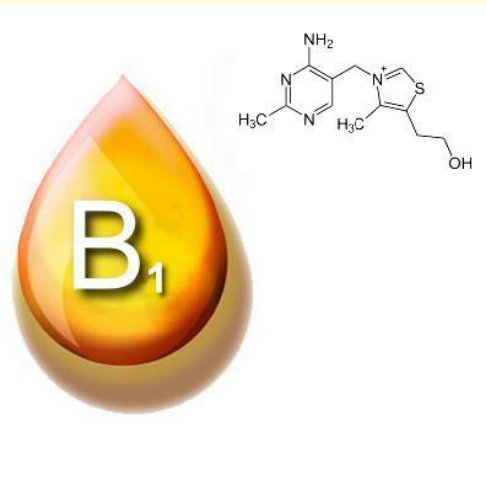


4 к -2013



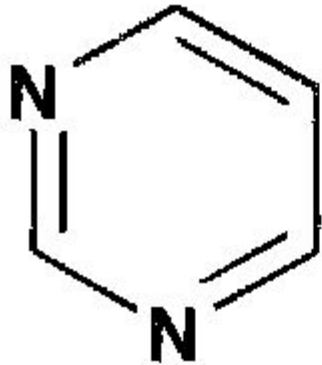
Лекция 7

Производные пиримидинтиазиола

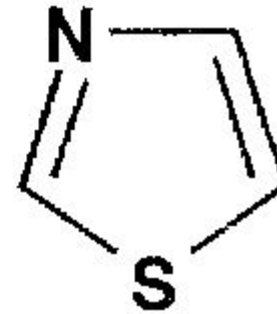
Витамины группы В

- Растворимы в воде.
- Совместно витамины группы В решают свою главную функцию — участие в тканевом дыхании и выработке энергии, играют важную роль в поддержании как ментального, так и эмоционального здоровья.
- Витамины группы В, за исключением цианокобаламина, нельзя накопить в организме, поэтому их следует пополнять ежедневно.
- **В1 - тиамин, рибофлавин, никотиновая кислота, пиридоксин,...** **фолиевая кислота,...** **В12 - цианокобаламин**

1. Основа химической структуры – два гетероцикла:



пиримидин



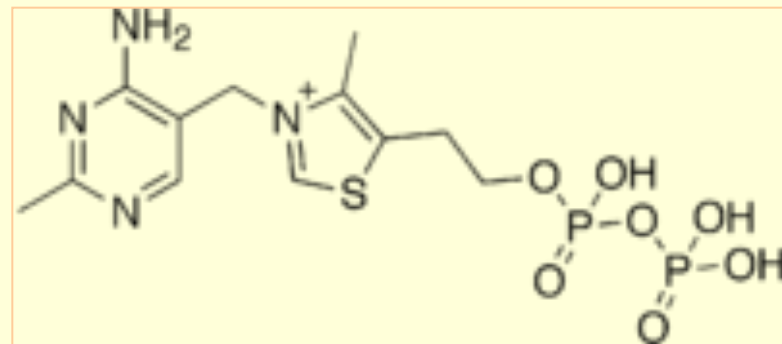
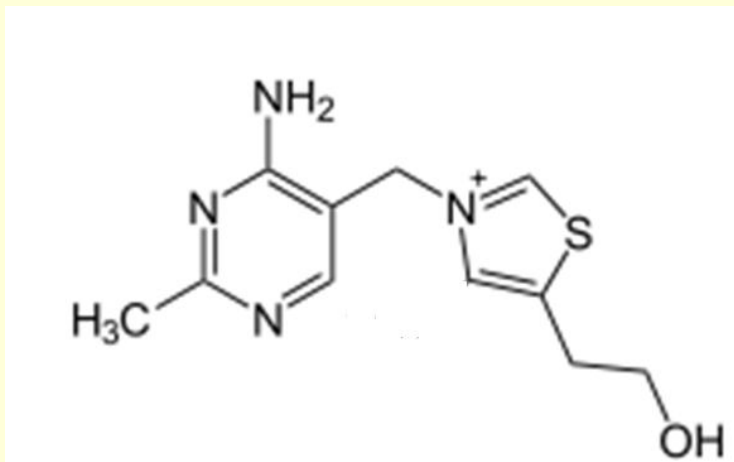
тиазол

Они связаны между собой в молекуле метиленовой группой, поэтому ЛС относят к

пиримидинотиазоловым или

пиримидилметилтиазолиевым витаминам.

ТИАМИН –биологически активное соединение



пиримидин

тиазол

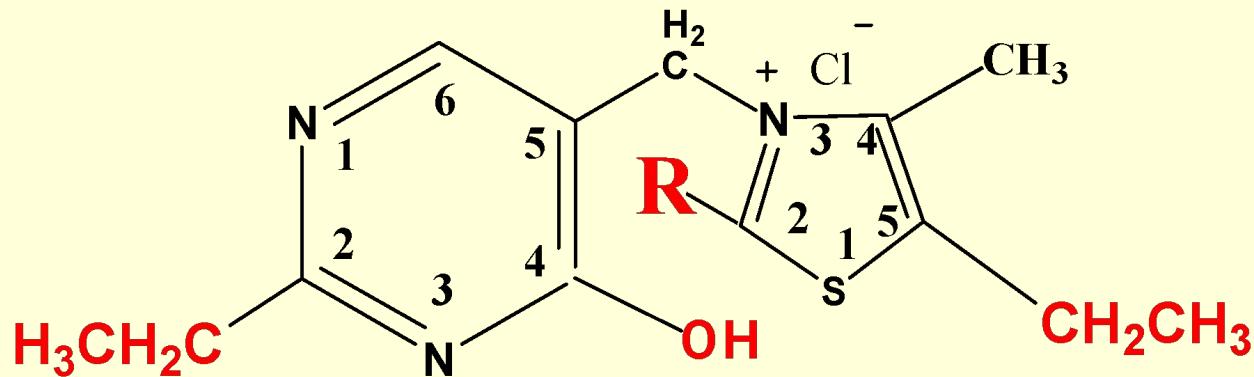
тиаминпирофосфат

3-[(4-амино-2-метил-5-метил)пиримидин-5-ил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метил-тиазол (тиаминдифосфат, кокарбоксилаза)

- Атом азота в тиазоловом ядре имеет положительный заряд (ониевый ион) и легко присоединяет анионы, например галогениды - хлориды или бромиды.
- Атомы азота *N1*, *N3* и азот аминогруппы у *C4* пиримидинового кольца придают молекуле тиамин *основные свойства*.
- Тиамин хлорид, как и тиамин бромид, представляет собой *двойные соли*, образование которых обусловлено *основными свойствами пиримидинового кольца* и *присутствием четвертичного азота в тиазоловом кольца*.
- В положении *C5* тиазоловое кольцо содержит гидроксиэтильную группу, способную образовывать сложные эфиры с карбоновыми и неорганическими кислотами.

Изменения в структуре тиамина приводит к изменению витаминной активности (QSAR-ККСА):

- Замена $-\text{NH}_2$ -группы в пиримидиновом ядре на $-\text{OH}$ -группу \longrightarrow потеря витаминной активности;
- Замена $-\text{CH}_3$ -группы в положении С2 на $-\text{C}_2\text{H}_5$ \longrightarrow активность повышается, но дальнейшее увеличение длины цепи - снижение активности;
- Замена $-\text{H}$ в положении С2 тиазолия на различные радикалы \longrightarrow потеря витаминной активности;
- Замена $-\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - группы на алкильный радикал \longrightarrow потеря витаминной активности:



Источники витамина В1



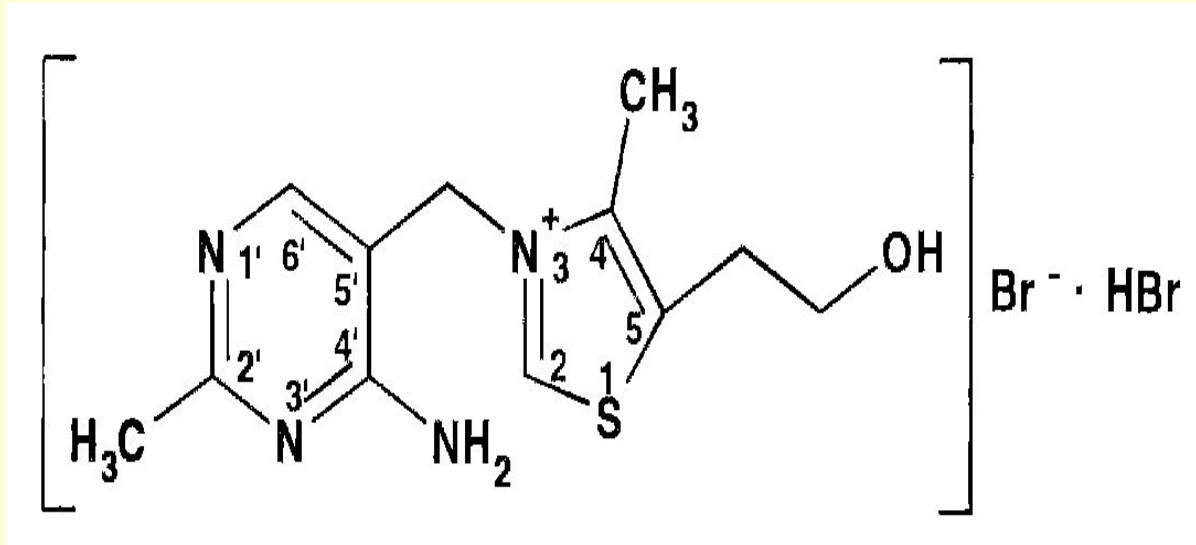
Тиамин содержится в дрожжах, зародышах и оболочках семян злаковых культур (пшеницы, овса, гречихи, кукурузы), а также в орехах, арахисе. Эти продукты могут служить источниками получения тиамина. Однако процесс извлечения сложен, а выход очень мал. Так, из 1 т дрожжей можно получить только около 0,25 г тиамина.

В тиамине нуждаются все животные за исключением жвачных, так как бактерии в их кишечнике синтезируют достаточное количество витамина.

- **Тиаминтрифосфат**, обнаружен у бактерий, грибов, растений и животных^[1], у *E. coli* играет роль сигнальной молекулы при ответе на аминокислотное голодание^[2].
- **Аденозинтиаминдифосфат** — накапливается у *E. coli* в результате углеродного голодания^[3].
- **Аденозинтиаминтрифосфат** — присутствует в небольших количествах в печени позвоночных, функция его неизвестна^[4].

В медицинской практике применяют тиамин в виде солей:

тиамина бромид
(хлорид). Первый
из них
представляет
собой 4 – метил –
5 - β – оксиэтил –
N – (2' –метил – 4'
– амино - 5' -
метилпиримидил)
– тиазолий
бромида
гидробромид:



2. Открытие витаминов

*Николай Иванович Лунин (1853-1937) –
русский врач-педиатр*

В 1880 г. при выподлнении диссертационной работы в Дерптском (ныне Тартуском, Эстония) университете *обнаружил:*

мышь не могут выжить, питаясь искусственной смесью из белка, жира, сахара и минеральных солей.

- **Впервые был сделан вывод** о существовании неизвестных веществ, абсолютно необходимых для жизни.
- В 1911 г. появился новый научный термин **"витамины"** (*vitamine*): от латинского *vita* – жизнь и "амин" (*amine*).
- Один из первых открытых витамином (1912 г) – витамин B_1 – витамин *аневрин* (*старое название*);

История

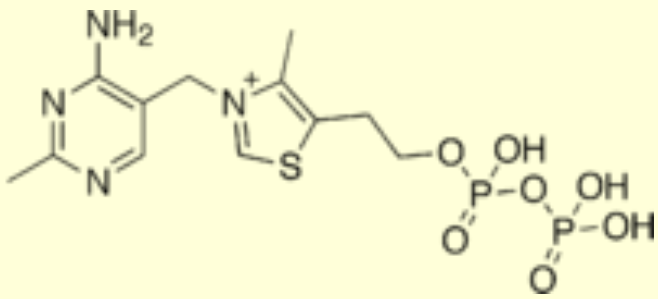
- Христиан Эйкман Христиан Эйкман предположил существование паралитического яда в эндосперме риса и полезных для организма веществ, излечивающих болезнь бери-бери в рисовых отрубях.
- За исследования, которые привели к открытию витаминов, Эйкман получил в 1929 году Нобелевскую премию в области медицины.
- В чистом виде впервые выделен Б. Янсен Б. Янсен в 1926 году.

Тиамин – витамин группы В₁

- Вещество, содержащееся в шелухе рисовых зерен, *излечивало кур и голубей от паралича*.
- После установления в структуре этого вещества атома серы оно было названо **тиамином** (греч. *тео* – сера) или *антиневритным* витамином.
- Потребность в тиамине связана с тем, что он входит в структуру кофермента *кокарбоксилазы*, принимающего участие в **декарбоксилировании α -кетокислот, в частности, пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот, в синтезе ацетилкофермента А.**
- **Накопление α -кетокислот в плазме (выше 0,01 г/л) приводит к нарушению функции нервной системы и вызывает энцефалопатию Вернике (острое поражение среднего мозга) или полиневрит — заболевание «бэри-бэри».**

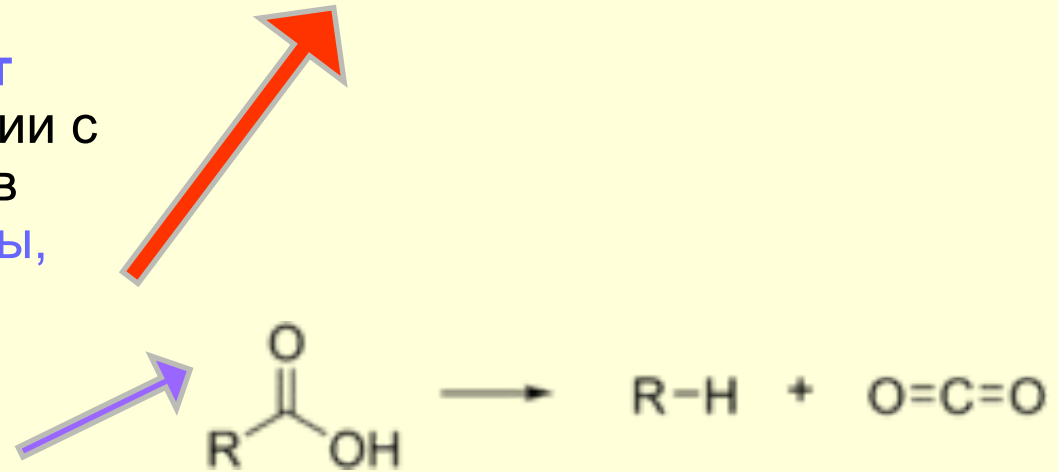


«Бéри-бéри» (в переводе с японского означает *«кожные оковы»*) - проявляется в виде *поражения двигательных нервов преимущественно нижних конечностей.*



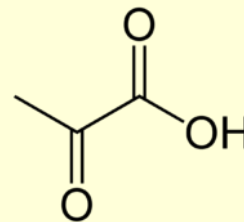
карбоксилирование

Тиаминпирофосфат
(**тиаминдифосфат, кокарбоксилаза – кофермент карбоксилазы**) — в соединении с белком и ионами Mg^{2+} входит в состав фермента карбоксилазы, катализирующей **карбоксилирование** и



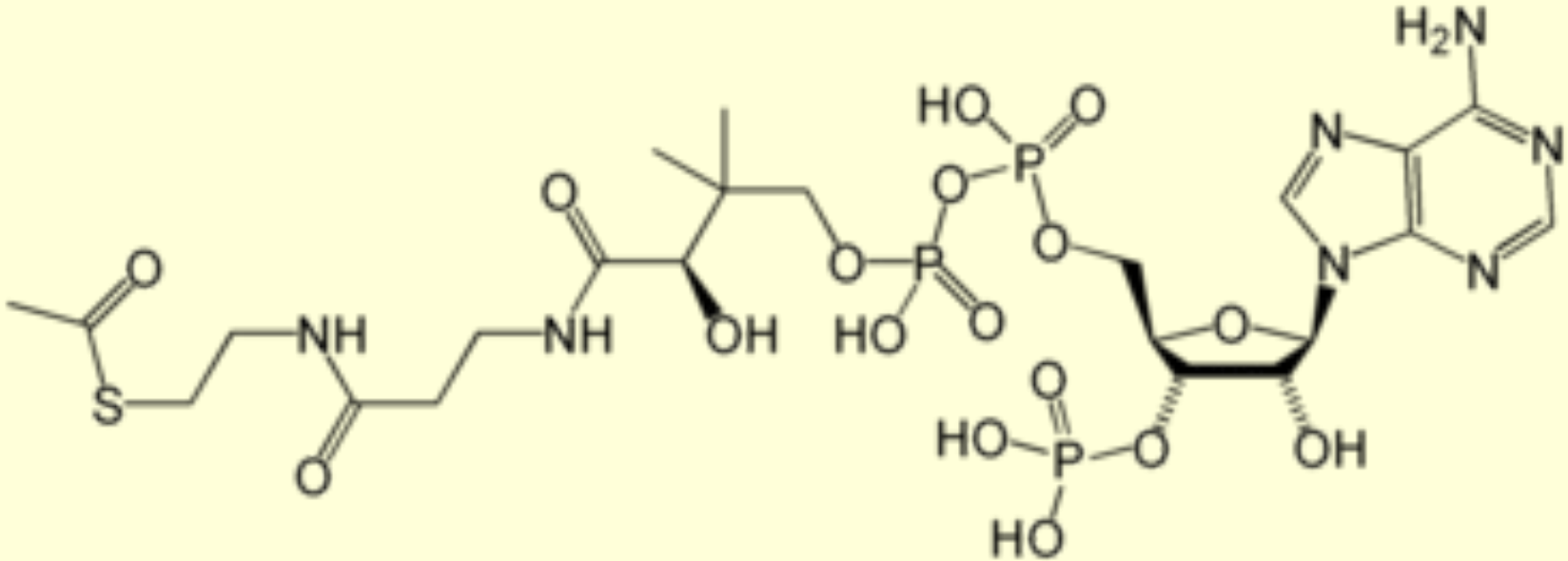
декарбоксилирование α -кетокислот (например, в превращении пировиноградной кислоты в ацетилкофермент А). Во всех случаях происходит разрыв $\text{C}-\text{C}$ связи, смежной с кетогруппой субстрата.

декарбоксилирование α -кетокислот



Пировиноградная или 2-оксoproпановая или α -кетопропионовая кислота

Тиамин принимает участие в синтезе Кофермента А

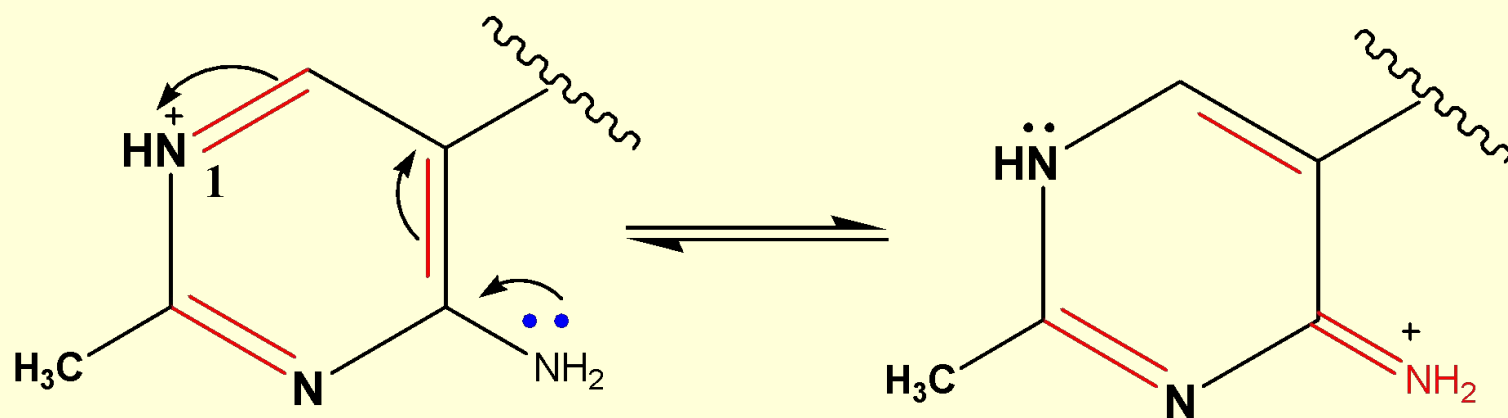


- **Кофермент А (КоА)** — кофермент ацетилирования; принимает участие в реакциях переноса **ацильных групп**.

Реакционная способность тиамина в средах с различным pH

Протонирование ($pH < 7$) по $N1$ сопровождается образованием амидиновой структуры тиамина

(не происходит разрушение и инактивация молекулы, биологическая активность сохраняется):

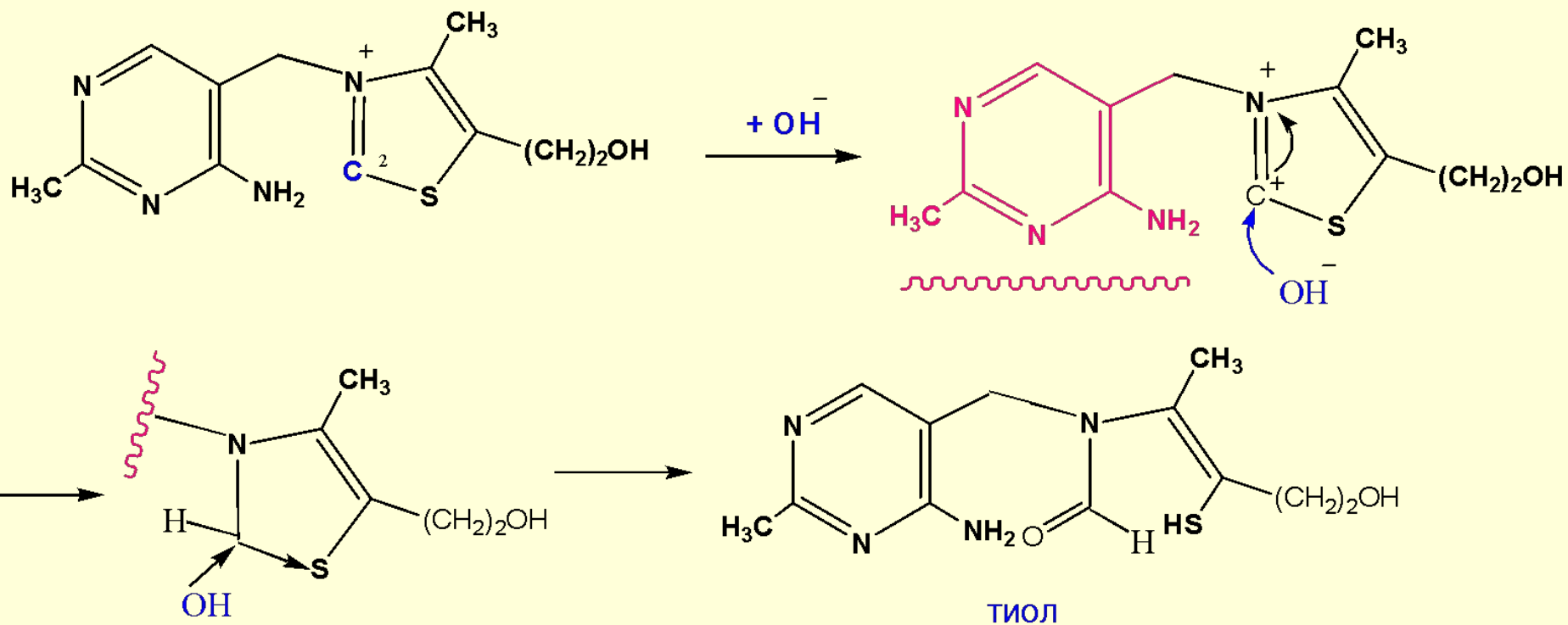


пиримидиний-ион

амидиний-ион

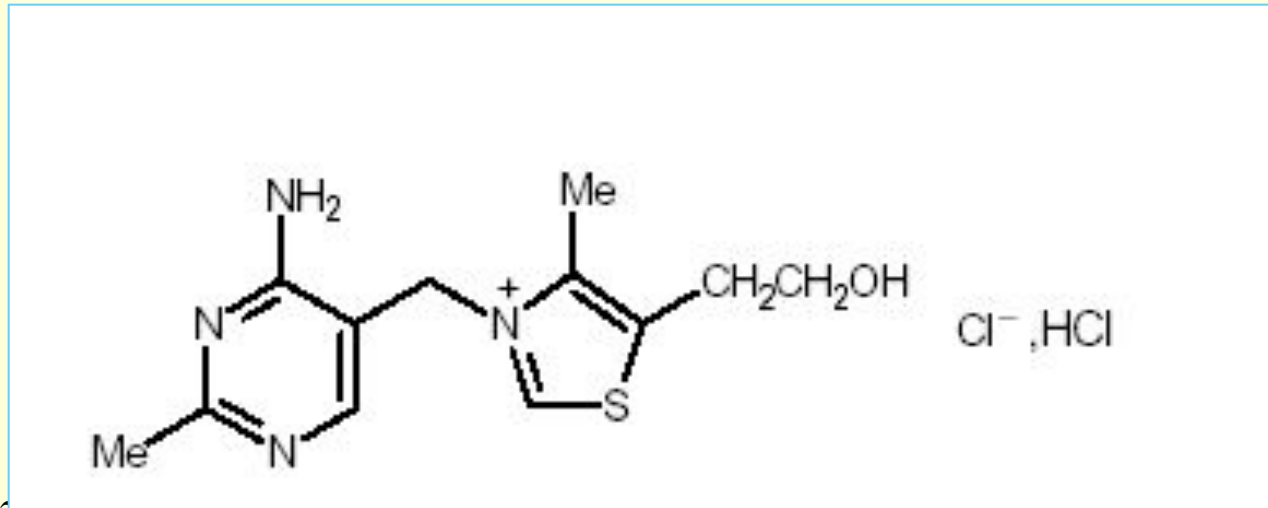
В щелочной среде

- реакционный центр – С2 тиазолия;
- в результате присоединения –ОН-группы тиазоловый цикл раскрывается с образованием тиольной формы (*с потерей биологической активности*);
- реакция лежит в основе образования *тиохрома* (см. ниже).



2. Контроль качества тиамин хлорида

Тиамин хлорид/ Thiamini chloridum/ Витамин В₁



PhEur

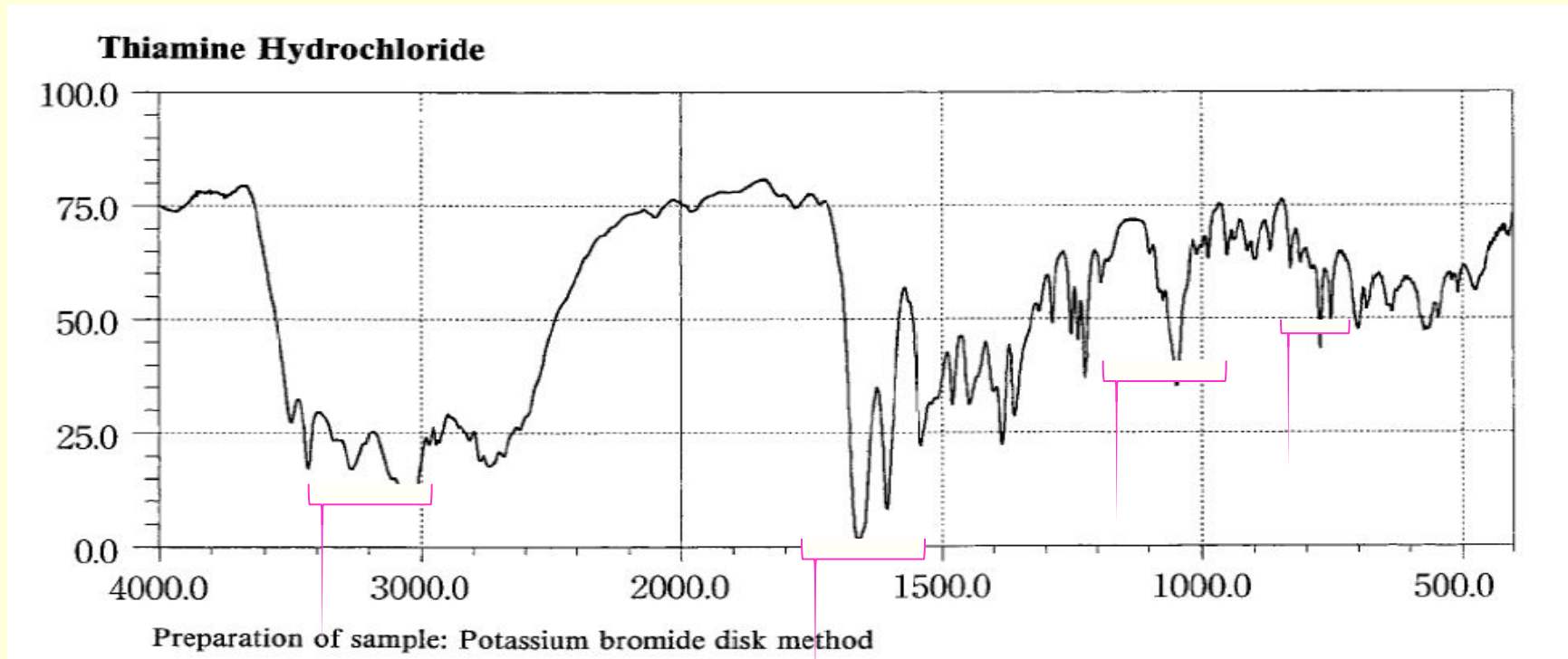
5-[4-амино-2-метил-5-пиримиоинил)-метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метил-тиазолия хлорид гидрохлорид (или бромид гидробомид)

В связи с идентичностью химической структуры тиамин хлорид и тиамин бромид мало отличаются между собой по свойствам.

Описание: белые (почти белые) или с желтоватым оттенком (тиамин бромид) кристаллические порошки; легко растворимы в воде, растворимы в глицерине, мало растворимы в спирте.

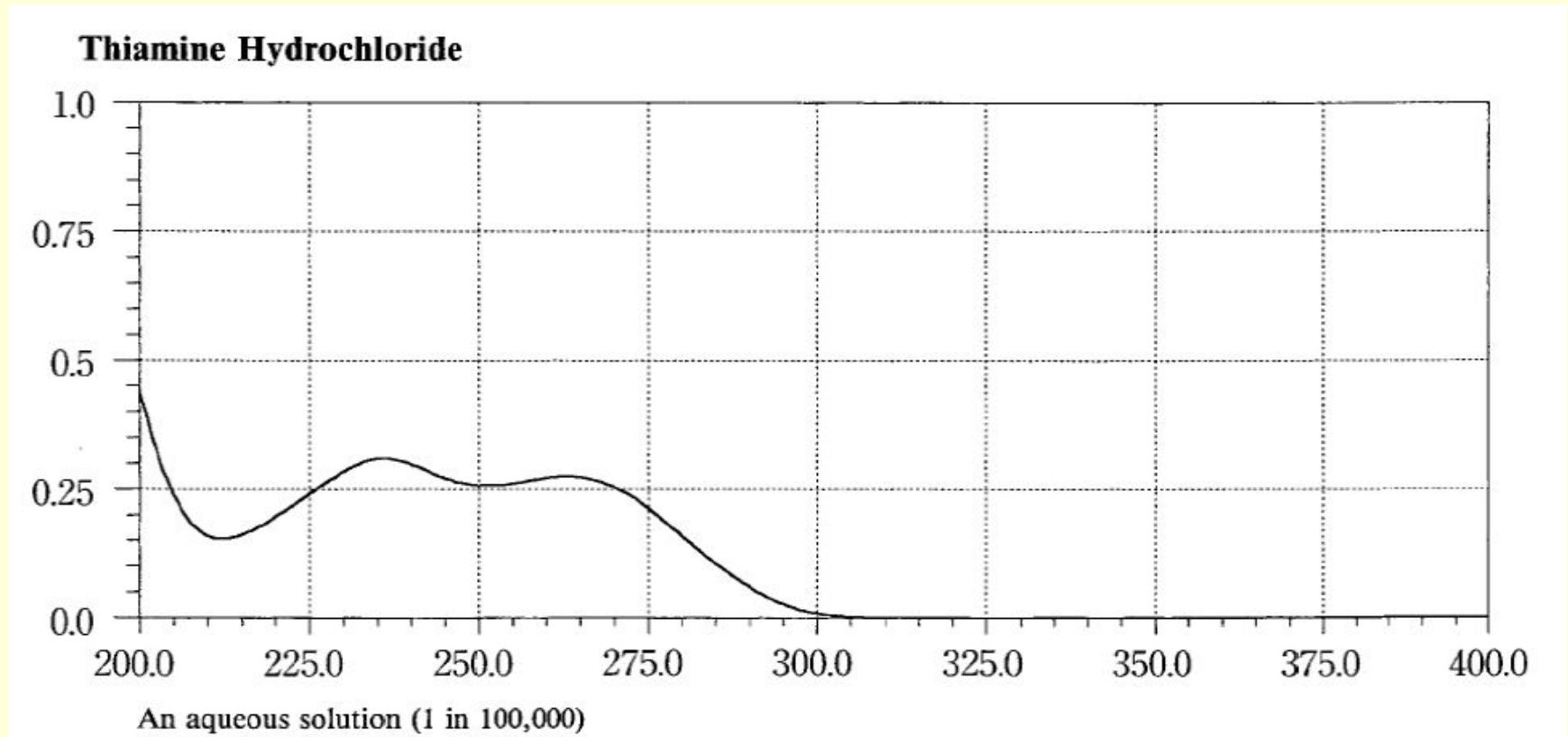
2.1. Определение подлинности

ИК- спектроскопия: - ИК-спектр тестируемого образца сравнивают со спектром стандартного образца тиамина (перед определением образцы высушивают при температуре 105°C в течение 2 ч.)



- валентные колебания (ν) связи N-H в интервале частот 3070-3350 cm^{-1} ;
- деформационные колебания (δ) связей N-H в интервале частот 1600-1650 cm^{-1} ;
- валентные колебания связей C-OH (простые спирты) 1050 cm^{-1} ;
- валентные колебания (ν), обусловленными присутствием галогенов - 760 cm^{-1}

УФ–спектроскопия



Спектральные характеристики???
(область, аналитические длины волн, величины поглощения)

Определение подлинности тиамина основано также на реакциях :

- с общеалкалоидными реактивами;
- определения хлорид- и бромид –ионов;
- атом серы можно обнаружить по выделяющемуся SO_2 при окислительной термической деструкции лекарственного вещества ;
- образования окрашенных продуктов окисления.



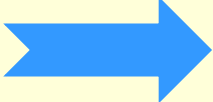
!

Тиамин можно обнаружить по образованию:

- **красно – коричневого осадка** с 0,02 М раствором **иода**,
- **желтого осадка пикрата** (температура плавления 206-208⁰С) с насыщенным раствором **пикриновой кислоты**.

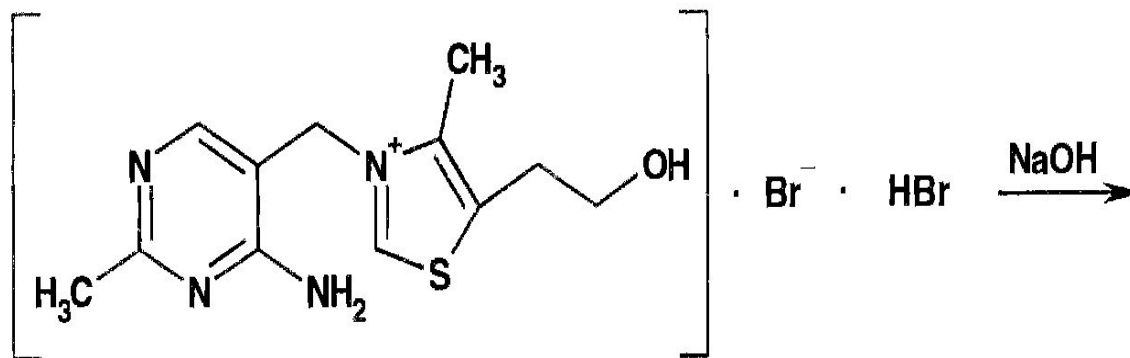
Среди окислительно-восстановительных особенно известна реакция образования *тиохрома*, протекающая в щелочном растворе.

Методика (Ph.Eur):

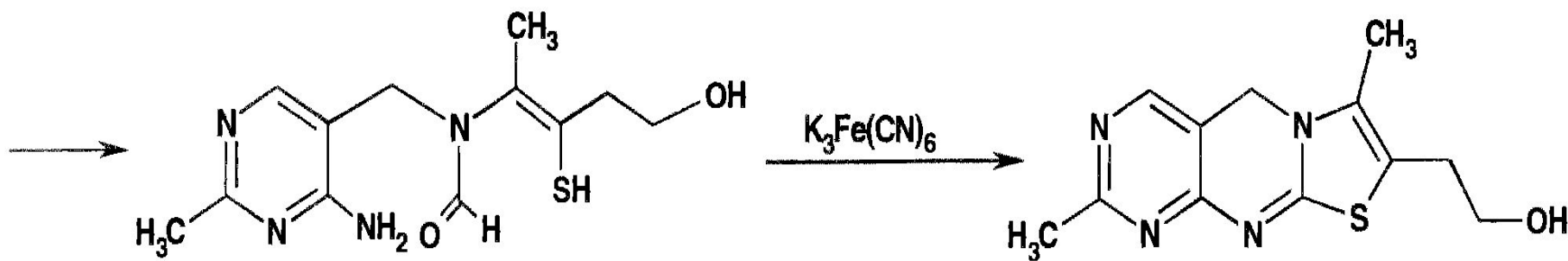
- *около 20 мг ЛВ растворить в 10 мл воды, 1,6 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида;*
- *раствор нагреть на водяной бане в течение 30 минут и оставить охлаждаться;*
- *затем добавить 5 мл 2 моль/л раствора натрия гидроксида, 10 мл 5 % раствора железа феррицианида и 10 мл бутанола;*
- *перемешать содержимое колбы* 

*Спиртовой слой имеет интенсивную **сине-фиолетовую флуоресценцию** при облучении УФ-светом ($\lambda=365$ нм).*

Образование тиохрома



тиамин



тиольная форма тиамин

тиохром

Тиохром из водных растворов извлекают бутиловым или изоамиловым спиртом. **Полученные спиртовые растворы при ультрафиолетовом облучении (363 нм) имеют характерную синюю флуоресценцию**, исчезающую при подкислении и вновь возникающую при подщелачивании. Реакцию образования тиохрома используют для количественного флуориметрического определения тиамин.

2.2. Оценка чистоты

- **Прозрачность и цветность.** Раствор тиамин (5 %), приготовленный на дистиллированной воде, свободной от углекислого газа, должен быть прозрачным и по цветности не превышать стандартный раствор. Цветность раствора тиамин хлорида определяют также методом спектрофотометрически.
- **Определение нитратов** к 0,4 мл раствора (1:10) добавляют 2 мл серной кислоты и охлаждают. Затем осторожно добавляют 2 мл 80 г/л раствора FeSO₄. Не должно появляться коричневое кольцо:
$$\text{FeSO}_4 + \text{NO} + 5\text{H}_2\text{O} \longrightarrow [\text{Fe}(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})_5]\text{SO}_4$$
- Методом газовой хроматографии определяют присутствие **летучих органических веществ**. Хроматографическую чистоту препарата оценивают, сравнивая хроматограммы исследуемой пробы и стандартного образца.
- Содержание **тяжелых металлов** не должно превышать 20 ppm.
- Содержание **сульфатов** не должно превышать 300 ppm.

2.3. Количественное определение

- кислотно-основное титрования в неводной и водной средах;
- аргентометрия;
- методы алкалиметрического и аргентометрического титрования могут быть использованы в качестве экспресс-методов количественного определения тиамин в лекарственных средствах.
- возможно также количественное осаждение тиамин кремнево-вольфрамовой, фосфорно-вольфрамовой кислотами и другими осадительными реактивами с последующим гравиметрическим или нефелометрическим определением тиамин.

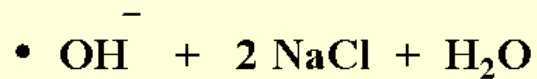
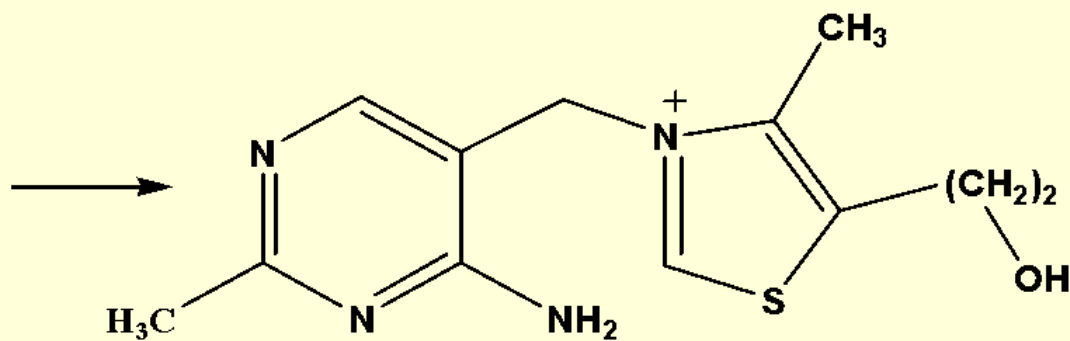
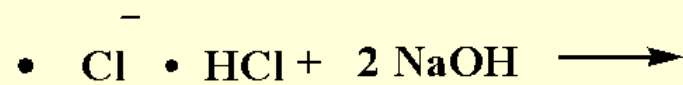
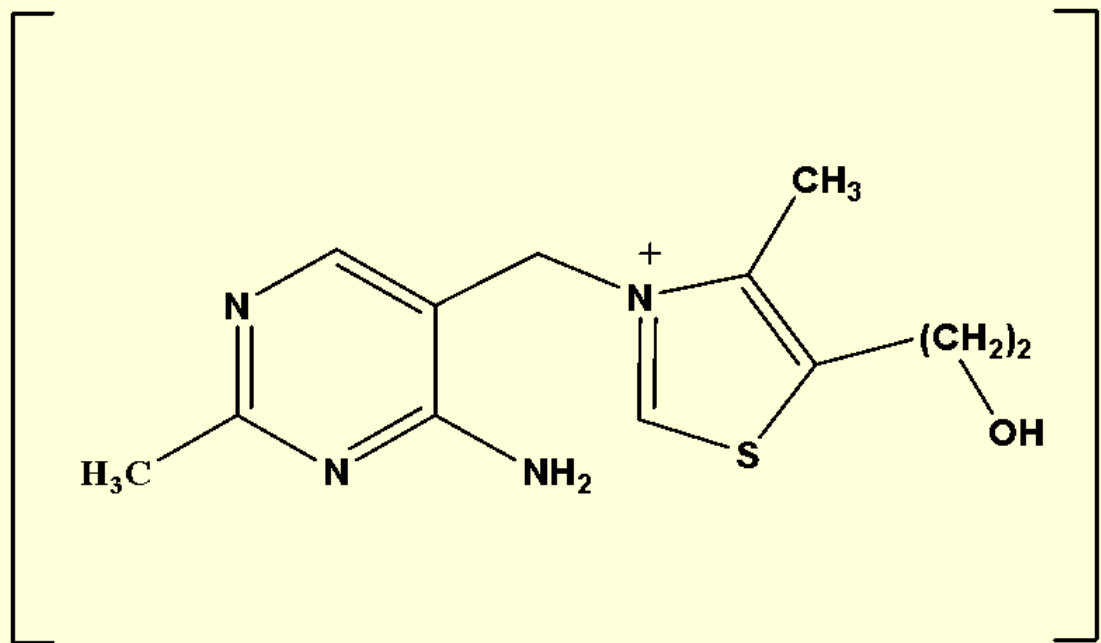
Методика (EPH) алкалиметрического титрования:

- *растворить 0,150 г субстанции в смеси из 5,0 мл 0,01 моль/л раствора HCl и 50 мл спирта этилового;*
- *проводят потенциометрическое титрование 0,1 моль/л раствором NaOH.*

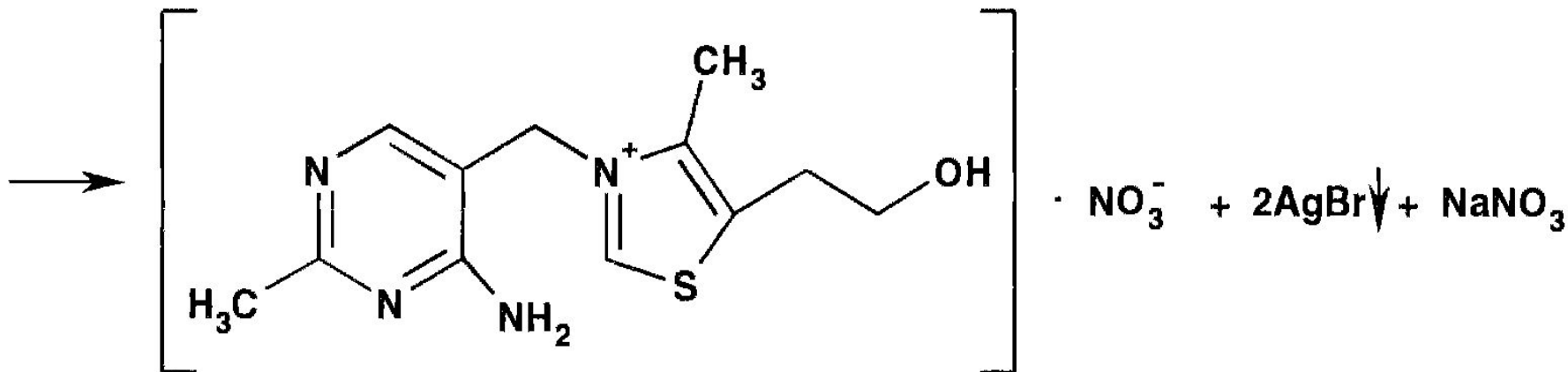
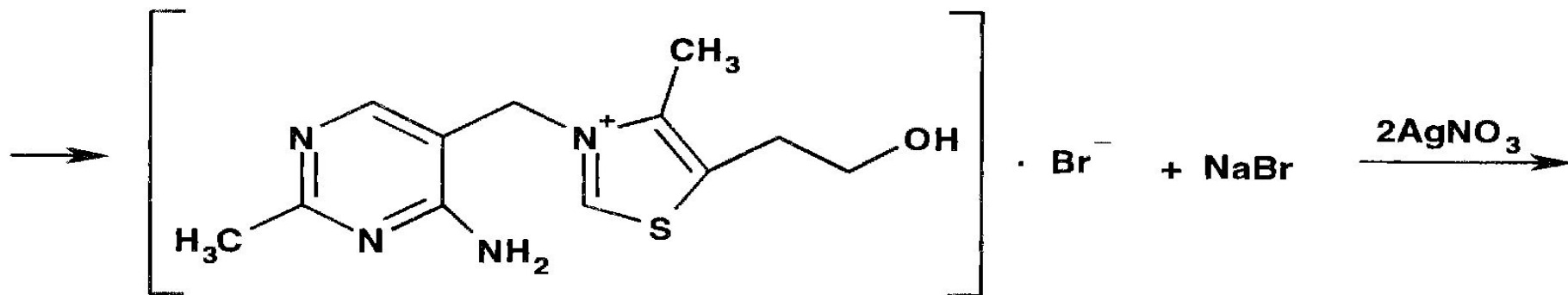
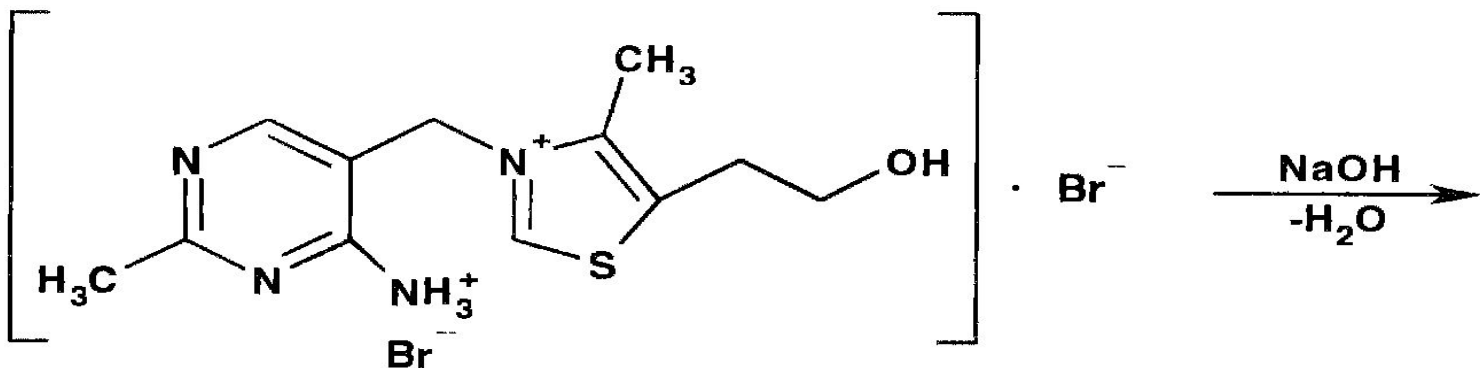
1 мл 0,1 моль/л раствора NaOH соответствует 16,86 г



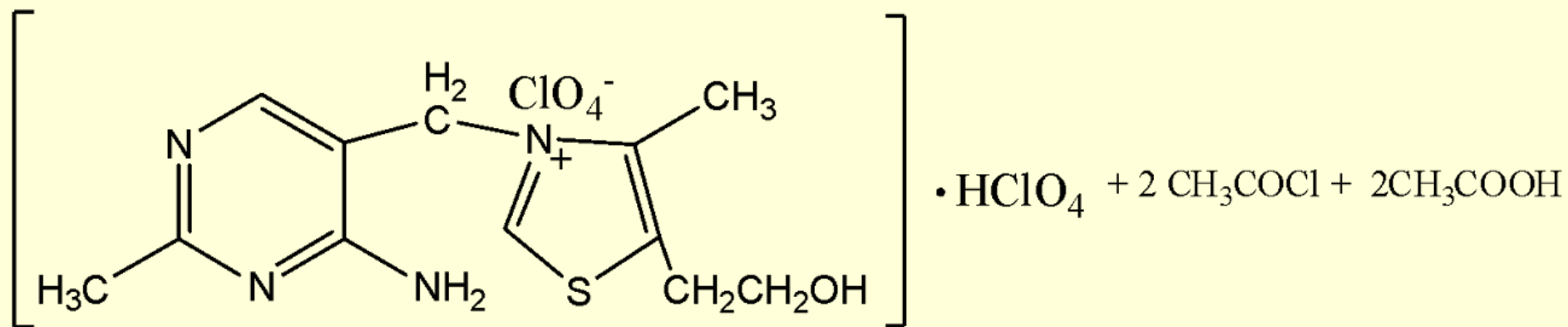
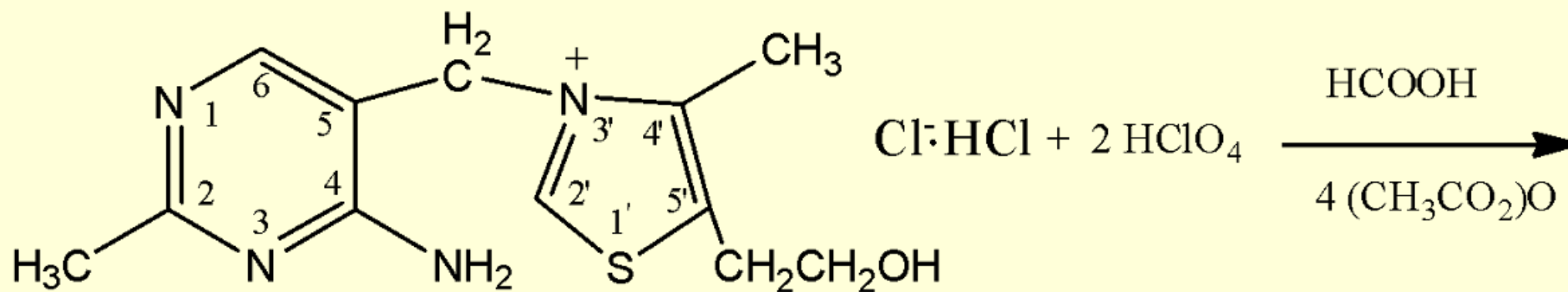
В соответствии с *Ph.Eur* содержание тиамина хлорида в лекарственной субстанции должно быть *не менее 98,5 % и не более 101,5 %.*



Аргентометрическое титрование



Неводное титрование



Основание тиамин из растворов количественно осаждается

некоторыми осадительными (общеалкалоидными реактивами):

Фосфорновольфрамная кислота осаждает тиамин из растворов солей. В образовавшемся фосфорновольфрамате затем обнаруживают наличие присутствие **серы и галогена**.

Реакция осаждения **кремневоольфрамной кислотой** рекомендуется для **гравиметрического и фотонейтриметрического определения** солей тиамин.

Кремневоольфрамат тиамин имеет состав: $2[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrN}_4\text{OS}]\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3$.

Гравиметрическое определения тиамина бромида

- Нагревание смеси водного раствора точной навески тиамина бромида, концентрированной HCl и 10% раствора кремнево-вольфрамовой кислоты.
- Образовавшийся осадок отделяют, промывают на фильтре горячей разбавленной HCl, затем водой и ацетоном.
- Все операции выполняют на предварительно высушенной до постоянной массы воронке, которую вместе с осадком сушат, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Масса осадка, умноженная на **коэффициент 0,25**, соответствует количеству тиамина бромида.
- ПРОВЕРИТЬ !

Биотрансформация тиамина

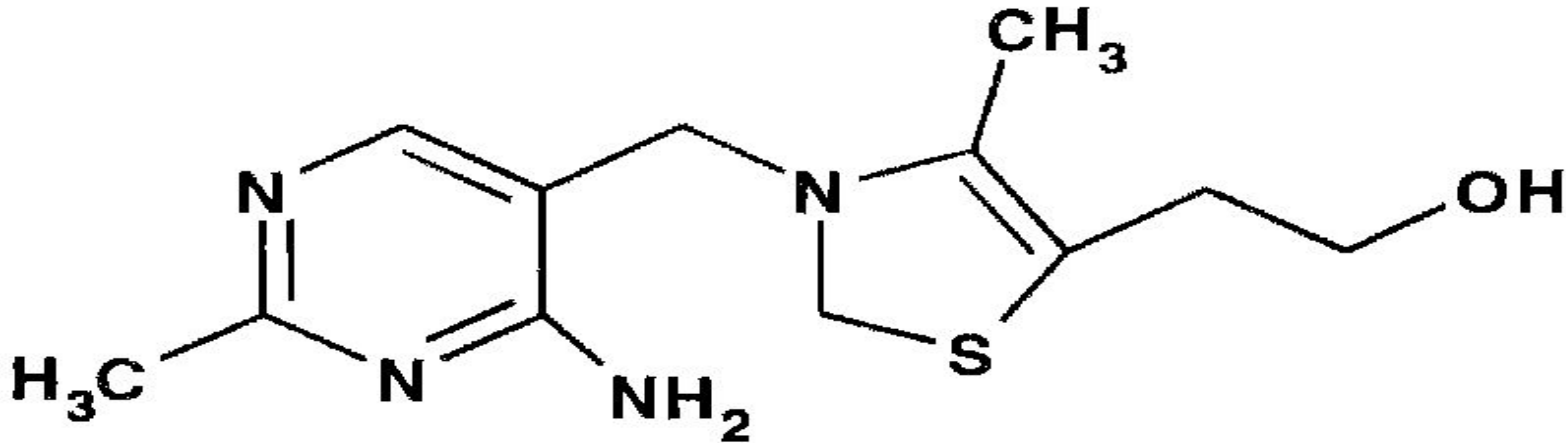
При участии специфического АТФ-зависимого фермента – тиаминпирофосфокиназы (в печени, в тканях мозга) – витамин В1 превращается в активную форму – тиаминдифосфат (ТДФ) - кокарбоксилаза.

Дозы

- Соли тиаминна назначают при нарушениях функции нервной системы. Вводят внутрь по 0,005 -0,01-0,02г или внутримышечно по 0,5-1,0 мл 2,5% или 5% -ного раствора тиаминна хлорида (3% -ные или 6%- ные растворы тиаминна бромида).

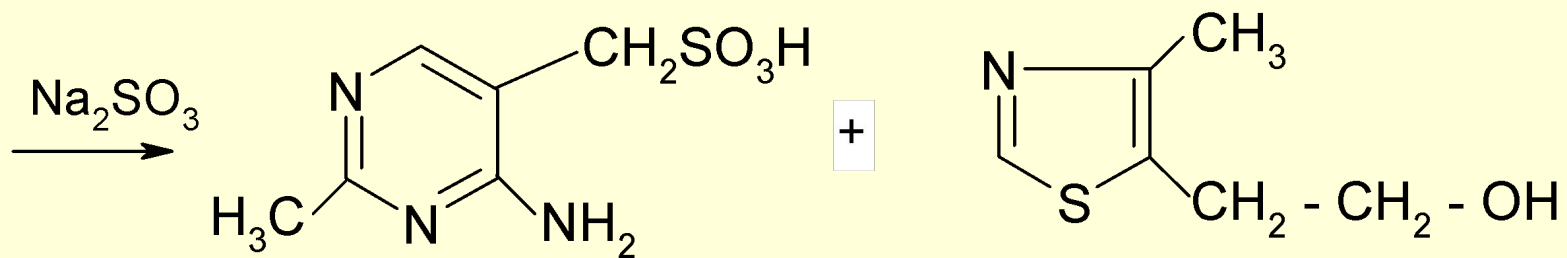
Хранение

Соли тиамин хранят в герметически закрытой таре, предохраняющей от действия света, без контакта с металлами. Недопустимость такого контакта обусловлена возможностью постепенного разложения тиамин до дигидротиамин:



Вспомогательные вещества

Тиамин



сульфо кислота метил-
амино-пиримидин

4-метил-5-гидроксиэтилтиазол

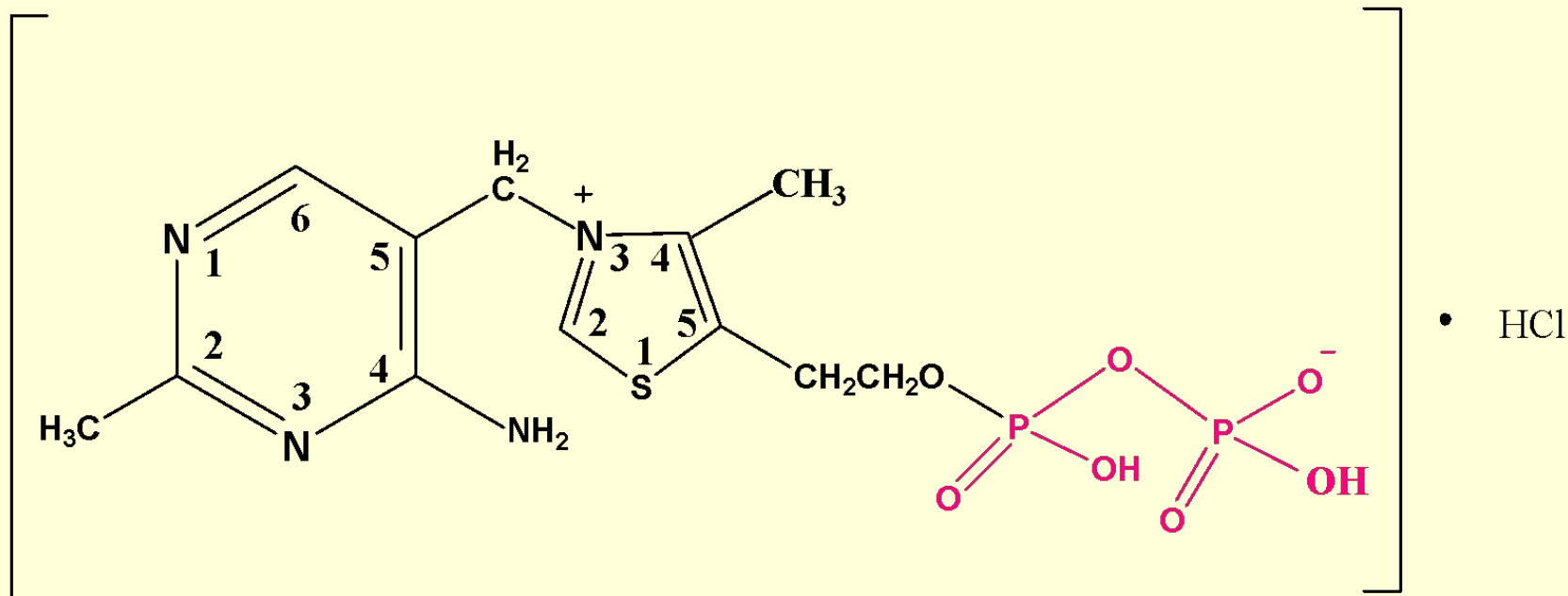
4. Фосфорные эфиры тиаминa

В медицине применяются:

- Кокарбоксилаза (в виде соли)
- Фосфотиамин
- Бенфотиамин

4.1. Кокарбоксилазы гидрохлорид

Coccarboxylase Hydrochloride



3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидинил)-метил]-5-(2-гидроксиэтил)4-метил-тиазолио -O- дифосфоната гидрохлорид



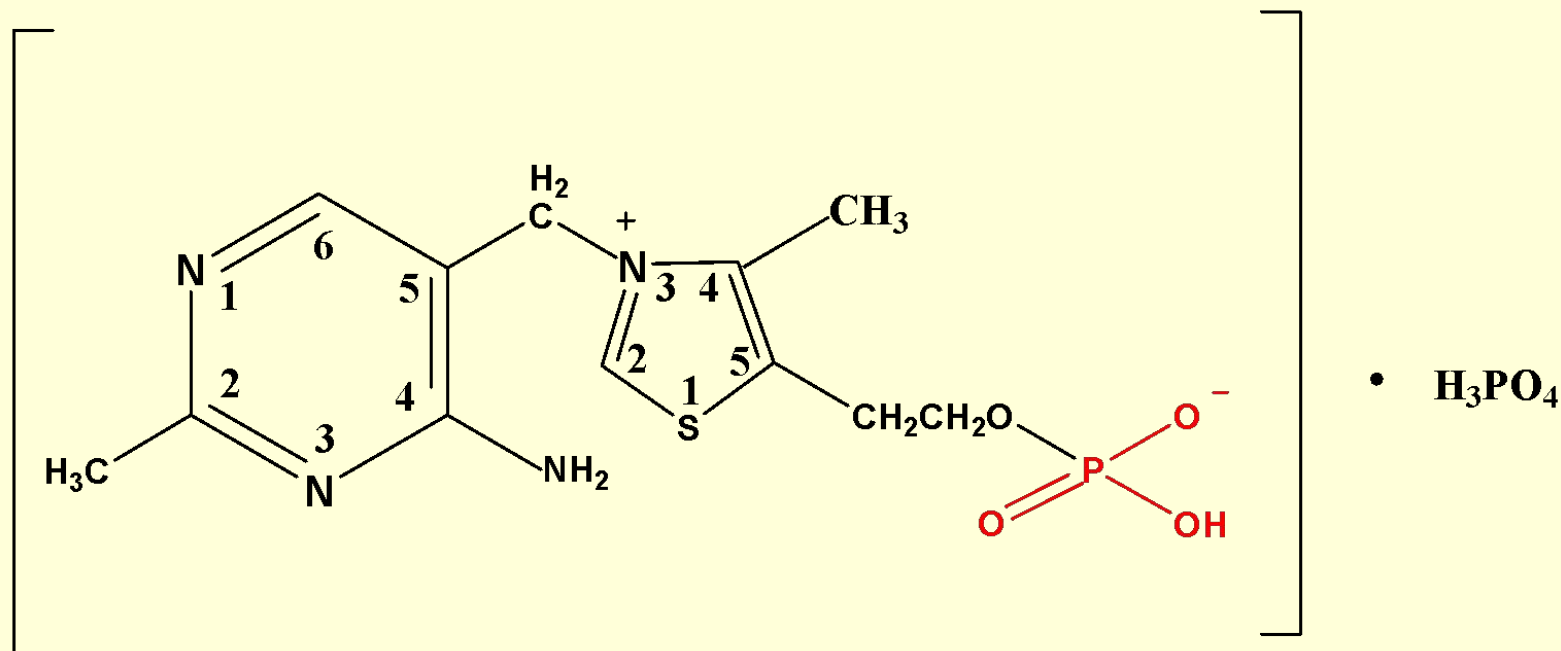
Описание: лиофилизированная сухая пористая, гигроскопичная масса белого цвета со слабым специфическим запахом, легко растворима в воде.

- *ко*ферментное, B_1 – витаминоподобное ЛВ;
- катализирует декарбоксилирование α -кетокислот;

Показания:

- невриты
- интоксикации
- почечная, печеночная, сердечная недостаточности
- ацидозы

4.2. Фосфотиамин *Phosphothiaminum* *Monophosphothiamine (МНН)*



Монофосфорный эфир- 4-метил-5b-оксиэтил-N-(2-метил-4-амино-5-метил-пиримидинил)-тиазолия фосфата

Описание: Белый кристаллический порошок кислого вкуса со слабым характерным запахом. Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте.

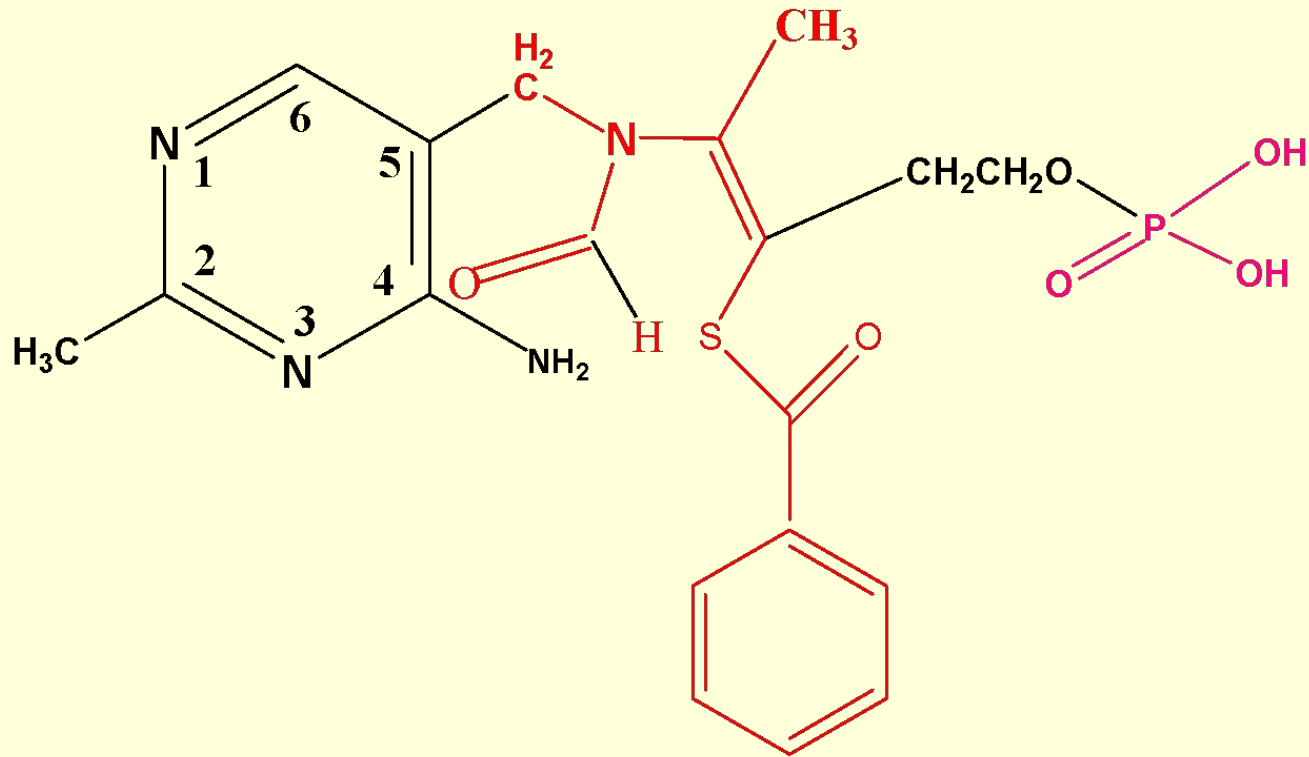
Применение в медицине

- больше депонируется в тканях организма (по сравнению с тиаминами);
- в меньшей степени разрушается ферментом тиаминазой;
- легче переходит в активную форму – кокарбоксилазу;
- менее токсичен

Показания

- невриты
- полиневриты (в том числе не связанных с В 1 -витаминной недостаточностью),
- при астенических состояниях,
- в качестве дополнительного средства при хронической недостаточности кровообращения,
- при хронических гастритах, сопровождающихся нарушениями двигательной и секреторной функций желудка
- форма выпуска: таблетки по 0,01 и 0,03 г в банках по 20; 50 или 100 штук

4.3. Бенфотиамин *Benfotiaminum*



N-[(4-амино-2-метил-5-пиримидинил)-метил]-*N*-(2-гидрокси-2-меркапто-1-метил)-*S*-бензоат-*O*-фосфат

Описание: белый кристаллический порошок со слабым характерным запахом. Практически нерастворим в воде и спирте.

Применение в медицине

- является синтетическим соединением, близким по строению и действию к тиамину и кокарбоксилазе;
- обладает B_1 -витаминной активностью, хорошо всасывается при приеме внутрь.

Показания

- при гиповитаминозе и авитаминозе B_1 и при других показаниях к применению витамина B_1 , а также кокарбоксилазы (дерматозы, хронический гепатит, функциональные расстройства нервной системы и др.).
- Форма выпуска: таблетки по 0,005 и 0,025 г в банках оранжевого стекла по 50 или 100 штук.

4.4. Идентификация фосфорных эфиров тиамин

Общие методы:

- образование **тиохрома**, бенфотиамин – после нагревания на водяной бане;
- обнаружение органически связанного фосфора после гидролиза в HNO_3 конц. с образованием ионов PO_4^{-3} :



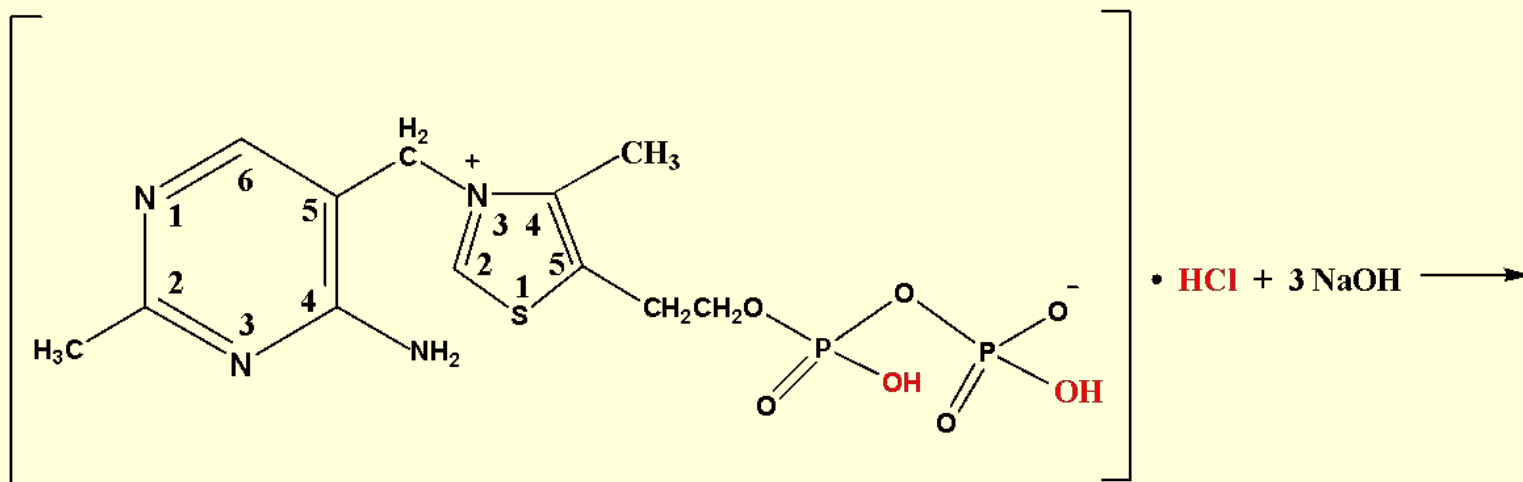
желтый кристаллический осадок

- ИК-спектроскопия: характерные полосы поглощения в области $3500-2500 \text{ см}^{-1}$;
- УФ-спектроскопия

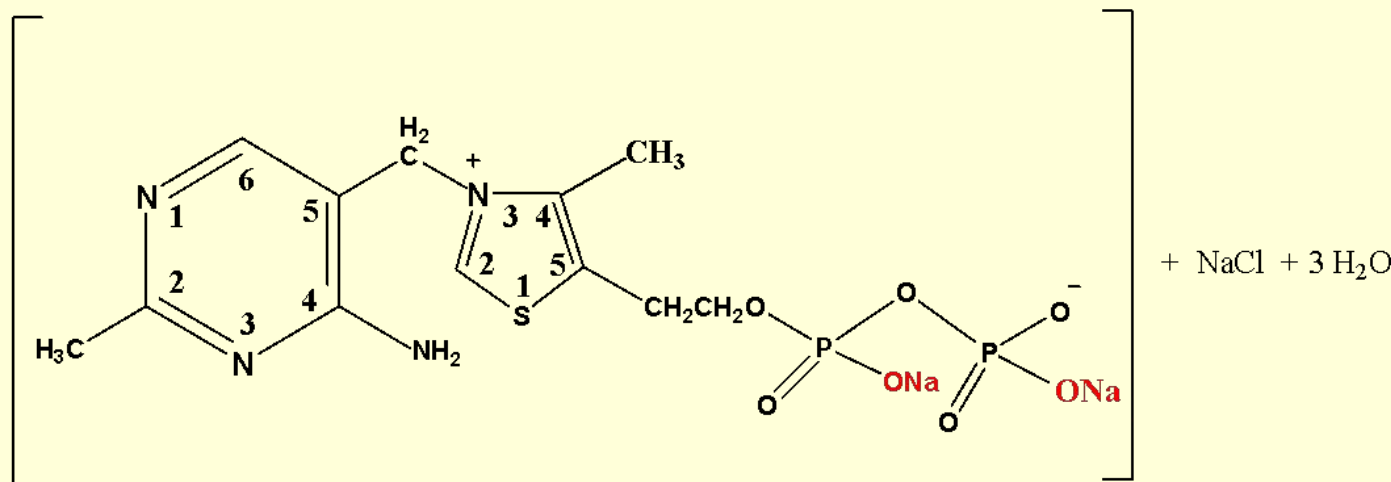
Дифференцирующие реакции -

- Основаны на различии **анионов** фосфотиаминина, кокарбоксилазы гидрохлорида – H_3PO_4 и HCl ;
- Идентификация бенфотиаминина по остатку *бензойной кислоты* после предварительного отщепления.

Количественное определение – алкалиметрия кокарбоксилазы гидрохлорида:



f=1/3



Лекционная задача

- Сделать вывод о качестве фармацевтической субстанции *Thiamini chloridum* по показателю «содержание действующего вещества» в соответствии с методикой *ГФ РФ XII*:
- Методика: Навеску субстанции 0,1579 г растворить в 5 мл муравьиной кислоты безводной, прибавить 50 мл уксусного ангидрида и титровать при интенсивном перемешивании 0,1 моль/л раствором хлорной кислоты с потенциометрической индикацией конца титрования.
- Объем титранта составил 9,46 мл; Mr 337,3.
Содержание действующего вещества не менее 98,5 % и не более 101,0%.
- написать уравнение химической реакции;
- рассчитать титр соответствия.