

УДК: 544.35; 544.971

С. В. Блохина¹, М. В. Ольхович¹, А. В. Шарапова¹, Е. Д. Жирова²

СИНТЕЗ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО БИОАКТИВНОГО ФТОРПРОИЗВОДНОГО ТРИАЗОЛ-3-ТИОНА

¹Институт химии растворов им. Г. А. Крестова Российской академии наук,
Академическая ул., д. 1, 153045 Иваново, Россия. E-mail: svb@isc-ras.ru

²Ивановский государственный химико-технологический университет,
Шереметевский пр., д. 7, 153000 Иваново, Россия

*Синтезировано новое фторпроизводное триазол-3-тиона как потенциальный нейропротектор. Структура и чистота вещества подтверждены методами ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и элементного анализа. Проведено *in vitro* исследование биологической активности соединения: оценена кальций-блокирующая способность и влияние на функциональную активность АМРА рецепторов. Методом изотермического насыщения измерена растворимость вещества в растворителях, имитирующих среды организма, в интервале температур 293–313 К. С использованием уравнений Вант-Гоффа и Апелблата выполнено моделирование температурных зависимостей растворимости соединения. Определена липофильность синтезированного производного и сделано заключение, что вещество должно обладать хорошей кишечной абсорбцией. На основе рассчитанных термодинамических функций растворения и распределения соединения выполнен анализ влияния энтальпийных и энтропийных вкладов на энергию Гиббса указанных процессов. Изучена проницаемость полученного производного через искусственные лиотропные фосфолипидные мембраны. Установлено, что проницаемость синтезированного производного достаточна для прохождения через биологические клеточные мембраны.*

Ключевые слова: синтез, производное триазол-3-тиона, биологическая активность, растворимость, липофильность, лиотропные фосфолипидные мембраны, термодинамика.

DOI: 10.18083/LCAppl.2021.2.35

S. V. Blokhina¹, M. V. Olkhovich¹, A. V. Sharapova¹, E. D. Zhirova²

SYNTHESIS AND PHARMACEUTICAL SIGNIFICANT PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF A NEW BIOACTIVE FLUORINE DERIVATIVE OF TRIAZOL-3-THIONE

¹G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of Solutions of RAS,
1 Akademicheskaya St., Ivanovo, 153045, Russia. E-mail: svb@isc-ras.ru

²Ivanovo State University of Chemical Technology,
7 Sheremetevsky Av., Ivanovo, 153000, Russia

*A new fluorine derivative of triazole-3-thione has been synthesized as a potential neuroprotector. The structure and purity of the compound were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and elemental analysis. The *in vitro* study of the biological activity of the compound was carried out: the calcium-blocking ability and the effect on the functional activity of AMPA receptors. The shake flask method was used to measure the solubility of the compound in solvents imitating the body's media in the temperature range of 293–313 K. The temperature dependences of the compound solubility were modeled using the Van't Hoff and Apelblat equations. The lipophilicity of the compound was determined and it was concluded that it should have a good intestinal absorption. On the basis of the calculated dissolution and distribution thermodynamic functions, the analysis of the influence of enthalpy and*

entropy contributions on the Gibbs energy of these processes was carried out. The permeability of the compound through artificial lyotropic phospholipid membranes was studied. It was found that the permeability is sufficient to pass through the body's biological cell membranes.

Key words: synthesis, triazole-3-thione derivative, biological activity, solubility, lipophilicity, lyotropic phospholipid membranes, thermodynamics.

Введение

Старение населения является глобальным процессом, затрагивающим все страны мира и в том числе Россию. Поставленный диагноз болезни Альцгеймера кардинально ухудшает жизнь как самого человека, так и членов его семьи. В настоящее время не существует препаратов для лечения этого тяжелого заболевания. Исследователи во всех развитых странах продолжают искать средства против болезни Альцгеймера и других прогрессирующих деменций. Накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать структурный каркас на основе гамма-карболинового ядра в качестве базового элемента новой группы нейроактивных препаратов [1]. Объектом настоящей работы являлся 5-[2-(8-фтор-2-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-пиридо[4,3-b]индол-5-ил)этил]-4-метил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тион, представляющий собой гибрид двух фармакофорных фрагментов: карболина и триазол-тиона, соединенных этильным линкером. Кроме основных химических центров, синтезированное соединение содержит атомы серы и фтора, повышающие его биоактивность (рис. 1).



Рис. 1. Молекулярная структура исследуемого соединения

Fig. 1. Molecular structure of the studied compound

Химическая структура молекулы является не единственным фактором, влияющим на биологическую активность лекарственного препарата. Лекарственное вещество должно обладать комплек-

сом физических и химических свойств, обеспечивающих его распределение в организме, а следовательно, взаимодействие с ферментами и рецепторами. К важнейшим из этих свойств относятся растворимость, липофильность и проницаемость вещества через липидный слой мембран. Растворимость в биологических средах организма является одной из наиболее важных характеристик лекарственных соединений, поскольку в значительной степени определяет ADME свойства препарата и оказывает влияние на терапевтические дозы и возможные побочные эффекты [2]. Общепринятой характеристикой липофильности молекулы является коэффициент распределения в системе 1-октанол/вода. Коэффициенты распределения в указанной системе рассматриваются как важнейшие физико-химические параметры во всех исследованиях, связанных с токсикологическими свойствами веществ и их фармакокинетическим поведением [3, 4].

Другой важный этап в процессе разработки лекарственных веществ предполагает исследование биодоступности, которая показывает способность молекул проникать через клеточные мембраны, чтобы взаимодействовать с внутриклеточными рецепторами [5]. В биофизических исследованиях широкое применение нашли искусственные фосфолипидные мембраны, которые служат моделью биологических клеточных мембран [6]. Фосфолипидные везикулы в мембране формируют билипидный слой, который обладает жидкокристаллическими свойствами: дальним ориентационным порядком и текучестью [7]. Считается, что основная масса липидов в биологических мембранах находится в ламелярной жидкокристаллической фазе. Структурное подобие фосфолипидных мембран и лиотропных жидких кристаллов позволяет использовать их для интерпретации молекулярной структуры и функций различных клеточных тканей и органов [8]. Лекарственные препараты, загруженные в везикулы, позволяют предохранить их от нежелательных воздействий организма, а также снижают побочные эффекты [9, 10].

Цель настоящей работы заключалась в синтезе нового фторопроизводного триазол-3-тиона как потенциального нейропротектора и исследовании его фармацевтически значимых физико-химических свойств – растворимости, липофильности и мембранной проницаемости.

Экспериментальная часть

Синтетической целью работы являлось получение нового соединения ряда γ -карболинов, обладающего нейрокорректирующей активностью. Пиридо[4,3-*b*]индол, синтезированный методом Фишера, был присоединен по активированной двойной связи акрилонитрила и затем полученный нитрил переведен в тиоамид. 2,4-Дигидро-1,2,4-триазол-3-тион получали по следующей схеме: пиридо[4,3-*b*]индол присоединяли по активированной двойной связи этилакрилата и затем полученный эфир переводили в соответствующий гидразид. Последний при взаимодействии с изотиоцианатом дал триазол-3-тион. В результате проведенных работ был получен 2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тион с фтором в качестве заместителя. Структура и чистота (> 98 %) синтезированного соединения подтверждены методом ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и элементного анализа.

5-[2-(8-Фтор-2-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1 H -пиридо[4,3-*b*]индол-5-ил)этил]-4-метил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тион. Выход 83 %, $T_{\text{пл}} = 215\text{--}218$ °C (этанол). Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 /CDCl $_3$, 1:1, δ , м.д., Дж/Гц): 13,49 (уш.с, 1H, NH); 7,26 (дд, 1H, $N_{\text{аром}}$, $J = 8,9$; $J = 4,4$); 7,03 (дд, 1H, $N_{\text{аром}}$, $J = 9,8$; $J = 2,2$); 6,84 (тд, 1H, $N_{\text{аром}}$, $J = 9,2$; $J = 2,2$); 4,43 (т, 2H, CH $_2$, $J = 7,0$); 3,52 (с, 2H, MeNCH $_2$); 3,16 (с, 3H, Me); 3,05 (т, 2H, CH $_2$, $J = 7,0$); 2,75 (м, 4H, MeNCH $_2$ CH $_2$); 2,48 (с, 3H, Me). Спектр ^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д., Дж/Гц): 166,57; 156,82 (д, $J = 231,4$); 150,16; 135,47; 132,22; 125,32 (д, $J = 10$); 109,91 (д, $J = 9$); 108,06 (д, $J = 22$); 107,75; 102,33 (д, $J = 23$); 51,76; 50,99; 45,27; 29,34; 25,67; 21,95. Применение процедуры DEPT 135 позволило обнаружить сигнал, скрытый растворителем. Масс-спектр (m/z): 345 (M^+).

Растворимость веществ определяли методом изотермического насыщения в диапазоне температур от 293,15 до 313,15 К. Данный метод заключается в определении концентрации соединения в насыщенном растворе. Избыточное количество соединения добавляли к известному количеству

чистого растворителя. Концентрированные суспензии соединения в каждом растворителе непрерывно перемешивали в воздушном термостате в течение 72 ч. Время осаждения твердой фазы после перемешивания составляло 4 ч. После достижения насыщения аликвоту раствора отбирали и центрифугировали в течение 5 мин при фиксированной температуре. Затем растворы фильтровали. Насыщенный раствор разбавляли соответствующим растворителем до необходимой концентрации. Концентрацию в молярности оценивали, измеряя поглощение на длине волны 329 нм с использованием УФ-спектрофотометра (Cary-50, США) при комнатной температуре.

Эксперименты по измерению коэффициентов распределения соединения в системе 1-октанол/буфер pH 7,4 проводили методом изотермического насыщения при пяти температурах: 293,15; 298,15; 303,15; 308,15 и 313,15 К. Одинаковые объемы буфера, насыщенного 1-октанолом и 1-октанола, насыщенного буфером, с определенной концентрацией соединения, добавляли в пробирку, которую помещали в термостат. Полученный раствор перемешивали для достижения состояния равновесия в течение двух дней. Концентрации препарата в обеих фазах определяли с помощью спектрофотометра Cary-50 (США) в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda = 190\text{--}400$ нм) с точностью 2–4 %.

Проницаемость синтезированного производного гамма-карболина определяли с использованием искусственных фосфолипидных мембран на основе яичного лецитина. Процедура изготовления мембран была опубликована ранее [11] и заключалась в следующем: фосфатидилхолин из яиц растворяли в смеси хлороформа и метанола с последовательным удалением органических растворителей в вакууме. В результате была получена липидная пленка, которая была растворена в фосфатном буфере, содержащем 10 % этанола. Суспензии малых и больших липосом получали фильтрованием через поликарбонатные мембранные фильтры с размером пор 0,4 мкм и 0,8 мкм соответственно. Суспензии липосом адсорбировали последовательно на фильтры с помощью центрифуги. В начале процесса адсорбции небольшие липосомы располагались в порах носителя, а затем более крупные – на его поверхности. Далее для создания плотного барьера из липосом использовался цикл замораживания-оттаивания.

Необходимым условием эксперимента являлась сохранность целостности мембран во время проведения опытов в буферном растворе pH 7,4.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе проведены исследования биологической активности и фармацевтически значимых физико-химических свойств синтезированного 5-[2-(8-фтор-2-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-пиридо[4,3-b]индол-5-ил)этил]-4-метил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тиона, молекулярная структура которого представлена на рис. 1. На кривой ДСК образца соединения наблюдается острый эндотермический пик плавления, который характеризуется температурой начала плавления 272 °С и энтальпией 41,1 кДж·моль⁻¹.

Биологическая активность

Поскольку целевая мишень полученного соединения – глутаматэргическая система ЦНС, то были проведены *in vitro* испытания его физиологической активности. Оценка кальций-блокирующих свойств соединения проводилась на культуре P₂ – фракции синапсом коры мозга крысят, в которой присутствуют NMDA, каинатные и метаботропные рецепторы. Изученное соединение проявило высокую ингибирующую активность

(18 %) в широком концентрационном интервале 0,1–1 μМ, сравнимую с действием лекарственного препарата сравнения Латрепирдина.

Исследование влияния структуры нового производного γ-карболина на функциональную активность AMPA рецепторов было проведено на одиночных изолированных нейронах Пуркинье, выделенных из мозжечка головного мозга крыс. Добавление в омывающий нейрон раствора изученного соединения приводило к концентрационно-зависимому изменению амплитуды токов. Максимальная позитивная модуляция AMPA рецепторов была достигнута при концентрации вводимого соединения 10⁻⁷ М. Изученное соединение проявило высокую активность в данном тесте (~140 % от контроля).

Растворимость в фармацевтически значимых растворителях

Растворимость изученного соединения была измерена в буферном растворе pH 7,4, 1-октаноле и гексане в интервале температур 293,15–313,15 К (табл. 1). Указанные растворители относятся к фармацевтически значимым: буфер pH 7,4 моделирует среду плазмы крови, 1-октанол своей амфифильностью имитирует липидный слой биологических мембран, гексан используется как растворитель при очистке лекарственных веществ.

Таблица 1. Температурная зависимость растворимости исследуемого соединения *C* (моль·л⁻¹) в буфере pH 7,4, гексане и 1-октаноле

Table 1. Temperature dependences of solubility *C* (mol·L⁻¹) of the studied compound in buffer solution pH 7,4, hexane and 1-octanol

Т/К	Буфер pH 7,4	Гексан	1-октанол
	<i>C</i> ·10 ⁴	<i>C</i> ·10 ³	<i>C</i> ·10 ³
293,15	4,66	2,94	1,63
298,15	5,36	3,39	1,97
303,15	6,19	3,85	2,41
303,15	7,04	4,45	2,87
313,15	8,11	5,05	3,47

На рисунке 2 приведены температурные зависимости растворимости изученного соединения в различных растворителях.

Растворимость органических веществ зависит от их протолитических свойств. Исследован-

ное соединение относится к классу γ-карболинов, имеет тетрациклическое строение и содержит N-акцепторный фрагмент (основной атом N в гетероцикле) и N-донорный фрагмент (кислотная вторичная амино-группа).

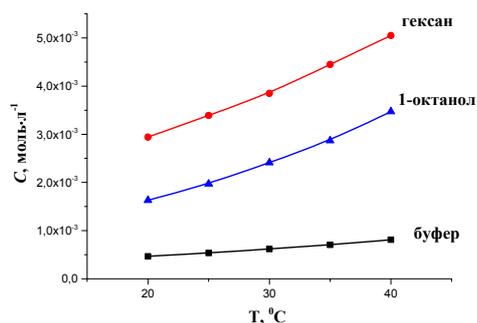


Рис. 2. Температурная зависимость растворимости исследуемого соединения в различных растворителях

Fig. 2. Temperature dependence of solubility of the studied compound in different solvents

Рассчитанное с использованием программы *ACD/Labs Software V.11.02* значение pK_a , равное 9,62, показывает, что изученное вещество является сильной кислотой, что объясняется наличием NH -группы в триазол-тионовом гетероцикле. Содержание ионизированных и неионизированных форм молекул в зависимости от pH водного раствора было определено на основе значений pK_a по уравнению *Henderson-Hasselbach* [12]. Результаты расчетов показали, что молекулы изученного соединения существуют в нейтральной форме при значениях $pH < 7,0$, а при $pH > 7,0$ проявляют себя как кислоты и переходят в депротонированную форму. В использованном нами для измерения растворимости буферном растворе pH 7,4 практически все молекулы вещества находятся в нейтральной форме (99 %), что является одним из факторов, объясняющих низкую водную растворимость синтезированного вещества. Растворимость изученного соединения в гексане почти на порядок выше, чем в буферном растворе, но не превышает величины $3,39 \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$ при стандартной температуре. Поскольку гексан может взаимодействовать с веществами только посредством сил ван-дер-Ваальса, то наличие полярных заместителей и гетероциклов в молекулярной структуре растворенного вещества способствует повышению растворимости за счет образования индуцированных диполей и возникающих вследствие этого сил притяжения между растворенным веществом и растворителем. Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют, что растворимость вещества в

1-октаноле также низкая и имеет значения $(1,63-3,47) \cdot 10^{-3}$ моль·л $^{-1}$ в исследованной температурной области. Установлено, что растворимость соединения в 1-октаноле ниже, чем в гексане. Следовательно, несмотря на наличие активной гидроксигруппы в молекулах 1-октанола и электроотрицательного атома фтора в структуре растворенного вещества, растворимость определяется не возможным образованием водородных связей с растворителем, а неспецифической сольватацией. Отметим, что низкая растворимость изученного соединения в 1-октаноле обусловлена также увеличением ассоциации и мольного объема молекул спирта по сравнению с гексаном, что противодействует внедрению молекул растворенного вещества в свободную полость растворителя.

Моделирование процесса растворения

Для количественного описания зависимости экспериментальной растворимости от температуры были использованы модифицированное уравнение Апелъблата и уравнение Вант-Гоффа. Модифицированное уравнение Апелъблата [13] широко применяется для получения данных по растворимости различных веществ и выражается уравнением:

$$\ln x = A + \frac{B}{T/K} + C \ln(T/K) \quad (1)$$

где x – мольная доля растворенного вещества, T – абсолютная температура, A , B и C – параметры эмпирической модели, полученные в результате оптимизации [14].

Согласно модели Вант-Гоффа, растворимость соединения в исследуемых растворителях рассчитывается по уравнению [15]:

$$\ln x = A + \frac{B}{(T/K)}, \quad (2)$$

где x – мольная доля растворенного вещества, A и B – константы модели, рассчитанные с использованием метода наименьших квадратов.

Растворимость исследуемого соединения в различных растворителях, определенная по уравнениям (1, 2), приведена в табл. 2. Коэффициенты модифицированного уравнения Апелъблата и уравнения Вант-Гоффа, а также значения отклонений экспериментальных и рассчитанных величин растворимости (RAD и $RMSD$) представлены в табл. 3.

Таблица 2. Экспериментальная ($x_{\text{эксп}}$) и расчетная ($x_{\text{расч}}$) растворимость исследуемого соединения в различных растворителях в температурном интервале 293,15–313,15 К

Table 2. Experimental (x_{exp}) and calculated (x_{cal}) solubility of the studied compound in different solvents at the temperatures range of 293,15–313,15 K

Т/К	$x_{\text{эксп}}$	Уравнение Апелблата		Уравнение Вант-Гоффа	
		$x_{\text{расч}}$	RD	$x_{\text{расч}}$	RD
буфер pH 7.4					
293,15	$8,340 \cdot 10^{-6}$	$8,339 \cdot 10^{-6}$	0,0002	$8,314 \cdot 10^{-6}$	0,0031
298,15	$9,600 \cdot 10^{-6}$	$9,614 \cdot 10^{-6}$	-0,0014	$9,627 \cdot 10^{-6}$	-0,0029
303,15	$1,111 \cdot 10^{-6}$	$1,106 \cdot 10^{-6}$	0,0042	$1,109 \cdot 10^{-6}$	0,0014
308,15	$1,266 \cdot 10^{-6}$	$1,271 \cdot 10^{-6}$	-0,0040	$1,273 \cdot 10^{-6}$	-0,0053
313,15	$1,460 \cdot 10^{-6}$	$1,458 \cdot 10^{-6}$	0,0015	$1,453 \cdot 10^{-6}$	0,0045
Гексан					
293,15	$3,850 \cdot 10^{-4}$	$3,854 \cdot 10^{-4}$	-0,0009	$3,840 \cdot 10^{-4}$	0,0026
298,15	$4,470 \cdot 10^{-4}$	$4,456 \cdot 10^{-4}$	0,0030	$4,461 \cdot 10^{-4}$	0,0019
303,15	$5,110 \cdot 10^{-4}$	$5,145 \cdot 10^{-4}$	-0,0068	$5,158 \cdot 10^{-4}$	-0,0093
308,15	$5,960 \cdot 10^{-4}$	$5,930 \cdot 10^{-4}$	0,0051	$5,935 \cdot 10^{-4}$	0,0042
313,15	$6,810 \cdot 10^{-4}$	$6,823 \cdot 10^{-4}$	-0,0020	$6,799 \cdot 10^{-4}$	0,0017
1-октанол					
293,15	$2,510 \cdot 10^{-4}$	$2,505 \cdot 10^{-4}$	0,0022	$2,495 \cdot 10^{-4}$	0,0060
298,15	$3,012 \cdot 10^{-4}$	$3,027 \cdot 10^{-4}$	-0,0058	$3,037 \cdot 10^{-4}$	-0,0082
303,15	$3,680 \cdot 10^{-4}$	$3,653 \cdot 10^{-4}$	0,0072	$3,672 \cdot 10^{-4}$	0,0021
308,15	$4,390 \cdot 10^{-4}$	$4,402 \cdot 10^{-4}$	-0,0028	$4,413 \cdot 10^{-4}$	-0,0053
313,15	$5,299 \cdot 10^{-4}$	$5,296 \cdot 10^{-4}$	0,0007	$5,273 \cdot 10^{-4}$	0,0049

Таблица 3. Параметры модифицированного уравнения Апелблата и уравнения Вант-Гоффа для исследуемого соединения в использованных растворителях

Table 3. Parameters of the modified Apelblat and Van't Hoff equations of the studied compound in the used solvents

Растворитель	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>RMSD</i>	100 <i>RAD</i>
уравнение Апелблата					
буфер pH 7,4 ^c	-75,23	0,6974	10,77	$3,29 \cdot 10^{-8}$	0,22
гексан	-75,05	0,8126	11,3391	$2,23 \cdot 10^{-6}$	0,35
1-октанол	-111,38	1,7430	17,1008	$1,63 \cdot 10^{-6}$	0,37
уравнение Вант-Гоффа					
буфер pH 7,4 ^c	-2,95	-2564,0	-	$4,55 \cdot 10^{-8}$	0,34
гексан	1,08	-2622,2	-	$2,54 \cdot 10^{-6}$	0,31
1-октанол	3,42	-3435,1	-	$2,05 \cdot 10^{-6}$	0,53

Как следует из представленных данных, значения растворимости, полученные с помощью модифицированного уравнения Апелблата и уравнения Вант-Гоффа, демонстрируют хорошее соответствие экспериментальной растворимости при *RAD* менее 1 %. Можно сделать заключение, что использованные модели подходят для корреляции растворимости исследуемого соединения в выб-

ранных растворителях. При этом модифицированное уравнение Апелблата имеет меньшие значения *RMSD* для исследуемых систем.

Коэффициенты активности и избыточные термодинамические функции растворения

Температурная зависимость растворимости вещества описывается следующим термодинамическим соотношением [16]:

$$\ln x = \ln x_{id} - \ln \gamma = \frac{\Delta H_m}{RT} \left[\frac{T - T_m}{T} \right] + \int_{T_m}^T \frac{(C_p^L - C_p^S) dT}{RT^2} - \ln \gamma, \quad (5)$$

где x , x_{id} , γ , T_m , ΔH_m , $\Delta C_p = C_p^L - C_p^S$, R , и T обозначают мольную долю растворенного вещества в растворе, мольную долю растворенного вещества в идеальном растворе, коэффициент активности растворенного вещества, температуру плавления вещества, энтальпию плавления вещества, дифференциальную молярную теплоемкость чистого растворенного вещества, газовую постоянную и экспериментальную температуру. Температура и энтальпия плавления соединения были определены методом дифференциальной сканирующей калориметрии и составили 545,15 К и 41,1 кДж·моль⁻¹, соответственно. Поскольку растворимость или равновесная мольная доля соединения в исследуемых растворителях очень мала, предполагается, что последний член в уравнении (5) равен коэффициенту активности при бесконечном разбавлении $\ln \gamma^\infty$, который может быть выражен уравнением:

$$\ln \gamma^\infty = \frac{H^E}{RT} - \frac{S^E}{R}, \quad (6)$$

где H^E и S^E – избыточная парциальная молярная энтальпия и энтропия.

Поскольку величина ΔC_p может считаться равной нулю, то уравнение (5) упрощается и имеет следующий вид:

$$\ln x_{id} = -\frac{\Delta H_m}{RT_m} \ln \left[\frac{T_m}{T} \right]. \quad (7)$$

На основании данных, приведенных в табл. 4, можно сделать вывод о положительном отклонении от идеальности ($\gamma^\infty > 1,0$) во всех исследованных системах. В буферном растворе значения $\ln \gamma^\infty$ больше 6, а в гексане и октаноле значения этого параметра немного выше 2 и не превышают 2,7. При более высокой температуре коэффициенты активности соединений в буфере немного увеличиваются, в то время как в органических растворителях они уменьшаются, и процесс растворения становится ближе к идеальному. Такая зависимость значений коэффициентов активности веществ от температуры в водных растворах наблюдалась ранее и обусловлена особенностями структуры воды и ее свойств как растворителя [17].

Анализ значений G^E , H^E и TS^E исследуемых систем, представленных в табл. 5, позволяет получить информацию о межмолекулярных взаимодействиях в изученных растворах, а также оценить влияние энтальпийного и энтропийного термов на величину G^E .

Таблица 4. Температурные зависимости идеальной растворимости ($\ln x_{id}$) и коэффициентов активности при бесконечном разбавлении ($\ln \gamma^\infty$) соединения в исследуемых растворителях

Table 4. Temperature dependences of the ideal solubility ($\ln x_{id}$) and activity coefficients at the infinite dilution ($\ln \gamma^\infty$) of the compound in studied solvents

Т/К	$\ln x_{id}$	$\ln \gamma^\infty$		
		буфер рН 7,4	гексан	1-октанол
293,15	-5,630	6,064	2,245	2,660
298,15	-5,477	6,077	2,238	2,631
303,15	-5,326	6,081	2,233	2,581
308,15	-5,178	6,099	2,230	2,553
313,15	-5,032	6,102	2,225	2,510
	<i>A</i>	6,67 ± 0,06	1,94 ± 0,10	0,29 ± 0,11
	<i>B</i>	-179 ± 20	87 ± 6	693 ± 35
	<i>R</i>	0,9805	0,9919	0,9961

Таблица 5. Избыточные термодинамические функции растворимости соединения в выбранных растворителях при 298,15 К

Table 5. Excess thermodynamic solubility functions of the compound in selected solvents at 298,15 K

Растворитель	G^E , кДж·моль ⁻¹	H^E , кДж·моль ⁻¹	TS^E , кДж·моль ⁻¹	S^E , кДж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	^a ζ_H , %	^b ζ_{TS} , %
буфер pH 7,4	15,1 ± 0,3	-1,5 ± 0,2	-16,6	-55,7 ± 2,2	8,3	91,7
гексан	5,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	-4,9	-16,4 ± 0,8	12,5	87,5
1-октанол	6,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	-0,7	-2,3 ± 0,01	89,3	10,7

$$^a\zeta_H = (H^E / (H^E + TS^E)) \cdot 100 \%; \quad ^b\zeta_{TS} = (TS^E / (H^E + TS^E)) \cdot 100 \%$$

Установлено, что основным термодинамическим фактором, ответственным за положительное отклонение от идеальности в водной среде и гексане, является высокое отрицательное значение энтропии: $|H^E| < |TS^E|$. Напротив, в растворе 1-октанола доминирующий вклад в изменение энергии Гиббса растворения вносит энтальпийная составляющая: $|H^E| > |TS^E|$. Энтальпийный (H^E) и энтропийный (TS^E) вклады в энергию Гиббса, приведенные в табл. 5, показывают, что в 1-октаноле энтропийная составляющая незначительна ($TS^E < 11 \%$), а в буфере и гексане этот вклад является определяющим ($> 80 \%$).

Распределение в водно-органической системе

Коэффициент распределения изученного соединения в системе 1-октанол/буфер pH 7,4 равен отношению равновесных молярных концентраций вещества в органической (C_o) и водной (C_w) фазах:

$$P = C_o / C_w. \quad (8)$$

Экспериментально полученные коэффициенты распределения производного приведены в табл. 6. Следует отметить, что эмпирическим путем установленная граница липофильности лекарственных препаратов выражается неравенством: $-0,5 < \log P < 5$ [6] и значение коэффициента распределения полученного соединения входит в этот рекомендуемый интервал. Из этого следует, что синтезированное производное должно иметь хорошую кишечную абсорбцию благодаря оптимальному балансу растворимости и проницаемости путем пассивной диффузии. С повышением температуры коэффициенты распределения возрастают, что свидетельствует об увеличении содержания вещества в октанольной фазе, которая имитирует липидный слой мембран.

Таблица 6. Экспериментальные концентрации и коэффициенты распределения для исследуемого соединения в системе 1-октанол/буфер pH 7,4

Table 6. Experimental concentrations and partition coefficients of the studied compound in the 1-octanol/buffer pH 7,4 system

T (K)	$C_o \cdot 10^4$	$C_w \cdot 10^5$	$\log P$	$x_o \cdot 10^5$	$x_w \cdot 10^7$	$\log P^*$
293,15	1,97	3,74	0,72	3,11	6,74	1,66
298,15	1,99	3,45	0,76	3,15	6,22	1,71
303,15	2,02	3,21	0,80	3,19	5,78	1,74
308,15	2,05	3,05	0,84	3,23	5,27	1,79
313,15	2,07	2,72	0,88	3,27	4,89	1,82

Значения стандартной энергии Гиббса переноса вещества из буферной фазы в органическую были рассчитаны по уравнению:

$$\Delta G^o = -RT \ln P^*, \quad \text{где } P^* = x_o / x_w, \quad (9)$$

где x_o и x_w – мольные доли соединения в водной и октанольной фазах, соответственно.

Энтальпию переноса ΔH^o получали из температурной зависимости коэффициентов распределения:

$$d(\ln P^*)/dT = \Delta H^o / RT^2. \quad (10)$$

Энтропия переноса ΔS^o определена по уравнению:

$$\Delta S^o = (\Delta H^o - \Delta G^o) / T. \quad (11)$$

Рассчитанные на основе экспериментальных данных термодинамические функции переноса соединения в системе 1-октанол / буфер pH 7,4 имели следующие значения: $\Delta G^{\circ} = -9,7$ кДж·моль⁻¹, $\Delta H^{\circ} = 14,2$ кДж·моль⁻¹ и $\Delta S^{\circ} = 23,9$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹. Согласно полученным результатам, значения энергии Гиббса отрицательны, и это свидетельствует о самопроизвольности процесса переноса соединения из водной фазы в органическую среду. Установлено, что значения ΔH° положительны и, следовательно, процесс распределения соединения является эндотермическим, что связано с гидрофобной гидратацией фенильных и алкильных фрагментов молекул изученного соединения. Изменения энтропии также положительны, что указывает на понижение упорядоченности системы в результате переноса вещества.

Мембранная проницаемость

Раствор изученного соединения был приготовлен путем растворения в буфере pH 7,4. Затем 100 мкл раствора помещали в донорные камеры измерительной ячейки. В акцепторных камерах находился раствор фосфатного буфера (600 мкл). Эксперименты по определению проницаемости соединения проводили при комнатной температуре без перемешивания, и ячейки перемещали в лунки, содержащие равные количества свежего буферного раствора, в течение 6 ч. Образцы по 200 мкл из каждого акцепторного отсека переносили в планшеты с УФ-излучением (*Costar*) и определяли концентрацию вещества спектрофотометрически на приборе (*Cary-50*, США). Линейная часть наклона кривой стандартной зависимости кумулятивного количества соединения от времени представляет собой интенсивность потока в установившемся состоянии. Полученные значения плотности потока использовались для расчета коэффициента кажущейся проницаемости.

Эксперименты по исследованию мембранной проницаемости соединения были проведены с использованием искусственных фосфолипидных мембран, которые обладают свойствами лиотропных жидких кристаллов. На начальном этапе было выполнено тестирование сформированных мембран путем определения коэффициента проницаемости кофеина как модельного лекарственного соединения. Эксперимент показал, что коэффициент мембранной проницаемости кофеина хорошо согласуется с литературным значением $12,5 \cdot 10^{-6}$ см·с⁻¹ [11].

В соответствии с разработанной методикой был определен кажущийся коэффициент мембранной проницаемости изученного фторпроизводного триазол-3-тиона через сформированные фосфолипидные мембраны в буфере pH 7,4, имитирующем среду плазмы крови. Установлено, что значение кажущегося коэффициента проницаемости синтезированного производного равно $3,7 \cdot 10^{-7}$ см·с⁻¹, что на порядок ниже, чем у соединения сравнения кофеина.

Выводы

Разработаны методики синтеза и получено новое биоактивное фторпроизводное триазол-3-тиона как потенциальное лекарственное соединение, обладающее нейрокорректирующей активностью. Строение и чистота вещества подтверждены методами ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и элементного анализа. Биологические тесты показали, что изученное соединение может модулировать глутаматиндуцированный захват ионов кальция в синапсомы коры мозга крыс. Кроме того, установлено, что синтезированное производное способно оказывать влияние на функциональную активность AMPA рецепторов.

Методом изотермического насыщения измерена растворимость изученного триазол-3-тиона в фармацевтически значимых растворителях: буферном растворе pH 7,4, гексане и 1-октаноле, в интервале температур 293,15–313,15 К. Показано, что исследуемое производное в указанных растворителях имеет низкую растворимость, которая не превышает значения $5 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹. Уравнения Вант-Гоффа и Апелъблата применены для моделирования изменения растворимости соединения от температуры в указанных растворителях.

Исследована липофильность синтезированного производного и сделано заключение, что вещество должно обладать хорошей кишечной абсорбцией благодаря оптимальному балансу растворимости и проницаемости путем пассивной диффузии. На основе рассчитанных термодинамических функций выполнен анализ влияния энтальпийных и энтропийных факторов на процессы растворения и распределения соединения в использованных растворителях.

Проведены эксперименты по изучению проницаемости соединения через сформированные искусственные фосфолипидные мембраны, обладающие свойствами лиотропных жидких кристаллов. Определено, что проницаемость синтезированного производного достаточна для прохождения через биологические клеточные мембраны организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-43-370016_рег_центр_а).

Список литературы / References

1. Чичёва М. М., Бовина Е. В., Брновицкий Е. В., Устюгов А. А. Разработка нейропротекторных соединений с мультитаргетным механизмом действия на основе гамма-карболинов // *Русский ученый*. 2017. Т. 1, № 1. С. 31–46. [Chicheva M.M., Bovina E.V., Bronovitsky E.V., Ustyugov A.A. Gamma-carbolines as a structural base for the development of neuro-protective compounds with a multi-target mechanism of action-carbolines as a structural base for the development of neuroprotective compounds with a multitarget mechanism of action. *Russian Scientist*, 2017, **1** (1), 31–46 (in Russ.)].
2. Avdeef A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, **59**, 568–590. DOI: 10.1016/j.addr.2007.05.008.
3. Tute M.S. Lipophilicity: A History. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology* / editors V. Pliška, B. Testa, Han van de Waterbeemd. Chichester : John Wiley & Sons, 2008, Ch. 2, 7–26.
4. Sangster J. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. Chichester : John Wiley & Sons, 1997, 170 p.
5. Shinoda W. Permeability across lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Biomembranes*, 2016, **1858** (10), 2254–2265. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.03.032.
6. Kerns E., Di L. Drug like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. New York : Academic Press, 2008, 552 p.
7. Kim E.B., Lockwood N., Chopra M., Guzmán O., Abbott N.L., de Pablo J.J. Interactions of Liquid Crystal-Forming Molecules with Phospholipid Bilayers Studied by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J.*, 2005, **89** (5), 3141–3158. DOI: 10.1529/biophysj.105.065193.
8. Stillwell W. An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function, 2 ed. Elsevier B.V., 2016.
9. Demetzos C., Pippa N. Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs) : a mini-review. *Drug Deliv.*, 2014, **21** (4), 250–257. DOI: 10.3109/10717544.2013.844745.
10. Селиванова Н. М., Губайдуллин А. Т., Галяметдинов Ю. Г. Лиотропные мезофазы на основе биополимера хитозана, уксусной кислоты и неионных ПАВ как системы доставки биоактивных субстанций // *Жидк. крист. и их практич. использ.* 2018. Т. 18, № 3. С. 6–13. [Selivanova N.M., Gubaidullin A.T., Galyametdinov Yu.G. Lyotropic mesophases based on chitosane biopolymer, acetic acid and non-ionic surfactants, as delivery systems of bioactive substances. *Liq. Cryst. and their Appl.*, 2018, **18** (3), 6–13. (in Russ.). DOI:10.18083/LCAppl.2018.3.6].
11. Flaten G.E., Bunjes H., Luthman K., Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier. 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **28**, 336–343. DOI: 10.1016/j.ejps.2006.03.008.
12. Po H.N., Senozan N.M. Henderson–Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *J. Chem. Educ.* 2001, **78**, 1499–1503. DOI: 10.1021/ed078p1499.
13. Apelblat A., Manzurola E. Solubilities of acetylsalicylic, 4-aminosalicylic, 3, 5-dinitrosalicylic, and p-toluic acid, and magnesium-DL-aspartate in water from T = (278 to 348) K. *J. Chem. Thermodyn.* 1999, **31**, 85–91. DOI: 10.1006/jcht.1998.0424.
14. Atkins P., De Paula J. Physical chemistry for the life sciences, eighth ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2006, 590 p.
15. Prausnitz J.M., Lichtenthaler R.N., Gomes de Azevedo E. Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria, second ed. New Jersey : Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1986, 860 p.
16. Stanley I. Chemical and Engineering Thermodynamics, third ed. New York : John Wiley & Sons, 1999, 763 p.
17. Blokhina S., Sharapova A., Ol'khovich M., Perlovich G. Thermodynamic study of aceclofenac solubility, distribution and sublimation. *J. Chem. Thermodynam.*, 2019, **137**, 13–21. DOI: 10.1016/j.jct.2019.05.014.

Поступила 16.03.2021 г.

Received 16.03.2021

Принята 15.04.2021 г.

Accepted 15.04.2021