

차에 함유된 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류의 HPLC에 의한 동시분석법

김수연 · 小机信行^{1,*} · 한재숙¹ · 이갑량
영남대학교 생활과학부, ¹위덕대학교 외식산업학부

Analytical Method for Methylxanthin, Catechin, and Theaflavin Determinations in Korean Commercial Teas by HPLC

Soo-Yeun Kim, Nobuyuki Kozukue^{1,*}, Jae-Sook Han¹, and Kap-Rang Lee

Department of Human Ecology, Yeungnam University
¹Division of Food Service Industry, Uiduck University

Abstract Method for separation and quantification of methylxanthins, catechins, and theaflavins in Korean commercial teas (green, oolong, and black teas) was developed using reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC). After extraction with hot water, tea compounds were separated on Inertsil ODS-3v (5 μm) column, eluted with gradient of 7% acetonitrile and 93% of 20 mM phosphate buffer mixture for 7 min. Column effluent was monitored at 270 nm. This technique was effective for analyses of methylxanthins, catechins, and theaflavins in teas and biological samples. In green and oolong teas, two kinds of methylxanthins and 7 of catechins were identified, whereas 4 theaflavins were only identified in black tea. Among seven catechins in green and oolong teas, EGCG showed highest amount, whereas ECG was highest in black tea. (theaflavins were found only in black teas) In all teas, theobromine content was lower than that of caffeine.

Key words: methylxanthins, catechins, theaflavins, HPLC

서 론

최근, 차는 생체 내에서 유용한 기능성을 가진 「기능성 식품」으로서 인식되어 그 소비가 증가되고 있는 실정이다. 주된 차의 기능성 성분은 methylxanthin류와 catechin류 및 theaflavin류의 3종류(Fig. 1)로, methylxanthin류는 초콜릿, 코코아, 커피, 차 등의 기호식품, 그리고 추잉껌 등의 많은 식품에서 광범위하게 함유되어 있으며 주요 구성 성분은 질소를 함유한 알카로이드화합물의 일종인 theobromine(TB)과 caffeine(CAF)이다(1-4). 한편, 녹차와 우롱차 및 홍차에 함유되어 있는 catechin류는 차의 정미성분(苦味成分)으로 특히, 떫은맛의 주요 물질이며, 화학적으로는 epigallocatechin gallate(EGCG)를 비롯한 7종류의 catechin화합물로 알려져 있다. 이러한 성분은 함유 비율에 따라 차의 품질과 등급이 결정지어질 만큼 차에 있어서 중요한 요소라 하겠다(5). 또한 발효차인 홍차에는 methylxanthin류와 catechin류 외에 theaflavin류가 함유되어 있어 홍차 특유의 색과 기호에 영향을 준다(6,7).

지금까지 차에 대한 연구는 신체 내 여러 생리작용으로서의 항산화작용(8,9), 항균작용(10,11), 소취작용(12), 활성산소 소거작용(13,14), 콜레스테롤 상승 억제작용(15, 16), 혈당상승 억제작용

(17,18), 혈압상승억제작용(19,20) 등에 관한 보고와 항종양작용(21,22), 항변이원성(23,24) 등의 여러 작용에 관한 보고가 알려져 있다. 특히, 최근에는 홍차에 함유되어 있는 theaflavin-3,3'-gallate가 tyrosine receptor kinase를 억제한다는 보고(25)가 있어 이 물질이 항암작용과 관련되는지에 대한 관심을 모으고 있다.

이와 같이 차 속에는 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류와 같은 기능성 성분들이 함유되어 있으나 최근까지 이들 성분을 동시에 분리하여 분석한 보고는 거의 찾아 보기 어려운 실정이다.

따라서 본 연구는 차에 함유되어 있는 2종류의 methylxanthin류로 theobromine과 caffeine, 7종류의 catechin류로 (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-catechin (C), (+)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), (-)-gallocatechin(GC), (-)-epicatechin gallate(EGC) 및 (-)-catechin gallate(CG)와 4종류의 theaflavin류, theaflavin(TF), theaflavin-3-gallate(TF3G), theaflavin-3'-gallate (TF3'G) 및 theaflavin-3,3'-digallate(TF33'G)를 HPLC로 동시에 분석하는 방법을 확립하였기에 이 방법을 이용하여 한국에서 시판되고 있는 녹차, 홍차 및 우롱차에 함유되어 있는 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류를 분석한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 한국 시판 녹차(Hanla Sulloc Cha, Amorepacific Co.), 홍차(Lipton Black Tea, Lipton Co.) 및 우롱차(Oolong Tea, Nokchawon Co.) 3종은 대구시 수성구에 위치한 월마트에서 구입하였다.

*Corresponding author: Nobuyuki Kozukue, Division of Food Service Industry, Uiduck University, 525 Yugeum, Gangdong, Gyongju, Gyeongsangbuk 780-713, Korea
Tel: 82-54-760-1707
Fax: 82-54-760-1609
E-mail: kozukue@uu.ac.kr
Received May 20, 2005; accepted December 15, 2005

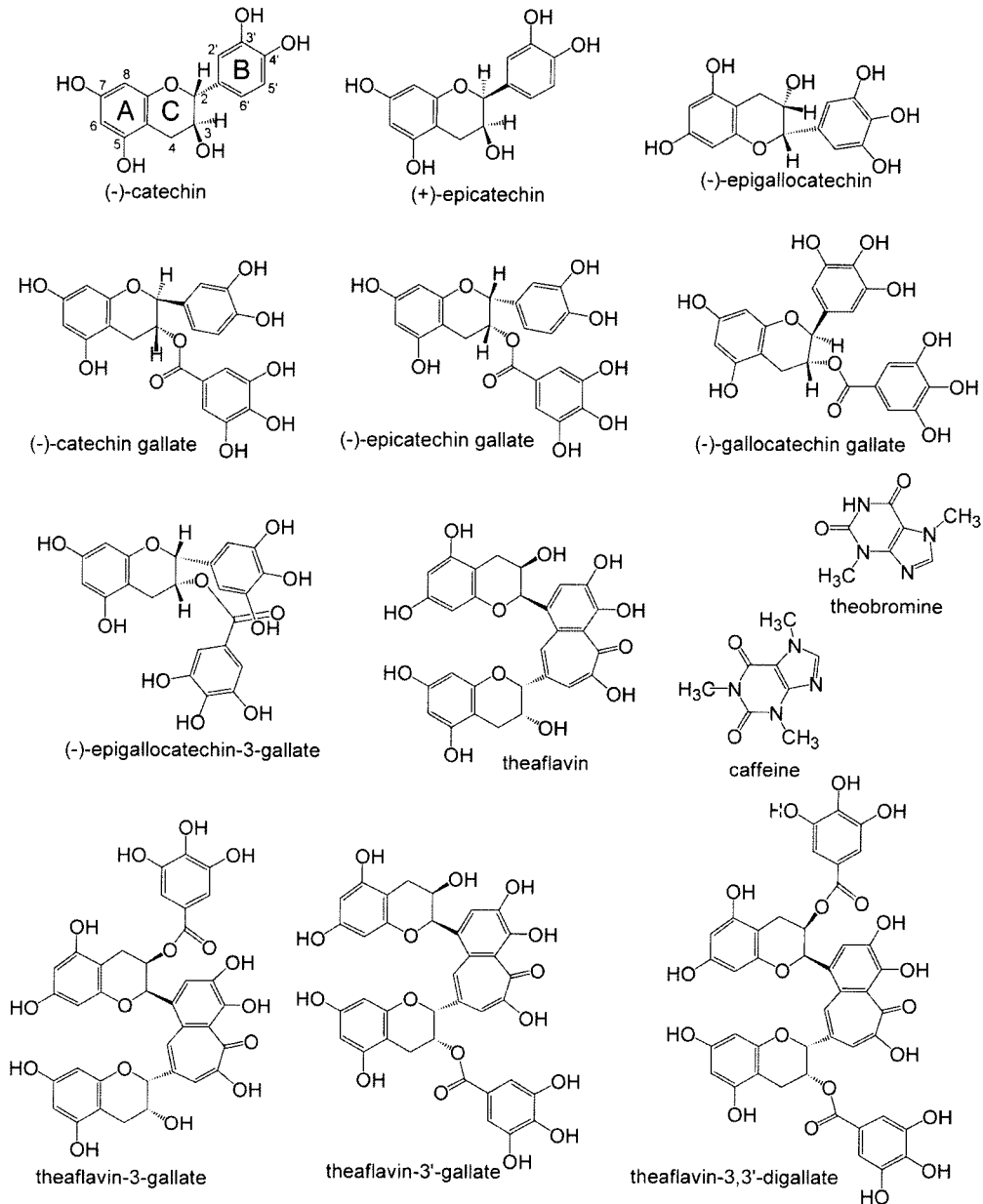


Fig. 1. Structures of catechins, theaflavins, and methylxanthins evaluated in this study.

표준품 및 시약

표준 CAF 및 TB은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였으며 7종의 catechin류는 미농무성의 Dr. Friedman M(USDA, Albany, USA)으로부터 증여받아 사용하였다. Theaflavin류 4종류는 Wako사, acetonitrile은 Sigma사의 HPLC용 시약을 사용하였으며 그 밖의 시약은 특급시약을 사용하였다.

HPLC 조건

HPLC기기는 gradient장치가 있는 HITACHI(model 655A-II, Tokyo, Japan)제품을 사용하였다. Detector는 SHIMADZU사의 Photo diode array(model SPD-M10Avp, Kyoto, Japan)를 사용하여 파장 270 nm로 설정하였다. Column은 GL Science사의 Inertsil ODS-3v(5 μ m, 4.0 \times 250 nm)를 사용하였다. 유속은 분당 1 mL였으며 column 온도는 SHIMADZU(model CTO-10Avp, Kyoto, Japan)의 column oven을 사용하여 30°C로 설정하였다. Peak의 면적은 HITACHI chromat integrator(model D-2500, Tokyo, Japan)

를 사용하여 측정하였으며 시료는 HITACHI auto sampler(model 655A-40, Tokyo, Japan)를 사용하여 HPLC에 직접 20 μ L를 주입하였다.

분석 방법

두 종류의 methylxanthin류, 7종류의 catechin류 및 4종류의 theaflavin류의 총 13종류의 화합물을 동시에 분석하기 위하여 여러 분석 조건을 검토한 결과, 용매의 농도를 단계적으로 바꾸는 stepwise법과 gradient법을 병행하여 분석하는 것이 가장 효과적이라는 것을 알았다. 본 연구에 실험한 solvent는 처음 7분간은 acetonitrile과 20 mM KH_2PO_4 를 7:93의 비율로 일정하게 유지하여 용출(isocratic법)시키다가 그 이후부터 20분까지는 10:90, 25분까지는 15:85, 30분까지는 20:80, 45분까지는 25:75의 비율로 acetonitrile의 양을 점점 증가시키면서 용출(linear gradient법)되도록 하였다. 또한 마지막 45-70분 동안은 acetonitrile과 20 mM KH_2PO_4 를 25:75의 비율로 일정하게 유지하여 용출(isocratic법)시켰다.

차의 추출 방법

시료 1.5 g을 250 mL의 삼각플라스크에 넣은 후 200 mL의 끓인 증류수를 넣어 정확히 5분간 천천히 교반한 다음 filter paper (Whatman No. 2)로 여과하였다. 여액의 일부를 원심분리(18,000 g, 10 min)하여 상등액의 20 µL를 직접 HPLC에 주입하였다.

정량과 동정

13종류의 표준 화합물을 HPLC로 분석하여 얻어진 각각의 peak 면적과 그 절대량으로부터 검량선을 작성하여 13종의 화합물을 정량하였다. 동정은 먼저 각각의 표준물질로 차 시료에서 얻어진 각 peak의 retention time비교한 후 PDA detector로 표준물질과 시료 peak의 spectrum을 해석하였다. 그 후 차의 추출액에 일정량의 표준물질을 혼합하여 검출한 peak의 단일성 유무(spike법)를 확인하여 실행하였다.

회수율

회수율은 일정량의 차 잎에 일정량의 표준시약을 첨가한 경우(A)와 첨가하지 않은 경우(B), 표준시약만을 이용한 경우(C)를 각각 HPLC로 분석하여 얻어진 면적을 다음과 같은 계산식에 따라 산출하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

결과 및 고찰

표준 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류의 HPLC에 의한 분석조건

표준 시약 TB, EGC, CAF, C, EC, EGCG, GCG, ECG, CG, TF, TF3G, TF3'G 및 TF33'G을 각각 0.19-1.28 mg까지 정확히 칭량하여 2 mL의 50% acetonitrile에 용해시켜 표준 시료로 이용하였다. 13종의 표준 시료를 일정량 HPLC에 주입하여 stepwise 법과 gradient법에 의하여 시료를 분석한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서와 같이, 처음으로 분리되는 물질은 TB로서, retention time은 7.86분이었으며, 다음으로 EGC가 20.62분, CAF가 22.35분, C가 24.23분, EC가 31.06분, EGCG가 32.70분, GCG가 34.35분, ECG가 38.30분, CG가 39.04분, TF가 53.34분, TF3G가 58.27분, TF3'G가 61.60분, 그리고 마지막으로 TF33'G가

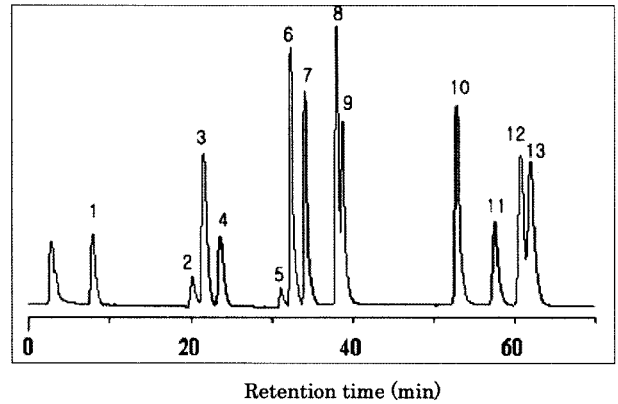


Fig. 2. HPLC separation of the extract from standard methylxanthins, catechins and theaflavins. Peak: 1, TB; 2, EGC; 3, CAF; 4, C; 5, EC; 6, EGCG; 7, GCG; 8, ECG; 9, CG; 10, TF; 11, TF3G; 12, TF3'G; 13, TF33'G. Column: Inertsil ODS-3V (5 µm, 4.0 × 250 mm), UV: 270 nm, mobile phase: acetonitrile/20 mM phosphate buffer, temperature: 30°C, flow rate: 1 mL/min, sample size: 20 µL.

63.10분에서 순차적으로 용출되었다. Nishitani 등(26)의 보고에서는 약 40분 내에 차 성분 중 7종의 catechin류와 다른 폴리페놀류를 분석하였으며 Aucamp 등(27)은 MECK에 의하여 5종의 catechin류를 13분 내에 분석하였으나 완전하게 분리되지는 않았는데 비하여 본 연구에서는 위와 같은 방법으로 7종의 catechin류를 비롯한 총 13종의 화합물의 peak가 겹쳐지지 않고 약 65분 이내에 완전하게 분리가 완료되었다.

또한 Goto 등(28)의 보고에는 column 온도를 40°C로 설정한 경우에 C의 분리가 가장 좋고 50°C로 온도를 올리면 C의 분리가 불완전하게 된다고 하였다. 또, column 온도를 30°C로 낮추면 C와 CAF의 peak가 겹쳐진다고 보고하였다. 본 연구에서도 column 온도를 50, 45, 40, 30, 25, 20 및 15°C 등의 7구간의 온도에서 실험한 결과, 50와 30°C 이하에서 분석하면 CAF의 peak 형태가 일그러져 불완전한 peak가 나타났다. 따라서 methylxanthin류 및 catechin류를 양호하게 분리분석하는 데에는 column의 온도가 중요한 역할을 하며 최적의 분석 column 온도는 30-45°C이라는 것을 알았다. 따라서 본 연구에서는 column 온도를 30°C로 설정하였으며 이는 Wang 등(29)의 연구 결과와 같았다.

Table 1. HPLC analysis of standards: limits of detection, tests for linearity and recoveries after spiking of tea

Compound	Limits of detection (ng)	Linearity range (ng)	Recovery after spiking (%)
theobromin	1.95	0-800	101.3 ± 2.6
(-)-epigallocatechin	14.64	0-800	82.4 ± 1.2
caffeine	2.40	0-800	99.8 ± 1.7
(-)-catechin	12.58	0-2000	91.9 ± 1.5
(+)-epicatechin	3.03	0-1500	82.4 ± 2.6
(-)-epigallocatechin-3-gallate	4.61	0-1500	79.6 ± 4.6
(-)-gallocatechin gallate	5.95	0-2500	92.3 ± 5.3
(-)-epicatechin gallate	6.50	0-5500	99.6 ± 0.7
(-)-catechin gallate	1.36	0-3300	103.8 ± 1.3
theaflavin	6.03	0-3300	74.2 ± 2.1
theaflavin-3-gallate	5.85	0-1400	86.6 ± 1.0
theaflavin-3'-gallate	5.15	0-1800	81.8 ± 1.2
theaflavin-3,3'-digallate	6.78	0-1800	89.1 ± 1.4

Range of linear plots of concentration versus peak area in µvolts (n = 3), r² = 0.99 for all 13 plot.

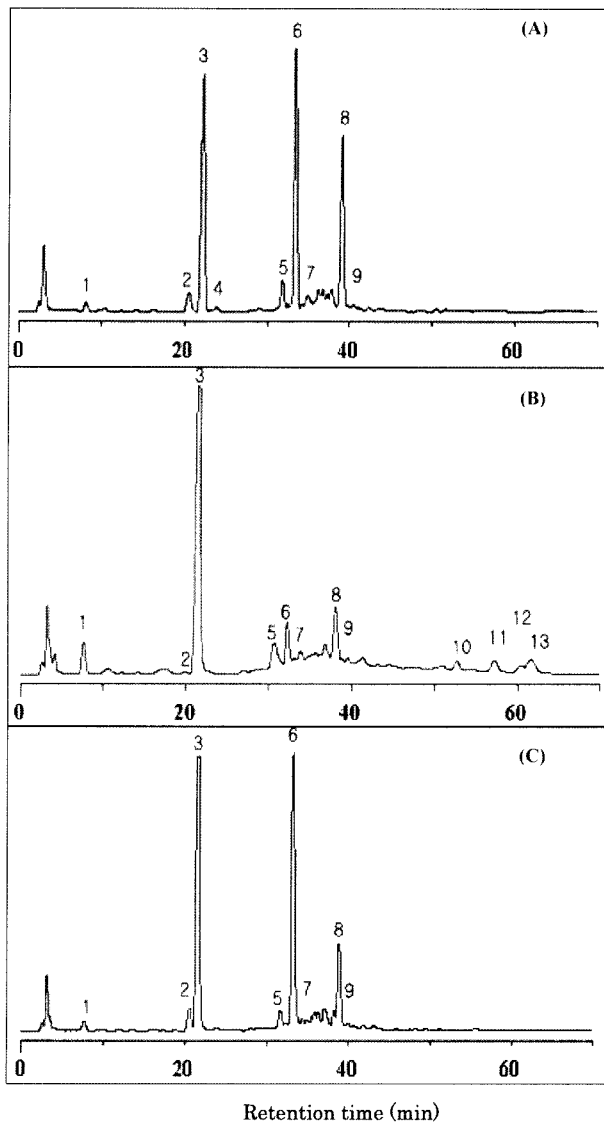


Fig. 3. HPLC chromatograms of the extracts from Korean commercial green tea (A), black tea (B), and oolong tea (C). Peak: 1: TB, 2: EGC, 3: CAF, 4: C, 5: EC, 6: EGCG, 7: GCG, 8: ECG, 9: CG, 10: TF, 11: TF3G, 12: TF3'G, 13: TF3''G.

Methylxanthin류, Catechin류 및 Theaflavin류의 검량선, 최소 검출량 및 회수율

표준 시약 13종을 사용하여 위의 HPLC법으로 분석하여 검량선, 최소 검출량 및 회수율을 측정된 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 나타낸 바와 같이, 검량선의 직선성은 상관관계수 $r^2=0.99$ 이상으로 양호한 결과를 나타내었으며 최소 검출량은 13종 모두 1.36-14.64 ng이 검출되었다.

한편, 회수율은 표준 시약 13종류 중, TF의 회수율이 74.2%로 가장 낮았으며 그 외 12종은 모두 80% 이상으로 13종의 평균회수율은 89.6%로 높은 회수율을 나타내었다. 이 회수율은 지금까지 차류에 관한 보고(28,29)와 비교하면 상당히 높은 결과라 하겠다.

한국 시판 녹차, 홍차 및 우롱차의 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류의 HPLC에 의한 분석

한국 시판의 녹차, 홍차 및 우롱차를 열수 추출하여 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 비발효차인 녹차는 methylxanthin류

2종류와 catechin류 7종류가 검출되었다. 각각의 peak를 동정하기 위하여 실험방법에서 언급한 3종류의 동정법으로 분석한 결과, methylxanthin류에는 TB와 CAF이, catechin류는 EGC, C, EC, EGCG, GCG, ECG, CG의 7종류가 동정되었다. 또한 녹차에는 theaflavin류는 전혀 검출되지 않았으며 양적으로는 methylxanthin류 중에서는 CAF이, catechin류로서는 EGCG가 가장 많았으며 다음으로는 ECG가 많았으며 EGC, C, EC 및 CG는 적게 나타났다.

한편, 발효차인 홍차는 녹차에서 전혀 검출되지 않았던 theaflavin류 4종류가 검출되어 methylxanthin류, catechin류를 포함한 총 13종의 화합물이 동정되었다. Theaflavin류는 홍차 제조 시에 차 잎을 발효하는 과정 중 catechin류가 중합되어 형성되는 물질로서 홍차의 색과 품질을 결정하는 중요한 요인이 되는데(6,7), 그 중 TF3'G의 함량이 가장 많았다. 또한 catechin류 중에서는 ECG가 가장 많았다. 우롱차는 녹차와 마찬가지로 theaflavin류는 전혀 검출되지 않았으며 methylxanthin류와 catechin류만 검출되었다. 이러한 결과는 우롱차가 홍차와는 다르게 발효시간이 그다지 길지 않아 catechin류의 중합이 일어나지 않았기 때문이라고 생각된다. 또한 우롱차는 녹차와 같이 catechin류로서는 EGCG가 가장 많았다. 이러한 결과는 Lee 등(30)의 연구 결과와 일치하였다.

따라서 본 연구는 차의 주요 성분인 methylxanthin류, catechin류, theaflavin류의 HPLC에 의한 동시분석법을 보고한 것으로 그 의의가 크다고 사료되며 이러한 성분이 차의 종류와 제조방법, 추출온도 및 시간 등에 따라 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 추후에 보고하고자 한다.

요 약

본 연구는 차에 함유되어 있는 특유의 정미성분으로 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류의 총 13종의 화합물을 HPLC를 이용한 동시분석법을 확립함과 동시에 이 분석법을 이용하여 한국에서 시판되고 있는 녹차, 홍차 및 우롱차에 함유되어 있는 주요 성분을 분석하였으며 그 결과는 다음과 같다.

HPLC분석조건은 역상(ODS)column을 이용하여 acetonitrile: 20 mM 인산완충액의 solvent 중 acetonitrile의 농도를 처음 단계 7%에서 최종 40%까지 단계적으로 변화시켜 분당 1mL씩 용출시켜 분석하였다. Column 온도는 효과적으로 각 성분을 분리시키기 위하여 정확하게 30°C로 설정하였으며 파장은 270 nm에서 분석하였다. 또한 차에 함유되어 있는 methylxanthin류, catechin류 및 theaflavin류의 총 13종의 화합물을 분석한 결과, 한 시료당 90분이 소요되었으며 재현성과 정량성이 뛰어나 13종의 화합물이 완전하게 분리되었다.

시판 녹차, 홍차, 우롱차를 분석한 결과, 녹차와 우롱차는 2종류의 methylxanthin류와 7종류의 catechin류는 검출되었으나 홍차에서 검출된 4종류의 theaflavin류는 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 차의 품질 관리 및 소비자의 차 선택에 있어 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

문 헌

1. Caudle AG, Gu Y, Bell LN. Caffeine and theobromine contents of ready-to-eat chocolate cereals. *J. Am. Diet. Assoc.* 100: 690-692 (2000)
2. Martinez LL, Alba PLL, Campos RG, Rodriguez LMD. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrometry and partial least squares. *Anal. Chim. Acta.* 493: 83-94 (2003)
3. Blauch JL, Tarka SM. HPLC determination of caffeine and theo-

- bromine in coffee, tea, and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.* 48: 745-750 (1983)
4. Craig WJ, Nguyen TT. Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J. Food Sci.* 49: 302-305 (1984)
 5. Wang LF, Kim DM, Lee CY. Interaction of flavanols in green tea extract during heat processing and storage. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 608-612 (2002)
 6. Obanda PM, Owuor P, Mang'oka R, Kavoi MM. Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chem.* 85: 163-173 (2004)
 7. Obanda PM, Owuor P, Mang'oka R. Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chem.* 75: 395-404 (2001)
 8. Luczaj M, Skrzydlewska E. Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chem. Toxicol.* 42: 2045-2051 (2004)
 9. Majchrzak D, Mitter S, Elmadafa I. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chem.* 88: 447-451 (2004)
 10. Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller JMT. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 169-174 (1997)
 11. Yoda Y, Hu ZQ, Zho WH, Shimamura T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J. Infect. Chemother.* 10: 55-58 (2004)
 12. Urabe K, Nadamoto T, Kawamura M, Yasumoto K. Effects of *Houttuynia cordata* and refinery final molasses on the development of offensive odor in porcine small intestine during storage. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo).* 40: 63-71 (1994)
 13. Wang LF, Zhang HY. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin and a rationally designed planar catechin. *Bioorg. Chem.* 33: 108-115 (2005)
 14. Jin G, Yoshioka H. Synthesis of lipophilic poly-lauroyl-(+)-catechins and radical-scavenging activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 440-447 (2005)
 15. Ikeda I, Kobayashi M, Hamada T, Tsuda K, Goto H, Imaizumi K, Nozawa A, Sugimoto A, Kakuda T. Heat-epimerized tea catechins rich in gallic acid gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7303-7307 (2003)
 16. Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J. Nutr. Biochem.* 14: 326-32 (2003)
 17. Rizvi SI, Zaid MA, Anis R, Mishra N. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2: 70-75 (2005)
 18. Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J. Nutr. Rev.* 134: 3431-3440 (2004)
 19. Villar A, Terencio MC, Paya M. Hypotensive effect of *Rhamnus lycioides* extracts. *Ethnopharmacol.* 16: 269-273 (1986)
 20. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 134: 38-42 (2004)
 21. Ramos S, Alia M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Agric. Food Chem.* 53: 1271-1280 (2005)
 22. Henning SM, Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL, Heber D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 1558-1564 (2004)
 23. Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S. Effect of catechins on mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA 102 elicited by tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH). *J. Vet. Med. Sci.* 67: 137-138 (2005)
 24. Geetha T, Garg A, Chopra K, Kaur I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutat. Res.* 22: 65-74 (2004)
 25. Sachinidis A, Seul C, Seedwald S, Ahn H, Ko Y, Vetter H. Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptor and transformation of A172 human glioblastoma. *FEBS. Lett.* 471: 51-55 (2000)
 26. Nishitani E, Sagesaka YM. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *J. Food Comp. Analysis* 17: 675-685 (2004)
 27. Aucamp JP, Hara Y, Apostolides Z. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.* 876: 235-242 (2000)
 28. Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima K. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. Chromatogr. A.* 749: 295-299 (1996)
 29. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extractions using relative response factors. *Food Chem.* 81: 307-312 (2003)
 30. Lee YJ, Ahn MS, Oh WT. A Study on the catechins content and antioxidative effect of various solvent extracts of green, oolong and black tea. *J. Food Hyg. Safety* 13: 370-376 (1998)