



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C07C 69/732 (2006.01)
C07C 69/56 (2006.01)
C07C 67/52 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009105341/04, 16.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.02.2009

(45) Опубликовано: 20.10.2010 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 4354035 A, 12.10.1982. CN 1995007 A,
11.07.2007. WO 03/066568 A1, 14.08.2003.
G.Janicsák and I.Máthé «Parallel determination
of rosmarinic and caffeic acids by TLC-
densitometry», Chromatographia, Volume 46,
Numbers 5-6 / Сентябрь 1997 г. Adriana
Vergés, Mikel A. (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН,
патентный отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),
Купера Елена Владимировна (RU),
Рущкова Татьяна Анатольевна (RU),
Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),
Новиков Вячеслав Леонидович (RU),
Глазунов Валерий Петрович (RU),
Козловский Алексей Стефанович (RU),
Попов Александр Михайлович (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к
фармацевтическому производству и касается
способа получения розмариновой кислоты.
Способ получения розмариновой кислоты из
растительного сырья включает экстракцию
водой и очистку, морскую траву
семейства Zosteraceae экстрагируют водой в
течение 6-8 час при комнатной температуре
при добавлении пищевой кислоты до pH 2,5-
3,0, после экстракции полученный раствор

фильтруют, траву прессуют, получая
дополнительный экстракт, экстракты
объединяют, их очистку осуществляют на
мембранном микрофилтре, затем на
хроматографической колонке с полихромом-1,
целевой продукт элюируют 5-7% водным
раствором этилового спирта, концентрируют и
лиофилизуют. Способ обеспечивает
повышение выхода, чистоты розмариновой
кислоты, упрощение способа. 1 з.п. ф-лы, 3 ил.

(56) (продолжение):

Becerro, Teresa Alcoverro and Javier Romero "Variation in multiple traits of vegetative and reproductive seagrass tissues influences plant-herbivore interactions», Oecologia, Volume 151, Number 4 / Апрель 2007 г.
Thomas M. Arnold and Nancy M. Targett "Marine Tannins: The Importance of a Mechanistic Framework for Predicting Ecological Roles» Journal of Chemical Ecology, Volume 28, Number 10 / Октябрь 2002 г.
A.Pavlov, M.Ilieva and M.Mincheva "Release of rosmarinic acid by Lavandula vera MM cell suspension in two-phase culture systems» World Journal of Microbiology and Biotechnology, Volume 17, Number 4 / Июнь 2001 г.
Sang Un Park et al. «Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant» African Journal of Biotechnology, v.7(25), p.49594965, 29.12.2008. T.Milkova et al. «Comparative Study of the Chemical Composition of Zostera marina L. and Zostera nana Roth the Black Sea» Botanica Marina, v.38, 1-6, c.99-102,

RU 2401827 C1

RU 2401827 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 401 827** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C07C 69/732 (2006.01)
C07C 69/56 (2006.01)
C07C 67/52 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2009105341/04, 16.02.2009**

(24) Effective date for property rights:
16.02.2009

(45) Date of publication: **20.10.2010 Bull. 29**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-t 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),
Kupera Elena Vladimirovna (RU),
Rutskova Tat'jana Anatol'evna (RU),
Makhan'kov Vjacheslav Valentinovich (RU),
Novikov Vjacheslav Leonidovich (RU),
Glazunov Valerij Petrovich (RU),
Kozlovskij Aleksej Stefanovich (RU),
Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) **ROSMARINIC ACID SYSNTHESIS METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical production and a rosmarinic acid synthesis method. The method for synthesis of rosmarinic acid from plant material involves extraction with water and purification. Zosteraceae sea grass is extracted with water for 6-8 hours at room temperature while adding edible acid to pH 2.5-3.0. After extraction, the obtained solution is

filtered and the grass is pressed to obtain an extra extract. The extracts are combined and purified on a membrane microfilter and then on a chromatographic column with polychrome-1. The end product is eluated with 5-7% aqueous solution of ethyl alcohol, concentrated and lyophilised.

EFFECT: method is simple and ensures high output and purity of rosmarinic acid.

2 cl, 3 dwg, 3 ex

RU 2 401 827 C1

RU 2 401 827 C1

Изобретение относится к фармацевтическому производству и касается способа получения розмариновой кислоты.

Розмариновая кислота, т.е. ([3-(3,4-Дигидроксифенил)-1-оксо-2Е-пропенил]окси)-3,4-дигидроксibenзопропионовая кислота), является субстанцией, широко используемой в фармакологии и парафармацевтике для производства лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. Она имеет низкую токсичность, быстро выводится из кровотока [Phytochemistry, 62, p.121-125, 2003]. Розмариновая кислота проявляет седативный эффект [RU 2275931 C1, 2006.05.10; JP 2002275061, 2002.09.25], антиоксидантную, противовоспалительную активность [JP 2005272362, 2005.10.06], антимуtagenную, антибактериальную [RU 2006108863, 27.09.2007] и противовирусную активность [RU 2001192257, 2002.11.27], в частности, используется в терапии Herpes simplex.

Розмариновая кислота входит в состав композиций, используемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе при хронической устойчивой стенокардии [RU 2328300 C2, 2008.07.10; CN 1923803, 2007.03.07; JP 4243822, 1992.08.31], кардиоваскулярных и цереброваскулярных заболеваниях [RU 2006136529, 2008.04.27; JP 4243822, 1992.08.31]; в качестве антиаллергического средства [JP 2004097108, 2004.04.02; US 2006134236, 2006.06.22]; для защиты суставов в качестве противовоспалительного и анальгетического средства [KR 2002008211, 2002.11.27]; для лечения язвы желудка [CN 1153778, 1997.07.09], острой и хронической почечной недостаточности [CN 1977834, 2007.06.13], фиброза печени и почек [CN 101095668, 2008.01.02].

Розмариновая кислота применяется в косметическом производстве [Petersen M., Simmonds M-S.J.//Phytochemistry, 62, p.121-125, 2003; RU 2003138141, 2005.06.10].

Традиционными источниками получения розмариновой кислоты и ее производных являются растения видов Boraginaceae и Lamiaceae, в частности Melissa officinalis) и розмарины Rosmarinus officinalis [Petersen M., Simmonds M-S.J.//Phytochemistry, 62, p.121-125, 2003]. Известны также технологические способы получения розмариновой кислоты из культуры клеток тканей растений, например Coleus blumei и Salvia officinalis [Petersen M., Simmonds M-S.J.//Phytochemistry, 62, p.121-125, 2003], Lavanda vera [Georgiev M. et al//Food Chemistry, 94(1), p.111-114, 2006]

Известен способ получения розмариновой кислоты из ароматических растений путем экстракции измельченного сырья спиртом, концентрирования экстракта, растворения остатка в воде, экстракции водной фазы толуолом при pH 4,5, затем метил-трет-бутил эфиром при pH 3,5-4 с добавлением соляной кислоты поэтапно, упаривания эфирного экстракта, растворения его в воде с активированным углем при нагревании, фильтрации, добавки кристаллов розмариновой кислоты в качестве затравки, охлаждения при 0-5°C в течение 6 часов, фильтрования и сушки в вакууме при 60°C в течение 24 час. Выход целевого продукта - 1,08% от веса сырья, чистота - 90,6% от стандарта [WO 03/066568 A1, 2003.08.14].

К недостаткам данного способа относятся длительность и трудоемкость, а также токсичность и пожароопасность.

Известен способ получения розмариновой кислоты путем экстракции сырья методом настаивания, ультразвуковой обработки, добавления антиоксиданта в экстракт, доведения pH экстракта до кислого значения, нагревания, фильтрации и хроматографии на полиамидной смоле, или ионообменной смоле, или крупнопористой смоле на стандартных колонках [CN 1995007 A, 2007.07.11].

К недостаткам способа можно отнести недостаточно высокую степень очистки

целевого продукта на ионообменных смолах, а также необходимость наличия высокотехнологичных ультразвуковых экстракторов.

В качестве прототипа выбран способ получения розмариновой кислоты из *Melissa officinalis* путем экстракции листьев водой при 80-100°C, подкисления экстракта неорганической кислотой pH 2-2,5, фильтрации раствора, дальнейшей экстракции кислого водного раствора органическим растворителем, выбранным из группы, состоящей из органических эфиров, высших спиртов, не смешивающихся с водой, и эфиров алифатических карбоновых кислот; упаривания экстракта, растворения остатка в воде при 40-80°C, отстаивания при 2-8°C в течение 4-14 часов, фильтрации, выпаривания в вакууме до трети объема, отстаивания в течение 2-8 часов с добавлением зародышевых кристаллов, фильтрации, промывки ледяной водой и повторной кристаллизации при 4°C в течение 2 суток, фильтрации, промывки и сушки. Выход целевого продукта - 1,15% от веса сырья (55% от теоретического). Возможна очистка эфирного экстракта на Сефадексе LH-20 в 70% водном метаноле с последующей кристаллизацией [US 4354035, 1982.10.12].

К недостаткам известного способа относятся его многостадийность (15 стадий), использование токсичных и пожароопасных органических растворителей (диэтиловый или диизопропиловый эфиры или н-бутиловый спирт или этилацетат), недостаточно высокий выход целевого продукта. Сырье - *Melissa officinalis* в России не культивируется для промышленной переработки.

Таким образом, широкое применение розмариновой кислоты лимитировано недостаточным ее выпуском в связи с ограниченностью сырьевой базы и сложностью технологических процессов ее производства. В основном выпуск лекарственных средств на ее основе ограничен галеновыми препаратами. В этой связи возникла необходимость в поиске распространенного, постоянно возобновляемого источника сырья и простого, воспроизводимого технологического способа получения розмариновой кислоты.

Поставленная задача решена способом получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включающим экстракцию водой и очистку, в котором согласно изобретению морскую траву семейства *Zosteraceae* экстрагируют водой в течение 6-8 ч при комнатной температуре при добавлении пищевой кислоты до pH 2,5-3,0, после экстракции полученный раствор фильтруют, траву прессуют, получая дополнительный экстракт, экстракты объединяют, их очистку осуществляют на мембранном микрофилт্রে, затем на хроматографической колонке с полихромом-1, целевой продукт элюируют 5-7% водным раствором этилового спирта, концентрируют и лиофилизируют.

С целью дополнительной очистки целевого продукта лиофилизат растворяют в дистиллированной воде, фильтруют, затем кристаллизуют при температуре 4°C и высушивают.

Заявителем было обнаружено, что розмариновая кислота может быть получена простым способом, обеспечивающим более высокий выход и чистоту целевого продукта, из морской травы семейства *Zosteraceae* (*Zostera asiatica* (зостера азиатская), *Z. marina* (зостера морская) и *Phyllospadix iwatensis* (филлоспадикс иватенский)).

Эти многолетние растения произрастают у открытых берегов на глубинах до 10 м, распространены на всем побережье Дальнего Востока. Запасы зостеры практически не ограничены. Ведется промысловая заготовка зостеры для производства пищевых пектинов - препаратов «Зостерин» и «Изостерит».

Заявителем разработана технология получения розмариновой кислоты из морского

растительного сырья при сохранении возможности его использования для дальнейшей промышленной переработки.

Сущность предлагаемого способа состоит в следующем.

5 Морскую траву семейства Zosteraceae промывают питьевой водой, декантируют, измельчают и экстрагируют дистиллированной или деминерализованной водой с постепенным добавлением раствора пищевой кислоты до pH 2,5-3,0 при постоянном перемешивании в течение 6-8 ч при комнатной температуре. После экстракции полученный раствор фильтруют, траву прессуют, получая дополнительный экстракт.
10 Прессованную траву направляют на дальнейшую переработку.

Экстракт фильтруют на мембранном микрофилт্রে (мембрана 6-15 кДа) и наносят на хроматографическую колонку с полихромом-1. Колонку отмывают дистиллированной водой. Полихром-1 (ТУ 6-09-10-1833-88) - продукт полимеризации тетрафторэтилена, часто используется в ГЖХ при анализе высокополярных
15 соединений (воды, кислот, гликолей и т.п.), поскольку неполярная поверхность его лишена адсорбционных центров, и он не обладает каталитической активностью.

Розмариновую кислоту элюируют с колонки 5-7% водным раствором этилового спирта. Элюат концентрируют в вакууме до минимального объема и лиофилизируют.
20 Получают продукт 80-82% степени чистоты в виде порошка светло-желтого цвета. Выход - 3% от веса сырья в пересчете на сухое сырье.

Для получения розмариновой кислоты с более высокой степенью чистоты полученный порошок растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды, фильтруют и кристаллизуют при температуре 4°C. Образовавшиеся кристаллы
25 розмариновой кислоты отфильтровывают и высушивают. Это позволяет получить препарат со степенью чистоты 92-94%. Выход - 2% в пересчете на кристаллизованный продукт (80-85% от теоретического).

Технический результат заключается в повышении выхода, степени чистоты
30 розмариновой кислоты, в упрощении способа (процесс включает 7-8 стадий, способ-прототип - 15 стадий, в заявляемом способе в отличие от прототипа не используются токсичные органические растворители).

На фиг.1 представлено содержание розмариновой кислоты в экстракте *Zostera asiatica* (анализ методом ВЭЖХ)
35 (12,83 - пик, соответствующий времени удерживания розмариновой кислоты).

На фиг.2 приведена ВЭЖХ розмариновой кислоты (чистота 80-85%).

На фиг.3 приведена ВЭЖХ розмариновой кислоты в кристаллах (чистота 92-94%).

Для анализа использовали жидкостный хроматограф "LaChrom" (Merck Hitachi),
40 снабженный насосом L-7100, УФ детектором L-7400, термостатом L-7300, интегратором D-7500 и колонкой Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.5 μm (75 см x 4.6 мм) с защитной колонкой Hypersil ODS, 5 μm (4.0 см x 4.0 мм). Колонку термостатировали при 30°C. Разделение примесей проводили смесью растворителей: А (вода + 1% ледяной уксусной кислоты) и В (ацетонитрил + 1% ледяной уксусной
45 кислоты) в следующем режиме: 0-5 мин - изократический, 90% А, 10% В; 5-35 мин градиентный, 90-10% А, 10-90% В. Скорость подачи растворителей 1 мл/мин. Детектирование проводили при 270 нм.

Осуществление изобретения иллюстрируется следующими примерами.

50 Пример 1. Морскую траву *Zostera asiatica* в количестве 3 кг на сырой вес промывают питьевой водой. Воду сливают. Траву измельчают, загружают в реактор и экстрагируют 10 л дистиллированной воды с постепенным добавлением 5% раствора соляной кислоты до pH 2,5 при постоянном перемешивании в течение 6 ч при

комнатной температуре; рН экстракта поддерживают добавлением 5% раствора соляной кислоты.

После окончания процесса экстракции полученный раствор отфильтровывают, траву прессуют, получая дополнительный экстракт, а прессованную траву отправляют на дальнейшую переработку.

Экстракты объединяют и фильтруют на мембранном микрофилт্রে (мембрана 6-15 кДа), затем наносят на хроматографическую колонку с полихромом-1 с размером частиц 0,5-1 мм (0,5 кг). Промывают колонку дистиллированной или деминерализованной водой (2-3 л). Элюируют розмариновую кислоту 5% водным раствором этилового спирта (1,5 л). Полученный элюат концентрируют упариванием в вакууме до объема 0,5 л и лиофильно высушивают. Получают 8 г розмариновой кислоты в виде порошка светло-желтого цвета. Чистота препарата 80-82% (по данным ВЭЖХ).

Пример 2. Морскую траву *Phyllospadix ivantensis* в количестве 30 кг на сырой вес промывают пресной питьевой водой. Воду сливают. Траву измельчают, загружают в реактор и экстрагируют 100 л деминерализованной воды с добавлением 7% раствора фосфорной кислоты до рН 3,0 при постоянном перемешивании в течение 8 ч при комнатной температуре; рН экстракта поддерживают добавлением 7% раствора фосфорной кислоты.

После окончания процесса экстракции полученный раствор отфильтровывают, траву прессуют, получая дополнительный экстракт, и отправляют на дальнейшую переработку.

Экстракты объединяют, затем фильтруют на мембранном микрофилт্রে (мембрана 6-15 кДа) и наносят на хроматографическую колонку с полихромом-1 с размером частиц 0,5-1 мм (5 кг). Промывают колонку дистиллированной или деминерализованной водой (20-30 л). Элюируют розмариновую кислоту 7% водным раствором этилового спирта (10 л). Затем элюат концентрируют упариванием в вакууме до объема 2 л и лиофильно высушивают.

Полученный порошок светло-желтого цвета растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды, фильтруют и кристаллизуют при температуре 4°C. Образовавшиеся кристаллы розмариновой кислоты отфильтровывают и высушивают. Получают 60 г розмариновой кислоты. Чистота препарата 92-94% (по данным ВЭЖХ).

Пример 3.

Розмариновую кислоту получают, как описано в примере 1 или 2, но в качестве сырья используют *Zostera marina*.

Формула изобретения

1. Способ получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включающий экстракцию водой и очистку, отличающийся тем, что морскую траву семейства *Zosteraceae* экстрагируют водой в течение 6-8 ч при комнатной температуре при добавлении пищевой кислоты до рН 2,5-3,0, после экстракции полученный раствор фильтруют, траву прессуют, получая дополнительный экстракт, экстракты объединяют, их очистку осуществляют на мембранном микрофилт্রে, затем на хроматографической колонке с полихромом-1, целевой продукт элюируют 5-7% водным раствором этилового спирта, концентрируют и лиофилизуют.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что лиофилизат растворяют в дистиллированной воде, фильтруют, затем кристаллизуют при температуре 4°C и

ВЫСУШИВАЮТ.

5

10

15

20

25

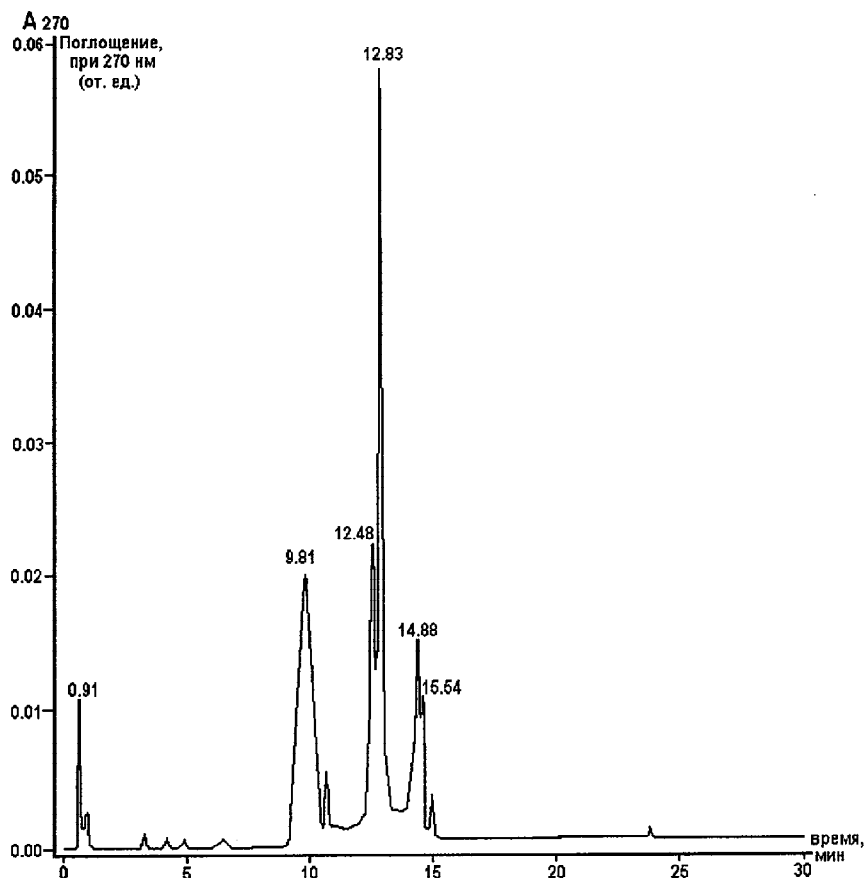
30

35

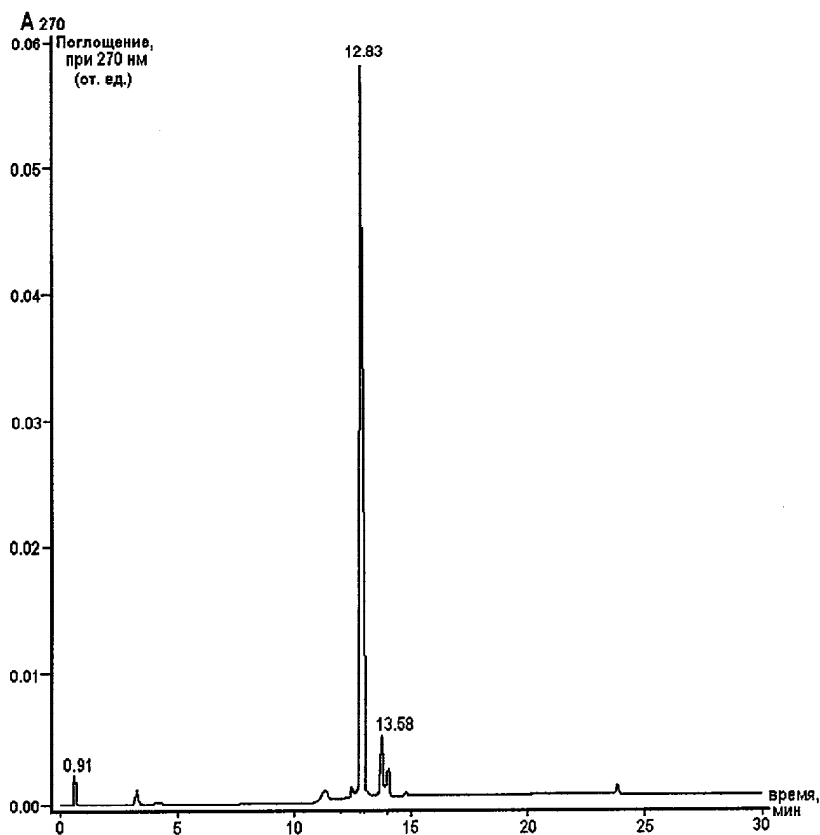
40

45

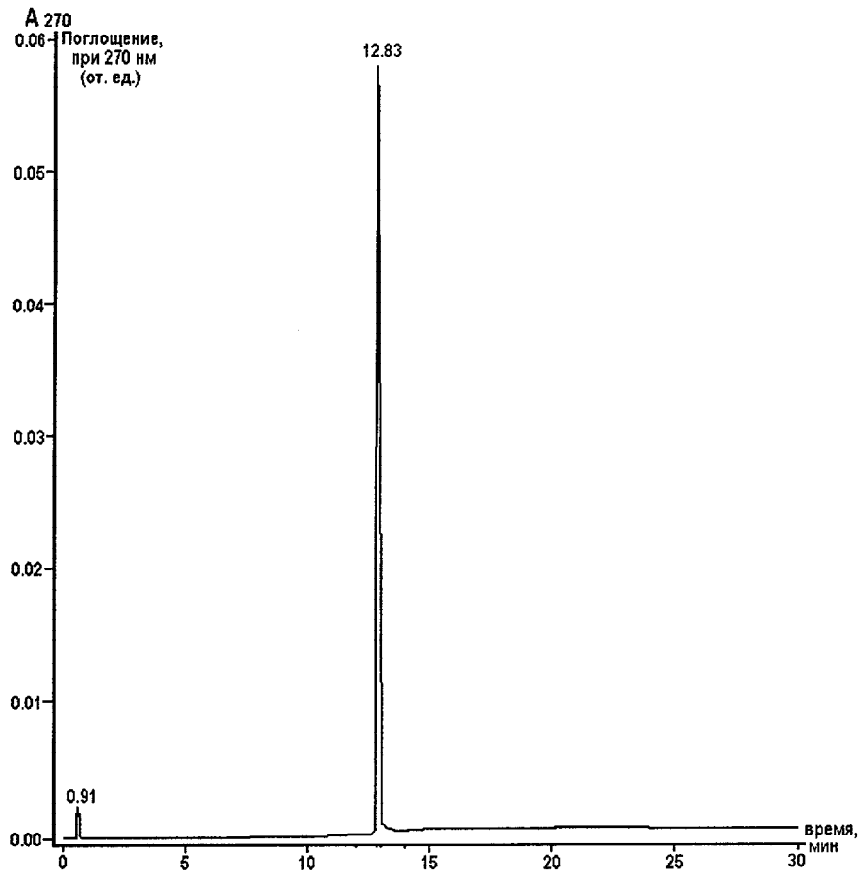
50



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3