

В. И. Крылов, С. В. Моисеев, А. А. Кутин, Н. Г. Сахно, О. В. Гунар,
В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БИС-(1-(АДАМАНТАН-1-ИЛ)ЭТИЛ)АМИНА ГИДРОХЛОРИДА

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, 127051, Москва, e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

Идентифицирована ранее не описанная в нормативной документации и литературных источниках примесь субстанции римантадина гидрохлорида. Установлена и подтверждена встречным синтезом структура обнаруженной примеси. Разработан метод синтеза бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амина гидрохлорида в лабораторных условиях, произведена оценка антибактериальной активности полученного соединения.

Ключевые слова: римантадина гидрохлорид; бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорид; синтез; антибактериальная активность.

Римантадин (I) – противовирусный препарат, производное адамантана, обладающий прямым противовирусным действием. Механизм действия I основан на его способности угнетать раннюю стадию специфической репродукции от проникновения вируса в клетку до начальной транскрипции ДНК. Римантадин эффективен в отношении вируса гриппа типа А, вируса клещевого энцефалита [1].

Существует несколько способов получения I [2 – 7]. В настоящее время широкое применение получил метод восстановительного аминирования 1-ацетиладамантана (III) формамидом и муравьиной кислотой по Лейкарту – Валлаху с последующим разложением формильного производного кипячением с соляной кислотой [3]. Полученный I перекристаллизуют из 2-пропанола в присутствии активированного угля [7]. Несмотря на проведенную очистку, целевой продукт может содержать некоторое количество родственных примесей, контроль которых осуществляется при оценке показателей качества субстанции.

При определении посторонних примесей субстанции I производства "Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко., Лтд", Китай, методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием на хроматограмме (рис.1) была обнаружена неидентифицированная примесь, не описанная в нормативной документации и литературных источниках, со временем выхода 7,73 мин, в масс-спектре которой (рис.2) обнаружен ион с молекулярной массой 342,34 Да, который интерпретирован нами как квазимолекулярный ион с брутто-формулой $C_{24}H_{41}N$.

Предположительно структура данной примеси может соответствовать гидрохлориду бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амина (VI) (см. схему синтеза), имеющему аналогичную молекулярную формулу. Образование такого соединения возможно на стадии гидролиза формильного производного при наличии избыточного количества 1-ацетиладамантана.

Нами было сделано предположение, что наличие 2 адамантановых фрагментов в молекуле VI может обуславливать его антибактериальную активность, так

как известно, что производные адамантанов имеют достаточно широкий спектр биологической активности [8].

Цель данной работы – подтверждение состава и строения примеси путем встречного синтеза VI и оценка его антибактериальной активности.

Экспериментальная химическая часть

Регистрацию спектров ЯМР 1H и ^{13}C производили на ЯМР спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 при температуре 300 К в растворе дейтерохлороформа с концентрацией 20 мг/мл. Шкалу химических сдвигов градуировали по отношению к сигналу дейтерированного растворителя.

Масс-спектры получены на хроматографе Agilent Infinity 1260 с масс-селективным детектором Quadropole 6130. Условия хроматографирования: колонка Poroshell 120 EC C-18 50 мм × 4,6 мм × 2,7 мкм; температура колонки 26 °С; подвижная фаза – $CH_3CN + 0,1\% CF_3COOH$ и $H_2O + 0,1\% CF_3COOH$ в соотношении 80:20; скорость потока – 0,400 мл/мин; объем пробы – 0,5 мкл; растворитель – ацетонитрил.

1-(Адамантан-1-ил)этиламин (II). К раствору 10 г (46,4 ммоль) I в 40 мл воды прибавляют раствор 5 г гидроксида натрия в 20 мл воды. Смесь перемешивают при 65 °С в течение 1 ч. Полученную эмульсию экстрагируют 2 порциями хлористого метилена, сушат над сульфатом натрия, фильтруют и на ротонном испарителе при пониженном давлении удаляют растворитель. Выход основания II составляет 7,0 г (84 %).

1-(Адамантан-1-ил)-N-(1-(адамантан-1-ил)этил)-этан-1-имин (IV). Смесь 3,58 г (20 ммоль) основания II и 3,56 г (20 ммоль) 1-ацетиладамантана (III) нагревают при кипении в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры в реакционную массу добавляют 60 мл метилового спирта, выпавшие белые кристаллы фильтруют и сушат до постоянной массы. Выход азометинового производного (IV) составляет 6,21 г (92 %).

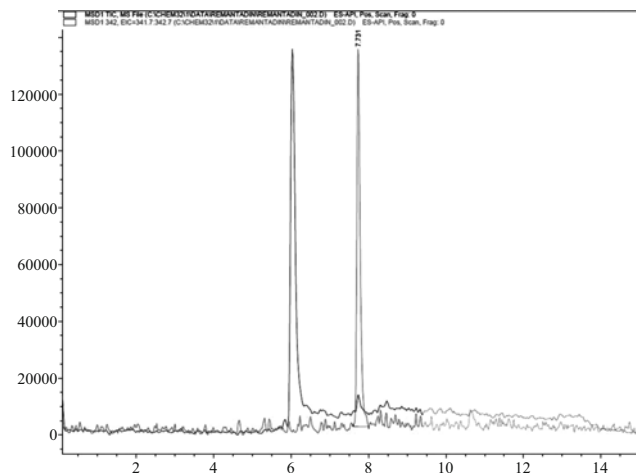


Рис. 1. Хроматограмма испытуемого образца вещества римантадина гидрохлорида.

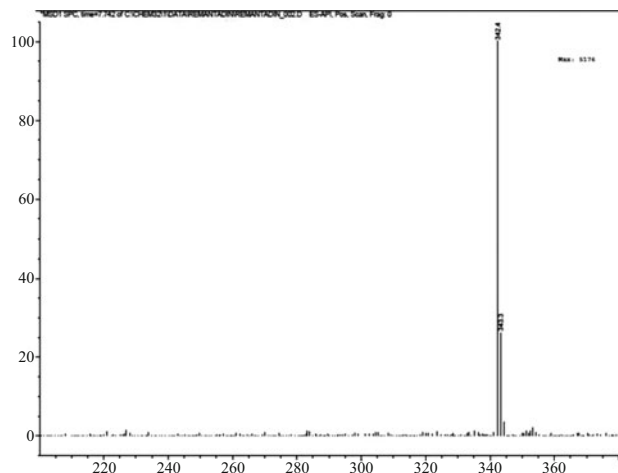


Рис. 2. Масс-спектр примеси образца вещества римантадина гидрохлорида.

бис-(1-(Адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорид (VI). К смеси 6,21 г азометина IV в 100 мл метилового спирта при интенсивном перемешивании порциями прибавляют 6 г боргидрида натрия и перемешивают в течение 3 ч, реакционную массу выливают в 500 мл воды, выпавший осадок фильтруют и сушат, затем растворяют в 50 мл хлороформа и в течение 1 ч пропускают через раствор хлористый водород. Хлороформный раствор упаривают досуха, остаток перекристаллизовывают из 5 мл хлористого метилена, выход 4,5 г (60 %), белые кристаллы с т.пл. 276 °С (разл.). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1,41 (уш.с, 6H, CH_3), 1,72 (уш.с, 12H, 6CH_2), 1,79 (уш.с, 6H, 6CH), 2,09 (уш.с, 6H, 6CH), 2,71 (м, 2H, CH), 7,31 (с, 1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 11,95, 28,16, 35,94, 36,37, 38,50, 67,42. $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N HCl}$.

Экспериментальная биологическая часть

Для определения антибактериальной активности использованы тест-штаммы бактерий *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 10702), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), а также тест-штаммы плесневых и дрожжевых грибов

Candida albicans (ATCC 10231) и *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Питательные среды для определения чувствительности (TSB – для определения активности в отношении бактерий и жидкой среде Сабуро – дрожжевых и плесневых грибов) разливали по 2,0 мл в пробирки. Количество пробирок определяли необходимым диапазоном разведений веществ (7 штук – для 1 микроорганизма).

Готовили разведения образцов 1:10 в соответствующей жидкой питательной среде. После этого подготовленное разведение в количестве 2,0 мл при помощи стерильной пипетки вносили в первую пробирку, содержащую 2,0 мл бульона. Тщательно перемешивали и новой пипеткой переносили 2,0 мл раствора в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 2,0 мл бульона. Эту процедуру повторяли, пока не был приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 2,0 мл бульона удаляли. Таким образом, получали ряд последовательных разведений исследованных соединений, концентрации которых в соседних пробирках отличались в 2 раза: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280. Для каждого микроорганизма был подготовлен отдельный ряд разведений каждого препарата.

Сравнительная оценка антибактериальных свойств римантадина и бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорида

Показатель	Вид микроорганизма						
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
	Римантадина гидрохлорид						
Разведение	1:1280	1:640	1:640	1:640	1:160	1:80	1:80
МПК, мг/мл	<0,78	1,56	1,56	1,56	6,25	12,5	12,5
	бис-(1-(Адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорид						
Разведение	<1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	<1:20	<1:20
МПК, г/мл	>0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	>0,05	>0,05
	Римантадин (98 %) + бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорид (2 %)						
Разведение	>1:1280	1:640	1:640	>1:1280	1:320	1:80	1:80
МПК, мг/мл	<0,78	1,56	1,56	<0,78	3,13	12,5	12,5

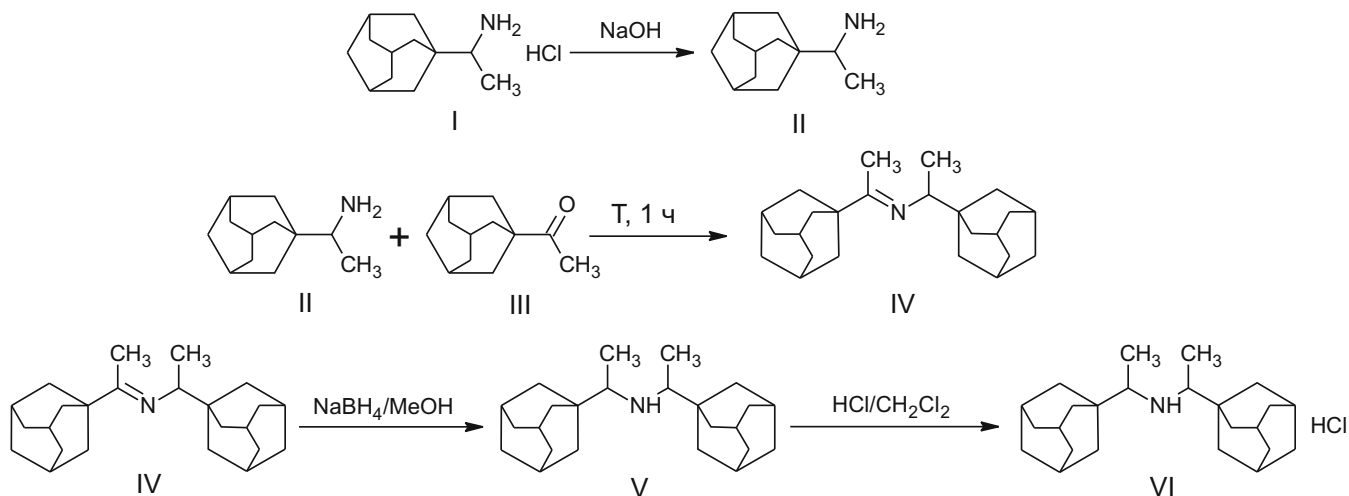


Схема синтеза бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорида (VI).

Приготовление инокулята. 24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на скошенной агаризованной среде (*B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* – на среде TSA, *C. albicans* – на среде SDCA), смывали стерильным раствором натрия хлорида 0,9 %.

При помощи стандартного образца мутности ВОЗ (10 ЕД) готовили микробные взвеси с концентрацией клеток 10^9 КОЕ/мл (для культур *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) и 10^7 КОЕ/мл (для *B. cereus*, *C. albicans*).

Путем последовательных десятикратных разведений доводили концентрацию клеток в суспензии до 10^4 КОЕ/мл.

Контаминация образцов. В подготовленные разведения образцов вносили по 0,2 мл суспензий микроорганизмов (из расчета, чтобы в 1 мл разведения препарата содержалось 10^3 КОЕ микроорганизма). Посевы инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 24 – 72 ч.

Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. В случае появления помутнения, образования пленки или придонного роста, отмечали первое разведение, в котором этот рост наблюдался.

Результаты и их обсуждение

По известным препаративным методикам, представленным на схеме, осуществлен синтез соединения VI.

Основание II, полученное после обработки гидрохлорида I водным раствором едкого натра, вовлекали во взаимодействие с III. Полученный азометин IV восстанавливали боргидридом натрия до соответствующего амина V и переводили его в гидрохлорид, пропуская сухой хлористый водород через раствор амина V в хлористом метиле. Выпавший осадок гидрохлорида VI перекристаллизовывали из хлористого метилена. Структура гидрохлорида VI подтверждена методами ВЭЖХ и ЯМР спектроскопии ^1H и ^{13}C . На хрома-

тограмме пик, соответствующий VI, имеет время выхода 7,73 мин, идентичное времени выхода обнаруженной примеси в субстанции I.

Антимикробную активность VI определяли, сравнивая её с активностью I и смеси I с VI. Испытания заключались в определении минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для определения МПК заданные концентрации вещества вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Сравнительная оценка антибактериальных свойств соединений I и VI и их смеси приведена в таблице.

Из данных таблицы видно, что бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорид обладает незначительной активностью в отношении исследованных микроорганизмов.

Данные по активности субстанции I и смеси веществ I и VI аналогичны и, очевидно, обусловлены действием активного вещества.

Таким образом, идентифицирована примесь в известном противовирусном препарате римантадине гидрохлориде и установлено, что гидрохлорид бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин е обладает незначительной противомикробной активностью и не оказывает существенного влияния на антибактериальные свойства субстанции римантадина гидрохлорида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Ю. Мидруев, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев и др., *Разработка и регистрация лек. средств*, 6(1), 120 – 124 (2014).
2. Патент США US 3352916 (1967); https://www.surechembl.org/document/US-3352916-A/?query=&root-search=bd87ffa72df41bc59bc62669e5895cd0&root_page=1.
3. Патент США US 3852352 (1974); https://www.surechembl.org/document/US-3852352-A/?query=&root-search=16e48985b0578eea5b7a1587e0a2f26b&root_page=1.
4. Патент США US 4551552 (1985); https://www.surechembl.org/document/US-4551552-A/?query=&root-search=206be43601a08278d94cc01c250d920b&root_page=1.

5. Европейский патент EP0178668 (1986); https://www.surechembl.org/document/EP-0178668-A2/?query=&root_search=66241843bf6f0cff3704146e31eb6c9d&root_page=1.
6. Патент России 2152924 (1998); <http://ru-patent.info/21/50-54/2152924.html>.
7. Л. Н. Яхонтов, Р. Г. Глушков, *Синтетические лекарственные средства*, Медицина, Москва (1983), сс. 54 – 57.
8. Е. В. Кузнецова, А. К. Ярош, Т. А. Бухтиарова, *Ж. НАМН України*, **19**(1), 12 – 22 (2013).

Поступила 24.04.15

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BIS(1-(ADAMANTAN-1-YL)ETHYL)AMINE HYDROCHLORIDE

V. I. Krylov, S. V. Moiseev*, A. A. Kutin, N. G. Sakhno, O. V. Gunar,
V. A. Yashkir, and V. A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health
of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

* e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

We have identified an impurity in rimantadine hydrochloride substance, which was previously not described in the standard documentation and available literature. The impurity structure has been established and confirmed by direct synthesis. A method has been developed for the synthesis of bis(1-(adamantane-1-yl) ethyl) amine hydrochloride under laboratory conditions the antibacterial activity of the obtained compound has been estimated.

Keywords: rimantadine hydrochloride; bis(1-(adamantan-1-yl)ethyl)amine hydrochloride; impurity; synthesis; antibacterial activity.