

Г. Л. Арутюнян, А. Д. Арутюнян, К. А. Геворкян, Р. В. Пароникян,
Г. М. Степанян, С. П. Гаспарян*

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИГИДРОХЛОРИДОВ АЗААДАМАНТАНОВ, СОДЕРЖАЩИХ 8-ГИДРОКСИХИНОЛИНОВЫЙ ФРАГМЕНТ, У МЫШЕЙ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОЙ И ДИЗЕНТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА, Армения, Ереван.
* e-mail: g_sahak@yahoo.com

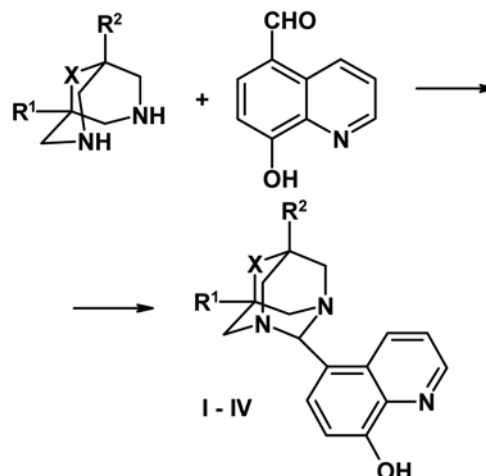
Осуществлен синтез новых производных азаадамантанов, содержащих 8-гидроксихинолиновый фрагмент, и изучена их антибактериальная активность. Исследования показали, что полученные соединения обладают высокой антибактериальной активностью *in vitro*. Дигидрохлориды 6-оксо-5,7-диэтил- и 5,7-диметил-2-(8'-гидроксихинолил-5')-1,3-диазаадамантанов проявляют лечебное действие при стафилококковой и дизентерийной инфекции у мышей.

Ключевые слова: 1,3-диазаадамантан; 1,3,5-триазаадамантан; 8-гидроксихинолин; азометины; основания Шиффа; конденсация; антибактериальная активность.

Одним из направлений поиска новых антибактериальных средств является химическая модификация известных препаратов. Применяемые в медицинской практике препараты 8-оксихинолинового ряда (энтеросептол, интестопан, мексаформ, 5-нитро-8-гидроксихинолин (5-НОК) и др.) обладают антибактериальной, противопаразитарной и противогрибковой активностью [1]. Вместе с тем многие используемые препараты токсичны, недостаточно избирательны, подвержены инактивации в организме и проявляют побочные эффекты.

Известно, что введение в молекулу физиологически активного вещества объёмистого и липофильного адамантанового фрагмента приводит к существенному изменению характера и величины биологической активности. Исследованиями антибактериальной активности различных производных 1,3-диазаадамантана выявлен ряд соединений, угнетающих рост как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [2], а производные 1,3,5-триазаадамантанового ряда, в частности, 7-амино-1,3,5-триазаадамантан, проявляют противовирусную активность [3].

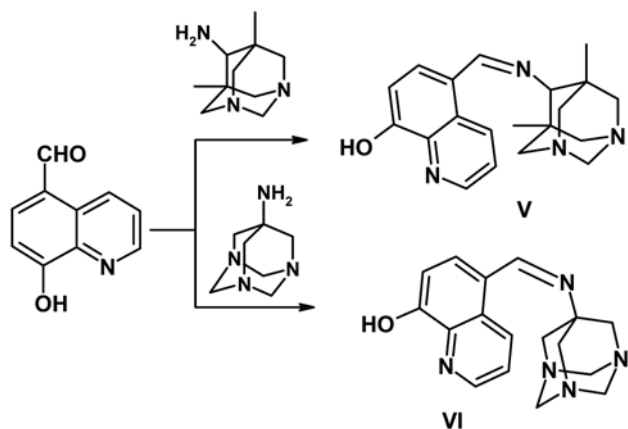
В контексте вышесказанного представляло интерес синтезировать и исследовать антибактериальную активность соединений, состоящих из азаадамантановых и 8-гидроксихинолиновых фармакофорных фрагментов. В этой связи взаимодействием 1,5-диалкил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов [4] с 8-гидроксихинолин-5-альдегидом [5] нами осуществлен синтез 5,7-диалкил-1,3-диазаадамантанов I – IV. По структуре эти соединения представляют собой 5-НОК, в котором нитрогруппа заменена на диазаадамантановый фрагмент.



I: X = CH₂, R¹ = R² = CH₃; II: X = CO, R¹ = R² = CH₃; III: X = CO, R¹ = R² = C₂H₅; IV: X = CO, R¹ = CH₃, R² = n-C₃H₇

К другому типу соединений относятся азометины (основания Шиффа) V и VI, содержащих также азаадамантановый и 8-гидроксихинолиновый фрагменты. Эти соединения нами синтезированы конденсацией 8-гидроксихинолин-5-альдегида с 6-амино-5,7-диметил-1,3-диаза- [2] и 7-амино-1,3,5-триазаадамантанам [3].

Строение синтезированных соединений подтверждено результатами элементного анализа, ИК- и ЯМР ¹H спектров (табл. 2). В спектрах ЯМР ¹H соединений I – V сигналы аксиальных и экваториальных протонов 4 метиленовых групп 1,3-диазаадамантанового кольца проявляются в виде 4 дуплетов (две АВ-системы) в области 3,66 – 2,48 м.д. В спектре ЯМР ¹H соединения VI сигналы 6 протонов 3 метиленовых групп CCH₂N фрагмента 1,3,5-триазаадамантанового кольца образуют синглет в области 3,43 м.д., а протоны 3 метиленаминовых групп (NCH₂N) проявляются в виде 2 дуплетов (АВ-система) в области 4,01 и 4,38 м.д.



С целью изучения биологических свойств синтезированных соединения **I – VI** переведены в водорастворимые дигидрохлориды.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры сняты в вазелиновом масле на спектрофотометре “FT-IR NEXUS”, спектры ЯМР ^1H — на приборе Varian Mercury-300 (300 МГц) в DMSO-d_6 , внутренний стандарт — ТМС. Ход реакции и чистоту веществ контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системах: пропанол — вода, 7:3 (А); бутанол — нас. NH_3 (Б); проявитель — нингидрин. Физико-химические и спектральные характеристики синтезированных соединений представлены в табл. 1 и 2.

Общая методика синтеза 2-(8'-гидроксинолил-5')-1,3-диазаадамантанов I–IV. К раствору 5 ммоль соответствующего 3,7-диазабicyclo[3.3.1]нонана в 20 мл этанола прибавляют 0,87 г (5 ммоль) 8-гидроксихинолин-5-альдегида и кипятят 5 ч, оставляют на ночь. Образовавшийся осадок фильтруют и перекристаллизовывают из этанола.

5,7-Диметил-6-[5'-(8'-гидрокси)хинолилметилимино]-1,3-диазаадамантан (V). К раствору 0,9 г (5 ммоль) 6-амино-5,7-диметил-1,3-диазаадамантана в 50 мл абсолютного толуола прибавляют 0,87 г (5 ммоль) 8-гидроксихинолин-5-альдегида и 0,002 г *n*-толуолсульфокислоты и кипятят 10 ч в колбе с вододетальной насадкой. Раствор фильтруют и фильтрат перегоняют в вакууме, полученный остаток перекристаллизовывают из абсолютного этанола.

Таблица 1

Физико-химические характеристики синтезированных соединений **I – VI**

Соединение	Выход, %	$T_{\text{пл}}$, °С	R_f	Молекулярная формула	$T_{\text{пл}}$ дигидрохлоридов, °С
I	77	252 – 253	0,62 (А)	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$	245 – 246
II	71	251 – 252	0,56 (А)	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$	253 – 254
III	57	204 – 205	0,62 (Б)	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$	198 – 200
IV	80	264 – 265	0,50 (А)	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$	250 (с субл.)
V	48	262 – 264	0,25 (Б)	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$	260 – 261
VI	70	270 – 271	0,30 (Б)	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$	270 – 272

7-[5'-(8'-Гидрокси)хинолилметилимино]-1,3,5-триазаадамантан (VI). Получают аналогично **V** из 0,8 г (5 ммоль) 7-амино-1,3,5-триазаадамантана, 0,87 г (5 ммоль) 8-гидроксихинолин-5-альдегида и 0,002 г *n*-толуолсульфокислоты в 50 мл абсолютного толуола. Перекристаллизовывают из абсолютного толуола.

Общая методика получения дигидрохлоридов I – VI. Растворяют 1 г соединения в 15 мл абсолютного этанола и медленно прикапывают эфирный раствор хлористого водорода до кислой реакции. Осадок фильтруют, промывают 4 – 5 раз абсолютным эфиром до нейтральной реакции, сушат и перекристаллизовывают из абсолютного этанола (табл. 1).

Экспериментальная биологическая часть

Антибактериальную активность дигидрохлоридов соединений **I – VI** изучали методами “диффузии в агаре” и серийных разведений в мясопептонном бульоне (рН 7,2 – 7,4) при бактериальной нагрузке 20 млн микробных тел на 1 мл среды [6, 7]. Два наиболее активных соединения изучали также методом генерализованной инфекции белых мышей [8].

При методе “диффузии в агаре” в качестве тест-объектов использовали грамположительные стафилококки (*Staphylococcus aureus* 209p, 1, 25923, 5, 6832) и грамотрицательные штаммы (*Sh. flexneri* 6858, *E. coli*, *S. typhi* 91120-90, *E. typhi*-79). Соединения испытывали в концентрации 1:20, растворяя их в физиологическом растворе. Учет результатов проводили по диаметру (d , мм) зон отсутствия роста микроорганизмов на месте нанесения соединений (0,1 мл) после суточного выращивания тест-культур в термостате при 37 °С. Опыты повторялись не менее 3 раз. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента — Фишера.

В опытах серийного разведения использовали штаммы *Staphylococcus aureus* 209p и *Sh. flexneri* 6858. На каждый подопытный микроорганизм составляли ряды по 7 – 8 пробирок, содержащих питательную среду с различными концентрациями испытуемых веществ. Пробирки засеивали одинаковым количеством бактериальной взвеси, приготовленной из 18-часовой культуры. Результаты опыта учитывали по интенсивности роста микробов после 20 – 24-часовой инкубации в термостате при 37 °С. В качестве положительного контроля использовали 5-НОК (фирмы Лек ДД, Веровшакова 57, Любляна, Словения, лекарственная форма в таблетках, с учетом количества вещества) [1].

Опыты для определения химиотерапевтических свойств проводили на белых беспородных мышках обоего пола массой 17 – 18 г, а для определения острой токсичности — на мышках массой 19 – 21 г. Всего использовано 95 мышей.

Острую токсичность веществ определяли при однократном пероральном введении [7]. Вещества вводили животным в 3 дозах — 1250, 900 и 650 мг/кг. Каждую дозу вводили 6 мышам обоего пола. Установлено, что LD_{100} дигидрохлоридов соединений **I** и **III** составляет

Спектральные характеристики синтезированных соединений I – VI

Соединение	ЯМР ¹ H спектры (ДМСО), химические сдвиги, δ, м.д.		ИК-спектр, ν _{max} , см ⁻¹
	протоны азаадамантановых групп	протоны хинолиновой группы	
I	0,49 (с, 3H, CH ₃), 0,75 (с, 3H, CH ₃), 1,51 (с, 2H, CH ₂), 2,48 и 2,93 (два д, J _{AB} 12,8 Гц, по 2H, NCH ₂), 3,00 и 3,26 (два д, J _{AB} 12,5 Гц, по 2H, NCH ₂), 5,20 (с, 1H, NCHN)	7,01 (д, J 8,1 Гц, 1H, 7'-H), 7,36 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1, 1H, 3'-H), 7,67 (дд, J ₁ 8,1 Гц, J ₂ 1,4 Гц, 1H, 6'-H), 8,72 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6, 1H, 2'-H), 8,77 (ш, 1H, OH), 9,36 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6, 1H, 4'-H)	3306 (OH), 1617, 1578, 1505 (аром.)
II	0,68 (с, 3H, CH ₃), 0,94 (с, 3H, CH ₃), 2,79 и 3,32 (два д, J _{AB} 12,9 Гц, по 2H, NCH ₂), 3,25 и 3,66 (два д, J _{AB} 13,0 Гц, по 2H, NCH ₂), 5,52 (с, 1H, NCHN)	7,05 (д, J 8,1 Гц, 1H, 7'-H), 7,40 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1, 1H, 3'-H), 7,74 (дд, J ₁ 8,1 Гц, J ₂ 1,3 Гц, 1H, 6'-H), 8,75 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 2'-H), 8,90 (ш, 1H, OH), 9,32 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 4'-H)	3336 (OH), 1704 (CO), 1580, 1505 (аром.)
III	0,72 (т, J 7,5 Гц, 3H, CH ₃), 0,95 (т, J 7,5 Гц, 3H, CH ₃), 1,18 (кв, J 7,5 Гц, 2H, CH ₂), 1,47 (кв, J 7,5 Гц, 2H, CH ₂), 2,82 и 3,31 (два д, J _{AB} 12,9 Гц, по 2H, CH ₂ N), 3,26 и 3,66 (два д, J _{AB} 13,0 Гц, по 2H, CH ₂ N), 5,51 (с, 1H, NCHN)	7,06 (д, J 8,1 Гц, 1H, 7'-H), 7,40 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1 Гц, 1H, 3'-H), 7,74 (дд, J ₁ 8,1 Гц, J ₂ 1,3 Гц, 1H, 6'-H), 8,76 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 2'-H), 8,89 (ш, 1H, OH), 9,32 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 4'-H)	3336 (OH), 1696 (CO), 1580, 1505 (аром.)
IV	0,81 (т, J 6,4 Гц, 3H, CH ₃), 0,93 (с, 3H, CH ₃), 1,05 – 1,2 (м, 4H, CH ₂ CH ₂), 2,82 и 3,33 (два д, J _{AB} 12,9 Гц, по 2H, NCH ₂), 3,23 и 3,65 (два д, J _{AB} 13,0 Гц, по 2H, NCH ₂), 5,52 (с, 1H, NCHN)	7,06 (д, J 8,1 Гц, 1H, 7'-H), 7,40 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1 Гц, 1H, 3'-H), 7,74 (дд, J ₁ 8,1 Гц, J ₂ 1,1 Гц, 1H, 6'-H), 8,76 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 2'-H), 8,88 (ш, 1H, OH), 9,32 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 4'-H)	3334 (OH), 1693 (CO), 1580, 1500 (аром.)
V	0,46 (с, 6H, 2CH ₃), 2,72 и 2,97 (два д, J _{AB} 12,6 Гц, по 2H, NCH ₂), 2,85 и 3,42 (два д, J _{AB} 12,8 Гц, по 2H, NCH ₂), 2,89 (с, 1H, NCH), 3,87 (с, 2H, NCH ₂ N)	7,10 (д, J 8,0 Гц, 1H, 7'-H), 7,62 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1 Гц, 1H, 3'-H), 7,69 (д, J ₁ 8,0 Гц, 1H, 6'-H), 8,52 (с, 1H, CH=N), 8,86 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 2'-H), 9,60 (ш, 1H, OH), 9,86 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 4'-H)	1630 (C=N), 1605, 1569, 1505 (аром.)
VI	3,43 (с, 6H, NCH ₂), 4,01 и 4,38 (два д, J _{AB} 12,4 Гц, 3Ha и 3He, NCH ₂ N)	7,10 (д, J 8,0 Гц, 1H, 7'-H), 7,55 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 4,1 Гц, 1H, 3'-H), 7,75 (д, J ₁ 8,0 Гц, 1H, 6'-H), 8,57 (с, 1H, CH=N), 8,83 (дд, J ₁ 4,1 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 2'-H), 9,32 (ш, 1H, OH), 9,80 (дд, J ₁ 8,7 Гц, J ₂ 1,6 Гц, 1H, 4'-H)	1633 (C=N), 1600, 1570, 1500 (аром.)

1250 мг/кг, МПД — 625 – 650 мг/кг, а для 5-НОК — 750 и 390 мг/кг, соответственно.

Химиотерапевтическое действие соединений изучали при экспериментальной стафилококковой и дизентерийной инфекции белых мышей. В опытах использовали штаммы *Staphylococcus aureus* 6832 и *Sh. flexneri* 6858. Инфекцию вызывали внутрибрюшинным введением суточной агаровой культуры тест-микроба в виде взвеси в физиологическом растворе в объеме 1 мл. Использовали дозу, вызывающую 100 % гибель контрольных животных через 24 – 48 ч после инфицирования. Соединения вводили перорально одновременно с заражением в дозе 1/2 от МПД (300 мг/кг) в объеме 0,5 мл. Животные находились под наблюдением в течении 10 сут. Оценку активности

проводили по величине суммарной продолжительности жизни мышей, выраженной в мышеднях и в процентах по отношению к максимально возможной продолжительности жизни в данной группе животных в течение наблюдаемого срока. В идентичных условиях был испытан также контрольный препарат 5-НОК в дозе 200 мг/кг.

Результаты, полученные при методе “диффузии в агаре”, показывают, что все испытуемые соединения проявляют высокую антибактериальную активность. Они угнетают рост микроорганизмов в зоне диаметром 25 – 38 мм, при этом мало отличаются как между собой, так и по действию на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы (табл. 3).

Антибактериальная активность дигидрохлоридов соединений I – VI

Соединение	Величина диаметра зоны угнетения роста микроорганизмов, мм								
	<i>St. aureus</i>					<i>Sh. flexneri</i> 6858	<i>E. coli</i> 0-55	<i>S. typhi</i> 91120-90	<i>E. typhi</i> 79
	209p	1	25923	5	6832				
I	32 ± 1,5	32 ± 2,0	31 ± 2,0	28 ± 2,0	29 ± 1,0	25 ± 0,5	25 ± 1,0	32 ± 2,0	25 ± 1,0
II	34 ± 2,0	34 ± 1,7	32 ± 2,0	30 ± 2,0	30 ± 2,0	25 ± 0,6	25 ± 0,5	26 ± 1,0	27 ± 1,0
III	38 ± 2,0	36 ± 2,5	31 ± 1,5	32 ± 2,0	34 ± 2,5	40 ± 2,0	40 ± 2,0	35 ± 2,0	30 ± 2,0
IV	30 ± 2,5	30 ± 2,0	30 ± 1,7	32 ± 2,0	30 ± 2,0	34 ± 2,0	34 ± 2,0	33 ± 1,0	32 ± 1,0
V	34 ± 2,5	34 ± 1,5	30 ± 2,0	30 ± 1,7	32 ± 2,0	40 ± 2,0	38 ± 2,0	33 ± 1,8	30 ± 1,0
VI	32 ± 1,0	32 ± 2,0	30 ± 0,5	30 ± 1,8	30 ± 1,0	38 ± 1,8	38 ± 1,8	35 ± 2,0	31 ± 2,0
5-НОК	22 ± 1,5	20 ± 1,5	32 ± 0,6	23 ± 1,0	25 ± 1,0	28 ± 1,8	28 ± 1,5	33 ± 2,0	28 ± 1,8

Соединения	МПК, мкг/мл	
	<i>St. aureus</i> 209p	<i>Sh. flexneri</i> 6858
I	7,8	15,6
II	31,2	31,2
III	15,6	31,2
IV	31,2	31,2
V	62,5	125
VI	62,5	125
5-НОК	62,5	125

Исследования методом серийных разведений показали, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) дигидрохлоридов соединений I – IV составляет 7,8 – 31,2 мкг/мл, а дигидрохлориды соединений V и VI по МПК не отличаются от контрольного препарата 5-НОК (табл. 4). Среди изученных веществ наиболее низким МПК обладают дигидрохлориды соединений I и III (7,8 – 15,6 мкг/мл). Указанные соединения отобраны для исследования в химиотерапевтических экспериментах.

Установлено, что абсолютно смертельная доза (ЛД₁₀₀) дигидрохлоридов соединений I и III составляет 1250 мг/кг, а максимально переносимая доза (МПД) — 625 – 650 мг/кг. Эти соединения по сравнению с 5-НОК (ЛД₁₀₀ = 750 мг/кг) малотоксичны.

Показано, что исследуемые соединения при однократном введении внутрь при стафилококковой инфекции обладают лечебным действием (табл. 5). Они повышают продолжительность жизни зараженных животных на 52 – 54 %, несколько уступая контрольному препарату — 5-НОК (63 %). Противодизентерийное действие соединений выражено слабее (42 – 47 %). На этой модели 5-НОК продлевает жизнь зараженных животных на 55 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены соединения, обладающие высокой антибактериальной активностью *in vitro*, а из них дигидрохлориды соединений I и III проявляют выраженное

Штамм микроорганизма	Соединение	Доза, мг/кг	Количество животных	Выжило	Суммарная продолжительность жизни животных		
					абсолютная*	%	p
<i>Staphylococcus aureus</i> 6832	I	300	10	5	52/100	52	< 0,01
	III	300	10	5	54/100	54	< 0,01
	5-НОК	200	10	6	63/100	63	< 0,01
	Контроль	-	5	-	-	-	-
<i>St. flexneri</i> 6858	I	300	10	4	42/100	42	< 0,03
	III	300	10	4	47/100	47	< 0,03
	5-НОК	200	10	5	55/100	55	< 0,01
	Контроль	-	5	-	2/50	4	-

* Числитель — число мыш-дней в данной группе. Знаменатель — максимально возможное число мыш-дней при наблюдении в течение 10 сут.

лечебное действие при стафилококковой и дизентерийной инфекции мышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. М. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2007), сс. 840 – 841.
2. Г. Л. Арутюнян, Р. В. Пароникян, К. А. Геворкян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **42**(1), 20 – 23 (2008).
3. Патент США 3301854, *Chem. Abstr.*, **67**, 2193h (1967).
4. Г. Л. Арутюнян, К. А. Геворкян, М. А. Манукян, *Химия гетероцикл. соед.*, № 10, 1548 – 1555 (2007).
5. A. Goswami, A. K. Singha, B. Venkataramanib, *Talanta*, **60**, 1141 – 1154 (2003).
6. Н. С. Егоров, *Основы учения об антибиотиках*, Высшая школа, Москва (1979), с. 179.
7. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К., Москва (2012), сс. 509 – 525, сс. 640 – 654.
8. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971), сс. 109 – 114.

Поступила 22.02.19

SYNTHESIS OF DIHYDROCHLORIDES OF AZAADAMANTANES CONTAINING 8-HYDROXYQUINOLINE FRAGMENTS AND STUDY OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN MICE WITH DYSENTERY AND STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS

G. L. Harutyunyan¹, A. D. Harutyunyan¹, K. A. Gevorkyan¹, R. V. Paronikyan¹, H. M. Stepanyan¹, and S. P. Gasparyan^{1*}

¹ Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Academy of Sciences of Armenia, 0014 Yerevan, 375014 Armenia

* e-mail: g_sahak@yahoo.com

New azaadamantane derivatives containing 8-hydroxyquinoline fragment were synthesized and their antibacterial activity was studied. It was established that the synthesized compounds exhibited high antibacterial activity *in vitro*. In particular, dihydrochlorides of 6-oxo-5,7-diethyl- and 5,7-dimethyl-2-(8'-hydroxyquinol-5'-yl)-1,3-diazaadamantanes showed therapeutic effect in mice with dysentery and staphylococcal infections.

Keywords: 1,3-diazaadamantane; 1,3,5-triazaadamantane; 8-hydroxyquinoline; azomethines; Schiff bases; condensation; antibacterial activity.