

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Печинский Станислав Витальевич

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук,

заслуженный работник высшей школы РФ,

профессор Оганесян Э.Т.

Пятигорск, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА И МОДИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1 Современные принципы дизайна лекарственных средств	15
1.2 Биокатализ как составляющая концепции «зеленой химии»	20
1.3 Применение биокатализаторов в химическом синтезе	23
1.3.1 Характеристика и использование некоторых классов ферментов в фармацевтическом производстве	24
1.3.2 Преимущества и недостатки применения биокатализа в фармацевтической отрасли	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	37
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Объекты, материалы и реактивы	39
2.2 Методы исследования	46
2.3 Методики и условия проведения экспериментальных исследований	46
2.4 Дизайн исследования	56
ГЛАВА 3 ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТБОРА КАНДИДАТОВ ДЛЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО СИНТЕЗА СУБСТАНЦИЙ И ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	58
3.1 Отбор каротиноидов для химической модификации	58
3.2 Прогноз биологической активности сложных эфиров ксантофиллов методом молекулярного докинга	66
3.3 Выбор флавоноидов для химической модификации	76
3.4 PASS-прогноз видов фармакологической активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов	82

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3	93
ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭНЗИМНОГО СИНТЕЗА ПРОИЗВОДНЫХ КАРОТИНОИДОВ	95
4.1 Предварительный выбор условий энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов	95
4.2 Оптимизация параметров синтеза производных каротиноидов методом математического планирования эксперимента	102
4.3 Синтез и установление структуры сложных эфиров производных ксантофиллов	110
4.3.1 Энзимный синтез эфиров астаксантина, лютеина, зеаксантина	110
4.3.2 Доказательство структуры сложных эфиров ксантофиллов методом ЯМР	121
4.3.2.1 Идентификация сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина методом ^1H ЯМР	124
4.3.2.2 ^{13}C ЯМР спектры сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина	136
4.3.3 Анализ сложных эфиров ксантофиллов методом масс-спектрометрии	147
4.4 Хемоэнзимный синтез <i>all-trans</i> -изомеров лютеина и зеаксантина	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4	160
ГЛАВА 5 СИНТЕЗ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФЛАВОНОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ	161
5.1 Экспериментальный выбор предварительных условий этерификации производных флавоноидов	161
5.2 Оптимизация параметров синтеза новых сложных эфиров флавоноидов методом математического планирования эксперимента	169
5.3 Синтез производных флавоноидов с применением биокатализаторов	176
5.4 Установление структуры и анализ сложных эфиров флавоноидов методами ЯМР и масс-спектрометрии	189

5.4.1 Идентификация сложных эфиров кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина методом ^1H ЯМР	189
5.4.2 ^{13}C ЯМР спектры сложных эфиров кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина	198
5.4.3 Идентификация сложных эфиров флавоноидов методом масс-спектрометрии	206
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5	211
ГЛАВА 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ КСАНТОФИЛЛОВ И ФЛАВОНОИДОВ <i>IN VITRO</i> ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАДИКАЛ-КАТИОНАМИ АВТС ⁺	212
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6	232
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	233
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	236
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	237
ПРИЛОЖЕНИЯ	280

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения

ВИНИТИ РАН – Всероссийский институт научной и технической документации
Российской академии наук

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИИ – искусственный интеллект

ИК – инфракрасная область спектра

ИЮПАК (IUPAC) – Международный союз теоретической и прикладной химии

ЛП – лекарственный препарат

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛС – лекарственное (ые) средство (а)

ЛФ – лекарственная форма

НАДФ (НАДФН) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НД – нормативный документ

НПВС – нестероидные противовоспалительные препараты (средства)

ПФ – подвижная фаза

СО – стандартный образец

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ – ультрафиолетовая область спектра

Ч.д.а. – чистый для анализа

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ABTS – 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты
диаммонийная соль)

ADMET – абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция и токсичность

CADD – автоматизированный дизайн ЛС

CAS (VS) – компьютерный (виртуальный) скрининг

DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида

ЕС – эпикатехин

EGCG – эпигаллокатехин-3-галлат

ЕМЕА – Европейское агентство лекарственных средств, Великобритания, Лондон

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США

HTS – экспериментальный высокопроизводительный скрининг

LBDD – создание ЛС на основе лигандов

LBVS – скрининг на основе сходства или отличия конфигураций лигандов выборки

SBDD – структурно-ориентированный дизайн ЛС

SBVS – скрининг на основе структуры активного центра биомишени

TEAC – эквивалентная антиоксидантная способность Тролокса (Trolox equivalent antioxidant capacity)

QSAR – количественная взаимосвязь структура-активность

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 ВолгГМУ 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.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА И МОДИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Современные принципы дизайна лекарственных средств

Дизайн ЛС всегда был и остается крайне дорогостоящим и ресурсоемким процессом, имеющим несколько «критических точек», к которым в первую очередь относят высокие риски при проведении клинических испытаний. Вместе с этим, учитывая высокую вариабельность структур БАС и терапевтических белков-мишеней, можно признать практически неограниченный потенциал разработки современных ЛС [388].

«Золотой стандарт» создания перспективного ЛС осуществляется за счет экспериментального высокопроизводительного скрининга (high-throughput screening – HTS) и требует значительных вложений. Этот процесс занимает, как правило, 10 – 15 лет и опирается на классический фармакологический и химический скрининг [75].

Очевидно, что внедрение рациональных подходов к разработке ЛС значительно выгоднее экономически и требует меньших временных затрат. Такой результат достигается за счет широких возможностей ускорения разработки активной молекулы, а в дальнейшем и производства ЛС, которые открывают применение методов и инструментария *in silico* [286].

Альтернативой экспериментальному скринингу стал автоматизированный дизайн ЛС (computer-aided drug design – CADD), базирующийся на принципе «обратной фармакологии» (reverse pharmacology). Основой автоматизированного дизайна ЛС является методология и методы *in silico*: например, компьютерный или виртуальный скрининг (computer-aided screening – CAS или virtual screening – VS), молекулярный докинг и молекулярно-динамические подходы (molecular docking, and molecular dynamic – MD approaches), технологии QSAR, ADMET и др. [224].

CADD объединяет два основных направления – структурно-ориентированный дизайн ЛС (structure-based drug design – SBDD) и создание ЛС на основе лигандов (ligand-based drug discovery – LBDD) [348].

Для обоих направлений автоматизированный этап реализуется за счет скрининга *in silico*, который можно осуществить двумя основными путями: 1) провести скрининг на основе структуры активного центра биомишени (structure-based virtual screening – SBVS); 2) провести скрининг на основе сходства или отличия конфигураций лигандов выборки (ligand-based virtual screening – LBVS) [348].

Для SBVS-подхода первичной является трехмерная структура биомишени, как правило, рецептора или фермента, которую используют для генерации или скрининга потенциальных лигандов – структур кандидатов ЛС с последующим выбором, синтезом, биологическим испытанием и оптимизацией соединений-лидеров. Этот подход считается максимально успешным, поскольку после завершения проекта «Геном человека» [97, 146, 204], а также с учетом достижений в области биоинформатики [162, 257], криоэлектронной микроскопии [126, 353] и рентгеновской кристаллографии [78] в сотни раз возросла доступность и достоверность трехмерных структур терапевтически значимых мишеней, внесенных в доступные базы данных, например, PDB [291] и UniProt [339].

Скрининг *in silico* с использованием LBVS-подхода позволяет ранжировать соединения по принципу «активные-неактивные» в отношении того или иного вида фармакологической активности. Этот подход в большей степени опирается на экспериментальные данные по видам активности участников выборки, опубликованные в открытой печати и внесенные в программные ресурсы. Результаты LBVS далее могут быть использованы для оптимизации структуры соединений-лидеров с целью повышения их активности, биодоступности и снижения токсичности [348].

Очевидно, что оба подхода CADD совершенствуются и развиваются в отдельности. Более эффективной признается комбинация стратегий SBVS-

подхода и LBVS-подхода, поскольку они обе дополняют друг друга. Этому способствует повышение достоверности и доступности информации баз данных и библиотек соединений. Одними из самых обширных электронных баз данных химических библиотек признаны следующие: PubChem [284], ChEMBL [109], ZINC [389]. Они содержат молекулы с небольшой молекулярной массой и их профиль биологической активности. В базе COD (Crystallography Open Database) собраны кристаллографические структуры органических, неорганических, металлоорганических соединений, а также минералов [114]. DrugBank объединяет ЛС, разрешенные FDA и EMEA к медицинскому применению и еще находящиеся на стадиях клинических испытаний [128].

Рациональный дизайн ЛС использует и объединяет несколько концепций и технологий, например, дизайн ЛС *de novo* (Drug design *de novo*), репозиционирование или перепрофилирование ЛС (Drug Repositioning), гомологическое моделирование рецептора (Homology modeling), молекулярный докинг (Molecular docking simulation), молекулярная динамика (Molecular docking simulation), количественная взаимосвязь структура-активность (QSAR), параметры ADMET (абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция и токсичность) и др. [77]. Некоторые из этих подходов и инструментов мы посчитали рациональным описать подробнее.

Дизайн ЛС *de novo* принимает за основу или биологическую мишень – рецептор, или уже известные вещества, связывающиеся с этой мишенью. В данном случае моделирование строится на конструировании фармакофора или высокоактивных структур-каркасов, объединяющих несколько фармакофоров. Согласно определению IUPAC «фармакофор» – это набор стерических и электронных свойств, необходимых для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий со специфической биологической мишенью [177]. В настоящее время дизайн ЛС *de novo*, как правило, осуществляется с использованием ИИ и поддерживается значительным количеством бесплатных и коммерческих компьютерных инструментов и платформ, например, LigBuilder [212], OpenGrowth [253], AutoGrow [69], e-LEA3D [110].

Одним из облегченных и упрощенных вариантов концепции «ЛС *de novo*» можно признать оптимизацию известных соединений с установленным фармакоформным фрагментом. При таком подходе к дизайну возможна оптимизация и самого фармакофора, и ауксофора – той части структуры, которая не является фармакофором, но при этом обеспечивает его функциональность. Ауксофор может быть оптимизирован, т. е. структурно модифицирован с целью изменения физических свойств соединения, его биодоступности и стабильности [77].

Дизайн ЛС *de novo*, безусловно, является наиболее прогрессивным подходом, при этом как и любая методология имеет некоторые ограничения. Например, новые соединения не всегда имеют приемлемую схему синтеза, поэтому необходимо программное обеспечение, которое будет учитывать факторы химического синтеза в процессе конструирования молекулы. В этом контексте оптимизация уже известных структур с минимизацией затрат на синтез становится актуальной. Кроме того, вновь синтезированные или оптимизированные молекулы после докинга *in silico* обязательно должны быть помещены в полость рецептора, и этот факт необходимо зафиксировать кристаллографически, достоверно подтвердив положительный результат докинга. Эта часть эксперимента доступна не всем исследователям и лабораториям. Кроме того, новые соединения в дальнейшем в обязательном порядке должны пройти полный комплекс испытаний на токсичность и безопасность *in vivo*, несмотря на то что на начальном этапе базовую информацию можно получить с помощью технологий *in silico*.

Другим устоявшимся принципом дизайна ЛС является репозиционирование или перепрофилирование ЛС (Drug Repositioning). Принцип опирается на поиск нового терапевтического использования уже применяемых и изученных с точки зрения безопасности и токсичности ЛС или БАС [186, 188]. Многие исследователи считают его революционным, т. к. перепрофилирование ЛС или БАС ускоряет процесс разработки препаратов, снижает стоимость и риски, присущие разработке ЛС *de novo* [279, 306].

При создании ЛС *de novo* и при их перепрофилировании исследователи чаще всего в качестве инструмента применяют методологию молекулярного докинга. Это самый популярный и успешный структурный метод в автоматическом дизайне ЛС, с помощью которого прогнозируют взаимодействие лиганда и биологической мишени [118, 147, 232]. Такой прогноз строится на предсказании ориентации лиганда внутри рецептора и дальнейшей оценке их комплементарности с помощью скоринговых функции [280]. В процессе докинга используются два разных типа стыковки лиганда и мишени. Первый вариант – жесткая стыковка или жесткий докинг, основанный на концепции «замка и ключа» [312], при котором и лиганд, и карман рецептора имеют жесткую конфигурацию. Жесткая структура обоих затрудняет наблюдение за взаимодействием молекулы ЛС и сайта связывания, а иногда анализируемая молекула не может качественно взаимодействовать с карманом рецептора или же взаимодействует, но слабо. В этом случае эксперимент не дает ожидаемого результата [233], и в итоге может быть «потеряна» перспективная структура. Вместе с тем простота и скорость являются преимуществами жесткого докинга и поэтому его можно использовать для предварительных исследований. Для улучшения стыковочного контакта необходима внутренняя гибкость рецептора [331].

Следует признать, что не существует абсолютно «жестких» биологических мишеней, поэтому тип «мягкой стыковки» или теории «гибкости» более предпочтителен с точки зрения приближенности условий эксперимента *in silico* к реальным. Основа «гибкого докинга» – это концепция индуцированной подгонки, при которой фрагменты мишени и лиганда остаются гибкими в процессе стыковки [342]. Такой вариант докинга позволяет учитывать взаимодействие лиганда с конформационными изменениями рецептора и может предсказать потенциальные изменения в структуре лиганда, но этот подход достаточно трудоемок. Современное программное обеспечение позволяет проводить эти исследования на достаточно высоком и достоверном уровне. За последние десятилетия было разработано множество программ, позволяющих осуществлять

докинговые исследования, среди которых наиболее популярными являются пакет программ AutoDock [68], платформы DockThor [125], Molegro Virtual Docker [239] и др.

Среди отечественных исследователей наиболее популярным является сервис «PASS online», который позволяет осуществлять прогноз более 4000 видов биологической активности, токсические и побочные эффекты соединений и др. [359].

К преимуществам автоматизированного дизайна ЛС можно отнести возможность скрининга значительной выборки структур за короткие сроки и с минимальными материальными затратами, т. к. виртуальность эксперимента не требует синтеза молекул выборки, что повышает экономичность эксперимента. Следует признать эффективным совмещение нескольких подходов и инструментов при проведении эксперимента *in silico*, например сочетание скрининга путем молекулярного докинга с моделированием фармакофоров. Главным недостатком докинга является низкая доступность и дороговизна реального подтверждения точности связывания лиганда с сайтом биомишени, в частности кристаллографический эксперимент [281, 318]. Важно, что в настоящее время существует доступный и достоверный программный ресурс, который позволяет реализовать теоретический фрагмент исследования, т. е. провести обоснование синтеза и модификации природных БАС, в частности с использованием молекулярного докинга.

1.2 Биокатализ как составляющая концепции «зеленой химии»

Одним из важнейших приоритетов в современном фармацевтическом производстве является концепция «зеленой химии», которая была впервые сформулирована в середине 90-х годов XX века П. Анастасом, чтобы решать экологические проблемы, связанные с химическими продуктами и процессами их производства [57]. П. Анастас и Дж. Уорнер впервые предложили 12 принципов «зеленой химии» [56], которая позволяет не только улучшить экологичность

процесса химического производства, но и повысить экономические показатели. Возможность сочетания экономических и экологических преимуществ, безусловно, является причиной того, что «зеленая химия» привлекла такое огромное внимание синтетиков за последние два десятилетия.

Для производства фармацевтических препаратов основной проблемой является постоянно возрастающая сложность молекул, которая требует многоэтапного и многостадийного синтеза. Так, например, с учетом «правила Липинского» молекулярная масса молекулы-кандидата должна быть не менее 450. Однако разработчики с целью повышения эффективности и безопасности все больше усложняют структуры фармацевтических молекул. Анализ 128 молекул-кандидатов «в лекарства» от разных фармацевтических компаний показал, что в среднем для синтеза активных фармацевтических субстанций требуется восемь стадий. Большое число стадий синтеза также объясняет, почему E-фактор (отношение кг отходов к кг целевого продукта) в фармацевтической отрасли намного выше (25-100), чем, например, в производстве удобрений, бытовой химии и косметике (<1-5) [58].

Ведущие фармацевтические компании решают эту проблему путем интеграции «зеленой химии» в фармацевтическую отрасль, развивая ее основные приоритетные направления, используя реагенты с высокой атомной экономичностью, заменяя растворители на менее токсичные, выбирая более эффективных реакций синтеза, в том числе с использованием биокатализаторов [95].

Биокатализ – это общий термин, описывающий применение любого типа биокатализатора. Здесь имеются в виду либо ферменты природного происхождения, либо генетически модифицированные, изолированные или же в виде целых клеток, а также в виде рекомбинантных экспрессируемых белков внутри клеток. В литературе встречается несколько синонимичных определений этого процесса, таких как энзимный синтез, энзимный катализ, хемоэнзимный синтез, ферментативный катализ [115].

Знаковым примером использования «зеленой химии» для производства фармацевтических препаратов является производство цефалексина, в котором 13-стадийный химический процесс был заменен двумя стадиями с использованием биокатализа. Предложенный способ позволил в три раза улучшить показатель E-фактора производства: для ферментативного процесса он составлял 5 кг отходов на 1 кг цефалексина, а в химическом синтезе – 15 кг отходов на 1 кг цефалексина. Другое преимущество состоит в то, что биокаталитический синтез цефалексина не требует использования метиленхлорида, что существенно снижает токсичность отходов [254].

Очевидно, что интерес к применению биокатализа в фармацевтической промышленности не случаен, т. к. эта отрасль на сегодняшний день производит больше всего отходов [134, 228, 304]. Кроме того, поскольку биокатализ обычно проводится примерно при одинаковом температурном режиме, то появляется возможность проведения спаренных каскадов реакций, что обеспечивает дополнительные экономические и экологические перспективы для фармацевтического синтеза [307, 351].

Еще одним «зеленым» преимуществом биокатализаторов является использование в производстве стандартных многоцелевых реакторов периодического действия, не требующих установки дополнительных дорогостоящих специальных устройств, например оборудования высокого давления [288], что позволяет сократить затраты при реализации непрерывных процессов [301].

Безусловно, что не все биокаталитические процессы оказывают столь впечатляющее влияние на процесс производства, но преимущества биокатализа очевидны. Технический прогресс в области биокатализа способствует росту ферментативных схем синтеза и тем самым продвижению и внедрению принципов «зеленой химии» в фармацевтическую отрасль.

Однако динамика развития в этой области остается проблемой для «зеленой химии» в целом и для ферментативного синтеза в частности. Высокая скорость истощения числа лекарственных препаратов-кандидатов, как правило, не

оправдывает обширных работ по поиску новых схем синтеза и их разработке на ранней стадии создания ЛС. Разработчики преимущественно уделяют основное внимание скорости вывода ЛП на рынок, а не поиску более эффективного и экономичного производства. Это часто приводит к неоптимальным и плохо изученным схемам синтеза с низким использованием «зеленых» принципов.

Долгое время реализации ферментативного синтеза при переводе кандидатов в ЛП препятствовало ограниченное количество легкодоступных биокатализаторов или отсутствие положительного опыта их применения. Кроме того, против выбора биокаталитических схем синтеза долгое время активно выступали химики-технологи, для которых использование давно проверенных и часто используемых классических схем синтеза было предпочтительным, даже при существующих альтернативах. Однако за последнее десятилетие эта ситуация изменилась, и этому способствовали прорывные разработки, например, в молекулярной биологии, биоинформатике и генной инженерии. Все это в совокупности привело к увеличению спектра легкодоступных коммерческих биокатализаторов [297].

Крайне важным является то, что, применяя принципы «зеленой химии», можно объединить экологичность и высокую экономическую целесообразность фармацевтического синтеза, т. е. прогресс в биокатализе может обеспечить более «зеленое» будущее фармацевтического производства.

1.3 Применение биокатализаторов в химическом синтезе

Успешное развитие молекулярной биологии, биоинформатики и биоинженерии за последние 20 лет привело к увеличению частоты применения биокатализаторов. Все активнее их используют в различных отраслях промышленности: в пищевой промышленности [219], при получении биотоплива [71], фармацевтических препаратов [133], в сельском хозяйстве [294], т. к. это делает производство экологичным («зеленым») и экономически эффективным [83, 90, 209].

В последние годы наблюдается интенсивное внедрение энзимного катализа в различные сферы химического производства, в том числе в синтез ЛС [83, 293]. Основными драйверами этого процесса являются быстрое коммерческое продвижение и производство новых ферментов, развитие биоинформатики и компьютерное моделирование ферментативных реакций. Столь бурный прогресс связан в первую очередь с тем, что в последние несколько десятилетий молекулярная инженерия внесла огромный вклад в понимание ферментативного катализа. Были устранены такие недостатки ферментов, как низкая стабильность и высокая чувствительность к влиянию рН среды и температуры. Одним из важнейших факторов развития стала направленная модификация структуры ферментов методами генной инженерии, что позволило повысить их эффективность, стабильность и снизить стоимость. Использование технологий *in silico* позволяет направленно модифицировать природные ферменты и получать более эффективные энзимы [158, 293].

1.3.1 Характеристика и использование некоторых классов ферментов в фармацевтическом производстве

Исторически сложилось, что наиболее популярными ферментами, используемыми для синтеза ЛС, являются кеторедуктазы, липазы, трансаминазы, альдолазы и др. [52, 131, 366, 376].

По оценкам специалистов около 25% всех известных в настоящее время ферментов являются **оксидоредуктазами**, а наиболее часто используемыми в биокатализе являются дегидрогеназы, к которым относятся и алкогольдегидрогеназы. Это ферменты, которые катализируют превращение широкого спектра кетонов и некоторых альдегидов в спирты с высокой степенью регио- и стереоселективности в присутствии НАДФ или НАДФН. За последние 10 лет научные и технологические достижения сделали их промышленное применение по-настоящему эффективным, экологически чистым и способным конкурировать с традиционным катализом при производстве спиртов [298]. Чаще

все их используют для получения промежуточных продуктов, характеризующихся высокой энантиоселективностью. Пример такого энантиоселективного синтеза – получение 3-тиациклопентанона и 3-оксациклопентанона – промежуточных продуктов в синтезе Fosamprenavir и Sulopenem представлен на рисунке 1.1.

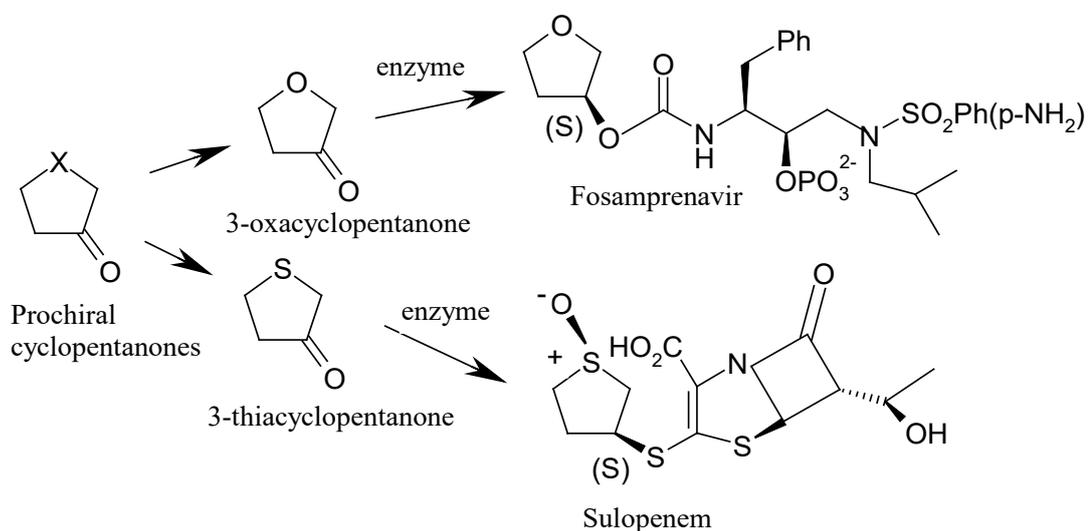


Рисунок 1.1 – Энантиоселективный синтез Fosamprenavir и Sulopenem согласно [249]

Авторы этого исследования изучали природу энантиоселективности родственных мутантных кеторедуктаз. Было проведено бикаталитическое восстановление почти симметричных 3-оксациклопентанона и 3-тиациклопентанона, что практически невозможно было осуществить другими способами [249].

Компания «Merck Sharp & Dohme Corp» использовала биокатализ для синтеза новых селективных агонистов β_3 -адренергических рецепторов (Рисунок 1.2).

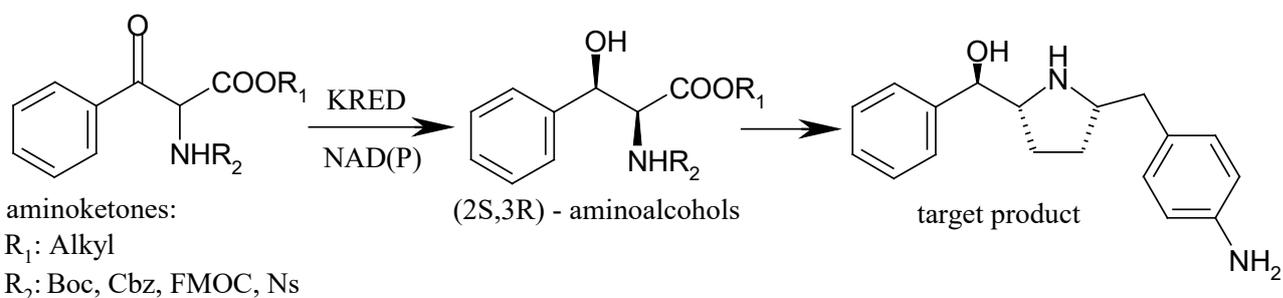


Рисунок 1.2 – Биокаталитический синтез селективных агонистов β_3 -адренергических рецепторов согласно [117]

Один из этих этапов синтеза включает восстановление аминокетонов до аминоспиртов в присутствии кеторедуктаз (KRED) и кофактора НАДФ. Использование энзима позволило получить стереоселективный изомер из диастереомеров с высоким выходом оптической чистоты [117].

Липазы – представители наиболее часто используемых классов гидролаз в органическом синтезе. Они широко встречаются в природе (дрожжи, бактерии, грибы, растения, животные, человек) и значительное их количество производится промышленным путем. Естественная функция липаз – гидролиз и повторная этерификация триглицеридов. Липазы, несомненно, являются наиболее ценным классом ферментов в прикладном биокатализе, т. к. обладают рядом уникальных свойств: широкая специфика субстрата, отсутствие необходимости использовать кофакторы, способность работать при высоких концентрациях субстрата и коммерческая доступность [101, 104].

Примером использования липазы в стереоселективном фармацевтическом синтезе ЛС является патент компании «Zhejiang changming pharmaceutical CO Ltd», опубликованный в 2018 г. В нем описывается синтез противоэпилептического препарата Levetiracetam (Keppra, Elepsia) начиная с рацемического метил-2-бромобутаноата, с применением коммерчески доступной иммобилизованной липазы В *Candida antarctica* – липазы Novozim 435 (Рисунок 1.3) [264].

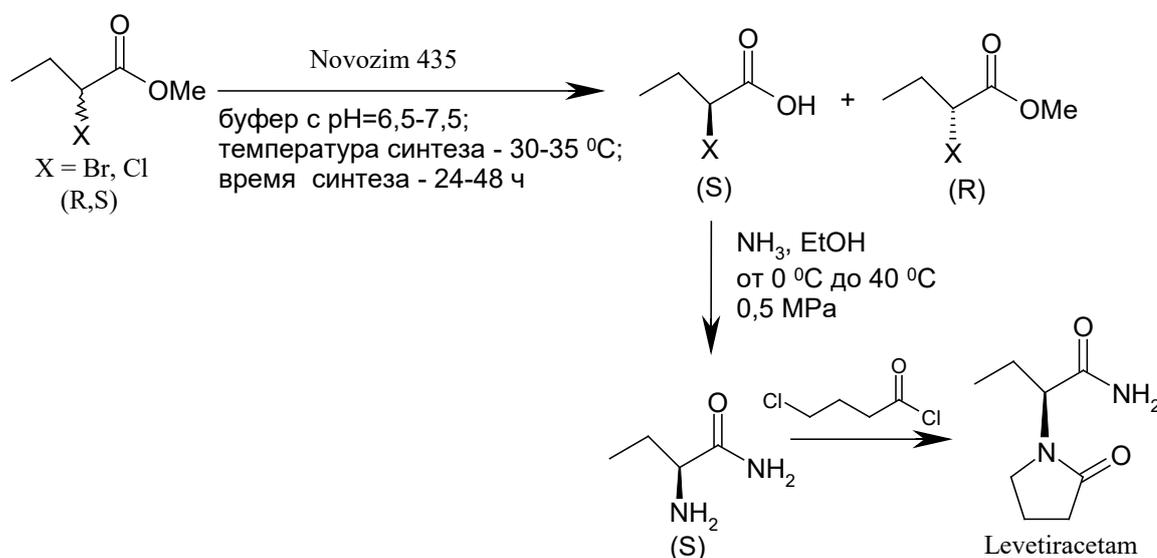


Рисунок 1.3 – Хемоэнзимный синтез Levetiracetam согласно [264]

Ключевым моментом данного синтеза является образование только S-изомера (S), (Рисунок 1.3), который извлекается с помощью этилацетата и используется в дальнейшем для синтеза Levetiracetam [264].

Использование липазы для получения Ticagrelor (Brilinta) было запатентовано Пекинским университетом химических технологий в 2017 г. (Рисунок 1.4) [265]. Предложенный способ синтеза является более экономичным и простым по сравнению с методом синтеза, предложенным компанией «AstraZeneca» – разработчиком оригинального препарата Ticagrelor.

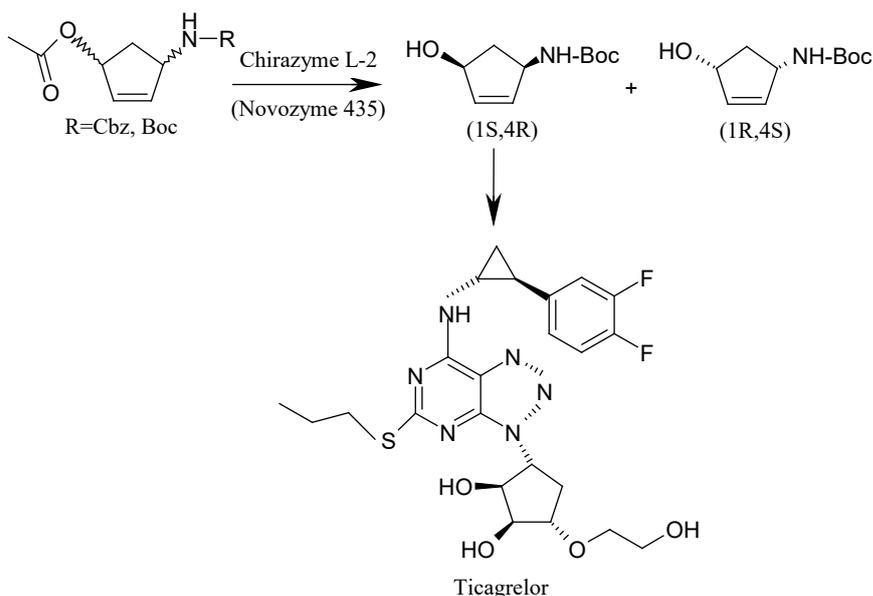


Рисунок 1.4 – Энзимный синтез Ticagrelor согласно [265]

Преимуществом энзимного синтеза Ticagrelor является получение только S-изомера промежуточного продукта (Рисунок 1.4), что не требует в дальнейшем дополнительной очистки целевого соединения. В качестве катализатора предложено использовать коммерческую липазу Chirazyme L-2, которая является аналогом Novozim 435 [265].

В 2018 г. компания «HC-Pharma AG» (Швейцария) запатентовала схему синтеза противовирусного препарата Sofosbuvir (Sovaldi), используемого в комбинированной терапии хронического гепатита С (Рисунок 1.5) [267].

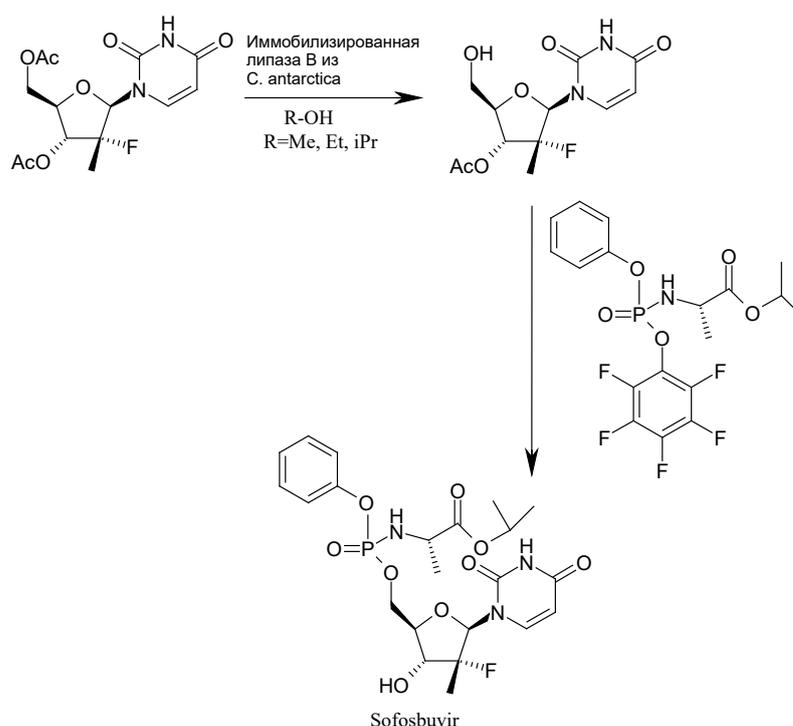


Рисунок 1.5 – Биокаталитический синтез Sofosbuvir согласно [267]

По этой схеме моноацетилирование промежуточного продукта проводится в присутствии липазы. Крайне важно, что данная схема используется в промышленном производстве [267].

Основным преимуществом биокатализаторов, в частности, липаз, является их способность приводить к высокоэффективному стереоселективному синтезу и гидролизу сложных эфиров [327, 102, 105]. Это их свойство чаще всего используется для фармацевтического синтеза, т. к. в большинстве случаев оптические изомеры имеют различную эффективность и безопасность.

Классическим примером таких эффектов является активность напроксена (Naproxen), относящегося к классу НПВС, для которого активность (S)-изомера в 28 раз выше, чем у соответствующего (R)-энантиомера. Для решения задачи по получению преимущественно (S)-изомера была предложена схема, основанная на ферментативном гидролизе рацемического метилового эфира напроксена в присутствии липазы *Candida rugosa* (CRL), иммобилизованной на Amberlite XAD7 (Рисунок 1.6) [332].

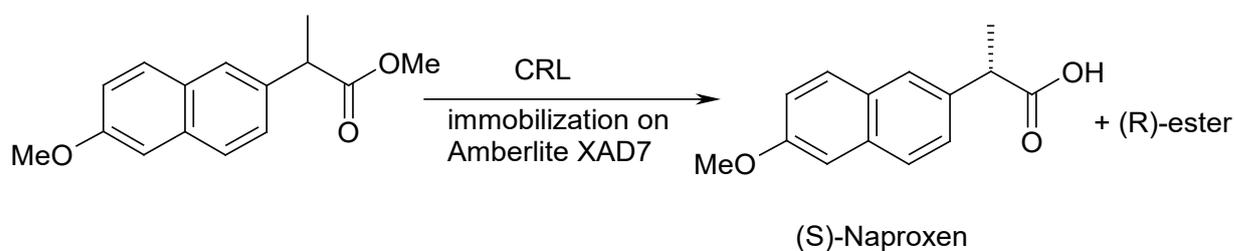


Рисунок 1.6 – Синтез (S)-Naproxen в присутствии липазы *Candida rugosa* согласно [332]

Исследования показали, что использование биокатализаторов в форме наночастиц приводит к повышению эффективности энантиоселективной биотрансформации [387]. В случае синтеза (S)-Naproxen применение инкапсулированных наночастиц липазы повысило выход необходимого изомера с 49% до 98% [332].

Примером того как два оптических изомера проявляют различные виды фармакологической активности, является флурбипрофен (Flurbiprofen): (S)-флурбипрофен является препаратом НПВС, тогда как в экспериментах на животных показано ингибирование роста опухоли его энантиомером [325]. Для эффективной наработки и исследования (R)-Flurbiprofen была разработана схема его биокаталитического синтеза (Рисунок 1.7).

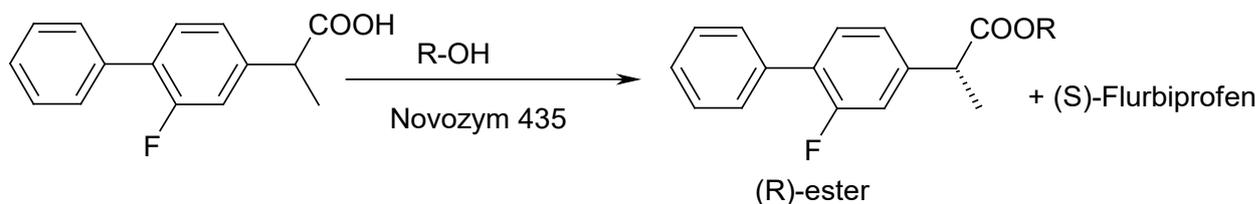


Рисунок 1.7 – Энантиоселективный синтез эфира (R)-Flurbiprofen согласно [325]

В качестве биокатализатора авторы использовали несколько коммерческих липаз: *A. oryzae* MIM (Microbiologia Industriale Milano), *A. oryzae* CBS 102.07 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland), *Rhizopus oryzae* CBS 112.07, *R. oryzae* CBS 260.28, *R. oryzae* CBS 328.47, *R. oryzae* CBS 391.34, кроме того, одним из апробированных биокатализаторов являлся Novozyme 435. В результате оптимизации параметров синтеза (температуры и времени реакции) авторам удалось повысить выход целевого продукта с 62% до 92% [325].

Изомеры кетопрофена характеризуются различной активностью и токсичностью: (R)-Ketoprofen токсичен, а его изомер – (S)-Ketoprofen фармакологически активен и является востребованным представителем группы препаратов НПВС.

Изучено влияние следующих иммобилизованных липаз на синтез (S)-Ketoprofen: *Candida rugosa* (CRL, Type VII), *Mucor javanicus* (MJL, Amano), *Mucor miehei* (MML), *Rhizomucor miehei* (RML), *Pseudomonas cepacia* (PCL, Amano) (Рисунок 1.8) [382].

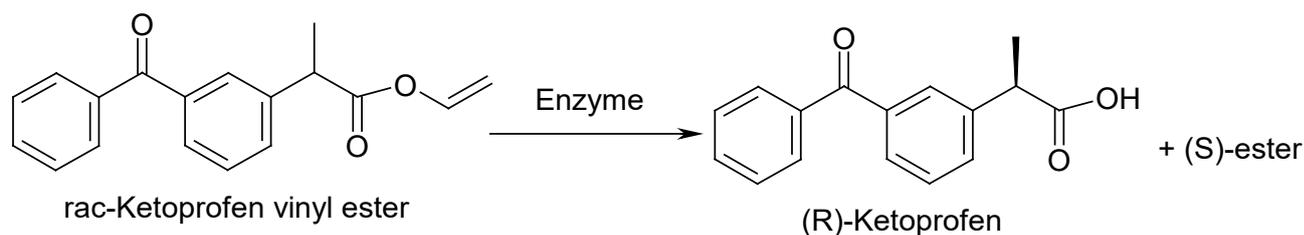


Рисунок 1.8 – Ферментативный гидролиз рацемата винилового эфира Ketoprofen согласно [382]

Авторы установили, что иммобилизация липаз защищает конформацию от разрушения под действием полярных растворителей и высоких температур в ходе синтеза. Помимо этого, иммобилизация липаз обуславливает высокую активность в течение 30 циклов при сохранении исходной энантиоселективности [295, 382].

Примером изучения липаз, иммобилизованных на магнитных наночастицах, является энантиоселективная этерификация (R,S)-Ibuprofen (Рисунок 1.9). Авторами установлено, что две коммерчески доступные липазы *Candida rugosa* (CRL от Sigma-Aldrich Co. и OF от Meito Sanguo Co.) приводили к получению изомеров в соотношении 83% к 42% с преобладанием (S)-эфира.

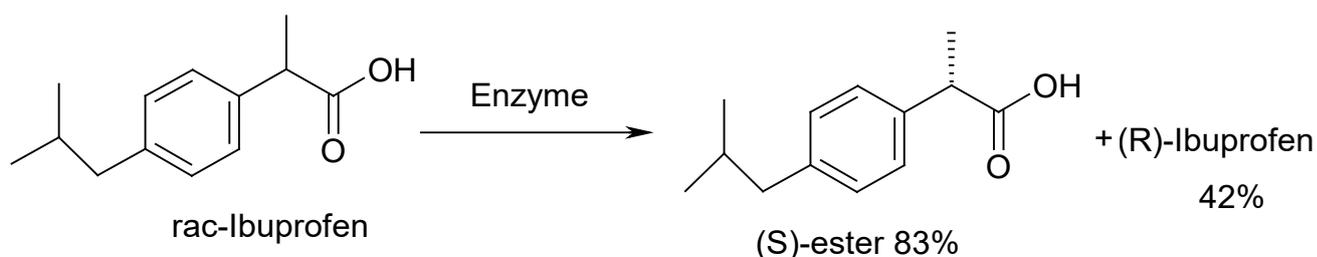


Рисунок 1.9 – Ферментативная этерификация Ibuprofen согласно [227]

Это исследование показало, что использование энзимов, иммобилизованных на магнитных частицах, способствует более быстрому удалению катализатора из реакционной среды. Применяемые в эксперименте иммобилизованные липазы остаются активными более чем после пяти циклов, что имеет положительные экономические перспективы [227].

Как показали приведенные примеры, использование липаз позволяет проводить стереоселективный синтез соединений, однако для повышения выхода целевых продуктов необходима оптимизация таких параметров синтеза, как температура, время синтеза, скорость перемешивания реакционной среды, цикличность использования биокатализатора.

Трансаминазы способны катализировать процесс обратимой передачи аминокислотной группы от подходящего донора к акцептору. В последние годы к ним приковано пристальное внимание, т. к. они обеспечивают синтез хиральных первичных аминов [197, 213]. Так, компания «Codexis» (США) предложили использовать трансаминазу для синтеза ЛС Vernakalant (Рисунок 1.10).

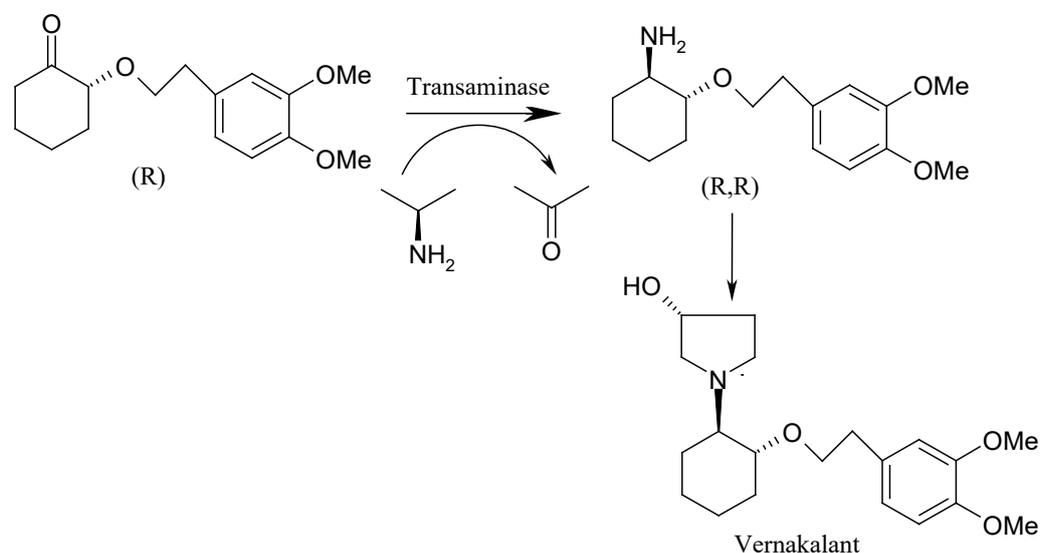


Рисунок 1.10 – Стереоселективный энзимный синтез Vernakalant согласно [197]

Полученный амин (R,R)-88 является промежуточным продуктом в синтезе Vernakalant – блокатора ионных каналов, применяемого для лечения мерцательной аритмии [197].

Компания «Pfizer Ireland Pharmaceuticals» запатентовала синтез прегабалина, используемого в терапии нейропатических болей, генерализованном тревожном расстройстве, эпилепсии и т. п. (Рисунок 1.11).

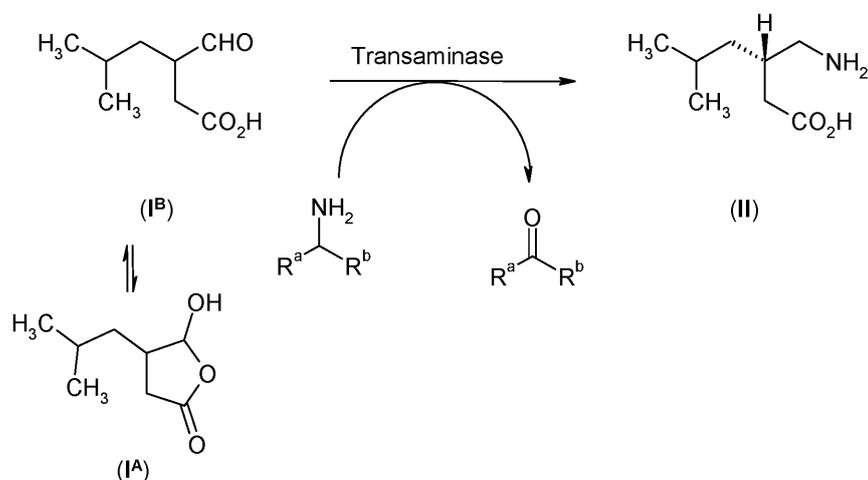


Рисунок 1.11 – Синтез прегабалина с участием трансаминаз согласно [270]

В предлагаемой схеме используется стереоселективная трансаминаза, которая обеспечивает образование только *S*-энантиомера – соединение I^A (Рисунок 1.11), что позволяет сократить стадии очистки промежуточного продукта [270].

Другой обширной группой биокатализаторов являются *лиазы*, которые катализируют формирование ковалентных связей. В связи с успешными исследованиями в области направленного конструирования ферментов с заданными свойствами лиазы стали интенсивно использоваться в фармацевтическом производстве и в области тонкого органического синтеза. Так, Юлихский исследовательский центр (Германия) запатентовал синтез алкалоида Cathine, схема которого представлена на рисунке 1.12.

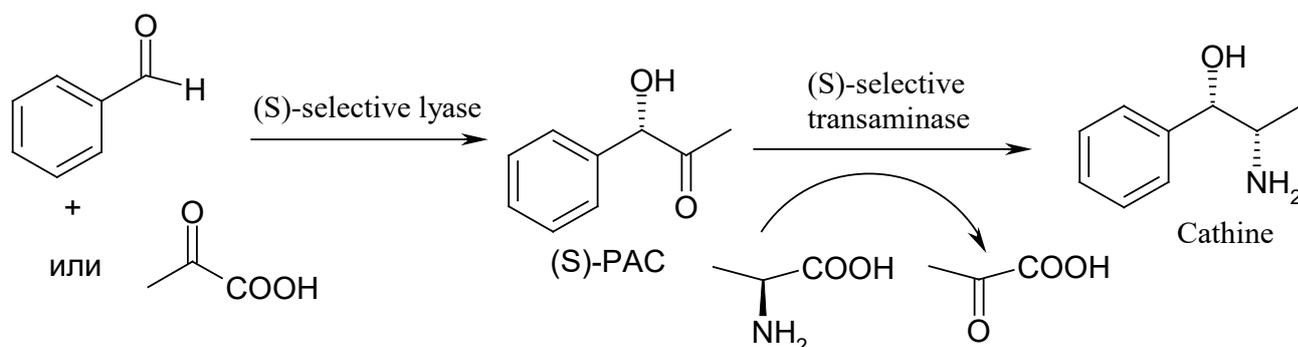


Рисунок 1.12 – Стереоселективный синтез Cathine согласно [271]

Синтез Cathine осуществлен с использованием (S)-селективных лиазы и трансаминазы, в результате которого целевым продуктом стал Cathine в форме S-изомера [271].

К классу *лиаз* относят альдолазы, катализирующие биологический эквивалент альдольной конденсации в химической реакции, что приводит к образованию углерод-углеродных связей путем обратимого стереоконтролируемого добавления нуклеофильного кетона к электрофильному акцептору альдегида. Способность альдолаз принимать множество «неестественных» акцепторных субстратов для создания новых стереоцентров делает их мощными инструментами для асимметричного синтеза.

На рисунке 1.13 показана запатентованная компанией «Pfizer» схема синтеза статинов, в которой в качестве биокатализатора используется альдолаза [269].

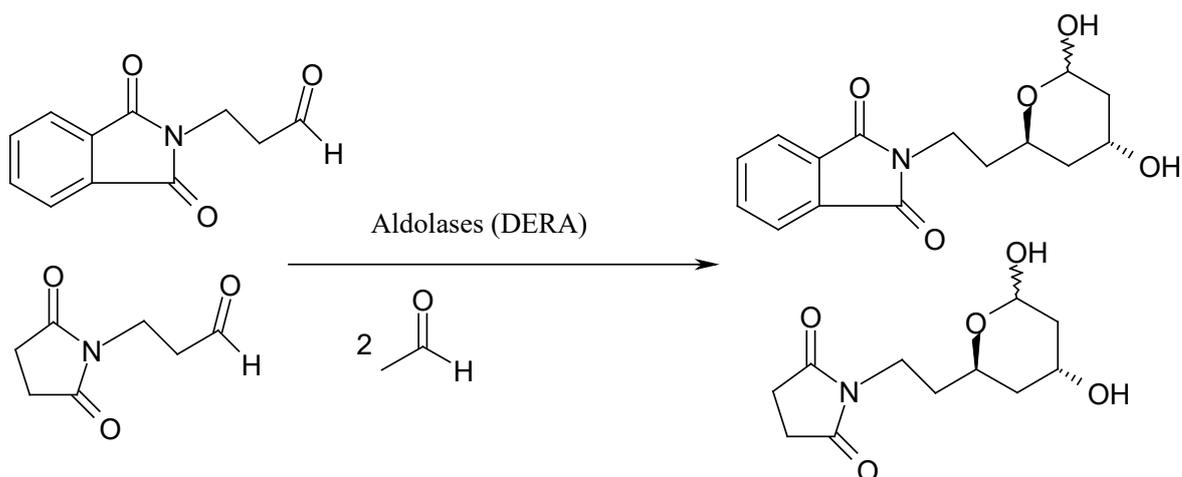


Рисунок 1.13 – Хемоэнзимный способ синтеза статинов согласно [269]

На этапе взаимодействия альдегида с субстратом аминокальдегида или N-защищенным субстратом аминокальдегида альдолаза-катализируемые условия позволяют проводить конденсацию с формированием соответствующих изомеров лактола.

Таким образом, в современном фармацевтическом синтезе используются практически все классы биокатализаторов, что в первую очередь обусловлено их стереоселективностью, экономической эффективностью, стабильностью, широким ассортиментом и коммерческой доступностью современных ферментов.

Отдельно следует выделить класс липаз, т. к. их естественной функцией является катализ реакций этерификации.

1.3.2 Преимущества и недостатки применения биокатализа в фармацевтической отрасли

Существенным стимулом для развития энзимного синтеза стал прогресс в развитии современной генной инженерии. Развитие таких методов, как ДНК-шаффлинг (рекомбинация фрагментов генов двух и более гомологичных белков), сайт-направленный мутагенез, циркулярная пермутация, направленная эволюция и позволяет «конструировать» новые энзимы с заданными свойствами и расширять области их применения [174, 185]. Современный биокатализ имеет явные преимущества и перспективы использования в фармацевтической отрасли, но как и любое новое научно-практическое направление сталкивается с определенными трудностями.

Высокая каталитическая активность в сравнении с традиционными катализаторами является неоспоримым преимуществом энзимного катализа [358]. Использование генной инженерии способствует созданию все более активных и менее дорогостоящих ферментов, а внедрение различных технологических приемов, например иммобилизация на твердых носителях [70, 136], позволяет повысить их стабильность и активность. Все эти процессы будут способствовать внедрению биокатализа в фармацевтическое производство.

Немаловажным движущим фактором востребованности энзимов в фармацевтической отрасли является их более высокая экологичность в сравнении с классическими химическими катализаторами. Использование биокатализаторов уменьшает количество отходов, а в некоторых случаях позволяет уменьшить количество токсичных реактивов и растворителей, т. е. «озеленяет» производство ЛС.

Еще одним преимуществом энзимного синтеза являются энантиселективность и высокая энантиомерная чистота конечного продукта.

Около 57% современных коммерческих лекарственных препаратов и около 99% всех природных БАС являются хиральными молекулами [180, 208]. Для большинства ЛС фармакологические свойства напрямую связаны с их пространственной структурой. Присутствие в фармацевтической субстанции нескольких стереоизомеров может быть причиной не только потери фармакологической активности, но проявления серьезных нежелательных реакций, т. е. хиральная конфигурация является критическим фактором для безопасности ЛС. Широко известный пример такого проявления – талидомидовая трагедия [340].

Еще одним приоритетным аспектом развития хемоэнзимного синтеза можно признать экономическую составляющую этого процесса. Стереоселективность энзимов опосредованно обуславливает их экономическое преимущество: синтез соединения происходит в белковой структуре фермента, при этом пространственная структура продукта синтеза ограничивается активным центром белка-энзима, поэтому конечный продукт получают только в необходимой изомерной форме. Как следствие, синтезированные таким образом соединения не требуют дополнительной хроматографической или электрофоретической очистки, что удешевляет технологию производства [80, 168]. Долгое время биокатализ применялся в одноэтапных схемах, которые не давали существенных экономических преимуществ. Разработка и внедрение в процесс производства сначала многоэтапных, а затем и каскадных биокатализируемых технологических схем производства позволили свести к минимуму выделение промежуточных продуктов, что напрямую повлияло на сокращение отходов и в конечном итоге на сокращение производственных затрат [119, 172]. Кроме того, снижение стоимости биокатализа связано с прорывом в развитии производства ферментов, чему способствует повышение активности энзимов, расширение ассортимента коммерческих ферментов, используемых в фармацевтическом производстве, и их ценовая доступность. Суммарно это приводит к расширению объемов данного рыночного сегмента, например, в 2014 г. рынок ферментов имел объем около 4 млрд долларов, а в 2020 г. уже оценивался в более чем 10 млрд долларов. Такой

активный рост способствует увеличению инвестиций в научно-исследовательский и биотехнологический секторы производства, в том числе фармацевтического.

Как отмечалось выше, энзимный синтез сталкивается и с определенными трудностями. Основная проблема при внедрении биокатализа в фармацевтическую отрасль – скорость и затраты на создание ферментов с конкретными специализированными свойствами. Регио-, хемо- и энантиоселективность ферментов является как плюсом их использования, так и минусом, т. к. довольно часто для каждой реакции, а особенно для фармацевтического синтеза, требуется разработка специфического фермента. Создание ферментов с заданными свойствами – сложная наукоемкая задача, в решении которой могут помочь методы *in silico*. Создание последовательности ДНК, тестирование полученного фермента в предлагаемых условиях, корректировка его структуры – все эти этапы могут быть проведены на компьютерных моделях, позволяющих быстро и недорого решать поставленные задачи. Например, для проведения филогенетического анализа пептида с максимальной длиной до 40 000 аминокислот возможно использование программного комплекса [178] или PfamScan [277]. Выбор фермента для определенной реакции можно проводить, используя программу Selenzyme [99, 315]. Другим примером решения задачи по выбору фермента может быть веб-инструмент EC-BLAST – это алгоритм количественного сходства поисков между ферментными реакциями на трех уровнях: изменение длины связей, поиск центра реакции и сходства структуры реакции. Этот веб-ресурс использует знания об изменениях связей и моделях реакции для всех известных биохимических реакций, полученных в результате картирования в каждой реакции. Этот подход имеет потенциал для поиска новых биохимических преобразований с целью улучшения функции фермента, а также для реинженерии ферментов [287].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из наиболее перспективных путей поиска и последующего производства фармацевтических препаратов является энзимный синтез. В связи с развитием технологии создания ферментов за два последних десятилетия появились возможности быстро и эффективно разрабатывать способы синтеза ЛС с использованием энзимов. Биокатализ имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным хемокатализом и в ближайшие годы станет основным вектором развития всего органического синтеза.

Биокатализ произвел «революцию» в области создания лекарственных средств: снизилась себестоимость производства, повысилась чистота целевого продукта, появилась возможность синтеза новых ЛС, получение которых по классическим схемам ранее было затруднено или вовсе невозможно. Это в первую очередь касается 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, что позволяет в перспективе повысить эффективность, биодоступность, чистоту и безопасность получаемого препарата.

При правильном построении модели взаимодействия белка с лигандом эффективность применения докинга может быть практически сравнима с фармакологическими исследованиями. При этом эксперимент *in silico* экономически более выгоден и требует меньше времени на его проведение, что является ключевым преимуществом данного метода. Кроме того, он позволяет проводить определение качественного и количественного взаимодействия лиганда с белком для еще не синтезированных соединений, что открывает широкие возможности использования данного метода.

Очень важным при использовании докинга в исследованиях является построение адекватной модели, способной верифицировано получать результаты. Необходимо учитывать, что модели очень чувствительны ко влиянию различных факторов, и поэтому при их разработке нужно создавать механизмы проверки

адекватности и в случае необходимости вносить изменения. Такие постоянные корректировки можно назвать тренировкой модели. Очевидно, что чем более качественно будет проведен этот процесс, тем эффективнее будет модель.

Направленная химическая модификация структуры природных соединений считается одним из наиболее эффективных способов потенцирования их фармакологической активности и повышения биологической доступности [388]. Оптимизация структуры может приводить либо к обобщению фармакологических свойств исходных соединений, либо к появлению новых. Несомненным плюсом такой стратегии является прогнозируемая и, вероятнее всего, меньшая токсичность целевых продуктов, т. к. участвующие в модификации структуры, как правило, достаточно изучены и не несут потенциальной опасности. При оптимизации, а иногда и кардинальном изменении свойств базовых структур появляется перспектива 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*.

Материалы обзора литературы опубликованы в работе [27].

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты, материалы и реактивы:

➤ каротиноиды:

- астаксантин природного происхождения получен по унифицированной методике, опубликованной в работах [16, 19];
- зеаксантин природного происхождения получали по опубликованной методике [16, 19, 20];
- лютеин природного происхождения был получен по методике [13, 16, 19].
- астаксантин (β, β -каротин-4,4'-дион) (41659 Sigma Aldrich);
- лютеин (β, ϵ -каротин) (127-40-2 Sigma-Aldrich);
- зеаксантин (β, β -Каротин) (14681 Sigma-Aldrich);

➤ флавоноиды:

- гесперетин (FH23766 Biosynth Carbosynth);
- кверцетин (Q4951 Sigma-Aldrich),
- мирицетин (M6760 Sigma-Aldrich);
- нарингенин (5893 Sigma-Aldrich);

➤ ароматические кислоты:

- 4-гидроксibenзойная кислота (240141 Sigma-Aldrich);
- 2,6-дигидроксibenзойная кислота (D109606 Sigma-Aldrich);
- 3,4-дигидроксibenзойная (протокатеховая) кислота (37580 Sigma-Aldrich);
- 3,4,5-тригидроксibenзойная (галловая) кислота (G7384 Sigma-Aldrich);
- коричная кислота (8.00235 Sigma-Aldrich);
- 4-метилбензойная (*n*-толуиловая) кислота (T36803 Sigma-Aldrich);
- фенилгликолевая (миндальная) кислота (8.06913 Sigma-Aldrich);

➤ фармацевтические субстанции ЛС:

- бензойная кислота (242381 Sigma-Aldrich);
- 2-гидроксibenзойная (салициловая) кислота (247588 Sigma-Aldrich);
- ибупрофен (I4883 Sigma-Aldrich);
- кетопрофен (K1751 Sigma-Aldrich);
- 3-пиридинкарбоновая (никотиновая) кислота (N4126 Sigma-Aldrich);

➤ биокатализаторы:

- Amano Lipase PS (immobilized on diatomite) – иммобилизованная липаза *Pseudomonas cepacia* (708011 Sigma-Aldrich);
- Novozyme 435 – иммобилизованная липаза *Candida antarctica* (Новозим 435) (L4777 Sigma-Aldrich);

➤ синтезированные сложные эфиры астаксантина:

- β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-дibenзоат (соединение С.1);
- β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2);
- β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.3);
- 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);
- β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.6);
- β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.7);

➤ синтезированные сложные 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'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10);
- β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11);
- β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12);

- β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13);
- β,ϵ -каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14);
 - синтезированные сложные эфиры зеаксантина:
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноеат) (соединение С.18);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат) (соединение С.20);
 - β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.21);
 - синтезированные сложные эфиры флавоноидов:
 - нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1);
 - нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2);
 - нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3);
 - нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4);
 - кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5);
 - кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.6);

- кверцетин 4'-циннамат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.7);
- кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8);
- гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9);
- гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.10);
- гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11);
- гесперетин 3'-никотинат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.12);
- кверцетин-3-салицилат (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.13);
- кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.14);
- кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.15);
- кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.16);
- кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.17);
- мирицетин-3-салицилат (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.18);
- мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.19);
- мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.20);
- мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.21);

➤ мирицетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксibenзоат) (соединение F.22);

➤ растворители и реактивы соответствовали требованиям НД:

- аммония ацетат (ФС 1.3.0001);
- алюминия оксид для хроматографии (ТУ 6-68-164-99);
- ацетон (ч.д.а.) (ГОСТ 2603-79);
- ацетонитрил для хроматографии (ТУ 2636-040-44493179-00 с изм. №1);
- бензоилхлорид (8.01804 Sigma-Aldrich);
- вода очищенная (ФС.2.2.0020);
- *n*-гексан (ч.д.а.) (ТУ 2631-003-05807999-98);
- динатрия гидрофосфат додекагидрат (натрия фосфорнокислый двузамещенный) (ч.д.а.) (ОФС.1.3.0001);
- диэтиловый эфир (ч.д.а.) (ТУ 2600-001-43852015-10 с изм. №1);
- йода раствор 1 ммоль (ОФС.1.3.0002.);
- калия гидроксид (ч.д.а.) (ГОСТ 24363-80);
- калия гидроксид (ОФС.1.3.0001);
- калия гидрокарбонат (ОФС.1.3.0001);
- калия персульфат (ч.д.а.) (ОФС.1.3.0001);
- кислота серная (ОФС.1.3.0001);
- кислота ортофосфорная (ТУ 2142-002-00209450-96);
- кислота уксусная (ОФС.1.3.0001);
- метанол (ч.д.а.) (ГОСТ 6995-77);
- натрия гидроксид (ч.д.а.) (ГОСТ 4328-77);
- натрия гидрокарбонат (ОФС.1.3.0001);
- натрия сульфат (ОФС.1.3.0001);
- натрия сульфат (ч.д.а.) (ГОСТ 4166-76);
- натрия тетраборат (бура) (ОФС.1.3.0001);
- петролейный эфир (ГОСТ 11992 – 66);

- силикагель для хроматографии 60, фракция 40-63 мкм (60737 Sigma-Aldrich);
- спирт этиловый 95 %, 96 % (ФС 1.2.0036);
- спирт этиловый 40 %, 70 % (ФС 1.2.0178);
- спирт изобутиловый (ГОСТ 5208-2013);
- тетраметилсилан (Merk, кат. № 103562);
- толуол (ч.д.а.) (ГОСТ 5789-78);
- трет-бутилметиловый эфир (УФ-ИК-ВЭЖХ) (363312.1611 Panreac);
- Тролокс (Trolox) (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты), (RRS_218940250, Acros Organics);
- хлороформ (ч.д.а.) (ТУ 2631-020-11291058-96);
- этилацетат (ч.д.а.) (ГОСТ ГОСТ 22300-76);
- АВТС (диаммония 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат), (A1888, Sigma-Aldrich);

➤ лабораторное оборудование:

- весы лабораторные ВЛ-210 Класс точности 1 (специальный);
- весы лабораторные электронные ЛВ 210-А;
- баня комбинированная лабораторная БКЛ-М;
- испаритель ротационный R-213b;
- картридж для ТФЭ (Agilent Bond Elut C18, 500 мг);
- колбы для синтеза (ГОСТ 25336-82);
- колбы конические вместимостью 25, 50, 100, 250 мл (ГОСТ 25336-82);
- колбы мерные вместимостью 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250 мл (ГОСТ 25336-82);
- колонка для ВЭЖХ Dionex Acclaim C30 (250x4,6 мм, 5 мкм);
- колонка для ВЭЖХ Agilent ZORBAX Eclipse C18 (150x4,6 мм, 5 мкм);
- масс-спектрометр Agilent 6420;
- перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-0;
- пипетки градуированные (класс точности 1) (ГОСТ 29227-91);

- прибор ПТП (М);
- спектрофотометр Аквилон СФ-104;
- спектрометр Bruker AMXIII-400;
- хроматограф Agilent HPLC 1100;
- хроматограф Agilent HPLC 1260;
- хроматограф Стайер;
- цилиндры мерные градуированные на 10, 50, 100 и 500 мл (ГОСТ 25336-82);
- эксикатор стеклянный (ГОСТ 25336-82);

➤ программное обеспечение:

математическое планирование эксперимента проведено с использованием следующего программного обеспечения:

- Microsoft Office Word 2007;
- Microsoft Office Excel 2007.

Фрагмент эксперимента *in silico* был реализован с применением следующих программных комплексов и электронных ресурсов, имеющих свободный доступ:

- прогностическая программа «PASS online» [359];
- молекулярный докинг кандидатов с белком Stard3 код 5I9J проводили, используя программу ArgusLab, GA Dock, разработанную Mark Thompson, Planaria Software Seattle [62, 88];

- WA-оптимизацию пространственной структуры лиганда выполняли полуэмпирическим методом РМЗ с помощью программного комплекса GAMESS [86, 144];

- для обработки хроматограмм использовали программу Мультихром версия 1,5 ООО Амперсенд, Россия;

- для прогнозирования фрагментов ионов в масс-спектрах использовали программу CFM-ID 4.0 [103].

2.2 Методы исследования

При проведении экспериментальной части работы были использованы общепринятые фармакопейные методы установления структуры синтезированных соединений:

- определение температуры плавления (метод 1);
- регистрация ЯМР-спектров;
- регистрация ИК-спектров;
- масс-спектрометрия;
- ВЭЖХ.

Основные требования к проведению этих испытаний изложены в ГФ XV [11].

2.3 Методики и условия проведения экспериментальных исследований

Методика синтеза сложных эфиров ксантофиллов (соединения С.1 – С.21).
Синтез эфиров осуществляли в среде толуол : метанол (10:1, объемное отношение) при температуре 60 °С.

К смеси 2 ммоль ксантофилла (астаксантина, лютеина зеаксантина) и 4 ммоль кислоты (бензойной, 4-метилбензойной, никотиновой, фенилгликолевой, 2-гидроксibenзойной кислот, ибупрофена, кетопрофена) прибавляли 50 мл толуола и 5 мл метанола. В полученную реакционную смесь вносили 0,5 г катализатора Новозим 435. Смесь перемешивали 4,5 ч при 60 °С (скорость перемешивания 55 об/мин), защищая от действия света. Далее реакционную смесь охлаждали до 20 °С, образовавшийся осадок отделяли и промывали спиртом этиловым 95 %, затем сушили 2 ч в вакууме (20– 25 мм рт. ст.) при 40 °С.

Для разделения полученных моно- и диэфиров, а также отделения их от не прореагировавшего ксантофилла, полученную смесь пропускали через колонку, заполненную силикагелем (фракция 40/100), в качестве ПФ использовали смесь *n*-гексан : этилацетат (7:3, объемное отношение), которую пропускали через колонку со скоростью около 1,5 мл/мин и фракционировали по 30 мл.

Максимальное количество диэфиров определялось во фракции 3, моноэфиров – во фракции 4.

После разделения сложные эфиры промывали спиртом этиловым 95 % и водой, после чего сушили в вакууме (25 ± 2 мм рт. ст.) при температуре $40\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

Процесс синтеза полусинтетических эфиров ксантофиллов контролировали методом ВЭЖХ в следующих условиях: ПФ – метанол : трет-бутилметиловый эфир : вода (45:52:3, объемное отношение), объем вводимой пробы – 20 мкл; скорость ПФ – 1,0 мл/мин, длина волны детектирования – 210 нм, образцы предварительно растворяли в ПФ.

Анализ эфиров ксантофиллов методом ВЭЖХ проводили на колонке Dionex Acclaim C30 (250x4,6 мм, 5 мкм) в следующих условиях: ПФ – метанол : трет-бутилметиловый эфир : вода (45:52:3, объемное отношение), объем вводимой пробы – 20 мкл; скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин, длина волны детектирования – 210 нм, образцы предварительно растворяли в ПФ. Выбранная для разделения колонка позволяет с высокой эффективностью проводить разделение стереоизомеров каротиноидов, что использовали для определения их чистоты.

Условия проведения ЯМР-анализа производных каротиноидов (соединения С.1 – С.21): регистрацию спектров ЯМР проводили в растворе диметилсульфоксид- D_6 (ДМСО- d_6 , дейтеродиметилсульфоксид) с 0,03% ТМС (тетраметилсилан) – внутренний стандарт степень дейтерирования минимум 99,96%, при 400 и 100 МГц.

Условия анализа производных каротиноидов (соединения С.1 – С.21) методом масс-спектрометрии: масс-спектрометр Agilent 6420, сопряженный с ВЭЖХ системой Agilent HPLC 1100, методом химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Сканируемый диапазон масс (m/z) составлял от 100 до 900 с разрешением 20 000, для β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионата из-за высокой молекулярной массы от 100 до 1000. Параметры ВЭЖХ: колонка Dionex Acclaim C30 (250x4,6 мм, 5 мкм); температура

колонки 25 °С; подвижная фаза метанол (фаза А), трет-бутилметиловый эфир (фаза В), вода (фаза С); линейный градиент: фаза А 85 %; В 12 %; С 3 % → А 5 %, В 92 %; С 3 % за 90 мин; объем пробы – 20 мкл; скорость подвижной фазы – 0,3 мл/мин; объем пробы автоматически вводимой в масс-детектор – 20 мкл. Параметры масс-спектрометра: капиллярное напряжение: 4 кВ (положительный), 2,8 кВ (отрицательный); температура ионного источника – 120 °С; температура десольватации – 300 °С; температура газа – 87 °С; скорость газа-носителя (гелий) 5 л/мин; температура газа для десольватации – 256 °С; энергии CID: 40 эВ.

Методика синтеза all-trans-изомеров лютеина или зеаксантина.

Получение смеси изомеров (изомеризация): 2 ммоль лютеина или зеаксантина растворяли в 20 мл *n*-гексана, прибавляли 1 ммоль йода и реакцию смесь при перемешивании со скоростью 50 об/мин облучали флюоресцентной лампой мощностью 25 Вт в течение 10 мин. Непрореагировавший иод отмывали 10% спиртовым раствором калия иодида.

Методика получения all-trans-изомеров лютеина или зеаксантина: в 40 мл *n*-гексана, 10 мл толуола и 5 мл метанола, растворяли 2 ммоль лютеина или зеаксантина, добавляли 0,5 г Новозим 435 и избыток бензойной кислоты 0,6 г (5 ммоль). Полученную реакцию смесь перемешивали в течение 12 ч при температуре 60 °С со скоростью 55 об/мин.

После окончания реакции этерификации иммобилизованный фермент отделяли фильтрованием. Для отделения непрореагировавшей бензойной кислоты и изомеров лютеина или зеаксантина полученный маточный раствор после отделения ферментов охлаждали до минус 4 °С. Далее полученный раствор фильтровали и к фильтрату прибавляли 80 мл ацетона с последующим охлаждением до температуры минус 10 °С в течение 12 ч. Кристаллы дибензоатов лютеина и зеаксантина, которые кристаллизуются при температуре ниже минус 7 °С, отделяли фильтрованием.

К полученным эфирами прибавляли 50 мл 10 % спиртового раствора калия гидроксида и перемешивали в течение 3 ч со скоростью 100 об/мин при

температуре 40 °С. Ход реакции омыления контролировали с помощью ВЭЖХ анализа: о завершении процесса гидролиза свидетельствует полное исчезновение пика эфира.

Далее реакционную смесь количественно переносили в делительную воронку, прибавляли 100 мл *n*-гексана и 5 г натрия сульфата, перемешивали 10 мин и отделяли верхний слой органического растворителя. Раствор промывали водой очищенной до значения рН среды около 7. Полученный раствор охлаждали при температуре минус 20 °С в течение 12 ч. *Транс*-изомеры лютеина или зеаксантина отделяли фильтрованием. Учитывая высокую светочувствительность и способность к окислению лютеина и зеаксантина, на всех этапах исследования реакционные смеси предохраняли от действия света и кислорода воздуха.

Определение чистоты полученных продуктов проводили методом ВЭЖХ на приборе Agilent HPLC 1200. Параметры ВЭЖХ: колонка Dionex Acclaim C30 (250x4,6 мм × 5 мкм), температура колонки – 30 °С; УФ детектор – 445 нм; линейный градиент: подвижная фаза – метанол : трет-бутилметиловый эфир : ацетонитрил (фаза А) 90:5:5; трет-бутилметиловый эфир : метанол : ацетонитрил (фаза Б) 90:5:5; линейный градиент: фазы А 100, Б 0 % → А 10 %, Б 90 % за 90 мин; объем пробы 20 мкл, скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин.

Методика получения эфиров флавоноидов (соединения F.1 – F.12). 2 ммоль нарингенина (0,544 г), или кверцетина (0,604 г), или гесперетина (0,604 г) растворяли в 50 мл ацетона, прибавляли 3 ммоль или бензойной (0,366 г), или салициловой (0,414 г), или коричной (0,444 г), или никотиновой (0,369 г) кислоты и 0,5 г Новозим 435. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при температуре 50 °С со скоростью 120 об/мин. После окончания реакции иммобилизованный фермент отделяли фильтрованием. Очистку полученного раствора от избытка непрореагировавших кислот и диэфиров проводили методом твердофазной экстракции. В качестве элюента использовали смесь 0,1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила (8:2, объемное отношение), скорость потока примерно 1 мл/мин, чистоту собираемой фракции – первые 6 мл после введения пробы, контролировали методом ВЭЖХ. Полученную фракцию, содержащую 4'-

эфирь нарингенина или кверцетина и 3'-эфирь гесперетина, сушили в течение 2 ч при давлении 50 мм рт. ст. и температуре 60 °С. Полученное вещество запаивали в ампулы темного стекла.

Методика «защищенного» синтеза эфиров флавоноидов (соединения F.13 – F.22). К раствору 2 ммоль кверцетина (0,604 г) или мирицетина (0,636 г) в 500 мл 10 % раствора калия карбоната прибавляли 20 ммоль бензоилхлорида (2,3 мл), после перемешивания в течение 1 ч при температуре 35 °С. Полученный осадок отделяли фильтрованием, сушили при температуре 60 °С в термостате. Полученный продукт растворяли в 200 мл ацетонитрила и прибавляли 12 мл концентрированной серной кислоты, реакцию среду перемешивали со скоростью 200 об/мин при температуре 80 °С в течение 2 ч. Далее раствор охлаждали, доводя до значения рН среды, равного 6, 10 % спиртовым раствором калия гидроксида, прибавляли 0,5 г катализатора Новозим 435 и 2 ммоль или 2-гидроксибензойной (салициловой) (0,276 г), или 4-гидроксибензойной (0,276 г), или 2,6-дигидроксибензойной (0,308 г), или 3,4-дигидроксибензойной (протокатеховой) (0,308 г), или 3,4,5-тригидроксибензойной (галловой) (0,340 г), кислоты. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при температуре 50 °С со скоростью 120 об/мин. Полученный раствор фильтровали, к фильтрату добавляли 10 мл 10 % спиртового раствора калия гидроксида и нагревали при температуре 70 °С в течение 7 мин. После охлаждения реакционной смеси к ней прибавляли 10 % раствор серной кислоты до нейтральной реакции среды с рН около 6, промывали хлороформом и перекристаллизовывали целевой эфир при температуре минус 10 °С. Полученный продукт растворяли в метаноле и пропускали через колонку, заполненную силикагелем (5 г), используя в качестве ПФ этилацетат-метанол (1:9, объемное отношение). Целевой продукт сушили в течение 2 часов при давлении 25 мм рт. ст. и температуре 60 °С.

Регистрацию спектров ЯМР ¹Н проводили в условиях, указанных выше.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре, сопряженном с ВЭЖХ-системой, методом химической ионизации при атмосферном давлении

(APCI), температура ионного источника – 120 °С, газ-носитель – гелий, энергия CID – 40 эВ.

Параметры ВЭЖХ: колонка – Agilent ZORBAX Eclipse C18 (150x4,6 мм × 5 мкм), температура колонки – 30 °С; УФ детектор – 330 нм; линейный градиент: подвижная фаза – 0,05 М фосфорная кислота (фаза А); ацетонитрил (фаза Б); линейный градиент: 0% – 90 мин фазы А 90%, Б 10 % → А 0%, Б 100 %; объем пробы 20 мкл, скорость подвижной фазы – 0,3 мл/мин; объем пробы, автоматически вводимой в масс-детектор – 20 мкл.

Времена удерживания и порядок выхода пиков на хроматограмме, на примере синтеза соединения F.1: 25,55 мин – нарингенина 4'-бензоат (соединение F.1), 11,67 мин – нарингенин, 4,09 мин – бензойная кислота, аналогичный порядок наблюдался и при синтезе других эфиров.

Анализ эфиров флавоноидов (соединения F.1 – F.22) методом ВЭЖХ. Параметры ВЭЖХ: колонка Agilent ZORBAX Eclipse C18 (150x4,6 мм × 5 мкм), УФ детектор – 330 нм; изократический режим элюирования, состав подвижной фазы ацетонитрил – 0,05 М фосфорная кислота (30:70, объемное отношение), скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин; объем пробы – 20 мкл.

Разработка докинговой модели для теоретического прогноза и обоснования видов активности будущих эфиров ксантофиллов. За основу была взята компьютерная модель взаимодействия экспериментального вещества, близкого по строению к исследуемым соединениям, с обратной транскриптазой двойного мутанта K103N/Y181C, построенная на основании кристаллографического снимка с величиной разрешения 2,9Å (PDB код: 4H4O) [142]. Проведено сопоставление полученных прогнозов с результатами скрининга ряда производных урацила *in vitro* на клеточных культурах человеческих Т-лимфоцитов МТ-4, инфицированных штаммом двойного мутанта K103N/Y181C ВИЧ-1 [251].

На первом этапе нами были исследованы соединения, которые использовали для корректировки модели в качестве обучающей выборки. Результаты исследования их анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* использовали для

проверки корректности построенной компьютерной модели, описывающей взаимодействия лиганда с белком.

При построении компьютерной модели было установлено, что наиболее значимым является связывание ингибитора с аминокислотой лизин 103, которое происходит за счет наличия в структуре урацила. Моделирование взаимодействия лиганд-белок выявило, что необходимо учитывать не только гибкость лиганда, но и гибкость белка, что играет значительную роль. Было установлено, что структура белка адаптируется к действию лиганда и может образовывать комплементарную форму, при этом границы кармана связывания «окружают» ингибитор. Локальные изменения в структуре белка могут объяснить взаимодействие лиганда с тирозином в положении 188, которые компенсируют потери гидрофобного взаимодействия, вызванного мутацией Y181C. Это взаимодействие – второй ключевой фактор связывания белок-лиганд. Внесение в модель факторов гибкости как лиганда, так и белка позволило существенно повысить точность прогноза и разработать стратегию дизайна новых высокоактивных соединений этой группы [29].

Для дальнейшей корректировки системы результаты докинговых исследований сравнили с исследованиями *in vitro*, приведенными в работе [96].

Модель, построенная на закономерности между ингибирующим действием и энергией докинга, не во всех случаях позволяла проводить адекватный прогноз. Это было связано с тем, что даже небольшое изменение структуры молекулы ингибитора иногда приводило к полной потере ингибирующей активности, поэтому для прогноза было предложено провести коррекцию разработанной модели, в частности, были внесены изменения в алгоритмы расчета и вновь проведены расчеты энергии докинга [29]. Такой подход позволил существенно повысить точность прогнозов разработанной модели, с помощью которой была изучена группа родственных соединений, в качестве препаратов сравнения использовали Невирапин и Эфавиренц [29].

Как показывает эксперимент, построенная экспериментальная компьютерная модель позволяет с высокой точностью спрогнозировать

ингибирующие свойства еще не синтезированных соединений, однако дальнейший синтез этих соединений и тесты *in vitro* подтвердили прогноз модели. Разработанная модель показала свою эффективность и высокую корреляцию с тестами *in vitro* на этапе обучающей выборки [29].

С целью подтверждения возможности построения адекватной модели *in silico* с применением тех же ресурсов [53,86, 89, 221] был проведен аналогичный эксперимент, но на выборке известных и оригинальных ЛС с иной структурой и видами активности [32]; компьютерная модель была построена и апробирована на уже известных взаимодействиях топоизомеразы IV *Streptococcus pneumoniae* и топоизомеразы IV *Staphylococcus aureus* с фторхинолонами. Сравнение проводили по пространственному расположению лиганда в активном центре белка, рассчитанному с помощью компьютерной модели с кристаллографическими снимками, и энергии докинга.

Сопоставление данных энергии докинга и ингибирующей активности показало согласованность результатов исследований, полученных *in silico* и *in vitro*, т. е. можно констатировать, что разработанная компьютерная модель взаимодействия лигандов с топоизомеразой IV грамположительных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* позволяет проводить исследования по выявлению закономерностей структура-активность.

При расчетах энергии докинга учитывали гибкость как лиганда, так и белка. Подобный подход виртуального скрининга еще не синтезированных соединений позволяет существенно сократить время поиска новых высокоактивных БАС, а также расширить информацию о закономерностях взаимосвязи структура-активность. Такая техника «стратегической гибкости» позволила улучшить прогнозирующую способность компьютерной модели [108, 113, 223, 302, 375].

Методика определения антиоксидантной активности in vitro при взаимодействии с радикал-катионом ABTS⁺

Приготовление фосфатного буферного раствора с рН около 7,4. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 17,9 г динатрия гидрофосфат, растворяли в 700-800 мл воды и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Приготовление раствора 7мМ АВТS. 0,384 г диаммониевой соли 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Приготовление раствора 2,45 мМ калия персульфата. 0,066 г калия персульфата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Приготовление стандартного раствора Тролокс (Trolox) с концентрацией 1-10 мМ. 0,25 г Тролокс (Trolox) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 10 мл спирта этилового 95 %, доводили фосфатным буферным раствором с рН 7,4 до метки и перемешивали (раствор А с концентрацией Тролокс (Trolox) 10 мМ).

Объемы раствора А равные 1, 2, 4, 6 и 8 мл, соответственно, помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, объем раствора доводили фосфатным буферным раствором с рН 7,4 до метки и перемешивали (растворы с концентрацией Тролокс (Trolox) 1, 2, 4, 6 и 8 мМ, соответственно).

Приготовление испытуемых растворов. Готовили серию растворов синтезированных соединений с концентрацией от 1 до 10 ммоль/л. Для производных каротиноидов в качестве растворителя использовали хлороформ, для производных флавоноидов – спирт этиловый 95%.

Пример приготовления раствора β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-дibenзоат (С.1, М.м. 804,4) с концентрацией от 1 до 10 мМ. 0,08 г вещества С.1 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл хлороформа, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А соединения С.1 с концентрацией 10 мМ). Объемы раствора А равные 1, 2, 4, 6 и 8 мл, соответственно, помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводили объем

раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (растворы соединения С.1 с концентрацией 1, 2, 4, 6 и 8 мМ, соответственно).

Пример приготовления раствора нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (F.1, М.м. 376,1 с концентрацией от 1 до 10 мМ). 0,04 г соединения F.1 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл спирта этилового 95 %, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А соединения F.1 с концентрацией 10 мМ). Объемы раствора А равные 1, 2, 4, 6 и 8 мл, соответственно, помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали (растворы соединения F.1 с концентрацией 1, 2, 4, 6 и 8 мМ, соответственно).

Методика определения антиоксидантной активности. Смешивали растворы 7 мМ АВТС и 2,45 мМ калия персульфата в равных количествах (1:1), оставляли на 12 ч в темном месте. Полученный раствор разбавляли водой до значения оптической плотности 0,700 при длине волны 734 нм.

К 2 мл полученного раствора прибавляли 20 мкл испытуемого раствора, выдерживали 5 мин в термостате при температуре 25 °С и измеряли оптическую плотность, используя в качестве раствора сравнения воду.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартных растворов 1-10 мМ Тролокс (Trolox), приготовленных аналогичным способом.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм.

По полученным результатам рассчитывали ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity) – эквивалентную антиоксидантную способность Тролокса (Trolox), которую определяли как концентрацию раствора Тролокса (мМ), вырабатывающего антиоксидантный эффект, эквивалентный эффекту 1,0 мМ раствора определяемого вещества. Расчет проводили по формуле:

$$TEAC = \frac{A_{trolox} \cdot C_{trolox}}{A_x \cdot C_x}, \text{ где} \quad (2.1)$$

A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

C_x – концентрация испытуемого раствора, ммоль/л;

A_{trolox} – оптическая плотность стандартного раствора Тролокс;

C_{trolox} – концентрация стандартного раствора Тролокс, ммоль/л.

2.4 Дизайн исследования

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

Дизайн диссертационного исследования представлен на рисунке 2.1.

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, позволяют подтвердить или опровергнуть корректность выдвинутых теоретических предположений и общую концепцию исследования.



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

ГЛАВА 3 ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТБОРА КАНДИДАТОВ ДЛЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО СИНТЕЗА СУБСТАНЦИЙ И ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

3.1 Отбор каротиноидов для химической модификации

Целенаправленный транспорт ЛС – одна из приоритетных проблем современных медицины и фармации, решение которой ведется, как правило, в нескольких взаимосвязанных областях: 1) направленный (прогнозируемый) синтез ЛС; 2) разработка таргетных ЛС; 3) использование передовых ЛФ и средств доставки (липосомальные, микрокапсулированные, магнитные ЛФ, транспортные терапевтические системы и др.). Целевая доставка ЛС к органу-мишени позволит повысить терапевтический эффект и, что немаловажно, снизить дозу и побочное действие ЛС.

Научным сообществом достаточно активно ведутся исследования по получению полусинтетических продуктов на основе природных БАС, например, тритерпеноидов лупанового ряда [1, 41], производных глицирризиновой кислоты [3], алкалоидов [10], терпенофенолов [42, 46], флавоноидов [45, 229], природных пептидов [6], антибиотиков [9, 18] и др.

Среди более 700 известных каротиноидов ксантофиллы как кислородсодержащие каротиноиды представляют особый интерес за счет более разнообразных химических и фармакологических свойств, по сравнению с каротинами. Модификация структуры природных каротиноидов, обладающих широким спектром фармакологических свойств [64, 334, 244], открывает перспективу направленного синтеза их оригинальных полусинтетических производных. Для каротиноидов характерна избирательность накопления в органах и тканях. Классическим примером такого средства является максимально высокая, по сравнению с другими тканями, концентрация лютеина и зеаксантина в центре макулы

сетчатки человеческого глаза [94, 145, 242]. Специфичность кумуляции каротиноидов в органах и тканях целесообразно использовать для направленного транспорта ЛС к органу-мишени. Модификация молекулы каротиноида, например синтез сложных эфиров, окажет влияние на его фармакокинетические характеристики [371], причем сохраняющийся основной фармакофор – каротиноидный фрагмент позволит сохранить изначальные свойства базовой структуры. Значимым для поиска модифицированных производных каротиноидов является то, что эти соединения в связанной форме в биологических средах находятся преимущественно в виде эфиров органических кислот [258].

Особенности структуры и физико-химически свойств ксантофиллов не позволяют проводить реакцию этерификации в классических условиях, например по методу Фишера. Другая проблема, требующая решения, – это стереоспецифичность сложных эфиров, т. к. крайне велика вероятность изомеризации ксантофиллов и их производных в процессе синтеза. Решению этих задач способствует использование в качестве катализаторов энзимов, в частности липаз. Предварительно для дальнейшего рассмотрения в качестве кандидатов модельных структур каротиноидов были выбраны астаксантин, лютеин и зеаксантин, поскольку они достаточно изучены как аналитически, так и фармакологически [37, 38].

Далее был проведен более детальный анализ особенностей структур и некоторых видов активности астаксантина, лютеина, зеаксантина для решения вопроса целесообразности их химической модификации.

Астаксантин – терпеноид с длиной углеродной цепи C₄₀, содержащий 13 сопряженных двойных связей в полиеновой цепи, которая связывает два β-иононных цикла. Последние содержат два спиртовых гидроксила у хиральных центров в положении C₃ и C_{3'} и две карбонильные группы в положениях C₄ и C_{4'} [329, 385].

Исследования антиоксидантной активности природного астаксантина и родственных ему каротиноидов показали, что по этому виду действия он

превосходит α -токоферол, α -каротин, лютеин, ликопин и β -каротин. Столь высокую антиоксидантную активность астаксантина связывают с наличием β -иононовых колец, карбонильных групп в положениях C4 и C4' и гидроксильных групп у хиральных атомов углерода C3 и C3' [216, 218, 260, 337, 377]. В природе астаксантин встречается как в свободном состоянии, так и в виде сложных эфиров чаще всего с жирными кислотами с от C14 до C22, по одной или обеим гидроксигруппам [371, 311]. Важным отличительным свойством эфиров астаксантина является их более высокая стабильность при хранении, нагревании и окислении [289]. Например, в результате окисления астаксантина образуется астацен, однако этот процесс происходит гораздо медленнее для этерифицированных форм ксантофилла [143, 341, 386]. Следовательно, астаксантин в виде сложных эфиров имеет ряд преимуществ перед свободным ксантофиллом, при этом основными из них, на наш взгляд, является большая липофильность, следовательно, биодоступность и стабильность, что важно при создании ЛВ.

Важный фактор, влияющий на биологическую активность каротиноидов, – их существование в виде геометрических и оптических изомеров [244, 372]. В связи с зависимостью биологической активности от строения оптических изомеров и вероятным наличием опасных остаточных органических растворителей, используемых при синтезе, синтетический астаксантин для использования в медицинских целях не разрешен в США [107, 135, 192, 151, 152,]. По этой же причине синтетический астаксантин применяется ограниченно только в аквакультуре и исследованиях на животных [248, 127, 173, 300]. Вместе с тем природный астаксантин используется как компонент пищевых добавок в США, Европе и Японии [130, 165, 222, 272].

С учетом вышесказанного астаксантин можно использовать как перспективную модель для синтеза стереоселективных сложных эфиров в присутствии биокатализаторов.

Астаксантин, как правило, образует природные сложные эфиры с насыщенными жирными кислотами: миристиновой (C14:0) пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0), нондекановой (C19:0), эйкозановой (C20:0); с мононенасыщенными жирными кислотами: миристолеиновая (C14:1), олеиновой (C18:1), эйкозеновой (C20:1) и полиненасыщенными жирными кислотами: октадекатриеновой (C18:3), октадекатетраеновой (18:4), эйкозапентаеновой (C20:5) эйкозагексаеновой (C20:6) и докозагексаеновой (C22:6) кислотами [139, 141, 155, 226, 355, 370].

Известно, что большинство ЛС относятся к ароматическим или гетероциклическим соединениям. В связи с этим, если в перспективе молекулу астаксантина рассматривать как транспортер ЛС, то представляется логичным использовать в реакции этерификации биологически активные кислоты ароматического и гетероциклического рядов с постепенным усложнением их структуры.

Поэтому изначально в качестве исходной модельной кислоты была выбрана бензойная как первый представитель гомологического ряда ароматических кислот. Далее кислоты-кандидаты отбирали по мере постепенного усложнения их структуры и фармакологических свойств, в частности, по наличию заместителей в ароматическом ядре и усложнению его строения. По этому принципу для исследования отобрали 4-метилбензойную и фенилгликолевую кислоты. Соблюдая принцип постепенного усложнения структуры кислот, а также необходимость перехода к структурам ЛС, мы остановили свой выбор на 2-гидроксибензойной (салициловой) кислоте, которая долгое время применялась в качестве ЛС [7]. В результате такого подхода к подбору кандидатов отобрали кислоты с максимально близкими структурами, в связи с чем в синтезе были использованы ЛС ибупрофен и кетопрофен, которые содержат остаток пропионовой кислоты, в ароматическом ядре у ибупрофена присутствует остаток изобутила, а в структуре кетопрофена имеется ядро бензофенона. Для эксперимента со стереоселективной липазой

использование этих препаратов в качестве ацилирующих реагентов имеет особое значение, поскольку они являются оптически активными соединениями [7, 364].

Для увеличения числа кислот в качестве ацилирующих агентов, которые могли бы участвовать в синтезе сложных эфиров астаксантина, мы сочли целесообразным провести эксперимент с никотиновой кислотой, поскольку она относится к производным пиридина, ядро которого входит в состав значительного числа ЛС [7].

Таким образом, в эксперименте с астаксантином в реакции этерификации использовали бензойную, 4-метилбензойную, фенилгликолевую, 2-гидроксibenзойную (салициловую), никотиновую кислоты, а также ибупрофен и кетопрофен.

Зеаксантин и лютеин. Зеаксантин относится к ксантофиллам (подгруппа кислородсодержащих каротиноидов) и в своей структуре содержит 11 сопряженных двойных связей, распределенных между полиеновой цепью и β -иононовыми кольцами, последние содержат два спиртовых гидроксила в положении С3 и С3' [79]. Лютеин и зеаксантин являются структурными изомерами, отличающимися лишь расположением двойной связи в одном из циклогексеновых циклов. Вследствие этого спиртовый гидроксил у лютеина находится в аллильном положении ϵ -кольца, а у зеаксантина – в β -кольце. Такое отличие определяет различное масс-спектрометрическое поведение лютеина и зеаксантина [363, 55, 365]. Кроме того, экспериментально подтверждено, что в сравнении с лютеином зеаксантин проявляет более выраженную антиоксидантную активность, обусловленную его строением [100, 334]. Возможно, что эти особенности структур могут стать причиной различного поведения лютеина и зеаксантина в реакции этерификации, однако решить этот вопрос можно только экспериментально.

Как уже было описано выше, особенности физико-химических и биохимических свойств определяют высокую специфичность накопления

каротиноидов в органах и тканях организма человека. Максимально доказательным примером этого – избирательность накопления зеаксантина и лютеина в сетчатке глаза, причем в центре макулы их концентрация примерно в 1000 раз выше, чем в других тканях [64, 66, 316, 334]. В периферической зоне сетчатки соотношение лютеин:зеаксантин составляет 2:1, однако в макулярной зоне у 90 % людей в возрасте от 3 до 95 лет зеаксантин является доминирующим макулярным каротиноидом [137, 141].

Возрастная макулярная дегенерация (дистрофия) (ВМД) – одна из первопричин слепоты пожилых людей [184, 252]. Согласно данным National Eye Institute [246] к 2050 году только в США число страдающих этой нозологией возрастет до 5,4 млн человек. Доказана прямая взаимосвязь между высоким уровнем потребления лютеина и зеаксантина и снижением риска возникновения ВМД [79, 365].

Клинические исследования показали, что лютеин и зеаксантин понижают риск развития ВМД за счет защиты от фотоокислительного стресса [49, 79, 365].

Организм человека не способен синтезировать лютеин и зеаксантин *de novo*, что предопределяет их поступление только с пищей или в составе биодобавок и ЛС [48, 183, 247, 310]. В этом контексте повышается значимость вопроса биодоступности поступающих в организм ксантофиллов. Следует подчеркнуть, что природный этерифицированный зеаксантин имеет более высокую биодоступность, чем его свободная форма [266, 379].

Высокоселективное распределение лютеина и зеаксантина в макуле связано с участием в их транспорте специфичных лютеинсвязывающего (STARD3) и зеаксантинсвязывающего (GSTP1) белков [166, 205]. Эту эксклюзивность связывания можно использовать для получения таргетных ЛС путем целенаправленной модификации природных структур ксантофиллов, в частности этерификации лютеина и зеаксантина.

В связи с изложенным выше в качестве модельных природных соединений, кроме астаксантина, были выбраны ксантофиллы лютеин и зеаксантин.

Чтобы сохранить системность построения эксперимента – пошаговое усложнение структур кислот и дальнейший переход к ЛС – для этерификации лютеина и зеаксантина так же как и для астаксантина, были использованы бензойная, 4-метилбензойная, фенилгликолевая и 2-гидроксibenзойная (салициловая) кислоты.

Исследования метаболизма каротиноидов, в частности зеаксантина, показали, что основными «переносчиками» этих соединений в кровотоке являются ЛПВП [94, 334, 207]. Никотиновая кислота улучшает микроциркуляцию, оказывает антикоагулянтное действие, что может положительно влиять на патогенез ВМД, кроме того, никотиновая кислота повышает содержание ЛПВП, участвующих в метаболизме каротиноидов [243]. Набор именно этих фармакологических свойств, а также гетероциклическая природа никотиновой кислоты позволили выбрать ее в качестве ацитилирующего реагента для этерификации зеаксантина и лютеина.

Сохраняя системность в выборе кислот-кандидатов для синтеза сложных эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина в эксперимент был включен ибупрофен. Помимо этого препарата, в перечень основных ЛС ВОЗ и стандарты лечения ВМД входит другой нестероидный противовоспалительный препарат – кетопрофен [43, 364]. Он имеет более сложную структуру, чем ибупрофен, по этому принципу его также внесли в перечень кислот-кандидатов для синтеза сложных эфиров.

Таким образом, в качестве кислот для этерификации зеаксантина и лютеина были выбраны бензойная, 4-метилбензойная, фенилгликолевая, 2-гидроксibenзойная (салициловая), никотиновая кислоты, ибупрофен и кетопрофен.

Значительное число фармацевтических субстанций природного и синтетического происхождения существуют в форме *цис*- и *транс*-изомеров [7].

Известно, что в случае геометрической изомерии одно и то же вещество характеризуется различным сродством к белкам-мишеням и, следовательно, проявляет различный уровень фармакологической активности и токсичности [137, 361]. Кроме того, для соединений природного происхождения характерна «нативная» геометрическая конфигурация, в которой они преимущественно существуют и проявляют максимальную биологическую активность [159, 230].

Каротиноиды являются одним из классов природных соединений с максимальной вариабельностью изомерных форм, например, для лютеина и зеаксантина характерно существование R и S стереоизомеров по положению C3 и C3', а также *цис*- и *транс*-изомеров по положениям C9, C9' и C13, C13'. «Нативной» конфигурацией для обоих соединений является *транс*-форма, которая обеспечивает максимальное сродство с рецепторами и, следовательно, биологическое действие [120, 165, 243, 336].

Астаксантин как и большинство всех известных каротиноидов является хиральным соединением и существует в форме энантиомеров: (3*R*,3'*R*) астаксантин и (3*S*,3'*S*) астаксантин или в виде *мезо*-формы (Рисунок 3.1.) [74, 92, 157, 373].

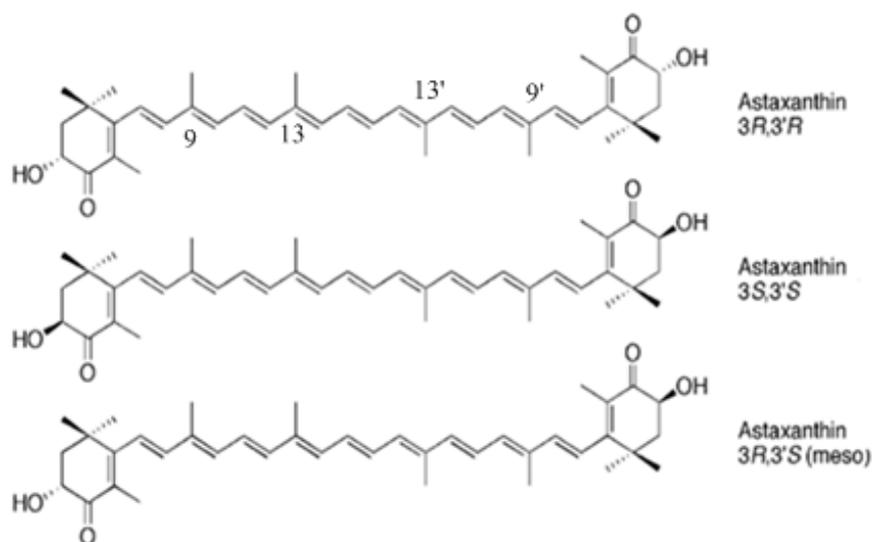


Рисунок 3.1 – Изомерные формы астаксантина согласно [93]

Астаксантину аналогично зеаксантину и лютеину присуща и геометрическая изомерия [217, 250]. Так, липидный экстракт из отходов креветок *L. vannamei* содержит «нативный» астаксантин в виде *all-trans*-астаксантина и его 9-*цис* и 13-*цис* изомеров [150, 321].

Как синтетические, так и природные астаксантин, лютеин и зеаксантин, как правило, представляют собой смеси геометрических изомеров, что оказывает существенное влияние на их биодоступность, физиологическую активность, фармакологическое действие [61, 202].

Другой, не менее важной проблемой использования субстанций с большим диапазоном изомерных форм является получение образцов одного из типов изомеров с высоким уровнем чистоты, что особенно важно при создании СО, которые обеспечивают не только аналитическую достоверность и воспроизводимость исследований, но и достоверность фармакологического эксперимента. В этой связи мы посчитали перспективным осуществить синтез одной геометрической конфигурации субстанций лютеина и зеаксантина. Промежуточной стадией для получения геометрических изомеров одного типа для модельных ксантофиллов была выбрана реакция этерификации в присутствии стереоселективной липазы.

Таким образом, в качестве модельных соединений для стереоселективного синтеза выбраны лютеин и зеаксантин.

С целью обоснования дальнейшей перспективы фармацевтического использования будущих этерифицированных производных астаксантина, лютеина и зеаксантина следовало осуществить теоретический прогноз видов их активности *in silico*.

3.2 Прогноз биологической активности сложных эфиров ксантофиллов методом молекулярного докинга

Эксклюзивность связывания лютеина и зеаксантина в макуле [178, 179, 195, 196] можно использовать для получения таргетных ЛС путем целенаправленной модификации природных структур ксантофиллов, в

частности этерификации лютеина и зеаксантина. В этой связи методом молекулярного докинга путем «гибкой» стыковки, осуществлен прогноз активности сложных эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина, которые далее предполагается синтезировать, изучена возможность связывания этих структур с белком STARD3 PDP код 5I9J [65]. 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.

Для выявления взаимодействия эфиров ксантофиллов со специфическими белками было решено разработать компьютерную модель на основе хорошо изученных взаимодействий ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1 как с помощью докинга, так и кристаллографии. Опираясь на большой массив экспериментальных и расчетных данных, полученных другими исследователями, провели корректировку разработанной нами модели, что позволило значительно улучшить получаемые результаты. С этой целью использована программа ArgusLab, GA Dock, разработанная Mark Thompson, Planaria Software Seattle [89, 221]. Оптимизацию геометрии лиганда проводили полуэмпирическим методом PM3 с помощью программного комплекса GAMESS [53,87]. Такое сочетание позволило добиться наиболее точного моделирования взаимодействия лиганд-белок. Методики корректировки прогностической модели представлены в главе 2.

Опираясь на собственные экспериментальные данные, полученные на выборках, объединяющих объекты различной структуры и видов активности, [29, 32], а также учитывая опыт других исследователей [67, 189, 190, 281, 326, 342], мы пришли к выводу, что метод молекулярного докинга, в частности стратегию гибкого докинга, можно применить для теоретического прогноза взаимодействия с транспортными белками эфиров ксантофиллов.

В качестве объектов исследования *in silico* были отобраны не только эфиры зеаксантина и лютеина, но и эфиры астаксантина, которые являются

родственными структурами эфиров зеаксантина и лютеина, но априори не проявляют рассматриваемые фармакологические свойства. Такой подход позволяет увеличить точность прогнозов за счет выявления факторов, которые не только способствуют увеличению активности, но и отрицательно влияют на рассматриваемые процессы. На наш взгляд, данный способ особенно эффективен в случае, когда за счет незначительных изменений в структуре, например переход от астаксантина к лютеину и далее к зеаксантину, наблюдаются значительные изменения в активности соединений.

После того, как было установлено, что предложенная нами модель работоспособна, эффективна и характеризуется валидированными результатами между значениями *in silico* и *in vitro*, мы перешли к следующему этапу наших исследований, а именно, к определению взаимодействия белка STARD3 с лютеином, зеаксантином, астаксантином и их эфирами.

Известно, что лютеин, зеаксантин и мезозеаксантин, находящиеся в желтом пятне (область в центре сетчатки глаза), защищают глаза от фотоокислительного стресса [154, 198]. Исследования показали, что диеты, богатые лютеином и зеаксантином, а также добавки, содержащие эти каротиноиды, могут помочь предотвратить ВМД [303, 299, 283].

Белок STARD3, также обозначаемый как MLN64, ранее был идентифицирован как белок, который связывает зеаксантин и лютеин и считается, что он отвечает за тканеспецифическое распределение макулярных каротиноидов [81, 205, 206].

Интерес к STARD3 возник еще до открытия его способности к связыванию лютеина и других ксантофиллов, а также защитной функции сетчатки глаза. С помощью рентгеноструктурного анализа было установлено, что он является аналогом STARD1 [343], который связывает холестерин в качестве первого обязательного шага в стероидном биогенезе. Гомология между этими белками позволила сделать предположение, что STARD3 также

должен связывать холестерин. Позже было установлено, что STARD3, в отличие от StARD1, может связываться не только с холестерином, но и с другими ксантофиллами, обеспечивая тем самым селективность их распределения в организме.

Для построения модели прогнозирования связывания белка STARD3 с ксантофиллами и их эфирами нами была заимствована структура белка, построенная на основании кристаллографического снимка с разрешением 1,74Å лютеин-связывающего белка человека код PDP 5I9J [114].

На первом этапе была построена модель взаимодействия лютеина с белком StARD3. Точность ее построения сильно влияла на адекватность получаемых результатов остальных кандидатов, поэтому пространственную структуру лютеина мы взяли из другой модели белка CP29, выделенного из шпината, построенной на основании кристаллографического снимка с разрешением 2,80Å код PDP 3PL9 [114]. Такой подход позволил уменьшить количество неточностей прогнозирования пространственной структуры лютеина. Высокая точность связана с тем, что отсутствует погрешность расчетов используемых программ оптимизации пространственной структуры. Таким образом, использование структуры, заимствованной из кристаллографического снимка лиганда, в нашем случае лютеина, повышает точность модели, что является одним из ключевых факторов при прогнозировании взаимодействия. Важно, что при оптимизации структур остальных кандидатов, мы использовали параметры, позволяющие прогнозировать пространственную структуру с наибольшей вероятностью. Наилучшие результаты были получены с помощью полуэмпирического метода PM3, расчеты проводили в программном комплексе GAMESS [144].

Следующим этапом был выбор условий проведения докинга белка и лигандов, основными факторами оптимизации служили: жесткость структур белка в месте стыковки и лиганда, размер сайта связывания, максимальное число позиций лиганда, прецизионность.

Важной особенностью белка STARD3 является туннелеобразная полость, которая используется для прикрепления холестерина и лютеина при транспортировке [65, 166, 205, 206, 336]. Эта полость 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.

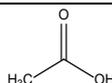
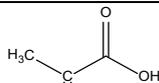
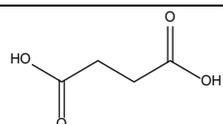
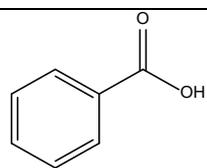
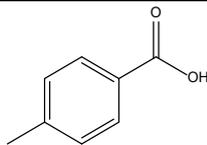
Для более полного и точного понимания закономерностей структура-активность необходимо изучение как можно более репрезентативного круга кандидатов с различной направленностью изменений в структуре. В связи с этим было расширено число кислот-кандидатов для получения эфиров ксантофиллов. Мы сочли целесообразным изучение влияния следующих факторов: увеличение молекулярной массы ацильных радикалов (от уксусной кислоты с молекулярной массой 60 до нифлумовой 282), введение различных гетероатомов – кислорода, азота, серы, фтора, а также имеющие алифатический радикал и циклические фрагменты. Алифатические кислоты – уксусная, пропионовая, янтарная, яблочная и винная были выбраны для выявления влияния гидроксильных групп в радикале кислоты на взаимодействие эфира и белка.

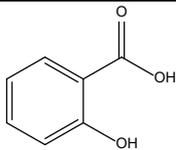
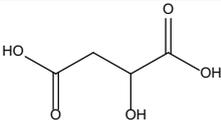
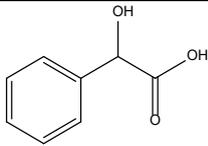
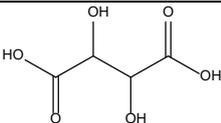
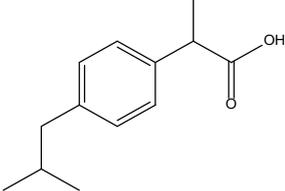
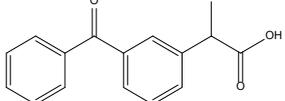
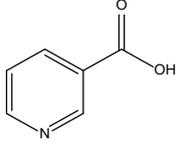
Для исследования важным было выявление закономерностей взаимодействия веществ, проявляющих противовоспалительное действие. В связи с этим для исследования были отобраны следующие соединения: салициловая, ацетилсалициловая, ацексамовая, тиапрофеновая, мефенамовая, нифлумовая кислоты, а также ЛС – производные пропионовой кислоты – ибупрофен, кетопрофен и флурбипрофен. Перечень перечисленных соединений отражает известное правило «от простого к сложному» и одновременно показывает, что в эксперименте использованы производные ароматических кислот, которые применяются в медицинской практике.

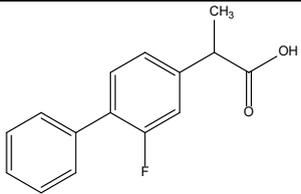
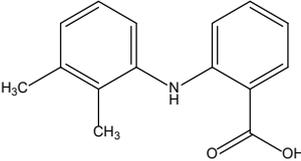
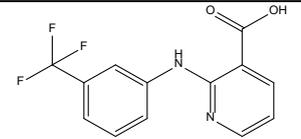
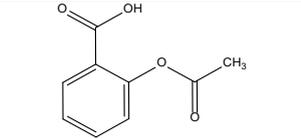
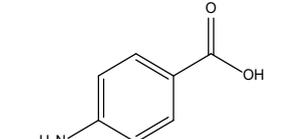
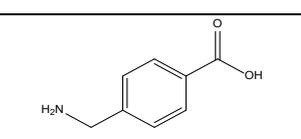
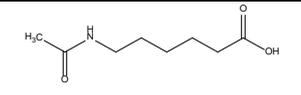
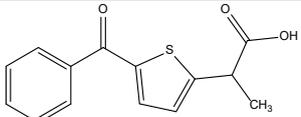
Таким образом, в качестве кислот выбрано двадцать модельных соединений, позволяющих при небольшой выборке выявить основные факторы, влияющие на закономерности взаимосвязи структура-активность в ряду эфиров ксантофиллов.

В таблице 3.1 представлены результаты расчетов энергии докинга различных моно- и диэфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина.

Таблица 3.1 – Энергии докинга моно- и диэфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина

№	Ацилирующая кислота	Лютеин		Зеаксантин		Астаксантин	
		моно-эфир	диэфир	моно-эфир	диэфир	моно-эфир	диэфир
1.	—	-14,64	-14,41	-14,38	-14,25	-8,35	-8,10
2.	 Уксусная	-12,55	-12,37	-12,28	-12,19	-7,11	-7,02
3.	 Пропионовая	-12,40	-12,29	-12,18	-12,07	-6,88	-6,62
4.	 Янтарная	-12,24	-12,19	-12,09	-12,02	-6,60	-6,51
5.	 Бензойная	-11,89	-11,76	-11,65	-11,49	-6,55	-6,51
6.	 4-Метилбензойная	-11,44	-11,35	-11,21	-11,16	-6,48	-6,39

7.	 <p>2-Гидроксibenзойная (салициловая)</p>	-11,19	-11,07	-11,10	-11,03	-6,33	-6,27
8.	 <p>Яблочная</p>	-10,98	-10,86	-10,89	-10,77	-6,15	-6,08
9.	 <p>Фенилгликолевая</p>	-10,84	-10,79	-10,79	-10,75	-6,06	-6,02
10.	 <p>Винная</p>	-10,71	-10,70	-10,64	-10,62	-5,89	-5,77
11.	 <p>Ибупрофен</p>	-10,59	-10,54	-10,55	-10,53	-5,70	-5,63
12.	 <p>Кетопрофен</p>	-10,43	-10,40	-10,41	-10,37	-5,51	-5,44
13.	 <p>Пиридин-3- карбоновая (никотиновая)</p>	-10,29	-10,22	-10,25	-10,18	-5,35	-5,28

14.		-8,86	-8,65	-8,77	-8,71	-5,12*	-5,09*
15.		-8,60	-8,53	-8,55	-8,51	-5,08*	-5,03*
16.		-8,41	-8,34	-8,37	-8,28	-4,95*	-4,89*
17.		-8,23	-8,19	-8,20	-8,17	-4,85*	-4,82*
18.		-8,15	-8,11	-8,13	-8,08	-4,80*	-4,78*
19.		-8,08	-8,04	-8,05	-8,01	-4,71*	-4,70*
20.		-7,53	-7,40	-7,45	-7,37	-4,59*	-4,52*
21.		-6,33*	-6,20*	-6,28*	-6,15*	-4,49*	-4,41*

Наилучший результат определения энергии докинга получен для молекул лютеина и зеаксантина (Таблица 3.1), а все остальные соединения уступают им и расположены в таблице по мере уменьшения стыковки с белком, что в первую очередь связано с их природным сродством к данному белку. Как и предполагалось, астаксантин характеризуется низкими значениями взаимодействия, что может свидетельствовать об адекватности разработанной модели, которая способна с высокой долей вероятности определять взаимодействие лиганда с белком даже при незначительных изменениях структуры. Нами был определен интервал значений энергии докинга от 0 до -10, в котором кандидаты имеют низкие шансы для связи лиганда с белком, что, скорее всего, приведет к тому, что лиганд не будет связываться с белком STARD3. Сильные пространственные отклонения в таблице помечены значком «*», что свидетельствует о невозможности адекватно оценить степень связывания, и значит, такие кандидаты в дальнейших исследованиях на предложенной модели рассматриваться не будут, кроме того, это приведет к тому, что лиганд не свяжется с белком.

Из полученных нами данных следует, что в ряду алифатических кислот – уксусной, пропионовой, янтарной, яблочной и винной – наблюдается уменьшение связывания с белком по мере увеличения количества гидроксильных групп. Этерификация азотсодержащими соединениями – аминокислотами, аминотетраацетатами, ацетамидоуксусной, метилэстерами, нифлумовой кислотами – свидетельствует о том, что усложнение структуры ацилирующего компонента приводит к снижению стыковки с белком. Установлено, что наличие аминогрупп в боковой цепи также способствует снижению связывания, что менее характерно для азотсодержащих гетероциклов. Наличие серы в структуре тиапрофеновой кислоты или фтора в нифлумовой кислоте ведет к резкому снижению связывания.

На рисунке 3.1 показано расположение лютеина, дибензоата лютеина и диникотината лютеина в белке STARD3 код 5I9J.

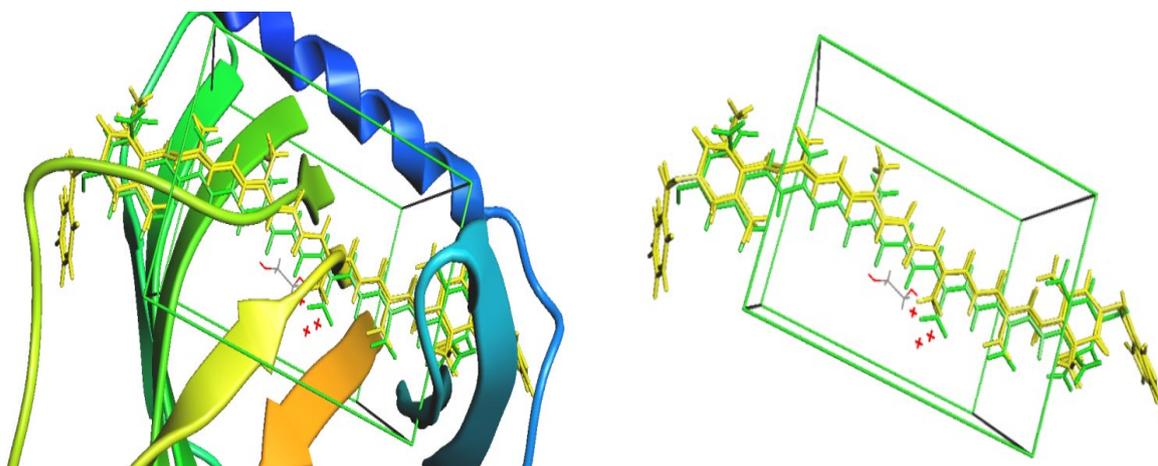


Рисунок 3.1 – Пространственное расположение лютеина (β,ϵ -Каротин) (зеленый) и его эфиров (β,ϵ -Каротин-3,3'-диилдибензоат – дибензоат лютеина и β,ϵ -Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат – диникотинат лютеина) (желтый) в белке STARD3 код 5I9J

Построенная модель позволила выявить закономерности между строением лиганда, в частности характером вводимой в структуру ксантофилла кислоты и связыванием будущего эфира с белком STARD3. 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 имеют меньшее сродство с белком, чем более простые молекулы. Переход от ароматических структур к гетероциклическим также негативно влияет на изучаемое взаимодействие. Еще одним интересным фактом является то, что моноэфиры легче проникают в полость омега-петли тем концом, который не связан с введенным радикалом, но эти отличия не существенны при изучении на построенной модели.

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: бензойная, метилбензойная, фенилгликолевая, никотиновая, салициловая кислоты, ибупрофен и кетопрофен. Мы считаем, что в дальнейшем изучение *in vitro*

синтезированных эфиров необходимо для подтверждения расчетных данных при выявлении закономерностей взаимосвязи структура-активность. Следует также отметить, что предлагаемый вариант прогноза перспективен с точки зрения разработки ЛП с целью их селективной доставки в желтое пятно, что, в свою очередь, может быть использовано в терапии ВМД.

3.3 Выбор флавоноидов для химической модификации

Несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения таких вторичных метаболитов растений, как флавоноиды, они, безусловно, являются одним из самых изучаемых классов природных соединений. По данным базы «PubMed», количество работ, посвященных флавоноидам, за последние 12 лет увеличилось примерно в четыре раза. В 2012 г. общее число публикаций по запросу «flavonoids» составило 6502, а за период с января 2023 г. по май 2024 г. – 29835 статей [285]. Возрастание интереса к этому классу БАС связано с широким диапазоном их биологической активности [345, 347, 259] и возросшим числом экспериментального подтверждения фармакологических свойств флавоноидов [167, 384]. Такая тенденция свидетельствует о закономерном росте числа исследований в этой области.

Соединения данного ряда являются природными биологически активными полифенолами, которые обычно в растениях встречаются в виде гликозидов, агликонов и их метилированных производных. Наиболее известными и изученными их свойствами являются антиоксидантная, ангиопротекторная [4, 187], гепатопротекторная, антибактериальная, антимуtagenная, противоопухолевая и противовирусная активности [2, 200, 268, 237, 317].

Вместе с тем многогранное изучение флавоноидов на современном уровне [305] крайне редко выходит за пределы научного интереса и, к сожалению, не завершается созданием нового ЛП. Такой парадокс, во-

первых, связан с тем, что получать из растительного сырья индивидуальные природные флавоноиды экономически не выгодно, а во-вторых, они не могут быть использованы в качестве препаратов немедленного действия, что связано как с менее выраженной фармакологической активностью по сравнению с синтетическими соединениями, так и такими свойствами, как низкая растворимость, абсорбция и быстрый метаболизм [156, 171, 335].

Большинство исследователей считает, что биологическое действие и терапевтические эффекты флавоноидов обусловлены в первую очередь их антиоксидантной активностью, которая обусловлена полифенольной природой агликона [112, 171, 278, 335].

Например, кверцетин является одним из наиболее распространенных агликонов флавоноидов с хорошо изученными фармакологическими свойствами и высокой скоростью метаболизма. Ему присущи антиканцерогенное [338, 383], противовирусное [128], антиоксидантное [320, 367] действия. Он оказывает положительное влияние на метаболический синдром, который рассматривают как комплекс заболеваний, приводящих к летальному исходу вследствие развития сердечно-сосудистых заболеваний [167].

Для мирицетина подтвержден положительный терапевтический эффект при воспалительных заболеваниях, атеросклерозе, тромбозах, церебральной ишемии, сахарном диабете, болезни Альцгеймера и патогенных микробных инфекциях [50, 323, 241]. Он вызывает апоптоз культуры клеток лейкемии и гепатомы человека, снижает риск развития рака кожи и метастазирования рака поджелудочной железы в экспериментах *in vitro* [179].

Нарингенин проявляет противовоспалительные, антимикробные, противовирусные свойства [215, 380, 346]. Имеются данные исследований *in vitro* и *in vivo*, которые показали инактивацию канцерогенов после лечения чистым нарингенином [240]. Нарингенин обладает потенциалом применения при сердечно-сосудистых заболеваниях [160].

Гесперетин – флаванон, характеризующийся противодиабетической активностью [369]. Еще одно ценное направление его использования – выраженное ангиопротекторное и вазодилатирующее действие [256], а также способность предотвращать ишемию миокарда [214]. Гесперетин, как и описанные выше агликоны, проявляет антиканцерогенный эффект [322, 374].

Особый интерес и перспективу представляют противовирусная и антиканцерогенная активности флавоноидов. Ранее в эксперименте *in silico* нами была рассмотрена возможность связывания 30 флавоноидов-лигандов и основной протеазы SARS-CoV-2 – 3CLpro [26]. 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 всех четырех описанных выше агликонов, мы включили их в эксперимент в качестве базовых структур для оптимизации. Далее необходимо было определить стратегию оптимизации выбранных флавоноидов.

Следует отметить, что даже небольшие изменения в структуре флавоноидов приводят к проявлению новых свойств [201].

Например, EGCG (эпигаллокатехин-3-галлат) ингибирует развитие гепатоцеллюлярной карциномы [84] и карциномы яичников [84, 85], ингибирует 3CL-протеазу SARS-CoV-2 [161, 262]. Аналогичные эффекты признаются и для ЕС (эпикатехин). Интересно, что ЕС значительно менее активен, чем его природные эфиры, в частности EGCG, т. е. именно сложный эфир с галловой кислотой способствуют усилению биологической активности ЕС [319]. В этом контексте этерификация агликонов флавоноидов может оказаться перспективной.

Большинство природных флавоноидов в растениях находятся в виде О-гликозидов, биологическая активность и биодоступность которых зависят как от природы, так и от положения углеводного компонента [261]. В

зависимости от типа гликозидирования можно решить ряд задач по повышению эффективности и биодоступности флавоноидов, учитывая при этом, что 3-О-гликозиды даже в процессе экстракции из растений очень легко гидролизуются, в отличие от трудногидролизующихся 7-О-гликозидов [360].

Значительное число исследований по модификации флавоноидов в присутствии энзимов описывают их этерификацию по гидроксигруппам углеводного фрагмента в гликозидах [54, 182, 245, 263, 290, 328]. Однако, по нашему мнению, более целесообразной будет этерификация агликонов флавоноидов, поскольку именно они являются фармакофорами и характеризуются определенной липофильностью. Этерификация, вероятней всего, должна влиять на их растворимость. Существует обратная корреляция между числом гидроксигрупп и липофильностью флавоноидов [352]. Один из способов увеличения липофильности – перевод гидроксильных групп в сложноэфирные [354].

Гидроксигруппы в кольце «В» обуславливают наиболее выраженные антиоксидантные свойства, тогда как енольная гидроксигруппа в положении С3, характеризующаяся слабыми кислотными свойствами, в наименьшей степени проявляет антиоксидантные свойства. Более того, образование эфиров по данному гидроксилу практически не влияет на антиоксидантную активность исходных флавоноидов [112, 210].

Значимым процессом, который следует учитывать при модификации структуры флавоноидов, является окисление, например, кверцетина и родственных ему соединений в процессе метаболизма (Рисунок 3.2):

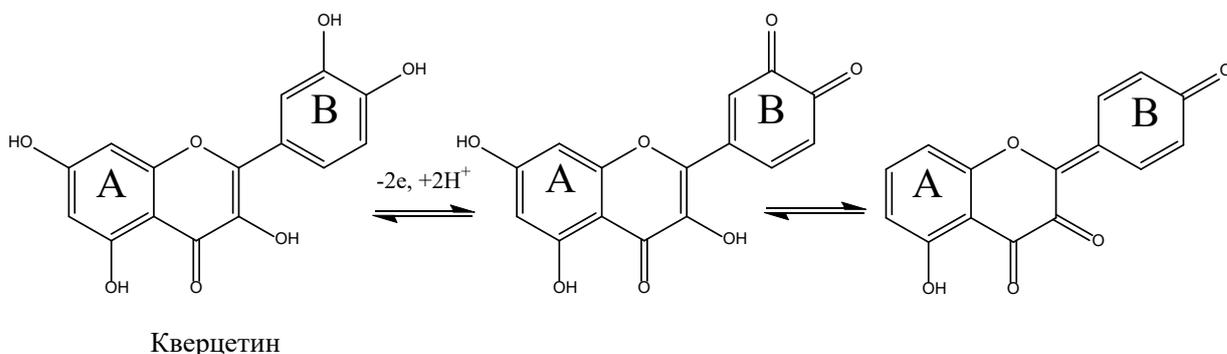


Рисунок 3.2 – Схема окисления флавоноидов на примере кверцетина

В результате такого пути окисления флавоноиды теряют фармакологическую активность, поскольку формируется хиноновая структура фармакофора с участием кольца «В» [111, 193].

Представляется логичным, что для получения эфиров по положению С3 необходимо предварительно защитить остальные гидроксигруппы, например, положения С5, С7, С3', С4' для кверцетина и С5, С7, С3', С4', С5' для мирицетина. Важным аргументом в пользу этерификации флавоноидов по положению С3 является то обстоятельство, что изменение структуры вводимого радикала не окажет отрицательного влияния на фармакофоры, поскольку сохраняется главная цепь сопряжения, что, вероятней всего, будет способствовать повышению стабильности и липофильности молекулы [76, 116, 261, 314, 313].

Следовательно, направленная модификация, а именно синтез эфиров флавоноидов по положению С3, будет способствовать стабилизации фармакофора, повышению антиоксидантной активности и создаст перспективы для синтеза новых оптимизированных молекул флавоноидов, проявляющих ценные виды активности.

Мы предполагаем, что полученные эфиры могут проявлять бинарные свойства двух молекул – исходного флавоноида и ацилирующего компонента, однако возможен и эффект потенцирования их фармакологических свойств.

На следующем этапе исследования для модификации отобранных флавоноидов было необходимо выбрать ацилирующие агенты.

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, а их виды активности рассмотрены выше в разделе 3.1.

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.

Опубликованные данные показывают, что протокатеховая кислота будучи мощным антиоксидантом, может быть использована при лечении нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [199, 381]. Она характеризуется антидепрессивным потенциалом в эксперименте на животных [194, 255]. И, что особенно ценно, усиливает антибактериальную активность антибиотиков и антибактериальных препаратов [140].

Галловая кислота известна своей антибактериальной, антиоксидантной и противовоспалительной активностью [98], благодаря антиоксидантной активности она проявляет антиканцерогенное действие, включая миграцию, экспрессию онкогенов [181, 344] и имеет терапевтический потенциал в патогенезе COVID-19 [73]. Имеются сведения о том, что галловая кислота уменьшает повреждение нейронов и амилоидную невропатологию головного мозга, характерные для болезни Альцгеймера [362, 378]. Она является практически нетоксичным соединением с минимальными побочными эффектами, что подтверждено в экспериментах на животных и клиническими испытаниями [72].

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 всех производных фенил-бенз- γ -пирана, а также участвует в модификации природных БАС [60, 124, 309]. Сама коричная кислота проявляет антиоксидантные свойства [276]. В обзорах [121, 138, 308] приводятся сведения о видах активности коричной кислоты и ее модифицированных производных, в частности о противомикробной,

противоопухолевой и противовоспалительной активностях, а также положительном влиянии на течение болезни Альцгеймера.

Поскольку все перечисленные выше кислоты являются достаточно подробно изученными и малотоксичными, то мы теоретически прогнозируем низкую токсичность синтезированных целевых эфиров.

3.4 PASS-прогноз видов фармакологической активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов

Для всех предполагаемых ацилированных ксантофиллов и флавоноидов нами были получены предварительные сведения о фармакологической активности и токсичности *in silico* с помощью прогностической программы «PASS online» (Таблица 3.2) [359].

Помимо прогноза нами осуществлен сравнительный анализ антиоксидантной, мембранстабилизирующей и антирадикальной активности целевых соединений с учетом острой токсичности.

В ряду производных ксантофиллов наблюдается увеличение активностей антиоксидантной и по связыванию свободных радикалов в следующем порядке: сложный эфир с ибупрофеном, кетопрофеном, затем с кислотами никотиновой, фенилгликолевой, бензойной, метилбензойной и салициловой. Расчетные значения связывания свободных радикалов превысили значения 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, тогда как некоторые сложные эфиры флавоноидов показали высокую антивирусную активность и антиканцерогенное действие. Так, нарингенин 4'-циннамат, гесперетин 3'-циннамат, кверцетин 4'-циннамат, кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5, мирицетин-3-салицилат, мирицетин-

3-дигидроксибензоат-3,4, мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 показали высокое антиканцерогенное действие, а кверцетин 4'-никотинат, кверцетин 4'-циннамат, кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5, мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 являются соединениями лидерами в ряду антивирусной активностью в отношении SARS-CoV-2.

Таблица 3.2 Данные прогноза *in silico* некоторых видов активности астаксантина, лютеина, зеаксантина и кверцетина, мирицетина, нарингенин, гесперетина и их эфиров

№	Эфиры каротиноидов и флавоноидов с ароматическими кислотами	Вероятность проявления активности					
		Антиканцерогенное действие (вероятность)	SARS-CoV-2	Мембрано-протекторное действие	Связывание свободных радикалов	Анти-оксидантное действие	Токсичность LD50, мг/кг
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Астаксантин	0,740	-	0,607	0,535	0,758	5525
2.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-дибензоат (С.1)	0,714	-	0,341	0,556	0,652	5908
3.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (С.2)	0,718	-	0,228	0,557	0,653	5948
4.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (С.3)	0,600	-	0,112	0,407	0,510	5214

1	2	3	4	5	6	7	8
5.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (С.4)	0,640	-	0,344	0,419	0,553	4786
6.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (С.5)	0,798	-	0,395	0,708	0,659	4805
7.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (С.6)	0,650	-	0,104	0,252	0,556	1928
8.	β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (С.7)	0,584	-	0,128	0,295	0,574	2557
9.	Лютеин	0,623	-	0,204	0,205	0,609	3995
10.	β,ϵ -каротин-3,3'-дибензоат (С.8)	0,557	-	0,117	0,217	0,676	4840
11.	β,ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (С.9)	0,561	-	0,101	0,217	0,677	5027

1	2	3	4	5	6	7	8
12.	β,ϵ -каротин-3,3'- диилди(пиридин-3- карбоксилат) (С.10)	0,451	-	-	0,148	0,553	4053
13.	β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2- гидрокси-2-фенилэтанат (С.11)	0,482	-	0,199	0,153	0,585	3109
14.	β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2- гидрокси-2-бензоат (С.12)	0,683	-	0,212	0,336	0,672	3663
15.	β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-(4- изобутилфенил)-пропионат (С.13)	0,497	-	0,099	0,218	0,594	2849
16.	β,ϵ -каротин-3,3'-диилди(2-(3- бензоилфенил)пропионат) (С.14)	0,431	-	0,102	0,235	0,599	3382
17.	Зеаксантин	0,812	-	0,560	0,449	0,766	6683

1	2	3	4	5	6	7	8
18.	β,β -Каротин-3,3'- диилди(бензоат) (С.15)	0,772	-	0,309	0,480	0,679	7544
19.	β,β -Каротин-3,3'-диилди(4- метилбензоат) (С.16)	0,775	-	0,261	0,481	0,680	7379
20.	β,β -Каротин-3,3'- диилди(пиридин-3- карбоксилат) (С.17)	0,679	-	-	0,317	0,530	6398
21.	β,β -Каротин-3,3'-диилди(2- гидрокси-2-фенилэтаноеат) (С.18)	0,708	-	0,312	0,327	0,573	5849
22.	β,β -Каротин-3,3'-диилди(2- гидроксибензоат) (С.19)	0,840	-	0,376	0,641	0,675	6654
23.	β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(4- изобутилфенил)-пропионат) (С.20)	0,716	-	0,097	0,207	0,574	2637

1	2	3	4	5	6	7	8
24.	β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (С.21)	0,670	-	0,100	0,250	0,587	3213
25.	Нарингенин	0,724	0,096	0,964	0,769	0,794	1371
26.	Нарингенин 4'-бензоат (F.1)	0,776	0,696	0,947	0,839	0,674	2204
27.	Нарингенин 4'-салицилат (F.2)	0,791	0,633	0,940	0,875	0,691	3894
28.	Нарингенин 4'-циннамат (F.3)	0,855	0,809	0,975	0,922	0,805	1893
29.	Нарингенин 4'-никотинат (F.4)	0,684	0,789	0,909	0,738	0,525	1860
30.	Кверцетин	0,757	0,270	0,873	0,811	0,872	1892
31.	Кверцетин 4'-бензоат (F.5)	0,802	0,944	0,965	0,909	0,775	2838

1	2	3	4	5	6	7	8
32.	Кверцетин 4'-салицилат (F.6)	0,816	0,926	0,949	0,925	0,791	2048
33.	Кверцетин 4'-циннамат (F.7)	0,871	0,968	0,979	0,950	0,865	2180
34.	Кверцетин 4'-никотинат (F.8)	0,722	0,965	0,924	0,793	0,594	1894
35.	Гесперетин	0,783	0,048	0,952	0,878	0,746	2157
36.	Гесперетин 3'-бензоат (F.9)	0,803	0,711	0,923	0,912	0,635	2356
37.	Гесперетин 3'-салицилат (F.10)	0,817	0,652	0,911	0,928	0,651	2205
38.	Гесперетин 3'-циннамат (F.11)	0,872	0,819	0,964	0,952	0,754	1632
39.	Гесперетин 3'-никотинат (F.12)	0,723	0,799	0,858	0,798	0,504	1656
40.	Кверцетин-3-салицилат (F.13)	0,810	0,873	0,965	0,916	0,759	2054
41.	Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (F.14)	0,802	0,899	0,969	0,903	0,769	1878
42.	Кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (F.15)	0,773	0,908	0,965	0,868	0,747	2240
43.	Кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (F.16)	0,813	0,912	0,970	0,917	0,772	2126

1	2	3	4	5	6	7	8
44.	Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (F.17)	0,835	0,935	0,965	0,933	0,831	2099
45.	Кверцетин 3-бензоат	0,795	0,931	0,969	0,895	0,762	2314
46.	Кверцетин 5-бензоат	0,771	0,925	0,960	0,847	0,735	1344
47.	Кверцетин 7-бензоат	0,775	0,917	0,956	0,873	0,754	1498
48.	Мирицетин	0,784	0,197	0,968	0,832	0,924	2227
49.	Мирицетин-3-салицилат (F.18)	0,832	0,896	0,961	0,931	0,821	2245
50.	Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (F.19)	0,826	0,918	0,965	0,922	0,831	2152
51.	Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (F.20)	0,799	0,926	0,961	0,902	0,814	1952
52.	Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (F.21)	0,834	0,929	0,966	0,933	0,831	2415
53.	Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (F.22)	0,858	0,926	0,965	0,928	0,834	2195

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 PASS, меньше или сопоставима с родоначальными флавоноидами.

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 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'.

С помощью методов *in silico* были установлены наиболее перспективные соединения. Так, самая высокая связь с транспортным белком STARD3 наблюдается у эфиров лютеина с бензойной, 4-метилбензойной, 2-гидроксибензойной (салициловой) кислотами.

Нарингенин 4'-циннамат (F.3), гесперетин 3'-циннамат (F.11), кверцетин 4'-циннамат (F.7), кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (F.17), мирицетин-3-салицилат (F.18), мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (F.21),

мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (F.22) показали высокое антиканцерогенное действие, а кверцетин 4'-никотинат (F.8), кверцетин 4'-циннамат (F.7), кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (F.22), мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (F.21) являются соединениями-лидерами в ряду антивирусной активностью в отношении SARS-CoV-2.

Наиболее высокое мембрано-протекторное действие в ряду сложных эфиров ксантофиллов проявляют β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (C.4), β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (C.5), β,β -каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (C.19), в ряду сложных эфиров флавоноидов нарингенин 4'-циннамат (F.3), кверцетин 4'-циннамат (F.7) и кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (F.16).

Самое высокое антиоксидантное действие и связывание свободных радикалов в ряду сложных эфиров ксантофиллов прогнозируется у β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоата (C.5), β,β -Каротин-3,3'-диилди(бензоата) (C.15) и β,β -Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоата) (C.16), в ряду сложных эфиров флавоноидов – кверцетин 4'-циннамата (F.7), кверцетин-3-тригидроксибензоата-3,4,5 (F.17), мирицетин-3-гидроксибензоата-4 (F.19), мирицетин-3-дигидроксибензоата-3,4 (F.21), мирицетин-3-тригидроксибензоата-3,4,5 (F.22).

Минимальная токсичность прогнозируется у β,β -Каротин-3,3'-диилди(бензоата) (C.15), β,β -каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоата) (C.16), в ряду сложных эфиров флавоноидов – нарингенин 4'-салицилата (F.2), кверцетин 4'-бензоата (F.5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3

На основании данных теоретического прогноза для осуществления запланированной экспериментальной части исследования в качестве модельных каротиноидных структур для оптимизации были выбраны лютеин, зеаксантин и астаксантин. Этерификацию каждого из ксантофиллов следует провести с перспективными, на наш взгляд, ацилирующими агентами – бензойной, 4-метилбензойной, фенилгликолевой, никотиновой, салициловой кислотами, ибупрофеном и кетопрофеном.

Прогноз методом молекулярного докинга показал, что с точки зрения фармакологической активности наиболее перспективными следует считать в первую очередь эфиры лютеина и зеаксантина.

Для направленной модификации структуры флавоноидов, а именно синтеза их эфиров по положению С3, выбраны кверцетин, мирицетин, нарингенин, гесперетин. Для получения связанных и системных данных по энзимной этерификации молекул природных БАВ в эксперимент с флавоноидами включены бензойная, салициловая, никотиновая кислоты.

С целью установления влияния числа фенольных гидроксигрупп в структуре ацилирующей кислоты на фармакологические свойства продуктов синтеза нами будут использованы 4-гидроксibenзойная, 2,6-дигидроксibenзойная, 3,4-дигидроксibenзойная (протокатеховая), 3,4,5-тригидроксibenзойная (галловая) и коричная кислоты.

Данные, полученные с помощью прогностической программы «PASS online», позволяют сделать вывод о том, что сложные эфиры, синтезированные на основе перечисленных выше исходных соединений, будут проявлять антиоксидантную, мембранопротекторную и антиканцерогенную активности. Особый интерес представляют полученные сведения в отношении ингибирования белка *replicase polyprotein 1ab* [42], что позволяет с высокой долей вероятности предположить противовирусную активность кандидатов, таких как кверцетин 4'-никотинат, кверцетин 4'-циннамат, кверцетин-3-тригидроксibenзоат-3,4,5, мирицетин-3-

дигидроксибензоат-3,4 в отношении SARS-CoV-2. По результатам прогноза предлагаемые целевые соединения должны обладать низкой токсичностью при применении в модельных опытах на крысах.

Результаты диссертационного исследования, представленные в Главе 3, опубликованы в работах [26, 29, 32, 37, 38].

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ЭНЗИМНЫЙ СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ КАРОТИНОИДОВ

4.1 Выбор условий ферментативного синтеза сложных эфиров ксантофиллов

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 [195]. Очевидно, что этерификация ксантофиллов требует адаптации традиционных условий ее протекания. Это связано с особенностями растворимости ксантофиллов: они практически не растворимы в воде и растворимы в неполярных органических растворителях [93].

Немаловажным фактором является температурный режим: реакция при температурах выше 50°C приведет к разрушению основного фармакофора ксантофиллов – полиеновой цепи. Другая особенность – это использование металлов и кислот в качестве катализаторов. Следует иметь в виду, что, помимо основной реакции, имеет место выделение водорода. Присутствие в реакционной системе астаксантина, лютеина, зеаксантина, вероятней всего, будет сопровождаться частичным или полным гидрированием их полиеновой цепи и, как следствие, способствовать изменению каротиноидной структуры. С учетом описанных жестких условий реакции этерификации ксантофиллов в классических условиях, нами был использован более щадящий режим получения их сложных эфиров в присутствии биокатализаторов.

Для решения задач масштабирования процессов синтеза при его трансфере в фармацевтическое производство целесообразно выявить набор факторов, достоверно влияющих на этерификацию, и определить уровень влияния каждого из них. Как правило, выявление закономерностей влияния параметров синтеза на выход целевого продукта проводят с применением

математических методов, например, построением математических моделей. В связи с этим на первом этапе необходимо предварительно отобрать параметры, которые далее будут включены в план математического эксперимента, и оценить их влияние на выход продукта реакции.

Для накопления экспериментального материала по использованию биокатализаторов в синтезе полусинтетических производных каротиноидов и с учетом достаточно широкого ассортимента современных липаз и их популярности у исследователей мы посчитали целесообразным изначально провести эксперимент для двух катализаторов: Новозим 435 – иммобилизованной липазы *Candida antarctica* [324] и биокатализатора Amano Lipase PS – иммобилизованной липазы *Pseudomonas cepacia* [129]. Изучение зависимости выхода целевого дибензоата зеаксантина от времени (Рисунок 4.1) показало, что биокатализатор Amano Lipase PS в первые два часа обеспечивает более высокий выход – 43 %, в то время как Новозим 435 – 38 %.

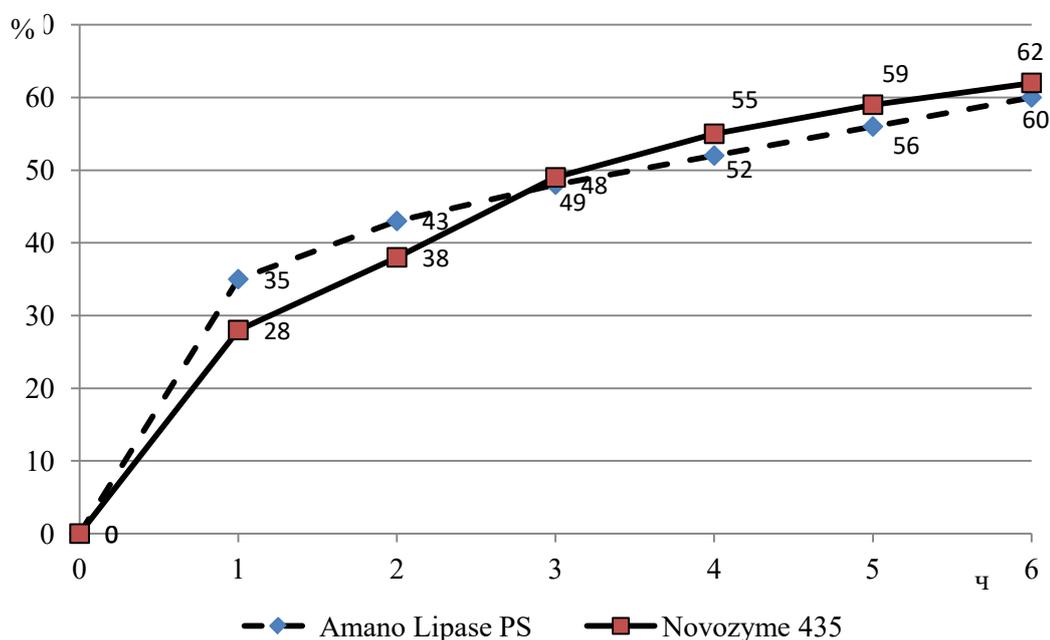


Рисунок 4.1 Динамика выхода целевого продукта при использовании биокатализаторов Amano Lipase PS и Новозим 435 на примере синтеза дибензоата зеаксантина

В интервале от трех до шести часов интенсивность выхода превалирует для системы с катализатором Новозим 435 со значением, не превышающим 2 %.

На рисунках 4.2 и 4.3 представлено изменение выхода дибензоата лютеина и астаксантина в реакции этерификации в присутствии Новозим 435 и Amano Lipase PS.

При параллельном синтезе дибензоата лютеина в присутствии липаз Amano Lipase PS и Новозим 435 установлено, что накопление целевого продукта протекает аналогично синтезу дибензоата зеаксантина. В первые два часа Amano Lipase PS имел некоторое преимущество перед Новозим 435: для первого фермента выход составил 41 %, для второго – около 38 %.

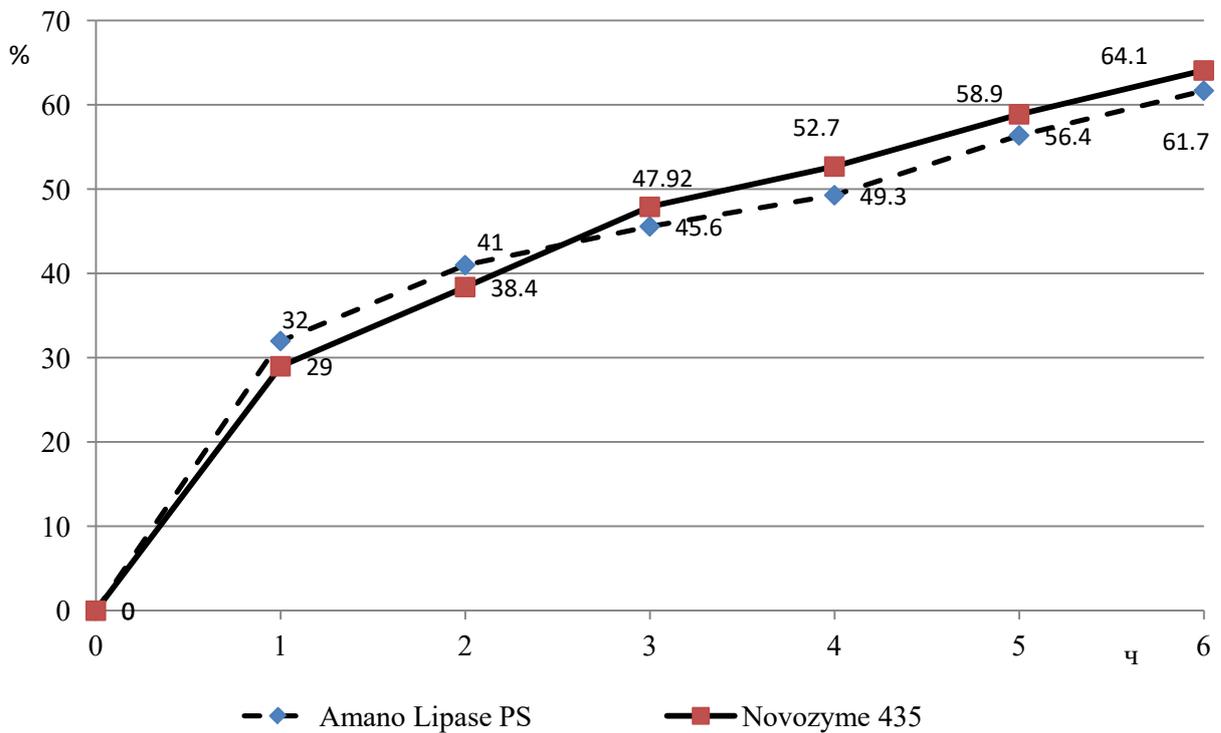


Рисунок 4.2 Динамика выхода целевого продукта при использовании биокатализаторов Amano Lipase PS и Новозим 435 на примере синтеза дибензоата лютеина

После трех часов синтеза количество целевого продукта увеличивалось в среде с Новозим 435, хотя оно не превысило 3 % относительно данных по Amano Lipase PS.

Влияние марки липазы на выход дибензоата астаксантина продемонстрировало, что биокатализатор Amano Lipase PS в первые два часа обеспечивает более высокий выход – от 0 до свыше 44 %, в то время как

Новозим 435 – до 39 %. На третьем часе синтеза выход дибензоата астаксантина практически сравнялся – 45,7 % и 46,9 % для Amano Lipase PS и Новозим 435, соответственно.

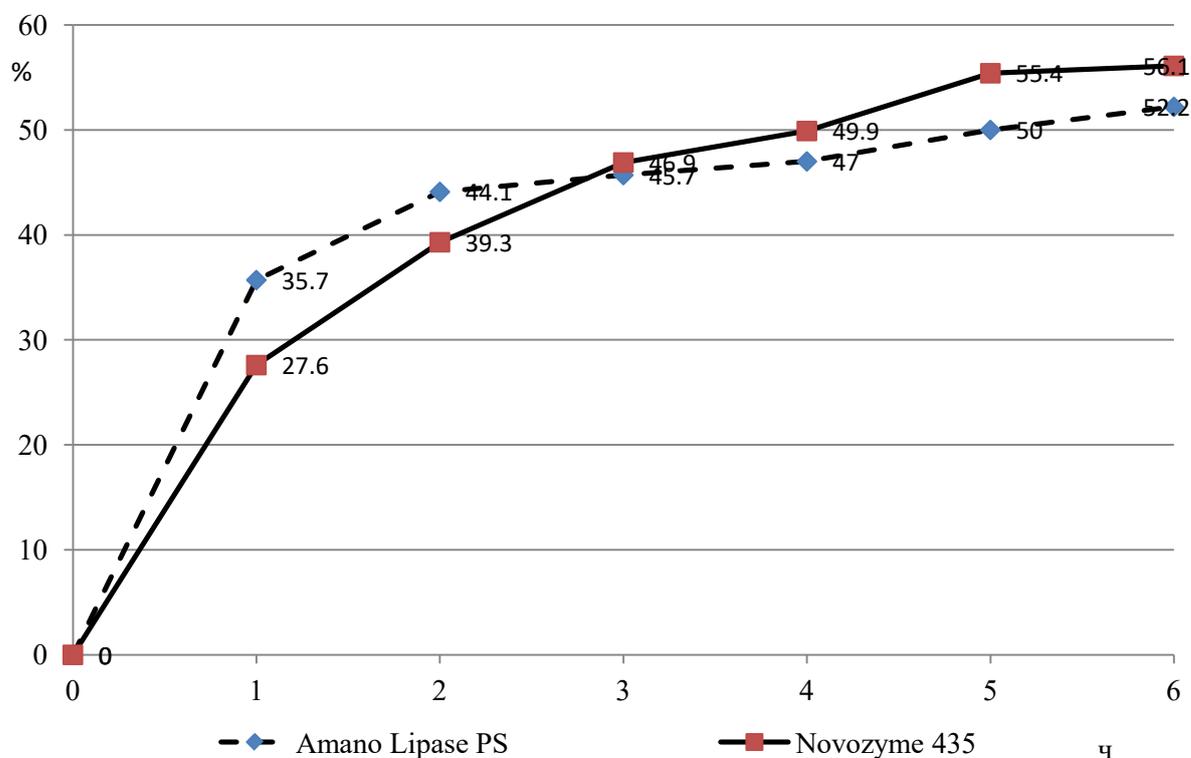


Рисунок 4.3 Динамика выхода целевого продукта при использовании биокатализаторов Amano Lipase PS и Новозим 435 на примере синтеза дибензоата астаксантина

В течение последующих трех часов наблюдения установлено, что выход дибензоата астаксантина в присутствии Новозим 435 превосходил этот показатель для системы с Amano Lipase PS от 2 % до 4 %.

Следует отметить, что по истечении шести часов достоверного различия в увеличении выхода целевого продукта при использовании обоих биокатализаторов в синтезе дибензоатов зеаксантина, лютеина и астаксантина не наблюдалось.

Для полученных данных были рассчитаны коэффициенты Пирсона, значение которого составило для синтеза дибензоата зеаксантина 0,99, дибензоата лютеина 0,99, дибензоата астаксантина 0,98, что

свидетельствуют о высокой корреляции и невозможности определить предпочтительный метод по этому параметру.

Таким образом, можно 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.

Общими критическими параметрами любой методики синтеза, как правило, являются соотношение исходных реагентов, температура процесса, время протекания реакции, скорость перемешивания реакционной среды. При использовании ферментов в качестве катализаторов необходимо дополнительно устанавливать оптимальное количество энзима, которое необходимо вносить в реакционную среду.

На следующем этапе исследования нами осуществлен предварительный выбор параметров для их дальнейшего включения в математическую модель оптимизации синтеза. В качестве модельного сложного эфира использовали дибензоат астаксантина, критерием выбора при этом являлся выход целевого продукта реакции.

Соотношение исходных реагентов 0,001 моль астаксантина и 0,002 моль бензойной кислоты было проведено на основании стехиометрических коэффициентов в уравнении реакции их взаимодействия [21]. Молярное соотношение исходных реагентов в схемах синтеза сложных диэфиров остальных ксантофиллов было аналогичным.

Общеизвестно, что повышение температуры реакционной среды увеличивает скорость реакции, т.е. ожидается, что температурный фактор должен оказать максимальное влияние на выход целевого продукта синтеза. Повышение температуры реакционной среды при дальнейшем трансфере методики в производство приведет к ее удорожанию, поэтому был проведен синтез дибензоат астаксантина без нагревания, т.е. при комнатной температуре, равной 21 °С (Рисунок 4.4).

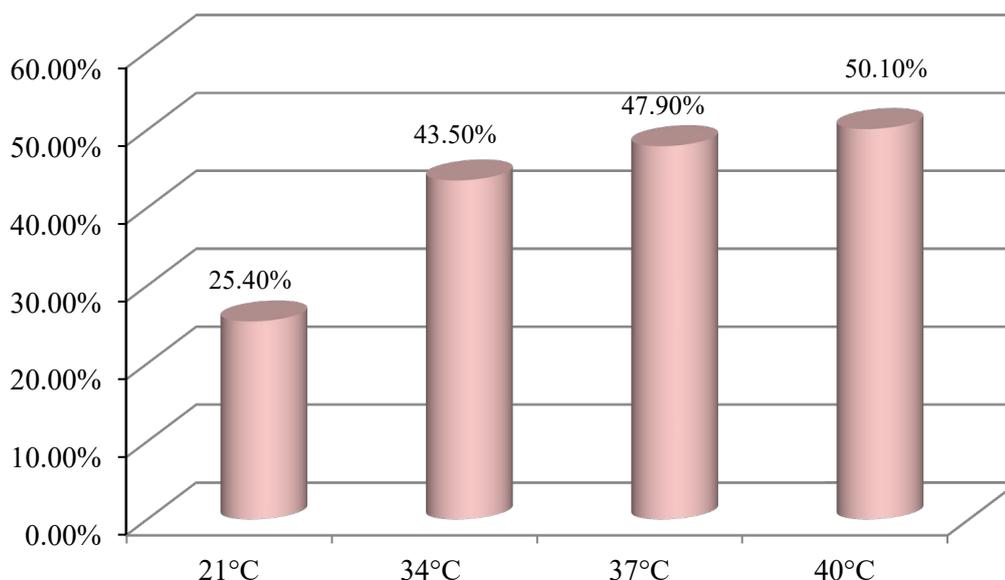


Рисунок 4.4 – Влияние температуры синтеза на выход дибензоата астаксантина

В связи с тем, что синтез осуществляется в присутствии липазы Новозим 435, процесс проводили при температуре 37 °С. Изменение температуры вели в пределах ± 3 °С, чтобы исключить влияние деградации фермента на эффективность синтеза (Рисунок 4.4).

Как показал эксперимент, нагревание реакционной среды приводит к значительному повышению выхода продукта реакции с 25 % до 48 %, т. е. температурный фактор оказывает значимое влияние на получение сложного эфира.

Время синтеза является важным показателем, поскольку определяет длительность технологического цикла производства одной серии субстанции при масштабировании и влияет на затратность процесса. Нами было изучено четыре варианта этого показателя – 1; 2,5; 4,0; 5,5 часов. Температура эксперимента составила 37 °С (Рисунок 4.5), т. к. при этом значении в предыдущем эксперименте был достигнут максимальный рост выхода целевого продукта и оно оптимально для функционирования липаз.

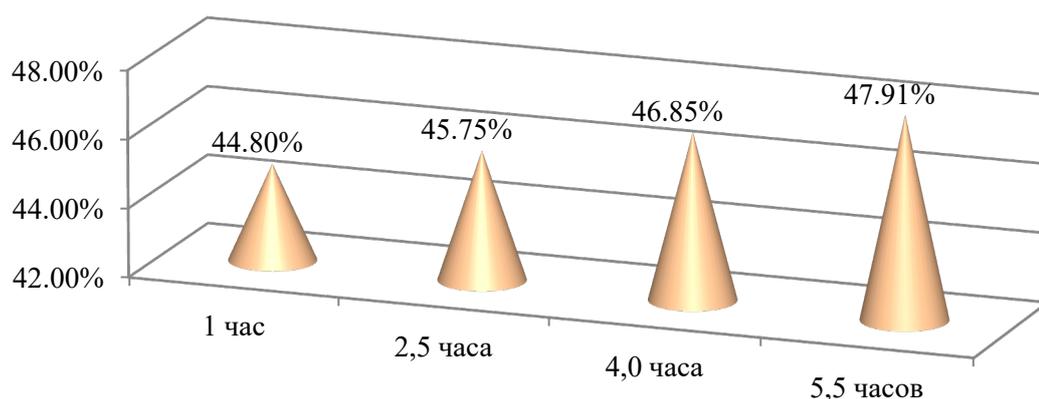


Рисунок 4.5 – Зависимость выхода дибензоата астаксантина от времени синтеза

Продолжительность синтеза, как и предполагалось, оказывает влияние на выход основного продукта реакции. При этом варьирование временного фактора в пределах 0,5 часа меняет контролируемый показатель в пределах около 1%. Если сравнить выход целевого продукта при продолжительности процесса от 1 часа к 5,5 часам, то выход в целом увеличивается на 3%. Кроме того, необходимо учитывать температурный фактор, потому что повышение температуры реакции, как правило, позволит сократить время протекания процесса, а выход целевого продукта при этом повысится.

Параметром, влияющим на выход продукта реакции, является скорость перемешивания реакционной смеси. Особенность иммобилизованных энзимов связана с хрупкостью частиц носителя, поэтому следует выбирать такое оптимальное число оборотов мешалки, чтобы интенсивное перемешивание не приводило к потере активности фермента; снижение же оборотов увеличивает продолжительность реакции. Однако самой важной проблемой, на наш взгляд, является то, что в реакционной среде одновременно происходит высвобождение не только фермента, но и полимерных компонентов подложки-носителя. Это, безусловно, может быть одной из причин загрязнения целевого продукта, что негативно отразится на создании фармацевтических препаратов.

Экспериментально были изучены четыре значения этого фактора – скорость вращения мешалки 15 об/мин; 30 об/мин; 45 об/мин; 60 об/мин. Установлено, что выход целевого продукта при изменении скорости вращения мешалки в пределах указанных значений изменялся незначительно – менее 0,5 %. Возможно, что в дальнейшем оптимальное сочетание этого параметра с продолжительностью синтеза и температурным режимом приведет к повышению выхода дибензоата астаксантина.

Далее нами изучено влияние количества вносимого в реакционную среду биокатализатора Новозим 435 на выход дибензоата астаксантина. Этот параметр изменяли от 0,25 г до 1,0 г с интервалом в 0,25 г. Установлено, что влияние количества катализатора на выход продукта реакции выше, чем у показателя «скорость перемешивания»: выход сложного эфира повысился на 1,5 %.

Опираясь на полученный результат, можно расположить изученные факторы в порядке убывания их влияния на выход целевого продукта реакции: «температура реакционной среды», «время реакции», «количество биокатализатора», «скорость перемешивания реакционной смеси».

Учитывать эту зависимость при дальнейшей оптимизации методики синтеза математическими методами мы считаем перспективным.

4.2 Оптимизация параметров синтеза производных каротиноидов методом математического планирования эксперимента

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. Такой подход позволяет выявить влияние факторов на выход продукта. Это влияние определяется количественно, что в дальнейшем позволяет быстро и

эффективно оптимизировать процесс синтеза как в лабораторных условиях, так и при масштабировании методики в условиях промышленного производства. В качестве объекта математической модели был выбран астаксантин ввиду его большей стабильности в сравнении с лютеином и зеаксантином.

Первым этапом построения математической модели был выбор значимых факторов и определение важности их влияния. Предварительными экспериментами (Глава 4, раздел 4.1) было установлено, что основными факторами в порядке убывания их влияния на процесс синтеза являются температура, время протекания реакции, количество биокатализатора и скорость перемешивания.

Для математического описания процесса синтеза с участием астаксантина построен план эксперимента, вводные параметры которого представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – 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, т. е. алгебраическая сумма значений каждого столбца равна нулю и ортогональностью, сумма почленных произведений любых двух столбцов равна нулю. Критерием оптимизации служило экспериментальное значение выхода продукта синтеза в процентах (Y , %). План и результат эксперимента по получению дибензоата астаксантина (β, β -каротин-4,4'-дион-3,3'-дибензоата) представлен в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – План и результат эксперимента по получению дибензоата астаксантина (соединение С.1)

№ опыта	Уровни факторов				Экспериментальное значение Y , %
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	+1	+1	+1	+1	52,12
2	+1	-1	+1	+1	51,11
3	-1	+1	+1	+1	50,34
4	-1	-1	+1	+1	48,55
5	+1	+1	-1	+1	52,05
6	+1	-1	-1	+1	50,17
7	-1	+1	-1	+1	49,24
8	-1	-1	-1	+1	48,09
9	+1	+1	+1	-1	52,04
10	+1	-1	+1	-1	49,89
11	-1	+1	+1	-1	48,78
12	-1	-1	+1	-1	46,22
13	+1	+1	-1	-1	51,25
14	+1	-1	-1	-1	49,88
15	-1	+1	-1	-1	50,54
16	-1	-1	-1	-1	46,03

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии.

$$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{796,3}{16} = 49,77 \quad (4.1)$$

$$b_1 = \frac{\sum y \cdot X_1}{n} = \frac{20,72}{16} = 1,295 \quad (4.2)$$

$$b_2 = 1,026, \quad b_3 = 0,113, \quad b_4 = 0,44$$

Все коэффициенты в уравнениях регрессии имеют положительное значение, из чего следует, что все выбранные нами факторы влияют на синтез и степень их влияния прямо пропорциональна значению коэффициентов.

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

$$y = 49,77 + 1,295x_1 + 1,026x_2 + 0,113x_3 + 0,440x_4 \quad (4.3)$$

Далее, согласно матрице эксперимента, по результатам опытов в условиях основного уровня, отраженных в таблице 4.1, 4.2 и 4.3, проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнений, вначале проанализировав дисперсию.

Таблица 4.3 – Результаты опытов, проведенных в условиях основного уровня факторов

y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$	$\sum y = 300,36$ $n=6$ $\bar{y} = \frac{\sum y}{n} = 49,92$ $\sum (y - \bar{y})^2 = 0,674$
49,83	-0,23	0,0529	
49,78	-0,28	0,0784	
50,12	0,06	0,0036	
49,32	-0,74	0,5476	
50,39	1,17	1,3689	
50,08	0,02	0,0004	

$$S_y^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1} = 0,135 \quad (4.4)$$

Затем среднюю квадратичную погрешность:

$$S_{bi} = \sqrt{\frac{S_y^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0,135}{5}} = \sqrt{0,027} = 0,1642 \quad (4.5)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [11]:

$$t_0 = \frac{b_0}{S_{bi}} = \frac{49,77}{0,1642} = 303,1 \quad (4.6)$$

$$t_1 = 7,89; \quad t_2 = 6,25; \quad t_3 = 0,69; \quad t_4 = 2,68$$

Коэффициент Стьюдента для третьего (t_3) фактора меньше табличного значения, что свидетельствует о несущественном влиянии количества биокатализатора на выход продукта синтеза в рассматриваемом интервале, а значит, его количество можно было бы уменьшить. Однако для многократного использования биокатализатора необходимо использовать избыточное количество, что позволяет уменьшить его постепенную деградацию.

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывают температура (t_1) и время реакции (t_2), при этом необходимо учитывать, что при температуре выше 60 °С происходит деградация биокатализатора, поэтому необходимо учитывать баланс между выходом продукта и длительностью использования биокатализатора.

Таким образом, после математического моделирования процесса ацилирования была установлена количественная взаимосвязь влияния факторов. Установлено, 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 значимо 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.

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

$$y=49,77+1,295x_1+1,026x_2+0,440x_4 \quad (4.7)$$

Для проверки адекватности математической модели в окончательное уравнение регрессии подставляли данные таблицы и рассчитывали теоретические значения. Расчет теоретического значения по получению дибензоата астаксантина (соединение С.1) представлен в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Значения экспериментального и рассчитанного выхода дибензоата астаксантина (соединение С.1) по окончательному уравнению регрессии

№ опыта	Пример определения расчетного содержания ($U_{\text{расчетное}}$): $y_1=49,77+1,295(+1)+1,026(+1)+0,440(+1)=52,53$		
	$U_{\text{экспериментальное}}$	$U_{\text{расчетное}}$	$(y_{\text{э}} - y_{\text{р}})^2$
1	2	3	4
1.	52,12	52,53	0,168
2.	51,11	50,48	0,397
3.	50,34	49,94	0,160
4.	48,55	47,89	0,436
5.	52,05	52,53	0,230
6.	50,17	50,48	0,096
7.	49,24	49,94	0,490
8.	48,09	47,89	0,040

Продолжение таблицы 4.4

1	2	3	4
9.	52,04	51,65	0,152
10.	49,89	49,60	0,084
11.	48,78	49,06	0,078
12.	46,22	47,00	0,608
13.	51,25	51,65	0,160
14.	49,88	49,60	0,078
15.	50,54	49,06	2,190
16.	46,03	47,00	0,941

По полученным данным определяли сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности, где k -число факторов:

$$S_R = \sum (y_3 - y_p)^2 = 6,31 \quad (4.8)$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N-(k+1)} = \frac{6,31}{16-5} = 0,57 \quad (4.9)$$

После этого рассчитывали значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{0,57}{0,41} = 1,39 \quad (4.10)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 1,39, что не превышает табличного значения этого показателя – $F_{0,95}(15,5) = 2,90$ [11], а значит, разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса синтеза, параметром при этом служил выход целевого продукта в процентах от максимального расчетного значения. Для этого использовали метод крутого восхождения, результаты которого представлены в таблице 4.5. 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. Результаты поиска оптимальных условий синтеза методом крутого восхождения представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Определение оптимальных параметров синтеза методом крутого восхождения

Характеристика	X ₁ , °С	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

В результате поиска оптимальных значений в третьем опыте был достигнут максимальный выход продукта синтеза 64,93 % при температуре 60 °С, времени реакции 4,5 ч, количества биокатализатора 0,5 г и скорости перемешивания 55 об/мин. Дальнейшее увеличение параметров не приводит к увеличению выхода продукта, что, скорее всего, связано с особенностью свойств биокатализатора, снижением его эффективности при температуре выше 60 °С, о чем свидетельствуют результаты опыта 4.

Путем построения математической модели и поиска оптимальных условий методом крутого восхождения удалось повысить выход целевого

продукта с 50 % до 65 %, 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 соблюдается температурный режим при 60 °С, в течение 4,5 ч, со скоростью перемешивания – 55 об/мин и в присутствии 0,5 г биокатализатора Новозим 435. Эти условия далее использовали при синтезе сложных эфиров ксантофиллов.

4.3 Синтез и установление структуры сложных эфиров производных ксантофиллов

4.3.1 Энзимный синтез эфиров астаксантина, лютеина, зеаксантина

Проведя экспериментальный и теоретический выбор условий реакции этерификации астаксантина, лютеина и зеаксантина (Разделы 4.1, 4.2), ацилирующих кислот-кандидатов (Глава 3), далее осуществляли этерификацию выбранных ксантофиллов с семью кислотами. Синтез проводили в оптимизированных условиях по методике, представленной в Главе 2. Общая схема получения сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина представлена на рисунке 4.6.

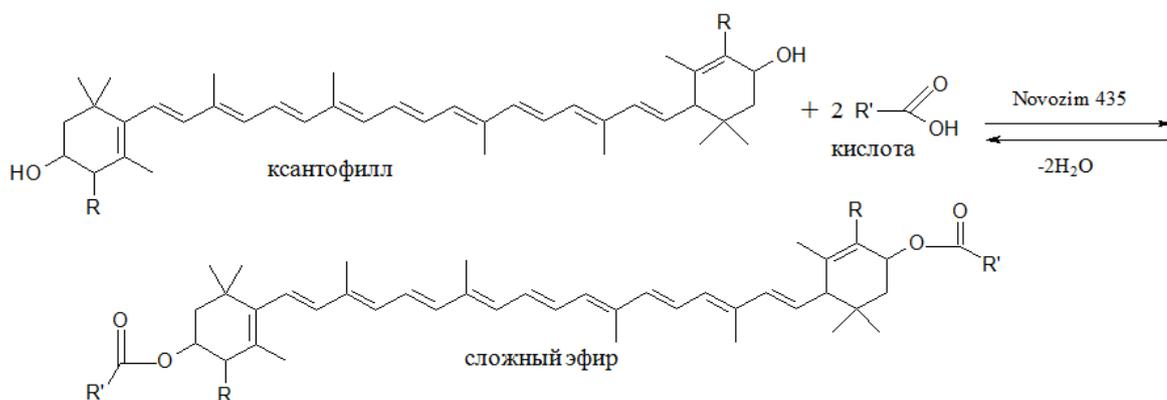


Рисунок 4.6 – Общая схема синтеза сложных эфиров ксантофиллов

Процесс синтеза контролировали методом ВЭЖХ в условиях, приведенных в Главе 2, с учетом изменения качественного и количественного состава реакционной смеси. Анализировали пробы из реакционной смеси до начала и по окончании синтеза, после очистки на колонке, а также целевые продукты реакции. Ниже показаны типовые хроматограммы на примере синтеза дибензоатов астаксантина (соединение С.1), лютеина (соединение С.8) и зеаксантина (Соединение С.15) (Рисунки 4.7 – 4.16).

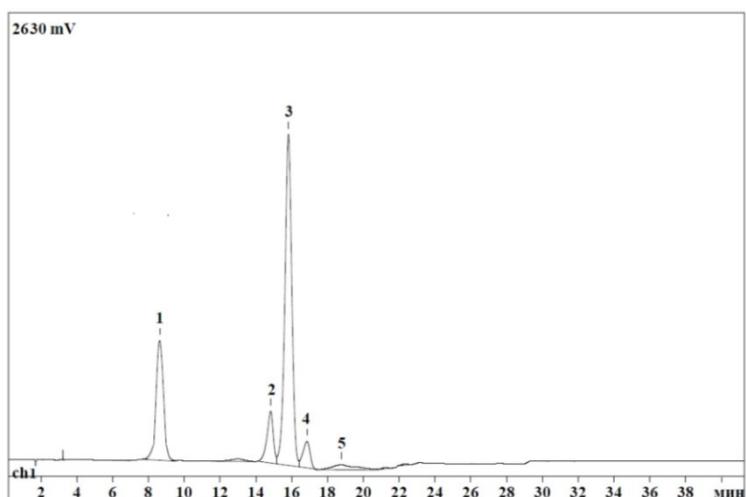


Рисунок 4.7 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза дибензоата астаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пики 2, 4, 5 – изомеры астаксантина, пик 3 – астаксантин

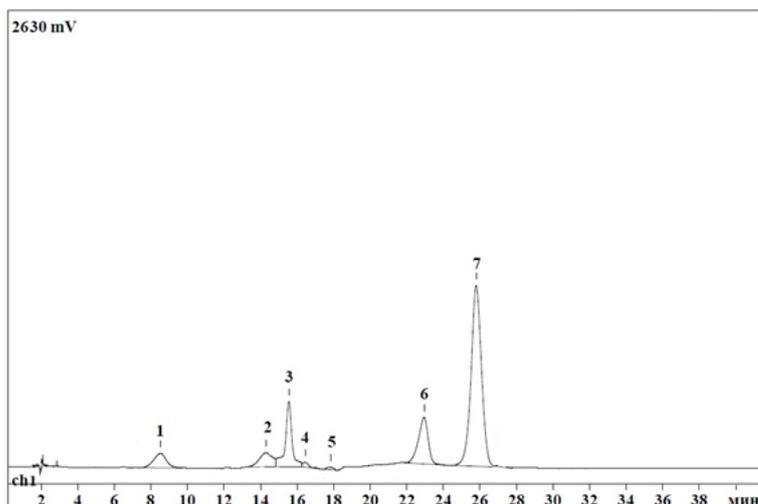


Рисунок 4.8 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза дибензоата астаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пики 2, 4, 5 – изомеры астаксантина, пик 3 – астаксантин, пик 6 – монобензоат астаксантина, пик 7 – дибензоат астаксантина

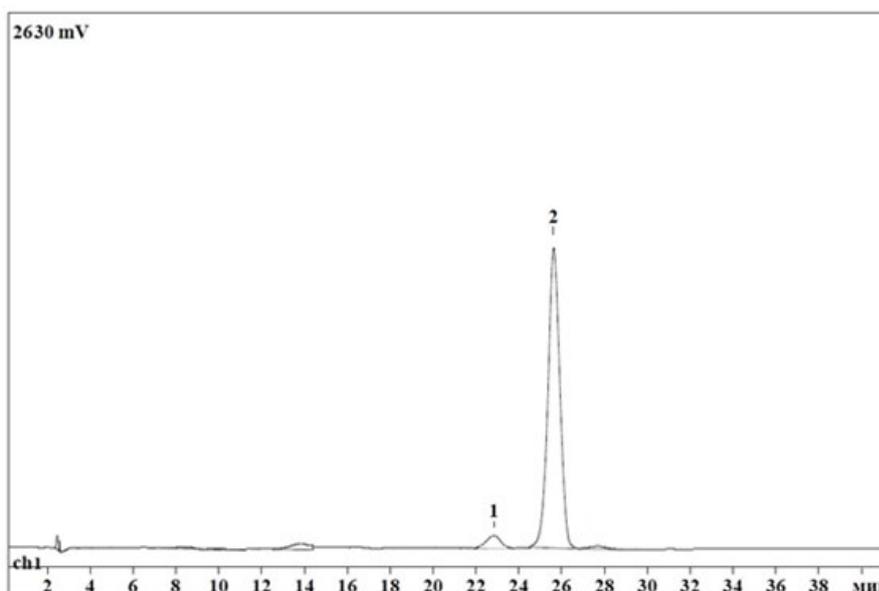


Рисунок 4.9 – Хроматограмма дибензоата астаксантина после очистки на колонке: пик 1 – монобензоат астаксантина, пик 2 – дибензоат астаксантина (соединение С.1)

Чистота полученного соединения С.1 по разработанной методике составила 92,4 %.

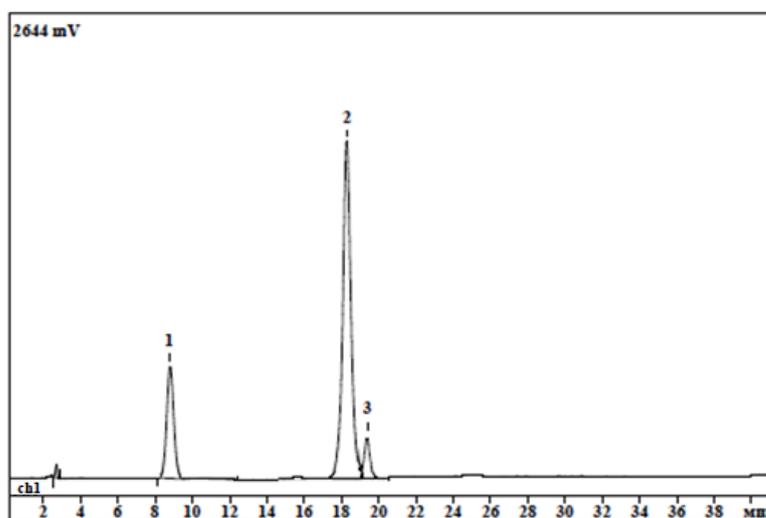


Рисунок 4.10 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза дибензоата лютеина: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – лютеин, пик 3 – изомер лютеина

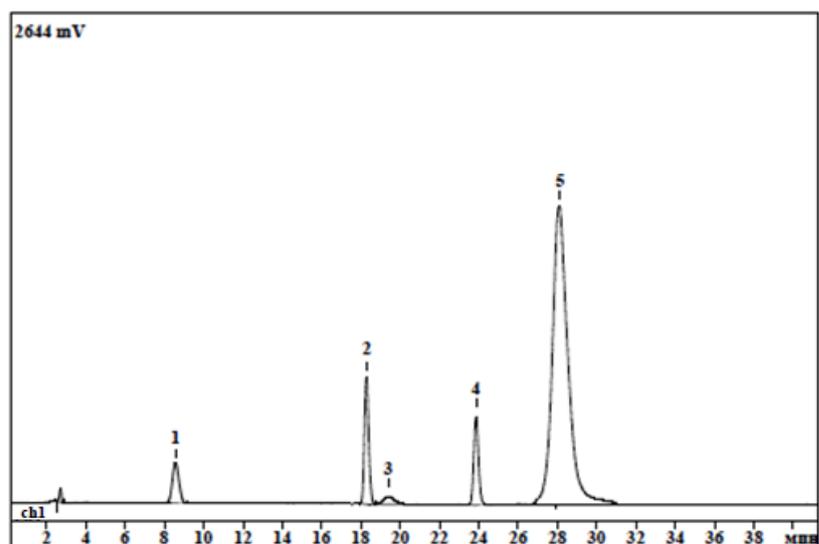


Рисунок 4.11 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза дибензоата лютеина: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – лютеин, пик 3 – изомер лютеина, пик 4 – монобензоат лютеина, пик 5 – дибензоат лютеина

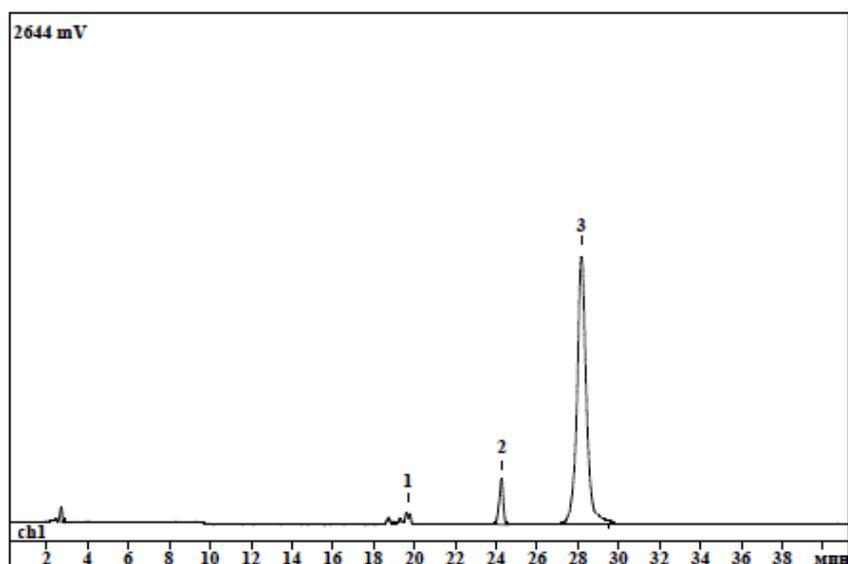


Рисунок 4.12 – Хроматограмма дибензоата лютеина после очистки на колонке: пик 1 – лютеин, пик 2 – монобензоат лютеина, пик 3 – дибензоат лютеина (соединение С.8)

Чистота полученного соединения С.8 составила 90,3 %.

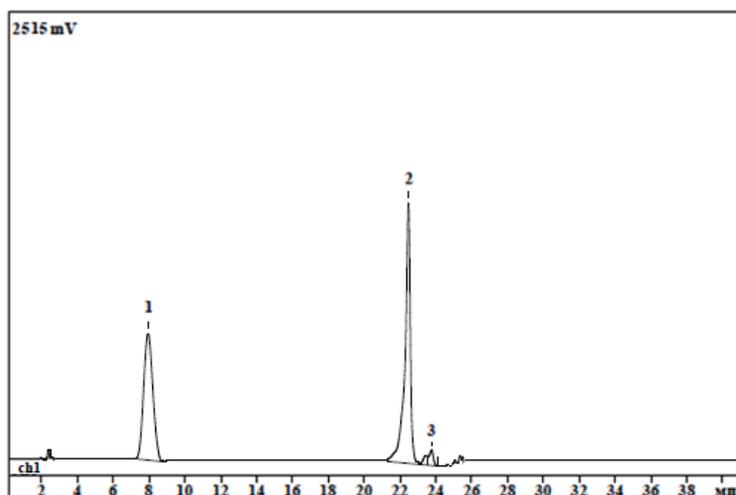


Рисунок 4.13 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза дибензоата зеаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – зеаксантин, пик 3 – изомер зеаксантина

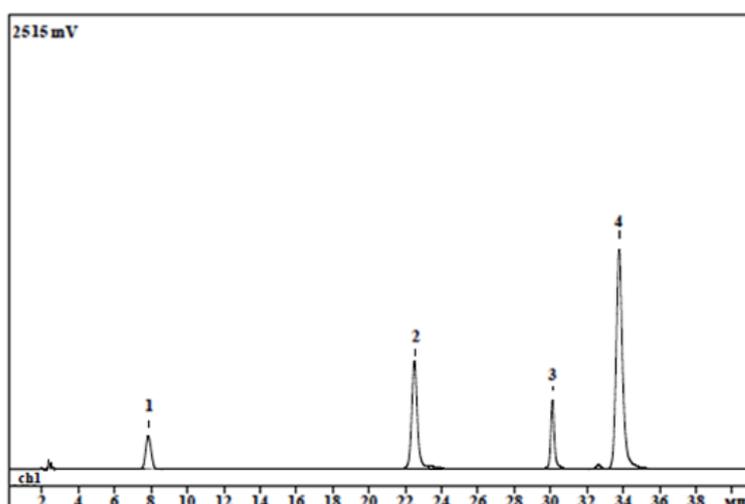


Рисунок 4.14 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза дибензоат зеаксантина: пик 1 – бензойная кислота, пик 2 – зеаксантин, пик 3 – монобензоат зеаксантина, пик 4 – дибензоат зеаксантина

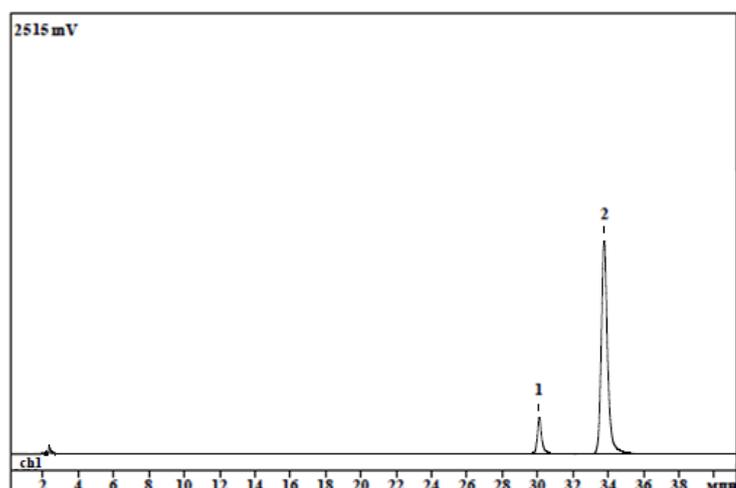
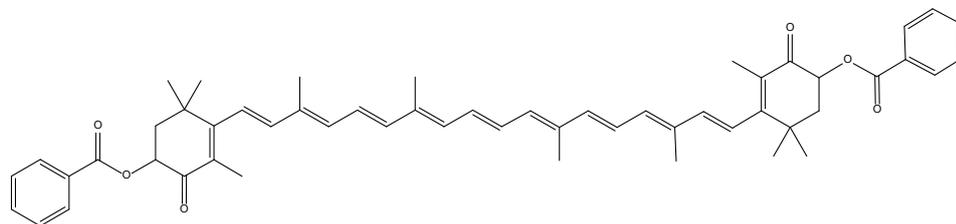


Рисунок 4.15 – Хроматограмма дибензоата зеаксантина после очистки на колонке: пик 1 – монобензоат зеаксантина, пик 2 – дибензоат зеаксантина (соединение С.15)

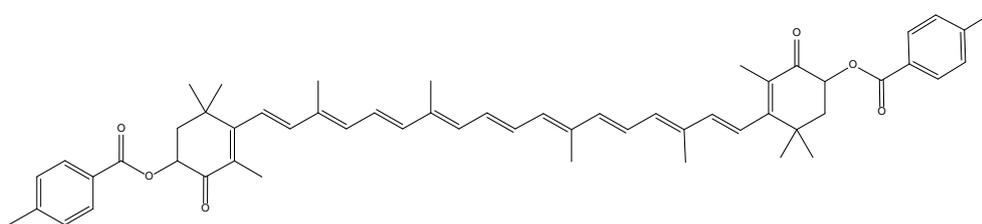
Чистота соединения С.15 составила 91,4 %. Для остальных целевых соединений чистота составила более 90 %.

На рисунке 4.16 приведены формулы и практический выход для синтезированных сложных эфиров астаксантина.



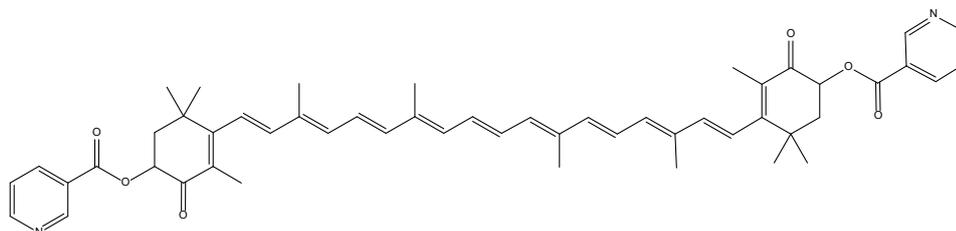
β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1);

выход 0,94 г (58,4 %)

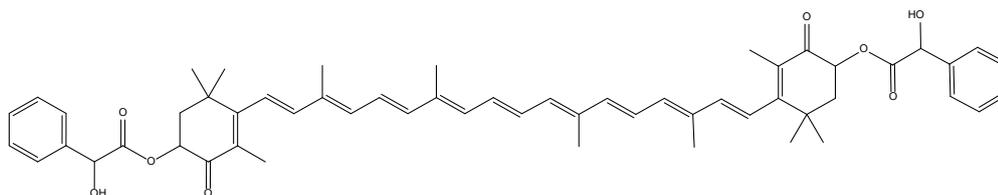


β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2);

выход 0,96 г (57,7 %)

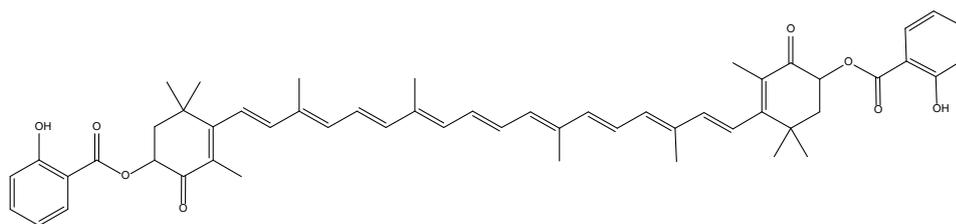


**β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат)
(соединение С.3);** выход 0,93 г (57,7 %)



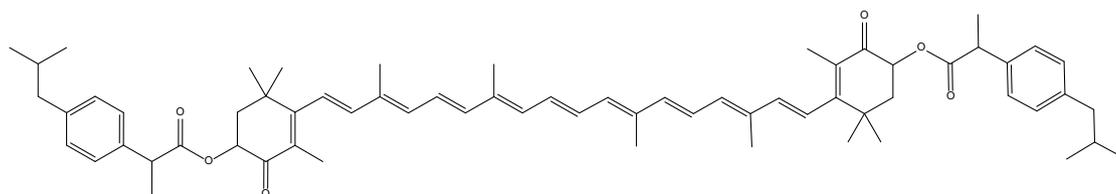
β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4);

выход 0,95 г (54,9 %)

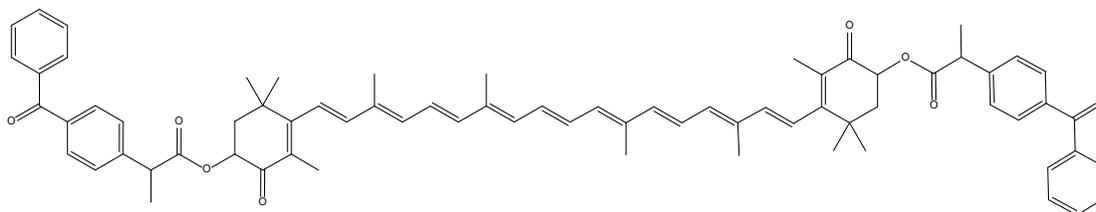


β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5);

выход 0,94 г (56,2 %)



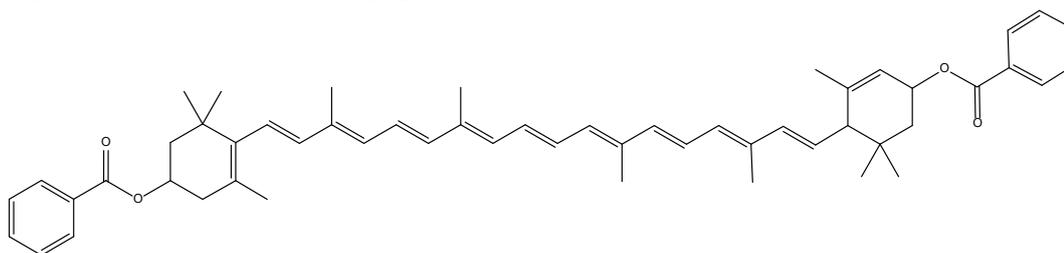
β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат
(соединение С.6); выход 1,11 г (57,1 %)



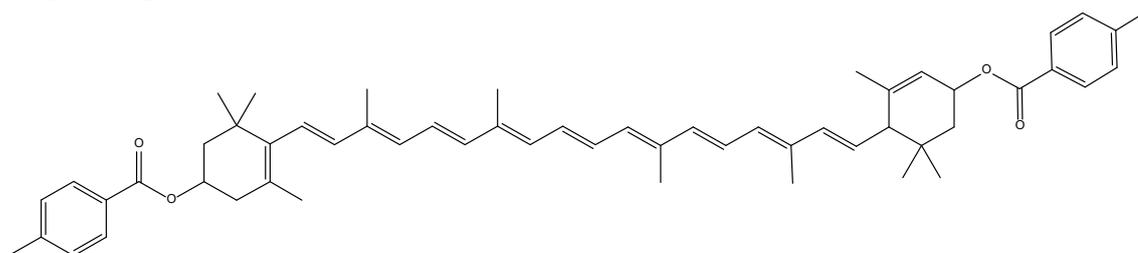
β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат)
(соединение С.7); выход 1,16 г (54,3 %)

Рисунок 4.16 – Формулы синтезированных сложных эфиров астаксантина с указанием выхода продукта реакции

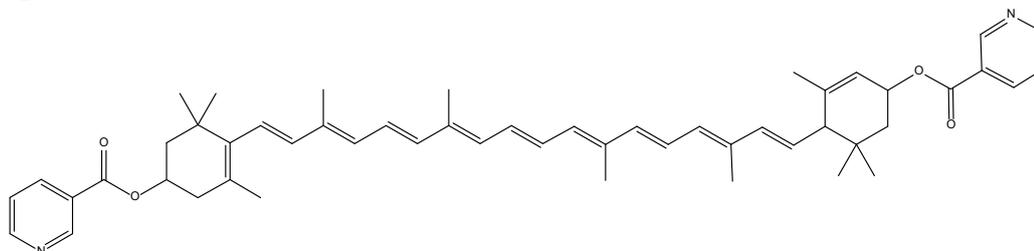
На рисунке 4.17 приведены формулы и практический выход для синтезированных сложных эфиров лютеина.



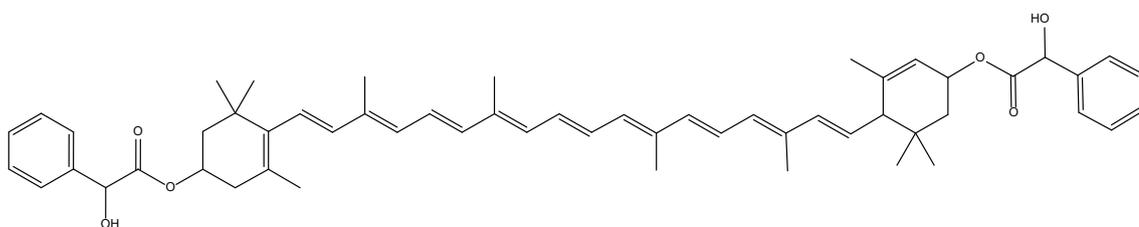
β,ϵ -каротин-3,3'-диденди(3,3'-добензоат) (соединение С.8); выход 0,95 г (61,1 %)



β,ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9); выход 0,97 г (60,2 %)

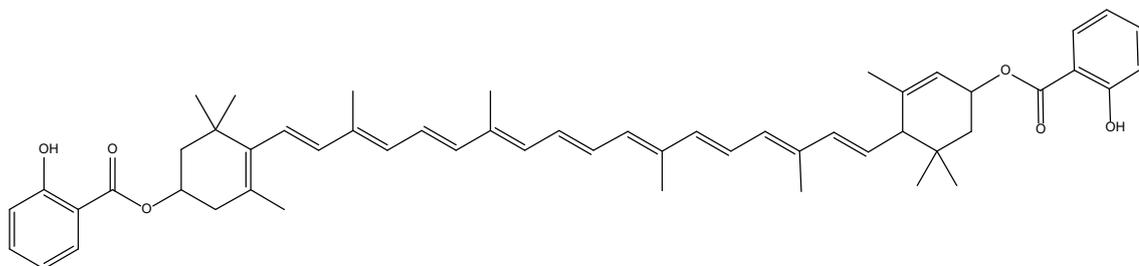


β,ϵ -каротин-3,3'-диденди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10);
выход 0,92 г (59,0 %)



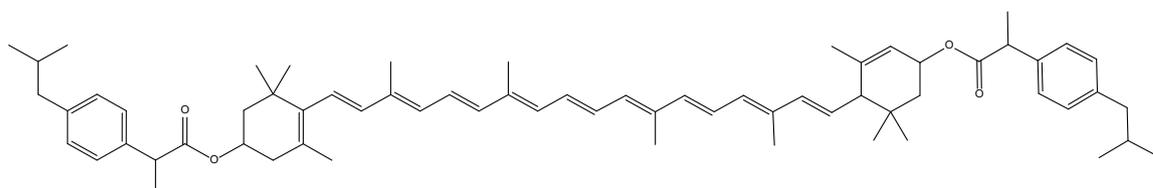
β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11);

выход 0,97 г (57,9 %)



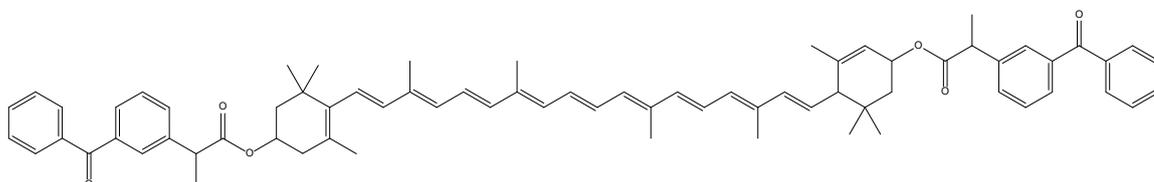
β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12);

выход 1,11 г (68,6 %)



β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13);

выход 1,22 г (64,5 %)

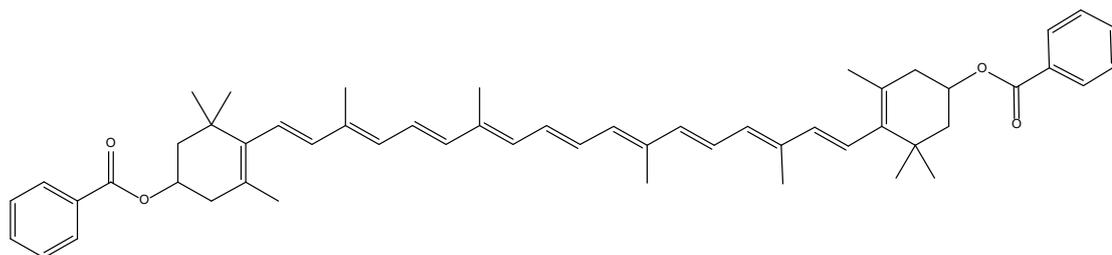


β,ϵ -каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14);

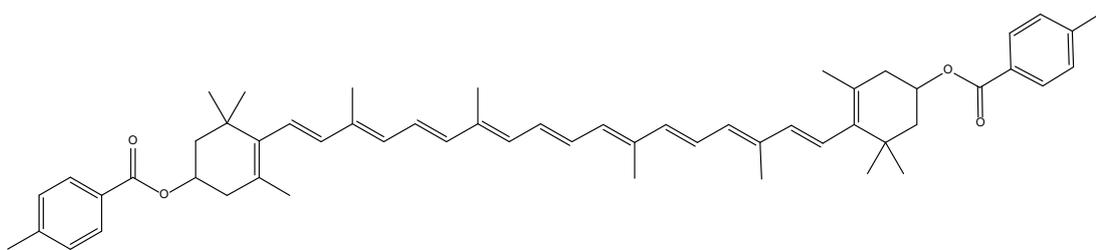
выход 1,15 г (55,2 %)

Рисунок 4.17 – Формулы синтезированных сложных эфиров лютеина с указанием выхода продукта реакции

На рисунке 4.18 приведены формулы и практический выход для синтезированных сложных эфиров зеаксантина.

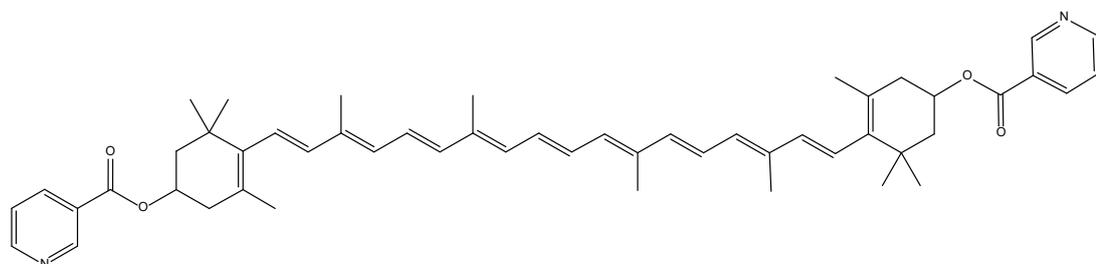


β,β -Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15); выход 1.01 г (64,9 %)



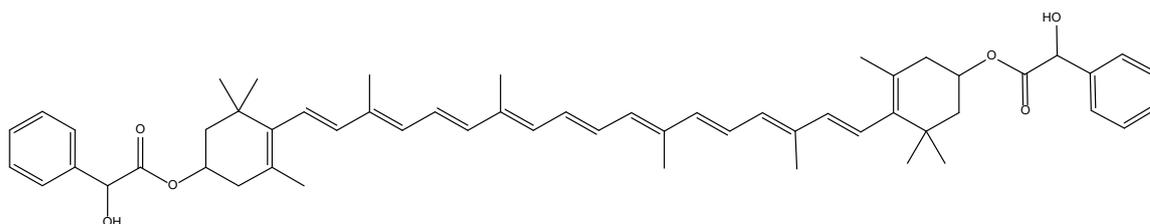
β,β -Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16);

выход 0.99 г (61,5 %)



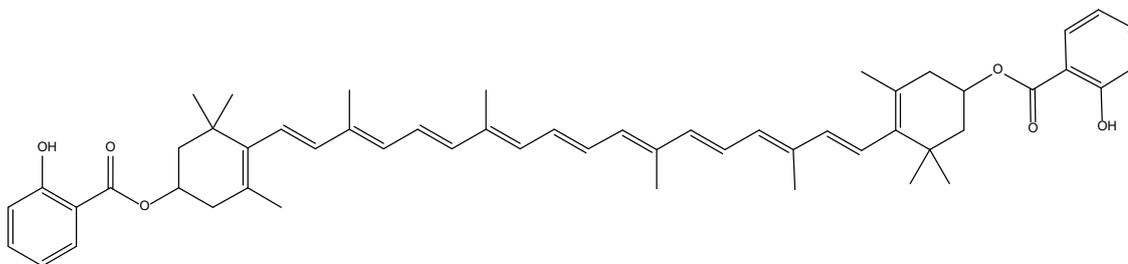
β,β -Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17);

выход 0.99 г (63,5 %)



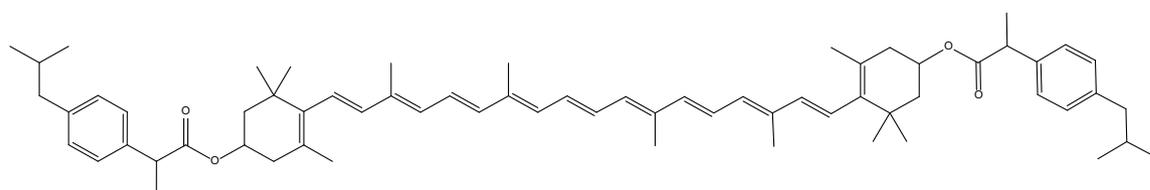
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноат) (соединение С.18);

выход 1.01 г (60,3 %)



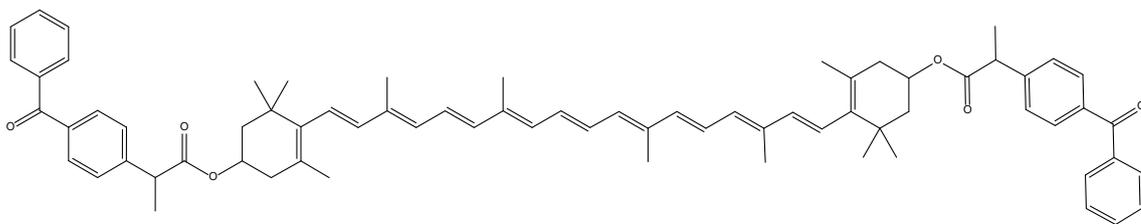
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19);

выход 1,08 г (66,7 %)



β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат)

(соединение С.20); выход 1.18 г (62,4 %)



β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат)
(соединение С.21); выход 1.14 г (54,7 %)

Рисунок 4.18 – Формулы синтезированных сложных эфиров зеаксантина с указанием выхода продукта реакции

Далее для всех синтезированных сложных эфиров была определена температура плавления в соответствии с ГФ XV [1]. С помощью этой физической константы в большинстве случаев нельзя однозначно подтвердить структуру соединений, но изменение температуры плавления может свидетельствовать об изменениях структуры целевого продукта в процессе синтеза.

Приводимые значения температур плавления исходных соединений – это среднее из трех определений: для астаксантина составила 215 °С, лютеина – 196 °С, зеаксантина – 215 °С, бензойной кислоты – 122 °С, 4-метилбензойной кислоты – 182 °С, никотиновой кислоты – 237 °С, фенилгликолевой кислоты – 120 °С, 2-гидроксibenзойной кислоты (салициловой кислоты) – 159 °С, ибупрофена – 76 °С, кетопрофена – 94 °С.

Далее для всех синтезированных и исходных соединений температуры плавления были определены в тех же условиях (Таблица 4.6).

Таблице 4.6 – Значение температуры плавления исходных ксантофиллов и синтезированных сложных эфиров ксантофиллов

Синтезированное соединение	Экспериментально определенные температуры плавления, °С
1	2
β, β -каротин-4,4'-дион-3,3' (астаксантин)	216

1	2
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1)	153
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2)	149
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди (пиридин-3- карбоксилат) (соединение С.3)	156
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4)	144
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5)	142
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)- пропионат (соединение С.6)	140
β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3- бензоилфенил)пропионат) (соединение С.7)	138
β , ϵ -каротин-3,3' (лютеин)	196
β , ϵ -каротин-3,3'-добензоат (соединение С.8)	165
β , ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9)	162
β , ϵ -каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10)	171
β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11)	157
β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12)	156
β , ϵ -каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13)	154
β , ϵ -каротин-3,3'-диилди(2-(3- бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14)	151
β , β -Каротин-3,3' (зеаксантин)	215
β , β -Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15)	181
β , β -Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16)	178

1	2
β,β -Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17)	186
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтанوات) (соединение С.18)	172
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19)	171
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)- пропионат) (соединение С.20)	168
β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(3- бензоилфенил)пропионат) (соединение С.21)	166

Таким образом, получен 21 новый полусинтетический сложный эфир астаксантина, лютеина и зеаксантина с семью модельными кислотами. Чистота полученных соединений, определенная методом ВЭЖХ, составила более 90%. На примере салициловой, никотиновой кислот, ибупрофена и кетопрофена показана принципиальная возможность получения сложных эфиров ксантофиллов и ЛВ.

Далее структуры синтезированных новых сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина устанавливали методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии.

4.3.2 Доказательство структуры сложных эфиров ксантофиллов методом ЯМР

В данном разделе представлены некоторые особенности, выявленные в процессе идентификации сложных эфиров ксантофиллов ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопией.

При разработке методик синтеза с использованием биокатализаторов на первых этапах наблюдается незначительный выход конечного продукта

из-за малых количеств исходных веществ и не оптимизированных условий синтеза. В таких условиях ЯМР анализу особенно мешают сигналы примесей, которые могут перекрывать важные пики определяемого образца. Эти примеси чаще всего накапливаются за счет остаточных количеств таких растворителей, как *n*-гексан, хлороформ, ацетон и т. д., ранее использованных при получении самого каротиноида. Как правило, при получении каротиноидов применяют *n*-гексан, сигналы которого наблюдаются при 0,89, 1,27 и 1,29 в ЯМР ^1H и 14,2, 22,9 и 31,8 в ЯМР ^{13}C спектрах. Наличие следовых количеств воды в исследуемых образцах приводит к появлению еще одного, часто мешающего для идентификации метильной группы сигнала около 1,55 ppm. Поскольку сигнал протонной воды сильно зависит от температуры, т. е. его можно легко сместить за счет повышения температуры образца на несколько градусов для выявления скрытых сигналов.

В малых образцах очень высокое влияние на протон в гидроксильных группах (ОН) оказывает наличие примесей кислот, в некоторых случаях это может приводить к уширению или слиянию полос. Для предотвращения этого явления мы использовали хорошо известный прием фильтрации образцов через небольшой слой алюминия оксида. Присутствие кислорода воздуха также является проблемой для небольших количеств образца и поэтому предварительно через пробы пропускали аргон в течение 3 мин, что позволило существенно уменьшить это влияние.

Поскольку ядро ^{13}C имеет меньшее гиромагнитное отношение по сравнению с ^1H , то на практике это приводит к тому, что чувствительность снижается до 500 раз, поэтому необходимо использовать большее количество образца и более длительно проводить измерения.

Помимо ^1H и ^{13}C спектров для синтезированных нами соединений характерно наличие атома кислорода, и поэтому для них в принципе возможно получение ЯМР ^{17}O спектров. Однако детектированию такого спектра сильно препятствуют два фактора. Во-первых, естественное

содержание ^{17}O очень низкое – всего около 0,037 %, а во-вторых, он имеет ядерный квадрупольный момент, который вместе с сильными градиентами электрического поля в ковалентных связях приводит к сильному уширению сигналов. На практике чувствительность ЯМР ^{17}O примерно в 100 раз ниже ЯМР ^{13}C .

Таким образом, наиболее чувствительными и информативными для рассматриваемых нами соединений являются ЯМР ^1H спектры, а для получения дополнительной информации, подтверждающей структуру, могут быть использованы ^{13}C и ^{17}O ЯМР спектры.

Идентификация впервые синтезированных сложных эфиров ксантофиллов методом ^1H ЯМР позволяет получать информацию о длинах связей и геометрии молекулы, что особенно важно при установлении структуры соединений, имеющих большое количество пространственных изомеров, каждый из которых характеризуется присущей ему биологической активностью. Необходимо учитывать, что надежность и точность получаемых результатов сильно зависит от чистоты определяемых образцов, поэтому на подготовительных этапах работы следует проводить очистку и контролировать чистоту таким хроматографическим методом, как ВЭЖХ с высокоэффективными и селективными колонками. В нашем случае мы использовали обращенно-фазные колонки С30, позволяющие разделять изомеры каротиноидов и их производных.

Сигналы родственных соединений хорошо коррелируют между собой. В эксперименте нами использован растворитель – дейтеродиметилсульфоксид, поскольку при использовании других растворителей для приготовления испытуемых растворов возможны отклонения в сигналах.

4.3.2.1 Идентификация сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина методом ^1H ЯМР

ЯМР ^1H спектры синтезированных соединений С.1 – С.21 регистрировали в условиях, описанных в Главе 2. Типичный ЯМР ^1H спектр приведен на рисунке 4.10. Спектр ЯМР ^1H β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-дibenзоата (соединение С.1) представлен на рисунке 4.19.

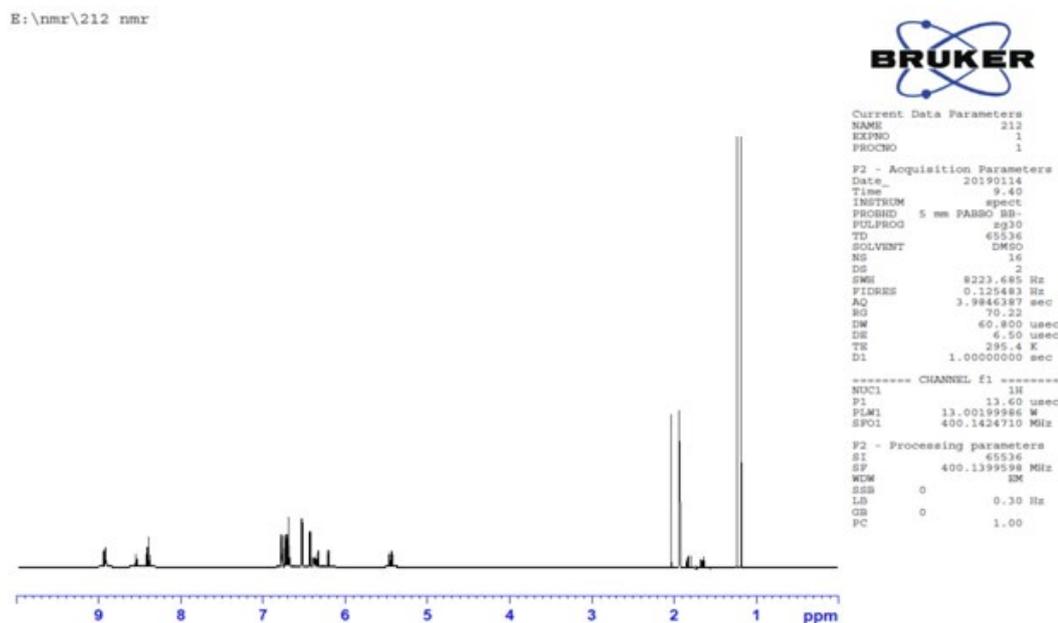


Рисунок 4.19 – ^1H ЯМР спектр дибензоат астаксантина (соединение С.1)

В структуре синтезированных соединений можно выделить четыре характерных фрагмента – это полиеновая цепь, метильные группы, концевая циклогесеновая группа каротиноида и введенный в структуру ацильный остаток (Рисунки 4.20 – 4.32).

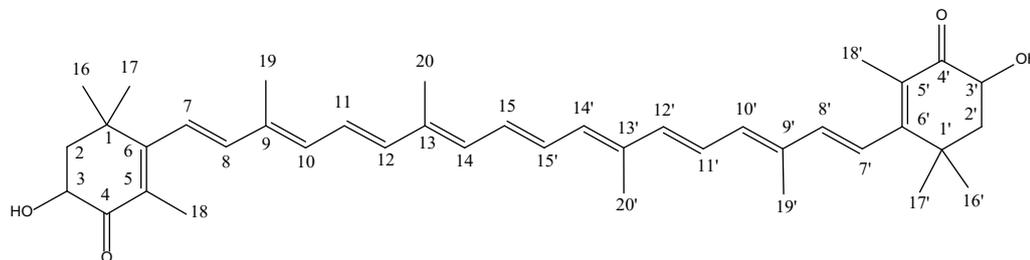


Рисунок 4.20 – Структурная формула астаксантина

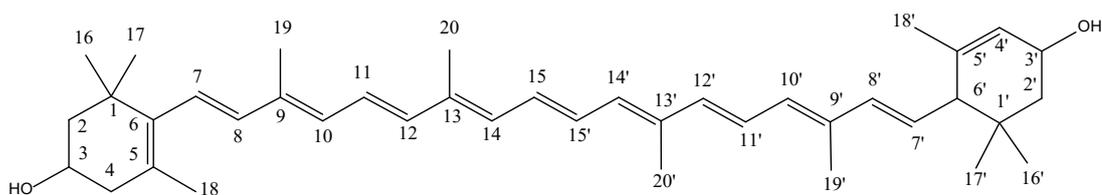


Рисунок 4.21 – Структурная формула лютеина

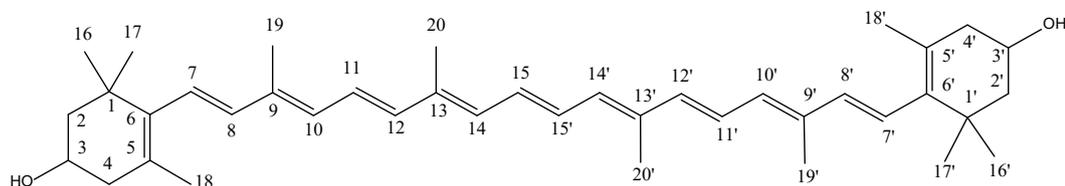
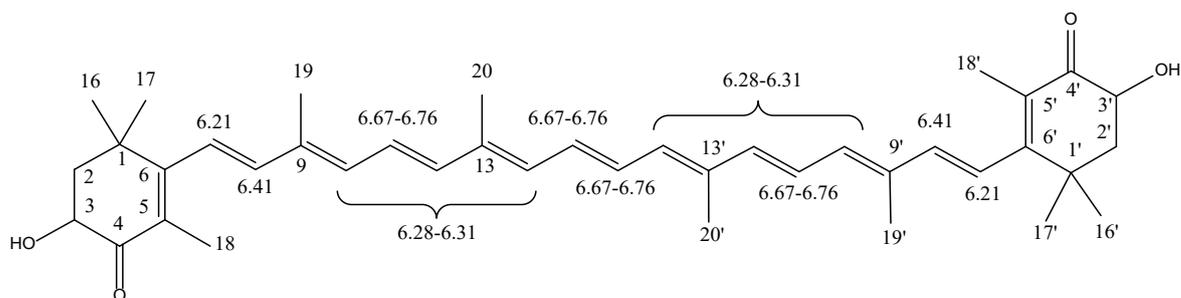
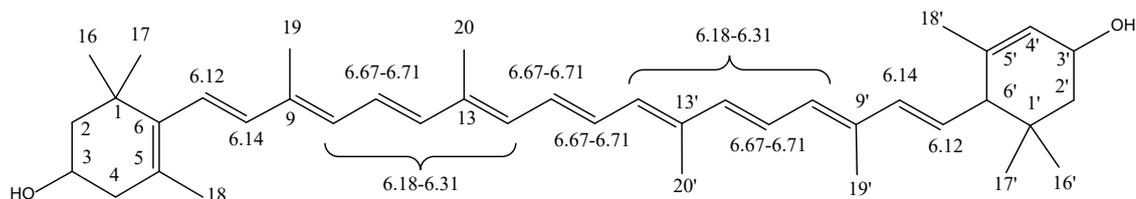


Рисунок 4.22 – Структурная формула зеаксантина

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.

На рисунках 4.23 – 4.25 представлены характерные сигналы полиеновой цепи ^1H ЯМР спектра астаксантина, лютеина и зеаксантина, соответственно.

Рисунок 4.23 – Сигналы полиеновой цепи ^1H ЯМР спектра астаксантинаРисунок 4.24 – Сигналы полиеновой цепи ^1H ЯМР спектра лютеина

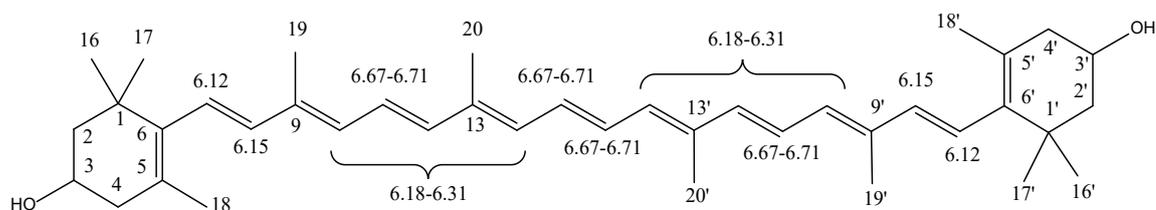


Рисунок 4.25 – Сигналы полиеновой цепи ^1H ЯМР спектра зеаксантина

Для полиеновой структуры ксантофиллов характерны следующие сигналы: 6,12-6,21 для двух протонов в положениях C7 и C7'; 6,14-6,41 – в положениях у C8 и C8': мультиплет 6,18-6,31 для шести протонов при C10, C10', C12, C12', C14, C14' и мультиплет 6,67-6,76 для четырех протонов у C11, C11', C15, C15' атомов.

На рисунках 4.26 – 4.28 представлены характерные сигналы метильных групп ^1H ЯМР спектров астаксантина, лютеина и зеаксантина, соответственно.

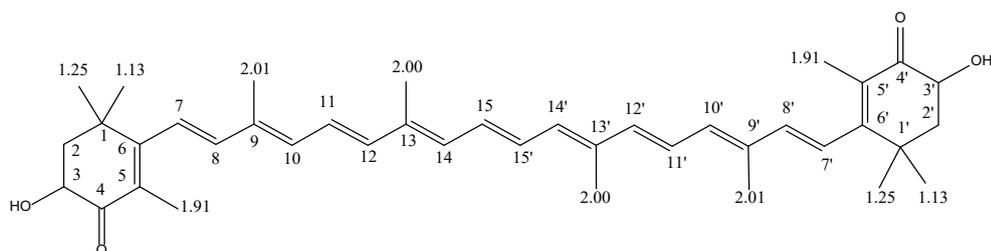


Рисунок 4.26 – Сигналы метильных групп ^1H ЯМР спектра астаксантина

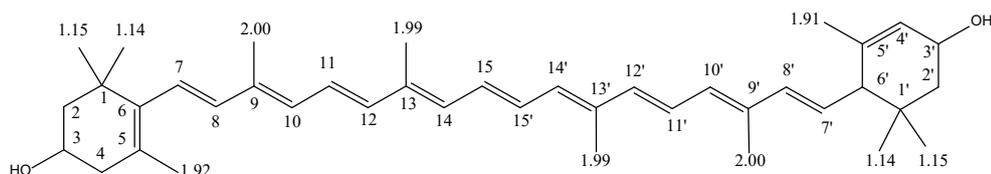


Рисунок 4.27 – Сигналы метильных групп ^1H ЯМР спектра лютеина

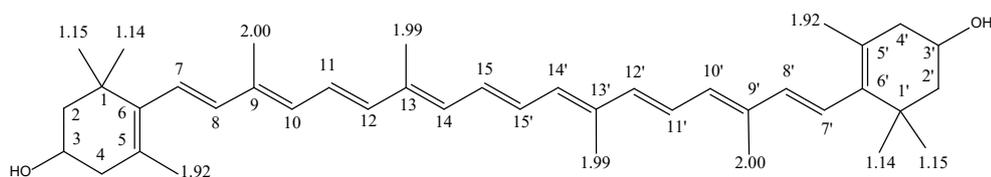


Рисунок 4.28 – Сигналы метильных групп ^1H ЯМР спектра зеаксантина

Заместители в положениях C1 и C1', а именно метильные группы, имеют сильные характерные сигналы при C17, C17' – 1,13-1,25, C16, C16' – 1,13-1,25, в положениях C5 и C5' сигнал протонов 1,91-1,92 для C18 и C18'; в

положении C13 и C13' – 1,99-2,00 (C20 и C20'), положениях C9 и C9' – 2,00-2,01 для протонов при C19 и C19'.

На рисунке 4.29 представлены характерные сигналы концевых групп ^1H ЯМР спектра астаксантина.

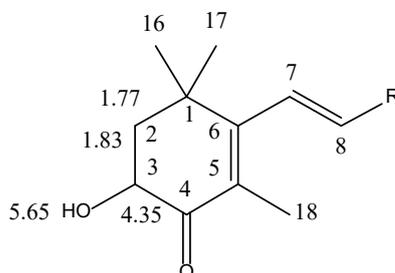


Рисунок 4.29 – Диаграммы сигналов концевых групп ^1H ЯМР спектра астаксантина

Для сигналов концевых циклогексановых групп можно выделить два сигнала протонов в положениях C2 и C2', расположенных по разные стороны плоскости молекулы 1,77eq и 1,83ax, сигнал протона в положениях C3 и C3' – 4,35 и сигнал 5,65, характерный для протонов гидроксильных групп в положениях C3 и C3'.

Концевые группы лютеина отличаются по расположению двойной связи, поэтому наблюдаются отличия и в сигналах (Рисунок 4.30).

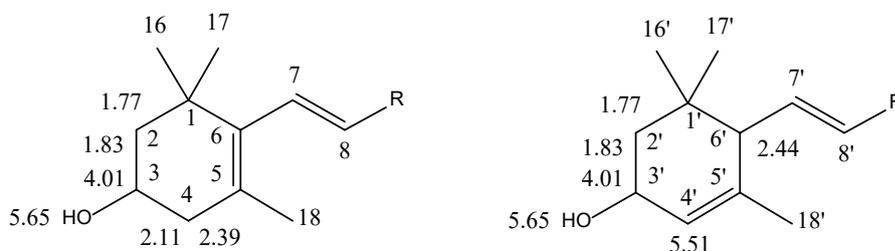


Рисунок 4.30 – Диаграммы сигналов концевых групп ^1H ЯМР спектра лютеина

Зеаксантин, в отличие от лютеина, имеет симметричную структуру концевых групп, главное отличие от лютеина – это отсутствие полосы 2,44, характерной для водорода в положении C6'. На рисунке 4.31 представлены сигналы, присущие концевым группам ^1H ЯМР спектра зеаксантина.

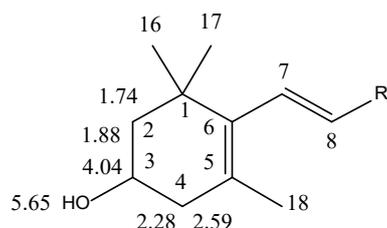


Рисунок 4.31 – Диаграммы сигналов концевых групп ^{13}C ЯМР спектра зеаксантина

Кислоты, введенные в структуру для получения сложных эфиров, также имеют характерные сигналы. На рисунке 4.32 представлены характерные сигналы радикалов на ^{13}C ЯМР спектрах сложных эфиров ксантофиллов.

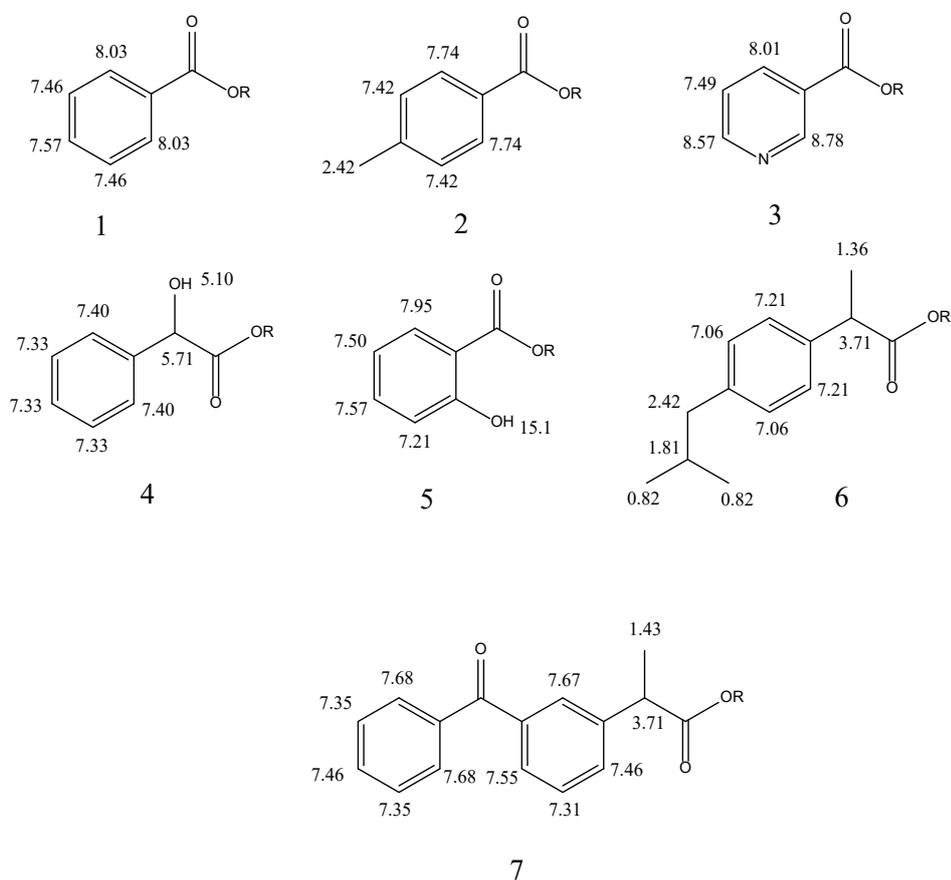


Рисунок 4.32 – Диаграммы сигналов ацильных радикалов ^{13}C ЯМР спектра сложных эфиров

При образовании сложноэфирной связи наблюдаются изменения сигналов в ближайших атомах, так, в бензойной кислоте сигналы водородов в метаположении 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.

Ниже приведены числовые результаты измерения ^1H ЯМР спектров каротиноидов, кислот и синтезированных сложных эфиров производных каротиноидов – соединения С.1– С.21:

Астаксантин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1,13 с (6H, Me $^{17,17'}$), 1,25 с (6H, Me $^{16,16'}$), 1,39 т (2H eq, H $^{2,2'}$, $J = 13$), 1,61 т (2H ax, H $^{2,2'}$, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me $^{18,18'}$), 2,00 с (6H, Me $^{13,13'}$), 2,01 с (6H, Me $^{9,9'}$), 4,35 м (2H, H $^{3,3'}$), 6,21 д (2H, H $^{7,7'}$, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H $^{10,10', 12,12',14,14'}$), 6,41 д (2H, H $^{8,8'}$, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H $^{11,11',15,15'}$).

Лютеин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1,14 с (6H, Me $^{16,16'}$), 1,15 с (6H, Me $^{17,17'}$), 1,61 дд (2H, H $^{2,2'}$, $J=14$), 1,74 дд (2H, H $^{2,2'}$, $J=14$), 1,91 с (3H, Me 5), 1,92 с (3H, Me 5), 1,99 с (6H, Me $^{13,13'}$), 2,00 с (6H, Me $^{9,9'}$), 2,04 м (1H, H 4 , $J=17$), 2,23 т (1H, H 4), 2,44 д (1H, H 6 , $J=8$), 3,32 м (2H, H $^{3,3'}$), 5,51 с (1H, H 4), 6,12 с (2H, H $^{7,7'}$), 6,14 с (2H, H $^{8,8'}$), 6,18 м (2H, H $^{10,10'}$), 6,27 м (2H, H $^{14,14'}$), 6,31 д (2H, H $^{12,12'}$, $J=15$), 6,67-6,71 м (4H, H $^{11,11',15,15'}$).

Зеаксантин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 1,14 с (6H, Me $^{16,16'}$), 1,15 с (6H, Me $^{17,17'}$), 1,61 дд (2H, H $^{2,2'}$, $J=14$), 1,74 с (6H, Me $^{5,5'}$), 1,99 с (6H, Me $^{13,13'}$), 2,00 с (6H, Me $^{9,9'}$), 2,03 м (1H, H 4 , $J=17$), 2,24 т (1H, H 4), 4,04 м (2H, H $^{3,3'}$), 5,51 с (1H, H 4), 6,12 с (2H, H $^{7,7'}$), 6,15 с (2H, H $^{8,8'}$), 6,18 м (2H, H $^{10,10'}$), 6,27 м (2H, H $^{14,14'}$), 6,31 д (2H, H $^{12,12'}$, $J=15$), 6.67-6.71 м (4H, H $^{11,11',15,15'}$).

Бензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,45 д (2H, H 4,6 , $J = 8,5$), 7,58 т (1H, H 5 , $J = 7,3$), 8,07 д (2H, H 3,7 , $J = 8,0$), 12,77 с (1H, OH 1).

4-метилбензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,42 с (3H, Me 5), 7,42 д (2H, H 4,6 , $J = 8,5$), 7,74 д (2H, H 3,7 , $J = 8,0$), 12,75 с (1H, OH 1).

Никотиновая кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,49 т (1H, H 5 , $J = 8,0$), 8,02 д (1H, H 6 , $J = 7,9$), 8,57 д (1H, H 4 , $J = 5,0$), 8,79 с (1H, H 3), 12,35 с (1H, OH 1).

Фенилгликолевая кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 5,01 с (1H, OH²), 5,74 с (1H, H²), 7,33 т (3H, H^{4,6,8}, $J = 7$), 7,40 д. д (2H, H^{3,5}, $J = 8$), 12,70 с (1H, OH¹).

Салициловая кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 7,22 д (1H, H⁴, $J = 7,5$), 7,50 т (1H, H⁶, $J = 7,4$), 7,57 т (1H, H⁵, $J = 7,3$), 7,95 д (1H, H⁷, $J = 7,7$), 12,73 с (1H, OH¹), 15,12 с (1H, OH³).

Ибупрофен. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 0,82 с (6H, Me¹⁰, $J = 7,0$), 1,41 с (3H, Me², $J = 7,0$), 1,81 т (1H, H¹⁰, $J = 7,0$), 2,42 д (2H, H⁹), 3,74 к (1H, H², $J = 7$), 7,06 д (2H, H^{5,7}, $J = 8$), 7,21 д (2H, H^{4,8}, $J = 8$), 12,70 с (1H, OH¹),

Кетопрофен. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,48 с (3H, Me², $J = 7,0$), 3,73 к (1H, H², $J = 7,0$), 7,31 д (2H, H^{12,14}, $J = 8,4$), 7,35 д (4H, H^{4,8}, $J = 8,4$), 7,46 т (1H, H¹³, $J = 8,1$), 7,55 д (2H, H^{5,7}, $J = 8,4$), 7,68 д (2H, H^{11,15}, $J = 8,4$), 12,72 с (1H, OH¹).

Синтезированные сложные эфиры ксатофиллов:

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,46 д (4H, H^{24,24',26,26'}, $J = 9$), 7,57 т (2H, H^{25,25'}, $J = 7$), 8,03 д. д (4H, H^{23,23',27,27'}, $J = 8$).

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 2,42 с (6H, Me^{25,25'}), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,42 д. д (4H, H^{24,24',26,26'}, $J = 8$), 7,74 д. д (4H, H^{23,23',27,27'}, $J = 9$).

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.3). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13,0$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с

(6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,49 д. д (2H, H^{24,24'}, $J = 8$), 8,02 д. д (2H, H^{23,23'}, $J = 8$), 8,57 д. д (2H, H^{25,25'}, $J = 4$), 8,79 т (2H, H^{26,26'}, $J = 2$).

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 5,01 с (2H, OH^{22,22'}), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 5,71 с (2H, H^{22,22'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,33 т (6H, H^{25,25',26,26',27,27'}, $J = 7$), 7,40 д. д (4H, H^{24,24',28,28'}, $J = 8$).

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,21 т (2H, H^{26,26'}, $J = 8$), 7,50 т (2H, H^{24,24'}, $J = 8$), 7,57 т (2H, H^{25,25'}, $J = 8$), 7,95 д. д (2H, H^{23,23'}, $J = 8$), 15,1 с (2H, OH^{27, 27'}).

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.6). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 0,82 с (12H, Me^{31, 31'}, $J = 7.0$), 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,36 с (6H, Me^{22, 22'}, $J = 7$), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,81 т (2H, H^{31,31'}, $J = 7$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}), 2,42 д (4H, H^{30,30'}), 3,71 к (2H, H^{22, 22'}, $J = 7$), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, $J = 16$), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, $J = 15$), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,06 д (4H, H^{26,26',28,28'}, $J = 8$), 7,21 д (4H, H^{25,25',29,29'}, $J = 8$).

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.7). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,13 с (6H, Me^{17,17'}), 1,25 с (6H, Me^{16,16'}), 1,43 с (6H, Me^{22, 22'}, $J = 7$), 1,77 т (2H eq, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,83 т (2H ax, H^{2,2'}, $J = 13$), 1,91 с (6H, Me^{18,18'}), 2,00 с (6H, Me^{13,13'}), 2,01 с (6H, Me^{9,9'}),

3,71 к (2H, H^{22,22'}, J = 7), 5,41 м (2H, H^{3,3'}), 6,21 д (2H, H^{7,7'}, J = 16), 6,28–6,31 м (6H, H^{10,10', 12,12',14,14'}), 6,41 д (2H, H^{8,8'}, J = 15), 6,67–6,76 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,31 д (2H, H^{32,32',34,34'}, J = 8,4), 7,35 д (4H, H^{24,24',28,28'}, J = 8,4), 7,46 т (4H, H^{33,33'}, J = 8,1), 7,55 д (2H, H^{25,25', 27,27'}, J = 8,4), 7,67 д (2H, H^{25,25'}, J = 8,4), 7,68 д (4H, H^{31,31',35,35'}, J = 8,4).

β,ε-каротин-3,3'-добензоат (соединение С.8). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me^{5'}), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,44 д (1H, H^{6'}, J=8), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,46 д (4H, H^{24,24',26,26'}, J=9), 7,57 т (2H, H^{25,25'}, J=7), 8,03 д (4H, H^{23,23',27,27'}).

β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me^{5'}), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,42 с (6H, Me^{25,25'}), 2,44 д (1H, H^{6'}, J=8), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,42 дд (4H, H^{24,24',26,26'}), 7,74 дд (4H, H^{23,23',27,27'}, J=9).

β,ε-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me^{5'}), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,44 д (1H, H^{6'}, J=8), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,49 д. д (2H, H^{24,24'}, J = 8), 8,02 д. д (2H, H^{23,23'}, J = 8), 8,57 д. д (2H, H^{25,25'}, J = 4), 8,79 т (2H, H^{26,26'}, J = 2).

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me⁵), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,44 д (1H, H⁶, J=8), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,01 с (2H, OH^{22,22'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 5,71 с (2H, H^{22,22'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,33 т (6H, H^{25,25',26,26',27,27'}, J = 7), 7,41 д. д (4H, H^{24,24',28,28'}, J = 8).

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me⁵), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,44 д (1H, H⁶, J=8), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,21 т (2H, H^{26,26'}, J = 8), 7,50 т (2H, H^{24,24'}, J = 8), 7,57 т (2H, H^{25,25'}, J = 8), 7,95 д. д (2H, H^{23,23'}, J = 8), 15,1 с (2H, OH^{27, 27'}).

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 0,82 с (12H, Me^{31,31'}, J = 7,0), 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,36 с (6H, Me^{22, 22'}, J = 7), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,81 т (2H, H^{31,31'}, J = 7), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me⁵), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,42 д (4H, H^{30,30'}), 2,44 д (1H, H⁶, J=8), 3,71 к (2H, H^{22, 22'}, J = 7), 4,01 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,14 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,06 д (4H, H^{26,26',28,28'}, J = 8), 7,21 д (4H, H^{25,25',29,29'}, J = 8).

β,ε-каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,43 с (6H, Me^{22, 22'}, J = 7), 1,77 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,83 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,91 с (3H, Me⁵), 1,92 с (3H, Me⁵), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,11 м (1H, H⁴, J=17), 2,39 т (1H, H⁴), 2,44 д (1H, H⁶, J=8), 3,71 к (2H, H^{22, 22'}, J

= 7), 4,01 м (2Н, Н^{3,3'}), 5,51 с (1Н, Н^{4'}), 6,12 с (2Н, Н^{7,7'}), 6,14 с (2Н, Н^{8,8'}), 6,18 м (2Н, Н^{10,10'}), 6,27 м (2Н, Н^{14,14'}), 6,31 д (2Н, Н^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4Н, Н^{11,11',15,15'}), 7,31 д (2Н, Н^{32,32',34,34'}, J = 8,4), 7,35 д (4Н, Н^{24,24',28,28'}, J = 8,4), 7,46 т (4Н, Н^{33,33'}, J = 8,1), 7,55 д (2Н, Н^{25,25', 27,27'}, J = 8,4), 7,67 д (2Н, Н^{25,25'}, J = 8,4), 7,68 д (4Н, Н^{31,31',35,35'}, J = 8,4).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15). Спектр ЯМР ¹Н, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6Н, Me^{16,16'}), 1,15 с (6Н, Me^{17,17'}), 1,74 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6Н, Me^{5,5'}), 1,99 с (6Н, Me^{13,13'}), 2,00 с (6Н, Me^{9,9'}), 2,28 м (1Н, Н⁴, J=17), 2,59 т (1Н, Н⁴), 4,04 м (2Н, Н^{3,3'}), 5,51 с (1Н, Н^{4'}), 6,12 с (2Н, Н^{7,7'}), 6,15 с (2Н, Н^{8,8'}), 6,18 м (2Н, Н^{10,10'}), 6,27 м (2Н, Н^{14,14'}), 6,31 д (2Н, Н^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4Н, Н^{11,11',15,15'}), 7,46 д (4Н, Н^{24,24',26,26'}, J=9), 7,57 т (2Н, Н^{25,25'}, J=7), 8,03 д (4Н, Н^{23, 23',27,27'}).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16). Спектр ЯМР ¹Н, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6Н, Me^{16,16'}), 1,15 с (6Н, Me^{17,17'}), 1,74 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,88 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6Н, Me^{5,5'}), 1,99 с (6Н, Me^{13,13'}), 2,00 с (6Н, Me^{9,9'}), 2,28 м (1Н, Н⁴, J=17), 2,59 т (1Н, Н⁴), 2,42 с (6Н, Me^{25,25'}), 4,04 м (2Н, Н^{3,3'}), 5,51 с (1Н, Н^{4'}), 6,12 с (2Н, Н^{7,7'}), 6,15 с (2Н, Н^{8,8'}), 6,18 м (2Н, Н^{10,10'}), 6,27 м (2Н, Н^{14,14'}), 6,31 д (2Н, Н^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4Н, Н^{11,11',15,15'}), 7,42 дд (4Н, Н^{24,24',26,26'}), 7,74 дд (4Н, Н^{23,23',27,27'}, J=9).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17). Спектр ЯМР ¹Н, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6Н, Me^{16,16'}), 1,15 с (6Н, Me^{17,17'}), 1,74 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,88 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6Н, Me^{5,5'}), 1,99 с (6Н, Me^{13,13'}), 2,00 с (6Н, Me^{9,9'}), 2,28 м (1Н, Н⁴, J=17), 2,59 т (1Н, Н⁴), 4,04 м (2Н, Н^{3,3'}), 5,51 с (1Н, Н^{4'}), 6,12 с (2Н, Н^{7,7'}), 6,15 с (2Н, Н^{8,8'}), 6,18 м (2Н, Н^{10,10'}), 6,27 м (2Н, Н^{14,14'}), 6,31 д (2Н, Н^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4Н, Н^{11,11',15,15'}), 7,49 д.д (2Н, Н^{24,24'}, J = 8), 8,02 д.д (2Н, Н^{23,23'}, J = 8), 8,57 д.д (2Н, Н^{25,25'}, J = 4), 8,79 т (2Н, Н^{26,26'}, J = 2).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноат) (соединение С.18). Спектр ЯМР ¹Н, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6Н, Me^{16,16'}), 1,15 с (6Н, Me^{17,17'}), 1,74 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,88 дд (2Н, Н^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6Н, Me^{5,5'}), 1,99 с (6Н,

Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,28 м (1H, H⁴, J=17), 2,59 т (1H, H⁴), 4,04 м (2H, H^{3,3'}), 5,01 с (2H, OH^{22,22'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 5,71 с (2H, H^{22,22'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,15 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,33 т (6H, H^{25,25',26,26',27,27'}, J = 7), 7,41 д.д (4H, H^{24,24',28,28'}, J = 8).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19).

Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,74 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,88 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6H, Me^{5,5'}), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,28 м (1H, H⁴, J=17), 2,59 т (1H, H⁴), 4,04 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,15 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,21 т (2H, H^{26,26'}, J = 8), 7,50 т (2H, H^{24,24'}, J = 8), 7,57 т (2H, H^{25,25'}, J = 8), 7,95 д.д (2H, H^{23,23'}, J = 8), 15,1 с (2H, OH^{27,27'}).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат)

(соединение С.20). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 0,82 с (12H, Me^{31,31'}, J = 7,0), 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,36 с (6H, Me^{22,22'}, J = 7), 1,74 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,81 т (2H, H^{31,31'}, J = 7), 1,88 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6H, Me^{5,5'}), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,28 м (1H, H⁴, J=17), 2,59 т (1H, H⁴), 2,42 д (4H, H^{30,30'}), 3,71 к (2H, H^{22,22'}, J = 7), 4,04 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,15 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,06 д (4H, H^{26,26',28,28'}, J = 8), 7,21 д (4H, H^{25,25',29,29'}, J = 8).

β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат)

(соединение С.21). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 1,14 с (6H, Me^{16,16'}), 1,15 с (6H, Me^{17,17'}), 1,43 с (6H, Me^{22,22'}, J = 7), 1,74 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,88 дд (2H, H^{2,2'}, J=14), 1,92 с (6H, Me^{5,5'}), 1,99 с (6H, Me^{13,13'}), 2,00 с (6H, Me^{9,9'}), 2,28 м (1H, H⁴, J=17), 2,59 т (1H, H⁴), 3,71 к (2H, H^{22,22'}, J = 7), 4,04 м (2H, H^{3,3'}), 5,51 с (1H, H^{4'}), 6,12 с (2H, H^{7,7'}), 6,15 с (2H, H^{8,8'}), 6,18 м (2H, H^{10,10'}), 6,27 м (2H, H^{14,14'}), 6,31 д (2H, H^{12,12'}, J=15), 6,67–6,71 м (4H, H^{11,11',15,15'}), 7,31 д (2H, H^{32,32',34,34'}, J = 8,4), 7,35 д (4H, H^{24,24',28,28'}, J = 8,4), 7,46 т (4H, H^{33,33'}, J = 8,1),

7,55 д (2H, H^{25,25', 27,27'}, J = 8,4), 7,67 д (2H, H^{25,25'}, J = 8,4), 7,68 д (4H, H^{31,31',35,35'}, J = 8,4).

4.3.2.2 ¹³C ЯМР спектры сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина

Далее в условиях, описанных в Главе 2, регистрировали ¹³C ЯМР-спектры синтезированных соединений С.1 – С.21. Типичный ¹³C ЯМР-спектр приведен на рисунке 4.33.

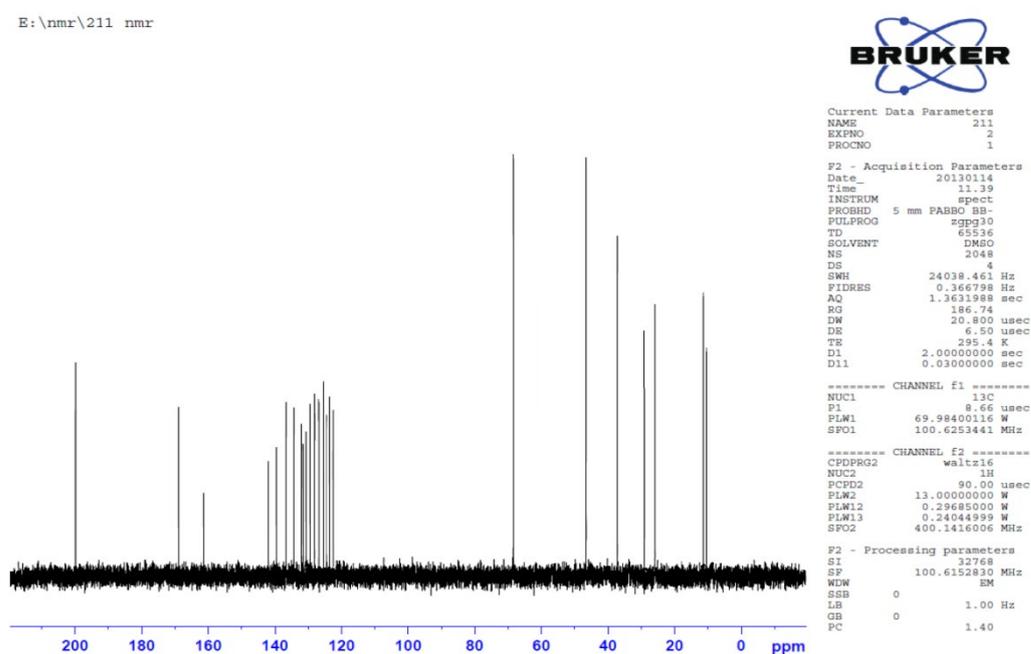


Рисунок 4.33 – ¹³C ЯМР спектр β, β-каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоата (астаксантина дибензоат – соединение С.1)

Для удобства идентификации синтезированных соединений в ¹³C ЯМР спектре рассматривали четыре наиболее значимых фрагмента структуры: полиеновая цепь, метильные группы, концевые циклогексеновые ядра ксантофилла и введенный в структуру ацильный остаток.

На рисунках 4.34 – 4.36 представлены характерные сигналы полиеновой цепи ¹³C ЯМР спектров астаксантина, лютеина и зеаксантина.

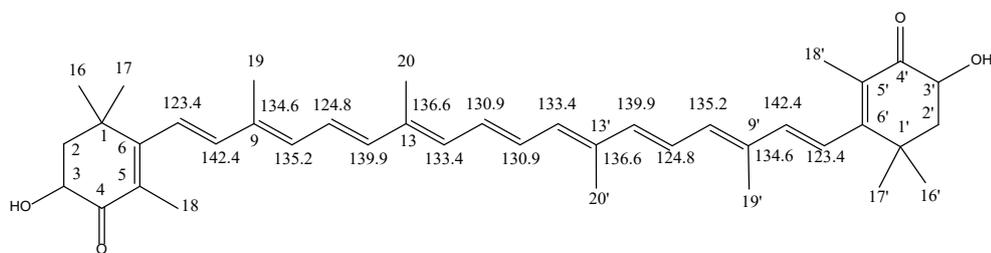


Рисунок 4.34 – Сигналы полиеновой цепи ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

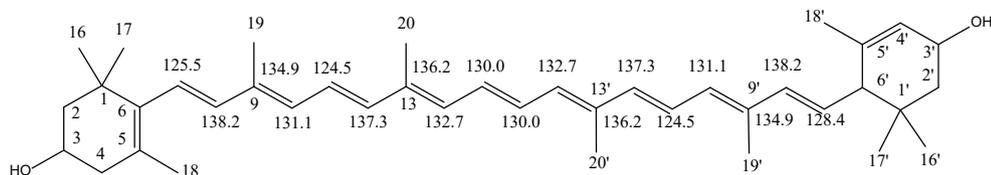


Рисунок 4.35 – Сигналы полиеновой цепи ^{13}C ЯМР спектра лютеина

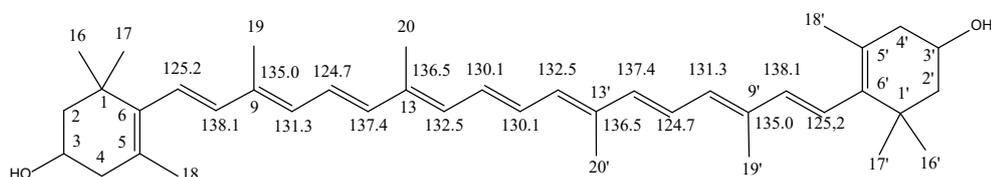


Рисунок 4.36 – Сигналы полиеновой цепи ^{13}C ЯМР спектра зеаксантина

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

На рисунках 4.37 – 4.39 представлены характерные сигналы атомов углерода метильных групп ^{13}C ЯМР спектров астаксантина, лютеина и зеаксантина.

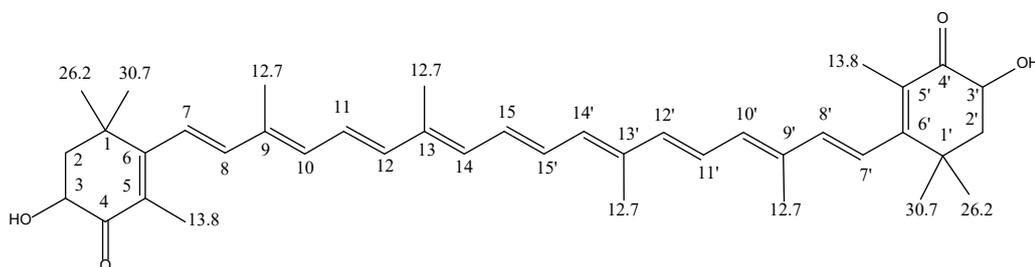


Рисунок 4.37 – Сигналы атомов углеродов метильных групп ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

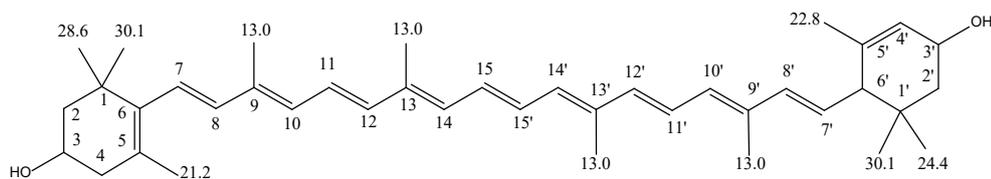


Рисунок 4.38 – Сигналы атомов углеродов метильных групп ^{13}C ЯМР спектра лютеина

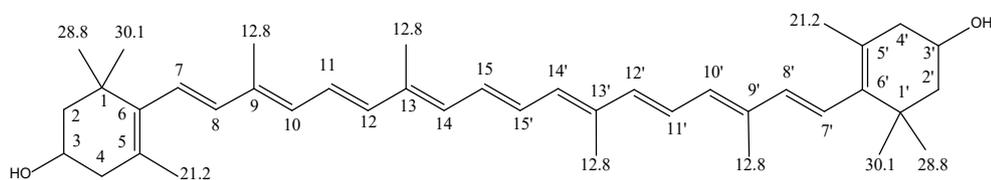


Рисунок 4.39 – Сигналы атомов углеродов метильных групп ^{13}C ЯМР спектра зеаксантина

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.

На рисунках 4.40 – 4.42 представлены характерные сигналы концевых групп ^{13}C ЯМР спектров астаксантина, лютеина и зеаксантина.

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.

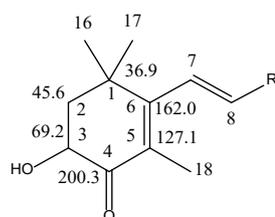


Рисунок 4.40 – Сигналы циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра астаксантина

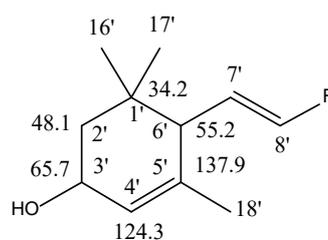
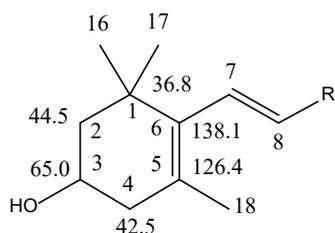


Рисунок 4.41 – Сигналы концевых циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра лютеина

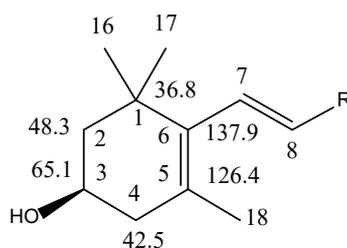


Рисунок 4.42 – Сигналы концевых циклогексановых фрагментов ^{13}C ЯМР спектра зеаксантина

Ацильные остатки, введенные в структуру для получения сложных эфиров, имеют характерные сигналы. На рисунке 4.43 представлены сигналы радикалов ^{13}C ЯМР спектра сложных эфиров астаксантина. Полосы поглощения незначительно отличаются от полос поглощения кислот до синтеза ввиду образования сложноэфирной группы.

Астаксантин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 127,1 (C5,5'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 162,0 (C6,6'), 200,3 (C4,4').

Лютеин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 124,3 (C4'), 126,4 (C5), 128,4 (C7'), 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8').

Зеаксантин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8').

Бензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 128,2 (C4,C6), 128,7 (C2), 129,5 (C3,C7), 133,9 (C5), 171,2 (C1).

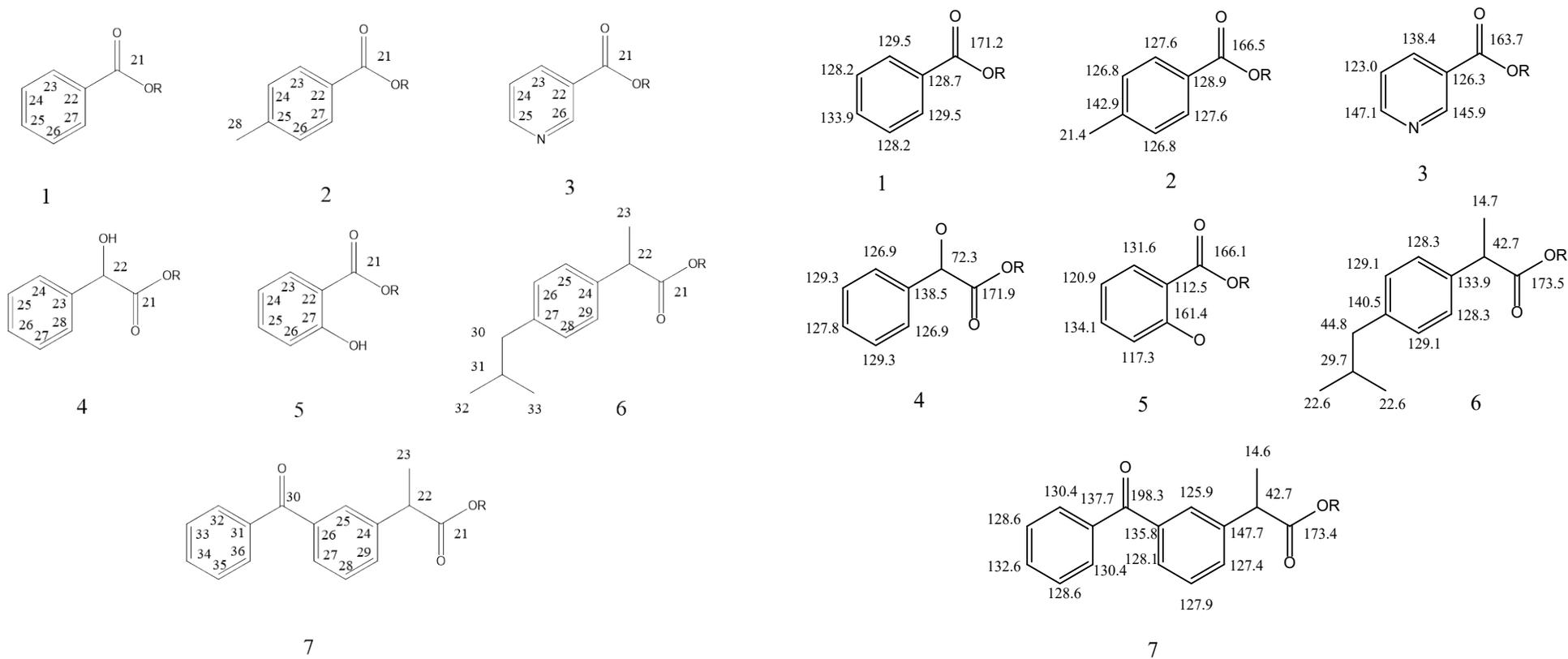


Рисунок 4.43 – Сигналы ацильных остатков ^{13}C ЯМР спектра сложных эфиров ксантофиллов

4-метилбензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 21,4 (C8), 126,8 (C4,6), 127,6 (C3,7), 128,9 (C2), 142,9 (C5), 169,5 (C1).

Никотиновая кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 123,0 (C5), 126,3 (C2), 138,4 (C6), 145,9 (C3), 147,1 (C4), 166,4 (C1).

Фенилгликолевая кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 72,3 (C2), 126,9 (C4,8), 127,8 (C6), 129,3 (C5,7), 138,5 (C3), 173,2 (C1).

Салициловая кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 112,5 (C2), 117,3 (C4), 120,9 (C6), 131,6 (C7), 134,1 (C5), 161,4 (C3), 169,9 (C1).

Ибупрофен. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 14,7 (C3), 22,6 (C12,13), 29,7 (C11), 42,7 (C2), 44,8 (C10), 128,3 (5,9), 129,1 (C6,8), 133,9 (C4), 140,5 (C7), 175,3 (C1).

Кетопрофен. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 14,6 (C3), 42,7 (C2), 125,9 (C5), 127,4 (C9), 127,9 (C8), 128,1 (C7), 128,6 (C13,15), 130,4 (C12,16), 132,6 (C14), 135,8 (C6), 137,7 (C11), 147,7 (C4), 175,2 (C1), 198,3 (C10).

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'.

Ниже приведены числовые результаты измерения ^{13}C ЯМР спектров синтезированных сложных эфиров производных ксантофиллов – соединения С.1 – С.21:

Синтезированные сложные эфиры ксантофиллов:

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 127,1 (C5,5'), 128,2 (C24,24',26,26'), 128,7 (C22,22'), 129,5 (C23,23',27,27'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 133,9 (C25,25'), 134,6

(C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 162,0 (C6,6'), 171,2 (C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 21,4 (C28,28'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 126,8 (C24,24',26,26'), 127,1 (C5,5'), 127,6 (C23,23',27,27'), 128,9 (C22,22'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 142,9(C25,25'), 162,0(C6,6'), 166,5(C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат)

(соединение С.3). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,0 (C24,24'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 126,3 (C22,22'), 127,1 (C5,5'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 138,4 (C23,23'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 145,9 (C26,26'), 147,1 (C25,25'), 162,0 (C6,6'), 163,7 (C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 72,3 (C22,22'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 126,9 (C24,24',28,28'), 127,1 (C5,5'), 127,8 (C26,26'), 129,3 (C25,25',27,27'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 138,5 (C23,23'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 162,0 (C6,6'), 171,9 (C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 112,5 (C22,22'), 117,3 (C26,26'), 120,9 (C24,24'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 127,1 (C5,5'), 130,9 (C15,15'), 131,6 (C23,23'), 133,4 (C14,14'), 134,1 (C25,25'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 161,4 (C27,27'), 162,0 (C6,6'), 166,1 (C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат

(соединение С.6). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 14,7 (C23,23'), 22,6 (C32,32',33,33'), 26,2 (C16,16'), 29,7 (C31,31'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 42,7 (C22,22'), 44,8 (C30,30'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 127,1 (C5,5'), 128,3 (25,25',29,29'), 129,1 (C26,26',28,28'), 130,9 (C15,15'), 133,4 (C14,14'), 133,9 (C24,24'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 136,6 (C13,13'), 139,9 (C12,12'), 140,5 (C27,27'), 142,4 (C8,8'), 162,0 (C6,6'), 173,5 (C21,21'), 200,3 (C4,4').

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат)

(соединение С.7). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,7 (C19,19',20,20'), 13,8 (C18,18'), 14,6 (C23,23'), 26,2 (C16,16'), 30,7 (C17,17'), 36,9 (C1,1'), 42,7 (C22,22'), 45,6 (C2,2'), 69,2 (C3,3'), 123,4 (C7,7'), 124,8 (C11,11'), 125,9 (C25,25'), 127,1 (C5,5'), 127,4 (C29,29'), 127,9 (C28,28'), 128,1 (C27,27'), 128,6 (C33,33',35,35'), 130,4 (C32,32',36,36'), 130,9 (C15,15'), 132,6 (C34,34'), 133,4 (C14,14'), 134,6 (C9,9'), 135,2 (C10,10'), 135,8 (C26,26'), 136,6 (C13,13'), 137,7 (C31,31'), 139,9 (C12,12'), 142,4 (C8,8'), 147,7 (C24,24'), 162,0 (C6,6'), 173,4 (C21,21'), 198,3 (C30,30'), 200,3 (C4,4').

β,ϵ -каротин-3,3'-добензоат (соединение С.8). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,4 (C5), 128,2 (C24,24',26,26'), 128,4 (C7'), 128,7 (C22,22'), 129,5 (C23,23',27,27'), 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 133,9 (C25,25'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 171,2 (C21,21').

β,ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18), 21,4 (C28,28'), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,4 (C5), 126,8 (C24,24',26,26'), 127,6

(C23,23',27,27'), 128,4 (C7'). 128,9 (C22,22'), 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 142,9 (C25,25'), 166,5 (C21,21').

β,ε-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,4(C18), 22,8(C18'), 24,4(C16'), 28,6(C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 123,0 (C24,24'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,3 (C22,22'), 126,4 (C5), 128,4 (C7'). 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 138,4 (C23,23'), 147,1 (C25,25'), 145,9 (C26,26'), 163,7 (C21,21').

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,4 (C18), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 72,3 (C22,22'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,4 (C5), 126,9 (C24,24',28,28'), 127,8 (C26,26'), 128,4 (C7'), 129,3 (C25,25',27,27'), 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 138,5 (C23,23'), 171,9 (C21,21').

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 21,4 (C18), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 112,5 (C22,22'), 117,3 (C26,26'), 120,9 (C24,24'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,4 (C5), 128,4 (C7'). 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 131,6 (C23,23'), 132,7 (C14,14'), 134,1 (C25,25'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 161,4 (C27,27'), 166,1 (C21,21').

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 14,7 (C23,23'), 21,4 (C18), 22,6 (C32,32',33,33'), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6

(C16), 29,7 (C31,31'), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 42,7 (C22,22'), 44,5 (C2), 44, 8 (C30,30'), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 126,4 (C5), 128,3 (25,25',29,29'), 128,4 (C7'). 129,1 (C26,26',28,28'), 130,0 (C15,15'), 131,1 (C10,10'), 132,7 (C14,14'), 133,9(C24,24'), 134,9 (C9,9'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 140,5 (C27,27'), 173,5 (C21,21').

β,ε-каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 13,0 (C19,19',20,20'), 14,6 (C23,23'), 21,4 (C18), 22,8 (C18'), 24,4 (C16'), 28,6 (C16), 30,1 (C17,17'), 34,2 (C1'), 36,8 (C1), 42,5 (C4), 42,7 (C22,22'), 44,5 (C2), 48,1 (C2'), 55,2 (C6'), 65,0 (C3), 65,7 (C3'), 124,3 (C4'), 124,5 (C11,11'), 125,5 (C7), 125,9 (C25,25'), 126,4 (C5), 127,4 (C29,29'), 127,9 (C28,28'), 128,1 (C27,27'), 128,4 (C7'), 128,6 (C33,33',35,35'), 130,0 (C15,15'), 130,4 (C32,32',36,36'), 131,1 (C10,10'), 132,6 (C34,34'), 132,7 (C14,14'), 134,9 (C9,9'), 135,8 (C26,26'), 136,2 (C13,13'), 137,3 (C12,12'), 137,7 (C31,31'), 137,9 (C5'), 138,1 (C6), 138,2 (C8,8'), 147,7(C24,24'), 173,4 (C21,21'), 198,3 (C30,30').

β,β-Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 128,2 (C24,24',26,26'), 128,7 (C22,22'), 129,5 (C23,23',27,27'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 133,9 (C25,25'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4(C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 171,2 (C21,21').

β,β-Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 21,4(C28,28'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 126,8 (C24,24',26,26'), 127,6 (C23,23',27,27'), 128,9 (C22,22'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 142,9 (C25,25'), 166,5 (C21,21').

β,β -Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 123,0 (C24,24'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,3 (C22,22'), 126,4 (C5,5'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 138,4 (C23,23'), 147,1 (C25,25'), 145,9 (C26,26'), 163,7 (C21,21').

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноат) (соединение С.18). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 72,3 (C22,22'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 126,9 (C24,24',28,28'), 127,8 (C26,26'), 129,3 (C25,25',27,27'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 138,5 (C23,23'), 171,9 (C21,21').

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 112,5 (C22,22'), 117,3 (C26,26'), 120,9 (C24,24'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 131,6 (C23,23'), 132,5 (C14,14'), 134,1 (C25,25'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 161,4 (C27,27'), 166,1 (C21,21').

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат) (соединение С.20). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 14,7 (C23,23'), 21,2 (C18,18'), 22,6 (C32,32',33,33'), 28,8 (C16,16'), 29,7 (C31,31'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 42,7 (C22,22'), 44,8 (C30,30'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 126,4 (C5,5'), 128,3 (C25,25',29,29'), 129,1 (C26,26',28,28'), 130,1 (C15,15'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 133,9 (C24,24'), 135,0 (C9,9'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 140,5 (C27,27'), 173,5 (C21,21').

β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат)

(соединение С.21). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 12,8 (C19,19',20,20'), 14,6 (C23,23'), 21,2 (C18,18'), 28,8 (C16,16'), 30,1 (C17,17'), 36,8 (C1,1'), 42,5 (C4,4'), 42,7 (C22,22'), 48,3 (C2,2'), 65,1 (C3,3'), 124,7 (C11,11'), 125,2 (C7,7'), 125,9 (C25,25'), 126,4 (C5,5'), 127,4 (C29,29'), 127,9 (C28,28'), 128,1 (C27,27'), 128,6 (C33,33',35,35'), 130,1 (C15,15'), 130,4 (C32,32',36,36'), 131,3 (C10,10'), 132,5 (C14,14'), 132,6 (C34,34'), 135,0 (C9,9'), 135,8 (C26,26'), 136,5 (C13,13'), 137,4 (C12,12'), 137,7 (C31,31'), 137,9 (C6,6'), 138,1 (C8,8'), 147,7 (C24,24'), 173,4 (C21,21'), 198,3 (C30,30').

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.

4.3.3 Анализ сложных эфиров ксантофиллов методом масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия может быть использована в идентификации сложных эфиров ксантофиллов не только для определения молекулярной массы синтезированных соединений, но и для надежной идентификации в спектрах образующихся фрагментарных ионов. Разные методы ионизации приводят к появлению различных фрагментов, что может создавать определенные трудности при сравнении результатов, полученных в неодинаковых условиях.

Одним из надежных способов установления структуры и массы ионов в масс-спектре является их прогноз с помощью компьютерных программ. Для прогнозирования фрагментов ионов мы использовали программу CFM-ID 4.0

[103], которая позволяет проводить прогноз с высокой долей вероятности за счет того, что при разработке данной программы авторами были проанализированы спектры около 1000000 уже известных соединений. Еще одним преимуществом программы является возможность установления структуры по экспериментальным значениям ионов неизвестных соединений. Кроме того, программа позволяет проводить расчеты при низкой (10 эВ), средней (20 эВ) и высокой (40 эВ) энергиях столкновения, а также выбирать позитивный или негативный ионный режим, что повышает точность идентификации [356].

Анализ полученных соединений методом масс-спектрометрии проводили в условиях, приведенных в Главе 2. Типовой масс-спектр производных ксантофиллов представлен на рисунке 4.44.

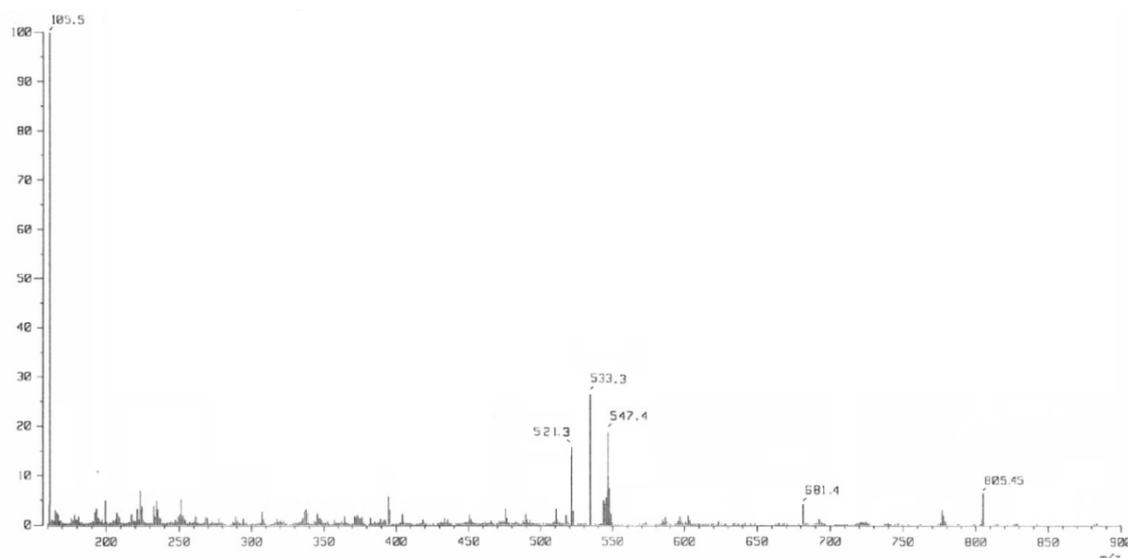


Рисунок 4.44 – Масс-спектр β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоата (астаксантина добензоат – С.1)

Прогнозируемые и экспериментально полученные характерные фрагменты ионов сложных эфиров атаксантина, лютеина и зеаксантина представлены в таблице 1, Приложение 1.

Результаты измерения масс спектров сложных эфиров астаксантина:

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1), m/z : 805,4376 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 805,4390 ESI: $[M-805]^+$; $[M-681]^+$; $[M-547]^+$; $[M-533]^+$; $[M-521]^+$; $[M-105]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2), m/z : 833,4688 $[M + H]^+$. $C_{56}H_{64}O_6H^+$. M_{calc} 833,4703 ESI: $[M-833]^+$; $[M-695]^+$; $[M-601]^+$; $[M-547]^+$; $[M-535]^+$; $[M-119]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.3), m/z : 807,4274 $[M+ H]^+$. $C_{52}H_{58}N_2O_6H^+$. M_{calc} 807,4295. ESI: $[M-807]^+$; $[M-682]^+$; $[M-548]^+$; $[M-534]^+$; $[M-516]^+$; $[M-106]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4), m/z : 865,4589 $[M + H]^+$. $C_{56}H_{64}O_8H^+$ M_{calc} 865,4601. ESI: $[M-865]^+$; $[M-837]^+$; $[M-617]^+$; $[M-551]^+$; $[M-497]^+$; $[M-119]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5), m/z : 837,4264 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_8H^+$ M_{calc} 837,4288. ESI: $[M-837]^+$; $[M-809]^+$; $[M-549]^+$; $[M-537]^+$; $[M-121]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.6), m/z : 973,6266 $[M+ H]^+$. $C_{66}H_{84}O_6H^+$ M_{calc} 973,6288. ESI: $[M-974]^+$; $[M-944]^+$; $[M-671]^+$; $[M-638]^+$; $[M-605]^+$; $[M-553]^+$; $[M-161]^+$.

β , β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил) пропионат) (соединение С.7), m/z : 1069,5518 $[M+ H]^+$. $C_{72}H_{76}O_8H^+$ M_{calc} 1069,5540. ESI: $[M-974]^+$; $[M-1070]^+$; $[M-816]^+$; $[M-669]^+$; $[M-599]^+$; $[M-287]^+$; $[M-105]^+$.

Результаты измерения масс спектров сложных эфиров лютеина:

β , ϵ -каротин-3,3'-добензоат (соединение С.8), m/z : 777,4787 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{64}O_4H^+$. M_{calc} 777,4805 ESI: $[M-777]^+$; $[M-531]^+$; $[M-507]^+$; $[M-409]^+$; $[M-399]^+$; $[M-271]^+$; $[M-105]^+$.

β , ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9), m/z : 805,5101 $[M + H]^+$. $C_{56}H_{68}O_4H^+$. M_{calc} 805,5118 ESI: $[M-806]^+$; $[M-533]^+$; $[M-521]^+$; $[M-495]^+$; $[M-409]^+$; $[M-285]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение **C.10**), m/z : 779,4689 $[M+H]^+$. $C_{52}H_{62}N_2O_4H^+$. M_{calc} 779,4710. ESI: $[M-779]^+$; $[M-654]^+$; $[M-548]^+$; $[M-532]^+$; $[M-502]^+$; $[M-383]^+$; $[M-106]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение **C.11**), m/z : 837,5001 $[M+H]^+$. $C_{56}H_{68}O_6H^+$ M_{calc} 837,5016. ESI: $[M-838]^+$; $[M-551]^+$; $[M-537]^+$; $[M-301]^+$; $[M-119]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение **C.12**), m/z : 809,4689 $[M+H]^+$. $C_{54}H_{64}O_6H^+$ M_{calc} 809,4703. ESI: $[M-810]^+$; $[M-547]^+$; $[M-535]^+$; $[M-121]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение **C.13**), m/z : 945,6659 $[M+H]^+$. $C_{66}H_{88}O_4H^+$ M_{calc} 945,6683. ESI: $[M-946]^+$; $[M-617]^+$; $[M-605]^+$; $[M-537]^+$; $[M-387]^+$; $[M-161]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение **C.14**), m/z : 1041,5934 $[M+H]^+$. $C_{72}H_{80}O_6H^+$ M_{calc} 1041,5955. ESI: $[M-1042]^+$; $[M-786]^+$; $[M-639]^+$; $[M-535]^+$; $[M-209]^+$; $[M-105]^+$.

Результаты измерения масс спектров сложных эфиров зеаксантина:

β,ε-каротин-3,3'-дibenзоат (соединение **C.15**), m/z : 777,4783 $[M+H]^+$. $C_{54}H_{64}O_4H^+$. M_{calc} 777,4805 ESI: $[M-777]^+$; $[M-531]^+$; $[M-507]^+$; $[M-409]^+$; $[M-399]^+$; $[M-271]^+$; $[M-105]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение **C.16**), m/z : 805,5097 $[M+H]^+$. $C_{56}H_{68}O_4H^+$. M_{calc} 805,5118 ESI: $[M-806]^+$; $[M-533]^+$; $[M-521]^+$; $[M-495]^+$; $[M-409]^+$; $[M-285]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение **C.17**), m/z : 779,4685 $[M+H]^+$. $C_{52}H_{62}N_2O_4H^+$. M_{calc} 779,4710. ESI: $[M-779]^+$; $[M-654]^+$; $[M-548]^+$; $[M-532]^+$; $[M-502]^+$; $[M-383]^+$; $[M-106]^+$.

β,ε-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение **C.18**), m/z : 837,4997 $[M+H]^+$. $C_{56}H_{68}O_6H^+$ M_{calc} 837,5016. ESI: $[M-837]^+$; $[M-551]^+$; $[M-537]^+$; $[M-301]^+$; $[M-119]^+$.

β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.19), m/z : 809,4686 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{64}O_6H^+$ M_{calc} 809,4703. ESI: $[M-810]^+$; $[M-547]^+$; $[M-535]^+$; $[M-121]^+$.

β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.20), m/z : 945,6655 $[M+ H]^+$. $C_{66}H_{88}O_4H^+$ M_{calc} 945,6683. ESI: $[M-946]^+$; $[M-617]^+$; $[M-605]^+$; $[M-537]^+$; $[M-387]^+$; $[M-161]^+$.

β,ϵ -каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.21), m/z : 1041,5930 $[M+ H]^+$. $C_{72}H_{80}O_6H^+$ M_{calc} 1041,5955. ESI: $[M-1042]^+$; $[M-786]^+$; $[M-639]^+$; $[M-535]^+$; $[M-209]^+$; $[M-105]^+$.

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-гидроксибензойной кислоты (салициловой кислоты) – 121, ибупрофена – 161, кетопрофена 209 и 105. Также было установлено, что отличий в образующихся фрагментах у эфиров лютеина и зеаксантина не выявлено, а значит, их нельзя отличить в предлагаемых условиях. Для синтезированных диэфиров производных ксантофиллов не выявлены фрагменты, характерные для родоначальной структуры ксантофиллов, что может свидетельствовать о различных процессах их фрагментации. Таким образом, предварительно были спрогнозированы, а затем и экспериментально установлены характерные сигналы, подтверждающие структуру для синтезированных соединений производных ксантофиллов.

4.4 Хемознзимный 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. Мы предположили, что причиной такой трансформации изомеров

исходных ксантофиллов является использование энзимов как катализаторов реакции этерификации. В связи с этим далее мы сочли целесообразным изучить получение субстанций ксантофиллов в форме *all-trans*-изомеров с помощью энзимного синтеза.

Это направление тем более важно исследовать, поскольку каротиноиды по числу пространственных изомеров – это рекордсмены среди природных соединений, а для синтеза ЛВ, вполне логично использовать конкретный изомер. В этой связи становится очевидной необходимость использования приемов и методов получения ксантофиллов с определенной геометрической конфигурацией как объектов дальнейшей химической модификации.

Кроме того, получение каротиноидов из природного сырья подразумевает его технологическую обработку, например экстракцию. Так, традиционная экстракция каротиноидов из растительных объектов проводится неполярными растворителями, например, *n*-гексаном или хлороформом, при нагревании, что в большинстве случаев требует дополнительной обработки сырья вспомогательными реагентами [14, 15]. В результате подобных технологических операций, как правило, происходит частичный переход *транс*-изомеров в *цис*-формы, что не может не влиять на биодоступность и физиологическую активность каротиноидов [225]. Изомеризацию ксантофиллов могут инициировать и другие факторы, например, механическое воздействие, в частности, интенсивное перемешивание [234], присутствие катионов металлов [211], повышение температуры, воздействие света [163]. Это негативное воздействие следует учитывать при разработке способов получения ксантофиллов и их производных.

Лютеин и зеаксантин получают не только экстракцией из растительных объектов, но и синтетическим путем, который характеризуется значительной многостадийностью, использованием агрессивных реагентов, катализаторов, высокой энергозатратностью и обладает низкой энантиоселективностью [191, 300, 368].

Идея получения соединений преимущественно в форме только одного изомера может быть реализована путем хемоэнзимного синтеза, основными преимуществами которого является стереоселективность, проведение реакций без нагревания при комнатной температуре, без повышения давления, без использования агрессивных растворителей. Такой путь позволяет осуществить синтез в органических (неводных) средах, а иммобилизация энзимов создает возможность их многократного использования [357].

В настоящее время липазы с заданными энантиоселективными свойствами получают методом направленной эволюции. При этом конкретная последовательность взаимодействия аминокислот в активном центре, взаимодействующим с субстратом, препятствует образованию нескольких изомерных форм целевого продукта. Боковые цепи аминокислот, входящих в активный центр, формируют максимально узкий промежуток-«тоннель» между аминокислотными цепями, что гарантирует пространственную ориентацию молекулы только в одном направлении [132].

При выборе биокатализатора мы учитывали собственный эксперимент, проведенный с применением Новозим 435, который позволил получить только *транс*-изомеры сложных эфиров ксантофиллов. Аналогичный тип биокатализатора использовался при синтезе пальмитата ретинола [220] и лаурата ретинола [170] 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 E-фактора синтеза [57].

Для подтверждения предположения о том, что синтез субстанций лютеина и зеаксантина в присутствии иммобилизованной липазы из *Candida antarctica* протекает стереоспецифично, предварительно часть этих исходных веществ была подвергнута изомеризации, которую проводили согласно [170, 330] обработкой растворов указанных ксантофиллов 1 ммоль 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 в условиях, приведенных в Главе 2 (Рисунки 4.45 – 4.46).

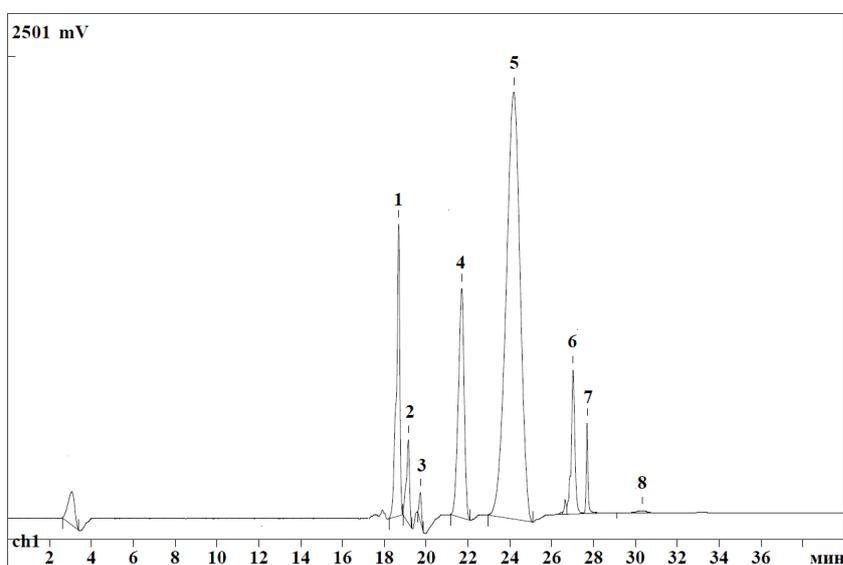


Рисунок 4.45 – Хроматограмма раствора лютеина после изомеризации йодом: пик 1 – 13-*Z*-лютеин, пики 2,3 – неидентифицированные изомеры лютеина, пик 4 – 13'-*Z*-лютеин, пик 5 – *all-trans*-лютеин, пик 6 – 9-*Z*-лютеин, пик 7 – 9'-*Z*-лютеин, пик 8 – неидентифицированный изомер лютеина

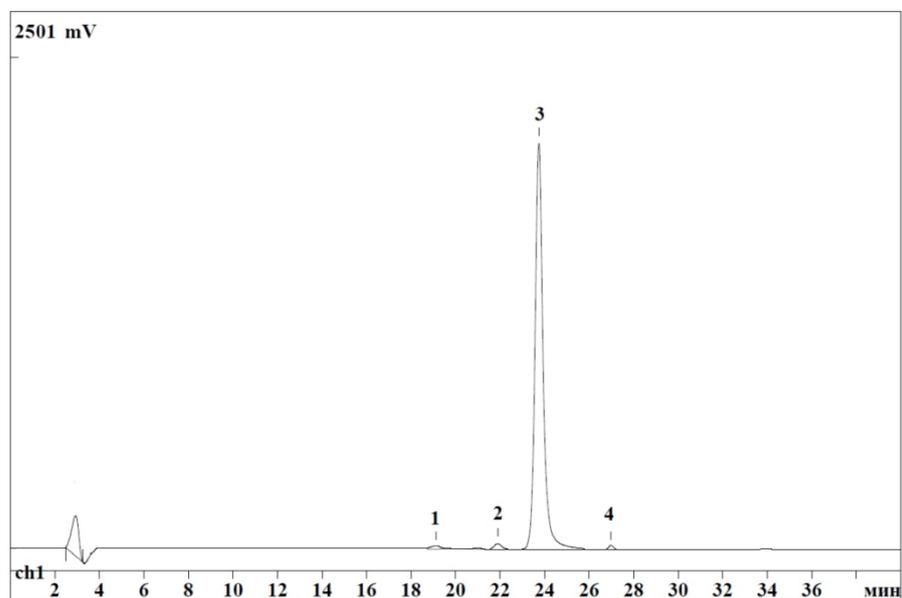


Рисунок 4.46 – Хроматограмма раствора после получения *all-trans*-изомера лютеина: пик 1 – 13-*Z*-лютеин, пик 2 – 13'-*Z*-лютеин, пик 3 – *al-trans*-лютеин, пик 4 – 9-*Z*-лютеин

Идентификацию изомеров лютеина проводили в соответствии с очередностью выхода и по относительным временам удерживания на

основании данных статьи [61]. В таблице 4.7 приведены результаты определения количественного содержания изомеров лютеина и зеаксантина.

Таблица 4.7 – Содержание *транс*-изомеров в субстанциях лютеина и зеаксантина

Образцы ксантофиллов	Содержание <i>транс</i> -изомеров до энзимного синтеза, %	Содержание <i>транс</i> -изомеров после энзимного синтеза, %
Лютеин Sigma-Aldrich	95,2	99,7
Зеаксантин Sigma-Aldrich	94,7	99,5
Лютеин из растительного объекта	76,4	99,6
Зеаксантин из растительного объекта	73,1	99,4
Лютеин после изомеризации	57,5	99,4
Зеаксантин после изомеризации	52,3	99,3

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, содержание *транс*-изомеров составило 76,4 % и 73,1 %, соответственно. После проведенной изомеризации количество *транс*-изомеров лютеина и зеаксантина в образцах составляло 57,5 % и 52,3 %, соответственно.

Таким образом, в эксперименте участвовали как коммерческие образцы лютеина и зеаксантина (Sigma-Aldrich), так и выделенные из растительных объектов по ранее описанной методике [16, 19] и их *транс*- и *цис*-изомеры.

Получение субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров строилось на двухэтапном синтезе (Рисунок 4.47).

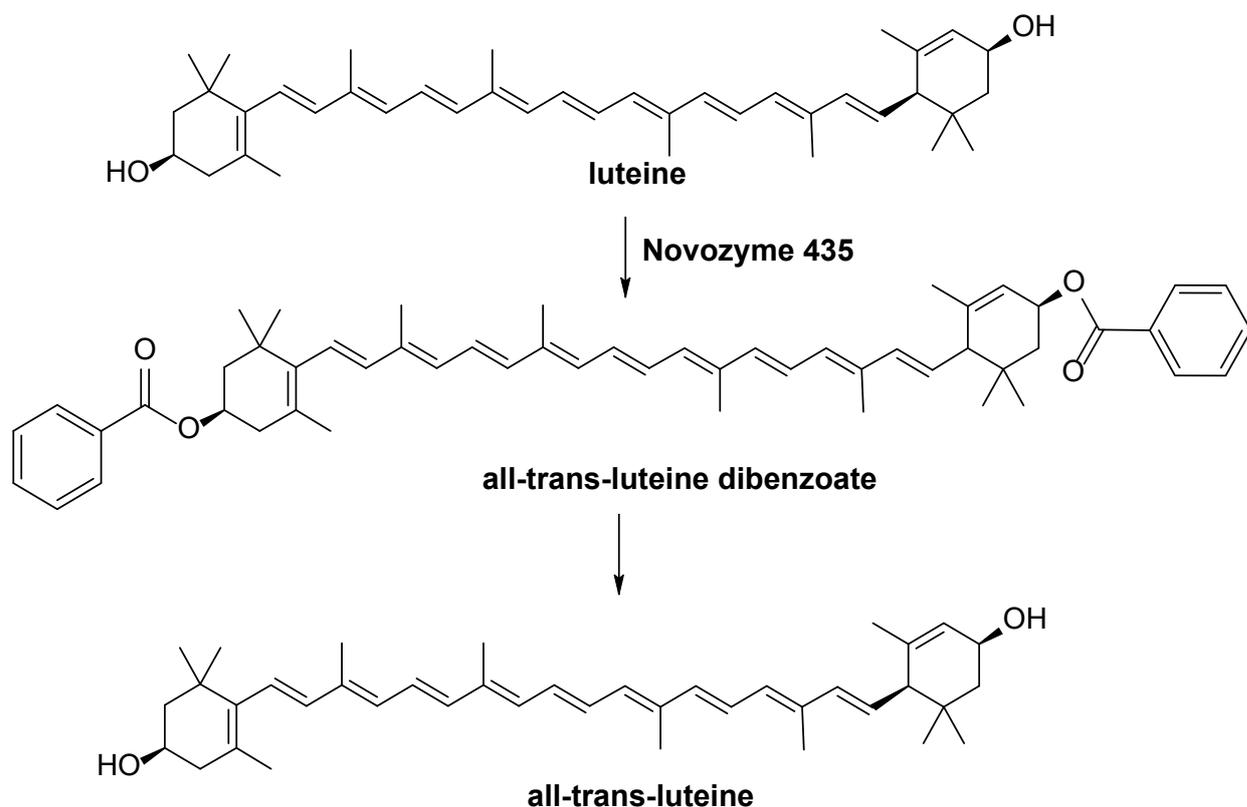


Рисунок 4.47 – Схема получения *транс*-изомеров на примере лютеина

На первой стадии предполагалось провести этерификацию ксантофиллов, катализируемую Новозим 435. Этерификация происходит 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» [148, 149]. Поэтому продукт на первой стадии – *all-trans*-добензоат 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 второй стадии синтеза следовало провести стереосопряженный гидролиз эфиров лютеина и зеаксантина, который приводит к образованию *all-trans*-лютеину и *all-trans*-зеаксантину.

Для этерификации использовали кислоту бензойную, т. к. она является ароматической кислотой, имеет относительно простое строение, характеризуется низкой токсичностью, обладает свойствами консерванта, легко детектируется в процессе ВЭЖХ-анализа и ранее была использована для получения эфиров ксантофиллов. Вероятно, в дальнейшем для получения *транс*-изомеров лютеина и зеаксантина можно будет использовать и другие кислоты, с которыми получены сложные эфиры лютеина и зеаксантина (Глава 4, раздел 4.3).

Соотношение ксантофилл : кислота бензойная рассчитано нами с учетом их эквимольного соотношения согласно уравнению реакции [21], 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*-гексана, толуола, метанола 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 (Глава 4, таблица 4.5): 60 °С, 4,5 ч, 55 об/мин.

Другим фактором, важным с экономической точки зрения, является кратность использования энзима. В Разделе 4.2 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 (Рисунок 4.48).

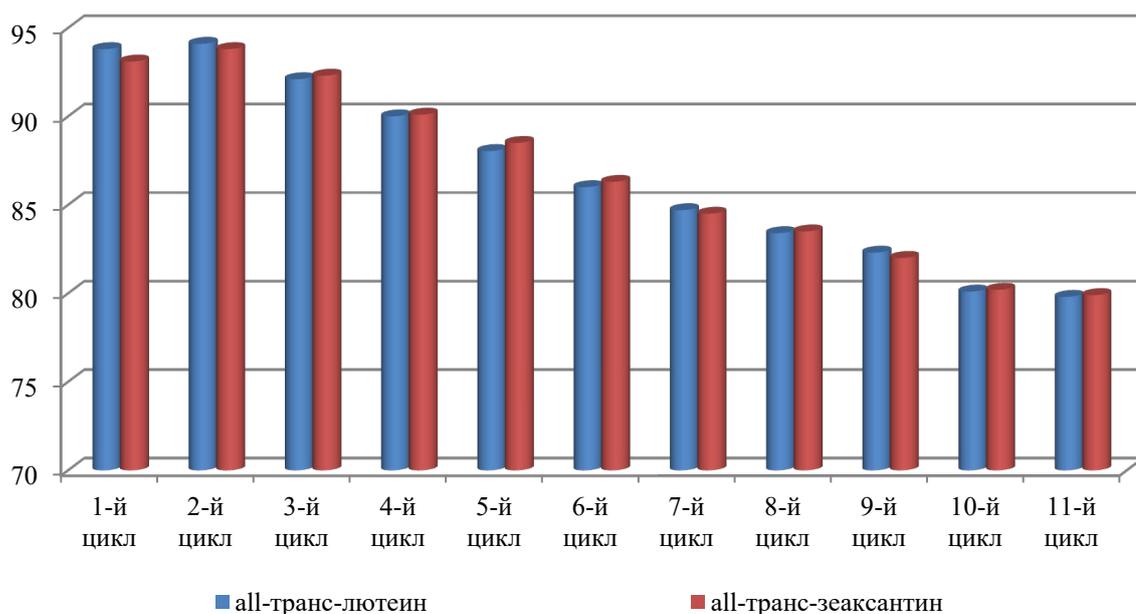


Рисунок 4.48 – Динамика накопления целевого продукта в зависимости от цикличности использования биокатализатора

Несомненным плюсом предложенного подхода является возможность многократного использования биокатализатора. Как следует из данных диаграммы (Рисунок 4.48), 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 экономически значим, однако, как уже оговаривалось выше, вероятней всего, при масштабировании методики или замене катализатора аналогичным необходимо будет экспериментально подтверждать его эффективность, т. к. этот параметр крайне зависим коммерчески.

Анализ всех полученных образцов после синтеза показал высокое содержания *транс*-изомеров – более 99 % – и чистоту продукта (Таблица 4.7), что подтверждает высокую энантиоселективность способа. 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, возможно, связано с переходом *цис*-изомеров в *транс*-форму под действием фермента или других благоприятных условий обратной изомеризации.

Резюмируя обсуждение результатов эксперимента, можно констатировать, что предложенный способ получения *all-trans*-изомеров лютеина и зеаксантина имеет перспективы использования при получении субстанций и СО, содержащих только один тип изомера, причем 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.

Методики идентификации, определения примесей и количественного содержания послужили основой для разработки проектов ФС для соединений С.9 и С.19 (Приложение 2).

Результаты эксперимента, представленные в главе 4, отражены в следующих публикациях [21, 22, 23, 28, 35, 36, 37, 38, 39, 273].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

Из представленного выше экспериментального материала следует, что:

1) положительный результат при синтезе сложных эфиров свидетельствует о принципиальной возможности получения нового класса полусинтетических производных ксантофиллов;

2) при условии адаптации разработанные нами условия синтеза сложных эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина можно использовать для работы с другими ксантофиллами;

3) расширение исследований с целью получения индивидуальных сложных эфиров ксантофиллов, а также их дальнейшее использование в фармакологических экспериментах позволят выявить некоторые взаимосвязи между структурой, селективным накоплением ксантофиллов и их эфиров в тканях и органах;

4) более высокая устойчивость эфиров ксантофиллов, например к окислению, позволит решить проблемы их стабилизации;

5) стереоселективность биокатализа обеспечивает высокую степень чистоты полусинтетических сложных эфиров ксантофиллов. Вероятно, минимизация количества изомеров в целевом продукте повысит чистоту, безопасность и биологическую эффективность продукта. С этой точки зрения расширяется возможность их использования в лечении различных заболеваний, и вместе с этим открывается перспектива целенаправленного транспорта некоторых ЛС;

6) получение образцов субстанций зеаксантина и лютеина, содержащих только один тип изомеров, с высоким уровнем чистоты имеет общетеоретическое и принципиальное значение в области не только синтеза фармакологически активных субстанций, но и создании СО для любых классов соединений, т. к. их использование обеспечивает не только аналитическую достоверность и воспроизводимость исследований, но и достоверность фармакологического эксперимента.

ГЛАВА 5 СИНТЕЗ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФЛАВОНОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

5.1 Экспериментальный выбор предварительных условий этерификации производных флавоноидов

Теоретическое обоснование выбора объектов химической модификации флавоноидов (Глава 3, разделы 3.3 и 3.4) показало, что целесообразным является синтез 22 сложных эфиров для четырех агликонов – кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина.

Далее, следуя дизайну исследования, необходимо было экспериментально подтвердить возможность получения сложных эфиров выбранных флавоноидов.

Этерификацию флавоноидов проводят методами традиционного химического синтеза или в присутствии биокатализаторов [256, 352].

К недостаткам традиционных химических подходов с точки зрения принципов «зеленого» синтеза [57] 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 [11]. Их использование 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 [57].

Однако не всегда биокатализ позволяет избежать органической среды синтеза. Так, в работах [82, 238] получение пентаацетилкверцетина и аминокзащищенных производных кверцетина проводилось в среде пиридина

с уксусным ангидридом и при 180 °С в течение 5–48 часов. В патенте [349] описан способ получения сложных эфиров флавоноидов в среде одного из перечисленных растворителей – пиридина, хлороформа, толуола или ацетона – при температуре около 100 °С. При этом приведенные условия не обеспечивают региоселективности этерификации: выход целевого продукта находился на уровне 10 % – 60 %, но совместно с образовавшимися побочными моно-, ди- и полиэфирами.

Учитывая дальнейшую фармацевтическую направленность применения субстанций модифицированных флавоноидов, мы 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 [153], однако их использование в лабораторных и промышленных условиях усложняется необходимостью дополнительного введения в реакционную смесь стехиометрических количеств соответствующего ацилкофермента А [122].

Имеется обширная информация по этерификации флавоноидов в присутствии липазы В *Candida antarctica* (Новозим 435) [54, 182, 245, 263, 290, 328]. Во всех описанных случаях этерификации подвергались флавоноиды-гликозиды, и ацилирование при этом происходило региоселективным путем по гидроксильным группам углеводных остатков, а не агликонов. Например, были получены сложные эфиры рутина по 4'''-ОН-положению рамнозного остатка [290] или эфиры кофейной и *n*-кумаровой кислот с изокверцитрином и хризантемином по 6''-О-положению [245].

Вышеупомянутые условия этерификации предполагали температурный режим в интервале от 20 °С до 50 °С и время этерификации от нескольких часов до 7 суток [196, 231, 290].

В предыдущем эксперименте по этерификации производных ксантофиллов (Глава 4, раздел 4.1) мы остановили свой выбор на биокатализаторе – липазе В *Candida antarctica* (Новозим 435). Для получения сопоставимых результатов по энзимной этерификации производных каротиноидов и производных флавоноидов в эксперименте было предложено использовать тот же биокатализатор.

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 соотношение агликон-кислота, временной фактор, скорость перемешивания реакционной смеси, температурный режим. Эксперимент проведен на примере образования моноэфира нарингенина и бензойной кислоты – нарингенин 4'-бензоата (соединение F.1). Контролируемым показателем служило количество образовавшегося целевого продукта – моноэфира и побочного продукта реакции – диэфира.

На начальном этапе было изучено влияние количественного соотношения агликон-кислота. Региоселективное образование нарингенин-4'-бензоата (соединение F.1) теоретически должно осуществляться согласно уравнению реакции, приведенному на рисунке 5.1.

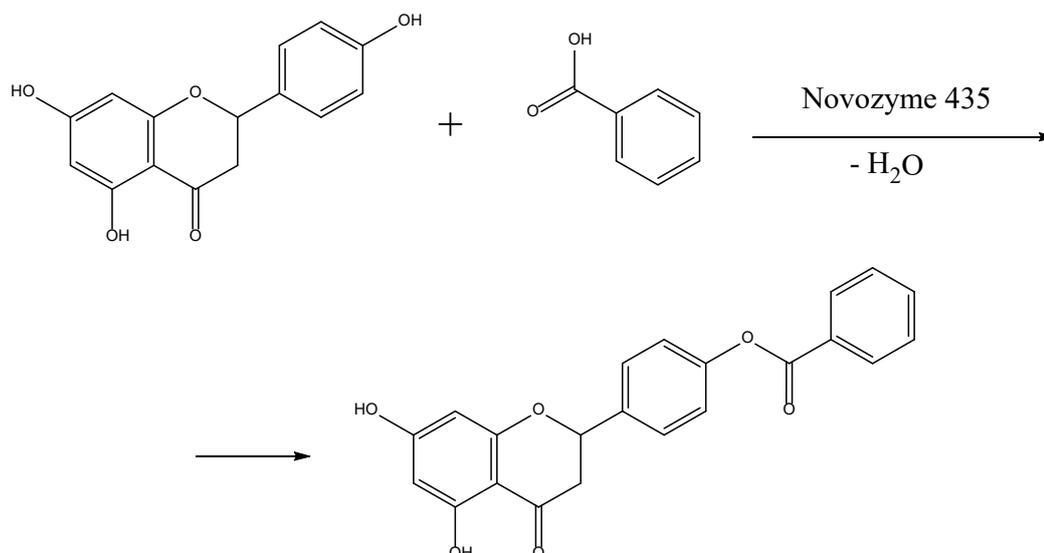


Рисунок 5.1 – Синтез 4'-моноэфира нарингенина и бензойной кислоты (нарингенин-4'-бензоат – соединение F.1)

Экспериментально были апробированы следующие молярные соотношения – 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 %. С учетом результатов собственных предварительных исследований [31,274, 275] весь дальнейший эксперимент был проведен при мольном соотношении агликон-кислота – 2:3.

При выявлении 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 5.2). Время синтеза исследовали в интервале от 0 до 12 ч. Поскольку эксперимент был предварительный и одной из целей использования биокаталитической схемы синтеза было по возможности

снизить температуру процесса, то этот опыт проводили при верхнем значении комнатной температуры 25 °С [11].

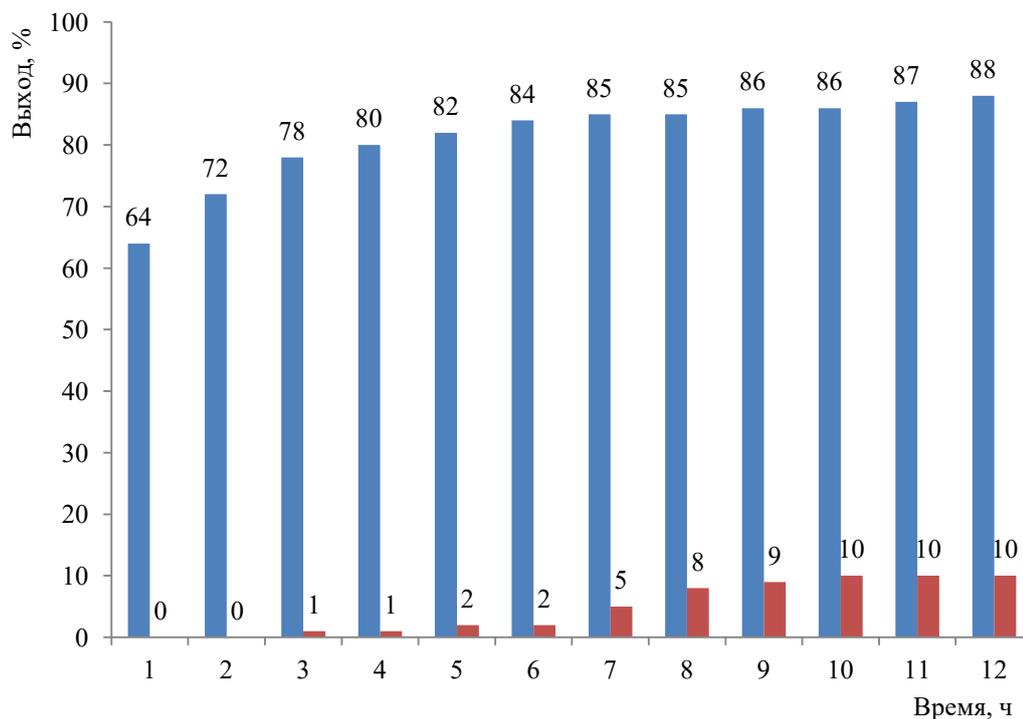


Рисунок 5.2 – Зависимость динамики образования основного продукта (синий) моноэфира и побочного продукта (красный) диэфира от времени синтеза

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 полученный результат, 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. в этот период

образуется и 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 (Глава 4, раздел 4.2) [274, 275]. С учетом этих данных 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 5.3).

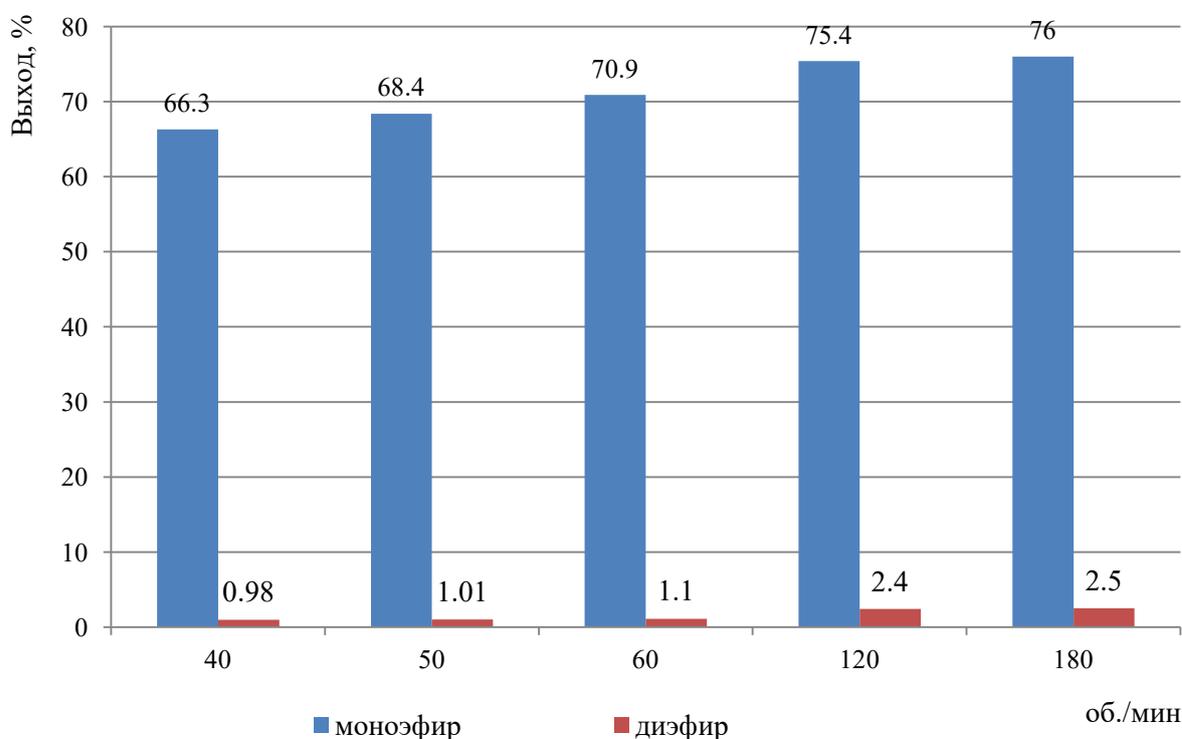


Рисунок 5.3 – Зависимость выхода целевого и побочного продукта реакции от скорости перемешивания реакционной среды

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

Можно сделать предварительный вывод о том, 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 5.4).

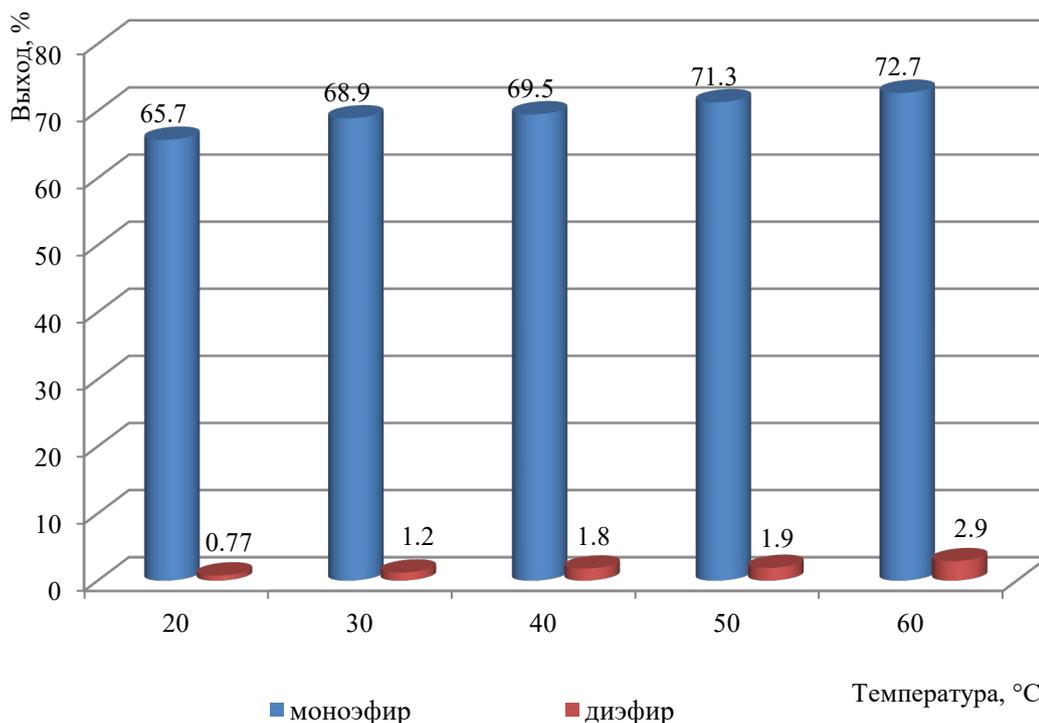


Рисунок 5.4 – Влияние температуры синтеза на выход 4'-моноэфира нарингенина (соединение F.1)

Пробный эксперимент показал, что температура оказывает значимое влияние на выход продукта, т. к. сохраняя неизменными остальные параметры, повышение температуры увеличивает выход целевого продукта от 66 % до 73 %. С учетом этих данных в дальнейший план эксперимента включили показатель «температура», а его вводным значением выбрали 25 °C как максимальное значение для понятия «комнатная температура» [11].

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.

5.2 Оптимизация параметров синтеза новых сложных эфиров флавоноидов методом математического планирования эксперимента

При разработке методики синтеза эфиров флавоноидов с использованием биокатализатора, нами, как и в случае с ксантофиллами, предложено использовать метод математического планирования эксперимента. Данный подход показал свою эффективность, т. к. сокращает количество опытов, необходимых для установления оптимальных параметров, а также позволяет определить наиболее значимые факторы и степень их влияния на процесс синтеза.

Ввиду того что все исходные продукты характеризуются очень близкими химическими свойствами, нами предварительно изучено влияние факторов на примере синтеза нарингенин 4'-бензоата (соединение F.1) и полученные результаты экстраполированы на синтез других эфиров по разработанной методике.

Выбор значимых факторов является ключевым этапом при построении математической модели, т. к. в ней определяются основные переменные, которые будут участвовать в процессе синтеза. Выявление всех значимых факторов помогает улучшить понимание процесса и достичь более эффективных результатов. На основании наших предварительных исследований (Глава 5, раздел 5.1) и с учетом данных, описанных в работе [306], посчитали целесообразным изучить влияние таких факторов, как температура, время протекания реакции, количество биокатализатора и скорость перемешивания.

Для математического описания рассматриваемого процесса синтеза предварительно был построен план эксперимента, вводные данные которого представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – 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.

План и результат эксперимента по получению 4'-моноэфира нарингенина (соединение F.1) представлен в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – План и результат эксперимента по получению 4'-моноэфира нарингенина (соединение F.1)

№ опыта	Уровни факторов				Экспериментальное значение Y , %
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	2	3	4	5	6
1	+1	+1	+1	+1	71,15
2	+1	-1	+1	+1	70,89
3	-1	+1	+1	+1	70,11
4	-1	-1	+1	+1	68,48
5	+1	+1	-1	+1	71,03
6	+1	-1	-1	+1	70,72

Продолжение таблицы 5.2

1	2	3	4	5	6
7	-1	+1	-1	+1	70,04
8	-1	-1	-1	+1	68,55
9	+1	+1	+1	-1	69,86
10	+1	-1	+1	-1	68,22
11	-1	+1	+1	-1	67,93
12	-1	-1	+1	-1	66,15
13	+1	+1	-1	-1	69,88
14	+1	-1	-1	-1	68,30
15	-1	+1	-1	-1	67,91
16	-1	-1	-1	-1	66,12

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии.

$$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{1105,3}{16} = 69,08 \quad (5.1)$$

$$b_1 = \frac{\sum y \cdot x_1}{n} = \frac{14,76}{16} = 0,923 \quad (5.2)$$

$$b_2 = 0,655, b_3 = 0,015, b_4 = 1,038$$

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.

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

$$y = 69,08 + 0,923x_1 + 0,655x_2 + 0,015x_3 + 1,038x_4 \quad (5.3)$$

Далее, согласно матрице эксперимента, по результатам опытов в условиях основного уровня, отраженных в таблице 5.1, 5.2 и 5.3, проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнений, сначала определили оценку дисперсии:

Таблица 5.3 – Результаты опытов проведенных в условиях основного уровня факторов

Y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$	$\sum_{n=6} y = 411,17$ $\bar{y} = \frac{\sum y}{n} = 68,53$ $\sum (y - \bar{y})^2 = 1,45$
68,55	0,021667	0,000469	
68,93	0,401667	0,161336	
67,99	-0,538330	0,289803	
69,25	0,721667	0,520803	
67,84	-0,688330	0,473803	
68,61	0,081667	0,006669	

$$S_y^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1} = \frac{1,45}{5} = 0,29 \quad (5.4)$$

Затем определили среднюю квадратичную погрешность:

$$S_{bi} = \sqrt{\frac{S_y^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0,29}{5}} = \sqrt{0,058} = 0,24 \quad (5.5)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [11]:

$$t_0 = \frac{b_0}{S_{bi}} = \frac{68,53}{0,24} = 285,5 \quad (5.6)$$

$$t_1 = \frac{b_1}{S_{bi}} = \frac{0,923}{0,24} = 3,84 \quad (5.7)$$

$$t_2 = 2,73; \quad t_3 = 0,06; \quad t_4 = 4,33$$

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

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывают скорость перемешивания (t_4), температура (t_1) и время реакции (t_2).

Таким образом, математическое моделирование процесса синтеза способствовало установлению количественной степени влияния факторов.

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

$$y=69,08+0,923x_1+0,655x_2+1,038x_4 \quad (5.8)$$

Для проверки адекватности математической модели в окончательное уравнение регрессии подставляли данные таблицы и рассчитывали теоретические значения по получению 4'-моноэфира нарингенина (соединение F.1), эти данные представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Значения экспериментального и рассчитанного получения 4'-моноэфира нарингенина (соединение F.1) по окончательному уравнению регрессии

№ опыта	Пример определения расчетного содержания ($U_{\text{расчетное}}$): $y_1=69,08+0,923(+1)+0,655(+1)+1,038(+1)=52,53$		
	$U_{\text{экспериментальное}}$	$U_{\text{расчетное}}$	$(y_o - y_p)^2$
1.	71,15	71,70	0,302
2.	70,89	70,39	0,250
3.	70,11	69,85	0,068
4.	68,48	68,54	0,004
5.	71,03	71,70	0,449
6.	70,72	70,39	0,109
7.	70,04	69,85	0,036
8.	68,55	68,54	0,000
9.	69,86	69,62	0,058
10.	68,22	68,31	0,008
11.	67,93	67,77	0,026
12.	66,15	66,46	0,096
13.	69,88	69,62	0,068
14.	68,30	68,31	0,000
15.	67,91	67,77	0,020
16.	66,12	66,46	0,116

По полученным данным рассчитывали сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности, где k – число факторов:

$$S_R = \sum(y_{\text{э}} - y_{\text{р}})^2 = 1,61 \quad (5.9)$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N-(k+1)} = \frac{1,61}{16-5} = 0,15 \quad (5.10)$$

После этого рассчитывали значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{0,15}{0,29} = 0,52 \quad (5.11)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 0,52, что не превышает табличного значения этого показателя – $F_{0,95}(15,5) = 2,90$ [11], 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, результаты которого представлены в таблице 5.5. 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. Результаты поиска оптимальных условий синтеза методом крутого восхождения представлены в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Определение оптимальных параметров синтеза методом крутого восхождения

Характеристика	X ₁ , °С	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 при температуре 50 °С, времени реакции 6 ч, количестве биокатализатора 0,5 г и скорости перемешивания 120 об/мин. 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 (соединение F.1) выявить оптимальные параметры синтеза 4'-эфиров остальных флавоноидов: мольное соотношение агликон-кислота – 2:3, количество энзима – 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. Оптимизированная методика синтеза

сложных эфиров флавоноидов по положению 4' приведена в Главе 2.

5.3 Синтез производных флавоноидов с применением биокатализаторов

Основываясь на теоретическом и экспериментальном выборе условий реакции этерификации кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина (Разделы 5.1, 5.2), кислот-кандидатов (Глава 3, раздел 3.4), далее проводили синтез сложных эфиров флавоноидов-агликонов. Оптимизированная методика синтеза соединений F.1 – F.12 приведена в Главе 2.

На рисунках 5.1 (Глава 5, раздел 5.1), 5.5, 5.6 показаны схемы синтеза сложных эфиров нарингенина, кверцетина и гесперетина. При взаимодействии со всеми изученными кислотами с участием нарингенина и кверцетина происходит региоселективная этерификация по положению C4' цикла В.

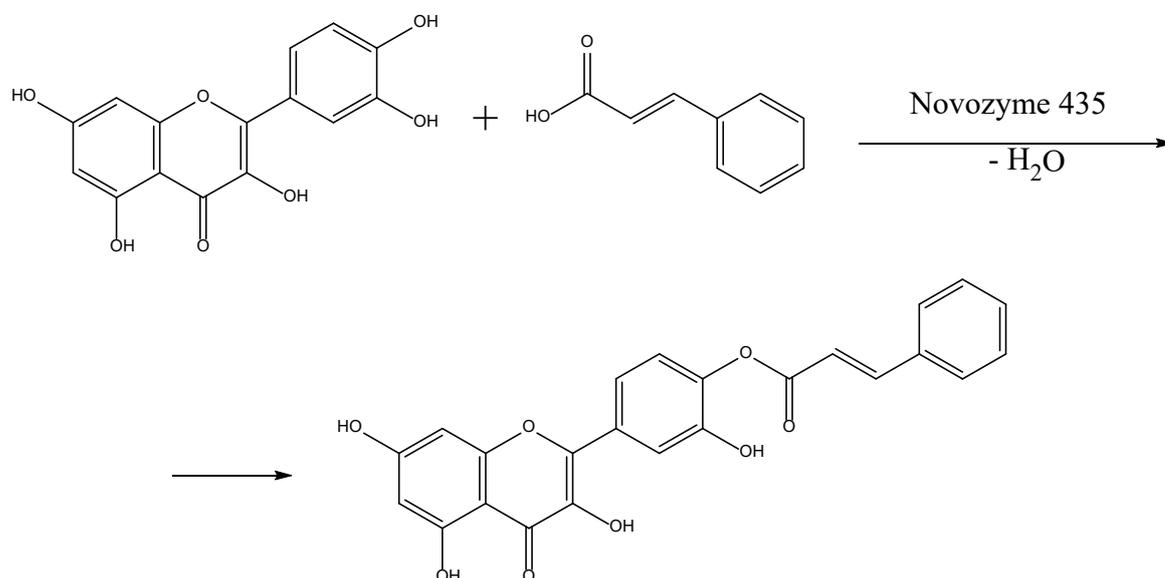


Рисунок 5.5 – Синтез 4'-моноэфира кверцетина и коричной кислоты
(соединение F.7)

Схема на рисунке 5.6 отражает химизм образования сложного эфира гесперетина, для которого со всеми кислотами, участвовавшими в эксперименте, происходило региоселективное образование 3'-моноэфиров.

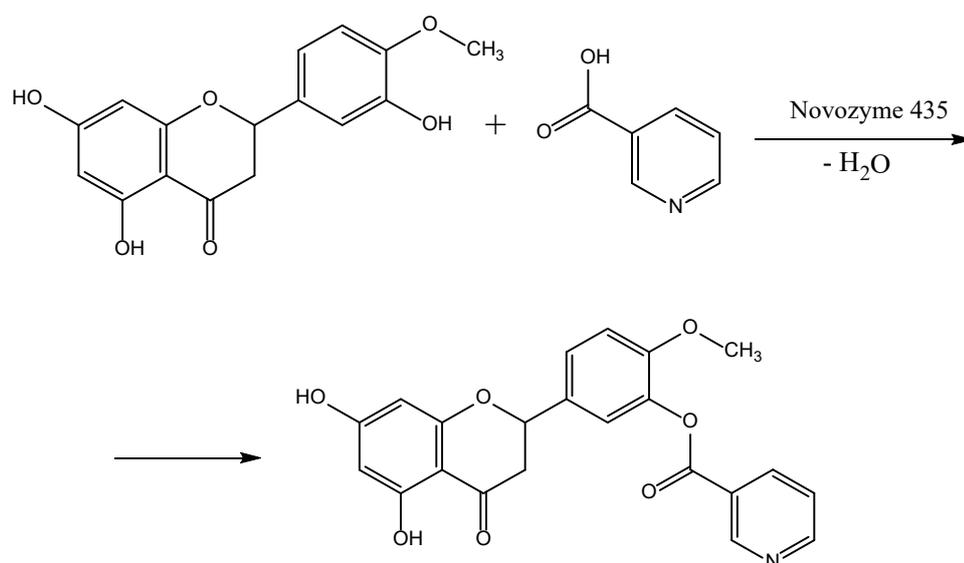


Рисунок 5.6 – Синтез 3'-моноэфира гесперетина и никотиновой кислоты (соединение F.9)

При получении сложных эфиров флавоноидов следует обращать внимание на число этерифицируемых гидроксигрупп флавоноида. Так, в работе [116] авторами предварительно *in silico* было спрогнозировано, что конфигурация активного центра катализатора липазы В из *Candida antarctica* (CALB) должна обеспечить этерификацию кверцетина винилацетатом по С3'-гидроксигруппе бокового фенильного радикала флавоноида. Однако эксперимент показал, что кверцетин ацилируется региоселективно в первую очередь по положению С4' с выходом 35 % и только затем и по положению С3'. С учетом данных этого эксперимента очевидно, что в реакционной среде будет образовываться некоторое количество побочного продукта – диэфира флавоноида, которое мы контролировали на предварительном этапе эксперимента.

В процессе синтеза эфиров выбранных флавоноидов-агликонов контроль чистоты исходных и конечных продуктов реакции осуществляли методом ВЭЖХ в условиях, представленных в Главе 2, принимая во внимание изменение качественного и количественного состава реакционной смеси.

Для анализа первую пробу отбирали после добавления всех реактивов, кроме фермента. 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) (соединение F.1). (Рисунки 5.7 – 5.10).

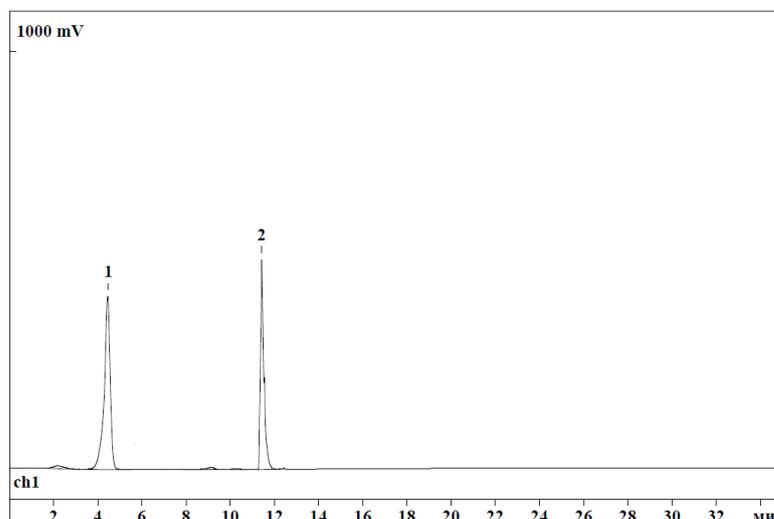


Рисунок 5.7 – Хроматограмма пробы реакционной смеси до начала синтеза нарингенина 4'-бензоата (соединение F.1):

1-бензойная кислота, 2- нарингенин

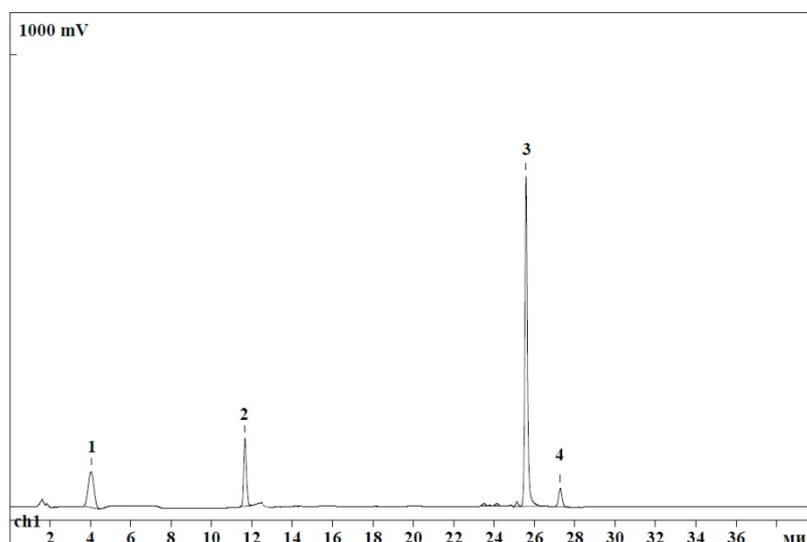


Рисунок 5.8 – Хроматограмма пробы реакционной смеси после окончания синтеза нарингенина 4'-бензоата (соединение F.1): 1-бензойная кислота, 2- нарингенин, 3- нарингенина 4'-бензоат, 4-примесь нарингенин 7,4'-дibenзоата

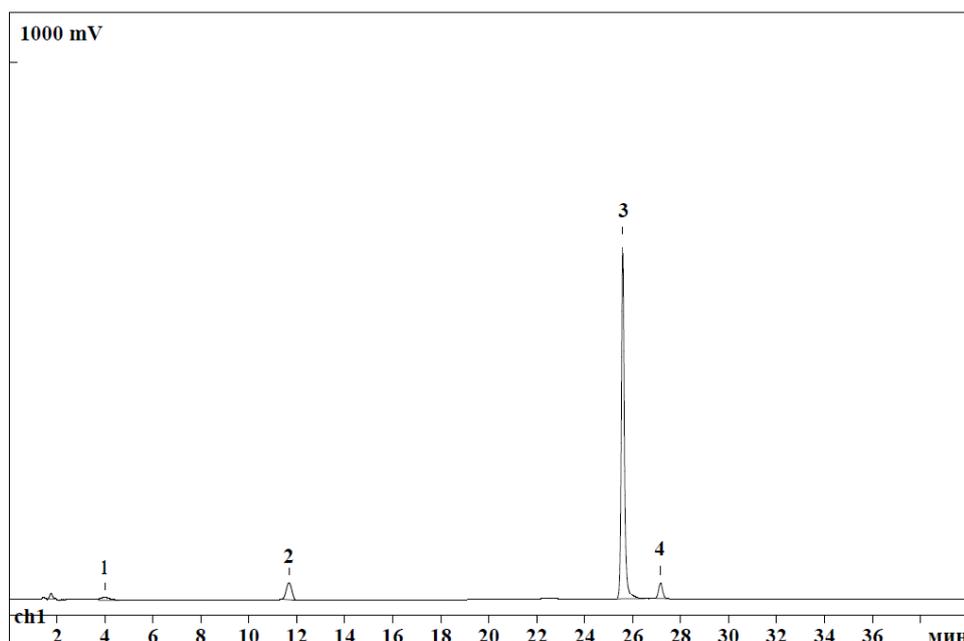
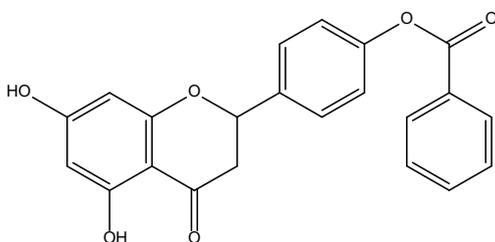
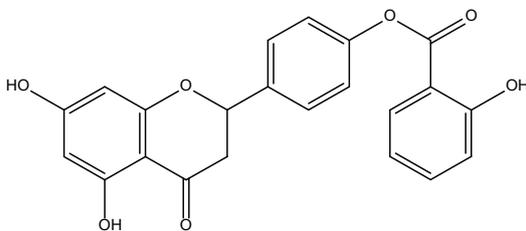


Рисунок 5.9 – Хроматограмма конечного продукта синтеза нарингенин 4'-бензоата после очистки: 1-бензойная кислота, 2- нарингенин, 3- нарингенина 4'-бензоат (соединение F.1), 4-примесь нарингенин 7,4'-дibenзоата

На рисунке 5.10 приведены формула, величина практического выхода, температура плавления синтезированных С4' эфиров флавоноидов – соединения F.1 – F.12.

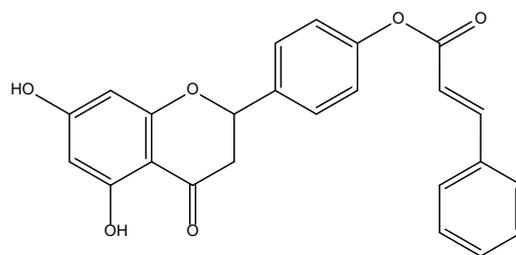


Нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1); Выход 0,655 г (87 %), т. пл. 229–232 °С



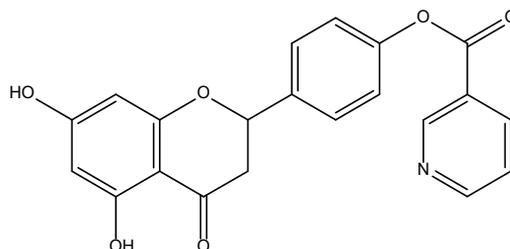
Нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2);

Выход 0,670 г (86 %), т. пл. 251–253 °С



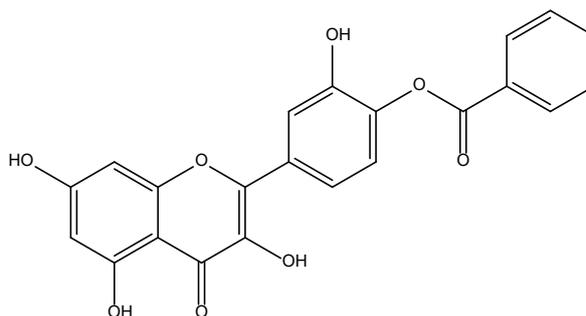
Нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3);

ВЫХОД 0,685 г (85 %), т. пл. 234–237 °С



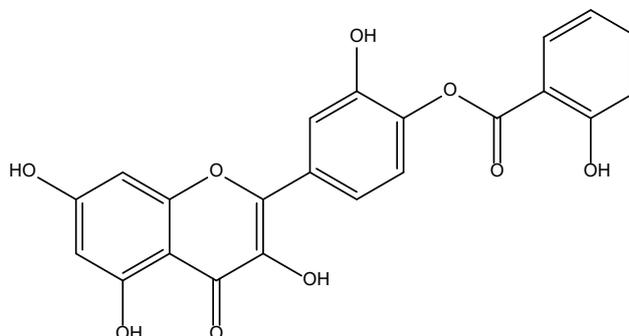
Нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4);

ВЫХОД 0,664 г (88 %), т. пл. 245–247 °С



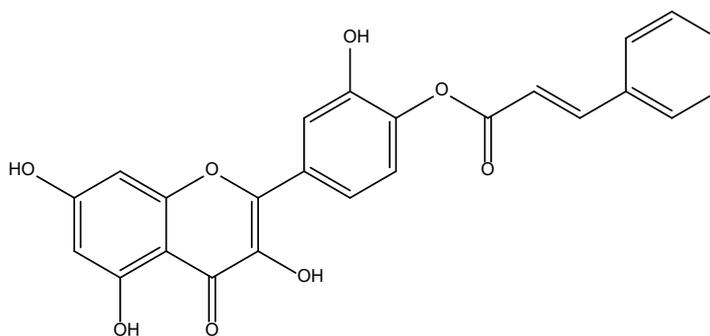
Кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5);

ВЫХОД 0,715 г (88 %), т. пл. 289–292 °С



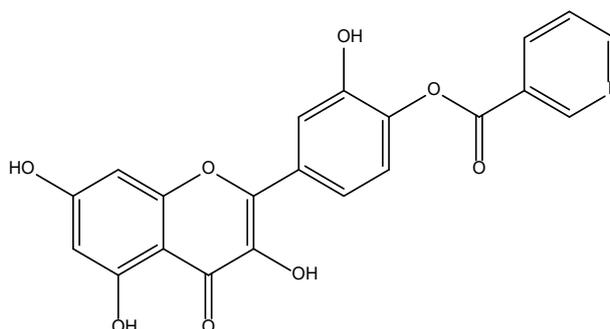
Кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.6);

ВЫХОД 0,717 г (85 %), т. пл. 322–324 °С



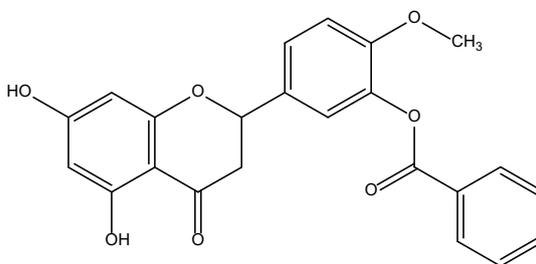
Кверцетин 4'-циннамат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.7);

ВЫХОД 0,760 г (88 %), т. пл. 297–299 °С



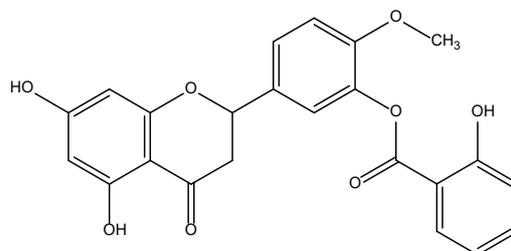
Кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8);

ВЫХОД 0,685 г (84 %), т. пл. 308–310 °С



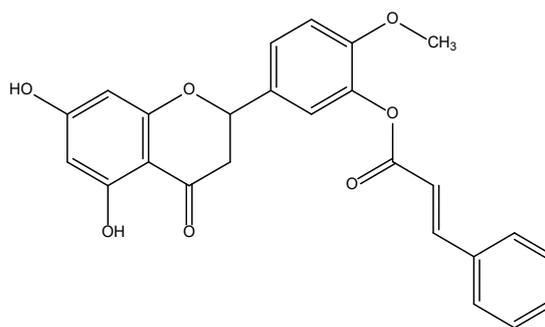
Гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9);

ВЫХОД 0,655 г (87 %), т. пл. 229–232 °С



Гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.10);

ВЫХОД 0,701 г (83 %), т. пл. 251–253 °С



Гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11);

выход 0,727 г (84 %), т. пл. 231–233 °С

а

Гесперетин 3'-никотинат 5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.12);

выход 0,694 г (85 %), т. пл. 244–246 °С

Рисунок 5.10 – Структурная формула соединений F.1 – F.12, практический выход и температура плавления

Как уже было показано (Глава 3, раздел 3.4, рисунок 3.4), значимую роль в стабилизации флавоноидов от окислительной деградации может играть получение их сложных эфиров по положению С3, поэтому такой подход к оптимизации молекул флавоноидов, вероятней всего, имеет перспективу развития.

В этом контексте представляются интересными опубликованные данные по проведению «защищенного» синтеза производных рутина, в частности 3-О-метилкверцетина и 7-О-бензоилкверцетина [350]. Авторы патента для получения С5, С7, С3', С4'-бензоилпроизводных рутина использовали бензоилхлорид и реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный продукт растворяли в кипящем этаноле и проводили кислотный гидролиз гликозида на водяной бане в течение 1 часа в присутствии кислоты соляной концентрированной. Далее полученный эфир концентрировали в ацетоне, метилировали кипячением в присутствии диметилсульфата в среде ацетона, после чего гидролизировали

эфирные связи в положениях С7, С5, С3', С4' в среде 10 % раствора калия гидроксида при температуре около 55 °С во избежание эффектов гидролиза. Продуктом синтеза являлся 3-О-метилкверцетин. Вторым разделом этого патента является получение 7-О-бензоилкверцетина, которое заключается в следующем: рутин растворяли в 5% – 10 % водном растворе буры, добавляли избыток бензоилхлорида, далее полученный 7-О-бензоилрутин подвергали кислотному гидролизу в присутствии соляной или серной кислот, нагревая на водяной бане, после охлаждения 7-О-бензоилкверцетин отделяли и перекристаллизовывали из смеси ацетон-метанол. Ключевым моментом синтеза в представленном патенте является то, что бензоилирование проводят в присутствии буры.

Нами была предложена и разработана методика синтеза сложных эфиров флавоноидов, базирующаяся на реакции образования эфира по положению С3 после «защиты» гидроксигрупп в положениях С3', С4', С5, С7 [25, 275].

На рисунке 5.11 приведен синтез сложного эфира кверцетина и 3,4,5-тригидроксибензойной (галловой) кислоты (соединение F.17). Синтез остальных эфиров при взаимодействии со всеми изученными кислотами с участием кверцетина и мирицетина происходит по аналогичной схеме.

На первом этапе проводили этерификацию по всем гидроксигруппам, для чего использовали реакцию Шоттена-Баумана и избыток бензоилхлорида в щелочной среде аналогично работе [350]. Температура реакции не должна превышать 55 °С, т. к. при повышенной температуре наблюдался процесс гидролиза, уменьшающий выход целевого продукта. Пентабензойный для кверцетина или гексабензойный для мирицетина эфиры выпадали 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.

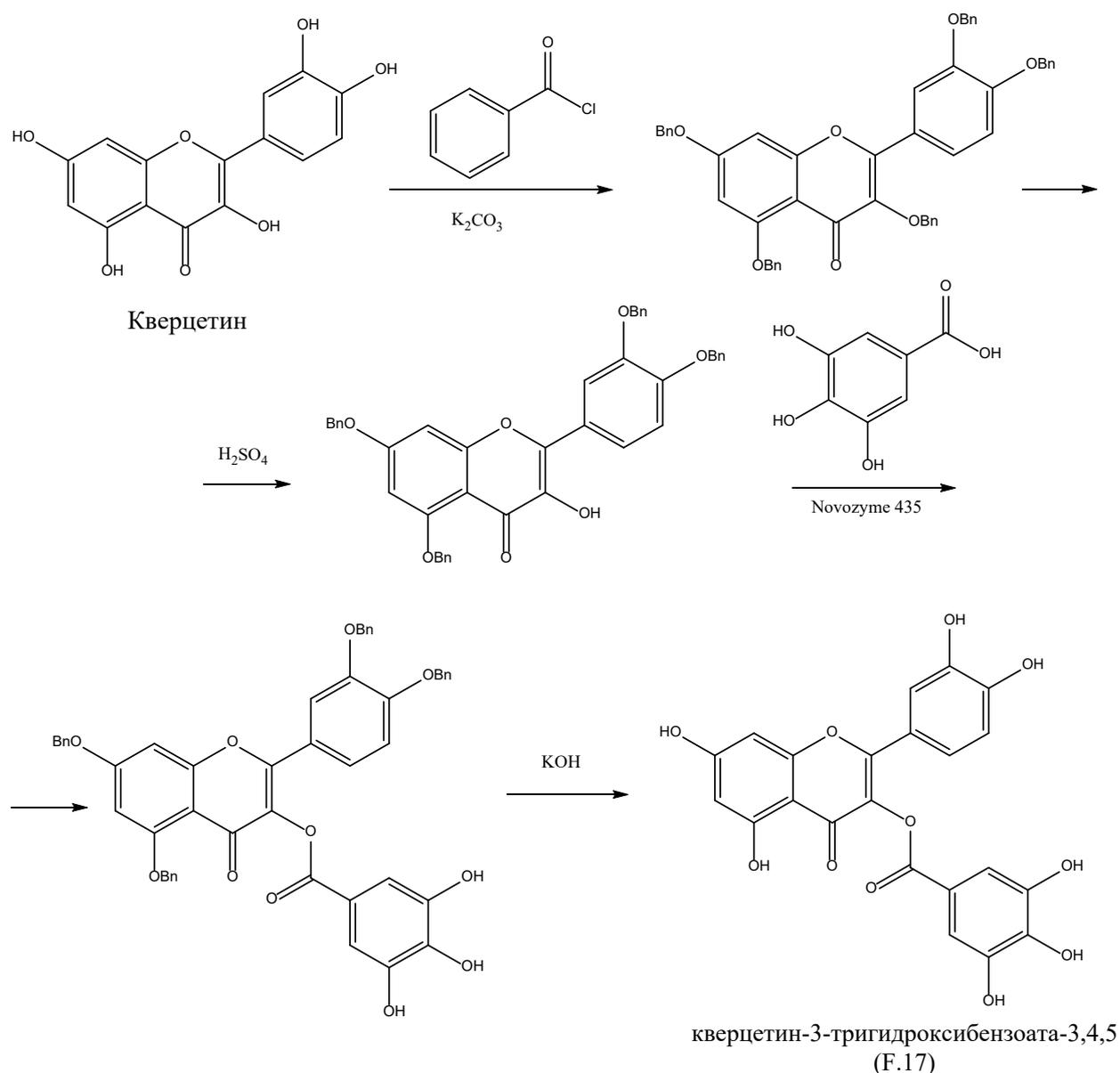


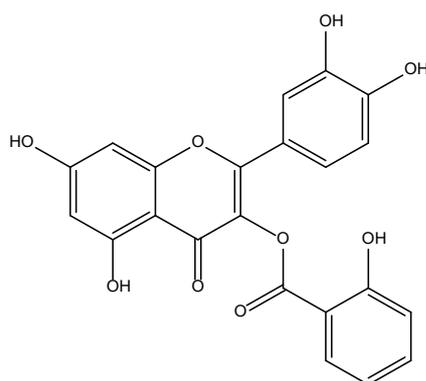
Рисунок 5.11 – Схема «защищенного» синтеза кверцетин-3-тригидроксибензоата-3,4,5 (соединение F.17)

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 pH 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.

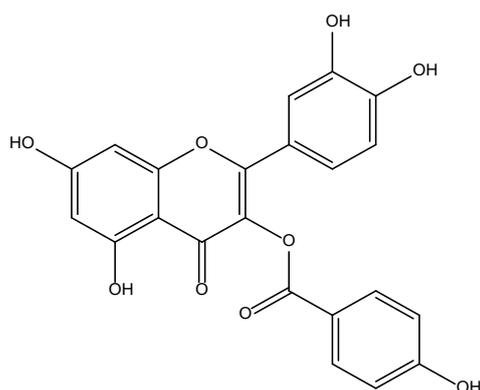
На четвертой стадии с помощью раствора калия гидроксида при температуре не выше 70 °С проводили гидролиз по положениям С3', С4', С5, С7. При этом эфирная связь в положении С3 не разрушалась, что обеспечивало использование спиртового раствора гидроксида калия в эквимольном соотношении 1:4 и нагревание реакционной среды не выше 70 °С в течение 7 мин. Целевой продукт синтеза выделяли в соответствии с методикой опубликованной нами в работах [25, 275].

Ниже приведены структура, величина практического выхода целевого продукта и установленное значение температуры плавления синтезированных эфиров нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина (Рисунок 5.12).

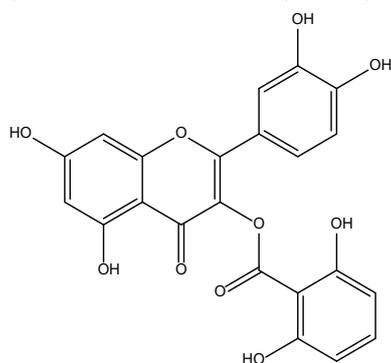


Кверцетин-3-салицилат (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксibenзоат) (соединение F.13);

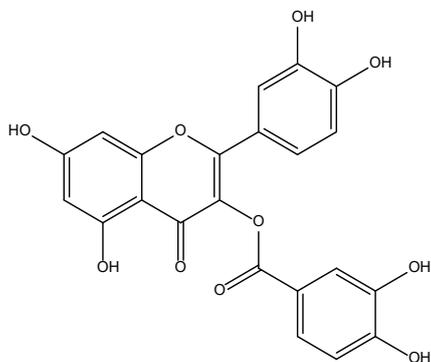
выход 0,701 г (83 %), т. пл. 321–323 °С



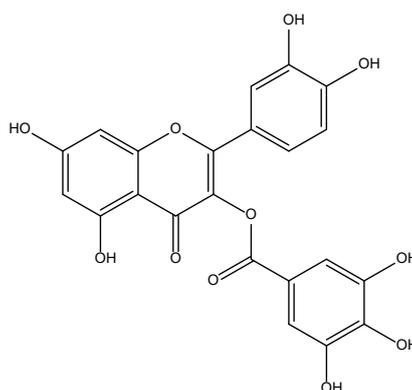
Кверцетин-3-гидроксibenзоат-4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксibenзоат)
(соединение F.14); ВЫХОД 0,694 г (82 %), т. пл. 321–324 °С



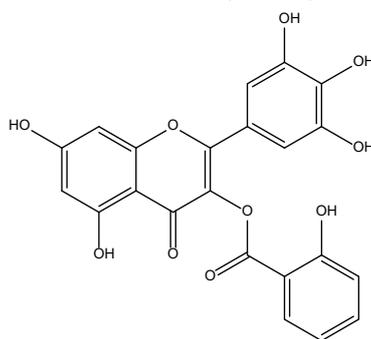
Кверцетин-3-дигидроксibenзоат-2,6 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксibenзоат)
(соединение F.15); ВЫХОД 0,685 г (78 %), т. пл. 329–331 °С



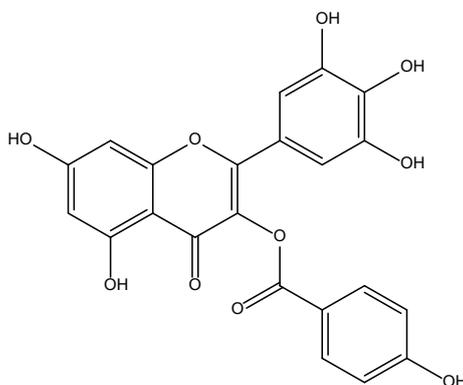
Кверцетин-3-дигидроксibenзоат-3,4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксibenзоат)
(соединение F.16); ВЫХОД 0,691 г (79%), т. пл. 328–331 °С



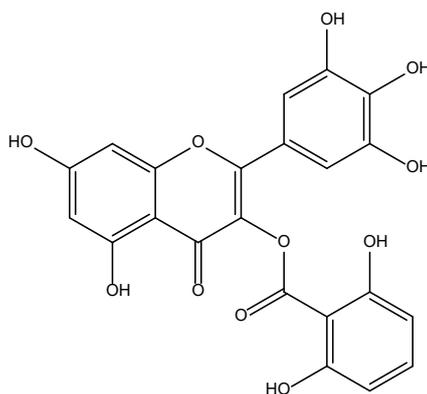
Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.17); выход 0,765 г (84 %), т. пл. 333–335 °С



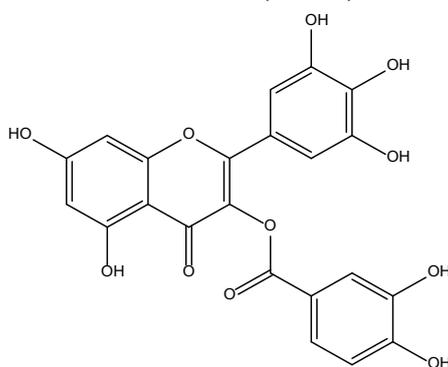
Мирицетин-3-салицилат (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.18); выход 0,693 г (79 %), т. пл. 360–362 °С



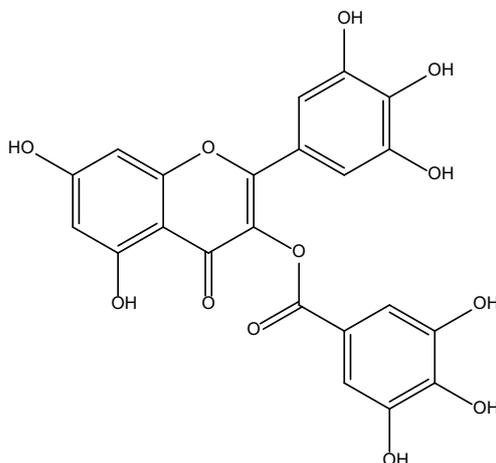
Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.19); выход 0,694 г (78 %), т. пл. 361–364 °С



Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.20); выход 0,685 г (75 %), т. пл. 369–371 °С



Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.21); выход 0,691 г (77 %), т. пл. 369–371 °С



Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.22); выход 0,771 г (82 %), т. пл. 373–375 °С

Рисунок 5.12 – Структурная формула, практический выход и температура плавления эфиров кверцетина и мирицетина, полученных «защищенным» синтезом

Таким образом, с применением энзимного катализа синтезировано 12 соединений (соединения F.1 – F.12), являющихся 4'-эфирами флавоноидов, и 10 сложных эфиров кверцетина и мирицетина (соединения F.13 – F.22) с региоселективной этерификацией по положению С3 пиранового фрагмента флавоноида.

5.4 Установление структуры и анализ сложных эфиров флавоноидов методами ЯМР и масс-спектрометрии

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 условиях, приведенных в Главе 2.

5.4.1 Идентификация сложных эфиров кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина методом ^1H ЯМР

Регистрацию спектров ^1H ЯМР проводили в условиях, приведенных в Главе 2. В качестве примера на рисунке 5.13 представлен типовой ^1H ЯМР-спектр кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (соединение F.14).

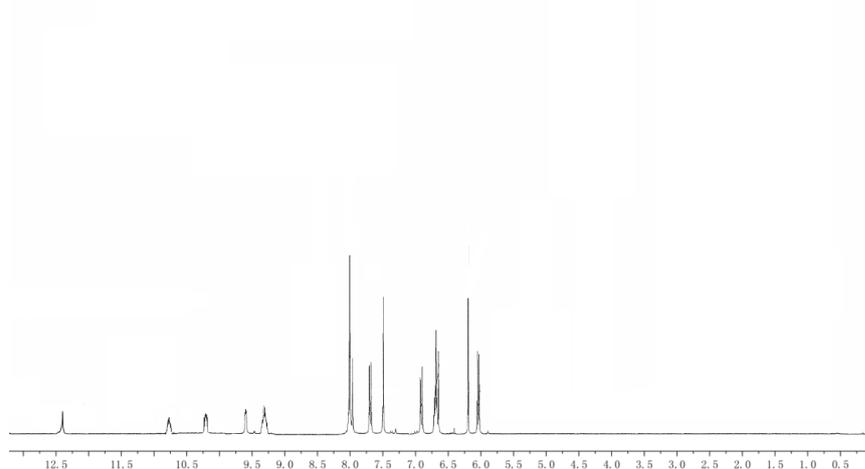


Рисунок 5.13 – ^1H ЯМР-спектр кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (соединении F.14)

Для упрощения процесса идентификации полученных соединений в их структуре можно выделить два ключевых фрагмента: ядро флавоноида и ацильный фрагмент, введенный в структуру реакцией этерификации. Каждый из них имел характерные сигналы. Для флавоноидов, входящих в структуру эфиров, были характерны следующие сигналы, представленные на рисунках 5.14 и 5.15.

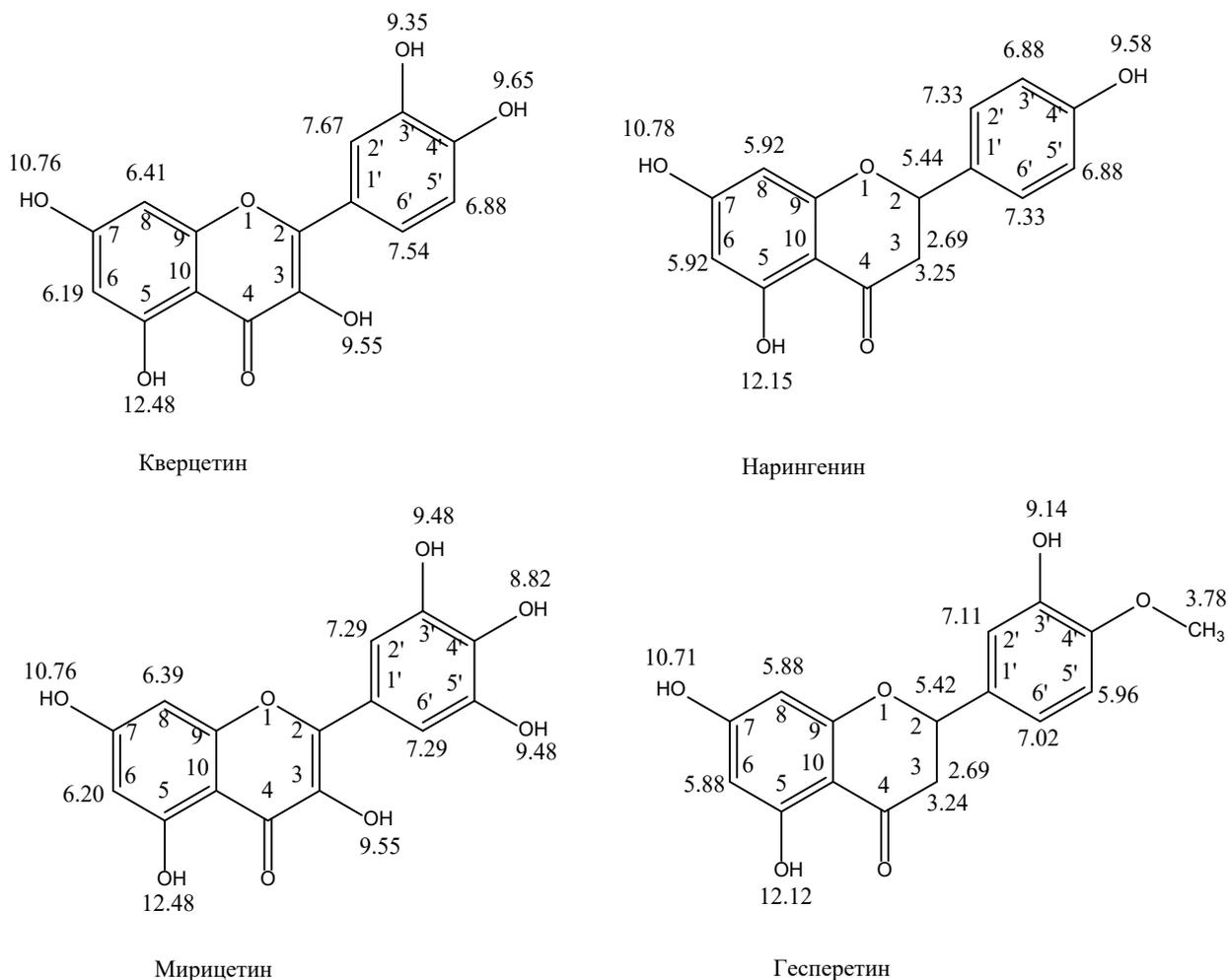


Рисунок 5.14 – Сигналы ^1H ЯМР спектров кверцетина, нарингенина, гесперетина, мирицетина

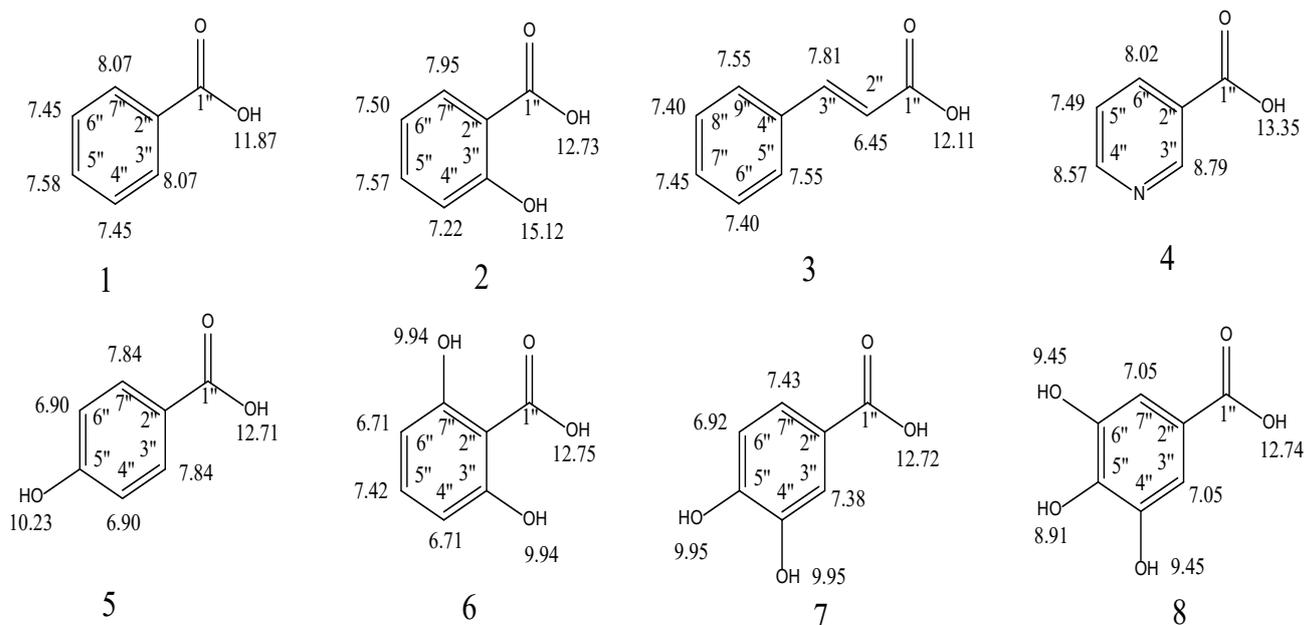


Рисунок 5.15 – Сигналы ^1H ЯМР спектров кислот, участвовавших в синтезе

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.

Ниже приведены числовые показатели измерения ^1H ЯМР спектров сначала флавоноидов и кислот, а затем сложных эфиров производных флавоноидов – соединения F.1 – F.22:

Нарингенин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 2,9$, 17,0), 3,25 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,1), 5,44 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,92 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 6,88 д (2H, $\text{H}^{3',5'}$, $J = 8,8$), 7,33 д (2H, $\text{H}^{2',6'}$, $J = 8,4$), 9,58 с (1H, OH^4), 10,78 с (1H, OH^7), 12,15 с (1H, OH^5).

Кверцетин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H^6 , $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H^8 , $J = 2,0$), 6,88 д (1H, $\text{H}^{5'}$, $J = 8,4$), 7,54 дд (1H, H^6 , $J = 2,2$, $J = 8,4$), 7,67 д (1H, H^2 , $J = 9,2$), 9,35 с (1H, $\text{OH}^{3'}$), 9,55 с (1H, OH^3), 9,65 с (1H, OH^4), 10,76 с (1H, OH^7), 12,48 с (1H, OH^5).

Гесперетин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 3,0$, 17,0), 3,24 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,2), 3,78 с (3H, $-\text{OCH}_3$), 5,42 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,88 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 5,96 д (1H, H^5 , $J = 8,5$), 7,02 дд (1H, H^6 , $J = 8,3$), 7,11 д (1H, H^2 , $J = 8,5$), 9,14 с (1H, OH^3), 10,71 с (1H, OH^7), 12,12 с (1H, OH^5).

Мирицетин. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,20 д (1H, H^6 , $J = 2,0$), 6,39 д (1H, H^8 , $J = 2,0$), 7,29 с (1H, $\text{H}^{2',6'}$), 8,82 с (1H, $\text{C}^4\text{-OH}$), 9,48 с (2H, $\text{C}^{3',5'}\text{-OH}$), 9,55 с (1H, OH^3), 10,76 с (1H, $\text{C}^7\text{-OH}$), 12,48 с (1H, $\text{C}^5\text{-OH}$).

Бензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,45 д (2H, $\text{H}^{4'',6''}$, $J = 8,5$), 7,58 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 7,3$), 8,07 д (2H, $\text{H}^{3'',7''}$, $J = 8,0$), 11,87 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

Салициловая кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,22 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 7,5$), 7,50 т (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,4$), 7,57 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 7,3$), 7,95 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 7,7$), 12,73 с (1H, $\text{OH}^{1''}$), 15,12 с (1H, $\text{OH}^{3''}$).

Коричная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,45 д (1H, $\text{H}^{2''}$, $J = 15,9$), 7,40 т (2H, $\text{H}^{6'',8''}$, $J = 7,9$), 7,45 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 7,3$), 7,55 д (2H, $\text{H}^{5'',9''}$, $J = 16,0$), 7,81 д (1H, $\text{H}^{3''}$, $J = 15,9$), 12,11 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

Никотиновая кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,49 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 8,0$), 8,02 д (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,9$), 8,57 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 5,0$), 8,79 с (1H, $\text{H}^{3''}$), 13,35 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

4-Гидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,90 д (2H, $\text{H}^{4'',6''}$, $J = 8,6$), 7,84 д (2H, $\text{H}^{3'',7''}$, $J = 8,6$), 10,23 с (1H, $\text{C}^{5''}\text{-OH}$), 12,71 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

2,6-Дигидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,71 д (2H, $\text{H}^{4'',6''}$, $J = 8,4$), 7,42 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 8,4$), 9,94 с (2H, $\text{C}^{2'',6''}\text{-OH}$), 12,75 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

3,4-Дигидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,92 д (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 8,4$), 7,38 д (1H, $\text{H}^{3''}$, $J = 8,4$), 7,43 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 8,4$), 9,95 с (2H, $\text{C}^{3'',4''}\text{-OH}$), 12,72 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

3,4,5-тригидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 7,05 д (2H, $\text{H}^{3'',7''}$, $J = 2,7$), 8,91 с (1H, $\text{C}^{5''}\text{-OH}$), 9,45 с (2H, $\text{C}^{6'',4''}\text{-OH}$), 12,74 с (1H, $\text{OH}^{1''}$).

Синтезированные сложные эфиры флавоноидов:

Нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 2,9$, 17,0), 3,25 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,1), 5,44 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,92 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 7,17 д (2H, $\text{H}^{3',5'}$, $J = 7,5$), 7,41 д (2H, $\text{H}^{2',6'}$, $J = 8,7$), 7,48 д (2H, $\text{H}^{4'',6''}$, $J = 6,4$), 7,52 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 5,5$), 8,07 д (2H, $\text{H}^{3'',7''}$, $J = 6,2$), 10,78 с (1H, OH^7), 12,15 с (1H, OH^5).

Нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 2,9$, 17,0), 3,25 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,1), 5,44 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,92 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 7,17 д (2H, $\text{H}^{3',5'}$, $J = 7,5$), 7,19 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 6,7$), 7,41 д (2H, $\text{H}^{2',6'}$, $J = 8,7$), 7,53 т (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,0$), 7,55 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 7,3$), 7,99 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 6,6$), 10,78 с (1H, OH^7), 12,15 с (1H, OH^5), 15,12 с (1H, $\text{OH}^{3''}$).

Нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 2,9$, 17,0), 3,25 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,1), 5,44 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,92 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 6,49 д (1H, $\text{H}^{2''}$, $J = 14,7$), 7,14 д (2H, $\text{H}^{3',5'}$, $J = 8,1$), 7,39 д (2H, $\text{H}^{2',6'}$, $J = 8,3$), 7,43 т (2H, $\text{H}^{6'',8''}$, $J = 7,1$), 7,45 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 7,2$), 7,55 д (2H, $\text{H}^{5'',9''}$, $J = 15,9$), 7,81 д (1H, $\text{H}^{3''}$, $J = 15,7$), 10,78 с (1H, OH^7), 12,15 с (1H, OH^5).

Нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 22,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 2,9$, 17,0), 3,25 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9$, 17,1), 5,44 дд (1H, H^2 , $J = 3,0$, 12,7), 5,92 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 7,14 д (2H, $\text{H}^{3',5'}$, $J = 7,5$), 7,38 д (2H, $\text{H}^{2',6'}$, $J = 8,7$), 7,49 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 8,0$), 8,00 д (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,7$), 8,57 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 5,0$), 8,77 с (1H, $\text{H}^{3''}$), 10,78 с (1H, OH^7), 12,15 с (1H, OH^5).

Кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4H-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H^6 , $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H^8 , $J = 2,0$), 6,94 д (1H, $\text{H}^{5'}$, $J = 8,1$),

7,48 д (2H, H^{4''},^{6''}, $J = 6,4$), 7,52 т (1H, H^{5''}, $J = 5,5$), 7,61 дд (1H, H^{6'}, $J = 2,5$, $J = 8,7$), 7,72 д (1H, H^{2'}, $J = 9,0$), 8,07 д (2H, H^{3''},^{7''}, $J = 6,2$), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,55 с (1H, OH^{3'}), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.6). Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H⁶, $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H⁸, $J = 2,0$), 6,94 д (1H, H^{5'}, $J = 8,1$), 7,18 д (1H, H^{4''}, $J = 6,7$), 7,53 т (1H, H^{6''}, $J = 7,0$), 7,55 т (1H, H^{5''}, $J = 7,3$), 7,61 дд (1H, H^{6'}, $J = 2,5$, $J = 8,7$), 7,72 д (1H, H^{2'}, $J = 9,0$), 7,99 д (1H, H^{7''}, $J = 6,6$), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,55 с (1H, OH^{3'}), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵), 15,12 с (1H, OH^{3''}).

Кверцетин 4'-циннамат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.7). Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H⁶, $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H⁸, $J = 2,0$), 6,49 д (1H, H^{2''}, $J = 14,7$), 6,94 д (1H, H^{5'}, $J = 8,1$), 7,43 т (2H, H^{6''},^{8''}, $J = 7,1$), 7,45 д (1H, H^{7''}, $J = 7,2$), 7,55 д (2H, H^{5''},^{9''}, $J = 15,9$), 7,61 дд (1H, H^{6'}, $J = 2,5$, $J = 8,7$), 7,72 д (1H, H^{2'}, $J = 9,0$), 7,81 д (1H, H^{3''}, $J = 15,7$), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,55 с (1H, OH^{3'}), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8). Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H⁶, $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H⁸, $J = 2,0$), 6,99 д (1H, H^{5'}, $J = 9,7$), 7,49 т (1H, H^{5''}, $J = 8,0$), 7,65 дд (1H, H^{6'}, $J = 2,5$, $J = 8,8$), 7,69 д (1H, H^{2'}, $J = 8,2$), 8,00 д (1H, H^{6''}, $J = 7,7$), 8,57 д (1H, H^{4''}, $J = 5,0$), 8,77 с (1H, H^{3''}), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,55 с (1H, OH^{3'}), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9). Спектр ЯМР ¹H, δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, *ax*-H³, $J = 3,0$, 17,0), 3,24 дд (1H, *eq*-H³, $J = 12,9$, 17,2), 3,81 с (3H, -OCH₃), 5,42 дд (1H, H², $J = 3,0$, 12,7), 5,88 м (2H, H^{6,8}), 6,02 д (1H, H^{5'}, $J = 8,6$), 7,11 дд (1H, H^{6'}, $J = 8,5$), 7,15 д (1H, H^{2'}, $J = 8,6$), 7,48 д (2H, H^{4''},^{6''}, $J = 6,4$), 7,52 т (1H, H^{5''}, $J = 5,5$), 8,07 д (2H, H^{3''},^{7''}, $J = 6,2$), 10,71 с (1H, OH⁷), 12,12 с (1H, OH⁵).

Гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.10). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 3,0, 17,0$), 3,24 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9, 17,2$), 3,81 с (3H, $-\text{OCH}_3$), 5,42 дд (1H, H^2 , $J = 3,0, 12,7$), 5,88 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 6,02 д (1H, H^5 , $J = 8,6$), 7,11 дд (1H, H^6 , $J = 8,5$), 7,15 д (1H, $\text{H}^{2'}$, $J = 8,6$), 7,18 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 6,7$), 7,53 т (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,0$), 7,55 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 7,3$), 7,99 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 66$), 10,71 с (1H, OH^7), 12,12 с (1H, OH^5), 15,12 с (1H, $\text{OH}^{3''}$).

Гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 3,0, 17,0$), 3,24 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9, 17,2$), 3,81 с (3H, $-\text{OCH}_3$), 5,42 дд (1H, H^2 , $J = 3,0, 12,7$), 5,88 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 6,02 д (1H, H^5 , $J = 8,6$), 6,49 д (1H, $\text{H}^{2''}$, $J = 14,7$), 7,11 дд (1H, H^6 , $J = 8,5$), 7,15 д (1H, $\text{H}^{2'}$, $J = 8,6$), 7,43 т (2H, $\text{H}^{6'';8''}$, $J = 7,1$), 7,45 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 7,2$), 7,55 д (2H, $\text{H}^{5'';9''}$, $J = 15,9$), 7,81 д (1H, $\text{H}^{3''}$, $J = 15,7$), 10,71 с (1H, OH^7), 12,12 с (1H, OH^5).

Гесперетин 3'-никотинат 5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.12). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 2,69 дд (1H, $ax\text{-H}^3$, $J = 3,0, 17,0$), 3,24 дд (1H, $eq\text{-H}^3$, $J = 12,9, 17,2$), 3,81 с (3H, $-\text{OCH}_3$), 5,42 дд (1H, H^2 , $J = 3,0, 12,7$), 5,88 м (2H, $\text{H}^{6,8}$), 5,98 д (1H, H^5 , $J = 8,4$), 7,07 дд (1H, H^6 , $J = 8,3$), 7,10 д (1H, $\text{H}^{2'}$, $J = 8,2$), 7,49 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 8,0$), 8,00 д (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,7$), 8,57 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 5,0$), 8,77 с (1H, $\text{H}^{3''}$), 10,71 с (1H, OH^7), 12,12 с (1H, OH^5).

Кверцетин-3-салицилат [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат] (соединение F.13). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J , Гц): 6,19 д (1H, H^6 , $J = 2,0$), 6,41 д (1H, H^8 , $J = 2,0$), 6,88 д (1H, H^5 , $J = 8,4$), 7,22 д (1H, $\text{H}^{4''}$, $J = 7,5$), 7,50 т (1H, $\text{H}^{6''}$, $J = 7,4$), 7,54 дд (1H, H^6 , $J = 2,2, J = 8,4$), 7,57 т (1H, $\text{H}^{5''}$, $J = 7,3$), 7,67 д (1H, $\text{H}^{2'}$, $J = 2,0$), 7,96 д (1H, $\text{H}^{7''}$, $J = 7,7$), 9,35 с (1H, $\text{OH}^{3'}$), 9,65 с (1H, $\text{OH}^{4'}$), 10,76 с (1H, OH^7), 12,48 с (1H, OH^5), 15,12 с (1H, $\text{OH}^{3''}$).

Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат] (соединение

F.14). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 6,19 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,41 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,88 д (1H, H^{5'}, J = 8,4), 6,92 д (2H, H^{4'',6''}, J = 8,6), 7,54 дд (1H, H^{6'}, J = 2,2, J = 8,4), 7,67 д (1H, H^{2'}, J = 2,0), 7,84 д (2H, H^{3'',7''}, J = 8,6), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,65 с (1H, OH^{4'}), 10,23 с (1H, C^{5''}-OH), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4H-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.15). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 6,19 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,41 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,71 д (2H, H^{4'',6''}, J = 8,4), 6,88 д (1H, H^{5'}, J = 8,4), 7,42 т (1H, H^{5''}, J = 8,4), 7,54 дд (1H, H^{6'}, J = 2,2, J = 8,4), 7,67 д (1H, H^{2'}, J = 2,0), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,65 с (1H, OH^{4'}), 9,94 с (2H, C^{3'',7''}-OH), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4H-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.16). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 6,19 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,41 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,88 д (1H, H^{5'}, J = 8,4), 6,92 д (1H, H^{6''}, J = 8,4), 7,38 д (1H, H^{3''}, J = 8,4), 7,43 д (1H, H^{7''}, J = 8,4), 7,54 дд (1H, H^{6'}, J = 2,2, J = 8,4), 7,67 д (1H, H^{2'}, J = 2,0), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,65 с (1H, OH^{4'}), 9,95 с (2H, C^{4'',5''}-OH), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4H-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.17). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 6,19 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,41 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,88 д (1H, H^{5'}, J = 8,4), 7,07 д (2H, H^{3'',7''}, J = 2,8), 7,54 дд (1H, H^{6'}, J = 2,2, J = 8,4), 7,67 д (1H, H^{2'}, J = 2,0), 8,91 с (1H, C^{5''}-OH), 9,35 с (1H, OH^{3'}), 9,45 с (2H, C^{6'',4''}-OH), 9,65 с (1H, OH^{4'}), 10,76 с (1H, OH⁷), 12,48 с (1H, OH⁵).

Мирицетин-3-салицилат (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4H-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.18). Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (J, Гц): 6,20 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,39 д (1H, H⁸, J = 2,0), 7,22 д (1H, H^{4''}, J = 7,5), 7,29 с (1H, H^{2',6'}), 7,50 т (1H, H^{6''}, J = 7,4), 7,57

т (1H, H^{5''}, J = 7,3), 7,96 д (1H, H^{7''}, J = 7,7), 8,82 с (1H, C^{4'}-OH), 9,48 с (2H, C^{3',5'}-OH), 10,76 с (1H, C⁷-OH), 12,48 с (1H, C⁵-OH), 15,12 с (1H, OH^{3''}).

Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.19). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 6,20 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,39 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,92 д (2H, H^{4'',6''}, J = 8,5), 7,29 с (1H, H^{2',6'}), 7,84 д (2H, H^{3'',7''}, J = 8,6), 8,82 с (1H, C^{4'}-OH), 9,48 с (2H, C^{3',5'}-OH), 10,23 с (1H, C^{5''}-OH), 10,76 с (1H, C⁷-OH), 12,48 с (1H, C⁵-OH).

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.20). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 6,20 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,39 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,71 д (2H, H^{4'',6''}, J = 8,4), 7,29 с (1H, H^{2',6'}), 7,42 т (1H, H^{5''}, J = 8,4), 8,82 с (1H, C^{4'}-OH), 9,48 с (2H, C^{3',5'}-OH), 9,94 с (2H, C^{3'',7''}-OH), 10,76 с (1H, C⁷-OH), 12,48 с (1H, C⁵-OH).

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.21). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 6,20 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,39 д (1H, H⁸, J = 2,0), 6,92 д (1H, H^{6''}, J = 8,4), 7,29 с (1H, H^{2',6'}), 7,38 д (1H, H^{3''}, J = 8,4), 7,43 д (1H, H^{7''}, J = 8,4), 8,82 с (1H, C^{4'}-OH), 9,48 с (2H, C^{3',5'}-OH), 9,95 с (2H, C^{4'',5''}-OH), 10,76 с (1H, C⁷-OH), 12,48 с (1H, C⁵-OH).

Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.22). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц): 6,20 д (1H, H⁶, J = 2,0), 6,39 д (1H, H⁸, J = 2,0), 7,07 д (2H, H^{3'',7''}, J = 2,8), 7,29 с (1H, H^{2',6'}), 8,82 с (1H, C^{4'}-OH), 9,48 с (2H, C^{3',5'}-OH), 8,91 с (1H, C^{5''}-OH), 9,45 с (2H, C^{6'',4''}-OH), 10,76 с (1H, C⁷-OH), 12,48 с (1H, C⁵-OH).

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.

5.4.2 ^{13}C ЯМР спектры сложных эфиров кверцетина, мирицетина, нарингенина и гесперетина

Регистрацию ^{13}C ЯМР-спектров синтезированных соединений (соединения F.1 – F.22) проводили в условиях, описанных в Главе 2. На рисунке 5.16 представлен типичный ^{13}C ЯМР-спектр мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.22).

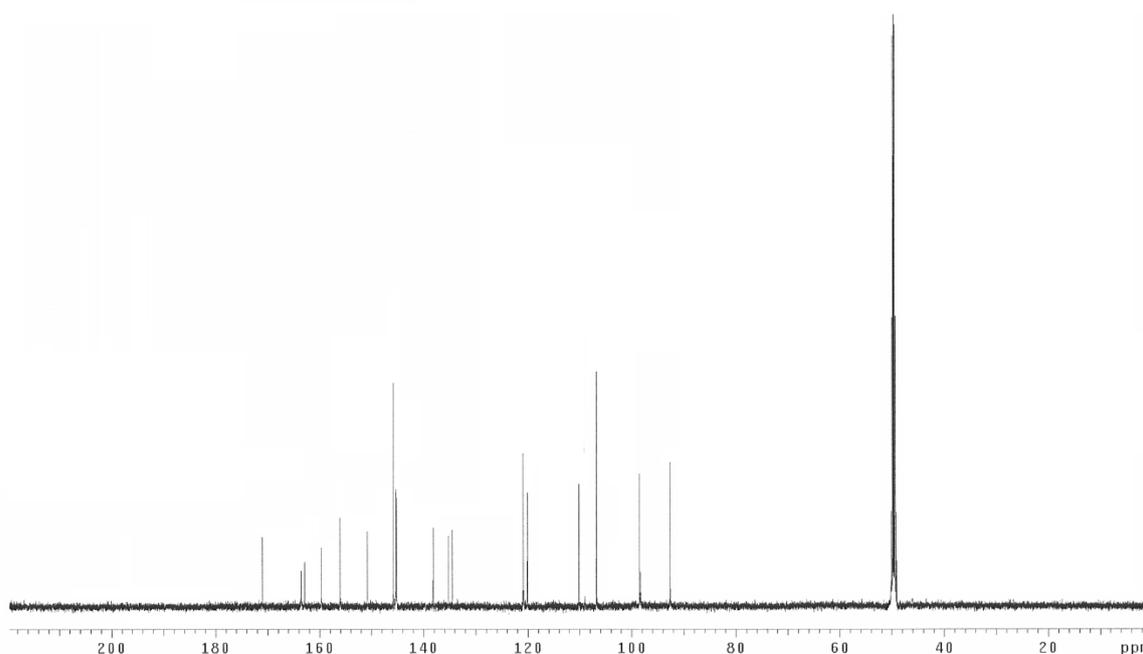
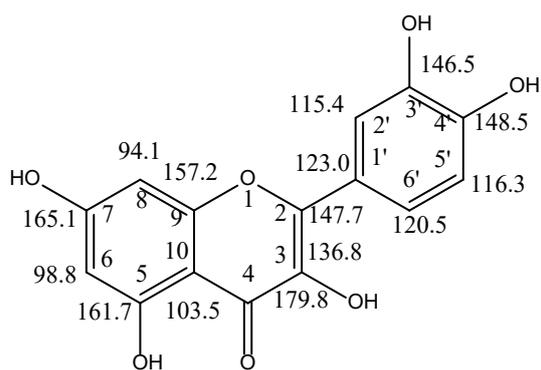
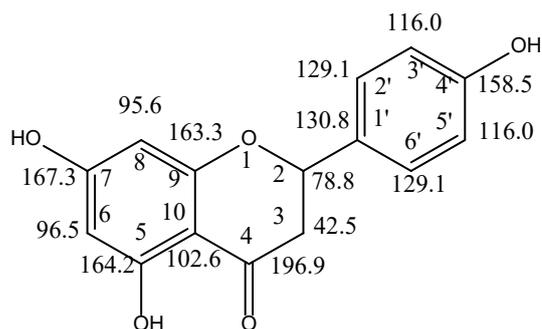


Рисунок 5.16 – ^{13}C ЯМР-спектр мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.22)

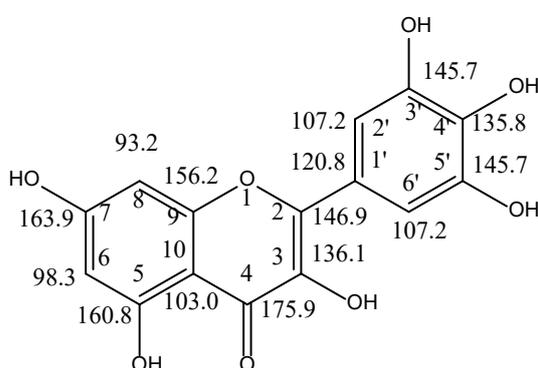
Подход к трактовке ^{13}C ЯМР спектров был аналогичен таковому при идентификации синтезированных соединений методом ^1H ЯМР: нами рассматривались имеющие характерные сигналы два наиболее значимых фрагментов структуры – ядро флавоноида и введенный в структуру ацильный остаток.



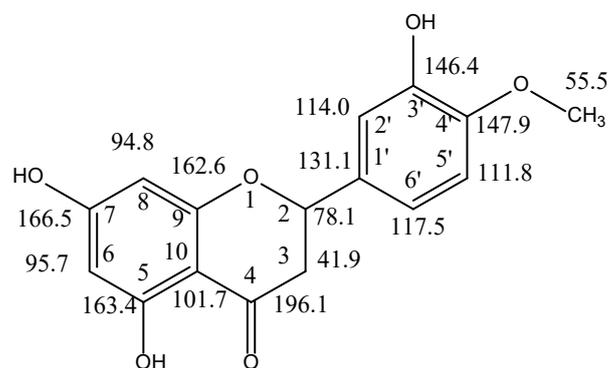
Кверцетин



Нарингенин

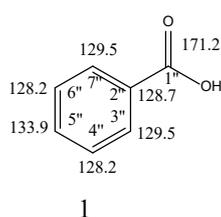


Мирицетин

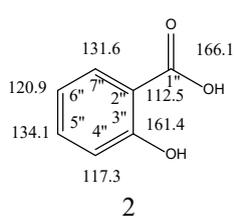


Гесперетин

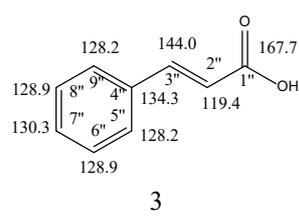
Рисунок 5.17 – Сигналы ЯМР ^{13}C спектров кверцетина, нарингенина, гесперетина, мирицетина



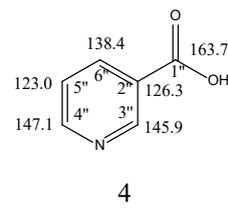
1



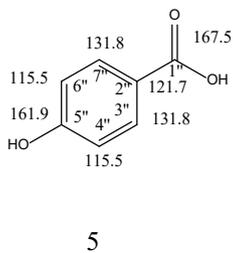
2



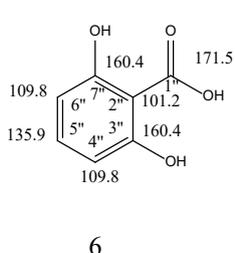
3



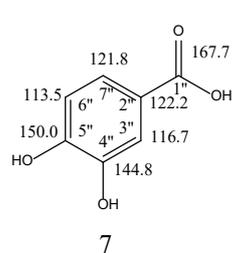
4



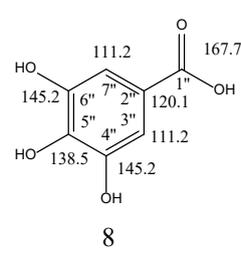
5



6



7



8

Рисунок 5.18 – 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'. Ниже приведены числовые результаты измерения ^{13}C ЯМР спектров флавоноидов, кислот и синтезированных сложных эфиров флавоноидов – соединения F.1 – F.22:

Нарингенин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 42,5(С3), 78,8(С2), 95,6(С8), 96,5(С6), 102,6(С10), 116,0(С3',С5'), 129,1(2',6'), 130,8(С1'), 158,5(С4'), 163,3(С9), 164,2(С5), 167,3(С7), 196,9 (С4).

Кверцетин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(С8), 98,8(С6), 103,5(С10), 115,4(С2'), 116,3(С5'), 120,5(С6'), 123,0(С1'), 136,8(С3), 146,5(С3'), 147,7(С2), 148,5(С4'), 157,2(С9), 161,7(С5), 165,1(С7), 179,8 (С4).

Гесперетин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 41,9(С3), 55,5(С7'), 78,1(С2), 94,8(С8), 95,7(С6), 101,7(С10), 111,8(С5'), 114,0(С2'), 117,5 (С6'), 131,1(С1'), 146,4(С3'), 147,9(С4'), 162,6(С9), 163,4(С5), 166,5(С7), 196,1(С4).

Мирицетин. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(С8), 98,3(С6), 103,0(С10), 107,2(С2',С6'), 120,8(С1'), 135,8(С4'), 136,1(С3), 145,7(С3',С5'), 146,9(С2), 156,2(С9), 160,8(С5), 163,9(С7), 175,9(С4).

Бензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 128,2(С4",С6"), 128,7(С2"), 129,5(С3",С5"), 133,9(С5"), 171,2(С1").

Салициловая кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 112,5(С2"), 117,3(С4"), 120,9(С6"), 131,6(С7"), 134,1(С5"), 161,4(С3"), 166,1(С1").

Коричная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 119,4(С2"), 128,2(С5",С9"), 128,9(С6",С8"), 130,3(С7"), 134,3(С4"), 144,0(С3"), 167,7(С1").

Никотиновая кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 123,0(С5"), 126,3(С2"), 138,4(С6"), 145,9(С3"), 147,1(С4"), 163,7(С1").

4-Гидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 115,5(C4",C6"), 121,7(C2"), 131,8(C3",C7"), 161,9(C5"), 167,5(C1").

2,6-Дигидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 101,2(C2"), 109,8(C4",C6"), 135,9(C5"), 160,4(C3",C7"), 171,5(C1").

3,4-Дигидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 113,5(C6"), 116,7(C3"), 121,8(C7"), 122,2(C2"), 144,8(C4"), 150,0(C5"), 167,7(C1").

3,4,5-тригидроксибензойная кислота. Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 111,2(C3",C7"), 120,1(C2"), 138,5(C5"), 145,2(C4",C6"), 167,7(C1").

Синтезированные сложные эфиры флавоноидов:

Нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 42,5(C3), 78,8(C2), 95,6(C8), 96,5(C6), 102,6(C10), 121,5(C3',C5'), 128,2(C4",C6"), 128,7(C2"), 129,5(C3",C7"), 129,9(C2',C6'), 133,9(C5"), 134,9(C1'), 149,8(C4'), 163,3(C9), 164,2(C5), 167,3(C7), 168,5(C1"), 196,9 (C4).

Нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 42,5(C3), 78,8(C2), 95,6(C8), 96,5(C6), 102,6(C10), 111,6(C2"), 117,3(C4"), 120,9(C6"), 121,5(C3',C5'), 129,9 (C2',C6'), 131,6(C7"), 134,1(C5"), 134,9(C1'), 149,8(C4'), 161,4(C3"), 163,3(C9), 164,2(C5), 165,4(C1"), 167,3(C7), 196,9 (C4).

Нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 42,5(C3), 78,8(C2), 95,6(C8), 96,5(C6), 102,6(C10), 120,1(C2"), 121,5(C3',C5'), 128,2(C5",C9"), 128,9(C6",C8"), 129,9(C2',C6'), 130,3(C7"), 134,3(C4"), 134,9(C1'), 142,1(C3"), 151,5(C4'), 163,3(C9), 164,2(C5), 167,3(C7), 173,0(C1"), 196,9 (C4).

Нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 42.5(C3), 78.8(C2), 95.6(C8), 96.5(C6), 102.6(C10), 121.5(C3',C5'), 123.0(C5''), 125.2(C2''), 129.9(C2',C6'), 134.9(C1'), 138.4(C6''), 145.9(C3''), 147.1(C4''), 149.8(C4'), 161.4(C1''), 163.3(C9), 164.2(C5), 167.3(C7), 196.9 (C4).

Кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 114,5(C2'), 119,7(C6'), 122,8(C5'), 127,3(C1'), 128,2(C4'',C6''), 128,7(C2''), 129,5(C3'',C7''), 133,9(C5''), 136,8(C3), 141,8(C4'), 147,7(C2), 150,9(C3'), 157,2(C9), 161,7(C5), 165,1(C7), 175,4(C1''), 179,8 (C4).

Кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.6). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 113,4(C2''), 114,5(C2'), 117,3(C4''), 119,7(C6'), 120,9(C6''), 122,8(C5'), 127,3(C1'), 131,6(C7''), 134,1(C5''), 136,8(C3), 141,8(C4'), 147,7(C2), 150,9(C3'), 157,2(C9), 161,4(C3''), 161,7(C5), 165,1(C7), 168,5(C1''), 179,8 (C4).

Кверцетин 4'-циннамат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.7). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94.1(C8), 98.8(C6), 103.5(C10), 114.5(C2'), 119.7(C6'), 120.1(C2''), 122.8(C5'), 127.3(C1'), 128.2(C5'',C9''), 128.9(C6'',C8''), 130.3(C7''), 134.3(C4''), 136.8(C3), 141.8(C4'), 142.1(C3''), 147.7(C2), 150.9(C3'), 157.2(C9), 161.7(C5), 165.1(C7), 173.0(C1''), 179.8 (C4).

Кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 114,5(C2'), 119,7(C6'), 122,8(C5'), 123,0(C5''), 125,2(C2''), 127,3(C1'), 136,8(C3), 138,4(C6''), 141,8(C4'), 145,9(C3''), 147,1(C4''), 147,7(C2), 150,9(C3'), 157,2(C9), 161,4(C1''), 161,7(C5), 165,1(C7), 179,8 (C4).

Гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 41,9(C3), 55,2(C7'), 78,1(C2), 94,8(C8), 95,7(C6), 101,7(C10), 110,3(C5'), 116,5(C2'), 121,9 (C6'), 128,2(C4",C6"), 128,7(C2"), 129,5(C3",C7"), 132,8(C1'), 133,9(C5"), 145,0(C3'), 149,1(C4'), 162,6(C9), 163,4(C5), 166,5(C7), 175,4(C1"), 196,1(C4).

Гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.10). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 41,9(C3), 55,2(C7'), 78,1(C2), 94,8(C8), 95,7(C6), 101,7(C10), 110,3(C5'), 113,4(C2"), 116,5(C2'), 117,3(C4"), 120,9(C6"), 121,9 (C6'), 131,6(C7"), 132,8(C1'), 134,1(C5"), 145,0(C3'), 149,1(C4'), 161,4(C3"), 162,6(C9), 163,4(C5), 166,5(C7), 168,5(C1"), 196,1(C4).

Гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 41,9(C3), 55,2(C7'), 78,1(C2), 94,8(C8), 95,7(C6), 101,7(C10), 110,3(C5'), 116,5(C2'), 120,1(C2"), 121,9(C6'), 128,2(C5",C9"), 128,9(C6",C8"), 130,3(C7"), 132,8(C1'), 134,3(C4"), 142,1(C3"), 145,0(C3'), 149,1(C4'), 162,6(C9), 163,4(C5), 166,5(C7), 173,0(C1"), 196,1(C4).

Гесперетин 3'-никотинат 5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.12). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 41,9(C3), 55,2(C7'), 78,1(C2), 94,8(C8), 95,7(C6), 101,7(C10), 110,3(C5'), 116,5(C2'), 121,9 (C6'), 123,0(C5"), 125,2(C2"), 132,8(C1'), 138,4(C6"), 145,0(C3'), 145,9(C3"), 147,1(C4"), 149,1(C4'), 161,4(C1"), 162,6(C9), 163,4(C5), 166,5(C7), 196,1(C4).

Кверцетин-3-салицилат (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4H-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.13). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 114,1(C2"), 115,4(C2'), 116,3(C5'), 117,3(C4"), 120,5(C6'), 120,9(C6"), 123,0(C1'), 131,6(C7"), 133,2(C3), 134,1(C5"), 146,5(C3'), 153,3(C2), 148,5(4'), 157,2(C9), 161,4(C3"), 161,7(C5), 162,4(C1"), 165,1(C7), 174,1 (C4).

Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.14). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 115,4(C2'), 115,5(C4",C6"), 116,3(C5'), 119,1(C2"), 120,5(C6'), 123,0(C1'), 131,8(C3",C7"), 133,2(C3), 146,5(C3'), 153,3(C2), 148,5(4'), 157,2(C9), 161,7(C5), 161,9(C5"), 163,1(C1"), 165,1(C7), 174,1 (C4).

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.15). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 100,4(C2"), 103,5(C10), 109,8(C4",C6"), 115,4(C2'), 116,3(C5'), 120,5(C6'), 123,0(C1'), 133,2(C3), 135,9(C5"), 146,5(C3'), 153,3(C2), 148,5(4'), 157,2(C9), 160,4(C3",C7"), 161,7(C5), 163,5(C1"), 165,1(C7), 174,1 (C4).

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.16). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94,1(C8), 98,8(C6), 103,5(C10), 113,5(C6"), 115,4(C2'), 116,3(C5'), 116,7(C3"), 120,5(C6'), 121,1(C2"), 121,8(C7"), 123,0(C1'), 133,2(C3), 144,8(C4"), 146,5(C3'), 150,0(C5"), 153,3(C2), 148,5(4'), 157,2(C9), 161,7(C5), 163,3(C1"), 165,1(C7), 174,1 (C4).

Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.17). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 94.1(C8), 98.8(C6), 103.5(C10), 110.6(C3",C7"), 115.4(C2'), 116.3(C5'), 120.2(C2"), 120.5(C6'), 123.0(C1'), 133.2(C3), 138.5(C5"), 145.2(C4",C6"), 146.5(C3'), 153.3(C2), 148.5(4'), 157.2(C9), 161.7(C5), 163.1(C1"), 165.1(C7), 174.1 (C4).

Мирицетин-3-салицилат (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.18). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(C8), 98,3(C6), 103,0(C10), 107,2(C2',C6'), 114,1(C2"), 117,3(C4"), 120,8(C1'), 120,9(C6"),

131,6(C7"), 132,8(C3), 134,1(C5"), 135,8(C4'), 145,7(C3',C5'), 151,4(C2), 156,2(C9), 160,8(C5), 161,4(C3"), 162,4(C1"), 163,9(C7), 170,7(C4).

Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.19). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(C8), 98,3(C6), 103,0(C10), 107,2(C2',C6'), 115,5(C4",C6"), 119,1(C2"), 120,8(C1'), 131,8(C3",C7"), 132,8(C3), 135,8(C4'), 145,7(C3',C5'), 151,4(C2), 156,2(C9), 160,8(C5), 161,9(C5"), 163,1(C1"), 163,9(C7), 170,7(C4).

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.20). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(C8), 98,3(C6), 100,4(C2"), 103,0(C10), 107,2(C2',C6'), 109,8(C4",C6"), 120,8(C1'), 132,8(C3), 135,8(C4'), 135,9(C5"), 145,7(C3',C5'), 151,4(C2), 156,2(C9), 160,4(C3",C7"), 160,8(C5), 163,5(C1"), 163,9(C7), 170,7(C4).

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.21). Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(C8), 98,3(C6), 103,0(C10), 107,2(C2',C6'), 113,5(C6"), 116,7(C3"), 120,8(C1'), 121,1(C2"), 121,8(C7"), 132,8(C3), 135,8(C4'), 144,8(C4"), 145,7(C3',C5'), 150,0(C5"), 151,4(C2), 156,2(C9), 160,8(C5), 163,3(C1"), 163,9(C7), 170,7(C4).

Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение F.22). Спектр ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d^6), δ_{C} , м. д.: 93,2(C8), 98,3(C6), 103,0(C10), 107,2(C2',C6'), 110,6(C3",C7"), 120,2(C2"), 120,8(C1'), 135,8(C4'), 132,8(C3), 138,5(C5"), 145,2(C4",C6"), 145,7(C3',C5'), 151,4(C2), 156,2(C9), 160,8(C5), 163,1(C1"), 163,9(C7), 170,7(C4).

Таким образом, для всех синтезированных соединений 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. Методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии проведено подтверждение структуры синтезированных соединений.

5.4.3 Идентификация сложных эфиров флавоноидов методом масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия в сочетании с данными ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР является объективным методом идентификации синтезированных соединений, причем не только для определения молекулярной массы полученных структур, но и для образующихся фрагментарных ионов.

Ранее нами была проведена идентификация сложных эфиров каротиноидов этим методом (Глава 4, раздел 4.3.3). Используя разработанный ранее алгоритм действия, нами вначале было проведено прогнозирование фрагментов ионов с помощью программы CFM-ID 4.0 [103], а затем определяли их в масс-спектрах синтезированных соединений.

Условия анализа синтезированных сложных эфиров флавоноидов приведены в Главе 2. Типовой масс-спектр сложного эфира нарингенина (соединение F.2) представлен на рисунке 5.19.

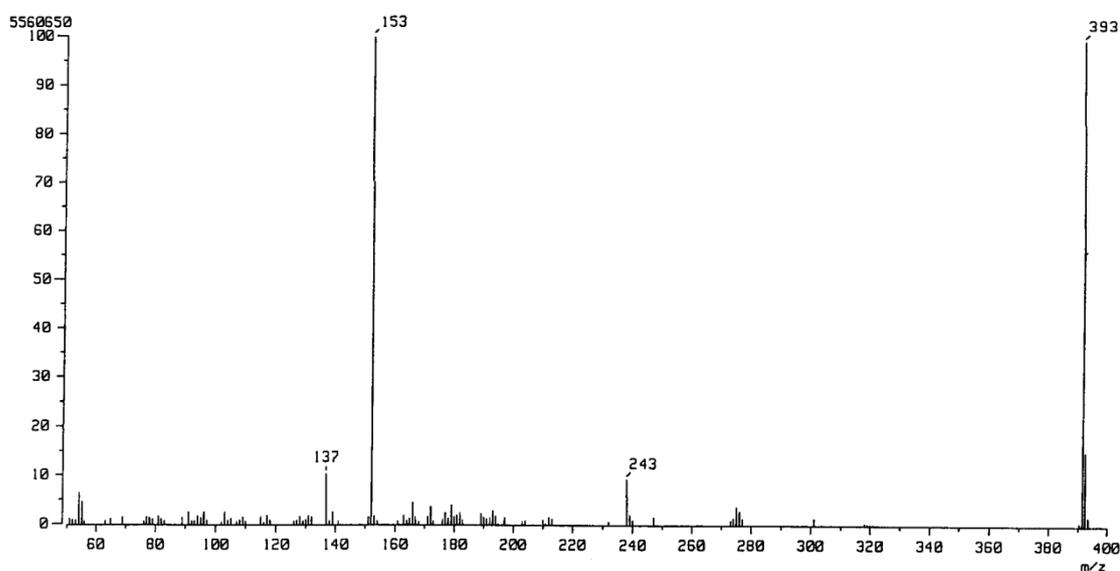


Рисунок 5.19 – Масс-спектр нарингенина 4'-салицилата (соединение F.2)

Теоретически прогнозируемые и экспериментально полученные характерные фрагменты ионов соединений F.1 – F.22 представлены в таблице 2, Приложение 1.

Далее приведены результаты измерения масс-спектров сложных эфиров флавоноидов:

Нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1). Масс-спектр, m/z : 377,094 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 377,095 ESI: $[M-377]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-121]^+$.

Нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2). Масс-спектр, m/z : 393,091 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 393,089 ESI: $[M-393]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-137]^+$.

Нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3). Масс-спектр, m/z : 403,112 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 403,110 ESI: $[M-403]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-147]^+$.

Нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4). Масс-спектр, m/z : 378,091 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 378,089 ESI: $[M-378]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-106]^+$.

Кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5). Масс-спектр, m/z : 407,075 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 407,069 ESI: $[M-407]^+$; $[M-270]^+$; $[M-257]^+$; $[M-153]^+$; $[M-121]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.6). Масс-спектр, m/z : 423,067 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 423,064 ESI: $[M-407]^+$; $[M-270]^+$; $[M-257]^+$; $[M-153]^+$; $[M-121]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин 4'-циннамат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.7). Масс-спектр, m/z : 433,088 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 433,085 ESI: $[M-433]^+$; $[M-257]^+$; $[M-153]^+$; $[M-147]^+$; $[M-139]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8). Масс-спектр, m/z :

408,075 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 408,064 ESI: $[M-408]^+$; $[M-257]^+$; $[M-153]^+$; $[M-139]^+$; $[M-106]^+$; $[M-69]^+$.

Гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9). Масс-спектр, m/z : 407,107 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 407,105 ESI: $[M-407]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-121]^+$.

Гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (F.10). Масс-спектр, m/z : 423,103 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 423,100 ESI: $[M-423]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-137]^+$.

Гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11). Масс-спектр, m/z : 433,124 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 433,121 ESI: $[M-433]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-147]^+$.

Гесперетин 3'-никотинат 5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (F.12). Масс-спектр, m/z : 408,102 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 408,100 ESI: $[M-408]^+$; $[M-243]^+$; $[M-153]^+$; $[M-106]^+$.

Кверцетин-3-салицилат (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение F.13). Масс-спектр, m/z : 423,067 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 423,064 ESI: $[M-423]^+$; $[M-377]^+$; $[M-286]^+$; $[M-153]^+$; $[M-137]^+$; $[M-123]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение F.14). Масс-спектр, m/z : 423,067 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 423,064 ESI: $[M-423]^+$; $[M-377]^+$; $[M-286]^+$; $[M-153]^+$; $[M-123]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение F.15). Масс-спектр, m/z : 439,063 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 439,059 ESI: $[M-439]^+$; $[M-393]^+$; $[M-247]^+$; $[M-153]^+$; $[M-123]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение F.16). Масс-спектр, m/z : 439,063 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 439,059 ESI: $[M-439]^+$; $[M-393]^+$; $[M-247]^+$; $[M-153]^+$; $[M-123]^+$; $[M-69]^+$.

Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение **F.17**). Масс-спектр, m/z : 455,058 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 455,054 ESI: $[M-455]^+$; $[M-388]^+$; $[M-263]^+$; $[M-153]^+$; $[M-123]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

Мирицетин-3-салицилат (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат) (соединение **F.18**). Масс-спектр, m/z : 439,064 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 439,059 ESI: $[M-439]^+$; $[M-393]^+$; $[M-302]^+$; $[M-153]^+$; $[M-137]^+$]⁺; $[M-123]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат) (соединение **F.19**). Масс-спектр, m/z : 439,064 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 439,059 ESI: $[M-439]^+$; $[M-393]^+$; $[M-302]^+$; $[M-153]^+$; $[M-139]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат) (соединение **F.20**). Масс-спектр, m/z : 455,059 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 455,054 ESI: $[M-455]^+$; $[M-409]^+$; $[M-318]^+$; $[M-153]^+$; $[M-139]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат) (соединение **F.21**). Масс-спектр, m/z : 455,059 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 455,054 ESI: $[M-455]^+$; $[M-409]^+$; $[M-318]^+$; $[M-153]^+$; $[M-139]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат) (соединение **F.22**). Масс-спектр, m/z : 471,055 $[M + H]^+$. $C_{54}H_{60}O_6H^+$. M_{calc} 471,049 ESI: $[M-471]^+$; $[M-425]^+$; $[M-334]^+$; $[M-153]^+$; $[M-139]^+$]⁺; $[M-69]^+$.

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

Методики идентификации, определения примесей, количественного содержания положены в основу проектов ФС для соединений F.7 и F.22 (Приложение 2).

Результаты эксперимента, представленные в главе 5, отражены в следующих публикациях [24, 25, 31, 36, 274, 275].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5

Экспериментальные данные показали, что:

1) существует принципиальная возможность региоселективного биокаталитического синтеза сложных эфиров такого многопрофильного с точки зрения видов фармакологической активности класса природных БАС как флавоноиды, что продемонстрировано на примере полученных сложных эфиров нарингенина и кверцетина по положению С4' и гесперетина и мирицетина по положению С3';

2) предложен подход, позволяющий проводить региоселективную этерификацию флавоноидов по положению С3, что обеспечивается «защитой» гидроксигрупп в положениях С3', С4', С5, С7;

3) этерификация флавоноидов по положению С3, вероятней всего, будет способствовать повышению их устойчивости к действию окислителей, т. е. повысит стабильность цикла В флавоноидного ядра как один из основных фармакофоров этого класса БАС;

4) представляется перспективным дальнейшее более глубокое изучение синтезированных соединений методами молекулярного докинга и фармакологическое подтверждение прогностических результатов *in silico*.

ГЛАВА 6 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 [47, 59, 282].

Для определения антиоксидантной активности *in vitro* предложено множество различных методик, и у каждой из них есть свои преимущества и недостатки. Наиболее популярными для БАС, рассматриваемых в качестве потенциальных кандидатов в ЛС, являются подходы, основанные на использовании модельных радикалов, например, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (DPPH) [91, 106, 169] или 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты диаммонийная соль) (ABTS), которые химически взаимодействуют с антиоксидантами [51, 63, 236, 333].

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 TEAC, 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 [12, 236, 203], то именно ее использовали для изучения антиоксидантной активности производных ксантофиллов (соединения С.1 – С.21) и производных флавоноидов (соединения F.1 – F.22).

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 [175, 176] и сопоставлять с собственными теоретическими прогнозами *in silico*.

Метод ТЕАС имеет множество модификаций, при этом первые исследования проводились на основе реакции активации метмиоглобина с пероксидом водорода в присутствии АВТС для получения катион-радикала. Антиоксидантную активность определяли путем измерения оптической плотности раствора при длине волны 734 нм и уменьшению интенсивности окраски раствора, что свидетельствовало о степени проявляемого действия [235,296]. Основным недостатком этой модификации является образование промежуточных продуктов взаимодействия и нестабильность радикал-катиона, что затрудняет интерпретацию результатов.

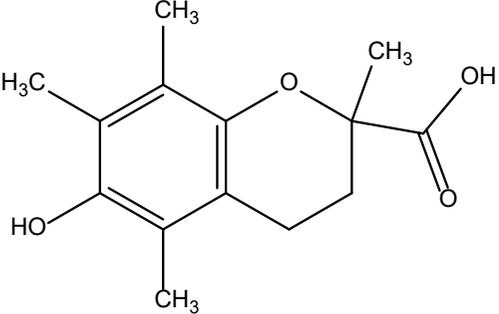
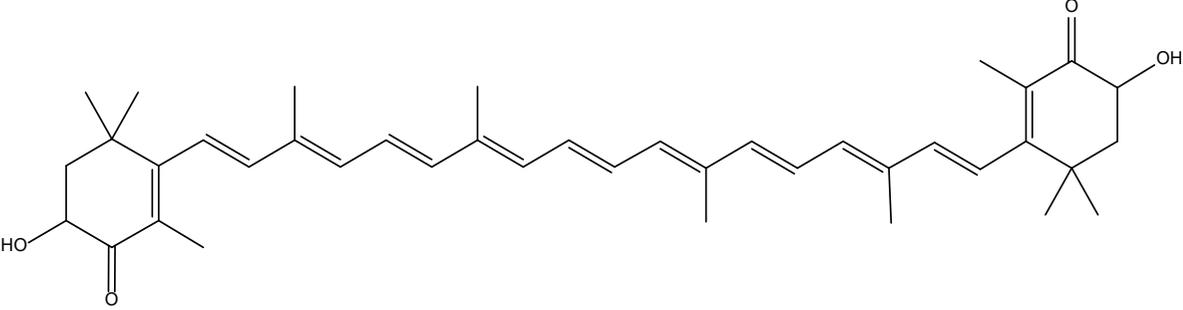
В настоящее время более предпочтительной модификацией этого метода является образование монарадикального катиона при взаимодействии АВТС с калия персульфатом. Преимуществом данного варианта является отсутствие промежуточного радикала, а также образование более стабильного катион-радикала. Кроме этого, данная методика применима как к водным растворам, так и растворам веществ в липофильных растворителях [292].

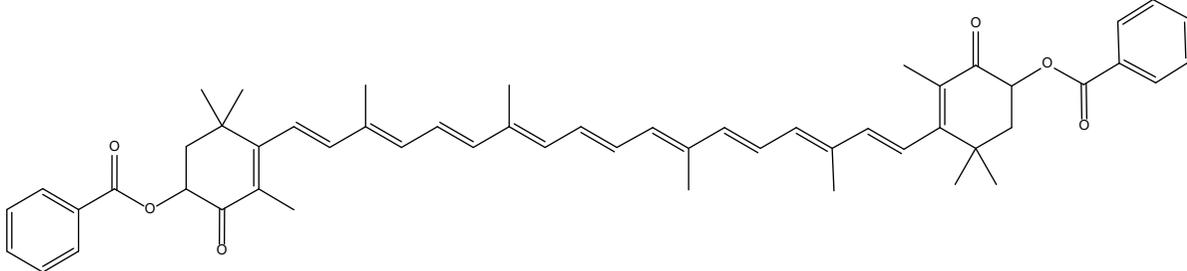
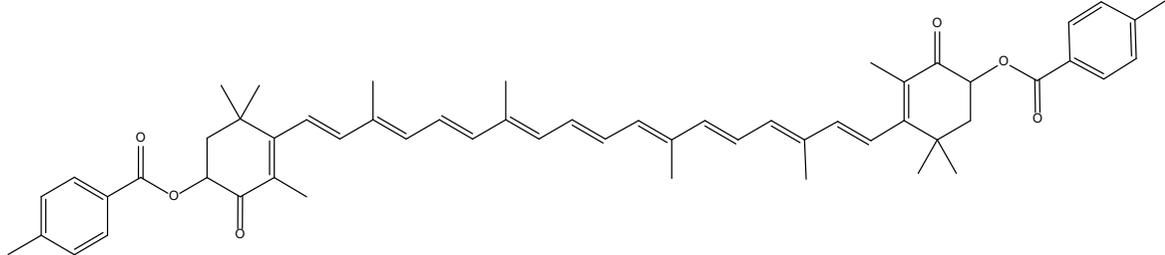
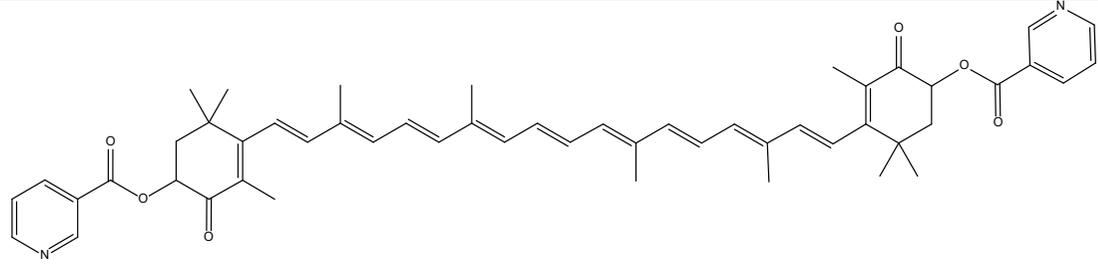
Определение антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров ксантофиллов (соединения С.1 – С.21) и сложных эфиров флавоноидов (соединения F.1 – F.22) проводили для их растворов с

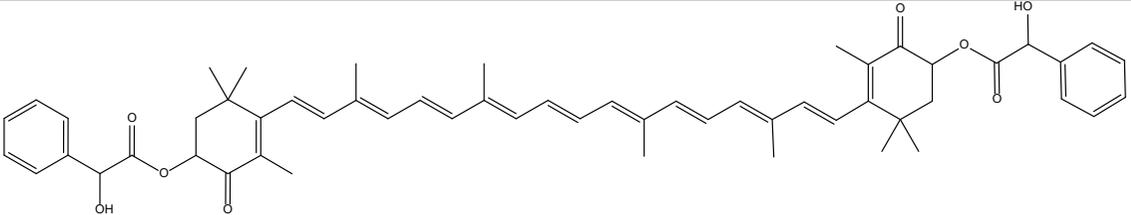
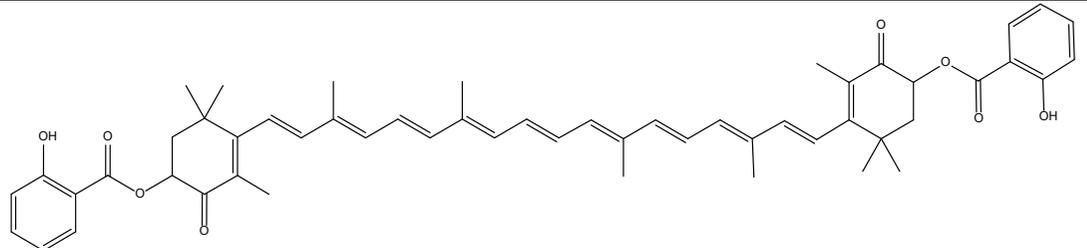
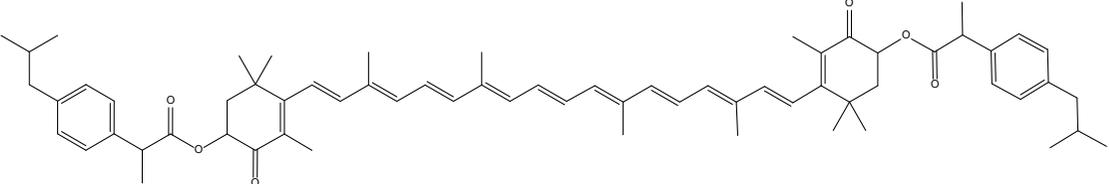
концентрациями от 1 до 10 мМ в соответствии с методикой, приведенной в Главе 2, раздел 2.4. Значение ТЕАС рассчитывали как среднее из результатов определения испытуемых растворов с концентрацией 1-10 мМ и стандартных растворов Тролокс (Trolox) с концентрацией 1-10 мМ.

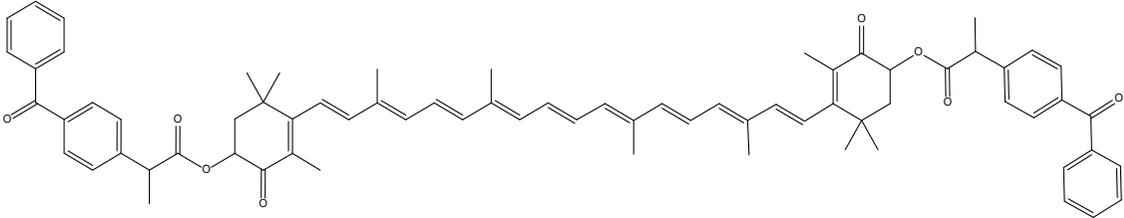
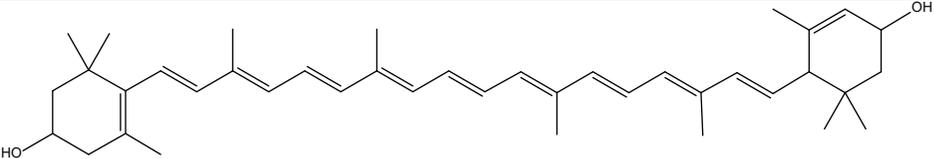
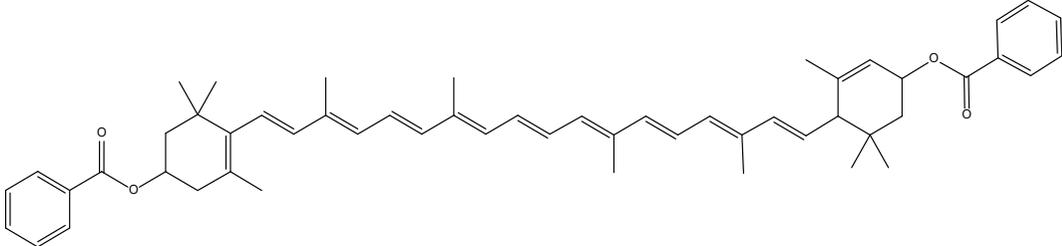
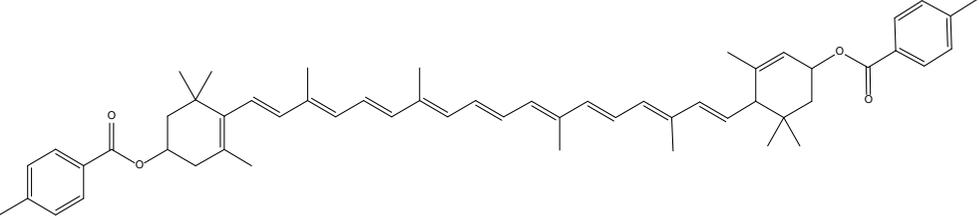
В таблице 6.1 представлены результаты прогнозов *in silico* и экспериментальные данные, полученные *in vitro* по методике ТЕАС.

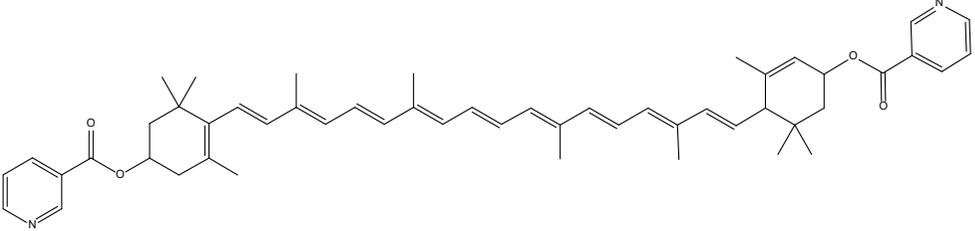
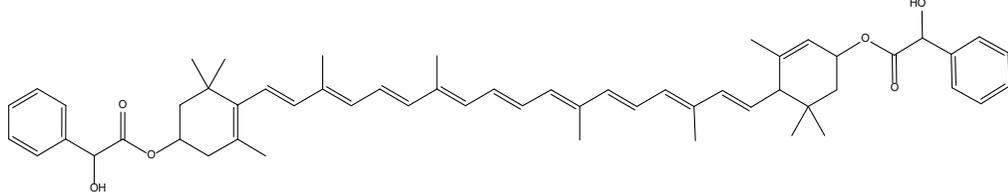
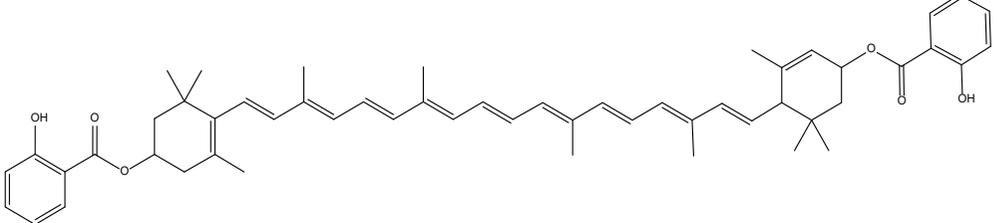
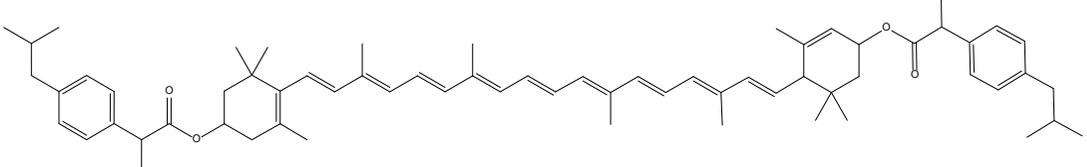
Таблица 6.1. Данные теоретического прогноза антиоксидантной активности *in silico* в программе «PASS-online» [42] и экспериментальные данные, полученные *in vitro* по методике ТЕАС для соединений С.1 – С.21 и F.1 – F.22

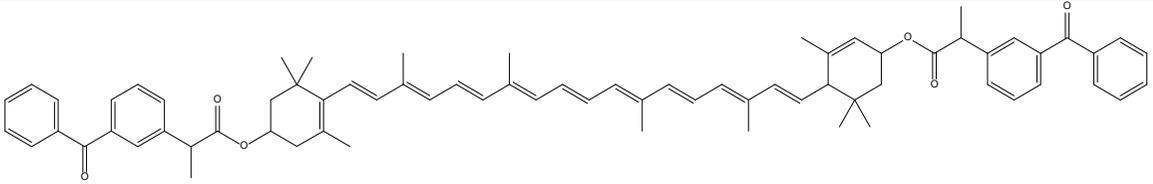
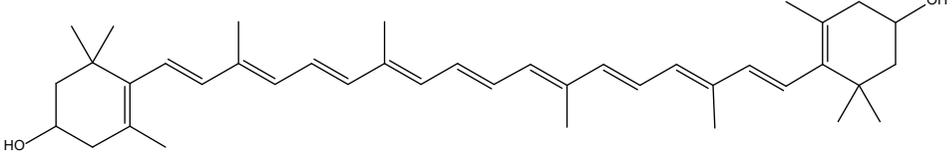
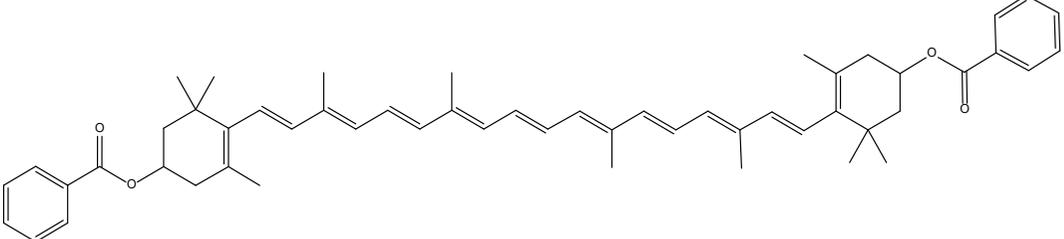
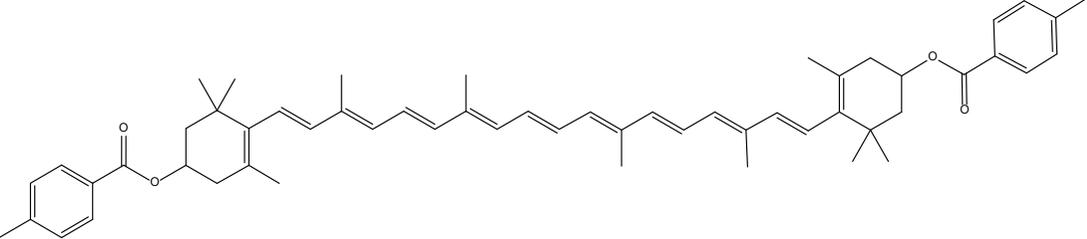
№	Изучаемые соединения	Связывание свободных радикалов [42]	Антиоксидантное действие [42]	ТЕАС
1	2	3	4	5
1.	 <p style="text-align: center;">Тролокс</p>	0,687	0,947	1,0
2.	 <p style="text-align: center;">Астаксантин</p>	0,535	0,758	0,93

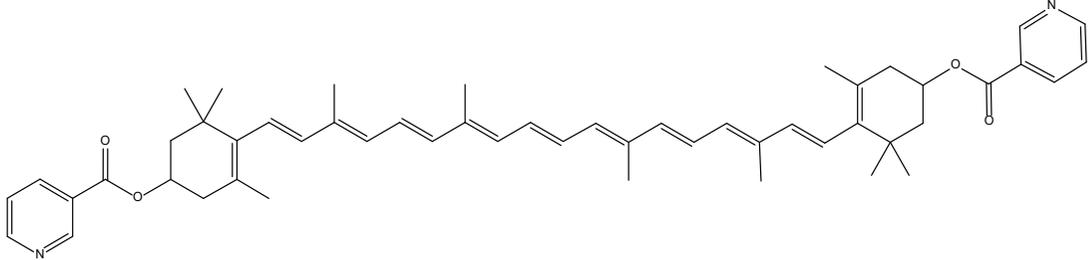
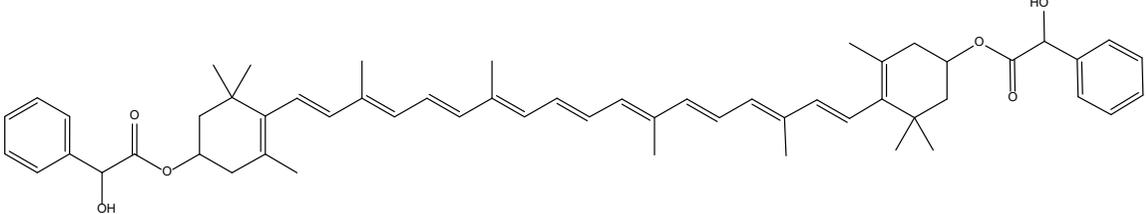
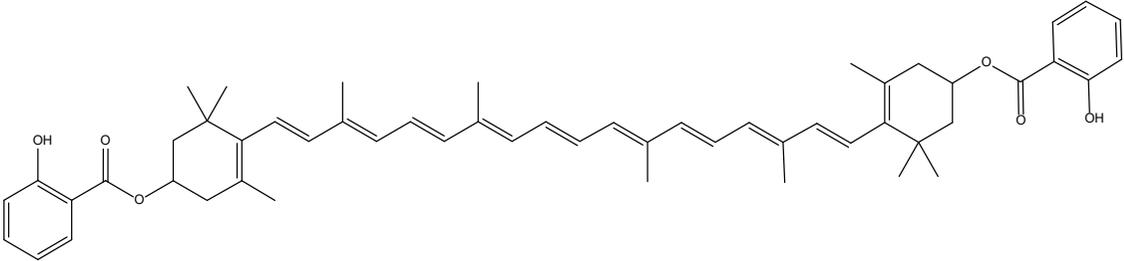
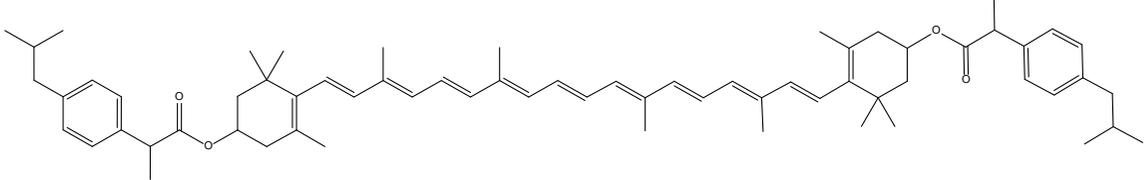
1	2	3	4	5
3.	 <p data-bbox="421 518 1288 566">β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-добензоат (соединение С.1)</p>	0,556	0,652	0,95
4.	 <p data-bbox="353 869 1355 917">β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2)</p>	0,557	0,653	0,95
5.	 <p data-bbox="380 1220 1332 1332">β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.3)</p>	0,407	0,510	0,76

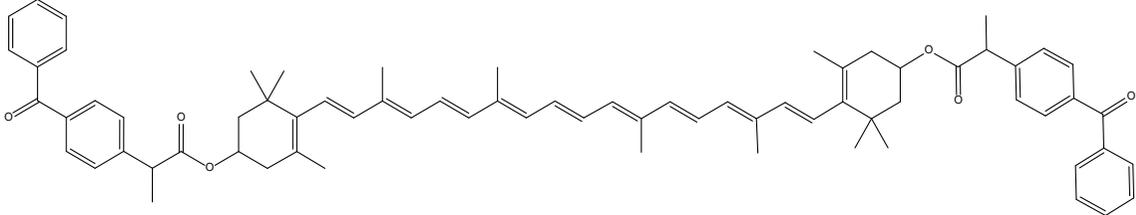
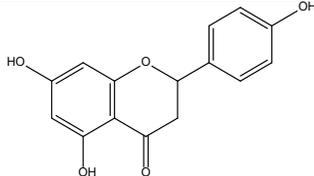
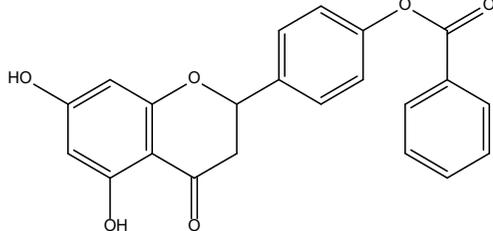
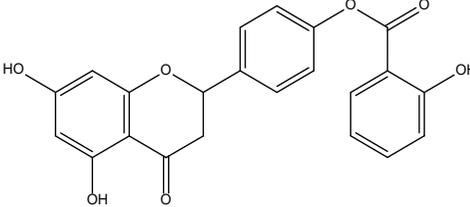
1	2	3	4	5
6.	 <p>β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4)</p>	0,419	0,553	0,79
7.	 <p>β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5)</p>	0,708	0,659	1,25
8.	 <p>β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.6)</p>	0,252	0,556	1,08

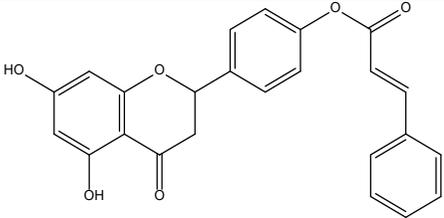
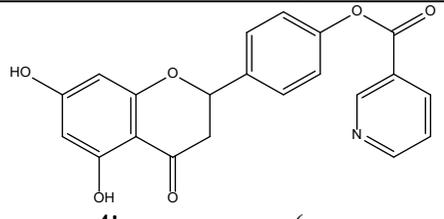
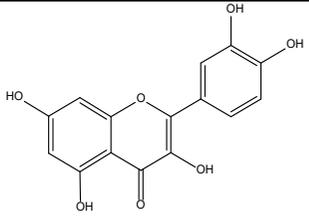
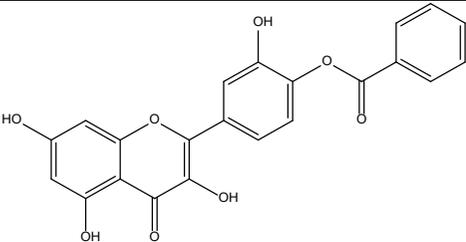
1	2	3	4	5
9.	 <p data-bbox="349 440 1361 531">β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.7)</p>	0,295	0,574	1,12
10.	 <p data-bbox="792 719 920 751">Лютеин</p>	0,205	0,609	1,49
11.	 <p data-bbox="501 1031 1205 1070">β,ε-каротин-3,3'-добензоат (соединение С.8)</p>	0,217	0,676	1,54
12.	 <p data-bbox="434 1313 1272 1353">β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9)</p>	0,217	0,677	1,54

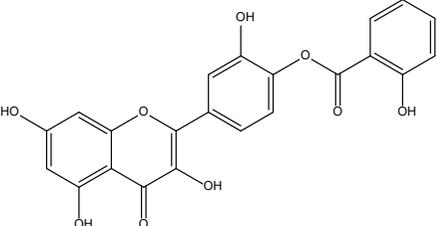
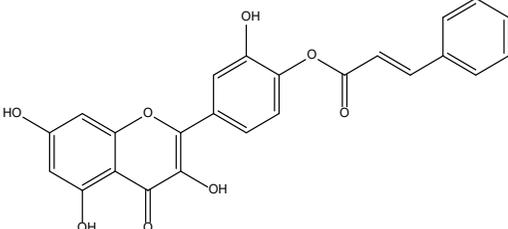
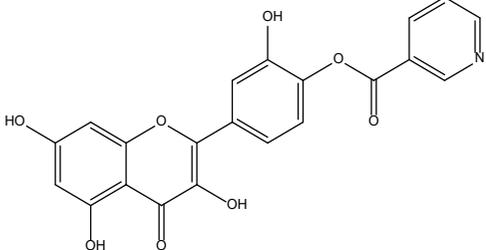
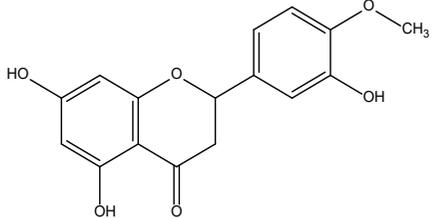
1	2	3	4	5
13.	 <p>β,ϵ-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10)</p>	0,148	0,553	0,82
14.	 <p>β,ϵ-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11)</p>	0,153	0,585	0,87
15.	 <p>β,ϵ-каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12)</p>	0,336	0,672	2,01
16.	 <p>β,ϵ-каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.13)</p>	0,218	0,594	1,68

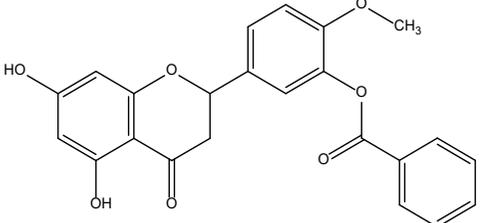
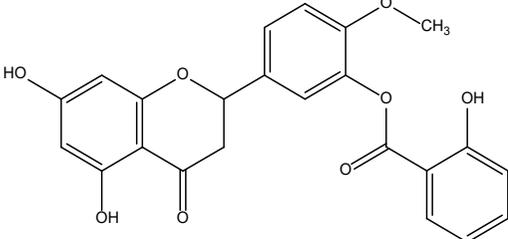
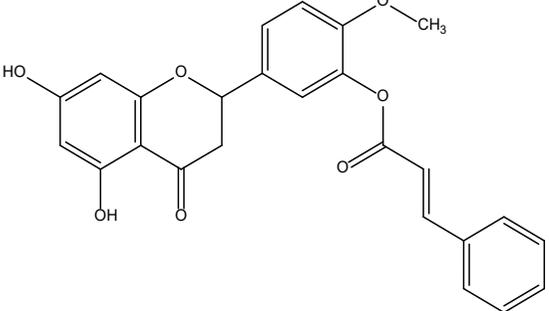
1	2	3	4	5
17.	 <p data-bbox="280 406 1433 446">β,ϵ-каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14)</p>	0,235	0,599	1,73
18.	 <p data-bbox="761 630 952 662">Зеаксантин</p>	0,449	0,766	1,38
19.	 <p data-bbox="436 925 1276 965">β,β-Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15)</p>	0,480	0,679	1,44
20.	 <p data-bbox="369 1244 1332 1276">β,β-Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16)</p>	0,481	0,680	1,44

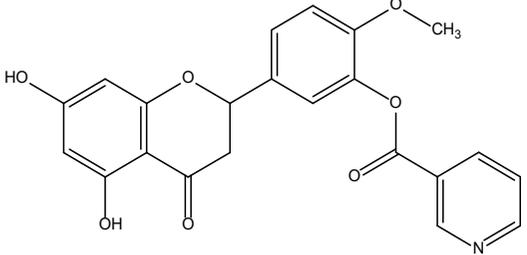
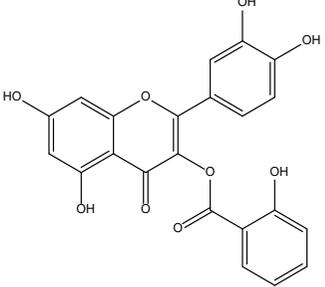
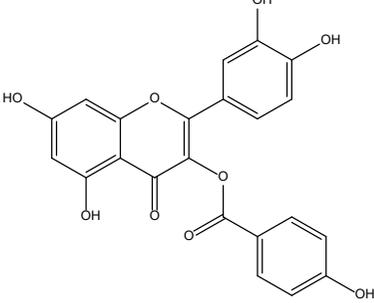
1	2	3	4	5
21.	 <p>β,β-Каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17)</p>	0,317	0,530	0,70
22.	 <p>β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноат) (соединение С.18)</p>	0,327	0,573	0,75
23.	 <p>β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксibenзоат) (соединение С.19)</p>	0,641	0,675	1,96
24.	 <p>β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат) (соединение С.20)</p>	0,207	0,574	1,55

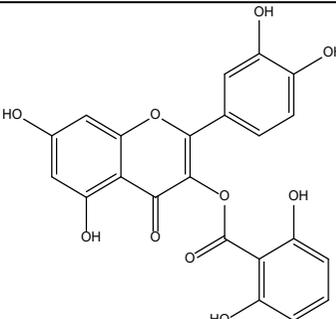
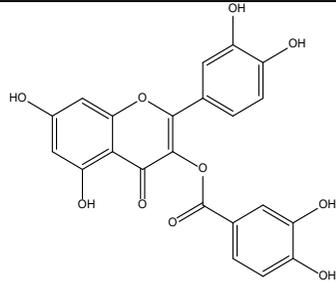
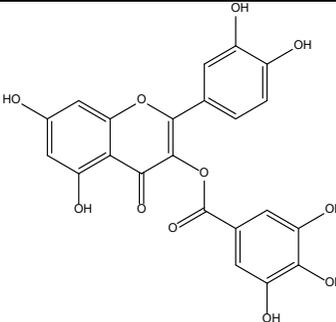
1	2	3	4	5
25.	 <p data-bbox="257 438 1444 486">β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.21)</p>	0,250	0,587	1,62
26.	 <p data-bbox="750 686 952 726">Нарингенин</p>	0,769	0,794	2,55
27.	 <p data-bbox="537 997 1176 1045">Нарингенин 4'-бензоат (соединение F.1)</p>	0,839	0,674	3,46
28.	 <p data-bbox="515 1284 1198 1332">Нарингенин 4'-салицилат (соединение F.2)</p>	0,875	0,691	3,65

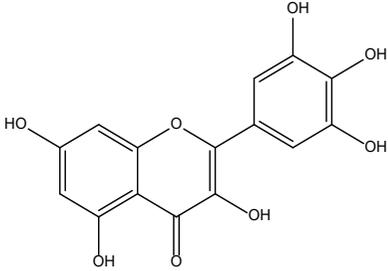
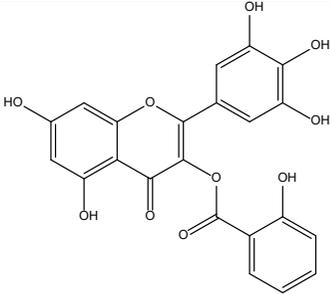
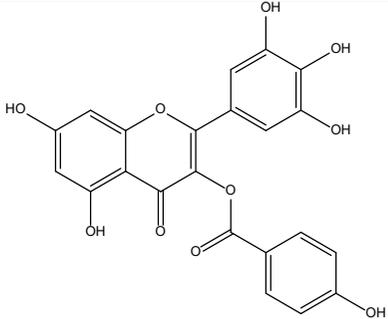
1	2	3	4	5
29.	 <p data-bbox="539 427 1167 464">Нарингенин 4'-циннамат (соединение F.3)</p>	0,922	0,805	3,99
30.	 <p data-bbox="539 671 1167 711">Нарингенин 4'-никотинат (соединение F.4)</p>	0,738	0,525	2,29
31.	 <p data-bbox="775 927 936 967">Кверцетин</p>	0,811	0,872	3,33
32.	 <p data-bbox="566 1214 1144 1251">Кверцетин 4'-бензоат (соединение F.5)</p>	0,909	0,775	3,87

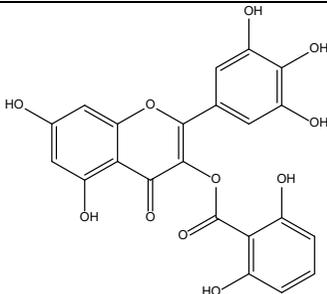
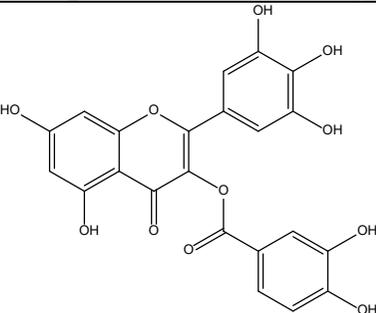
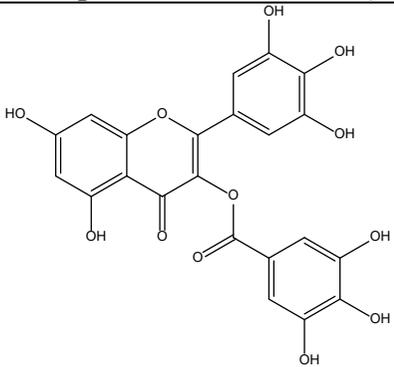
1	2	3	4	5
33.	 <p data-bbox="528 438 1180 475">Кверцетин 4'-салицилат (соединение F.6)</p>	0,925	0,791	3,95
34.	 <p data-bbox="528 722 1180 759">Кверцетин 4'-циннамат (соединение F.7)</p>	0,950	0,865	4,12
35.	 <p data-bbox="528 1032 1180 1069">Кверцетин 4'-никотинат (соединение F.8)</p>	0,793	0,594	2,34
36.	 <p data-bbox="763 1303 947 1340">Гесперетин</p>	0,878	0,746	2,59

1	2	3	4	5
37.	 <p data-bbox="539 507 1167 547">Гесперетин 3'-бензоат (соединение F.9)</p>	0,912	0,635	3,88
38.	 <p data-bbox="510 842 1196 882">Гесперетин 3'-салицилат (соединение F.10)</p>	0,928	0,651	3,99
39.	 <p data-bbox="517 1257 1193 1297">Гесперетин 3'-циннамат (соединение F.11)</p>	0,952	0,754	4,06

1	2	3	4	5
40.	 <p data-bbox="510 539 1198 576">Гесперетин 3'-никотинат (соединение F.12)</p>	0,798	0,504	2,20
41.	 <p data-bbox="519 901 1189 938">Кверцетин-3-салицилат (соединение F.13)</p>	0,916	0,759	3,92
42.	 <p data-bbox="452 1284 1256 1321">Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 (соединение F.14)</p>	0,903	0,769	3,89

1	2	3	4	5
43.	 <p data-bbox="421 582 1288 619">Кверцетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (соединение F.15)</p>	0,868	0,747	3,78
44.	 <p data-bbox="421 901 1288 946">Кверцетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (соединение F.16)</p>	0,917	0,772	3,96
45.	 <p data-bbox="398 1268 1310 1315">Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.17)</p>	0,933	0,831	4,20

1	2	3	4	5
46.	 <p data-bbox="757 507 952 547">Мирицетин</p>	0,832	0,924	3,74
47.	 <p data-bbox="510 874 1198 914">Мирицетин-3-салицилат (соединение F.18)</p>	0,931	0,821	4,05
48.	 <p data-bbox="443 1265 1265 1305">Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 (соединение F.19)</p>	0,922	0,831	3,99

1	2	3	4	5
49.	 <p>Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 (соединение F.20)</p>	0,902	0,814	3,88
50.	 <p>Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 (соединение F.21)</p>	0,933	0,831	4,07
51.	 <p>Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.22)</p>	0,928	0,834	4,31

Для понимания, насколько прогноз *in silico* и результаты эксперимента *in vitro* коррелируют между собой, полученные данные подвергли корреляционному анализу. Для этого были построены графики зависимости активности и рассчитан коэффициент корреляции Пирсона.

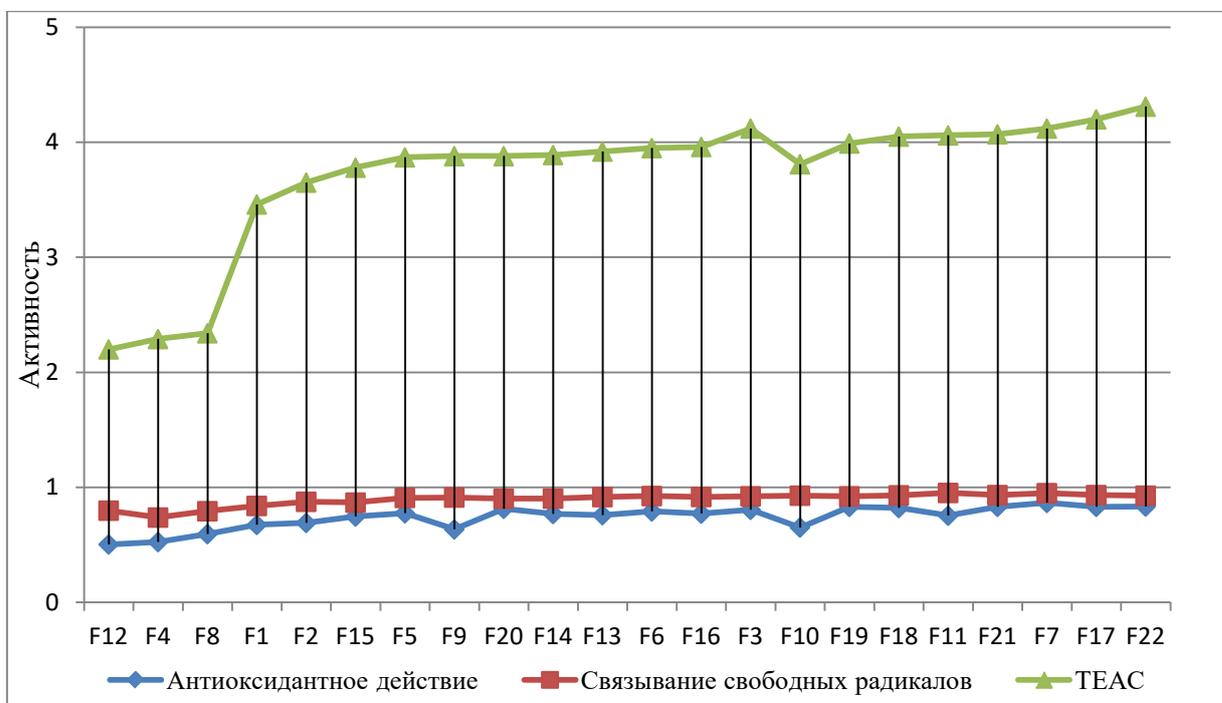


Рисунок 6.1 – Графики зависимости активности сложных эфиров флавоноидов для данных *in vitro* и *in silico*

В случае со сложными эфирами флавоноидов коэффициент корреляции Пирсона для данных *in vitro* и *in silico* по их антиоксидантному действию составил 0,77, а для данных *in vitro* и *in silico* по связыванию свободных радикалов – 0,85, что свидетельствует о высокой корреляции всех данных, при этом ближе к результатам *in vitro* оказался прогноз программой «PASS online» по связыванию свободных радикалов.

Для синтезированных соединений производных каротиноидов по антиоксидантной активности наблюдалась зависимость на том же уровне – 0,78, а по связыванию свободных радикалов – 0,88. Резюмируя, можно говорить о достаточно высокой корреляции прогностических и экспериментальных результатов.

Сравнительный анализ полученных экспериментальных данных *in vitro* и теоретического прогноза *in silico* позволили 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 увеличение активности происходит после введения салициловой кислоты, ибупрофена и кетопрофена, при этом она превышает значения самих исходных структуры 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-гидроксибензойной, 2,6-дигидроксибензойной, 3,4-дигидроксибензойной (протокатеховая), 3,4,5-тригидроксибензойной (галловая) кислот, наиболее активными являются эфиры салициловой и галловой кислоты.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что наиболее активные из синтезированных сложных эфиров – это кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.17: ТЕАС – 4,20) и мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (соединение F.22: ТЕАС – 4,31), которые превосходят по активности кверцетин (ТЕАС – 3,33) и мирицетин (ТЕАС – 3,74) в 1,3 и 1,2 раза, соответственно.

Материалы главы 6 опубликованы в работах [30,33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6

1. Методом *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS^{•+} изучена антирадикальная активность 21 сложного эфира ксантофиллов и 22 сложных эфиров флавоноидов.

2. Полученные результаты подтвердили 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*.

3. На основании полученных результатов сформулированы закономерности влияния вводимых радикалов на исходную структуру ксантофилла или флавоноида.

4. Определена степень влияния вводимых радикалов на родоначальную структуру ксантофилла или флавоноида, что позволит в дальнейшем получать их более активные производные.

5. По результатам эксперимента определены наиболее перспективные соединения в ряду сложных эфиров ксантофиллов. Таковыми являются эфиры лютеина: β,ε-каротин-3,3'-дибензоат (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-литедрами 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: агликаны – 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-гидроксибензоат) (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-тригидроксибензоат-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-гидроксибензоат), кверцетин 4'-циннамат и мирицетин-3-тригидроксибензоат-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абышев, А. З. Производные бетуленола как перспективные анти-ВИЧ агенты / А. З. Абышев, Р. А. Абышев, В. Х. Нгуен, В. А. Морозова // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т.13, Вып. 2. – С. 15-32.
2. Байсаров, Г. М. Флавоноидные соединения *Artemisiaglabella* Kar. et Kir., синтезы на их основе и их биологическая активность / Г. М. Байсаров, А. Р. Жуматаева, Г. К. Мукушева и др. // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 215 -222.
3. Балтина, Л. А. Синтез, противовоспалительная и противоязвенная активность конъюгата глицирризиновой кислоты с метиловым эфиром l-фенилаланина / Л. А. Балтина, Т. А. Сапожникова, С. Ф. Габдрахманова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 3. – С. 16-19.
4. Белая, Н. И. Прогностическая модель связи антирадикальной активности с потенциалом ионизации молекул и ионов флавоноидов / Н. И. Белая, А. В. Белый, И. Н. Щербаков // Кинетика и катализ. – 2020. – Т. 61, № 3. – С. 334-342.
5. ВИНИТИ РАН: официальный сайт. – Москва. – URL[^] <http://catalog.viniti.ru>.
6. Головащ, С. Р. Синтез фосфинового аналога аланиллейцина / С. Р. Головащ, О. С. Григоркевич, Г. С. Цебриков [и др.] // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 90, № 4. – С. 645-649.
7. Государственный реестр лекарственных средств: официальный сайт. – Москва. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
8. Гусаков, А. В. Биокатализаторы на основе грибных целлюлаз: фундаментальные и прикладные аспекты: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 02.00.15. / Гусаков Александр Васильевич. – М., 2005. – 59 с.
9. Давидович, Н. В. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) / Н. В. Давидович, Н. Н. Кукалевская, Е. Н. Башилова, Т. А. Бажукова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 387-393.

10. Дикусар, Е. А. Синтез аналогов алкалоидов, содержащих изоксазольные и изотиазольные фрагменты / Е. А. Дикусар, С. К. Петкевич, А. В. Клецков [и др.] // Сб. статей X Междунар. симпозиума «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации», Москва. – 2018. – С. 47-49.
11. Издания Государственной фармакопеи РФ. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia> (дата обращения – 18.11.2020).
12. Ильясов, И. Р. Сравнительный кинетический анализ антирадикальной активности апигенина и нарингенина при взаимодействии с радикал-катионами АВТС⁺⁺ / И. Р. Ильясов, Д. Ю. Демин, В. Л. Белобородов, В. К. Колхир // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19, № 1. – С. 17-21.
13. Курегян, А. Г. Способ получения каротиноидов из растительного сырья / А. Г. Курегян, С. В. Печинский // Материалы XXI международной заочной научно-практической конференции «Современная медицина актуальные вопросы», Новосибирск, 2013. – С. 94-99.
14. Курегян, А. Г. Выделение биологически активных веществ из растительных объектов в военно-полевой технологии лекарственных средств на примере крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) / А. Г. Курегян, Э. Ф. Степанова, С. В. Печинский, Ю. Ю. Жидкова // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. – Т. 59, №3. – С. 134 – 139.
15. 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.
16. Курегян, А. Г. Получение каротиноидов и их идентификация методами спектроскопии в ИК- и УФ- областях / А. Г. Курегян, С. В. Печинский // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Вып. 1. – С. 22-27.

17. Максимова, Ю. Г. Гетерогенные биокатализаторы на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий и их ферментов для трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот: автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.02.03 / Максимова Юлия Геннадьевна. – Пермь, 2016. – 46 с.
18. Олсуфьева, Е. Н. Основные тенденции в создании полусинтетических антибиотиков нового поколения / Е. Н. Олсуфьева, В. С. Янковская // Успехи химии. – 2020. – Т. 89, № 3. – С. 339-378.
19. Патент 2648452 РФ Способ получения индивидуальных каротиноидов / А. Г. Курегян, С. В. Печинский, Э. Ф. Степанова // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России. – №2016148100; заявл.07.12.2016; опубл. 26.03.2018, Бюл. №9. – 6 с.
20. Патент 2659165 РФ Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной / А. Г. Курегян, С. В. Печинский, Э. Ф. Степанова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России. – №20171115145; заявл.27.04.2017; опубл. 28.06.2018, Бюл. №19. – 7 с.
21. Патент 2702005 РФ Синтез полусинтетических производных природных лютеина и астаксантина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Ф. Степанова // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России. – №201845080 : заявл.18.12.2018 : опубл. 03.103.2019, Бюл. №28. – 10 с.
22. Патент 2739248 РФ Синтез полусинтетических сложных эфиров природного зеаксантина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. – №2019139342: заявл.02.12.2019; опубл 22.12.2020., Бюл. № 36. – 7 с.
23. Патент 2777890 РФ Хемознзимный способ получения *all-trans*-изомеров субстанций лютеина и зеаксантина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. – № 2021110891: заявл. 16.04.2021: опубл. 16.04.2021, Бюл. №23– 11 с.

24. Патент 2800457 РФ Синтез сложных эфиров флавоноидов нарингенина, кверцетина, гесперетина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. . Оганесян // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. – № 2022115103: заявл. 03.06.2022: опубл. 21.07.2023, Бюл. №21– 11 с.
25. Патент 2806073 РФ Региоселективный энзимный синтез производных кверцетина и мирицетина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. – № 2022124102: заявл. 12.09.2022: опубл. 25.10.2023, Бюл. №30– 13 с.
26. 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. – С. 22–35.
27. 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.
28. 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.
29. 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 // Хим.-фармац. журн. – 2015.– №10. – С.40 – 43.
30. Печинский, С. В. Изучение антиоксидантной активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов / С. В. Печинский // сб. материалов XXXII Российского национального конгресса «Человек и лекарства», Москва, 2024. – С. 135.
31. 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.

32. 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: www.science-education.ru/128-22249.

33. 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. 223-227.

34. Печинский, С. В. Оптимизация параметров ферментативного 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.

35. 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.

36. 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.

37. Печинский, С. В. Синтез сложных эфиров зеаксантина / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян // Журнал общей химии. – 2020. – № 5 (90). – С. 730-735.

38. Печинский, С. В. Синтез сложных эфиров лютеина, астаксантина и прогноз их активности / С. В. Печинский, А. Г. Курегян, Э. Т. Оганесян, Э. Ф. Степанова // Журнал общей химии. – 2019. – Т. 89, №5. – С. 721-725.
39. Печинский, С. В. Хемоэнзимный синтез *all-trans*-изомеров лютеина и зеаксантина / С. В. Печинский, Э. Т. Оганесян, А. Г. Курегян // Журнал общей химии. – 2021. – Т. 91, № 9. – С. 1390–1396.
40. Понаморева, О. Н. Закономерности функционирования ферментных систем микроорганизмов как биокатализаторов в амперометрических биосенсорах: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.01.06 / Понаморева Ольга Николаевна. – М., 2013. – 48 с.
41. Пономарев, Д. В. 3,28-Диацетоксилуп-20(29)-ен-30-овая кислота и ее ω -бромалкиловые эфиры / Д. В. Пономарев, Л. Р. Григорьева, А. В. Немтарев [и др.] // Журнал органической химии. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 584-590.
42. Попова, С. А. Синтез новых гетероциклических соединений на основе терпенофенолов / С. А. Попова, И. Ю. Чукичева // Сб. статей X Междунар. симпозиума «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации», Москва. – 2018. – С. 133-135.
43. Приказ № 1276 н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при возрастной макулярной дегенерации»: официальный сайт. – URL: <https://minzdrav.gov-murman.ru/documents/standarty-meditsinskoy-pomoshchi>.
44. Смирнов, И. В. Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 3.01.06 / Смирнов Иван Витальевич. – М, 2017. – 48 с.
45. Тюкавкина, Н. А. Современные тенденции создания лекарственных средств на основе флавоноидов / Н. А. Тюкавкина, И. А. Селиванова, Р. П. Терехов // Сб. статей X Междунар. симпозиума «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации», Москва. – 2018. – С. 526-532.
46. Чукичева, И. Ю. Новые перспективы полусинтетических терпенофенолов / И. Ю. Чукичева, Е. В. Буравлев, И. А. Дворникова // Сб.

статей X Междунар. симпозиума «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации», Москва. – 2018. – С. 190-192.

47. Яшин, А. Я. Методология определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и биологических жидкостей / А. Я. Яшин // Аналитика. – 2021. – Т.11, №5 – С. 370-384. DOI: 10.22184/2227-572X.2021.11.5.370.384.

48. Addo, E. K. The Lutein and Zeaxanthin in Pregnancy (L-ZIP) study-carotenoid supplementation during pregnancy: ocular and systemic effects-study protocol for a randomized controlled trial / E. K. Addo, A. Gorusupudi, S. Allman, P.S. Bernstein // *Trials*. – 2021. – Vol. 22 – P. 300-313.

49. Addo, E. K. The value of pre-symptomatic genetic risk assessment for age-related macular degeneration: the Moran AMD Genetic Testing Assessment (MAGENTA) study-a study protocol for a randomized controlled trial // E. K. Addo, M. E. Hartnett, P. S. Bernstein // *Trials*. – 2023. – Vol. 24, №1. – P. 414-429.

50. Agraharam, G. Myricetin: a Multifunctional Flavonol in Biomedicine / G. Agraharam, A. Girigoswami, K. Girigoswami // *Curr. Pharmacol. Rep.* – 2022. – Vol. 8, №1. – P. 48-61.

51. Alam, M. N. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity / M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman // *Saudi Pharm. J.* – 2013. – Vol.21. – P. 143–152.

52. Alcántara, A. R. Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry / A. R. Alcántara, Domínguez de María P., J. A. Littlechild // *Chem. Sus. Chem.* 2022. – 15, №9. – P. e202102709.

53. Alexeev, Y. GAMESS as a free quantum-mechanical platform for drug research / Y. Alexeev, M. P. Mazanetz, O. Ichihara, D. G. Fedorov // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2012. – Vol.12. №18. – P. 2013-2033.

54. Almeida, V. M. Synthesis of naringin 6"-ricinoleate using immobilized lipase / V. M. Almeida, R. C. Carla Branco, A. Sandra [et al.] // *Almeida et al. Chemistry Central Journal*. – 2012. – Vol. 6, №41. – P. 2.

55. An appraisal of trials investigating the effects on macular pigment optical density of lutein and zeaxanthin dietary interventions: a narrative review / N. Fitzpatrick, V. Chachay, J. Bowtell [et al.] // *Nutr Rev.* – 2022. – Vol. 80, №3.–P. 513-524.
56. Anastas, P. T. *Green chemistry: theory and practice* / P. T. Anastas, J. C. Warner. – New York: Oxford University Press, 1998. – 160 p.
57. Anastas, P. T. *Green chemistry* / P. T. Anastas, T. C. Williamson // *ACS Symposium Series* [Электронный ресурс], 1996. – Vol. 626. – P. 1–17.
58. Antenucci A. Green chemistry meets asymmetric organocatalysis: a critical overview on catalysts synthesis / A. Antenucci, S. Dughera, P. Renzi // *Chem..Sus. Chem.* – 2021. – Vol. 14, №14. – P. 2785-2853.
59. Apak, R. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays / R. Apak, M.Özyürek, K. Güclü, E. Çapanoglu // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – Vol. 64. – P. 997–1027.
60. Application of cinnamic acid in the structural modification of natural products: A review / H. Deng, Q. Xu, H. Y. Guo [et al.] // *Phytochemistry.* – 2023. – Vol. 206. – P. 113532.
61. Aman, R. Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables / R. Aman, J. Biehl, R. Carle [et al.] // *Food Chemistry.* – 2005. – Vol. 92. – 753–763.
62. ArgusLab, GA Dock: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>. (дата обращения – 18.11.2020).
63. Arnao, M. B. An Enzymatic Calorimetric Method for Measuring Naringin Using 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) in the Presence of Peroxidase / M. B. Arnao, J. L. Casas, J. A. de Rio [et al.] // *Analytical Biochemistry.* – 1990. – Vol. 185. – P.335-338.

64. Arunkumar, R. The macular carotenoids: A biochemical overview / R. Arunkumar, A. Gorusupudi, P. S. Bernstein // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* – 2020. – Vol. 1865, №11. – P. 158617.
65. Arunkumar, R. The macular carotenoids: A biochemical overview / R. Arunkumar, A. Gorusupudi, P. S. Bernstein // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* – 2020. – Vol. 1865, №11. – P. 158617.
66. Arunkumar, R. The macular carotenoids: A biochemical overview // R. Arunkumar, A. Gorusupudi, P. S. Bernstein // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* – 2020. – Vol. 1865, №11. – P. – 158617- 158657.
67. Aucar, M. G. Molecular Docking Using Quantum Mechanical-Based Methods. / M. G. Aucar, C. N. Cavasotto // *Methods Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 2114. – P. 269-284.
68. Autodock.scripps.edu [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://autodock.scripps.edu> (дата обращения – 22.10.2020).
69. AutoGrow4 is an open-source program for semi-automated computer-aided drug discovery [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://durrantlab.pitt.edu/autogrow4> (дата обращения – 12.09.2023).
70. Ayala, M. Halogenases: a biotechnological alternative for the synthesis of halogenated pharmaceuticals / M. Ayala, L. Segovia, E. Torres // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 16, №14. – P. 1100-1111.
71. Babaki, M. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t-butanol and blue silica gel contents / M. Babaki, M. Yousefi, Z. Habibi [et al.] // *Renewable Energy.* – 2016. – Vol. 9. - P. 196-206.
72. Bai, J. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases / J. Bai, Y. Zhang, C. Tang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol.133. – P.110985.
73. Baraskar, K. Therapeutic Role of Phyto-phenol Gallic Acid for the Cure of COVID-19 Pathogenesis / K. Baraskar, P. Thakur, R. Shrivastava, V. K.

Shrivastava // *Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets.* – 2023. – Vol. 23, №4. – P. 464-469.

74. Barba, F. J. Bioactive components from leaf vegetable products / F. J. Barba, M. J. Esteve, A. Frígola // *Studies in Natural Products Chemistry.* – 2014. – Vol. 41. – P. 321-346.

75. Batool, M. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm / M. Batool, B. Ahmad, S. Choi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 2783.

76. Benguo, L. Empirical, thermodynamic and quantum-chemical investigations of inclusion complexation between flavanones and (2-hydroxypropyl)-cyclodextrins / L. Benguo, L. Wei, A. N. Tien, Zh. Jian // *Food Chemistry.* – 2012. – Vol. 134, №2. – P. 926–932.

77. Benjamin, E. Blass Basic principles of drug discovery and development. – Elsevier Inc. P., 2015 – 574 p.

78. Bergmann, J. Combining crystallography with quantum mechanics / J. Bergmann, E. Oksanen, U. Ryde // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2022. – Vol. 72. - P. 18-26.

79. Bernstein, P. S. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease/ P. S. Bernstein, B. Li , P. P. Vachali // *Prog Retin Eye Res.*– 2016.– Vol. 50. – P. 34-66.

80. Bezborodov, A. M. Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals (Review) / A. M. Bezborodov, N. A. Zagustina // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2016. – Vol. 52. – P. 237-249.

81. Bhosale, P. Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye / P. Bhosale, A. J. Larson, J. M. Frederick [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, №47. – P. 9447-9454

82. Biasutto, L. Ester-Based Precursors to Increase the Bioavailability of Quercetin / L. Biasutto, E. Marotta, U. De Marchi [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2007. –Vol. 50, №2. – P. 241–253.

83. Bilal, M. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point / M. Bilal, H. M. N. Iqbal, S. Guo [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 108. – P. 893–901.
84. Bimonte, S. Epigallocatechin-3-gallate in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma: experimental findings and translational perspectives / S. Bimonte, V. Albino, M. Piccirillo [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy.* – 2019. – Vol. 13. – P. 611.
85. Bimonte, S. The Potential Roles of Epigallocatechin-3-Gallate in the Treatment of Ovarian Cancer: Current State of Knowledge / S. Bimonte, M. Cascella // *Drug Design, Development and Therapy.* – 2020. – Vol. 14. – P. 4245.
86. Bitencourt-Ferreira, G. Docking with AutoDock4 / G. Bitencourt-Ferreira, V. O. Pintro, W. F. Jr. de Azevedo // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 2053. – P. 125-148.
87. Bitencourt-Ferreira, G. Docking with GemDock / G. Bitencourt-Ferreira, W. F. Jr. de Azevedo // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 2053. – P. 169-188.
88. Bitencourt-Ferreira, G. Molecular Docking Simulations with ArgusLab / G. Bitencourt-Ferreira, W. F. Jr. de Azevedo // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 2053. – P. 203-220.
89. Bitencourt-Ferreira, G. Molegro Virtual Docker for Docking / G. Bitencourt-Ferreira, W. F. Jr. de Azevedo // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 2053. – P. 149-167.
90. Bornscheuer, U. T. Engineering the third wave of biocatalysis / U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas // *Nature.* – 2012. – Vol. 485, №7397. – P. 185-94.
91. Brand-Williams, W. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity / W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset // *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* – 1995. – Vol. 28. – P. 25-30.

92. Breitenbach, J. Engineered maize as a source of astaxanthin: processing and application as fish feed / J. Breitenbach, M. Nogueira, G. Farré [et al.] // *Transgenic Res.* – 2016. – Vol. 25, №6. – P. 785-793.
93. Britton, G. *Carotenoids Handbook* / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – Basel: Birkhäuser, 2003. – 671 p.
94. Britton, G. *Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health.* – Basel, Boston, Berlin.: Birkhäuser Verlag, 2009. – pp. 464.
95. Bryan, M. C. Green chemistry meets asymmetric organocatalysis: a critical overview on catalysts synthesis / M. C. Bryan, P. J. Dunn, D. Entwistle [et al.] // *Green Chem.* – 2018. – Vol. 20. - P. 5082-5103.
96. Buckheit, R. W. Unique Anti-Human Immunodeficiency Virus Activities of the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Calanolide A, Costatolide, and Dihydrocostatolide / R. W. Buckheit, E. L. White, V. Fliakas-Boltz [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43, №8. – P. 1827–1834.
97. Byrska-Bishop, M. High-coverage whole-genome sequencing of the expanded 1000 Genomes Project cohort including 602 trios / M. Byrska-Bishop, U. S. Evani, X. Zhao // *Cell.* – 2022. Vol. 185, №18. – P. 3426-3440.
98. Cai, L. Gallic acid mitigates LPS-induced inflammatory response via suppressing NF- κ B signalling pathway in IPEC-J2 cells / L. Cai, Z. Wei, X. Zhao [et al.] // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* – 2022. – Vol. 106, №5. – P. 1000-1008.
99. Carbonell, P. Selenzyme: enzyme selection tool for pathway design / P. Carbonell, J. Wong, N. Swainston [et al.] // *Bioinformatics.* – 2018. – Vol. 34, №12. – P. 2153-2154.
100. Carbonera, D. Violaxanthin and Zeaxanthin May Replace Lutein at the L1 Site of LHCII, Conserving the Interactions with Surrounding Chlorophylls and the Capability of Triplet-Triplet Energy Transfer / D. Carbonera, A. Agostini, M. Bortolus [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, №9. – P 4812-4825.

101. Carvalho, A. C. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates / A. C. Carvalho, T. de S. Fonseca, M. C. de Mattos // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015.– Vol. 16, №12. - P. 29682-716.
102. Castro de Almeida, D.K. Lipase-catalysed enantioselective kinetic resolution of rac-lipidic alkynylcarbinols and a C5 synthon thereof via a hydrolysis approach / D. K. Castro de Almeida, M. R. da Silva, M. C. de Mattos [et al.] // *Molecular Catalysis.* –2020. – Vol. 488. – P. 110926.
103. CFM-ID 4.0 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://cfmid4.wishartlab.com>. (дата обращения – 18.11.2020).
104. Chandra, P. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review / P. Chandra, S. R. Enespa, P. K. Arora // *Microb. Cell Fact.* – 2020. – Vol. 19, №1. – P. 169.
105. Chandra, P. Sources, purification, immobilization and industrial applications of microbial lipases: An overview. / P. Chandra, Enespa, R. Singh // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2023. – Vol. 63, №24. – P.6653-6686.
106. Chandrasekar, D. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations / D. Chandrasekar, K. Madhusudhana, S. Ramakrishna, Prakash V. Diwan // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2006. – Vol.40. – P. 460-464.
107. Chekanov, K. Diversity and Distribution of Carotenogenic Algae in Europe: A Review / K. Chekanov // *Mar. Drugs.* – 2023. – Vol. 21(2). – P. 108-139.
108. Che-Kim, T. Comparative in vitro activities of the new quinolone nemonoxacin (TG-873870), gemifloxacin and other quinolones against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Che-Kim, L. Chih-Cheng, L. Chun-Hsing [et al.] // *J. of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2009. – Vol. 64. – P. 428-435.
109. ChEMBL – manually curated database of bioactive molecules with drug-like properties [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (дата обращения – 20.10.2020).

110. Cheminformatic Tools and Databases for Pharmacology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/LEA3D/index.html> (дата обращения – 12.09.2023).
111. Cho, S. Y. Quercetin-POC conjugates: Differential stability and bioactivity profiles between breast cancer (MCF-7) and colorectal carcinoma (HCT116) cell lines / S. Y. Cho, M. K. Kim, K. S. Park [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21, №7. – P.1671-1679.
112. Clementina, M. M. Santos The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids / M. M. Santos Clementina, Artur M. S. Silva // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25, № 3. - P. 696.
113. Cong-Ran, L. In vivo antibacterial activity of Nemonoxacin, a novel non-fluorinated quinolone / L. Cong-Ran, L. Yi, L. Guo-Qing [et al.] // *J. Antimicrob Chemother.* – 2010. – Vol. 65. – P. 2411-2415.
114. Crystallography Open Data base (COD) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.crystallography.net/cod/> (дата обращения – 19.10.2020).
115. Database of medical and biological publications of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) USA [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения – 22.10.2020).
116. de Araújo, M. E. Biocatalytic synthesis of flavonoid esters by lipases and their biological benefits / M. E. de Araújo, Y. E. Franco, M. C. Messias, GBLongato[et al.] // *Planta Med.* – 2017. – Vol. 83, №. 01/02. – P.7-22.
117. de María, P. D. Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents (2014–2019) / P. D. de María, G. de Gonzalo, A. R. Alcántara // *Catalysts.* – 2019. Vol. 9, №802. - P. 2-42.
118. de Ruyck, J. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel / J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, M. F. Lensink // *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* – 2016. – Vol. 9. – P. 1-11.
119. Del Arco, J. New trends in the biocatalytic production of nucleosidic active pharmaceutical ingredients using 2'-deoxyribosyltransferases / J. Del Arco, J. Acosta, J. Fernández-Lucas // *Biotechnol. Adv.* – 2021. – Vol. 51. – P. 107701.

120. Demmig-Adams, B. Zeaxanthin and Lutein: Photoprotectors, Anti-Inflammatories, and Brain Food / B. Demmig-Adams, M. López-Pozo, J. J. Stewart // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, №16. – P. 3607-3621.
121. Deng, H. Application of cinnamic acid in the structural modification of natural products: A review / H. Deng, Q. Xu, H. Y. Guo [et al.] // *Phytochemistry*. – 2023. – Vol. 206. - P. 113532.
122. Di Carlo, G. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs / G. Di Carlo, G. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso // *Life Sciences*. – 1999. – Vol. 65, № 4. – P.337–353.
123. Di Petrillo, A. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review / A. Di Petrillo, G. Orrù, A. Fais, M. C. Fantini // *Phyther. Res.* – 2022. – Vol. 36, №1. – P. 266-278.
124. Dimmito, M. P. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Cinnamic Acid-Based Antimicrobials / M. P. Dimmito, L. Marinucci, G. Magi [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2022. – Vol.15, №2. – P. 228.
125. DockThor - A Free Web Server for Protein-ligand Docking [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dockthor.lncc.br/v2/> (датаобращения – 22.10.2020).
126. Dodd, T. Simulation-Based Methods for Model Building and Refinement in Cryoelectron Microscopy / T. Dodd, C. Yan, I. Ivanov // *J. Chem. Inf. Model.* – 2020. – Vol. 60, №5. – P. 2470-2483.
127. Dong, H. Astaxanthin preparation by fermentation of esters from *Haematococcus pluvialis* algal extracts with *Stenotrophomonas species* / X. Dong, X. Li, X. Xue, X. Mao // *Biotechnol Prog.* – 2016. – Vol. 32, №3. - P. 649-656.
128. DrugBank Online (Database for Drug and Drug Target Info) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.drugbank.ca/> (дата обращения – 19.10.2020).
129. Dulęba, J. The influence of substrate systems on the enantioselective and lipolytic activity of immobilized Amano PS from *Burkholderia cepacia* lipase

- (APS-BCL) / J. Duleba, T. Siódmiak, M. P. Marszał // *Process Biochemistry*. – 2022. – Vol.120. – P. 126–137.
130. Elbahnaswy, S. Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: a review / S. Elbahnaswy, G. E. Elshopakey // *Fish Physiol. Biochem.* – 2024. – Vol. 50, №1. – P. 97-126.
131. Engleder, M. On the current role of hydratases in biocatalysis / M. Engleder, H. Pichler // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, №14. – P.5841-5858.
132. Engstrom, K. Directed evolution of an enantioselective lipase with broad substrate scope for hydrolysis of alpha-substituted esters / K. Engstrom, J. Nyhlen, A. G. Sandstrom, J.-E. Backvall / *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132, №20. – P. 7038–7042.
133. *Enzyme Technologies: Metagenomics, Evolution, Biocatalysis, and Biosynthesis*. – Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010. – 368 p.
134. Faber, K. Biocatalysis: Ready to master increasing complexity / K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner // *Adv. Synth. Catal.* – 2019. – Vol. 361. – P. 2373-2376.
135. Fassett, R. G. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease / R. G. Fassett, J. S. Coombes // *Mar. Drugs*. – 2011. – Vol. 9, №3. – P. 447-465.
136. Federsel, H. J. Recent trends in enzyme immobilization-concepts for expanding the biocatalysis toolbox / H. J. Federsel, T. S. Moody, S. J. C Taylor // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, №9. – P. 2822.
137. Feinstein, D. L. The relative toxicity of brodifacoum enantiomers / D. L. Feinstein, K. Gierzal, A. Iqbal [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2019. – Vol. 15, № 306. – P. 61-65.
138. Feng, L. S. Feng Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: A mini-review / L. S. Feng, J. B. Cheng, W. Q. Su // *Arch Pharm (Weinheim)*. – 2022. – Vol.355, №7. – P. e2200052.

139. Fengping, M. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. Fengping, L. Dayan, L. Yeguang, Z. Mingtao // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – Vol. 352. – P. 176-181.
140. Fifere, A. Does Protocatechuic Acid Affect the Activity of Commonly Used Antibiotics and Antifungals? / A. Fifere, I. A. Turin-Moleavin, I. Rosca // *Life (Basel)*. – 2022. – Vol. 12, №7. P. 1010.
141. Frassanito, R. High production of unexpected carotenoids in Dinophyceae. Astaxanthin esters from the freshwater dinoflagellate *T. sanguine* / R. Frassanito, G. Flaim, I. Mancini, G. Guella // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2006. – Vol. 34. – P. 843–853.
142. Frey, K. M. Crystal Structures of HIV-1 Reverse Transcriptase with Picomolar Inhibitors Reveal Key Interactions for Drug Design / K. M. Frey, M. Bollini, A. C. Mislak, J. A. Cisneros [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134. – P. 19501-19503.
143. Galarza, J. I. Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress / J. I. Galarza, B. O. Arredondo Vega, J. Villón, V. Henríquez // *Biotechnol Rep (Amst)*. – 2019. – e00351. – 31 p.
144. GAMESS: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.msg.chem.iastate.edu/gamess/download.html>. (дата обращения – 18.11.2020).
145. García-Romera, M. C. Effect of macular pigment carotenoids on cognitive functions: A systematic review / M. C. García-Romera, M. C. Silva-Viguera, I. López-Izquierdo [et al.] // *Physiol Behav*. – 2022. – Vol. 254. – P. 113891.
146. Gibbs, R. A. The Human Genome Project changed everything / R. A. Gibbs // *Nat Rev Genet*. – 2020. – Vol. 21, №10. – P. 575-576.
147. Gloriam, D. E. Bigger is better in virtual drug screens / D. E. Gloriam // *Nature*. – 2019. – Vol. 566. - P. 193-194.

148. Godoy, C. A. Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks / C. A. Godoy, J. S. Pardo-Tamayo, O. Barbosa // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, №17. - P. 9933.
149. Godoy, C. A. New Strategy for the Immobilization of Lipases on Glyoxyl- Agarose Supports: Production of Robust Biocatalysts for Natural Oil Transformation / C. A. Godoy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol.18, №10. – P.2130-2149.
150. Gómez-Estaca, J. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and a-tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient / J. Gómez-Estaca, M. M. Calvo, Álvarez- I. Acero, P. Montero, // *Food Chemistry.* – 2017. – Vol. 216. – P. 37-44.
151. Gross, G. J. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax) / G. J. Gross, S. F. Lockwood // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 75. – P. 215–224.
152. Gross, G. J. Seven day oral supplementation with Cardax (disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats / G. J. Gross, S. L.Hazen, S. F. Lockwood // *Mol. Cell Biochem.* – 2006. – Vol. 283. – P. 23–30.
153. Grotewold, E. *The Science of Flavonoids* / E. Grotewold. The Ohio State University Columbus, Ohio, USA, 2006. – 273 p.
154. Grudzinski, W. Physiological Significance of the Heterogeneous Distribution of Zeaxanthin and Lutein in the Retina of the Human Eye / W. Grudzinski, R. Luchowski, J. Ostrowski [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, №13. – P. 10702.
155. Guillou, A. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste / A. Guillou, M. Khalil, L. Adambounou // *Aquaculture.* – 1995. – Vol. 130. – P. 351-360.
156. Guowen, L. Pharmacokinetic properties of isorhamnetin, kaempferol and quercetin after oral gavage of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. in rats

using a UPLC-MS method / L. Guowen, Z. Xiaoli, X. Yan [et al.] // *Fitoterapia*. – Vol. 83, № 1. – P.182-191.

157. Han, D. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications / D. Han, Q. Hu, Y. Li. // *Algae*. – 2013. – Vol. 28, №2. – P. 131-147.

158. Hanefeld, U. Biocatalysis making waves in organic chemistry / U. Hanefeld, F. Hollmann, C. E. Paul // *Chem. Soc. Rev.* – 2022. – Vol. 51, №2. – P. 594-627.

159. Tanambell H., Screening of In Vitro Health Benefits of Tangerine Tomatoes / H. Tanambell, S. Y. Quek, K. S. Bishop // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – P. 230-245.

160. Heidary Moghaddam, R. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review / R. Heidary Moghaddam, Z. Samimi, S. Z. Moradi [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 887. – P. 173535.

161. Henss, L. The green tea catechin epigallocatechin gallate inhibits SARS-CoV-2 infection / L. Henss, A. Auste, C. Schürmann [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2021. – Vol. 102. – P. 001574.

162. Hephzibah, C. R. A review of bioinformatics tools and web servers in different microarray platforms used in cancer research / C. R. Hephzibah, K. S. Udhaya, S. Younes [et al.] // *Adv Protein Chem Struct Biol.* – 2022. – Vol. 131. – P. 85-164.

163. Hernandez-Marin, E. Cis Carotenoids: Colorful Molecules and Free Radical Quenchers / E. Hernandez-Marin, A. Martínez, A. Galano // *Journal of Physical Chemistry B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter*. – 2013. – Vol. 117, № 15. – P. 4050-4061.

164. Higuera-Ciapara, I. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, F. M. Goycoolea // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2006. – Vol.46, №2. – P. 185-196.

165. Honda, M. Application of E/Z-Isomerization Technology for Enhancing Processing Efficiency, Health-Promoting Effects, and Usability of Carotenoids: A

- Review and Future Perspectives / M. Honda // *J. Oleo Sci.* – 2022. – Vol. 71, №2. – P. 151-165.
166. Horvath, M. P. Bernstein Structure of the lutein-binding domain of human StARD3 at 1.74 Å resolution and model of a complex with lutein / M. P. Horvath, E. W. George, Q. T. Tran // *Structural Biology communications.* – 2016. – Vol. 72, № 8. – P. 609-618.
167. Hosseini, A. Quercetin and metabolic syndrome: A review / A. Hosseini, B. M. Razavi, M. Banach, H. Hosseinzadeh // *Phytother. Res.* – 2021. – Vol. 35, №10. – P. 5352-5364.
168. Hoyos, P. Biocatalysis in the pharmaceutical industry. A greener future / P. Hoyos, V. Pace, M. J. Hernaiz, A. R. Alcantara // *Current Green Chemistry.* – 2014. – Vol.1, №2. – P. 115-181.
169. Hristea, E. N. Reaction of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl with HO·, O₂ ·-, HO- , and HOO- Radicals and Anions / E. N. Hristea, M. T. Caproiu, G. Pencu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2006. – Vol. 7. – P. 130-143.
170. Huang, S. M. Efficient Approach for Lipase-Catalyzed Synthesis of Retinyl Laurate Nutraceutical by Combining Ultrasound Assistance and Artificial Neural Network Optimization / S. M. Huang, H. J. Li, Y. C. Liu [et al.] // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22., № 11. – P. 1972. doi:10.3390/molecules22111972.
171. Huang, Ting Pharmacokinetics and Bioavailability Enhancement of Baicalin: A Review / Huang Ting, Liu Yanan, Zhang Chengliang // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* – 2019. – Vol. 44, №2. – P.159-168.
172. Huffman, M. A. Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir / M. A. Huffman, A. Fryszkowska, O. Alvizo [et al.] // *Science.* – 2019. – Vol. 366, №6470. – P. 1255-1259.
173. Hussein, G. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition / G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2006. – Vol.69, №3. – P. 443-449.

174. Illane, A. Dr. Frances Arnold is awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2018: Good news for biocatalysis / A. Dr. Illane // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 36. – P. A1.
175. Ilyasov, I. R. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways / I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova, R. P. Terekhov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, №3. – P. 1131.
176. Ilyasov, I. R. Three ABTS^{•+} radical cation-based approaches for the evaluation of antioxidant activity: fast- and slow-reacting antioxidant behavior / I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova // *Chemical Papers*. – 2018.
177. International Union of Pure and Applied Chemistry [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://iupac.org/> (дата обращения – 19.10.2020).
178. InterProScan – InterPro. Classification of protein families: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/interpro> (дата обращения – 18.11.2023).
179. Javed, Z. Myricetin: targeting signaling networks in cancer and its implication in chemotherapy / Z. Javed, K. Khan, J. Herrera-Bravo [et al.] // *Cancer Cell. Int.* – 2022. – Vol. 22, №1. – P. 239–252.
180. Jiang, W. Synthesizing chiral drug intermediates by biocatalysis / B. Jiang, B. Fang // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 192, №1. – P. 146-179.
181. Jiang, Y. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent / Y. Jiang, J. Pei, Y. Zheng [et al.] // *Chin. J. Integr. Med.* – 2022. – Vol.28, №7. – P. 661-671.
182. Jiumn-Yih, W. Enzymatic Synthesis of Novel Vitexin Glucosides / W. Jiumn-Yih, W. Tzi-Yuan, D. Hsiou-Yu [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, №20. – P. 6274.
183. Johnson, E. J. Intake of lutein and zeaxanthin differ with age, sex, and ethnicity / E. J. Johnson, J. E. Maras, H. M. Rasmussen, K. L. Tucker // *J. Am. Diet. Assoc.* – 2010. – Vol. 110, №9. – P. 1357–1362.

184. Johra, F. T. Mechanistic Review of β -Carotene, Lutein, and Zeaxanthin in Eye Health and Disease / F. T. Johra, A. K. Bepari, A. T. Bristy, H. M. Reza // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, №11. - P. 1046-1067.
185. Jones, C. W. Another nobel prize for catalysis: Frances Arnold in 2018 / C. W. Jones // *ACS Catal.* – 2018. – Vol. 8. - P. 10913-10913.
186. Jourdan, J. P. Drug repositioning: a brief overview / J. P. Jourdan, R. Bureau, C. Rochais [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 72, № 9. – P. 1145-1151.
187. Jovanovic, S. V. Flavonoids as Antioxidants / S. V. Jovanovic, S. Steeden, M. Tomic [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1994. – Vol. 116. – P. 4846-4851.
188. Kale, M. A. Drug Repositioning: A Unique Approach to Refurbish Drug Discovery / M. A. Kale, P. B. Shamkuwar, V. K. Mourya [et al.] // *Curr Drug Discov/ Technol.* – 2022. – Vol. 19, №1. – P. e140122192307.
189. Kaur, T. Molecular Docking in Formulation and Development / T. Kaur, A. Madgulkar, M. Bhalekar, K. Asgaonkar // *Curr. Drug Discov. Technol.* – 2019. – Vol. 16, №1. – P. 30-39.
190. Kaur, T. Molecular Docking in Formulation and Development / T. Kaur, A. Madgulkar, M. Bhalekar, K. Asgaonkar // *Curr. Drug Discov. Technol.* – 2019. – Vol. 16, №1. – P. 30-39.
191. Khachik, F. Total synthesis of (3R,3'R,6'R)-lutein and its stereoisomers / F. Khachik, A. N. Chang // *J. Org. Chem.* – 2009. – Vol. 74, №10. - P. – 3875-3885.
192. Khan, S. K. Novel astaxanthin prodrug (CDX-085) attenuates thrombosis in a mouse model / S. K. Khan, T. Malinski, R. P. Mason [et al.] // *Thromb Res.* – 2010. – Vol. 126. – P. 299-305.
193. Kim, M. Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promoiety / M. K. Kim, K. S. Park, C. Lee // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol.53, №. 24. – P. 8597-85607.

194. Kim, Y. S. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans* / Y. S. Kim, H. W. Seo, M.-H. Lee [et al.] // Archives of Pharmacal Research. – 2014. – Vol. 2, №37. - P. 245–252.
195. Koninklijke N. V. Patent 2707193 US // Publ. Date 26.04.1955. Hiroshi Takahashi Patent 3673239 US // Publ. Date 27.07.1972.
196. Kontogiannia, A. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media / A. Kontogiannia, V. Skouridoua, V. Seretia [et al.] // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2001. – Vol. 103. – P. 655-660.
197. Kossaify, A. Vernakalant in Atrial Fibrillation: A relatively new weapon in the armamentarium against an old enemy / A. Kossaify // Drug Target Insights. – 2019. – Vol. 13, №1. – P. 1–7.
198. Krinsky, N. I. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye / N. I. Krinsky, J. T. Landrum, R. A. Bone // Annu. Rev. Nutr. – 2003. – Vol. 23. – P. 171-201.
199. Krzysztoforska, K. Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of in vitro and in vivo studies in rodents and humans / K. Krzysztoforska, D. Mirowska-Guzel, E. Widy-Tyszkiewicz // Nutr Neurosci. – 2019. – Vol. 2, №22. - P. 72-82.
200. Kumar, S. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview / S. Kumar, A. K. Pandey // Scientific World Journal. – 2013. – P. 162750.
201. Kyriakou, E. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening / E. Kyriakou, A. Primikyri, P. Charisiadis [et al.] // Org. Biomol. Chem. – 2012.– Vol. 10. – P. 1739.
202. Landrum, J. T. Analysis of macular carotenoids in the developing macaque retina: The timeline of macular pigment development / J. T. Landrum, V. Mendez, Y. Cao, [et al.] // Methods Enzymol. – 2022. – Vol. 674. – P. 215-253.
203. Lee, B. W. Selective ABTS Radical-Scavenging Activity of Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata* / B. W. Lee, J. H. Lee, S. W. Gal [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2006. – Vol. 70, №2. – P. 427–432.

204. Lee, C. Three decades of the Human Genome Organization / C. Lee, S. E. Antonarakis, A. Hamosh, J. Burn // *Am J Med Genet A.* – 2021. – Vol. 185, №11. – P. 3314-3321.
205. Li, B. Identification of StARD3 as a lutein-binding protein in the macula of the primate retina / B. Li, P. Vachali, J. M. Frederick, P. S. Bernstein // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, №13. – P. 2541-2549.
206. Li, B. Human ocular carotenoid-binding proteins / B. Li, P. Vachali, P. S. Bernstein // *Photochem Photobiol Sci.* – 2010. – Vol. 9, №11. – P. 1418-1425.
207. Li, B. Mechanism for the selective uptake of macular carotenoids mediated by the HDL cholesterol receptor SR-BI. / B. Li, E. W. George, P. Vachali [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2023. – Vol. 229. – P. 109429-109462.
208. Li, G. Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes / G. Li, J. B. Wang, M. T. Reetz // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26, №7. – P. 1241–1251.
209. Li, G. The rise of enzyme engineering in China / G. Li // *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities.* – 2015. – Vol. 31, №6. – P. 805-819.
210. Li, W. Highly efficient and regioselective synthesis of dihydromyricetin esters by immobilized lipase / W. Li, H. Wu, B. Liu [et al.] // *Journal of Biotechnology.* – 2015. – Vol. 199. – P. 31–37.
211. Li, X.-X. Iron(II)-induced isomerization of (all-E)-xanthophyll pigments lutein, zeaxanthin, and β cryptoxanthin in acetone / X.-X. Li, L.-J. Han // *Eur Food Res Technol.* – 2008. – №227. – P.1307-1313.
212. LigBuilder V3 - An Integrated De Novo Drug Design System [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pkumdl.cn:8080/ligbuilder3> (дата обращения – 12.09.2023).
213. Limanto, J. A highly efficient asymmetric synthesis of vernakalant / J. Limanto, E. R. Ashley, J. Yin [et al.] // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16, №10. – P. 2716-2719.

214. Liu, P. Hesperetin modulates the Sirt1/Nrf2 signaling pathway in counteracting myocardial ischemia through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis / P. Liu, J. Li, M. Liu [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2021. – Vol. 139. – P. 111552.
215. Liu, S. Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties / S. Liu, C. Li, X. Dai [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2023. -Vol. 164. – P. 114990.
216. Liu, X. Cis-astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer / X. Liu, T. Osawa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 357, №1. – P. 187-93.
217. Liu, X. Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers / X. Liu, X. Junting, Z. Lesong [et al.] // *Food Chem.* – 2023. – Vol. 404 (Pt B). – P.134605.
218. Liu, X. Stereoisomers of Astaxanthin inhibit Human colon cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis / X. Liu, M. Song, Z. Gao [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – Vol. 64. – P. 7750-7759.
219. Liu, Y. A novel process for phosphatidylserine production using a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst with overexpression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in a purely aqueous system / Y. Liu, L. Huang, Y. Fu [et al.] // *Food Chemistry.* – 2019. – Vol. 274. – P. 535-42.
220. Liu, Z. Q. Efficient two-step chemo-enzymatic synthesis of all-trans-retinyl palmitate with high substrate concentration and product yield / Z. Q. Liu, L. M. Zhou, P. Liu [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2015. – № 99. – P. 8891–8902.
221. Lohning, A. E. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists / A. E. Lohning, S. M. Levonis, B. Williams-Noonan, S. S. Schweiker // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 17, №18. – 2023-2040.

222. Lorenz, R. T. Commercial potential of Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin / R. T. Lorenz, G. R. Cysewski // Trends in Biotechnology. – 2000. – Vol. 18. – P. 160–167.
223. Luke, L. Dose escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of Nemonoxacin (TG-873870), a novel potent broad-spectrum nonfluorinated quinolone, in healthy volunteers / L. Luke, C. Li-Wen, T. Cheng-Yuan [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – Vol.54. – P. 405-410.
224. Macalino, S. J. Y. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery / S. J. Y. Macalino, V. Gosu, S. Hong, S. Cho // Arch. Pharm. Res. – 2015. – Vol.38. – P. 1686-1701.
225. Mares, J. Lutein and Zeaxanthin Isomers in Eye Health and Disease / J. Mares // Annu Rev Nutr. – 2016. – №36. – P. 571.
226. Mariutti, L. R. B. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? / L. R. B. Mariutti, A. Z. Mercadante // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 648. – P. 36-43.
227. Marszall, M. P. Immobilization of Candida rugosa lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen / M. P. Marszall, T. Siódmiak // Catalysis Communications. – 2012. Vol. 24. - P. 80-84.
228. McElroy C. R. Towards a holistic approach to metrics for the 21st century pharmaceutical industry / C. R. McElroy, A. Constantinou, L. C. Jones [et al.] // Green Chem. – 2015. – Vol. 17. - P. 3111–3121.
229. Mecenas, A. S. Rutin derivatives obtained by transesterification reactions catalyzed by Novozym 435: Antioxidant properties and absence of toxicity in mammalian cells / A. S. Mecenas, C. R. Adão Malafaia, L. S. Sangenito // PLoS One. – 2018. – Vol.13, № 9. – P. 13(9): e0203159.
230. Meléndez-Martínez, A. J. Analysis of geometrical isomers of dietary carotenoids / A. J. Meléndez-Martínez // Methods Enzymol. – 2022. – Vol. 670. – P. 369-398.
231. Mellou, F. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from

- K562 cells / F. Mellou, H. Loutrari, H. Stamatis [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2006. – Vol. 41. – P. 2029–2034.
232. Meng, X. Y. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery / X. Y. Meng, H. X. Zhang, M. Mezei, M. Cui // *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* – 2011. – Vol. 7. – P. 146-157.
233. Meng, X.-Y. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery / X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui // *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* – 2012. – Vol. 72. – P. 146-157.
234. Milborrow, B. V. Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis / B. V. Milborrow // *Carotenoid chemistry and biochemistry*. – 1982. – P. 279 – 295.
235. Miller, N. J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates / N. J. Miller, C. Rice-evans, M. Davies [et al.] // *Clinical Science*. – 1993. – Vol. 84. – P. 407-412.
236. Miller, N. J. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls / N. J. Miller, J. Sampson, L. P. Candeias [et al.] // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 384. – P. 240-242.
237. Min, Z. Structure-activity relationship of flavonoid bifunctional inhibitors against Zika virus infection / Z. Min, L. Hongmiao, L. Jingyan [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 177. – P. 113962.
238. Mohajeri, M. Synthesis and *In vitro* Leishmanicidal Activities of Six Quercetin Derivatives / M. Mohajeri, L. Saghaei, M. Ghanadian [et al.] // *Adv. Biomed. Res.* – 2018. – Vol. 7, № 64. – P. 1-5.
239. Molexus Computational Drug Discovery [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://molexus.io/molegro-virtual-docker/> (дата обращения – 22.10.2020).
240. Motallebi, M. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy / M. Motallebi, M. Bhia, H. F. Rajani [et al.] // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 305. – P. 120752.

241. Mran, M. Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials / M. Mran, F. Saeed, F. Hussain [et al.] // *Food Sci. Nutr.* – 2021. – Vol. 9, №10. – P. 5854–5868.
242. Mrowicka, M. Lutein and Zeaxanthin and Their Roles in Age-Related Macular Degeneration-Neurodegenerative Disease / M. Mrowicka, J. Mrowicki, E. Kucharska, I. Majsterek // *Nutrients.* – 2022. – Vol.14, №4. – P. 827.
243. Murillo, A. G. Zeaxanthin: Metabolism, Properties, and Antioxidant Protection of Eyes, Heart, Liver, and Skin / A. G. Murillo, S. Hu, M. L. Fernandez // *Antioxidants (Basel).* – 2019. – Vol.8, №9. – P. 390-408.
244. Nair, A. Astaxanthin as a King of Ketocarotenoids: Structure, Synthesis, Accumulation, Bioavailability and Antioxidant Properties / A. Nair, A. Ahirwar, S. Singh [et al.] // *Mar. Drugs.* – 2023.– Vol. 21,№ 3. – P. 176.
245. Nakajima, N. Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas* / N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada [et al.] // *Journal Of Bioscience And Bioengineering.* – 2000. – Vol. 90, №3. – P. 347.
246. National Eye Institute: официальный сайт. –RL: <https://www.nei.nih.gov>.
247. Nebeling, L. C. Changes in carotenoid intake in the United States: the 1987 and 1992 National Health Interview Surveys / L. C. Nebeling, M. R. Forman, B. I. Graubard, R. A. Snyder // *J. Am. Diet. Assoc.*– 1997. – Vol. 97, №9. – P. 991-996.
248. Nguyen, K. D. Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production / K. D. Nguyen // *Chem. Biomol. Eng. Publ. Other Works.* – 2013. – Vol.1, №1. – P.1-11.
249. Noeya, E. L. Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductases / E. L. Noeya, N. Tibrewalb, G. Jiménez-Osésa [et al.] // *PNAS.* – 2015. – Vol. 112, №51. – P. E7065-E7072.
250. Nomenclature of carotenoids. IUPAC Commission of the Nomenclature of Organic Chemistry and the IUPAC-IUB Commission on Biochemical

Nomenclature. // Pure and Applied Chemistry. – 1975. – P. 407 – 431. – URL: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/carot/>.

251. Novikov, M. S. 1-[2-(2-Benzoyl-and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents / M. S. Novikov, K. S. Seley-Radtke, O. N. Ivanova, A. V. Ivanov [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2011. – Vol. 19. – P. 5794-5902.

252. Ong, B. B. Age-related macular degeneration / B. B. Ong, F. G. Ah-Fat // Br. J. Hosp. Med. (Lond). – 2016. – Vol. 77, №2. – P. 18-21.

253. OpenGrowth - program which constructs de novo ligands for proteins [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://opengrowth.sourceforge.net> (дата обращения – 12.09.2023).

254. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). [Электронный ресурс] / The Application of biotechnology to industrial sustainability. – Paris: OECD Publishing, 2001. – Режим доступа: doi.org/10.1787/9789264195639-en (дата обращения – 23.10.2023).

255. Ormazabal, P. Effect of protocatechuic acid on insulin responsiveness and inflammation in visceral adipose tissue from obese individuals: possible role for PTP1B / P. Ormazabal, B. Scazzocchio, R. Vari [et al.] // International Journal of Obesity. – 2018. – Vol.42, №12. – P. 2012–2021.

256. Øyvind, M. Markham Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications / M. Øyvind, K. R. Andersen // Taylor & Francis Group, LLC. - 2006. – 1212 p.

257. Paiva, V. A. Protein structural bioinformatics: An overview / V. A. Paiva, I. S. Gomes, C. R. Monteiro [et al.] // Comput Biol Med. – 2022. – Vol. 147. P. 105695.

258. Pameijer, E. M. What did we learn in 35 years of research on nutrition and supplements for age-related macular degeneration: a systematic review / E. M. Pameijer, P. Heus, J. A. A. Damen [et al.] // Acta Ophthalmol. – 2022. – Vol. 100, №8. – P. e1541-e1552.

259. Panche, A. Flavonoids: an overview / A. Panche, A. Diwan, S. Chandra // Journal of Nutritional Science. – 2016. – Vol. 5, E47. – P. 1-15.

260. Panis, G. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line Author links open overlay panel / G. Panis, G. Rosales Carreon // *Algal. Research.* – 2016. – Vol. 18. – P. 175-90.
261. Park, K.-S. Synthesis and biological evaluation of flavonol-glucose conjugates for cosmeceutical development / K.-S. Park, K. Hyungmi, M. Kim [et al.] // *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* – 2015. – Vol. 58, №3. – P.317.
262. Park, R. Epigallocatechin Gallate (EGCG), a Green Tea Polyphenol, Reduces Coronavirus Replication in a Mouse Model / R. Park, M. Jang, Y.-I. Park [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13. – P. 2533.
263. Passicos, E. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure / E. Passicos, X. Santarelli, D. Coulon // *Biotechnology Letters.* – 2004. – Vol. 26. – P.1073-1076.
264. Patent CN105063120B Zhejiang Changming Pharmaceutical CO Ltd. Declared of 07.08.2018 Available from: <https://patents.google.com/patent/CN105063120A/en>.
265. Patent CN104164469B Method for using *Candida antarctica* lipase B to produce the chiral drug intermediate ticagrelor / G. Zheng, Q. Chen // Publ. Date. Declared of 26.11.2014 Available from: <https://patents.google.com/patent/CN104164469B/en?q=+Patent+CN104164469B>.
266. Patent 7566795 US Preparation of retinyl esters / N. W. Boaz, S. K. Clendennen // Declared of 28.07.2014. – Available from: <https://patents.google.com/patent/US7566795B2/en>.
267. Patent WO2017144423A1 Process of the preparation of Sofosbuvir / M. Gaboardi, G. Pallanza, M. Baratella, G. Castaldi, M. Castaldi. Declared of 31.08.2017. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2017144423A1/en?q=Patent++WO2017144423A1>.
268. Patent 10765660 B2 US Agent containing flavonoid derivatives for treating cancer and inflammation / H. Lowe, N. J. Toyang, J. Bryant // Declared of

- 27.06.2017. – Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/8a/c5/67/7f84f832259b2e/US10765660.pdf>.
269. Patent WO2009019561A2 Process for preparing chiral compounds / D. W. Bauer, S. Hu, P. M. O'neil, T. Watson // Declared of 14.05.2009.
270. Patent WO2014155291A1 Process and intermediates for the preparation of pregabalin / S. Debarge, D. T. Erdman, P. M. O'Neill, R. Kumar, M. J. Karmilowicz // Declared of 02.10.2014. – Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2014155291A1/en?q=Patent+WO2014155291A1>.
271. Patent WO2014198247A1 Process for producing cathine / D. Rother, M. Poh, T. Sehl, Á. G .Baraibar // Declared of 18.12.2014. – Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2014198247A1/en?q=Patent+WO2014198247A1>.
272. Patil, A. D. Pharmaceutical and nutraceutical potential of natural bioactive pigment: astaxanthin / A. D. Patil, P. . Kasabe, P. B. Dandge // Nat. Prod. Bioprospect. – 2022. – Vol. 12, №1. – P. 25-51.
273. Pechincky, S. V. Synthesis of astaxanthin end its esters (Chapter 1) / S. V.Pechincky, A. G. Kuregyan, E. T. Oganessian // Global Perspectives on Astaxanthin From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications – Elsevier (USA), 2021. – P. 1–18.
274. 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.
275. 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.
276. Perinelli, D. R. Antioxidant Properties of Ester Derivatives of Cinnamic and Hydroxycinnamic Acids in Nigella sativa and Extra-Virgin Olive Oils-Based Emulsions / D. R. Perinelli, E. Torregiani, G. Bonacucina [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol.11, №2. – P. 194.

277. PfamScan. PfamScan is used to search a FASTA sequence against a library of Pfam HMM: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/pfamscan> (дата обращения – 18.11.2023).
278. Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants / P. G. Pietta // *Journal of Natural Products*. – 2000. – Vol. 63, №7. – P. 1035-1042.
279. Pillaiyar, T. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery / T. Pillaiyar, S. Meenakshisundaram, M. Manickam, M. Sankaranarayanan // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 95. – P. 112275.
280. Pinzi, L. In silico repositioning of cannabigerol as a novel inhibitor of the enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase / L. Pinzi; C. Lherbet, M. Baltas [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 2567.
281. Pinzi, L. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery / L. Pinzi, G. Rastelli // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 4331.
282. Pisoschi, A. M. Methods for total antioxidant activity determination. A review / A. M. Pisoschi, G. P. Negulescu // *Biochem. and Anal. Biochem.* – 2011. – Vol.1. – P.1–10.
283. Prenatal Carotenoid Supplementation With Lutein or Zeaxanthin Ameliorates Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) in *Bco2*^{-/-} Macular Pigment Mice / R. Arunkumar, B. Li, E. K. Addo [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* – 2023. – Vol. 64, №4. – P. 9.
284. PubChem – open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения – 19.10.2020).
285. PubMed: официальный сайт. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=flavonoids&sort=pubdate&timeline=expanded>
286. Qureshi, R. AI in drug discovery and its clinical relevance / R. Qureshi, M. Irfan, T. M. Gondal [et al.] // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9, №7. – P. e17575.

287. Rahman, S. EC-BLAST: a tool to automatically search and compare enzyme reactions / S. Rahman, S. Cuesta, N. Furnham [et al.] // *Nature Methods*. – 2014. – Vol. 11. – P. 171-174.
288. Ramesh, H. Considerations for the application of process technologies in laboratory- and pilot-scale biocatalysis for chemical synthesis / H. Ramesh, M. Nordblad, J. Whittall, J. M. Woodley [Электронный ресурс], 2016. – Режим доступа: doi.org/10.1002/9781118697856.ch01.
289. Raza, S. H. A. Beneficial effects and health benefits of Astaxanthin molecules on animal production: / S. H. A. Raza, S. R. Z. Naqvi, S.A. Abdelnour [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 138. – P. 69-78.
290. Razak, N. N. A. Enzymatic Synthesis of Flavonoid Ester: Elucidation of Its Kinetic Mechanism and Equilibrium Thermodynamic Behavior / N. N. A. Razak, M. S. M. Annuar // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2015. – Vol. 54. № 21. – P. 5604-5612.
291. RCSB Protein Data Bank (RCSBPDB) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rcsb.org> (дата обращения – 20.10.2020).
292. Re, R. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1999. – Vol. 26, №. 9/10. – P. 1231–1237.
293. Reetz, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future / M. T. Reetz // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, № 34. – P. 12480-12496.
294. Regner, E. L. Biomass-bound biocatalysts for biodiesel production: Tuning a lipolytic activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation using agro-industrial raw materials and waste products / E. L. Regner, H. N. Salvatierra, M. D. Baigorí, L. M. Pera // *Biomass and Bioenergy*. – 2019. Vol. 120. – P. 59-67.
295. Reis, P. Lipases at interfaces: A review / P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke [et al.] // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2009. – Vol. 147–148. – P. 237–250.

296. Rice-Evans, C. Total antioxidant status in plasma and body fluids / C. Rice-Evans, N. J. Miller // *Methods in Enzymology*. – 1994. – Vol. 234. – P. 279-293.
297. Robertson, D. E. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization / D. E. Robertson, B. A. Steer // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2004. - Vol. 8, № 2. – P. 141-149.
298. Robinson, P. K. *Enzymes: principles and biotechnological applications* / P. K. Robinson // *Essays Biochem.* – 2015. – Vol. 59, №15. – P. 1-41.
299. Rodella, U. Antioxidant Nutraceutical Strategies in the Prevention of Oxidative Stress Related Eye Diseases / U. Rodella, C. Honisch, C. Gatto [et al.] // *Nutrients*. – 2023. – Vol.15, №10. – P. 2283.
300. Rodríguez-deLeón, E. A Simple and Efficient Method for the Partial Synthesis of Pure (3R,3'S)-Astaxanthin from (3R,3'R,6'R)-Lutein and Lutein Esters via (3R,3'S)-Zeaxanthin and Theoretical Study of Their Formation Mechanisms / E. Rodríguez-deLeón, Oscar. C. Jiménez-Halla, José E. Báez, M. Moustapha Bah // *Molecules*. – 2019. – Vol.24. – P. 1386-1399.
301. Rogers, L. Continuous manufacturing – the Green Chemistry promise? / L. Rogers, K. F. Jensen // *Green Chem.* – 2019. – Vol. 21. – P. 3481-3498.
302. Ronald, A. R. *Fluoroquinolone antibiotics* / A. R. Ronald, D. E. Low . – Basel - Boston – Berlin : Springer Basel AG, 2003. – 261 p.
303. Rondanelli, M. Diet and ideal food pyramid to prevent or support the treatment of diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and cataracts / M. Rondanelli, C. Gasparri, A. Riva [et al.] // *Front Med (Lausanne)*. 2023. – Vol. 10. – P. 1168560.
304. Roschangar, F. A deeper shade of green: inspiring sustainable drug manufacturing / F. Roschangar, J. Colberg, P. J. Dunn [et al.] // *Green Chem.* – 2017. – Vol. 19. - P. 281-285.
305. Roy, A. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications / A. Roy, A. Khan, I. Ahmad [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2022. – Vol. 2022. – P. 5445291.

306. Roy, S. Drug Repurposing: An Emerging Tool for Drug Reuse, Recycling and Discovery / S. Roy, S. Dhaneshwar, B. Bhasin // *Curr Drug Res Rev.* – 2021. – Vol. 13, №2. – P. 101-119.
307. Rudroff, F. Whole-cell based synthetic enzyme cascades—light and shadow of a promising technology / F. Rudroff // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 2019. – Vol. 49. – P. 84-90.
308. Ruwizhi, N. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy / N. Ruwizhi, B. A. Aderibigbe // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020.–Vol.21, №16. – P. 5712.
309. Rychlicka, M. Biological Properties, Health Benefits and Enzymatic Modifications of Dietary Methoxylated Derivatives of Cinnamic Acid / M. Rychlicka, A. Rot, A. Gliszczyńska // *Foods.* – 2021. – Vol. 10, №6. – P. 1417.
310. Sahni, S. Total carotenoid intake is associated with reduced loss of grip strength and gait speed over time in adults: The Framingham Offspring Study / S. Sahni, A. B. Dufour, R. A. Fielding [et al.] // *Am.J. Clin. Nutr.* – 2021. – Vol.113, №2. – P. 437-445.
311. Saini, R. K. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits-A Review of Recent Advancements / R. K. Saini, P. Prasad, V. Lokesh [et al.] // *Antioxidants (Basel).* – 2022. — Vol. 11, № 4. – P. 795-829.
312. Salmaso, V. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview / V. Salmaso, S. Moro // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 923.
313. Sardone, L. Temperature and pressure dependence of quercetin-3-O-palmitate interaction with a model phospholipid membrane: film balance and scanning probe microscopy study / L. Sardone, B. Pignataro, F. Castelli [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2004. – Vol. 271, № 2. - P. 329–353.
314. Saskia, A. B. E. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids / A. B. E. Saskia, V. Acker, D.-j. V. D. Berg [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1996. – Vol.20, №3. – P. 331–342.

315. Selenzyme: Enzyme Selection Tool: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://selenzyme.synbiochem.co.uk>. (дата обращения – 18.11.2023).
316. Semenov, A. N. Protein-Mediated Carotenoid Delivery Suppresses the Photoinducible Oxidation of Lipofuscin in Retinal Pigment Epithelial Cells / A. N. Semenov, E. G. Maksimov, A. M. Moysenovich [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2023. – Vol.12, №2. – P. 413-432.
317. Seri, J. Flavonoids with inhibitory activity against SARS-CoV-2 3CLpro / J. Seri, S. Kim, D. Y. Kim [et al.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 35, №1. – P. 1539-1544.
318. Sethi A. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications / A. Sethi, K. Joshi, K. Sasikala, M. Alvala [Электронный ресурс], 2020. – Режим доступа: [doi:10.5772/intechopen.85991](https://doi.org/10.5772/intechopen.85991).
319. Sharifi-Rad, M. Preclinical Pharmacological Activities of Epigallocatechin-3-gallate in Signaling Pathways: An Update on Cancer // M. Sharifi-Rad, R. Pezzani, M. Redaelli [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 3. – P. 467.
320. Shen, P. Potential Implications of Quercetin in Autoimmune Diseases / P. Shen, W. Lin, X. Deng [et al.] // *Front Immunol*. – 2021. – Vol.12. – P. 689044.
321. Snell, T. W. Astaxanthin Bioactivity Is Determined by Stereoisomer Composition and Extraction Method / T. W. Snell, J. Carberry // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14, №7. – P. 1522.
322. Soheli, Md. Chemotherapeutic potential of hesperetin for cancer treatment, with mechanistic insights: A comprehensive review / Md. Soheli, H. Sultana, T. Sultana // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8, №1. – P. e08815.
323. Song, X. Myricetin: A review of the most recent research / X. Song, L. Tan, M. Wang [et al.] // *Biomed. Pharmacother*. – 2021. – Vol. 134. – P. 111017.
324. Soni, S. Trends in lipase engineering for enhanced biocatalysis / S. Soni // *Biotechnol Appl Biochem*. – 2022. – Vol. 69, №1. – P. 265–272.
325. Spizzo, P. Resolution of (R,S)-flurbiprofen catalysed by dry mycelia in organic solvent / P. Spizzo, A. Basso, C. Ebert [et al.] // *Tetrahedron*. – 2007. Vol. 63, №45. – P. 11005-11010.

326. Stanzione, F. Use of molecular docking computational tools in drug discovery / F. Stanzione, I. Giangreco, J.C. Cole // *Prog. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 60. – P. 273-343.
327. Stergiou, P.Y. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions / P.Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou [et al.] // *Biotechnology Advances.* – 2013. – Vol. 31, № 8. - P. 1846-1859.
328. Stevenson, D. E. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®) / D. E. Stevenson, R. Wibisono, D. J. Jensen [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2006. – Vol. 39. – P. 1236.
329. Subramanian, B. Chromatographic, NMR and vibrational spectroscopic investigations of astaxanthin esters: application to «Astaxanthin-rich shrimp oil» obtained from processing of Nordic shrimps / B. Subramanian, M.-H. Thibault, Y. Djaoued [et al.]// *Royal Society of Chemistry.* – 2015. – P. 1-11.
330. Sundquist, A. R. Cis/trans isomerization of carotenoids by the triplet carbonyl source 3-hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane / A. R. Sundquist, M. Hanusch, W. Stahl, H. Sies // *Photochemistry and Photobiology.* – 1993. – Vol. 57., №. 5. – P. 785–791.
331. Tripathi, A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock / A. Tripathi, V. A. Bankaitis // *J. Mol. Med. Clin. Appl.* – 2018. – Vol. 2, №1. – P. 16966/2575-0305.106.
332. Takac, S. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward S-Naproxen production / S. Takac, M. Bakkal, // *Pro. Biochem.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1021-1027.
333. Tan, J. B. L. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts / J. B. L.Tan, Y. Y. Lim // *J. Foodchem.* – 2014. – Vol. 172, №1 – P. 814-822.
334. Tanaka, T. Cancer chemoprevention by carotenoids. Review / T. Tanaka, M. Shnimizu, H. Moriwaki // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – P. 3202-3242.

335. Tang, D. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone / D. Tang, K. Chen, L. Huang, J. Li // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2017. – Vol. 13, № 3. – P. 323-303.
336. Tanprasertsuk, J. Relationship between concentrations of lutein and StARD3 among pediatric and geriatric human brain tissue / J. Tanprasertsuk, B. Li, P. S. Bernstein [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, №7. – e0159877.
337. Terao, J. Antioxidant Activity of β -Carotene-Related Carotenoids in Solution / J. Terao // *Lipids*. – 1989. – Vol. 24, №7. – P. 659-61.
338. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism / M. Reyes-Farias, C. Carrasco-Pozo // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, №13. – P. 3177.
339. The Uni Prot Consortium Uni Prot [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения – 21.10.2020).
340. Tian, C. Enantiomerization Mechanism of Thalidomide and the Role of Water and Hydroxide Ions / C. Tian, P. Xiu, Y. Meng [et al.] // *Chemistry A European Journal*. – 2012. – Vol. 18, №5. – P. 14305-14313.
341. Todorović, B. Identification and Content of Astaxanthin and Its Esters from Microalgae *Haematococcus pluvialis* by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS after Extraction with Various Solvents / B. Todorović, V. J. Grujić, A. U. Krajnc // *Plants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, №11. – P. 2413-2427.
342. Torres, P. H. M. Key topics in molecular docking for drug design / P. H. M. Torres, A. C. R. Sodero, P. Jofily, F. P. Silva-Jr // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, №18. – P. 4574.
343. Tsujishita, Y. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain / Y. Tsujishita, J. H. Hurley // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, №5. – P. 408-414.
344. Tuli, H. S. Gallic Acid: A Dietary Polyphenol that Exhibits Anti-neoplastic Activities by Modulating Multiple Oncogenic Targets / H. S. Tuli, H. Mistry, G. Kaur [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem*. – 2022. – Vol. 22, №3. – P. 499-514.

345. Tungmunnithum, D. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview / D. Tungmunnithum, A. Thongboonyou, A. Pholboon, A. Yangsabai // *Medicine*. – 2018. – Vol. 5, № 3. – P. 93-109.
346. Tutunchi, H. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19 / H. Tutunchi, F. Naeini, A. Ostadrahimi, M. J. Hosseinzadeh-Attar // *Phytother. Res.* – 2020. – Vol. 34, № 12. – P. 3137-3147.
347. Ullah, A. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent/ A. Ullah, S. Munir, Badshah Syed Lal [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 22. – P. 5243-5282.
348. Updates on drug designing approach through computational strategies: a review. [Электронный ресурс] / I. Azad, T. Khan, N. Ahmad [et al.] // *Future Sci OA*. – 2023. – Vol. 9, №5. – Режим доступа: <https://www.future-science.com/doi/epub/10.2144/fsoa-2022-0085> (дата обращения – 01.12.2023).
349. US 6235294B1 Flavonoide esters and their use notably in cosmetics / E. Perrier, A.-M. Mariotte, A. Boumendjel, D. Bresson-Rival // 2001. – P. 1–11.
350. US 3661890A Preparation of quercetin derivatives. Leonard Jurd, Application filed by US Department of Agriculture USDA, 1972. – P. 1–4.
351. Uwe, T. Bornscheuer (Chemo-) enzymatic cascade reactions / T. Uwe // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 2019. – Vol. 74, № 3–4. – P. 61-62.
352. van Dijk1, C. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles / C. van Dijk1, A. J. Driessen, K. Recourt // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 60, №11. – P.1593.
353. Vant, J. W. Exploring cryo-electron microscopy with molecular dynamics / J. W. Vant, D. Sarkar, J. Nguyen [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2022. – Vol. 50, №1. – P. 569-581.
354. Viskupicova, J. Enzyme-Mediated Preparation of Flavonoid Esters and Their Applications / J. Viskupicova, M. Ondrejovic, T. Maliar // *Biochemistry*. – 2011. – P. 263-289.

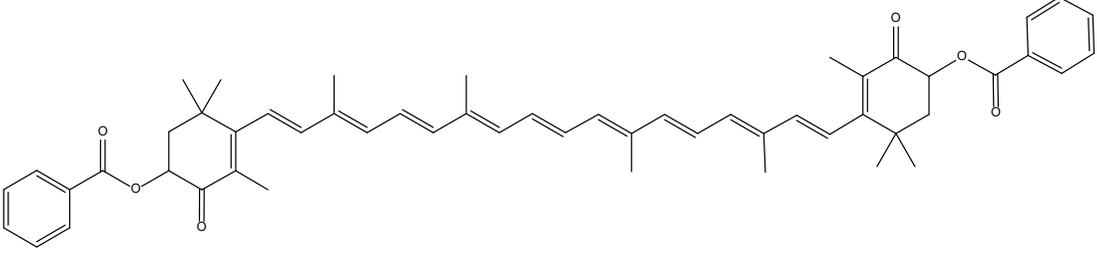
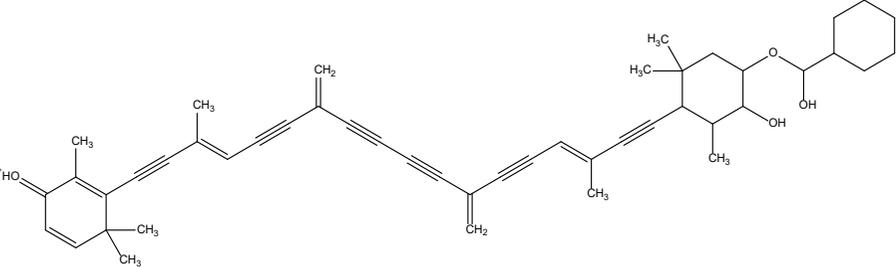
355. Wade, N. M. Dietary astaxanthin levels affect colour, growth, carotenoid digestibility and the accumulation of specific carotenoid esters in the Giant Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* / N. M. Wade, S. Cheers, N. Bourne [et al.] // *Aquac. Res.* – 2017. – Vol. 48. – P. 395-406.
356. Wang, F. CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification / F. Wang, J. Liigand, S. Tian [et al.] // *Analytical Chemistry.* – 2021. – Vol. 93, №34. – P. 11692-11700.
357. Wang, R. Enzymatic Synthesis of Lutein Dipalmitate in Organic Solvents / R. Wang, M. Hou, Y. Zhang [et al.] // *Catal Lett.* 2015. – №145. – P. 995–999.
358. Wang, W. Practical enzymatic production of carbocycles / W. Wang, D.F. Taber, H. Renata // *Chemistry.* – 2021. – Vol. 27, №46. – P. 11773-11794.
359. Way2Drug [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.way2drug.com/passonline/> (дата обращения – 22.10.2020).
360. Zhang W. L., Hydrolysis of Glycosidic Flavonoids during the Preparation of Danggui Buxue Tang: An Outcome of Moderate Boiling of Chinese Herbal Mixture / W. L. Zhang, J.-P. Chen, K. Y.-C. Lam [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* – 2014. – Vol. 2014. – P.1.
361. Wen-wen, H. *Cis-* and *Trans*-Palmitoleic Acid Isomers Regulate Cholesterol Metabolism in Different Ways / H. Wen-wen, H. Bi-hong, B. Kai-Kai [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – 12 p.
362. Wianowska, D. A Concise Profile of Gallic Acid-From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination / D. Wianowska, M. Olszowy-Tomczyk // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28, №3. – P. 1186.
363. Wilson, L. M. The Effect of Lutein/Zeaxanthin Intake on Human Macular Pigment Optical Density: A Systematic Review and Meta-Analysis / L. M. Wilson, S. Tharmarajah, Y. Jia [et al.] // *Adv. Nutr.* – 202. – Vol.12, №6. – P. 2244-2254.
364. World Health Organization, global website: официальный сайт. – URL: https://www.who.int/selection_medicines/list/en.

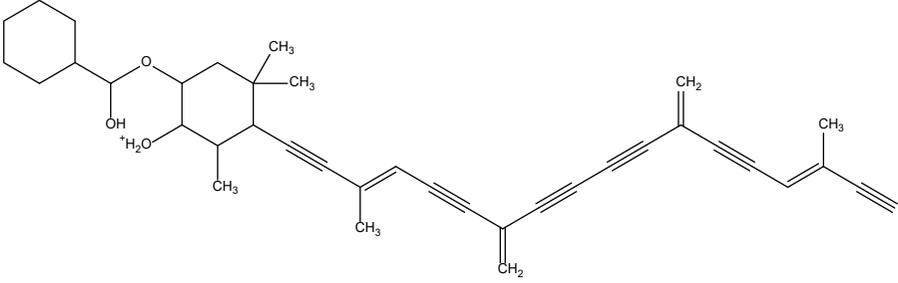
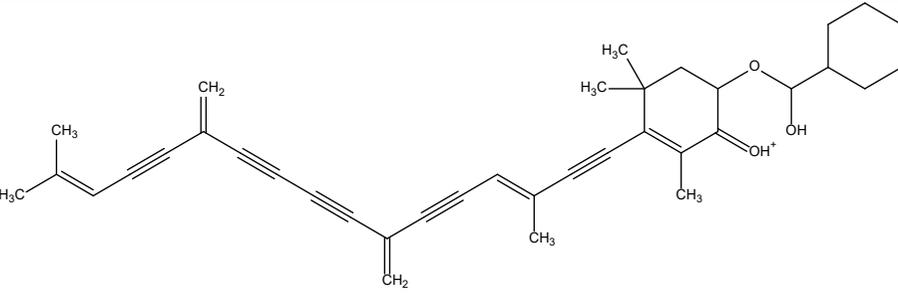
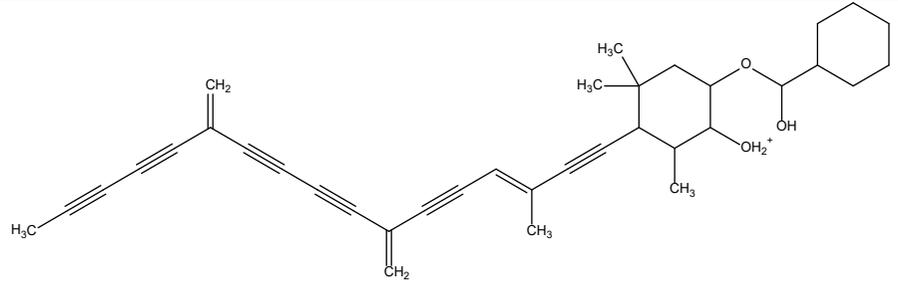
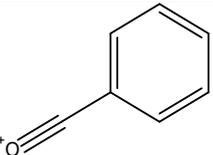
365. Wu, J. Intakes of Lutein, Zeaxanthin, and Other Carotenoids and Age-Related Macular Degeneration During 2 Decades of Prospective Follow-up / J. Wu, E. Cho, W. C. Willett [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 133, №12. – P. 1415-1424.
366. Wu, S. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications / S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* – 2021. – Vol. 60, №1. - P. 88-119.
367. Xu, D. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application / D. Xu, M. J. Hu, Y. Q. Wang, Y. L. Cui // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, №6. – P. 1123.
368. Yamano, Y. Total Synthesis of Loroxanthin / Y. Yamano, M. Tanabe, A. Shimada, A. Wada // *Mar. Drugs.* – 2022. – Vol.20, №11. – P. 658.
369. Yang, H. Hesperetin, a Promising Treatment Option for Diabetes and Related Complications: A Literature Review / H. Yang, Y. Wang, S. Xu [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2022. – Vol. 70, №28. – P. 8582-8592.
370. Yang, L. Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability / L. Yang, X. Qiao, J. Gu [et al.] // *Food Chem.* – 2021. – Vol. 343. – P. 128497.
371. Yang, L. Preparation, characterization and antioxidant activity of astaxanthin esters with different molecular structures / L. Yang, X. Qiao, J. Liu [et al.] // *J. Sci. Food. Agric.* – 2021. – Vol. 101, №6. – P. 2576-2583.
372. Yao, G. DFT-based Raman spectral study of astaxanthin geometrical isomers / G. Yao, M. Muhammad, J. Zhao [et al.] // *Food Chem (Oxf).* – 2022. – Vol.4. – P. 100103-100114.
373. Yao, G. DFT and Raman study of all-trans astaxanthin optical isomers / G. Yao, S. Guo, W. Yu [et al.] // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2021. – Vol. 262. – P. 120143.
374. Yap, K. M. Hesperidin and its aglycone hesperetin in breast cancer therapy: A review of recent developments and future prospects / K. M. Yap, M. Sekar, Y. S. Wu [et al.] // *Saudi. J. Biol. Sci.* – 2021. – Vol. 28, №12. – P. 6730-6747.

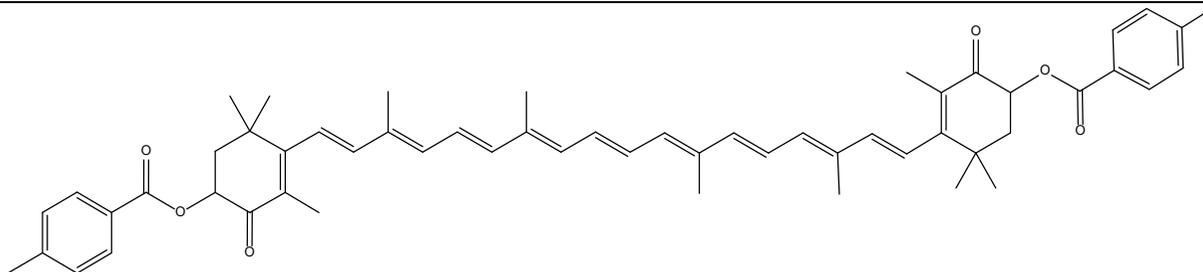
375. Yen-Hsu, Ch. In vitro activity of nemonoxacin (TG-873870), a novel non-fluorinated quinolone, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, enterococci and *Streptococcus pneumoniae* with various resistance phenotypes in Taiwan / Ch. Yen-Hsu, L. Chia-Ying, L. Jang-Jih [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 64.–P. 1226-229.
376. Yi, D. Recent trends in biocatalysis / D. Yi, T. Bayer, C. P. S. Badenhorst [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2021. – Vol. 50, №14. – P. 8003-8049.
377. Yousry, M. A. Naguib Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids / M. A. Yousry // *J. Agric. Food Chem.* – 2000 – Vol. 48, №4. - P. 1150-1154.
378. Yu, M. Gallic acid disruption of A β 1–42 aggregation rescues cognitive decline of APP/PS1 double transgenic mouse / M. Yu, X. Chen , J. Liu [et al.] // *Neurobiol. Dis.*– 2019. – № 124. – P. 67–80.
379. Yuan, C. Long-Term Intake of Dietary Carotenoids Is Positively Associated with Late-Life Subjective Cognitive Function in a Prospective Study in US Women / C. Yuan, E. Fondell, A. Ascherio [et al.] // *J. Nutr.* – 2020. – Vol. 150, №7. – P. 1871-1879.
380. Zeng, W., Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics / W. Zeng, L. Jin, F. Zhang [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2018. – Vol. 135. – P. 122–126.
381. Zhang, S. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle. / S. Zhang, Z. Gai, T. Gui [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2021. – № 8. - P. 6139308.
382. Zhang, W.-W. Improved activity of lipase immobilized in microemulsion-based organogels for (R,S)-ketoprofen ester resolution: Long-term stability and reusability / W.-W. Zhang, J.-Q. Jia, N. Wang [et al.] // *Biotechnol. Rep.* – 2015. Vol. 7. – P. 1-8.
383. Zhang, Y. Q. A New Risk Model Based on 7 Quercetin-Related Target Genes for Predicting the Prognosis of Patients With Lung Adenocarcinoma / Y. Q. Zhang, K. Li, Q. Guo, D. Li // *Front Genet.* – 2022. – Vol. 13. – P. 890079.

384. Zhao, J. Systems pharmacological study illustrates the immune regulation, anti-infection, anti-inflammation, and multi-organ protection mechanism of Qing-Fei-Pai-Du decoction in the treatment of COVID-19 / J. Zhao, S. Tian, D. Lu // *Phytomedicine*. – 2021. – Vol. 85. – P. 1533-15.
385. Zhao, L. Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin / L. Zhao, G. Zhao, F. Chen [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2006. – Vol. 54, №21. – P. 8346-51.
386. Zhao, Y. Astaxanthin preparation by lipase-catalyzed hydrolysis of its esters from *Haematococcus pluvialis* algal extracts / Y. Zhao, F. Guan, G. Wang [et al.] // *J. Food Sci.* – 2011 – Vol. 76, №4. – P. 643-650.
387. Zhong, L. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production / L. Zhong, Y. Feng, G. Wang [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 152. – P. 207-222.
388. Zhou, S.-F. *Drug Design and Discovery: Principles and Applications* / S.-F. Zhou, W.-Z. Zhong // *Molecules*. – 2017. Vol. 22. – P. 279.
389. ZINC database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://zinc.docking.org/> (дата обращения – 20.10.2020).

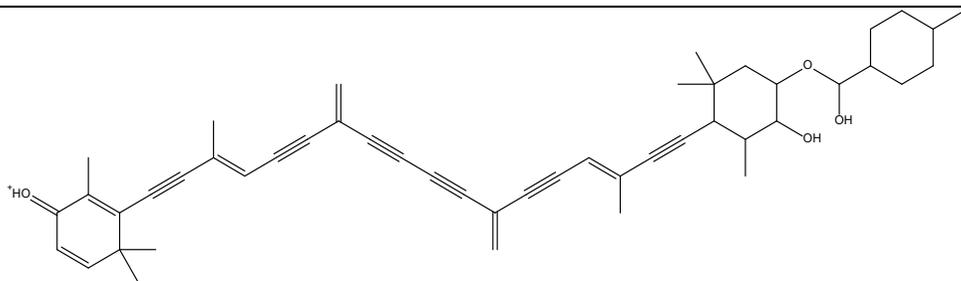
Таблица 1 – Теоретические данные и экспериментальные результаты анализа производных ксантофиллов методом масс-спектрометрии (соединения С.1 – С.19)

№	Структура фрагмента	Прогнозируемая масса	Экспериментальная масса	Относительная интенсивность
β, β-каротин-4,4'-дион-3,3'- дибензоат (соединение С.1)				
				
1		681,4	681,37	100

2	 <p>Chemical structure of a complex polyene chain. It features a cyclohexane ring attached to a chain containing a hydroxyl group, a methoxy group, and several methyl groups. The chain is highly conjugated, with alternating double and triple bonds, and ends with a terminal alkyne group.</p>	547,32	547,35	22
3	 <p>Chemical structure of a complex polyene chain. It features a cyclohexane ring attached to a chain containing a hydroxyl group, a methoxy group, and several methyl groups. The chain is highly conjugated, with alternating double and triple bonds, and ends with a terminal alkyne group.</p>	533,3	533,32	29
4	 <p>Chemical structure of a complex polyene chain. It features a cyclohexane ring attached to a chain containing a hydroxyl group, a methoxy group, and several methyl groups. The chain is highly conjugated, with alternating double and triple bonds, and ends with a terminal alkyne group.</p>	521,3	521,29	18
5	 <p>Chemical structure of a phenylacetylene derivative, showing a benzene ring attached to an ethynyl group.</p>	105,0	105,11	17

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.2)


1

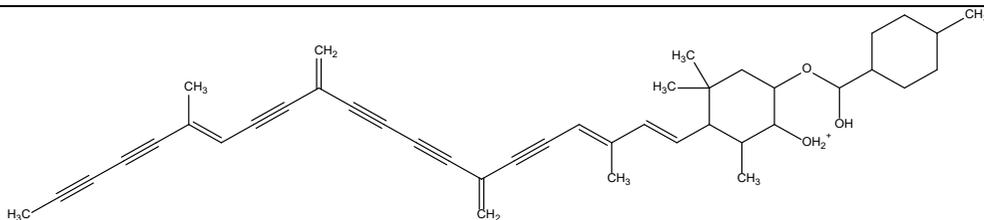


695,4

695,42

100

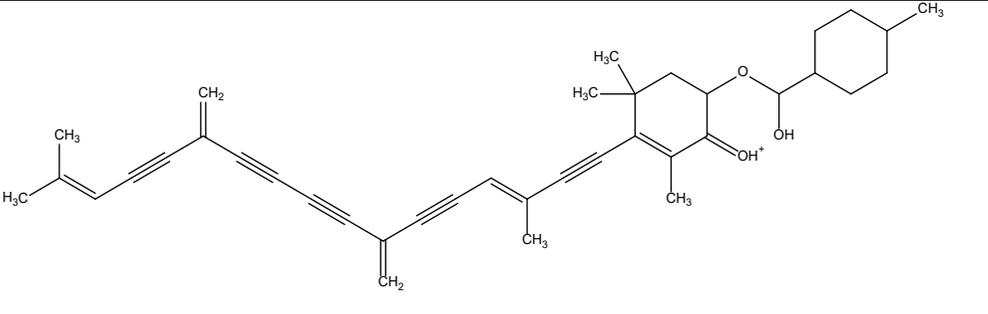
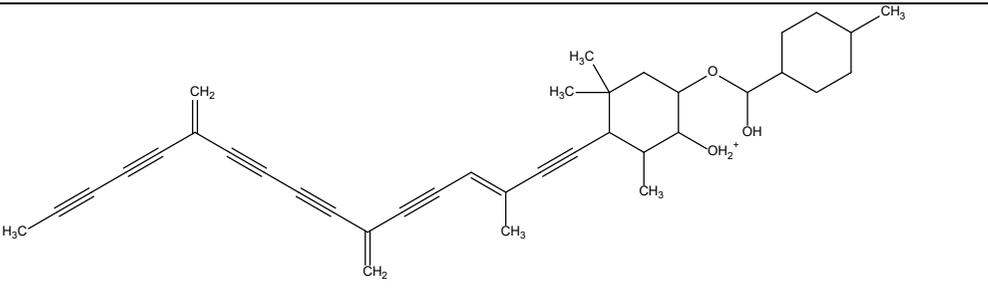
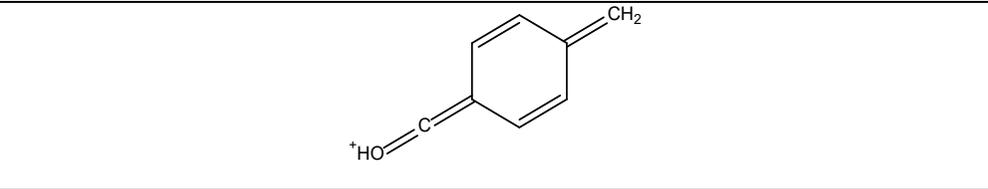
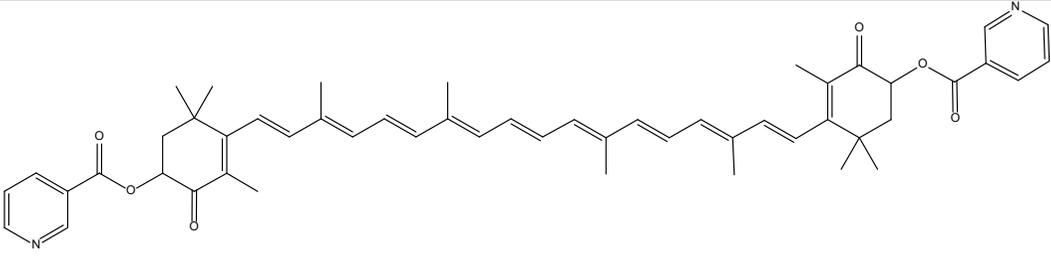
2

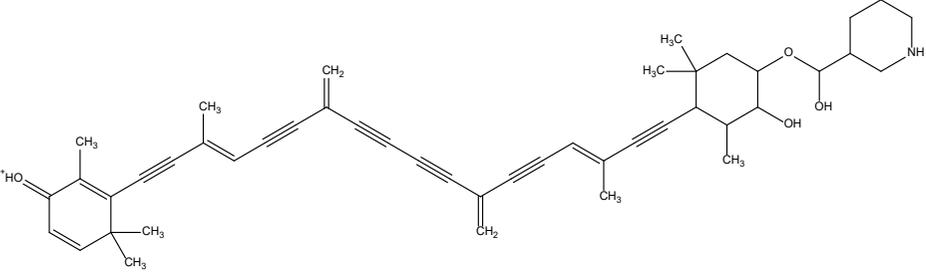
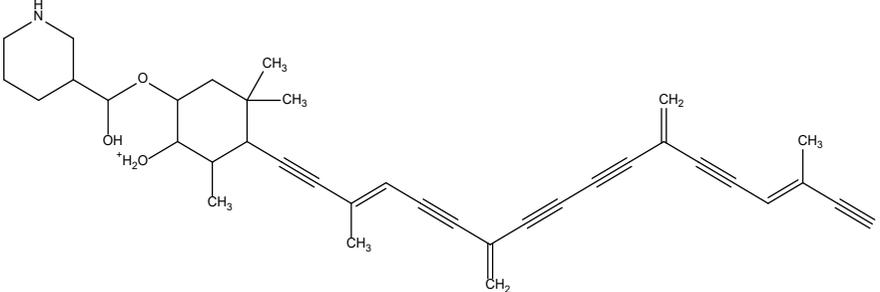
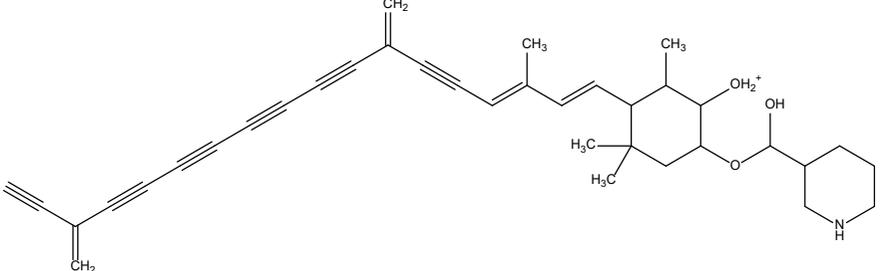


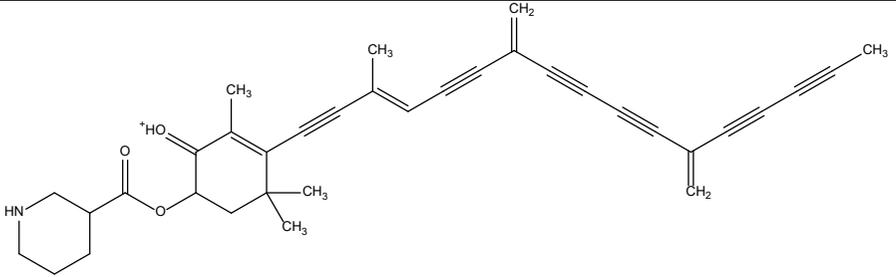
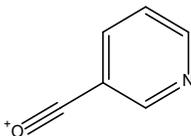
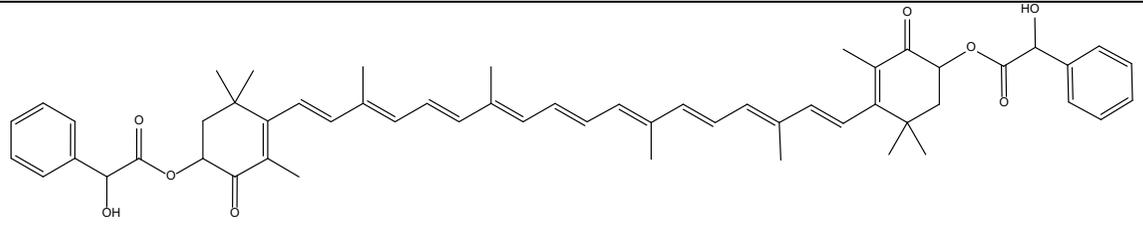
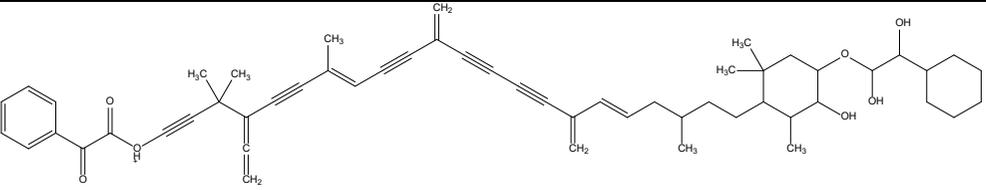
601,4

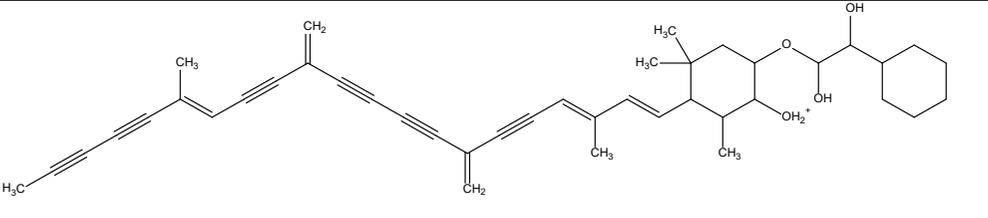
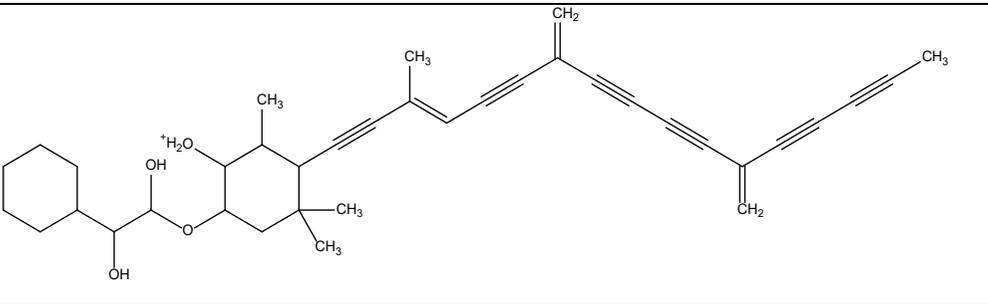
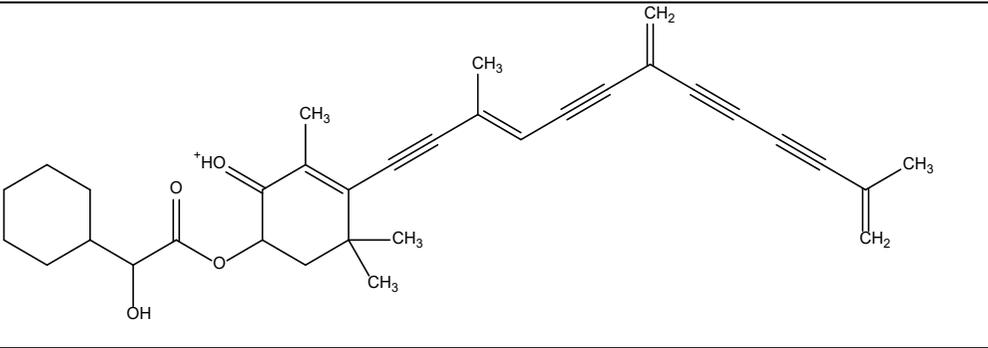
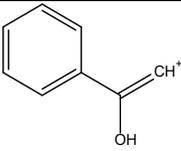
601,37

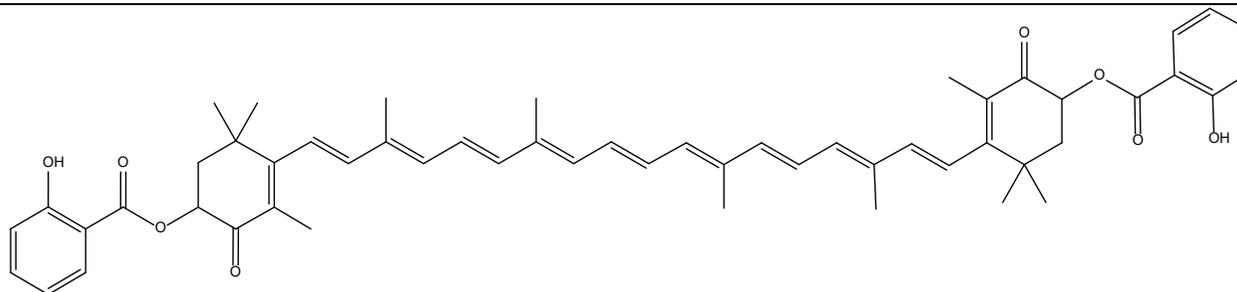
9

3		547,3	547,38	28
4		535,3	535,14	18
5		119,1	119,05	15
β, β-каротин-4,4'-дион-3,3'- диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.3)				
				

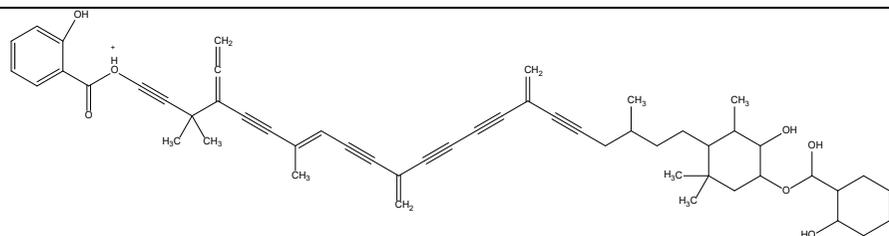
1		682,4	682,37	100
2		548,3	548,28	27
3		534,3	534,33	34

4		516,3	516,24	20
5		106,0	106,11	11
β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.4)				
				
1		837,5	837,45	100

2		617,4	617,34	6
3		551,3	551,37	11
4		497,3	497,25	7
5		119,0	119,11	22

β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.5)


1

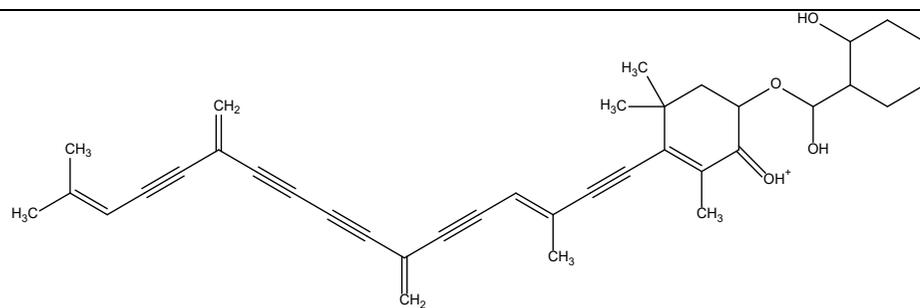


809,4

809,43

100

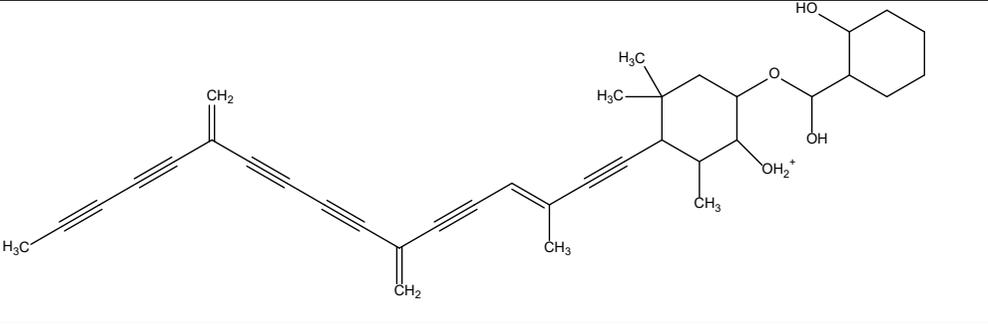
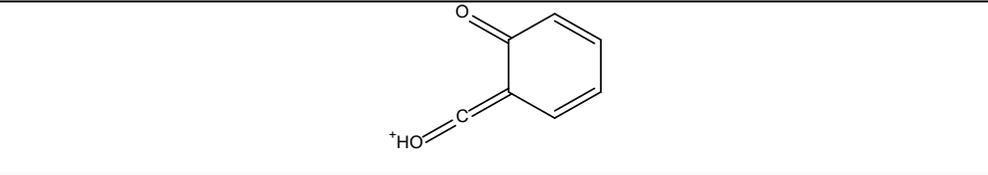
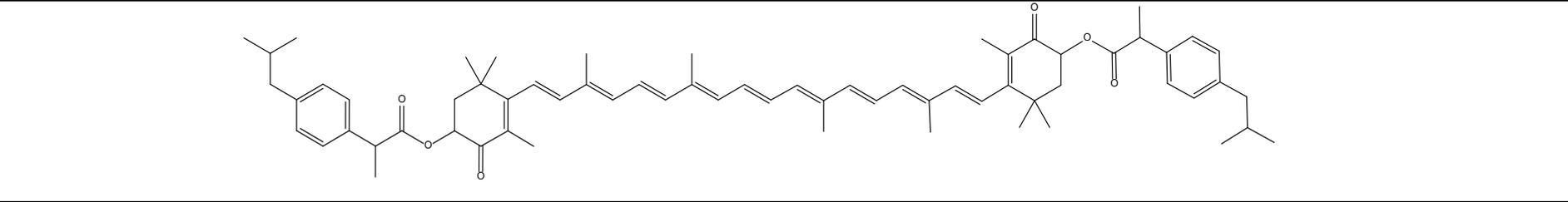
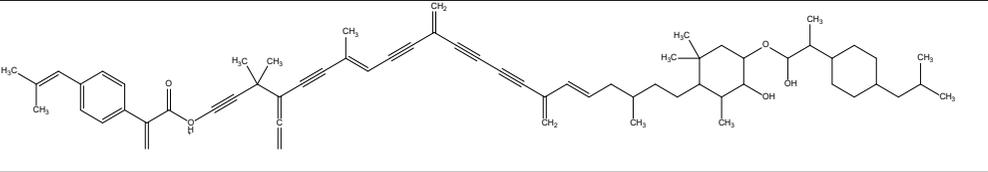
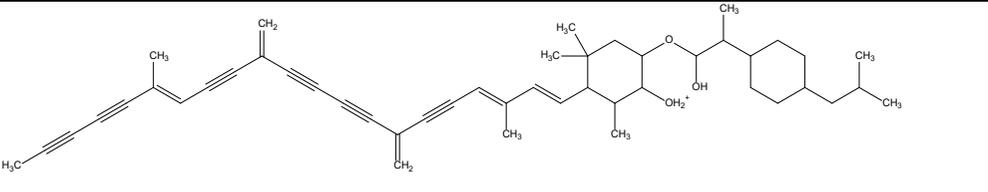
2

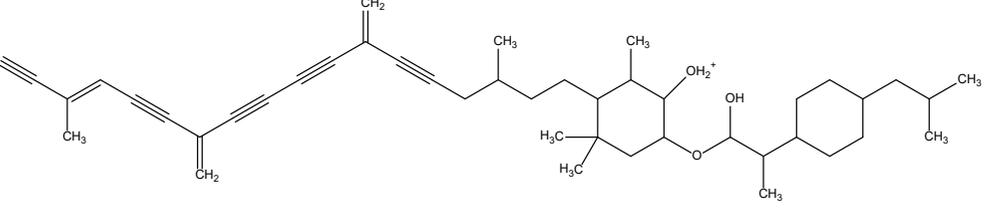
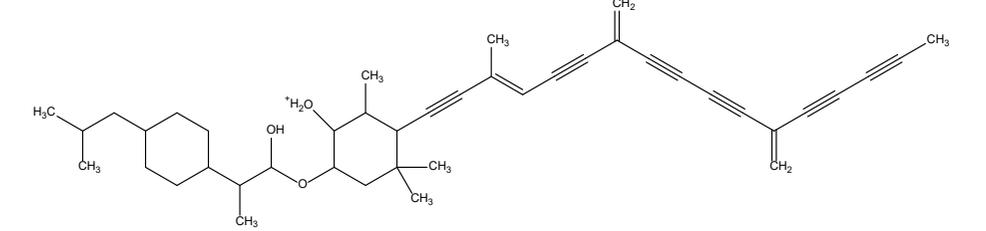
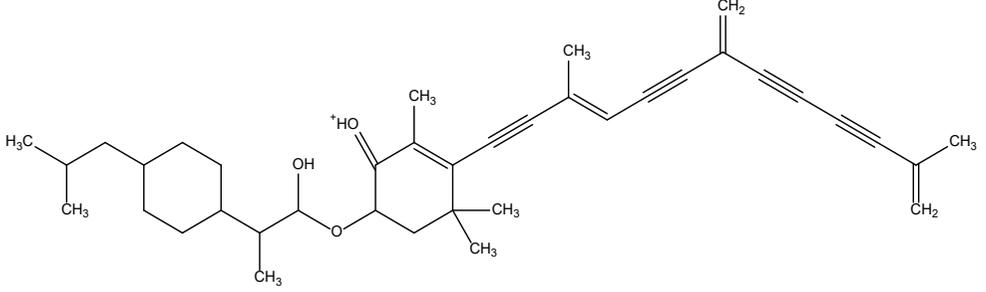
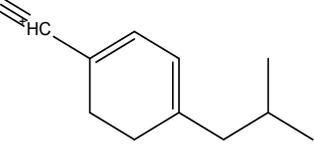


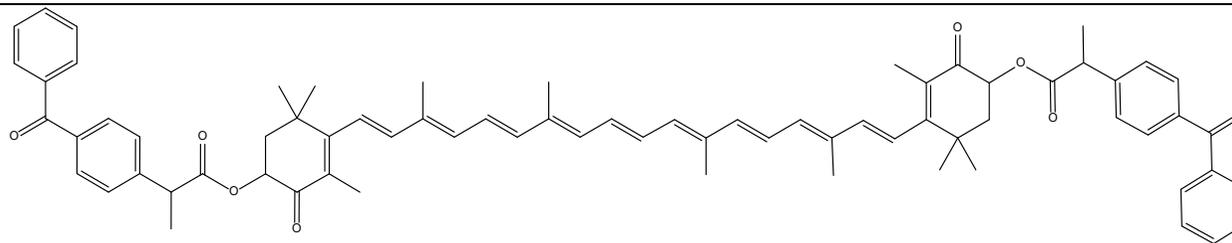
549,3

549,22

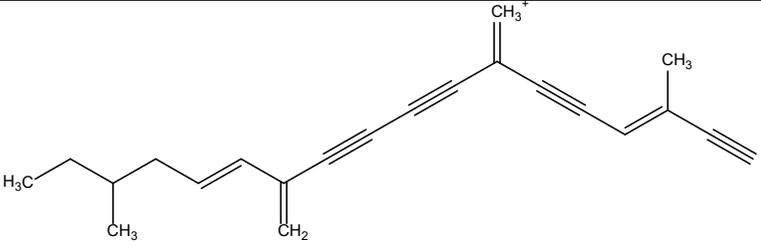
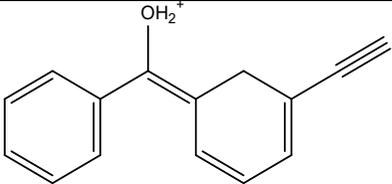
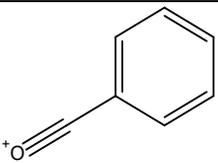
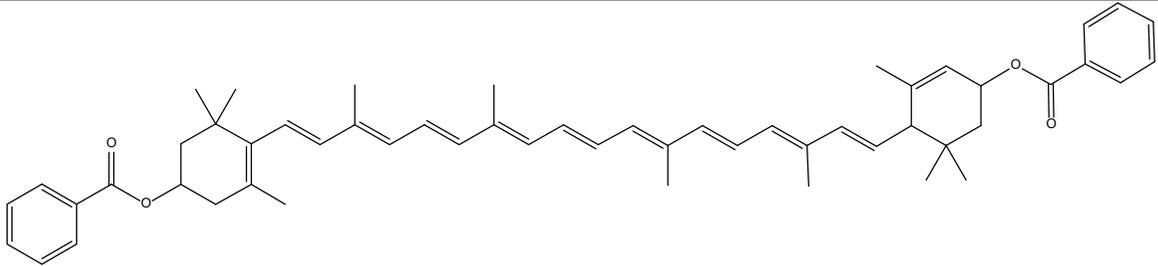
14

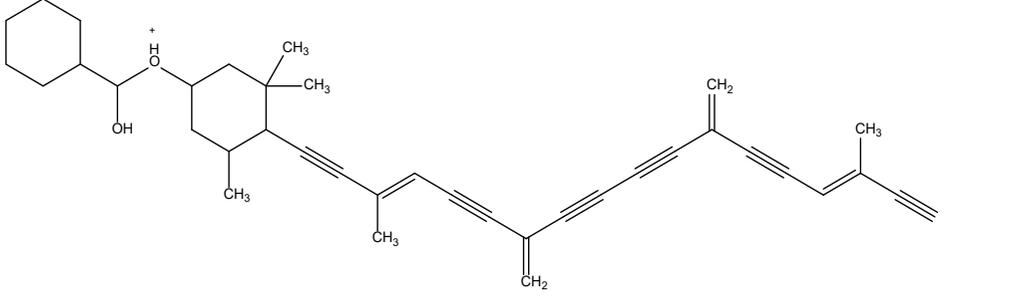
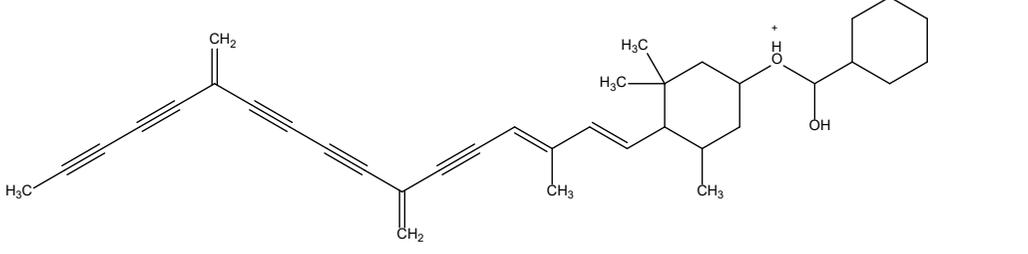
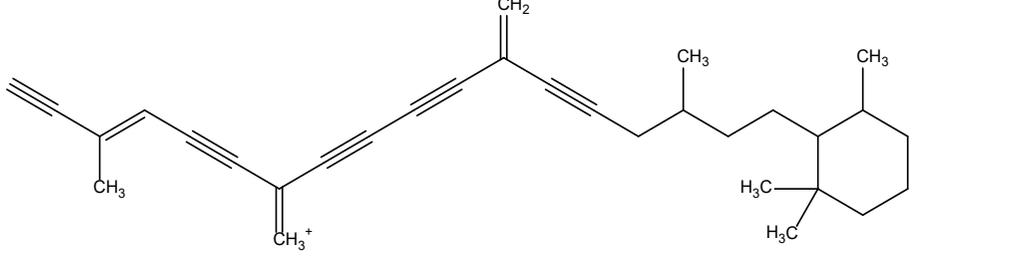
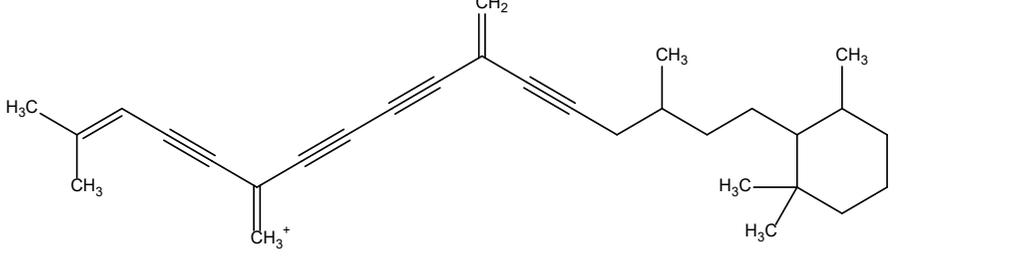
3		537,3	537,27	9
4		121,0	121,41	14
β,β-каротин-4,4'-дион-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (соединение С.6)				
				
1		943,6	943,54	100
2		671,4	671,49	21

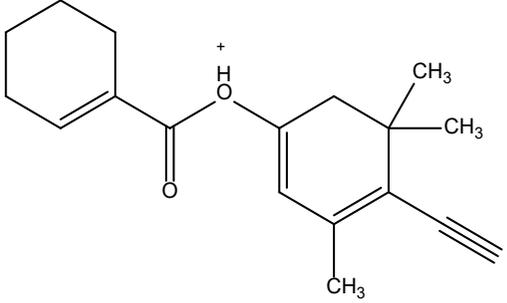
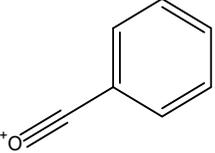
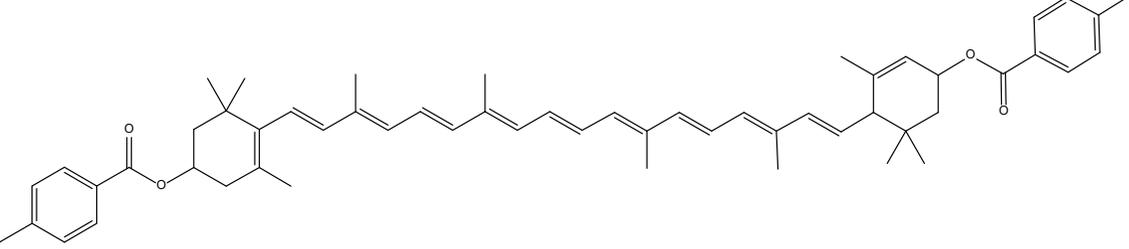
3		637,5	637,47	27
4		605,4	605,35	45
5		553,4	553,36	33
6		161,1	161,09	15

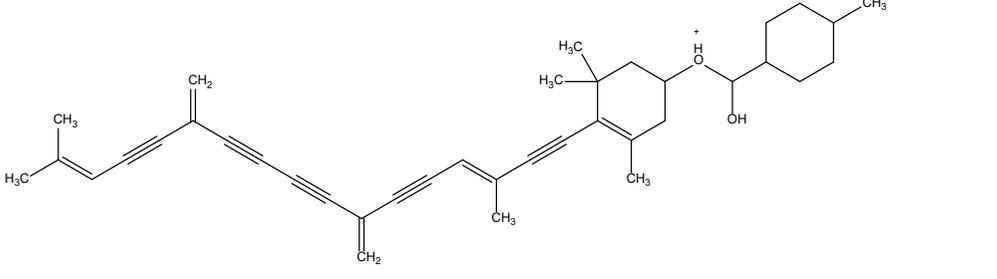
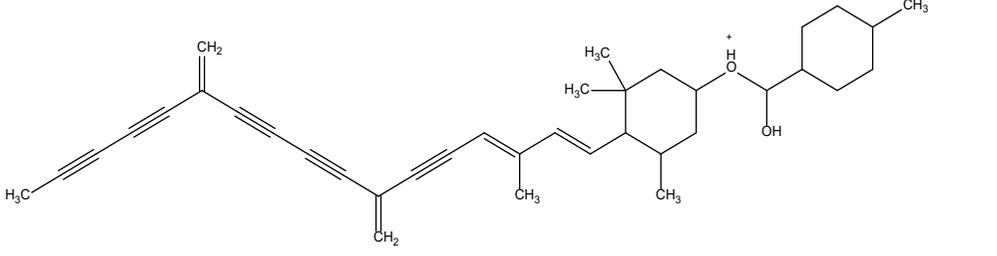
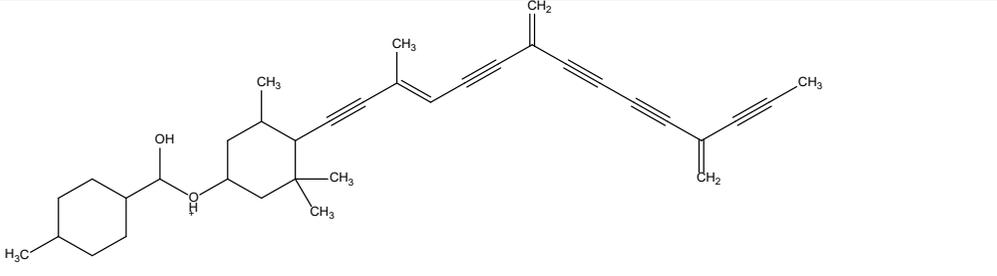
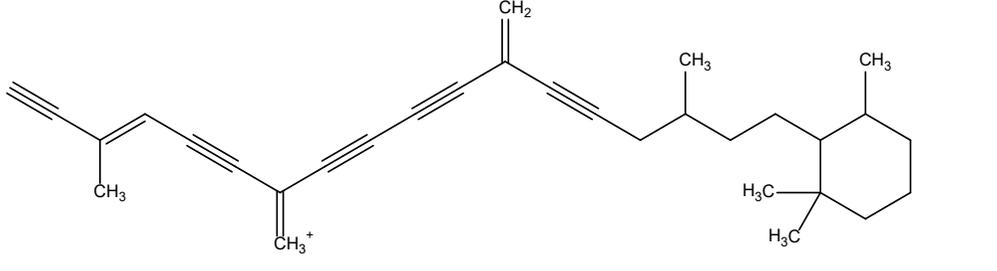
β,β -каротин-4,4'-дион-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.7)


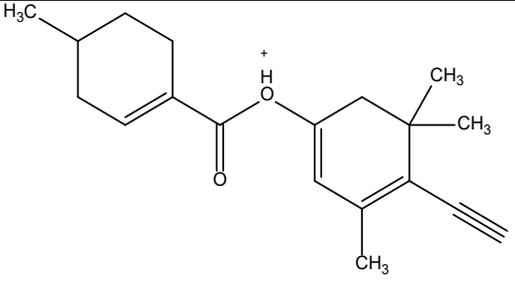
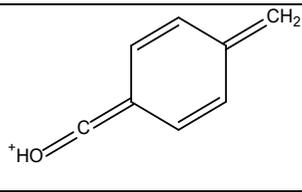
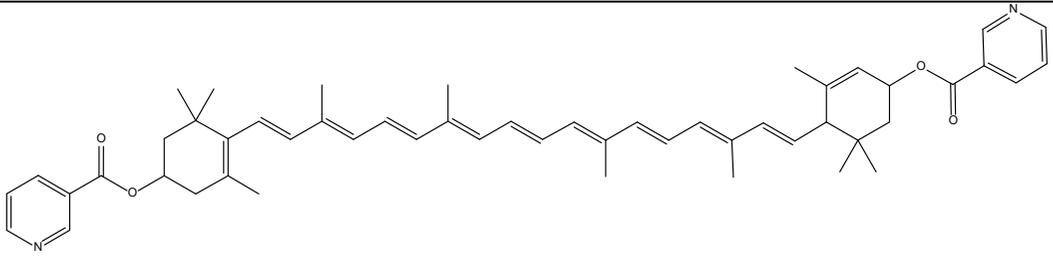
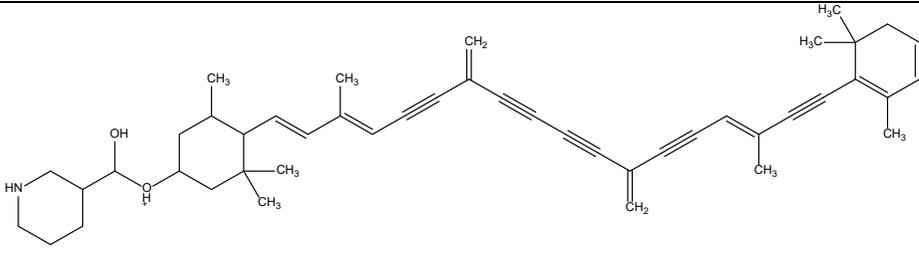
1		815,5	815,45	100
2		669,4	669,38	19
3		599,3	599,32	36

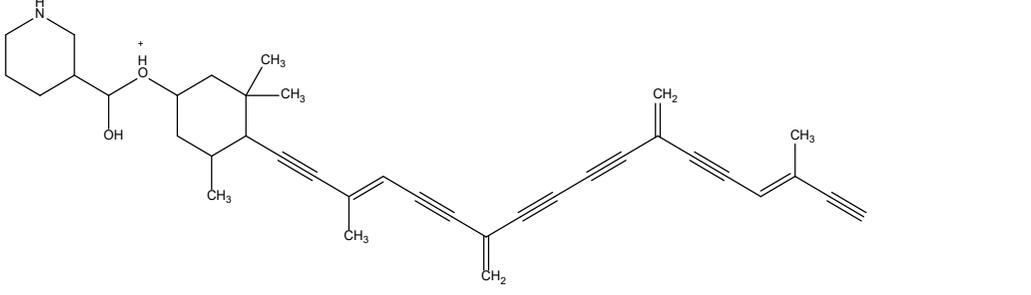
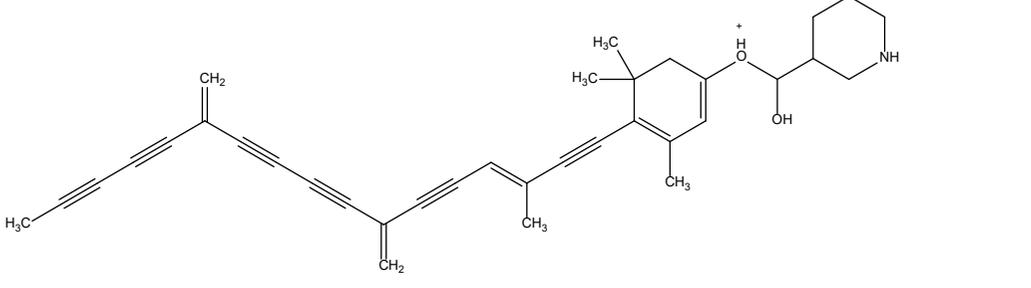
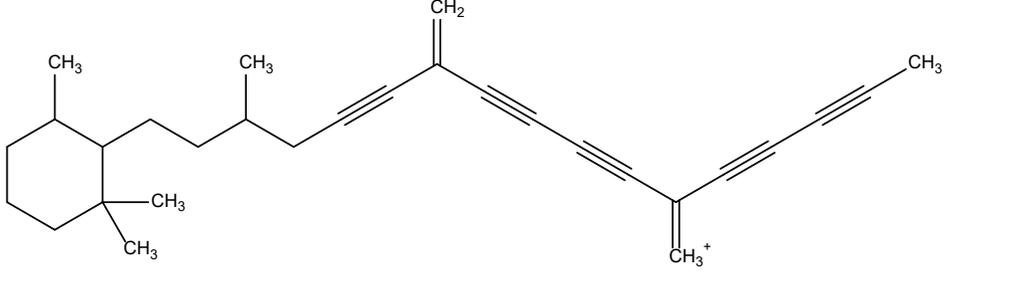
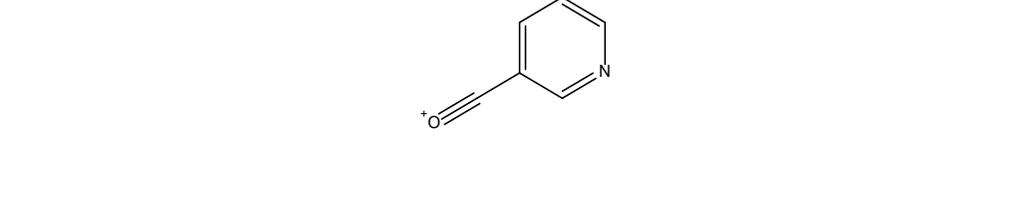
4	 <p>Chemical structure of a long-chain polyene with terminal alkyne and methyl groups. The structure shows a chain of conjugated double bonds and triple bonds, with a terminal alkyne group (CH₃) and a methyl group (CH₃) attached to the chain. The chain is terminated by a methyl group (H₃C) and a methyl group (CH₃).</p>	287,2	287,24	66
5	 <p>Chemical structure of a stilbene derivative with a hydroxyl group (OH₂⁺) and an alkyne group (C≡CH) attached to the central double bond. The structure shows two phenyl rings connected by a double bond, with a hydroxyl group (OH₂⁺) and an alkyne group (C≡CH) attached to the central carbon.</p>	209,1	209,07	41
6	 <p>Chemical structure of a phenyl alkyne (phenylacetylene) with a positive charge (+) on the oxygen atom of the alkyne group.</p>	105,0	105,11	14
β,ε-каротин-3,3'-дibenзоат (соединение С.8)				
 <p>Chemical structure of β,ε-carotene-3,3'-dibenzoate, showing the long polyene chain of the carotenoid and the two benzoate groups attached to the terminal rings.</p>				

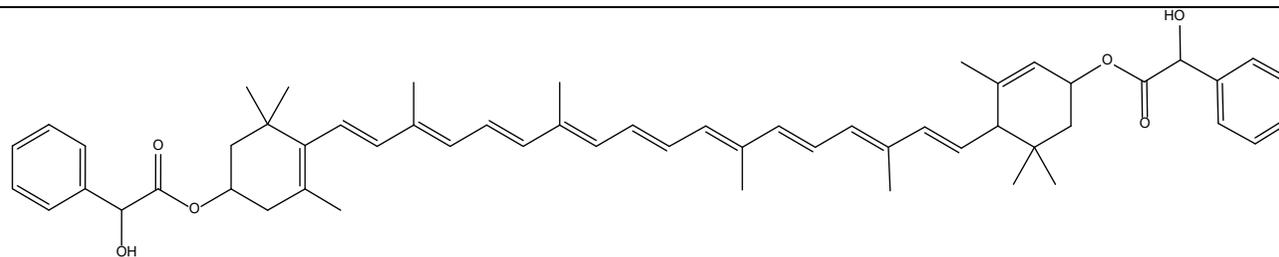
1		531,3	531,33	100
2		507,3	507,38	52
3		409,3	409,28	67
4		399,3	399,31	70

5		271,2	271,16	34
6		105,0	105,11	19
β,ε-каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9)				
				

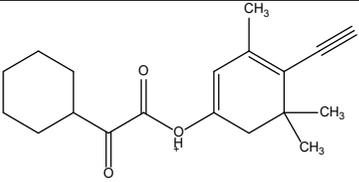
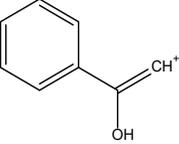
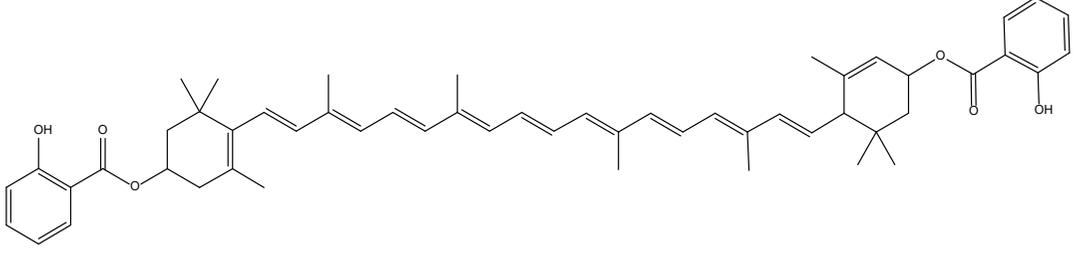
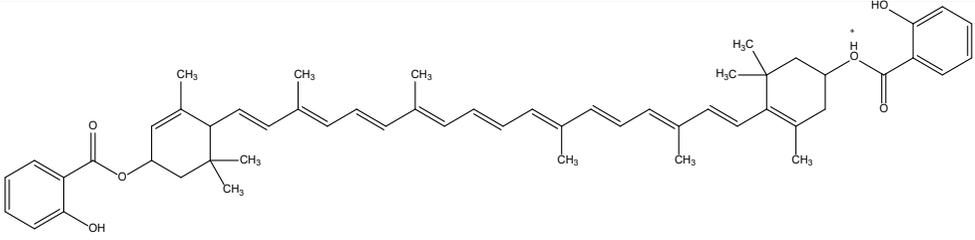
1		533,3	533,41	100
2		521,3	521,34	36
3		495,3	495,33	16
4		409,3	409,28	43

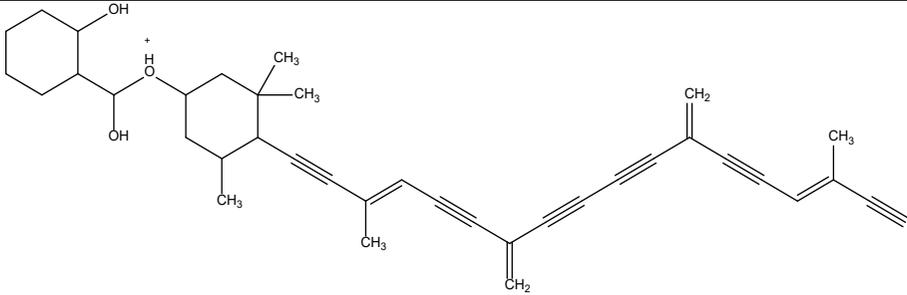
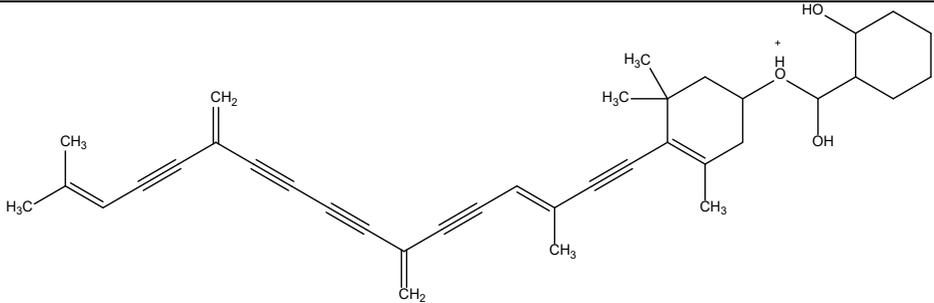
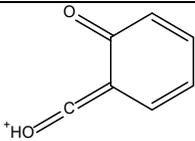
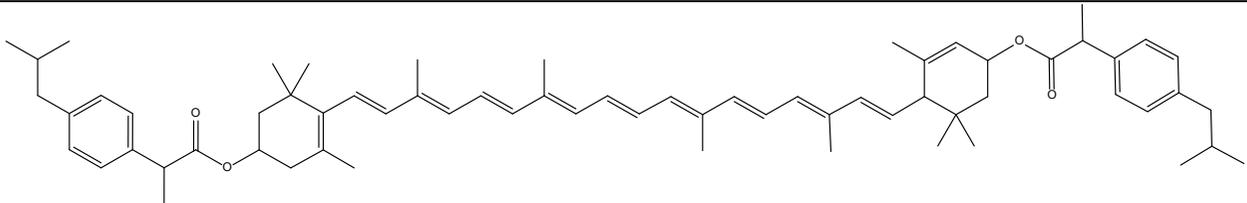
5		285,2	285,17	16
6		119,1	119,05	10
β,ε-каротин-3,3'-диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.10)				
				
1		654,4	654,71	100

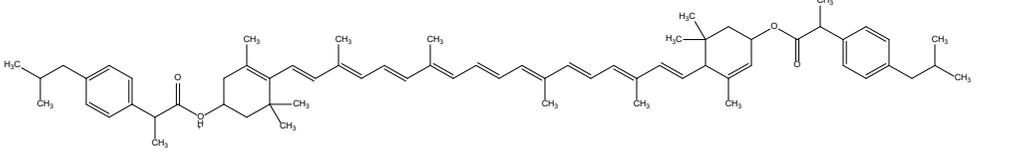
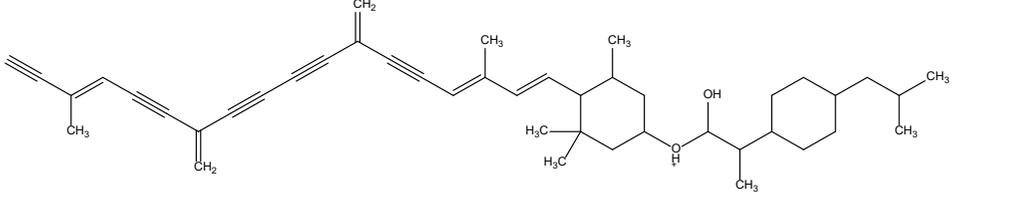
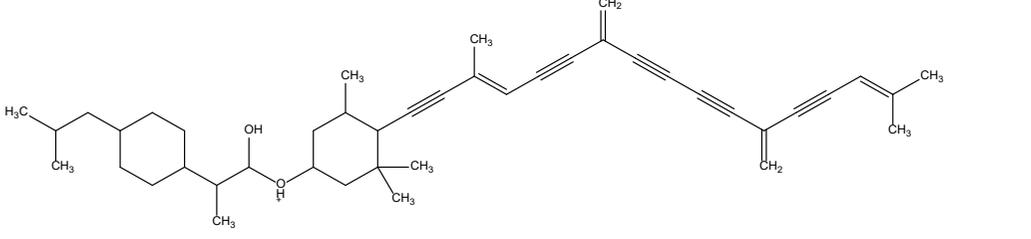
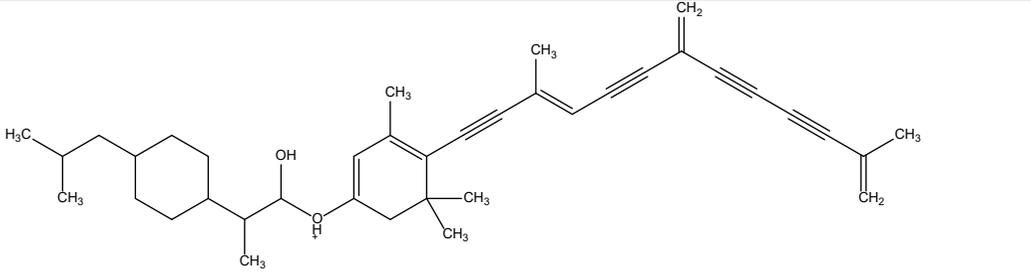
2		532,3	532,35	36
3		502,3	502,28	43
4		383,3	383,22	41
5		106,0	106,11	16

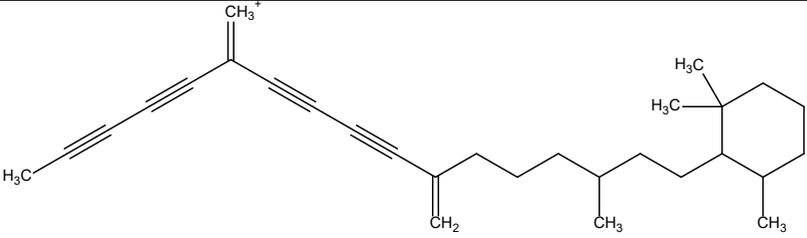
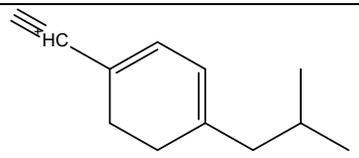
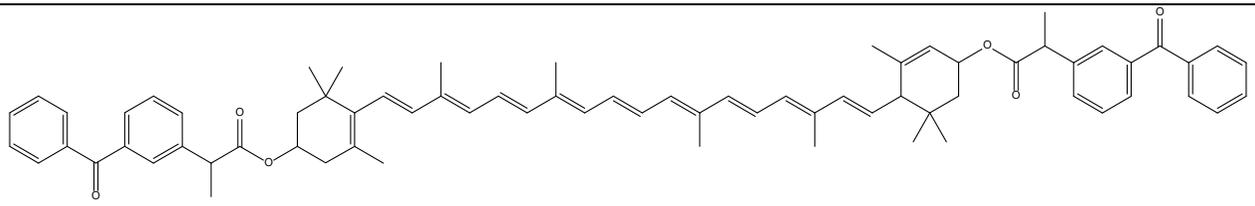
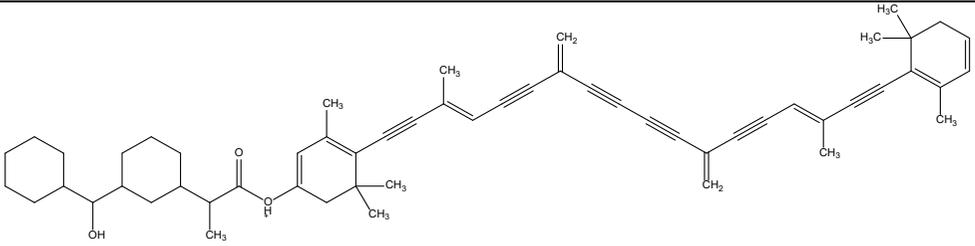
β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-фенилэтанат (соединение С.11)


1		837,5	837,52	100
2		551,4	551,38	16
3		537,3	537,34	16

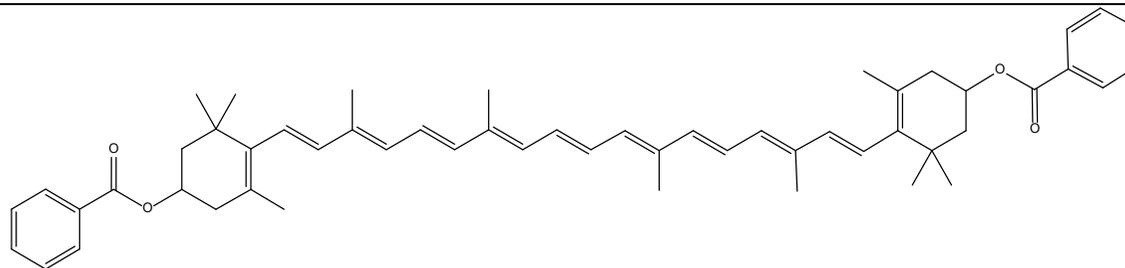
4		301,2	301,18	6
5		119,0	119,09	8
β,ϵ -каротин-3,3'-ди-2-гидрокси-2-бензоат (соединение С.12)				
				
1		809,5	809,44	100

2		547,4	547,37	30
3		535,3	535,24	66
4		121,0	121,38	11
β,ϵ-каротин-3,3'-ди-2-(4-изобутилфенил)-пропионат (C.13)				
				

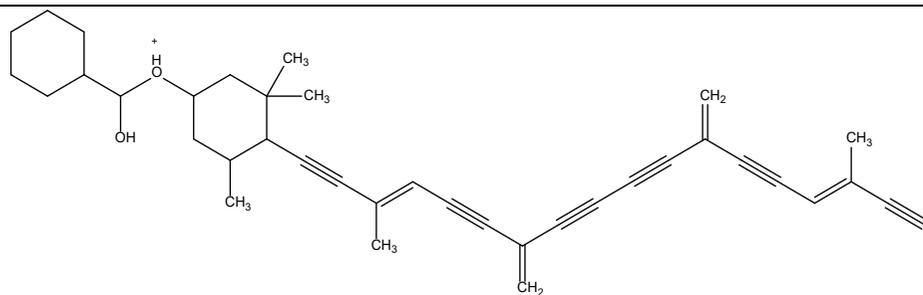
1		945,7	945,68	100
2		617,4	617,45	59
3		605,4	605,49	66
4		537,3	537,34	24

5		387,3	387,28	45
6		161,1	161,07	80
β,ϵ-каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.14)				
				
1		785,5	785,43	100

2		639,4	639,38	60
3		535,3	535,41	65
4		209,1	209,08	45
5		105,0	105,11	14

β,β -Каротин-3,3'-диилди(бензоат) (соединение С.15)


1

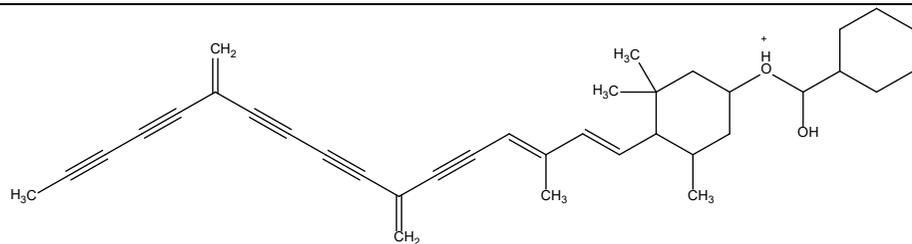


531,3

531,31

100

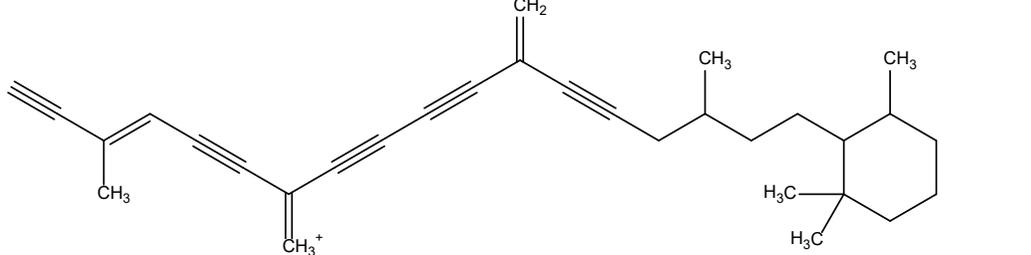
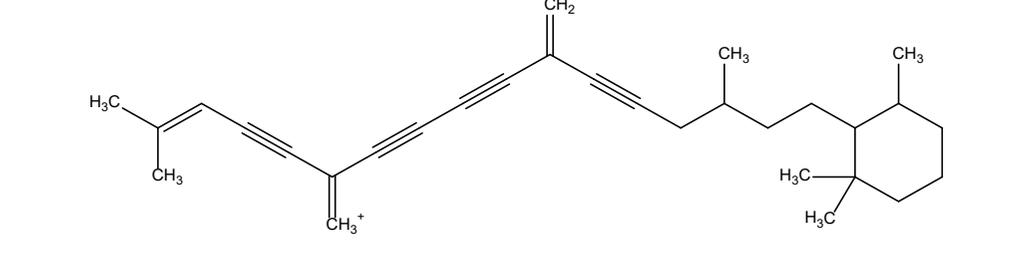
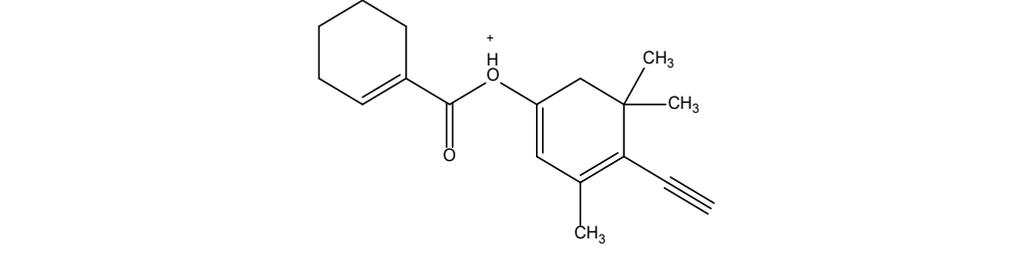
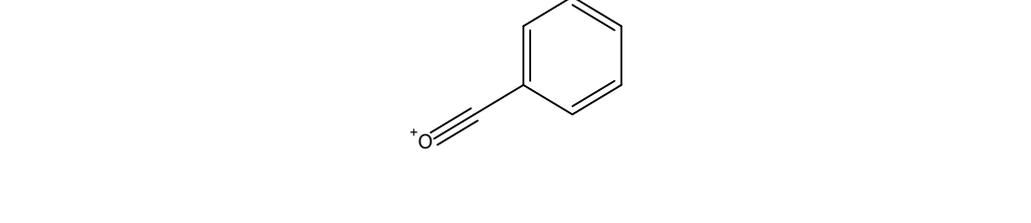
2

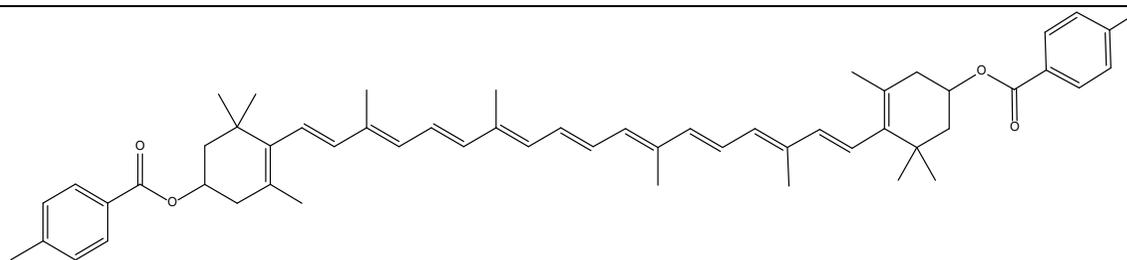


507,3

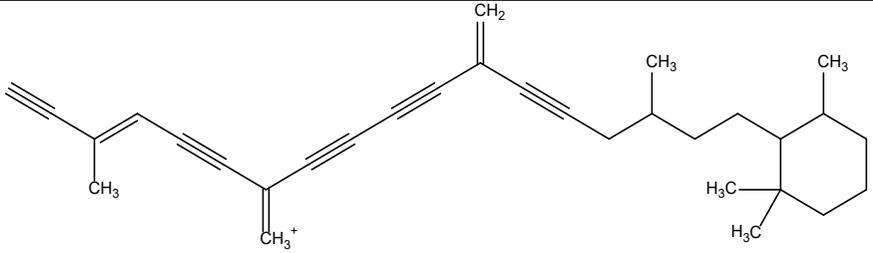
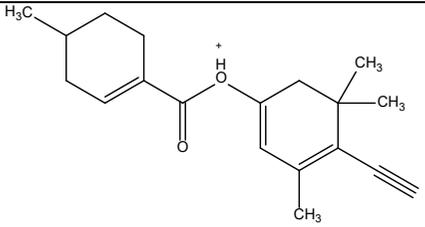
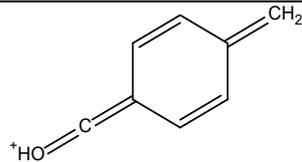
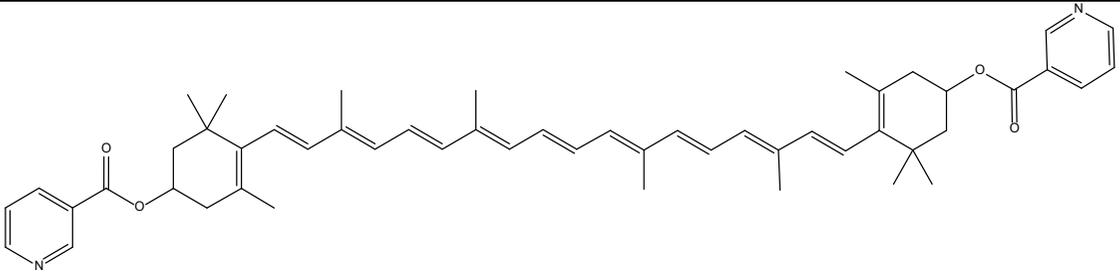
507,37

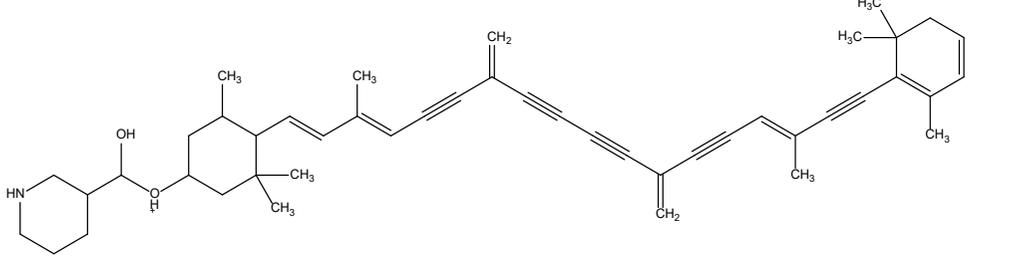
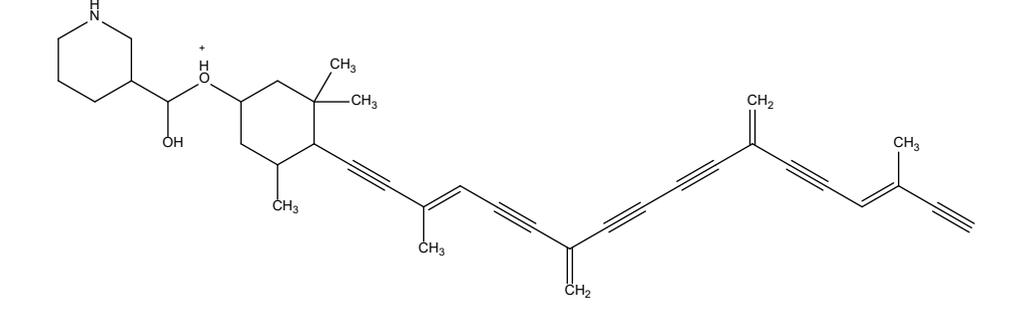
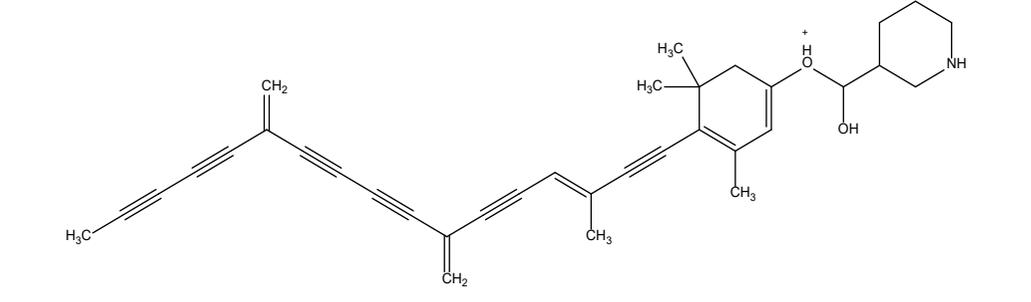
52

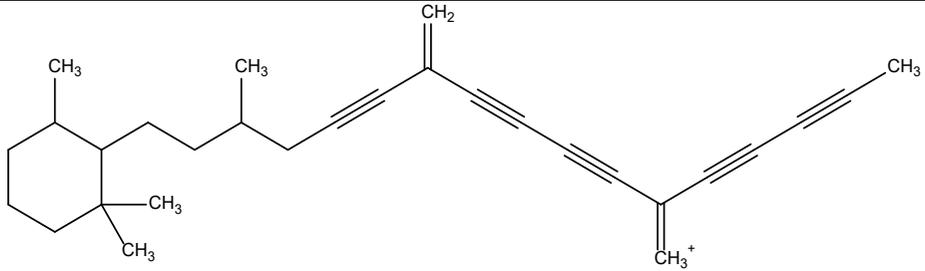
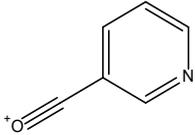
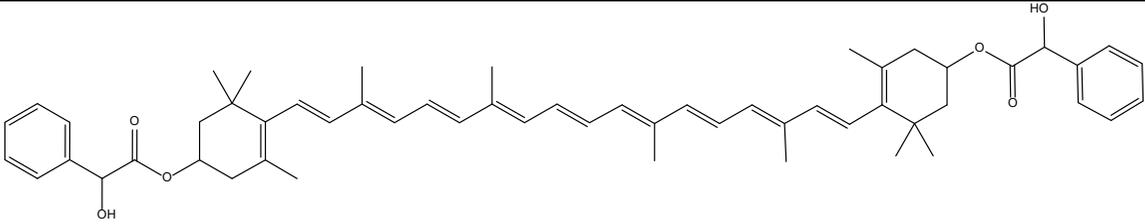
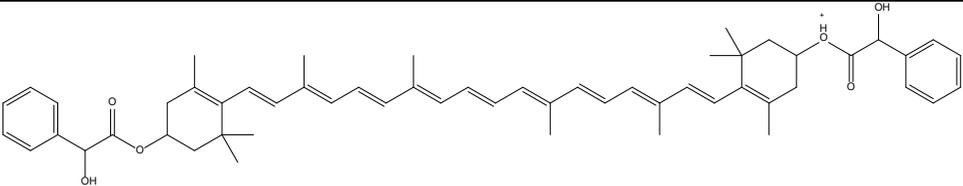
3		409,3	409,26	66
4		399,3	399,30	70
5		271,2	271,14	33
6		105,0	105,08	19

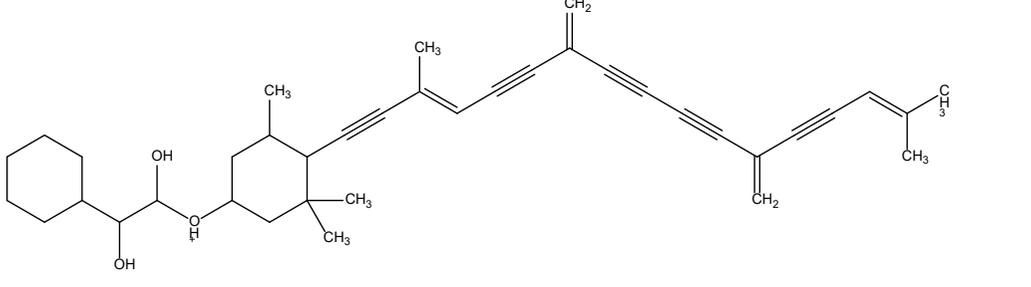
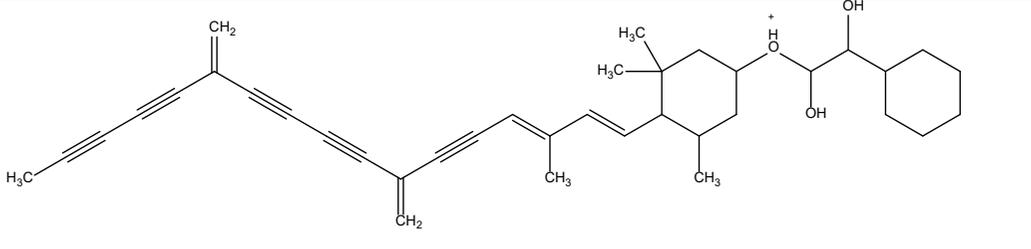
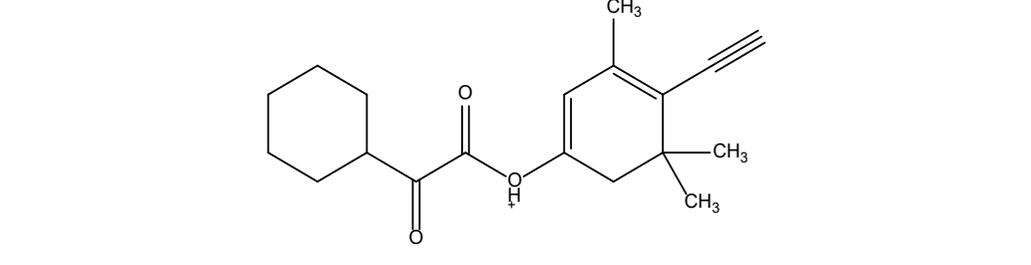
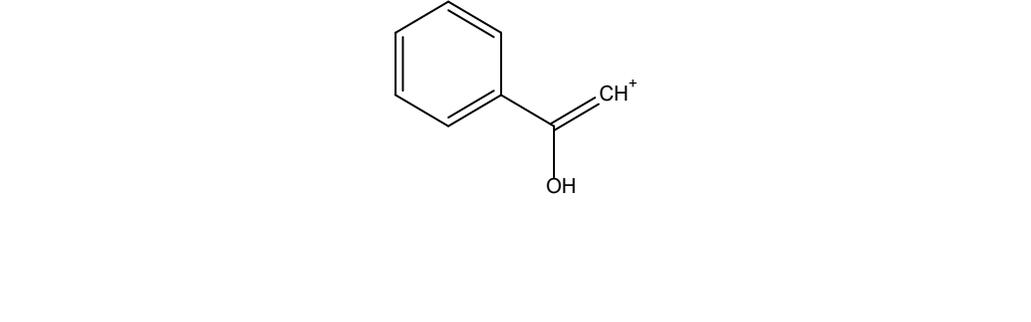
β,β -Каротин-3,3'-диилди(4-метилбензоат) (соединение С.16)


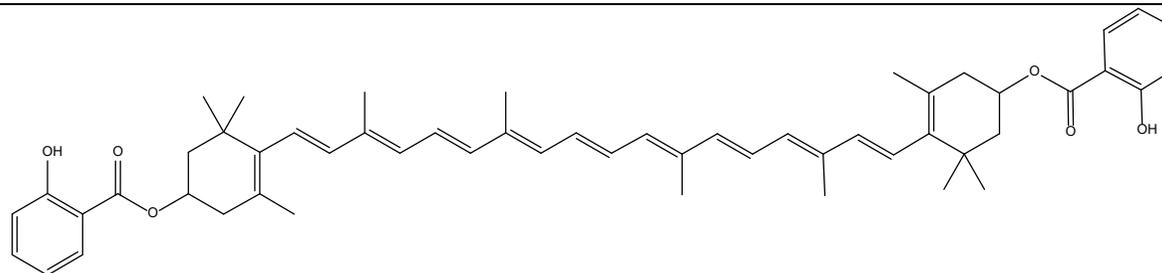
1		533,3	533,40	100
2		521,3	521,33	36
3		495,3	495,34	16

4		409,3	409,27	43
5		285,2	285,15	16
6		119,1	119,05	10
β,β-Каротин-3,3'- диилди(пиридин-3-карбоксилат) (соединение С.17)				
				

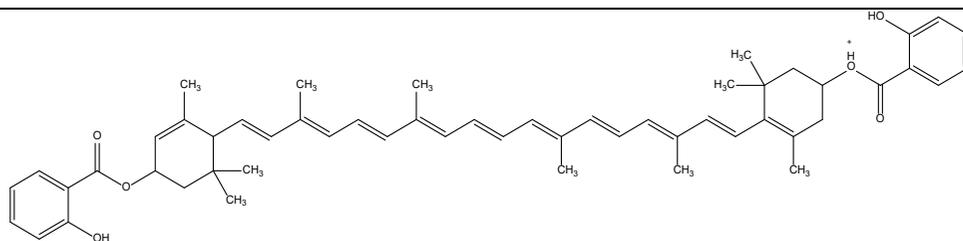
1		654,4	654,70	100
2		532,3	532,33	36
3		502,3	502,24	42

4		383,3	383,20	41
5		106,0	106,11	15
β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-гидрокси-2-фенилэтаноат) (соединение С.18)				
				
1		837,5	837,50	100

2		551,4	551,36	16
3		537,3	537,33	15
4		301,2	301,15	6
5		119,0	119,06	9

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19)


1

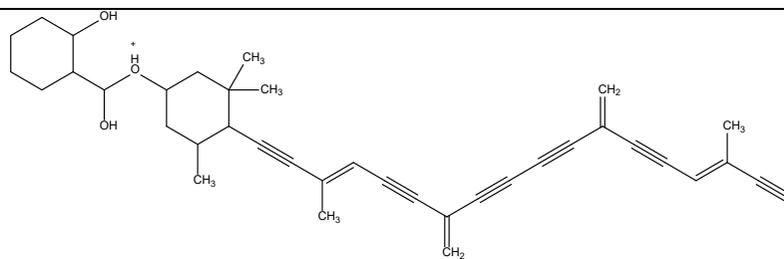


809,5

809,43

100

2

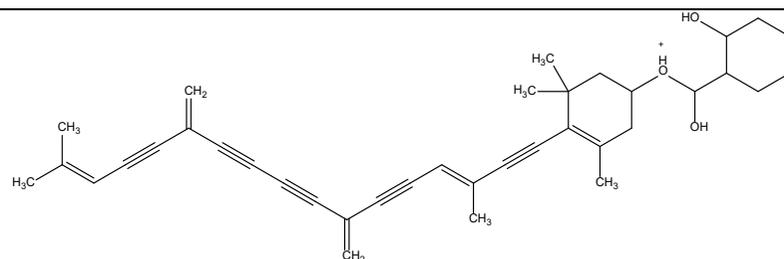


547,4

547,35

30

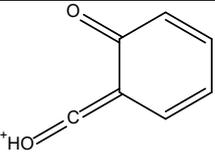
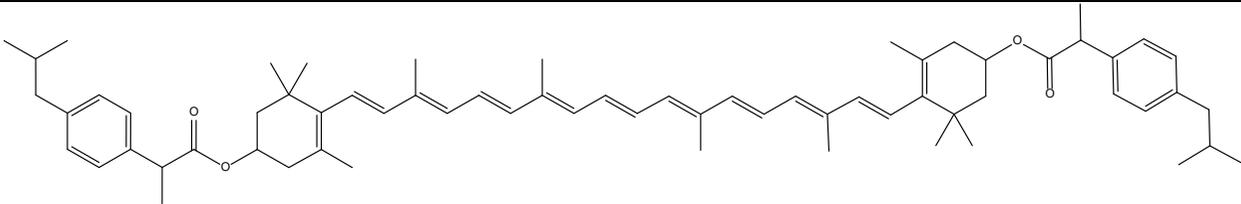
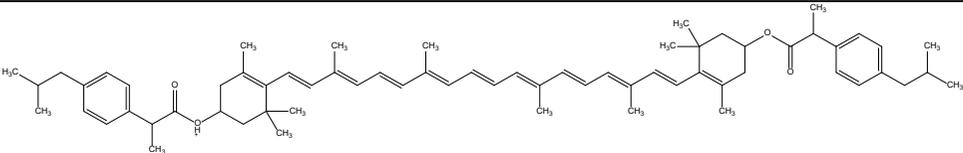
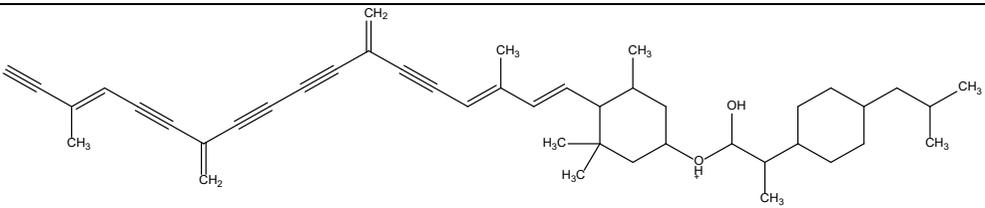
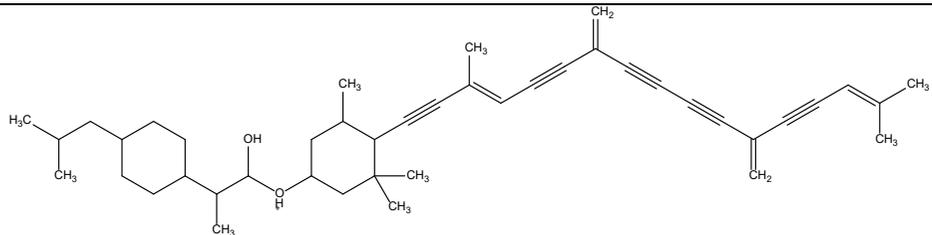
3

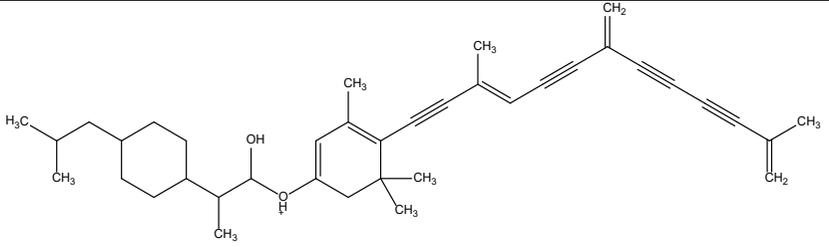
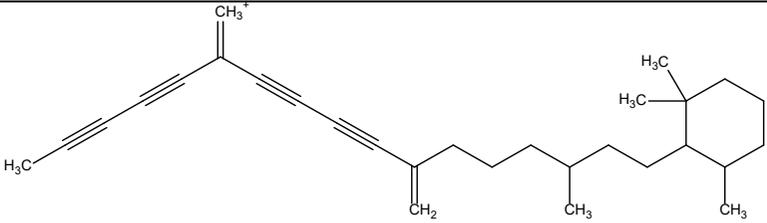
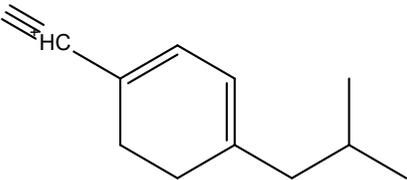


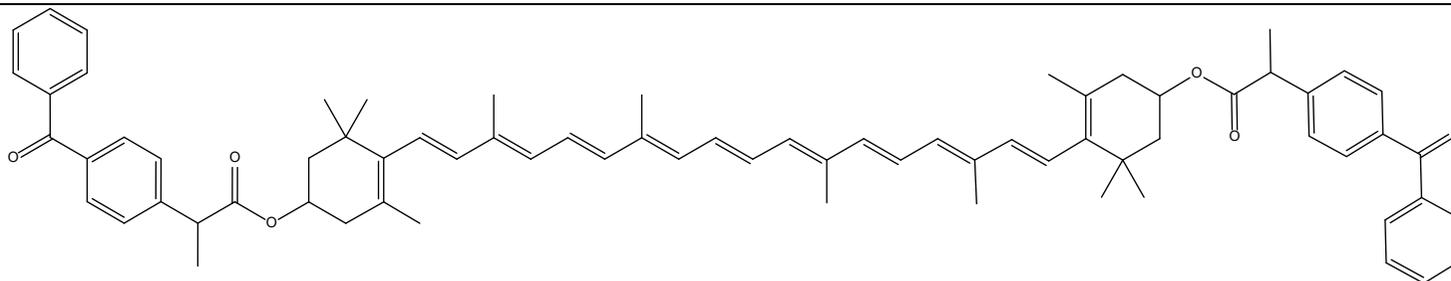
535,3

535,22

65

4		121,0	121,35	15
β,β-Каротин-3,3'-диилди(2-(4-изобутилфенил)-пропионат) (соединение С.20)				
				
1		945,7	945,66	100
2		617,4	617,43	56
3		605,4	605,46	65

4		537,3	537,31	24
5		387,3	387,26	45
6		161,1	161,05	19

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-(3-бензоилфенил)пропионат) (соединение С.21)


1		785,5	785,41	100
2		639,4	639,36	77
3		535,3	535,40	64

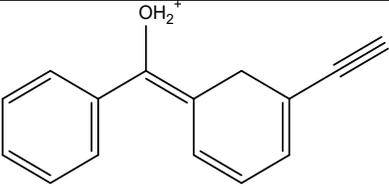
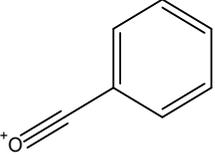
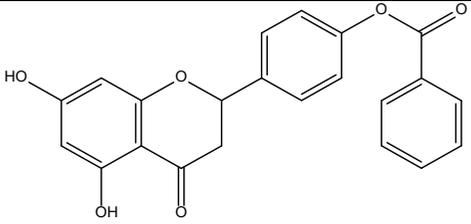
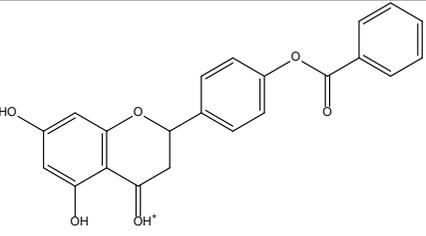
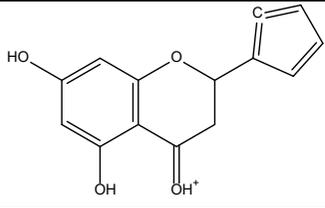
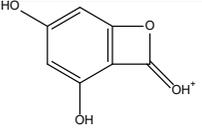
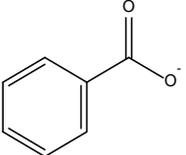
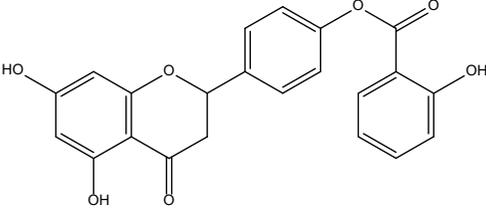
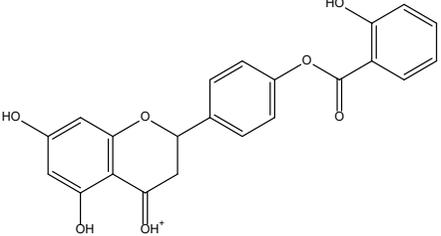
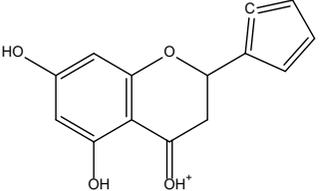
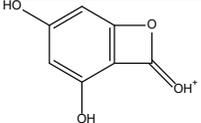
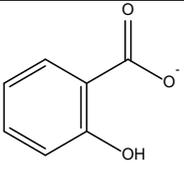
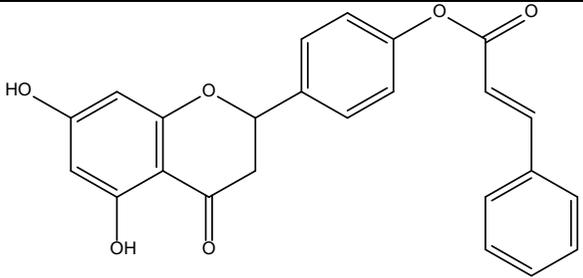
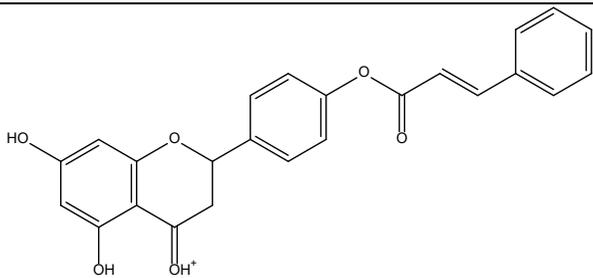
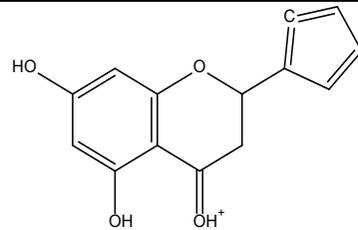
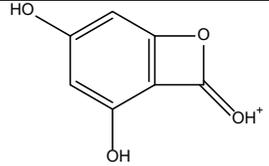
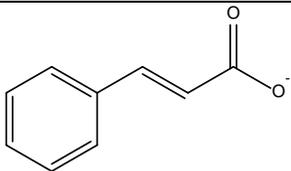
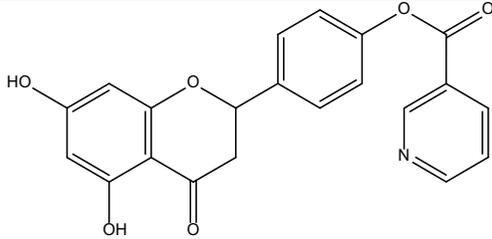
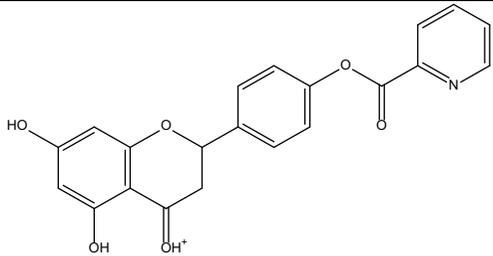
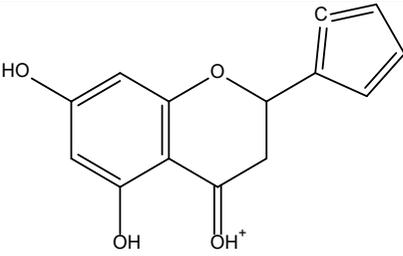
4		209,1	209,07	45
5		105,0	105,10	14

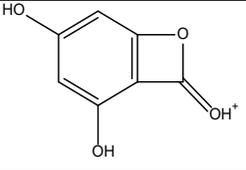
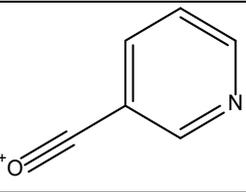
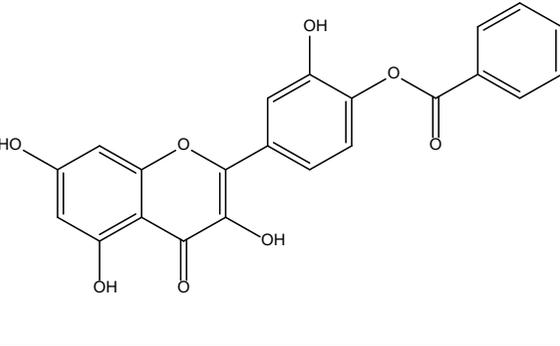
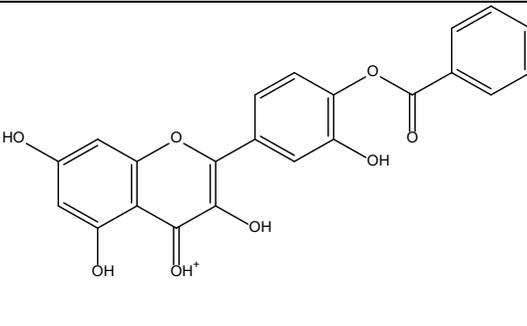
Таблица 2 – Теоретические данные и экспериментальные результаты анализа производных флавоноидов методом масс-спектрометрии (соединения F.1 – F.22)

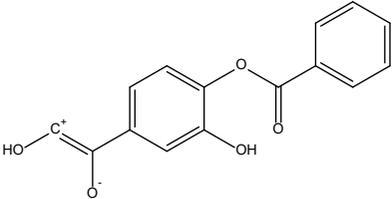
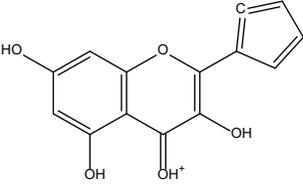
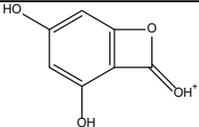
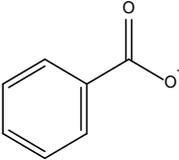
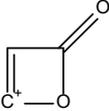
№	Структура фрагмента	Прогнозируемая масса	Экспериментальная масса	Относительная интенсивность
Нарингенин 4'-бензоат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.1)				
				
1		377,1	377,09	100
2		243,0	243,08	11
3		153,0	153,01	100

4		121,0	121,04	8
Нарингенин 4'-салицилат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.2)				
				
1		393,1	393,10	100
2		243,0	243,08	12
3		153,0	153,01	100

4		137,0	137,03	11
Нарингенин 4'-циннамат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил циннамат) (соединение F.3)				
				
1		403,1	403,11	100
2		243,0	243,08	12

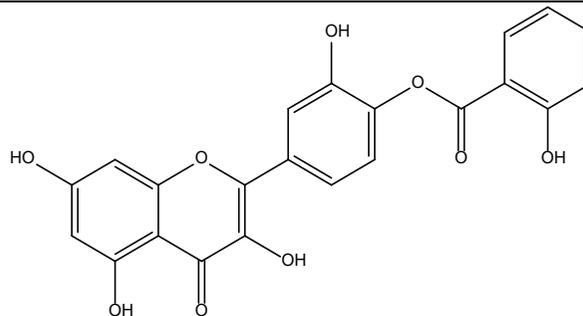
3		153,0	153,01	100
4		147,0	147,05	9
Нарингенин 4'-никотинат (4-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.4)				
				
1		378,1	378,09	100
2		243,0	243,08	11

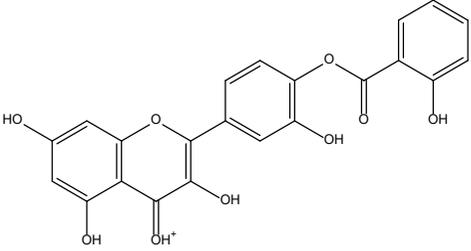
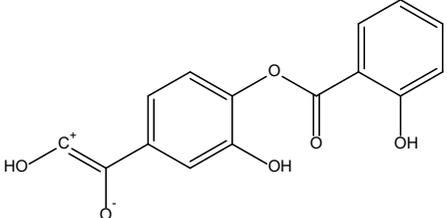
3		153,0	153,01	100
4		106,0	106,11	14
Кверцетин 4'-бензоат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил бензоат) (соединение F.5)				
				
1		407,1	407,08	100

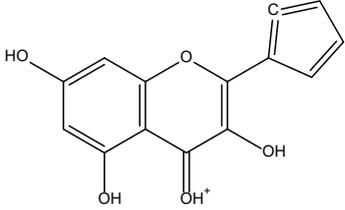
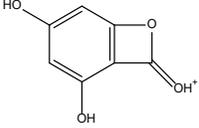
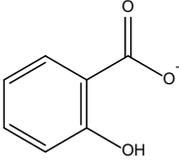
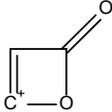
2	 <chem>O=C(O)c1ccc(O)c(OC(=O)c2ccccc2)c1</chem>	270,1	270,07	32
3	 <chem>Oc1ccc(O)c2c(O)c(O)c(O)c2O1</chem>	257,0	257,04	25
4	 <chem>Oc1ccc(O)c2oc(O)c12</chem>	153,0	153,01	100
5	 <chem>[O-]C(=O)c1ccccc1</chem>	121,0	121,04	10
6	 <chem>O=C1OC=CC1</chem>	68,99	69,04	32

Кверцетин 4'-салицилат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил 2-гидроксибензоат)

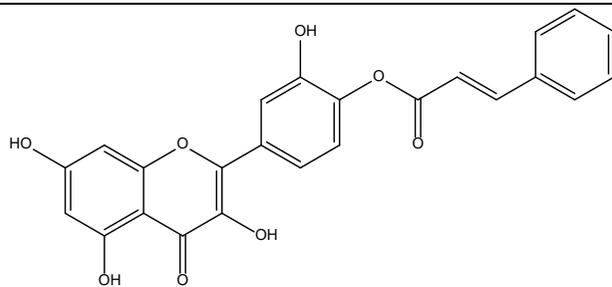
(соединение F.6)

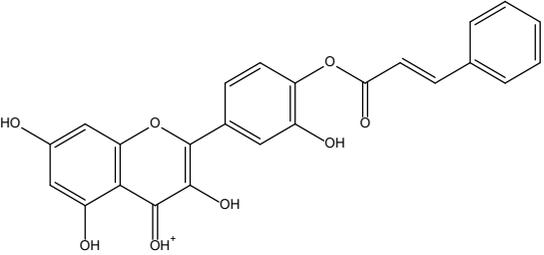
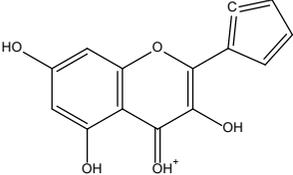
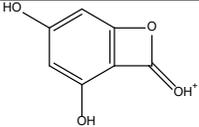
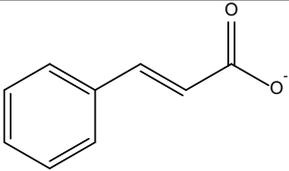
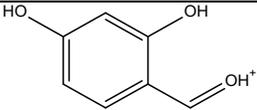


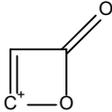
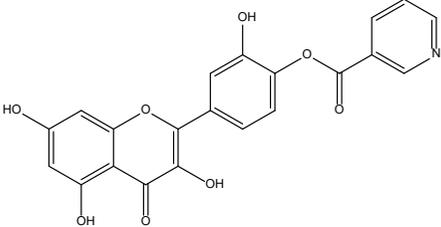
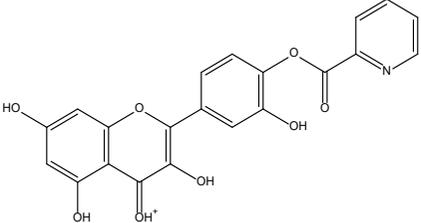
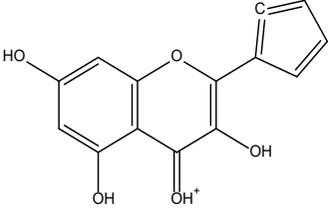
1		423,1	423,07	100
2		286,0	286,05	28

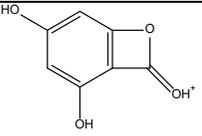
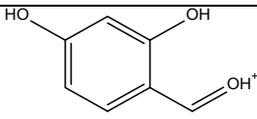
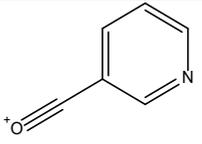
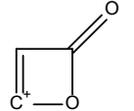
3		257,0	257,04	20
4		153,0	153,01	100
5		137,0	137,03	12
6		68,99	69,04	31

Кверцетин 4'- циннатат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннатат) (соединение F.7)

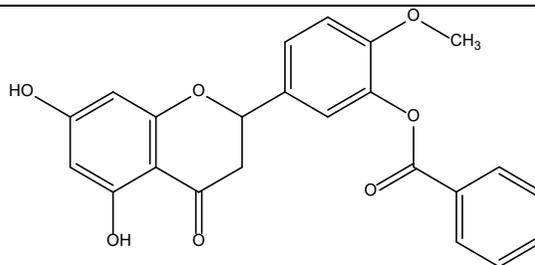


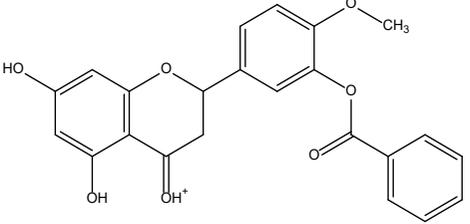
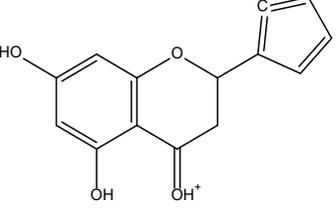
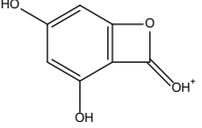
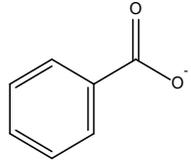
1		433,1	433,09	100
2		257,0	257,07	22
3		153,0	153,01	100
4		147,0	147,05	13
5		139,0	138,97	27

6		68,99	69,04	32
Кверцетин 4'-никотинат (2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил никотинат) (соединение F.8)				
				
1		408,1	408,08	100
2		257,0	257,07	21

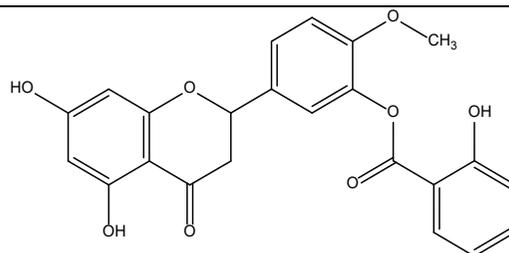
3		153,0	153,01	100
4		139,0	138,97	27
5		106,0	106,11	13
6		68,99	69,04	33

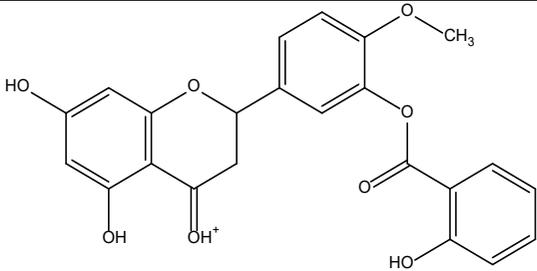
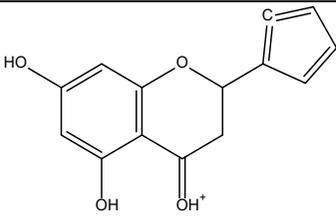
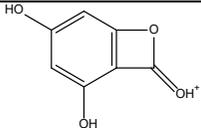
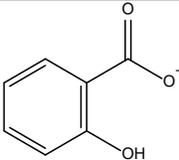
Гесперетин 3'-бензоат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.9)

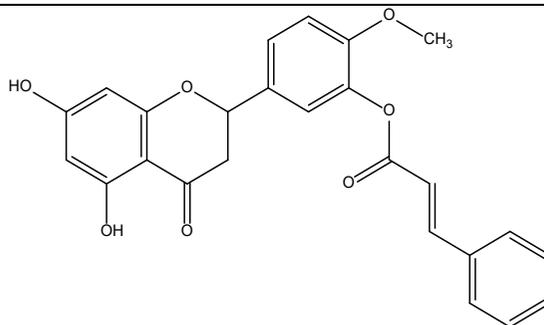


1		407,1	407,11	100
2		243,0	243,10	12
3		153,0	153,01	100
4		121,0	121,04	9

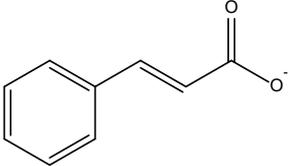
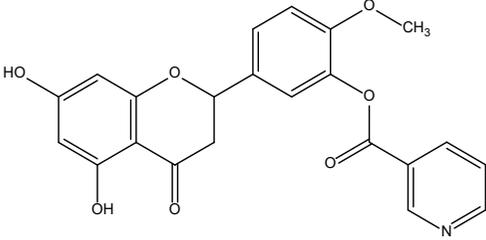
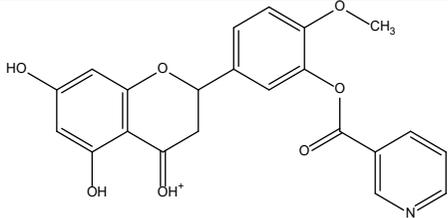
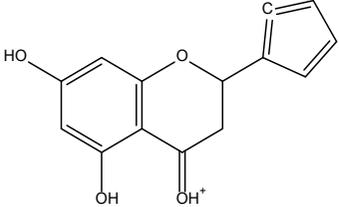
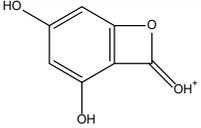
Гесперетин 3'-салицилат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил 2-гидроксибензоат) (соединение F.10)

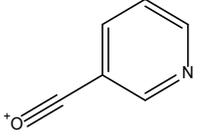
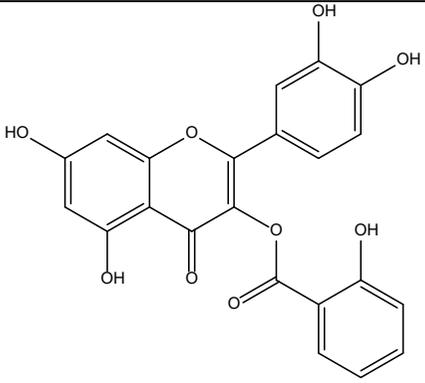
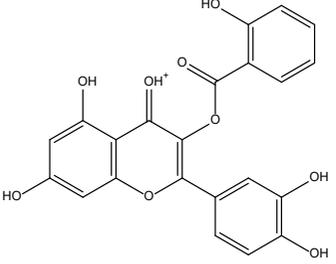


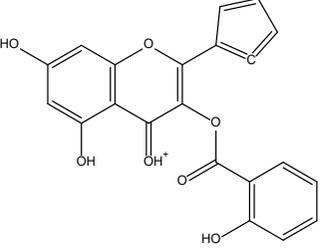
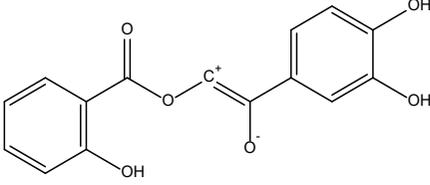
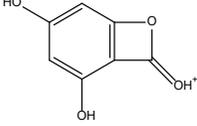
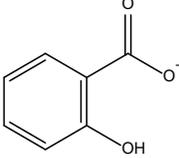
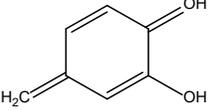
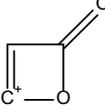
1		423,1	423,10	100
2		243,0	243,09	11
3		153,0	153,01	100
4		137,0	137,03	10
Гесперетин 3'-циннамат (5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил циннамат) (соединение F.11)				



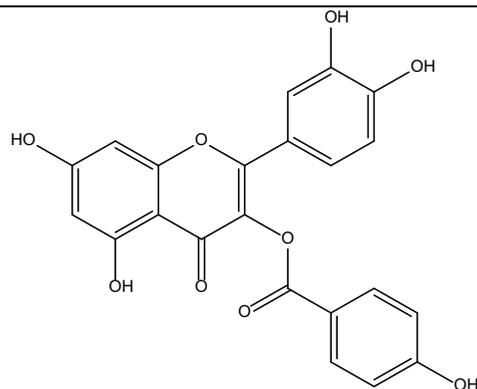
1		433,1	433,12	100
2		243.0	243.11	12
3		153,0	153,01	100

4		147,0	147,05	8
Геспертин 3'-никотинат 5-(5,7-дигидрокси-4-оксохроман-2-ил)-2-метоксифенил бензоат) (соединение F.12)				
				
1		408,1	408,10	100
2		243,0	243,09	9
3		153,0	153,01	100

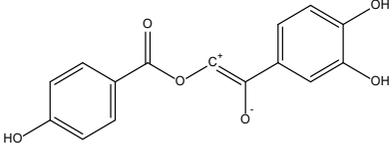
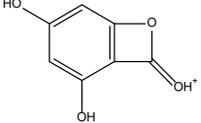
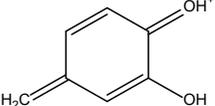
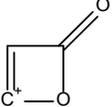
4	 <chem>[O+]#N#CC1=CC=CN=C1</chem>	106,0	106,11	12
Кверцетин-3-салицилат [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат] (соединение F.13)				
 <chem>Oc1ccc(O)c(O)c1OC(=O)c2cc(O)c(O)c(O)c2</chem>				
1	 <chem>Oc1ccc(O)c(O)c1OC(=O)c2cc(O)c(O)c(O)c2</chem>	423,1	423,07	100

2		377,1	377,06	24
3		286,0	286,07	28
4		153,0	153,01	100
5		137,0	137,03	11
6		123,1	123,04	16
7		68,99	69,04	27

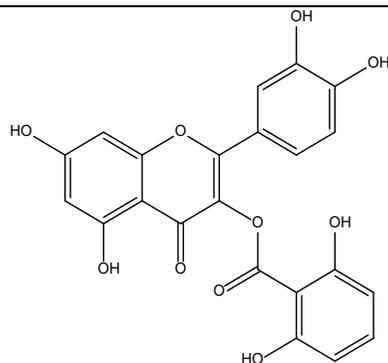
Кверцетин-3-гидроксибензоат-4 [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат]
(соединение F.14)

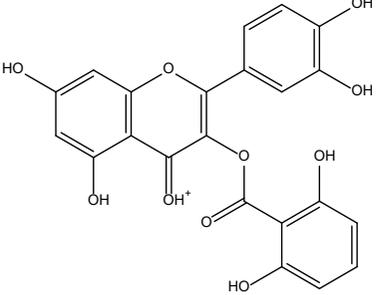
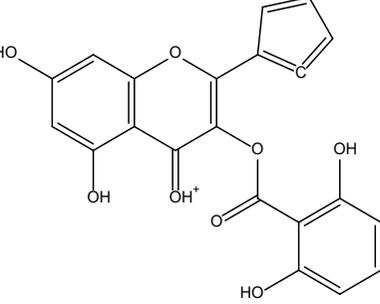
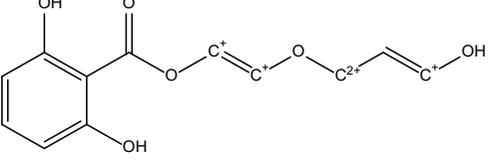
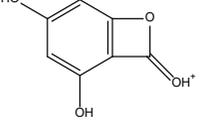
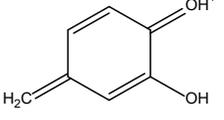


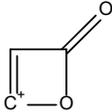
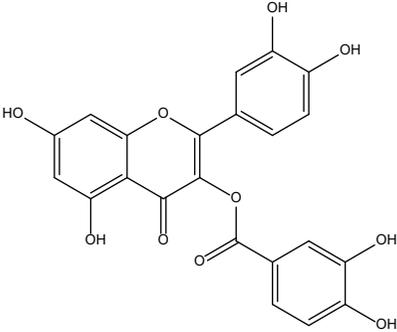
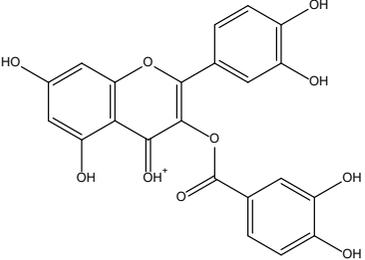
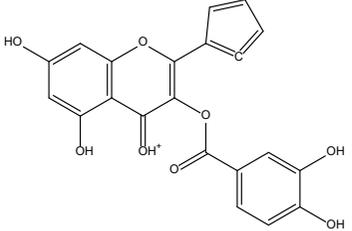
1		423,1	423,07	100
2		377,1	377,08	28

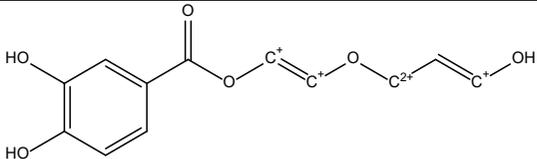
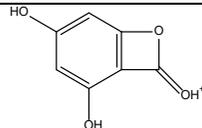
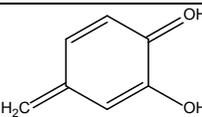
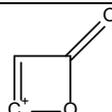
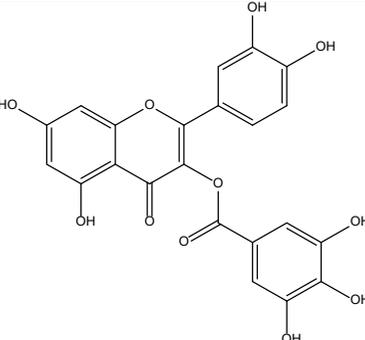
3		286,0	286,07	31
4		153,0	153,01	100
5		123,1	123,04	15
6		68,99	69,04	29

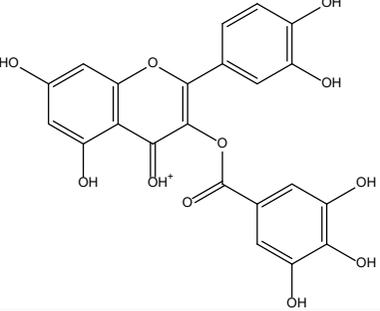
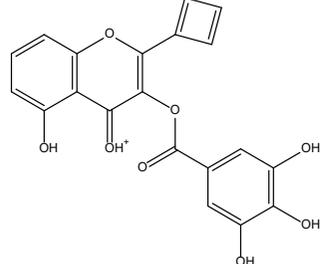
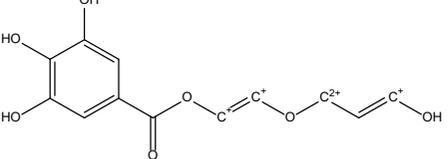
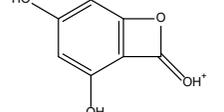
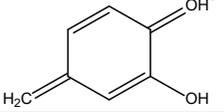
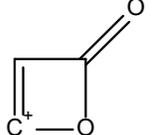
Кверцетин-3-дигидроксibenзоат-2,6 [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксibenзоат] (соединение F.15)



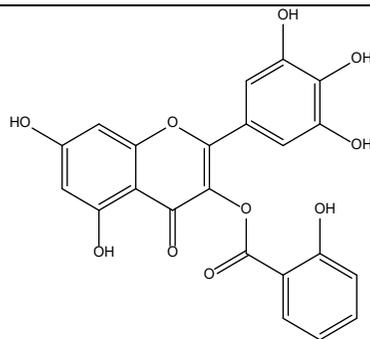
1		439,1	439,06	100
2		393,1	393,07	33
3		247,1	247,06	10
4		153,0	153,01	100
5		123,1	123,04	14

6		68,99	69,04	30
<p>Кверцетин-3-дигидроксibenзоат-3,4 [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксibenзоат] (соединение F.16)</p>				
				
1		439,1	439,06	100
2		393,1	393,07	29

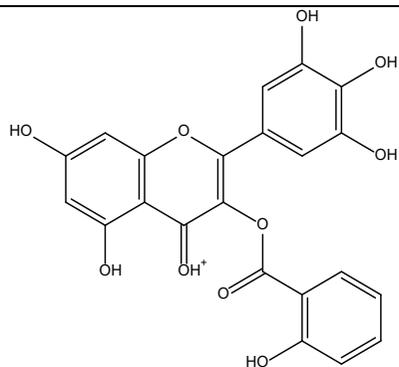
3		247,1	247,06	11
4		153,0	153,01	100
5		123,1	123,04	13
6		68,99	69,04	30
<p>Кверцетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 [2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат] (соединение F.17)</p>				
				

1		455,1	455,06	100
2		381,1	381,07	32
3		263,1	263,06	13
4		153,0	153,01	100
5		123,1	123,04	14
6		68,99	69,04	30

Мирицетин-3-салицилат [5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2-гидроксибензоат]
(соединение F.18)



1

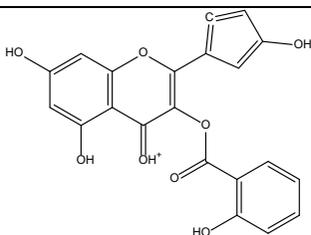


439,1

439,06

100

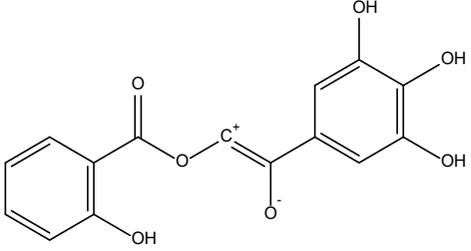
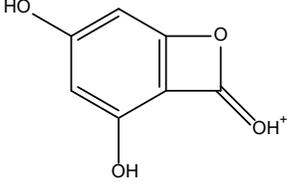
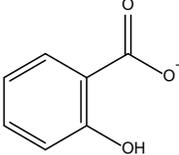
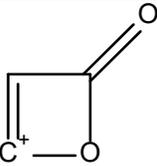
2



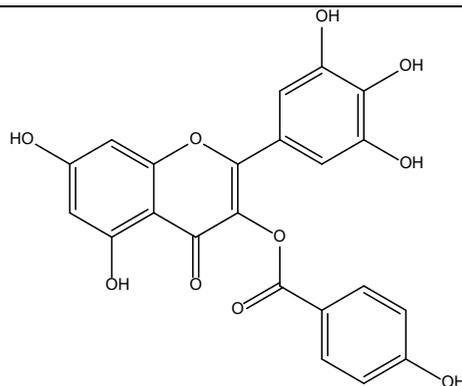
393,1

393,09

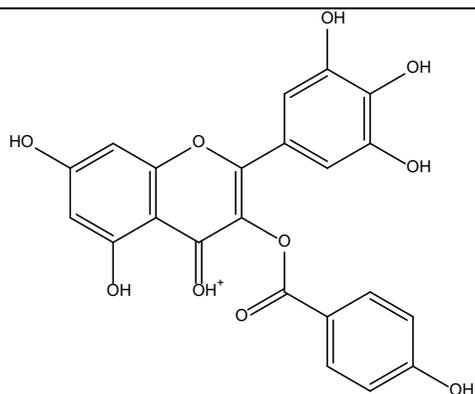
28

3		302,0	302,09	33
4		153,0	153,01	100
5		137,0	137,03	11
6		68,99	69,04	30

Мирицетин-3-гидроксибензоат-4 [5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 4-гидроксибензоат] (соединение F.19)



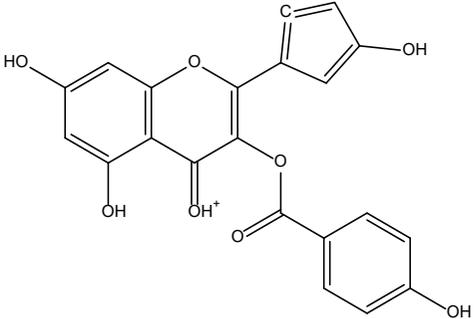
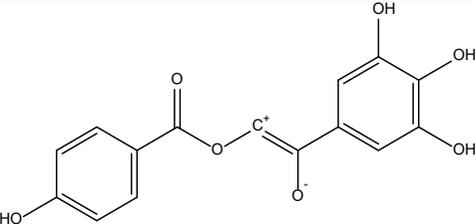
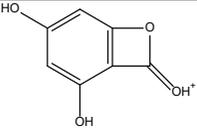
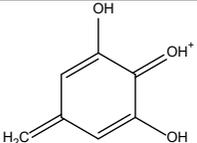
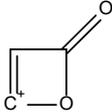
1



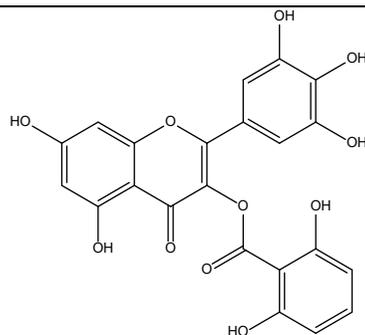
439,1

439,06

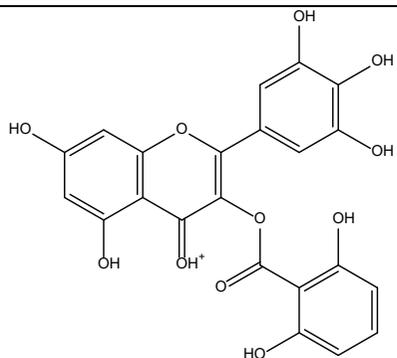
100

2		393,1	393,09	22
3		302,0	302,09	30
4		153,0	153,01	100
5		139,0	139,03	11
6		68,99	69,04	31

Мирицетин-3-дигидроксибензоат-2,6 [5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 2,6-дигидроксибензоат] (соединение F.20)



1

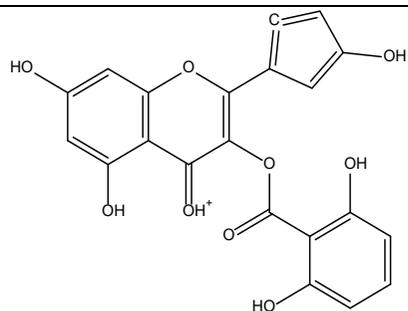


455,1

455,06

100

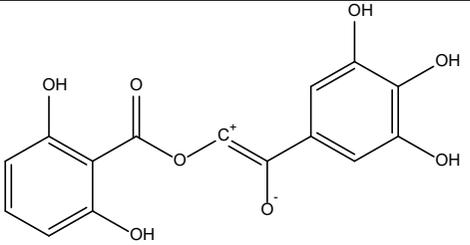
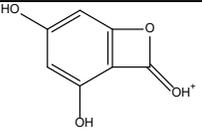
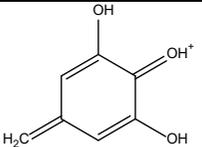
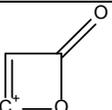
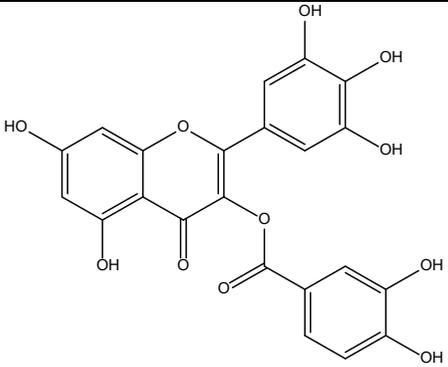
2

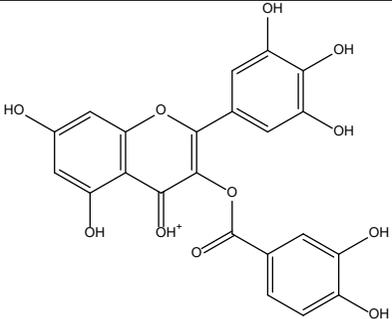
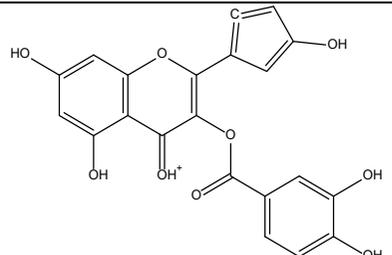
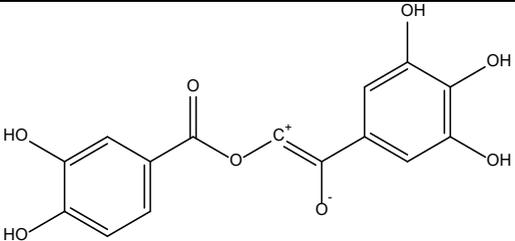
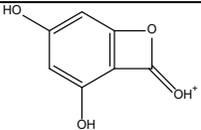
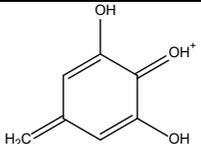


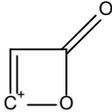
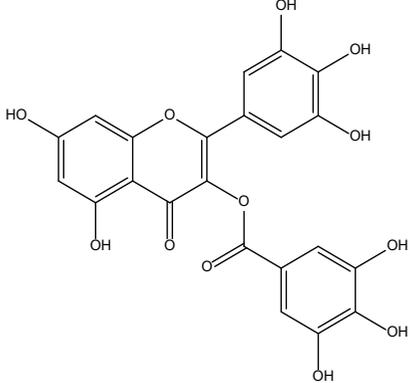
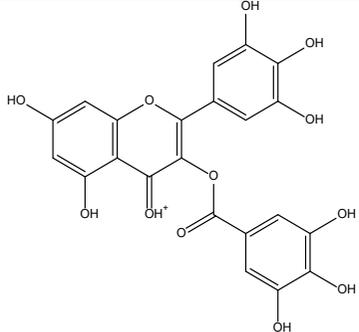
409,1

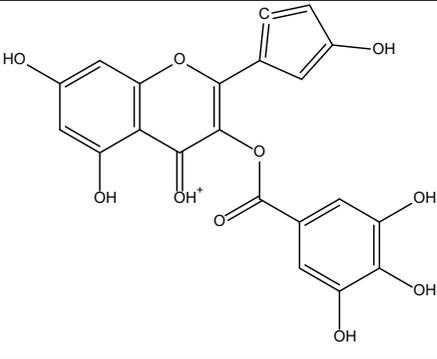
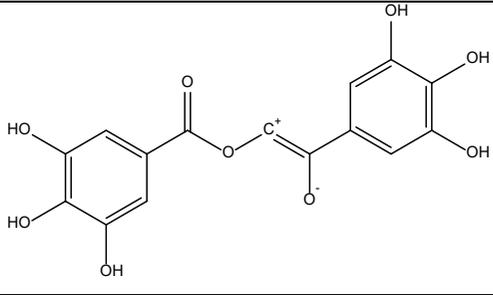
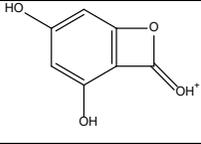
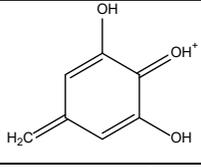
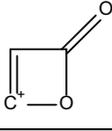
409,05

17

3		318,0	318,06	29
4		153,0	153,01	100
5		139,0	139,03	11
6		68,99	69,04	32
<p>Мирицетин-3-дигидроксибензоат-3,4 [5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4-дигидроксибензоат] (соединение F.21)</p>				
				

1		455,1	455,06	100
2		409,1	409,05	21
3		318,0	318,06	31
4		153,0	153,01	100
5		139,0	139,03	11

6		68,99	69,04	30
<p>Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 [5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил 3,4,5-тригидроксибензоат] (соединение F.22)</p>				
				
1		471,1	471,05	100

2		425,1	425,05	19
3		334,0	334,04	31
4		153,0	153,01	100
5		139,0	139,03	12
6		68,99	69,04	33

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук, профессор

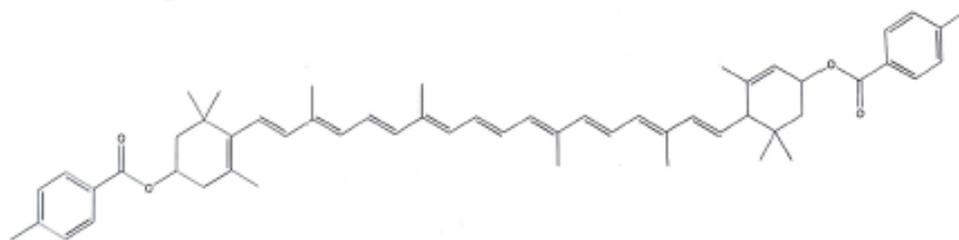
_____ Багирова В.Л.
«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

β , ϵ -каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат (соединение С.9)



$C_{56}H_{68}O_4$

М.м. 805,2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

β , ϵ -Каротин-3,3'-ди-4-метилбензоат.

Субстанцию получают путем энзимного синтеза.

Содержит не менее 99,0% $C_{56}H_{68}O_4$ в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

Описание. От светло-желтого до желтого цвета порошок.

Растворимость. Растворим в диметилсульфоксиде, умерено растворим в спирте 96%, практически нерастворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность.

1. ИК-спектрометрия (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см⁻¹ по положению полос поглощения соответствует спектру фармакопейного стандартного образца.

2. Спектрофотометрия. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте 96% в области длин волн от 200 до 600 нм должен иметь максимумы при 269±2 нм и 445±2 нм.

3. ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца (раздел «Родственные примеси»).

ИСПЫТАНИЯ

Температура плавления. От 160 до 164 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза (ПФ). Метанол : трет-бутилметиловый эфир : вода (45:52:3, объемное отношение).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в ПФ и доводят объем раствора ПФ до метки.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца, растворяют в ПФ и доводят объем раствора ПФ до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 мг фармакопейного стандартного образца примеси А и 25 мг стандартного образца Соединения С.9, растворяют в ПФ и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание

Примесь А: β,ε-каротин-3,3'-диол (лютеин) [127-40-2].

Хроматографические условия

Колонка	250 × 4,6 мм, 5 мкм, Dionex Acclaim C30 или аналогичная;
Температура колонки	30 °С;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 210 нм;
Объём пробы	20 мкл;
Время хроматографирования	3-кратное от времени удерживания основного пика.

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения, раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Относительное время удерживания соединений. Соединение С.9 – 1 (около 28 мин); примесь А – около 0,7.

Идентификация примесей. Для идентификации пика примеси А используют относительное время удерживания соединения, хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы разрешение (R_s) между пиками примеси А и Соединения С.9 должно быть не менее 3,0.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %);
- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси».

Содержание Соединения С.9 $C_{56}H_{68}O_4$ в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 – площадь пика Соединения С.9 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика Соединения С.9 на хроматограмме раствора стандартного образца;

a_1 – навеска субстанции, мг;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца Соединения С.9, мг;

P – содержание Соединения С.9 в фармакопейном стандартном образце %;

W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.

ХРАНЕНИЕ

В хорошо укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

Заместитель директора по
научной работе Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Д.А. Коновалов

Заведующий кафедрой органической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Э.Т. Оганесян

Доцент кафедры фармацевтической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолГМУ Минздрава России,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

С.В. Печинский

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

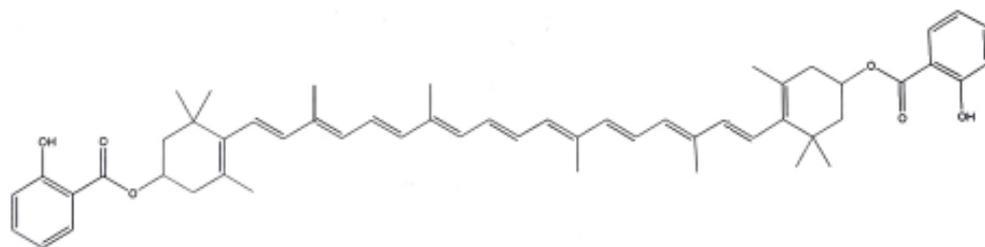
Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук, профессор
_____ Багирова В.Л.
«__» _____ 20__ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат) (соединение С.19)



$C_{54}H_{64}O_6$

М.м. 809,1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

β,β -Каротин-3,3'-диилди(2-гидроксибензоат).

Субстанцию получают путем энзимного синтеза.

Содержит не менее 99,0% $C_{56}H_{68}O_4$ в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

Описание. От светло-желтого до желтого цвета порошок.

Растворимость. Растворим в диметилсульфоксиде, умерено растворим в спирте 96%, практически нерастворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность.

1. ИК-спектрометрия (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см⁻¹ по положению полос поглощения соответствует спектру фармакопейного стандартного образца.

2. Спектрофотометрия. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте в области длин волн от 200 до 600 нм должен иметь максимумы при 299±2 нм и 446±2 нм.

3. ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца (раздел «Родственные примеси»).

ИСПЫТАНИЯ

Температура плавления. От 169 до 173 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза (ПФ). Метанол : трет-бутилметиловый эфир : вода (45:52:3, объемное отношение).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в ПФ и доводят объем раствора ПФ до метки.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца, растворяют в ПФ и доводят объем раствора ПФ до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 мг фармакопейного стандартного образца примеси А и 25 мг стандартного образца Соединения С.19, растворяют в ПФ и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание

Примесь А: β , β -каротин-3,3'-диол (зеаксантин) [144-68-3].

Хроматографические условия

Колонка	250 × 4,6 мм, 5 мкм, Dionex Acclaim C30 или аналогичная;
Температура колонки	30 °С;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 210 нм;
Объём пробы	20 мкл;
Время хроматографирования	3-кратное от времени удерживания основного пика.

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения, раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Относительное время удерживания соединений. Соединение С.19 – 1 (около 34 мин); примесь А – около 0,7.

Идентификация примесей. Для идентификации пика примеси А используют относительное время удерживания соединения, хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы разрешение (R_s) между пиками примеси А и Соединения С.19 должно быть не менее 3,0.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %);
- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси».

Содержание Соединения С.19 $C_{54}H_{64}O_6$ в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 – площадь пика Соединения С.19 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика Соединения С.9 на хроматограмме раствора стандартного образца;

a_1 – навеска субстанции, мг;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца Соединения С.19, мг;

P – содержание Соединения С.19 в фармакопейном стандартном образце %;

W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.

ХРАНЕНИЕ

В хорошо укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

Заместитель директора по
научной работе Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Д.А. Коновалов

Заведующий кафедрой органической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Э.Т. Оганесян

Доцент кафедры фармацевтической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

С.В. Печинский

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

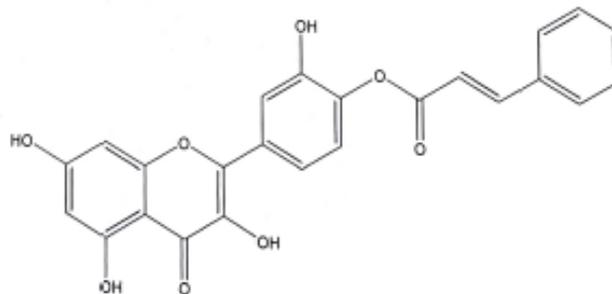
Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук, профессор
_____ Багирова В.Л.
«__» _____ 20__ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кверцетин 4'- циннамат (Соединение F.7)

C₂₄H₁₆O₈

М.м. 432,38

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

2-гидрокси-4-(3,5,7-тригидрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)фенил циннамат.

Субстанцию получают путем энзимного синтеза.

Содержит не менее 99,0% C₂₄H₁₆O₈ в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

Описание. Желтый или зеленовато-желтый кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим в спирте 96%, очень мало растворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность.

1. ИК-спектрометрия (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см⁻¹ по положению полос поглощения соответствует спектру фармакопейного стандартного образца.
2. Спектрофотометрия. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте 96% в области длин волн от 200 до 450 нм должен иметь максимумы при 259±2 нм, 276±2 нм и 374±2 нм.
3. ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца (раздел «Родственные примеси»).

ИСПЫТАНИЯ

Температура плавления. От 297 до 299°C (ОФС «Температура плавления», метод 1).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза (ПФ). Ацетонитрил – 0,05 М фосфорная кислота (30:70, объемное отношение).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в ацетонитриле и доводят объем раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца, растворяют в ацетонитриле и доводят объем раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг фармакопейного стандартного образца примеси А и 50 мг стандартного образца Соединения F.7, растворяют в ацетонитриле и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание

Примесь А: 3,3',4',5,7-Пентагидроксифлавоон (кверцетин) [117-39-5].

Хроматографические условия

Колонка	150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;
Температура колонки	25 °С;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 280 нм;
Объём пробы	20 мкл;
Время хроматографирования	3-кратное от времени удерживания основного пика.

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения, раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Относительное время удерживания соединений. Соединение F.7 – 1 (около 23 мин); примесь А – около 0,5.

Идентификация примесей. Для идентификации пика примеси А используют относительное время удерживания соединения, хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы разрешение (R_s) между пиками примеси А и Соединения F.7 должно быть не менее 3,0.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %);
- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси».

Содержание Соединения F.7 $C_{24}H_{16}O_8$ в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 – площадь пика Соединения F.7 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика Соединения F.7 на хроматограмме раствора стандартного образца;

a_1 – навеска субстанции, мг;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца Соединения F.7, мг;

P – содержание Соединения F.7 в фармакопейном стандартном образце %;

W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.

ХРАНЕНИЕ

В хорошо укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

Заместитель директора по
научной работе Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Д.А. Коновалов

Заведующий кафедрой органической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Э.Т. Оганесян

Доцент кафедры фармацевтической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

С.В. Печинский

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

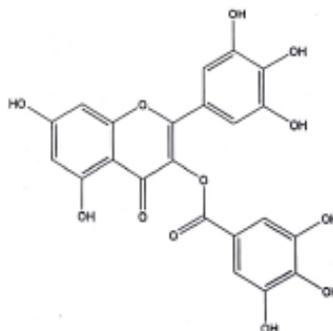
Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук, профессор
_____ Багирова В.Л.
«__» _____ 20__ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Мирицетин-3-тригидроксибензоат-3,4,5 (Соединение F.22)



$C_{22}H_{14}O_{12}$

М.м. 470,34

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

5,7-дигидрокси-4-оксо-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-4Н-хромен-3-ил
3,4,5-тригидроксибензоат.

Субстанцию получают путем энзимного синтеза.

Содержит не менее 99,0% $C_{22}H_{14}O_{12}$ в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

Описание. Желтый или зеленовато-желтый кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим в спирте 96%, очень мало растворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность.

1. ИК-спектрометрия (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 cm^{-1} по положению полос поглощения соответствует спектру фармакопейного стандартного образца.

2. Спектрофотометрия. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в спирте 96% в области длин волн от 200 до 450 нм должен иметь максимумы при 255 ± 2 нм, 272 ± 2 нм и 377 ± 2 нм.

3. ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца (раздел «Родственные примеси»).

ИСПЫТАНИЯ

Температура плавления. От 373 до 375°C (ОФС «Температура плавления», метод 1).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза (ПФ). Ацетонитрил – 0,05 М фосфорная кислота (30:70, объемное отношение).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в ацетонитриле и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца,

растворяют в ацетонитриле и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг фармакопейного стандартного образца примеси А и 50 мг стандартного образца Соединения F.22, растворяют в ацетонитриле и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание

Примесь А: 3,3',4',5,5',7-Гексагидроксифлавоон (мирицетин) [529-44-2].

Хроматографические условия

Колонка	150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;
Температура колонки	25 °С;
Скорость потока	1,0 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 280 нм;
Объём пробы	20 мкл;
Время хроматографирования	3-кратное от времени удерживания основного пика.

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения, раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Относительное время удерживания соединений. Соединение F.22 – 1 (около 21 мин); примесь А – около 0,5.

Идентификация примесей. Для идентификации пика примеси А используют относительное время удерживания соединения, хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы

разрешение (R_s) между пиками примеси А и Соединения F.22 должно быть не менее 3,0.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %);
- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

Потеря в массе при высушивании. Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

Остаточные органические растворители. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси».

Содержание Соединения F.22 $C_{22}H_{14}O_{12}$ в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 – площадь пика Соединения F.22 на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика Соединения F.22 на хроматограмме раствора стандартного образца;

a_1 – навеска субстанции, мг;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца Соединения F.22, мг;
 P – содержание Соединения F.22 в фармакопейном стандартном образце %;
 W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.

ХРАНЕНИЕ

В хорошо укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

Заместитель директора по
 научной работе Пятигорского медико-фармацевтического
 института – филиала ФГБОУ ВО
 ВолгГМУ Минздрава России,
 доктор фармацевтических наук,
 профессор



Д.А. Коновалов

Заведующий кафедрой органической химии
 Пятигорского медико-фармацевтического
 института – филиала ФГБОУ ВО
 ВолгГМУ Минздрава России,
 доктор фармацевтических наук,
 профессор

Э.Т. Оганесян

Доцент кафедры фармацевтической химии
 Пятигорского медико-фармацевтического
 института – филиала ФГБОУ ВО
 ВолгГМУ Минздрава России,
 кандидат фармацевтических наук,
 доцент

С.В. Печинский

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2702005

**СИНТЕЗ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ПРИРОДНЫХ ЛЮТЕИНА И АСТАКСАНТИНА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Печинский Станислав Витальевич (RU), Курегян Анна Гургеновна (RU), Степанова Элеонора Федоровна (RU)*

Заявка № 2018145080

Приоритет изобретения 18 декабря 2018 г.

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 03 октября 2019 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 18 декабря 2038 г.



*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Излиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 702 005**⁽¹³⁾ **C1**(51) МПК
C07C 57/46 (2006.01)
C07C 57/48 (2006.01)
C07D 213/127 (2006.01)
C07D 213/55 (2006.01)
C07D 213/60 (2006.01)
C07D 213/65 (2006.01)(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**(52) СПК
C07C 57/46 (2019.05); C07C 57/48 (2019.05); C07D 213/127 (2019.05); C07D 213/55 (2019.05); C07D 213/60 (2019.05); C07D 213/65 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018145080, 18.12.2018

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
18.12.2018Дата регистрации:
03.10.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.12.2018

(45) Опубликовано: 03.10.2019 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

357532, Ставропольский край, г. Пятигорск,
пр. Калинина, 11, корп. 1, Пятигорский медико-
фармацевтический институт - филиал ФГБОУ
ВО ВолГМУ Минздрава России

(72) Автор(ы):

Печинский Станислав Витальевич (RU),
Курегян Анна Гургеновна (RU),
Степанова Элеонора Федоровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Волгоградский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 7566795 B2, 28.07.2009. US
3673239 A1, 27.06.1972. US 2707193 A, 26.04.1955.
ГАМАЮРОВА В.С. Ферментативный
катализ в неводных средах. Бутлеровские
сообщения. Казань, 2011, т.25, п.7, с.87-95.(54) **СИНТЕЗ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИРОДНЫХ ЛЮТЕИНА И АСТАКСАНТИНА**(57) **Формула изобретения**

Синтез полусинтетических сложных эфиров в присутствии биокатализатора Новозим 435, отличающийся тем, что в качестве спиртосоставляющих сложных эфиров используют природные ксантофиллы, а именно лютеин или астаксантин, навески которых, соответствующие 0,001 моль вещества, и кислотосоставляющие, а именно или бензойную кислоту, или п-метилбензойную кислоту (п-толуиловую кислоту), или никотиновую кислоту, или миндальную кислоту в количестве, эквивалентном 0,002 моль вещества, растворяют в 50 мл толуола, помещают в реактор, для предотвращения попадания света и воздуха, нагревают реакционную среду до 37°C, перемешивают в течение 6 часов при скорости вращения мешалки 30 об/мин, смену направления перемешивания осуществляют через 10 мин; процесс синтеза контролируют методом ВЭЖХ; по окончании синтеза раствор пропускают через колонку, заполненную алюминия оксидом, собирая вторую окрашенную фракцию; раствор промывают спиртом этиловым 95% и водой; упаривают в ротормном испарителе, высушивают над безводным сульфатом натрия при комнатной температуре, предохраняя от действия света; полученные полусинтетические сложные эфиры хранят в ампулах темного стекла.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2739248

**СИНТЕЗ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ
ПРИРОДНОГО ЗЕАКСАНТИНА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Печинский Станислав Витальевич (RU), Курегян Анна Гургеновна (RU), Оганесян Эдуард Тоникович (RU)*

Заявка № 2019139342

Приоритет изобретения 02 декабря 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 22 декабря 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 02 декабря 2039 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Излиев Г.П. Излиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 739 248**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
C07C 57/46 (2006.01)
C07C 57/48 (2006.01)
C07D 213/127 (2006.01)
C07D 213/55 (2006.01)
C07D 213/60 (2006.01)
C07D 213/65 (2006.01)

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(52) СПК
C07C 57/46 (2020.08); C07C 57/48 (2020.08); C07D 213/127 (2020.08); C07D 213/55 (2020.08); C07D 213/60 (2020.08); C07D 213/65 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2019139342, 02.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.12.2019

Дата регистрации:
22.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.12.2019

(45) Опубликовано: 22.12.2020 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

357532, Ставропольский край, г. Пятигорск,
пр. Калинина, 11, корп. 1, Пятигорский медико-
фармацевтический институт - филиал ФГБОУ
ВО ВолгГМУ Минздрава России

(72) Автор(ы):

Печинский Станислав Витальевич (RU),
Курегян Анна Гургеновна (RU),
Оганесян Эдуард Тоникович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Волгоградский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 272005 C1, 03.10.2019. Печинский
С.В. и др. Создание новых катализаторов для
получения молекулярного водорода на основе
производных акридина, иммобилизованных
на углеродных материалах. Журнал общей
химии, 2019, т. 89(5), с.721-725. US 7566795 B2,
28.07.2009. US 3673239 A1, 27.06.1972.

(54) **СИНТЕЗ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ПРИРОДНОГО ЗЕАКСАНТИНА**(57) **Формула изобретения**

Синтез полусинтетических сложных эфиров ксантофилла в присутствии биокатализатора Amano Lipase PS в количестве 0,2 г, при эквимолярном соотношении спирт : кислота - 0,001:0,002, где в спиртосоставляющей сложных эфиров является природный ксантофилл - зеаксантин, в качестве кислот используют или бензойную, или п-метилбензойную кислоту, или фенилгликолиевую кислоту, или никотиновую кислоту, или салициловую кислоту, или ибупрофен, или кетопрофен, которые растворяют в 50 мл толуола, реакционную среду помещают в реактор, защищенный от воздействия света и воздуха, реакционную среду нагревают до 40°C, перемешивают в течение 6 часов при скорости вращения мешалки 30 об/мин, процесс синтеза контролируют методом ВЭЖХ, по окончании синтеза полученную смесь фильтруют, охлаждают до 20°C, промывают 95%-ным этиловым спиртом, высушивают 2 часа в вакууме (20-25 мм рт. ст.) при 40°C, полученные полусинтетические сложные эфиры хранят в ампулах темного стекла.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 777 890**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
C07C 69/78 (2006.01)
C07C 57/48 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07C 69/78 (2022.02); C07C 57/48 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021110891, 16.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.04.2021

Дата регистрации:
11.08.2022

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 16.04.2021

(45) Опубликовано: 11.08.2022 Бюл. № 23

Адрес для переписки:
357532, Ставропольский край, г. Пятигорск,
пр. Калинина, 11, корп. 1, Пятигорский МФИ
- филиал ФГБОУ ВО "Волгоградский
государственный медицинский университет"
МЗ РФ (Пятигорский МФИ - филиал ФГБОУ
ВО ВолгГМУ Минздрава России)

(72) Автор(ы):
Печинский Станислав Витальевич (RU),
Курегян Анна Гургеновна (RU),
Оганесян Эдуард Тоникович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Волгоградский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2702005 C1, 03.10.2019. EP
1460060 A1, 22.09.2004. US 2007190595 A1,
16.08.2007. Бочкарев В. В. Оптимизация
технологических процессов органического
синтеза: учебное пособие, 2010, Издательство
Томского политехнического университета,
с.15-16, 41-44. SU 575037 A3, 30.09.1977.

(54) ХЕМОЭНЗИМНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ALL-TRANS-ИЗОМЕРОВ СУБСТАНЦИЙ ЛЮТЕИНА И ЗЕАКСАНТИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к синтезу all-trans-изомеров субстанций лютеина или зеаксантина, при котором на 1-м этапе для получения сложного эфира бензойной кислоты лютеина или зеаксантина в присутствии Новозима 435 используют лютеин или зеаксантин по 0,002 моль, бензойную кислоту - 0,005 моль (0,6 г), время проведения этерификации 12 часов, температура процесса 37°C, скорость вращения мешалки 50 об/мин, не прореагировавшую бензойную кислоту

осаждают при 4°C, перекристаллизацию бензоатов лютеина или зеаксантина проводят при 10°C; на 2-м этапе проводят стереосопряженный гидролиз бензоатов лютеина или зеаксантина, используя щелочной агент - 10% спиртовой раствор гидроксида калия, при температуре 20-22°C, время гидролиза - 30 минут и скорость вращения мешалки - 100 об/мин. 1 пр., 1 ил.

RU 2 777 890 C 1

RU 2 777 890 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 800 457** ⁽¹³⁾ **С1**(51) МПК
C07D 311/30 (2006.01)
C07D 311/32 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07D 311/30 (2023.01); C07D 311/32 (2023.01); A61K 31/35 (2023.01)

(21)(22) Заявка: 2022115103, 03.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.06.2022Дата регистрации:
21.07.2023Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 03.06.2022

(45) Опубликовано: 21.07.2023 Бюл. № 21

Адрес для переписки:
357532, Ставропольский край, г. Пятигорск,
пр. Калинина, 11, Черников Максим
Валентинович(72) Автор(ы):
Печинский Станислав Витальевич (RU),
Курегян Анна Гургеновна (RU),
Оганесян Эдуард Тоникович (RU)(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Волгоградский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Ami Yi Hsan Saik, Yan Yau Lim,
Johnson Stanslas & Wee Sim Choo "Lipase-
catalysed acylation of quercetin with cinnamic
acid" Biocatalysis and Biotransformation, 2016;
34(1), pp.33-43. EP 2468741 A1, 27.06.2012. WO
2015019193 A2, 12.02.2015. RU 2702005 C1,
03.10.2019.

(54) Синтез сложных эфиров флавоноидов нарингенина, кверцетина, гесперетина

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к способу получения сложных эфиров нарингенина, кверцетина, гесперетина. Описан синтез сложных эфиров флавоноидов при эквимольном соотношении спирт : кислота – 0,002:0,003, где спиртосоставляющей сложных эфиров являются или нарингенин, или гесперетин, в качестве кислот используют или бензойную кислоту, или салициловую, или коричную кислоту, или никотиновую кислоту, также спиртосоставляющей сложных эфиров является кверцетин, в качестве кислот используют или бензойную кислоту, или никотиновую кислоту, которые растворяют в 50 мл ацетона, реакционную смесь перемешивают в течение 6 часов при температуре 50°C со скоростью 120 об/

мин, меняя направление перемешивания через 15 минут, процесс синтеза контролируют методом ВЭЖХ, после окончания реакции иммобилизованный фермент отделяют фильтрованием, реакционную среду очищают от избытка непрореагировавших кислот и диэфиров колоночной хроматографией, используя в качестве элюента смесь спирта этилового 70% и ацетонитрила в объемном соотношении 7:3, полученные сложные эфиры высушивают 2 ч при давлении 50 мм рт. ст. и температуре 60°C и запаивают в ампулы темного стекла. Технический результат – получение синтез новых сложных эфиров флавоноидов, таких как нарингенин, кверцетин и гесперетин. 12 пр.

RU 2 800 457 C 1

RU 2 800 457 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2806073

**Региоселективный энзимный синтез производных
кверцетина и мирицетина**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Печинский Станислав Витальевич (RU), Курегян Анна Гургеновна (RU), Оганесян Эдуард Тоникович (RU)*

Заявка № 2022124102

Приоритет изобретения 12 сентября 2022 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 25 октября 2023 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 12 сентября 2042 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 806 073** (13) **C1**(51) МПК
C07D 311/32 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07D 311/32 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022124102, 12.09.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.09.2022Дата регистрации:
25.10.2023Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 12.09.2022

(45) Опубликовано: 25.10.2023 Бюл. № 30

Адрес для переписки:
357532, Ставропольский край, г. Пятигорск,
пр. Калинина, 11, Ахвердова Ольга
Альбертовна(72) Автор(ы):
Печинский Станислав Витальевич (RU),
Курегян Анна Гургеновна (RU),
Оганесян Эдуард Тоникович (RU)(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Волгоградский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 3661890 A, 09.05.1972. Wei Li at
al. Highly efficient and regioselective synthesis
of dihydromyricetin esters by immobilized lipase.
Journal of Biotechnology, 2015, 199, 31-37. JPH
0212472 B2, 20.03.1990. Сивцева Ольга
Сергеевна. Получение флаванонов и синтеза
на их основе: диссертация. кандидата
фармацевтических наук: 14.04.02 / Сивцева
Ольга (см. прод.)

(54) Региоселективный энзимный синтез производных кверцетина и мирицетина

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармации, в частности к химико-фармацевтической отрасли, и касается региоселективного способа получения сложных эфиров флавоноидов, выбранных из сложных эфиров кверцетина или мирицетина, и может использоваться для получения стандартных образцов и лекарственных препаратов на основе этих соединений. Предлагаемый способ включает следующие этапы: на 1-м этапе получают пентабензоат кверцетина или гексабензоат мирицетина при температуре 35°C в течение 1 часа; на 2-м этапе высушенные при температуре 60°C пентабензоат кверцетина или гексабензоат мирицетина растворяют в ацетонитриле, гидролизуют только по 3 положению, что обеспечивается нагреванием

до 80°C, добавлением концентрированной серной кислоты, перемешиванием со скоростью 200 об/мин в течение 2 часов; на 3-м этапе проводят этерификацию по 3 положению, нейтрализуя среду до pH=6 10% спиртовым раствором калия гидроксида, используя биокатализатор Nowozyme 435, в качестве кислот – или 2-гидроксибензойную (салициловую) кислоту, или 4-гидроксибензойную кислоту, или 2,6-дигидроксибензойную кислоту, или 3,4-дигидроксибензойную (прокатеховую) кислоту, или 3,4,5-тригидроксибензойную (галловую) кислоту, перемешивая реакционную среду со скоростью 120 об/мин при температуре 50°C в течение 6 часов; на 4-м этапе осуществляют щелочной гидролиз заблокированных гидроксильных групп с помощью 10% спиртового

RU 2 806 073 C 1

RU 2 806 073 C 1

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский
государственный университет имени
Коста Левановича Хетагурова»,
кафедра Экономических наук, доцент
Загалова З.А.



«12» мая 2024

УТВЕРЖДАЮ

Декан факультета химии, биологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский
государственный университет имени
Коста Левановича Хетагурова»,
доктор биологических наук, профессор
Хетагуров Х. М.

«12» мая 2024

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование научной работы. Диссертационная работа Печинского Станислава Витальевича «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Предмет внедрения. Результаты диссертационного исследования по направленной модификации структуры биологически активных соединений путем энзимного синтеза, в частности, способы энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов – лютеина, зеаксантина, астаксантина и флавоноидов – нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина и способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров.

Источник информации. Материалы исследовательской работы, выполненной в рамках диссертационного исследования Печинского С.В. «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза». Научный консультант – доктор фармацевтических наук, профессор Оганесян Э.Т..

Где внедрено. Кафедра органической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова»

Цель внедрения. Использование в учебном процессе и научно-исследовательской работе сотрудников кафедры органической химии факультета химии, биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова».

Заведующий кафедрой органической химии
ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский
государственный университет имени
Коста Левановича Хетагурова»,
доктор химических наук, доцент



Абаев В.Т.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава
России, д.м.н., доцентС.В. Поройский
« 14 » _____ 2024 г.**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационной работы Печинского С.В. на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакологии, клинической фармакологии и фармации ИНМФО ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ: председателя – заведующей кафедрой, д-р. мед. наук, проф. Бородкиной Л. Е.; членов комиссии – чл. кор. РАН, ЗДН, д-р. мед. наук, проф. кафедры Тюренкова И. Н. и канд. мед. наук, доцента Фролова М. Ю. подтверждает использование четырех сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов, синтезированных при работы над диссертационной работой Печинского С.В. на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза», научный консультант – доктор фармацевтических наук, профессор Оганесян Э.Т., в фармакологических исследованиях по выявлению антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров.

Председатель комиссии:

заведующая кафедрой фармакологии, клинической
фармакологии и фармации ИНМФО
ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России,

д-р. мед. наук, профессор

Л. Е. Бородкина

Члены комиссии:

Профессор кафедры

Доцент

И. Н. Тюренков

М. Ю. Фролов

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и
воспитательной работе Пятигорского
медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО «ВолГМУ»
Минздрава России, д-р. фармацевт. наук

И.И. Кодонида

«13» марта 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предметы внедрения: Результаты диссертационного исследования по направленной модификации структуры биологически активных соединений путем ферментативного синтеза, в частности, способы ферментативного синтеза сложных эфиров ксантофиллов – лютеина, зеаксантина, астаксантина и флавоноидов – нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина и способ ферментативного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров.

Источник информации: материалы экспериментальной части диссертационной работы Печинского Станислава Витальевича на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем ферментативного синтеза». Научный консультант – доктор фармацевтических наук, профессор, заслуженный работник высшей школы Оганесян Эдуард Тоникович.

Где внедрено: кафедра фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Цель внедрения: использование в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии материалов экспериментальной части диссертационной работы Печинского С.В..

Заведующий кафедрой
фармацевтической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный
медицинский университет» Минздрава
России, д-р. фармацевт. наук, доцент

И.П. Кодонида

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и
воспитательной работе Пятигорского
медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО «ВолГМУ»
Минздрава России, д.р. фармацевт. наук

И.П. Колонида

«22» марта 2024

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Результаты диссертационного исследования по направленной модификации структуры биологически активных соединений путем энзимного синтеза, в частности, способы энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов – лютеина, зеаксантина, астаксантина и флавоноидов – нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина и способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров.

Источник информации: материалы экспериментальной части диссертационной работы Печинского Станислава Витальевича на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза». Научный консультант – доктор фармацевтических наук, профессор, заслуженный работник высшей школы Оганесян Эдуард Тоникович.

Где внедрено: кафедра органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Цель внедрения: использование в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре органической химии материалов экспериментальной части диссертационной работы Печинского С.В..

Доцент кафедры
органической химии
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный
медицинский университет» Минздрава
России, канд. фармацевт. наук, доцент



А.В. Ивченко

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР

академик Российской академии наук,

доктор сельскохозяйственных наук

Сидельников Н.И.



«20» марта 2022

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование научной работы. Диссертационная работа Печинского С.В. «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Предмет внедрения. Результаты исследования по направленной модификации структуры биологически активных соединений путем энзимного синтеза:

- 1) способы энзимного ацилирования ксантофиллов – лютеина, зеаксантина, астаксантина и флавоноидов – нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина;
- 2) способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров;
- 3) результаты прогнозов видов фармакологической активности для 21 сложного эфира ксантофиллов и 22 сложных эфиров флавоноидов методами *in silico*;
- 4) результаты определения антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS⁺.

Источник информации. Материалы исследовательской работы, выполненной в рамках диссертационного исследования Печинского С.В. «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза». Научный консультант – доктор фармацевтических наук, профессор Оганесян Э.Т.

Где внедрено. ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва.

Цель внедрения. Использование в научно-исследовательской работе сотрудников ФГБНУ ВИЛАР.

Заместитель директора,
заведующий научно-организационным отделом,
кандидат фарм. наук

Семкина О. А.