

Печинский Станислав Витальевич

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ОБОСНОВАНИЕ МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРЫ
НЕКОТОРЫХ КСАНТОФИЛЛОВ И ФЛАВОНОИДОВ
ПУТЕМ ЭНЗИМНОГО СИНТЕЗА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Самара, 2025

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор,
заслуженный работник высшей школы

Оганесян Эдуард Тоникович

Официальные оппоненты:

Клен Елена Эдмундовна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической, аналитической и токсикологической химии, заведующий кафедрой.

Нестерова Ольга Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра химии, заведующий кафедрой.

Курбатова Светлана Викторовна – доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», кафедра физической химии и хроматографии, профессор кафедры.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.

Защита диссертации состоится «__» _____ 202__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171, и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2025/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Распоряжением Правительства Российской Федерации № 1495-р в июне 2023 г. была утверждена Стратегия развития отечественной фармацевтической промышленности на период до 2030 г. Среди задач, которые призвана решить «Стратегия 2030», приоритетной является разработка, внедрение и применение новых ЛС. В этом документе официально обозначены наиболее выраженные угрозы и вызовы для фармацевтической отрасли, и первыми названы технологическое отставание и вытеснение в сегмент дженериков в случае проигрыша в конкурентной борьбе на рынках оригинальных и инновационных ЛП, особенно в сегменте синтеза.

Конкурентоспособность и признание российских препаратов на фармацевтическом рынке возможны только в том случае, если отечественный продукт и его технология будут вписаны в парадигму развития передового мирового фармацевтического производства, приоритетными драйверами которого являются экологичность и экономическая эффективность (Chandra, 2020; Hanefeld, 2021; Enespa, 2023).

Одним из наиболее перспективных ресурсов, позволяющих решать эти вопросы, является концепция «зеленой химии», имеющая статус научного направления с 1998 г. и включающая 12 принципов «зеленого синтеза», которые реализуются различными способами и подходами (Anastas, 1998; Bryan, 2018; Antenucci, 2021; Del Arco, 2021). Среди них наиболее интересным с теоретической точки зрения и перспективным в практическом плане, по нашему мнению, является оптимизация процессов катализа.

Необходимо особо подчеркнуть, что если грамотно выстроить концепцию катализа при синтезе или модификации структуры вещества, то одновременно можно решать такие важные задачи, как снижение энергозатрат, отказ от токсичных растворителей, минимизация использования вспомогательных веществ в ходе синтеза, повышение чистоты и наконец снижение себестоимости целевого продукта (Bezborodov; 2016; Wang, 2021; Federsel, 2021).

В последние годы стало очевидным, что создание ЛС на основе природных соединений осложнено экономически и экологически, кроме того, природные БАС, как правило, характеризуются неудовлетворительными показателями биодоступности. В этой связи модификацию структуры природных БАС путем получения их полусинтетических производных с применением биокаталитических реакций можно признать актуальным направлением исследований.

Степень разработанности темы исследования. За период с 2003 по 2024 гг., в соответствии с данными ВИНТИ РАН, в Российской Федерации диссертационных работ в фармацевтической отрасли по проблемам использования энзимов и биокатализа защищено не было (ВИНТИ РАН, 2024). При этом было выполнено четыре диссертационных исследования на соискание ученой степени доктора химических и доктора биологических наук. Так, Гусаковым А.В. были разработаны экспериментальные и теоретические основы действия «тополитических» целлюлаз, оптимальных для применения в процессах биообработки текстильных материалов (Гусаков А.В., 2005). В работе Понаморевой О.Н. представлено решение комплекса научно-практических задач, связанных с разработкой надежных и высокочувствительных амперометрических биосенсоров на основе целых клеток микроорганизмов и аналитических биотехнологий в области экологического мониторинга

(Понаморева О.Н., 2013). В диссертации Смирнова И.В. проведена разработка новых принципов создания биокатализаторов с заранее заданными функциональными активностями на основе антител, реализующих механизм «ковалентного» катализа (Смирнов И.В., 2017). Максимовой Ю.Г. были выявлены закономерности процессов биокаталитической трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот, протекающих в гетерогенной среде с участием адгезированных бактериальных клеток и биопленок нитрилгидролизующих бактерий, а также иммобилизованных ферментов метаболизма нитрилов, с целью создания эффективного биокатализатора (Максимова Ю.Г., 2016). Таким образом, следует признать низкий уровень развития данного направления в области фармацевтического синтеза в РФ и отсутствие работ в области теоретического и экспериментального обоснования применения биокатализа для направленной модификации структуры природных БАС.

Цель исследования – теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение возможности применения энзимного синтеза для химической модификации биологически активных соединений на примере ксантофиллов и флавоноидов.

Для реализации поставленной цели следует решить следующие **задачи**:

- 1) критически проанализировать опубликованные материалы по изучаемой проблематике и обосновать перспективность изучения энзимного синтеза для направленной модификации БАС;
- 2) провести отбор структур ксантофиллов, флавоноидов и ацильных фрагментов для направленной химической модификации этих природных БАС;
- 3) методами *in silico* теоретически обосновать возможности химической модификации структуры выбранных ксантофиллов и флавоноидов;
- 4) экспериментально подтвердить возможность энзимного синтеза производных каротиноидов;
- 5) обосновать перспективу оптимизации молекул некоторых флавоноидов путем энзимного синтеза;
- 6) изучить антиоксидантную активность синтезированных соединений методом *in vitro*, сравнить полученный результат с теоретическим прогнозом *in silico* и выявить соединения-лидеры.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

- теоретически обоснована возможность химической модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов методами *in silico*;
- построена математическая модель энзимного синтеза сложных эфиров производных каротиноидов;
- предложен способ энзимного синтеза сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина – всего 21 соединение, 19 из которых получены впервые, новизна подтверждена патентами РФ «Синтез полусинтетических производных природных лютеина и астаксантина» (патент РФ № 2702005), «Синтез полусинтетических сложных эфиров природного зеаксантина» (патент РФ № 2739248);
- разработан способ получения субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров, новизна которого подтверждена патентом РФ «Хемоэнзимный способ получения *all-trans*-изомеров субстанций лютеина и зеаксантина» (патент РФ № 2777890);
- предложена математическая модель энзимного синтеза сложных эфиров флавоноидов;

➤ разработан способ получения сложных эфиров флавоноидов – всего 22 соединения, 17 из которых получены впервые, что подтверждено патентами РФ «Синтез сложных эфиров флавоноидов нарингенина, кверцетина, гесперетина» (патент РФ № 2800457) и «Региоселективный энзимный синтез производных кверцетина и мирицетина» (патент РФ № 2806073);

➤ впервые осуществлен региоселективный синтез сложных эфиров кверцетина и мирицетина, что подтверждено патентом РФ «Региоселективный энзимный синтез производных кверцетина и мирицетина» (патент РФ № 2806073);

➤ антиоксидантная активность синтезированных сложных эфиров лютеина, зеаксантина, астаксантина, нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина подтверждена экспериментом *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS^{•+}, выявлены соединения-лидеры.

Теоретическая и практическая значимость. С применением методов *in silico* на примере представителей двух обширных классов природных БАС – каротиноидов и флавоноидов – проведено теоретическое обоснование возможности химической модификации их структуры путем получения сложных эфиров.

Предложенные математические модели энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов (на примере лютеина, зеаксантина, астаксантина) и флавоноидов (на примере нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина) способствуют дальнейшему масштабированию предложенных схем синтеза и их адаптации к производственным условиям.

Единый системный подход к разработке способов энзимного синтеза сложных эфиров на примере изученных ксантофиллов и флавоноидов позволяет использовать предложенные условия для синтеза сложных эфиров других соединений этих классов.

Разработанный способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров демонстрирует принципиальную возможность получения соединений в виде только одной геометрической формы, что может быть использовано для синтеза других соединений, которым присуще наличие геометрических изомеров.

Сравнительный анализ результатов антиоксидантной активности синтезированных соединений, полученных методом *in vitro* и теоретического прогноза *in silico* с определением влияния введенных ацильных фрагментов в молекулы исходных ксантофиллов и флавоноидов, дополняет уже имеющиеся данные по взаимосвязи структура-активность этих классов соединений.

Результаты диссертационного исследования используются в научной работе ФГБНУ «Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений», кафедры фармакологии и фармации Института НМФО ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, в научной и учебной работе кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова», кафедры органической химии и кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Пятигорский медико-фармацевтический институт» – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования. Основные методологические принципы – обеспечение системного и логичного подхода при выполнении исследования, учет и анализ передовых данных по изучаемой проблеме, законодательных документов РФ, нормативных и правовых актов Минздрава РФ.

Диссертационное исследование выполнялось с применением метода комплексного подхода, методов сравнения, группировки, графического метода; метода молекулярного докинга; химических, физических, физико-химических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту:

- обоснование химической модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов методами *in silico*;
- энзимный синтез сложных эфиров ксантофиллов;
- получение *all-trans*-изомеров субстанций лютеина и зеаксантина с использованием энзимного синтеза;
- энзимный синтез сложных эфиров флавоноидов;
- результаты сравнительного анализа антиоксидантной активности синтезированных соединений *in silico* и *in vitro* и выбор соединений-лидеров.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием химических, физико-химических, математических методов, методов компьютерного моделирования *in silico*, что позволило получить воспроизводимые и достоверные результаты. Все данные обработаны математически и являются статистически достоверными.

Результаты и основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» 23 – 25 июня 2016 г., г. Москва; V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения» 6 – 7 декабря 2016 г., г. Пятигорск; 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» 11 – 12 мая 2017 г., г. Пятигорск; Международной научно-практической конференции «Фармацевтическая технология: вчера, сегодня, завтра» 17 – 18 апреля 2019 г., г. Пятигорск; Международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» 10 – 11 июня 2021 г., ВИЛАР, г. Москва; Международной научно-практической конференции «Прорывные научные исследования: проблемы, пределы и возможности» 2 февраля 2023, г. Казань; Международной научной конференции «Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения» 6 – 7 июня 2024 г., ВИЛАР, г. Москва; Международной научно-практической конференции «Глобализация науки: история, современное состояние, перспективы развития», 2 августа 2024 г., г. Саратов.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи диссертационной работы, определены приоритетные экспериментальные и теоретические направления исследования, проведен информационно-патентный поиск. Автором лично осуществлено теоретическое обоснование выбора структур для стереоселективного синтеза субстанций и химической модификации природных соединений методами *in silico*, планирование экспериментальной части работы, при этом авторский вклад в реализацию практических задач является определяющим. Интерпретация экспериментальных данных, систематизация и теоретический анализ результатов исследования проведены лично автором, который непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикации, представлении результатов исследования на научных конференциях и конгрессах. Оформление диссертационного исследования проведено автором самостоятельно.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, тема утверждена на заседании Ученого совета, протокол №13 от 30 июня 2021 г., Протокол № 14 с изменениями от 15 мая 2024 г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1 и 3 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, включая 11 статей, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получено 5 патентов РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 382 страницах печатного текста, содержит 14 таблиц, 83 рисунка. Работа включает следующие разделы: введение, список использованных сокращений, главу 1 (обзор литературы); главу 2 (объекты, материалы, методы исследования); 4 главы собственных исследований; общее заключение; список литературы (389 источников, из которых 344 иностранных), приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Современные принципы, перспективы направленного синтеза и модификации лекарственных средств

В **обзоре литературы** описаны современные принципы дизайна лекарственных средств; биокатализ представлен как составляющая концепции «зеленой химии»; дана характеристика применению биокатализаторов в химическом синтезе и их использованию в фармацевтическом производстве; обсуждены преимущества и недостатки применения биокатализа в фармацевтической отрасли.

На основании анализа данных литературы сделаны выводы о том, что одним из наиболее перспективных путей поиска и последующего производства фармацевтических препаратов является энзимный синтез, который имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным хемокатализом и в ближайшие годы станет основным вектором развития всего органического синтеза. Это связано с тем, что биокатализ снизил себестоимость производства, повысил чистоту целевого продукта, обеспечивая синтез новых ЛС, получение которых по классическим схемам ранее было затруднено или вовсе невозможно, в частности, тех структур, активность которых обусловлена геометрией молекулы и зависит от нее. Стереоселективный энзимный синтез решает проблему получения целевого соединения преимущественно в форме одного из возможных наиболее активных изомеров и позволяет в перспективе повысить эффективность, биодоступность, чистоту и безопасность получаемого препарата. При синтезе новых соединений эксперимент *in silico* экономически более выгоден и требует меньше времени на его проведение, позволяет проводить определение качественного и количественного взаимодействия лиганда с белком для еще не синтезированных соединений, что является ключевыми преимуществами данного метода. Направленная химическая модификация структуры природных соединений – это один из наиболее эффективных способов

потенцирования их фармакологической активности, повышения биологической доступности, снижения токсичности целевых продуктов. Такой подход открывает перспективу создания репрезентативно новых кандидатов для последующих фармакологических исследований с позиции взаимосвязи структура-активность и расширения баз данных для теоретического изучения активности, токсичности и путей деструкции методами *in silico*.

Объекты, материалы и методы исследования

Экспериментальная часть исследования реализована с применением физических, химических, физико-химических, математических методов и методов *in silico*.

Общий дизайн исследования разрабатывался с соблюдением системного подхода и применением универсальных научных методов, в частности, анализа, синтеза, обобщения, научной индукции, логической аналогии и др. (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Задачей теоретического модуля исследования является обоснование, конкретизация и логическое построение экспериментальной части работы. Теоретический фрагмент позволяет прогнозировать практический результат, выбирать перспективные экспериментальные направления, структурировать получаемые экспериментальные данные.

Данные, полученные при реализации практических задач, позволят подтвердить или опровергнуть корректность выдвинутых теоретических предположений и общую концепцию исследования.

Теоретическое обоснование отбора кандидатов для стереоселективного синтеза субстанций и химической модификации природных соединений

Ксантофиллы как кислородсодержащие производные каротиноидов представляют особый интерес за счет более разнообразных химических и фармакологических свойств, по сравнению с каротинами. Каротиноидам присуща избирательность накопления в органах и тканях, и классическим примером такого сродства является максимально высокая, по сравнению с другими тканями, концентрация лютеина и зеаксантина в центре макулы сетчатки человеческого глаза. Высочайшее селективное распределение лютеина и зеаксантина в макуле связано с участием в их транспорте специфических лютеинсвязывающего (STARD3) и зеаксантинсвязывающего (GSTP1) белков. Эту эксклюзивность связывания можно использовать для получения таргетных ЛС путем целенаправленной модификации природных структур ксантофиллов, в частности этерификации лютеина и зеаксантина. Астаксантин не является макулярным ксантофиллом, однако имеет очень близкую с лютеином и зеаксантином структуру, что целесообразно использовать в эксперименте для выяснения взаимосвязи структура-активность в данном ряду соединений.

В процессе модификации структуры мы учитывали то, что эти соединения в связанной форме в биологических средах находятся преимущественно в виде эфиров органических кислот. Поэтому, если в перспективе молекулы ксантофиллов рассматривать как транспортеры ЛС, то логично в реакции этерификации использовать биологически активные кислоты ароматического и гетероциклического рядов с постепенным усложнением их структуры. В качестве исходной модельной кислоты была выбрана бензойная как первый представитель гомологического ряда ароматических кислот. Для более полного и точного понимания закономерностей структура-активность необходимо изучение как можно более репрезентативного круга кандидатов с различной направленностью изменений в структуре. Далее кислоты отбирали по мере постепенного усложнения их структуры и фармакологических свойств, учитывая при этом природу и положение заместителей в ароматическом ядре, а также увеличение молекулярной массы ацильных радикалов из-за наличия атомов кислорода, азота, серы, фтора, а также алифатических радикалов и циклических фрагментов.

Соблюдая принцип «от простого к сложному», в эксперименте *in silico* использовали следующие ацилирующие реагенты: уксусную, пропионовую, янтарную, яблочную, винную, бензойную, 4-метил-бензойную, фенилгликолевую, 2-гидроксibenзойную (салициловую), никотиновую, мефенамовую, нифлумовую, ацетилсалициловую, 4-аминобензойную, 4-аминометилбензойную, ацексамовую, тиапрофеновую кислоты, а также ибупрофен, кетопрофен, флурбипрофен. Таким образом, в качестве кислот выбрано двадцать модельных соединений, которые позволят при небольшой выборке выявить основные факторы, влияющие на закономерности взаимосвязи структура-активность в ряду эфиров ксантофиллов.

Для достоверного прогнозирования *in silico* необходимо иметь оптимальную модель взаимодействия кандидатов со специфическими белками. Предварительно нами была разработана докинговая модель, осуществлена корректировка разработанной модели, что

позволило значительно улучшить получаемые результаты. Поскольку предложенная нами модель оказалась работоспособной и эффективной, характеризующейся валидированными результатами между значениями *in silico* и *in vitro*, далее сочли целесообразным определить взаимодействие белка STARD3 с лютеином, зеаксантином, астаксантином и их эфирами. С этой целью использована программа ArgusLab, GA Dock. Оптимизацию геометрии лиганда проводили полуэмпирическим методом PM3 с помощью программного комплекса GAMESS. Для построения прогностической модели связывания белка STARD3 с ксантофиллами и их эфирами нами была заимствована структура белка, полученная на основании кристаллографического снимка с разрешением 1,74Å лютеин-связывающего белка человека.

Методом молекулярного докинга, в частности путем «гибкой» стыковки, изучена возможность связывания с белком STARD3 PDP 120 сложных эфиров (моно- и дипроизводных) лютеина, зеаксантина и астаксантина, которые далее предполагается синтезировать.

Важной особенностью белка STARD3 является наличие в нем туннелеобразной полости, которая используется для прикрепления холестерина и лютеина при транспортировке (Рисунок 2) и слегка изгибается. Эксперименты по построению модели показали, что структура лиганда должна проходить через эту полость, входящую в состав омега-петли, при этом концевое кольцо ксантофилла должно проникнуть через вход в полость, сильно ограниченную пространственно, что может играть ключевую роль в селективности связывания с белком STARD3.

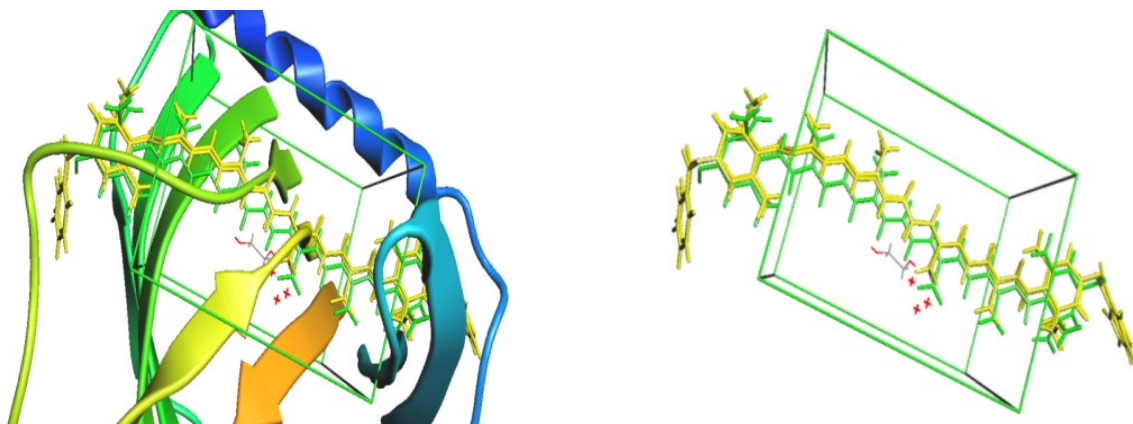


Рисунок 2 – Пространственное расположение лютеина (зеленый), и его эфиров (дibenзоат лютеина и диникотинат лютеина) (желтый) в белке STARD3 код 5I9J

В результате проведенных нами исследований было установлено, что наилучший результат в разработанной модели был получен для молекул лютеина и зеаксантина, с энергией докинга -14,5 и -14,3, соответственно. Все остальные соединения уступают им, что в первую очередь, связано с их природным сродством родоначальных ксантофиллов к данному белку. Как и предполагалось, астаксантин (энергия докинга -8,2) характеризуется низкими значениями связывания с белком, что может свидетельствовать об адекватности разработанной модели, способной с высокой долей вероятности определять взаимодействие лиганда с белком даже при незначительных изменениях структуры.

Анализ данных энергии докинга для диэфиров лютеина (первое значение) и зеаксантина (второе значение) показал, что в ряду алифатических кислот – уксусной (-12,37, -12,19), пропионовой (-12,29, -12,07), янтарной (-12,19, -12,02), яблочной (-10,86, -10,89) и винной (-10,70, -10,64) наблюдается снижение энергии связывания с белком по мере увеличения количества гидроксильных групп. Этерификация азотсодержащими соединениями –

аминобензойной (-8,11, -8,08), аминотетилбензойной (-8,04, -8,01), ацетамидовой (-7,40, -7,37), метилбензойной (-8,53, -8,51), нифлумовой (-8,34, -8,28) кислотами свидетельствует о том, что усложнение структуры ацилирующего компонента приводит к снижению энергии связывания. Установлено, что аминогруппы в боковой цепи также понижают энергию связывания, что менее характерно для азотсодержащих гетероциклов. Сера в структуре тиапрофеновой (-6,20, -6,15) кислоты или фтор в нифлумовой кислоте способствуют резкому снижению энергии связывания. Аналогичная закономерность наблюдается и для моноэфиров изученных ксантофиллов и ацилирующих кислот. Полученные данные свидетельствуют о том, что не все предложенные соединения могут связываться с белком STARD3, а значит, и селективно транспортироваться в орган-мишень. Прогноз *in silico* показал, что молекулы с большими молекулярными массами и разветвленными боковыми цепями характеризуются меньшим сродством с белком, чем более простые молекулы. Переход от ароматических структур к гетероциклическим также оказывает негативное влияние на изучаемое взаимодействие.

Таким образом, с учетом результатов прогноза *in silico* нами были отобраны семь наиболее перспективных, на наш взгляд, кислот для этерификации молекул лютеина, зеаксантина и астаксантина, а именно: бензойная, метилбензойная, фенилгликолевая, никотиновая, салициловая кислоты, ибупрофен и кетопрофен.

Постоянный научный интерес к флавоноидам связан с широким спектром их биологической активности и возросшим числом экспериментально подтвержденных фармакологических свойств. Соединения данного ряда являются природными биологически активными полифенолами, которые в растениях встречаются в виде гликозидов, агликонов и их метилированных производных. Наиболее известными и изученными их свойствами являются антиоксидантная, ангиопротекторная, гепатопротекторная, антибактериальная, антимуtagenная, противоопухолевая и противовирусная активности, две последние представляют особый интерес и перспективу.

Предварительно в эксперименте *in silico* нами была рассмотрена возможность связывания 30 флавоноидов-лигандов и основной протеазы SARS-CoV-2 – 3CLpro. Среди всех анализируемых производных флавонола изучались и мирицетин, и кверцетин, а из производных флаванона – нарингенин и гесперетин. Общий анализ всех структур и их активности позволил предположить, что производные флаванона более активны, чем производные флавонола. Принимая во внимание перспективность видов активности, мы включили мирицетин, кверцетин, нарингенин и гесперетин в эксперимент в качестве базовых структур для дальнейшей оптимизации.

Для сохранения системности и единства эксперимента с ксантофиллами и флавоноидами, а также с целью расширения экспериментальных и теоретических данных по энзимному катализу реакций образования сложных эфиров, в эксперимент в качестве ацилирующих реагентов нами были включены бензойная, салициловая, никотиновая кислоты. Эти кислоты стали общими при модификации соединений из обоих классов БАС. Для выяснения зависимости возможного усиления фармакологических свойств от числа фенольных гидроксильных групп в структуре вводимого ацильного радикала было решено использовать 4-гидроксibenзойную, 2,6-дигидроксibenзойную, 3,4-дигидроксibenзойную (протокатеховую) и 3,4,5-тригидроксibenзойную (галловую) кислоты. Помимо перечисленных выше кислот, в качестве ацилирующего средства нами была выбрана коричная кислота, которая, как известно, в виде циннамоильного фрагмента является структурным звеном, формирующим главную цепь

сопряжения всех производных фенил-бенз-γ-пирана и проявляет антиоксидантную, противомикробную, противоопухолевую и противовоспалительную активности.

С помощью прогностической программы «PASS online» для всех предполагаемых ацилированных ксантофиллов и флавоноидов осуществлен сравнительный анализ антиоксидантной, мембранстабилизирующей и антирадикальной активностей целевых соединений с учетом острой токсичности.

В ряду производных ксантофиллов наблюдается увеличение антиоксидантной активности в следующем порядке по связыванию свободных радикалов: сложные эфиры с ибупрофеном, кетопрофеном, затем с кислотами никотиновой, фенилгликолевой, бензойной, метилбензойной и салициловой. Расчетные значения связывания свободных радикалов превысили таковые исходных ксантофиллов в рассматриваемом ряду начиная с бензойной кислоты. Установлено, что производные ксантофиллов не обладают антивирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 и обладают менее выраженным антиканцерогенным действием по сравнению с исходными ксантофиллами.

В эксперименте *in silico* было установлено, что эфиры коричной кислоты будут обладать более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с исходными флавоноидами. Ацилирование бензойной и салициловой кислотами теоретически потенцирует мембранопротекторное действие и активность в отношении свободных радикалов. Введение никотиновой кислоты должно приводить к появлению гипохолестеринемического эффекта, особенно у эфиров нарингенина и гесперетина.

Острая токсичность, установленная с помощью компьютерного прогноза на ресурсе «PASS online», меньше или сопоставима с родоначальными флавоноидами.

Таким образом, по результатам эксперимента *in silico* для синтеза сложных эфиров мирицетина, кверцетина, нарингенина и гесперетина выбраны бензойная, салициловая, коричная, никотиновая, 4-гидроксibenзойная, 2,6-дигидроксibenзойная, 3,4-дигидроксibenзойная и галловая кислоты.

На примере бензоатов кверцетина с расположением заместителей в положениях C3, C5, C7 и C3', C4' было установлено, что наиболее перспективными будут эфиры по положениям C3 и C4', поскольку их активность выше в сочетании с низкой токсичностью. Аналогичные результаты были получены и для других флавоноидов. Важным моментом является то, что при синтезе эфиров по положениям C5 и C7 будет образовываться большое количество других эфиров в связи с тем, что гидроксигруппы в этих положениях занимают промежуточное положение по активности в реакции этерификации. По этой причине выход целевого продукта всегда будет ниже, чем примесей. Учитывая особенности синтеза, расчетные значения фармакологической активности и токсичности, мы сочли целесообразным разработать методику синтеза эфиров флавоноидов по положениям C3 и C4'.

Экспериментальное обоснование и энзимный синтез производных каротиноидов

Классическая реакция этерификации наиболее полно и быстро протекает в присутствии активных металлов, например цинка, никеля, магния, и сильных кислот – серной или хлористоводородной. Другим необходимым условием является нагревание реакционной смеси, как правило, до 100 °С. Очевидно, что этерификация ксантофиллов требует адаптации традиционных условий ее протекания, что связано с особенностями растворимости

ксантофиллов: они практически не растворимы в воде, но растворимы в неполярных органических растворителях.

Немаловажным фактором является температурный режим: реакция при температурах выше 50 °С приводит к разрушению основного фармакофора ксантофиллов – полиеновой цепи. Другая особенность – это использование металлов и кислот в качестве катализаторов. Помимо основной реакции ацилирования, имеет место выделение водорода из-за взаимодействия металла с кислотой. Вследствие этого в реакционной среде будет происходить частичное или полное гидрирование полиеновой цепи атаксантина, лютеина, зеаксантина, что как следствие, способствует изменению каротиноидной структуры.

Другая проблема, требующая решения, – это стереоспецифичность сложных эфиров, т. е. крайне велика вероятность изомеризации ксантофиллов и их производных в процессе синтеза. Решению этих задач способствует использование в качестве катализаторов энзимов, в частности липаз.

Для накопления экспериментального материала по использованию биокатализаторов в синтезе полусинтетических производных каротиноидов, а также с учетом достаточно широкого ассортимента современных липаз и их популярности у исследователей мы посчитали целесообразным изначально провести эксперимент с участием двух катализаторов: Новозим 435 – иммобилизованной липазы *Candida antarctica* и биокатализатора Amano Lipase PS – иммобилизованной липазы *Pseudomonas cepacia*. Изучение зависимости выхода целевого дибензоата зеаксантина от времени показало, что биокатализатор Amano Lipase PS в первые два часа обеспечивает более высокий выход – 43 %, в то время как Новозим 435 – 38 %. В интервале от трех до шести часов интенсивность выхода превалирует для системы с катализатором Новозим 435 со значением, не превышающим 2 %. Следует отметить, что по истечении шести часов достоверного различия в увеличении выхода целевого продукта при использовании обоих биокатализаторов в синтезе дибензоатов зеаксантина, лютеина и атаксантина не наблюдалось.

Представленные данные позволяют сделать вывод, что использование фермента Amano Lipase PS не создает явных преимуществ по сравнению с Новозим 435. Учитывая собственные результаты и большую коммерческую доступность, весь дальнейший эксперимент по синтезу эфиров каротиноидов проводили с ферментом Новозим 435.

Для впервые разрабатываемой методики синтеза необходимо не только оптимизировать условия проведения реакции, но и изучить влияние всех факторов на процесс как индивидуально, так и совместно. В этой связи было проведено математическое планирование эксперимента, по результатам которого построена математическая модель в виде уравнения регрессии, описывающее количественное влияние факторов на выход продукта, что в дальнейшем позволит оптимизировать процесс синтеза как в лабораторных условиях, так и при масштабировании методики в условиях промышленного производства. В качестве объекта математической модели был выбран дибензоат атаксантина ввиду его большей стабильности в сравнении с эфирами лютеина и зеаксантина.

Первым этапом построения математической модели был выбор значимых факторов и определение важности их влияния. Предварительными экспериментами было установлено, что основными факторами в порядке убывания их влияния на процесс синтеза являются температура, время протекания реакции, количество биокатализатора и скорость перемешивания, которые были включены в план эксперимента (Таблица 1).

Таблица 1 – Условия планирования эксперимента

Уровни планирования	Температура X_1 , °C	Время реакции X_2 , час	Количество биокатализатора X_3 , г	Скорость перемешивания X_4 , об/мин
Основной уровень	40	2,5	1,0	30
Интервал варьирования	5	0,5	0,5	10
Верхний уровень (+1)	45	3,0	1,5	40
Нижний уровень (–1)	35	2,0	0,5	20

Для математического описания вблизи начальных точек поверхности отклика использовали варьирование каждого фактора на двух уровнях +1 и –1. В таком случае число необходимых опытов для реализации всех возможных сочетаний факторов будет равен $N=2^k$, где k – это число факторов равное 4, т. е. необходимо было провести 16 опытов.

Для упрощения расчетов и возможности взаимного сопоставления факторов эксперимента натуральные факторы были перекодированы в безразмерные величины. Построенный полный факторный план включал все опыты, в которых сочетаются все возможные комбинации уровней факторов. Он обладал симметричностью относительно центра эксперимента, критерием оптимизации служило экспериментальное значение выхода продукта синтеза дибензоата астаксантина в процентах.

На основании полученных результатов было составлено опорное уравнение регрессии, имеющее следующий вид:

$$y=49,77+1,295x_1+1,026x_2+0,113x_3+0,440x_4 \quad (1)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с фармакопейным (2,57). Коэффициент Стьюдента для первого ($t_1=7,89$), второго ($t_2=6,25$) и четвертого ($t_4=2,68$) факторов превысил табличное значение, для третьего ($t_3=0,69$) фактора он был меньше табличного значения, что свидетельствует о незначительном влиянии количества биокатализатора на выход продукта синтеза в рассматриваемом интервале, а значит, его количество можно уменьшить.

После оценки значимости влияния факторов на процесс синтеза уравнение приняло окончательный вид:

$$y=49,77+1,295x_1+1,026x_2+0,440x_4 \quad (2)$$

Таким образом, математическое моделирование процесса ацилирования показало количественную взаимосвязь влияния факторов: наибольшее положительное влияние на процесс оказывают температура (t_1) и время реакции (t_2), при этом необходимо учитывать, что при температуре выше 60 °C происходит деградация биокатализатора, поэтому необходимо учитывать баланс между выходом продукта и длительностью использования биокатализатора.

Кроме того, определено, что дополнительным фактором для введения в модель должно быть количество циклов использования биокатализатора. Однако на современном уровне их производства не получается достичь стабильности этого фактора, и количество циклов сильно

отличается от партии к партии. Так, для одних партий биокатализатора количество стабильных циклов использования было на уровне 6, а для других партий 11, что значительно отличается и пока не может быть учтено в математической модели.

Развитие производства биокатализаторов приведет к стабилизации этого фактора, и он впоследствии должен быть добавлен для изучения степени влияния в математическую модель. Это позволит оптимизировать использование биокатализатора не только в однократном, но при многократном применении, что существенно повлияет на экономическую эффективность их использования. К сожалению, в настоящее время параметр «количество циклов использования биокатализатора» не может быть учтен в математической модели, т. к. это свойство энзима относится к неконтролируемым факторам оптимизации.

Для проверки адекватности построенной математической модели в окончательное уравнение регрессии подставляли экспериментальные данные и рассчитывали теоретические значения. Значимость отклонений практических и теоретических значений определяли с использованием критерия Фишера. Расчетное значение критерия Фишера составило 1,39, что не превышает фармакопейное значение этого показателя – $F_{0,95}(15,5) = 2,90$. Таким образом, разработанная модель может быть признана адекватной.

На следующем этапе проведена оптимизация процесса синтеза, и при этом параметром служил выход целевого продукта в процентах от максимального расчетного значения. Для этого использовали метод крутого восхождения. Начальной точкой движения был выбран эксперимент с наилучшими результатами, полученными при построении модели.

Варьирование факторов проводили в соответствии с их влиянием на процесс синтеза и с учетом величины коэффициентов для каждого фактора в окончательном уравнении регрессии. Наибольшее значение коэффициента наблюдается у первого и второго факторов – это температура и время реакции, поэтому их шаг варьирования был максимальным. Для незначимого фактора – количество биокатализатора – значение принимали на минимальном уровне – 0,5 г во всех экспериментах. В результате поиска оптимальных значений в третьем опыте был достигнут максимальный выход продукта синтеза 64,93 %. (Таблица 2).

Таблица 2 – Определение оптимальных параметров синтеза методом крутого восхождения

Характеристика	X ₁ , °C	X ₂ , час	X ₃ , г	X ₄ , об/мин	y, %
Начальная точка движения	45	3,0	0,5	40	52,05
Единица варьирования	5	0,5	–	5	–
Коэффициент в уравнении регрессии	1,295	1,026	–	0,440	–
Опыт 1	50	3,5	0,5	45	56,42
Опыт 2	55	4,0	0,5	50	59,21
Опыт 3	60	4,5	0,5	55	64,93
Опыт 4	65	5,0	0,5	60	55,12

Дальнейшее увеличение значений параметров не приводит к увеличению выхода продукта, что, скорее всего, связано с особенностью свойств биокатализатора, снижением его эффективности при температуре выше 60 °C, о чем свидетельствуют результаты опыта 4.

Путем построения математической модели и поиска оптимальных условий методом крутого восхождения удалось повысить выход целевого продукта на 15 %, а также выявить количественное влияние всех рассматриваемых факторов на процесс синтеза.

Данные, полученные на основе проведенных исследований методом математического планирования эксперимента, показали, что оптимальный выход целевого продукта достигается, если синтез проводить при температуре 60 °С, в течение 4,5 часов, со скоростью перемешивания – 55 об/мин и в присутствии 0,5 г биокатализатора Новозим 435.

Далее в оптимизированных условиях была осуществлена этерификация астаксантина, лютеина, зеаксантина семью wybranнми кислотами. Общая схема получения сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина представлена на рисунке 3. Процесс синтеза контролировали методом ВЭЖХ в разработанных нами условиях. Анализу подвергали пробы из реакционной смеси до начала и по окончании синтеза, после очистки на колонке, а также целевые продукты реакции (Рисунки 4 – 6, на примере синтеза дибензоата астаксантина).

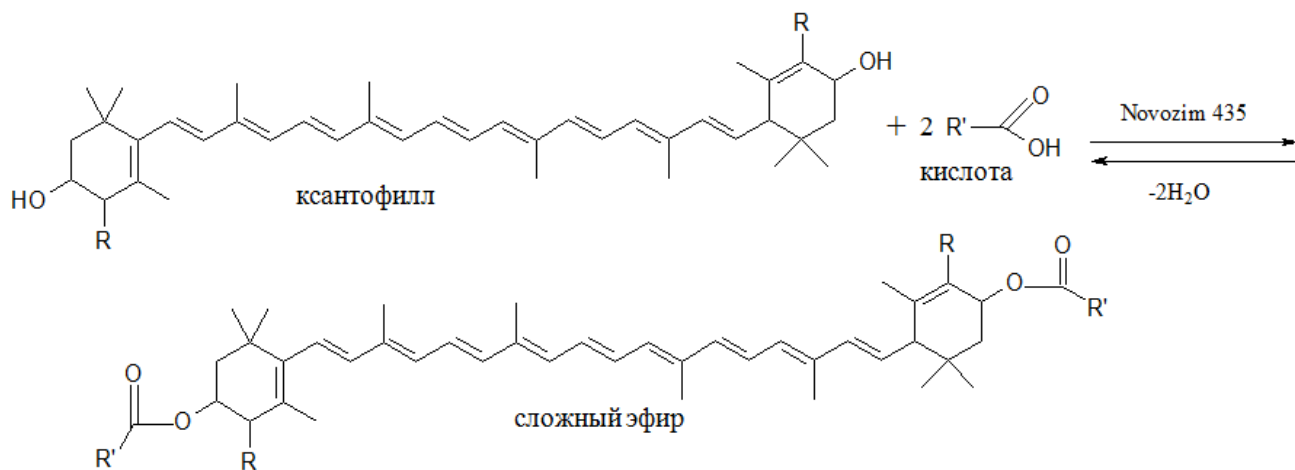


Рисунок 3 – Общая схема синтеза сложных эфиров ксантофиллов

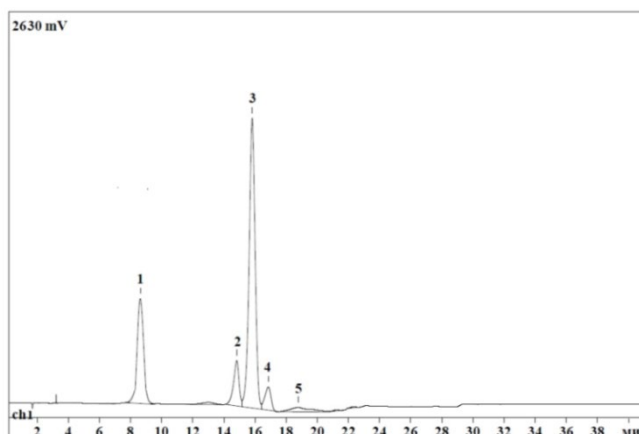


Рисунок 4 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза дибензоата астаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пики 2, 4, 5 – изомеры астаксантина, пик 3 – астаксантин

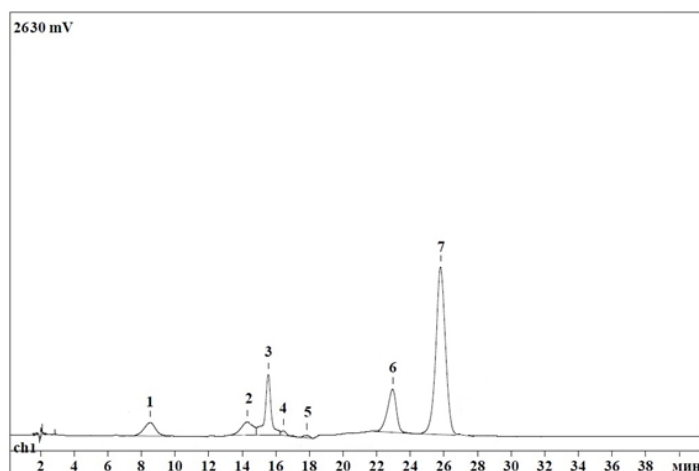


Рисунок 5 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза дибензоата атаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пики 2, 4, 5 – изомеры атаксантина, пик 3 – атаксантин, пик 6 – монобензоат атаксантина, пик 7 – дибензоат атаксантина

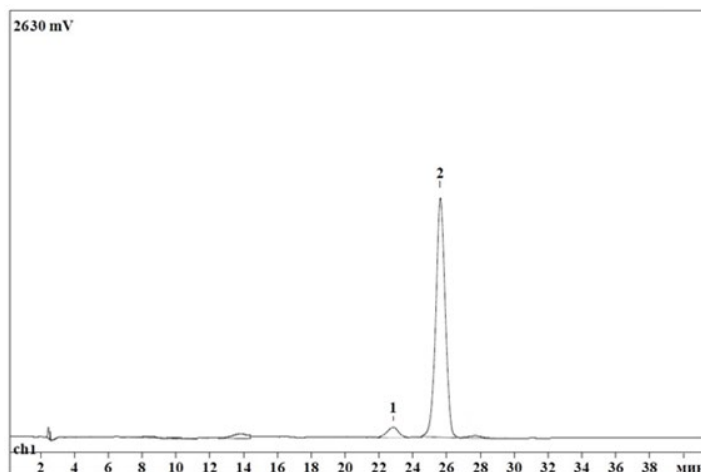


Рисунок 6 – Хроматограмма дибензоата атаксантина после очистки на колонке: пик 1 – монобензоат атаксантина, пик 2 – дибензоат атаксантина

Для всех синтезированных сложных эфиров была определена температура плавления, значение которой достоверно отличалось от температуры плавления исходных соединений, что может косвенно свидетельствовать об образовании сложных эфиров в процессе синтеза.

С целью подтверждения структур синтезированных новых сложных эфиров атаксантина, лютеина и зеаксантина нами использован метод ЯМР спектроскопии. Следует отметить, что для синтезированных эфиров ксантофиллов наиболее чувствительными и информативными являются ^1H ЯМР спектры, а для получения дополнительной информации, подтверждающей структуру, проанализированы ^{13}C спектры.

В структуре синтезированных соединений можно выделить четыре характерных фрагмента – это полиеновая цепь (Рисунок 7), метильные группы (Рисунок 8), концевая циклогесеновая группа ксантофилла (Рисунки 9 – 11) и введенный в структуру ацильный остаток (Рисунок 12). Каждый фрагмент имеет свои особенности при идентификации структуры, поэтому при анализе ^1H ЯМР спектра необходимо учитывать, что мультиплеты в полиеновой области могут быть значительно уширены из-за спиновых взаимодействий, а в

алифатических областях сигнал может быть скрыт сильными метильными сигналами или сигналами примесей.

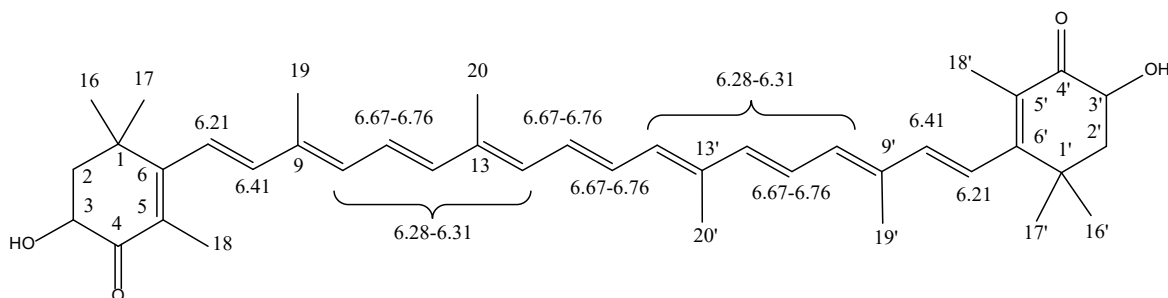


Рисунок 7 – Сигналы полиеновой цепи ^1H ЯМР спектра астаксантина

Для полиеновой структуры ксантофиллов характерны следующие сигналы: 6,12-6,21 для двух протонов в положениях $\text{C}7$ и $\text{C}7'$; 6,14-6,41 – в положениях у $\text{C}8$ и $\text{C}8'$; мультиплет 6,18-6,31 для шести протонов при $\text{C}10$, $\text{C}10'$, $\text{C}12$, $\text{C}12'$, $\text{C}14$, $\text{C}14'$ и мультиплет 6,67-6,76 для четырех протонов у $\text{C}11$, $\text{C}11'$, $\text{C}15$, $\text{C}15'$ атомов.

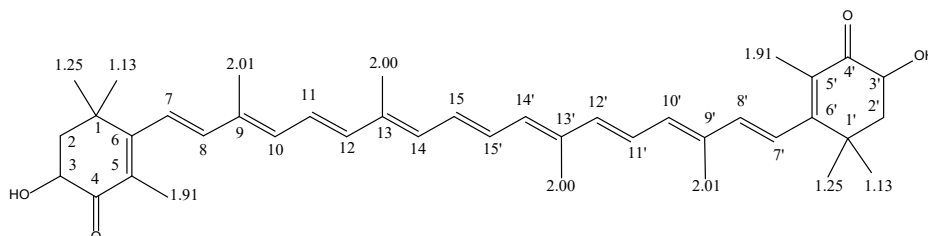


Рисунок 8 – Сигналы метильных групп ^1H ЯМР спектра астаксантина

Заместители в положениях $\text{C}1$ и $\text{C}1'$, а именно метильные группы, имеют сильные характерные сигналы при $\text{C}17$, $\text{C}17'$ – 1,13-1,25, $\text{C}16$, $\text{C}16'$ – 1,13-1,25, в положениях $\text{C}5$ и $\text{C}5'$ сигнал протонов 1,91-1,92 для $\text{C}18$ и $\text{C}18'$; в положении $\text{C}13$ и $\text{C}13'$ – 1,99-2,00 ($\text{C}20$ и $\text{C}20'$), положениях $\text{C}9$ и $\text{C}9'$ – 2,00-2,01 для протонов при $\text{C}19$ и $\text{C}19'$.

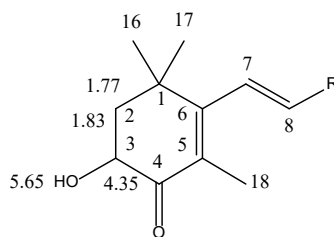


Рисунок 9 – Сигналы концевых групп ^1H ЯМР спектра астаксантина

Для сигналов концевых циклогексеновых фрагментов можно выделить два сигнала протонов в положениях $\text{C}2$ и $\text{C}2'$, расположенных по разные стороны плоскости молекулы 1,77eq и 1,83ax, сигнал протона в положениях $\text{C}3$ и $\text{C}3'$ – 4,35 сигнал 5,65 характерный для протонов гидроксильных групп в положениях $\text{C}3$ и $\text{C}3'$.

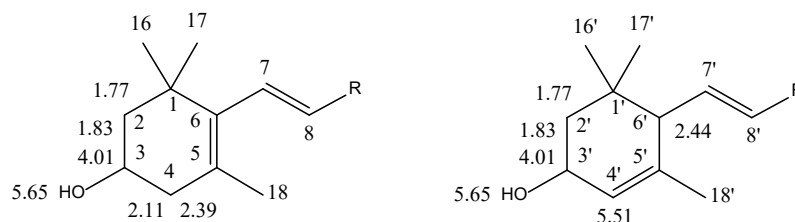


Рисунок 10 – Диаграммы сигналов концевых групп ^1H ЯМР спектра лютеина

Зеаксантин в отличие от лютеина имеет симметричную структуру концевых групп, главное отличие от лютеина – это отсутствие полосы 2,44, характерной для водорода в положении С6'.

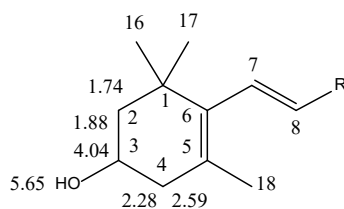


Рисунок 11 – Диаграммы сигналов концевых групп ^1H ЯМР спектра зеаксантина

Кислоты, введенные в структуру для получения сложных эфиров, также имеют характерные сигналы. На рисунке 11 представлены характерные сигналы радикалов на ^1H ЯМР спектрах сложных эфиров ксантофиллов.

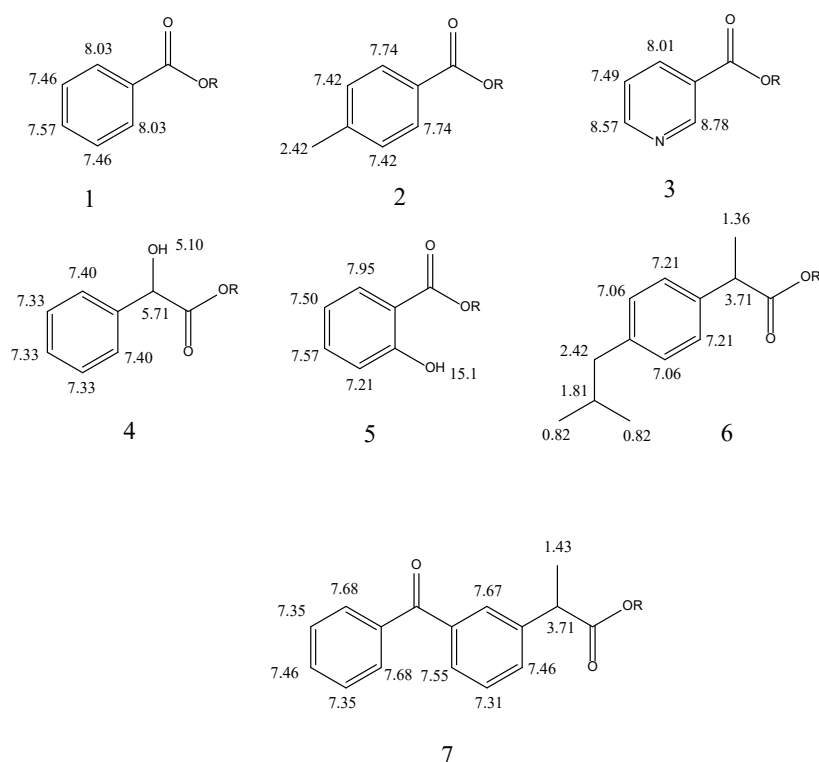


Рисунок 12 – Диаграммы сигналов ацильных радикалов ^1H ЯМР спектра сложных эфиров

При образовании сложноэфирной связи наблюдаются изменения сигналов в ближайших атомах: так, в бензойной кислоте сигналы водородов в метоположении имеют значение 8,07, тогда как в синтезированных соединениях – 8,03. В астаксантине в положениях С2, С2' и С3, С3' наблюдаются сдвиги до образования эфира – 1,39, 1,61, 4,35, после – 1,77, 1,83 и 5,41, соответственно. Похожие изменения характерны и для других синтезированных производных каротиноидов.

Для удобства идентификации синтезированных соединений в ^{13}C ЯМР спектре анализировали четыре наиболее значимых фрагмента структуры: полиеновая цепь (Рисунок 13), метильные группы (Рисунок 14), концевые циклогексеновые ядра ксантофилла (Рисунки 15 – 17) и введенный в структуру ацильный остаток (Рисунок 18).

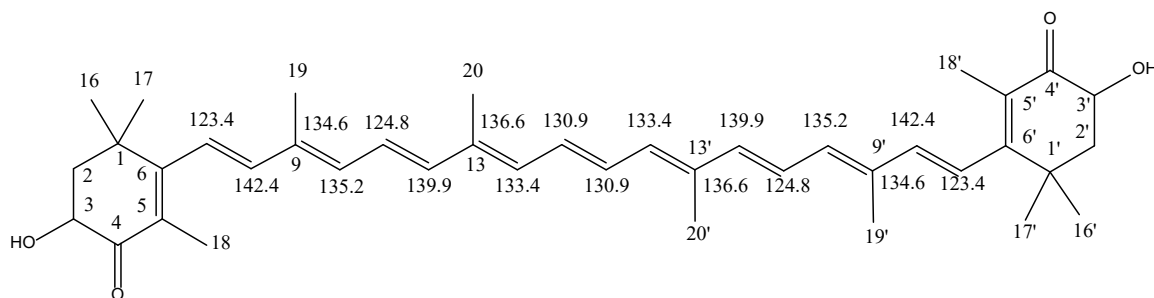


Рисунок 13 – Сигналы полиеновой цепи ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

Для полиеновой структуры характерны следующие сигналы в ^{13}C ЯМР спектре для углеродов в положениях C7 и C7' – 123,4-128,4, C11 и C11' – 124,5-124,8, C15 и C15' – 130,0-130, C14 и C14' – 132,5-139,9, C9 и C9' – 134,6-135,0, C10 и C10' – 131,1-135,2, C13 и C13' – 136,2-136,5, C12 и C12' – 137,3-139,9, C8 и C8' – 138,1-142,4.

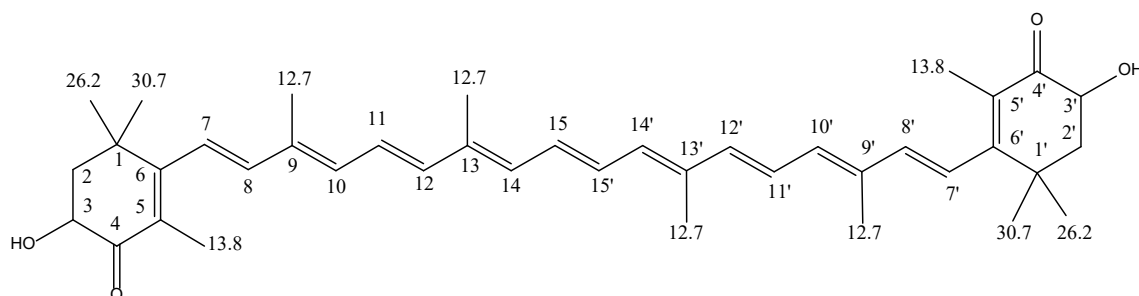


Рисунок 14 – Сигналы атомов углеродов метильных групп ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

Углеродные атомы метильных групп имеют характерные сигналы в положениях C16, C16' – 24,4-28,8, C17, C17' – 30,1-30,7, в положениях C18 и C18' сигнал 13,8-22,8, C19 и C19', C20 и C20' – 12,7-13,0.

Для атомов углерода концевых циклогексановых фрагментов наблюдались следующие сигналы в положениях C1 и C1' – 36,9, C2 и C2' – 45,6, C3 и C3' – 69,2, C5 и C5' – 127,1, C6 и C6' – 162,0, C4 и C4' – 200,3.

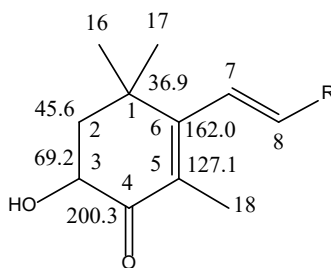


Рисунок 15 – Сигналы циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

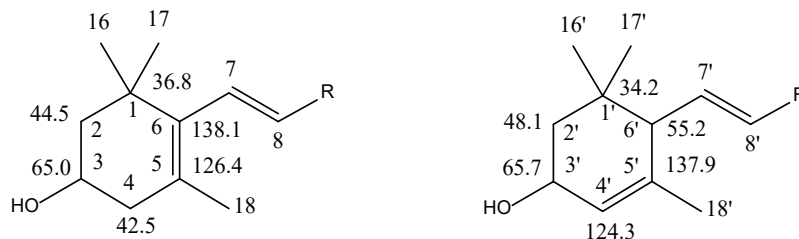


Рисунок 16 – Сигналы концевых циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра лютеина

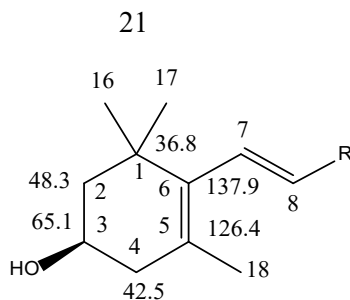


Рисунок 17 – Сигналы концевых циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра зеаксантина

Ацильные остатки, введенные в структуру для получения сложных эфиров, имеют характерные сигналы. На рисунке 17 представлены сигналы радикалов ^{13}C ЯМР спектра сложных эфиров астаксантина. Полосы поглощения незначительно отличаются от полос поглощения кислот до синтеза ввиду образования сложноэфирной группы.

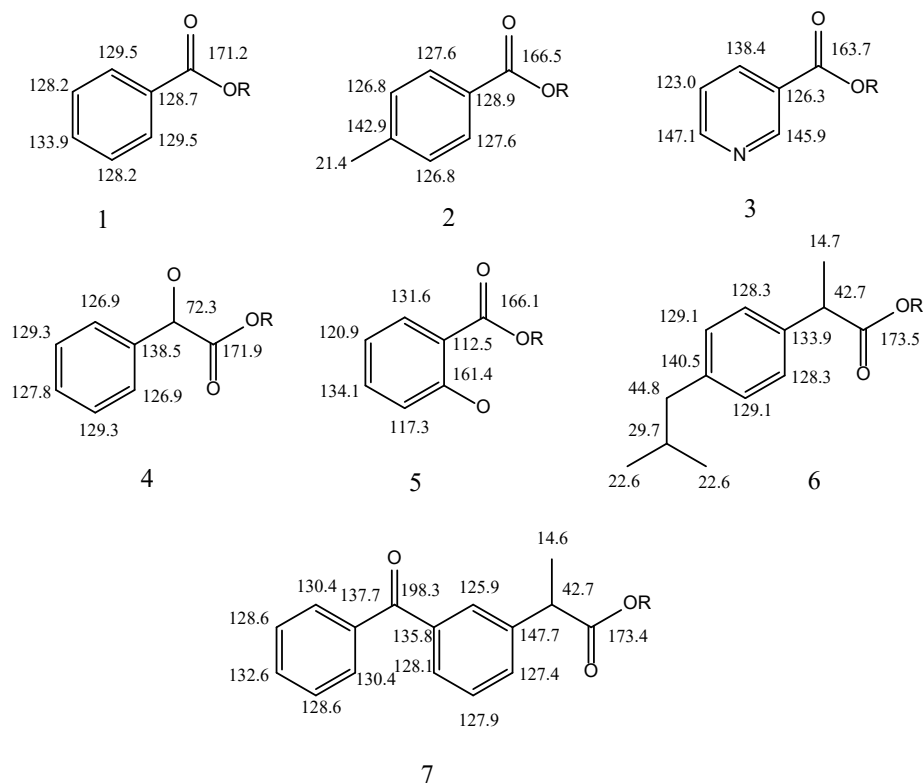


Рисунок 18 – Сигналы ацильных остатков ^{13}C ЯМР спектра сложных эфиров ксантофиллов

В ^{13}C ЯМР спектрах при образовании сложноэфирной связи наблюдаются изменения сигналов у ближайших атомов. Так, у каротиноидов наблюдается сдвиг сигналов для углеродов в положениях C2, C3, C4 и C2', C3', C4', а в ацильном остатке у углерода в положение C1 и C1'.

Для всех синтезированных соединений было проведено соотнесение сигналов с атомами водорода в ^1H и углерода в ^{13}C ЯМР спектрах. В спектрах синтезированных соединений установлены сигналы, характерные для ксантофиллов и кислот. Выявлено отсутствие сигналов или их сдвигов, характерных для образования сложноэфирной связи в синтезированных эфирах ксантофиллов. Таким образом, проведено доказательство структуры синтезированных соединений методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Масс-спектрометрия может быть использована в идентификации сложных эфиров ксантофиллов не только для определения молекулярной массы синтезированных соединений, но и для надежной идентификации образующихся фрагментарных ионов. Разные методы

ионизации приводят к появлению различных фрагментов, что может создавать определенные трудности при сравнении результатов, полученных в неодинаковых условиях.

В результате эксперимента было установлено, что для всех эфиров бензойной кислоты определяется фрагмент с молекулярной массой 105, для 4-метилбензойной кислоты – 119, никотиновой кислоты – 106, фенилгликолевой кислоты – 119, 2-гидроксibenзойной кислоты (салициловой кислоты) – 121, ибупрофена – 161, кетопрофена 209 и 105. Характерно, что отличий в образующихся фрагментах у эфиров лютеина и зеаксантина нет, а значит, в предлагаемых условиях их нельзя отличить. Для синтезированных диэфиров производных ксантофиллов фрагменты, характерные для родоначальной структуры ксантофиллов, не выявлены, что может свидетельствовать о различных путях их фрагментации. Таким образом, предварительно были спрогнозированы, а затем и экспериментально установлены характерные сигналы, подтверждающие структуру для синтезированных соединений производных ксантофиллов.

Хемоэнзимный синтез *all-trans*-изомеров лютеина и зеаксантина

В эксперименте при получении сложных эфиров ксантофиллов нами было установлено, что независимо от состава изомеров в исходных ксантофиллах, в продуктах реакций обнаруживались только *all-trans*-изомеры. Предположительно причиной такой трансформации изомеров исходных ксантофиллов является использование энзимов в качестве катализаторов реакции этерификации. Для подтверждения этого утверждения было целесообразным изучить получение субстанций ксантофиллов в форме *all-trans*-изомеров с помощью энзимного синтеза.

При выборе биокатализатора учитывали результаты собственного эксперимента, проведенного с применением Новозим 435, который позволил получить только *транс*-изомеры сложных эфиров ксантофиллов. Аналогичный тип биокатализатора использовался и другими исследователями при синтезе пальмитата ретинола и лаурата ретинола с образованием только *транс*-изомеров этих эфиров. Кроме того, при необходимости масштабирования и промышленного трансфера методики получения субстанций ксантофиллов, биокатализ позволит избежать использования дополнительных агрессивных реактивов, применяемых в классическом синтезе, и тем самым снизит значение Е-фактора синтеза.

Для доказательства нашей гипотезы, что синтез субстанций лютеина и зеаксантина в присутствии иммобилизованной липазы Новозим 435 протекает стереоспецифично, часть исходных ксантофиллов предварительно была подвергнута изомеризации, которую проводили с помощью 1 ммоль/л раствором йода. Дополнительно реакционную смесь облучали флюоресцентной лампой мощностью 25 Вт в течение 10 мин. Анализ содержания изомеров до и после изомеризации проводили методом ВЭЖХ (Рисунок 19).

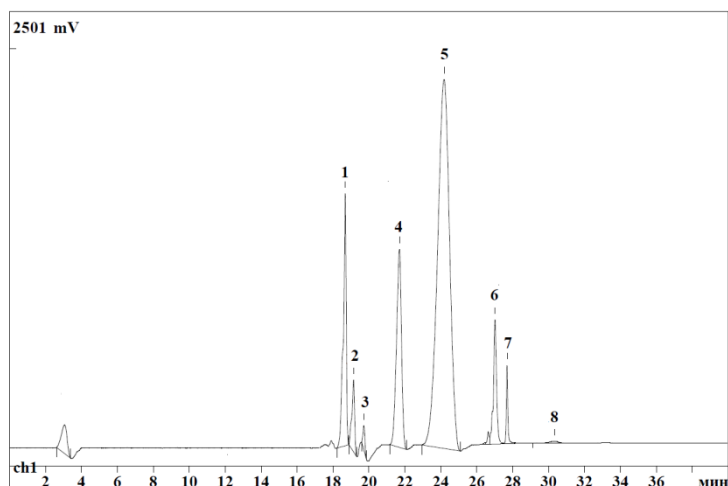


Рисунок 19 – Хроматограмма раствора лютеина после изомеризации йодом:
пик 1 – 13-*Z*-лютеин, пики 2,3 – неидентифицированные изомеры лютеина,
пик 4 – 13'-*Z*-лютеин, пик 5 – *all-trans*-лютеин, пик 6 – 9-*Z*-лютеин, пик 7 – 9'-*Z*-лютеин,
пик 8 – неидентифицированный изомер лютеина

Установлено, что в образцах лютеина и зеаксантина производства Sigma-Aldrich содержание *транс*-изомеров составило 95,2 % и 94,7 %. В лютеине и зеаксантине, полученных из природных объектов по разработанной нами методике, содержание *транс*-изомеров составило 76,4 % и 73,1 %, соответственно. После проведенной изомеризации количество *транс*-изомеров лютеина и зеаксантина в образцах составляло 57 % и 52 %, соответственно.

Получение субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров осуществлялось путем двухэтапного синтеза (Рисунок 20).

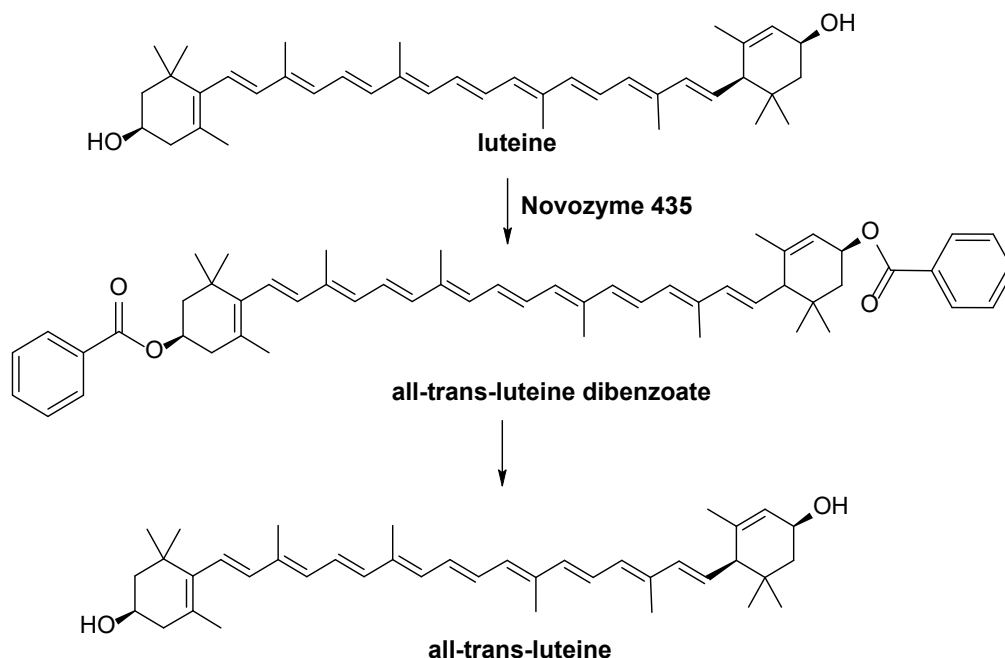


Рисунок 20 – Схема получения *транс*-изомеров на примере лютеина

На первом этапе происходит этерификация ксантофиллов, катализируемая биокатализатором Новозим 435 в активном центре энзима. Этот центр представляет собой «карман», который является «доступным» только для одного типа изомера ксантофилла и, помимо этого, стабильно и, вероятней всего, необратимо трансформирует структуру

каротиноида «под себя». Поэтому продуктом на первой стадии были *all-trans*-дibenзоат лютеина или зеаксантина, а последующий гидролиз этих *транс*-эфиров на втором этапе позволяет получить каротиноид в *all-trans*-конфигурации. Оптимальное количество энзима, вводимого в реакционную среду и необходимого для полноценной этерификации, было установлено на стадии разработки методики синтеза сложных эфиров и оставило 0,5 г. Далее на втором этапе синтеза осуществляли стереосопряженный гидролиз эфиров лютеина и зеаксантина, который приводил к образованию *all-trans*-лютеину и *all-trans*-зеаксантину.

Для этерификации в качестве модельной использовали кислоту бензойную, т. к. она является простейшей ароматической кислотой, характеризуется низкой токсичностью, обладает свойствами консерванта, легко детектируется в процессе ВЭЖХ-анализа и ранее была использована для получения эфиров ксантофиллов. В дальнейшем для получения *транс*-изомеров лютеина и зеаксантина можно будет использовать и другие кислоты.

Соотношение ксантофилла и кислоты бензойной рассчитано нами с учетом их эквимольного соотношения согласно уравнению реакции (Рисунок 20), но с добавлением некоторого избытка кислоты, что необходимо для полного протекания первой стадии синтеза.

Принимая во внимание особенности растворимости лютеина, зеаксантина и бензойной кислоты, синтез проводили в смеси *n*-гексан, толуол, метанол в соотношении 8:2:1.

Очевидно, что первая стадия получения субстанций лютеина и зеаксантина дублирует условия получения их сложных эфиров, поэтому в качестве базовых значений температуры, времени синтеза и скорости перемешивания были взяты параметры, полученные при оптимизации методом крутого восхождения.

Другим фактором, важным с экономической точки зрения, является кратность использования энзима. Количество циклов использования биокатализатора не учтено в математической модели, т. к. это свойство энзима отнесено нами к неконтролируемым факторам оптимизации, поэтому он практически был изучен в условиях проведения конкретного эксперимента, а параметром оптимизации служило содержание сложного эфира ксантофилла в реакционной среде. Экспериментально установлено, что оптимальным можно признать четырехкратное применение коммерческой липазы Новозим 435, т.к. такое число циклов позволяет поддерживать эффективность синтеза на уровне, близком к 90%. Эксперимент показал, что даже на десятом и одиннадцатом циклах активность биокатализатора Новозим 435 остается на уровне 80%. Этот факт является экономически значимым и, как уже указывалось выше, вероятней всего, при масштабировании методики или замене катализатора на аналогичный необходимо будет экспериментально подтверждать его эффективность.

Анализ всех полученных образцов после синтеза показал содержания *транс*-изомеров более 99 % и приемлемую чистоту продукта, что подтверждает высокую энантиоселективность способа синтеза (Рисунок 21).

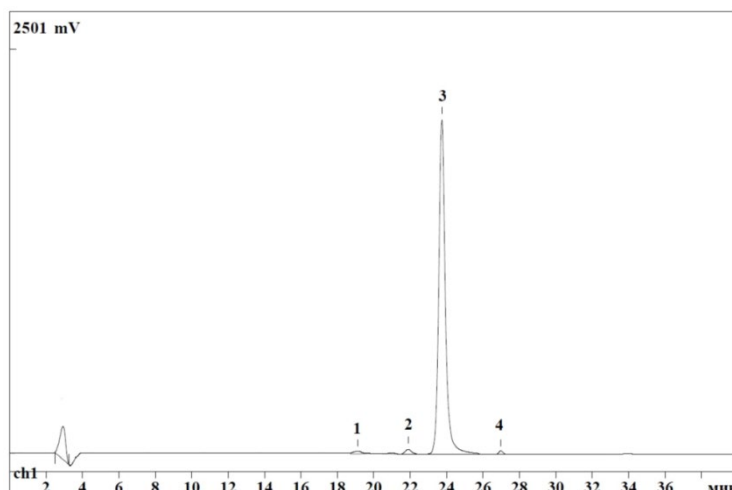


Рисунок 21 – Хроматограмма раствора после получения *all-trans*-изомера лютеина:
пик 1 – 13-*Z*-лютеин, пик 2 – 13'-*Z*-лютеин, пик 3 – *all-trans*-лютеин, пик 4 – 9-*Z*-лютеин

Преимуществом предложенного способа является возможность использовать его для объектов с исходным низким содержанием *транс*-изомеров. В этом случае выход продукта несколько выше, чем содержание *транс*-изомеров в первоначальном образце. Это, вероятно, связано с переходом *цис*-изомеров в *транс*-форму под действием фермента или других благоприятных условий обратной изомеризации.

Можно констатировать, что предложенный способ получения *all-trans*-изомеров лютеина и зеаксантина имеет перспективы использования при получении субстанций и стандартных образцов, содержащих только один тип изомера, в частности для объектов с изначально низким содержанием *транс*-изомеров. Способ может применяться для очистки указанных ксантофиллов, полученных из природного сырья, или после неправильного хранения. Разработанный способ отвечает требованиям концепции «зеленого синтеза», т. к. отличается экономическим и технологическим преимуществами, и с этих позиций он имеет приоритет в случае промышленного масштабирования. Следует подчеркнуть, что проблема получения субстанций с большим диапазоном изомерных форм является важной не только для каротиноидов. Экспериментально продемонстрированный подход может быть использован для получения фармацевтических субстанций природного происхождения, относящихся к другим классам органических соединений.

Синтез сложных эфиров флавоноидов с использованием биокатализаторов

Теоретическое обоснование выбора объектов химической модификации флавоноидов показало, что целесообразным является синтез 22 сложных эфиров для четырех агликонов – кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина.

Далее, следуя дизайну исследования (Рисунок 1), необходимо было экспериментально подтвердить возможность получения сложных эфиров перечисленных флавоноидов.

Этерификацию флавоноидов проводят методами традиционного химического синтеза или в присутствии биокатализаторов.

К недостаткам традиционных химических подходов с точки зрения принципов «зеленого» синтеза можно отнести применение токсичных органических растворителей,

длительность протекания реакций, необходимость нагревания и невысокий выход целевого продукта. В связи с тем, что полученные эфиры в дальнейшем предполагается рассматривать как кандидаты для создания ЛС, то, по нашему мнению, основным недостатком следует признать использование большого числа органических растворителей, относящихся, как правило, ко 2 классу токсичности. Это традиционно потребует дополнительной очистки целевого продукта, обязательной идентификации и определения содержания каждого из использованных растворителей. Безусловно, это приведет к низким экологическим и экономическим показателям синтеза.

Учитывая дальнейшую фармацевтическую направленность применения субстанций модифицированных флавоноидов, сочли целесообразным выбрать такие условия синтеза, которые позволят увеличить выход целевого продукта, обеспечить регио- и стереоселективность и полностью исключить применение токсичных растворителей, а также воздействие высоких температур.

В растениях биосинтез эфиров флавоноидов катализируется ацилтрансферазами, однако их использование в лабораторных и промышленных условиях усложняется необходимостью дополнительного введения в реакционную смесь стехиометрических количеств соответствующего ацилкофермента А. Вместе с этим имеется обширный опыт по этерификации флавоноидов в присутствии липазы В *Candida antarctica* – Новозим 435. Однако во всех описанных случаях этерификации подвергались флавоноиды-гликозиды, и ацилирование при этом происходило региоселективным путем по гидроксильным группам углеводных остатков, а не агликонов.

Для получения сопоставимых результатов с использованием энзимной этерификации производных каротиноидов и производных флавоноидов в эксперименте использовали тот же биокатализатор, поэтому в качестве последнего выступал Новозим 435.

Полноценное построение эксперимента предполагает проведение предварительного выбора параметров синтеза, которые нуждаются в оптимизации и, вероятней всего, могут оказать существенное влияние на выход целевого продукта.

Общепринятыми факторами, оказывающими влияние на любую схему синтеза, являются соотношение реагентов, температурный режим процесса, продолжительность синтеза, скорость перемешивания реакционной среды, что справедливо и для получения эфиров флавоноидов. При использовании энзимов следует определять целесообразное количество биокатализатора, вносимое в систему.

Экспериментально были изучены предварительные параметры синтеза: соотношение агликон-кислота, временной фактор, скорость перемешивания реакционной смеси, температурный режим. Эксперимент проведен на примере образования моноэфира нарингенина и бензойной кислоты – нарингенин 4'-бензоата. Контролируемым показателем служило количество образовавшегося целевого продукта – моноэфира и побочного продукта реакции – диэфира.

Региоселективное образование нарингенин-4'-бензоата осуществлялось согласно уравнению реакции, приведенному на рисунке 22.

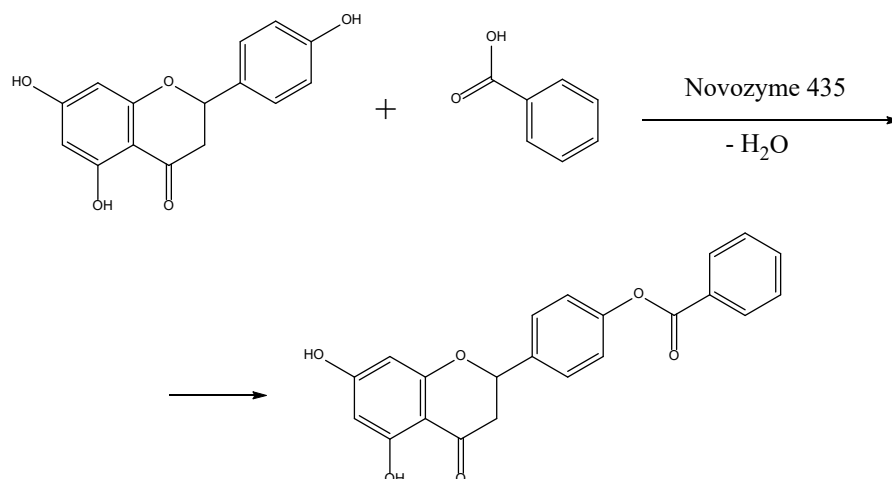


Рисунок 22 – Синтез 4'-моноэфира нарингенина и бензойной кислоты

Экспериментально были апробированы следующие молярные соотношения агликон: кислота – 3:1; 2:1; 2:2; 2:3. Основным контролируемым параметром служило образование нарингенин-4'-бензоата. Установлено, что при соотношении 2:3 уровень образования целевого продукта был наибольшим – около 80 %, а содержание диэфира нарингенина в реакционной среде не превышало 1 %, поэтому весь дальнейший эксперимент был проведен при мольном соотношении агликон-кислота – 2:3.

При изучении влияния факторов на процесс ферментативного синтеза сложных эфиров ксантофиллов было установлено, что скорость реакции значительно ниже, чем при использовании химических катализаторов. В связи с этим для определения влияния данного фактора сочли целесообразным предварительно изучить процесс в широком диапазоне времени до 12 ч.

Первоначально необходимо было определить влияние времени синтеза на выход целевого продукта реакции с учетом образования диэфира нарингенина (Рисунок 23). Время синтеза исследовали в интервале от 0 до 12 ч. В связи с тем, что эксперимент был предварительный, целью которого была попытка по возможности снизить температуру процесса, то биокаталитический синтез проводили при верхнем значении комнатной температуры – 25 °С.

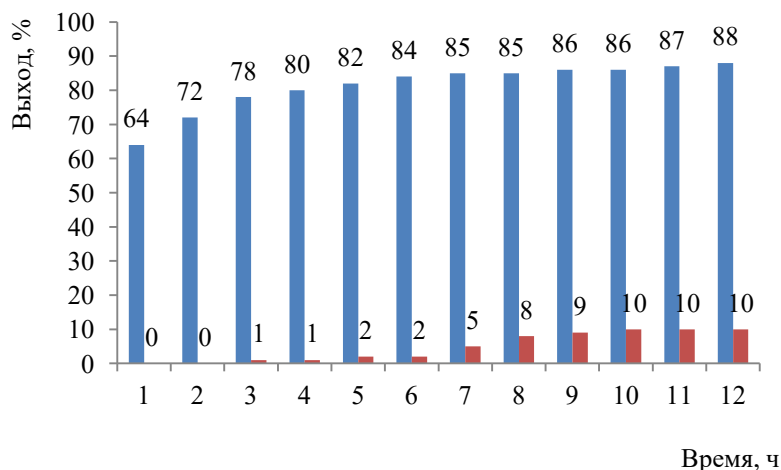


Рисунок 23 – Зависимость динамики образования основного продукта (синий) моноэфира и побочного продукта (красный) диэфира от времени синтеза

Из представленных данных следует, что образование диэфиров наблюдается только после 3 ч от начала реакции и их концентрация постепенно увеличивается при длительности процесса в течение 10 ч. Далее увеличения концентрации не наблюдается, и она находится на уровне 10 % в течение последующих двух часов. Активное увеличение концентрации целевого моноэфира происходит в течение первых 6 ч синтеза – его концентрация – 84 % была зафиксирована после 6 ч синтеза. В течение последующих 6 часов концентрация целевого продукта увеличивается незначительно от 85 % до 88 %.

Учитывая полученные результаты, мы пришли к выводу о том, что при математическом планировании эксперимента в качестве основного уровня для параметра «время реакции» следует выбрать 3,5 ч, т. к. за это время образуется достаточное количество целевого продукта – около 80%, и уже фиксируется образование побочного диэфира.

Значение другого показателя, которое следовало определить на начальном этапе, – это количество энзима, вносимого в реакционную среду. Предварительные испытания по синтезу эфиров ксантофиллов позволили выбрать его значение, равное 1,0 г, и установить, что этот фактор оказывает минимальное влияние на выход продукта реакции. Принимая во внимание эти данные, для проведения математического планирования эксперимента по синтезу эфиров флавоноидов в качестве первичного значения параметра «количество биокатализатора» было взято значение – 1,0 г липазы Новозим 435.

Используя предварительные параметры описанных выше факторов: время синтеза 3,5 ч, количество липазы – 1,0 г, температура синтеза – 25 °С, далее проводили предварительный эксперимент по определению скорости перемешивания реакционной среды. Были изучены режимы перемешивания со скоростью 40, 50, 60, 120, 180 об/мин (Рисунок 24).

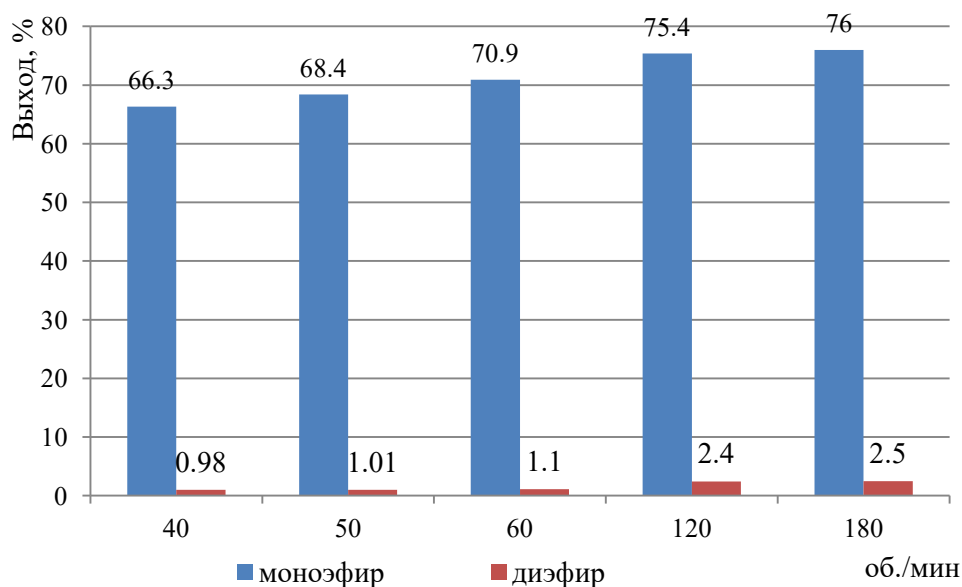


Рисунок 24 – Зависимость выхода целевого и побочного продукта реакции от скорости перемешивания реакционной среды

Из представленных данных следует, что при увеличении скорости перемешивания реакционной смеси выход целевого продукта начинает возрастать. Эта тенденция наблюдается уже при переходе от 40 об/мин и к 50 об/мин – выход повышается примерно на 2 %. Далее при увеличении скорости перемешивания до 60 об/мин и потом до 120 об/мин эта зависимость

продолжается сохраняться. При увеличении скорости до 180 об/мин резкого увеличения выхода продукта не наблюдается. Очевидно, что этот же параметр синтеза влияет и на образование побочного продукта реакции – диэфира флавоноида.

Следует учесть, что эти данные получены при постоянных значениях других факторов, описанных выше, а их изменение может изменить влияние параметра «скорость перемешивания реакционной среды» на выход целевого продукта. Однако можно сделать предварительный вывод, что увеличение скорости перемешивания реакционной смеси оказывает существенное воздействие на выход основного продукта реакции: от начальных – около 66 % до конечного экспериментального значения – 76 %. В связи с тем, что содержание и основного моноэфира, и побочного диэфира в реакционной среде начинает возрастать при переходе от режима 40 об/мин к 50 об/мин, в качестве начального значения этого фактора выбрали среднее значение – 45 об/мин.

Общепризнано, что температура оказывает пропорциональное влияние не только на скорость реакции, но и на выход продукта реакции. Для внесения фактора «температура» в план эксперимента и определения первоначального ее влияния на выход сложных эфиров флавоноидов изучили температурный режим синтеза в интервале значений – 20 °С, 30 °С, 40 °С, 50 °С, 60 °С (Рисунок 25).

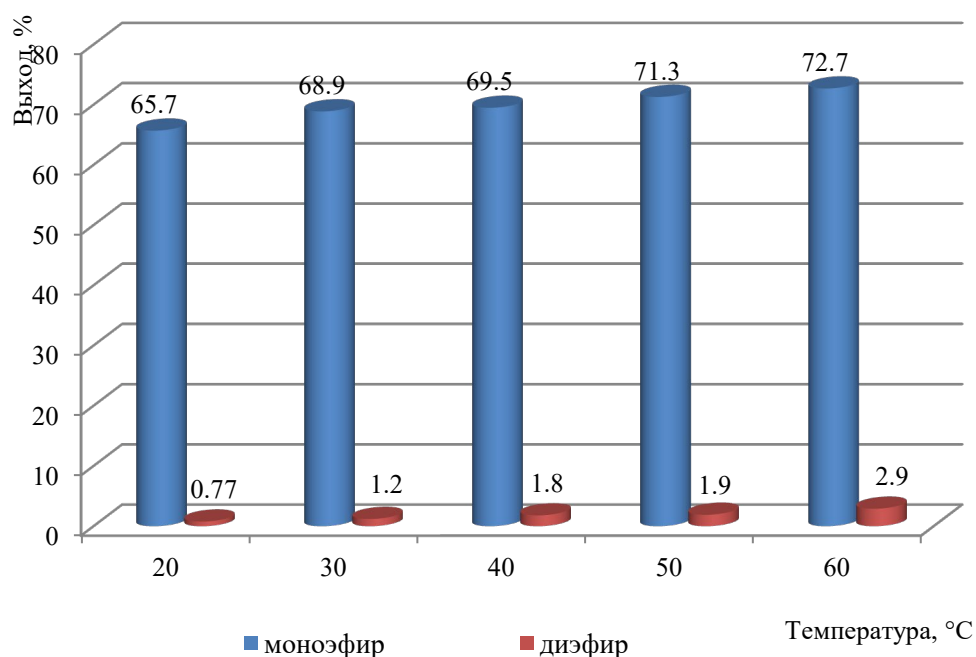


Рисунок 25 – Влияние температуры синтеза на выход 4'-моноэфира нарингенина

Пробный эксперимент показал, что температура оказывает значительное влияние на выход продукта, т. к. при сохранении неизменными остальных параметров повышение температуры увеличивает выход целевого продукта от 66 % до 73 %. С учетом этих данных в дальнейший план эксперимента был включен показатель «температура», а его вводным значением выбрано температура 25 °С как максимальное значение для понятия «комнатная температура».

Таким образом, предварительно установлено, что наибольшее влияние на синтез эфиров флавоноидов оказывают время реакции, скорость перемешивания и температура, в меньшей степени – количество вносимого энзима. Кроме того, анализ целевого и побочного продуктов синтеза по мере их накопления показал, что синтез 4'-эфиров флавоноидов может быть выполнен в одну стадию, тогда как синтез по положению С3 как наименее реакционному центру является более сложным. В связи с этим мы предположили, что более целесообразно, вначале осуществить синтез 4'-эфиров флавоноидов, а затем, используя полученные данные, разработать методику синтеза 3-эфиров флавоноидов.

При разработке методики синтеза эфиров флавоноидов с использованием биокатализатора, как и в случае с ксантофиллами, был использован метод математического планирования эксперимента.

Ввиду того, что все исходные продукты характеризуются очень близкими химическими свойствами, нами предварительно было изучено влияние факторов на примере синтеза нарингенин 4'-бензоата и полученные результаты экстраполированы на синтез других эфиров по разработанной методике.

Для математического описания рассматриваемого процесса синтеза предварительно был построен план эксперимента (Таблица 3).

Таблица 3 – Условия планирования эксперимента

	Температура X_1 , °C	Время реакции X_2 , час	Количество биокатализатора X_3 , г	Скорость перемешивания X_4 , об/мин
Основной уровень	25	3,5	1,0	45
Интервал варьирования	5	0,5	0,5	15
Верхний уровень (+1)	30	4	1,5	60
Нижний уровень (-1)	20	3	0,5	30

При математическом описании вблизи начальных точек поверхности отклика, как и в случае с синтезом эфиров ксантофиллов, использовали варьирование каждого фактора на двух уровнях +1 и -1. Число необходимых опытов для реализации всех возможных сочетаний факторов составило 16. После расчета значений коэффициентов было составлено опорное уравнение регрессии, имеющее следующий вид:

$$y=69,08+0,923x_1+0,655x_2+0,015x_3+1,038x_4 \quad (3)$$

Все коэффициенты в уравнениях регрессии имеют положительное значение, а это значит, что все выбранные нами факторы оказывают влияние на процесс синтеза, а степень этого влияния прямо пропорциональна значению коэффициентов.

Далее, согласно матрице эксперимента, по результатам опытов в условиях основного уровня проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнений.

Для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с фармакопейным (2,57).

Коэффициент Стьюдента для третьего (t_3) фактора (0,06) меньше табличного значения, что свидетельствует о его несущественном влиянии на выход целевого продукта синтеза количества биокатализатора в рассматриваемом интервале, а значит, его количество можно уменьшить до значения нижнего уровня 0,5 г.

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывают скорость перемешивания ($t_4=4,33$), температура ($t_1=3,84$) и время реакции ($t_2=2,73$).

После количественной оценки значимости влияния факторов на процесс синтеза уравнение приняло окончательный вид:

$$y=69,08+0,923x_1+0,655x_2+1,038x_4 \quad (4)$$

Для проверки адекватности математической модели в окончательное уравнение регрессии подставляли экспериментальные данные и рассчитывали теоретические значения по получению 4'-моноэфира нарингенина.

По полученным данным рассчитывали сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности, после этого рассчитывали значение критерия Фишера. Расчетное значение критерия Фишера составило 0,52, что не превышает табличного значения этого показателя – $F_{0,95}(15,5) = 2,90$, а значит, разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса синтеза. Параметром оптимизации служил выход целевого продукта в процентах от максимального расчетного значения. Для этого использовали метод крутого восхождения (Таблица 4). Начальной точкой движения был выбран эксперимент с наилучшими результатами, полученными при построении модели.

Варьирование факторов проводили в соответствии с их влиянием на процесс синтеза и с учетом величины коэффициентов для каждого фактора в окончательном уравнении регрессии.

Наибольшее значение коэффициента наблюдается у четвертого и первого факторов – это скорость перемешивания и температура реакции, поэтому шаг их варьирования был максимальным. Для незначимого фактора – количество биокатализатора – его величину принимали на минимальном уровне 0,5 г во всех экспериментах (Таблица 4).

Таблица 4 – Определение оптимальных параметров синтеза методом крутого восхождения

Характеристика	X_1 , °C	X_2 , ч	X_3 , г	X_4 , об/мин	Y , %
Начальная точка движения	30	4,0	0,5	60	71,15
Единица варьирования	5	0,5	–	15	–
Коэффициент в уравнении регрессии	0,923	0,655	–	1,038	–
Опыт 1	35	4,5	0,5	75	74,26
Опыт 2	40	5,0	0,5	90	77,50
Опыт 3	45	5,5	0,5	105	81,69
Опыт 4	50	6,0	0,5	120	84,44
Опыт 5	55	6,5	0,5	135	82,31

В результате поиска оптимальных значений уже в четвертом опыте был достигнут максимальный выход продукта синтеза – около 84%, а дальнейшее увеличение параметров не приводит к увеличению выхода продукта, о чем свидетельствуют результаты опыта 5.

Таким образом, с помощью построения математической модели и поиска оптимальных условий методом крутого восхождения нам удалось повысить выход продукта от 71 % в начальных условиях до 84 %, а также на примере 4'-моноэфира нарингенина выявить оптимальные параметры синтеза 4'-эфиров остальных флавоноидов: мольное соотношение агликон-кислота – 2:3, количество фермента – 0,5 г, температура процесса – 50 °С, время синтеза – 6 ч, скорость перемешивания реакционной среды – 120 об/мин. Полученные данные были использованы в эксперименте по синтезу 4'-эфиров флавоноидов.

Основываясь на теоретическом и экспериментальном выборе условий реакции этерификации кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина, кислот-кандидатов, далее проводили синтез сложных эфиров агликонов флавоноидов.

При взаимодействии со всеми изученными кислотами с участием нарингенина и кверцетина происходит региоселективная этерификация по положению С4' цикла В (Рисунок 26).

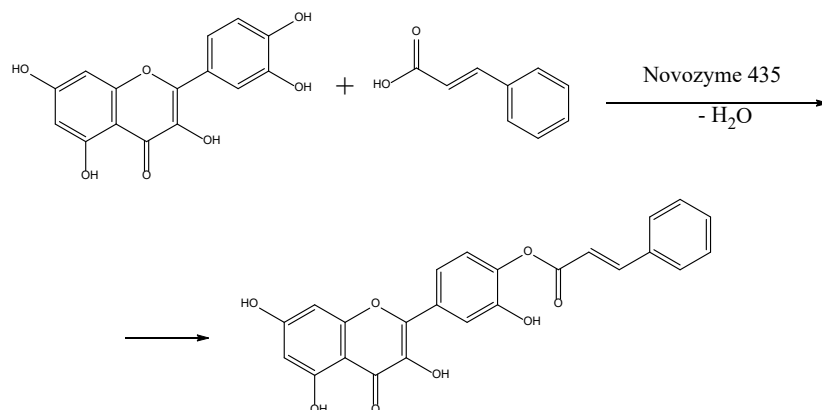


Рисунок 26 – Синтез 4'-моноэфира кверцетина и коричной кислоты

Схема на рисунке 27 отражает химизм образования сложного эфира гесперетина, для которого со всеми кислотами, участвовавшими в эксперименте, происходило региоселективное образование 3'-моноэфиров.

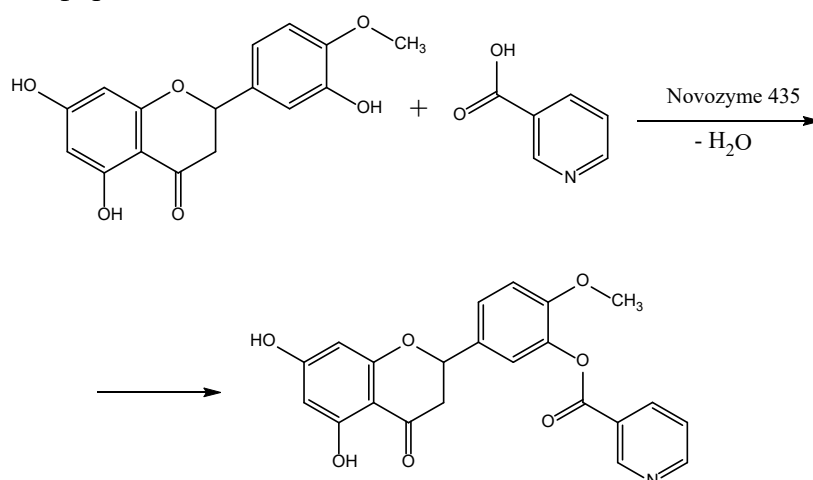


Рисунок 27 – Синтез 3'-моноэфира гесперетина и никотиновой кислоты

При получении сложных эфиров флавоноидов следует обращать внимание на число этерифицируемых гидроксигрупп флавоноида. Эксперимент показал, что кверцетин ацилируется региоселективно, в первую очередь, по положению С4' с выходом 35 %, а только потом и по положению С3'. Данные этого эксперимента, говорят о том, что в реакционной среде, очевидно, будет образовываться некоторое количество побочного продукта – диэфира флавоноида.

В процессе синтеза эфиров выбранных флавоноидов-агликонов контроль чистоты исходных и конечных продуктов реакции осуществляли методом ВЭЖХ.

Для анализа первую пробу отбирали после добавления всех реактивов, кроме фермента (Рисунок 28).

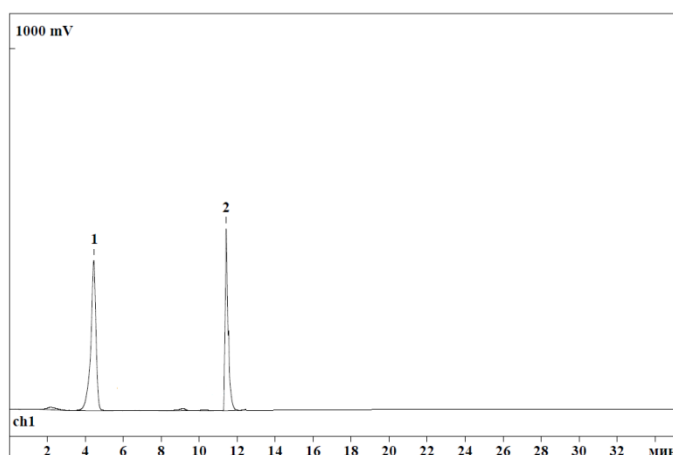


Рисунок 28 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза нарингенина 4'-бензоата: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – нарингенин

Далее добавляли Новозим 435 и все последующие пробы отбирали через каждый час. Ниже приведены типовые хроматограммы на примере синтеза нарингенина 4'-бензоата (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (Рисунки 29 – 30).

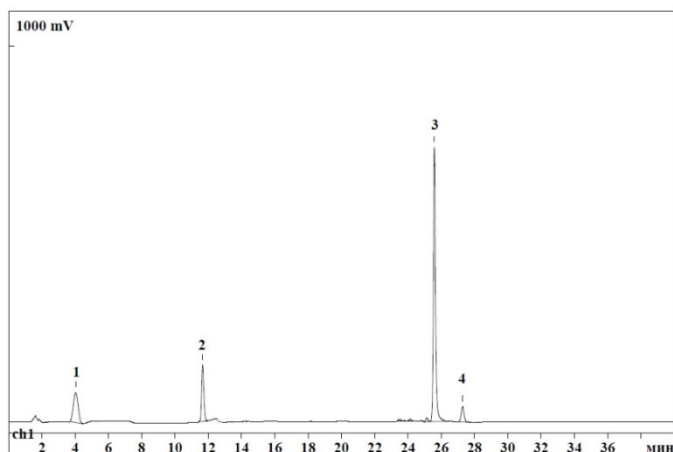


Рисунок 29 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза нарингенина 4'-бензоата (соединение F.1): пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – нарингенин, пик 3 – нарингенина 4'-бензоат, пик 4 – примесь нарингенина 7,4'-дибензоата

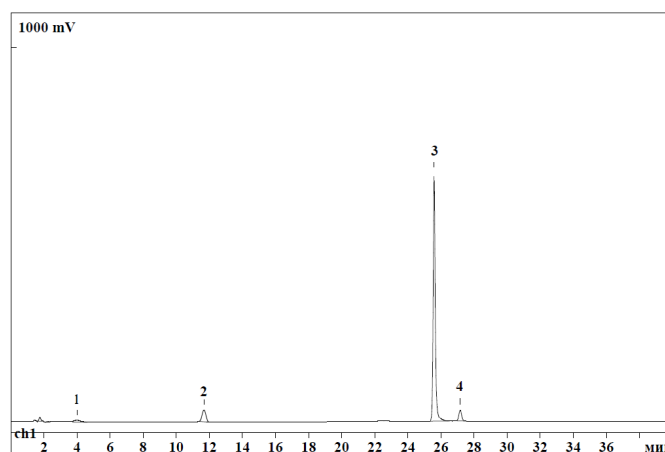


Рисунок 30 – Хроматограмма конечного продукта синтеза нарингенин 4'-бензоата после очистки: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – нарингенин, пик 3 – нарингенина 4'-бензоат (соединение F.1), пик 4 – примесь нарингенин 7,4'-дibenзоата

В защите агликонов флавоноидов от окислительной деградации значительную роль может играть этерификация по положению C3, и такой подход к оптимизации молекул флавоноидов, вероятней всего, имеет дальнейшую перспективу развития.

Нами была разработана методика синтеза сложных эфиров флавоноидов, базирующаяся на реакции образования эфира по положению C3 после «защиты» гидроксигрупп в положениях C3', C4', C5, C7.

На рисунке 31 приведен синтез сложного эфира кверцетина и 3,4,5-тригидроксibenзойной (галловой) кислоты. Синтез остальных эфиров кверцетина и мирицетина взаимодействием со всеми изученными кислотами происходит по аналогичной схеме.

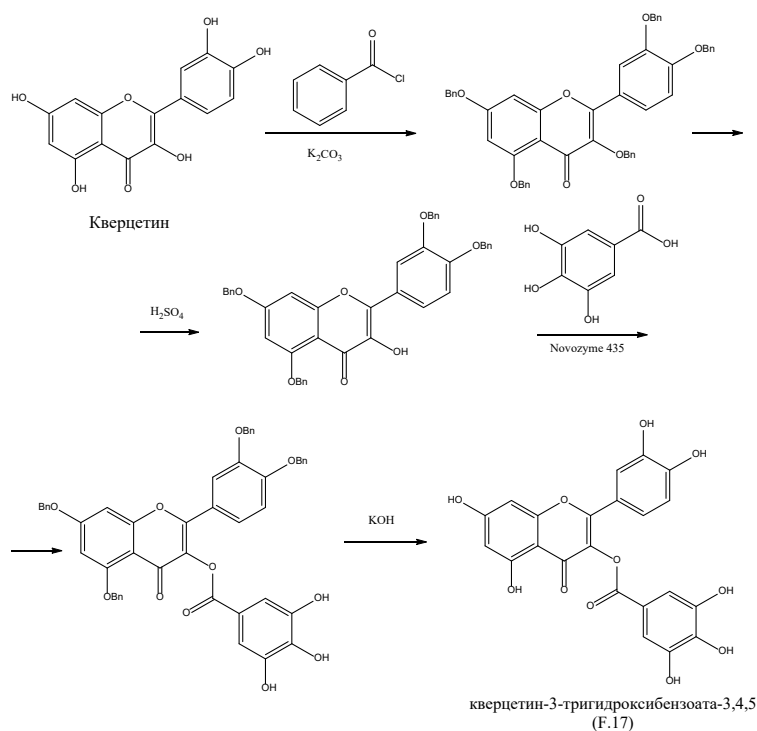


Рисунок 31 – Схема синтеза кверцетин-3-тригидроксibenзоата-3,4,5

На первом этапе осуществлена этерификация всех гидроксигрупп избытком бензоилхлорида в щелочной среде по реакции Шоттена-Баумана. Температура реакции не должна превышать 55 °С, т. к. при повышенной температуре наблюдался процесс гидролиза, уменьшающий выход целевого продукта. Пентабензоат кверцетина или гексабензоат мирицетина выделялись из реакционной среды в виде осадка и легко отделялись фильтрованием или центрифугированием. Выход целевого продукта на данной стадии составил 96 %.

На второй стадии полученный эфир подвергали гидролизу для расщепления сложноэфирной связи по положению С3, поскольку она является наименее прочной. Необходимо учитывать, что проведение гидролиза в более жестких условиях будет способствовать расщеплению других эфирных связей.

Нами были установлены условия гидролиза, позволяющие селективно расщеплять сложноэфирную связь в положении С3: кислотный гидролиз в 10% растворе серной кислоты, при нагревании не выше 80 °С, в среде ацетонитрила и в течение не более двух часов. Такие условия позволяют получать продукт с выходом 91 %.

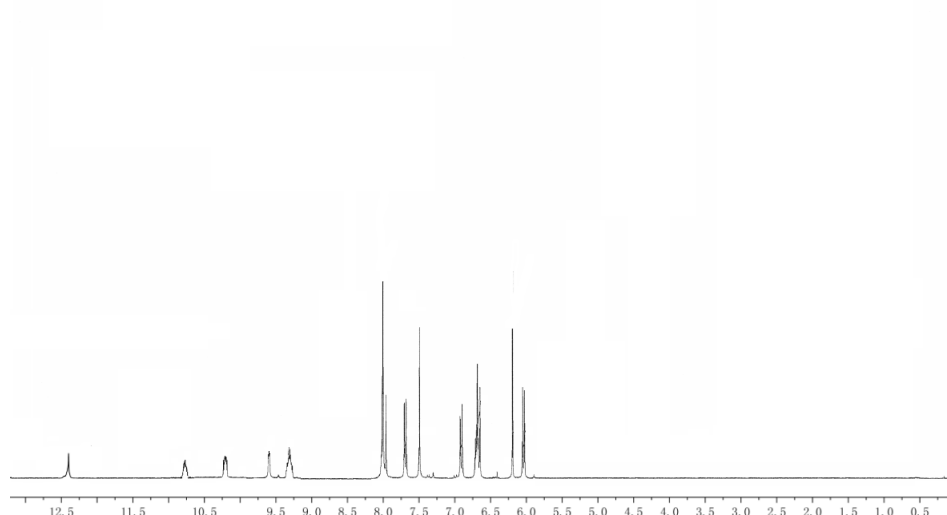
На третьей стадии спиртовым раствором гидроксида калия нейтрализовывали кислоту до рН около 6, после чего добавили фермент Новозим 435 и соответствующую ацилирующую кислоту, необходимую для образования целевого эфира. Установлено, что реакцию следует проводить при температуре не выше 50 °С, чтобы предотвратить деградацию фермента. Использование ферментного катализа на этой стадии синтеза позволяет существенно повысить как выход продукта, так и его чистоту. По завершении синтеза иммобилизованный фермент удаляли фильтрованием.

На четвертой стадии с помощью раствора калия гидроксида при температуре не выше 70 °С проводили гидролиз по положениям С3', С4', С5, С7. При этом эфирная связь в положении С3 не разрушалась, что обеспечивало использование спиртового раствора гидроксида калия в эквимольном соотношении 1:4 и нагревание реакционной среды не выше 70 °С в течение 7 мин. Далее проводили очистку целевого продукта.

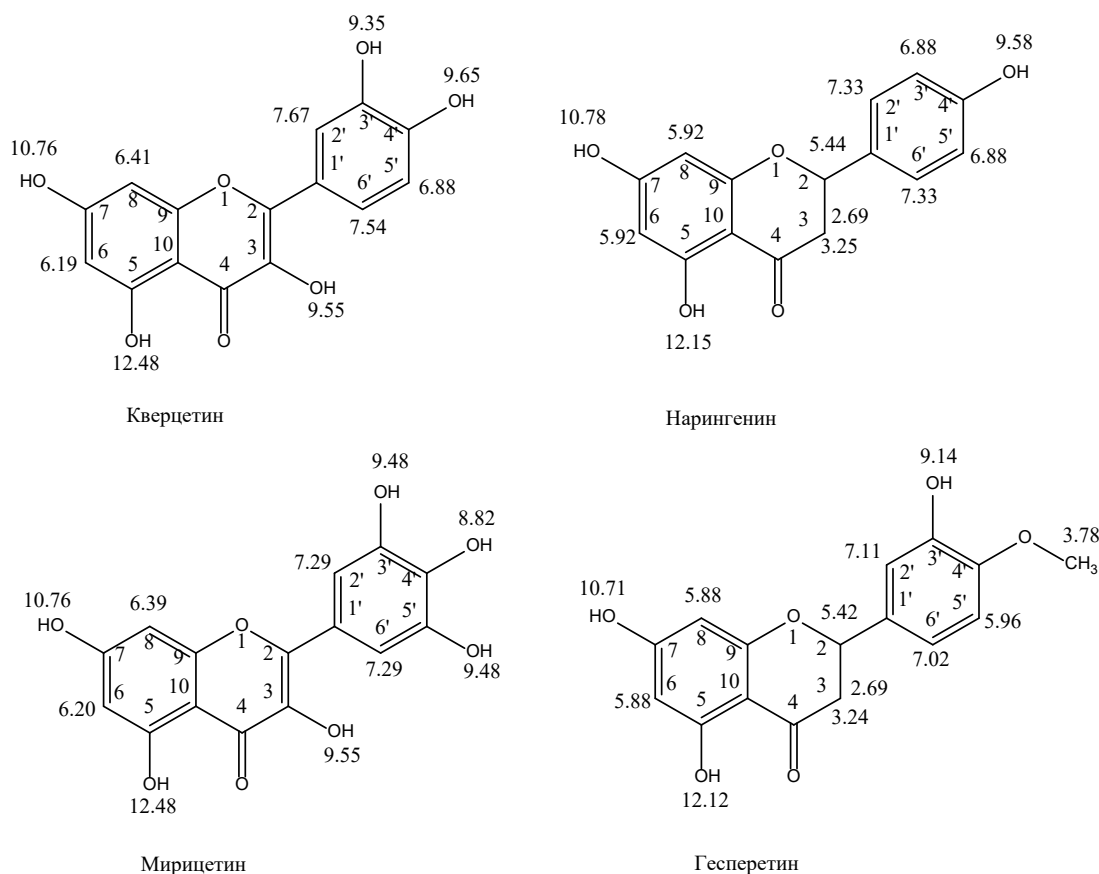
Таким образом, с применением энзимного катализа синтезировано 12 соединений, являющихся 4'-эфирами флавоноидов, и 10 сложных эфиров кверцетина и мирицетина с региоселективной этерификацией по положению С3 пиринового фрагмента флавоноида.

Для всех синтезированных сложных эфиров была определена температура плавления, которая достоверно отличалась от температуры плавления исходных соединений, что может косвенно свидетельствовать об образовании сложных эфиров в процессе синтеза.

Для подтверждения структуры синтезированных производных флавоноидов оптимально использовать метод ЯМР спектроскопии как один из наиболее надежных способов определения структуры органических веществ. Регистрацию спектров ^1H и ^{13}C ЯМР проводили в разработанных нами условиях. В качестве примера на рисунке 32 представлен типовой ^1H ЯМР-спектр кверцетин-3-гидроксибензоат-4.

Рисунок 31 – ^1H ЯМР спектр кверцетин-3-гидроксибензоат-4

Для упрощения процесса идентификации полученных соединений в их структуре можно выделить два ключевых фрагмента: ядро флавоноида (Рисунок 33) и ацильный фрагмент, введенный в структуру реакцией этерификации (Рисунок 34). Каждый из них имел характерные сигналы.

Рисунок 33 – Сигналы ^1H ЯМР спектров кверцетина, нарингенина, гесперетина, мирицетина

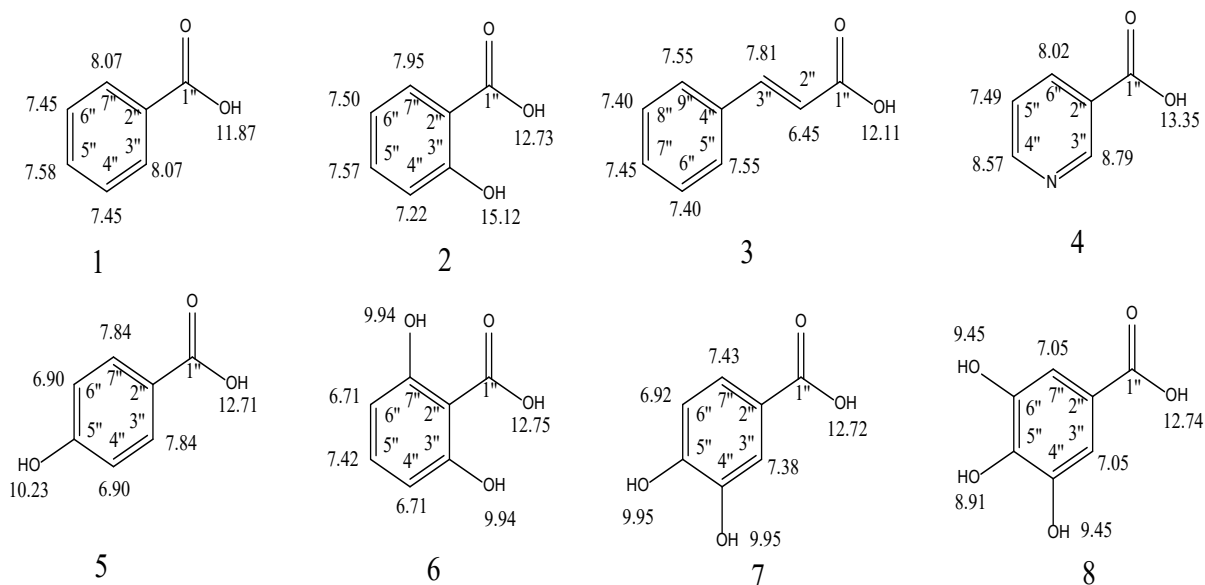


Рисунок 34 – Сигналы ^1H ЯМР спектров кислот, участвовавших в синтезе

Отсутствие полосы 9,58 для нарингенина, 9,65 для кверцетина и 9,14 для гесперетина указывает на образование сложноэфирной связи по положению 4' для нарингенина и кверцетина и 3' для гесперетина.

Отсутствие в ^1H ЯМР спектре сигнала 9,55, характерного для гидроксильной группы в положение С3 для мирицетина и кверцетина, подтверждает образование сложноэфирной связи по положению С3 для этих соединений.

Полосы поглощения эфиров отличаются от полос поглощения кислот и флавоноидов до синтеза ввиду образования сложноэфирной группы. В структуре флавоноидов с введением в структуру радикала наблюдается сдвиг сигналов, особенно в ближайших положениях. Так, у кверцетина при введении радикала в С4' положение наблюдаются сдвиги в положениях С3', С5', С1' и в меньшей степени С2' и С6'. Величина сдвига зависит от введенного радикала. Сдвиги также наблюдаются и в кислотах, использованных в синтезе сложных эфиров. На рисунке 35 представлен типичный ^{13}C ЯМР-спектр мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5.

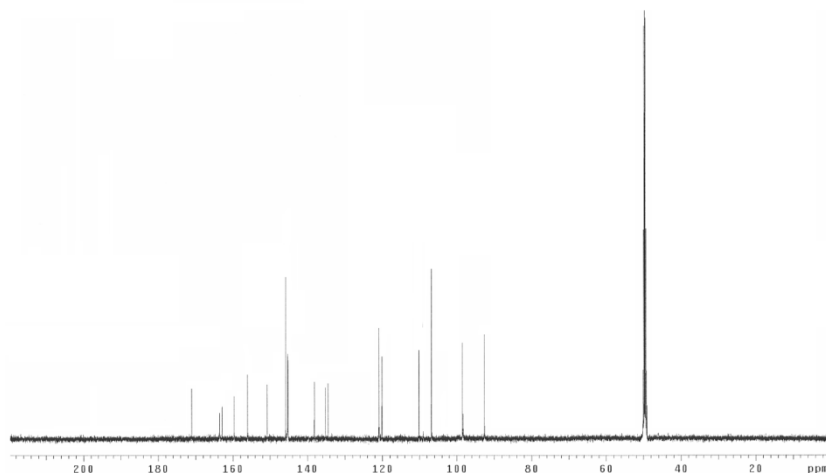


Рисунок 35 – ^{13}C ЯМР спектр мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5

Подход к трактовке ^{13}C ЯМР спектров был аналогичен таковому при идентификации синтезированных соединений методом ^1H ЯМР: нами рассматривались имеющие характерные

сигналы два наиболее значимых фрагментов структуры – ядро флавоноида (Рисунок 36) и введенный в структуру ацильный остаток (Рисунок 37).

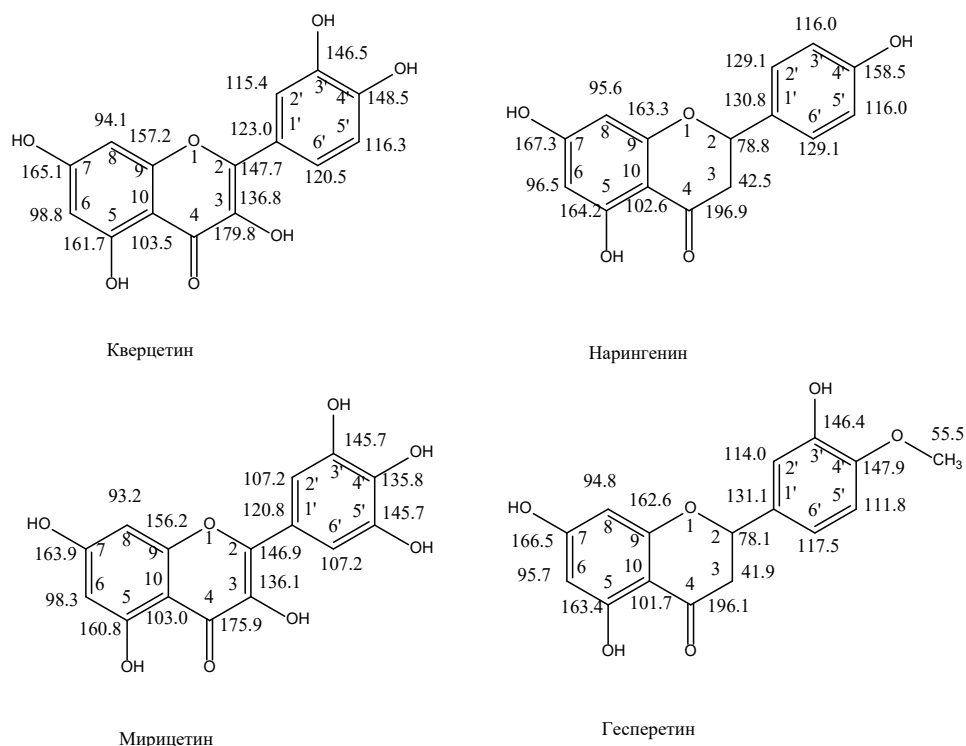


Рисунок 36 – Сигналы ЯМР ^{13}C спектров кверцетина, нарингенина, гесперетина, мирицетина

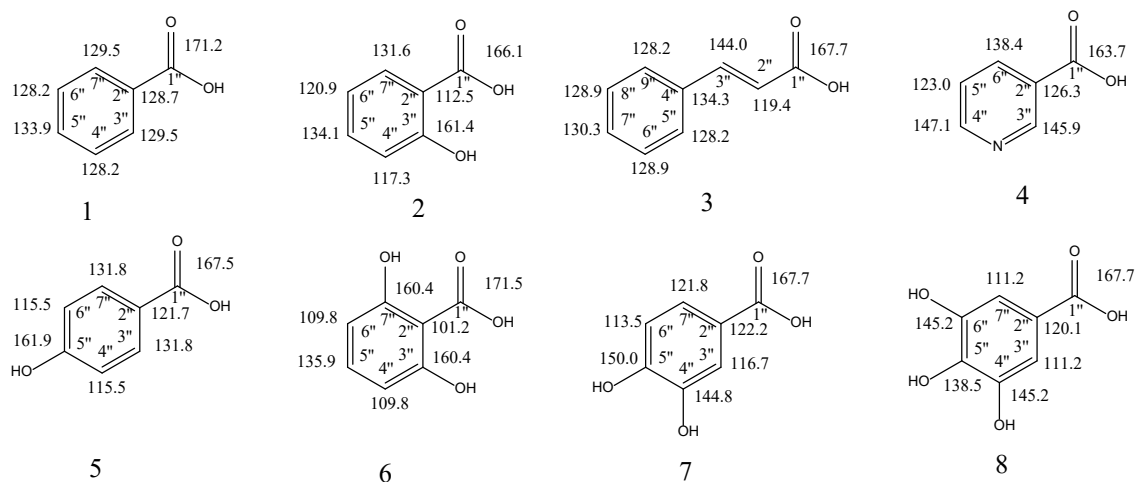


Рисунок 37– Сигналы ЯМР ^{13}C спектров кислот, участвовавших в синтезе

В структуре флавоноидов с введением в структуру кислот наблюдается сдвиг сигналов, особенно в ближайших положениях. Например, у кверцетина при введении в С4' положение радикала наблюдаются сдвиги в положениях С3', С5', С1' и С2', С6'.

Таким образом, для всех синтезированных сложных эфиров было проведено соотнесение сигналов с атомами водорода в ^1H и углерода в ^{13}C ЯМР спектрах. Выявлены характерные сдвиги сигналов или их отсутствие для образования сложноэфирной связи в синтезированных эфирах флавоноидов позволили подтвердить структуры синтезированных соединений.

Далее, используя метод масс-спектрометрии, разработанный ранее алгоритм действия, вначале провели прогнозирование фрагментов ионов, с помощью программы CFM-ID 4.0, а затем определяли их в масс-спектрах синтезированных соединений (Рисунок 38).

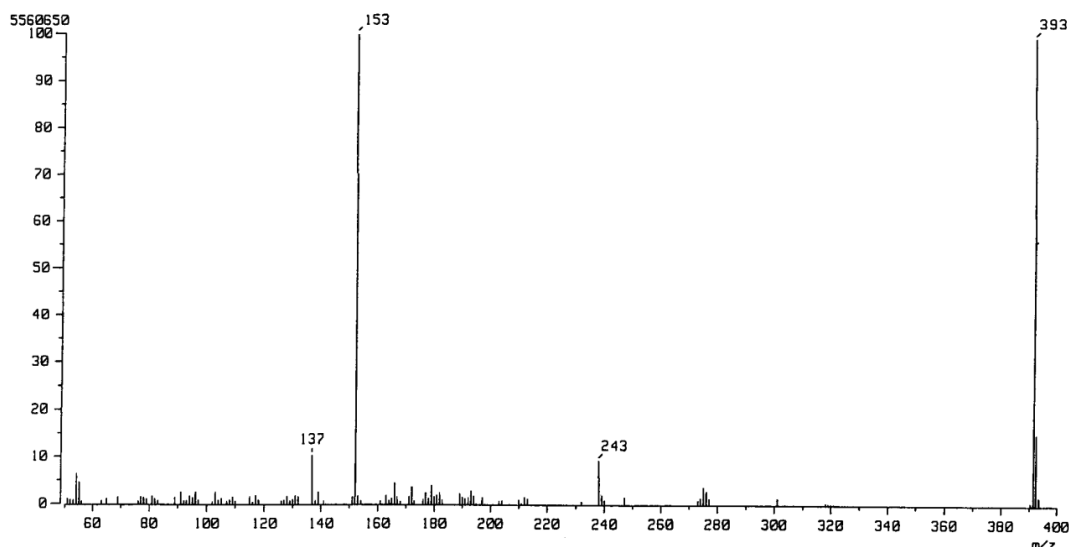


Рисунок 38 – Масс-спектр нарингенина 4'-салицилата

В результате эксперимента было установлено, что фрагмент с молекулярной массой 153 встречается во всех спектрах синтезированных производных флавоноидов, а фрагменты с молекулярной массой 121 встречаются во всех спектрах полусинтетических эфиров, в состав которых входит бензойная кислота, для салицилатов наблюдается фрагмент 137, циннаматов 147, никотинатов 106.

Таким образом, сочетанием методов ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, масс-спектрометрии и определением температуры плавления подтверждена структура 22 синтезированных сложных эфиров нарингенина, кверцетина, гесперетина и мирицетина.

Определение антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS^{•+}

Клиницисты и фармакологи во всем мире признают, что окислительный стресс является одним из основных этиотропных факторов и триггером для большинства патологий. В настоящее время не существует общепринятой методики определения антиоксидантной активности, поэтому сравнение результатов, полученных различными методами, как правило, не имеет четкой корреляции.

Учитывая тот факт, что синтезированные нами соединения имеют различную полярность, а следовательно, и растворимость, необходимо было выбрать метод, приемлемый для всех объектов исследования и позволяющий проводить сравнение полученных нами результатов с данными, опубликованными для других соединений, например, флавоноидов и каротиноидов. Это сравнение требуется для понимания степени влияния использованных в нашем эксперименте радикалов на антиоксидантную активность исходных структур и определения взаимосвязи структура-активность.

Поскольку методика ТЕАС, основанная на оценке способности веществ связывать радикал-катион ABTS^{•+} по сравнению со стандартом Тролоксом (Trolox), ранее была использована другими исследователями для определения антиоксидантной активности как флавоноидов, так и каротиноидов, то именно ее использовали для изучения антиоксидантной активности производных ксантофиллов и производных флавоноидов.

Важным преимуществом этой методики является то, что с ее помощью изучено значительное число представителей различных классов соединений, что позволяет достоверно сравнивать уровень антиоксидантной активности синтезированных нами соединений с ранее изученными этим методом БАС и сопоставлять с собственными теоретическими прогнозами *in silico*.

Определение антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров ксантофиллов и сложных эфиров флавоноидов проводили для их растворов с концентрациями от 1 до 10 мМ в соответствии с разработанной нами методикой. Значение ТЕАС рассчитывали как среднее из результатов определения испытуемых растворов с концентрацией 1-10 мМ и стандартных растворов Тролокс (Trolox) с концентрацией 1-10 мМ.

Сравнительный анализ полученных экспериментальных данных *in vitro* и теоретического прогноза *in silico* позволили нам выявить ряд закономерностей структура-активность в ряду синтезированных сложных эфиров:

- введение в структуру и каротиноидов, и флавоноидов фрагмента никотиновой кислоты приводит к значительному снижению антиоксидантного и антирадикального действия родоначальных соединений;
- этерификация каротиноидов и флавоноидов салициловой, коричной, галловой кислотами способствует увеличению рассматриваемых видов активности;
- в ряду производных ксантофиллов повышение активности происходит после введения салициловой кислоты, ибупрофена и кетопрофена, при этом она превышает значения самих исходных структур каротиноидов;
- установлено, что увеличение активности в ряду сложных эфиров флавоноидов происходит при введении ацильных радикалов в следующей последовательности: бензойной, салициловой и коричной кислот, соответственно;
- этерификация кверцетина, например салициловой кислотой как по положению С3, так и по С4' существенно не влияет на исходную активность флавоноида;
- в ряду сложных эфиров, полученных с помощью 4-гидроксibenзойной, 2,6-дигидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной (протокатеховая), 3,4,5-тригидроксibenзойной (галловая) кислот, наиболее активными являются эфиры салициловой и галловой кислот.

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее активные из синтезированных сложных эфиров – это кверцетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5 (ТЕАС – 4,20) и мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5 (ТЕАС – 4,31), которые превосходят по активности кверцетин (ТЕАС – 3,33) и мирицетин (ТЕАС – 3,74) в 1,3 и 1,2 раза, соответственно.

Таким образом, сопоставление и сравнение экспериментов *in silico* и *in vitro* позволили определить наиболее перспективные соединения в ряду сложных эфиров ксантофиллов.

Таковыми являются эфиры лютеина: β , ϵ -каротин-3,3'-дibenзоат (соединение С.8), β , ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9), β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12); эфир зеаксантина: β , β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19); эфиры астаксантина: β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4), β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5). В ряду сложных эфиров флавоноидов определены следующие перспективные соединения: нарингенин 4'-циннамат (соединение F.3), кверцетин 4'-циннамат (соединение F.7), гесперетин 3'-циннамат (соединение F.11), кверцетин 4'-никотинат (соединение F.8), кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.17), мирицетин-3-салицилат (соединение F.18), мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (соединение F.21), мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.22). Соединениями-лидерами признаны β , ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат, β , β -каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат), кверцетин 4'-циннамат и мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Критический анализ современного состояния биокатализа как одного из направлений «зеленой» химии позволил обосновать перспективность изучения энзимного синтеза как пути модификации ксантофиллов и флавоноидов, химическая модификация которых, в частности этерификация, невозможна в классических условиях.

2. Теоретически сформирован ряд соединений для оптимизации структуры каротиноидов: модельные ксантофиллы – лютеин, зеаксантин и астаксантин, ацилирующие агенты – бензойная, 4-метилбензойная, фенилгликолевая, никотиновая, салициловая кислоты, ибупрофен и кетопрофен. Для направленной модификации структуры флавоноидов, а именно синтеза их сложных эфиров, сгенерированы следующие ряды: агликоны – кверцетин, мирицетин, нарингенин, гесперетин, а для их ацилирования – бензойная, салициловая, никотиновая, 4-гидроксибензойная, 2,6-дигидроксибензойная, 3,4-дигидроксибензойная (протокатеховая), 3,4,5-тригидроксибензойная (галловая) кислоты.

2. Прогноз методом молекулярного докинга показал, что с точки зрения фармакологической активности наиболее перспективными следует считать эфиры лютеина и зеаксантина. Это определяется их высокоселективным распределением и связыванием с лютеинсвязывающим (STARD3) и зеаксантинсвязывающим (GSTP1) белками. Данные, полученные с помощью прогностической программы «PASS Online», показали, что сложные эфиры флавоноидов, будут проявлять антиоксидантную, мембранопротекторную и антиканцерогенную активность, превосходящую таковую для исходных флавоноидов, что и было далее экспериментально доказано на моделях *in vivo*.

3. Экспериментально подтверждена возможность получения новых полусинтетических производных ксантофиллов – осуществлен синтез 21 сложного эфира астаксантина, лютеина и зеаксантина с семью кислотами, 19 соединений получены впервые. Предложенная при этом математическая модель позволяет использовать разработанные

условия синтеза сложных эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина для других ксантофиллов. Получение образцов субстанций зеаксантина и лютеина в форме *all-trans*-изомеров имеет общетеоретическое и практическое значение не только в области синтеза фармакологически активных субстанций, но и в сфере создания стандартных образцов для любых классов соединений, характеризующихся геометрической изомерией.

4. Экспериментально подтверждена возможность региоселективного биокаталитического синтеза сложных эфиров флавоноидов: получены 12 сложных эфиров нарингенина и кверцетина по положению C4' и 10 сложных эфиров кверцетина и мирицетина с региоселективной этерификацией по положению C3 пиранового фрагмента флавоноида. Предложенный подход, а именно использование энзима в качестве катализатора, позволяет проводить региоселективную этерификацию флавоноидов по положению C3, что обеспечивается «защитой» гидроксигрупп в положениях C3', C4', C5, C7.

5. Методом *in vitro* изучена антирадикальная активность 21 сложного эфира ксантофиллов и 22 сложных эфиров флавоноидов при взаимодействии с радикал-катионами ABTS^{•+}. Полученные результаты подтверждают собственный теоретический прогноз *in silico*, а именно синтезированные соединения превзошли родоначальные структуры по антирадикальному действию как в прогностической программе «PASS-online», так и в исследованиях *in vitro*.

6. С учетом результатов экспериментов *in silico* и *in vitro* установлено, что β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9) занимает лидирующее положение при стыковке с лютеинсвязывающим белком, имея высокий прогноз антиканцерогенной и антиоксидантной активности. Эфир зеаксантина – β,β-каротин-3,3'-диилди(2-гидроксibenзоат) (соединение С.19) в соответствии с прогнозом должен проявить максимально высокое антиканцерогенное действие среди эфиров ксантофиллов. Прогноз *in silico* и определение антиоксидантной активности *in vitro* показали, что кверцетин 4'-циннамат (соединение F.7) и мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5 (соединение F.22) являются соединениями-лидерами, при этом соединение F.7 имеет максимальную антиоксидантную активность *in silico*, а соединение F.22 *in vitro* среди всех синтезированных сложных эфиров. В соответствии с прогнозом соединение F.7 должно обладать наибольшей активностью в отношении SARS-CoV-2, а соединение F.22 – выраженным мембрано-протекторным и антирадикальным действиями. Таким образом, соединениями-лидерами признаны β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат, β,β-каротин-3,3'-диилди(2-гидроксibenзоат), кверцетин 4'-циннамат и мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5, на которые составлены проекты НД.

Перспективные направления использования результатов диссертационного исследования

С учетом того, что в концепции «зеленой химии», включающей 12 основных направлений, ведущую позицию занимает оптимизация процессов катализа, биокатализ в синтезе ЛС, на наш взгляд, имеет теоретическую и практическую перспективу как элемент развития «зеленой технологии» в РФ.

Дальнейшее промышленное масштабирование энзимного синтеза производных ксантофиллов и флавоноидов, их практическое внедрение расширит номенклатуру отечественных ЛС природного происхождения, проявляющих антиоксидантную активность.

Значимым для практической и экспериментальной медицины будет установление специфической фармакологической активности синтезированных сложных эфиров и ее сравнение с активностью исходных ксантофиллов и флавоноидов. В дальнейшем этот экспериментальный материал позволит провести более достоверную корреляционную оценку зависимости между теоретическим прогнозированием взаимосвязи структура-активность *in silico* и экспериментом *in vivo* на модели взаимодействия с радикал-катионами ABTS^{•+}.

Представляется перспективным дальнейшее более широкое развитие энзимного синтеза в РФ для получения субстанций синтетических ЛС, характеризующихся наличием геометрических изомеров, что имеет принципиальное значения для уменьшения уровня токсичности таких ЛС за счет снижения или исключения содержания примесей «нежелательных» геометрических изомеров.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Печинский, С. В. Перспективы использования биокатализа в фармации на примере синтеза эфиров лютеина / С. В. Печинский // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2021. – Т. 24, №9. – С. 3 – 9. DOI: 10.29296/25877313-2021-09-01.
2. Печинский, С. В. Биокатализ как инструмент оптимизации фармацевтического синтеза лекарственных средств (обзор) / С. В. Печинский // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – Т. 25, № 8. – С. 10 – 23. DOI: 10.29296/25877313-2022-08-02.
3. Печинский, С.В. Оптимизация синтеза сложного эфира астаксантина методом математического планирования / С. В. Печинский, Э. Т. Оганесян, А. Г. Курегян // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2023. – Т. 26, № 6. – С. 3 – 9. DOI: 10.29296/25877313-2023-06-01.
4. Печинский, С. В. Оптимизация параметров энзимного синтеза нарингенин-4'-бензоата методом математического планирования эксперимента / С. В. Печинский, Э. Т. Оганесян, А. Г. Курегян, А. А. Маркарян // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2023. – Т. 42, №4. – С. 4 – 11. DOI: 10.34907/JRQAI.2023.49.38.001.
5. Курегян, А. Г. Каротиноиды и хлорофиллы при совместном присутствии: аналитические и технологические особенности / А. Г. Курегян, С. В. Печинский, А. А. Маркарян // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2023. – Т. 26, № 12. – С. 3 – 14. DOI 10.29296/25877313-2023-12-01.
6. Печинский, С. В. Дизайн новых производных урацила, обладающих ингибиторной активностью в отношении обратной транскриптазы мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, А. А. Озеров, М. С Новиков // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2015. – №10. – С.40 – 43.

7. Pechinskii, S. V. Synthesis of Lutein and Astaxanthin Esters and Their In Silico Activity / S. V. Pechinskii, A.G. Kuregyan, E. T. Oganessian, E. F. Stepanova // **Russian Journal of General Chemistry**. – 2019. – Vol. 89, №. 5. – P. 913 – 917. DOI: 10.1134/S1070363219050098.
8. Pechinsky, S. V. Synthesis of Zeaxanthin Esters / S. V. Pechinsky, A. G. Kuregyan, E. T. Oganessian // **Russian Journal of General Chemistry**. – 2020. – Vol. 90, №. 5. – P. 827 – 831. DOI: 10.1134/S1070363220050114.
9. Pechinsky, S. V. Chemoenzymatic synthesis of *all-trans*-isomers of lutein and zeaxanthin / S. V. Pechinsky, A. G. Kuregyan, E. T. Oganessian // **Russian Journal of General Chemistry**. – 2021. – Vol 91, № 9. – С. 1674 – 1679. DOI: 10.1134/S1070363221090103.
10. Pechinskii, S. V. Chemoenzyme Synthesis of Flavonoid Esters / S. V. Pechinskii, A. G. Kuregyan, E. T. Oganessian // **Russian Journal of General Chemistry**. – 2022. – Vol. 92, №8. – P. 1401– 1407. DOI: 10.1134/S1070363222080060.
11. Pechinskii, S. V. Regioselective Synthesis of Quercetin and Myricetin Derivatives / S. V. Pechinskii, A. G. Kuregyan, E. T. Oganessian // **Russian Journal of General Chemistry**. – 2023. – Vol. 93, №. 2. – P. 245 – 252. DOI: 10.1134/S1070363223020032.
12. Печинский, С. В. Изучение ингибирующей активности немоноксацина – нового, не содержащего фтор, производного хинолона в отношении топоизомеразы IV методом молекулярного докинга / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, М. Ю. Самсонов, А. И. Иванов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22249>.
13. Курегян, А. Г. Модель стабилизации субстанций каротиноидов / А. Г. Курегян, Э. Ф. Степанова, С. В. Печинский, Э. Т. Оганесян // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2020. – №4. – С. 55 – 66.
14. Печинский, С. В. Поиск активных кандидатов в ряду флавоноидов в отношении возбудителя SARS-Cov-2 методом молекулярного докинга / С. В. Печинский, Э. Т. Оганесян, А. Г. Курегян // Фармацевтическое дело и технология лекарств. – 2021. – №1. DOI:10.33920/med-13-2101-02 22- 23.
15. Печинский, С. В. Выбор параметров, влияющих на синтез сложных эфиров астаксантина / С. В. Печинский // Прорывные научные исследования: проблемы, пределы и возможности: сб. статей междунар. науч.-практ. конф. – Уфа: OMEGA SCIENCE, 2023. – С. 170 – 173.
16. Печинский, С. В. Определение антиоксидантной активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов / С. В. Печинский, А. Г. Курегян // Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения: сб. статей междунар. конф. –М., ФГБНУ ВИЛАР, 2024. – С. 223 – 22.
17. Печинский, С. В. Изучение влияния количественного соотношения агликон - кислота на региоселективный синтез нарингенин - 4' – бензоата / С. В. Печинский, А. Г. Курегян // Глобализация науки: история, современное состояние, перспективы развития: сб. статей междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: OMEGA SCIENCE, 2024. – С. 183 – 185.

18. Печинский, С. В. Изучение антиоксидантной активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов / С. В. Печинский // XXXII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. тезисов. Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2025. – 24(6S). – С. 135.

Патенты:

1. Патент №2702005 РФ Синтез полусинтетических производных природных лютеина и астаксантина : №201845080 : заявл.18.12.2018; опубл. 03.103.2019 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Ф. Степанова. – 10 с.
2. Патент № 2739248 РФ Синтез полусинтетических сложных эфиров природного зеаксантина №2019139342; заявл. 02.12.2019; опубл. 22.12.2020 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян – 7 с.
3. Патент № 2777890 РФ Хемоэнзимный способ получения all-trans-изомеров субстанций лютеина и зеаксантина № 2021110891 : заявл. 16.04.2021: опубл. 16.04.2021 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян – 8 с.
4. Патент № 2800457 РФ Синтез сложных эфиров флавоноидов нарингенина, кверцетина, гесперетина № 2022115103: заявл. 03.06.2022: опубл. 21.07.2023 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян – 11 с.
5. Патент № 2806073 РФ Региоселективный энзимный синтез производных кверцетина и мирицетина № 2022124102: заявл. 12.09.2022: опубл. 25.10.2023, Бюл. №30 / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян – 13 с.

Печинский Станислав Витальевич

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ОБОСНОВАНИЕ МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРЫ
НЕКОТОРЫХ КСАНТОФИЛЛОВ И ФЛАВОНОИДОВ
ПУТЕМ ЭНЗИМНОГО СИНТЕЗА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук