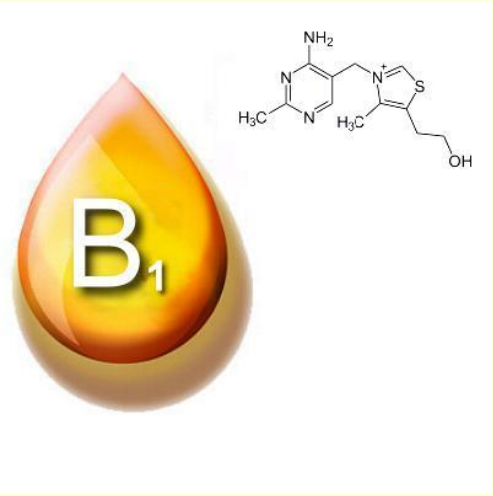


4 к -2013

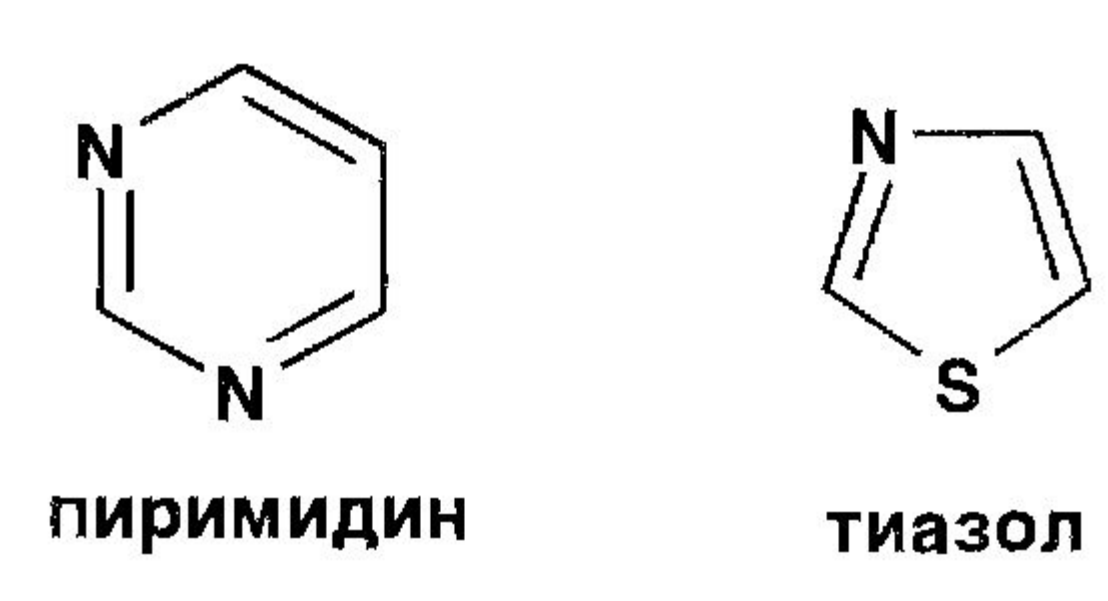
Лекция 7

Производные пирмидинтиазиола

Витамины группы В

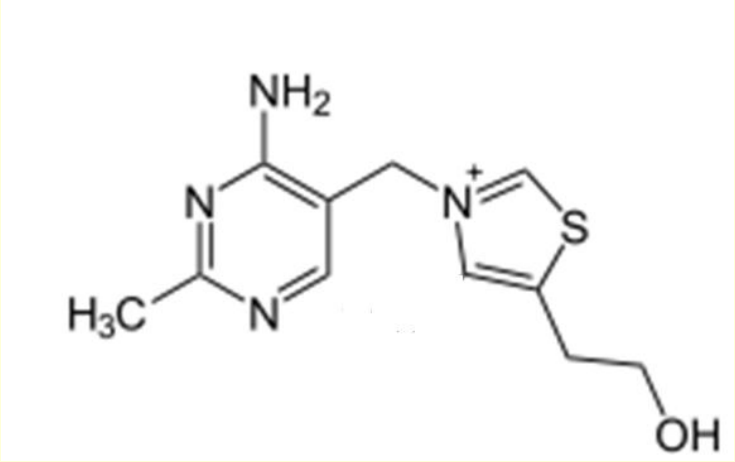
- Растворимы в воде.
- Совместно витамины группы В решают свою главную функцию — участие в тканевом дыхании и выработке энергии, играют важную роль в поддержании как ментального, так и эмоционального здоровья.
- Витамины группы В, за исключением цианокобаламина, нельзя накопить в организме, поэтому их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

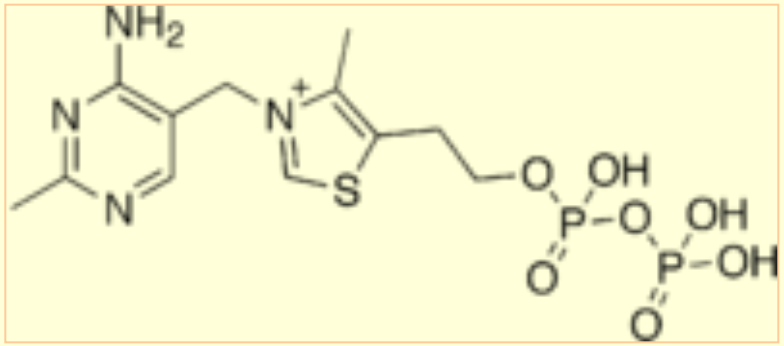
1. Основа химической структуры – два гетероцикла:



Они связаны между собой в молекуле метиленовой группой, поэтому ЛС относят к **пиримидинотиазоловым** или **пиримидилметилтиазолиевым** витаминам.

ТИАМИН –биологически активное соединение





пиримидин **тиазол** **тиаминпирофосфат**

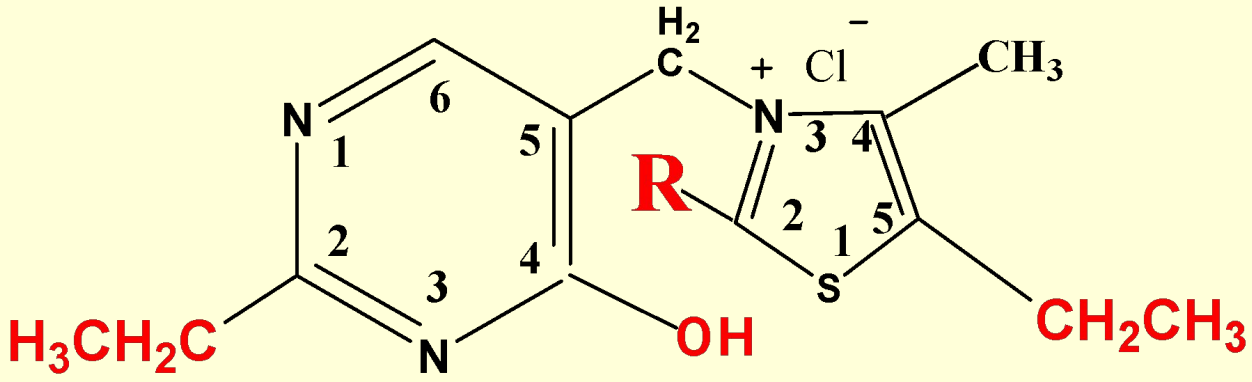
(тиаминдифосфат, кокарбоксилаза)

3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидил) метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метил-тиазол

- 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 тиамина ***основные свойства.***
- Тиамина хлорид, как и тиамина бромид, представляет собой *двойные соли,* образование которых обусловлено основными свойствами пиримидинового кольца и присутствием четвертичного азота в тиазоловом кольца.
- В положении С5 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 –NH_2-группы в пиримидиновом ядре на –ОН –группу ⟹ потеря витаминной активности;
- Замена –CH_3-группы в положении С2 на –C_2H_5 ⟹ активность повышается, но дальнейшее увеличение длины цепи - снижение активности;
- Замена –Н в положении С2 тиазолия на различные радикалы ⟹ потеря витаминной активности;
- Замена –C_2H_5OH – группы на алкильный радикал ⟹ потеря витаминной активности:



Источники витамина B1

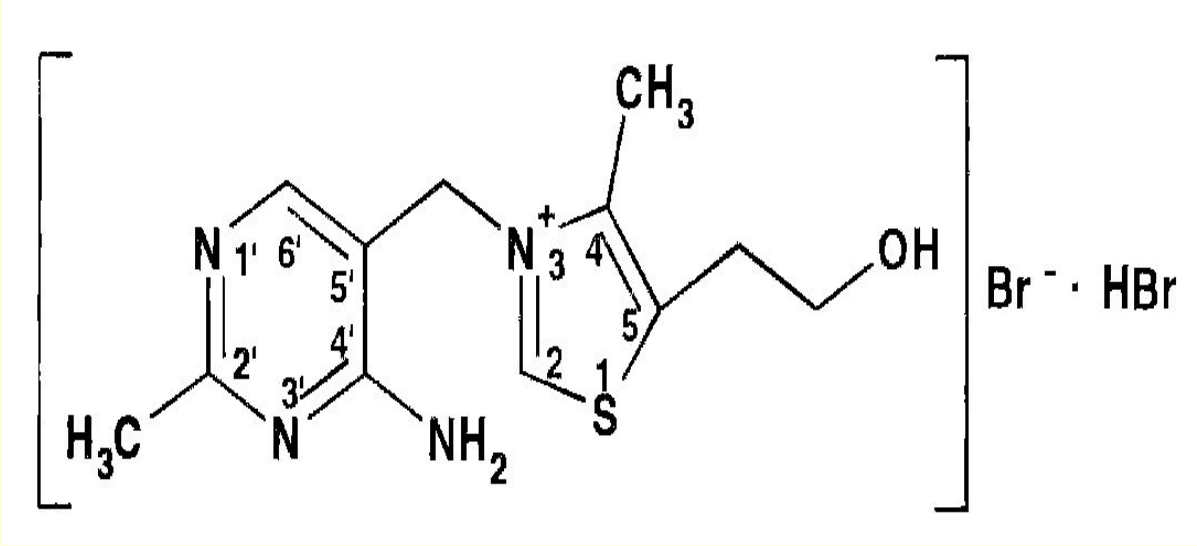
Тиамин содержится в дрожжах, зародышах и оболочках семян злаковых культур (пшеницы, овса, гречихи, кукурузы), а также в орехах, арахисе. Эти продукты могут служить источниками получения тиамина. Однако процесс извлечения сложен, а выход очень мал. Так, из 1 т дрожжей можно получить только около 0,25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

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

мыши 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

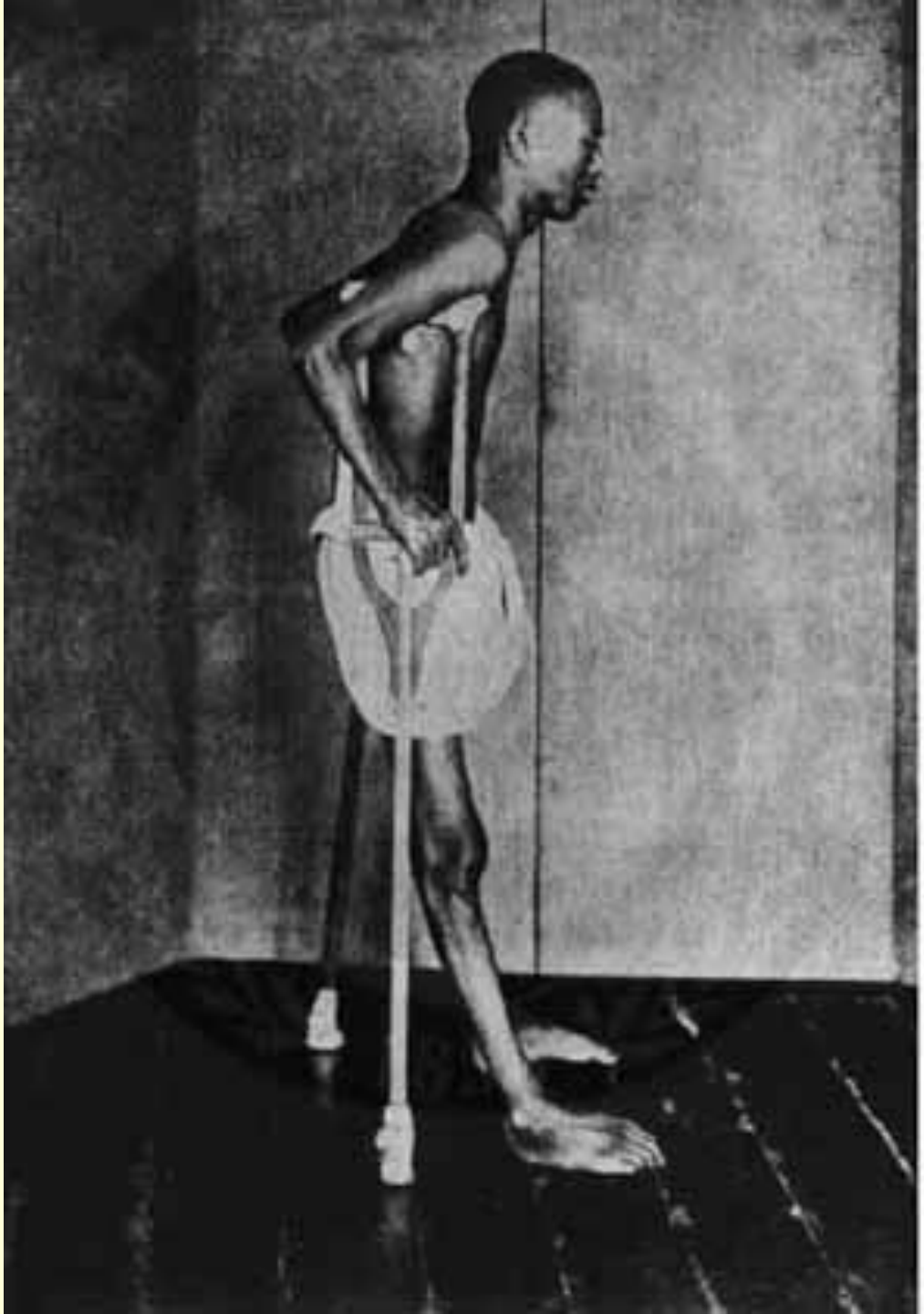
- Христиа́н Э́йкман Христиа́н Э́йкман предположил существование паралитического яда в эндосперме риса и полезных для организма веществ, излечивающих болезнь бери-бери в рисовых отрубях.
- За исследования, которые привели к открытию витаминов, Эйкман получил в 1929 году Нобелевскую премию в области медицины.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

Тиамин – витамин группы B_1

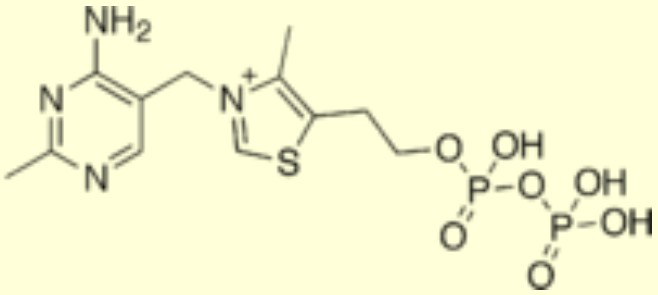
- Вещество, содержащееся в шелухе рисовых зерен, *излечивало кур и голубей от паралича.*
- После установления в структуре этого вещества атома серы оно было названо **тиамином** (греч. *тео* – сера) или *антиневритным* витамином.

- 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 ***«бéри-бéри».***



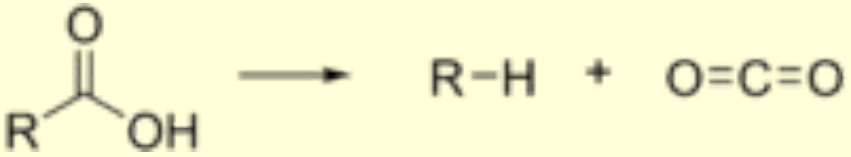
«Бе́ри-бе́ри» (в переводе с японского означает *«кожные оковы»*) - проявляется в виде *поражения двигательных нервов преимущественно нижних конечностей*.



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

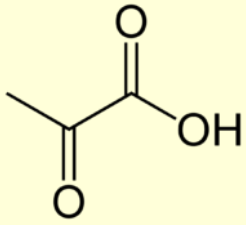
RMgX + CO_2 -> RCOOMgX -> RCOOH

карбоксилирование



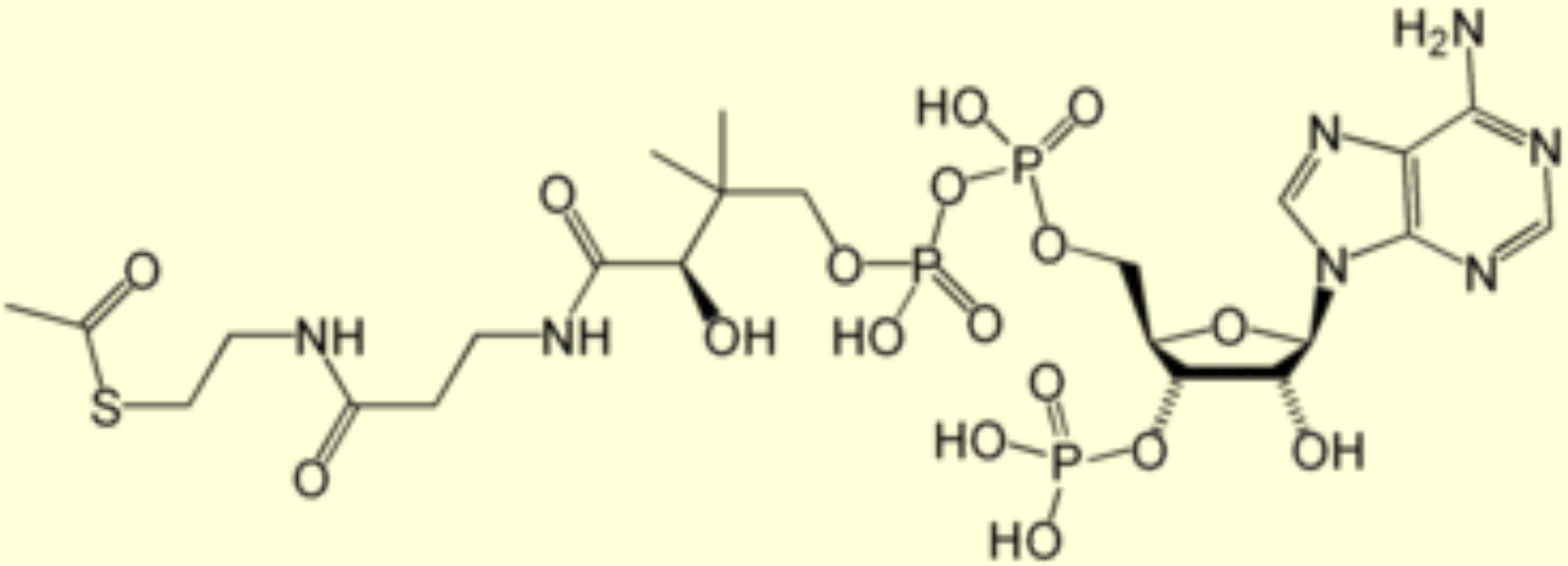
декарбоксилирование α-кетокислот (например, в превращении пировиноградной кислоты в ацетилкофермент А). Во всех случаях происходит разрыв С—С связи, смежной с кетогруппой субстрата.

декарбоксилирование α-кетокислот



Пировиноградная или 2-оксопропановая или α-кетопропионовая кислота

Тиамин принимает участие в синтезе Кофермента А

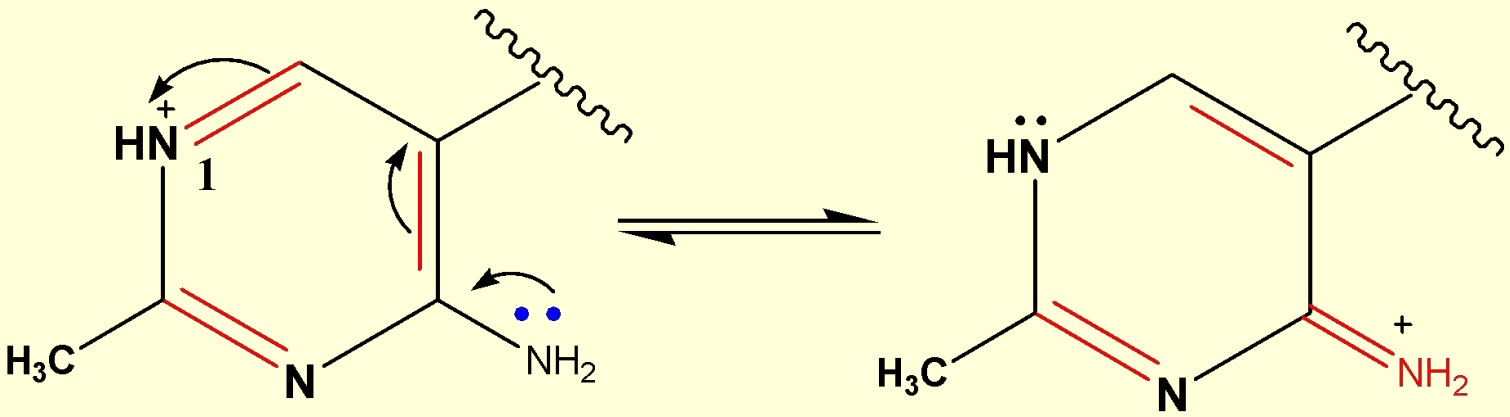


- ***Кофермент А (КоА)*** — **кофермент ацетилирования**; принимает участие в реакциях переноса **ацильных групп**.

Реакционная способность тиамина в средах с различным *pH*

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

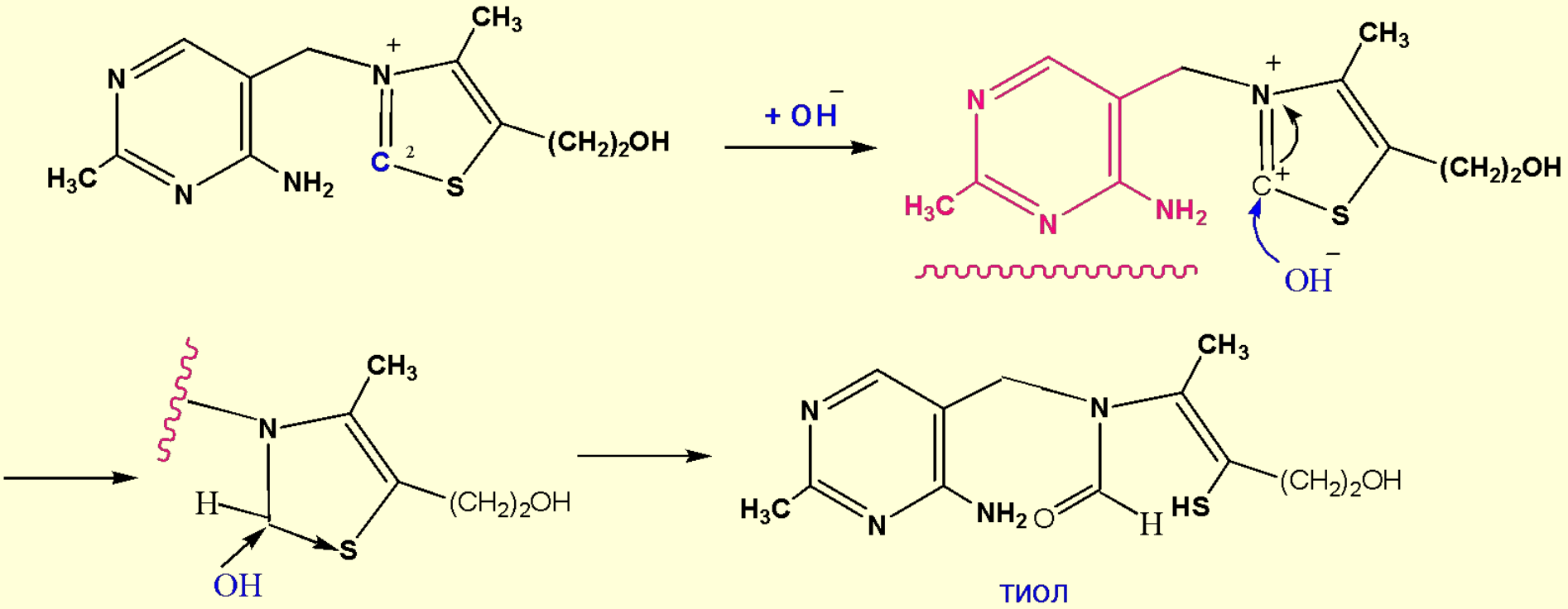
(не происходит разрушение и инактивация молекулы, биологическая активность сохраняется):



пиримидиний-ион **амидиний-ион**

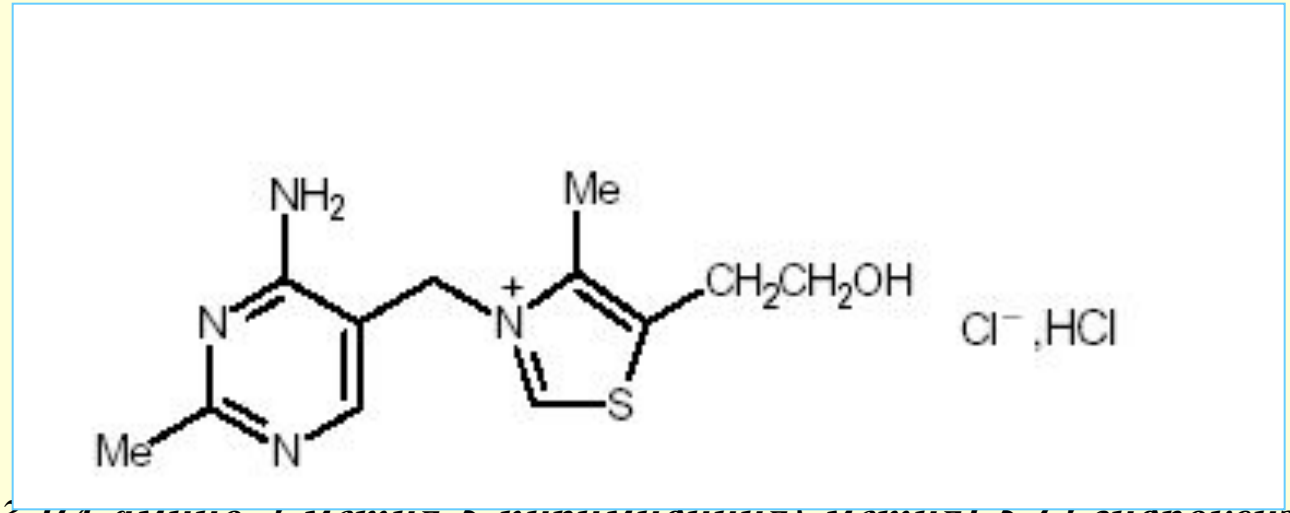
В щелочной среде

- 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 тиамина хлорида

Тиамина хлорид/ Thiamini chloridum/ Витамин B_1



PhEur

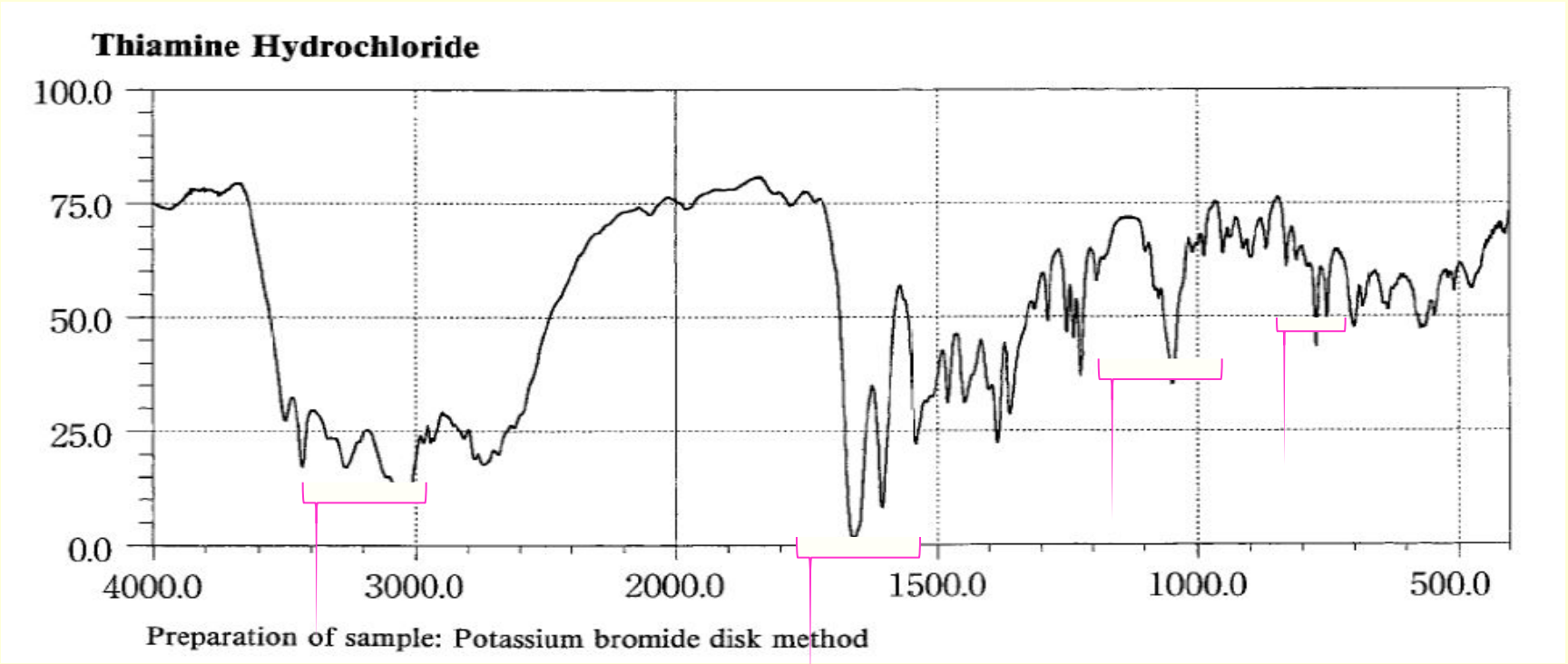
3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидинил)-метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метил-тиазолия хлорид гидрохлорид (или бромид гидробомид)

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

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

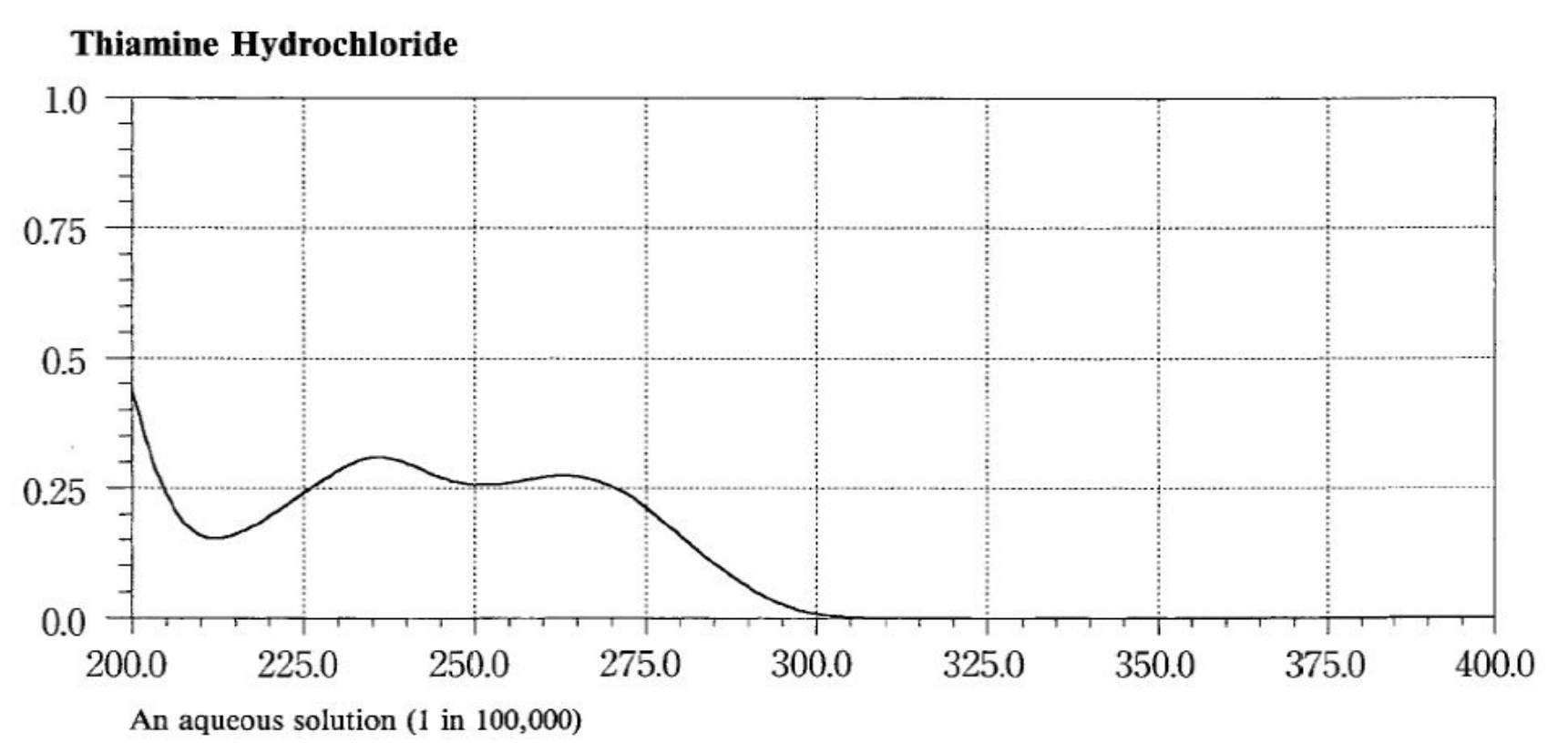
2.1. Определение подлинности

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



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

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 206-208^{0}С) с насыщенным раствором **пикриновой кислоты.**

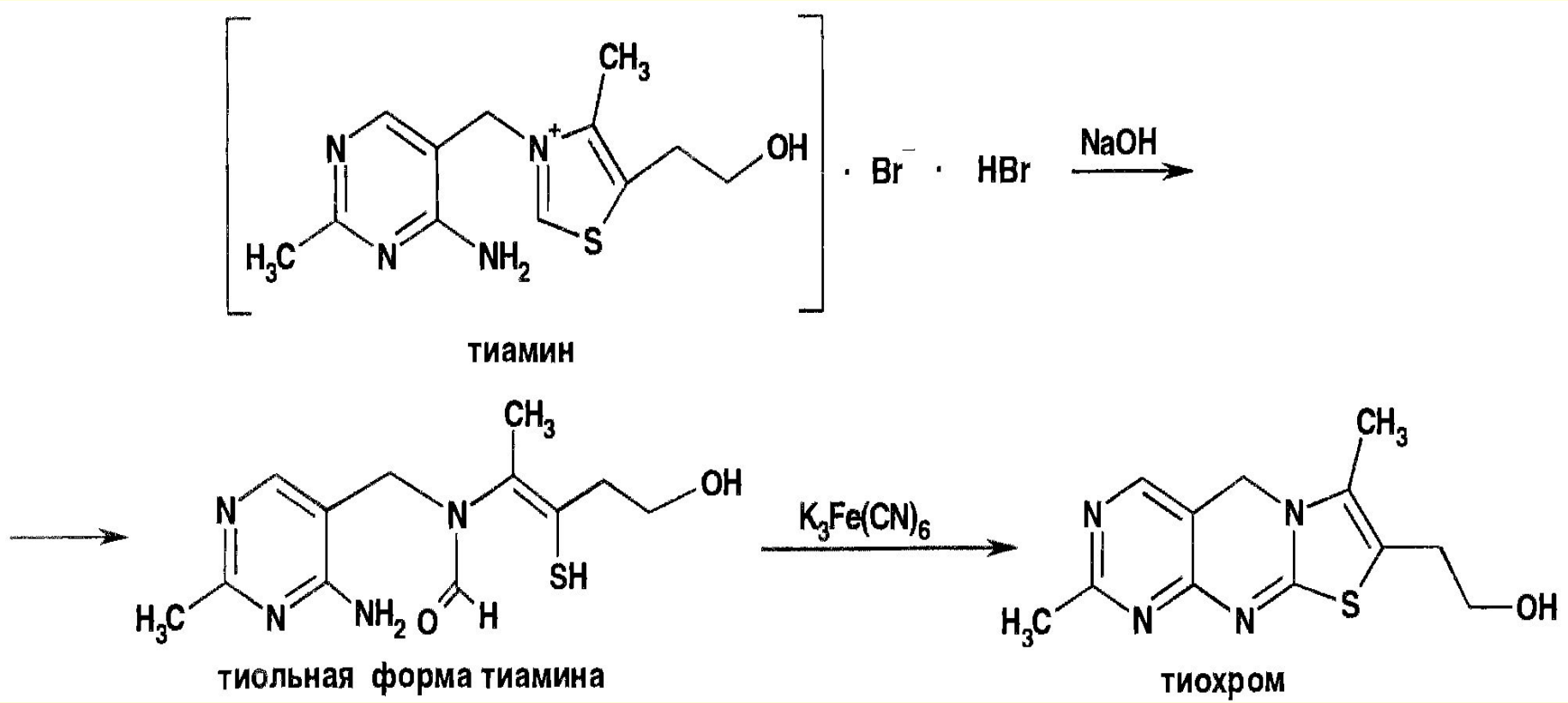
Среди окислительно-восстановительных особенно известна реакция образования ***тиохрома,*** протекающая в щелочном растворе.

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 (λ=365 нм).

Образование тиохрома



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 тиамина.

2.2. Оценка чистоты

- ***Прозрачность и цветность.*** Раствор тиамина (5 %), приготовленный на дистиллированной воде, свободной от углекислого газа, должен быть прозрачным и по цветности не превышать стандартный раствор. Цветность раствора тиамина 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:

  $FeSO_4 + NO + 5H_2O \rightarrow [Fe(NO)(H_2O)_5]SO_4$
- 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

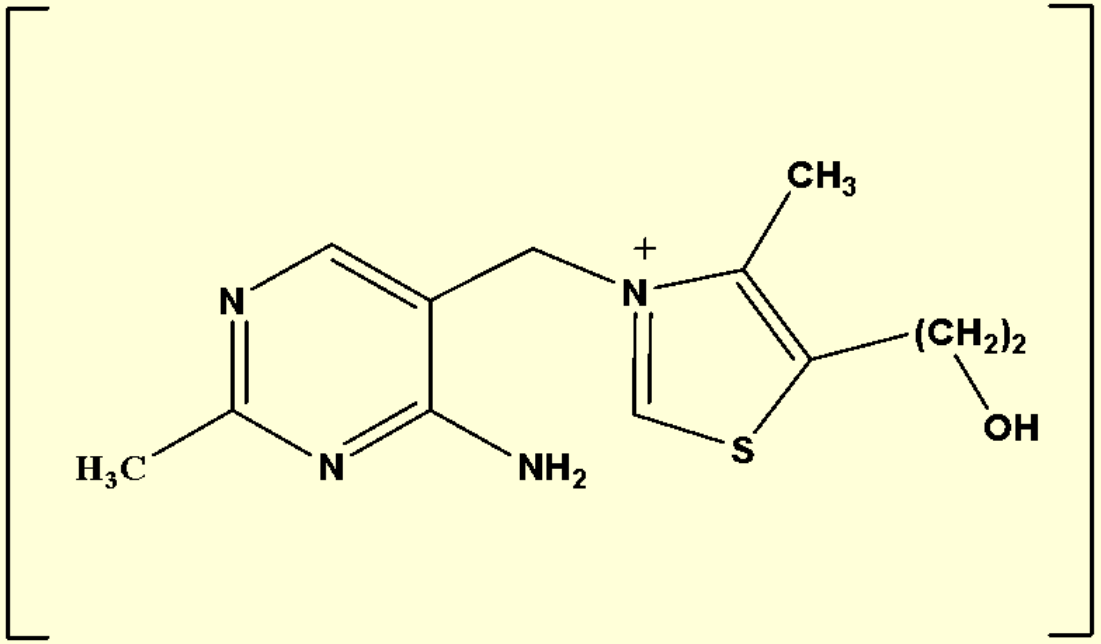
- кислотно-основное титрования в неводной и водной средах;
- аргентометрия;
- методы алкалиметрического и аргентометрического титрования могут быть использованы в качестве экспресс-методов количественного определения тиамина в лекарственных средствах.
- возможно также количественное осаждение тиамина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

Методика (EPh) алкалиметрического титрования:

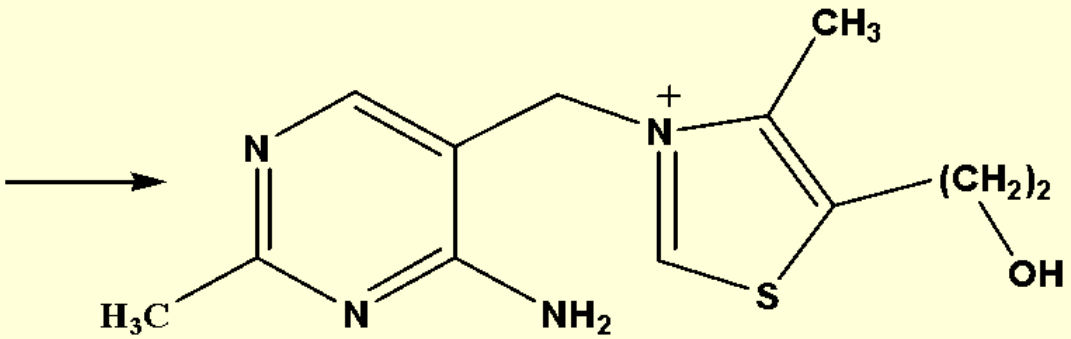
- *растворить 0,150 г субстанции в смеси из 5,0 мл 0,01 моль/л раствора HCl и 50 мл спирта этилового;*
- *проводят потенциометрическое титрование 0,1 моль/л раствором NaOH.*

1 мл 0,1 моль/л раствора NaOH соответствует 16,86 г $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$.

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

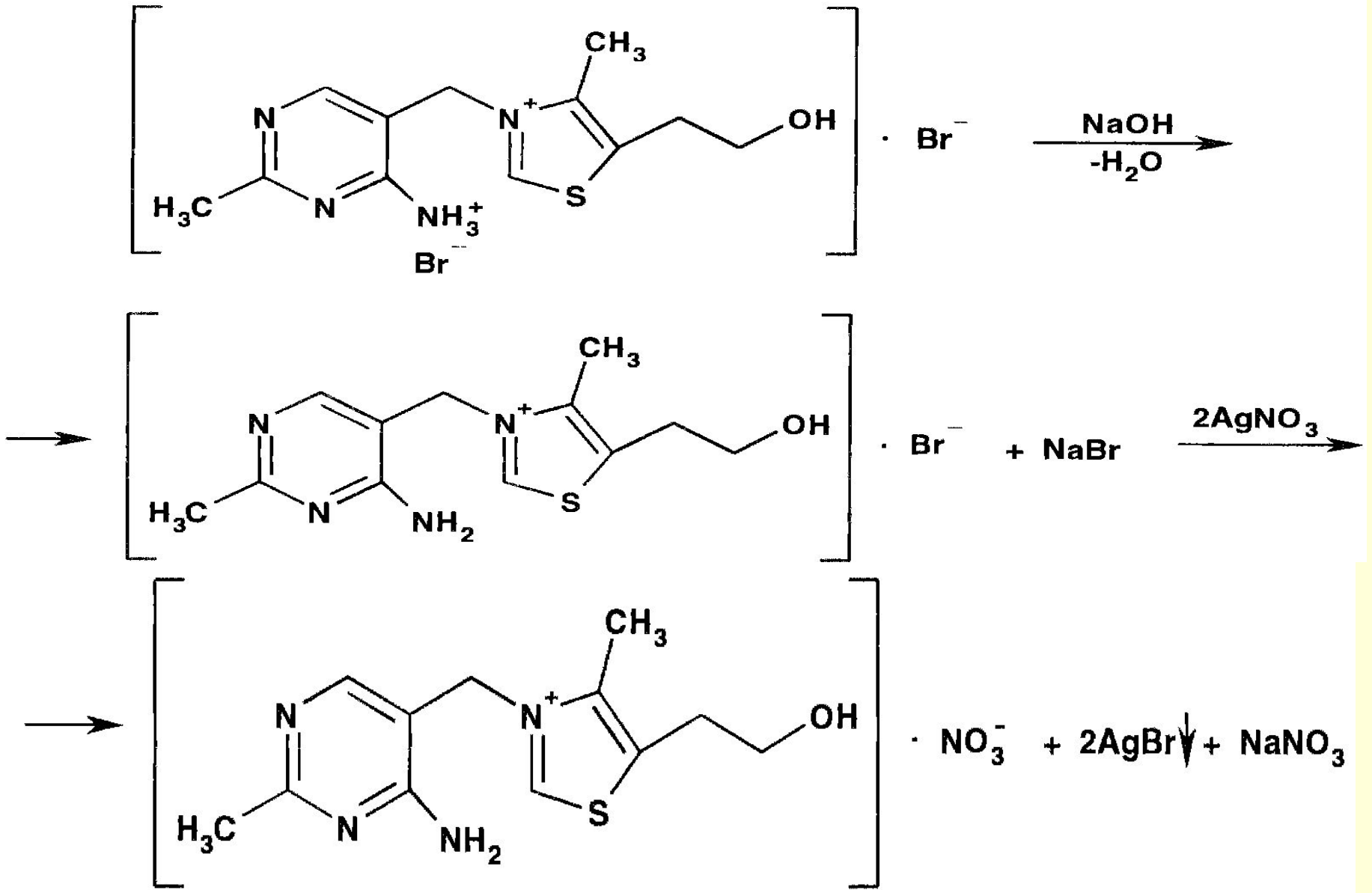


$\bullet\ Cl^{-} \bullet HCl + 2\ NaOH \longrightarrow$

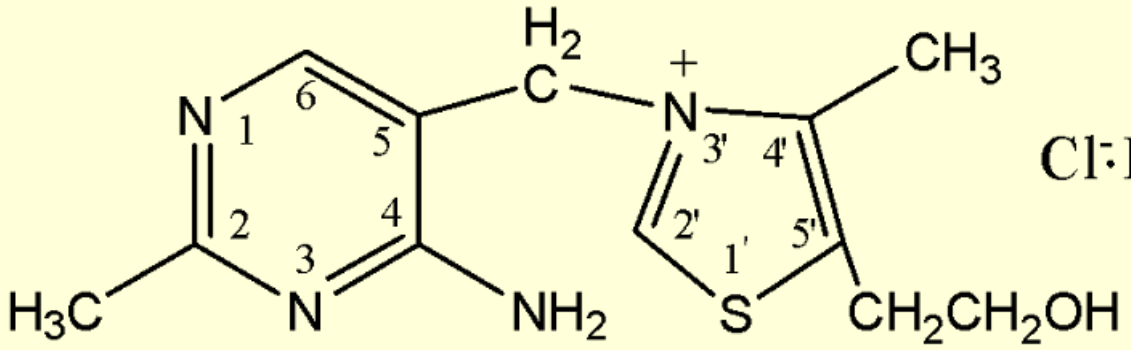


$\bullet\ OH^{-} + 2\ NaCl + H_2O$

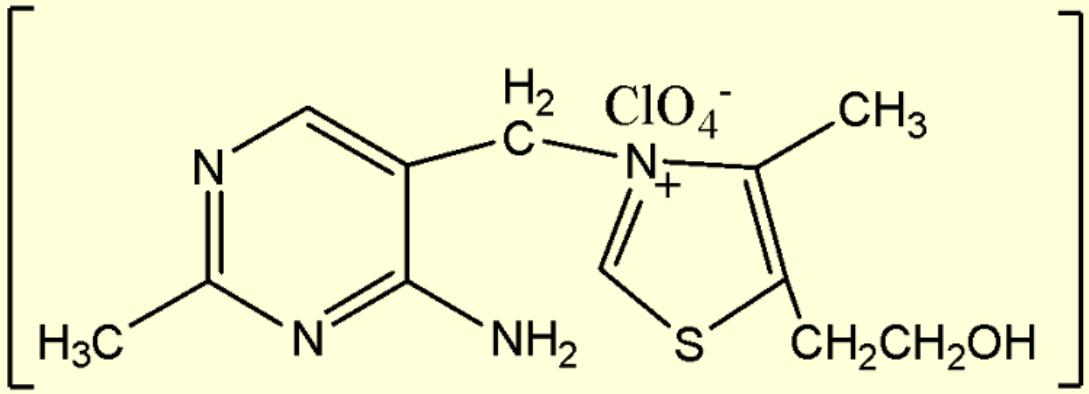
Аргентометрическое титрование



Неводное титрование



$$Cl^{-}\cdot HCl + 2\,HClO_4 \xrightarrow[4\,(CH_3CO_2)O]{HCOOH}$$



$$\cdot HClO_4 + 2\,CH_3COCl + 2CH_3COOH$$

Основание тиамина из растворов количественно осаждается

некоторыми осадительными (общеалкалоидными реактивами):

Фосфорновольфрамовая кислота осаждает тиамин из растворов солей. В образовавшемся фосфорновольфрамате затем обнаруживают наличиеприсутствие **серы и галогена.**

Реакция осаждения **кремневовольфрамовой кислотой** рекомендуется для **гравиметрического и фотонефелометрического определения** солей тиамина. Кремневольфрамат тиамина имеет состав: $2[C_{12}H_{17}BrN_4OS]SiO_2 \cdot 12WO_3$.

Гравиметрическое определения тиамина бромида

- Нагревание смеси водного раствора точной навески тиамина бромида, концентрированной HCl и 10% раствора кремневовольфрамовой 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

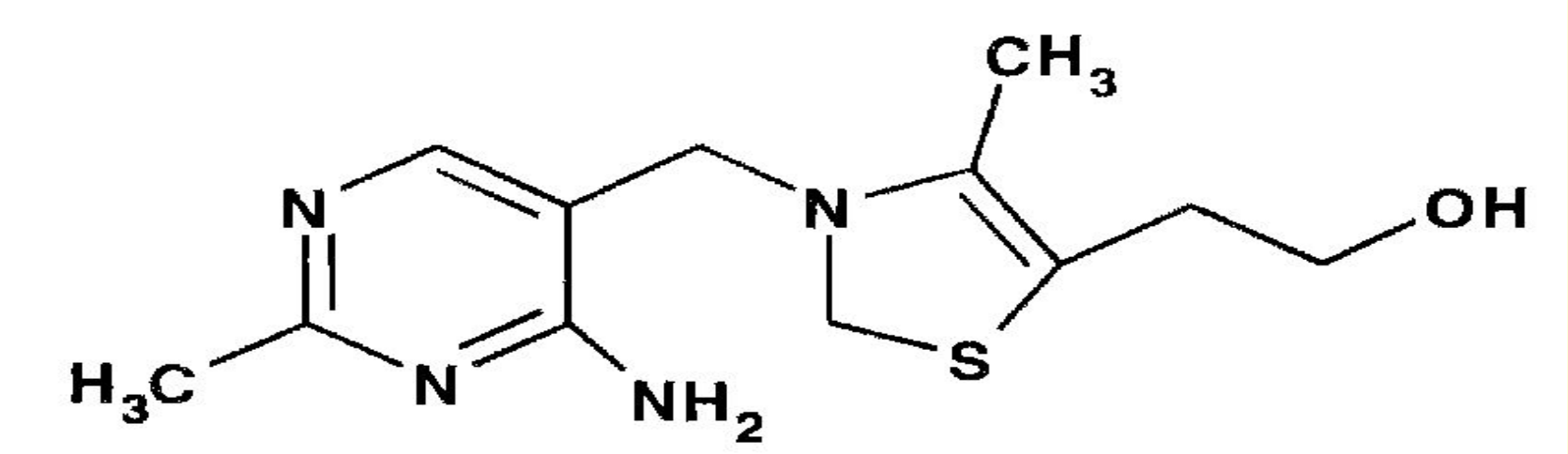
При участии специфического АТФ-зависимого фермента – тиаминпирофосфокиназы (в печени, в тканях мозга) – витамин В1 превращается в активную форму – тиаминдифосфат (ТДФ) - кокарбоксилаза.

Дозы

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

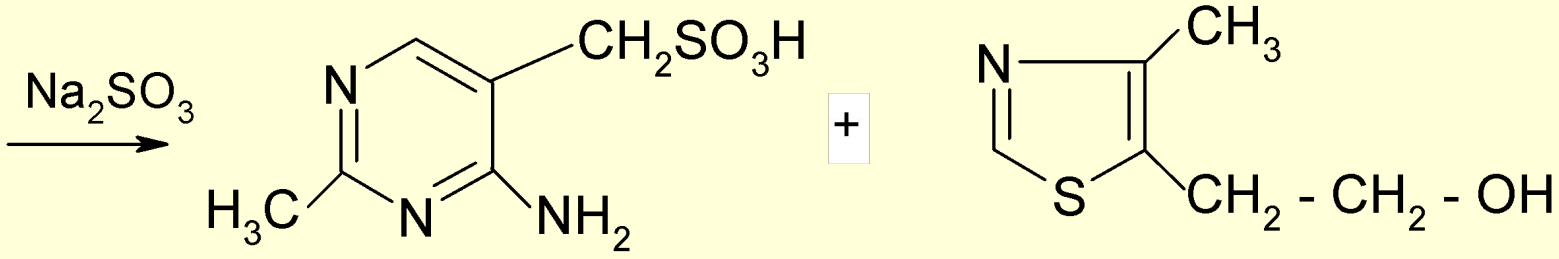
Хранение

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



Вспомогательные вещества

Тиамин



сульфокислота метил-амино-пиримидин

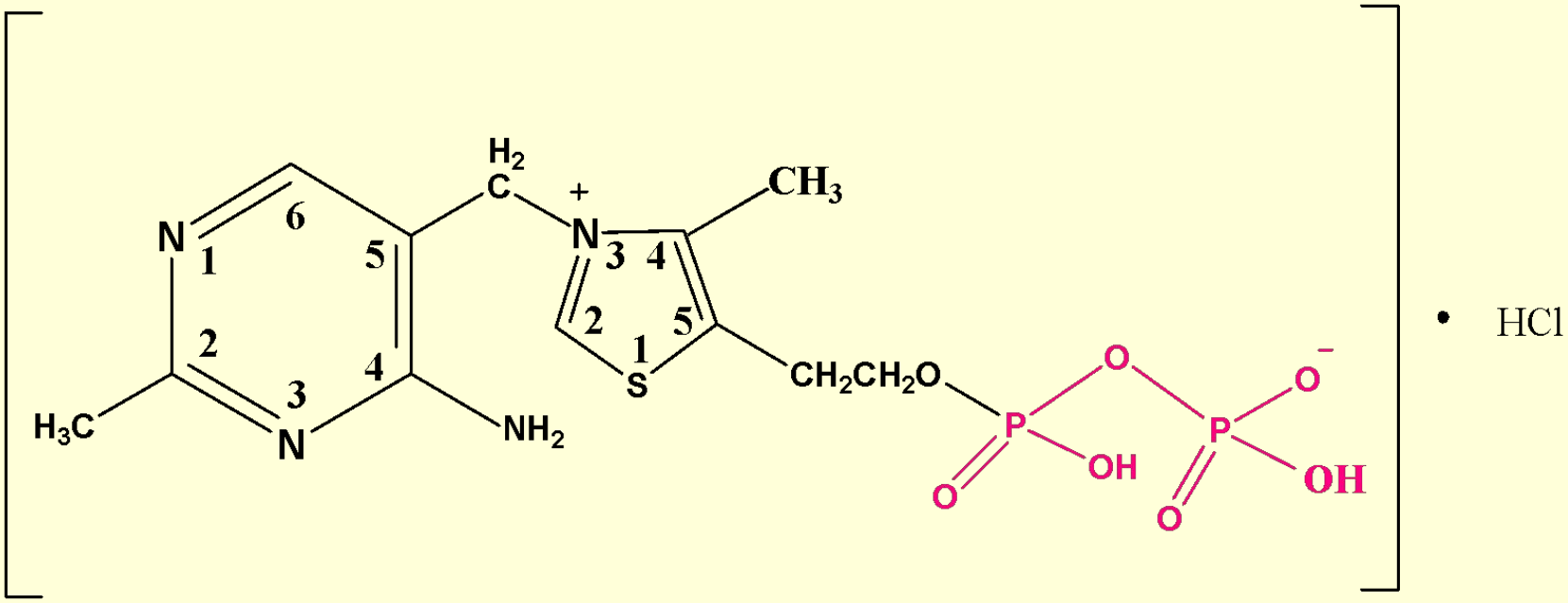
4-метил-5гидроксиэтилтиазол

4. Фосфорные эфиры тиамина

В медицине применяются:

- Кокарбоксилаза (в виде соли)
- Фосфотиамин
- Бенфотиамин

4.1. Кокарбоксилазы гидрохлорид
Cocarboxylase Hydrochloride



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

$C_{12}H_{14}ClN_2O_2P_2S$

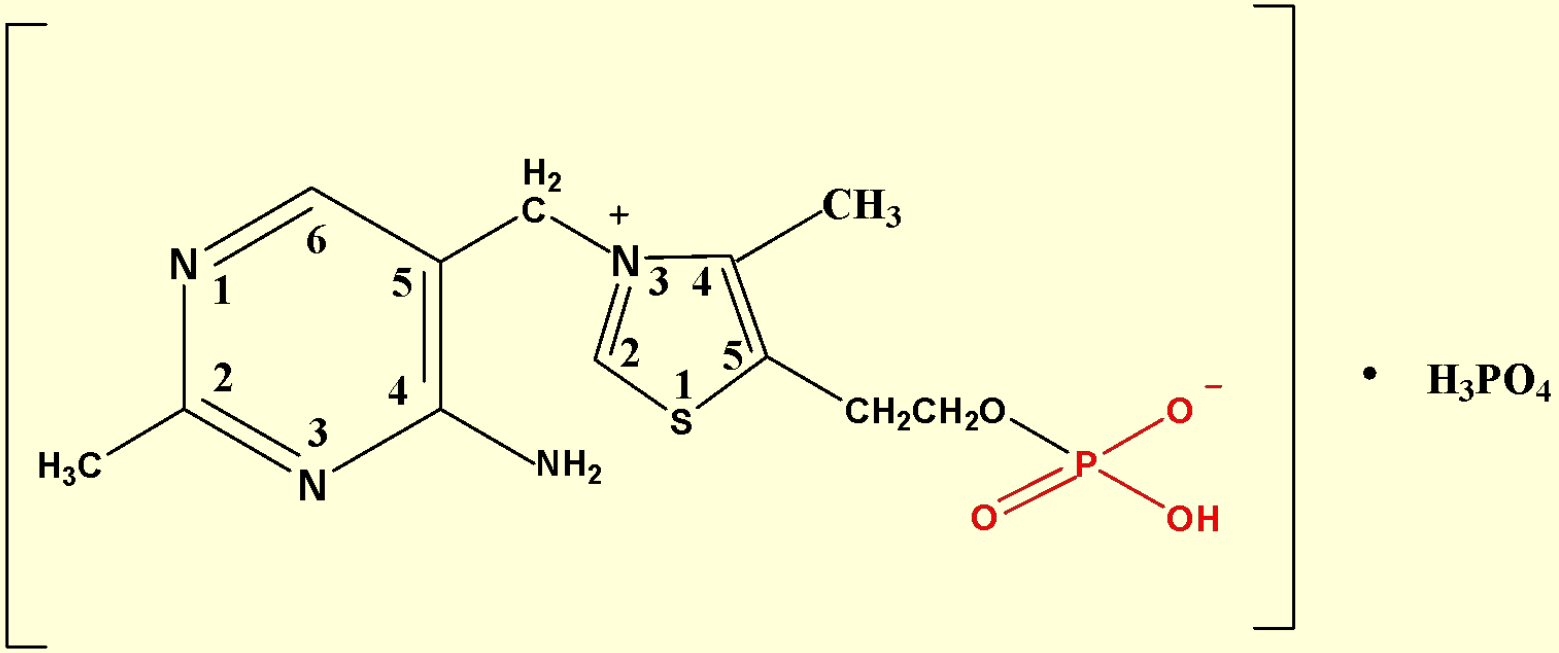
Описание: лиофилизированная сухая пористая, гигроскопичная масса белого цвета со слабым специфическим запахом, легко растворима в воде.

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

Показания:

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

4.2. Фосфотиамин *Phosphothiaminum*
Monophosphothiamine (MHH)



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.

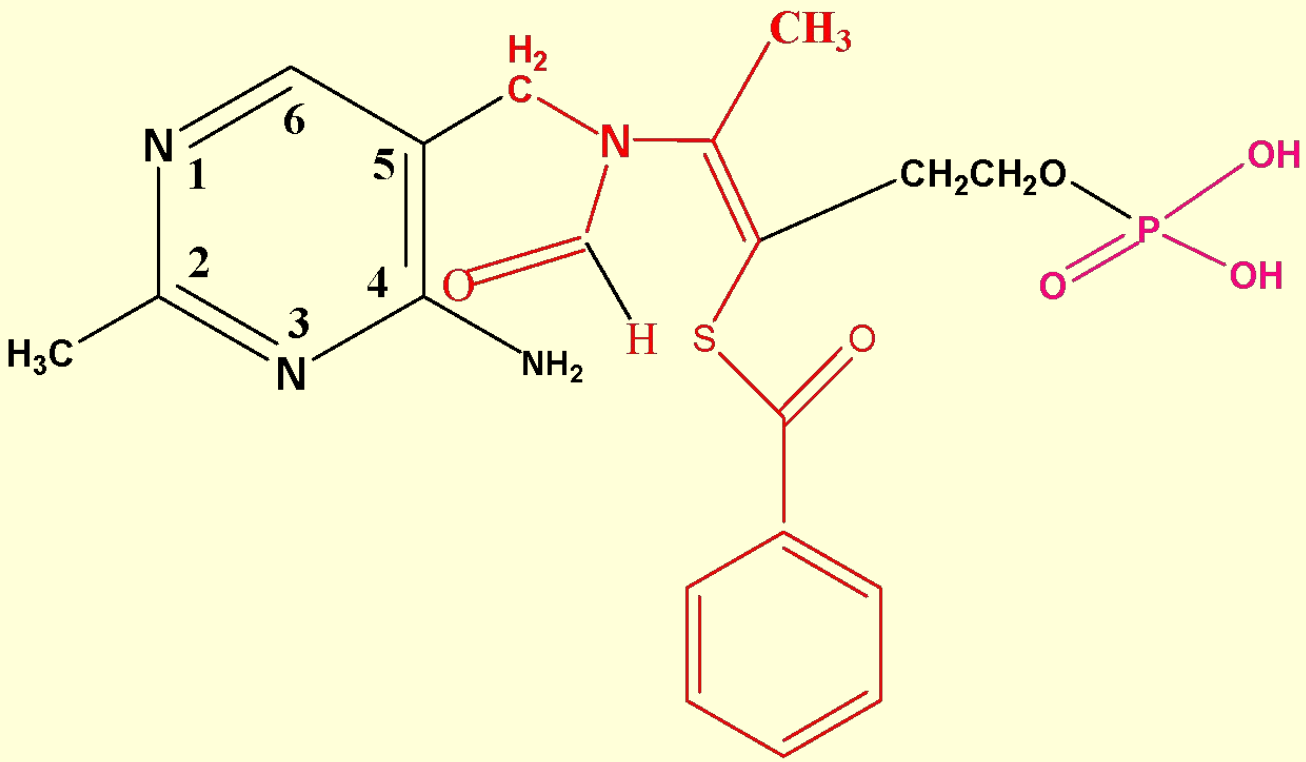
Применение в медицине

- 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-О-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 тиамина

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} :

$$H_3PO_4 + 12\,(NH_4)_2MoO4 + 21\,HNO_3 = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12\,MoO_3\downarrow + 21\,NH_4NO_3 + 12\,H_2O$$

желтый кристаллический осадок

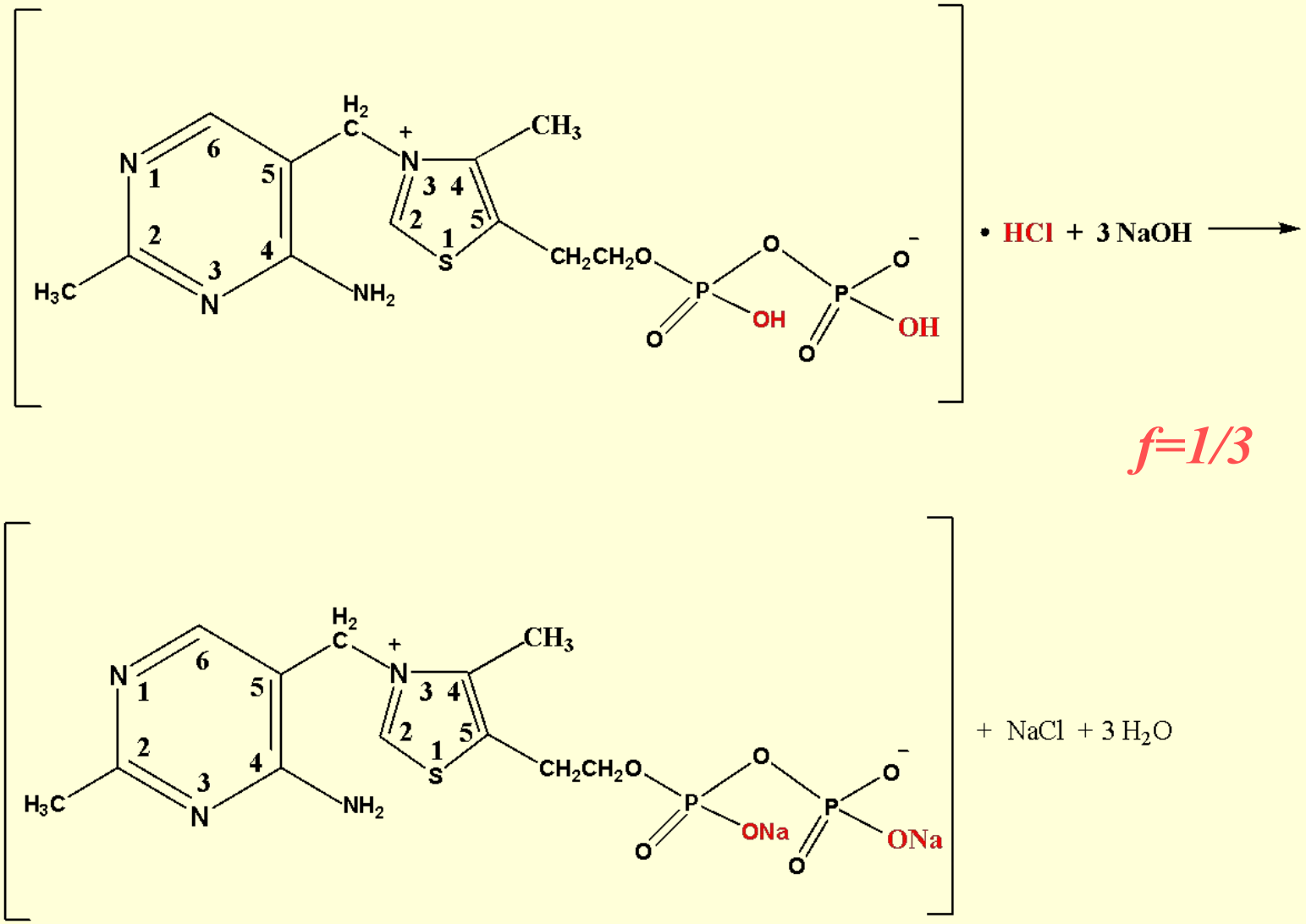
- ИК-спектроскопия: характерные полосы поглощения в области 3500-2500 $см^{-1}$;
- УФ-спектроскопия

Дифференцирующие реакции -

- Основаны на различии анионов фософотиамина, кокарбоксилазы гидрохлорида – H_3PO_4 и HCl;

- Идентификация бенфотиамина по остатку *бензойной кислоты* после предварительного отщепления.

Количественное определение – алкалиметрия кокарбоксилазы гидрохлорида:



Лекционная задача

- Сделать вывод о качестве фармацевтической субстанции *Thiamimi 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.