 1523-1530
31. Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S. and Osawa, T. (1998) Antioxidative polyphenol isolated from *Theobroma cacao*. J. Agric. Food Chem., 46, 454-457

---

(접수 2009년 9월 21일, 채택 2010년 1월 15일)