

녹차에서 카테킨 화합물의 초임계 유체 추출

나 영 진 ·¹이 윤 우 ·¹김 재 덕 ·[†]노 경 호
초정밀분리기술센터, 인하대학교 화학공학과, 국가지정 초임계유체연구실, 한국과학기술연구원¹
(접수 : 2001. 5. 21., 게재승인 : 2001. 8. 2.)

Supercritical Fluid Extraction of Catechin Compounds from Green Tea

Young Jin Ra, Yoon Woo Lee¹, Jae Duck Kim¹, and Kyung Ho Row[†]
Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University
¹National Research Lab. for Supercritical Fluid, KIST
(Received : 2001. 5. 21., Accepted : 2001. 8. 2.)

Catechin compounds from the Green tea cultivated in Bosung (Chollanamdo) were extracted using supercritical fluid and various additives, and analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The chromatographic column was packed with LiChrospher 100RP-18(15 μ m), and water was used as the mobile phase with 0.05% phosphoric acid and acetonitrile. Gradient elution was applied to separate EGCG by changing the mobile phase compositions. Comparing the extraction yield of three different types of supercritical fluids, pure CO₂, with additives of water and ethanol (5 wt.%), the extraction amount of EGCG was most abundant in the supercritical CO₂ with ethanol. However, more was extracted and pure higher purity was achieved by solvent extraction using ethanol.

Key Words : EGCG, catechin compound, Green Tea, supercritical fluid

서 론

기상과 액상이 구분이 되지 않는 초임계상이 존재한다는 것은 19세기초에 처음으로 인식되었고, 19세기말에는 초임계 유체가 고체에 대해 용해력을 갖고 있다는 사실이 증명되었지만 여러 가지의 실험적 어려움 때문에 집중적인 연구가 진행되지 못하였다. 그후 1950년대 후에도 압축된 기체를 분리 공정에서 보조물질로 이용하는 특허 등 여러 제안이 있었으나 실제적인 응용을 하지 못하다가 1960년대에 초임계 유체를 이용한 추출방법이 발표된 후 본격적인 연구와 응용 예가 소개되었다(1,2).

초임계 유체는 액체 유기 용매와 마찬가지로 저 휘발성 물질을 비교적 낮은 온도에서 용해하는 능력을 갖고 있지만 액체용매보다 우수한 전달물성값을 갖고 있어, 용질을 함유하고 있는 물질 속으로 더 잘 스며들며, 추출물을 함유한 유체가 흐를 때에도 압력강하가 작다. 초임계 유체 추출에서는 임계온도가 낮은 기체를 용매로 사용하기 때문에 열에 불안정한 물질을 손상 없이 추출할 수 있으며, 초임계 유체 추출

에 사용되는 기체는 대부분 농축된 상태에서 친 지방성(lipophilic)을 나타내므로 극성물질이나 고분자 물질을 잘 용해하지 않아 선택성이 좋으며, 적절한 압력과 온도의 선택으로 추출단계와 분리단계를 최적화 할 수도 있고, 첨가제(additive)를 사용하여 용해도와 선택도를 증가시킬 수도 있다(3).

최근에 차나무 재배 면적의 확대, 현대적 제차 설비에 의한 상업생산과 더불어 소비자들의 차에 대한 새로운 인식으로 인해서 전통 차문화가 부활되어 뿌리를 내리고 점차 자리를 잡아가고 있다. 녹차는 건강 증진, 신체 기능 조절 면에서 유용한 기호 식품으로 오랫동안 애용되어 왔다. 녹차는 *Camellia* 속으로 90여종이 있다.

녹차가 일반 식물에 비해 특이한 점은 카페인을 함유하고 있고 카테킨 화합물이 많이 들어 있어 일반 식물과는 달리 여러 가지 생리활성과 관련되고 있다. 녹차의 주성분인 탄닌은 단백질과 결합하는 특성을 지닌 카테킨 화합물을 총칭하는 것으로 탄닌 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 탄닌의 hydroxyl기와 단백질의 활성부위의 공유결합에 의한 반응으로 고도의 소수성 아미노산 잔기와 소수성 결합과 수소결합을 포함하는 2단계 기작에 의해 탄닌 복합체의 침전물을 형성한다. 그 중 녹차의 탄닌류에 대하여는 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 녹차에 함유되어 있는 카테킨 화합물은 주로 (+)catechin(C), (-)epigallocatechin gallate(EGCG) 및 (-)epigallocatechin(EGC), (-)epicatechin(EC), (-)epicatechin gallate(ECG) 등이다.

[†]Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inha University and Center of Advanced Bioseparation Technology, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

녹차의 생리 활성 물질인 카테킨 화합물은 추출 및 정제과정이 복잡하고 수율이 낮고 가격이 비싸다는 단점이 있고 이 성분과 생체 내에서의 작용에 관련된 연구는 미비한 실정이다. 그러나 1980년대 이후 녹차 카테킨 화합물의 다양한 연구 결과가 나왔으며, 최근에는 많은 항암작용이 보고되고 있어 우수한 항암제로 대두되고 있다. 시판되는 차 제품 중 제조방법이 각기 다른 차, 즉 비발효차인 녹차 중 증제차와 볶음차, 반발효차인 오롱차 및 발효차인 홍차 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 카테킨 화합물은 매우 다양한 용도로 이용될 수 있으며, 치매 예방, 에이즈 바이러스 억제 및 십이지장암, 결장암, 피부암, 위암, 폐암, 유방암, 간암, 대장암 억제 효과와 식도암, 방광암, 전립선암 예방 효과 등 많은 항암작용이 보고되고 있다(4,5).

녹차로부터의 카테킨 화합물의 추출은 주로 열수 또는 ethanol 등을 이용한 용매 추출법을 주로 사용해왔다(6). 녹차로부터 항산화제 및 항암제 등으로 그 효용가치가 뛰어나다고 밝혀진 EGCG 등을 포함한 카테킨 화합물에 대한 초임계 유체 추출특성을 살펴보기 위해 추출한 sample은 첨가제로서 물과 ethanol을 사용하였고 분석용 역상 HPLC로서 분석을 하였다. ethanol을 사용하여 용매추출법으로 카테킨 화합물을 분리하였고 초임계유체에 의한 실험결과와 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

녹차는 보성산으로 경동시장에서 구입하였으며, 초임계 유체는 CO₂, 첨가제로는 water 및 ethanol을 사용하였고, 이동상은 phosphoric acid가 0.05% 포함된 water와 acetonitrile을 사용하였다. 표준시료물질인 (-)Epicatechin (EC), (-)Epigallocatechin Gallate (EGCG), (-)Epicatechin Gallate (ECG)는 Sigma Co.에서 구입하였으며, acetonitrile, ethyl acetate는 HPLC grade를 덕산화학에서 구입하였고, phosphoric acid는 동양화학에서 extra pure급을 구입하였다. water는 2차 증류한 증류수를 사용하였다. 증류수는 감압 pump(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.5 μm, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다.

실험기기

Figure 1에서는 초임계추출 장치도를 보여주고 있다. 추출기는 크기가 내경 160 mm, 외경 220 mm, 길이 825 mm이고 추출기의 온도를 일정하게 유지시켜 주기 위하여 추출기의 외부에 jacket을 부착하였다. 이산화탄소의 도입과 가압을 위한 pump로는 Milton Roy Co.의 고압용 Milroyal pump (model MCP13D10B1M, 최대유속 28.7GPH)를 사용하였다. 추출기의 출구에는 추출기의 압력을 일정하게 유지시켜 주기 위하여 압력 조절기 (Tescom model 26-1021-44)를 설치하였으며, line filter와 rupture disc를 설치하였다. 분리기 하부의 외벽에는 냉각을 위한 jacket을 부착하였다. 분리기로부터 나온 line에는 작은 입자로부터 압력 조절계를 보호하기 위하여 line filter와 압력을 일정하게 유지하기 위한 압력 조절기를 설치하였다.

분석용 column의 크기는 3.9×300 mm이고, 충전물은

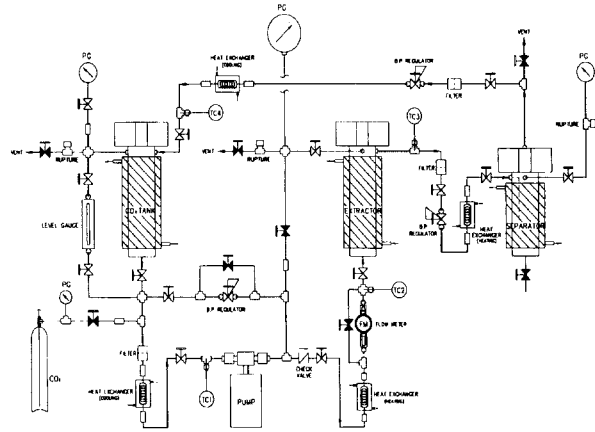


Figure 1. Schematic diagram of SFE system used in this study.

LiChrospher 100RP-18(15 μm, Merck Co.)이다. HPLC는 Waters사의 616 pump(multisolvent delivery system), 486 UV-visible tunable wavelength absorbance, 280 nm, Reodyne 주입기(20 μL sample loop), 데이터 저장 시스템은 Chromate(ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다.

실험방법

초임계 추출

추출물을 포함한 이산화탄소는 분리기(내경 160 mm, 외경 220 mm, 길이 500 mm)의 중간부로 도입되면서 압력이 강해지기 때문에 용해도가 떨어져 추출물과 분리되고 이산화탄소는 분리기의 상부로 배출된다. 이때 추출물은 분리기의 하부에 축적된다.

녹차 약 1200 g (dry basis)를 정확히 무게를 측정하여 추출기 (extractor) 내부에 충전시키고 50℃, 300 bar에서 8시간 동안 추출을 수행하였다. 이때 이산화탄소의 유량은 약 200 g/min으로 유지시켰다. 추출물을 포함한 초임계 이산화탄소는 압력 조절기에 의해 약 50 bar로 감압하여 단일 팽창시키고 추출물은 분리기의 하부로 이산화탄소 기체는 상부로 분리 배출시켰다.

HPLC 분석

추출물은 모두 끈적한 gel상태로 농축되어 있었으며 이를 분석하기 위해 추출물을 ethyl acetate(HPLC grade)를 용매로 하여 30℃, 300 rpm에서 1시간 동안 교반한 후 물을 이용 1:1로 partition한 후 여과하였다. sample의 농도는 1 g/10 mL이다. 용해된 시료를 구배 용매 조성법을 사용하여 HPLC로 분석하였다.

분석용 RP-HPLC의 column(3.9×300 mm)는 15 μm로 충전되었다. 이동상은 phosphoric acid가 0.05% 포함된 water와 acetonitrile을 사용하였다. 구배용매 조성법으로 유속은 1.0 μL/min, injection volume은 20 μL이고, UV detector의 wavelength는 280 nm이며 실온에서 실험하였다.

결과 및 고찰

본 고순도 분리연구실에서는 녹차로부터의 카테킨 화합물

을 추출하기 위해서 열수를 이용하여 용매 추출하였다. 실험 결과는 논문을 통해 이미 발표되었으며(7,8) 이번 실험에서는 최근 청정용매로 각광받고 있는 초임계유체 추출법을 이용하여 녹차로부터 카테킨 화합물을 추출하고 기존의 용매추출과 비교하였다.

천연물에서의 추출에 적합한 초임계 이산화 탄소는 대부분 비극성 물질에 대해서는 큰 용해력을 갖고 선택도도 좋지만, 극성물질을 추출하려면 조건이 까다로운 경우가 많다. 이런 경우에 초임계 유체의 휘발도와 추출하려는 물질의 휘발도의 중간정도의 휘발도를 갖는 물질을 첨가제로 사용한다. 첨가제로는 보통 용매로 사용하는 alcohol, chlorinated hydrocarbon, n-hexane, acetone, water 등이 많이 쓰인다(9). 첨가제를 사용하면 용해도가 커지고 그 결과로 순수 초임계 유체만을 사용할 때 보다 추출압력이 낮아지므로, 온도만 변화시켜서 추출물과 용매를 분리할 수 있다. 그러나 첨가제를 사용하는 경우에는 상평형관계가 복잡해지고 기존의 추출 때와 같이 용매의 잔유분 문제가 대두되는 단점이 있다. 녹차는 (1)자연 건조한 상태, (2)물을 포함한 상태 (5.0 wt.%), 그리고 (3)ethanol을 포함한 상태 (5.0 wt.%)로 초임계 유체 CO₂를 이용하여 추출하였다. 추출수율은 각각 0.1, 0.9, 5.1 wt%이었고, 이에 비해서 ethanol을 용매로 하여 추출하는 경우 21.3 wt%로 상대적으로 추출수율이 높았다. 초임계 유체를 이용한 추출은 모두 보성산 녹차잎 1200 g에서 추출한 것으로 추출된 양은 각각 1.2 g, 10.8 g, 61.2 g이었다. 추출물의 분석을 위해 시료를 역상 HPLC에서 많이 사용되는 용매들에 용해시켜본 결과 ethylacetate에 가장 잘 용해되었다.

주입 시료의 농도는 1 mg/mL에서부터 100 mg/mL까지 변화시키면서 실험하였으나 ethanol을 포함한 초임계 유체에서의 시료를 제외하고는 UV detector의 감도가 매우 낮아서 peak의 판별이 어려웠다. 같은 조건에서의 실험을 위해서 3 가지 초임계 유체의 시료를 100 mg/mL의 일정한 농도로 실험하였다. ethanol을 이용한 용매추출법도 병행하여 초임계 유체에 의해서 추출한 시료와 비교하였다. 녹차잎 5 g을 ethylacetate 30 mL에 녹인 후 40°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 여과를 하고 증발기를 이용하여 용매를 증발시킨 후에 물에 다시 녹여서 chloroform과 ethylacetate를 이용 1:1 분비를 하여 30 mL의 시료를 얻었다.

분석은 역상 HPLC에서 행해졌으며 녹차에 포함된 유용성분인 카테킨 화합물 중에서 가장 효과가 뛰어나다고 알려진 EGCG의 분리되는 정도를 고찰하였다. 역상 HPLC 분석에서의 이동상의 조성은 0.05% (vol.) phosphoric acid가 포함된 물과 acetonitrile을 사용하였고 구배시간은 시작시간으로부터 20분간으로 초기 조성 90:10 (water:acetonitrile, vol. %)에서 60:40 (vol. %)까지 선형으로 구배를 주었다. 40분이내에 한번의 분석을 완료하였다.

Figure 2는 첨가제를 첨가하지 않은 순수한 초임계 유체 CO₂를 이용하여 추출한 시료를 구배용매 조성법으로 분석한 결과이다. EGCG가 부분적으로 분리되었으나 첫 번째 peak에서 EGC와 EC가 caffeine과 함께 용출되었다. EGCG의 머무름 시간은 13.12분이며 peak의 intensity는 167.93 mV이었다. 농도가 0.5 mg/mL인 EGCG 표준물질의 intensity가 272.88 mV인 것과 비교해보면 EGCG의 함량이 매우 작음을 알 수

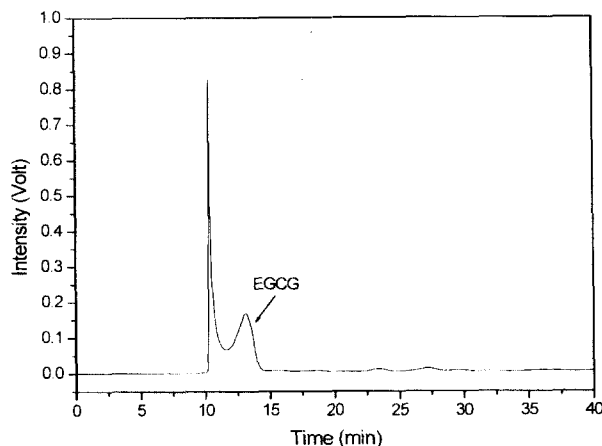


Figure 2. Chromatogram of supercritical fluid extract by RP-HPLC in gradient method(1st mobile phase : 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile. (vol.%) = 90/10, gradient time : 20 min, 2nd mobile phase 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 60/40)

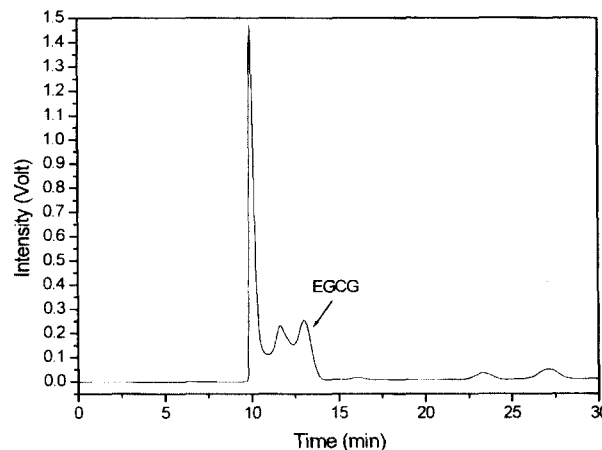


Figure 3. Chromatogram of supercritical fluid with H₂O extract by RP-HPLC in gradient method. (1st mobile phase : 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 90/10, gradient time : 20 min, 2nd mobile phase 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 60/40)

있다. 첨가제로 물을 사용하여 초임계 유체로 추출한 경우에서 시료를 분석한 결과가 Figure 3에 나타나있다. Figure 2에서와 마찬가지로 EGCG가 부분적으로 분리되었지만 caffeine peak (체류시간 10분)다음에 EC peak (체류시간 12분)가 분리되었다. 이는 물을 첨가한 초임계 유체의 추출수율이 순수한 초임계보다 커서 보다 많은 양의 추출물중에서 EC가 부분적으로 분리되었다.

용매추출법에 의해서 녹차에 함유된 카테킨 화합물은 용매 중에서 ethanol에 가장 높은 용해도를 보인다(10). Figure 4는 ethanol을 함유한 녹차를 초임계 유체 CO₂를 이용하여 추출한 결과로서 Figure 2와 비슷한 형태의 chromatogram을 보여주고 있으나 EGCG의 검출량이 매우 증가하였다. EGCG의 머무름 시간은 Figures 2, 3과 비슷하였지만 추출량의 증가에 따라서 이전 peak (caffeine, EGC, EC등)가 커짐에 따라서 약간 머무름 시간이 길어졌다. EC, EGC, EGCG 표준시료물질

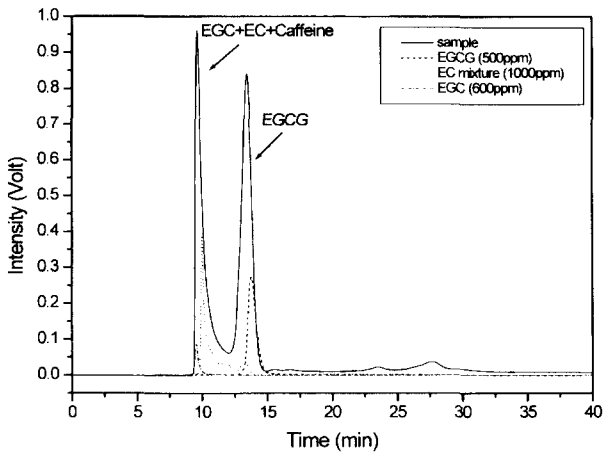


Figure 4. Chromatogram of supercritical fluid with ethanol extract by RP-HPLC in gradient method. (1st mobile phase : 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 90/10, gradient time : 20 min, 2nd mobile phase 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 60/40)

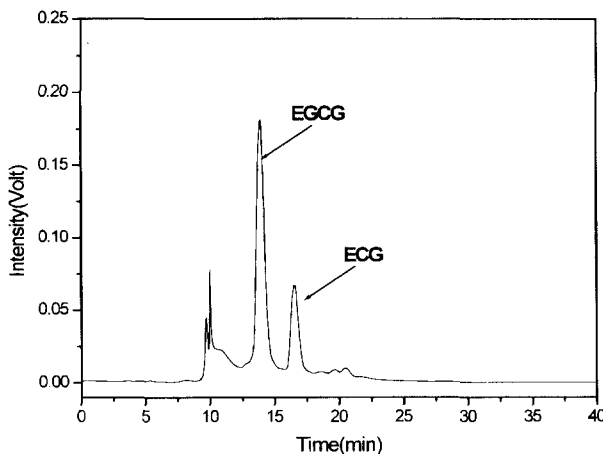


Figure 5 Chromatogram of ethanol extract by RP-HPLC in gradient method. (1st mobile phase : 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 90/10, gradient time : 20 min, 2nd mobile phase 0.05% phosphoric acid in water/acetonitrile (vol.%) = 60/40)

을 각기 주입하여 두 개의 peak를 각기 정성분석하였다.

Figures 2,3,4는 초임계 유체를 사용한 경우이고 이에 비해서 Figure 5에서는 ethanol을 이용한 추출물의 분석결과이다. Chloroform과 ethyl acetate를 사용한 두 번의 분배과정을 통해서 caffeine이 상당히 제거되었다.

4가지 시료에 포함되어 있는 EGCG의 peak 특성을 Table 1에서 요약하였다. Table에서 보는 바와 같이, 각 추출 방법에 대한 추출양과 EGCG가 함유된 정도가 차이가 컸다. 초임계 추출방법중에서는 ethanol을 포함하고 있는 방법이 가장 EGCG의 함량이 많아서 순수한 초임계 유체를 사용한 경우에 비해서 물을 포함한 경우가 10배, ethanol을 포함한 경우는 200배 정도로 컸다. 그러나 이 경우, ethanol 용매 추출법에 비교해보면, 반 정도에 불과했다. 녹차에 함유된 EGCG 등의 카테킨 화합물은 초임계 유체를 이용한 추출 방법보다 ethanol 용매 추출 방법이 EGCG의 함량이 높았다. 한국산

Table 1. EGCG amounts with different extraction methods

	Extraction amount	Injection Concentration ³	Content of EGCG ⁴
CO ₂	1.2 g ¹	100 mg/mL	5.65 mg
CO ₂ +H ₂ O	10.8 g ¹	"	56 mg
CO ₂ +ethanol	61.2 ¹	"	1010 mg
Ethanol extraction standard (EGCG)	5 g ²	167 mg/mL	2060 mg
		0.5 mg/mL	

1 : 1200 g powder

2 : 5 g powder in ethanol

3 : 25 μL of injection volume

4 : 1000 g powder

꿀에 포함된 perillyl alcohol을 정제하기 위하여 methanol 용매 추출법에 비해서 초임계 유체를 사용하는 경우 70배 정도의 추출수율이 큰 것과는 매우 다른 결과이다(11). 카테킨 화합물이 주로 중간 정도의 극성을 가진 물질이어서 비극성의 순수한 초임계 유체, 또는 물과 에탄올을 포함하는 초임계 유체보다 ethanol에 의한 용매추출법에 의해서 가장 많은 EGCG 등의 카테킨 화합물을 얻을 수 있게 되었다.

요약

전라남도 보성산 녹차로부터 유용성분인 카테킨 화합물을 초임계 이산화 탄소와 첨가제를 사용하여 추출하고 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 분석하였다. LiChrospher 100RP-18(15 μm)로 충전된 column을 이용하여 0.05% phosphoric acid가 포함된 물과 acetonitrile을 이동상으로 사용하였으며 구배용매 조성법을 적용하였다. 이동상의 조성에 따른 체류인자의 조절을 통해 EGCG를 분리하였다. 각각의 초임계 추출법에 따른 EGCG의 추출량을 비교한 결과, 초임계 유체에 극성물질을 포함하는 경우가 녹차의 유용성분인 EGCG의 추출량이 가장 많았다. 그러나 ethanol에 의한 용매 추출법은 초임계 유체에 의한 추출법보다 EGCG에 대해 많은 추출양과 선택적인 고순도 분리가 가능하였다.

감사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 조정필 분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- McDaniel, L. H., M. Ashraf-Khorassani, and L. T. Taylor (2001), Supercritical fluid extraction of wood pulp with analysis by capillary gas chromatography-mass spectrometry, The Journal of Supercritical Fluids, Volume 19, Issue 3, 275.
- Yak, H. K., B. J. Mincher, K. H. Chiu, and C. M. Wai (1999), Supercritical fluid extraction/radiolysis of PCBs from contaminated soil, Journal of Hazardous Materials, 69(2), 209.

3. Lucien, F. P. and N. R. Foster (2000), Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review, *J. Supercritical Fluids*, 17(2), 111.
4. Oguni, I., S. J. Chen, P. Z. Lin, and Y. Hara (1992), *Prev. Med.*, 21, 332.
5. Valcic, S., B. N. Timmermann, D. S. Alberts, G. A. Wchter, M. Krutzsch, J. Wymer, and J.M. Guillen (1996), *Anti-Cancer Drugs*, 7, 461.
6. Hong S. B., J. I. Kim, and K. H. Row (2000), *2000 Theories and Applications of Chemical Engineering*, 6, 3356.
7. David G., P. A. Breen, J. M. Horner, K. D. Bartle, A. A. Clifford, James Waters, and Graham Lawrence (1996), *Wat. Res.* 30(2), 476.
8. Chung, S. T., K. H. Row, J. H. Kang, and Y. K. Park (1998), pending to Korean patent.
9. Row, K. H. (1999), *Principles and Applications of Liquid Chromatography*, Inha Univ., 241.
10. Victor N., M. Nakajima, J. Tong, and S. Ichikawa (1999), Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils, *J. Food Eng.*, 40, 161.
11. Lee C. H., Y. W. Lee, J. D. Kim, Y. Y. Lee, and K. H. Row (2001), Separation of Perillyl Alcohol in Korean Orange Peel by Supercritical CO₂ and Preparative High-Performance Liquid Chromatography, *Korean J. Chem. Eng.*, in press.