**Анализ лекарственных препаратов, содержащих производные пиримидин-тиазола (витамины группы В1 ): тиамина хлорид, кокарбоксилаза и бенфотиаминовые лекарственные формы.**

Основу химической структуры тиамина составляют пиримидиновые и тиазольные гетероциклы:

N

N

N

S

 **пиримидинтиазол**

В молекуле тиамина ядра пиримидина и тиазола соединены друг с другом через метильную группу. Следовательно, тиамин относится к пиримидиндиазольным или пиримидилметилтиазольным витаминам.

Заболевание, называемое бери-бери, возникает при гиповитаминозе витамина В1 . Люди, страдающие этим заболеванием, ощущают необычную тяжесть в ногах, кажется, будто их заменяют протезы. На начальном этапе больной пытается ходить на носочках, так как чувствует резкую боль в икроножных мышцах при касании пятками земли. Затем ноги и руки становятся парализованными, больной настолько расстроен, что похож на ободранный скелет. При тяжелом течении заболевания часто заканчивается летальным исходом.

Наблюдения и опыты, проведенные многими учеными в конце 19-начале 20 века, показали, что в рисовых отрубях и некоторых растениях, принадлежащих к семейству бобовых, есть фактор, излечивающий от этого заболевания. Из рисовых отрубей был получен даже активный препарат концентрата. Впервые витамин В 1 в кристаллической форме был выделен из дрожжей в 1931 году немецким химиком *Виндаусом Адольфом* . Поскольку молекула этого вещества содержит серу и аминогруппу, его назвали *тиамином .*

Тиамин или витамин В 1 в форме эфира фосфорной кислоты (кокарбоксилаза, тиаминдифосфат) образует коферментную часть тиаминовых ферментов, участвующих в метаболизме сахаров. Ферменты тиамина участвуют в реакциях декарбоксилирования пировиноградной кислоты (CH 3 COCOOH) и других α-кетокислот. Недостатоктиамина в организме вызывает накопление в клетках пировиноградной кислоты. Полиневрит возникает из-за токсического действия пировиноградной кислоты на нервные клетки и сердечную мышцу. Болезнь бери-бери представляет собой тяжелую форму периферического полиневрита и связана с поражением двигательных и чувствительных нейронов.

Тиамин содержится в продуктах растительного происхождения и микроорганизмов. В растениях (пшеница, рожь, горох, рис и др.) тиамин находится преимущественно в свободной форме, а в микроорганизмах (пивные дрожжи) - в фосфатированной форме. В злаках тиамин находится в основном в отрубях. Поэтому удаление отрубей приводит к снижению содержания витамина в пищевых продуктах.

молекула тиамина имеет оксиэтильную (R-CH2 -CH2 OH) группу, он образует простые и сложные эфиры. В настоящее время известно множество производных с тиаминовой активностью. Одна группа из них создана на основе тиаминтиола. В медицинской практике применяют тиамин-бромид и тиамин-хлорид. Тиамин-тиол можно легко превратить в тиамин-дисульфид (RSSR) на основе сульфгидрильной группы (R-SH). Тиамин-дисульфид равен тиамину по биологической активности и менее токсичен.

Так, наряду с тиамином многие его производные обладают активностью витамина В1 . Поэтому эти вещества образуют витамины группы В1 и обладают свойством превращаться в организме в тиамин.

Между строением молекулы тиамина и его биологической активностью существует очень тесная связь. Так, при определенных изменениях пиримидиновых и тиазольных остатков в молекуле тиамина витаминное свойство утрачивается и образуются даже антивитаминодействующие вещества. Например, при замене группы NH 2 в 4'-положении пиримидинового ядра на группу ОН полученное окситиаминовое вещество не только не обладает витаминной активностью, но даже является сильным антивитамином витамина В1 . При замене тиазольной части в молекуле тиамина на дигидро- и тетрагидротиазольные остатки он теряет свои витаминные свойства. При замене тиазольной части производным пиридина с сохранением функциональных групп пиритаминное вещество не обладает витаминными свойствами, оно даже является антивитамином витамина В1 .

Для синтеза препаратов тиамина сначала синтезируют пиримидиновый и тиазольный фрагменты, а затем их конденсируют.

1. Синтезировать пиримидин, ацетамид $α$и -ацетоксиметилен-$-β$

Цис-форма этоксипропионитрила конденсируется:



ацетамида $α$-ацетоксиметилен- 2-метил-4-амино-5- 2-метил-4-амино-5-бром-

 *β-* этоксипропионитрил этоксиметилпиримидин метилпиримидингидро-

бромид

1. Синтез тиазольного кольца на основе тиоформамида и бромацетопропилацетата

они делают:



тиоформамид бромацетопропил- 4-метил-5-4 $β$- $ β$метил-

ацетат ацетоксиэтилтиазол ацетоксиэтилтиазол

1. Пиримидиновые и тиазольные части 100-120, полученные на предыдущих стадиях$℃$

соединяются в одну молекулу при плавлении при комнатной температуре или при нагревании в органическом растворителе:

2

1

3

4

5

6

N

3

H

C

N

N

H

2

H

B

r

(

H

C

l

)

C

H

2

B

r

(

C

l

)

+

.

C

H

3

C

H

2

C

H

2

O

H

S

N

2

1

3

4

5

 2-метил-4-амино-5-бром(хлор) -4-метил-5β-оксиэтилтиазол

 -метилпиримидин-гидробромид

 (гидрохлорид)

2

1

3

4

5

6

N

3

H

C

N

N

H

2

C

H

2

+

0

C

H

3

C

H

2

C

H

2

S

N

2

1

3

4

5

1

0

0

-

1

2

0

C

O

H

B

r

H

B

r

v

ə

y

a

C

l

H

C

l

.

.

.

.

**Тиамин-бромид - Бромид тиамина**

**хлорид тиамина - хлорид тиамина**

2

1

3

4

5

6

N

3

H

C

N

N

H

2

C

H

2

+

0

C

H

3

C

H

2

C

H

2

S

N

2

1

3

4

5

1

0

0

-

1

2

0

C

O

H

B

r

H

B

r

v

ə

y

a

C

l

H

C

l

.

.

.

.

4-Метил-5-β-оксиэтил-N-(2-метил-4-амино-5-метилпиримидил)-тиазолия хлорид (бромид)-гидрохлорид (гидробромид)

 **Синтез.**

 Следует отметить, что тиамин также содержится в крупах, орехах, арахисе и т. д. доступны в природном сырье, и эти источники могут быть использованы для получения тиамина. Однако получение тиамина из этих источников представляет собой сложный процесс, и выход его очень низок. Например, из 1 т дрожжей можно получить всего 0,25 г тиамина. Поэтому в настоящее время препараты тиамина получают методом синтеза.

Оба препарата (тиамина бромид и тиамина хлорид) представляют собой белый кристаллический порошок. Бромид тиамина имеет бледно-желтый цвет. Имеют характерный запах (запах дрожжей). Они легко растворимы в воде, умеренно растворимы в спирте, практически не растворимы в эфире, ацетоне, бензоле и хлороформе. Тиамин представляет собой дикислотное основание (основность определяется аминогруппой в ядре пиримидина и атомом азота в ядре тиазола). Поэтому они образуют два типа солей — хлоридные и гидрохлоридные (бромидные и гидробромидные).

**Определение подлинности**

1) Проводят характерную для этих препаратов тиохромную реакцию. 0,05 г препарата растворяют в 25 мл воды. К 5 мл раствора прибавляют 1 мл гексацианоферрата калия (III), 1 мл растворов NaOH, 5 мл бутилового или изоамилового спирта, встряхивают и оставляют в покое. В верхнем слое наблюдается голубая флуоресценция в УФ-лучах; при подкислении раствора флуоресценция пропадает, а при подщелачивании вновь появляется. Предполагается, что тиохромная реакция протекает в несколько стадий. На первой стадии 1 моль HCl или HBr нейтрализуют щелочью. На 2-й стадии под действием щелочи образуется 2 моля тиамингидроксида (за счет азота тиазольного ядра). На 3-й стадии получают тиамин-тиоловую форму действием 3 молей щелочи:

T

i

a

m

i

n

N

a

O

H

N

N

3

H

C

N

H

2

N

C

O

H

S

H

C

C

H

2

C

C

H

3

C

H

2

O

H

C

H

2

t

i

a

m

i

n

-

t

i

o

l

I

I

I

m

ə

r

h

ə

l

ə

R3Fe(CN)6

C

H

3

C

H

2

C

H

2

O

H

S

N

N

N

N

3

H

C

-

2

H

2

O

t

i

o

x

r

o

m

2) к 5 мл раствора, приготовленного на шаге 1, прибавляют 1 мл соляной кислоты, 1 мл раствора хлорамина, 1 мл хлороформа и встряхивают; в слое хлороформа не должно быть желтого окрашивания. Эта реакция относится к иону бромида и отличает хлорид тиамина от бромида тиамина:

S

O

2

N

C

l

N

a

+

2

H

C

l

S

O

2

N

H

2

C

l

2

+

N

a

C

l

+

2HBr + Cl 2 →Br 2 + 2HCl

3) В 5 мл раствора, приготовленного в 1-м определении, проводят хлоридную реакцию.

дает белый осадок с насыщенным раствором HgCl 2 , красно-коричневый с 0,1 М раствором йода, желтый осадок с насыщенным раствором пикриновой кислоты (температура плавления 206-208 0 С).

5) 1% раствор препарата в воде дает желтую окраску с 15% раствором щелочи.

6) При обработке раствора тиамина 6-аминотимолом в щелочи образуется темно-желтая окраска.

В щелочной среде тиамин превращается в тиаминтиол, а 6-аминтимоил — в тимохинон. Затем тиаминтиол (R-SH) реагирует с тимохинонимином с образованием желтого производного типа индофенола.

2

1

3

4

5

6

N

a

O

H

C

H

3

C

3

H

C

H

C

H

3

C

H

O

H

C

H

3

N

2

H

C

3

H

C

H

3

O

N

H

 6-Аминтимол тимохинон

C

H

3

C

3

H

C

H

C

H

3

O

N

S

R

 тимохинона с тиамин-тиолом

 ауриновый краситель, который он производит

7) Тиамин с его солью реината аммония дает розовый осадок 1:1, растворимый в ацетоне при рН 4-5:

(C 12 H 17 N 4 OS)Cl - · HCl + NH 4 [Cr(NH 3 ) 2 (SCN) 4 ] → NH 4 Cl + HCl +

+ [C 12 H 17 N 4 Os] · [Cr(NH 3 ) 2 (SCN) 4 ]

Используя это определение, количество тиамина можно определить фотоколориметрически.

8) Как и другие тройные амины, тиамин окрашивается в красный цвет при нагревании на водяной бане с кристаллами уксусного ангидрида и лимонной кислоты. В результате пиролиза тиамина происходит конденсация за счет единственной аминогруппы в его молекуле:

2Р $-$НХ 2 $\rightarrow $R $-$NH $–$R + NH 3$\uparrow $

Поэтому при нагревании тиамина с диметилоксалатом в присутствии тиобарбитуровой кислоты получается красное вещество.

9) УФ-спектрофотометрия: 0,0015 % раствор тиамин-бромида в 0,1 М соляной кислоте дает максимальное поглощение при длине волны 246 нм, а 0,0025 % раствор тиамин-хлорида в воде дает максимальное поглощение при длине волны 237 и 262 нм.

10) ИК-спектроскопия: спектр тиамин-бромида и тиамин-хлорида, снятый в полях 4000-700 см -1 , должен быть таким же, как спектр стандартного образца.

**Определение чистоты**

Анализируют тиотиамин (промежуточное звено метаболизма тиамина). 0,2 г препарата растворяют в 5 мл воды, добавляют 1 мл прозрачного раствора HCl; не должно быть желтого окрашивания и не должна образовываться мутность в растворе.

C

H

2

N

S

C

H

2

O

H

C

H

2

C

H

3

N

3

H

C

N

H

2

N

S

Тиотиамин

**Количественная оценка**

Это делается несколькими способами.

1. Метод неводного титрования

Около 0,1 г (мин) хлорида (или бромида) тиамина растворяют в 20 мл безводной уксусной кислоты при слабом нагревании. После охлаждения раствора добавляют 5 мл раствора 2-ацетата ртути и титруют 0,1 М хлорной кислотой до изумрудно-зеленого цвета (индикатор-фиолетовый кристалл).

Параллельно проводят контрольный опыт (Т=0,01688 г/мл тиамин-хлорида и Т=0,02176 г/мл тиамин-бромида).

Тиамин-хлорид + Hg(CH 3 COO) 2 + 2HClO 4→

(или (C12H17N4OS) + Cl - $∙$HCl)

H

g

C

l

2

+

2

C

H

3

C

O

O

H

+

C

H

2

N

S

H

C

H

2

C

H

3

N

3

H

C

N

H

2

N

C

H

2

O

H

2

C

l

O

4

.

+

+

+

2) Метод нейтрализации (алкалиметрии)

Растворяют около 0,05-0,1 г (мин) тиамина хлорида (или бромида) в 10-15 мл воды и 0,1 М растворе NaOH до синей окраски (индикатор бромтимоловый синий) или до красной окраски (индикатор -фенолфталеин)) титруют (Т=0,03373 г/мл для тиамин-хлорида и Т=0,04352 г/мл для тиамин-бромида).

T

i

a

m

i

n

-

x

l

o

r

i

d

+

N

a

O

H

N

a

C

l

+

H

2

O

+

C

H

2

N

S

+

C

H

2

C

H

3

N

3

H

C

N

H

2

N

C

H

2

C

l

.

O

H

+

3) Метод аргентометрии (плитка)

(C 12 H 17 N 4 OS) + Cl - · HCl + 2AgNO 3→

→2AgCl↓ + (C 12 H 17 N 4 OS) + NO 3 - · HNO 3

Около 0,05 г (мин) тиамина хлорида (или тиамина бромида) растворяют в 10 мл воды и прибавляют по каплям 2—3 капли бромфенолового синего и уксусной кислоты до получения зеленовато-желтой окраски. Полученный раствор титруют 0,02 М раствором AgNO 3 до пурпурного окрашивания. Титр такой же, как и во 2-м определении.

4) Флуорометрический метод (на основе тиохромной реакции).

5) Определение количества тиамин-бромида также проводят гравиметрическим методом. Определение основано на осаждении тиамина кремниевой вольфраматной кислотой (SiO 2 ·12WO 3 ). Полученный осадок отделяют фильтрованием через стеклянный фильтр и сушат при 100-105 ° С. Состав осадка: SiO 2 · 12WO 3 · 2C 12 H 17 BrN 4 OS. Умножая количество осадка на 0,25, рассчитывают количество принятого препарата в процентах:

Количество осадка в граммах $∙$0,25 $∙$100

X% =

0,05%

Количество препарата должно быть не менее 98%.

В1 применяют для профилактики и лечения В1 гипо- и авитаминозов. Кроме того, витамины В1 полезны при лечении многих заболеваний (невриты, радикулиты, невралгии, периферические параличи, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, атония кишечника, заболевания печени, миокардиодистрофия, спазм периферических сосудов, зуд различной этиологии, пиодермия, экземы, псориаза, фурункулеза и др.) широко применяется в лечении.

Не рекомендуется одновременное введение витаминаВ1 с пиридоксином (витамин В6 ) и цианокобаламином (витамин В12) . Потому что цианокобаламин усиливает вызывающее аллергию действие тиамина, а пиридоксин затрудняет превращение тиамина в биологически активную форму - тиаминдифосфат.

тиамина хлорид 0,002; таблетки по 0,005 и 0,01 г; Растворы для инъекций 2,5 и 5% выпускают в ампулах по 1 мл.

Тиамин-бромидин 0,00258; таблетки по 0,00645 и 0,0129 г; 3% и 6% растворы для инъекций выпускают в количестве 1 мл. Высвобождение тиамин-бромида в несколько более высоких дозах связано с тем, что его молекулярная масса (Mk=435,2) выше, чем молекулярная масса тиамин-хлорида (Mk337,27). Следовательно, 0,00129 г (1,29 мг) тиамина бромида соответствует 0,001 г (1 мг) тиамина хлорида.

В 1 (0,014 г/л)и витамин В 2 (0,003 г/л) присутствуют вместе с белком в очищенных сухих пивных дрожжах (Faex medicalis).

Раствор **тиодина (Solutio " Tiodinum** ") содержит 12,5 мг тиамина бромида и 10 мг натрия йодида в 1 мл (применяется при радикулитах, заболеваниях ЦНС).

В1 входит в **состав** многих поливитаминных препаратов (**Пентовит**, **Гептавит** , **Декамевит** , **Аэровит** , **Гексавит** , **Ундевит**и др.).

В одном шприце нельзя смешивать витамин В1 с пенициллином или стрептомицином (антибиотики расщепляются), в том числе с никотиновой кислотой (витамин В 1 расщепляется).

 Препараты тиамина хранят в плотно укупоренной таре и в защищенном от света месте.

**Кокарбоксилаза-гидрохлорид**$-$

**Кокарбоксилазы гидрохлорид**

C

H

2

N

S

+

H

C

l

C

H

3

N

3

H

C

N

H

2

N

.

C

H

2

C

H

2

O

P

O

P

O

H

O

H

O

O

O

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

метилтиазолио *-0* -дисфосфоната гидрохлорид

или тиамин-дифосфат

Тиамин является коферментным препаратом. Участвует в углеводном обмене.

Представляет собой белый кристаллический порошок со слабым характерным запахом. Легко растворим в воде, практически не растворим в спирте.

**Определение подинности**

1) Проводят тиохромную реакцию.

2) Проводится реакция, связанная с фосфатами.

P

r

e

p

a

r

a

t

H

N

O

3

;

t

C

3

H

2

O

0

2

H

3

P

O

4

+

t

i

a

m

i

n

-

n

i

t

r

a

t

H 3 PO 4 + 12(NH 4 ) 2 MoO 4 + 21HNO 3→

→12H 2 O + 21NH 4 NO 3 + (NH 4 ) 3 PO 4 ·12MoO 3 ↓

 (желтый кристалл)

3) Определяют хлориды.

4) УФ-спектрофотометрия: 0,002% раствор препарата в воде дает максимальное поглощение при длине волны 246 нм.

5) ИК-спектроскопия: наиболее объективный метод различения кокарбоксилазы, тиамина, фосфотиамина и бенфотиамина. В ИК-спектре этих веществ, в том числе кокарбоксилазы, наблюдаются семь основных зон в областях 3500-2500 см-1. ИК-спектры вещества и стандартного образца должны быть идентичными.

**Определение чистоты**

Примеси фосфотиамина (не более 3%) в препарате проверяют.

**Количественная оценка**

1. Проводится методом нейтрализации (алкалиметрии).

0,25 г препарата растворяют в 100 мл воды в колбе вместимостью 250 мл, 8

добавьте каплю раствора тимолфталеина и титруйте 0,1 М раствором NaOH до слабой синей окраски.

 Параллельно проводят контрольный опыт (Т=0,01536 г/мл).

N

a

C

l

+

H

2

O

+

.

H

C

l

+

3

N

a

O

H

ə

s

a

s

K

o

k

a

r

b

o

k

s

i

l

a

z

a

O

O

O

O

N

a

O

N

a

P

O

P

O

C

H

2

C

H

2

C

H

2

N

S

+

N

C

H

3

N

3

H

C

N

H

2

+

1. Проводится методом УФ-спектрофотометрии (на основе 4-го определения идентичности).

0,05-0,1 г вводят в мышцу или вену при нарушениях функции сердечно-сосудистой системы и коронарных артерий.

хранят при температуре не выше +5 в защищенном от света месте. Максимальный срок хранения 1 год.

**Бенфотиамин - Бенфотиамин**

N

H

2

N

O

C

H

3

O

H

3

H

C

O

H

P

O

C

H

2

C

H

2

C

H

2

N

S

O

N

C

O

H

C

C

6

H

5

N- [(4-амино-2-метил-5-пиримидинил) -метил ]-N(2-гидрокси-2-меркапто-

-1-метил-1-бутенил)формамид- *S* -бензоат- *0* -фосфат

Белый кристаллический порошок , со слабым типичным запахом.

**Определение подлинности**

1) УФ-спектрофотометрия: раствор бенфотиамина в фосфатном буфере с рН 4,9-5,1 дает максимум поглощения при длине волны 244 нм и минимум при длине волны 225 нм.

2) Бенфотиамин не дает тиохромной реакции. Однако после нагревания 0,025 г препарата вместе с раствором 0,05 г цистеина гидрохлорида в 10 мл воды на кипящей водяной бане в течение 20 мин проводят тиохромную реакцию в 5 мл профильтрованного раствора:

C

H

N

H

2

C

O

O

H

C

H

2

S

H

B

e

n

f

o

t

i

a

m

i

n

+

S

C

C

H

2

C

H

C

6

H

5

N

H

2

C

O

O

H

+

t

i

a

m

i

n

-

t

i

o

l

-

f

o

s

f

a

t

O

3) В кокарбоксилазе-гидрохлориде это вторая реакция дает \_

**Количественная оценка**

Проводится спектрофотометрическим методом. Оптическую плотность его раствора в фосфатном буфере с рН 4,9-5,1 определяют при длине волны 244 нм. В качестве контрольного раствора берут фосфатный буферный раствор.

Используется как аналог тиамина. Выпускается в таблетках по 0,005 и 0,025 г.

Препарат хранят при комнатной температуре, в защищенном от света месте.