

УДК 547.112.6 + 548.0

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СОЛИ *N*-(5-ГИДРОКСИНИКОТИНОИЛ)-*L*-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ СТРОЕНИЯ МЕТОДОМ РСА

© 2019 г. А. В. Киселев^а *, А. А. Мачула^б, С. И. Ефимов^{б, **}, Е. Б. Пашкова^б, С. В. Стовбун^а

^а ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», 119991, Россия, г. Москва, ул. Косыгина 4
*e-mail: icp@chph.ras.ru

^б ФГБНУ ВНИИРАЭ ООО «БИОН», 249032, Россия, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе 109 км
**e-mail: sefimov@bion-company.ru

Поступила в редакцию 11 декабря 2018 г.

После доработки 10 февраля 2019 г.

Принята к публикации 20 февраля 2019 г.

Разработан новый способ синтеза *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты через промежуточный имидазол 5-гидроксиникотиновой кислоты. Синтезирована его кальциевая соль (Ампассе®) и изучено ее строение методом РСА. Оптимизированы условия реакций для всех стадий процесса и усовершенствована методика очистки субстанции.

Ключевые слова: Ампассе®, кальциевая соль *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты, *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты, 5-гидроксиникотиновая кислота, диэтиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты, РСА.

DOI: 10.1134/S0514749219050070

N-(5-Гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовая кислота, ее одно- и двухвалентные соли обладают психотропным (антидепрессивным и анксиолитическим), нейротропным, геропротекторным и противовоспалительным действием [1–6].

До настоящего времени были известны два способа получения *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты **1**.

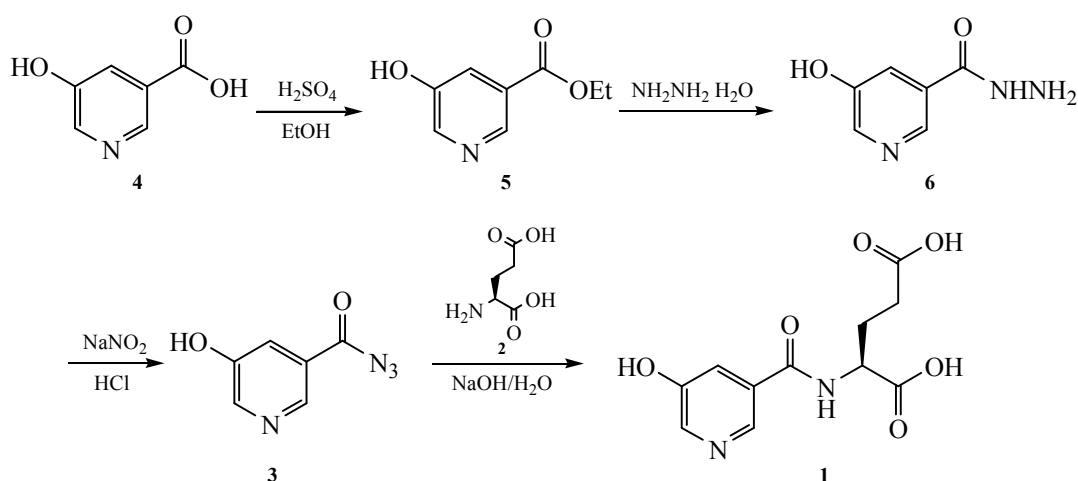
По первому способу [7] соединение **1** (схема 1) получают действием *L*-глутаминовой кислоты **2** на азид 5-гидроксиникотиновой кислоты **3** в присутствии гидроксида натрия в водной среде при 20–23°C.

5-Гидроксиникотиновую кислоту **4** переводят в этиловый эфир **5** кипячением в этиловом спирте в присутствии серной кислоты, который обработкой водным гидразингидратом переводят в гидразид **6**. Из последнего действием нитрита натрия в присутствии водной соляной кислоты получают азид **3**, конденсацией которого с аминокислотой **2** в водно-щелочной среде (рН 8–10) получают соединение **1** с выходом 35%, считая на кислоту **4**.

Недостатками данного метода являются низкий выход соединения **1**, а также необходимость использования неустойчивого, взрывоопасного азиды **3**, который даже при сушке (40°C) осмоляется и не приемлем в промышленном применении.

По второму способу [8] для синтеза **1** (схема 2) применяют взаимодействие гидрохлорида диэтилового эфира *L*-глутаминовой кислоты **7** со смешанным ангидридом **8**. Кислоту **1** обрабатывают метиловым эфиром хлормуравьиной кислоты **9** для защиты гидроксигруппы. Полученную 5-метокси-карбонилникотиновую кислоту **10** в присутствии триэтиламина при температуре –8÷–16°C обрабатывают изобутиловым эфиром хлормуравьиной кислоты **11**. К полученному смешанному ангидриду **12** добавляют гидрохлорид диэтилового эфира **7** в присутствии триэтиламина. По окончании реакции снимают защиту с гидроксильной и карбоксильной групп, выделяют целевой продукт и после перекристаллизации из водного спирта получают **1** с выходом 56–62%, считая на кислоту **4**.

Схема 1.



Недостатками данного способа являются сложность контроля полноты образования смешанного ангидрида **8** и использование в синтезе дорогостоящих хлорформатов.

Нами разработан новый способ получения **1** (схема 3), при котором кислота **4** переводится в соответствующий имидазолид **A** действием 1,1'-карбонилдиимдазола (CDI) **13** в толуоле. Имидазолид **A** без выделения реагирует с диэтиловым эфиром L-глутаминовой кислоты **14**. На заключительной стадии снимают защиту с карбоксильных групп, и целевой продукт **1** получают после очистки с выходом 65–70%, считая на кислоту **4**.

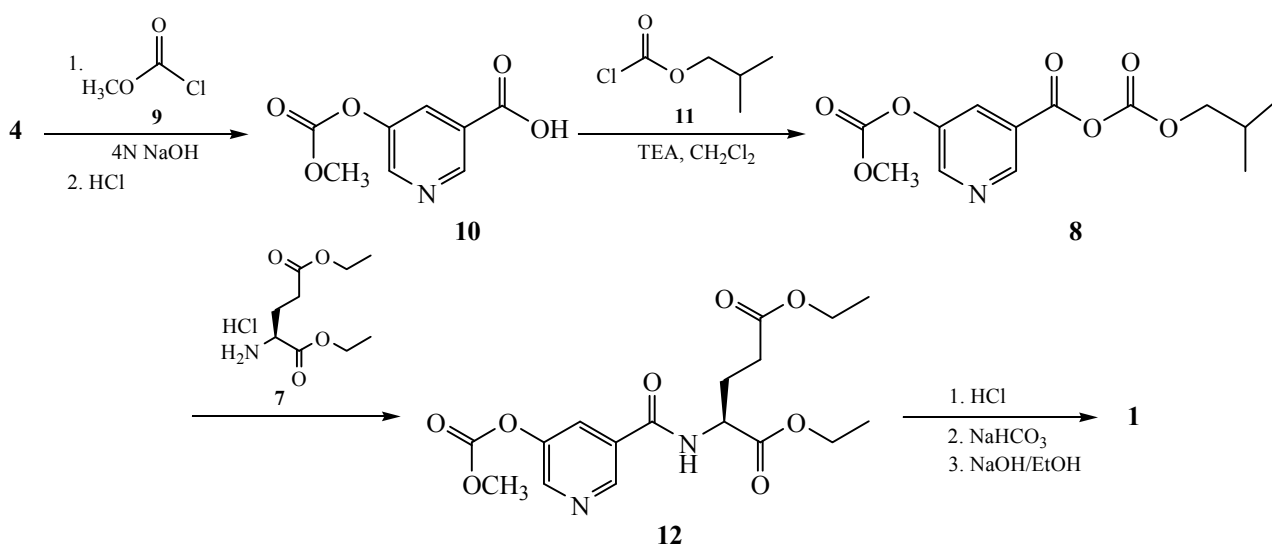
Первая и вторая стадии проходят в одном реакционном сосуде без выделения промежуточного имидазолида **A**. Реакционную массу после

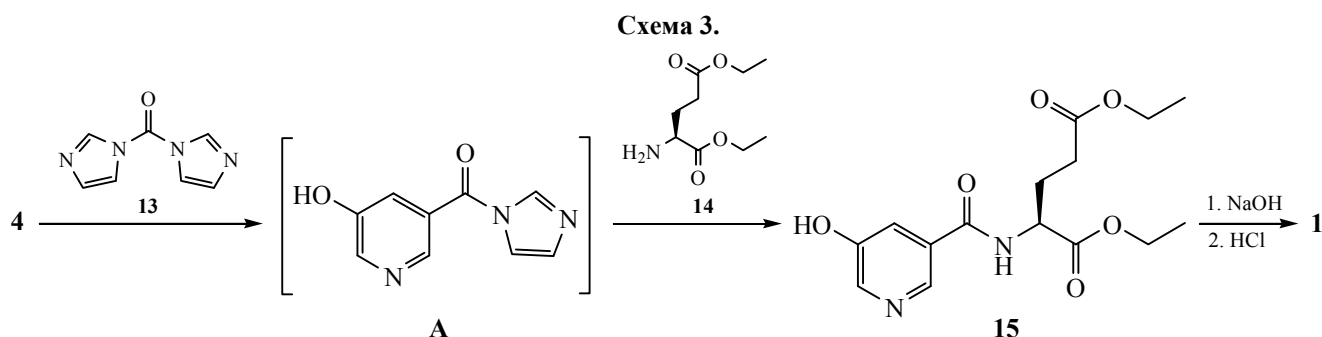
завершения второй стадии подвергают концентрированию. На третьей стадии осуществляют гидролиз сложноэфирных групп с одновременной двукратной очисткой продукта через промежуточную динатриевую соль *N*-(5-гидросиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты. Для выделения целевого продукта используют подкисление реакционной массы концентрированной соляной кислотой до pH 4.

Первоначально в реакционной массе образуются целевой диэтиловый эфир **15** (*M* 324.34) и побочный продукт **16** (*M* 445.43), содержащий в своей структуре второй фрагмент 5-гидросиникотиновой кислоты.

Побочный продукт **16** (схема 4) в ходе нагревания до 70–80°C самопроизвольно переходит в целевой продукт **15**. Избыток эфира аминокислоты

Схема 2.





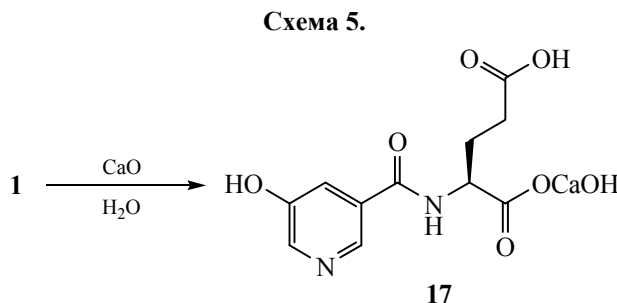
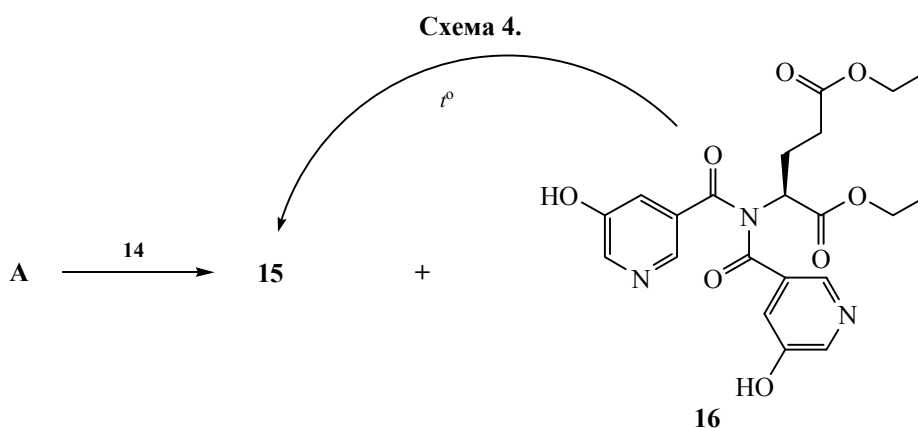
14 спо-собствует этому процессу. Варьиowaniem соотношения эфира аминокислоты:исходная кислота от 1.1:1 до 1.5:1 было установлено, что соотношение 1.5:1 является оптимальным для прохождения целевой реакции. Длительность выдержки при 80°C составляет 2 ч (контроль ВЭЖХ-МС).

Кальциевую соль *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты (Ампассе®) **17** (схема 5) готовили из кислоты **1**. Для этого к суспензии кислоты **1** порциями прибавляли порошок оксида кальция и перемешивали при комнатной температуре. Суспензия при этом разжижается. Не растворившуюся взвесь отфильтровывали. Прозрачный фильтрат нагревали для надежного образования кальциевой соли. Продукт выделяли высаживанием из водного раствора при добавлении органического

растворителя (метанол, этанол либо ацетон). Осадок отфильтровывали, промывали растворителем и сушили, получая чистую кальциевую соль *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты **17**.

С целью изучения структуры были выращены кристаллы кальциевой соли **17** и проведен их РСА.

В кристалле кальциевой соли **17** (рис. 1) содержатся две молекулы воды. Одна молекула входит в полиэдр кальция, другая нет. «Дальняя» от ароматического кольца карбоксильная группа координируется одним кислородом на 2 кальция, а вторым на один. В «ближней» один кислород координируется на один атом кальция, а второй образует связь с кальцием и водородную связь с NH-группой. Фенольная OH-группа образует водородную связь с азотом в ароматическом кольце (рис. 2).



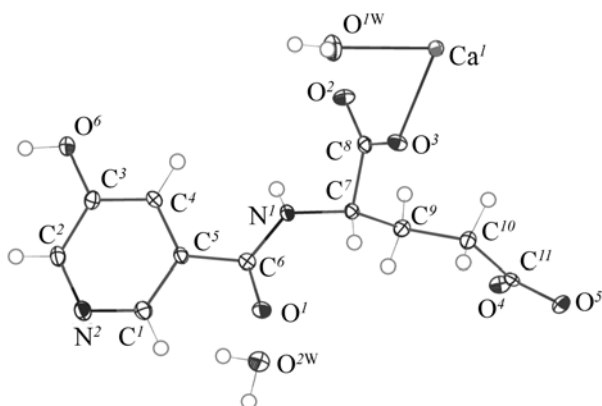


Рис. 1. Независимая часть элементарной ячейки соединения 17. Атомы представлены тепловыми эллипсоидами ($p = 50\%$).

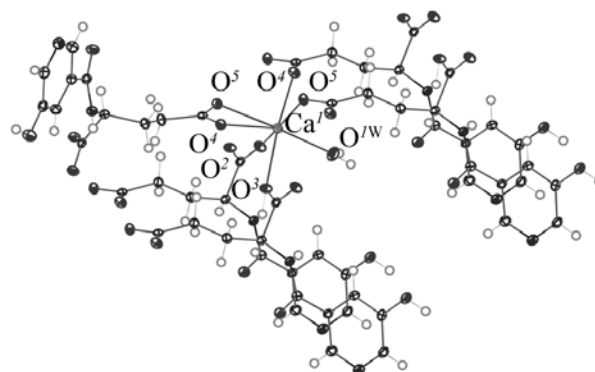


Рис. 2. Октаэдрическое окружение Ca^{2+} в кристалле соединения 17. Атомы представлены тепловыми эллипсоидами ($p = 50\%$).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Контроль реакций и чистоту соединений осуществляли методом ВЭЖХ-МС. Прибор Acella 600 с масс-спектрометрическим детектором LCQ Fleet. Колонка Luna C18(2) размером 4.6×250 мм в градиентном режиме (фаза А 0.1% раствор TFA в воде, фаза Б 0.1% раствор TFA в ацетонитриле).

Диэтиловый эфир *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты (15). В 2-х л колбе, снабженной механическим перемешиванием и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, приготовили суспензию 81 г (0.583 моль) кислоты 4 и 89.1 г (0.550 моль) CDI 13 в 600 мл толуола. Реакционную массу нагрели до 60–65°C (температура бани) и перемешивали при этой температуре 30 минут, подогрели до 80–85°C (температура бани), одной порцией прилили раствор 176 г (0.867 моль) диэтилового эфира *L*-глутаминовой кислоты 14 в 200 мл толуола и перемешивали при этой температуре 1 ч. После концентрирования при 60°C и 20 мм рт.ст. вес продукта-сырца составил 345 г.

***N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовая кислота (1).** В 3-х л однокорольной колбе к 345 г сырца диэтилового эфира 15 добавили при комнатной температуре раствор 233 г (5.83 моль) гидроксида натрия в 930 мл воды и перемешивали 2 ч., добавили 30 г активированного угля и перемешивали еще 30 минут. Профильтровали от угля на воронке Бюхнера (фильтровальная бумага). К фильтрату прибавили 545 мл конц. соляной кислоты до pH 4. Перемешивали еще 1 ч. Осадок отфильтровали на Шотте № 3, промыли 3×600 мл

водой. Сырец суспендировали в 750 мл воды, подкислили 65 мл конц. соляной кислоты до pH 4 и сразу подщелочили 90 мл 40% раствором гидроксида натрия до pH 8. К раствору добавили 13 г активированного угля и перемешивали 30 мин. Отфильтровали от угля, промыли водой. Маточный раствор подкислили конц. соляной кислотой до pH 4. Осадок отфильтровали и промыли на фильтре водой (3×500 мл). После сушки при 55°C и вакууме 40 мм рт.ст. в течение 12 ч. вес продукта составил 129 г (выход 70%). Чистота по ВЭЖХ 99.61%. Содержание основного вещества по титрованию 80%, воды 21%.

Кальциевая соль *N*-(5-гидроксиникотиноил)-*L*-глутаминовой кислоты (17). В 2-х л стакане при комнатной температуре приготовили суспензию 109 г (содержание основного вещества 83.93 г, 0.313 моль) кислоты 1 в 800 мл воды и порциями добавили 16.7 г (0.297 моль) порошок CaO. Перемешивали 20 минут. Отфильтровали от взвеси на Шотте № 4. Маточный раствор перелили в 4-х л колбу и перемешивали при 75–80°C в течение 1 ч. В колбу прилили 2400 мл этанола и перемешивали еще 30 минут при 50–60°C. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры в течение 30 минут и отфильтровали осадок на Шотте № 3, промыли 2×200 мл этанолом. После сушки при 60°C и вакууме 20 мм рт.ст. в течение 12 ч. вес продукта составил 77 г (выход 80%).

Данные по кристаллу соединения 17 для $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{CaN}_2\text{O}_8$ (M 342.32): сингония орторомбическая, пространственная группа $P2_12_12_1$ (№ 19), a 5.1174(9) Å, b 8.0140(13) Å, c 33.969(6) Å, V 1393.1(4) Å³, Z 4, T 100 К, $\mu(\text{MoK}_\alpha)$ 0.495 мм⁻¹, D_{calc} 1.632 г/мм³, 13909 измеренных отражений

($2.4 \leq 2\Theta \leq 64.06$), 4820 независимых отражений ($R_{\text{int}} 0.0670$), использованных для всех расчетов. Конечный $R_1 0.0437 [I > 2\sigma(I)]$ и $wR_2 0.1086$.

Спектр ЯМР ^1H (D_2O), δ , м.д.: 2.05–2.20 м (4H, H^{b2} , глут.), 2.34 м (2H, H^{g2} , глут.), 4.37 м (1H, H^a , глут.), 7.68 с (1H, H^d , пир.), 8.25 с (1H, H^e , пир.), 8.43 с (1H, H^2 , пир.), 8.64 с (1H, HN, глут.). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O), δ , м.д.: 31 (C^b , глут.), 36.7 (C^g , глут.), 58.9 (C^a , глут.), 126 (C^4 , пир.), 133.7 (C^3 , пир.), 139.9 (C^2 , пир.), 142 (C^6 , пир.), 156.6 (C^5 , пир.), 170 (C^3 , пир.-C=O), 178.5 (C^a , карб.-глут.), 182.1 (C^g , карб.-глут.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кузнецова Е.А., Воронина Т.А., Хромова И.В., Гарибова Т.Л., Тосина Е.К., Столярова Л.Г.,
- Троицкая В.С., Смирнова Л.Д. *Хим.-фарм. ж.* **1989**, 12, 1425.
- Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Хромова И.В., Кузнецова Е.А., Смирнов Л.Д. *Фармакол. и токсикол.* **1990**, 53, 13.
- Фирсов А.А., Портной Ю.А., Довженко С.А., Кобрин М.Б., Киселев А.В., Стовбун С.В., Долгова Г.В., Померанцева Т.Я. *Экспер. и клин. фармакол.* **2010**, 73, 31.
- Киселев А.В., Стовбун С.В., Сергиенко В.И. *Вест. МГОУ. Сер. естест. н.* **2011**, 2, 47.
- Киселев А.В., Стовбун С.В., Сергиенко В.И. *Вест. МГОУ. Сер. естест. н.* **2011**, 2, 83.
- Киселев А.В., Стовбун С.В., Танирбергенов Т.Б., Малиновская К.И. *Токсиколог. вест.* **2012**, 2, 5.
- Смирнов Л.Д., Воронина Т.А., Столярова Л.Г., Гарибова Т.Л., Ахундов Р.А., Кузнецова Е.А., Дюмаев К.М., Вальдман А.В., Руденко Г.М. Пат. 1368314 (**1988**). СССР.
- Пикалов В.Е., Фрыгина В.А., Смирнов Л.Д. Пат. 2051908 (**1996**). Россия.

A New Method of Obtaining the Calcium salt of *N*-(5-Hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid and Studying Its Structure Using the XRD

A. V. Kiselev^{a,*}, A. A. Machula^b, S. I. Efimov^{b,**}, E. B. Pashkova^b, and S. V. Stovbun^a

^a *Semenov Institute of Chemical Physics, 119991, Russia, Moscow, ul. Kosygina 4*

**e-mail: icp@chph.ras.ru*

^b *LLC Bion, RIRAE, 249032, Russia, Kaluzhskaya obl., Obninsk, Kievskoe shosse 109 km*

***e-mail: sefimov@bion-company.ru*

Received December 11, 2018; revised February 10, 2019; accepted February 20, 2019

A new method has been developed for the synthesis of *N*-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid via the intermediate 5-hydroxynicotinic acid imidazolide. Its calcium salt (Ampasse®) was synthesized and its structure was studied by XRD. The reaction conditions for all stages of the process were optimised, and the method of purification of the substance was improved.

Keywords: Ampasse®, calcium salt of *N*-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid, *N*-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid, 5-hydroxynicotinic acid, L-glutamic acid diethyl ester, XRD