

УДК 615.1; 51-7; 542.06; 66.097.3

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2023.49.38.001>

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЭНЗИМНОГО СИНТЕЗА НАРИНГЕНИН-4'-БЕНЗОАТА МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

С.В. Печинский, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск, ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, г. Москва

Э.Т. Оганесян, доктор фарм. наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск

А.Г. Курегян, доктор фарм. наук, профессор кафедры фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск

А.А. Маркарян, доктор фарм. наук, профессор, помощник ректора ФГБОУ ВО Российский Университет Медицины Минздрава России, ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, г. Москва

Оптимизация катализа при синтезе или модификации структуры биологически активных соединений (БАС) одновременно может решить такие важные задачи, как снижение энергозатрат, отказ от токсичных растворителей, минимизация использования вспомогательных веществ в ходе синтеза, повышение чистоты. Цель исследования – провести оптимизацию методики энзимного синтеза нарингенин-4'-бензоата методом математического планирования эксперимента. Оценку влияния параметров синтеза на выход сложного эфира нарингенина и бензойной кислоты проводили методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основе уравнения регрессии. Методом крутого восхождения определены оптимальные параметры синтеза нарингенин-4'-бензоата. Максимальный выход целевого продукта – нарингенин-4'-бензоата – был достигнут при температуре синтеза 50°C, времени реакции 6 часов, количестве биока-

тализатора 0,5 г и скорости перемешивания 120 об/мин. Максимальное влияние на выход продукта реакции оказывают скорость перемешивания, температура и время синтеза. Построенная математическая модель и выбор оптимальных условий синтеза нарингенин-4'-бензоата методом крутого восхождения обеспечили увеличение выхода сложного эфира до 84% и позволили установить количественное влияние всех изученных параметров на процесс синтеза.

Ключевые слова: математическое планирование эксперимента, крутое восхождение, нарингенин, бензойная кислота, биокатализ, этерификация

Признание российских препаратов конкурентоспособными на фармацевтическом рынке может быть обеспечено стремлением создавать отечественные технологии, которые будут отвечать требованиям и тенденциям развития передового фармацевти-

ческого производства и в первую очередь соответствовать параметрам концепции зеленой технологии [1,2]. С этих позиций наиболее интересной с теоретической точки зрения и перспективной в практическом плане является оптимизация процессов катализа. Очевидно, что грамотно выстроенная концепция катализа при синтезе или модификации структуры биологически активных соединений (БАС) одновременно может решить такие важные задачи, как снижение энергозатрат, отказ от токсичных растворителей, минимизация использования вспомогательных веществ в ходе синтеза, повышение чистоты, а в конечном итоге – снижать себестоимость целевого продукта. Синтез новых лекарственных средств (ЛС) сопряжен с экономическими и экологическими проблемами, поскольку сталкивается с многостадийностью технологических схем, что определяется высокой очисткой индивидуального соединения и все более усложняющейся их структурой, а также большим использованием часто токсичных растворителей и экстрагентов. В связи с этим, по нашему мнению, разработку и оптимизацию схем модификации структур БАС путем получения их полусинтетических производных с применением биокаталитических реакций можно считать актуальной.

Цель исследования – оптимизировать методику синтеза нарингенин-4'-бензоата методом математического планирования эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Влияние параметров синтеза на выход нарингенин-4'-бензоата устанавливали методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основании уравнения регрессии. Синтез целевого продукта – нарингенин-4'-бензоата – проводили в присутствии биоката-

лизатора Novozyme 435 (L4777 Sigma-Aldrich) по опубликованной нами методике [3], для синтеза использовали субстанции нарингенина (5893 Sigma-Aldrich) и бензойной кислоты (242381 Sigma). Контроль выхода нарингенин-4'-бензоата проводили методом ВЭЖХ по разработанной и опубликованной методике [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельного объекта для модификации структуры БАС путем энзимного синтеза был выбран нарингенин, который является производным флаванона. Он проявляет противовоспалительные, антимикробные, противовирусные свойства [4–6]. Имеются данные исследований *in vitro* и *in vivo*, которые показали инактивацию канцерогенов после лечения чистым нарингенином [7]. Это соединение обладает потенциалом применения при сердечно-сосудистых заболеваниях [8]. Особый интерес и перспективу представляет противовирусная и антиканцерогенная активность флавоноидов. Ранее в эксперименте *in silico* нами была рассмотрена возможность связывания 30 флавоноидов-лигандов и основной протеазы SARS-CoV-2-3CLpro. В эксперименте изучались производные флавонола и флаванона. Общий анализ всех структур и их активностей позволил предположить, что производные флаванона более активны, чем производные флавонола [9].

Значительное число исследований по модификации флавоноидов в присутствии энзимов описывает их этерификацию по гидроксигруппам углеводного фрагмента в гликозидах [10–15], т. е. при изучении реакций этерификации флавоноидов исследователи чаще используют их гликозиды. Однако, по нашему мнению, более целесообразной будет этерификация агликонов флавоноидов, поскольку именно они являются носителями фармакофора и определяют липофильность

этих соединений, а этерификация, вероятнее всего, должна усилить последний параметр. Примечательно, что существует обратная корреляция между числом гидроксигрупп и липофильностью флавоноидов [16]. Одним из путей увеличения липофильности является перевод гидроксильных групп в сложноэфирные [17].

Ранее нами при разработке методики энзимного синтеза сложных эфиров ксантофилов был применен метод математического планирования эксперимента [18], который показал свою эффективность, поскольку позволяет сократить количество опытов, необходимых для установления оптимальных параметров, а также определить наиболее значимые факторы и степень их как индивидуального, так и совместного влияния на процесс синтеза. На основании данных, описанных в работе [19], было решено изучить влияние следующих факторов: температура синтеза, время протекания реакции, количество биокатализатора и скорость перемешивания реакционной среды.

Для математического описания рассматриваемого процесса синтеза предварительно был построен план эксперимента, вводные данные которого представлены в табл. 1.

Для математического описания вблизи начальных точек поверхности отклика, как и в случае с синтезом эфиров ксантофилов [18], использовали варьирование каждого фактора на двух уровнях: +1 и -1. При этом

число необходимых опытов для реализации всех возможных сочетаний факторов будет равно 16. План и результат эксперимента по синтезу нарингенин-4'-бензоата представлен в табл. 2.

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии:

$$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{1105,3}{16} = 69,08 \quad (1)$$

$$b_2 = 0,655, b_3 = 0,015, b_4 = 1,038 \quad (2)$$

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

На основании полученных результатов было составлено опорное уравнение регрессии:

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

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

Таблица 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

Таблица 2

ПЛАН И РЕЗУЛЬТАТ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО СИНТЕЗУ НАРИНГЕНИН-4'-БЕНЗОАТА

№ опыта	Уровни факторов				Экспериментальное значение У, %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
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
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

$$S_y^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1} = \frac{1,45}{5} \quad (4)$$

$$t_1 = \frac{b_1}{S_{b1}} = \frac{0,923}{0,24} = 3,84 \quad (7)$$

Затем определяли среднюю квадратичную погрешность:

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

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

Для выявления значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [20]:

$$t_0 = \frac{b_0}{S_{b0}} = \frac{68,53}{0,24} = 285,5 \quad (6)$$

Коэффициент Стьюдента для третьего (t₃) фактора меньше табличного значения, что свидетельствует о несущественном влиянии на выход продукта синтеза количества биокатализатора в рассматриваемом интервале, а значит, его количество можно уменьшить до значения нижнего уровня 0,5 г. Наибольшее положительное влияние на процесс оказывают скорость перемешивания (t₄), температура (t₁) и время реакции (t₂). Таким образом, после математического моделирования процесса

синтеза была установлена количественная степень влияния факторов.

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

$$y = 69,08 + 0,923x_1 + 0,655x_2 + 1,038x_4 \quad (8)$$

Для проверки адекватности математической модели в окончательное уравнение регрессии (формула 8) подставляли экспериментальные данные, представленные в табл. 2, и рассчитывали теоретические значения выхода нарингенин-4'-бензоата. Ниже приведен пример определения расчетного содержания:

$$y_1 = 69,08 + 0,923(+1) + 0,655(+1) + 1,038(+1) = 52,53$$

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

$$S_R = \sum (y_3 - y_p)^2 = 1,61 \quad (9)$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N - (k + 1)} = \frac{1,61}{16 - 5} = 0,15 \quad (10)$$

После этого рассчитывали значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{0,15}{0,29} = 0,52 \quad (11)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 0,52, что не превышает табличное значение этого показателя – $F_{0,95}(15,5) = 2,90$ [20], следовательно, разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса синтеза, параметром оптимизации служил выход конечного продукта в процентах от максимального расчетного значения. Для этого использовали метод крутого восхождения, результаты которого представлены в табл. 3. 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 их шаг варьирования

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ СИНТЕЗА НАРИНГЕНИН-4'-БЕНЗОАТА МЕТОДОМ КРУТОГО ВОСХОЖДЕНИЯ

Характеристика	$X_1, ^\circ\text{C}$	$X_2, \text{ час}$	$X_3, \text{ г}$	$X_4, \text{ об/мин}$	$y, \%$
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

был максимальным, для незначимого фактора – количество биокатализатора – его значение принимали на минимальном уровне 0,5 г во всех экспериментах. Результаты выбора оптимальных условий синтеза методом крутого восхождения представлены в табл. 3.

В результате поиска оптимальных значений в четвертом опыте при температуре 50°C, времени реакции 6 часов, количестве биокатализатора 0,5 г и скорости перемешивания 120 об/мин был достигнут максимальный выход продукта синтеза – около 84%. Дальнейшее увеличение параметров не приводило к увеличению выхода продукта, о чем свидетельствуют результаты опыта 5: около 82%.

ВЫВОДЫ

С помощью построения математической модели и поиска оптимальных условий методом крутого восхождения был увеличен выход нарингенин-4'-бензоата с 71% в начальных условиях эксперимента до 84%. На основании экспериментальных данных и теоретических расчетов определены оптимальные параметры синтеза нарингенин-4'-бензоата: количество биокатализатора – 0,5 г, температура синтеза – 50°C, время синтеза – 6 ч, скорость перемешивания реакционной среды – 120 об./мин. Ввиду того, что флавоноиды обладают схожестью структур, а следовательно, близкими химическими свойствами, то, вероятнее всего, в дальнейшем можно будет экстраполировать результаты оптимизации параметров синтеза нарингенин-4'-бензоата на синтез сложных эфиров других флавоноидов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Paul T. Anastas, Tracy C. Williamson *Green chemistry*. ACS Symposium Series. 1996; 626: 1–17. DOI: 10.1021/bk-1996-0626.ch001.
2. Anastas P.T., Warner J.C. *Green chemistry: theory and practice*. – New York: Oxford University Press, 1998.
3. Pechinskii S.V., Kuregyan A.G., Oganesyanyan E.T. *Chemoenzyme synthesis of flavonoid esters // Russian Journal of General Chemistry*. – 2022. – Т. 92 – №8 – P. 1401–1407.
4. Zeng W., Jin L., Zhang F., Zhang C., Liang W. *Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics // Pharmacol. Res.* 2018 Sep; 135: 122–126. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.08.002.
5. Liu S., Li C., Dai X., Song T., Wang X., He Y., He Z., Tan J., Zhang J. *Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties // Biomed. Pharmacother.* 2023 Aug; 164: 114990. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114990.
6. Tutunchi H., Naeini F., Ostadrahimi A., Hosseinzadeh-Attar M.J. *Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19 // Phytother. Res.* 2020 Dec; 34(12): 3137–3147. DOI: 10.1002/ptr.6781.
7. Motallebi M., Bhia M., Rajani H.F., Bhia I., Tabarraei H., Mohammadkhani N., Pereira-Silva M., Kasaii M.S., Nouri-Majd S., Mueller A.L., Veiga F.J. B., Paiva-Santos A.C., Shakibaei M. *Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy // Life Sci.* 2022 Sep 15; 305: 120752. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120752.
8. Heidary Moghaddam R., Samimi Z., Moradi S.Z., Little P.J., Xu S., Farzaei M.H. *Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review // Eur.J. Pharmacol.* 2020 Nov 15; 887: 173535. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173535.
9. Печинский С.В., Оганесян Э.Т. Курегиан А.Г. *Поиск активных кандидатов в ряду флавоноидов в отношении возбудителя SARS-CoV-2 методом молекулярного докинга // Фармацевтическое дело и технология лекарств.* 2021. №1. С. 22. DOI: 10.33920/med-13-2101-02.
10. Almeida V.M., Carla R.C. Branco, Sandra A. Assis, Ivo. J.C. Vieira, Braz-Filho R., Branco A.

- Almeida, et al. Synthesis of naringin 6'' – rici-noleate using immobilized lipase // *Chemistry Central Journal*. 2012. Vol. 6. №41. P. 2. DOI: 10.1186/1752-153X-6-41.
11. Nobuyoshi Nakajima, Kohji Ishihara, Hiroki Hamada, Sei-Ichirou Kawabe, Tsutomu Furuya. Regioselective acylation of flavonoid gluco-side with aromatic acid by an enzymatic reac-tion system from cultured cells of *Ipomoea batatas* // *Journal of Bioscience and Bioengi-neering*. 2000. Vol. 90. №3. 347. DOI: 10.1016/s1389-1723(00)80095-x.
 12. David E. Stevenson, Reginald Wibisono, Dwayne J. Jensen, Roger A. Stanley, Janine M. Cooney. Direct acylation of flavonoid glyco-sides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®) // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. №39. 1236. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.006.
 13. Jiumn-Yih Wu, Tzi-Yuan Wang, Hsiou-Yu Ding, Yun-Rong Zhang, Shu-Yuan Lin, Te-Sheng Chang // *Molecules*. 2021. №26. P. 6274. doi.org/10.3390/molecules26206274.
 14. Razak N.N. A., Annuar M.S. M. // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2015. Vol. 54. №21. 150513175333005. DOI: 10.1021/acs.iecr.5b00996.
 15. Passicos E., Santarelli X., Coulon D. // *Biotech-nology Letters*. 2004. №26. P. 1073. doi.org/10.1023/B:BILE.0000032967.23282.15.
 16. van Dijk C., Driessen A.J., Recourt K. // *Biochem. Pharmacol*. 2000. Vol. 60. №11. P. 1593. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00488-3.
 17. Viskupicova J., Ondrejovic M., Maliar T. // *Bio-chemistry*. 2011. DOI: 10.5772/34174.
 18. Печинский С.В., Оганесян Э.Т., Курегян А.Г. Оптимизация синтеза сложного эфира астаксантина методом математическо-го планирования // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2023. Т. 26. №6. С. 3–9.
 19. Roy S., Dhaneshwar S., Bhasin B. *Drug Repur-posing: An Emerging Tool for Drug Reuse, Recy-cling and Discovery* // *Curr. Drug. Res. Rev.* 2021; 13(2): 101–119. DOI: 10.2174/2589977513666210211163711.
 20. Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд. Москва, 2023. URL: <http://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>.

OPTIMIZATION OF PARAMETERS OF ENZYMATIC SYNTHESIS OF NARINGENIN 4'-BENZOATE USING THE METHOD OF MATHEMATICAL EXPERIMENT PLANNING

S.V. Pechinskii^{1,2}, E.T. Oganessian¹, A.G. Kuregyan¹, A.A. Markaryan²

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgGMU of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State Medical and Dental University named after A.I. Evdokimov of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Optimizing catalysis in the synthesis or modification of the structure of biologically active compounds (BACs) can simultaneously solve such important problems as reducing energy costs, eliminating toxic solvents, minimizing the use of excipients during synthesis, increasing purity and, finally, reducing the cost of the target product. The purpose of the study is to optimize the method of enzymatic synthesis of naringenin-4'-benzoate using the method of mathematical experimental design. The influence of synthesis parameters on the yield of the ester of naringenin and benzoic acid was assessed by the method

of mathematical experimental planning, using the construction of a mathematical model based on a regression equation. The optimal parameters for the synthesis of naringenin-4'-benzoate were determined using the steep ascent method. The maximum yield of the target product, naringenin-4'-benzoate, was achieved at a synthesis temperature of 50°C, a reaction time of 6 hours, an amount of biocatalyst of 0.5 g, and a stirring speed of 120 rpm. The maximum influence on the yield of the reaction product is exerted by the stirring speed, temperature and synthesis time. The constructed mathematical model and the choice of optimal conditions for the synthesis of naringenin-4'-benzoate using the steep ascent method ensured an increase in the yield of the ester to 84% and made it possible to establish the quantitative influence of all studied parameters on the process of its synthesis.

Keywords: mathematical planning of an experiment, steep ascent, naringenin, benzoic acid, biocatalysis, esterification