

УДК 615.21

**СИНТЕЗ И ПСИХОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЕЙ
N-(4-ГИДРОКСИБЕНЗОИЛ)ГЛИЦИНА
И N-(4-АЦЕТОКСИБЕНЗОИЛ)ГЛИЦИНА**

Брель А.К., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., Родина Н.В.

*ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»,
Волгоград, e-mail: svlisina@gmail.com*

Получены N-(4-гидроксибензоил)глицин и N-(4-ацетоксибензоил)глицин и их калиевая, литиевая и натриевая соли. Исследовано влияние растворителя на выход N-(4-гидроксибензоил)глицина. Калиевая, натриевая и литиевая соли получены путем взаимодействия исходного амида с этилатом или фенолята натрия или калия и гидроксидом лития в среде бензола. Структура полученных соединений была подтверждена данными ИК- и ПМР-спектроскопии. Изучена психотропная активность синтезированных солей и оценена острая токсичность. Наибольшую активность продемонстрировал N-(4-ацетоксибензоил)глицинат лития. Его введение приводило к проявлению выраженного антиамнестического и транквилизирующего действия в сочетании с анальгетической активностью. Из сравнения доз, в которых N-(4-ацетоксибензоил)глицинат лития проявляет психотропное действие (10 мг/кг) с LD_{50} (3751.11 мг/кг), можно заключить, что препарат обладает широким диапазоном терапевтического действия и низкой токсичностью.

Ключевые слова: 4-гидроксибензойная кислота, глицин, ацилирование, N-(4-гидроксибензоил)глицин психотропная активность, острая токсичность

**SYNTHESIS AND BIOACTIVITY OF N-(4-HYDROXYBENZOYL)GLYCINE
AND N-(4-ACETOXYBENZOYL)GLYCINE SALTS**

Brel A.K., Lisina S.V., Budaeva Y.N., Rodina N.V.

Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: svlisina@gmail.com

N-(4-hydroxybenzoyl)glycine has been synthesized by N-acylation of glycine in polar solvents. Effect of solvent on yield of N-(4-hydroxybenzoyl)glycine has been monitored. Salts of N-(4-hydroxybenzoyl)glycine and its acetylated derivative – N-(4-acetoxybenzoyl)glycine – have been synthesized by the reaction of an amide with sodium/potassium phenolate or lithium hydroxide in inert solvent. The structure of synthesized products has been proved with IR and ¹H NMR spectroscopy. The present study has been carried out to evaluate acute toxicity and psychotropic activity. The leader – lithium N-(4-acetoxybenzoyl)glycinate – has demonstrated antiamnesic and antianxiety activities with analgesic action. The results of psychotropic activity reveal that lithium N-(4-acetoxybenzoyl)glycinate possesses significant psychotropic activity and low acute toxicity (LD_{50} 3751.11 mg/kg). In addition, our present investigation shows that the salt can create potent analgesic compounds.

Keywords: 4-hydroxybenzoic acid, glycine, acylation, N-(4-hydroxybenzoyl)glycine, psychotropic activity, acute toxicity

Производные 2-гидроксибензойной (салициловой) кислоты демонстрируют различные виды фармакологической активности: жаропонижающую, седативную, противосудорожную и значительную желчегонную активность [1]. Эфиры 4-гидроксибензойной кислоты (парабены) применяются в промышленности в качестве консервантов, проксиметакан (2-(диэтиламино)этиловый эфир 3-амино-4-пропоксибензойной кислоты) местноанестезирующее [4], нифуроксазид (гидразид [(5-нитро-2-фуранил)метил]-4-гидроксибензойной кислоты) – антибактериальное средство – блокирует дегидрогеназы и угнетает дыхательные цепи, цикл трикарбоновых кислот и ряд других биохимических процессов в микробной клетке, разрушает микробную стенку или цитоплазматическую мембрану, снижает продукцию токсинов микроорганизмами [3]. Глицин (аминоуксусная кислота) как средство, повышающее умственную работоспособность и уменьшающее психоэмоциональное напряжение [3]. N-(4-гидроксибензоил)гли-

цин и его производные являются потенциальными веществами, которые могут быть использованы для лечения раковых заболеваний и синтеза новейших инсектицидов. Производные N-(4-гидроксибензоил)глицина специфично связываются с ферментом РНМ (Peptidyl α -hydroxylating monoxygenase), который *in vivo* регулирует биосинтез α -амидированных белковых гормонов млекопитающих и насекомых [9]. Производные 4-гидроксигиппуровой кислоты демонстрируют значительную противовоспалительную активность [8] и снижает апоптоз гранулоцитов [10]. Таким образом, спектр активности производных оксибензойных кислот далеко не исчерпан. Целью работы является синтез новых производных оксибензойных кислот с широким спектром биологического действия в сочетании с низкой токсичностью и меньшим побочным эффектом.

Материалы и методы исследования

N-(4-гидроксибензоил)глицин был получен путем взаимодействия хлорангидрида 4-гидроксибен-

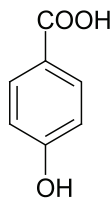
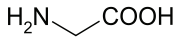
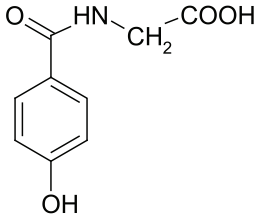
зойной кислоты с глицином. В качестве основания, связывающего образующийся хлороводород, использовалась гидроокись натрия. Для определения оптимальных условий протекания реакций, обеспечивающих высокий выход амида, в работе использовались две методики получения амидов карбоновых кислот:

- 1) в водном растворе NaOH;
- 2) в водно-органическом растворителе (вода и N,N-диметилформамид (DMFA) в соотношении 1:3) в присутствии NaOH (табл. 1). Как показано

в табл. 1, более высокий выход целевого амида был в водной среде. Возможно, влияние растворителя на скорость реакции ацилирования связано со специфической сольватацией функциональных групп, участвующих в реакции, что приводит к образованию молекулярных комплексов и определяет их реакционную способность. N-(4-ацетоксибензоил)глицин получали ацилированием N-(4-гидроксибензоил)глицина по известной методике [7]. Структура полученных соединений была подтверждена данными ИК и ЯМР ¹H спектроскопии.

Таблица 1

Выход N-(4-гидроксибензоил)глицина в зависимости от условий реакции

Исходная кислота	Реагент	Продукт	Выход амида*, %
			78.0 (А) 61.2 (Б)

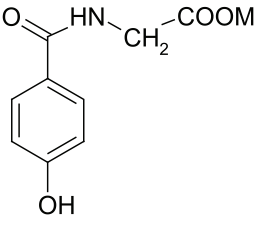
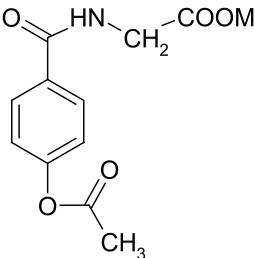
Примечание. * условия: (А) NaOH, H₂O; (Б) NaOH, H₂O:DMFA = 1:3.

Для получения водорастворимых биологически доступных форм N-(4-гидроксибензоил)глицина и N-(4-ацетоксибензоил)глицина, а также изучения влияния природы катиона на их фармакологическую

активность были получены калиевая, натриевая и литиевая соли (табл. 2) путем взаимодействия исходного амида с этилатом или фенолятом натрия или калия и гидроксидом лития в среде бензола.

Таблица 2

Соли N-(4-гидроксибензоил)глицина и его ацилированного производного

	Шифр	Катион, М	Выход, %
	IA	K ⁺	89,0
	IIA	Li ⁺	95,2
	IIIA	Na ⁺	97,1
	IV	K ⁺	96,6
	PIV	Li ⁺	98,1
	PIV	Na ⁺	98,2

В настоящей работе было проведено изучение спектра психотропной активности N-(4-гидроксибензоил)глицина и N-(4-ацетоксибензоил)глицина в виде водорастворимых солей с использо-

ванием следующих моделей фармакологического скрининга: «открытое поле»; приподнятый «плюс-лабиринт»; метод условной реакции пассивного избегания с отрицательным подкреплением (УРПИ)

[1, 5]. Исследуемые соединения использовались в дозах 10 и 50 мг/кг, разведенных в изотоническом 0,9% растворе NaCl при комнатной температуре. Вещества вводилось однократно за 60 минут до начала эксперимента. Результаты проведенных исследований подвергнуты статистической обработке, достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Метод изучения спонтанно-двигательной активности «открытое поле» позволяет изучить спонтанную двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень эмоционального реагирования животных. В течение трех минут наблюдения за животным регистрировали следующие показатели: число пересеченных квадратов (горизонтальная активность), число вставаний на задние лапы и заглядываний в отверстия (ориентировочно-исследовательская активность), количество выходов в центральную зону, число актов груминга и количество фекальных болюсов (эмоциональный фактор).

Метод приподнятого «плюс»-лабиринта позволяет оценить анксиолитическое (транквилизирующее, антифобическое) действие психотропных средств. Лабиринт поднят над уровнем пола на высоту 70 см и представляет собой квадратную площадку (10×10 см) с четырьмя крестообразно расположенными рукавами длиной 50 см и шириной 10 см. Два рукава имеют непрозрачные ограждения высотой 40 см, два рукава открыты. Крысу помещали на центральную площадку лабиринта хвостом к экспериментатору. В течение двух минут наблюдения фиксировали число посещений открытых рукавов и время нахождения в них. Увеличение количества выходов в открытые рукава и времени пребывания в них по сравнению с таковыми показателями в контрольной группе оценивали как проявление анксиолитического (антифобического) действия вещества.

Для изучения ноотропной активности соединений была использована методика выработки условной реакции пассивного избегания (УРПИ). В работе использовали модификацию этой методики, специально разработанную для крыс. Выработку условной реакции избегания затемненного отсека производили в экспериментальной камере, которая состояла из двух смежных отсеков, большого освещенного (60×40 см) и малого затемненного (15×15 см), снабженного электродным полом. Крыса считалась обученной, если в течение 30 секунд после сеанса обучения она не заходила в темный отсек экспериментальной камеры. Тест на воспроизведение памятного следа осуществлялся через 24 часа после обучения. Животное помещали в светлый отсек камеры и в течение трех минут регистрировали три показателя: латентный период первого захода в темный отсек, количество заходов и общее время пребывания в темной камере. Ноотропный эффект исследуемого вещества выражался в увеличении латентного периода первого захода животного в темный отсек, уменьшении количества заходов в этот отсек и времени пребывания в нем по сравнению с животными контрольной группы.

Анальгетическая активность соединений оценивалась по изменению порога вокализации при постепенном увеличении напряжения переменного тока до возникновения электроболевого раздражения и вокализации. Установка представляет собой бокс, состоящий из электродного пола,

ограниченного по периметру пластиковыми бортами. После помещения животного в установку подавались импульсы электрического тока с постепенным увеличением напряжения (скорость нарастания 5 В/с, длительность импульсов – 0,2 с). Порог переносимости электроболевого раздражения регистрировали при появлении вокализации у животного.

Острую суточную токсичность (ЛД₅₀) при однократном введении изучали на мышах-самках массой 25–30 г. Исследуемое соединение в изотоническом растворе хлорида натрия вводили животным внутрибрюшинно в различных возрастающих дозах однократно. Наблюдение за животными проводили в течение суток, отмечая количество погибших животных. Расчет ЛД₅₀ проводили по методу Литчфилда и Уилкоксона.

Результаты исследований и их обсуждение

Введение соединения ПА в дозе 10 мг/кг отмечена статистически достоверная тенденция к снижению тревожности животных – число актов груминга в тесте открытого поля снизилось на 73%. Полученные данные в других тестах свидетельствуют о том, что ПА не оказывало статистически достоверного влияния на поведение животных и не оказывало какого-либо действия. Введение соединения ПВ в дозе 10 мг/кг отмечена тенденция к снижению тревожности животных – число актов груминга в тесте открытого поля снизилось на 83%. Антифобическое действие подтверждается статистически достоверным увеличением времени пребывания в открытых рукавах в 5 раз. Кроме того, это соединение проявило антиамнестический эффект: в дозе 10 мг/кг вызывало статистически достоверное увеличение латентного периода первого захода в темный отсек на 614% и уменьшение общего времени пребывания в нем на 65% в тесте УРПИ. После введения ПВ в дозе 50 мг/кг соединение проявило общий психостимулирующий эффект, увеличивая вертикальную и горизонтальную активность, количество заглядываний в отверстия и число выходов в центральную зону, все данные статистически достоверны. Соединение ПВ в дозе 50 мг/кг статистически достоверно повышали порог болевой чувствительности на 89%, проявляя тем самым анальгетическое действие. Острая суточная токсичность соединения ПВ, как проявившего наибольшую активность, составляет 3751,11 мг/кг. Соединение ПВ в дозах 10 и 50 мг/кг достоверно не влияло на поведение крыс в «открытом поле». Тем не менее отмечена тенденция к повышению исследовательской активности и снижению тревожности животных – увеличение выходов в центральную зону на 73%. Однако эта активность не подтверждается в других

тестах. Кроме того, ПВ в дозе 10 мг/кг вызвало статистически достоверное снижение порога электроболевой чувствительности. Следует отметить, что в дозе 50 мг/кг соединение ПВ вызвало однонаправленные изменения в тесте УРПИ – увеличился латентный период первого захода в темный отсек на 238% и уменьшалось общее время пребывания в нем на 79%, что свидетельствует о тенденции к проявлению антиамнестических свойств. Остальные соединения не проявляли статистически

достоверной психотропной активности ни в одном из тестов.

Сравнение ПВ с отечественным лекарственным препаратом Мексидолом (этилметилгидроксипиридина сукцинат), проявляющим ноотропную, нейропротекторную, анксиолитическую и другие виды активности [2], показало, что терапевтический индекс соединения ПВ, вычисляемый по соотношению LD_{50}/ED_{50} , более чем в 14 раз превышает терапевтический индекс Мексидола (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная характеристика ПВ с Мексидолом

	LD ₅₀ , мг/кг	Терапевтический индекс LD ₅₀ /ED ₅₀
ПВ	3751,11 (3638,84–3866,85)	375,1
Мексидол (внутрибрюшинно) [2]	475	16,4

Примечание. * – данные статистически достоверны, критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$.

Заключение

Работа выполнена при финансовой поддержке научного гранта Администрации Волгоградской области (постановление № 77/3323 от 06.12.2012). Выражаем глубокую благодарность за содействие в исследовании биологической активности и токсичности веществ НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, в лице заведующего лабораторией психофармакологии, доктора медицинских наук Ковалёва Д.Г.

Выводы

1. В ходе изучения влияния условий на выход амидов оксibenзойных кислот было выявлено, что в сильнощелочной водной среде выход целевых продуктов на 17% выше, чем в водно-органическом растворителе в присутствии гидроксида натрия.

2. При исследовании психотропной активности синтезированных соединений выявлено, что производные N-(4-гидроксibenзоил)глицина и калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина практически не проявляли психотропной активности.

3. Острая суточная токсичность литиевой соли N-(4-ацетоксибензоил)глицина, проявившая значительную антифобическую, антиамнестическую и анальгетическую активности, при внутрибрюшинном введении составила более 1 г/кг и по классификации опасности (вредности) веществ

они относятся к классу умеренно токсичных соединений [6].

4. При сравнении терапевтических индексов литиевой соли N-(4-ацетоксибензоил)глицина и Мексидола, можно заключить, что соединение обладает широким диапазоном терапевтического действия и низкой токсичностью

Список литературы

1. Брель А.К., Лисина С.В., Саломатина Ю.Н. Амиды салициловой кислоты и их соли как потенциальные психотропные средства // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 30, № 5. – С. 55–59.
2. Воронина Т.А. Отечественный препарат нового поколения мексидол: основные эффекты, механизм действия, применение. – М., 2004. – 248 с.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. – Т.1,2. – М.: Новая волна, 2002.
4. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. – Вып 18 / Гл. ред. Г.Л. Вышковский. – М.: РЛС-МЕДИА, 2009. – С. 681.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 832 с., ил.
6. Саноцкий И.В. Критерий вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений / И.В. Саноцкий, И.П. Уланова. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.
7. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. – М.: Мир, 1999. – 704 с.
8. Russel F.G., Wouterse A.C., van Ginneken C.A. Renal clearance of substituted hippurates in the dog. II. 4-Amino-, hydroxy- and methoxy-substituted benzoyl glycines // J Pharmacol Exp Ther. – 1989. – 248(1). – P. 436–46.
9. Substituted hippurates and hippurate analogs as substrates and inhibitors of peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase (PHM) / Merkle D.J., Asser A.S., Baum-

gart L.E., Carballo N., Carpenter S.E., Chew G.H., Cosner C.C., Dusi J., Galloway L.C., Lowe A.B., Lowe E.W. Jr, King L. 3rd, Kendig R.D., Kline P.C., Malka R., Merkle K.A., McIntyre N.R., Romero M., Wilcox B.J., Owen T.C. // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – 16(23). – P. 10061–10074.

10. The uraemic retention solute para-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients / Cohen G., Raupachova J., Wimmer T., Deicher R., Hörl W.H. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2008. – 23(8). – P. 2512–2519.

References

1. Brel A.K., Lisina S.V., Salomatina J.N. *Butlerov Communications*, 2012, vol. 3, no.5, pp. 55–59.

2. Voronina T.A. Otechestvenny preparat novogo pokoleniya meksidol: osnovnye efekty, mechanism deystviya, primenenie. Moscow, 2004. 248 p.

3. Mashkovskij M.D. *Lekarstvennye sredstva: posobie dlja vrachej.* Vol. 1,2. Moscow, Novaja volna, 2002.

4. Registr lekarstvennyh sredstv Rossii RLS Jenciklopedija lekarstv. Moscow, RLS-MEDIA, 2009. 681 p.

5. Rukovodstvo po jeksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. Moscow, Medicina, 2005. 832 p.

6. Sanockij I.V., Ulanova I.P. Kriterij vrednosti v gigiene i toksikologii pri ocenke opasnosti himicheskikh soedinenij. Moscow, Medicina, 1975. 328 p.

7. Titce L., Ajher T. *Preparativnaja organicheskaja himija.* Moscow, Mir, 1999. 704 p.

8. Russel F.G., Wouterse A.C., van Ginneken C.A. Renal clearance of substituted hippurates in the dog. II. 4-Amino-, hydroxy- and methoxy-substituted benzoylglycines. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1989, 248(1), pp. 436–46.

9. Merkle D.J., Asser A.S., Baumgart L.E., Carballo N., Carpenter S.E., Chew G.H., Cosner C.C., Dusi J., Galloway L.C., Lowe A.B., Lowe E.W. Jr, King L. 3rd, Kendig R.D., Kline P.C., Malka R., Merkle K.A., McIntyre N.R., Romero M., Wilcox B.J., Owen T.C. *Bioorg Med Chem.*, 2008, 16(23), pp. 10061–10074.

10. Cohen G., Raupachova J., Wimmer T., Deicher R., Hörl W.H. *Nephrol Dial Transplant.*, 2008, 23(8), pp. 2512–2519.

Рецензенты:

Озеров А.А., д.х.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, г. Волгоград;

Навроцкий В.А., д.х.н., профессор, декан химико-технологического факультета, Волгоградского государственного технического университета, заслуженный химик РФ, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 17.10.2013.