

## 용매 추출과 분배에 의한 한국산 녹차로부터 카테킨 화합물의 회수

김정일·\*노경호  
초정밀분리기술센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 2001. 8. 3., 게재승인 : 2001. 9. 25.)

### Recovery of Catechin Compound from Korean Green Tea by Solvent Extraction and Partition

Jung Il Kim and Kyung Ho Row\*

Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 2001. 8. 3., Accepted : 2001. 9. 25.)

Catechin compounds as anticancer and antioxidant were target materials from Korean Green Tea in this work. The methodologies of solvent extraction and partition were utilized to recover catechin compounds from green tea and the optimal experimental conditions were found by comparing the degree of recovery as solvent, extraction times and operating temperatures. The extract was partitioned with chloroform, which was best fit to remove caffeine after the extraction of green tea with 80°C water for 40 min. Further, the resulting extract was partitioned in ethyl acetate layer to purify the catechin compounds of EGC, EC, EGCG and ECG. This experimental result could be extended to preparative HPLC to obtain EGCG on a commercial scale.

**Key Words** : green tea, catechin compound, solvent extraction, partition

#### 서 론

녹차는 최근 건강음료 식품으로 많은 주목을 받고 있는 물질로서 다당류, flavonoids, 비타민 B 복합체, 비타민 C, 비타민 E, R-아미노 부티르산(Butyric acid)과 불화물(fluoride)과 같은 다양한 유용 성분을 포함하고 있다. 특히 녹차에 포함된 카테킨 화합물은 강력한 항산화 및 항암 효과를 가지고 있고 그에 대한 연구 자료가 많이 보고되고 있다(1-3). 녹차에 포함된 대표적인 카테킨 화합물은 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC), 에피카테킨(epicatechin; EC), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG)와 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate; ECG) 등이 있다. 이들의 항산화 및 항암 효과 이외에 면역체계 강화, 항혈전 효과, 피부암 예방, 심장병 예방과 콜레스테롤 예방 등의 효과를 가지고 있다(4-7). 특히 카테킨 화합물 중에 EGCG는 일반 화장품의 항산화제로 많이 쓰이고 있는 비타민 C보다는 20배, 비타민 E보다는 30배, BHA나 BHT보다는 2~4배 강한 항산화 효과를 가지고 있다(8). 항산화제는 반응성이 높은 성분으

로 잘 알려진 자유 라디칼이 DNA나 다른 생체 세포와 반응하기 전에 자유 라디칼을 흡수하여 세포를 보호한다. 그러므로 항산화제는 피부 변형 속도를 감소시키는 효과를 가져온다. 따라서 앞으로의 화장품 산업에서 카테킨 화합물의 항산화 효과가 상당한 주목을 받을 것으로 기대된다.

용매 추출을 이용하여 카테킨 화합물을 회수하기 위한 많은 노력이 이루어졌으며 그에 대한 연구 자료가 많이 발표되었다(9,10). 최근 초임계 유체를 이용하여 녹차로부터 카테킨 화합물을 회수하기 위한 연구도 보고되고 있는데 그 효율이 물이나 에탄올에 비해 매우 낮은 수준이다(11). 또한 녹차 추출물을 이용하여 물과 에탄올에 대한 용해도를 비교한 연구가 발표되었다(12). 이 연구 결과에서 녹차 추출물의 용해도는 물보다는 에탄올에서 더 좋은 용해도를 나타내지만 순수한 녹차 잎으로부터 카테킨 화합물을 추출하는 경우에는 에탄올보다 물이 더 효율이 좋음을 본 연구에서 확인하였다. 카테킨 화합물은 추출 및 정제과정동안 많은 화학적 변화를 일으키게 된다. 이러한 현상으로 대표적인 것이 산화와 epimerisation이다. 특히 카테킨 화합물의 epimerisation은 제조과정동안 가장 중요한 요소가 되며, 온도와 시간에 따라 각기 다른 변화율을 나타낸다. 이러한 현상을 순수한 물을 사용한 경우보다 수돗물을 사용한 경우에 더 현저히 나타난다(13). 따라서 순수한 물을 이용하여 높은 온도에서 추출하는 경우에는 카테킨 화합물이 추출과정 동안 epimerisation을 일으키게 되므로 장시간 추출하는 것은 오히려 회수율을 낮추

\*Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959  
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

는 결과가 된다. 물로 추출하는 경우 40~50℃에서 장시간 추출을 하여도 epimerisation이 잘 일어나지 않지만 100℃에서는 20분 이상 추출하게 되면 epimerisation이 많이 일어난다. 따라서 본 연구에서는 50℃에서 4시간, 80℃에서 40분, 100℃에서 15분 동안 증류수를 사용하여 추출하였다.

본 연구의 목적은 물과 에탄올을 사용하여 각각 추출 온도와 시간을 변화시키면서 녹차로부터 카테킨 화합물의 회수하여 최적 추출조건을 실험적으로 구하는 것이다. 녹차 잎을 추출하기 위해서는 순수한 물을 사용하였으며 추출한 시료에 포함된 카테킨 화합물을 회수하기 위하여 에틸 아세테이트와 클로로포름을 순차적으로 사용하여 분배를 실시하였다. 추출과 분배에 의한 회수율을 비교하기 위해서 분석용 액체 크로마토그래피를 사용하였으며 정지상으로 크기가 15 μm인 C<sub>18</sub> 충전물이 채워진 컬럼(300×3.90 mm), 이동상으로는 물, 아세토나이트릴과 에틸아세테이트를 사용하였다.

**재료 및 방법**

**실험재료**

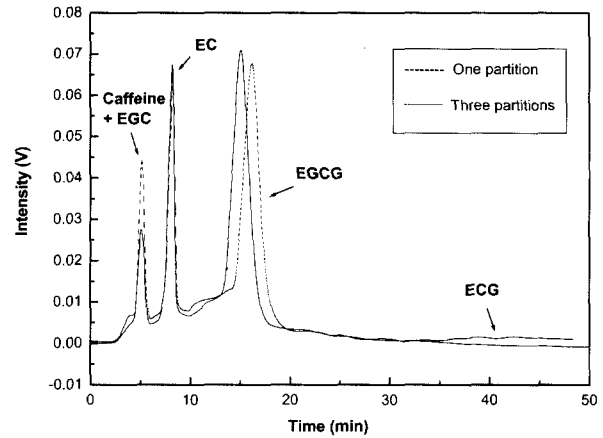
본 실험에 사용된 녹차는 전라남도 보성에서 재배된 차를 구입하여 사용하였으며, 표준시료 물질인 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC), 에피카테킨(epicatechin; EC), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG)와 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate; EGC)는 Sigma에서 구입하였으며, HPLC Grade의 메탄올, 에탄올, 아세토나이트릴, 에틸아세테이트, 클로로포름은 덕산화학에서 구입하였고, 물은 2차 증류한 증류수를 사용하였다.

**실험기기**

추출한 시료를 농축하기 위해 회전식 증발기(BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였다. 분석용 컬럼(300×3.90 mm)은 충전물의 크기가 15 μm (YMC Co.)인 역상 정지상을 채워 사용하였다. 분석용 HPLC는 Waters사의 600S, 515 펌프(multisolvent delivery system), 486 UV-visible tunable wavelength absorbance, Rheodyne 주입기(20 μL sample loop)를 사용하였고, 데이터 저장 시스템은 Chromate(ver. 3.0 Interface Eng.)를 사용하였다.

**실험방법**

녹차잎 3 g을 잘게 분쇄하여 용매 60 mL에 각각의 조업온도와 침적시간에 따라 교반기에서 교반하여 추출하였다. 용매로는 순수한 물과 에탄올을 사용하였고 추출 온도는 순수한 물이 50, 80, 100℃이고 각각 4시간, 40분, 15분 동안 교반하여 추출하였고, 에탄올은 40℃에서 2시간 동안 교반하여 추출하였다. 에탄올인 경우에는 클로로포름과 섞이기 때문에 이를 회전식 증발기로 농축시킨 후에 순수한 물을 첨가하여 60 mL를 만들었다. 각각의 조건에서의 추출물은 5 μm의 세공크기를 가지고 있는 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 다시 50℃로 가열하여 클로로포름과 1:1의 부피비율로 혼합하고 30분 동안 교반하여 층 분리를 실시하였다. 클로로포름층 위에 층분리된 물층을 분리하여 에틸아세테이트를 1:1의 부피비율로 혼합하여 층 분리를 하였다. 물층 위에 층분



**Figure 1.** Chromatogram of ethyl acetate layer with variation of chloroform partition number. (0.1% acetic acid in water/acetonitrile/ethyl acetate = 87/10/3 vol.%, column : 300×3.90 mm, packing material : 15 μm, flow rate : 1 mL/min, 20 μL injection)

리된 에틸아세테이트층에는 카테킨 화합물이 분배되어 있고 용매, 추출 온도와 시간에 따른 회수율을 비교하기 위하여 분석용 액체 크로마토그래피를 이용하였다. 정지상으로 크기가 15 μm인 C<sub>18</sub> 충전물 2.24 g이 채워진 컬럼(300×3.90 mm)을 사용하였고 시료의 주입량은 20 μL이고 이동상으로는 0.1% 아세트 산이 포함된 물, 아세토나이트릴, 에틸아세테이트를 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 하고 UV 검출기를 280 nm로 고정하였다.

**결과 및 고찰**

녹차로부터 카테킨 화합물을 추출하기 위하여 물과 에탄올을 이용하였다. 녹차 안에 포함된 카페인 함량은 2.66% 정도이며 카테킨 화합물의 함량은 대략 7.65% 정도이다. 카테킨 화합물 중에서 EGC는 2.26%, EC는 0.78%, EGCG는 3.44%, ECG는 1.01%가 각각 포함되어 있다(14). 추출과정에서 물인 경우에는 온도 50, 80, 100℃에서 각각 2시간, 40분, 15분의 시간으로 추출을 실시하였으며 에탄올인 경우에는 40℃에서 2시간 동안 추출을 실시하였다. 순수한 물과 에탄올을 사용하여 추출한 녹차 추출물 중에는 많은 성분들이 포함되어 있다. 따라서 추출과정 후 추출물 안에 포함되어 있는 카테킨 화합물을 얻기 위하여 같은 부피의 클로로포름과 에틸아세테이트를 각기 이용하여 분배하였다. 클로로포름과의 분배는 주로 카페인을 제거하기 위하여 실시하였고 그 밖에 약간의 불순물이 같이 제거된다. 그리고 횟수에 따라서 카페인 제거효율이 달라지는데 Figure 1에서는 클로로포름 분배를 1, 3회 실시하였을 때의 에틸아세테이트 층을 분석한 결과를 보여주고 있다. 3회 실시한 경우가 1회 실시한 경우보다 카페인의 양이 많이 줄어들었음을 알 수 있다. 그러나 카페인은 EGC와 체류시간이 거의 비슷하여 같이 용출되었다. 클로로포름 분배로 인하여 감소한 카페인의 양을 분석하기 위하여 1~3회까지 분배를 실시한 후 각각 횟수에 따라 클로로포름 층을 분석용 액체 크로마토그래피로 분석한 결과가 Figure 2에 나타나 있다. 1회와 2회 실시한 클로로포름 층

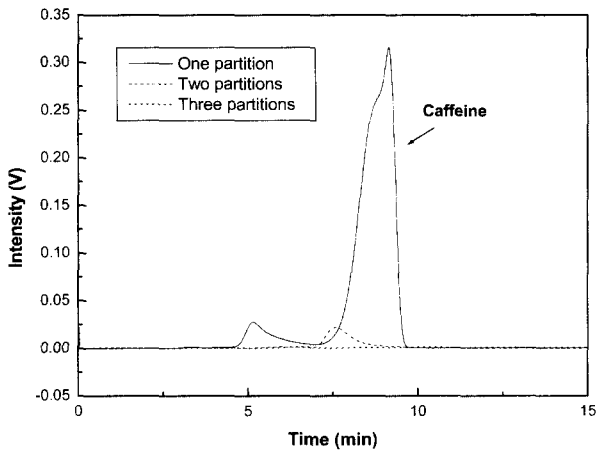


Figure 2. Chromatogram of chloroform layer with variation of chloroform partition number. (same as in Figure 1)

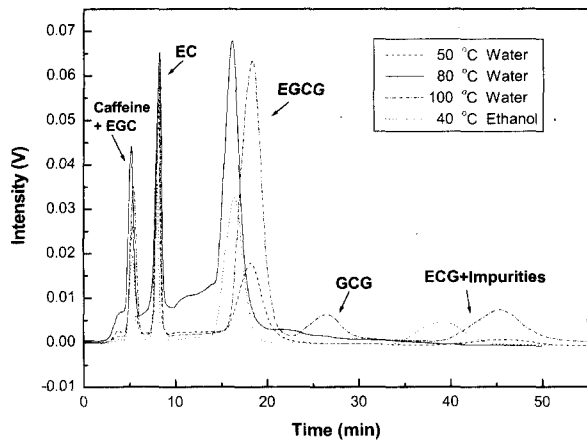


Figure 3. Chromatogram of ethyl acetate layers with variation of extraction condition (same as in Figure 1)

에서는 카페인의 양이 어느 정도 포함되어 있지만 3회 실시한 클로로포름 층에는 카페인이 거의 포함되지 않았다. 그러므로 카페인을 제거하기 위하여 실시하는 클로로포름과의 분배는 2회 실시하는 것이 가장 경제적이라 볼 수 있다.

층 분리가 이루어진 에틸아세테이트 층에서는 EC, EGC, EGCG, ECG와 같은 카테킨 화합물, 카페인과 미량의 불순물이 분배되었다. Figure 3은 물, 에탄올의 추출 용매와 온도, 시간에 따른 카테킨 화합물의 회수율을 비교하기 위하여 분석용 액체 크로마토그래피에서 카테킨 화합물이 포함된 추출물을 분석한 결과이다. EGC와 EC에 대한 회수율은 용매, 온도와 시간에 따라 거의 같은 회수율을 보였다. 하지만 EGCG에 대한 회수율은 순수한 물을 이용하여 80과 100°C에서 추출하였을 때 다른 경우보다 더 많은 카테킨 화합물을 회수하였다. 100°C로 추출한 경우에는 카테킨 화합물 이외에 다른 성분들이 분석되었다. EGCG의 오른쪽 피크는 높은 온도에서 추출하였기 때문에 EGCG가 epimerisation을 일으켜 GCG로 변한 것이다. 위 결과들은 크기가 15 μm인 C<sub>18</sub> 충전물 2.24 g이 채워진 컬럼(300×3.90 mm)에 에틸아세테이트층을 주입하여 얻은 결과이다. 이동상 조건은 0.1% 아세트산이 포함된 물/아세트나이트릴/에틸아세테이트(87/10/3, 부피비)이

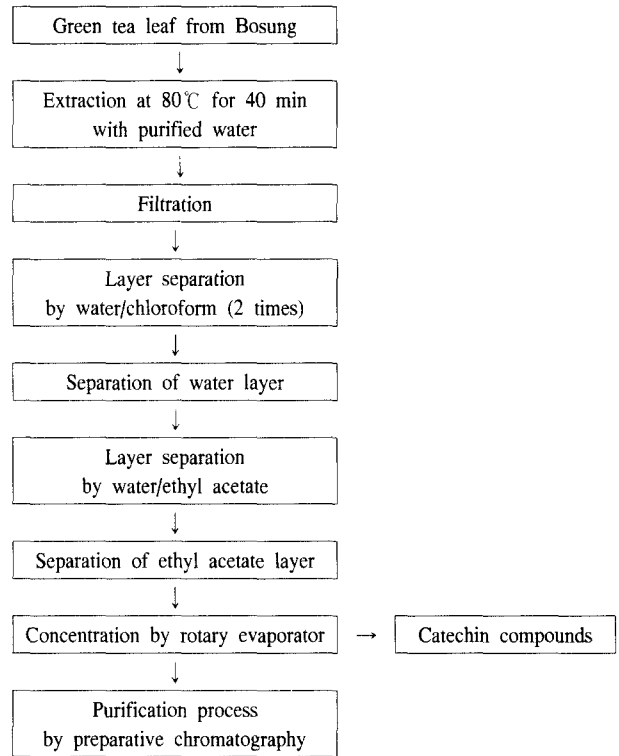


Figure 4. Scheme of the recovery of EGCG and other catechin compounds from green tea.

고 20 μL를 주입하여 분석하였다.

본 연구에서 실시한 용매, 온도와 시간에 따른 녹차로부터 카테킨 화합물의 회수율을 비교한 실험의 결과로부터 얻은 최적의 추출 조건은 다음과 같다. 먼저 녹차 잎을 잘게 분쇄한 다음 순수한 물을 이용하여 80°C에서 40분간 추출한다. 추출물에 포함된 녹차 잎과 부유물을 제거하기 위하여 크기가 5 μm인 여과지로 거른 다음 분배를 실시한다. 분배 과정은 먼저 카페인을 제거하기 위하여 클로로포름으로 2회 실시한 다음 추출물 층을 회수한다. 추출물 층에 포함된 카테킨 화합물을 회수하기 위하여 다시 에틸아세테이트로 분배를 실시한다. 이러한 방법은 조임계를 이용하여 추출한 경우보다 더 많은 양의 카테킨 화합물을 얻을 수 있는 방법이다(15). 또한 증류수를 이용한 추출과 용매 분배만으로 녹차에 포함된 유용성분을 비교적 간단히 회수할 수 있는 경제적인 방법으로 이용될 수 있다.

카테킨 화합물 중에서 항산화 및 항암 효과가 가장 우수한 EGCG를 얻기 위해서는 액체 크로마토그래피를 이용할 수 있다. Figure 4는 녹차로부터 EGCG를 얻기 위하여 필요한 공정들에 대한 개요도를 나타낸 것이다. 본 연구에서 얻은 실험결과를 제조용 액체 크로마토그래피에 응용한다면 순수한 EGCG를 얻을 수 있을 것이다. 이는 현재 국내특허 출원 중이다(16).

요 약

녹차는 최근 많은 건강 식품으로 많은 관심을 받고 있는 물질이며 함암 및 항산화 효과, 면역체계 강화, 항혈전 효과,

피부암 예방, 심장병 예방과 콜레스테롤 예방과 같은 효능을 지닌 카테킨 화합물을 포함하고 있다. 본 연구에서는 녹차로부터 카테킨 화합물을 회수하기 위하여 용매 추출과 분배 방법을 사용하였으며 추출 시 용매, 시간과 온도에 따른 회수율을 비교하여 최적 추출 조건을 조사하였다. 실험 결과로부터 얻은 최적 추출 조건은 물 80℃에서 40분 동안 추출한 후 카페인을 제거하기 위하여 클로로포름으로 분배를 실시하고 다시 에틸아세테이트로 분배를 실시하는 것이다. 에틸아세테이트 층에는 EGC, EC, EGCG, ECG와 같은 카테킨 화합물이 분배되어 있다. 더 나아가서는 제조용 액체 크로마토그래피를 이용하여 항암 및 항산화 효과가 가장 좋은 EGCG를 얻을 수 있을 것이다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀분리기술센터 연구비 지원에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Chi Han (1997), Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, *Cancer Letters*, **114**, 153-158.
- Melissa K. Johnson, George Loo (2000), Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA, *Mutation Research*, **459**, 211-218.
- Bao Ting Zhu, Nalin Taneja, Daniel P. Loder, Douglas A. Balentine, and Allan H. Conney (1998), Effects of tea polyphenols and flavonoids on liver microsomal glucuronidation of estradiol and estrone, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **64**, 207-215.
- Masami Suganuma, Sachiko Okabe, Naoko Sueoka, Eisaburo Sueoka, Satoru Matsuyama, Kazuo Imai, Kei Nakachi, and Hirota Fujiki (1999), Green tea and cancer chemoprevention, *Mutation Research*, **428**, 339-344.
- Won-Seek Kang, Il-Ho Lim, Dong-Yeon Yuk, Kwang-Hoe Chung, Jong-Bum Park, Hwan-Soo Yoo, and Yeo-Pyo Yun (1999), Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate, *Thrombosis Research*, **96**, 229-237.
- Ian R. Record and Ivor E. Dreosti (1998), Protection by black tea and green tea against UVB and UVA+B induced skin cancer in hairless mice, *Mutation Research*, **422**, 191-199.
- Mukhtar H. and Ahmad N. (2000), Prevention of cancer and optimizing health, *American J. of Clinical Nutrition*, **72**, 1698-1704.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., and Jang J. (1995), Plant flavonols are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease, *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2800-2802.
- E. L. Copeland, M. N. Clifford, and C. M. Williams (1998), Preparation of (-)-epigallocatechin gallate from commercial green tea by caffeine precipitation and solvent partition, *Food Chemistry*, **61**, 81-87.
- Yuko Yoshida, Masaaki Kiso, and Tetsuhisa Goto (1999), Efficiency of the extraction of catechins from green tea, *Food Chemistry*, **67**, 429-433.
- Chiehming J. Chang, Kou-Lung Chiu, Ying-Ling Chen, and Ching-Yuan Chang (2000), Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction, *Food Chemistry*, **68**, 109-113.
- Victor Nwuha, Mitsutoshi Nakajima, Jihong Tong, and Sosaku Ichikawa (1999), Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils, *J. of Food Engineering*, **40**, 161-165.
- Huafu Wang and Keith Helliwell (2000), Epimerisation of catechins in green tea infusions, *Food Chemistry*, **70**, 337-344.
- [http://www.greentea.com/teainformation/g\\_decaf.htm](http://www.greentea.com/teainformation/g_decaf.htm)
- Chiehming J. Chang, Kou-Lung Chiu, Ying-Ling Chen, and Ching-Yuan Chang (2000), Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction, *Food Chemistry*, **68**, 109-113.
- K. H. Row, J. I. Kim, and Y.H. Chang (2001), A process of extraction of catechin compounds and of purification of epigallocatechin gallate from green tea, pending to Korean Patent, 2001-44738.