

УДК 663.9

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ЗЕЛЕННОГО ЧАЯ В ПЕРИОДИЧЕСКОМ ОФОРМЛЕНИИ ПРОЦЕССА

© *Е.П. Мюльхи*¹, *М.В. Андриюхова*^{2*}

¹ *SwissCo Services AG, Buchweg, 9, Reinach, 4153 (Switzerland)*

² *Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, пр. Ленина, 46, Барнаул, 656038 (Россия), e-mail: andryukhova@mail.ru*

Листья зеленого чая (*camellia sinensis*) содержат до 36% полифенолов, один из которых, эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ), ввиду его антимуtagenного, антиканцерогенного и антибактериального эффекта оказывает наибольшее позитивное действие на живой организм. Согласно клиническим исследованиям, полифенолы зеленого чая, особенно ЭГКГ, также понижают артериальное давление, снижают содержание сахара и холестерина в крови. На основании вышеперечисленного фенольные соединения зеленого чая (особенно ЭГКГ) имеют важное значение как биологически активные вещества, и перед технологами стоит сложная задача выделения ЭГКГ из растительного сырья. Для разработки технологии выделения ЭГКГ потребовалось: а) выбрать эффективный полярный сорбент для препаративной хроматографии; б) выбрать эффективный элюент; в) определить температурный режим и давление для эффективной адсорбции и десорбции полифенолов зеленого чая. Была исследована зависимость степени извлечения целевого компонента от параметров препаративной хроматографии. В результате лабораторных экспериментов была разработана технология выделения ЭГКГ из экстракта зеленого чая с концентрацией более 90% мас. при максимальном его выходе 43%мас. Разработанная в лаборатории технология выделения ЭГКГ методом препаративной хроматографии была успешно внедрена в производство.

Ключевые слова: зеленый чай, полифенолы, эпигаллокатехин-3-галлат, полярный сорбент, препаративная жидкостная хроматография.

Введение

Листья зеленого чая содержат до 36% полифенолов [1–3], один из которых, эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ), ввиду его антимуtagenного, антиканцерогенного и антибактериального эффекта оказывает наибольшее позитивное действие на живой организм [4–12]. Согласно клиническим исследованиям полифенолы зеленого чая, особенно ЭГКГ, также понижают артериальное давление, снижают содержание сахара и холестерина в крови [5, 13, 14]. На основании вышеперечисленного фенольные соединения зеленого чая (особенно ЭГКГ) имеют важное значение в качестве биологически активных веществ, и перед технологами стоит сложная задача выделения ЭГКГ из растительного сырья.

Существует много способов экстракции и выделения полифенольных соединений из зеленого чая [15–17]. В рамках настоящей работы была разработана технология выделения полифенолов методом препаративной хроматографии в периодическом оформлении процесса. Экспериментальная работа по выделению активных компонентов из зеленого чая проводилась с использованием сухого экстракта зеленого чая, производимого в Китае (производитель – компания «Guizhou Highyin Biological Products Co»).

Основным полифенольным соединением данного экстракта (43%мас.) является ЭГКГ (рис. 1), который является также целевым компонентом при разделении этой смеси на составляющие [18].

Мюльхи Елена Петровна – кандидат технических наук, менеджер отдела качества, e-mail: elm65@gmx.ch
Андриюхова Марина Викторовна – кандидат технических наук, доцент, e-mail: andryukhova@mail.ru

Хроматографическое разделение успешно используется для разделения многокомпонентных смесей [19–21]. Данный метод носит динамический

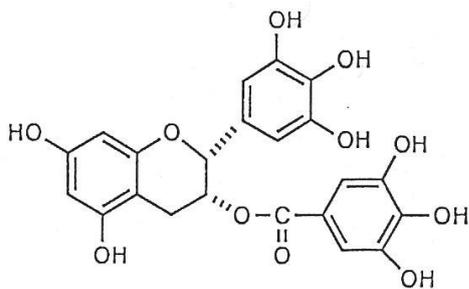


Рис. 1. Структурная формула эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ)

технологии, ограничивающей контакт целевого компонента с окружающей средой. Кроме этого, известно, что галлаты, например ЭГКГ и теафлавоны, образуют с помощью галлоидных групп в водной среде комплексные соединения с кофеином, что неблагоприятно сказывается на чистоте выделяемого целевого компонента. Таким образом, выделение целевого компонента ЭГКГ сталкивается с рядом технологических ограничений, которые необходимо учитывать.

В начале исследования необходимо было выбрать селективную стационарную и мобильную фазы [23–25], которые гарантировали бы разделение данной смеси, и определить температурный режим. При этом ставилась задача: максимальный выход ЭГКГ при содержании целевого компонента более 90%мас. Необходимо учитывать следующие аспекты: стабильность сорбента в течение длительного времени, его стоимость и наличие в объеме, необходимом для промышленного производства; мобильная и стационарная фаза должна удовлетворять требованиям, предъявляемым в производстве пищевых продуктов.

Экспериментальная часть

Для выбора стационарной фазы, обеспечивающей селективное разделение смеси зеленого чая [2, 26–28], был исследован ряд сорбентов, характеристики которых представлены в таблице 1.

С этой целью была исследована динамическая активность сорбента, описываемая временем проскока. Исследования осуществлялись на стальной лабораторной установке (длина 1 м, диаметр 0.02 м), снабженной терморубашкой (рис. 2). Установка работала без доступа воздуха, с введением инертного оксида азота при давлении 0.3–0.5 бар, чтобы снизить возможность окисления ЭГКГ. Мобильной фазой или элюентом при лабораторных исследованиях являлась смесь вода-органический растворитель. В верхнюю часть колонны вводили раствор, состоящий из экстракта зеленого чая и элюента в соотношении 1 : 1 в объеме, соответствующем $0.03 \cdot V_{\text{сорбента}}$ (где $V_{\text{сорбента}}$ – загрузка сорбента в колонне). Компоненты зеленого чая элюировались со скоростью 1.5 л/час под давлением 0.5 бар, в зависимости от сил взаимодействия компонентов с сорбентом или их времени удерживания. Отбор фракций (одна фракция – 250 мл) осуществлялся автоматически с интервалом в 10 минут с помощью автосамплера. Состав разделяемой смеси и отобранных фракций анализировался методом жидкостной хроматографии [19–21, 29].

Выбор эффективного элюента (мобильной фазы) для препаративной хроматографии также важный аспект для разработки технологии. Существуют литературные данные, которые описывают использование спиртов, ацетона и этилацетата в качестве полярной мобильной фазы [17, 30]. Стоит отметить, что в нашем случае мобильная фаза должна удовлетворять требованиям, предъявляемым в производстве пищевых продуктов. В связи с этим в качестве элюента был выбран этанол и изопропанол [21, 26]. Другие компоненты не рассматривались.

В рамках данной работы были проведены исследования по влиянию качественного и количественного состава выбранных элюентов в различных температурных режимах: 25 °С, 40 °С и 60 °С. Состав мобильной фазы варьировался для смеси вода-этанол в соотношении 90 : 10; 85 : 15; 80 : 20%об., а смесь вода – изопропанол использовалась только в одном соотношении 90 : 10%об. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что повышение температуры до 40 °С и выше значительно сказывается на увеличении выхода целевого компонента.

Адсорбент после окончания эксперимента регенерировался смесью вода – этанол (60 : 40 %об.) или вода – изопропанол (60 : 40 % об.) соответственно изначально выбранному элюату.

характер, при этом акты адсорбции и десорбции повторяются многократно. Для повышения выхода и чистоты разделяемых компонентов увеличение температуры при десорбции играет положительную роль. Но, с другой стороны, повышение температуры ведет к термической эспиримизации ЭГКГ и, соответственно, к потере основного компонента. Поэтому необходимо было исследовать влияние температуры на качество разделения и выход целевого продукта [21, 22]. Хроматографическое выделение ЭГКГ является сложной технологической задачей, так как этот компонент чувствителен к изменению pH среды. ЭГКГ нестабилен в щелочной среде, что ограничивает выбор элюента и адсорбента. С другой стороны, ЭГКГ очень легко окисляется кислородом воздуха, что требует разработки

Таблица 1. Характеристики сорбентов

Наименование сорбента	Полярность	Матрица	Размер удельной поверхности, м ² /г	Размер частиц, мкм
Amberlite XAD 7	слабо-полярный	акрилат	450	300–1200
Amberchrom CG 71 c	слабо-полярный	метакрилат	450–650	80–160
Diaion HP2MG	слабо-полярный	полиметакрилат	400	250–600
Amberlite XAD 761 (раннее название Duolite)	полярный	поликонденсат фенолформальдегида	150–200	–
Purolite MN 100	полярный	полистирол	1000	300–1200
Purolite MN 200	полярный	полистирол	1000	300–1200
Purolite A 860	–	полистирол модифицированный дивинилбензолом	–	300–1200
Amberlite XAD 1600	–	полимер дивинилбензола	800	300
Amberlite XAD 1180	–	полимер дивинилбензола	550	250–850

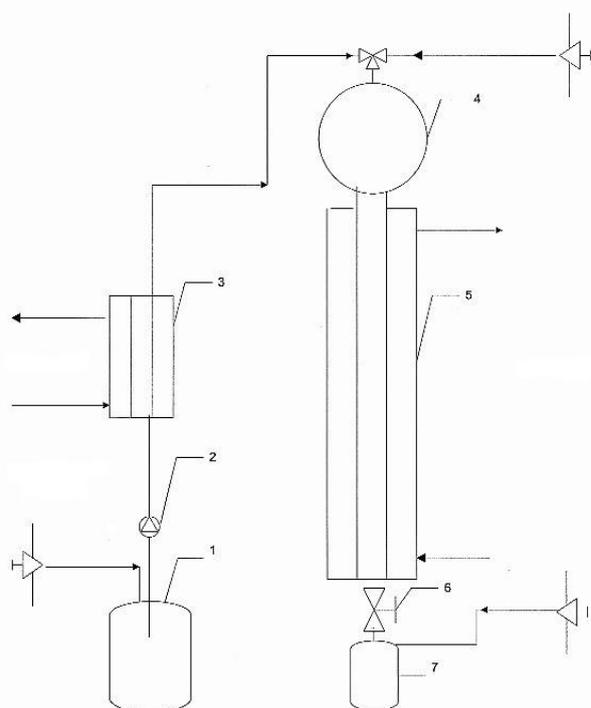


Рис. 2. Схема лабораторной установки периодической хроматографии

1 – сосуд с элементом для ввода газообразного азота под давлением 0.3–0.5 бар, 2 – насос, 3 – термостат для подогрева элюента, 4 – сосуд для ввода экстракта зеленого чая в присутствии газообразного азота под давлением 0.3–0.5 бар, 5 – адсорбционная колонна с терморушашкой для обогрева, 6 – вентиль для сбора фракций, 7 – фракционный сборник

Количественный и качественный анализ отобранных при препаративной хроматографии водно-спиртовых фракций осуществляли на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) Hewlett-Packard System 1100 с UV/VIS, оснащенный автосамплером, градиентным насосом, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки. Для определения количественного состава компонентов зеленого чая использовали колонку с обращенно-фазовым сорбентом Rocket Platinum с размером зерна сорбента 1.5 мкм и размером пор 100^oА. В качестве подвижной фазы использовали раствор 0.05% об. трифторуксусной кислоты в смеси вода-ацетонитрил (87 : 13 % об.). Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 10 мин (табл. 2).

Качественная идентификация компонентов осуществлялась с помощью сравнения времени удерживания внешнего стандарта и компонента смеси. Количественный анализ фракций проводили методом внешних стандартов. Построение градуировочных зависимостей (площади хроматографического пика вещества от его концентрации) осуществляли с использованием стандартных образцов компонентов. Для определения количественного состава были построены калибровочные прямые для каждого компонента смеси в диапазоне концентраций 0.05–2.5 мг/5 мл. Используемые в анализе реагенты представлены в таблице 3.

Таким образом, качественный и количественный состав каждой фракции анализировался методом ВЭЖХ и на основании этих данных строился концентрационный профиль разделения многокомпонентной смеси методом препаративной хроматографии при различных экспериментальных условиях.

Таблица 2. Параметры аналитического метода ВЭЖХ

Наименование	Характеристики
Прибор HPLC	Hewlett-Packard System 1100 с UV/VIS
Колонка	Rocket Platinum EPS 100°А C18, 1.5 мкм
Размер колонки	33 × 7 мм
Мобильная фаза	0.05%об. Трифторуксусная кислота в смеси вода-ацетонитрил (87 : 13 %об.)
Расход мобильной фазы	2.5 мл/минут
Детектор	UV at 210 нм
Предел давления	250 бар
Температура	23 °С
Объем вводимой пробы	1.0 мкл
Реагент для промывки колонки	Вода-ацетонитрил (40:60 % об.)

Таблица 3. Реагенты, используемые в ВЭЖХ

Компоненты	Производитель
Вода	деминерализованная вода, пропущенная через фильтр Millipore, Milli-Q-Gradient, соответствующая требованиям GMP и внутренним стандартам фармацевтической фирмы
Ацетонитрил	LiChrosolv, Merk, Art. no. 1.00030
Трифторуксусная кислота	Sigma, Art. no. T-6508
Галусовая кислота	Fluka, Art. no. 48630
Катехин	Sigma, Art. no. C-1788
Эпикатехингаллат	Sigma, Art. no. E-3893
Эпикатехин	Sigma, Art. no. E-4018
Эпигаллокатехин-3-галлат	Sigma, Art. no. E-4143
Кофеин	Fluka, Art. no. 27600
Галлокатехингаллат	Sigma, Art. no. E-3768

Обсуждение результатов

В результате обработки многочисленных экспериментальных данных были получены концентрационные профили разделяемой смеси для различных типов сорбентов и различных элюентов в диапазоне температур 25, 40 и 60 °С. Эти концентрационные профили показывают распределение компонентов по фракциям в зависимости от времени удерживания на адсорбенте, что является основой для разработки технологии выделения целевого компонента ЭГКГ из многокомпонентной смеси. Критериями выбора оптимального процесса являлось четкое разделение на фракции, при этом целевая фракция должна была иметь концентрацию ЭГКГ более 90%мас. при максимальном его выходе. В результате проведенных хроматографических экспериментов можно все исследуемые сорбенты разделить на 3 группы.

Сорбенты Amberlite 1600, Amberlite 1180 на основе полимера дивинилбензола очень сильно адсорбируют кофеин и такие высокомолекулярные соединения, как теафлавиномоногаллат и дигаллат, теарубин и т.д. Все полифенолы, содержащиеся в экстракте зеленого чая, задерживаются данными типами сорбентов с одинаковой силой и разделение компонентов или фракционирование смеси невозможно на типах сорбентов на основе полимера дивинилбензола. На рисунке 3 представлен концентрационный профиль разделения экстракта зеленого чая на Amberlite 1600. Как следует из графика, время проскока кофеина, а также галусовой кислоты, катехина, эпикатехина и галлокатехингаллата совпадает с ЭГКГ, поэтому невозможно на этих типах адсорбентов разделить компоненты зеленого чая на отдельные составляющие.

Вторую группу образуют полярные сорбенты на базе полистерола: Purolite MN100, Purolite MN200 и Purolite A860. Компоненты зеленого чая при их хроматографическом разделении на таком твердом носителе как Purolite MN100, Purolite MN200 имеют одинаковое время проскока и поэтому фракционирование невозможно (рис. 4). В другом случае целевой компонент ЭГКГ так сильно адсорбируется на Purolite A860, что даже повышение температуры до 40 °С не приводит к его десорбции. Таким образом, адсорбенты на базе полистерола Purolite MN100, Purolite MN200 и Purolite A860 не могут быть рекомендованы для разделения данной смеси.

Третью группу образуют сорбенты на базе акрилата: Amberlite XAD7 (рис. 5, рис. 6) Amberchrom CG 71 (рис. 7), Diaion HP2MG, которые слабо адсорбируют кофеин, галусовую кислоту (ГК), эпикатехин (ЭК). Галлокатехин (ГК) и эпигаллокатехингаллат (ЭГКГ) эффективно задерживаются сорбентом на основе акрилатов и легко десорбируются элюентом вода-этанол и вода-изопропанол при повышении температуры до

40 °С или 60 °С. Как видно на графиках (рис. 5–7), после элюирования около 2000–3500 мл отбирали фракции, обогащенные только целевым компонентом ЭГКГ (5000–6000 мл). Поэтому указанные типы сорбентов могут быть рекомендованы для использования в промышленном масштабе для выделения целевого компонента ЭГКГ из экстракта зеленого чая.

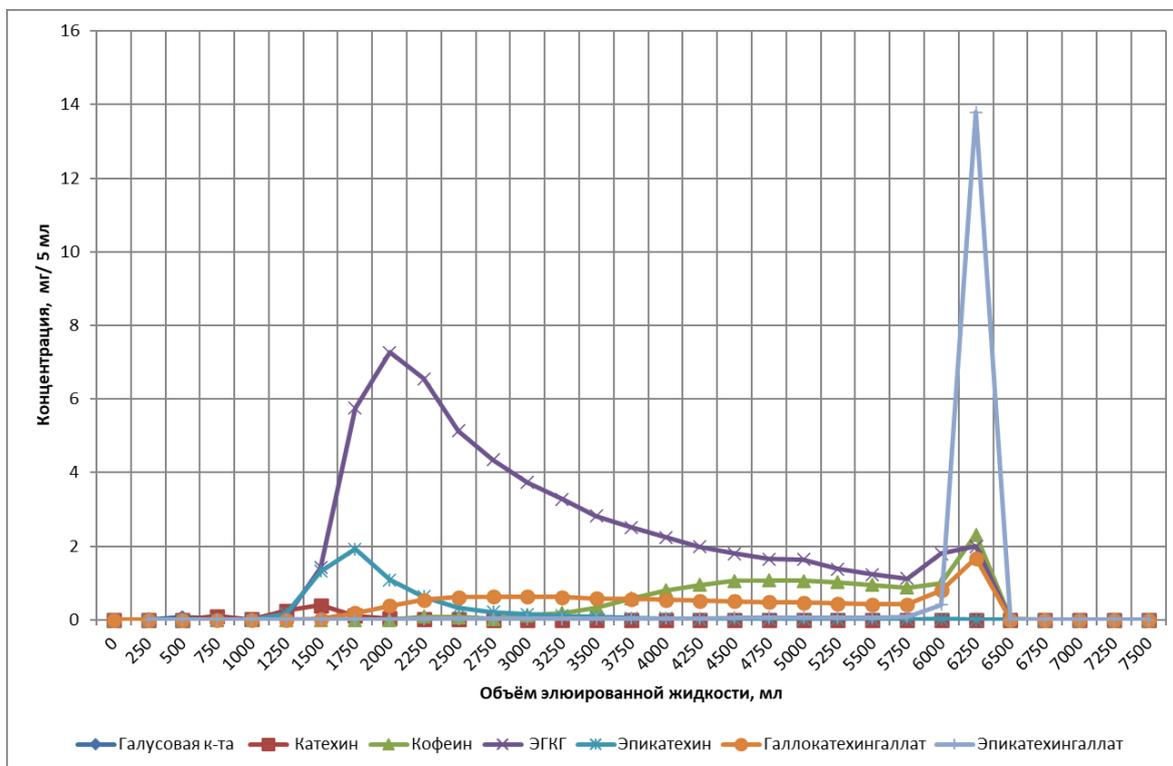


Рис. 3. Концентрационный профиль хроматографического разделения компонентов зеленого чая на Amberlite 1600 при 40 °С; элюент вода – этанол в соотношении 90 : 10%об.

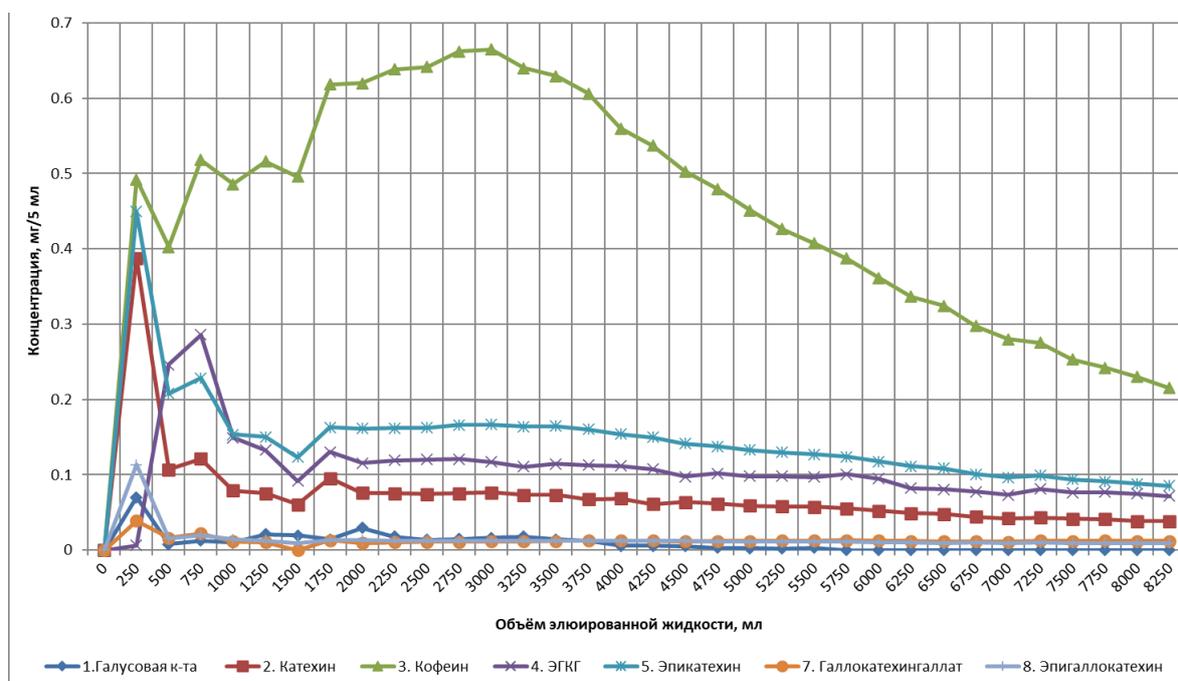


Рис. 4. Концентрационный профиль хроматографического разделения компонентов зеленого чая на Purolite MN 200 при 40 °С; элюент вода – изопропанол в соотношении 90 : 10%об.

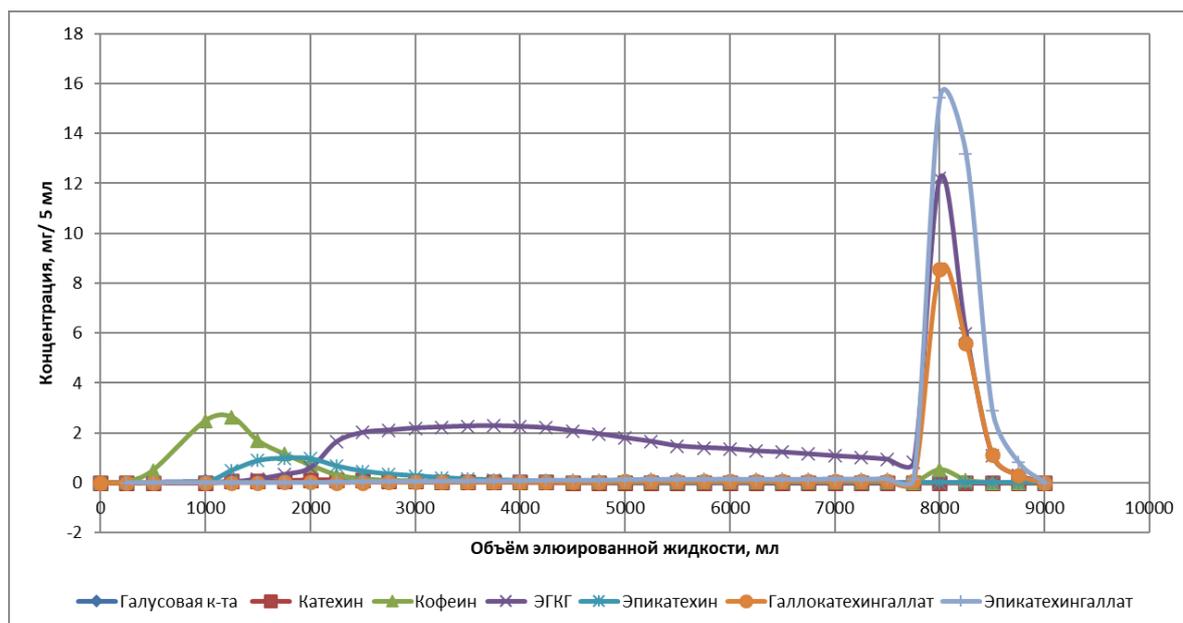


Рис. 5. Концентрационный профиль хроматографического разделения компонентов зеленого чая на Amberlite XAD 7 при 40 °С; элюент вода – изопропанол в соотношении 90 : 10%об.

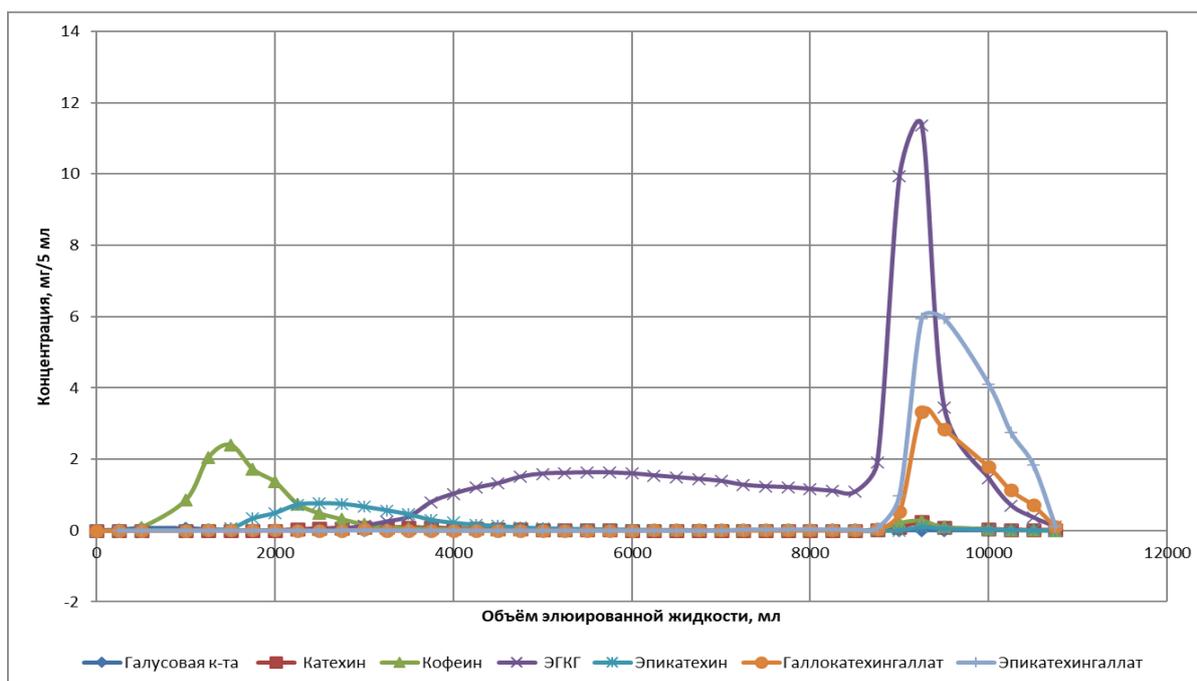


Рис. 6. Концентрационный профиль хроматографического разделения компонентов зеленого чая на Amberlite XAD 7 при 40 °С; элюент вода – этанол в соотношении 90 : 10%об.

В таблице 4 представлено содержание целевого компонента ЭГКГ в экстракте зеленого чая (43%мас.), производимого в Китае фирмой «Guizhou Highyin Biological Products Co» и поступающего на установку препаративной хроматографии (табл. 4). Содержание ЭГКГ в элюате после разделения с использованием полярного сорбента Amberlite XAD 7 составляет 92.1%мас. и выходом 43%мас. (табл. 4).

Таким образом, для технологического разделения экстракта зеленого чая из девяти исследованных сорбентов были выбраны два: Amberlit XAD 7 и Amberchrom CG 71. Дальнейшие эксперименты осуществлялись при варьировании значений температур и концентраций элюирующих смесей: вода – изопропанол и вода – этанол с целью выбора оптимальных значений данных параметров.

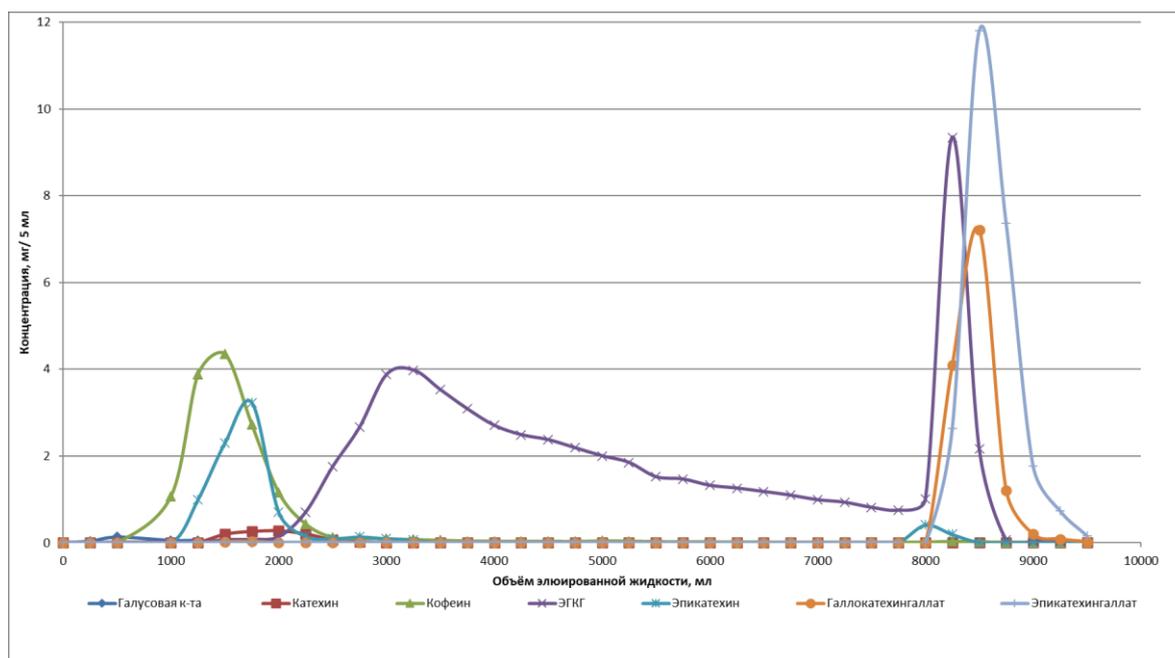


Рис. 7. Концентрационный профиль хроматографического разделения компонентов зеленого чая на Amberchrom CG-71 при 60 °С; элюент вода–этанол в соотношении 90 : 10%об.

Таблица 4. Концентрация разделяемых компонентов зеленого чая до и после разделения на Amberlite XAD 7 при 40 °С; элюент вода – изопропанол в соотношении 90 : 10%об.

Компонент	Состав экстракта зеленого чая*, мас. %	Содержание в целевом элюате, мг/мл	Содержание в целевом элюате, мас. %
Галусовая кислота (ГК)	0.09	0	0.0
Катехин (К)	0.49	21	3.0
Кофеин (Коф)	9.31	1	0.1
Эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ)	43.31	644	92.1
Эпикатехин (ЭК)	4.26	29	4.1
Галлокатехингаллат (ГК)	8.40	3	0.4
Эпикатехингаллат (ЭКГ)	18.63	1	0.1
Сумма**		699	100.0

*Средняя величина состава 7 экстрактов, установленных методом аналитической жидкостной хроматографии.

**Неидентифицированные высокомолекулярные соединения в экстракте зеленого чая составляют 15.5%мас.

Выводы

1. Для промышленного производства целевого компонента эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ) рекомендованы два полярных сорбента на основе акрилатов, а именно Amberlite XAD 7 (американского производителя «Dow Chemical», ранее «Rohm and Haas») и Amberchrom CG 71 (японского производителя «Toso Haas»).

2. Методом препаративной хроматографии удалось выделить из смеси зеленого чая целевой компонент эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ) с концентрацией 92%мас. и выходом целевого продукта 43%мас. при использовании сорбента Amberlite XAD 7.

3. Наилучшее качество целевого продукта ЭГКГ (концентрация 97%мас. при выходе продукта 73%мас.) было достигнуто при разделении методом препаративной хроматографии экстракта зеленого чая на Amberchrom CG 71, так как данный вид адсорбента имеет большую поверхность (размер частиц 80–160 мкм, удельная поверхность 450–650 м²/г) по сравнению с Amberlite XAD 7.

4. Для выделения ЭГКГ методом препаративной хроматографии могут быть равнозначно успешно использованы два элюента: вода–этанол и вода–изопропанол, оба в соотношении 90 : 10%об.

5. Установлено, что наиболее эффективное разделение исследуемой смеси достигается при повышении температуры в диапазоне от 40 до 60 °С, что приводит к увеличению выхода целевого компонента.

Список литературы

1. Scholz E., Bertram B. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch // *Zeitschrift für Phytotherapie*. 1995. Vol. 17. Pp. 235–250.
2. Saito S.T., Gosmann G., Pungartnik C., Brendel M. Grüntee-Extrakt-patente und Nutzungsvielfalt // *Aktuelle Patente auf Lebensmittel, Ernährung & Landwirtschaft*. 2009. Vol. 1. Pp. 203–215.
3. Tachibana H. Green tea polyphenol sensing // *Proceedings of the Japan Academy*. 2011. Vol. 8. N3. Pp. 66–80.
4. Chen D., Wan S.B. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment // *Advances in clinical chemistry*. 2011. Vol. 53. Pp. 155–177.
5. Khan N., Adhami V.M., Mukhtar H. Review: green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies // *Nutrition and Cancer*. 2009. Vol. 61. N6. Pp. 836–841. DOI: 10.1080/01635580903285056.
6. Tachibana H., Koga K., Fujimura Y., Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004. Pp. 380–381. DOI: 10.1038/nsmb743.
7. Xu H., Becker C.M. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo // *Fertility and Sterility*. 2011. Vol. 96. N4. Pp. 1021–1028. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.008.
8. Nihal M., Roelke C.T., Wood G.S. Anti-melanoma effects of vorinostat in combination with polyphenolic antioxidant–epigallocatechin-3-gallate (EGCG) // *Pharmaceutical Research*. 2010. Vol. 27(6). Pp. 1103–1114.
9. Xiao X., Yang Z.Q., Shi L.Q., Liu J., Chen W. Antiviral effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on influenza A virus // *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*. 2008. Vol. 33. Pp. 2678–2682.
10. Aktas O., Prozorovski T., Smorodchenko A., Savaskan N.E., Lauster R., Kloetzel P.M., Infante-Duarte C., Brocke S., Zipp F. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis // *Journal of Immunology*. 2004. Vol. 173(9). Pp. 5794–5800.
11. Lee K.W., Lee H.J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention // *BioFactors*. 2006. Vol. 26. N2. Pp. 105–121.
12. Widlansky M.E., Hamburg N.M. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease // *Journal of the American College of Nutrition*. 2007. Vol. 26. N2. Pp. 95–102.
13. Zhu B.H., Zhan W.H., Li Z.R., Wang Z., He Y.L., Peng J.S., Cai S.R., Ma J.P., Zhang C.H. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis // *World journal of gastroenterology*. 2007. Vol. 13. N8. Pp. 1162–1169.
14. Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea // *British Journal of Pharmacology*. 2013. Vol. 168. Pp. 1059–1073. DOI: 10.1111/bph.12009.
15. Russel M., Lilley T.H., Bailey N.A., Falshaw C.P., Haslam E., Magnotolo D., Begley M.J. Polyphenol – Caffeine Complexation // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1986. Pp. 105–106.
16. Min Z., Peigen X. Quantitative analysis of the active constituents in green tea // *Phytotherapy Research*. 1991. Vol. 5. P. 239.
17. Saijo R. Isolation and chemical structures of two new catechins from fresh tea leaf // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1982. Vol. 46. Pp. 1969–1970.
18. Datenblatt. Epigallocatechin gallate bei Sigma-Aldrich. 2017. Vol. 27.
19. Бидлингмейер Б., Фрайд Б., Хегнауер Г. и др. Препаративная жидкостная хроматография. М.: Мир, 1990. 358 с.
20. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // *Российский химический журнал*. 2003. Т. 47. №1. С. 64–79.
21. Мюльхи Е.П., Андриюхова М.В. Способ выделения активного компонента эпигаллокатехин-3-галлата из зеленого чая с помощью полярного адсорбента // *IV национальная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки и практики в различных отраслях народного хозяйства»*. Пенза, 2021. С. 39–42.
22. Zuo Y., Chen H., Deng Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and puerh teas using HPLC with a photodiode array detector // *Talanta*. 2002. Vol. 57. N2. Pp. 307–316.
23. Лисичкин Г.В., Сердан А.А., Кудрявцев Г.В., Староверов С.М., Юффа А.Я. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии. М., 1986. 248 с.
24. Дробь А.А., Васяров Г.Г., Титова Е.В., Староверов С.М., Якуба Ю.Ф., Гугучкина Т.И. Оптимизация методов ВЭЖХ контроля антоцианового состава вин и виноматериалов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2019. Т. 19. №2. С. 179–186. DOI: 10.17308/sorpchrom.2019.19/736.
25. А.с. 1429016 (СССР). Сорбент для жидкостной хроматографии / С.М. Староверов, В.В. Кротов, П.Н. Нестеренко, Г.В. Лисичкин. – 27.02.1987.
26. Patent 1077211 A3 (EP). Process for the production of epigallocatechin gallate / D. Burdick, H. Egger, A. Gum, I. Koschinski, E. Muelchi, I. Prevot-Halter. – 28.03.2001.
27. Patent 0083270 A1 (US). Process for the production of epigallocatechin gallate / D. Burdick, H. Egger, A. Gum, I. Koschinski, E. Muelchi, I. Prevot-Halter. – 01.05.2003.
28. Patent 097968 A (JA). Method for the production of epigallocatechin gallate / D. Burdick, H. Egger, A. Gum, I. Koschinski, E. Muelchi, I. Prevot-Halter. – 10.04.2001.
29. Wang R., Zhou W., Jiang X. Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56. Pp. 2694–2701. DOI: 10.1021/jf0730338.

30. Рудаков О.Б., Седишев И.П. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом // Известия РАН. Серия химическая. 2003. Вып. 1. С. 52–59.

Поступила в редакцию 5 мая 2021 г.

После переработки 18 июня 2021 г.

Принята к публикации 30 июня 2021 г.

Для цитирования: Мюльхи Е.П., Андриюхова М.В. Разработка технологии хроматографического разделения компонентов зеленого чая в периодическом оформлении процесса // Химия растительного сырья. 2021. №4. С. 327–336. DOI: 10.14258/jcprtm.2021049550.

Muelchi E.P.,¹ Andryukhova M.V.^{2} DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR THE SEPARATION OF THE COMPONENTS FROM GREEN TEA USING THE PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY BY DESIGN OF PERIODICAL PROCESS*

¹ *SwissCo Services AG, Buchweg, 9, Reinach, 4153 (Switzerland)*

² *Altai State Technical University named after I.I. Polzunova, pr. Lenina, 46, Barnaul, 656038 (Russia), e-mail: andryukhova@mail.ru*

Leaves of the green tea plant *camellis sinensis* contain up to 36 % polyphenols. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most interesting polyphenols because it exhibits a strong antioxidant effect. Furthermore, it has been demonstrated that EGCG has an antimutagenic and anticancer effects, an antibacterial effect and a beneficial effect on cholesterol level in blood. Therefore, is needed to isolate EGCG in a pure form in high yield by simple and commercial process. This method for isolation of EGCG contents the following steps: a) selection of macroporous polar resin for the preparative liquid chromatography; b) selection of polar elution solvent; c) determination the temperature and pressure for adsorption and desorption of the polyphenols of the green tea. Therefore, it was searched the interconnection between yield of EGCG and the range of temperature and amount of eluent. Finally, the process for the separation of Epigallocatechin gallate from green tea extract was developed in the laboratory and EGCG was isolated with the concentration 92% by the yield 43%. Accordingly, the technology of EGCG production based on the preparative liquid chromatography was launched and introduced on the market.

Keywords: green tea, polyphenols, Epigallocatechin gallate (EGCG), the preparative liquid chromatography, polar elution solvent, microporous polar resin.

* Corresponding author.

References

1. Scholz E., Bertram B. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 1995, vol. 17, pp. 235–250.
2. Saito S.T., Gosmann G., Pungartnik C., Brendel M. *Aktuelle Patente auf Lebensmittel, Ernährung & Landwirtschaft*, 2009, vol. 1, pp. 203–215.
3. Tachibana H. *Proceedings of the Japan Academy*, 2011, vol. 8, no. 3, pp. 66–80.
4. Chen D., Wan S.B. *Advances in clinical chemistry*, 2011, vol. 53, pp. 155–177.
5. Khan N., Adhami V.M., Mukhtar H. *Nutrition and Cancer*, 2009, vol. 61, no. 6, pp. 836–841. DOI: 10.1080/01635580903285056.
6. Tachibana H., Koga K., Fujimura Y., Yamada K. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, pp. 380–381. DOI: 10.1038/nsmb743.
7. Xu H., Becker C.M. *Fertility and Sterility*, 2011, vol. 96, no. 4, pp. 1021–1028. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.008.
8. Nihal M., Roelke C.T., Wood G.S. *Pharmaceutical Research*, 2010, vol. 27(6), pp. 1103–1114.
9. Xiao X., Yang Z.Q., Shi L.Q., Liu J., Chen W. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 2008, vol. 33, pp. 2678–2682.
10. Aktas O., Prozorovski T., Smorodchenko A., Savaskan N.E., Lauster R., Kloetzel P.M., Infante-Duarte C., Brocke S., Zipp F. *Journal of Immunology*, 2004, vol. 173(9), pp. 5794–5800.
11. Lee K.W., Lee H.J. *BioFactors*, 2006, vol. 26, no. 2, pp. 105–121.
12. Widlansky M.E., Hamburg N.M. *Journal of the American College of Nutrition*, 2007, vol. 26, no. 2, pp. 95–102.
13. Zhu B.H., Zhan W.H., Li Z.R., Wang Z., He Y.L., Peng J.S., Cai S.R., Ma J.P., Zhang C.H. *World journal of gastroenterology*, 2007, vol. 13, no. 8, pp. 1162–1169.
14. Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., Steinmann E. *British Journal of Pharmacology*, 2013, vol. 168, pp. 1059–1073. DOI: 10.1111/bph.12009.
15. Russel M., Lilley T.H., Bailey N.A., Falshaw C.P., Haslam E., Magnotolo D., Begley M.J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1986, pp. 105–106.
16. Min Z., Peigen X. *Phytotherapy Research*, 1991, vol. 5, p. 239.
17. Saijo R. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, vol. 46, pp. 1969–1970.
18. *Datenblatt. Epigallocatechin gallate bei Sigma-Aldrich*. 2017, vol. 27.
19. Bidlingmeyer B., Frayd B., Khegnauyer G. i dr. *Preparativnaya zhidkostnaya khromatografiya*. [Preparative liquid chromatography]. Moscow, 1990, 358 p. (in Russ.).
20. Yashin Ya.I., Yashin A.Ya. *Rossiyskiy khimicheskii zhurnal*, 2003, vol. 47, no. 1, pp. 64–79. (in Russ.).
21. Myul'khi Ye.P., Andryukhova M.V. *IV natsional'naya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Aktual'nyye problemy nauki i praktiki v razlichnykh otraslyakh narodnogo khozyaystva»*. [IV national scientific and practical conference "Actual problems of science and practice in various sectors of the national economy"]. Penza, 2021, pp. 39–42. (in Russ.).
22. Zuo Y., Chen H., Deng Y. *Talanta*, 2002, vol. 57, no. 2, pp. 307–316.
23. Lisichkin G.V., Serdan A.A., Kudryavtsev G.V., Staroverov S.M., Yuffa A.Ya. *Modifitsirovannyye kremnezemy v sorbsii, katalize i khromatografii*. [Modified silicas in sorption, catalysis, and chromatography]. Moscow, 1986, 248 p. (in Russ.).
24. Drob' A.A., Vasiyarov G.G., Titova Ye.V., Staroverov S.M., Yakuba Yu.F., Guguchkina T.I. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 179–186. DOI: 10.17308/sorpchrom.2019.19/736. (in Russ.).
25. Patent 1429016 (USSR). 27.02.1987. (in Russ.).
26. Patent 1077211 A3 (EP). 28.03.2001.
27. Patent 0083270 A1 (US). 01.05.2003.
28. Patent 097968 A (JA). 10.04.2001.
29. Wang R., Zhou W., Jiang X. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, vol. 56, pp. 2694–2701. DOI: 10.1021/jf0730338.
30. Rudakov O.B., Sedishev I.P. *Izvestiya RAN. Seriya khimicheskaya*, 2003, vol. 1, pp. 52–59. (in Russ.).

Received May 5, 2021

Revised June 18, 2021

Accepted June 30, 2021

For citing: Muelchi E.P., Andryukhova M.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 4, pp. 327–336. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021049550.