

## 녹차 중 카테킨류의 신속 분리 및 동정법

이정희 · 이용문<sup>†</sup> · 문동철  
충북대학교 약학대학  
(1992. 7. 3 접수)

### Rapid Separation and Identification Method of Tea Catechins

Jeong-Hee Lee, Yong-Moon Lee<sup>†</sup> and Dong-Cheul Moon

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju 360-763, Korea

(Received July 3, 1992)

**요 약.** 녹차 중 탄닌성분들인 에피갈로카테킨, 에피갈로카테킨 갈레이트는 세파덱스 LH-20 컬럼에서 물-아세톤의 혼합용리에 의하여 신속하게 분리되어 용출하였다. 용출액은 280nm에서 흡광도의 변화를 측정할 결과 4개의 분획으로 검출되었다. 각 분획을 그대로 고속원자충격 질량분석 장치에 도입하여 탄닌성분들을 동정할 수 있었다. 에피갈로카테킨, 에피갈로카테킨 갈레이트는 역상 HPLC에서 용출된 피크면적으로 계산한 결과, 70% 이상의 높은 수율로 얻을 수 있었다. 본 방법에 의하여 보고된 방법들보다 탄닌성분들을 신속하게 동정할 수 있고, 고순도로 얻을 수 있었다.

**ABSTRACT.** The tea tannins, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, were successfully separated by a Sephadex LH-20 column by the acetone based gradient elution. Each fractions was collected by monitoring at 280nm. Purified fractions were directly characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. Epigallocatechin and epigallocatechin gallate were identified and shown as low as 70% purity in the reversed phase column. This revised method is more advantageous than known methods in purity and rapidity.

**Key Words :** tannins, catechins, separation, FAB-MS, HPLC

#### 1. 서 론

최근, 건강에 관심을 갖는 인구의 증가와 기호의 다양화에 힘입어, 녹차류의 수요가 점차 확대되어 가고 있다. 특히 이들의 함유 성분이 성인병의 예방과 치료에 대하여 유용성이 점차 밝혀지면서, 각 성분에 대한 새로운 활성연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 녹차의 tannin류에 대하여는 최근 다양한 생리활성이 보고

되고 있으며, 이 중에서 catechin류에 대한 새로운 활성, 즉 혈압강화작용<sup>1</sup>, 항산화작용<sup>2</sup>, 총치균에 대한 항균작용<sup>3</sup>, 혈중 cholesterol 저하작용<sup>4</sup>, 돌연변이 억제작용<sup>5</sup> 및 혈소판응집저해작용<sup>6</sup> 등의 보고가 증가하고 있다. 이들 활성은 현재 성인병 및 노화의 연구와 관련된 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 주목받고 있다.

활성성분의 정제 및 확인법에 대한 연구는 위와 같은 활성연구를 위한 기초적 작업으로 중요하다. Tan-

nin의 활성연구시 먼저 고려하여야 할 점은 이들은 화학적으로 불안정하여 단리가 어려운 점이다. 또 tannin은 다른 물질과 결합하기 쉬운 성질 때문에 chromatography상에서도 일반화합물과 달리 용리거동을 예측하기 어렵다.

녹차 중 tannin성분의 분리법으로는 분배추출법<sup>2</sup>, Sephadex LH-20 또는 Toyopearl HW-40 column에 의한 분리법<sup>7-10</sup>이 보고되어 있다. 분배추출법은 유기용매를 대량 사용하여야 하기 때문에 분리조작의 경제성 및 안전성이 낮다. Column에 의한 분리는 일반적으로 분리시간이 길고 수율이 낮아, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR등에 의한 동정을 하기 위하여는 역상 chromatography에서 다시 한번 정제할 필요가 있다.

본 연구는 녹차 tannin 중의 활성 catechin류를 활성 연구에 이용하기 위하여 고순도로의 정제 및 확인을 신속하고 정확하게 할 수 있는 방법을 개발하였다. 즉 Sephadex LH-20 column을 acetone base의 용리액으로 한 Yayabe 등의 기존방법<sup>9</sup>을 개선하여 높은 수율을 얻음과 동시에 용리된 각 분획을 그대로 fast atom bombardment - mass spectrometry (FAB-MS)에 적용하여 극성이 큰 catechin류를 신속히 분리, 동정할 수 있었다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료 및 기기

녹차는 시판품을 태평양화학(주)에서 공여받았다. Sephadex LH-20은 Pharmacia사에서, Cosmosil 5C18 column은 Nakalai Tesque사에서 구입하였다. 녹차의 추출용매 및 acetone은 특급 이상을 사용하였으며, methanol은 HPLC용을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

측정기기로 HPLC는 Hitachi사의 L-6200 series를 사용하였고, mass spectrometry는 영국 VG Instrument사의 Trio II quadrupole mass spectrometer를 사용하였다.

### 2.2. 화합물의 분리 및 동정

시판 녹차 약 350g을 취하여 80°C의 열수 1.0 liter로 20분간 추출한 후, 고정성분을 2100rpm에서 5분간 원심분리하여 제거하였다. 상층은 vacuum rotary evaporator로 60°C 이하의 온도에서 약 150m/g 될 때까지

농축하였다. 농축 수용액을 ethyl acetate 150m/로 3회 추출한 후, 동일한 방법으로 농축하여 약 30m/로 하였다. 이 중 15m/를 Sephadex LH-20 column(30mm i.d. × 360mm) 상부에 loading하여, aqueous acetone의 stepwise gradient법으로 용리하였고, 용출되는 분획을 280mm에서의 흡광도로 기록하였다.

각 화합물의 동정은 액상 시료를 atom emission current 1mA(9 kV)의 중성 xenon primary beam으로 충격이온화하여 얻은 FAB-MS spectrum에 의하여 해석하였다.

각 분획은 Cosmosil 5C18 column(4.6mm i.d. × 150 mm)을 40°C로 고정하고, 20% methanol의 isocratic elution에 의하여 분리된 각 성분의 peak area비로 순도를 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 분리조건의 설정

녹차로부터 얻은 ethyl acetate농축액은 acetone을 전개용매로 한 thin layer chromatography(TLC) 분리 후, potassium ferricyanide와 ferric chloride용액을 분무한 결과 청색으로 정색하였다. 따라서 ethyl acetate층에는 다수의 polyphenol계의 방향족 성분이 존재함을 확인할 수 있었다.

Catechin류(Fig. 1)와 같은 polyphenol계 화합물들은 극성이 크고 수용성으로, 역상 mode의 chromatography에서 양호한 분리가 예상되었다. 그러나 Lobar pre-packed ODS column(11mm i.d. × 240mm)에서 정제를 시도한 결과 의외로 용출이 지연되고, Peak tailing이 있으며, 회수율이 점차로 저하되는 경향을 보였다. 이는 catechin류가 ODS column내에 잔존하는 silanol기와 상호작용 및 흡착에 의하여 일어나는 현상으로 여겨진다. 따라서 녹차 catechin류의 분리는 silanol기를 end-capping한 ODS column 또는 silanol기가 존재하지 않는 porous polymer column이 적당하다고 본다. 본 실험에 사용한 Sephadex LH-20 column은 유기용매의 조성이 증가하면 용리속도가 급격히 저하되어, 그 결과 용출시간이 길어지고 분리능이 저하되는 경향이 있었다. 따라서 될 수 있는 한 수용액의 비율이 높은 용리액에서 신속하게 catechin류가 용출되도록 하였다.

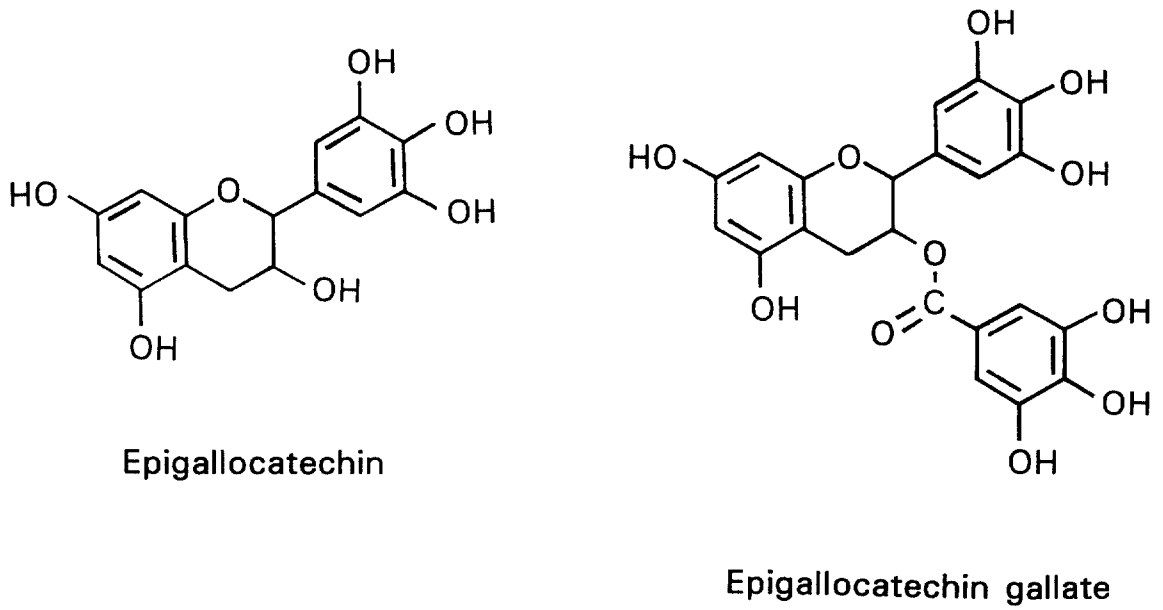


Fig. 1. Structure of Tea catechins.

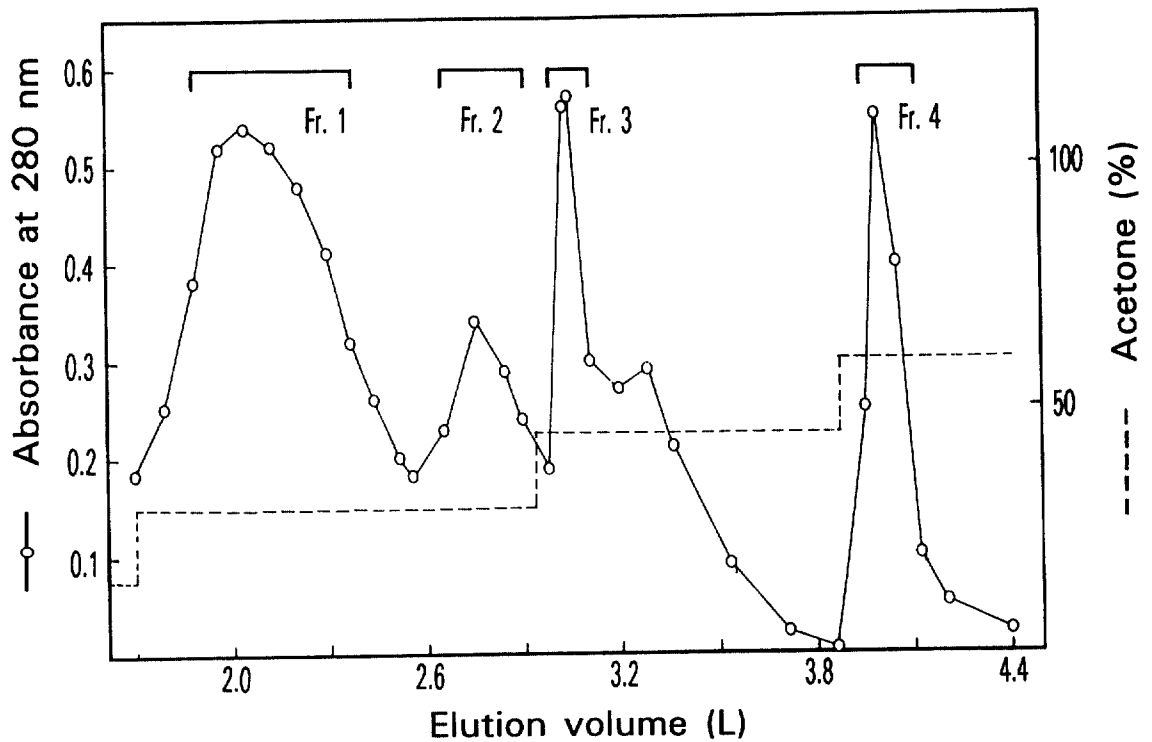


Fig. 2. A chromatogram of ethyl acetate extracts on Sephadex LH-20 with aqueous acetone by stepwise elution.

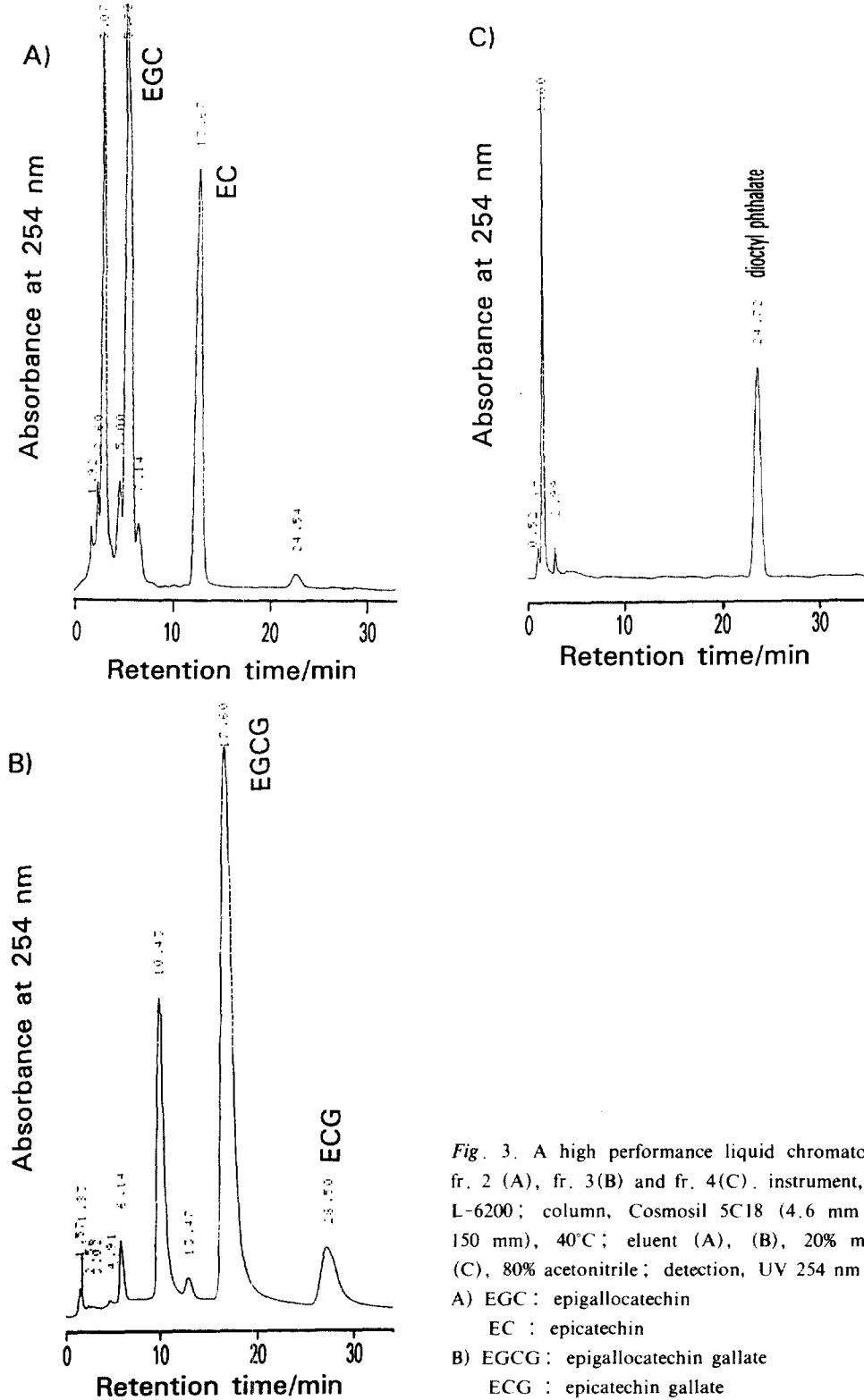


Fig. 3. A high performance liquid chromatogram for fr. 2 (A), fr. 3(B) and fr. 4(C). instrument, Hitachi L-6200; column, Cosmosil 5C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm), 40°C; eluent (A), (B), 20% methanol, (C), 80% acetonitrile; detection, UV 254 nm.

A) EGC : epigallocatechin

EC : epicatechin

B) EGCG : epigallocatechin gallate

ECG : epicatechin gallate

3.2. Column에 의한 분획

분리 column 제작은 Sephadex LH-20 약 60g을 평취하여 물 600ml에 약 4시간 이상 충분히 팽윤시킨 후, 미리 내벽을 silicon 처리한 column(30mm i.d. × 370 mm)에 천천히 부어 충전하였다. Yayabe 등의 방법을 개선하여 물 1100ml 및 15% acetone 600ml를 용리하여, 단시간에 caffeine, 유리 amino acids, 당류 및 착색성분들을 제거하였다. Catechin류는 30% acetone에서부터 용리되기 시작하였으며, 고순도를 얻기 위하여 30% acetone 1300ml, 45% acetone 900ml, 그리고 60% acetone 600ml의 stepwise gradient에 의하여 4개의 분획을 280nm에서 monitoring하여 분취할 수 있었다(Fig. 2).

3.3. 분획성분의 동정

각 분획에서의 catechin류의 순도는, 분획의 일부를

그대로 HPLC 장치에 주입하고, 254nm에서 검출되는 peak area에서 구하였다(Fig. 3). 이들의 동정은 Sephadex column용리액을 그대로 glycerol matrix와 함께 직접 FAB gun에 발라 positive FAB mode에서 나오는 [M + H]<sup>+</sup>의 molecular ion peak에 의하여 각 화합물을 동정하였다(Fig. 4).

그 결과 Fr. 1은 역상 HPLC 및 FAB-MS spectrum의 결과, 많은 종류의 aglycon과 anthocyanidin으로 구성된 수용성 anthocyanin류의 혼합물로 판정되었다. Fr. 2에서 m/z 307 및 291로부터 각각 epigallocatechin (EGC), epicatechin(EC)을 동정하였다. 역상 HPLC에서 일부 anthocyanin류가 3분대에 용출하였다(Fig. 3-A). Fr. 3에서 m/z 459 및 443의 epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate(ECG)를 동정할 수 있었다. 역상 HPLC에서 10분대에 용출하는 미지 물질은 FAB-MS spectrum에서 EC 유사물질로 추정되나

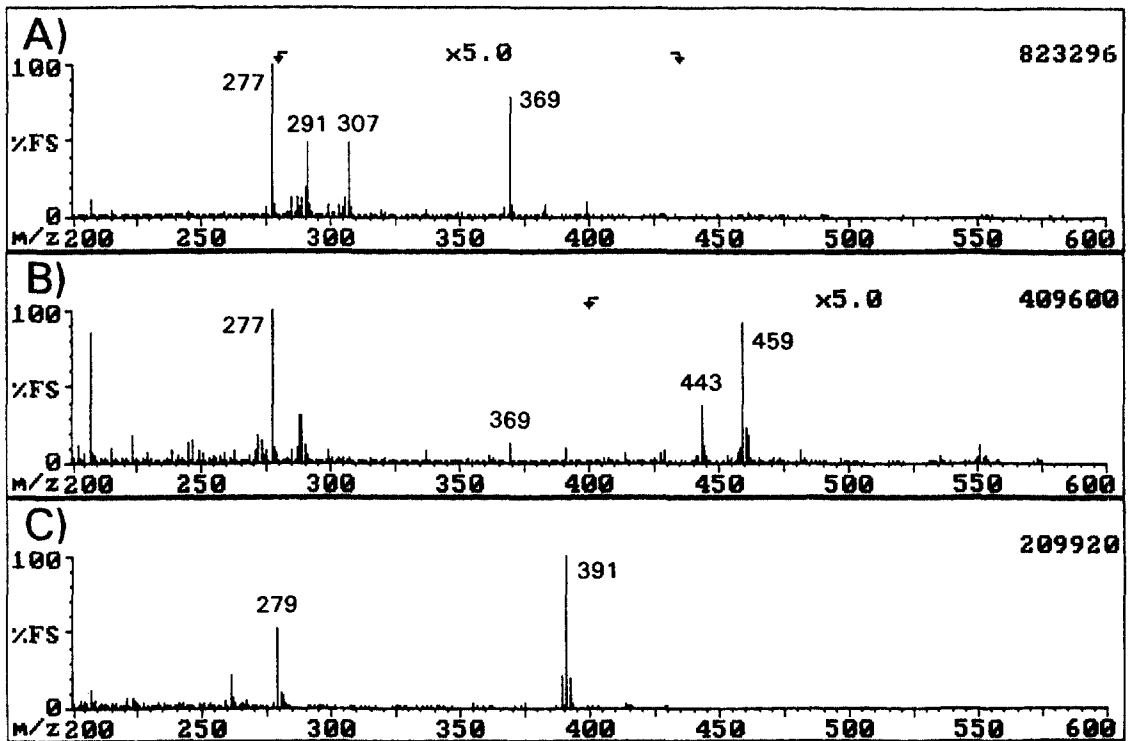


Fig. 4. A positive fast atom bombardment mass spectrum of fr. 2 (A), fr. 3 (B) and fr. 4 (C).  
 A) m/z 277, G<sub>3</sub>H<sup>+</sup>; m/z 291, epicatechin; m/z 307, epigallocatechin; m/z 369, G<sub>4</sub>H<sup>+</sup>. (G = glycerol)  
 B) m/z 277, G<sub>3</sub>H<sup>+</sup>; m/z 369, G<sub>4</sub>H<sup>+</sup>; m/z 443, epicatechin gallate; m/z 459, epigallocatechin gallate.  
 C) m/z 279, dibutyl phthalate; m/z 391, dioctyl phthalate.

상세한 연구는 현재 진행중이다(Fig. 3-B). Fr. 4에서 얻은 분획에서  $m/z$  391은 IR 및  $^1\text{H-NMR}$ 을 측정하여 비교한 결과, dioctyl phthalate로 판정되어 column system상의 가소제 일부가 용출된 것으로 추정되었고, 따라서 이 이상의 유기용매의 용리는 제한하였다(Fig. 3-C).

#### 4. 결 론

Tea catechin류는 정제가 어렵고, 열 분해되기 쉬워 순도 높은 표준물질을 구하기 어렵다. 따라서 보고된 문헌상의 용점측정, TLC의  $R_f$ 값 또는 HPLC의 retention time을 상호 비교함으로써만 동정할 수 있었다.<sup>9</sup> 본 방법에 의한 catechin류의 분석법은, 보고된 방법보다 유기용매 조성을 낮춤으로써 용출시간을 단축하였고, 정제수율도 EGC의 경우 75% 이상, EGCG의 경우 70% 이상으로 높일 수 있었다. 본 방법은 column 용리액을 그대로 FAB-MS spectrometry에 적용함으로써 각 화합물의 동정작업을 농축과정을 거치지 않고 신속하게 할 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 1991년도 한국과학재단 기초연구비지원(KOSEF 911-0304-043-1)에 의한 결과의 일부로, 이에 해당 기관에 감사드립니다.

#### 인용문헌

1. Y. Hara, T. Matsuzaki and T. Suzuki, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 803(1987).
2. T. Matsuzaki and Y. Hara, *ibid*, **59**, 129(1985).
3. S. Sakanaka, Y. Itoh, M. Kim and T. Yamamoto, *Proceedings of Annual Conference of Nippon Nogeikagaku*, **63**, 334(1988).
4. K. Muramatu, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 613(1986).
5. T. Kada, K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki and Y. Hara, *Mutat. Res.*, **150**, 127(1985).
6. M. Yamanaka, *Proceedings of Annual Conference of Nippon Nogeikagaku*, **63**, 627(1988).
7. A.G.H. Lea and D.J. Crispin, *J. Chromatogr.*, **54**, 133(1971).
8. T. Ozawa, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1079(1982).
9. F. Yayabe, H. Kinugasa and T. Takeo, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**, 845(1989).
10. Y. Mitane, M. Miwa and S. Okada, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 790(1990).