



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2013125893/04, 04.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.06.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.06.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2014 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: CN1995007A, 11.07.2007.  
RU2402525C1, 27.10.2010. RU2401827C1,  
20.10.2010. US 20030147974 A1, 07.08.2003

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,  
Институт биологии Коми научного центра УрО  
РАН, Патентно-информационная группа

(72) Автор(ы):

Алексеева Людмила Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биологии Коми  
научного центра Уральского отделения  
Российской академии наук (RU)**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения розмариновой кислоты и может быть использовано в фармацевтической промышленности. Способ включает экстрагирование, фильтрование, хроматографию, элюирование и концентрирование, причем в качестве сырья используют наземную часть растений с высоким содержанием розмариновой кислоты в надземной части, в частности мята полевая, или черноголовка обыкновенная, или черноголовка крупноцветковая, или чистец болотный или их сочетание, и доминирующим

компонентом розмариновой кислоты среди фенолкарбоновых кислот, растения экстрагируют, после экстракции полученный раствор фильтруют, хроматографию проводят на колонке с полиамидом методом фронтальной хроматографии, элюирование осуществляют 60% метанолом, после концентрирования проводят перекристаллизацию. Способ обеспечивает расширение сырьевой базы, обеспечивает получение розмариновой кислоты высокой чистоты с высоким выходом. 5 ил., 2 табл., 6 пр.

**RU**  
**2 541 542**  
**C 2**

**RU**  
**2 541 542**  
**C 2**



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013125893/04, 04.06.2013**(24) Effective date for property rights:  
**04.06.2013**

Priority:

(22) Date of filing: **04.06.2013**(43) Application published: **10.12.2014** Bull. № 34(45) Date of publication: **20.02.2015** Bull. № 5

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 28,  
Institut biologii Komi nauchnogo tsentra UrO RAN,  
Patentno-informatsionnaja grupp**

(72) Inventor(s):

**Alekseeva Ljudmila Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Institut biologii Komi  
nauchnogo tsentra Ural'skogo otdelenija  
Rossijskoj akademii nauk (RU)**

(54) **METHOD FOR PREPARING ROSMARINIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to a method for preparing rosmarinic acid and can be used in pharmaceutical industry. A method involves extraction, filtration, chromatography, elution and concentration; the raw material is presented by an elevated part of plants high in rosmarinic acid in the elevated part, particularly corn mint, or side wort, or big-flowered self, or marsh woundwort or a combination thereof, and a dominating ingredient of rosmarinic acid among

phenolcarboxylic acid; the plants are extracted; after the extraction, the prepared solution is filtered; the chromatography is performed in a polyamide column with by frontal chromatography; the elution is performed with 60% methanol; the concentration follows the re-crystallisation.

EFFECT: method provides extending the raw material base, provides preparing high-purity high-yield rosmarinic acid.

5 dwg, 2 tbl, 6 ex

RU 2 541 542 C 2

RU 2 541 542 C 2

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

Розмариновая кислота - ([3-(3,4-дигидрофосфат)-1-косо-2Е-пропенил]коси]-3,4-пропионовая кислота) широко используется в фармакологии, парафармацевтической промышленности для производства лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. Она имеет низкую токсичность, быстро выводится из кровотока [Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry*, 2003, V.62, №2, P.121-125]. Розмариновая кислота обладает высокой противовоспалительной [Al-Sereiti M.R., Abu-Amer K.M., Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn. ) and its therapeutic potentials // *Indian J. Exper. Biol.* 1999. №37. P.124-130], антимутагенной [Santamaria L., Tateo F., Bianchi A., Bianchi L. *Rosmarinus officinalis* extract inhibits as antioxidant mutagenesis by 8-methoxypsoralen (8-MOP) and benzo[a]pyrene (BP) in *Salmonella typhimurium* // *Med. Biol. Environ.* 1987. №15. P.97-101], противоопухолевой, антипролиферативной [Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Honda G., Sasayama S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells // *Nephrol Dial Transplant.* 2000. №15. P.1140-1145] и антициклооксигеназной [Patrick P., Kalidas S. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro // *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 2004. V.13. №1. P.101-106], антиаллергенной [Ito H., Miyazaki T., Ono M., Sakurai H. Antiallergic activities of rosmarinic acid and its related compounds: chemical and biochemical evaluations // *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 1998. V.6. №7. P.1051-1056], антидепрессантной [Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., Kubo M. Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*) // *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 2002. №22. P.15-22], антивирусной [Dimitrova Z., Dimov B., Manolova N., Pancheva S., Plieva D., Shishkov S. Antitherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts // *Acta Microbiol Bulg.* 1993. V.29. P.65-72] активностью, в том числе против вируса иммунодефицита человека [Mazumder A., Neamati N., Sunder S., Schulz J., Pertz H., Eich E., Pommier V. Curcumin analogues with altered potencies against hiv-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action // *J. Med. Chem.* 1997. V.40. P.3057-3063]. Розмариновая кислота является одним из эффективных натуральных антиоксидантов [Malencic D.J., Gasic O., Popovic M., Boza P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem // *Phytother. Res.* 2000. V.14. P.546-548] и может защищать от свободнорадикальных патологий, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания, лучевая болезнь [Lu Y., Foo L.Y. Polyphenolics of *Salvia* - a review // *Phytochemistry.* 2002. V.75. P.197-202]. Розмариновая кислота входит в состав композиций, используемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [RU 2328300 C2, 2008.07.10], кардиоваскулярных и цереброваскулярных заболеваний [RU 2006136529, 2008.04.27]. Розмариновая кислота применяется в косметическом производстве [Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry.* 2003. V.62, №2. P.121-125].

Традиционными источниками получения розмариновой кислоты и ее производных являются Melissa *officinalis* и розмарин *Rosmarinus officinalis* [Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry.* 2003. V.62, №2. P.121-125].

Известны способы получения розмариновой кислоты из культуры клеток *Coleus blumei* и *Salvia officinalis* [Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry.* 2003. V.62. №2. P.121-125]. Однако все указанные виды произрастают за рубежом и в южных зонах европейской части России с небольшими ареалами произрастания. Актуальным является поиск растений с высоким содержанием розмариновой кислоты, произрастающих на территории России.

Известен способ получения розмариновой кислоты из растений экстракцией

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 ч, фильтрования и сушки в вакууме при 60°C в течение 24 ч. 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 процесса выделения.

В качестве прототипа выбран способ получения розмариновой кислоты из растительного сырья, который включает экстракцию водой морской травы семейства Zosteraceae в течение 6-8 ч при комнатной температуре при добавлении пищевой кислоты до pH 2,5-3,0, последующую фильтрацию полученного раствора с отжимом, очистку экстракта на мембранном микрофилт্রে, затем на хроматографической колонке с полихромом-1 элюирование целевого продукта 5-7% водным раствором этилового спирта, концентрирование и лиофилизирование [RU 2401827, 20.10.2010].

К недостаткам известного способа относятся значительно меньшая растворимость розмариновой кислоты в воде, недостаточно высокий выход целевого продукта. Сырье *Zostera asiatica*, *Zostera marina*, *Phyllospadix iwatensis* имеет ограниченный ареал распространения.

Технический результат изобретения состоит в значительном расширении сырьевой базы и в упрощении способа получения розмариновой кислоты. Новый способ позволяет получить высокий выход и чистоту целевого продукта из наземной части растений, в которых розмариновая кислота является доминирующим компонентом среди фенолкарбоновых кислот.

Технический результат достигается тем, что способ получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включающий экстрагирование, фильтрование, хроматографию, элюирование и концентрирование, согласно изобретению в качестве сырья используют наземную часть растений с высоким содержанием розмариновой кислоты в наземной части и доминирующим компонентом розмариновой кислоты среди фенолкарбоновых кислот, хроматографию проводят на колонке с полиамидом методом фронтальной хроматографии, элюирование осуществляют метанолом, после концентрирования проводят перекристаллизацию, при этом в качестве сырья используют растения: мята полевая, или черноголовка обыкновенная, или черноголовка крупноцветковая, или чистец болотный.

Изобретение поясняется следующими чертежами и таблицами:

в таблице 1 показана экстракция *Stachys palustris* различными экстрагентами;

в таблице 2 показаны данные по содержанию розмариновой кислоты в представителях семейства Lamiaceae;

на рис.1 показан график высокоэффективной жидкостной хроматографии экстракта листьев *Stachys palustris*. По оси абсцисс - время удерживания, пик 3 - розмариновая кислота;

на рис.2 показано изменение концентрации розмариновой кислоты в элюате при хроматографии экстракта листьев *Stachys palustris* 96% метанолом;

на рис.3 изображен график изменения концентрации розмариновой кислоты в элюате при хроматографии экстракта листьев *Stachys palustris* 50% метанолом. Сорбент - диасорб С16;

на рис.4 изображен график изменения концентрации фенолкарбоновых кислот в

элюате при хроматографии экстракта листьев *Stachys palustris* 50% метанолом. Сорбент - полиамид;

на рис.5 - УФ-спектр розмариновой кислоты. По оси абсцисс - длина волны, нм.

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.

Способ осуществляется следующим образом.

В качестве растительного сырья для получения розмариновой кислоты используют наземную часть растений: *Mentha arvensis* L (мята полевая), *Prunella vulgaris* L. (черноголовка обыкновенная), *Prunella grandiflora* L. (черноголовка крупноцветковая), *Stachys palustris* L. (чистец болотный). Их использование обеспечивает более высокий выход и чистоту целевого продукта за счет высокого содержания розмариновой кислоты в надземной части растений. Кроме того, розмариновая кислота является доминирующим компонентом среди фенолкарбоновых кислот указанных растений.

Надземную часть растений высушивали при комнатной температуре и измельчали, экстрагировали 50% метанолом в течение 24 ч при комнатной температуре. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр. Хроматографию осуществляют на колонке с полиамидом (Ferak Berlin). Полиамид в качестве адсорбента широко применяется для разделения и очистки органических соединений за счет хорошей стабильности физико-химических свойств, избирательности адсорбции, легкой десорбции, длительного срока службы, легкого образования замкнутой цепи и экономии средств. Экстракт наносят на колонку до окончания процесса хроматографии (метод фронтальной хроматографии). Розмариновую кислоту элюируют с колонки 60% водным раствором метанола. Элюат концентрируют в вакууме. Для получения розмариновой кислоты с более высокой степенью чистоты полученный порошок перекристаллизовывают, растворив в минимальном количестве дистиллированной воды, фильтруют и кристаллизуют при температуре 4°C. Образовавшиеся кристаллы розмариновой кислоты отфильтровывают и высушивают.

#### Пример 1

Растения *Stachys palustris* 0,1 г экстрагировали 10 мл экстрагента при комнатной температуре 24 ч. В качестве экстрагента для извлечения розмариновой кислоты использовали различные концентрации этанола и метанола в воде, ацетонитрил, бутанол, этилацетат, также 1:1 подкисленные соляной кислотой (0,05%) ранее указанные экстрагенты (табл.1, рис.1). После окончания процесса экстракции полученный раствор отфильтровывали. Определение розмариновой кислоты в экстрактах осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на оборудовании производства «Кнауер»: насос Smartline 1000, детектор UV-VIS Smartline 2500,  $\lambda=330$  нм с использованием колонки Диасорб-130-C18, 7 мкм (250×4 мм) («БиоХимМак», Россия), элюента вода - ацетонитрил - фосфорная кислота (80:20:0.05, по объему) при скорости элюирования 0,7 мл/мин, сравнивая времена удерживания со стандартным образцом розмариновой кислоты.

#### Пример 2

В растениях семейства Lamiaceae: мята полевая, черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, чистец болотный, обнаружено высокое содержание розмариновой кислоты, и она является доминирующим компонентом среди фенолкарбоновых кислот (табл.2). Растения 0,1 г экстрагировали 10 мл 98% метанола

при комнатной температуре 24 ч. Определение розмариновой кислоты в экстрактах осуществляли методом ВЭЖХ, как это было описано в примере 1. Наибольшее содержание розмариновой кислоты обнаружено в надземной части Черноголовка крупноцветковая - 5,24% от сухого веса сырья (табл. 2).

5      Пример 3

Чистец болотный 1 г экстрагировали 100 мл 96% метанола. Согласно примеру 1 экстракция 96% метанолом дает наибольшее содержание розмариновой кислоты. Экстракт наносили на колонку с полиамидом (Ferak Berlin) или диасорбом-100-С16 (БиоХимМак СТ) (масса сорбента 10 г, колонка 120×21 мм) со скоростью 1 мл/мин. 10      Отбирали фракции по 10 мл. По розмариновой кислоте сорбционная емкость выше для полиамида, чем для диасорба. Недостатком хроматографии на сорбентах полиамид и диасорб экстракта растений 98% метанолом является одновременное элюирование с розмариновой кислотой ксантонов (желтая зона) и флавоноидов (темно-желтая зона в УФ-свете), (рис.2).

15      Пример 4

Чистец болотный 1 г экстрагировали 100 мл 50% метанола. Экстракт обрабатывали 100 мл гексана или хлороформа. Кроме гидрофобных соединений в гексан переходит 8,0% розмариновой кислоты, в хлороформ - 1,5% розмариновой кислоты. Таким образом, для устранения недостатка, описанного в примере 3, перед хроматографией 20      осуществляется обработка хлороформом экстракта, позволяющая удалить гидрофобные окрашенные соединения.

Пример 5

Чистец болотный 1 г экстрагировали 100 мл 50% метанола. Розмариновую кислоту выделяли методом фронтального анализа. 170 мл экстракта с концентрацией 25      розмариновой кислоты 0,148 мг/мл наносили на колонку с дисорбом С 16 (масса сорбента 10 г, колонка 120×21 мм) со скоростью 1 мл/мин. Отбирали фракции по 10 мл. Изменение концентрации розмариновой кислоты на выходе из сорбента показано на рис.3. На первом этапе при пропускании экстракта растений чистеца болотного в элюате розмариновая кислота не обнаруживается, поскольку происходит его сорбция 30      в колонке, из колонки элюируются гидрофильные примеси и фенолкарбоновые кислоты (соединение 1 и 2, пики на рис.1). Достигнув предельной сорбционной емкости по розмариновой кислоте, происходит элюирование розмариновой кислоты. После начала элюирования концентрация в элюате розмариновой кислоты растет до 0,197 мг/мл, что существенно превышает значение на входе, а затем уменьшается.

35      Десорбцию розмариновой кислоты осуществляли 20 мл 60% раствором метанола. Содержание розмариновой кислоты в элюате составляет 0,934 мг/мл розмариновой кислоты. Элюат собирали, концентрировали и сушили. В результате десорбции 60% метанолом содержание примесей минимальное. Фронтальная хроматография позволяет 40      получить 25 мг розмариновой кислоты, провести значительное концентрирование розмариновой кислоты, отделить некоторые гидрофильные и гидрофобные примеси.

Пример 6

Чистец болотный 1 г экстрагировали 100 мл 50% метанола. Розмариновую кислоту выделяли методом фронтального анализа, который предусматривает ввод в колонку 45      раствора разделяемой смеси вплоть до окончания процесса (Микеш О. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. М., 1982. Т.1). 170 мл экстракта с концентрацией розмариновой кислоты 0,148 мг/мл наносили на колонку с полиамидом (масса сорбента 10 г, колонка 120×21 мм) со скоростью 1 мл/мин. Отбирали фракции по 10 мл. Изменение концентрации розмариновой кислоты в элюате показано

на рис.4. На первом этапе при пропускании метанольного экстракта растений чистеца болотного в элюате розмариновая кислота не обнаруживается, поскольку происходит его сорбция колонке, из колонки элюируются гидрофильные примеси и фенолкарбоновые кислоты (соединение 1 и 2, пики на рис.1). Достигнув предельной сорбционной емкости по розмариновой кислоте, происходит элюирование розмариновой кислоты. После начала элюирования концентрация в элюате розмариновой кислоты растет до 0,340 мг/мл, что существенно превышает значение на входе, а затем уменьшается.

Десорбцию розмариновой кислоты осуществляли 20 мл 60% раствором метанола.

Содержание розмариновой кислоты в элюате составляет 0,320 мг/мл розмариновой кислоты. Фракции, соответствующие 110-170 мл нанесенного экстракта и 20 мл элюата, собирали, концентрировали и сушили. В результате в собранных фракциях содержание примесей минимальное. Фронтальная хроматография позволила провести значительное концентрирование розмариновой кислоты, отделить гидрофильные и гидрофобные примеси. Фронтальная хроматография позволила получить 25 мг розмариновой кислоты.

Для получения розмариновой кислоты с более высокой степенью чистоты полученный порошок перекристаллизовывают, растворив в минимальном количестве дистиллированной воды, фильтруют и кристаллизуют при температуре 4°C.

Образовавшиеся кристаллы розмариновой кислоты отфильтровывают и высушивают. Чистота препарата 92-94% (по данным ВЭЖХ). УФ-спектр розмариновой кислоты показан на рис.5.

Таблица 1

№ п/п	Растворитель	Содержание розмариновой кислоты, % от сухого веса	Содержание от суммы фенолкарбоновых кислот, %
1	Вода	0,06±0,00	9,2
2	30% этанол	0,06±0,00	7,8
3	50% этанол	1,08±0,05	76,7
4	70% этанол	1,16±0,06	76,9
5	96% этанол	1,15±0,05	99,4
6	30% метанол	0,02±0,00	2,3
7	50% метанол	1,48±0,07	74,2
8	70% метанол	1,71±0,09	90,4
9	96% метанол	1,74±0,09	98,0
10	Ацетонитрил	0,01±0,00	29,3
11	Бутанол	0,03±0,00	12,3
12	Этилацетат	0,04±0,00	20,1
13	Вода подкисленная	0,58±0,03	53,9
14	96% этанол подкисленный	1,30±0,07	98,0
15	96% метанол подкисленный	0,79±0,03	77,7
16	Ацетонитрил подкисленный	0,31±0,01	40,8
17	Бутанол подкисленный	0,10±0,01	98,6
18	Этилацетат подкисленный	0,49±0,03	42,5

Таблица 2

Растения	Места отбора образцов	Содержание розмариновой кислоты, % от сухого веса	Содержание от суммы фенолкарбоновых кислот, %
<i>Mentha arvensis</i> L. мята полевая	Республика Коми, Княжпогостский район	1,16±0,06	81,4
<i>Prunella grandiflora</i> L. Черноголовка крупноцветковая	Свердловская область, Красноуфимский район	5,24±0,10	78,8
<i>Prunella vulgaris</i> L. Черноголовка обыкновенная	Свердловская область, Красноуфимский район	3,12±0,11	87,5

	Stachys palustris L. чистец болотный	Республика Коми, Княжпогостский район	1,74±0,09	98,0
	Ajuga reptans L. живучка ползучая	г.Сыктывкар	0,00	0,0
	Dracoscephalum ruyschiana L. змееголовник Рюйша	Республика Коми, Усть-Цилемский р-н	0,13±0,00	18,2
5	Galeopsis bifida Voenn. пикульник двунадрезный	г.Сыктывкар	0,02±0,00	7,4
	Lamium amplexicaule L. яснотка стеблеобъемлющая	Республика Коми, с.Вьльгорт	0,06±0,00	17,7
	Scutellaria galericulata L. шлемник обыкновенный	г.Сыктывкар	0,07±0,00	67,3

### Формула изобретения

10       Способ получения розмариновой кислоты из растительного сырья, включающий экстрагирование, фильтрование, хроматографию, элюирование и концентрирование, отличающийся тем, что в качестве сырья используют наземную часть растений с высоким содержанием розмариновой кислоты в надземной части, в частности мята полевая, или  
15       черноголовка обыкновенная, или черноголовка крупноцветковая, или чистец болотный или их сочетание, и доминирующим компонентом розмариновой кислоты среди фенолкарбоновых кислот, растения экстрагируют, после экстракции полученный  
20       раствор фильтруют, хроматографию проводят на колонке с полиамидом методом фронтальной хроматографии, элюирование осуществляют 60% метанолом, после концентрирования проводят перекристаллизацию.

25

30

35

40

45



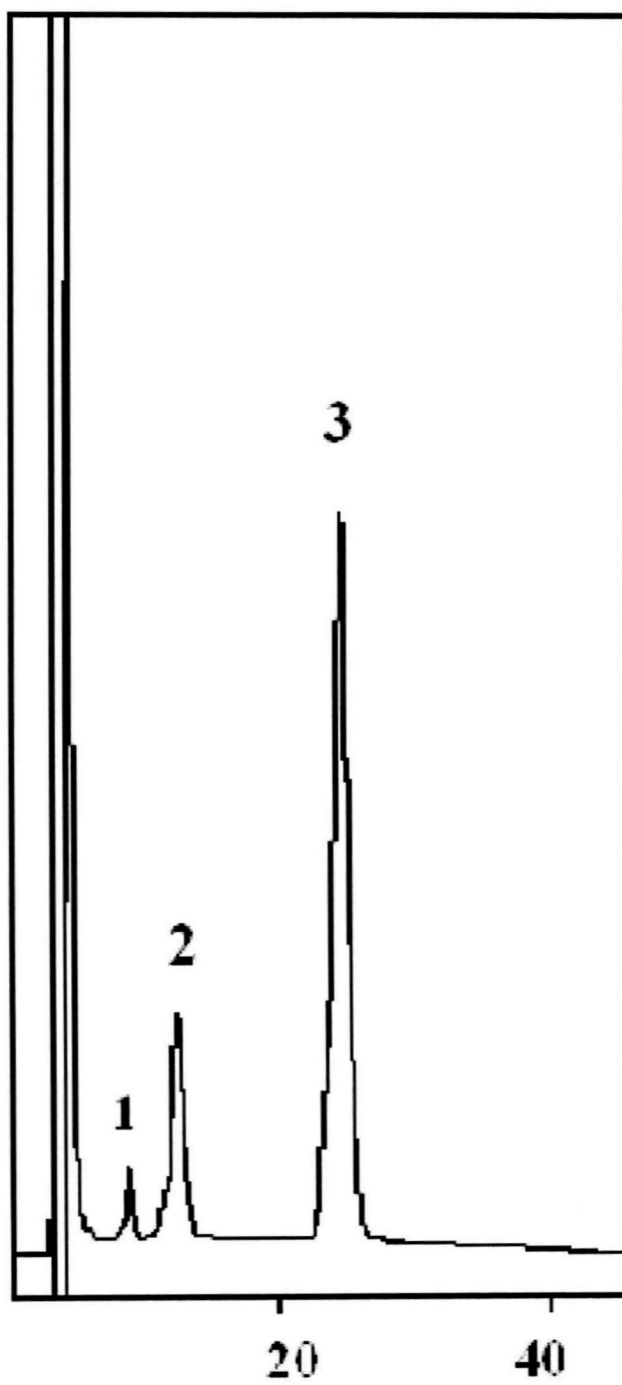


Рис. 1

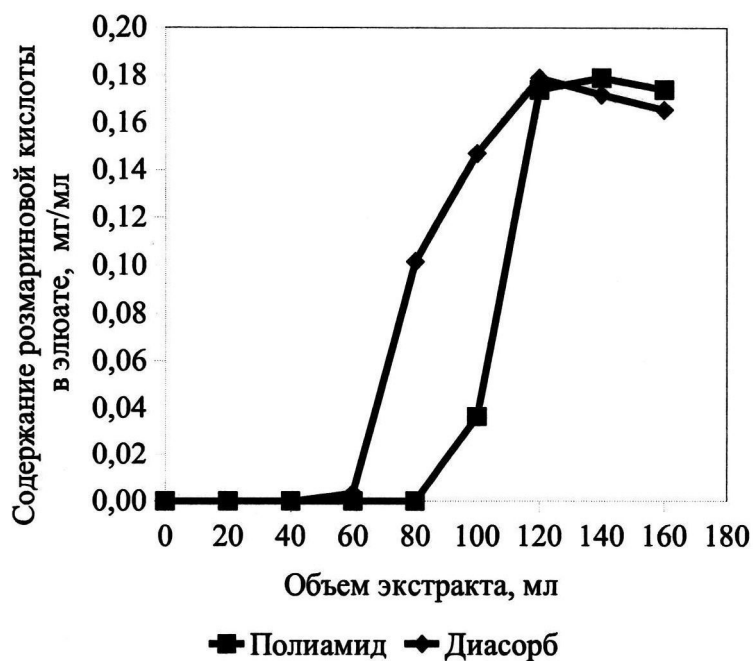


Рис. 2

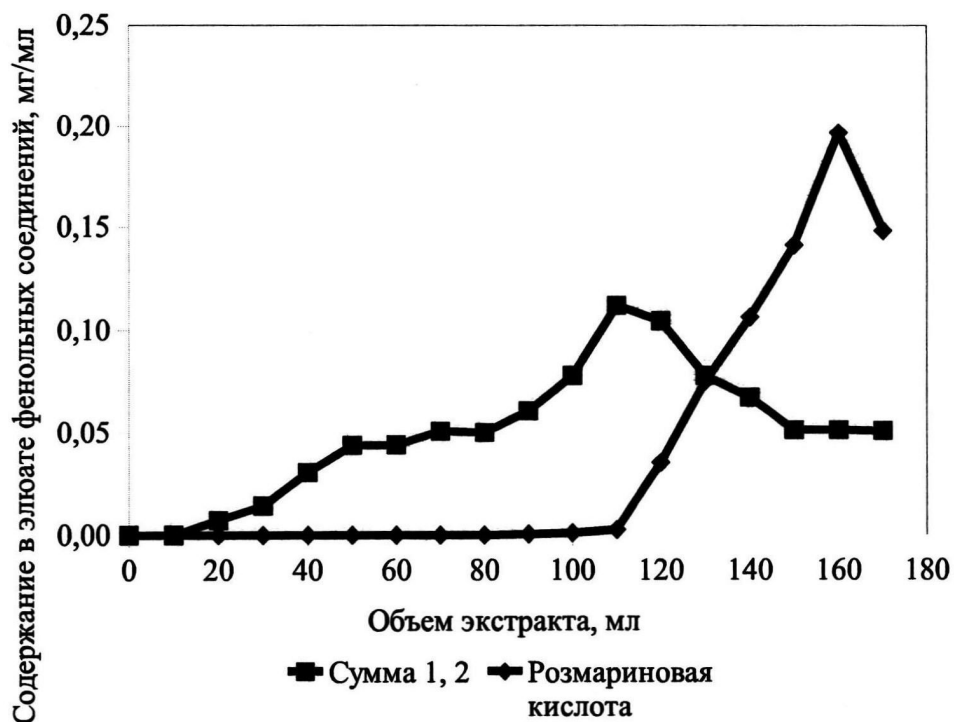


Рис. 3

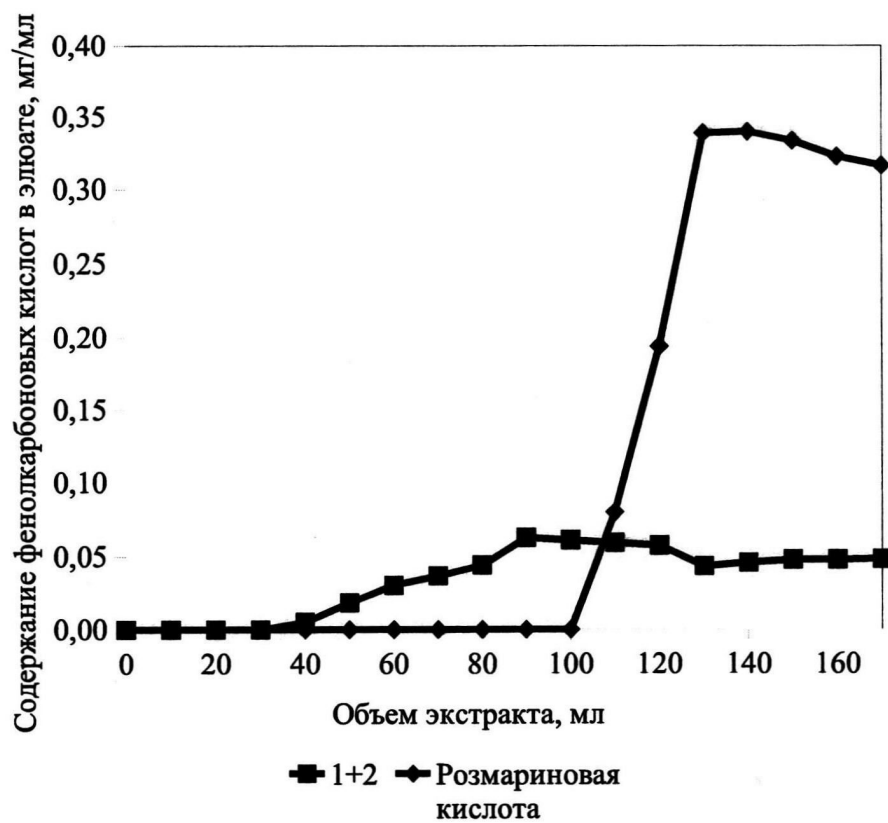


Рис. 4

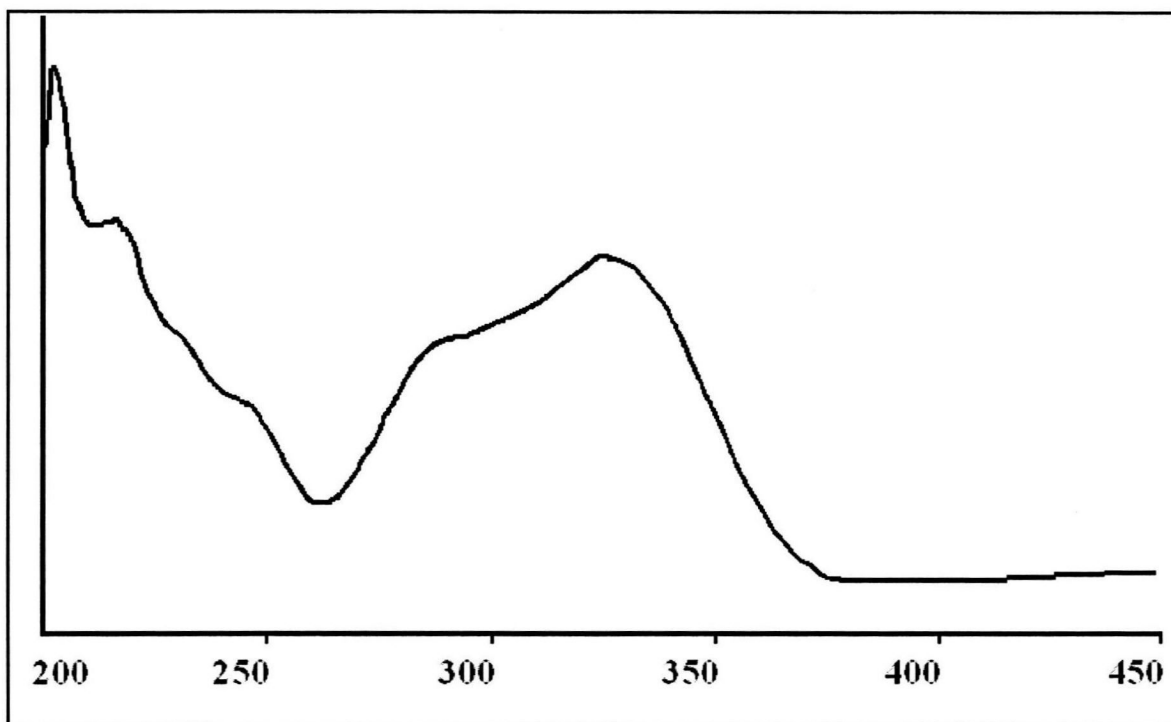


Рис. 5