

HPLC On-line ABTS⁺ Antioxidant screening 시스템을 이용한 한국산 녹차로부터 Catechin compounds의 항산화 활성분석

이 광 진

한국과학기술연구원 KIST강릉분원, 천연물소재연구센터
(접수 : 2008. 1. 24., 게재승인 : 2008. 2. 13.)

Antioxidant activity analysis of Catechin compounds in Korean green tea using HPLC On-line ABTS⁺ Antioxidant screening system

Kwang Jin Lee

Natural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology KIST Gangneung,
290 Daejeon-Dong, Gangneung, Gangwon-Do 210-340, South Korea

(Received : 2008. 1. 24., Accepted : 2008. 2. 13.)

In this work, we describes analysis of the antioxidant potential of Korean green tea phenolics using an high-performance liquid chromatography (HPLC) on-line ABTS⁺ antioxidant screening method. In conjunction with the analysis of their 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺) radical scavenging ability, the extraction of catechine compounds from Korean green tea were performed by various temperature and time. The optimum operating conditions were experimentally determined to analyze the catechine compounds in the pretreatment extracts. From the results, the extraction temperature 60°C, time 3 min was selected as an optimal antioxidant activity condition. The analysis by C₁₈ column was performed, the flow rate of mobile phase and UV wavelength was fixed at 1.0 ml/min and 254 nm, respectively. the mobile phase was composed from acetonitrile and water, and the gradient elution mode were applied.

Key Words : Green tea, Catechins, Solvent extraction, HPLC on-line ABTS⁺

서 론

차 (*Camellia sinensis*)의 주된 종류에는 녹차와 홍차가 있으며, 주성분으로 caffeine 1-5%과, 많은 양의 tannin과 phenolic이 5-27%로 함유되어 있다(1). 그 중에서 녹차의 건조된 잎에는 polyphenols이 10-30%로 함유되었음이 보고되어 있다(2, 3). Phenolic compounds는 simple phenols과 phenolic acids, hydroxycinnamic acid 유도체와 flavonoids 등의 세가지 종류 들로 나누고 있다. 이들 물질은 일정수준의 항산화 활성, 항돌연변이성, 항암성을 지니고 있다(4,5). Catechin compounds에는 (+)galocatechin (GC), (+)catechin (C), (-)epigallocatechin gallate (EGCG), (-)epicatechin gallate (ECG) 및 (-)epicatechin (EC)으로 구성되어 있으며(6, 7), 특히 EGCG (C₂₂H₁₈O₁₁)는

암 증식 효과 억제 및 항산화 효과가 좋은 것으로 알려져 있다(8). 이러한 녹차 및 홍차는 산업적으로 의약품, 식품 음료, 화장품등 대중적으로 많은 부분에 적용가능 하다(9). 현재 국내에서는 전남 보성산 녹차가 최대 산지이며, 많은 양의 대부분은 중국산 녹차를 수입하여 생활에 사용하고 있는 실정이다. 특히 우리나라 고부가가치의 생물분리공정 제품에 대한 국제 경쟁력의 우위 확보를 위한 연구와, 정밀 화학 및 의약품과 화장품에 관련된 산업분야에서의 고순도 분리에 대한 연구개발은 계속해서 진행되고 있다(10). 녹차로부터 유용성분을 얻기 위한 추출 방법으로는 일반적인 용매추출법으로 물, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴을 주로 사용하며(11), Soxhlet은 전통적인 증류방법으로 많이 알려져 있으며, 초음파 기술 추출공정은 고주파와 저주파의 사용에 따라 캐비테이션의 강도가 달라지며, 파장의 침투력이 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상시키므로 사용되고 있으며(12, 13), 초임계 CO₂를 이용한 추출 방법도 연구되어지고 있다(14).

오늘날 생물산업 공정에 천연물소재 활성화합물 (polyphenols, anthocyanins, tartaric acid, aroma compounds, poly-saccharides)

† Corresponding Author : Natural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology KIST Gangneung, 290 Daejeon-Dong, Gangneung, Gangwon-Do 210-340, South Korea
Tel : +82-33-650-7270, Fax : +82-33-650-7299
E-mail : cfc0079@empas.com

을 이용한 추출은 매우 많은 부분에 적용되고 있다(15). 이러한 추출물에서 HPLC On-line ABTS⁺ screening를 이용한 천연물 연구기법을 바이오 활성을 가지고 있는 다양한 생리활성물질의 신속한 탐색기법으로 적용하여 검토하는 것은 의미 있는 일이라 여겨진다(16, 17). 특히 활성화합물의 항산화활성과 라디칼 소거능을 신속히 규명하여, 활성을 빠른 시간내 탐색할 수 있는 장점은 생리활성물질 연구의 기반을 제공할 수 있을 것이다.

본 연구의 목적은 주변에서 손쉽게 구할 수 있는 녹차에서의 catechin 화합물을 추출하기 위하여 온도 (°C)와 시간 (분)을 변화하여 catechins을 추출하고 HPLC On-line ABTS⁺ screening 시스템을 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 추출량을 실험적으로 구하고 비교 하고자 한다. 또한 연구결과를 토대로하여 추출공정을 확립함으로써 이들 물질의 상용화에 필수적인 공정 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 시료는 전남 보성에서 재배된 녹차 (2007년 5월 채취)를 구입하였다. 표준 시료인 (+)gallicocatechin (GC), (+)catechin (C), (-)epigallocatechin gallate (EGCG), (-)epicatechin gallate (ECG) 및 (-)epicatechin (EC)는 Janssen Chemical 사와 Sigma 사에서 구입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급 (99.9%)으로 물, 아세트나이트릴, 에탄올은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)에서 그리고 아세트산은 동양화학 (Incheon Korea)에서 구입하여 사용하였다.

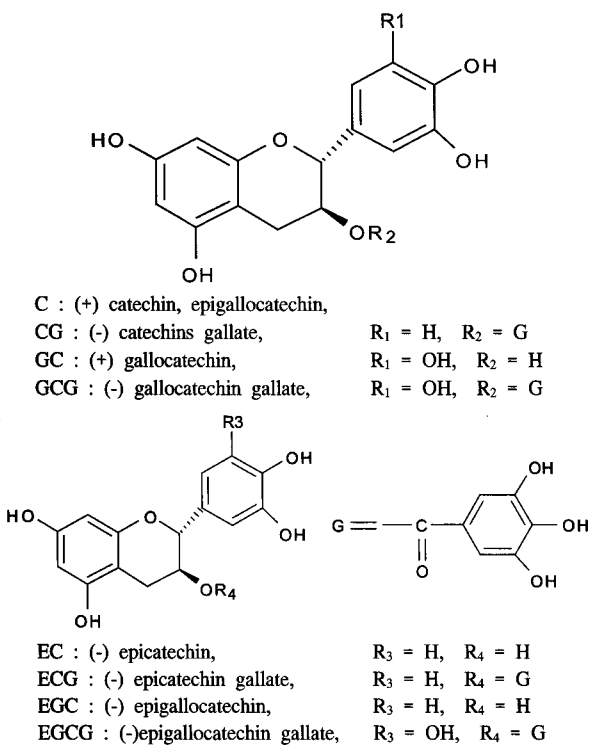


Figure 1. Structures of catechin compounds.

활성측정을 위해 Radical scavenging 활성분석을 위하여 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium persulfate를 Sigma-Aldrich에서 순도 99.0%를 구입하여 사용하였다. Fig. 1에서는 녹차에 함유된 catechin compounds의 구조식을 정리하여 놓았다.

추출 및 전처리

추출은 일정한 온도 (상온)에서 수행 하였으며, 녹차분말 3 g을 500 ml 비이커의 용매 100 ml에 첨가하여 추출하였다. 다양한 추출방법을 적용하기 위하여 추출온도 (25, 40, 60, 80, 100°C)과 추출시간 (3, 5, 10, 20, 30분)를 침적방법 (25°C)에서 각각 적용하였다. 각각의 추출물에는 많은 양의 단백질 성분과 기타 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 감압여과와 감압 농축을 30 ml로 하여 용매를 증발시키고 추출한 시료를 멤브레인 필터 (0.2 μm)로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다. Fig. 2에서는 녹차로부터 catechin compounds의 추출 및 정제공정을 나타내었다.

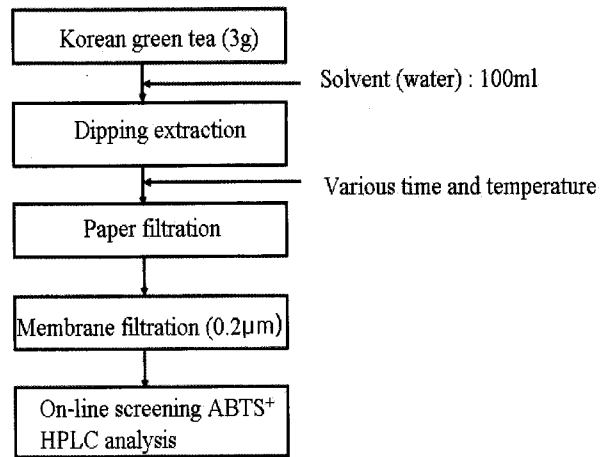


Figure 2. Extraction and purification procedures.

표준액제조

표준 시료인 (+)gallicocatechin (GC), (+)catechin (C), (-)epigallocatechin gallate (EGCG), (-)epicatechin gallate (ECG) 및 (-)epicatechin (EC)은 2 mg/ 4ml이 되게 에탄올에 녹여 500 ppm으로 만들어 사용하였다.

ABTS⁺ 표준액 제조

On-line 라디칼활성 측정을 위한 표준시료 조제는 125 ml 바이얼 병의 물 40 ml에 potassium persulfate 37.8 mg을 넣어 완전히 녹인 후 ABTS⁺ 44 mg을 첨가하여 충분히 교반 해준 후 호일을 돌려 쌓았다. 초기 제조된 용매 40 ml중 30 ml을 덜어서 870 ml의 순수한 물을 넣은 1 L 갈색 병에 넣고 하루 정도 radical의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다.

기기 및 Online screening ABTS⁺ HPLC 분석

HPLC급 물 (99.9%) 100%를 이용하여 추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식 증발기 (LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Japan)를 사용하였고, HPLC시스템은

로는 Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 으로 ChemStation (Agilent Technologies)이 부착된 HPLC-DAD 를 사용하였다. 각각의 녹차추출물 5 μ l Agilent 1200 HPLC system에 주입하였다. ABTS⁺ 표준액은 Agilent 1200 pump에 의하여 ABTS⁺ 시약이 유속 0.5 ml/min로 1 ml loop를 통해 시약이 운반 되며, 혼합기에서 혼합된 시료를 통해 UV검출기 (Agilent Technologies, Germany) 734 nm에서 항산화활성을 측정하였다. 데이터처리는 Agilent사의 PC에 설치된 Millennium 3.2를 사용하였으며, 분석에 사용된 컬럼 은 5 μ m인 물질이 충전된 분석용 RP-HPLC의 컬럼 (RS-tech OP C₁₈, 4.6 \times 250 mm)이었다. 유속은 1 ml/min로 고정하였다. UV detector는 DAD의 파장범위는 200-400 nm를 적용하였으며, 크로마토그래피는 254 nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계 A : 물/아세트산 (99.9/0.1, vol%), B : 아세트나이트릴/아세트산 (99.9/0.1, vol%)을 사용하여 (85:15-65:35, A:B vol.%)까지 40분 동안 선형 기울기용매 용출법으로 실험하였다. Fig. 3에서는 HPLC on-line ABTS⁺ screening 시스템을 나타내었다.

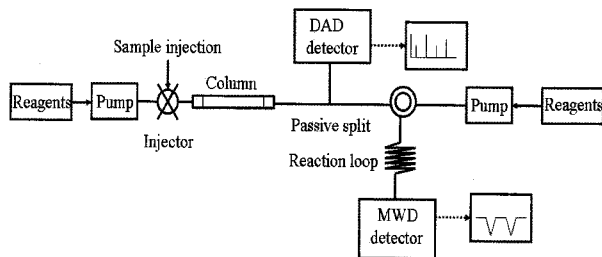


Figure 3. Schemes of HPLC On-line ABTS⁺ screening system.

결과 및 고찰

녹차의 항산화활성 성분으로 잘 알려진 catechin compounds 은 인체내의 항산화활성 및 항암성을 억제하는데 중요한 역할을 하며(4, 5), 각종 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤의 전달을 억제하기 때문에 상업적으로 매우 높은 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 녹차에서의 catechin compounds를 추출 하기 위하여 추출온도 (25, 40, 60, 80, 100 $^{\circ}$ C)와 추출시간 (3, 5, 10, 20, 30분)을 변화하여 침적방법 상온 (25 $^{\circ}$ C)에서 추출하고, HPLC on-line ABTS⁺ screening를 사용하여 항산화활성을 빠르게 분석하고 catechin compounds를 정량하여 항산화활성의 영향을 실험적으로 확인하였다(Tables 1, 2). 전처리한 녹차 추출물 (3 g)을 분석용 컬럼을 사용하여 이동상 1 ml/min, 주입부피 5 μ l, 254 nm의 실험조건에서 분석하였으며, ABTS⁺ 시약은 유속 0.5 ml/min, 734 nm에서 분석하였다. 이동상은 이성분계 A : 물/아세트산 (99.9/0.1, vol%), B : 아세 토나이트릴/아세트산 (99.9/0.1, vol%)을 사용하여 (85:15-65:35, A:B vol.%)까지 40분 동안 선형적으로 변화시켰다. 실험에서 언급한 바와 같이 표준 시료농도는 500 ppm으로 만들었으며, catechin compounds의 정성분석은 표준시료의 체류시간을 비교 하여 확인하였다. 이때, catechin compounds의 경우 체류시 간은 각각 5-galloylquinic acid는 4.16분, GC는 6.17분, EGC 는 8.87분, (+)catechin는 10.40분, EC는 14.24분, EGCG는 14.58분, ECG는 21.49분, caffeine는 11.31분이었다.

Table 1. Effect of difference temperature and time (3 min) on the antioxidant activity

Temp/ time (min)	Peak No.	Compounds	Retention time	Area in 280nm (%)	Area in 734nm (Antioxidant activity) (%)
25 $^{\circ}$ C, 3 min	1	5-Galloylquinic acid	4.169	7.670	1.045
	2	GC	6.178	0.207	0.757
	3	EGC	8.876	4.114	2.079
	4	Catechin	10.407	1.692	0.723
	5	EC	14.242	3.570	1.864
	6	EGCG	14.581	17.327	3.471
	7	ECG	21.494	4.315	2.757
	8	Caffeine	11.314	41.025	-
	9	Total	-	79.920	12.696
60 $^{\circ}$ C, 3 min	1	5-Galloylquinic acid	4.147	5.684	15.796
	2	GC	6.175	0.152	9.076
	3	EGC	8.872	3.156	19.620
	4	Catechin	10.398	1.890	7.408
	5	EC	14.232	2.863	8.579
	6	EGCG	14.563	20.627	21.035
	7	ECG	21.464	7.926	14.051
	8	Caffeine	11.336	40.075	-
	9	Total	-	82.373	95.565
100 $^{\circ}$ C, 3 min	1	5-Galloylquinic acid	4.153	4.407	7.968
	2	GC	6.175	0.135	7.031
	3	EGC	8.870	2.645	11.270
	4	Catechin	10.401	2.090	6.003
	5	EC	14.234	2.312	5.055
	6	EGCG	14.556	25.956	15.611
	7	ECG	21.469	9.354	11.543
	8	Caffeine	11.342	36.874	-
	9	Total	-	83.773	64.481

Table 2. Effect of difference temperature and time (30 min) on the antioxidant activity

Temp/ time (min)	Peak No.	Compounds	Retention time	Area in 280nm (%)	Area in 734nm (Antioxidant activity) (%)
25 $^{\circ}$ C, 30 min	1	5-Galloylquinic acid	4.162	7.255	2.274
	2	GC	6.184	0.181	3.728
	3	EGC	8.887	3.670	10.454
	4	Catechin	10.417	1.661	0.010
	5	EC	14.255	3.354	5.464
	6	EGCG	14.592	16.993	9.518
	7	ECG	21.499	4.545	5.306
	8	Caffeine	11.347	42.108	-
	9	Total	-	79.767	36.754
60 $^{\circ}$ C, 30 min	1	5-Galloylquinic acid	4.131	4.845	8.064
	2	GC	6.157	0.141	7.680
	3	EGC	8.837	2.887	13.577
	4	Catechin	10.359	1.889	5.531
	5	EC	14.193	2.537	6.968
	6	EGCG	14.517	24.291	19.259
	7	ECG	21.418	8.853	13.011
	8	Caffeine	11.313	38.030	-
	9	Total	-	83.473	74.09
100 $^{\circ}$ C, 30 min	1	5-Galloylquinic acid	4.140	3.059	5.979
	2	GC	6.178	0.297	5.516
	3	EGC	8.869	1.989	6.160
	4	Catechin	10.402	1.817	5.213
	5	EC	14.231	1.496	6.269
	6	EGCG	14.541	27.603	14.927
	7	ECG	21.462	10.857	13.797
	8	Caffeine	11.333	34.783	-
	9	Total	-	81.801	57.861

Fig. 4에서는 녹차에 포함된 catechin compounds의 항산화활성에의 영향을 확인하기 위하여 추출온도와 시간을 변화시켰다. 상온 (25°C)에서 침적방법을 적용한 실험의 결과를 나타내었다. 일반적으로 추출공정에서 추출용매의 선정은 매우 중요한 단계이다. 추출하고자 하는 물질의 극성과 유사한 극성을 가지는 유기 용매에서 높은 용해도를 가지기 때문에 추출 수율이 크게 된다(18, 19). 녹차 시료에 물 용매가 들어갔을 때 서로 비슷한 것끼리는 잘 혼합되고 섞이고 잘 붙는 성질에 따라 같은 성질끼리 서로 잘 녹으며 성질이 다른 것과는 섞이지도 녹이지도 못한다. 또한 극성 (투사율 2-3)이 없는 것은 극성이 없는 것끼리 분자 사이로 용매가 끼어들어 녹여낼 수가 있으며, 반대의 것들은 서로 침투가 어려워져서 녹이지 못한다. 녹차에 HPLC급 순수한 물 100%를 넣고, 침적과 여과 단계를 거쳤다. 위와 같이 녹차로부터 추출되어진 catechin compounds를 추출조건을 달리하여 피크의 면적을 구하여 보았을 때 추출 시간을 변화시키면서 (3, 5, 10, 20, 30분) 25, 100°C에서 침적을 시행하였다. 상온 (25°C), 3, 5, 10, 20, 30분에서 catechin compounds 추출에의 영향을 보면 거의 비슷한 79%의 수율을 보였고, 온도 (100°C), 3분에서는 83%, 5, 10분에서는 84%, 20, 30분에서는 81%이었다. 두 조건의 수율은 (0.2-0.5%)정도의 작은 차이를 보였으나 항산화활성은 온도 (25°C), 3, 5, 10분에서는 12%, 20분에서는 20%, 30분에서는 36%로 낮았고, 온도 (100°C), 3분에서는 64%, 5분에서는 68%, 10분에서는 85%, 20분에서는 76%, 30분에서는 57%로 두 조건에서 20-40% 정도의 차이가 있었다.

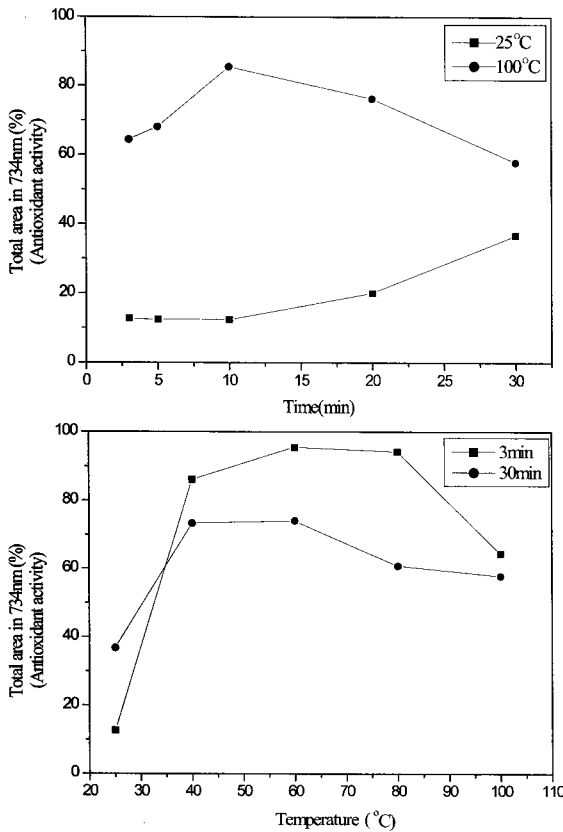


Figure 4. Effect of difference temperature and time on the antioxidant activity.

또한 추출 온도 (25, 40, 60, 80, 100°C)의 변화에 따른 항산화 활성을 조사하기 위하여 침적시간은 3, 30분으로 하여 적용하였다. 각각의 3분동안 25°C에서는 낮은 12%, 40°C에서는 86%, 60°C에서는 95%, 80°C에서는 94%, 100°C에서는 64%이었으며, 온도 증가에 따른 항산화활성의 영향은 80°C이후부터 감소되는 경향을 보이고 100°C 이후에서는 뚜렷한 감소를 보여주었다. 또한 30분, 25°C에서는 36%, 40°C에서는 73%, 60°C에서는 74%, 80°C에서는 60%, 100°C에서는 57%이었으며, 온도 증가와 시간이 증가함에 따라 항산화활성은 시간에 영향력을 좀더 받고 있음을 알 수 있었다. 추출에의 영향을 보면 많은 화합물들이 동반 추출되어 추출의 수율이 증가 하였지만 일정시간과 온도증가에 따라 catechin compounds의 구조는 불안정하여 쉽게 산화되었을 것이라 사료된다. 이 결과 녹차에서 catechin compounds의 추출효율 및 항산화 효과는 60°C, 3분의 조건에서 항산화활성 및 추출이 효율적이었으며, catechin compounds중에서 EGCG가 21%정도 많이 함유된 것을 확인 할 수 있었다. 또한 온도와 시간의 증가에 따라 caffeine이 증가 함을 알 수 있었다. 위에서 서술한 연구 결과는 catechin compounds의 항산화활성에 대한 영향이 caffeine의 추출 영향을 고려하는 기초 자료가 될 것이다. Fig 5에서는 catechin compounds의 HPLC on-line ABTS⁺ screening 분석 크로마토그램을 보여주고 있다. 본 연구결과 HPLC on-line ABTS⁺ screening 기법은 활성화합물의 항산화활성과 라디칼 소거능을 신속히 규명하는데 유용하며, 활성을 빠른 시간내 탐색할 수 있는 장점을 가지고 있다고 판단되어 다양한 분야에 적용하여 기능성 물질의 신속 탐색법으로 검토하는 것은 의미 있는 일이라 여겨진다.

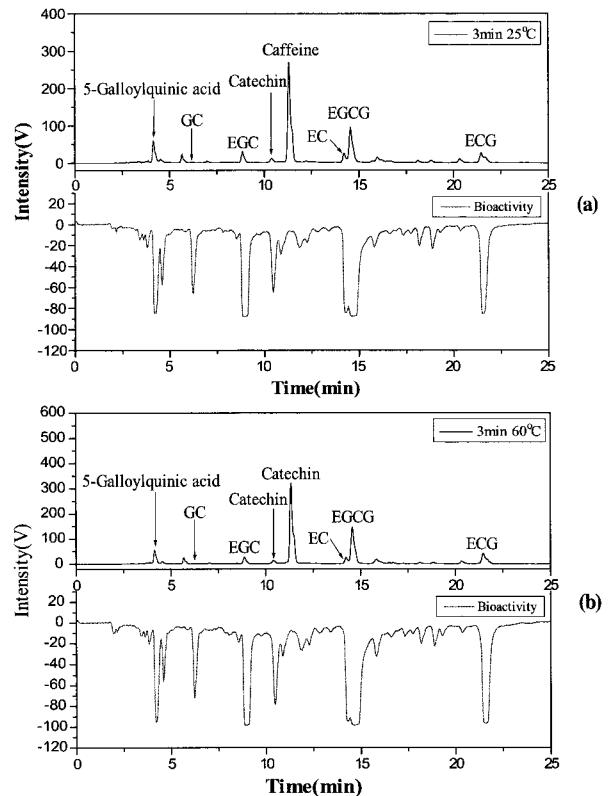


Figure 5. Chromatogram of catechin compounds using the HPLC On-line ABTS⁺ screening method.

여기에서 catechin compounds의 항산화활성 경향은 다른 물질의 피크와 겹치지 않고 baseline이 안정된 낮은 피크의 Intensity를 볼 수 있었다. 25℃, 3분의 조건에서는 EGCG> ECG> EGC> EC> 5-Galloylquinic acid> catechin> GC의 순으로 항산화활성이 있었으며, 추출효율 및 항산화효과가 높은 60℃, 3분의 조건에서는 EGCG> ECG> 5-Galloylquinic acid > ECG > GC > EC > catechin 순으로 항산화활성이 있었다.

요 약

한국산 녹차로부터 HPLC On-line ABTS⁺ screening 기법을 사용하여 catechin compounds의 특성중의 하나인 항산화활성을 빠르게 분석하였으며 녹차로부터 catechin compound의 추출을 다양한 온도와 시간의 추출방법을 적용하였다. 전 처리한 추출액에 포함된 catechin compounds을 분석하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색하였다. 실험결과에 의하면 추출온도 60℃, 추출시간 3분으로 추출한 시료가 항산화활성이 가장 우수 하였다.

감 사

본 연구는 한국과학기술연구원 KIST강릉분원 천연물소재연구센터에서 수행하였으며, 해양바이오·신소재 클러스터 사업단 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Amra, P. U., S. Mojca, Z. Eljko Knez, W. Bernd, O. Frank, and G. Sabine (2006), Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine, *Food Chemistry*, **96**(4), 597-605.
- Reza, F., A. G. Gholam, and H. H. K. Mohammad (2007), Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis*), *Food Chemistry*, **100**(1), 231-236.
- Quansheng, C., Z. Jiewen, H. Xingyi, Z. Haidong, and L. Muhua (2006), Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy, *Microchemical J.* **83**(1), 42-47.
- Masaki, K., L. Yuquan, and M. Kanehisa (2006), Dual function of (K)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes, *Cancer Letters*, **241**(2), 250-255.
- Haixia, C., Z. Min, and X. Bijun (2005), Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea, *Food Chemistry*, **90**(1-2), 17-21.
- Row, K. H., and Y. Z. Jin (2006), Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction, *Bioresource Technology*, **97**(5), 790-793.
- Thiraviam, G., G. Amita, C. Kanwaljit, and P. K. Indu (2004), Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract, *Mutation Research*, **556**(1-2), 65 - 74.
- Jianmei, Y., A. Mohamed, and G. Ipek (2005), Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics, *Food Chemistry*, **90**(1-2), 199-206.
- Laurent, B., L. David, and T. Angelo (2007), Production of green tea EGC- and EGCG-enriched fractions by a two-step extraction procedure, *Separation and Purification Technology*, **56**(1), 53-56.
- Hong, S. P., and K. H. Row (2002), Separation of Acanthoside-D in *Acanthopanax Senticosus* by Preparative Recycle Chromatography, *HWAHAK KONGHAK*, **40**(4), 488-491.
- Shi, Z., J. He, and W. Chang (2004), Micelle-mediated extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge* with analysis by high-performance liquid chromatography, *Talanta*, **64**(2), 401-07.
- Pan, X., G. Niu, and H. Liu (2002), Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge*, *Biochemical Engineering Journal*. **12**(1), 71-7.
- Yang, Q., X. I. Zhang, X. Y. Li, W. K. Tang, J. X. Zhang, C. X. Fang, and C. Y. Zheng (2007), Coupling continuous ultrasound-assisted extraction with ultrasonic probe, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of sodium Danshensu and four tanshinones in *Salvia miltiorrhiza bunge*, *Analytica Chimica Acta*, **589**(2), 231-38.
- Chang, C. J., K. L. Chiu, Y. L. Chen, and C. Y. Chang (2000), Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction, *Food Chemistry* **68**(1), 109-113.
- Kamaljit, V., M. Raymond, S. Lloyd, and B. Darren, (2006), Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry Review, Accepted Manuscript, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, S1466-8564(07)00124-5.
- Nuengchamnong, N., C. F. DeJong, B. Bruyneel, W. M. A. Niessen, H. Irth, and K. Ingkaninan, (2005), HPLC Coupled On-line to ESI-MS and a DPPH-based Assay for the Rapid Identification of Anti-oxidants in *Butea superba*, *Phytochemical Analysis*, **16**(6), 422-428.
- Ogawa, A., H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, and T. Toyooka, (1999), On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta*, **383**(3), 221-230.
- Shi, Z., J. He, and W. Chang (2004), Micelle-Mediated Extraction of Tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza Bunge* with Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, *Talanta*, **64**(2), 401-07.
- Han, S. K., K. J. Lee, J. D. Kim, Y. W. Lee, and K. H. Row (2004), Extraction of Isoflavones from Korean Soybean by Sub/Supercritical Water, *Korean Chemical Engineering Research*, **42**(6), 669-672.
- Labb'e, D., A. Tremblay, and L. Bazinet (2006), Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: basis for production of a catechin-enriched fraction, *Sep. Purif. Technol.*, **49**(1), 1-9.
- Huiling, L., L. Yuerong, D. Junjie, L. Jianliang, X. Hairong, and H. Wang (2007), Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment, *Food Chemistry*, **101**(4), 1451-1456.