

녹차의 카테킨류 분석법 개선

나호환 · 백순옥 · 한상빈 · 복진영

한국인삼연초연구소, 분석센터

초록 : HPLC에 의한 카테킨류 5성분의 정량분석법을 검토한 결과, 종래의 이동상을 acetonitril, acetic acid 및 methanol 수용액에서 acetonitrile, N,N-dimethyl formamide, ethyl acetate의 0.06% 인산수용액으로 전환하였을 때 컬럼에서의 용출시간을 45분에서 28분으로 줄일 수 있었으며, 특히 (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)나 (-)-epicatechin gallate(ECG)의 peak를 종래의 넓은 형태에서 예리한 chromatogram을 얻으므로써 분석값의 오차를 최소화할 수 있었고 머무름시간(0.32~3.97%)이나 peak 면적(1.61~7.02%)의 변동계수도 신뢰할 수 있는 값을 얻었다. 또한 시판되고 있는 수종의 녹차류와 홍차 및 대만산 오롱차를 분석한 결과 녹차류의 카테킨 함량은 120.3~153.7 mg/g 이었고 홍차는 녹차류의 1/4수준 이었다(1992년 6월 8일 접수, 1992년 7월 15일 수리).

Catechin은 1902년 Perkin 등¹⁾에 의하여 epicatechin과 함께 마호가니 나무로부터 최초로 확인된 물질로써, 현재까지 함유된 카테킨류로서는 (+)-catechin(C)과 (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG), (+)-epigallocatechin(EGC) 및 (-)-epicatechin gallate(ECG) 등 5성분²⁾인 것으로 알려져 있다. 특히 이들 화합물은 항암 작용이나 고혈압 및 동맥경화 억제작용 등^{2,7)}에 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 녹차에 대한 인식이 새로워졌고 많은 사람들로부터 각광을 받는 기호음료로써 자리를 굳히고 있다. 따라서 이들 화합물에 대한 분석방법도 여러방면으로 시도되고 있다. 일반적인 분석법으로는 주석산 철을 이용하여 탄닌으로 간간 비색정량하는 방법이 있다. 최근에는 Ikegaya 등⁴⁾에 의하여 HPLC로 별개의 catechin을 분석하는 방법이 개발되었으나 이 방법은 개개의 카테킨을 분석하는데 있어서는 효율적이나 분석시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 (-)EGCG나 (-)ECG의 경우 peak의 폭이 너무 넓어서 분석값에 오차가 커질 확율이 있다. 따라서 본 연구에서는 HPLC의 분석시간을 단축하고 peak의 폭을 줄이는 시간을 조건을 찾아 국내에서 시판되고 있는 녹차 몇종과 대만산 오롱차의 카테킨류를 분석하는 방법을 검토하였다

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 각종 차시료는 국내에서 시판되고

있는 볶음차 1종, 티백용 3종, 홍차 1종, 오롱차 1종과 대만산 오롱차 1종 및 인삼오롱차 1종 등 총 9종의 상품을 Table 1에서와 같이 구입하여 테시케이타에 1주일간 보관후 30~40 mesh가 되도록 분쇄하여 시료로 사용하였다.

표준품 및 시약

(+)-Catechin(C) 및 (-)-epicatechin(EC)은 Sigma사 제품을, (-)-epicatechingallate(ECG), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 일본의 태양화학주식회사 제품을 사용하였고, ethyl acetate, dimethyl formamide 및 acetonitrile은 J. T. Baker사의 HPLC용을 사용하였으며, 그 밖의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

Catechin 추출법

Ikegaya 등⁴⁾은 분석법에 따라, 분쇄한 시료 100 mg을 100 ml 용량 플라스크에 넣고 더운물 70~80 ml을 가한 다음 80℃ 항온수조에서 30분간 가온 추출하였다. 플라스크를 실온까지 식힌 후 물로 표선을 맞춘 용액을 여과하여 처음 10~20 ml는 버리고 이후 여액중 50 ml를 분액깔대기에 취해 크로로포름 50 ml를 넣어 카페인을 제거하였다. 이 조작을 3회 반복후 카페인을 제거한 물 용액에 다시 ethyl acetate 50 ml를 넣어 catechin을 추출하였다. 이 조작 역시 3회 반복하였고 ethyl acetate

0.45 μm millipore로 여과하여 분석용액으로 사용하였다.

표준용액 조제

(+)-Catechin은 10 mg을 25 ml 용량플라스크에, (-)-epicatechin, (+)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate는 각각 10 mg을 10 ml 용량 플라스크에 넣고 ethyl acetate로 표선까지 맞춘 다음, 이 용액을 다시 (+)-catechin은 0.5 ml, (-)-epicatechin과 (-)-epicatechin gallate는 각각 2 ml, (+)-epigallocatechin 5 ml과 (-)-epigallocatechin-3-gallate는 각각 6.5 ml을 25 ml용량 플라스크에 취한 후 ethyl acetate로 표선까지 맞추어 표준용액으로 사용하였다.³⁾

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 검토

Caffein이나 catechin류의 HPLC에 의한 분석법은 근래에 들어서 많이 보고되고 있으나 특히 catechin류는 column으로 부터의 용출시간이 Table 2에서 알 수 있

듯이 45분 이상 요구할 뿐만 아니라 column의 온도도 40 °C로 승온시켜야 하는 여러가지 문제점이 대두되었다. 또한 Fig. 1과 2 chromatogram을 보면 (-)-EGCG나 (-)-ECG 물질의 peak 폭이 넓게 퍼지는 경향이 있어서 정확한 정량값을 구하는데는 상당한 어려움이 수반하곤 하였다. 이에 반하여 새로이 검토한 분석조건은 이동상을 수정하여 분석시간을 30분 이내로 단축하고 column의 온도는 실온에서 수행할 수 있으며, peak의 폭을 Fig. 3과 4에서 알 수 있듯이 예리한 chromatogram을 얻으므로 분석값의 오차를 줄여 신뢰도를 높일 수 있었다.

또한 Table 3과 4의 표준용액과 시료용액에 대한 머루름 시간의 변동계수(CV)⁶⁾를 보면 0.32~3.96%로 비교적 높은 재현성을 보였다. 또한 Table 5의 표준물질에 대한 peak 면적의 변동계수에서도 1.61~7.01%로 신뢰할 수 있는 분석값을 얻을 수 있었다.

녹차류의 catechin 함량

국내에서 시판되고 있는 각종 녹차, 홍차 및 대만산 오롱차의 catechin 함량을 전술한 분석법에 의하여 실시한 결과를 Table 6에서 보면 동일 녹차제품이라도

Table 1. Tea samples used for catechin analysis in this experiment

Sample No.	Type of tea	Product origin	Fermentation	Remark
1	Green	Korea	Non-fermented	Steam
2	Green	Korea	Non-fermented	Roast
3	Green	Korea	Non-fermented	Tea bag
4	Green	Korea	Non-fermented	Tea bag
5	Green	Korea	Non-fermented	Tea bag
6	Black	Korea	Fermented	Tea bag
7	Oolong	Korea	Semi-fermented	
8	Oolong	Taiwan	Semi-fermented	1st class
9	Ginseng-oolong	Taiwan	Semi-fermented	

Table 2. Comparison of HPLC conditions for catechin analysis

Item	Ikegaya metho ⁹⁾	Improved method
Column	4.6 mmφ×250 mm C ₁₈	4.6 mmφ×125 mm C ₁₈
Guard column	2.1 mmφ× 50 mm	2.1 mmφ× 50 mm
Mobile phase(v/v)	Acetonitrile: 113 Acetic acid: 5 Methanol : 20 H ₂ O : 862	Acetonitrile : 63 N,N-Dimethyl formamide : 25 Ethylacetate : 25 0.06% H ₃ PO ₄ in H ₂ O : 900
Flow rate	1 ml/min	Romm temp.
Column temp.	40 °C	Room temp.
Detector	UV 280 nm	UV 280 nm
Chart speed	2 mm/min	2.5 mm/min
Analytical time	45 min	28 min

용액을 모두 합하여 농축한 후 10 ml로 정확히 맞추고 제조회사별 증자나 뒤음공정을 거친 1~2번 시료나 tea bag용 시료간에 전 catechin 함량이 17~33 mg/g 정도의 차를 보였으며, 잎차의 경우는 수확시기에 따라 품질을 정하고 있으나 최상품으로 알려진 1번차의 total catechin의 함량(134.9 mg/g)보다 수확시기가 가장 늦은 tea bag용 녹차의 함량(153.7 mg/g)이 다소 높은 경향을 보였다. 또한 항산화, 항암 및 항균작용⁷⁾에 효과가 있는 것으로 알려진 ECG나 EGCG의 함량은 비발효차인 녹차에서 가장 높았고, 반발효차인 오통차는 녹차보다 다소 적게 함유하였으며 발효차인 홍차는 녹차의 1/4 수준

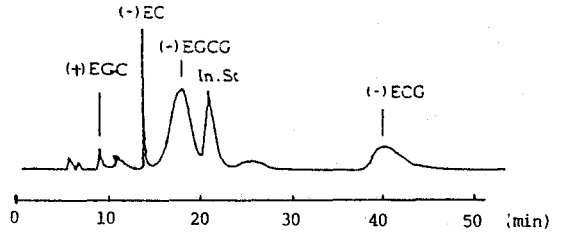


Fig. 2. HPLC chromatogram of sample solution by Ikegaya method.

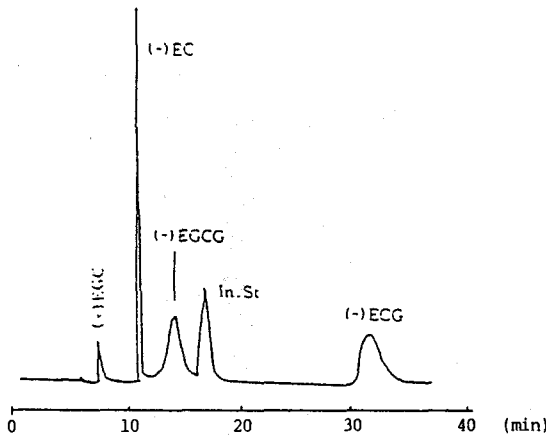


Fig. 1. HPLC chromatogram of catechin standard solution by Ikegaya method.

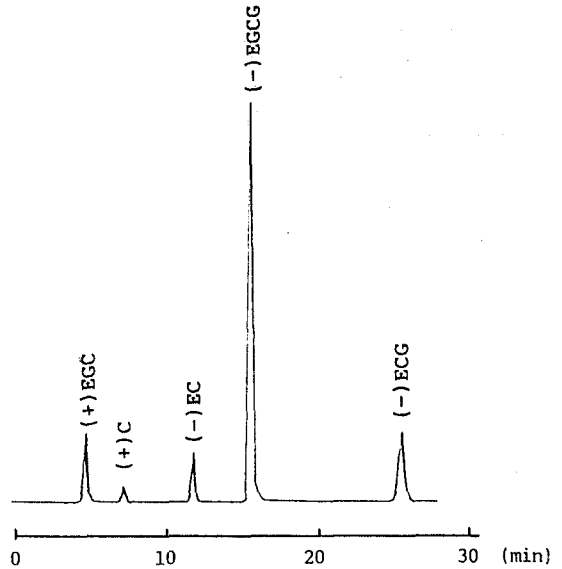


Fig. 3. HPLC chromatogram of catechin standard solution by the improved method.

Table 3. Retention time of catechin standard solution and its coefficient of variance(cv) from five replicate measurements

Item	(+)EGC	(+)C	(-)EC	(-)EGCG	(-)ECG
Mean of time (min)	3.95	6.63	11.42	15.25	24.48
CV (%)	2.20	1.40	1.57	1.68	3.96

Table 4. Retention time of sample solution and its coefficient of variance(cv) from five replicate measurements

Item	(+)EGC	(+)C	(-)EC	(-)EGCG	(-)ECG
Mean of time (min)	3.68	6.36	11.06	14.88	24.77
CV (%)	0.89	0.99	0.32	1.76	1.47

Table 5. Peak area of catechin standard solution and its coefficient of variance(cv) from five replicate measurements

Item	(+)EGC	(+)C	(-)EC	(-)EGCG	(-)ECG
Mean of time (min)	60,728	22,362	85,232	495,254	175,856
CV (%)	7.01	4.54	5.43	1.61	6.00

Table 6. Concentration of catechins in commercial leaf tea and tea bags

Sample	(+)EGC	(+)C	(-)EC	(-)EGCG	(-)ECG	Total
	mg/g					
1. Non-fermented Green Steam	26.0	2.08	7.4	79.6	22.9	138.0
2. Green Roast	24.7	1.58	7.6	78.7	22.3	134.9
3. Green Tea bag	25.8	1.75	5.6	93.7	26.8	153.7
4. Green Tea bag	25.5	1.12	6.7	76.7	19.6	129.6
5. Green Tea bag	16.5	1.22	6.3	68.6	27.7	120.3
6. Fermented Black Tea bag	6.9	0.16	0.9	7.3	35.7	
7. Semi-fermented Oolong	14.3	1.12	4.9	54.2	16.2	90.7
8. Oolong	11.0	0.45	2.6	76.6	14.2	104.9
9. Ginseng-oolong	21.0	0.30	3.1	57.5	10.5	92.4

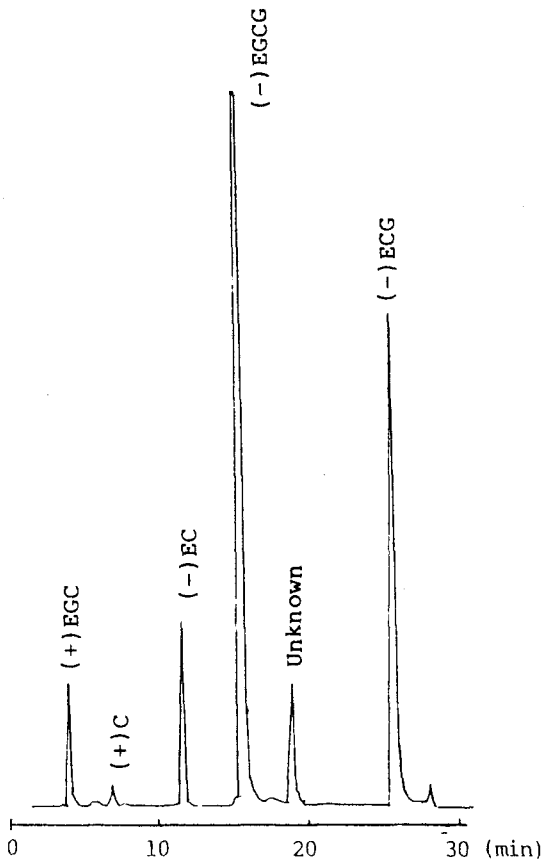


Fig. 4. HPLC chromatogram of sample solution by the improved method.

이었다. 이와같은 결과는 Terada 등⁵⁾이 발표한 catechin류의 발효과정에서의 산화 중합에 의한 theaflavin류의 생성에 기인하는 것으로 판단된다. 오롱차의 경우는 카테킨류의 함량이 국내제품(90.72 mg/g)보다 대만산(104.85 mg/g)이 다소 높았으며 이는 생산지별 품종이나 생육환경의 차이 등에 기인하는 것으로 보인다. 또한 성분별로는 (-)EGCG > (-)ECG ≅ (+)EGC > (-)EC > (+)C 순이었다. 따라서 이들 화합물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 현 시점에서 녹차류 중의 catechin류 분리 정량분석법 개선은 다방면으로 활용될 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Perkin and Yoshitake: J. Chem. Soc., 18 : 1160(1902)
2. Namiki, K., Yamanaka, M., Tateyama, C. Igarashi, M. and Namiki, M.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 38 : 189(1991)
3. Ikegaya, K.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi: 32 : 61(1985)
4. 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正: 茶研究(71), 43(1990)
5. Terada, S., Maeda, Y., Masui, T., Suzuki, Y. and Ina, K.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 34 : 20(1987)
6. George, W. S.: Statistical Methods, 6th Ed., Iowa State Univ., 62(1974)
7. 유태중: 차와 건강, 등지출판사, 57(1988)

Improvement of analytical method for catechins in green tea

Hyo-Hwan Rah, Soon-Ok Baik, Sang-Bin Han and Jin-Young Bock(Chemical Analysis Center, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Tae-Jeon, 305-345, Korea)

Abstract: Quantitative analysis of catechins by HPLC was studied. When the mobile phase was switched from the conventional(AOAC) Methanol, Acetonitril and Acetic acid solution in H₂O to 0.06% Phosphate solution with Acetonitrile, N,N-Dimethyl formamide, and Ethyl acetate, retention time could be reduced from 45 min to 28 min, especially, we obtained sharper chromatogram of the compounds, either (-)EGCG or (-)ECG, which resulted in minimization of analytical errors. CVs of retention time (0.32~3.97%) and peak area (1.61~7.01%) indicated that the data were more reliable. Content of catechins in commercial teas analyzed by the method was 120.3~153.7 mg/g in green teas which was about 4 times that in black tea.