



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 921 T2** 2007.09.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 077 211 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 921.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 117 410.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **11.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **22.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07D 311/62** (2006.01)  
**A23F 3/20** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**99116032**      **16.08.1999**      **EP**

(73) Patentinhaber:  
**DSM IP Assets B.V., TE Heerlen, NL**

(74) Vertreter:  
**Lederer & Keller, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**Burdick, David Carl, 4102 Binningen, CH; Egger,  
Heinz, 8006 Zürich, CH; Gum, Andrew George,  
4055 Basle, CH; Koschinski, Ingo, 79761  
Waldshut-Tiengen, DE; Muelchi, Elena, 4142  
Münchenstein, CH; Prevot-Halter, Isabelle, 68300  
St. Louis, FR**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zu Herstellung von Epigallocatechin Gallate**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von (-)-Epigallocatechin-Gallat (EGCG). Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf ein Verfahren zur Herstellung von EGCG durch Trennung von Teecatechinen, was die Behandlung mit einem makroporösen polaren Harz involviert.

**[0002]** Blätter der Grünteepflanze *camellia sinensis* enthalten bis zu 36 % Polyphenole auf Trockengewichtsbasis, jedoch variiert ihre Zusammensetzung mit dem Klima, der Jahreszeit, der Vielfalt und dem Zustand der Reife. Grüntee catechine sind die vorherrschende Gruppe der Grüntee polyphenole. Beispiele von Catechinen sind (-)-Epicatechin (EC), (-)-Epigallocatechin-Gallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC) und Epicatechin-Gallat (ECG).

**[0003]** EGCG ist die interessanteste Verbindung unter den oben erwähnten Catechinen, da es eine starke oxidationshemmende Wirkung zeigt. Außerdem ist demonstriert worden, daß EGCG eine antimutagene Wirkung, eine antibakterielle Wirkung und ebenso eine vorteilhafte Wirkung auf den Cholesterinspiegel im Blut aufweist. Die anderen Catechine, die im Tee vorliegen, sind weniger wirksam. Grüntee enthält ebenso andere Komponenten, wie Koffein, Proteine, Pektine und/oder Metallionen, die nicht wünschenswert sein können.

**[0004]** Es gibt daher eine Notwendigkeit, EGCG in reiner Form in hoher Ausbeute durch ein einfaches und ökonomisches Verfahren zu isolieren. Jedoch machen die strukturellen Ähnlichkeiten der verschiedenen Teecatechine die Trennung der einzelnen Catechine schwierig. Außerdem werden die Catechine im Tee normalerweise von Koffein begleitet, das in einer Menge von bis zu 4 % der Trockenmasse der Grünteeblätter vorliegt. Koffein ist für die Assoziation mit den Catechinen bekannt, und es ist nicht einfach zu entfernen.

**[0005]** Die Herstellung von Grünteeextrakten ist in der Technik allgemein bekannt. US-Patent Nr. 5,879,733 beschreibt die Herstellung eines Grünteeextraktes mit verbesserter Klarheit und Farbe. Der Teeextrakt wird durch Behandeln des Grünteeextraktes bei einer Temperatur zwischen 25°C und 60°C mit einer Menge eines Kationenaustauschharzes mit Lebensmittelqualität, das zur Entfernung von Metallkationen, die in dem Extrakt vorliegen, wirksam ist, erhalten. Der behandelte Extrakt wird dann mit einer Nanofiltrationsmembran kontaktiert. Jedoch ist das Verfahren, das in US 5,879,733 beschrieben wird, nicht geeignet, EGCG aus einem Gemisch aus Teecatechinen zu trennen.

**[0006]** US-Patent Nr. 4,613,672 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von reinem EGCG, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt: Teeblätter werden mit heißem Wasser oder mit wässrigen Lösungen aus 40 bis 75 % Methanol, 40 bis 75 % Ethanol oder 30 bis 80 % Aceton extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird mit Chloroform gewaschen und der gewaschene Extrakt wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Das organische Lösungsmittel wird abdestilliert und die konzentrierte Extraktkomponente wird der Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie unter Verwendung einer Umkehrphasen-Verteilungstrennsäule mit einem Entwickler aus Aceton/Tetrahydrofuran/Wasser (0 bis 25 : 0 bis 35 : 65 bis 85 Vol-%) unterzogen, wobei jedes von (-)Epicatechin, (-)Epigallocatechin, (-)Epicatechin-Gallat und (-)Epigallocatechin-Gallat voneinander isoliert wird. Das Verfahren, das in US-Patent Nr. 4,613,672 beschrieben wird, ermöglicht keine ökonomische Herstellung von EGCG in einem technischen Maßstab aufgrund der Verwendung von teuren Säulenfüllungen. Außerdem ermöglicht das Verfahren, das in US-Patent Nr. 4,613,672 beschrieben wird, keine Herstellung von EGCG, das zu Lebensmittelprodukten zugegeben werden kann, da die verwendeten Lösungsmittelgemische (Aceton/Tetrahydrofuran/Chloroform) nicht lebensmittelgeprüft sind.

**[0007]** Chemical Abstracts, Bd. 111, Nr. 17, 1989, Abstract Nr. 6208f offenbart eine präparative chromatographische Trennung von Grüntee catechinen unter Verwendung einer Sephadex-LH-20-Säule.

**[0008]** Ein chromatographisches Verfahren zur Trennung einzelner Catechine aus Grüntee unter Verwendung einer Sephadex-LH-20-Säule wird ebenso in R. Amarowicz et al., Food Research Int., Bd. 29, Nr. 1, S. 71 bis 76, 1996 offenbart.

**[0009]** Während die Technik die Herstellung von Catechinen als Gemische beschreibt, besteht noch eine Notwendigkeit für ein einfaches, sicheres und ökonomisches Verfahren zur Herstellung von EGCG in gereinigter Form zur Einbringung als ein Inhaltsstoff in Ergänzungen und Nahrungsmitteln.

**[0010]** Es ist nun herausgefunden worden, daß EGCG aus einem Gemisch aus Teecatechinen und/oder Koffein mit verbesserter Selektivität abgetrennt werden kann, wenn die Trennung unter Verwendung eines makroporösen polaren Harzes und eines geeigneten polaren Elutionslösungsmittels durchgeführt wird.

**[0011]** Daher ist die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung von Epigallocatechin-Gallat (EGCG) gerichtet, welches die Schritte umfaßt:

- a) Bereitstellen eines Grünteeextraktes;
- b) Unterziehen des Grünteeextraktes einer Chromatographie auf einem makroporösen polaren Harz, das allgemein zur Adsorption oder Chromatographie bei einer Temperatur zwischen etwa 10 °C und etwa 80 °C verwendet wird, wobei das makroporöse polare Harz aus der Gruppe, bestehend aus Acrylharzen, Polyamiden, Polyvinylpyrrolidon P 6755 und aromatischen Polyamiden und Polyestern, ausgewählt wird;
- c) Eluieren von EGCG aus dem makroporösen polaren Harz mit einem polaren Elutionslösungsmittel bei einer Temperatur zwischen etwa 10°C und etwa 80°C und bei einem Druck zwischen etwa 0,1 bar und etwa 50 bar;
- d) gegebenenfalls Konzentrieren des Eluats von Schritt c);
- e) gegebenenfalls Regenerieren des makroporösen polaren Harzes durch Desorbieren der übrigen Catechine; und
- f) gegebenenfalls Konzentrieren der desorbierten Catechine von Schritt e).

**[0012]** Die Herstellung des Grünteeextraktes, das als Ausgangsmaterial verwendet wird, ist in der Technik allgemein bekannt. Beispielsweise werden Grünteeblätter typischerweise mit heißem oder kaltem Wasser extrahiert, um eine Lösung zu bilden, die Teecatechine und Koffein enthält. Diese Grünteeelösung kann außerdem konzentriert werden, um entweder eine konzentrierte Extraktlösung oder ein Trockenpulver zu bilden. Die Extraktlösung oder das Pulver kann Stabilisatoren, wie lebensmittelgeprüfte Säuren, beispielsweise Zitronensäure, Ascorbinsäure, Isoascorbinsäure und dergleichen, enthalten.

**[0013]** Teeextraktpulver sind ebenso kommerziell erhältlich, beispielsweise von Guizhou Highyin Biological Product Co., Guiyang, P. R. China oder Zhejiang Zhongke Plant Technical Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang, P. R. China.

**[0014]** Die Trennung von EGCG wird typischerweise durch Unterziehen des Grünteeextraktes einer Säule, die mit makroporösem polarem Harz gefüllt ist, durchgeführt.

**[0015]** Wie hierin verwendet, bezieht sich „makroporöse polare Harze“ auf Acrylharze, wie Polyacrylate, beispielsweise AMBERLITE®XAD-7, erhältlich von Rohm and Haas, Philadelphia, Pa., oder Polymethacrylate, wie beispielsweise AMBERCHROM®CG-71, erhältlich von Toso Haas, oder DIAION HP 2MG, erhältlich von Mitsubishi Chem. Corp., Philadelphia, Pa; oder Polyamide, wie Polyamide 11, erhältlich von Merck, Darmstadt, Deutschland, Polyamide 6 und Nylon 6,6, erhältlich von Fluka, Buchs, Schweiz (Katalog Nr. 02395 bzw. 74712); Polyamide 12 (Grilamid L 25 Natur), erhältlich von EMS Chemie, Domat, Schweiz; oder Polyvinylpyrrolidon P 6755, erhältlich von Sigma; oder aromatische Polyamide und Polyester.

**[0016]** Das Harz wird vorzugsweise entgast und mit dem Elutionslösungsmittel äquilibriert verwendet.

**[0017]** Das Verfahren gemäß der Erfindung wird bei Temperaturen zwischen etwa 10 °C und etwa 80 °C, vorzugsweise etwa 40 °C und etwa 60 °C durchgeführt. Die Thermostatregelung kann beispielsweise durch das Platzieren der Säule in einen thermostategesteuerten Bereich, beispielsweise einen Heizmantel, stattfinden.

**[0018]** Der hydraulische Druck, unter dem die mobile Phase durch die Säule durchgeleitet wird, kann innerhalb weiter Grenzen variieren. Die mobile Phase wird vorzugsweise durch die Säule bei einem Druck von etwa 0,1 bar bis etwa 50 bar, vorzugsweise bei etwa 0,1 bar bis etwa 20 bar, stärker bevorzugt bei etwa 0,1 bar bis etwa 10 bar gepumpt.

**[0019]** Die mobile Phase umfaßt ein polares Elutionslösungsmittel, welches ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel ist. Wie hierin verwendet, bezieht sich das „organische Lösungsmittel“ auf Alkohole, wie Methanol, Ethanol, Isopropanol und dergleichen, und Ketone, wie beispielsweise Aceton oder Ester, wie Ethylacetat oder Gemische davon. Die Verwendung von Alkoholen mit Lebensmittelqualität, wie Ethanol und Isopropanol, ist bevorzugt. Besonders gute Ergebnisse werden erhalten, wenn eine mobile Phase, die ein Gemisch aus etwa 70 bis etwa 95 Vol-%, vorzugsweise etwa 90 Vol-%, Wasser und etwa 5 bis etwa 30 Vol-%, vorzugsweise etwa 10 Vol-%, organischen Lösungsmittel umfaßt, verwendet wird. Es ist vorteilhaft, die mobile Phase zu entgasen und sie unter einer inerten Atmosphäre, wie beispielsweise Stickstoff oder Argon, zu halten.

**[0020]** Die Säule wird mit der mobilen Phase konditioniert. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule kann innerhalb weiter Grenzen variieren. Die Fließgeschwindigkeit liegt zwischen etwa 0,5 und etwa

20 Bettvolumen/h, vorzugsweise etwa 0,5 und etwa 10 Bettvolumen/h, stärker bevorzugt etwa 0,8 und etwa 5 Bettvolumen/h. (1 Bettvolumen entspricht 1 m<sup>3</sup> Lösung oder Lösungsmittel pro m<sup>3</sup> Harz).

**[0021]** Nachdem das Gleichgewicht zwischen den stationären und mobilen Phasen hergestellt worden ist, wird die Teeextraktlösung in die mobile Phase eingebracht, wodurch der Grünteeextrakt einer Chromatographie auf dem makroporösen polaren Harz unterzogen wird. Wenn ein Grünteeextraktpulver als das Ausgangsmaterial verwendet wird, wird das Pulver in der mobilen Phase gelöst. Wenn ein wässriger Grünteeextrakt verwendet wird, ist es vorteilhaft, das Verhältnis von Wasser zu dem organischen Lösungsmittel in dem Extrakt zu dem der mobilen Phase durch Zugeben von organischem Lösungsmittel einzustellen.

**[0022]** Ein Schlüsselaspekt der vorliegenden Erfindung ist, den Grünteeextrakt mit einem makroporösen polaren Harz bei Temperaturen zwischen etwa 10 °C und etwa 80 °C, vorzugsweise bei etwa 40 °C und etwa 60 °C zu behandeln und EGCG mit einem polaren Elutionslösungsmittel zu eluieren. Dieses spezielle Wechselspiel der drei Merkmale von Harz, Elutionsmittel und Temperatur bildet einen wichtigen Aspekt der vorliegenden Erfindung und führt zu einer speziellen Trennung von EGCG aus einem Gemisch aus Teecatechinen und/oder Koffein, wodurch nach der Elution eine EGCG-Fraktion erhalten wird, die mindestens 75 %, vorzugsweise mehr als 85 %, stärker bevorzugt etwa 90 % bis etwa 97 %, EGCG enthält, berechnet in bezug auf die Gesamtmenge der Catechine, die in dem Extrakt oder Konzentrat vorliegen.

**[0023]** Die Fähigkeit des makroporösen polaren Harzes, Koffein, EGCG und die übrigen Catechine zu absorbieren, ist ebenso in Abhängigkeit des verwendeten Elutionsmittels und der Temperatur unterschiedlich. Die Affinität für Koffein ist geringer als die von EGCG, wodurch Koffein, wenn vorhanden, zunächst eluiert wird, und abgetrennt werden kann. Wenn geeignet, ist es ebenso möglich, dadurch Koffein in einer gereinigten Form zurückzuführen, was ebenso ein ökonomischer Vorteil sein könnte. Eine zweite Fraktion wird isoliert, in der das EGCG vorliegt. Die übrigen Teecatechine zeigen eine stärkere Affinität als die von EGCG, wodurch sie absorbiert bleiben, bis das Harz unter Verwendung eines Lösungsmittels, das zur Desorbierung der übrigen Catechine fähig ist, regeneriert wird. Beispielsweise können die übrigen Catechine durch Eluieren mit einem reinen organischen Lösungsmittel oder durch Verändern des Verhältnisses von Wasser zu organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase desorbiert werden. Ein geeignetes Regenerierungslösungsmittel ist beispielsweise ein reines organisches Lösungsmittel oder ein Gemisch aus etwa 10 Vol-% bis etwa 60 Vol-% Wasser und etwa 40 Vol-% bis etwa 90 Vol-% organisches Lösungsmittel, vorzugsweise etwa 40 Vol-% Wasser und etwa 60 Vol-% organisches Lösungsmittel.

**[0024]** Die Konzentration des EGCGs in dem Eluat kann durch in der Technik allgemein bekannten Verfahren, beispielsweise durch Verdampfen, durchgeführt werden. Das EGCG-Eluat kann zur Trockne eingedampft werden, um ein Pulver zu bilden, das EGCG in hoher Reinheit enthält, oder konzentriert werden, um die Kristallisierung zu ermöglichen. Die Konzentration kann durch Zugeben eines Stabilisators zu dem Eluat, wie eine Lebensmittelgeprüfte Säure, beispielsweise Zitronensäure, Ascorbinsäure, Isoascorbinsäure und dergleichen, durchgeführt werden. Die Säure wird vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,1 bis etwa 2,5 % in bezug auf EGCG zugegeben.

**[0025]** Die Vorfraktion, die Koffein enthält, und die Fraktion von Schritt e), die die übrigen Catechine enthält, können, wie oben beschrieben, konzentriert werden.

**[0026]** Das Verfahren kann unter Verwendung einer einzelnen Säule oder einem System von mehreren Chromatographiesäulen durchgeführt werden. Das Verfahren kann ebenso unter Verwendung von Technologien, auf die man sich in der Technik als „simulierte Bewegtbettchromatographie“ oder „Ringchromatographie“ bezieht, durchgeführt werden.

**[0027]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann mit einfachen und ökonomischen Betriebsweisen durchgeführt werden und ist daher auf eine Großproduktion in bezug auf die Ausbeute und Handhabung anwendbar.

**[0028]** EGCG, das, wie oben beschrieben, hergestellt wurde, verfügt über eine starke oxidationshemmende Aktivität und kann daher als ein Antioxidationsmittel für verschiedene Nahrungsmittel, Kosmetika, Öle und so weiter verwendet werden. Außerdem weist EGCG eine antimutagene Wirkung, eine antibakterielle Wirkung und ebenso eine vorteilhafte Wirkung auf den Cholesterinspiegel im Blut auf. Daher sind Konzentrate oder reines EGCG in Gesundheitspräparaten von Nutzen.

**[0029]** Die vorliegende Erfindung wird in bezug auf die folgenden Beispiele ausführlicher dargestellt.

## Beispiel 1: Trennung von EGCG

**[0030]** Ein Grünteeextrakt, der die unterschiedlichen Catechine und Koffein enthält (hergestellt von Guizhou Highyin Biological Products Co., Guiyang, China als „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“), wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Die Konzentration der Teekomponenten wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% ausgedrückt. Der Gehalt an EGCG, Koffein, anderen Catechinen sowie Gallussäure wird in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1 Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial

Verbindung	Teextrakt Beispiel 1 HPLC/Gew.-%	Teextrakt Beispiel 1 relativer Prozentsatz/%
Gallussäure	0,01	0,0
Catechin	2,3	3,2
Koffein	11,0	15,1
EGCG	38,1	52,3
Epicatechin	5,2	7,1
GCG	6,6	9,1
ECG	9,7	13,3
Gesamt	72,9	100,0

**[0031]** 33,5 l (26 kg) Amberlite®XAD-7-Harz mit einer Teilchengröße von 0,3 bis 1,2 mm wurden in eine Säule im halbtechnischen Maßstab mit einem Innendurchmesser von 150 mm, einer Länge von 2 m und einem Volumen von 35,4 l gefüllt. Die Säule wurde mit einem Heizmantel ausgestattet. Das Harz wurde gründlich mit Wasser gewaschen und mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) äquilibriert. Das Gerät und die Lösungsmittel, die verwendet wurden, wurden entgast und unter einer Atmosphäre von inertem Stickstoff vor der Verwendung gehalten.

**[0032]** Die gefüllte Säule wurde auf 60 °C thermostatiert. 0,4 kg des obigen Grünteeextraktes (Tabelle 1), das 152,5 g reines EGCG enthält, wurden in 1,8 kg eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst und auf die Spitze der Säule aufgebracht. EGCG wurde aus der Säule mittels einer Pumpe unter einem Druck von 0,5 bar und einer Temperatur von 60 °C mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 50 kg/h eluiert. Nach einem anfänglichen Eluat von 144 kg (Vorfraktion) wurde ein Haupteluat von 174 kg gesammelt, das 112 g EGCG als die Hauptpolyphenolkomponente enthält. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,064 %. Die Ausbeute des abgetrennten EGCG, ausgehend von 152,5 g EGCG, in dem Teextrakt betrug 73,5 %.

**[0033]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 78,3 kg eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) desorbiert. Vor der nächsten Trennung wurde die Säule mit 86 kg eines Gemische aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) in Rückspülweise bei einer Fließgeschwindigkeit von 120 kg/h konditioniert.

**[0034]** Tabelle 2 stellt die Trennungswirkung dar, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Haupteluat wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 2 Konzentration der Teekomponenten in dem Haupteluat

Verbindung	Hauptfraktion Beispiel 1 HPLC/ppm	relativer Prozentsatz/%
Gallussäure	0	0,0
Catechin	21	3,0
Koffein	1	0,1
EGCG	644	92,1
Epicatechin	29	4,1
GCG	3	0,4
ECG	1	0,1
Gesamt	699	100,0

## Beispiel 2

**[0035]** Beispiel 1 wurde unter Verwendung einer anderen Charge des „Grünteeextrakts, min. 95 % Polyphenol“ von Guizhou Highyin Biological Products Co., der zusammengesetzt, wie in Tabelle 3 gezeigt, war, wiederholt.

Tabelle 3 Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial

Verbindung	Teeextrakt Beispiel 2 HPLC/Gew.-%	Teeextrakt Beispiel 2 relativer Prozentsatz/%
Gallussäure	0,1	0,1
Catechin	1,4	1,9
Koffein	13,8	18,8
EGCG	35,1	47,9
Epicatechin	3,3	4,5
GCG	8,2	11,2
ECG	11,4	15,6
Gesamt	73,2	100,0

**[0036]** Die gewaschene Säule von Beispiel 1 wurde auf 60 °C thermostatiert und verwendet, um die Trennung durchzuführen. 0,4 kg des obigen Grünteeextraktes (Tabelle 3), der 140,5 g reines EGCG enthält, wurden in 1,8 kg eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst und auf die Spitze der Säule aufgebracht. Die Säule wurde dann eluiert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Nach einem anfänglichen Eluat von 200 kg (Vorfraktion) wurde ein Haupteluat von 117 kg gesammelt, das 72,8 g EGCG als die Hauptpolyphenolkomponente enthält. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,062 %. Die Ausbeute des getrennten EGCG, ausgehend von 140,5 g EGCG, in dem Teeextrakt betrug 51,8 %.

**[0037]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 100 kg eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) desorbiert. Vor dem nächsten Trennungsschritt wurde die Säule mit 100 kg eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) in Rückspülweise bei einer Fließgeschwindigkeit von 120 kg/h konditioniert.

**[0038]** Tabelle 4 stellt die Trennungswirkung dar, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Haupteluat wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extink-

tion bestimmt und in ppm ausgedrückt. Im Vergleich zu Beispiel 1 wurde EGCG in einem höheren Prozentsatz erhalten.

Tabelle 4 Konzentration von Teekomponenten in dem Haupteluat

Verbindung	Hauptfraktion Beispiel 2 HPLC/Gew.-%	relativer Prozentsatz/%
Gallussäure	0	0,0
Catechin	10	1,6
Koffein	1	0,2
EGCG	622	96,4
Epicatechin	2	0,3
GCG	6	0,9
ECG	4	0,6
Summe	645	100,0

Beispiel 3: Konzentration des Eluats

**[0039]** 9008 kg des Eluats der Adsorptions/Desorptions-Säule, hergestellt durch wiederholte Durchläufe, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden durch die Zugabe von 2 % Zitronensäure stabilisiert, berechnet in bezug auf die EGCG-Menge. Das Eluat wurde bei einer Temperatur von 40 °C und einem Druck von 55 mbar unter Verwendung eines Fallfilmverdampfers aus Edelstahl mit einer Wärmeaustauschoberfläche von 1,1 m<sup>2</sup> konzentriert. Die Menge an Catechinen und Koffein der Beschickungslösung, die der Verdampfungseinheit unterzogen wird, wird in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5 Konzentration der Teekomponenten in der gereinigten EGCG-Lösung, die der Verdampfung unterzogen wird

Verbindung	Beschickungs- Fallfilmverdampfer HPLC/ppm	relativer Prozentsatz/%
Gallussäure	0	0,0
Catechin	10	1,4
Koffein	1	0,1
EGCG	712	96,2
Epicatechin	7	0,9
GCG	7	0,9
ECG	3	0,4
Gesamt	740	100,0

**[0040]** Der Beschickungsfluß zu dem Verdampfer wurde zu einer Fließgeschwindigkeit zwischen 120 kg/h und 130 kg/h bei einer Kreislauffließgeschwindigkeit von 300 kg/h reguliert. Dadurch betrug die Destillatfließgeschwindigkeit 123,5 kg/h bei einer Bodenproduktentfernungsrates von 0,52 kg/h. Während des Konzentrationsverfahrens wurde einer ersten Fraktion eine Probe entnommen und analysiert, gefolgt von einer zweiten Fraktion, die ebenso analysiert wurde. Die zwei Fraktionen von EGCG-Konzentraten wiesen eine Gesamtmasse von 63,5 kg auf.

**[0041]** Tabelle 6 zeigt die Konzentration der Teekomponenten in den Bodenprodukten. Die Rückgewinnung

von EGCG betrug 95,9 %. Das Analyseergebnis zeigt deutlich, daß die hohe Reinheit des abgetrennten EGCG während der Konzentration der Lösung aufrechterhalten werden konnte.

**[0042]** EGCG kann aus der konzentrierten Lösung in einer festen Form entweder durch Sprühtrocknen oder durch Kristallisation isoliert werden.

Tabelle 6 Konzentration der Teekomponenten in dem EGCG-Konzentrat aus dem Fallfilmverdampfer

Verbindungen	Bodenprodukt des Fallfilmverdampfers			
	Zusammensetzung		Zusammensetzung	
	1. Fraktion		2. Fraktion	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz
Gallussäure	0,00	0,0	0,00	0,0
Catechin	0,17	1,5	0,14	1,6
Koffein	0,01	0,1	0,02	0,2
EGCG	10,70	95,4	8,07	94,8
Epicatechin	0,16	1,4	0,11	1,3
GCG	0,13	1,2	0,13	1,5
ECG	0,05	0,4	0,04	0,5
Summe	11,22	100,0	8,51	100,0
Gesamtmasse an Lösung	39,0 kg		24,5 kg	

#### Beispiel 4

**[0043]** 450 ml AMBERCHROM®CG-71c mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 120 µm wurden in eine Laborchromatographiesäule aus Edelstahl mit einem Innendurchmesser von 2,2 cm und einer Länge von 103 cm gefüllt. Die Säule wurde mit einem Heizmantel ausgestattet. Das Harz wurde gewaschen und mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) äquilibriert.

**[0044]** 20 g eines konzentrierten Catechinpulvers „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“ von Guizhou Hihy Biological Products Co. (Ausgangsmaterial) wurden in 20 ml eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst. Danach wurden 14 g dieser Lösung (entspricht 2,99 g EGCG) auf die Spitze der Säule aufgebracht. EGCG wurde mittels einer Chromatographiepumpe unter einem Druck von 2 bis 3 bar bei einer Temperatur von 60 °C mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) unter einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 16 ml/min eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten. Nach einem anfänglichen Eluat von 2,48 l (Vorfraktion) wurde die Fließgeschwindigkeit auf 25,5 ml/min geändert und das Haupteluat von 5,40 l wurde gesammelt, das EGCG in einer Konzentration von 0,627 g/l enthält. In bezug auf andere Catechine und Koffein betrug die Reinheit des EGCG in dem Haupteluat, bestimmt durch HPLC und ausgedrückt als relativer Prozentsatz, 97,13 %. Während des Experiments veränderte sich der Druck in dem System von 2 auf 3 bar in Abhängigkeit der angewendeten Fließgeschwindigkeit. Tabelle 7 vergleicht die Konzentration der Teekomponenten in dem Eluat und in dem Ausgangsmaterial, wodurch die Trennungswirkung dargestellt wird, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial und in der Hauptfraktion wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 7 Trennung von AMBERCHROM CG-71c, 60 °C, Lösungsmittelsystem: Wasser/Ethanol

Verbindung	Teekonzentrat (Ausgangsmaterial) Beispiel 4		Hauptfraktion Beispiel 4	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz/%	HPLC/ppm	Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,08	0,1	0	0,0
Catechin	0,50	0,6	1	0,2
Koffein	9,29	11,3	5	1,2
EGCG	42,23	51,4	407	97,1
Epicatechin	4,24	5,2	3	0,7
GCG	8,09	9,9	1	0,2
ECG	17,70	21,6	2	0,5
Gesamt	82,13	100,0	419	100,0

## Beispiel 5

**[0045]** 450 ml Amberlite®XAD-7 mit einem Teilchendurchmesser von 0,3 bis 1,2 mm wurde in eine Laborchromatographiesäule aus Glas mit einem Innendurchmesser von 2,4 cm und einer Länge von 100 cm gepackt. Die Säule wurde mit einem Heizmantel und am Boden mit einer Glassinterfritte P3 ausgestattet. Das Harz wurde gründlich mit entsalztem Wasser gewaschen und mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) vor der Verwendung äquilibriert.

**[0046]** 20 g eines konzentrierten Catechinpulvers „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“ von Guizhou Hihyin Biological Products Co. (Ausgangsmaterial) wurden in 20 ml eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst. Danach wurden 14 g dieser Lösung (entspricht 2,91 g EGCG) auf die Spitze der Säule aufgebracht. EGCG wurde mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 16,9 ml/min bei einer Temperatur von 60 °C und einem Druck von 0,5 bis 1 bar eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten. Nach einem anfänglichen Eluat von 2,48 l (Vorfraktion) wurde die Fließgeschwindigkeit auf 23,6 ml/min geändert und das Haupteluat von 4,95 l wurde gesammelt, das EGCG in einer Konzentration von 0,470 g/l enthielt. In bezug auf andere Hauptcatechine und Koffein betrug die Reinheit des EGCG in der Hauptfraktion, bestimmt durch HPLC, 86,1 (siehe Tabelle 8). Die Ausbeute, basierend auf EGCG, betrug 79,8 %. Während des Experiments veränderte sich der Druck in dem System von 0,5 auf 1 bar in Abhängigkeit der angewendeten Fließgeschwindigkeit.

**[0047]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 1,35 l eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) bei einer Fließgeschwindigkeit von 22,5 ml/min desorbiert. Diese Fraktion kann ebenso zur weiteren Reinigung oder Trennung der desorbierten Catechine verwendet werden. Tabelle 8 vergleicht die Konzentration der Teekomponenten in dem Eluat und in dem Ausgangsmaterial, wodurch die Trennungswirkung dargestellt wird, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial und in der Hauptfraktion wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 8 Trennung auf Amberlite XAD-7. 60 °C, Lösungsmittelsystem: Wasser/Ethanol

Verbindung	Teekonzentrat (Ausgangsmaterial) Beispiel 5		Hauptfraktion Beispiel 5	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz/%	HPLC/ppm	Rel. Prozentsatz/%
	Gallussäure	0,09	0,1	0
Catechin	0,50	0,6	2	0,4
Koffein	9,17	11,5	7	1,3
EGCG	41,16	51,5	470	86,1
Epicatechin	4,16	5,2	5	0,9
GCG	7,75	9,7	22	4,0
ECG	17,16	21,5	40	7,3
Gesamt	79,99	100,0	546	100,0

## Beispiel 6

**[0048]** Das regenerierte Harz von Beispiel 5 wurde in der Laborsäule, die in Beispiel 5 beschrieben wird, durch Pumpen eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) durch das Harz äquilibriert.

**[0049]** 20 g eines konzentrierten Catechinpulvers „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“ von Guizhou Hihyin Biological Products Co. (Ausgangsmaterial) wurden in 20 ml eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst. Danach wurden 14 g dieser Lösung (entspricht 3,04 g EGCG) auf die Spitze der Säule aufgebracht. EGCG wurde mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 22,5 ml/min bei einer Säulentemperatur von 40 °C und einem Druck von 1 bis 2 bar eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten. Nach einem anfänglichen Eluat von 3,60 l (Vorfraktion) wurde die Fließgeschwindigkeit auf eine Fließgeschwindigkeit von 26,3 ml/min geändert und das Haupteluat von 4,73 l wurde gesammelt. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,278 g/l. In bezug auf andere Hauptcatechine und Koffein betrug die Reinheit des Epigallocatechin-Gallats in dem Haupteluat, bestimmt durch HPLC, 93,2 %. Die Ausbeute, basierend auf EGCG, betrug 42,8 %. Während des Experimentes veränderte sich der Druck in dem System von 1 auf 2 bar in Abhängigkeit der angewendeten Fließgeschwindigkeit.

**[0050]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 1,98 l eines Gemisches aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) bei einer Fließgeschwindigkeit von 26,3 ml/min und einer Temperatur von 40 °C desorbiert. Diese Fraktion kann ebenso zur weiteren Reinigung oder Trennung der desorbierten Catechine verwendet werden. Tabelle 9 vergleicht die Konzentration der Teekomponenten in dem Eluat und in dem Ausgangsmaterial, wodurch die Trennungswirkung dargestellt wird, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial und in der Hauptfraktion wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 9 Trennung auf Amberlite XAD-7. 40 °C. Lösungsmittelsystem: Wasser/Ethanol

Verbindung	Teekonzentrat (Ausgangsmaterial) von Beispiel 6		Hauptfraktion von Beispiel 6	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz/%	HPLC/ppm	Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,08	0,1	0	0,0
Catechin	0,51	0,6	3	1,0
Koffein	9,48	11,3	4	1,4
EGCG	43,01	51,4	276	93,2
Epicatechin	4,34	5,2	9	3,0
GCG	8,23	9,8	2	0,7
ECG	18,03	21,5	2	0,7
Gesamt	83,68	100,0	296	100,0

## Beispiel 7

**[0051]** Das regenerierte Harz von Beispiel 6 wurde mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) äquilibriert.

**[0052]** 20 g eines konzentrierten Catechinpulvers „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“ von Guizhou Hihy Biological Products Co. (Ausgangsmaterial) wurden in 20 ml eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst. Danach wurden 14 g dieser Lösung (entspricht 3,21 g EGCG) auf die Spitze der Säule aufgebracht, und mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 18 ml/min bei einer Säulentemperatur von 60 °C eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten. Nach einem anfänglichen Eluat von 1,35 l (Vorfraktion) wurde die Fließgeschwindigkeit auf 16,5 ml/min geändert und das Haupteluat von 2,03 l wurde gesammelt. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,998 g/l. In bezug auf andere Hauptcatechine und Koffein betrug die Reinheit des Epigallocatechin-Gallats in dem Haupteluat, bestimmt durch HPLC, 85,7 %. Die Ausbeute, basierend auf EGCG, betrug 62,8 %. Während des Experimentes veränderte sich der Druck in dem System von 1 auf 2 bar in Abhängigkeit der angewendeten Fließgeschwindigkeit.

**[0053]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 2,03 l eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) bei einer Fließgeschwindigkeit von 16,5 ml/min und einer Temperatur von 40 °C desorbiert. Diese Fraktion kann ebenso zur weiteren Reinigung oder Trennung der desorbierten Catechine verwendet werden. Tabelle 10 vergleicht die Konzentration der Teekomponenten in dem Eluat und in dem Ausgangsmaterial, wodurch die Trennungswirkung dargestellt wird, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial und in der Hauptfraktion wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 10 Trennung auf Amberlite XAD-7, 60 °C, Lösungsmittelsystem: Wasser/Isopropanol

Verbindung	Teekonzentrat (Ausgangsmaterial) von Beispiel 7		Hauptfraktion von Beispiel 7	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz/%	HPLC/ppm	Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,05	0,1	0	0,00
Catechin	0,38	0,4	8	0,7
Koffein	9,48	10,8	28	2,4
EGCG	45,42	51,8	998	85,7
Epicatechin	4,38	5,0	16	1,4
GCG	8,80	10,0	35	3,0
ECG	19,12	21,8	80	6,9
Gesamt	87,63	100,0	1165	100,0

## Beispiel 8

**[0054]** Das regenerierte Harz von Beispiel 7 wurde mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) äquilibriert.

**[0055]** 20 g eines konzentrierten Catechinpulvers „Grünteeextrakt, min. 95 % Polyphenole“ von Guizhou Hihy Biological Products Co. (Ausgangsmaterial) wurden in 20 ml eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) gelöst. Danach wurden 14 g dieser Lösung (entspricht 3,10 g EGCG) auf die Spitze der Säule aufgebracht. EGCG wurde mit einem Gemisch aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 16,9 ml/min bei einer Säulentemperatur von 40 °C eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten. Nach einem anfänglichen Eluat von 2,48 l (Vorfraktion) wurde die Fließgeschwindigkeit auf 23,66 ml/min geändert und das Haupteluat von 4,95 l wurde gesammelt. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,370 g/l. In bezug auf andere Hauptcatechine und Koffein betrug die Reinheit des EGCG in der Hauptfraktion, bestimmt durch HPLC, 86,4 %. Die Ausbeute, basierend auf EGCG, betrug 59,2 %. Während des Experimentes veränderte sich der Druck in dem System von 1 auf 2 bar in Abhängigkeit der angewendeten Fließgeschwindigkeit.

**[0056]** Um das Harz zu regenerieren, wurden die übrigen Catechine durch Eluieren mit 2,03 l eines Gemisches aus Wasser/Isopropanol (Verhältnis 4 : 6, bezogen auf das Volumen) bei einer Fließgeschwindigkeit von 16,5 ml/min und einer Temperatur von 40 °C desorbiert. Diese Fraktion kann ebenso zur weiteren Reinigung oder Trennung der desorbierten Catechine verwendet werden. Tabelle 11 vergleicht die Konzentration der Teekomponenten in dem Eluat und in dem Ausgangsmaterial, wodurch die Trennungswirkung dargestellt wird, wie durch den relativen Prozentsatz von EGCG gezeigt. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial und in der Hauptfraktion wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% oder ppm ausgedrückt.

Tabelle 11 Trennung auf Amberlite XAD-7. 40 °C Lösungsmittelsystem: Wasser/Isopropanol

Verbindung	Teekonzentrat (Ausgangsmaterial) von Beispiel 8		Hauptfraktion von Beispiel 8	
	HPLC/Gew.-%	Rel. Prozentsatz/%	HPLC/ppm	Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,20	0,2	0	0,0
Catechin	0,49	0,6	4	0,9
Koffein	9,21	10,8	6	1,4
EGCG	43,74	51,5	370	86,4
Epicatechin	4,23	5,0	14	3,3
GCG	8,50	10,0	11	2,6
ECG	18,52	21,8	23	5,4
Gesamt	84,89	100,0	428	100,0

**[0057]** Beispiel 9 Trennung von EGCG über Polyamide 11 unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln Ein kommerziell erhältlicher Grünteeextrakt („Grünteeextrakt, min. 95% Polyphenole“, Charge#960328 von Guizhou Highyin Biological Product Co., Guiyang, China), der Catechine und Koffein in einer in Tabelle 12 gezeigten Menge enthält, wurde als das Ausgangsmaterial verwendet. Die Konzentration der Teekomponenten wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt.

Tabelle 12 Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial

Verbindung	Teextrakt HPLC/Gew.-%	Teextrakt Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,01	0,0
EGC	2,02	3,0
Catechin	0,78	1,2
Koffein	8,48	12,5
EGCG	36,87	54,5
Epicatechin	4,48	6,6
GCG	4,77	7,1
ECG	10,22	15,1
Gesamt	67,63	100,0

**[0058]** 250 g eines kommerziell erhältlichen Polyamide 11 (Kat. Nr. 1.07435.0100, Ursprung Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Teilchengröße von 5 bis 40 µm wurden in 300 ml Ethylacetat suspendiert und in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 5 cm und einer Länge von 36 cm übertragen. Die Säule war mit einem Heizmantel und einem Thermostat auf 40 °C ausgestattet. 3 g des Grünteeausgangsextraktes, charakterisiert in Tabelle 12, der 1,11 g reines EGCG enthält, wurden in 153 ml Ethylacetat gelöst und auf die Spitze der Säule aufgebracht. Eine Ethylacetat/Ethanol-Gradientelution (500 ml Ethylacetat, 1000 ml Ethylacetat/Ethanol (8,5 : 1,5 Volumen/Volumen), 1000 ml Ethylacetat/Ethanol (7 : 3 Volumen/Volumen), 2000 ml Ethylacetat/Ethanol (1 : 1 Volumen/Volumen)) unter einem Druck von 0,3 bar ergab eine Hauptfraktion von 550 ml, die nach der Verdampfung der Lösungsmittel 1,12 g Feststoff ergab, der 0,87 g EGCG als die Hauptcatechin-komponente enthält. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,186 %. Die Ausbeute des getrennten EGCG, berechnet aus 1,106 g EGCG, das in dem Ausgangsteextrakt vorliegt, betrug 76 %.

**[0059]** Um das Harz zu regenerieren, desorbierte die Elution mit 500 ml Ethanol die übrigen Catechine. Vor der nächsten Trennung wurde die Säule mit 500 ml Ethylacetat konditioniert.

**[0060]** Tabelle 13 stellt die Trennungswirkung dar. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Haupteluat wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt.

Tabelle 13 Konzentration der Teekomponenten in dem Rest des Haupteluats (nach der Lösungsmittelverdampfung)

Verbindung	Rest der Hauptfraktion HPLC/Gew.-%	Rest der Hauptfraktion Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0	0
EGC	0	0
Catechin	0	0
Koffein	0	0
EGCG	77,40	96,4
Epicatechin	0,05	0,1
GCG	0,74	0,9
ECG	2,07	2,6
Gesamt	80,26	100,0

**[0061]** Beispiel 10 Trennung von EGCG über Polyamide 11 unter Verwendung eines wässrigen Lösungsmittelgemisches. Eine wässrige Grünteeextraktlösung, die Catechine und Koffein in einer in Tabelle 14 gezeigten Menge enthält, wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Die Konzentration der Teekomponenten wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% ausgedrückt.

Tabelle 14 Konzentration der Teekomponenten in dem Rest der Ausgangsteextraktlösung (nach der Lösungsmittelverdampfung)

Verbindung	Teeextrakt HPLC/Gew.-%	Teeextrakt Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	1,36	4,8
EGC	3,61	12,6
Catechin	1,45	5,1
Koffein	6,89	24,1
EGCG	10,14	35,5
Epicatechin	1,59	5,6
GCG	0,99	3,5
ECG	2,51	8,8
Gesamt	28,54	100,0

**[0062]** 25 g Polyamide 11 (Kat. Nr. 1.07435.0100, Ursprung Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Teilchengröße von 5 bis 40 µm wurden in 100 ml Wasser suspendiert und der pH auf 6,5 eingestellt. Diese Suspension wurde in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 3 cm und einer Länge von 8 cm übertragen. 10 ml des obigen Grünteeextraktes (Tabelle 14), der 0,078 g reines EGCG enthält, wurden auf die Spitze der Säule aufgebracht. Eine Wasser/Ethanol-Gradientelution (500 ml Wasser, 600 ml Wasser/Ethanol (7 : 3 Volumen/Volumen), 350 ml Wasser/Ethanol (6 : 4 Volumen/Volumen), 500 ml Wasser/Ethanol (1 : 1 Volumen/Volumen)) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min ergab eine Hauptfraktion von 110 ml (0,072 g), die 0,046 g EGCG enthält. Die EGCG-Konzentration in dem Haupteluat betrug 0,06 %. Die Ausbeute des getrennten EGCG, ausgehend von 0,078 g EGCG, in dem Teeextrakt betrug 59 %.

**[0063]** Um das Harz zu regenerieren, desorbierte die Elution mit 500 ml Ethanol die übrigen Catechine. Vor

der nächsten Trennung wurde die Säule mit 500 ml Wasser konditioniert.

**[0064]** Tabelle 15 stellt die Trennungswirkung dar. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Haupteluat wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt.

Tabelle 15 Konzentration der Teekomponenten in dem Rest der Hauptfraktion (nach der Lösungsmittelverdampfung)

Verbindung	Rest der Hauptfraktion HPLC/Gew.-%	Rest der Hauptfraktion Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	1,10	1,6
EGC	0,00	0,0
Catechin	1,29	1,9
Koffein	0,00	0,0
EGCG	63,53	91,7
Epicatechin	0,00	0,0
GCG	0,16	0,2
ECG	3,20	4,6
Gesamt	69,28	100,0

Beispiel 11 Trennung von EGCG über Amberlite XAD-7, Lösungsmittelsystem: Wasser/Ethanol

**[0065]** 416 ml Amberlite XAD-7-Harz mit einem mittleren Teilchendurchmesser zwischen 0,3 und 1,2 mm wurden in eine Laborchromatographiesäule aus Glas (ECO 25/999 M3V-K von Stagroma AG, Wallisellen, Schweiz) mit einem Innendurchmesser von 2,5 cm und einer Länge von 100 cm gefüllt. Die Säule wurde mit einem Heizmantel ausgestattet und auf 60 °C thermostatiert. Das Harz wurde gewaschen und mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) äquilibriert.

**[0066]** Ein kommerziell erhältlicher Grünteeextrakt („Tea-polyphenole TP-80“ von Zhejiang Zhongke Plant Technical Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang, P. R. China), der Catechine und Koffein in der in Tabelle 16 gezeigten Menge enthält, wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Die Konzentration der Teekomponenten wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% ausgedrückt.

**[0067]**

Tabelle 16 Konzentration der Teekomponenten in dem Ausgangsmaterial

Verbindung	Teeextrakt von Beispiel 13 HPLC/Gew.-%	Teeextrakt von Beispiel 13 Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0,1	0,1
EGC	8,6	10,1
Catechin	1,9	2,2
Koffein	6,2	7,3
EGCG	40,3	47,4
Epicatechin	10,4	12,2
GCG	0,9	1,1
ECG	16,6	19,5
Gesamt	85,0	100,0

**[0068]** 11,2 g des Grünteeausgangsextraktes, charakterisiert in Tabelle 16, der 4,5 g reines EGCG enthält, wurden in 112,5 ml entsalztem Wasser gelöst und auf die Spitze der Säule aufgebracht. Die Catechine wurden mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol (Verhältnis 9 : 1, bezogen auf das Volumen) mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,6 l/Stunde bei einer Säulentemperatur von 60 °C eluiert. Das Elutionsmittel wurde entgast und unter einer Stickstoffatmosphäre vor der Verwendung gehalten.

**[0069]** Nach einem anfänglichen Eluat von 1,2 l wurde die Zusammensetzung des Elutionsmittels auf Wasser/Ethanol 8 : 2, bezogen auf das Volumen, geändert. Diese Elution mit einer Gesamtmenge von 1,5 l ergab eine Hauptfraktion von 900 ml, die 2,115 g EGCG enthält. Die EGCG-Konzentration in der Hauptfraktion betrug 0,245 %. Die Ausbeute des getrennten EGCG, ausgehend von 4,5 g EGCG, in dem Teeextrakt betrug 47 %. Während des Experiments veränderte sich der Druck in dem System von 0,8 auf 1,5 bar.

**[0070]** Um das Harz zu regenerieren, wurde die Elution mit einem Gemisch aus Wasser/Ethanol 4 : 6, bezogen auf das Volumen, fortgesetzt, wodurch Ethanol die übrigen Catechine desorbiert. Vor der nächsten Trennung wurde die Säule mit Wasser/Ethanol 9 : 1, bezogen auf das Volumen, konditioniert.

**[0071]** Tabelle 17 stellt die Trennungswirkung dar. Die Konzentration der Teekomponenten in dem Rest der Hauptfraktion (nach der Verdampfung des Lösungsmittels) wurde durch HPLC unter Verwendung der UV-Extinktion bestimmt und in Gew.-% ausgedrückt.

Tabelle 17 Konzentration der Teekomponenten in dem Rest der Hauptfraktion (nach der Lösungsmittelverdampfung)

Verbindung	Rest der Hauptfraktion von Beispiel 13 HPLC/Gew.-%	Rest der Hauptfraktion von Beispiel 13 Rel. Prozentsatz/%
Gallussäure	0	0
EGC	0	0
Catechin	0,6	0,7
Koffein	0,3	0,3
EGCG	81,4	94,5
Epicatechin	1,7	2,0
GCG	0,2	0,2
ECG	1,9	2,2
Gesamt	86,1	100,0

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Epigallocatechin-Gallat (EGCG), welches die Schritte umfaßt
  - a) Bereitstellen eines Grünteeextraktes;
  - b) Unterziehen des Grünteeextraktes einer Chromatographie auf einem makroporösen polaren Harz, das allgemein zur Adsorption oder Chromatographie bei einer Temperatur zwischen 10 °C und 80 °C verwendet wird, wobei das makroporöse polare Harz aus der Gruppe, bestehend aus Acrylharzen, Polyamiden, Polyvinylpyrrolidon P 6755 und aromatischen Polyamiden und Polyestern, ausgewählt wird;
  - c) Eluieren von EGCG aus dem makroporösen polaren Harz mit einem polaren Elutionslösungsmittel bei einer Temperatur zwischen 10 °C und 80 °C und bei einem Druck zwischen 0,1 bar und 50 bar;
  - d) gegebenenfalls Konzentrieren des Eluats von Schritt c);
  - e) gegebenenfalls Regenerieren des makroporösen polaren Harzes durch Desorbieren der übrigen Catechine; und
  - f) gegebenenfalls Konzentrieren der desorbierten Catechine von Schritt e).
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Acrylharz AMBERLITE®XAD-7 ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Acrylharz AMBERCHROM®CG-71 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polyamidharz Polyamide 11 ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Schritte b) und c) bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 60 °C durchgeführt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Schritt c) unter einem Druck von 0,1 bar bis 20 bar, vorzugsweise 0,1 bar bis 10 bar durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das polare Elutionslösungsmittel ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Elutionslösungsmittel ein Gemisch aus 70 Vol-% bis 95 Vol-%, vorzugsweise 90 Vol-%, Wasser und 5 Vol-% bis 35 Vol-%, vorzugsweise 10 Vol-%, eines organischen Lösungsmittels ist.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei das organische Lösungsmittel Ethanol, Isopropanol, Ethylacetat oder Aceton ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Fließgeschwindigkeit des Elutionslösungsmittels zwischen 0,5 und 20 Bettvolumen/h, vorzugsweise 0,5 und 10 Bettvolumen/h, stärker bevorzugt 0,8 und 5 Bettvolumen/h beträgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei Schritt d) durch Zugabe von Zitronensäure, Ascorbinsäure oder Isoascorbinsäure durchgeführt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Säure in einer Menge von 0,1 bis 2,5 % in bezug auf EGCG zugegeben wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei Schritt e) unter Verwendung eines reinen organischen Lösungsmittels oder einem Gemisch aus 10 bis 60 Vol-% Wasser und 40 bis 90 Vol-% organischen Lösungsmittel, vorzugsweise 40 Vol-% Wasser und 60 Vol-% organisches Lösungsmittel, durchgeführt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen