



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 32 999 T2 2007.11.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 103 550 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C07D 311/62 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 32 999.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 124 585.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **10.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **17.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(30) Unionspriorität:

99122753 16.11.1999 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:

DSM IP Assets B.V., TE Heerlen, NL

(72) Erfinder:

**Bonrath, Werner, 79115 Freiburg, DE; Burdick,
David Carl, 4102 Binningen, CH; Schirg, Peter,
79410 Badenweiler, DE; Thum, Andreas, 89073
Ulm, DE**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Konzentrieren von Catechinlösungen mittels Membranen**

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 betrifft ein Verfahren zum Konzentrieren von wässrigen Epigallocatechingallat-(hierin nachstehend als EGCG abgekürzt)-lösungen.

[0002] Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum Konzentrieren von wässrigen EGCG-Lösungen unter Verwendung von selektiven Nanofiltrations- oder Umkehrosmosemembranen (hierin auf Membran verkürzt).

[0003] US-Patentschrift 5,879,733 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Grünteeextrakt mit verbesserter Klarheit und Farbe. Diese Extrakte werden durch Behandeln von wässrigem Grünteeextrakt mit einer Menge eines Kationenaustauschharzes von Lebensmittelqualität, die wirksam ist, Metallkationen zu entfernen, die in dem Extrakt vorliegen, erhalten. Das mit einem Kationenaustauschharz behandelte Extrakt wird dann mit einer Nanofiltrationsmembran kontaktiert, um die Materialien mit höherem Molekulargewicht, wie z.B. Pektine, Proteine, Chlorophyll und Oxidationsprodukte, zu entfernen. Die Nanofiltrationsmembranen, die in US 5,879,733 beschrieben sind, werden aus Polymeren mit einer Molekulargewichtstrenngrenze von etwa 700 bis etwa 5.000 Dalton (einer Porengröße- im Bereich von etwa 17 bis etwa 40 Angström entsprechend) hergestellt. Polymere wie Celluloseacetate, Polysulfone, Polyvinylidenfluoride werden zur Herstellung dieser Nanofiltrationsmembranen verwendet. Insbesondere ist die Verwendung einer OSMO SP-12 Nanofiltrationsmembran (hergestellt von Osmonics, Inc. aus Minnetonka, Minn.) offenbart. Das Celluloseacetatpolymer, aus dem die Membran hergestellt wird, weist eine Molekulargewichtstrenngrenze von 1.000 Dalton (einer Porengröße von etwa 20 Angström entsprechend) auf. Bei Verwendung der Membran gehen die Teecatechine, die eine Molekulargröße aufweisen, die kleiner ist als der Porendurchmesser der Membran, zusammen mit Wasser durch die Membran hindurch, während die Materialien mit höherem Molekulargewicht von der Membran nicht durchgelassen werden.

[0004] US 5,879,733 offenbart keine Membran, die zum Konzentrieren von wässrigen EGCG-Lösungen geeignet ist. Es besteht daher immer noch ein Bedarf an einer Membran mit einer hohen Retentionsrate für EGCG, die in der Lage ist, eine akzeptable Fließgeschwindigkeit des Permeatstroms aufrechtzuerhalten.

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mehrschrittverfahren zum Konzentrieren von wässrigen Epigallocatechingallat-(EGCG)-lösungen, wobei das Verfahren mindestens teilweise chargenweise oder kontinuierlich durchgeführt werden kann, und umfasst:

- a) Einspeisen einer wässrigen EGCG-Lösung mit einem Gehalt an gelösten Feststoffen von etwa 0,03 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-% in mindestens ein Membranmodul unter einem Druck von etwa 5 bar bis etwa 100 bar, um ein abgeführtes Permeat und ein zurückgeführtes Retentat bereitzustellen, wobei die Konzentration von EGCG in dem zurückgeführten Retentat im Verhältnis zu der Konzentration in der Einspeiselösung erhöht ist, und wobei die Membran eine DESAL-5-Membran ist;
- b) Sammeln des abgeführten Permeats;
- c) Sammeln des zurückgeführten Retentats;
- d) gegebenenfalls Rezirkulieren des zurückgeführten Retentats zurück zu der Membran;
- e) gegebenenfalls Konzentrieren des zurückgeführten Retentats der Schritte c) und/oder d);
- f) gegebenenfalls Konzentrieren des abgeführten Permeats von Schritt b).

[0006] Die Anforderungen an die verwendete Membran sind: ein Retentionskoeffizient für EGCG über 90%, eine Permeatfließgeschwindigkeit über 5 l/m² h, ein Retentionskoeffizient für das gegebenenfalls zugegebene organische Lösemittel und für jegliche Verunreinigungen, die vorliegen, von weniger als 50%.

[0007] Membrane werden im Allgemeinen in einem definierten Lösemittel-Membran-System durch den Retentionskoeffizienten R und die Permeatfließgeschwindigkeit J_v charakterisiert.

[0008] In Bezug auf die Konzentration einer wässrigen EGCG-Lösung wird der Retentionskoeffizient R als $R = 100 \times (1 - C_p/C_k)$ definiert, wobei C_p die Konzentration von EGCG in dem Permeat und C_k die Konzentration von EGCG in dem Retentat ist.

[0009] Der Permeatfluss ist eine Funktion des osmotischen Drucks, der von allen gelösten Molekülen (z.B. EGCG und organisches Lösemittel) in dem Konzentrat verursacht wird.

[0010] Der Permeatfluss J_v wird als $J_v = A \times (\Delta P - \Delta \Pi)$ definiert, wobei A eine Membrankonstante in l/m² h bar, ΔP die Transmembrandifferenz des Drucks, $\Delta \Pi$ die Transmembrandifferenz des osmotischen Drucks ist.

[0011] Die notwendigen Anforderungen an die Membran werden durch die Membran DESAL-5 erfüllt, die im Handel von OSMONICS/DESAL, Vista, Kalifornien, erhältlich ist. Die DESAL-5-Membran ermöglicht die Konzentration von EGCG in einem Bereich bis zu 200-fach.

[0012] Ein bevorzugter Druckbereich für die Membran ist von etwa 10 bar bis etwa 100 bar, insbesondere von etwa 20 bar bis etwa 35 bar.

[0013] Das Verfahren der Erfindung kann bei einer beliebigen geeigneten und gewünschten Temperatur, die aus etwa 10°C bis etwa 60°C gewählt ist, durchgeführt werden.

[0014] Der Begriff "wässrige EGCG-Lösung" bezieht sich in diesem Zusammenhang auf eine Lösung von EGCG in einer Mischung von Wasser und gegebenenfalls einem organischen Lösemittel. Das Lösemittel oder die Lösemittelmischung umfasst vorzugsweise etwa 70 Vol.-% bis etwa 100 Vol.-%, vorzugsweise etwa 90 Vol.-% an Wasser und etwa 0 Vol.-% bis etwa 35 Vol.-%, vorzugsweise etwa 10 Vol.-% an einem organischen Lösemittel. Das organische Lösemittel ist vorzugsweise Methanol, Ethanol, Isopropanol oder Aceton. Die Anfangskonzentration von EGCG in der Lösung beträgt etwa 0,05 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, vorzugsweise etwa 0,05 Gew.-% bis etwa 2 Gew.-%.

[0015] Das Ausgangsmaterial ist ein Grünteeextrakt, der durch im Fachgebiet bekannte Verfahren hergestellt werden kann, z.B. durch Extrahieren von Grünteeblättern. Teeextraktpulver sind auch im Handel erhältlich, z.B. von Highyin Biological Products Co., Guiyang, China.

[0016] EGCG wird von Teepolyphenolen, die in dem Extrakt vorliegen, durch Chromatographie getrennt, z.B. wie in der europäischen Patentanmeldung 99116032.6 beschrieben, die sich auf ein Verfahren zum Herstellen von EGCG bezieht, das die Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen eines Grünteeextrakts;
- b) Unterwerfen des Grünteeextrakts einer Chromatographie an einem makroporösen polaren Harz bei einer Temperatur im Bereich von etwa 30°C bis etwa 80°C;
- c) Eluieren des EGCG von dem makroporösen polaren Harz mit einem polaren Elutionslösemittel bei einer Temperatur im Bereich von etwa 30°C bis etwa 80°C und bei einem Druck im Bereich von etwa 0,1 bar bis etwa 50 bar;
- d) Gegebenenfalls Konzentrieren des Eluats von Schritt c);
- e) gegebenenfalls Regenerieren des makroporösen polaren Harzes durch Desorbieren der verbleibenden Catechine und
- f) gegebenenfalls Konzentrieren der desorbierten Catechine von Schritt e).

[0017] Eine mögliche Ausführungsform des vorstehenden Chromatographieverfahrens ist in Beispiel 1 beschrieben.

[0018] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird jetzt ausführlicher mit Bezug auf [Fig. 1](#), die schematisch eine Einstufenmembran-Nanofiltrationsvorrichtung zeigt, dargelegt.

[0019] Die Vorrichtung weist einen Einspeiselösungsbehälter (1) auf, der mit einem Membranmodul (3) über eine Einspeiserohrleitung durch eine Hochdruckpumpe (2) verbunden ist. Modul (3) weist ein spiralförmiges oder flachfolienartiges Modul auf, das die Filtrationsmembran enthält. Die Rohrleitung für das abgeführte Permeat V_p ist mit dem Permeatbehälter (4) verbunden. Die Rückführrohrleitung V_r wird verwendet, um das zurückgeführte Retentat wieder dem Behälter (1) zuzuführen. Ein spiralförmiges Modul wird bevorzugt.

[0020] Im Betrieb wird die wässrige Einspeiselösung, die EGCG enthält, unter einem Druck von etwa 5 bis etwa 100 bar durch Pumpe (2) zu dem Modul (3) geleitet. Durch V_p tritt das abgeführte Permeat aus, das Wasser und gegebenenfalls ein organisches Lösemittel enthält.

[0021] Durch die Rohrleitung V_r tritt das zurückgeführte Retentat aus, das EGCG enthält, welches nicht durch die Membran hindurchgeht.

[0022] Für das in [Fig. 1](#) dargestellte Verfahren kann das zurückgeführte Retentat wieder in das Membranverfahren geschickt werden, in einem oder mehreren Zyklen, entweder in einem Chargen- oder in einem Mehrschrittsverfahren (zusätzliche Konzentration des abgeführten Permeats) oder als ein kontinuierliches Verfahren.

[0023] Die folgenden Beispiele erklären die Erfindung ausführlicher.

Beispiel 1 Herstellung des Ausgangsmaterials.

[0024] Eine Chromatographiesäule wurde mit 2,2 kg des Harzes Amberlite® XAD-7 gefüllt. 50 g Grünteeextrakt von Highyin Biological Products Co., Guiyang, China wurden in 50 ml entionisiertem Wasser gelöst und die erhaltene Lösung wurde auf das obere Ende der Säule bei 60°C adsorbiert und anschließend bei 60°C unter einer Argonatmosphäre durch einen Elutionsmittelstrom von 0,1 l/min eluiert. Das Elutionsmittel war eine Mischung von Wasser/Isopropanol (Volumenverhältnis von 9:1). Das Elutionsmittel wurde vor der Verwendung entgast und unter einer Argonatmosphäre gehalten. Es wurden drei Hauptfraktionen erhalten, die enthielten:

- a) 10,0 g EGCG in 10,3 l Lösung (0,97 g EGCG/l)
- b) 5,2 g EGCG in 10,4 l Lösung (0,50 g EGCG/l)
- c) 1,3 g EGCG in 5,6 l Lösung (0,23 g EGCG/l).

[0025] Die Menge an EGCG wurde durch HPLC-Analyse bestimmt. Lösemittel, die spezifische Mengen an EGCG enthielten, wurden als externe Standards verwendet, um die Menge an EGCG in den vorstehenden Fraktionen durch HPLC quantitativ zu bestimmen. Die Fraktionen wurden vereinigt, was in einer Einspeiselösung, die 0,63 g EGCG/l Wasser/Isopropanol 9/1 enthielt, resultierte.

Beispiel 2a: Konzentrieren der EGCG-Lösung in einem spiralförmigen Membranmodul

[0026] Speicherbehälter (1) wurde mit der Einspeiselösung von Beispiel 1 gefüllt. Das Ausgangsvolumen der Einspeiselösung betrug 6 l. Der Rest der Einspeiselösung wurde zu dem Membranmodul in 2 l-Anteilen zugegeben, wenn 2 l Permeat erhalten wurden. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur durch das Membranmodul (Totvolumen von etwa 2 l) mit einem spiralförmigen Membranelement DESAL DL 2540 F, das eine DESAL-5-DL-Membran enthielt, hindurchgeleitet. Die Permeatfließgeschwindigkeit betrug anfangs 12,2 l/m² h und am Ende 6,8 l/m² h. Der Druck über der Membran wurde konstant bei 31 bar gehalten. Die Membranoberfläche betrug 2,5 m². Das zurückgeführte Retentat wurde in den Behälter (1) zurückgeführt. 26,3 l Einspeiselösung, die 0,63 g EGCG/l enthielt, wurden zu 2,06 l konzentriert. Es wurde gefunden, dass das Konzentrat mindestens 15,6 g EGCG aufwies; Mindestausbeute 95%. Durch HPLC konnte kein EGCG in dem abgeführten Permeat nachgewiesen werden (die Nachweisgrenze betrug etwa 0,001 mg/ml). Der Retentionskoeffizient betrug daher etwa 99,99. Der Konzentrationsfaktor betrug etwa 13.

Beispiel 2b: Konzentrieren der EGCG-Lösung in einem Flachfolien-Membranmodul (wahlweise)

[0027] Aus praktischen Gründen wurde ein Flachfolien-Membranmodul mit einem Totvolumen von etwa 0,1 l für die weitere Konzentration des in Beispiel 2a erhaltenen Konzentrats verwendet.

[0028] Speicherbehälter (1) wurde mit der Einspeiselösung von Beispiel 2a gefüllt. Das Ausgangsvolumen der Einspeiselösung betrug 0,6 l. Der Rest der Einspeiselösung wurde kontinuierlich unter Stickstoffspülung zugegeben, bis 14,7 g gelöstes EGCG zugegeben wurden. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur durch das Membranmodul mit einem Flachfolien-Membranelement DESAL DL 5 hindurchgeleitet. Die Permeatfließgeschwindigkeit betrug anfangs 16 l/m² h und am Ende 3,8 l/m² h. Der Druck über der Membran wurde konstant bei 43 bar gehalten. Die Membranoberfläche betrug 0,0028 m². Das zurückgeführte Retentat wurde in den Behälter (1) zurückgeführt und auf ein Endvolumen von 126 ml konzentriert. Es wurde gefunden, dass das Konzentrat mindestens 14,2 g EGCG aufwies; Mindestausbeute 97%. Spuren von EGCG wurden durch HPLC in dem abgeführten Permeat nachgewiesen (die Quantitätsbestimmungsgrenze betrug etwa 0,01 mg/ml). Der Retentionskoeffizient betrug daher etwa 99,99. Der Konzentrationsfaktor betrug etwa 16.

Beispiel 3

[0029] Eine Einspeiselösung, die 0,98 g EGCG/l Wasser/Isopropanol 9/1 enthielt, wurde in einem Flachfolien-Membranmodul bei 35 bar und Umgebungstemperatur wie in Beispiel 2b beschrieben konzentriert. Der Retentionskoeffizient betrug 99,8.

Beispiel 4:

[0030] Eine Einspeiselösung, die 0,98 g EGCG/l Wasser/Isopropanol 9/1 (v/v) enthielt, wurde in einem Flachfolien-Membranmodul bei 35 bar und Umgebungstemperatur unter Verwendung der folgenden im Handel erhältlichen Membranen konzentriert. Die NITTO-Membranen sind von Nitto Denko, Japan, erhältlich. Die Membranoberfläche betrug 0,0028 m². Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse, die auch das Ergebnis von Beispiel 3 umfassen.

Membran	Permeat- fließ- geschw. (Anfang) l/m ² h	Retention (Anfang) %	Permeat- fließ- geschw. (Ende) l/m ² h	Retention (Ende) %
NITTO 7250 NF	19	93,8	8 (nach 6,5 h)	96,9
DESAL 5 DL NF	22	>99,1	10 (nach 6,5 h)	>99,8
NITTO 7450 NF	32	95,0	10 (nach 7 h)	91,1
DESAL YK NF	23	88,0	8 (nach 7 h)	86,3

[0031] Die vorstehende Tabelle zeigt deutlich, dass die Nanofiltrationsmembran DESAL 5 DL NF eine unerwartet hohe Retention von EGCG erzielt, während sie eine akzeptable Fließgeschwindigkeit der zu filternden Einspeiselösung aufrechterhält.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Konzentrieren einer wässrigen Epigallocatechingallat-(EGCG)-Lösung, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Einspeisen einer wässrigen EGCG-Lösung mit einem Gehalt an gelösten Feststoffen von etwa 0,03 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-% in mindestens ein Membranmodul unter einem Druck von etwa 5 bar bis etwa 100 bar, um ein abgeführtes Permeat und ein zurückgeführtes Retentat bereitzustellen, wobei die Konzentration von EGCG in dem zurückgeführten Retentat im Verhältnis zu der Konzentration in der Einspeiselösung erhöht ist, und wobei die Membran eine DESAL-5-Membran ist;
- b) Sammeln des abgeführten Permeats;
- c) Sammeln des zurückgeführten Retentats;
- d) gegebenenfalls Rezirkulieren des zurückgeführten Retentats zurück zu der Membran;
- e) gegebenenfalls Konzentrieren des zurückgeführten Retentats der Schritte c) und/oder d);
- f) gegebenenfalls Konzentrieren des abgeführten Permeats von Schritt b).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Membranmodul ein spiralförmiges Membranelement ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Druckbereich für die Membran bei etwa 10 bar bis etwa 100 bar liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Druckbereich für die Membran bei etwa 20 bar bis etwa 35 bar liegt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Verfahren bei einer Temperatur von etwa 10°C bis etwa 60°C ausgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die wässrige EGCG-Lösung eine Lösung von EGCG in einer Mischung von Wasser und gegebenenfalls einem organischen Lösemittel ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Mischung etwa 70 Vol.-% bis etwa 100 Vol.-%, vorzugsweise etwa 90 Vol.-% Wasser und etwa 0 Vol.-% bis etwa 35 Vol.-%, vorzugsweise etwa 10 Vol.-% eines organischen Lösemittels umfasst.

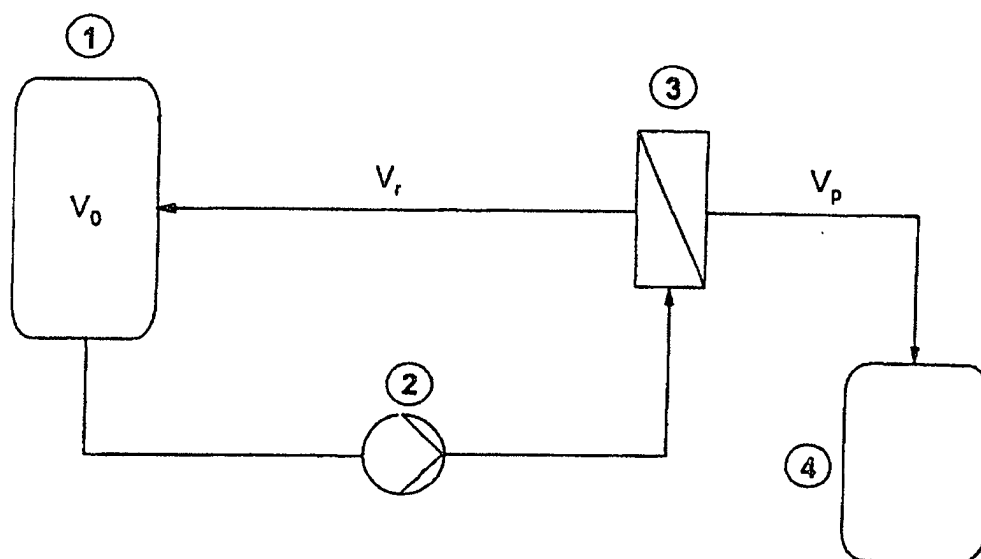
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei das organische Lösemittel Methanol, Ethanol, Isopropanol

oder Aceton ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1



V_0 Einspeise- und/oder Konzentratlösung

V_p abgeführtes Permeat

V_r zurückgeführtes Retentat

① Speicherbehälter für Konzentrat- und/oder
Einspeiselösung

② Pumpe

③ Membranmodul

④ Permeatbehälter