



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년07월17일  
 (11) 등록번호 10-1420000  
 (24) 등록일자 2014년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07D 311/62 (2006.01) A61K 36/82 (2006.01)  
 A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0035641  
 (22) 출원일자 2012년04월05일  
 심사청구일자 2012년04월05일  
 (65) 공개번호 10-2013-0113226  
 (43) 공개일자 2013년10월15일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 JP2011173902 A\*  
 Molecules. 2010. Vol. 15, pp. 7313-7352\*  
 Journal of Chromatography A. 2009. Vol. 1216,  
 pp. 3223-3231\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 강원대학교산학협력단  
 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)  
 (72) 발명자  
 정명근  
 대구 수성구 청호로 426, 103동 1001호 (범어동,  
 대구범어삼성쉐르빌)  
 황영선  
 대구 수성구 달구벌대로637길 21, 117동 811호 (매호동, 누리아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 김정현

전체 청구항 수 : 총 13 항

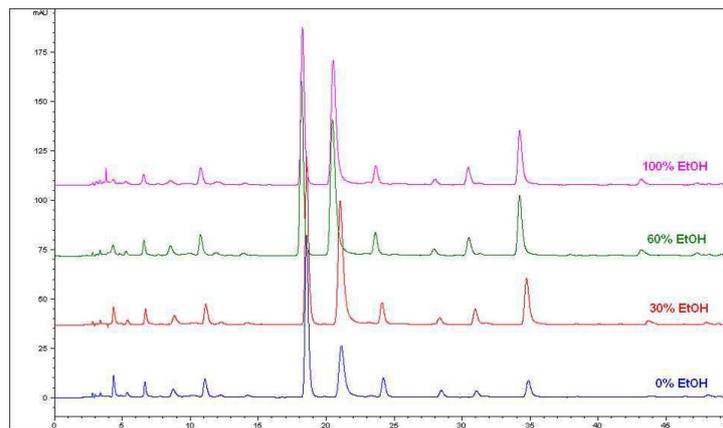
심사관 : 감유림

(54) 발명의 명칭 **차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법**

**(57) 요약**

본 발명은 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하여 알레르기 질환의 예방, 개선 및 치료에 효과적인 메칠화카테킨을 고순도이면서 보다 대량으로 추출할 수 있는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 고순도, 대량으로 추출하는 추출방법에 관한 것이다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**이민석**

제주 제주시 원노형로 93, 102동 704호 (노형동,  
부영아파트)

**이진호**

제주 제주시 원노형로 93, 101동 503호 (노형동,  
부영아파트)

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하되,

상기 개미산은 0.1 내지 2.0% 농도인 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서,

상기 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차 무게 대비 10 내지 50중량%(w/v)로 사용되는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서,

상기 에탄올은 40 내지 90% 에탄올인 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기 에탄올은 70 내지 80% 에탄올인 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서,

상기 추출은 저온 추출법, 상온 추출법, 초음파 추출법 및 환류 추출법 중 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

상기 메칠화카테킨은 녹차로부터 저온 추출법 또는 초음파 추출법에 의해 추출되며, 우롱차로부터 초음파 추출법에 의해 추출되는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 메칠화카테킨은 녹차로부터 저온 추출법에 의해 12시간 동안, 초음파 추출법에 의해 30분 동안 추출되며, 우롱차로부터 초음파 추출법에 의해 10분 동안 추출되는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법.

**청구항 9**

제1항 기재의 추출방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 약학 조성물

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 조성물은 메칠화카테킨을 0.01 내지 20중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 약학 조성물.

**청구항 11**

제1항 기재의 추출방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 건강보조식품.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 건강보조식품은 메칠화카테킨을 0.01 내지 20중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 건강보조식품.

**청구항 13**

제1항 기재의 추출방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 화장료 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서,

상기 조성물은 메칠화카테킨을 0.001 내지 10중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 및 개선용 화장료 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하는 메칠화카테킨을 고순도이면서 대량으로 추출할 수 있는 추출방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 근년 식습관의 변화, 공해의 심화 등으로 인하여 알레르기는 날로 증가하는 추세를 보이고 있으며, 전 국민의 20~25%가 아토피 피부염(AD), 천식, 비염 등의 증상을 가지고 있다. 이는 삶의 질을 현격히 저하시킴으로써 심각한 사회문제를 야기하고 있다. 이중 식품 알레르기는 영유아의 6~8%에서 확인되고 있고, 소아의 AD는 35%가 식품 알레르기에 의한 것으로 결코 무시할 수 없다.

[0003] 알레르기 질환은 천식, 알레르기 피부염, 아토피 피부염, 알레르기 결막염, 알레르기 장염 등이 있지만, 가장 흔한 것으로는 호흡기 질환인 천식 및 알레르기 비염과 피부 질환인 아토피 피부염이 대표적인 것이다.

[0004] 천식(asthma)은 비만세포와 같은 대표적인 염증세포와 호산구, T-림프구 등의 각종 체액성 염증 매개물에 의하여 발생하는 만성 염증성 질환으로 가역적인 기도폐쇄와 기관지 과민증이 특징이며, 이의 병태에는 여러가지 매개물질이 관여한다. 천식에 관여하는 물질로는 SRS-A(slow reacting substance of anaphylaxis)로 알려진 5-리폭시게나제(lipoxygenase)의 대사산물인 류코트리엔(Leukotriene)C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>이외에 염증성 사이토카인(cytokine)인 인터루킨(Interleukin, IL)-4, -5, -6등이 관여함이 알려져 있다.

[0005] 염증반응은 생체조직의 방어반응이다. 즉, 각종의 유해한 자극(stressor)에 응답하여, 자극에 의한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증의 자극에는, 감염 혹은 화학적, 물리적 자극 등이 있으며, 염증반응에 관련된 생체구성인자는 자유 라디칼(free radical), 단백질, 당질, 지질 등의 저분

자나 고분자의 화학물질과, 혈장, 혈구, 혈관 및 결합조직 등이 있다. 염증의 과정은 급성 염증 및 만성 염증의 두 가지로 나눌 수 있다. 급성염증은 수일 이내의 단기적인 반응이며, 만성염증은 지속시간이 길며, 조직의 증식 등이 보여진다.

- [0006] 알레르기 비염(allergic rhinitis)은 코 점막이 특정 물질에 대하여 과민반응을 나타내는 것으로 알레르기를 일으키는 원인 물질(항원)이 코 점막에 노출된 후 자극 부위로 비만세포, 호산구를 비롯한 여러 종류의 IgE 항체를 매개로 하는 염증세포가 몰려들어 이들이 분비하는 다양한 매개물질에 의하여 염증반응이 발생하는 질환이다. 연속적으로 일어나는 발작적인 재채기, 맑은 콧물, 코막힘 등의 세 가지 주요 증상을 특징으로 한다.
- [0007] 특징적인 증상 외에도 코 주위 가려움, 두통, 후각 감퇴 등의 증상이 동반될 수 있으며, 합병증으로 중이염, 부비동염, 인후두염 등이 동반될 수 있다.
- [0008] 알레르기 비염은 증상의 기간에 따라 연중 짧은 기간에만 발생하는 간헐적(intermittent) 알레르기 비염과 한 달 이상 오랜 기간 발생하는 지속성(persistent) 알레르기 비염으로 분류하며, 증상의 심한 정도에 따라 경도(mild)와 중등도(moderate) 중증(severe)으로 분류한다. 또한 어느 특별한 계절에만 발생하는 계절성과 일년내내 계속 발작하는 통년성으로 나누기도 한다. 계절성 알레르기성 비염은 식물의 꽃가루가 날아다니는 계절과 관련이 있는 경우가 많으나 만성이고 연중 계속되며 계절과 관련없이 통년성으로 발생하기도 한다.
- [0009] 알레르기 비염은 알레르기 천식과 함께 유전적 요인과 환경적 요인이 합쳐져서 생기는 대표적인 알레르기 질환으로, 부모로부터 물려받은 알레르기 체질과 주위의 천식 유발 요소들이 상호 작용을 일으켜 나타난다.
- [0010] 비염을 악화시키는 대표적인 악화요인은 기후변화, 감기, 공기오염, 스트레스 등이 있다.
- [0011] 아토피성 피부염(atopic dermatitis)은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부 질환으로 소양증(가려움증)과 피부건조증, 특징적인 습진을 동반한다. 유아기에는 얼굴과 팔다리의 펼쳐진 쪽 부분에 습진으로 시작되지만, 성장하면서 특징적으로 팔이 굽혀지는 부분과 무릎 뒤의 굽혀지는 부위에 습진의 형태로 나타나게 되며, 많은 경우에 성장하면서 자연히 호전되는 경향을 보인다. 어른의 경우 접히는 부위 피부가 두꺼워지는 태선화(lichenification)가 나타나고, 유소아기에 비해 얼굴에 습진이 생기는 경우가 많다. 아토피 피부염은 세계적으로 증가하는 추세이며 유병률이 인구의 20%라는 보고도 있다.
- [0012] 아토피 피부염의 발병 원인은 아직 확실하게 알려져 있지 않은 상태이다. 임상 증상도 피부건조증, 습진 등으로 다양하게 나타나기 때문에 발병 원인이 어느 한 가지로만 설명될 수는 없지만, 환경적인 요인과 유전적인 소인, 면역학적 반응 및 피부보호막의 이상 등이 주요 원인으로 여겨지고 있다. 환경적인 요인으로는 산업화로 인한 매연 등 환경 공해, 식품첨가물 사용의 증가, 서구식 주거 형태로 인한 카펫, 침대, 소파의 사용 증가, 실내 온도 상승으로 인한 집 먼지, 진드기 등의 알레르기를 일으키는 원인 물질(알레르겐; allergen)의 증가 등이 있다.
- [0013] 알레르기성 질환은 IgE에 의해 매개되며, 이것은 타입 2 T 헬퍼(Th2) 세포, 비만세포 및 산성백혈구(eosinophil)가 이 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. IgE는 윤충감염(helminth infection) 또는 다른 자극 없이도, 사람 또는 다른 몇몇의 실험동물 종들의 혈청 내에 일반적으로 존재하는 많은 면역글로불린 이형(isotype) 중 하나이다. IgE는 Th2 세포, IL-4, IL-5 및 IL-13 같은 사이토카인에 의해 매개되는 체액성 면역이 우세한 면역학적조건에서 생성되기 쉽다. 알레르기 질환들의 발병과정에 대한 현재의 개념은 유전적 및 환경적 요인은 서로 상호작용을 하고, 그럼으로써 Stat6-매개신호경로를 통한 IL-4의 생성 및 T 세포에서 c-Maf, GATA3, NIP45 및 NFATc 같은 특이전사인자들의 활성화 및 결과적으로 알레르기원(allergen)-특이적 T 헬퍼 2CD4+ 세포의 발달을 야기한다. 한번 생성된 알레르기원에 의해 활성화된 Th2 세포들은 IL-4, IL-5 및 IL-13을 분비한다. IL-4 및 IL-5는 B세포에 의한 IgE 및 IgG1의 생성을 유도하고, 골수에서의 산성백혈구의 발달을 자극하여, 염증이 생긴 조직으로 모이도록 유도한다. IL-13은 IL-4와 밀접하게 관련되어 있는 사이토카인으로, IL-4 수용체 알파사슬에 결합하여 IL-4, IgE 또는 산성백혈구와 무관하게 알레르기 표현형을 유도한다. 또한, IgE는 두 개의 이소폼의 IgE 수용체와 순환하며 결합한다. 친화성 IgE 수용체(FcεRI)는 비만세포 및 염기성백혈구의 표면에 존재하고, 저친화성 IgE 수용체(FcεRII 또는 CD23)는 림프구, 산성 백혈구, 혈소판 및 대식세포의 표면에 존재한다. 알레르기성 질환의 발병기전을 지배하는 가장 중요한 요인은 비만세포상의 IgE 수용체의 교차결합, 알레르기원을 만난 후 결과적인 비만세포의 탈과립인 것으로 믿어지고 있다. 비만세포에 의해 방출된 분자는 히스타민, 헤파린, 프로테아제 및 자유 라디칼을 포함하며, 혈관확장, 장관내 및/또는 기관지 평활근 수축, 점액분비 및 국소 단백질 분비와 같은 다양한 생물학적 효과를 매개한다. 비만세포의 초기매개반응에 따라 산성백혈구, 염기성백혈구 및 림프구의 유입이 6-24시간 후에 발생한다. 이 후기단계의 반응은 끊임없이 항원에

노출된 조직의 만성적 염증을 유도한다. 일반적으로, 알레르기성 질환의 예방을 위하여 항히스타민, 스테로이드 성 또는 비스테로이드성 항염증용 의약품 및 류코트리엔 길항제와 같은 조성물이 사용된다. 이러한 조성물들은 주로 증후성의 효과에 유용한데, 과도한 체액성 면역을 완화하거나 IgE 생산을 억제하는 것과 같은 알레르기성 질환의 근본적인 치유에 요구되는 예방을 제공하지는 못한다.

- [0014] 식품 알레르기는 식품에 의해 소화관을 통해 발생하는 면역 과민 반응으로 제 I 형, III형, IV형이 관련하는 것으로 보고되며, 이 중 제 I 형이 대표적인 반응에 속한다. 제 I 형 즉시형 과민반응은 2단계로 나뉘는데 제1단계는 알레르겐의 체내 침입에 의하여 면역반응의 균형이 깨어져 Th2 세포의 과도한 면역반응으로 IL-4, IL-13 등이 분비되고 그 영향으로 B 세포가 생산한 IgE 특이항체들이 비만세포나 호염기구의 표면에 부착됨으로써 알레르기 발증이 준비된 단계이다. 이를 알레르겐에 감작되었다고 한다. 여기에서 helper T 세포는 IL-12, IFN $\gamma$  이 포함된 Th1 세포와 IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 세포가 있다. Th2 세포에 의한 IL-4의 과도한 분비는 IgE 생산을 증가시켜 알레르기 반응에 관여하며, Th1 세포에 의해 생산된 IL-12 및 IFN  $\gamma$ 은 IgE 와 IgG1의 분비를 억제하고, IgG2a 의 분비를 증가시킨다.
- [0015] 알레르기 발증의 제2단계는 초기반응과 후기반응으로 나뉘며, 초기반응은 알레르겐이 체내에 재침입하여 비만세포를 자극하고 이 세포로부터 방출되는 히스타민, 지질대사물, 사이토카인 등에 의하여 혈관확장 등이 일어나는 것이고, 후기반응은 해당조직에 호중구, 호산구, 대식세포, Th2 세포, 호염기구 등이 침윤하여 활성화됨으로써 염증이 유발되어 아토피 피부염, 비염, 천식 등을 일으키는 것이다. 이 같은 탈과립 분비 물질 중 히스타민은 가장 잘 알려진 인자이며, 즉각형 과민 반응과도 관련되어 알레르기 증상의 중요한 지표로 사용되고 있다.
- [0016] 알레르기 환자의 경우 장관을 통하여 식품 알레르겐이 소화되지 않은 상태로 침투하게 되며, 이러한 알레르겐의 장내 흡수가 식품 알레르기 발증의 첫 단계라 할 수 있다. 장관은 영양소의 소화흡수를 담당하는 기관일 뿐만 아니라 여러 가지 생체 조절에 관여하고 있다. 장상피 세포는 소화흡수, barrier, 식신호의 전달/변환 등의 주요 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 그 밖에도 독특한 면역시스템(mucosal immunity)이나 신경조직이 발달되어 있는 등 소화관/장관의 역할을 결코 과소평가할 수 없다.
- [0017] 장상피세포는 barrier로써 세포간극(tight junction)에 의해 macromolecule의 투과를 제한하나 barrier의 파괴 시 투과성이 증가되어 식품 알레르기가 발생할 수 있다. 또한 일반적으로, 섭취된 단백질들은 장관내에서 소화 효소에 의해 가수분해되어 흡수되나, 소화관의 기능저하와 장 상태의 불안정, 또는 어린이들의 미성숙한 장의 경우 어떤 단백질들은 가수분해되지 않은 온전한 형태로 barrier를 통과한다. 이러한 것들이 알레르겐으로 작용하여 일부의 사람들에게는 알레르기 과민반응을 일으키게 된다. 장 상피 투과성이 증가되어 있는 장 질환, 소아 지방변증, 식품 알레르기, 급성 췌장염과 같은 질환의 경우 상피세포의 tight junction의 손상으로 장관 barrier 기능장애를 일으킨다고 한다. 즉, tight junction의 안정화를 통해 장관내 barrier의 기능을 강화시킨다면 식품 알레르기를 예방할 수 있을 것이다.
- [0018] 따라서 이와 같은 알레르기를 예방하기 위해, 3가지 방법을 고려해 볼 수 있다. 즉, Th1/Th2 사이토카인 균형 조절을 통한 알레르기 발증의 제1단계 반응 제어와 탈과립 억제를 통한 제2단계 반응 제어, 마지막으로 식품 알레르겐의 장상피 세포층 통과 억제를 통한 식품 알레르기 발증의 전단계인 알레르겐의 체내흡수 제어를 생각할 수 있다.
- [0019] 식품 및 천연물의 제 I 형 IgE 매개성 알레르기 억제활성이 보고된 바 있다. Park 등에 의하면 Quercetin은 OVA 로 유도된 천식 유발 마우스계에서 Th1/Th2 면역반응 조절을 통해 알레르기 반응을 억제함을 보고하였다. 그 외 다래, 마늘, 들깨 기름, 곤약, 소엽맥문동의 다당류성분, 영지버섯, 일본간장의 다당체 성분, 로얄 젤리, 동충하초 등의 성분 또한 이 같은 활성으로 알레르기 반응을 억제함이 보고되었다.
- [0020] 또한 식품은 아니나 펩타이드 및 세포벽 성분에 의한 장상피 세포 안정화를 통한 식품 알레르겐의 통과 억제 활성도 보고된 바 있다.
- [0021] 이와 같이 식품 및 식물유래 천연물들은 우리나라를 비롯한 동양에서 알레르기를 포함한 다양한 질병의 치료 및 예방에 한방과 민간요법으로 사용되어왔고 이에 대한 많은 보고들이 있다.
- [0022] 일반적으로 알레르기의 예방 및 치료는 알레르겐을 낮은 농도로부터 점차적으로 투여하는 감작(hypersensitization)을 통해 알레르겐에 의한 면역반응을 Th2에서 Th1으로 유도하여 IgE 대신 IgG를 생산하도록 유도하거나, Th0 세포를 Th1 세포로 분화하도록 IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  등이나 Th1 자극 면역강화제(adjuvant)를 투여하여 IgE의 생산을 낮추는 방법이 있다.
- [0023] 현재 의약품으로써 항알레르기제가 주류를 이루고 있으며, 2, 3세대 항히스타민제가 주로 판매되고 있다. 기존

항알레르지는 대부분 알레르기 증상을 완화하는 대체요법적 약제로서 염증계에 작용하는 약제가 많았고, 현재에도 신규 약제개발은 염증에 있어서 신규 화학전달 물질에 관한 약제가 많다. 최근에는 면역계에 작용하는 약제개발도 많아지고 있는데, 구체적으로는 사이토카인이나 IgE항체, T세포/B세포의 기능조절, 세포접착과정, 세포내 정보 전달과정의 조절에 관한 약제개발 등, 알레르지의 발증을 억제하는 것을 목적으로 한 근본 치료약의 개발도 많이 시도되고 있다.

[0024] 그러나, 아직까지 알레르기를 효과적으로 제어할 수 있는 만족스러운 조성물은 제시되어 있지 않으며, 해마다 악화되는 대기오염 및 환경공해에 따라 날로 증가하고 있는 알레르기성 질환을 겪고 있는 환자에 대한 효과적인 항알레르기 조성물의 제공은 시급한 실정이다.

[0025] 한편, 녹차는 차나무(*Camellia sinensis* L., Theaceae)의 싹이나 잎을 이용하여 차엽 속에 존재하는 산화효소를 화열이나 증기로 실활시켜 제조한 것으로서, 주성분은 카테킨류(catechins)이다. 이러한 카테킨류에 대하여 혈압강화작용(Hara, Y et al., Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61, pp803, 1987), 항산화작용(Matsuzaki, T et al., Nippon Nogeikagaku Kaishi, 59, pp129, 1985), 암발생 예방 작용, 충치 예방 작용 등 다양한 생리 활성이 보고되고 있으며, 그 카테킨류 중에서도 (-)-에피갈로카테킨갈레이트((-)-Epigallocatechingallate, 이하 EGCG)가 가장 대표적인 생리활성 물질이다. 녹차 카테킨이 체내에서 유해한 유리기를 제거하고 항산화 효소의 활성을 증가시켜 항산화 활성을 나타내며, 항암성, 항돌연변이성, 항바이러스성, 항염성, 항알레르기성 및 항혈전성을 가진다고 보고되어 있으며, 항균작용, 수렴작용 및 피부미백작용이 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0026] 우롱차는 녹차와 홍차의 중간적인 성질을 가지나 반발효차로, 중국 푸젠성(福建省)에서 생산되는 무이암차가 원조이다. 무이암차는 봄과 여름 두철에 걸쳐서 찻잎을 채취하는데, 너무 일찍 찻잎을 따면 무이암차의 독특한 향기와 맛을 낼 수 없기 때문에 무이암차는 녹차와 달리 펼쳐진 찻잎을 탄다. 우롱차의 짧은 맛 성분인 카테킨은 그 양이 녹차에 비해 절반 이하인 데다 높은 온도에서도 잘 용해되지 않기 때문에 물의 온도를 높게 하여 우려내는 것이 좋다. 우롱차는 산화효소의 작용에 의해 제조과정 중 카테킨의 함량이 녹차에 비해 30~40% 정도 감소하게 되고, 카테킨이 발효과정을 거치는 동안 테아플라빈(theaflavin) 및 기타 물질로 변한다. 이러한 우롱차는 이뇨작용, 해독작용, 비만방지 효과, 비타민류의 장내채류 촉진, 지질의 과산화억제, 혈액순환 촉진 및 콜레스테롤의 축적방지 등의 의학적, 약리적 기능을 가지고 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0027] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2011-0087149호

**비특허문헌**

[0028] (비특허문헌 0001) Park HJ et al. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. Int. Immunopharmacol. 9:261-7, 2009.

(비특허문헌 0002) Isobe N, Suzuki et al. Enzyme-Modified Cheese Exerts Inhibitory Effects on Allergen Permeation in Rats Suffering from Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:1740-1745, 2007.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0029] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 고순도이면서 보다 대량으로 추출할 수 있는 메칠화카테킨의 추출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0030] 또한 본 발명은 항알레르기 효과가 뛰어나 알레르기 환자에 대한 알레르기 질환의 예방 및 개선에 효과적인 약학 조성물, 건강보조식품 및 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0031] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하는 것을 특징으로 하는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하는 추출방법을 제공한다.
- [0032] 상기 개미산은 0.1 내지 2.0%의 농도인 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 에탄올로는 40 내지 90% 에탄올을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 70 내지 80% 에탄올을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0034] 특히, 상기 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매는 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차 무게 대비 10 내지 50중량%(w/v)로 사용하는 것이 좋다.
- [0035] 또한, 상기 추출은 저온추출, 상온추출, 초음파추출, 환류추출 등의 방법으로 수행될 수 있다. 특히, 추출재료가 녹차일 경우에는 저온추출 또는 초음파추출을 실시하고, 우롱차일 경우에는 초음파 추출을 실시하는 것이 바람직하다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 및 개선용 약학 조성물을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0039] 본 발명의 추출방법은, 항알레르기 활성을 가져 알레르기 환자에 대한 알레르기 질환의 예방, 개선 및 치료에 효과적인 메칠화카테킨을 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차 등의 추출재료로부터 고순도이면서 보다 대량으로 추출하는 예기치 못한 기술적 효과를 발휘하므로 차종 식물로부터 메칠화카테킨을 효율적으로 추출하는 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0040] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 녹차 함유 카테킨 화합물의 추출용매에 따른 HPLC 분석 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 녹차 함유 카테킨 화합물의 각 추출방법에 따른 HPLC 분석 크로마토그램을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0041] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0042] 식물로부터 유용 물질을 추출하기 위한 방법은 일반적으로 상압 상태의 용기에서 가열하여 달이는 방법(즉, 100℃ 이하), 또는 오토클레이브(autoclave)와 같은 내압성 용기 내에서 회분(batch)식으로 추출하는 방법 등이 주로 이용되고 있다. 그러나, 추출 대상이 되는 식물의 종류, 추출하고자 하는 성분, 추출에 사용되는 용매, 추출 방법 등에 따라 추출하고자 하는 성분의 순도, 추출되는 성분의 양과 같은 추출효율의 차이가 심하게 발생한다. 따라서, 추출대상이 되는 식물로부터 유용 물질을 추출하고자 할 때 최적의 추출효율을 나타낼 수 있는 추출방법을 적용하는 것이 무엇보다 중요하며, 이러한 최적의 추출방법을 적용하였을 경우 순도가 높으면서도 대량의 양으로 유용 물질을 추출할 수 있게 된다.
- [0043] 한편, 메칠화카테킨은 차나무로부터 추출되는 성분으로, 국내에서는 잘 알려지지 않았으나 뛰어난 항알레르기 효과로, 이들의 산업적 이용이 기대되는 물질이다. 그러나, 추출용매에 대한 문헌적 자료의 검토에서 메칠화카테킨만의 최적 추출에 대한 자료는 거의 전무한 상태이고, 녹차의 주요 성분인 카테킨 및 카페인을 대상으로 용매의 용해도와 안정성을 검토한 결과로 녹차에 함유된 일반적 카테킨이나 카페인은 순수한 수용매 혹은 에탄올에 잘 용해된다는 자료 정도에 불과하였다.
- [0044] 종래 차나무 잎을 이용하여 가공한 녹차나 우롱차로부터 추출물을 추출하거나, 카테킨 화합물(또는 카테킨류) 등을 추출할 경우에도 극소량의 메칠화카테킨이 포함되어 있을 수 있으나, 그 양은 극히 소량에 불과하며, 메칠

화카테킨의 구조적 불안정성과 추출과정 중 산도의 불균형 및 극단적 고온에 의해 입체 이성질체를 이루는 전화 현상이 발생할 수 있으므로 종래 무수한 카테킨 화합물(또는 카테킨류)에 적용한 추출방법으로는 고순도 및 대량의 메칠화카테킨을 분리해낼 수 없었으며, 특히, 현재까지 녹차 추출물에서 추출의 대상이 되는 지표물질이 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG)로 평가되고 있어, 적용된 다양한 추출방법이 모두 극성이 높은 카테킨 화합물의 추출에 효율적인 방법이었고, 상대적으로 극히 극성이 낮은 메칠화카테킨을 순수하게 대량 추출해내기에는 턱없이 어려웠다. 따라서, 본 발명에서는 차나무 잎을 이용하여 가공한 녹차나 우롱차, 차나무의 생잎으로부터 고순도의 메칠화카테킨만을 순수하게 분리하면서도 대량으로 추출할 수 있는 최적의 추출방법을 확립하고자 하였다.

- [0045] 이하 본 발명에서 설명하는 메칠화카테킨은 통상의 차나무 잎, 혹은 녹차나 우롱차에 함유된 메칠화카테킨을 의미하는 것으로, 구체적으로 차나무 잎, 혹은 녹차나 우롱차를 명시하지 않더라도, 차나무 잎, 녹차나 우롱차에 함유된 메칠화카테킨을 의미하는 것이다.
- [0046] 본 발명은 녹차 및 우롱차에 함유된 메칠화카테킨의 최적 추출조건을 확립하기 위한 것으로, 개미산 함유 증류수 및 에탄올 혼합용매를 추출용매로 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 상기 메칠화카테킨을 추출하기 위한 추출재료인 차나무 잎, 녹차 및 우롱차는 통상적으로 상용되는 차나무 잎, 녹차 및 우롱차가 사용될 수 있으며, 특히 본 발명에서는 (주)장원의 차나무 육종계통으로 가공한 녹차 및 우롱차를 사용하였다.
- [0048] 녹차 및 우롱차에 함유된 카테킨 화합물은 pH에 대해 불안정한 특성으로 pH 3 이하의 산성 조건에서 안정하며, pH 7~11 수준의 알칼리 조건이 될수록 안정성이 급격히 감소한다. 또한, 녹차의 갈변을 억제하기 위해서는 폴리페놀 산화효소에 의한 갈색화 반응을 차단해야 하는데, 폴리페놀 산화효소에 의한 갈변을 억제하면서 pH에 대한 안정성을 확보하기 위해서는 유기산을 사용하여 pH를 산성으로 만들어주는 방법이 가장 효율적이다.
- [0049] 이에 본 발명에서는 상기 녹차 및 우롱차에 함유된 메칠화카테킨을 추출하기 위하여 개미산을 포함하는 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용한다. 종래 차나무로부터 카테킨 화합물을 추출해내는데에 저렴하면서도 단순히 추출효율을 증대시킬 수 있는 무기산인 인산을 사용한 예가 있으나, 본 발명에서는 산성 조건을 유도하여 메칠화카테킨의 구조적 안정성을 증진시키면서 동시에 추출된 메칠화카테킨을 식품 및 다양한 용도에 적용하기 위해 인축에 유해성이 적은 유기산인 개미산을 사용하였다.
- [0050] 상기 추출용매로 개미산을 포함하지 않을 경우에는 pH에 대해 불안정한 메칠화카테킨의 특성으로 본 발명에서 목적하는 바와 같은 고순도의 메칠화카테킨을 얻을 수 없으며, 폴리페놀 산화효소에 의한 갈색화 반응이 유도되어 갈변현상이 나타날 수 있다.
- [0051] 특히, 상기 개미산은 0.1 내지 2.0% 농도의 것을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 농도를 벗어날 경우에는 메칠화카테킨의 구조적 안정성을 유지하지 못하거나 고농도로 사용되어 인축에 유해한 영향을 미칠 수 있게 된다.
- [0052] 또한, 상기 추출용매로 개미산을 포함하는 40 내지 90% 에탄올을 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 가장 바람직하게는 개미산을 포함하는 70 내지 80% 에탄올을 사용하는 것이다. 상기 범위내의 에탄올을 사용할 경우 최종 수득되는 메칠화카테킨의 순도와 최대의 추출효율 측면에 있어 보다 바람직하다.
- [0053] 구체적으로, 본 발명의 추출방법은 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차 등의 추출재료 무게 대비 10 내지 50중량%(w/v)의 양으로 상기와 같은 개미산 함유 증류수 및 에탄올의 혼합용매를 추출용매로 사용하여, 4 내지 80℃에서 10분 내지 48시간 동안 저온 추출법, 상온 추출법, 초음파 추출법 또는 환류 추출법 등의 통상의 추출법을 수행한 후 얻어진 추출액을 여과지로 여과한 후 얻어진 여과물을 동결건조, 상온건조 또는 열풍건조를 수행하는 추출방법을 통하여 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차 등의 추출재료로부터 고순도의 메칠화카테킨을 대량으로 수득할 수 있다.
- [0054] 특히, 녹차의 경우 저온 추출법, 구체적으로 저온 추출법에 의해 12시간 동안, 또는 초음파 추출법, 구체적으로 초음파 추출법에 의해 30분 동안 추출하는 것이, 우롱차의 경우 초음파 추출법, 구체적으로 초음파 추출법에 의해 10분 동안 추출하는 것이 최적의 추출효율 측면에 있어 더욱 바람직하다.
- [0055] 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 포함하는 여러 종류의 카테킨 화합물을 동시 추출할 경우, 동일한 조건에서 동일한 추출용매를 사용하거나, 동일한 추출용매를 사용하여 동일한 추출방법과 시간에 따라 추출한다 하더라도 추출하고자 하는 각 카테킨 성분에 따라 추출효율이 각각 상이하게 나타나며, 본 발명에서 메칠화카테킨의 추출에 기존 알려진 추출용매와 추출방법을 적용하였다 하더라도 녹차 및 우롱차로부터 메칠화카테킨만을 추출하기 위한 최적의 추출방법에 대한 연구는 이전까지는 전무하였으며, 특히 대량으로 메칠화카테킨

을 얻을 수 있는 방법에 대한 것은 어디에도 찾아볼 수 없는 기술이므로, 본 발명은 전혀 예기치 못한 기술임은 자명한 것이다.

- [0056] 따라서, 상기와 같은 본 발명의 추출방법에 따르면 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨만을 대량으로 추출할 수 있을 뿐만 아니라, 고순도의 메칠화카테킨을 효율적으로 추출할 수 있다. 즉, 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 항알레르기 특성이 우수한 메칠화카테킨을 보다 대량으로 추출하는 예기치 못한 기술적 효과를 얻을 수 있다.
- [0057] 본 발명에서는 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 메칠화카테킨만을 효율적으로 추출할 수 있는 조건을 확립하고자, 개미산을 포함하는 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매를 달리하여 상온조건에서 12시간 동안 추출하고, HPLC 분석을 통하여 메칠화카테킨의 추출효율을 비교 검토하였으며, 이렇게 하여 검정된 추출용매를 사용하면서 저온(4℃) 추출법, 상온(25℃) 추출법, 초음파(40℃) 추출법, 환류(80℃) 추출법 등 추출방법 간 추출효율을 비교 검토하여 최적의 추출방법을 확립하였다.
- [0058] 본 발명은 상기와 같은 최적의 추출효율을 구현할 수 있는 추출방법에 따라 녹차 및 우롱차로부터 추출한 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 항암 및 항산화 활성을 갖는 약학 조성물을 제공하는 바, 상기 메칠화카테킨은 조성물에 0.01 내지 20중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 약학적 조성물의 알레르기 예방 및 개선 효과가 미미할 수 있으며, 20중량%를 초과할 경우에는 사용량에 대비 항알레르기 효과가 상대적으로 낮을 수 있다.
- [0059] 본 발명의 추출방법에 따라 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 추출한 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여가 가능하다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 예를 들면, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골순, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다.
- [0060] 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 경구투여, 비경구 투여용, 주사용 등의 적합한 제형으로 제제화 할 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 제제화에 필요한 통상의 성분들과 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키제(troches), 로진지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 엘릭시르(elixirs), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 이때, 정제, 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유 등을 혼합할 수도 있다. 캡슐 제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 혼합할 수도 있다.
- [0061] 또한, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 흉부내 주사 주입방식과 점막, 또는 국소에 적용되는데, 분산제, 좌제, 분제, 에어로졸(비강 스프레이 또는 흡입제), 겔, 현탁액제(수성, 또는 비수성 액상 현탁액, 수중유 에멀전 또는 유중수 에멀전), 용액제 등 비경구 투여에 적합한 액상 투여 형태 등에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화 할 수 있다.
- [0062] 상기와 같은 본 발명의 약학적 조성물의 유효투입량은 환자의 연령, 신체적 조건, 몸무게 등의 상태를 고려하여 임상의 판단에 따라 필요한 범위로 조절될 수 있다. 일반적으로, 상기 약학적 조성물의 유효투입량은 성인 환자 체중 1kg 당 1 내지 200mg/일이고, 바람직하기로는 5 내지 100mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 수회, 바람직하기로는 하루 2회 내지 5회 분할 투여될 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명은 상기의 추출방법에 따라 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 추출한 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공하는 바, 본 발명의 건강보조식품은 널리 식용되는 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 추출된 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하므로 인체에 안전하여 식품에 첨가하여 사용하기에 적합하다.
- [0064] 상기 메칠화카테킨은 알레르기 예방 및 개선용 건강보조식품에 0.01 내지 20중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 건강보조식품의 알레르기 예방 및 개선 효과가 미미할 수 있으며, 20중량%를 초과할 경우에는 첨가 농도 대비 알레르기 예방 및 개선 효과가 상대적으로 낮을 수 있다.

- [0065] 상기 건강보조식품으로는 그 종류가 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 통상적인 기호성 식품 즉, 라면, 생면 등의 면류, 두부, 시리얼, 빵류, 추잉 껌, 사탕, 과자류 등에 첨가하여 통상적으로 알려진 방법에 의하여 각종 식품으로 제조할 수 있고, 식용가능한 색소로서 적용할 수도 있다. 또한, 정제, 과립제, 환제, 경질캡셀제, 연질 캡셀제 또는 액제 제형 등 일반적인 제형으로 제형화 될 수 있으며, 생즙, 과우치, 음료, 또는 다류 등으로 제조될 수도 있다. 상기한 성분 이외에 다른 성분은 제형에 따라 당업자가 적절하게 선택하여 배합할 수 있음은 물론이다.
- [0066] 또한, 본 발명의 건강보조식품에 포함되는 메칠화카테킨은 항알레르기 활성뿐 아니라 항산화 활성 또한 우수하여 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 효과적으로 방지할 수도 있다. 따라서, 본 발명에 따라 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 추출한 메칠화카테킨은 통상의 각종 식품류에 배합함으로써 이들 식품류를 보존하거나 식품의 신선도 및 품질을 장기간에 걸쳐 유지하기 위해 사용할 수도 있다.
- [0067] 상기 식품류로는 전형적인 식품뿐만 아니라, 음료(알콜성 음료도 포함함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용 식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소오스 등) 등을 포함함은 물론이다.
- [0068] 또한, 본 발명은 상기의 추출방법에 따라 차나무 잎, 녹차 및 우롱차로부터 추출한 메칠화카테킨을 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0069] 상기 메칠화카테킨은 화장료 조성물에 0.001 내지 10중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.001중량% 미만일 경우에는 항알레르기 활성이 미미할 수 있으며, 5중량%를 초과할 경우에는 투입 농도대비 항알레르기 효과가 상대적으로 낮을 수 있다.
- [0070] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 메칠화카테킨을 그대로 사용하거나 또는 필요에 따라 희석하여 사용할 수 있다. 상기 메칠화카테킨은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 기체, 보조제 및 첨가제를 사용하여 액체 또는 고체 형태로 제조될 수 있다. 액체 또는 고체 형태의 화장품으로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 화장수, 크림제, 로션제, 입욕제 등의 형태를 포함할 수 있다.
- [0071] 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 기체, 보조제 및 첨가제는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 물, 알콜, 프로필렌글리콜, 스테아르산, 글리세롤, 세틸 알코올, 유동 파라핀 등이 있다.
- [0072] 상기와 같은 본 발명의 화장료 조성물은 피부의 산화에 의한 손상, 예를 들면, 반점(갈색반), 주근깨, 피부균열, 자외선 손상(햇볕에 탐) 등을 예방하는데 매우 유용하며, 화장품 자체의 산화를 방지함으로써 화장품의 품질을 유지하는데도 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0073] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나, 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0074] 이하의 실시예들에서는 녹차 및 우롱차에 함유된 메칠화카테킨의 최적 추출조건을 확립하기 위하여, 먼저 0.1% 개미산을 포함하는 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매를 달리하여 상온조건에서 12시간 동안 추출하고, HPLC 분석을 통하여 메칠화카테킨의 추출효율을 비교 검토하였으며, 이렇게 하여 검정된 최적의 추출용매를 사용하면서 저온(4℃) 추출법, 상온(25℃) 추출법, 초음파(40℃) 추출법, 환류(80℃) 추출법 등 추출방법 간 추출효율을 비교 검토하였다.
- [0075] 이하 하기의 표에 있어 추출된 성분들의 함량 옆에 기재된 영문은 통계처리에 대한 결과로서 통계기법 중 단칸 다중검정에 의해 유의성을 표현한 것으로, 영문이 같을 경우 차이가 없다는 것, 예를 들어 A가 가장 함량이 높게 추출된다는 뜻이고, B, C로 내려 갈수록 통계적 차이가 있다는 뜻으로 함량이 통계적 수준에 의해 유의적으로 차이가 난다는 것을 의미한다.
- [0076] 이하의 실시예들에서 사용된 녹차 및 우롱차는 (주)장원에서 차나무 육종계통으로 가공한 것을 구입하여 사용하였다.
- [0077] 실시예 1. 녹차 함유 메칠화카테킨의 대량 추출을 위한 최적의 추출용매 선정
- [0078] 녹차에 함유된 메칠화카테킨을 대량으로 추출할 수 있는 최적의 추출용매를 찾기 위하여, 먼저 녹차에 0.1% 개

미산을 포함한 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매를 달리하여 사용하고, 상온(25℃) 조건에서 12시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 추출용매에 따른 녹차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 도 1 및 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0079]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨	총 카테킨 대비 EGCG-3Me 비율
H <sub>2</sub> O	2.08 E	0.09 A	4.48 AB	42.54 CD	1.72 E	33.54 F	12.78 DE	2.96 AB	5.66 G	105.85 G	1.91
10% EtOH	4.33 D	0.09 A	4.50 A	45.64 ABC	1.75 DE	63.09 E	13.12 CDE	2.32 C	12.56 F	147.40 F	2.94
20% EtOH	5.19 C	0.08 AB	4.52 A	47.02 A	2.01 CDE	73.95 D	14.22 A	2.56 BC	16.21 E	165.75 E	3.13
30% EtOH	5.88 B	0.08 AB	4.52 A	46.70 AB	2.14 CDE	76.39 CD	13.73 ABC	2.63 BC	18.91 D	170.98 DE	3.44
40% EtOH	5.90 B	0.09 A	4.24 AB	44.30 ABCD	2.39 C	80.94 BCD	13.95 AB	3.17 A	19.08 D	174.06 CDE	3.39
50% EtOH	5.91 B	0.08 AB	4.26 AB	44.65 ABC	2.23 CD	82.00 ABCD	13.91 AB	3.23 A	20.11 CD	176.38 BCDE	3.35
60% EtOH	6.29 AB	0.08 AB	4.19 AB	44.82 ABC	2.50 C	84.83 ABC	13.85 ABC	2.85 AB	22.07 ABC	181.48 ABCD	3.47
70% EtOH	6.55 AB	0.07 BC	4.09 B	44.96 ABC	3.08 B	87.95 AB	13.44 BCD	3.07 A	23.10 AB	186.29 ABC	3.52
80% EtOH	6.67 A	0.06 CD	4.28 AB	46.60 AB	4.19 A	90.44 A	12.39 E	2.80 AB	24.16 A	191.60 A	3.48
90% EtOH	6.68 A	0.06 CD	3.56 C	43.71 BCD	4.16 A	90.17 A	12.52 E	3.14 A	23.97 A	187.97 AB	3.55
100% EtOH	6.33 AB	0.05 D	2.75 D	41.35 D	3.12 B	79.86 BCD	11.16 F	2.32 C	21.48 BC	168.40 E	3.75

· 각 추출용매는 0.1% 개미산이 함유된 것임  
 · EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0080]

0.1%의 개미산을 포함한 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매별 녹차에 함유된 카테킨 화합물의 함량을 비교한 결과 도 1 및 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 극성이 높은 증류수보다 에탄올 함량의 증가에 의해 극성이 낮아지는 조건에서 현저히 추출효율이 증가하는 양상을 나타내었다. EGCG-3Me는 80~90% 에탄올에서 가장 높은 추출양상을 나타내었으며, 산술적으로 90% 에탄올 조건에서 6.68mg/g으로 가장 높은 추출율을 나타내었고, 가장 낮은 추출효율은 증류수로 2.08mg/g임을 확인할 수 있었다.

[0081]

한편, GA는 증류수부터 40% 에탄올까지 비교적 극성이 높을수록 추출율이 높아지는 양상을 나타내었으며, 100% 에탄올 수준일 경우 0.05mg/g 수준으로 가장 낮은 추출율을 나타내었다. GC의 경우에는 통계적으로 증류수부터 60% 에탄올까지 추출효율에 차이가 없었으나, 산술적으로 10~30% 에탄올일 경우 약 4.52mg/g 수준으로 가장 높은 추출율을 나타내었고, 100% 에탄올 수준일 경우 2.75mg/g 수준으로 역시 가장 낮은 추출율을 나타내었으므로 역시 GA와 마찬가지로 추출용매의 극성이 높을수록 추출이 높으며, 극성이 낮아지면서 추출율이 감소하는 양상을 나타내었다. EGC의 경우에는 극성이 가장 높은 증류수일 때 추출율이 42.54mg/g 수준으로 다소 낮은 양상을 나타내었고, 통계적으로 10%~80% 에탄올까지 44.30~47.02mg/g 수준으로 추출율의 차이가 인정되지 않았으나, 산술적으로는 20% 에탄올이 가장 높은 양상을 나타내었고, 90% 이상의 에탄올이 함유되어 극성이 극히 낮아질 경우 추출율이 감소하는 양상을 나타냄을 알 수 있었다. 또한, C는 다른 카테킨 화합물과는 달리 증류수로 추출할 경우, 즉 극성이 가장 높을 경우 1.72mg/g 수준으로 추출율이 가장 낮은 양상을 나타내었고, 90% 에탄올까지 추출용액의 극성이 낮아지면 추출율이 현저히 증가되는 양상으로 80% 에탄올 수준에서 가장 높은 추출율로 4.19 mg/g을 나타내었다. EGCG의 경우에는 증류수부터 극성이 낮아지면서 추출율이 현저히 증가하는 양상으로, C와 동일한 양상으로 역시 80~90% 에탄올이 통계적으로 가장 높은 양상을 나타내었으며, 80% 에탄올을 추출용매로 사용할 경우 증류수 추출대비 약 3배 이상 높은 90.44mg/g으로 추출효율이 가장 높았다. EC의 경우 추출용매의 극성차이에 따른 추출율의 큰 변화 및 일정 경향성은 없으나, 20% 에탄올 추출이 통계적으로 가장 높은 양상을

나타내어 14.22mg/g을 나타내었고, 20%~60% 에탄올까지 통계적 차이가 인정되지 않았고, 100% 에탄올로 추출할 경우 11.16mg/g으로 가장 낮은 추출율을 나타내었다. 또한, GCG의 경우에는 추출용매의 극성이 높을 때보다 극성이 낮은 용매조건에서 추출율이 높은 양상을 나타내었으며, 50% 에탄올 조건에서 3.23mg/g으로 가장 높은 양상을 나타내었고, 역시 100% 에탄올로 추출한 경우 2.32mg/g으로 가장 낮은 추출효율을 나타냄을 확인할 수 있었다. ECG의 경우에는 80% 에탄올 조건에서 24.16mg/g으로 가장 높은 추출율을 나타내었고, 가장 낮은 추출효율은 증류수로 5.66mg/g을 나타내었다. 총 카테킨 함량 역시 추출용매 중 에탄올의 함량 증가에 의해 극성이 낮아짐에 따라 추출효율이 현저히 증가되는 양상이었으며, 에탄올 함량이 60~90%까지 통계적 차이는 인정되지 않았으나, 산술적으로 80% 에탄올 조건이 191.60mg/g으로 가장 추출효율이 높은 양상을 나타내었다.

[0082] 결론적으로, 녹차로부터 메칠화카테킨을 포함하는 여러 종류의 카테킨 화합물을 추출할 경우, 동일한 조건에서 동일한 추출용매를 사용하더라도 추출하고자하는 성분에 따라 추출효율이 상이하게 나타남을 확인할 수 있었으며, 녹차를 추출재료로 하여 메칠화카테킨(EGCG-3Me)만을 최대의 효율로 추출하기 위해서는 에탄올 함량이 60~100% 까지 통계적 차이는 인정되지 않았으나, 산술적으로 에탄올 함량이 80~90% 수준이 추출함량에 대한 효율이 가장 높으므로, 녹차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하기 위한 최적의 추출용매는 0.1% 개미산 함유-90%에탄올을 이용하는 것이 가장 합리적인 것임을 알 수 있었다.

[0083] 실시예 2. 우롱차 함유 메칠화카테킨의 대량 추출을 위한 최적의 추출용매 선정

[0084] 우롱차에 함유된 메칠화카테킨을 대량으로 추출할 수 있는 최적의 추출용매를 찾기 위하여, 먼저 우롱차에 0.1% 개미산을 포함한 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매를 달리하여 사용하고, 상온(25℃) 조건에서 12시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 추출용매에 따른 우롱차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0085]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨	총 카테킨 대비 EGCG-3Me 비율
H <sub>2</sub> O	2.65 E	0.15 A	4.29 A	41.52 BC	3.05 CD	38.59 C	13.03 F	3.70 B	7.29 F	114.28 D	2.32
10% EtOH	3.90 D	0.15 A	4.25 A	42.28 BC	3.54 A	54.52 B	13.80 BCDE	4.10 A	12.91 E	139.45 BC	2.80
20% EtOH	4.34 D	0.14 AB	4.19 A	42.75 BC	3.38 AB	58.62 B	13.27 EF	4.11 A	13.11 DE	143.92 B	3.02
30% EtOH	5.14 C	0.15 A	4.32 A	46.41 A	3.50 A	68.43 A	14.21 ABC	3.96 AB	15.56 BCD	161.68 A	3.18
40% EtOH	6.35 AB	0.13 AB	4.13 AB	44.06 AB	2.78 DE	70.64 A	14.37 AB	3.81 AB	17.05 ABC	163.31 A	3.89
50% EtOH	6.76 AB	0.15 A	3.88 BC	43.31 BC	2.75 E	72.35 A	14.71 A	3.80 AB	17.83 AB	165.54 A	4.09
60% EtOH	6.79 AB	0.11 BC	3.82 C	42.04 BC	2.72 E	72.75 A	14.57 A	3.67 B	18.69 A	165.16 A	4.11
70% EtOH	7.11 A	0.12 AB	3.70 C	41.10 CD	3.11 BC	74.10 A	13.90 BCD	3.68 B	18.70 A	165.53 A	4.30
80% EtOH	6.62 AB	0.11 BC	3.12 D	38.58 DE	3.38 AB	70.71 A	13.67 CDE	3.75 AB	18.29 A	158.23 A	4.18
90% EtOH	6.51 AB	0.11 BC	2.97 D	38.29 E	3.52 A	69.57 A	13.42 DEF	3.88 AB	18.20 A	156.47 A	4.16
100% EtOH	6.13 B	0.08 C	2.02 E	33.63 F	2.36 F	57.96 B	10.44 G	2.24 C	15.09 CDE	129.95 C	4.72

· 각 추출용매는 0.1% 개미산이 함유된 것임  
· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0086] 0.1%의 개미산을 포함한 증류수로부터 100% 에탄올까지 추출용매별 우롱차에 함유된 카테킨 화합물의 함량을 비교한 결과 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 우롱차에 함유된 메칠화카테킨인 EGCG-3Me도 녹차와 동일한 양상으로

에탄올 함량의 증가로 인해 극성이 낮아지면서 추출효율이 높아지는 양상이 두드러짐을 알 수 있었으며, 통계적으로는 40~90% 에탄올 함량 범위에서는 차이가 인정되지 않았으나, 산술적으로 70% 에탄올 조건에서 가장 높은 추출양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0087] 한편, 우롱차의 GA 및 GC는 증류수부터 50% 에탄올 수준까지 극성이 높아짐에 따라 추출효율이 높아지는 양상이었으며, 추출용매 중 에탄올 함량의 증가 즉, 추출용매의 극성이 낮아지면서 현저히 추출효율이 감소하는 양상을 나타내어 녹차와 동일한 양상을 나타냄을 알 수 있었다. 우롱차의 EGC는 80% 에탄올 이상의 극성이 낮을 경우 추출이 현저히 감소하고, 증류수로부터 70% 에탄올까지는 통계적 차이는 인정되지만 큰 함량의 변화 없이 유사한 양상이었으며, 30% 에탄올이 가장 높은 추출양상을 나타내어 이 역시 녹차와 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있었다. 또한, 우롱차에 함유된 C의 경우에는 녹차와는 달리 추출용매에 대한 일정한 경향을 나타내지 않는 양상이었으며, 30% 에탄올까지가 비교적 높은 추출율을 나타내었고, 극성이 낮아지면서 일부 추출율이 낮아지는 양상을 나타내었다. EGCG는 녹차와 유사한 양상으로 극성이 높은 증류수로부터 에탄올 함량의 증가로 인해 극성이 낮아지면서 현저히 증가하는 양상으로 30~90% 에탄올 조건이 추출효율 측면에서 가장 높은 양상을 보였으며, 산술적으로는 70% 에탄올이 가장 높은 추출효율을 나타내었다. 우롱차에 함유된 EC 또한 추출용매의 극성에 따라 큰 차이는 없었으나 에탄올의 함량 범위가 30~60%일 때 산술적으로 가장 높은 양상을 나타내었다. 또한, GCG도 순수 에탄올을 제외하고는 추출용매별 큰 차이는 없으나 10~20% 에탄올에서 가장 높은 추출양상을 나타내었으며, 녹차보다는 다소 낮은 극성이 최대 추출에 적합함을 알 수 있었다. 우롱차의 ECG의 경우에는 극성이 낮아지면서 추출율이 높아지는 양상이 두드러지며 40~90% 에탄올 수준에서는 통계적 차이가 인정되지 않았고, 산술적으로 70% 에탄올에서 가장 높은 추출양상을 나타내었으며, 이 역시 녹차와 유사한 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다. 아울러, 우롱차 함유 총 카테킨 함량은 70% 에탄올까지는 극성이 낮아짐에 따라 추출효율이 소량 증가되는 양상이었으며, 에탄올 함량이 30~90%까지 통계적 차이 없이 유사한 추출효율을 나타내어, 녹차와 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

[0088] 결론적으로, 우롱차로부터 메칠화카테킨을 포함하는 여러 종류의 카테킨 화합물을 추출할 경우, 동일한 조건에서 동일한 추출용매를 사용하더라도 추출하고자하는 성분에 따라 추출효율이 상이하게 나타냄을 확인할 수 있었으며, 우롱차에서 메칠화카테킨(EGCG-3Me)만을 최대의 효율로 추출하기 위해서는 40~90% 에탄올까지 통계적 차이는 인정되지 않았으나, 산술적으로 70% 에탄올이 가장 높은 추출효율을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 녹차의 산술적 최고 조건인 90% 에탄올 수준보다 에탄올의 함량이 다소 낮은 조건이 우롱차에 함유된 메칠화카테킨의 추출에 유리한 것을 나타내는 것이나, 녹차와 동일한 조건에서 추출하는 것이 향후 가공차 종류의 구별 없이 범용적으로 분석할 수 있는 편이성면에서 유리하므로, 녹차 및 우롱차 모두 0.1% 개미산이 함유된 80% 에탄올을 최적의 추출용매로 이용하는 것이 가장 합리적인 것으로 판단되었다.

[0089] 실시예 3. 녹차 함유 메칠화카테킨의 대량 추출을 위한 최적의 추출방법 선정

[0090] 녹차에 함유된 메칠화카테킨만을 대량으로 추출할 수 있는 최적의 추출방법을 찾기 위하여, 상기 실시예 1의 실험결과에 따라 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하면서 저온(4℃) 추출, 상온(25℃) 추출, 초음파(40℃) 추출 및 환류(80℃) 추출법에 따라 추출한 후, 각 추출방법에 따른 추출효율을 비교하여 최적의 추출방법을 선정하였다.

[0091] 1) 저온(4℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0092] 먼저 녹차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 저온(4℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 저온(4℃) 추출 시 추출시간에 따른 녹차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0093]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
0.5h	5.86 D	0.07 AB	3.11 D	38.64 E	2.12 A	74.47 F	11.10 D	2.03 D	19.42 F	156.82 E
1h	6.20 CD	0.06 B	3.22 CD	42.13 D	2.20 A	80.52 E	11.50 D	2.16 CD	20.54 EF	168.52 D
2h	6.46 BC	0.09 A	3.28 BCD	42.15 D	2.19 A	82.71 DE	12.33 C	2.34 BC	21.21 DE	172.77 CD
3h	6.55 BC	0.07 AB	3.58 A	43.11 D	2.02 A	85.58 CDE	12.87 B	2.51 AB	22.12 CDE	178.42 C
6h	6.79 AB	0.07 AB	3.46 AB	43.61 CD	2.06 A	87.53 BCD	12.91 B	2.63 AB	22.73 BCD	181.77 BC
9h	6.96 AB	0.07 AB	3.55 A	45.41 BC	2.05 A	90.47 ABC	13.78 A	2.71 A	23.61 ABC	188.61 AB
12h	7.36 A	0.06 B	3.62 A	45.90 AB	1.64 B	95.06 A	13.86 A	2.49 AB	24.48 A	194.45 A
24h	6.93 AB	0.07 AB	3.43 ABC	45.53 BC	2.29 A	91.98 AB	13.45 A	2.52 AB	23.99 AB	190.20 AB

48h	7.05 AB	0.07 AB	3.56 A	47.52 A	2.10 A	93.53 A	13.71 A	2.56 AB	24.11 AB	194.21 A
-----	---------	---------	--------	---------	--------	---------	---------	---------	----------	----------

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0094] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 녹차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 4℃ 저온 조건에서 6시간 추출 이후부터 통계적 차이가 인정되지 않았고, 산술적으로 가장 높은 함량을 나타낸 추출 시간은 12시간 동안 추출한 것이었으며, 12시간까지 추출시간이 길어질수록 뚜렷히 추출함량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 아울러, 녹차에 가장 많이 함유되어 있는 EGCG 함량과 총 카테킨 함량 면에서도 저온 추출의 경우 12시간 추출이 가장 합리적인 것으로 나타났다.

[0095] 2) 상온(25℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0096] 먼저 녹차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 상온(25℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 상온(25℃) 추출 시 추출시간에 따른 녹차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0097]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
0.5h	6.20 AB	0.06 D	3.30 B	40.88 C	2.30 E	79.87 AB	11.62 E	2.23 D	20.53 A	166.99 BC
1h	6.02 AB	0.07 D	3.38 B	42.06 BC	2.86 CD	81.27 AB	12.16 CDE	2.77 ABC	20.82 A	171.41 ABC
2h	5.72 AB	0.08 CD	3.19 B	42.14 BC	2.77 CD	79.50 AB	12.67 BC	3.06 A	20.27 A	169.40 ABC
3h	6.48 A	0.07 D	3.55 B	46.23 A	2.57 DE	88.40 A	13.51 A	2.85 ABC	22.34 A	186.00 A
6h	6.45 A	0.08 CD	3.55 B	45.41 AB	2.81 CD	87.66 A	13.20 AB	2.97 AB	22.23 A	184.36 AB
9h	6.54 A	0.10 BC	3.44 B	45.57 AB	2.99 C	88.85 A	13.06 AB	2.83 ABC	22.58 A	185.95 A
12h	6.56 A	0.11 B	3.60 B	42.90 ABC	2.85 CD	87.57 A	12.57 BCD	2.51 CD	22.27 A	180.94 AB
24h	6.34 AB	0.08 CD	4.17 A	41.15 C	3.54 B	85.56 AB	11.94 DE	2.47 CD	22.31 A	177.56 AB
48h	5.41 B	0.14 A	4.60 A	34.84 D	5.04 A	75.94 B	10.61 F	2.60 BCD	20.40 A	159.58 C

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0098] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 녹차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 25℃ 상온 조건에서 48시간 추출을 제외하고는 모든 처리의 추출시간에서 통계적 차이가 인정되지 않았으며, 산술적으로 가장 높은 함량을 나타낸 추출 시간은 저온 추출과 마찬가지로 12시간 추출 시 6.56mg/g이었으며, 3시간 이상의 추출이면 추출효율 측면에서 문제가 없을 것임을 알 수 있었다. 한편, 녹차에 다량 함유되어 있는 카페인 및 EGCG, 총 카테킨 함량 면에서도 상온 추출의 경우 3-9시간 추출이 가장 합리적인 것임을 알 수 있었다.

[0099] 3) 초음파(40℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0100] 최근 천연물의 추출 시 작업의 편의성에 의해 활용도가 증대되고 있는 초음파 추출법을 적용하여 40℃ 조건에서 실험하였다. 먼저, 녹차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 초음파(40℃) 조건에서 10분~180분으로 추출시간을 달리하여 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 초음파(40℃) 추출 시 추출시간에 따른 녹차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0101]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
10min	6.04 B	0.05 C	3.58 B	39.96 C	1.94 C	74.51 C	11.48 D	1.83 B	20.02 C	159.42 C
20min	6.71 AB	0.05 C	3.85 AB	46.37 A	2.36 BC	88.91 AB	13.50 AB	2.43 A	23.21 AB	187.39 AB
30min	7.15 A	0.06 BC	4.03 A	47.35 A	2.44 BC	92.89 A	13.69 A	2.41 A	24.49 A	194.50 A
60min	6.73 AB	0.07 B	3.78 AB	46.63 A	2.83 AB	89.29 AB	13.44 ABC	2.58 A	23.18 AB	188.54 AB
90min	6.49 AB	0.07 B	3.67 AB	44.97 A	2.51 ABC	87.28 AB	12.95 C	2.44 A	22.53 B	182.92 AB
120min	6.25 B	0.09 A	3.72 AB	42.08 BC	2.66 AB	84.64 B	13.07 BC	2.61 A	22.17 B	177.27 B
180min	6.54 AB	0.09 A	3.93 AB	44.67 AB	3.13 A	88.51 AB	13.02 BC	2.64 A	22.96 AB	185.49 AB

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0102] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 녹차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 40℃ 초음파 조건에서 20분 추출 이후부터 추출시간에 따른 통계적 차이가 인정되지 않았으며, 산술적으로 30분 추출 시 7.15mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냄을 확인할 수 있었다. 한편, 녹차에 다량 함유되어 있는 카페인 및 EGCG, 총 카테킨 함량 면에서 있어서도 초음파 추출의 경우 30분 추출이 가장 효율적인 것임을 알 수 있었다.

[0103] 4) 환류(80℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0104] 기존 천연물의 추출 시 가장 많이 활용하였고, 선행 연구자들이 녹차 함유 카테킨 추출에 많이 사용한 열수 추출법에 해당하는 80℃ 조건의 환류 추출법을 이용하여 실험하였다. 먼저, 녹차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 환류(80℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 환류(80℃) 추출시 추출시간에 따른 녹차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0105]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
10min	6.66 A	0.07 BC	3.63 A	46.82 AB	2.47 B	88.55 AB	13.21 B	2.63 B	22.81 AB	186.84 AB
20min	6.80 A	0.05 C	3.65 A	48.73 A	2.56 AB	91.94 A	13.75 AB	2.88 AB	23.35 A	193.72 A
30min	6.60 AB	0.07 BC	3.66 A	47.14 AB	2.89 A	90.63 A	13.77 AB	2.90 AB	23.23 AB	190.88 A
60min	6.60 AB	0.06 BC	3.69 A	48.25 A	2.80 AB	90.60 A	14.42 A	2.99 A	23.02 AB	192.43 A
90min	6.68 A	0.07 BC	3.66 A	45.55 AB	2.58 AB	90.33 A	14.18 AB	2.66 AB	23.59 A	189.32 A
120min	6.46 AB	0.08 B	3.65 A	43.69 BC	2.63 AB	88.40 AB	14.51 A	2.84 AB	23.19 AB	185.46 AB
180min	6.03 B	0.10 A	3.56 A	41.67 C	2.84 AB	82.67 B	13.76 AB	2.67 AB	21.36 B	174.66 B

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0106] 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 녹차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 80℃ 환류 조건에서는 추출시간 10분부터 120분까지 추출시간에 따른 통계적 차이가 인정되지 않았고, 추출시간이 120분 이상이면 추출함량이 다소 감소하는 양상을 나타내었으며, 산술적으로 20분 동안 추출할 경우 6.80mg/g 수준으로 가장 높은 함량을 나타냄을 확인할 수 있었다. 한편, 녹차에 다량 함유되어 있는 카페인 및 EGCG, 총 카테킨 함량 면에서도 환류 추출시 20분 추출이 가장 효율적인 것임을 알 수 있었다.

[0107] 또한 도 2에는 녹차 함유 카테킨 화합물의 각 추출방법에 따른 HPLC 크로마토그램을 비교하여 나타내었다.

[0108] 실시예 4. 우롱차 함유 메칠화카테킨의 대량 추출을 위한 최적의 추출방법 선정

[0109] 우롱차에 함유된 메칠화카테킨을 대량으로 추출할 수 있는 최적의 추출방법을 찾기 위하여, 상기 실시예 2의 실험결과에 따라 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하면서 저온(4℃) 추출, 상온(25℃) 추출, 초음파(40℃) 추출 및 환류(80℃) 추출법에 따라 추출한 후, 각 추출방법에 따른 추출효율을 비교하여 최적의 추출방법을 선정하였다.

[0110] 1) 저온(4℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0111] 먼저 우롱차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 저온(4℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 저온(4℃) 추출시 추출시간에 따른 우롱차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0112]

추출용매	EGCG-3Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
0.5h	4.63 A	0.12 A	2.30 D	32.50 C	2.03 B	54.69 BC	10.11 D	2.18 C	13.63 BC	122.19 C
1h	4.62 A	0.08 C	2.61 CD	32.22 C	1.93 B	53.13 C	10.05 D	2.28 C	13.27 C	120.18 C
2h	4.71 A	0.09 BC	2.74 BC	35.20 BC	2.41 A	58.07 ABC	11.06 C	2.72 B	14.43 ABC	131.44 BC

3h	5.26 A	0.10 ABC	2.96 AB	38.89 AB	2.45 A	62.92 AB	11.85 BC	2.85 B	15.29 ABC	142.57 AB
6h	5.10 A	0.10 ABC	2.99 AB	37.93 AB	2.68 A	62.66 AB	12.38 B	3.31 A	15.54 AB	142.68 AB
9h	5.06 A	0.11 AB	3.07 AB	40.92 A	2.75 A	65.01 A	12.80 AB	3.46 A	15.75 AB	148.95 AB
12h	5.02 A	0.10 ABC	3.27 A	41.44 A	2.64 A	65.13 A	12.74 AB	3.44 A	15.65 AB	149.44 AB
24h	5.25 A	0.11 AB	3.16 A	40.63 A	2.73 A	67.40 A	13.59 A	3.55 A	16.53 A	152.96 A
48h	5.28 A	0.12 A	3.22 A	42.13 A	2.50 A	67.56 A	13.37 A	3.38 A	16.46 A	154.03 A

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0113] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 우롱차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 4℃ 저온 조건에서 6시간까지 추출시간이 길어질수록 추출함량이 소량 증가함을 확인할 수 있었으나, 녹차와는 다소 다른 양상을 나타내어 추출시간 간에 통계적 차이가 인정되지 않아, 3시간 이상의 추출이면 추출효율 측면에서 문제가 없을 것임을 알 수 있었다.

[0114] 2) 상온(25℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0115] 먼저 우롱차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 상온(25℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 상온(25℃) 추출 시 추출시간에 따른 우롱차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0116]

추출용매	EGCG-3 Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
0.5h	4.81 ABC	0.12 C	2.63 B	34.49 BCD	2.70 C	57.56 BC	10.66 C	2.54 D	14.31 B	129.82 B
1h	4.56 ABC	0.13 BC	2.68 B	34.56 BCD	3.07 C	58.09 BC	11.06 BC	2.88 CD	14.59 B	131.61 B
2h	4.69 ABC	0.13 BC	2.90 AB	36.96 ABC	2.88 C	62.25 ABC	12.56 A	3.29 BC	15.57 AB	141.23 AB
3h	4.97 AB	0.12 C	3.12 AB	40.70 A	3.67 B	65.91 AB	13.05 A	3.83 A	16.36 AB	151.74 A
6h	5.11 A	0.17 A	2.86 AB	40.64 A	3.74 B	68.22 A	12.83 A	3.73 AB	16.96 A	154.26 A
9h	4.58 ABC	0.16 AB	3.08 AB	37.82 AB	3.84 B	63.36 ABC	12.75 A	3.73 AB	15.88 AB	145.21 AB
12h	4.33 ABC	0.12 C	3.39 A	37.48 ABC	4.06 B	61.11 ABC	12.53 A	3.71 AB	15.53 AB	142.26 AB
24h	3.83 C	0.15 ABC	3.28 A	33.28 CD	4.83 A	55.34 C	11.66 B	3.89 A	14.30 B	130.57 B
48h	4.05 BC	0.18 A	3.27 A	31.89 D	5.05 A	57.25 BC	10.97 C	3.48 AB	14.86 AB	131.00 B

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0117] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 우롱차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 25℃ 상온 조건에서 6시간까지 추출시간이 길어질수록 추출함량이 소량 증가함을 확인할 수 있었으나, 이후 추출시간이 길어질수록 함량이 현저히 감소되는 양상을 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 상온 추출 시 녹차와는 다소 다른 경향을 나타내는 것으로, 우롱차의 경우 6시간 추출이 가장 합리적일 것임을 알 수 있었다.

[0118] 3) 초음파(40℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0119] 최근 천연물의 추출 시 작업의 편의성에 의해 활용도가 증대되고 있는 초음파 추출법을 적용하여 40℃ 조건에서 실험하였다. 먼저, 우롱차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 초음파(40℃) 조건에서 10분~180분으로 추출시간을 달리하여 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 초음파(40℃) 추출 시 추출시간에 따른 우롱차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0120]

추출 용매	EGCG-3 Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
10min	5.71 A	0.10 D	3.35 AB	41.16 AB	3.19 B	68.61 A	12.11 C	2.73 D	17.04 A	154.01 A
20min	5.61 A	0.11 D	3.14 ABC	42.40 AB	3.44 AB	70.17 A	12.83 B	3.04 CD	17.61 A	158.35 A
30min	5.67 A	0.11 D	3.41 A	43.37 A	3.45 AB	71.75 A	13.30 AB	3.22 C	18.02 A	162.30 A
60min	5.61 A	0.13 C	3.35 AB	43.18 A	3.63 AB	72.31 A	13.23 AB	3.36 BC	18.38 A	163.18 A
90min	5.67 A	0.13 C	3.06 BC	42.18 AB	3.41 AB	72.21 A	13.04 AB	3.32 BC	18.21 A	161.22 A
120min	5.09 A	0.16 B	2.96 C	39.88 B	3.42 AB	68.30 A	13.53 A	3.81 A	17.48 A	154.64 A
180min	5.44 A	0.19 A	3.11 ABC	41.00 AB	3.74 A	70.90 A	13.40 A	3.71 AB	18.08 A	159.57 A

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0121]

상기 표 9에 나타난 바와 같이, 우롱차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 40℃ 초음파 조건에서 추출 시 모든 추출시간에서 통계적 차이가 인정되지 않았고, 산술적으로 10분간 추출한 경우 5.71mg/g으로 가장 높은 추출효율을 나타내었으며, 초음파 추출의 경우 10분만의 추출로도 충분한 추출효율을 나타낼 것임을 확인하였다. 한편, 카페인, EGCG 및 총 카테킨 함량 면에서는 최적의 추출조건이 60분 수준이 적합함을 알 수 있었다.

[0122]

4) 환류(80℃) 추출시 추출시간에 따른 추출효율 비교

[0123]

기존 천연물의 추출 시 가장 많이 활용하였고, 선행 연구자들이 차 함유 카테킨 추출에 많이 사용한 열수 추출법에 해당하는 80℃ 조건의 환류 추출법을 이용하여 실험하였다. 먼저, 우롱차에 0.1% 개미산을 포함한 80% 에탄올을 추출용매로 사용하여 환류(80℃) 조건에서 48시간 동안 추출한 다음, HPLC 분석에 의해 환류(80℃) 추출시 추출시간에 따른 우롱차 함유 메칠화카테킨을 포함한 카테킨 화합물의 함량을 비교하고, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0124]

추출 용매	EGCG-3 Me	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	총 카테킨
10min	5.38 A	0.10 D	3.23 A	42.13 A	2.87 C	67.66 A	12.94 D	3.26 B	16.55 A	154.12 A
20min	5.18 A	0.14 B	3.30 A	42.86 A	3.30 BC	68.21 A	13.59 C	3.66 AB	16.86 A	157.11 A
30min	5.06 A	0.12 BCD	3.28 A	41.97 A	3.74 AB	67.16 A	13.54 C	3.84 A	16.68 A	155.40 A
60min	4.78 A	0.11 CD	3.39 A	41.13 A	3.61 AB	64.53 A	14.02 B	3.95 A	15.95 A	151.47 A
90min	4.91 A	0.12 BCD	3.28 A	40.74 A	3.69 AB	65.60 A	14.08 B	3.60 AB	16.25 A	152.27 A
120min	5.15 A	0.13 BC	3.37 A	40.97 A	3.14 C	69.45 A	14.91 A	3.68 AB	17.42 A	158.22 A
180min	5.22 A	0.18 A	3.44 A	40.66 A	4.03 A	68.91 A	14.52 A	3.59 AB	17.70 A	158.24 A

· EGCG-3Me: 메칠화카테킨, GA: 갈릭 에시드, GC: 갈로카테킨, EGC: 에피갈로카테킨, C: 카테킨, EGCG: 에피갈로카테킨갈레이트, EC: 에피카테킨, GCG: 갈로카테킨갈레이트, ECG: 에피카테킨갈레이트

[0125]

상기 표 10에 나타난 바와 같이, 우롱차 메칠화카테킨인 EGCG-3Me는 80℃ 환류 조건에서는 조사된 추출시간 전 분야에서 통계적 차이가 인정되지 않았고, 산술적으로 10분간 추출한 경우 5.38mg/g으로 가장 높은 추출효율을 나타내었으며, 환류추출 역시 초음파 추출의 경우와 동일하게 10분만의 추출로도 충분한 추출효율을 나타낼 것임을 확인할 수 있었다.

[0126]

상기 실시예 3 및 4에서 실험한 바와 같이 각 조건의 추출방법별로 녹차 및 우롱차 함유 메칠화카테킨의 추출함량이 산술적으로 가장 우수하였던 각 추출방법별 결과를 통계적으로 상호 비교하여 하기 표 11에 나타내었다.

표 11

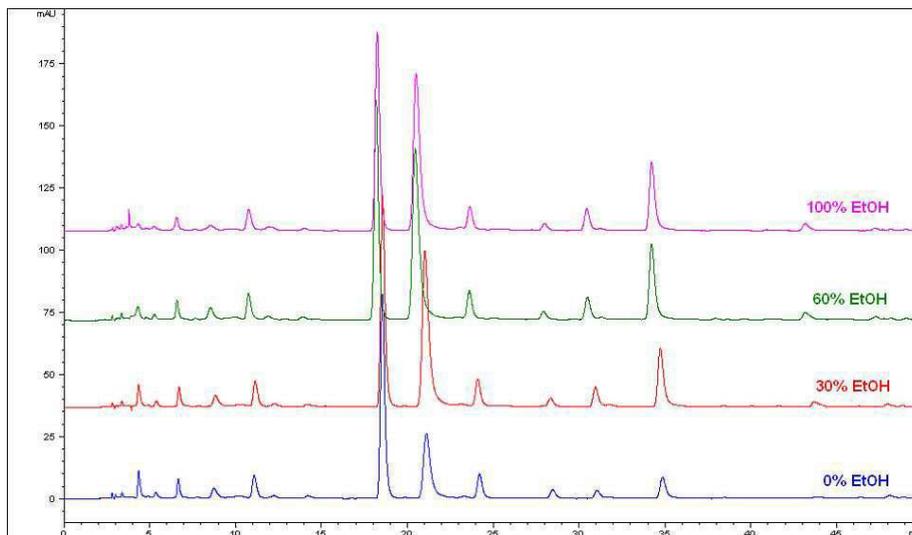
[0127]

추출방법	녹차	우롱차
저온(4℃) 추출	12h, 7.36 A mg/g	48h, 5.28 A mg/g
상온(25℃) 추출	12h, 6.56 C mg/g	6h, 5.11 A mg/g
초음파(40℃) 추출	30min, 7.15 AB mg/g	10min, 5.71 A mg/g
환류(80℃) 추출	20min, 6.80 BC mg/g	10min, 5.38 A mg/g

- [0128] 상기 표 11에 나타낸 바와 같이, 녹차의 경우 저온(4℃) 조건에서 12시간 동안 추출한 경우 7.36mg/g으로 조사된 모든 추출방법 중 가장 우수한 추출효율을 나타내었으며, 산술적으로 함량이 다소 낮으나 통계적으로 차이가 없는 초음파(40℃) 조건에서 30분간 추출할 경우에도 추출의 편이성 측면에서는 우수한 방법으로 판단되었다. 또한, 우롱차의 경우에는 녹차와는 다소 다른 양상으로 각 추출방법별 최적의 추출시간별 함량 간에 통계적 차이가 인정되지 않았으며, 산술적으로 초음파(40℃) 조건에서 10분간 추출한 경우 가장 우수한 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다. 전반적인 함량을 고려해볼 때, 녹차가 우롱차 대비 메칠화카테킨인 EGCG-3Me의 함량이 다소 높음을 알 수 있었다.
- [0129] 이상과 같은 결과를 통하여, 녹차 및 우롱차로부터 메칠화카테킨을 대량으로 추출하기 위해서는 0.1% 개미산을 포함하는 70~90% 에탄올을 추출용매로 이용하고, 녹차의 경우에는 저온(4℃) 조건에서 12시간 동안 추출하거나, 초음파(40℃) 조건에서 30분간 추출하는 것이 추출효율 측면에 있어 가장 바람직하며, 우롱차의 경우에는 초음파(40℃) 조건에서 10분간 추출하는 것이 추출효율 측면에 있어 가장 바람직할 것임을 알 수 있었다.
- [0130] 전술한 바와 같이, 차나무 잎, 녹차 또는 우롱차로부터 메칠화카테킨을 포함하는 여러 종류의 카테킨 화합물을 추출할 경우, 동일한 조건에서 동일한 추출용매를 사용하거나, 동일한 추출용매를 사용하여 동일한 추출방법과 시간에 따라 추출한다하더라도 추출하고자 하는 성분에 따라 추출효율이 각각 상이하게 나타남을 확인할 수 있었으며, 이같은 결과를 통하여 본 발명에서 메칠화카테킨의 추출에 기존 알려진 추출용매와 추출방법을 적용하였다 하더라도 녹차 및 우롱차로부터 메칠화카테킨만을 대량 추출하기 위한 최적의 추출방법에 대한 연구는 이전까지는 전무하였으며, 특히 대량으로 메칠화카테킨을 얻을 수 있는 방법에 대한 것은 어디에도 찾아볼 수 없는 기술이므로, 본 발명은 전혀 예기치 못한 기술임은 자명한 것이다.
- [0131] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

**도면**

**도면1**



도면2

