

유통되는 코코아 함유 가공품의 항산화능과 폴리페놀 함량에 관한 연구

이은순[†] · 금진영 · 황영옥 · 두옥주 · 조한빈 · 김정현 · 채영주

서울시보건환경연구원

Comparative Study on Antioxidant Capacities and Polyphenolic Contents of Commercially Available Cocoa-containing Products

Eun-Soon Lee[†], Jin-Young Kum, Young-Ok Hwang, Ock-Ju Tu,
Han-Bin Jo, Jung-Hun Kim, and Young-Zoo Chae

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 427-070, Korea

Abstract

UV-VIS spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic (HPLC-DAD) methods were applied in order to identify and quantify the composition of polyphenols in commercial cocoa-containing products. Total polyphenolic contents of cocoa mix, choco-syrup, milk chocolate, and dark chocolate were evaluated using Folin-Ciocalteu's phenol reagent according to a UV-VIS spectrometric method. Antioxidant capacities of cocoa extracts by methanol were evaluated by 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The obtained results show that the polyphenolic contents and antioxidant capacities of cocoa products and chocolates depend on solid cocoa content. Among the tested cocoa products and chocolates, the most abundant phenolic compound was epicatechin.

Key words: polyphenols, antioxidant capacities, ABTS, DPPH, epicatechin

서 론

인간의 수명이 증가하고 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 여러 측면에서 노화억제와 건강 유지를 위한 기능성 생리활성 물질에 대한 연구가 광범위하게 수행되어지고 있다(1,2). 생체 내에서 산화와 관련된 현상으로 인식되고 있는 노화의 원인으로 활성산소의 역할이 대두되어 이들의 제거에 대한 관심이 높아지고 있다(3). 활성산소는 강한 산화력이 있어 세포막 분해, 단백질 분해, 지방 산화, DNA 합성 억제, 광합성 억제, 엽록체의 파괴 등 생체 내에서 심각한 생리적인 장애를 유발한다(4,5). 이러한 노화와 생리적인 장애를 유발하는 활성산소를 제거하는 항산화기능을 가진 phytochemical로 알려진 식품으로는 녹차, 홍차, 적포도주와 더불어 초콜릿류와 같은 코코아 함유식품이 있다.

코코아는 *Theobroma cacao*의 씨앗으로 알려진 코코아 분말이나 초콜릿에 쓰이며, 주요한 성분은 카페인성분과 유사한 theobromine과 polyphenols로 알려져 있다. Herrmann(6)은 코코아의 폴리페놀류를 Table 1과 같이 분류하였다. Wollgast와 Anklam(7)의 연구에 의하면 코코아의 주원료인 *Theobroma cacao*의 폴리페놀류는 크게 세 가지로 분류하며, catechins 또는 flavan-3-ols(ca.37%)와 anthocyanins

(ca.4%), proanthocyanidins(ca.58%)이며 특히 proanthocyanidins는 고분자량이고, flavan-3-ols(특히 catechin과 epicatechin)의 중합체이다. 그 폴리페놀류 중 주요한 catechin은 epicatechin이며, 그 이외의 다른 (+)-catechin, traces of (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, (+)-epicatechin-3-gallate, procyanidins이다. 또한 소량의 quercetin, quercetin glycosides, naringenin, luteolin, apigenin, clovamide 그리고 phenolic acids(caffeic, ferulic, gallic and p-coumaric acid) 등이 있다고 하였다. 초콜릿은 카카오나무의 씨앗을 발효한 후 건조, 세척, 볶아서 껍질을 제거한 카카오닙(cacao nib)을 카카오매스로 가공하여, 여기에 다른 첨가물을 넣어서 제조하며, 또한 카카오매스는 코코아솔리드와 코코아버터로 가공된다. 초콜릿은 코코아솔리드, 코코아버터, 지방, 당을 포함하는 다크초콜릿, 밀크초콜릿, 무가당 초콜릿으로 분류되며 코코아솔리드를 포함하지 않은 화이트초콜릿이 있다. 그리고 코코아가공품이란 카카오열매에서 얻은 원료를 식품 또는 식품첨가물 등의 혼합 및 기타 방법으로 가공한 것으로 코코아매스, 코코아버터, 코코아분말 이외의 것을 말한다(8).

생리활성물질로서의 폴리페놀류의 기능성과 그 항산화성의 관련여부에 관심이 점차 증가하는 추세이나 그 연구가

[†]Corresponding author. E-mail: eslee67@seoul.go.kr
Phone: 82-2-570-3223, Fax: 82-2-570-3229

Table 1. Summary of different polyphenols in cocoabeans or cocoa products

Catechins	Procyanidins	Anthocyanins	Flavanol glycosides	Others
(-)-Epicatechin	procyanidin B1, B2, B3, B4, B5 ¹⁾	cyanidin-3- α -L-arabinoside	quercetin-3-O- α -D-arabinoside	clovamide
(+)-Catechin	procyanidin C1 (epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin)	cyanidin-3- β -D-galactoside	quercetin-3-O- β -D-glucopuranside	dideoxyclovamide
(+)-Gallocatechin	procyanidin D (epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin)			
(-)-Epigallocatechin	higher oligo- and polymers, mostly homologues of epicatechin with 2 to 18 monomeric units			

¹⁾Procyanidin B1=epicatechin-(4 β →8)-catechin, procyanidin B2=epicatechin-(4 β →8)-epicatechin, procyanidin B3=epicatechin-(4 α →8)-catechin, procyanidin B4=epicatechin-(4 α →8)-epicatechin, procyanidin B5=epicatechin-(4 β →6)-epicatechin.

녹차와 포도주에 집중되어 있고 카카오 자체에 대한 자료는 있으나 실제로 섭취하고 있는 유통식품에 대한 자료는 미비하여 그 접근을 하고자 하였다.

본 연구에서는 시중에 유통되어 실제로 섭취하게 되는 코코아 함유 가공품의 폴리페놀류의 함량과 항산화능과의 관련성을 분석함으로써 인간에 대한 생리학적인 영향에 대한 기능성 연구에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 전처리

본 실험에 사용된 재료는 시중에서 유통되는 코코아가공품 및 초콜릿제품을 코코아믹스, 초코시럽, 밀크초콜릿, 다크초콜릿으로 분류하여 분석하였다(Table 2). 식품공전(8)에 의하면 밀크초콜릿은 코코아 고형분 25% 이상(무지방 코코아 고형분 2.5% 이상) 함유하고 유고형분이 12% 이상(유지방 2.5% 이상)인 것을 말하며, 다크초콜릿(초콜릿)은 코코아 고형분 35% 이상(코코아버터 18% 이상, 무지방 코코아 고형분 14% 이상)으로 되어 있다. 그러나 이 연구에서 분석한 제품에 대한 정보는 밀크초콜릿과 초콜릿(또는 다크초콜릿)이라는 유형이었고, 코코아 함량과 성분 및 배합비율에 대한 정보는 정확하지 않는 제품이 많았다. 그러므로 코코아 함량에 대한 추정치는 밀크초콜릿과 다크초콜릿으로 분류된 식품공전의 분류기준(코코아 고형분 25% 이상(밀크초콜릿), 35% 이상(다크초콜릿))으로 가능하였다. 밀크초콜릿과 다크초콜릿은 Guyot 등(9)이 제시한 방법대로 지방을 제거하기 위해 시료를 동결 후에 균질화한 후 헥산으로 3회 추출하고, 남아 있는 유기용매를 제거하기 위하여 1일 건조하는 탈지과정을 행하였다. 추출은 Belščak 등(10)의 연구결

과에 따라 물보다 효율이 높은 70% 메탄올로 추출하였다. 약 5 g의 탈지 초콜릿류(밀크초콜릿, 다크초콜릿), 코코아믹스, 초코시럽 등에 70% 메탄올 10 mL($\times 2$)를 동일하게 가하고, 30분씩 2회 초음파처리 한 후 3,000 rpm 10분 원심분리기에서 분리, 여과한 후 상층액을 25 mL 플라스크에 정용하여 냉동고에 보관하여 분석에 사용하였다.

시약

HPLC 분석을 위한 표준품은 (-)-epicatechin gallate (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA), (-)-catechin (Sigma-Aldrich), (-)-gallocatechin gallate(Sigma-Aldrich), (-)-gallocatechin(Sigma-Aldrich), caffeic acid(Sigma-Aldrich), (-)-epicatechin(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 그리고 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 실험을 위해서 phosphoric acid(Sigma-Aldrich), gallic acid(3,4,5-trihydroxy benzoic acid)(Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, ABS radical assay를 위한 시약으로는 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(Sigma-Aldrich), 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(Sigma-Aldrich), (\pm)-6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl chromane-2-carboxylic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

총 폴리페놀 함량(total polyphenol content, TPC) 분석

총 폴리페놀 함량은 Lachman 등(11)의 방법을 변형하여 Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하여 흡광도 분석을 하였다. 추출물 0.5 mL에 2.5 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 30 mL 증류수, 7.5 mL 10% Na₂CO₃를 가하여 증류수 50 mL로 정용하여 2시간

Table 2. General description of groups analyzed

Group	Product description	Main composition	% of cocoa solid ¹⁾	Number of samples
CM	Cocoa mix	Cocoa solid, sugar, whey powder, skim milk powder, vegetable cream, sodium casein etc	3~16.4	8
CS	Choco-syrup	Cocoa solid, syrup, sugar or starch syrup, water etc	7~8	10
MC	Milk chocolate	sugar, whole milk powder, cocoa mass, cocoa butter, lactose, milk fat, lecithin etc	more than 25%	17
DC	Dark chocolate	cocoa mass, cocoa solid, cocoa butter, sugar etc	more than 35%	11

¹⁾Expressed data from real products.

후에 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였으며, 총 폴리페놀 함량은 검량선($y=13.4845x - 0.4983$; $R^2=0.9995$)을 작성한 후 (탈지된) 시료 g중의 mg gallic acid equivalents로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량(total flavonoid content, TFC) 분석

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(12)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 100 μ L를 80% ethanol 900 μ L로 희석한 후, 100 μ L를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 μ M potassium acetate를 함유하는 80% 에탄올 4.3 mL를 혼합하여 실온에서 40분 방치 후 270 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였으며, 총 플라보노이드 함량은 검량선($y=10.86629x - 0.118663$; $R^2=0.9995$)을 작성한 후 (탈지된) 시료 g중의 mg gallic acid equivalents로 나타내었다.

ABTS radical scavenging assay

ABTS radical을 이용한 항산화능은 ABTS radical cation decolorization assay 방법(13)에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온의 암소에서 24시간 방치하여 ABTS cation을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 1.25 ± 0.02 가 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS용액 2 mL에 추출시료 100 μ L를 더해서 반응시킨 후 정확히 6분 후에 734 nm 흡광도로 측정하였다. 표준물질은 (\pm)-6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl chromane-2-carboxylic acid(Trolox)를 사용하였으며 50~1,000 μ M의 농도로 검량선($y=1.23724x - 0.00140$; $R^2=0.9992$)을 작성하여 결과를 얻었다.

DPPH radical scavenging assay

DPPH radical을 이용한 항산화능은 Brand-Williams 등(14)의 방법에 따라 약간 변형하여 분석하였다. 추출시료 100 μ L에 0.094 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 1.9 mL를 하여 517 nm에서 흡광도의 평형을 이룰 때까지 매 2분마다 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 (\pm)-6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl chromane-2-carboxylic acid(Trolox)를 사용하여 50~1,000 μ M의 농도로 검량선($y=-0.00075x + 0.56625$; $R^2=0.9653$)을 작성하여 결과를 얻었다.

Catechins, phenolic acids, quercetin의 high-performance liquid chromatography(HPLC) 분석

HPLC 분석은 Šeruga 등(15)의 방법에 따라 폴리페놀류 중 gallic acid, catechin, epicatechin, gallic acid, quercetin, caffeic acid을 분석하였다. HPLC 분석은 Agilent 1200 series(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 하였고, 폴리페놀류 분리를 위해서 Eclipse XDB C18 column pore size 5 μ m(4.6 mm \times 150 mm, Agilent), DAD de-

tector를 사용하여 유속 0.8 mL/min, 칼럼온도 20°C, 주입부피 10 μ L로 분석하였다. 이동상은 0.1% phosphoric acid(A)와 methanol(B)로 A: 95%, B: 5%~A: 20%, B: 80% 30분까지 gradient 조건으로 분석하였다. Detection wavelength 범위는 190~600 nm로 하여 검출하였다. External standard는 gallic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, quercetin을 사용하였으며, detection wavelength는 gallic acid, catechin, epicatechin은 280 nm, caffeic acid는 320 nm에서 quercetin은 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 물질의 정성 및 정량은 retention time과 고유의 스펙트럼을 표준품과 비교하여 검량선으로부터 결과를 얻었다. 검출한계(limit of detection, LOD)는 $DL=3\sigma/S$ (σ : 감응의 표준편차, S 검정곡선의 기울기)로서 구하였으며, epicatechin 1.463 mg/kg, epicatechin gallate 0.744 mg/kg, quercetin 0.783 mg/kg, catechin 0.863 mg/kg, caffeic acid 0.232 mg/kg, gallic acid 0.151 mg/kg이었다. 적합한 정밀도와 정확도로서 정량적으로 측정될 수 있는 시료 중에서 검출될 수 있는 분석물질의 최소량인 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 $10\sigma/S$ (σ : 감응의 표준편차, S: 검정곡선의 기울기)로 구하였으며, epicatechin 4.875 mg/kg, epicatechin gallate 2.479 mg/kg, quercetin 2.609 mg/kg, catechin 2.878 mg/kg, caffeic acid 0.773 mg/kg, gallic acid 0.503 mg/kg이었다.

통계처리

총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량, 폴리페놀류의 함량, ABTS 제거능과 DPPH 제거능의 분석을 위하여 평균과 표준편차 등의 기술통계량을 산출하였다. 통계적 유의성 검증을 위하여 유의성검정을 위하여 SPSS 11.1(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one way ANOVA($\alpha=0.05$)를 실시하였으며, Duncan's multiple range test를 실시하고 항목간의 관련성을 위하여 상관계수를 구하였다.

결 과

총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 분석

총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 Table 3에 나타내었다. 밀크초콜릿과 다크초콜릿은 mg gallic acid equi-

Table 3. Total polyphenol (TPC) and total flavonoid contents (TFC)

Group	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg GAE/g)	TFC/TPC
CM	1.327 \pm 0.969 ^a	1.062 \pm 0.787 ^a	0.800
CS	1.025 \pm 0.798 ^a	0.621 \pm 0.305 ^a	0.606
MC	1.108 \pm 0.539 ^a	0.942 \pm 0.436 ^a	0.850
DC	4.269 \pm 1.761 ^b	3.146 \pm 1.848 ^b	0.737

Results are expressed as the means \pm SD, mg gallic acid equivalents /g. Groups are classified as Korean food code, with CM, cocoa mix; CS, choco-syrup; MC, milk chocolate; DC, dark chocolate. a,b superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

velants/g defatted로 나타내었으며, 코코아믹스와 초콜릿시럽은 mg gallic acid equivalents/g sample로 나타내었다. 총 폴리페놀 함량의 경우, 코코아믹스는 0.517~2.137 mg GAE/g, 초콜릿시럽은 0.034~2.017 mg GAE/g, 밀크초콜릿은 0.831~1.384 mg GAE/g, 다크초콜릿은 3.086~5.452 mg GAE/g을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 코코아믹스는 0.403~1.721 mg GAE/g, 초콜릿시럽은 0.242~0.999 mg GAE/g, 밀크초콜릿은 0.718~1.166 mg GAE/g, 다크초콜릿은 1.905~4.388 mg GAE/g을 보였다.

총 폴리페놀함량 실험에서 다크초콜릿은 4.269 mg GAE/g으로 가장 높은 함량이며 다른 코코아믹스, 초코시럽, 밀크초콜릿과 유의한 차이를 나타내었다(p<0.05). 밀크초콜릿은 코코아함량이 낮은 초코시럽 1.025 mg GAE/g과 비슷한 양인 1.108 mg GAE/g을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 실험의 경우 초콜릿은 3.146 mg GAE/g으로 다른 코코아믹스, 초코시럽, 밀크초콜릿과 유의한 차이를 나타내었으며(p<0.05), 가장 높은 함량으로 나타났다. 밀크초콜릿은 코코아믹스, 초코시럽과는 유의한 차이를 보이지 않았으나 초코시럽 0.621 mg GAE/g에 비해 높고 코코아믹스 1.062 mg GAE/g에 비해 낮았으며, 이것은 총 폴리페놀의 경향과 비슷하였다. 총 폴리페놀에 대한 총 플라보노이드의 비율은 코코아믹스와 밀크초콜릿이 0.800, 0.850으로 비슷하였고, 초코시럽과 초콜릿의 비율이 0.606, 0.737이었다. 코코아믹스와 밀크초콜릿은 상대적으로 총 플라보노이드에 비해 총 폴리페놀 함량이 다른 군에 비해 낮은 것을 알 수 있다. 코코아믹스와 밀크초콜릿의 성분(Table 2)을 살펴보면 다른 군과는 달리 milk-based인 우유가루, 유당, 유지방이 첨가되어 있는 공통점이 있는데, 이것은 milk-based 물질들이 플라보노이드처럼 반응하여 플라보노이드로 인식되어질 가능성이 있음을 시사한다. Siebert 등(16)의 연구에서는 밀크초콜릿의 우유성분은 catechin-protein을 형성하여 반응효율을 감소시킨다고 하였다.

ABTS radical scavenging assay

항산화능을 평가하기 위한 방법 중 본 연구에서는 ABTS radical 소거능을 측정하였다(Table 4). ABTS radical 소거능은 항산화제의 유무를 확인하는 것으로 hydrogen per-

oxide와 metmyoglobin이 반응하여, 미리 형성된 ABTS radical이 감소함으로써 metmyoglobin의 활성을 알아내게 되었다(13). 즉, 다른 항산화제는 미리 형성된 ABTS radical에 수소를 제공함으로써 ABTS radical을 감소시킨다. 코코아믹스의 ABTS radical 소거능은 29.171~149.672 μM/L Trolox, 초콜릿시럽 22.272~159.517 μM/L Trolox, 밀크초콜릿 144.711~156.502 μM/L Trolox, 다크초콜릿 138.772~156.162 μM/L Trolox였다. 변동계수(coefficients of variation)는 다크초콜릿 0.088, 밀크초콜릿 0.076, 초코시럽 0.608, 코코아믹스 0.806이었고, 다크초콜릿과 밀크초콜릿의 편차는 다른 군에 비해 비교적 낮은 자료의 균일한 분포를 나타내었다. 코코아믹스와 초코시럽의 경우, ABTS radical 소거능에 영향을 끼치는 것은 코코아함량보다 다른 물질들의 영향을 더 많이 받는 것으로 보이며, 다른 물질의 함량이 각기 다른 시료군의 특성으로 인하여 편차가 크게 나타난 것으로 추정된다.

ABTS radical 소거능은 밀크초콜릿, 다크초콜릿이 초코시럽, 코코아믹스와는 유의한 차이(p<0.05)를 나타내었으며, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량과는 다른 경향을 보였다.

DPPH radical scavenging assay

항산화능을 평가하기 위한 방법 중 이 연구에서는 DPPH radical 소거능을 측정하였다(Table 5). 이 연구에서는 초코시럽이 79.696 μM/L Trolox로 가장 낮은 소거능을 보였으며 또한 변동계수도 가장 높았고, 다른 코코아믹스 115.919 μM/L Trolox, 밀크초콜릿 130.462 μM/L Trolox, 초콜릿 125.389 μM/L Trolox와는 유의한 차이를 보였다(p<0.050). DPPH radical 소거능은 ABTS radical 소거능과는 상관관계(Pearson 상관계수 0.600, p=0.01)를 보였다. 코코아믹스의 경우 ABTS radical 소거능과는 달리 밀크초콜릿과 다크초콜릿의 소거능과 비슷한 값을 보이며 자료의 분포도 비교적 고루한 경향을 나타내었다. 항산화능을 측정하는 방법들은 소거능에 관련된 물질들이 저마다 다르고 다른 요인들이 작용하여 더 많은 연구방법들이 개발되어야 할 것이다.

Catechins, phenolic acids, quercetin의 HPLC 분석

HPLC는 폴리페놀물질을 분석하는 방법 중 가장 신뢰성

Table 4. Antioxidant capacity of groups by ABTS assay

Group	ABTS (μM/L Trolox)	Coefficient of variance
CM	89.423 ± 72.062 ^a	0.806
CS	90.894 ± 55.267 ^a	0.608
MC	150.606 ± 11.470 ^b	0.076
DC	147.467 ± 12.943 ^b	0.088

Results are expressed as the means ± SD, μM/L Trolox. Groups are classified as Korean food code, with CM, cocoa mix; CS, choco-syrup; MC, milk chocolate; DC, dark chocolate. a,b superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 5. Antioxidant capacity of groups by DPPH assay

Group	DPPH (μM/L Trolox)	Coefficient of variance
CM	115.919 ± 8.921 ^b	0.077
CS	79.696 ± 55.788 ^a	0.700
MC	130.462 ± 16.930 ^b	0.130
DC	125.389 ± 9.985 ^b	0.080

Results are expressed as the means ± SD, μM/L Trolox. Groups are classified as Korean food code, with CM, cocoa mix; CS, choco-syrup; MC, milk chocolate; DC, dark chocolate. a,b superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 6. Contents of catechins, phenolic acids and quercetin

Group	Catechins			Phenolic acids		Quercetin
	(-)-Epicatechin	(-)-Catechin	(-)-Epicatechin gallate	Gallic acid	Caffeic acid	
CM	0.051±0.039 ^a	0.054±0.036 ^a	ND	ND	ND	ND
CS	0.008±0.018 ^a	0.008±0.008 ^a	ND	ND	ND	ND
MC	0.163±0.075 ^a	0.046±0.027 ^a	ND	ND	ND	ND
DC	0.532±0.289 ^b	0.167±0.102 ^b	0~0.027	ND	0~0.009	0~0.023

Results are expressed as the means±SD, mg/g. Groups are classified as Korean food code, with CM, cocoa mix; CS, choco-syrup; MC, milk chocolate; DC, dark chocolate. a,b superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

있는 것으로 대표된다. Adamson 등(17)은 HPLC 분석은 식품시료 중에 폴리페놀류의 정량분석의 최초의 분석방법이라고 하였다. Liu 등(18)에 따르면 acidic mobile phase를 더 함으로써 hydroxyl과 carboxyl group의 이온화를 줄여 분리도를 향상시킨다고 하였다. 이 연구에서도 이동상을 0.1% phosphoric acid를 사용하여 flavan-3-ols 중의 (-)-epicatechin(EC), (-)-catechin(C)과 phenolic acids 중 gallic acid(GA), caffeic acid(CA) 그리고 quercetin을 분석하였다 (Table 6, Fig. 1~4). Epicatechin의 경우 초콜릿 0.532 mg/g으로 가장 높은 함량이었고, 밀크초콜릿 0.163 mg/g, 코코아믹스 0.051 mg/g, 초코시럽 0.008 mg/g과는 유의하게 ($p<0.05$) 차이를 보였고, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량과는 비슷한 경향을 보였다. 그리고 epicatechin은 총 폴리페놀 함량과 높은 상관관계($r=0.896$, $p=0.01$)를 보였다.

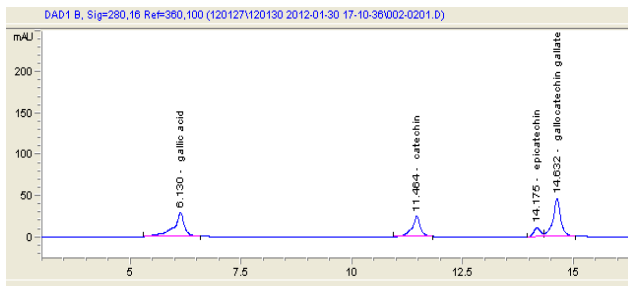


Fig. 1. Chromatogram of gallic acid (5.5 mg/L), catechin (15.3 mg/L), gallocatechin gallate (10.1 mg/L) standards at 280 nm.

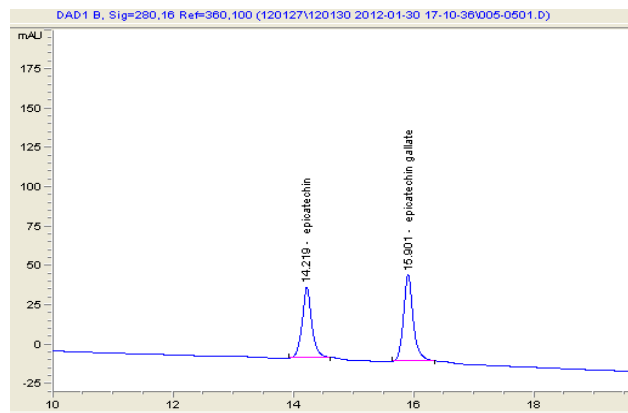


Fig. 2. Chromatogram of epicatechin (23.6 mg/L), epicatechin gallate (11.9 mg/L) standards at 280 nm.

Catechin의 경우 다크초콜릿 0.167 mg/g defatted로 밀크초콜릿 0.046 mg/g defatted, 코코아믹스 0.054 mg/g, 초코시럽 0.008 mg/g과는 유의한 차이($p<0.05$)를 보이며 높았다. 또한 epicatechin과 마찬가지로 총 폴리페놀과 총 플라보노이드와 비슷한 경향을 보이면서, 총 폴리페놀과 상관관계($r=0.896$, $p=0.01$)을 보였다. 또한 epicatechin gallate는 초콜릿군의 소수의 시료에서 0~0.027 mg/g 검출되었으며, caffeic acid 또한 초콜릿군의 소수에서 0~0.009 mg/g 검출되었고, quercetin도 초콜릿에서만 소량 0~0.023 mg/g 검출되었다. Belščak 등(10)의 연구결과는 defatted cocoa 중 epicatechin 0.10~1.78 mg/g, (+)-catechin 0.02~0.59 mg/g, gallic acid 0.01~0.48 mg/g, caffeic acid 0.05~0.19 mg/g이

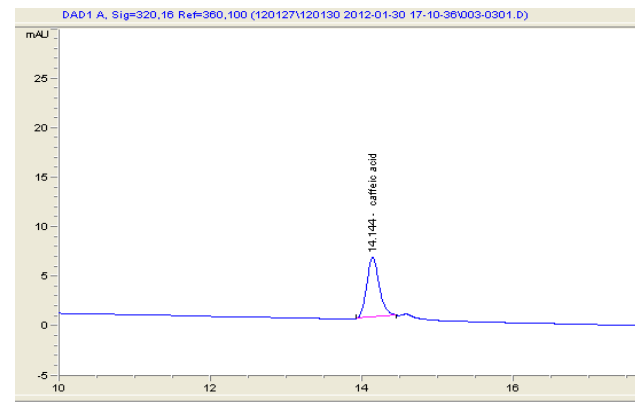


Fig. 3. Chromatogram of caffeic acid (3.4 mg/L) standard at 320 nm.

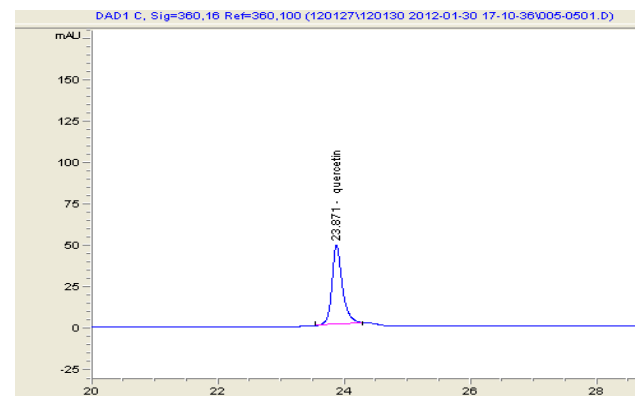


Fig. 4. Chromatogram of quercetin (16.8 mg/L) standard at 360 nm.

었다. Belščak 등(10) 연구의 대상시료 중 코코아함량은 16~100%였다.

고 찰

코코아(*Theobroma cacao*)와 코코아제품의 폴리페놀류는 주로 proanthocyanidins, flavan-3-ols, anthocyanins이다. 그리고 발효 전 카카오빈은 120~180 g/kg(8)의 폴리페놀류의 화합물을 함유하며, 특히 주요한 물질은 epicatechin과 (+)-catechin이고, 소량의 (+)-gallocatechin, (-)-epi-gallocatechin, (+)-epicatechin-3-gallate, procyanidin 등이 있으며, 그 이외에 quercetin, quercetin glycosides, nar-ingenin, luteolin, apigenin, clovamide 그리고 phenolic acids(caffeic, ferulic, gallic and p-coumaric acid) 등이 있다. 생리활성성분으로 알려진 폴리페놀류중의 코코아에 들어있는 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 그리고 폴리페놀류 중의 함량이 가장 많은 catechin과 phenolic acids를 분석하고 그들의 항산화능을 분석하여 그들의 관련성을 분석하고자 하였다. 총 폴리페놀 함량은 코코아함량이 가장 높을 것으로 추정되는 다크초콜릿이 가장 높았고, 다른 코코아믹스, 초코시럽, 밀크초콜릿과는 유의한 차이를 보였다. Belščak 등(10)은 메탄올 추출 시 총 폴리페놀과 플라보노이드함량과 시료의 코코아함량과 높은 상관관계(TPC, $r=0.845$ 와 TFC, $r=0.845$)를 보인다고 하였다. 이 연구에서는 폴리페놀함량이 다크초콜릿과 다른 코코아믹스, 초콜릿시럽, 밀크초콜릿과 유의한 차이를 보였으나, 밀크초콜릿은 코코아믹스와 초콜릿시럽과는 유의한 차이를 보이지 않았다. 밀크초콜릿의 코코아함량은 코코아믹스, 초콜릿시럽 등과는 차이가 있으리라 추정하나 총 폴리페놀 함량이 유의한 차이를 보이지 않은 것은 Siebert 등(16)의 연구에서 제시하듯이, 밀크초콜릿의 우유는 catechin-protein의 강한 결합을 형성하여 복잡한 matrix를 만들고 반응효율을 감소함으로써 카테킨 정량을 직접적으로 방해하며, 이것은 Folin-Ciocalteu 시약의 선택성(selectivity)의 부족으로 보인다는 Escarpa와 Gonzalez 등(19)의 견해와 같은 경향을 보인다. 또한 Vinson 등(20)은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 phenols와 반응할 뿐만 아니라 다른 환원화합물인 carotenoids, amino acids, sugars, vitamin C와도 반응한다고 하였다. 총 플라보노이드도 다크초콜릿에서 가장 높은 함량을 보이며 다른 코코아믹스, 초코시럽, 밀크초콜릿과는 유의한 차이를 나타내었다. 초콜릿과 코코아믹스, 초코시럽의 총 폴리페놀 중 flavonoid가 차지하는 비율은 0.606~0.850이었다. 다른 cocoa extract의 폴리페놀에 관한 연구 중 그 비율은 Pimentel 등(21)의 결과가 0.12~0.34, Belščak 등(10)의 연구에서는 약 0.30~0.55로 보였으나, Lee 등(22)의 연구에서는 약 0.8~0.85의 비율을 나타내어 본 연구의 결과와 비슷하였다. Wollgast와 Anklam(7)은 코코아빈의 종류, 원산지,

숙성정도, 수확 후 저장 및 발효조건(발효, 건조, 볶는 과정, 가공)에 따른 폴리페놀함량의 차이가 있다고 하였다. 본 연구의 결과는 Lee 등(22)의 결과와 비슷한 경향을 보였는데, Lee 등의 연구가 본 연구와 같은 지역에서 이루어짐을 볼 때 시료에 쓰인 코코아빈의 원산지 및 가공방법이 유사하리라 추정한다. 와인이나 녹차, black tea의 연구결과(21,22)를 보면 폴리페놀중 플라보노이드가 차지하는 비율이 cocoa extract의 경우보다 훨씬 낮다. 본 연구에서는 항산화능을 측정하기 위한 방법으로는 ABTS radical 소거능과 DPPH radical 소거능을 측정하였다. ABTS radical 소거능은 밀크초콜릿, 다크초콜릿이 초코시럽, 코코아믹스와는 유의한 차이($p<0.05$)를 나타내었으며, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량과는 다른 경향을 보였다. 즉, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드함량은 초콜릿이 가장 높았으나, 다크초콜릿, 밀크초콜릿의 ABTS radical 소거능은 147.47, 150.61 $\mu\text{m/L}$ Trolox로 비슷한 결과를 나타내었다. Arlorio 등(23)과 Othman 등(24)은 ABTS radical 소거능은 코코아추출물에서 phenols가 반응하기도 하지만, methylxantine 같은 메탄올-soluble 화합물, 소량의 플라보노이드, 색소성분 등도 관련된다고 설명하였다. 즉, ABTS radical 소거능에는 폴리페놀과 플라보노이드 이외의 다른 물질도 관여함으로써 밀크초콜릿의 항산화능도 높게 측정되고, 이것은 ABTS radical scavenging assay 방법 또한 선택성(selectivity)이 낮아 코코아의 항산화능의 정확한 측정을 위해선 다른 방법으로 더 많은 연구와 표준화된 방법개발의 필요성을 시사한다. 폴리페놀류 중 epicatechin, catechin은 다크초콜릿이 가장 높았으며 다른 코코아믹스, 초코시럽, 밀크 초콜릿과 유의한 차이를 보였다. 총 폴리페놀함량과 총 플라보노이드함량도 비슷한 경향을 보였으나 항산화능과의 관련성은 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

코코아가공품이나 초콜릿은 영양적으로 고에너지 식품이며 간식이나 후식으로 과다하게 섭취할 경우 비만이나 다른 부작용이 있음에도 불구하고, 건강에 유익하다는 인식이 점차 확산되고 있다. 그럼에도 불구하고 코코아가공품이나 초콜릿의 건강에 유익성은 코코아가공품, 초콜릿의 코코아로부터 얻어지는 폴리페놀류와 그 항산화능에 있다. 이 연구에서는 코코아자체의 폴리페놀류와 그 항산화능보다는 실제로 사람들이 날마다 먹는 제품에서의 폴리페놀류와 그 항산화능과 연관성을 연구하고자 하였다. 그러나 수많은 폴리페놀류가 존재하고, plant-derived product의 폴리페놀류의 정량과 항산화능의 분석에 관한 표준화된 방법이 아직 확립되지 않아 연구에 어려움이 있으며, 더구나 이 연구에서는 코코아함량에 대한 정확한 정보를 제공하는 제품이 많지 않았다. 그러므로 이 연구 결과의 약간의 불확실한 결론은 당연

한 것으로 보인다. 코코아 추출물에서 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 군은 코코아함량이 가장 높은 것으로 추정하는 다크초콜릿이었다. 코코아 추출물의 epicatechin은 정량적으로 catechin보다 높았으며, 다크초콜릿에서 그 함량이 가장 높았고, 다크초콜릿에서만 epicatechin gallate, caffeic acid, quercetin 등이 소량 검출되었다. 항산화능은 밀크초콜릿과 다크초콜릿이 코코아믹스와 초코시럽과는 유의하게 높았고, 밀크초콜릿과 다크초콜릿의 비슷한 항산화능을 보였으며, 이 결과는 더 정밀하고 확실한 항산화능 실험법의 확립의 필요성을 보여준다. 이 연구의 결과는 코코아로 만들어지는 초콜릿이 항산화능이 있음을 암시하며, 건강과의 관련 있음의 가능성을 나타내었다.

문 헌

- Goldberg I. 1994. *Functional Foods*. Chapman & Hall Press, New York, NY, USA. p 3-550.
- Sadaki O. 1996. The development of functional foods and materials. *Bioindustry* 13: 44-50.
- Fridorich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem* 266: 1478-1483.
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 232: 1302-1309.
- Herrmann K. 1995. Neuere Erkenntnisse über Kakao-inhaltsstoffe. II: catechin und procyanidine und deren oxidative kondensation sowie Ballaststoffe der Kakao-schalen. *Gordian* 95: 141-142, 144.
- Wollgast J, 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.
- Korea Food and Drug Administration. 2011. *Korea Food Code*. Korea. p 5-3-1.
- Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleat JF. 1998. Reversed-phase HPLC thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissues zones of French cider apple variety (*Malus domestica* var. *Kermerrien*). *J Agric Food Chem* 46: 1698-1705.
- Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganic KK, Karlović D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res Int* 42: 706-716.
- Lachman J, Hosnedl V, Pivec V, Orsak M. 1998. Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. *Proceeding of Conference Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, Czech Republic. p 118-125.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
- Re R, Pellegrini N, Protggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25-30.
- Šeruga M, Novak I, Jakobek L. 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem* 124: 1208-1216.
- Siebert KJ, Troukhanva NV, Lynn PY. 1996. Nature of polyphenol-protein interaction. *J Agric Food Chem* 44: 80-85.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. 1999. HPLC method for quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 47: 4184-4188.
- Liu AH, Li L, Xu M, Lin YH, Guo HZ, Guo DA. 2006. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method. *J Pharm Biomed Anal* 41: 48-56.
- Escarpa A, Gonzalez MC. 2001. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Anal Chem* 31: 57-139.
- Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.
- Pimentel FA, Nitzke JA, Klipel CB, de Jong EV. 2010. Chocolate and red wine - A comparison between flavonoids content. *Food Chem* 120: 109-122.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 51: 7292-7295.
- Arlorio M, Coisson JD, Travaglia F, Varsaldi F, Miglio G, Lombardi G. 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Res Int* 38: 1009-1014.
- Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adean I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem* 100: 1523-1530.

(2012년 6월 7일 접수; 2012년 9월 6일 채택)