

Mehanizam oksidacije diazepama hipokloritnom kiselinom. Kvantno-kemijska studija.

Sremec, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:788232>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Helena Sremec

Mehanizam oksidacije diazepama hipokloritnom
kiselinom. Kvantno-kemijska studija.

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljuje Helena Sremec, studentica studija Farmacije na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Davora Šakića.

Zahvaljujem se primarno svom mentoru, doc. dr. sc. Davoru Šakiću, na strpljivim odgovorima na moja beskrajna pitanja i nejasnoće te dostupnosti u bilo koje doba dana kroz posljednje dvije godine.

Hvala i prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku za svo preneseno znanje prilikom pisanja rada za Rektorovu nagradu.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su sve ove godine strpljivo čekali da završim školovanje i u svakom mi trenutku bili podrška. Vaši su savjeti uvijek bili korak u pravom smjeru.

Hvala Luciji Božičević na svim savjetima i pomoći u rješavanju brojnih nedoumica. Bez tebe bi ovih pet godina bilo daleko dosadnije.

Hvala Denisu Mliviću, ramenu za plakanje, na podršci i smirivanju mojih iracionalnih paničnih ispada noć prije ispita. Nadam se da nećeš zamjeriti što sam te spomenula u zahvalama.

I na kraju, hvala ostalim prijateljima, kako s Fakulteta tako i van njega, na svim kavama, cugama, večerama i ostalim druženjima! Bez vas bi moj život bio nezamisliv.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Povijesni pregled	1
1.2. Sinteza benzodiazepina	2
1.3. Metabolizam diazepama.....	4
1.4. N-oksidi.....	5
1.5. Hipokloritna kiselina.....	8
1.5.1. Hipokloritna kiselina u otpadnim vodama.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Računalna kemija.....	12
3.2. Računalne tehnike.....	12
3.2.1. Geometrijska optimizacija, frekvencijski račun i intrizične reakcijske koordinate ...	12
3.2.2. Solvatacijski računi	13
3.3. Izračun energije	14
3.4. Računalne metode.....	14
3.5. Korištene metode i tehnike.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. OKSIDACIJA NA POLOŽAJU C3	17
4.2. N4 OKSIDACIJA.....	19
4.3. N1 DEMETILACIJA.....	21
4.3.1. Primarna oksidacija	21
4.3.2. Sekundarna oksidacija	25
4.3.3. Keto-iminolna tautomerija.....	28
4.4. OKSIDACIJA NORDIAZEPAMA NA POLOŽAJU C3	30
4.5. DEMETILACIJA TEMAZEPAMA.....	31
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK	37
8. SUMMARY	38

Životopis

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. UVOD

1.1. Povijesni pregled

Povijest benzodiazepina započinje sredinom 50-ih godina prošlog stoljeća u kompaniji *Hoffman-La Roche* gdje su znanstvenici predvođeni Leom Sternbachom počeli istraživati novu skupinu spojeva za pomoć pacijentima oboljelima od psihičkih poremećaja. Oni su do tada uglavnom ovisili o barbituratima, meprobamatu i klorpromazinu, (Sternbach, 1979.) lijekovima sa značajnim nuspojavama. Leo Sternbach i njegovi kolege su tražili novu skupinu spojeva za koju su željeli da bude relativno neistražena, uz veliku mogućnost modifikacija strukture, lako se pročišćava te biološki aktivna. Do 1960. godine kompanija je registrirala klorodiazepoksid kao *Librium* iza kojega je 1963. uslijedio diazepam registriran pod imenom *Valium*. Nakon njih je uslijedio svojevrsni *boom* ove terapijske skupine koja je postala zanimljiva brojnim kompanijama. Tako je u SAD-u u periodu 1965.-1977. registrirano šest lijekova – oksazepam (*Serax*, 1965.), flurazepam (*Dalmane*, 1970.), klorazepat (*Tranxene*, 1972.), klonazepam (*Clonopin*, 1975.), lorazepam (*Ativan*, 1977.) te prazepam (*Verstran*, 1977.). (Sternbach, 1979.) Jedna od najpoznatijih *date-rape* droga je flunitrazepam, registriran kao *Rohypnol*, također Sternbachova molekula. Kada je *Hoffman-La Roche* uvidio za koje se svrhe njihov lijek počeo koristiti, modificirali su formulaciju kako bi bila manje topljiva u vodi te su dodali boju koja bi piće obojila plavo kao upozorenje. (Wick, 2013.)

Kada su se pojavili, klordiazepoksid i diazepam su bili prava novost na tržištu – lijekovi za središnji živčani sustav, a koji ne uzrokuju depresiju respiracije, što je bio slučaj s barbituratima, osim ako se ne kombiniraju s nekom drugom supstancom (npr. alkoholom). Međutim, mehanizam djelovanja je još uvijek ostao nepoznat, a kada je otkriven, prepoznate su negativne strane primjene benzodiazepina. (Wick, 2013.)

Benzodiazepini su supstrati GABA_A receptora – pentamernog proteina koji u svojem središtu sadrži kanal kroz kojeg olakšanom difuzijom prolaze kloridni ioni. Njihovim ulaskom u neuron, dolazi do hiperpolarizacije neurona koji na taj način postaje manje podražljiv te je γ -aminomaslačna kiselina (GABA) u stvari inhibitorni neurotransmitor. Sami benzodiazepini ne otvaraju zatvoreni kanal (za razliku od barbiturata koji to rade u visokim koncentracijama), ali svojim vezanjem na tzv. benzodiazepinsko mjesto (između $\alpha 1$ i $\beta 2$ podjedinice) olakšavaju vezanje GABA-e i povećavaju frekvenciju otvaranja kanala. (Katzung, 2015.)

Zbog širokog spektra registriranih lijekova iz skupine benzodiazepina, indicirani su u terapiji brojnih problema vezanih uz središnji živčani sustav. Najčešće se upotrebljavaju kao

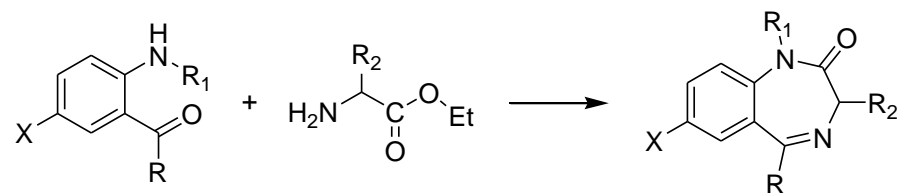
anksiolitici (uz što se veže o dozi ovisna sedacija i hipnoza), pogotovo diazepama kao primjera dugodjelujućeg benzodiazepina, dok se neki primjenjuju i kao antikonvulzivi, miorelaksansi ili anestetici. Diazepam se, primjerice, zbog svog svojstva izazivanja anterogradne amnezije koristi kao anestetik prilikom operacija ili nekih drugih invazivnih i bolnih medicinskih zahvata. (Katzung, 2015.)

O popularnosti ove skupine lijekova danas najviše govori njihova prisutnost na tržištu, odnosno potrošnja. Prema izvješću Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode iz 2018. godine, u 50 najkorištenijih lijekova po definiranim dnevnim dozama na 1000 stanovnika po danu, peto je mjesto zauzeo diazepam, dok je alprazolam zauzeo deseto mjesto. (www.halmed.hr, 2018.) Za razliku od 2017. godine, kada su ti lijekovi bili na petom, odnosno devetom mjestu (www.halmed.hr, 2017.), ponadali bismo se da Hrvati počinju smanjivati konzumaciju benzodiazepina. Međutim, kada se pogledaju definirane dnevne doze na 1000 stanovnika po danu, uviđa se povećanje definiranih dnevnih doza. Odnosno, iako su sada na nižim mjestima na ljestvici, broj doza se povećao, ali drugi su se farmaceutici počeli učestalije koristiti. Također su se na listu vratili oksazepam (48. mjesto) i alprazolam (47. mjesto) kojih prethodne godine nije bilo na listi najkorištenijih lijekova.

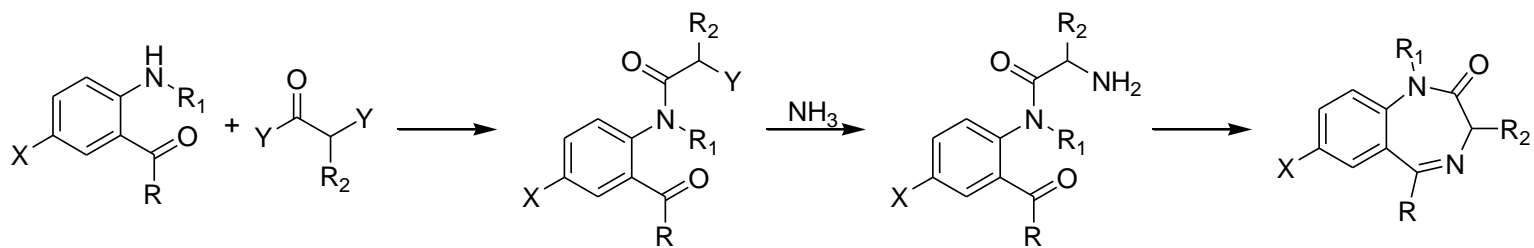
1.2.Sinteza benzodiazepina

Kao što je prikazano na shemi 1, postoje tri moguća puta sinteze 1,4-benzodiazepin-2-ona, a svima je zajednički ishodni spoj – 2-aminobenzofenon. Prvi sintetski put se odvija preko direktnog nastanka benzodiazepin-2-ona digeriranjem aminobenzofenona glicinskim esterom. Drugi sintetski put, iako ima više koraka, omogućava veću raznolikost produkta te iste daje u većem iskorištenju. U njemu se ishodni spoj haloacetilira, a dobiveni se spoj tretira s amonijakom. Tako nastali aminoacetamid ciklizira do željenog produkta. Treći sintetski put je put sličan prvome, samo se umjesto glicina koriste najčešće njegovi derivati (karbobenzoksiglicin, karbobenzoksiglicil klorid, karbobenzoksiglicin anhidrid) ili ftalimidoacetil klorid. Funkcija derivata je što imaju skupine koje zaštićuju glicin, a koje se u procesu uklanjaju i na koncu daju željeni spoj. Na shemi 1, X i Y predstavljaju halogene, dok su R, R₁, R₂, i R₃ bilo koji alkilni lanci ili arilne skupine. (Archer i Sternbach, 1968.)

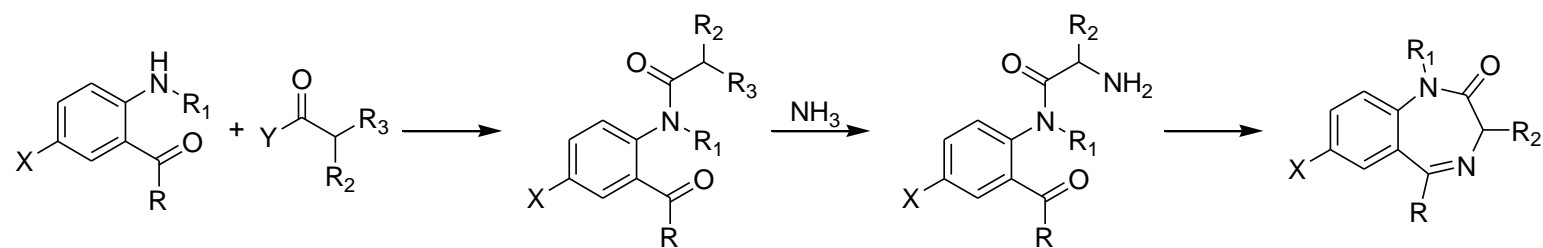
1. put sinteze



2. put sinteze



3. put sinteze

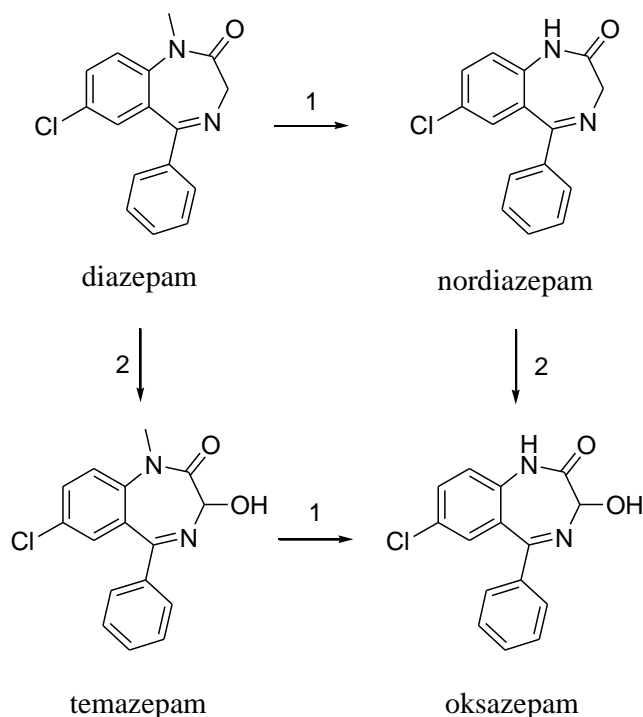


Shema 1: Tri potencijalna puta sinteze benzodiazepina

Zaključno, želimo li sintetizirati, primjerice, diazepam, supstituent X će nam biti klor, R₁ metil, a R fenilna skupina. S obzirom da je diazepam nesupstituiran na položaju C3, ulogu R₂ bi preuzeo vodik.

1.3. Metabolizam diazepamama

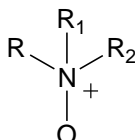
Diazepam je dugodjelujući benzodiazepin što može prvenstveno zahvaliti svome metabolizmu, odnosno, činjenici da nastaju aktivni metaboliti. Diazepam u najvećoj mjeri podliježe reakcijama N1-demetilacije te C3-hidroksilacije koje kataliziraju različiti enzimi porodice citokroma P450. Obje reakcije mogu katalizirati CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 te CYP3A5, dok u N1-demetilaciji može sudjelovati i CYP2C18. (Medić-Šarić i Rendić, 2016.) U literaturi se mogu pronaći podaci da se 30% primijenjene doze diazepamama izlučuje nepromijenjeno, 32% kao oksazepam, 15% kao temazepam, a 12% kao nordiazepam. (Greenblatt i sur., 1989.) Na shemi 2 su prikazane navedene reakcije i pripadajući im metaboliti. Svi navedeni metaboliti su biološki aktivni te registrirani lijekovi (u Hrvatskoj samo diazepam (www.halemd.hr) i oksazepam (www.halmed.hr), dok su temazepam (www.medicines.org.uk) i nordiazepam (www.drugs.com) dostupni u nekim europskim državama).



Schema 2: Hepatički metabolizam diazepamama

1.4.N-oksidi

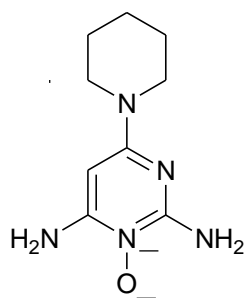
N-oksidi, odnosno amin oksidi, su spojevi dobiveni oksidacijom tercijarnih amina uz pomoć vodikovog peroksida ili drugih oksidansa u vrlo često visokim iskorištenjima. Kod njih kisik zadržava negativni, dok dušiku ostaje pozitivni naboj. (Wade i Simek, 2016.) Takvi su spojevi manje bazični, ali izraženije polarnosti u odnosu na same tercijarne amine. (Bickel, 1969.) Na slici 1 je prikazana općenita struktura N-oksida.



Slika 1: Opća struktura N-oksida

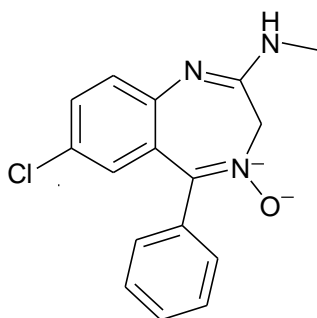
Trimetilamin je primjer jednog lako hlapljivog tercijarnog amina koji se pojavljuje u nekim vrstama ribe i daje im karakterističan miris. On se u ljudskome tijelu enzimom flavin-moonoksigenaza (FMO) pretvara u svoj N-oksid koji je teško hlapljiv. Ljudi koji imaju autosomalno recesivno nasljeđivan genski polimorfizam FMO3 enzima (te stoga bojuju od trimetilaminurije) ne mogu u potpunosti metabolizirati supstrat. Iz tog se razloga nakon konzumacije hrane bogate kolinom trimetilamin može pronaći u njihovom zadahu, znoju i urinu te ti ljudi imaju karakterističan miris po ribi. (Mitchell i Smith, 2001)

Od registriranih lijekova u upotrebi, minoksidil (slika 2) i klordiazepoksid (slika 3) su oni koji u svojoj strukturi sadrže N-oksid. Minoksidil je primarno je razvijan kao antihipertenziv samo za one najteže slučajeve hipertenzije kada su se svi ostali vazodilatatori pokazali neučinkovitima te je utvrđeno da pad tlaka tijekom terapije korelira s njegovom visinom prije terapije. Odnosno, osobi čiji je dijastolički tlak prije terapije ispod 85 mmHg, minoksidil isti neće sniziti. Danas minoksidil ima daleko veću primjenu zbog tada zamijećene nuspojave – rasta dlaka. On je danas to najčešći pripravak za liječenje različitih tipova alopecije iako se o samom mehanizmu djelovanja lijeka u toj indikaciji još i danas debatira. (Mfuh i Larionov, 2015)



Slika 2: Struktura minoksidila

Već spomenuti klordiazepoksid je benzodiazepin s N-oksidom u strukturi. Kao i svi benzodiazepini veže se na $GABA_A$ receptor te se koristi u terapiji anksioznosti koja uključuje opsesivno-kompulzivni poremećaj, fobije i napadaje panike te akutni sindrom ustezanja kod alkoholizma. (Katzung, 2015.)



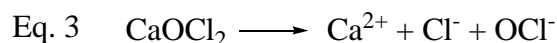
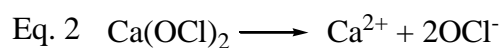
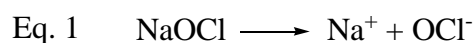
Slika 3: Struktura klordiazepoksida

Osim kao lijekovi, N-oksidi su prisutni kao metaboliti istih te intermedijeri metaboličkih reakcija. N-oksidi su polarniji od svojih ishodnih molekula što im omogućuje izlučivanje putem bubrega, brzo reduciranje u netoksične spojeve te su terapijski većinom inaktivni. Primjer lijeka čiji je N-oxid aktivan (iako u organizmu nastaje u zanemarivim količinama) je imipramin, triciklički antidepresiv. U tabeli 1 su navedeni lijekovi čiji su produkti metabolizma, između ostalih, i N-oksidi te enzimi koji tu reakciju oksidacije kataliziraju.

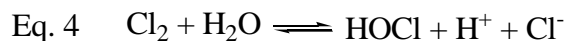
1.5. Hipokloritna kiselina

Hipokloritna kiselina je slaba kiselina koja nastaje otapanjem klora u vodi. Ona, odnosno njen ionski oblik su najčešći dezinficijensi vode koji se danas koriste. Prve dezinfekcije vode se pojavljuju u 19. stoljeću u Engleskoj tijekom epidemija vodom prenosivih bolesti. Tako je John Snow 1850. godine pokušao upotrijebiti otopinu hipoklorita kako bi dezinficirao vodu koju je opskrbljivala pumpa na Broad Streetu u Londonu tijekom epidemije kolere. Sims Woodhead je također iskoristio istu otopinu kao privremenu mjeru sterilizacije pitke vode u Kentu tijekom epidemije tifusa 1897. (Black & Veatch Corporation, 2009.)

Za primjenu kao dezinficijensi, mogu se koristiti otopine natrijevog ili kalcijevog hipoklorita ili se pak plinoviti klor uvodi u vodu. U prvom se slučaju odvijaju sljedeće kemijske reakcije:



U drugome slučaju dolazi do disproporcioniranja molekule klora što prikazuje Eq. 4:



U oba će se slučaja otpustiti OCl^- ioni koji će u kontaktu s protonima dati hipokloritnu kiselinu (tj. ravnotežu te kiseline i njene konjugirane baze), prema sljedećoj jednadžbi: (Black & Veatch Corporation, 2009.)



I hipokloritna kiselina i hipokloritni ion su jaki oksidirajući agensi koji pri fiziološkom pH reagiraju s brojnim biološkim molekulama uključujući proteine, lipide i DNA. Klor je u hipokloritu elektrofil te napada nukleofilne dijelove molekule kao što su amino-skupine, purinske baze, peptidne ili nezasićene C=C veze. S obzirom da je u hipokloritnoj otopini hipokloritna kiselina u ravnoteži sa svojom konjugiranom bazom (gore navedena jednadžba), obje će specije imati utjecaja na dezinfekciju nekog sustava (bile do otpadne vode ili neka čvrsta površina). Međutim, kako je hipokloritna kiselina slaba kiselina, ravnoteža će biti pomaknuta prema nedisociranoj speciji koja će ujedno lakše prodrijeti kroz hidrofobne

strukture bakterijske stijenke i membrane te će uspjeh dezinfekcije najviše ovisiti o koncentraciji nedisocirane specije. Iako nabijen, i hipokloritni će ion pomoći u tom procesu. Njegova je uloga najznačajnija u razaranju vanjske ovojnice bakterije inaktivacijom proteina plazmatske membrane, ali neće imati značajnijeg germicidnog utjecaja. (Fukuzaki, 2006.)

Osim kao kupovni dezinficijens, hipokloritnu kiselinu možemo pronaći i u ljudskome tijelu gdje ima značajnu ulogu kao dio urođene imunosti. Nastaje djelovanjem enzima mijeloperoksidaze iz vodikovog peroksida i kloridnog iona. Tako nastali HOCl inaktivira membranske proteine patogena, ali isto tako može pomoći stvaranje drugih specija koje bi mogle biti toksične za patogene. Ako se u fagosomu nalazi dovoljno nitritnih iona, HOCl pomaže stvaranje NO₂Cl (iako slabo vjerojatno i upitnog značaja). Također se može reducirati vodikovim peroksidom prilikom čega nastaje hidroksilni radikal, a uključivanjem hidrogenkarbonatnog aniona potencijalno može nastati karboksilni radikal. (Hurst, 2012.) S obzirom da se leukociti pri susretu s patogenima aktiviraju, u svoju okolinu izlučuju velik broj proupalnih molekula – od citokina do brojnih enzima (uključujući i mijeloperoksidazu). Stoga se HOCl može naći i ekstracelularno gdje pridonosi oštećenju tkiva. (Pattison i sur., 2007.)

1.5.1. Hipokloritna kiselina u otpadnim vodama

Kako u otpadnim vodama nema samo mikroorganizama za čiju je eliminaciju ipak potrebno određeno vrijeme, velik udio klorajućeg agensa koji se u otpadne vode dodaje se najprije troši na neutralizaciju jednostavnih anorganskih spojeva kao što su amonijak, S²⁻, HS⁻, SO₃²⁻, NO₂⁻, Fe²⁺ i Mn²⁺. Od svih navedenih, najznačajnije su reakcije spojeva s dušikom, bilo anorganskim (amonijak, nitrati, nitriti) ili organskim (aminokiseline, amini, proteini). Reakcijom hipokloritne kiseline s amonijakom, tri su moguća ishoda – nastanak mono-, di- ili trikloramina. Najpoželjniji je nastanak monokloramina jer potonja dva doprinose mirisu i okusu vode *po kloru*.



Što se organskog dušika tiče, o tipu spoja će uvelike ovisiti brzina reakcije s klorom. Tako će spojevi koji sadrže bazičniji dušik (primarni i sekundarni amini) brže reagirati od, recimo, amida s kojima će reakcija ići sporo. Aminokiseline i drugi spojevi s dušikom prvo daju svoje N-klorirane derivate koji potom podliježu oksidativnoj deaminaciji dajući NH₂Cl,

odnosno NHCl_2 . Tercijarni amini mogu formirati nestabilne kvarterne amonijeve spojeve ili N-oksidge, dok dušik u prstenastim strukturama može podlijegati i supstitucijama i oksidacijama koje mogu dovesti do pucanja prstena. (Black & Veatch Corporation, 2009.)

S obzirom da je HOCl jak oksidans, ispitivan je i proces oksidacije amina s hipokloritnom kiselinom. Zaključeno je da je hidroksilacija preferabilan proces u plinovitoj fazi, dok do kloriranja dolazi u vodenom mediju. Razlog tome je što molekule vode sudjeluju u reakciji kloriranja kao njeni svojevrsni katalizatori te na taj način snižavaju energetska barijeru procesa. Suprotno tome, molekule vode ne sudjeluju u hidroksilaciji te energiju tog procesa ne snižavaju. (Šakić i sur., 2015.)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Benzodiazepini su važna skupina lijekova zbog učestale primjene, dobre podnošljivosti i povoljne terapijske širine. Posebnu pozornost u ovome radu dali smo diazepamu kao često korištenom lijeku iz skupine.

Ekološku sudbinu benzodiazepina i njegovih metabolita (nordiazepam, temazepam, oksazepam), simulirat će se reakcijama s hipokloritom kiselinom. Reakcije pregrađivanja na 1,4-diazepinskom prstenu su istražene u ovisnosti o kiselosti medija (brzina reakcije pada s povećanjem pH) i koncentraciji klora (povećanje njegove koncentracije dovodi do povećanja brzine reakcije). Objavljeni su toksični derivati benzofenona i derivati kinazolina kao produkti razgradnje diazepama. (Carpinteiro i sur., 2017.) Provedena je i računalna studija (samo za diazepam i oksazepam), ali nije u potpunosti odgovorila na mehanističku problematiku metabolizma benzodiazepina. (Yang i sur., 2018.)

Osim ekološke sudbine, bitna nam je i biološka sudbina benzodiazepina. To je posebno važno u patogenezi ateroskleroze, neurodegenerativnih poremećaja, kronične bubrežne bolesti, malignih oboljenja i slično. (Morgan i sur., 2008.) Prilikom aktivacije imunskog sustava mijenja se ekspresija proteina pa tako i enzima odgovornih za metabolizam lijekova. U određenoj se mjeri to može pripisati povećanoj sintezi proteina akutne faze u jetri zbog čega hepatski metabolizam nekih lijekova može biti smanjen, ali i proinflamatornim citokinima koji specifično mogu reagirati s određenim enzimima u jetri i utjecati na njihovu aktivnost. (Morgan i sur., 2012.)

Hipokloritna kiselina može se naći ekstracelularno gdje pridonosi oštećenju tkiva. U ovom radu proučena je sudbina diazepama i njegovih metabolita u uvjetima upale kada su povećane i koncentracije hipokloritne kiseline. Pretpostavljamo da je transformacija diazepama u takvim uvjetima potencijalan model metabolizma citokromom P450, a usporedbom energija oksidacijskih procesa na N4 i C3 položaju u molekuli moći će se odrediti vjerojatnost nastanka pojedinog biološki aktivnog metabolita.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Računalna kemija

Računalna kemija je grana kemije koja atome i veze (tj. njihovu duljinu, vrijednosti veznih i deadarskih kuteva) u nekom zadanom sustavu promatra numerički. (Hok rektorova) Primjenom kvantno-mehaničkih aproksimacija dobiva se informacija o energiji zadanog sustava. Razlikom energija između optimiziranih struktura dobivamo termodinamičke i kinetičke parametre koje uspoređujemo s eksperimentalnim podacima. To dijelom eliminira potrebe za fizikalno-kemijskim eksperimentima iz kojih najčešće nije moguće dobiti egzaktan odgovor na to pitanje. (Božičević i Sremec, 2018.) Dodatna prednost računalne pred eksperimentalnom kemijom je njena mogućnost predočavanja prijelaznih stanja, odnosno intermedijera u kemijskim reakcijama koji su najčešće nedovoljno stabilni što onemogućava njihovu izolaciju i karakterizaciju u laboratorijskim uvjetima. (Šakić, 2015.)

3.2. Računalne tehnike

3.2.1. Geometrijska optimizacija, frekvencijski račun i intrizične reakcijske koordinate

Ploha potencijalne energije je matematička funkcija koja svakoj svojoj točki pridružuje određenu strukturu. Pomak u nekom smjeru po plohi potencijalne energije može dovesti do povišenja, odnosno sniženja energije sustava. Geometrijska optimizacija iteracijskim postupkom pomiče točku po plohi potencijalne energije uz uvjet da dobivena nova struktura ima nižu energiju od prethodne. Postupak se ponavlja sve dok struktura ne dođe do stacionarne točke, odnosno minimuma na plohi potencijalne energije. To je točka čija je prva derivacija promjene položaja o energiji spomenute funkcije ispod određene konvergencijske vrijednosti, a svaki pomak po plohi potencijalne energije znači povećanje energije promatranog sustava. Ishodnu točku određujemo proizvoljno - generiranjem njene strukture u programu za vizualizaciju, primjerice GaussView. Ponekad, umjesto minimuma u svim smjerovima (stacionarne točke nultog reda) nas zanimaju sedlaste točke plohe potencijalne energije. Takva je točka minimum u svim smjerovima, osim u smjeru reakcijske koordinate, kada je maksimum. Ta točka odgovara strukturi prijelaznog stanja procesa koje povezuje minimume na strani reaktanata i produkata. (Tandarić, 2016.)

Karakterizacija stacionarne točke n -tog reda provodi se računom frekvencije sustava. Njime se na određenoj teorijskoj razini izračunavaju druge (ili više) derivacije energije u odnosu na atomske koordinate, odnosno, sve frekvencije vibracija atoma u sustavu. Rezultat

nam može biti vibracija pozitivne ili negativne vrijednosti. Ukoliko su sve frekvencije pozitivne govorimo o minimumu, a ukoliko je jedna frekvencija negativna govorimo o stacionarnoj točki prvog reda, odnosno, prijelaznom stanju. Ukoliko smo pak dobili više negativnih frekvencija, račun je potrebno dalje optimirati do točke minimuma ili prijelaznog stanja.

Da bismo potvrdili predloženi mehanizam reakcije preko dobivenog prijelaznog stanja, potrebno je provesti izračun intrinzičnih reakcijskih koordinata. Njegova ishodišna točka će biti dobiveno prijelazno stanje, a zatim sljedeći gradijent promjene energije u oba smjera vektora negativne frekvencije se postupno optimizira do reaktanata ili (među)produkata. Optimizacija se odvija paralelno u oba reakcijska smjera, a dobivene je strukture potrebno dodatno optimizirati kako bi se dobile energije reaktanata, odnosno produkata. (Hok, 2017.)

3.2.2. Solvacijski računi

Otapalo može utjecati na mehanizam reakcije preko promjene geometrije i/ili energije strukture. Isto tako otapalo može sudjelovati u kemijskoj reakciji kao njen katalizator. Frekvencijskim računom dobivene su energije u vakuumu te je nužno uključiti otapalo u razmatranje. Solvacijski se efekti mogu opisati eksplicitnom ili implicitnom solvacijom, dok supramolekulski pristup objedinjava utjecaje i eksplicitne i implicitne solvacije.

Eksplicitnom se solvacijom modeliraju molekule otapala u interakciji sa solvatiranom strukturom, odnosno simulira se prva solvacijske ljuske. U njoj su molekule otapala intermolekulskim silama vezane na molekulu otopljene tvari te joj na taj način ograničavaju slobodu kretanja. U implicitnoj se solvaciji gleda utjecaj otapala na strukturu molekule uzimajući u obzir njegovo dielektrično polje što podrazumijeva model polarizabilnog kontinuuma. Solvacija će se odvijati na način da prvo nastane polarizabilna solvacijska šupljina nakon čega molekula ulazi u tu šupljinu, a kontinuum oko nje se polarizira. Iz interakcije solvacijske šupljine i molekule dobiva se Gibbsova slobodna energija solvacije koja utječe na promjenu energijskog gradijenta kod geometrijske optimizacije. Supramolekulskim ćemo pristupom uzeti u obzir oba modela, odnosno istovremeno ćemo moći promatrati i učinak dielektričnog polja otapala i učinak molekula u prvoj solvacijskoj ljusci. (Šakić, 2015.)

3.3. Izračun energije

Kako molekule pri 0 K nisu bez energije jer imaju određenu vibraciju, u naše optimizirane račune moramo uvesti korekciju za energiju nulte točke. Ona se izražava kao zbroj elektronske energije i energije najnižeg vibracijskog stanja molekule te se korigira različitim doprinosima translacijskog, rotacijskog i vibracijskog gibanja molekule, odnosno, entalpijom i entropijom. Apsolutnu Gibbsovu slobodnu energiju smo dobili prema niže navedenom izrazu gdje H predstavlja entalpiju, S entropiju, a T temperaturu.

$$\text{Eq. 9. } G = H - TS$$

Kako je kod podešavanja parametara u izračunima moguće podesiti temperaturu i tlak, u ovom su radu korišteni uvjeti od 298 K i 1 atm.

3.4. Računalne metode

S obzirom da se Schroedingerova jednačba može egzaktno riješiti samo za sustave s jednim elektronom, želimo li se služiti kvantno-kemijskim izračunima u kompleksnijim sustavima, potrebno je uvesti određene aproksimacije. Prema aproksimacijama koje koriste, razlikujemo semi-empirijske, *ab initio* te metode teorije funkcionala gustoće. (Tandarić, 2016.)

Kod semi-empirijskih metoda izračuni su brzi, ali upitne točnosti izračuna energije. Ona ovisi o tome koliko dobro računski sustav odgovara sustavu iz kojeg su uzimani eksperimentalni parametri. Razlog tome je što se u izračunima ne uzimaju u obzir ne-valentni elektroni, a loše su opisane i elektronske interakcije.

Potpuna suprotnost semi-empirijskim metodama su *ab initio* metode koje su izrazito dugotrajne i zahtijevaju znatne računalne resurse, ali daju precizne i konzistentne podatke. One Schroedingerovu jednačbu dijele u mnogo jedno-elektronskih jednačbi koje se zasebno rješavaju te na taj način opisuju ponašanje jednog elektrona u polju svih drugih u sustavu prisutnih elektrona. Dijele se na Hartree-Fock metodu koja zanemaruje elektronsku korelaciju i post-Hartree-Fock metode koje je uzimaju u obzir.

Metode teorije funkcionala gustoće (DFT, *Density Functional Theory*) objedinjuju karakteristike i Hartree-Fock i semi-empirijskih metoda, ali se za izračun energije ne koristi valna funkcija već elektronska gustoća. Opisuje ponašanje svakog elektrona u odnosu na

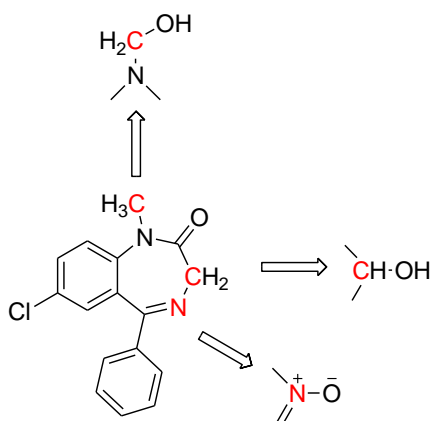
elektronsku gustoću sustava, ali mogu uvoditi i eksperimentalni parametri (ovisno o funkcionalu) s obzirom da nije poznat točan oblik funkcionala koji povezuje gustoću elektrona s energijom. U konačnici dobivamo metodu koja daje konzistentne rezultate s racionalnom uporabom računalnih resursa što je i uzrok njihove popularnosti. (Šakić, 2015.)

3.5. Korištene metode i tehnike

Vizualizacija dobivenih rezultata te dodavanje eksplicitnih voda provedeno je u programu GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.). Geometrijske optimizacije, frekvencijski i solvacijski računi provedeni su uporabom programskog paketa Gaussian16 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016), dok je za provedbu računa korišten klaster Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu (www.srce.hr). Za opis solvacijskih utjecaja, korišten je supramolekulski pristup. Kompleksi reaktanata, produkata i prijelaznih stanja optimizirani su dodavanjem do četiri eksplicitne molekule vode za opis prve i druge solvacijske ljuske. Eksplicitne molekule vode dodavane su u programu GaussView, dok su globalni minimumi s molekulama otapala oko osnovne strukture dobiveni korištenjem modificirane verzije stohastičke metode. (andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html; Saunders, 2004)

Za optimizaciju geometrija korišten je DFT funkcional B3LYP na 6-31G(d) baznom skupu. B3LYP (Becke Three Hybrid Functionals) kombinacija je tri parametra – Becke funkcionala izmjene (B), korelacijskog funkcionala (LYP) te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni. Bazni su skupovi matematička reprezentacija molekulskih orbitala te definiraju konstante u baznim funkcijama koje opisuju valnu funkciju, odnosno, elektronsku gustoću u našem slučaju. Što je veći broj baznih funkcija, točniji je opis molekulskih orbitala jer potpun opis valne funkcije zahtjeva neograničen broj molekulskih orbitala, a mi možemo baratati samo s njihovim konačnim brojem. Tako su kod 6-31G(d) baznog skupa unutarnje orbitale opisane sa šest primitivnih gaussianana (tj. Gaussove orbitale – osnovne funkcije za opis atomskih orbitala), dok su valentne orbitale opisane s dvije složene funkcije, pri čemu je prva dobivena kontrakcijom tri primitivna gaussianana, a druga kontrakcijom jednog. (Šakić, 2015.)

4. REZULTATI I RASPRAVA

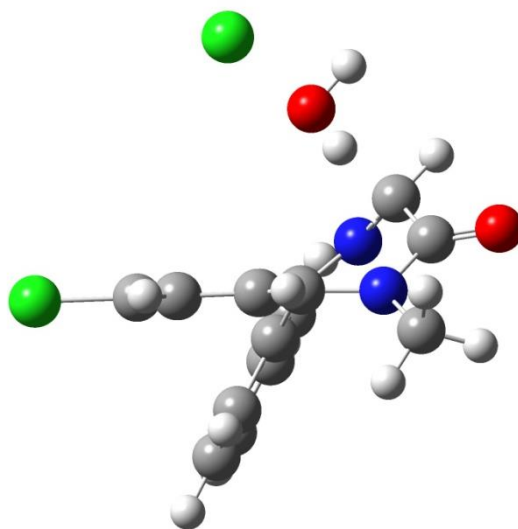


Shema 4: Prikaz proučavanih potencijalnih mjesta oksidacije na molekuli diazepama

Djelovanje hipokloritne kiselina kao oksidansa na diazepam može se promatrati kroz više aspekata, odnosno, sama je molekula podložna oksidaciji na više točaka – atomu ugljika vezanom na dušik u položaju 1, atomu ugljika na položaju 3 te atomu dušika na položaju 4. (Shema 4) S obzirom da je diazepam *in vivo* enzimatski podložan N1-demetilaciji, taj je proces također promatran. Sve ishodne strukture prikazane na shemama dobivene su pomoću stohastičke procedure sa potrebnim brojem eksplicitno dodanih voda na način da je odabrana ona struktura koja je nakon optimizacije imala najnižu slobodnu Gibbsovu energiju (globalni minimum). U radu objavljenom 2017. godine (Carpinteiro i sur., 2017.) izračunate su konstante oksidacije diazepama i nordiazepama u ultračistoj vodi pri 20 ± 2 °C. Koristeći Eyringovu jednadžbu, izračunata je slobodna Gibbsova energija prijelaznog stanja te za diazepam ona iznosi 96 kJ/mol, a za nordiazepam 97.5 kJ/mol.

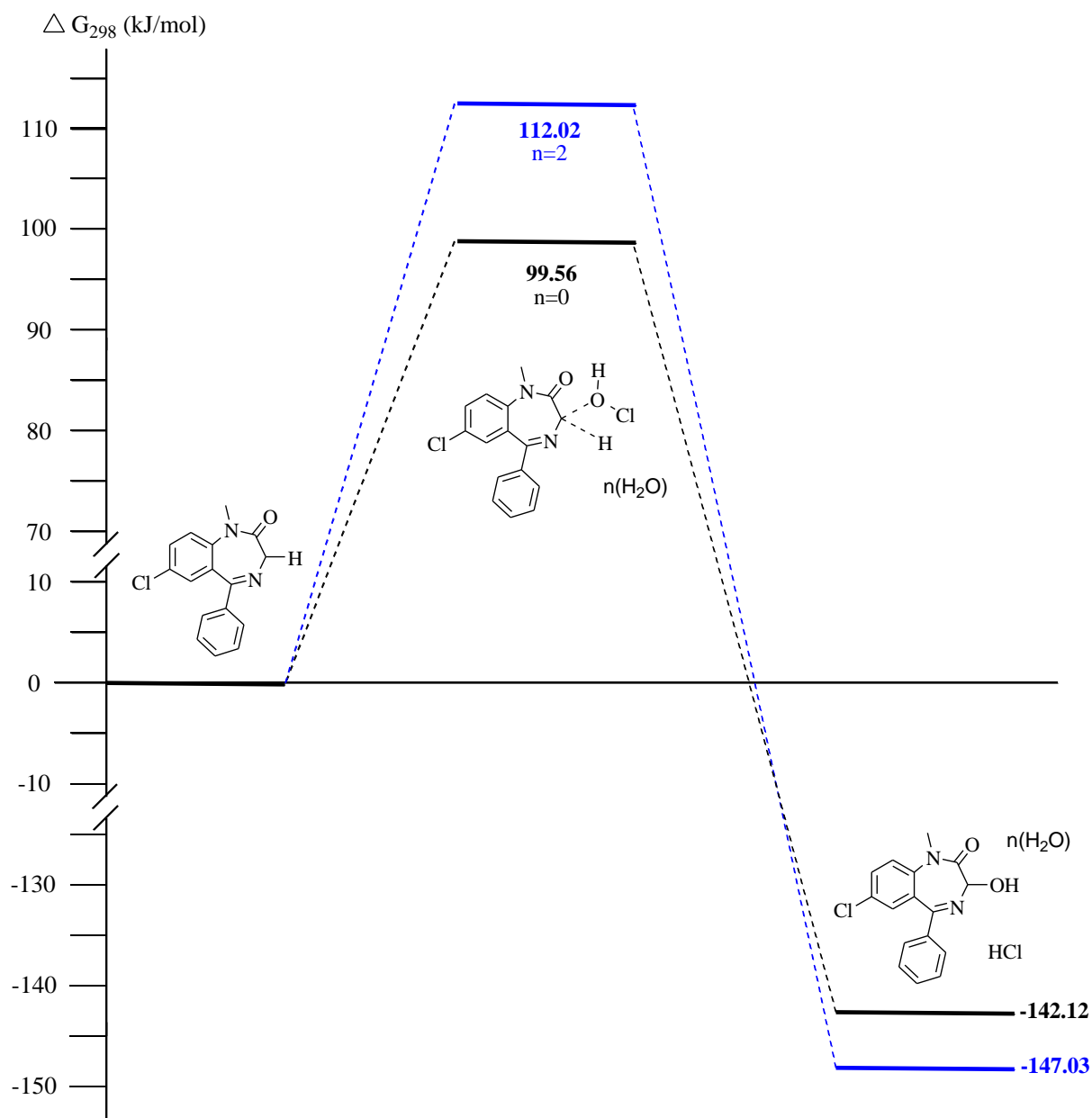
4.1. OKSIDACIJA NA POLOŽAJU C3

Oksidacija ugljika na položaju C3 u benzodiazepinskom sustavu pod utjecajem hipokloritne kiseline događa se kroz linearno prijelazno stanje u kojemu dolazi do vezanja hidroksilne skupine hipokloritne kiseline na C3 atom, te potom nastanka molekule klorovodične kiseline. (Slika 4) Ono je bez eksplicitno dodanih voda jer voda reakcije ovakvog tipa ne katalizira pa niti snižava energiju procesa. Kao produkt ove reakcije nastaje temazepam, aktivni metabolit diazepama.



Slika 4: Oksidacija C3 atoma bez prisutstva eksplicitnih voda

Na shemi 5 se vidi utjecaj dodavanja dvije eksplicitne vode sustavu diazepama i hipokloritne kiseline. Kod reakcija koje voda katalizira, očekuje se smanjenje barijere procesa, no u ovom slučaju vidimo suprotan učinak – energija procesa raste za 12.5 kJ/mol. Dodavanjem još jedne eksplicitne vode, barijera procesa se penje na 115.58 kJ/mol, a sa četiri vode ona iznosi nešto nižih 107.47 kJ/mol.



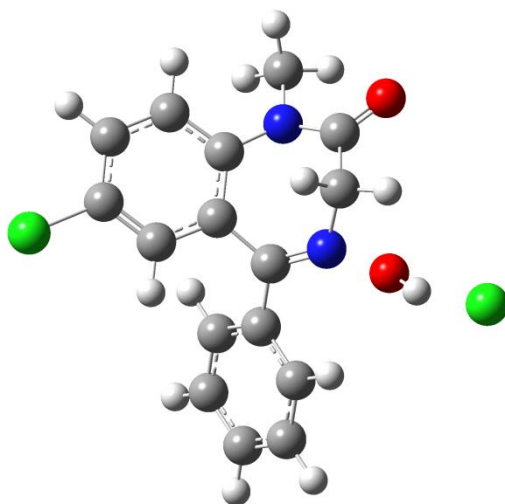
Shema 5: Prikaz utjecaja dvije eksplicitne molekule vode u sustav oksidacije C3 atoma diazepama

Usporedbom s eksperimentalnim podacima se vidi da ovaj proces zadovoljava, a razlika u 3.5 kJ/mol se može pripisati eksperimentalnim pogreškama.

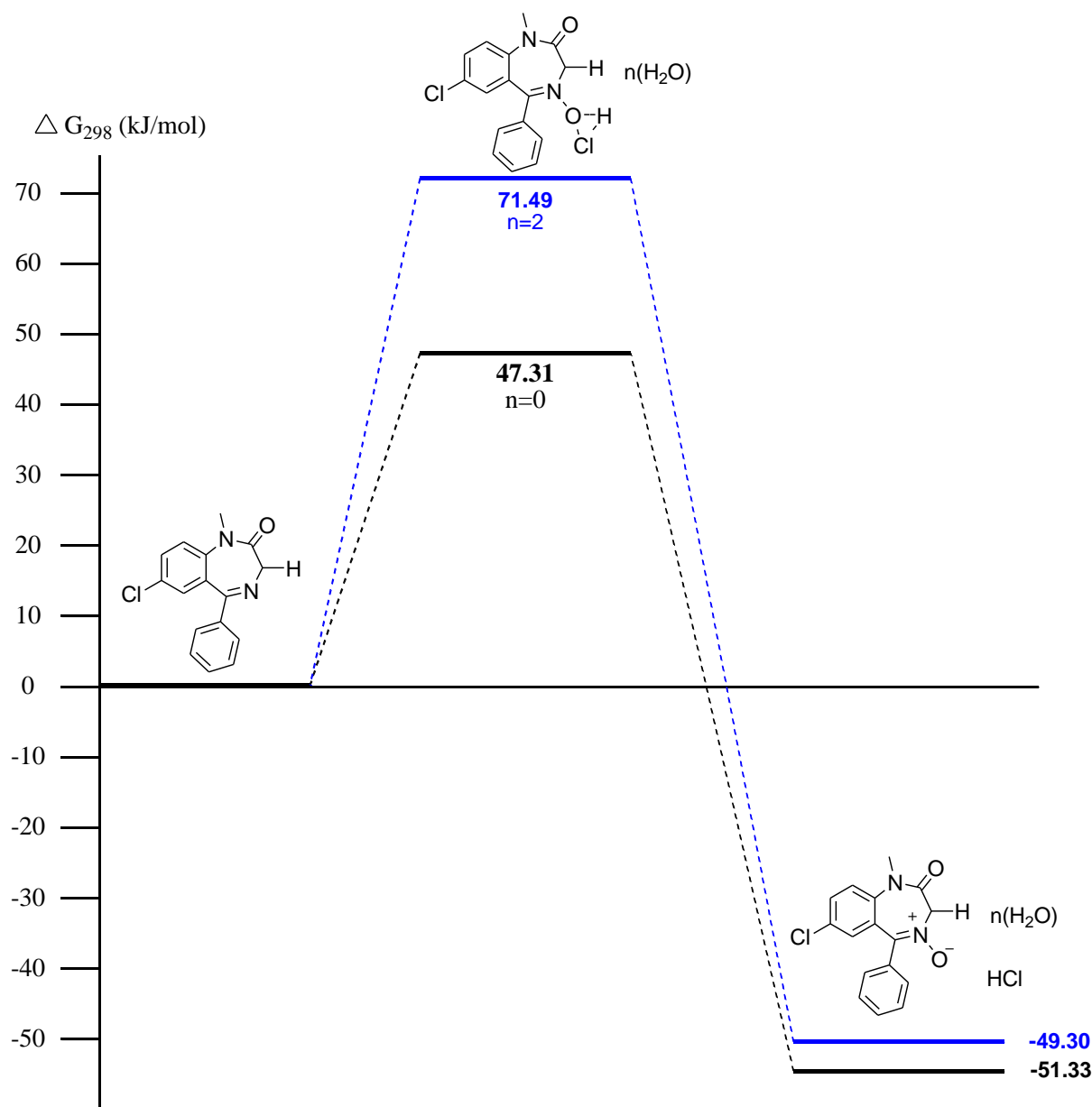
U literaturi je također pronađen 3-oksodiazepam kao međuprodukt tretiranja diazepama hipokloritnom kiselinom. (Yang i sur., 2018.) Kako bismo izračunali koliko je taj proces povoljan, za izračune je uzet 3-hidroksidiazepam dobiven prethodnom reakcijom.

4.2.N4 OKSIDACIJA

Slična je situacija i sa oksidacijom N4 atoma u diazepinskom prstenu. Proces je to kojeg karakterizira linearan prelazak kisika na dušik uz nastanak N4-oksida diazepama i klorovodične kiseline. Kako nema istovremenog prijenosa protona, voda ni ovdje ne sudjeluje kao katalizator već njeno prisustvo također povećava barijeru prijelaznog stanja kako je prikazano na shemi 6. Slika 5 predstavlja najstabilnije prijelazno stanje od 47.31 kJ/mol.



Slika 5: Prikaz prijelaznog stanja oksidacije N4 atoma bez eksplicitno dodanih voda



Shema 6: Prikaz utjecaja dvije eksplicitne molekule vode u sustav oksidacije N4 atoma diazepama

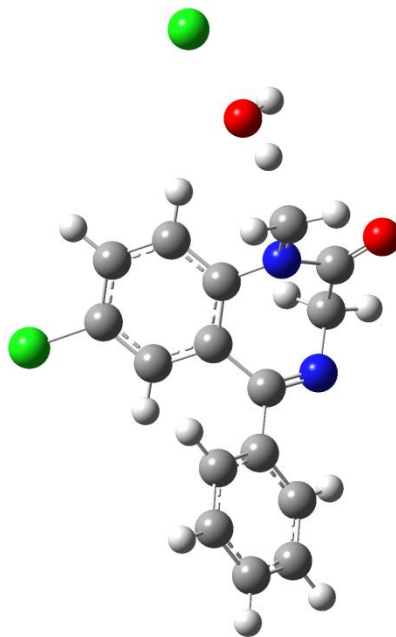
Kao što je prikazano na shemi 6, dodavanjem eksplicitnih molekula vode sustavu primijećen je značajan rast energije potrebne za odvijanje procesa. Kao i u prethodnom slučaju, energija procesa s tri eksplicitne vode je najviša te iznosi 86.16 kJ/mol, dok je sa četiri ipak nešto niža te iznosi 80.44 kJ/mol. Ako uspoređujemo procese oksidacije C3 i N4 atoma diazepama, primjećujemo da iako je barijera nastanka N4-oksida niža, produkti reakcije su zapravo daleko nestabilniji od 3-oksodiazepama te se mogu smatrati kratkoživućim međuproduktima.

4.3.N1 DEMETILACIJA

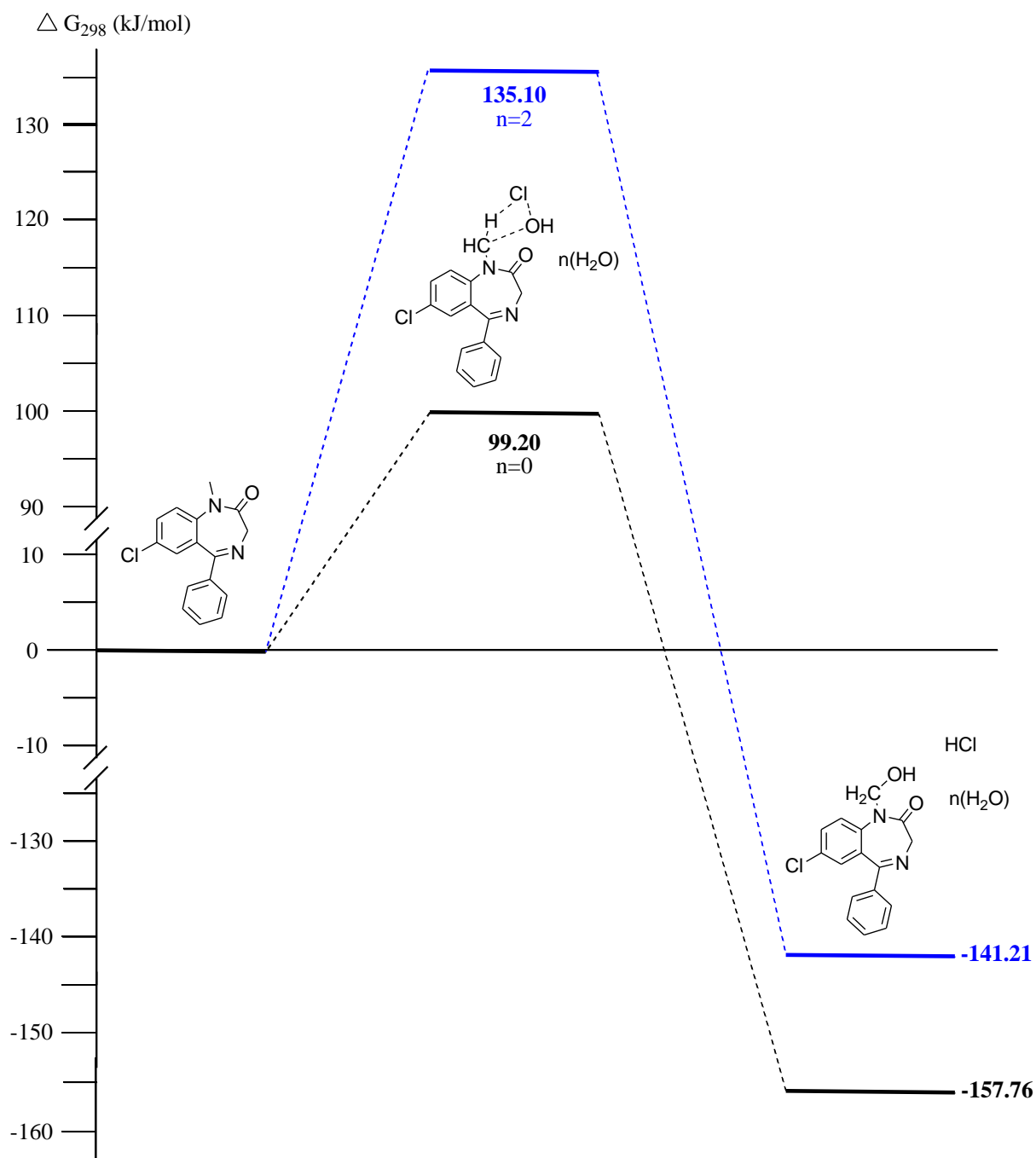
Osim C3 oksidacije, ovaj se proces također odvija u našem organizmu djelovanjem enzima CYP450 te je korak kojeg smo razlomili u dva dijela – oksidacija ugljikovog atoma vezanog na dušik u položaju N1 diazepinskog prstena te sama demetilacija prilikom čega se odcjepljuje formaldehid. Kako je nakon provedenih izračuna dobivena relativno visoka barijera koja konkurira primarnoj C3 oksidaciji, provedeni su izračuni za sekundarnu oksidaciju N1C koju također slijedi demetilacija, a u tom se slučaju odcjepljuje mravlja kiselina.

4.3.1. Primarna oksidacija

Prikaz najstabilnijeg prijelaznog stanja te energetske razlike najstabilnijeg i najnestabilnijeg prijelaznog stanja se vide na slici 6 te shemi 7.



Slika 6: Prikaz najstabilnijeg prijelaznog stanja primarne oksidacije N1C atoma u diazepamu

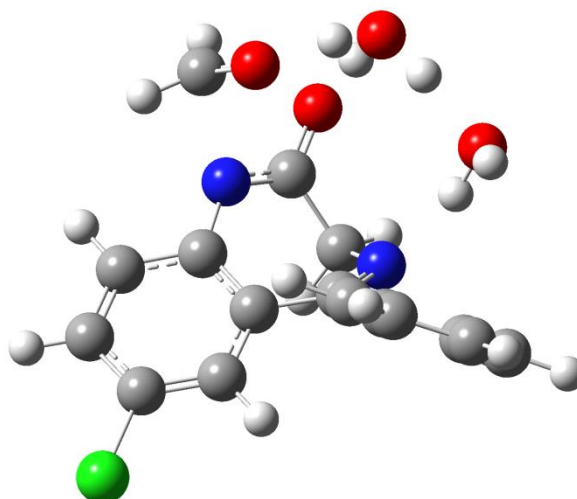


Shema 7: Prikaz utjecaja dvije eksplicitne molekule vode u sustav primarne oksidacije N1C atoma diazepama

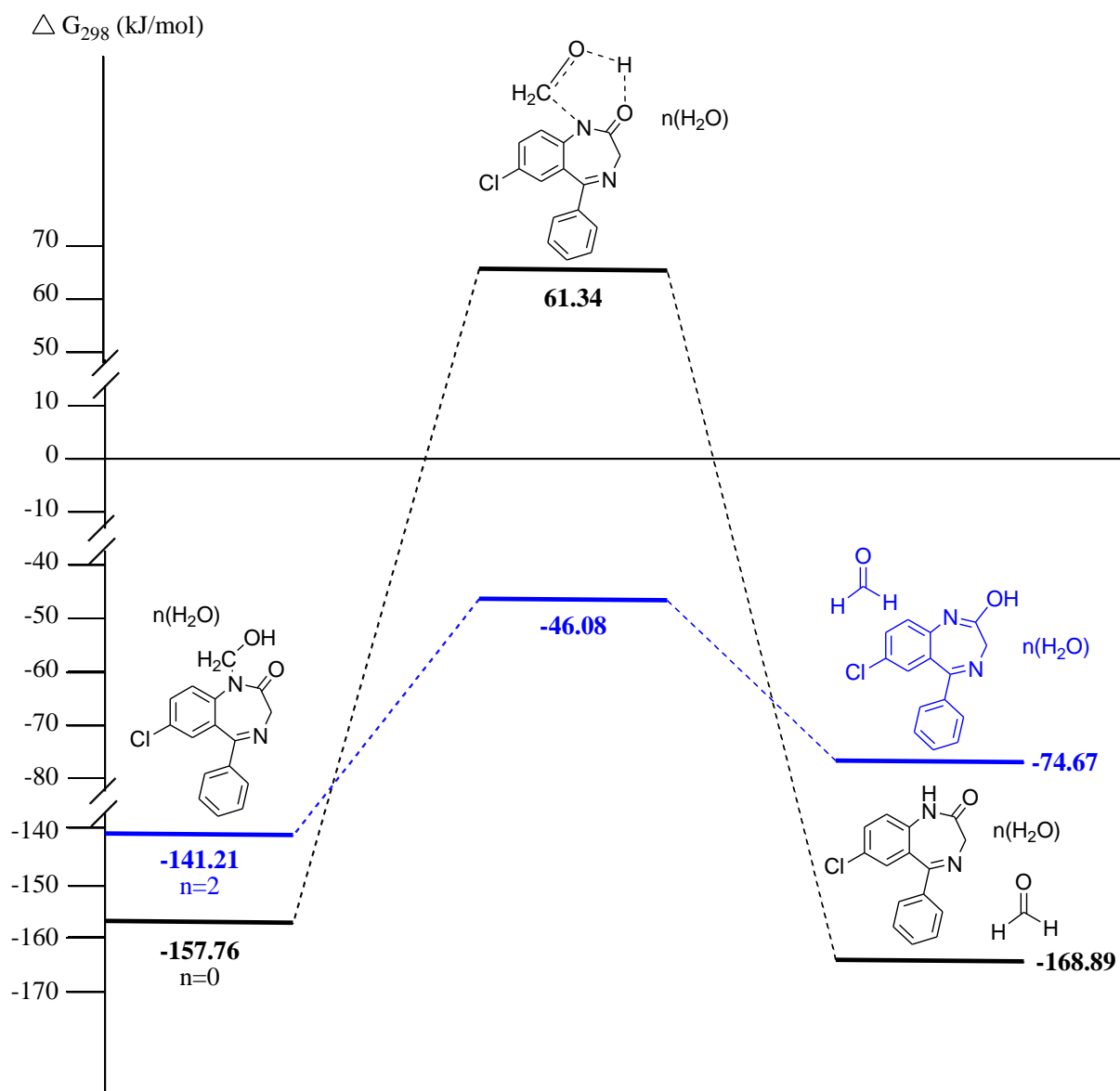
Na gornjem se prikazu vidi značajna razlika u slobodnim Gibbsovima energijama. Najstabilnije prijelazno stanje iznosi 99.2 kJ/mol te time zadovoljava eksperimentalne rezultate, a razliku ponovno možemo pripisati eksperimentalnim pogreškama. Dodatak dvije eksplicitne vode je ujedno i najnestabilnije prijelazno stanje, iako se s manje ili više voda ne razlikuje drastično. Tako je, primjerice, prijelazno stanje s jednom eksplicitnom vodom okarakterizirano slobodnom Gibbsovom energijom od 130 kJ/mol, ono s tri od 124 kJ/mol, a

sa četiri od 129 kJ/mol. Razlog tome bismo mogli pronaći u već ranije spomenutom linearnom putu prijenosa OH skupine hipokloritne kiseline na ugljikov atom.

Demetilacijom dušikovog atoma na položaju 1 diazepinskog prstena nastaje nordiazepam te se oslobađa formaldehid kao nusprodukt. Bez prisutstva eksplicitnih voda dolazi do direktnog prijenosa vodika s OH skupine ugljikovog atoma vezanog na N1 na taj dušik. Takav je proces energetski vrlo zahtjevan te je slobodna Gibbsova energija prijelaznog stanja čak 218.6 kJ/mol. Dodatkom jedne eksplicitne vode potrebna se energija smanjuje za oko 60 kJ/mol dok se dodatkom dvije vode (kako je prikazano na shemi 8) proces odvija uz barijeru od 95.13 kJ/mol. Razlog tome možemo pronaći u činjenici da voda katalizira prijenos vodikovog atoma, ali ne na N1 već na karbonilni kisik na C2 čime nastaje iminol. Ranije je pokazano na benzodiazepinskom sustavu da je iminolna specija nestabilnija od keto-specije te je olakšan prelazak vodika sa C2O prelazi na N1 atom keto-iminolnom tautomerijom. (Pem i Vrčec, 2018.)



Slika 7: Prikaz najstabilnijeg prijelaznog stanja demetilacije primarno hidroksiliranog N1C diazepama



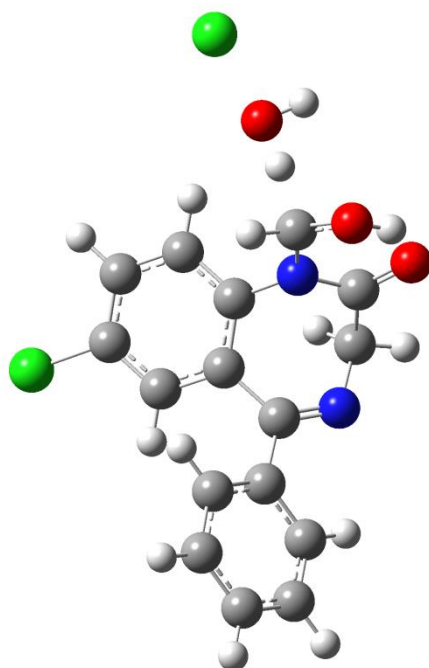
Shema 8: Prikaz utjecaja dvije eksplicitne molekule vode na sustav demetilacije N1C oksidiranog diazepama

Shema 8 prikazuje utjecaj dodavanja eksplicitnih voda u sustav, s time da je za energiju reaktanata uzeta vrijednost dobivena IRC procedurom u procesu primarne hidroksilacije N1C atoma diazepama (shema 7). Zamjećuje se da je barijera procesa demetilacije bez prisutnosti eksplicitnih voda mnogo nepovoljnija ($\Delta G^\ddagger=218.6$ kJ/mol) u odnosu na barijeru reakcije kada je ona potpomognuta dvjema eksplicitnim vodama ($\Delta G^\ddagger=95.13$ kJ/mol). Zanimljiva je činjenica da su produkti dobiveni reakcijom s dvije vode za otprilike 50 kJ/mol nestabilniji od primarno hidroksiliranog diazepama, dakle, takva je reakcija izrazito nepovoljna. Daljnjim dodavanjem eksplicitnih voda (tri i četiri) barijera procesa raste za otprilike 20 kJ/mol u odnosu na prijelazno stanje s dvije eksplicitne vode, dok

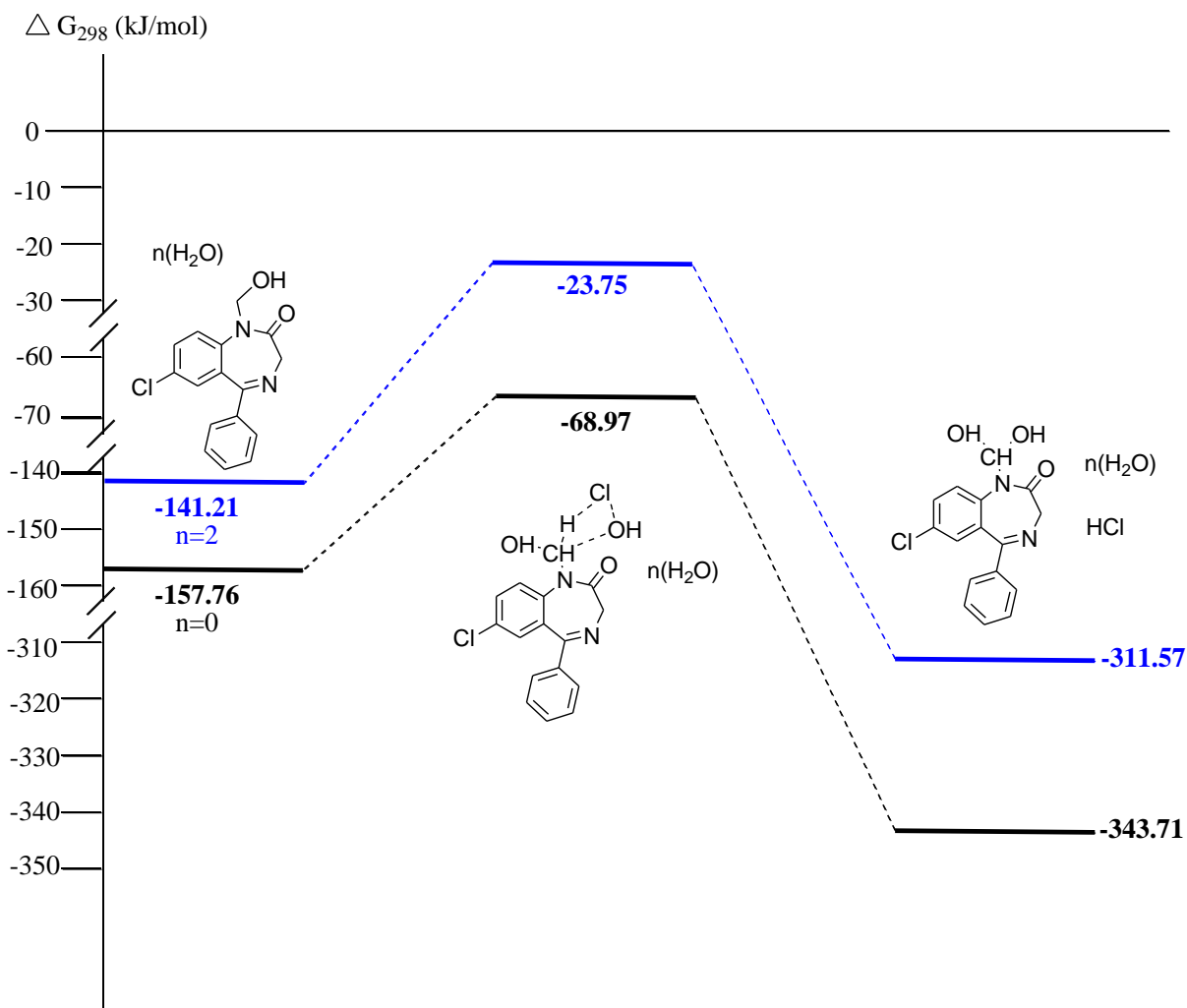
su produkti (također iminoli) dobiveni u takvim uvjetima stabilniji za otprilike 35 kJ/mol u odnosu na produkte dobivene reakcijom s dvije eksplicitne vode.

4.3.2. Sekundarna oksidacija

S obzirom na visoku energetska barijeru demetilacije primarno hidroksiliranog N1C atoma, provjereno je može li se ona sekundarnom oksidacijom spustiti. Dobivene barijere procesa su slične onima za primarnu hidroksilaciju te se kreću oko 90-120 kJ/mol (prilikom čega je najvjerojatniji proces onaj bez eksplicitno dodanih voda – prikazan na slici 8. Shema 9 prikazuje utjecaj dodane dvije eksplicitne molekule vode u sustav.

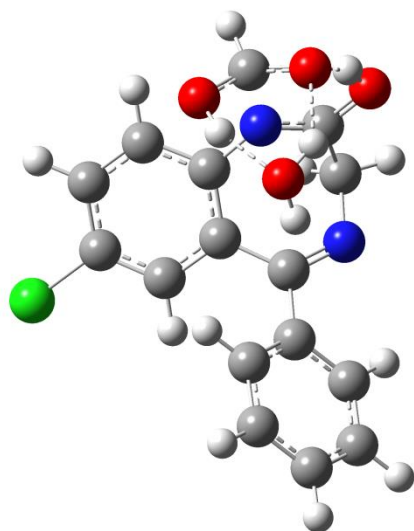


Slika 8: Prikaz prijelaznog stanja sekundarne hidroksilacije N1C atoma diazepama



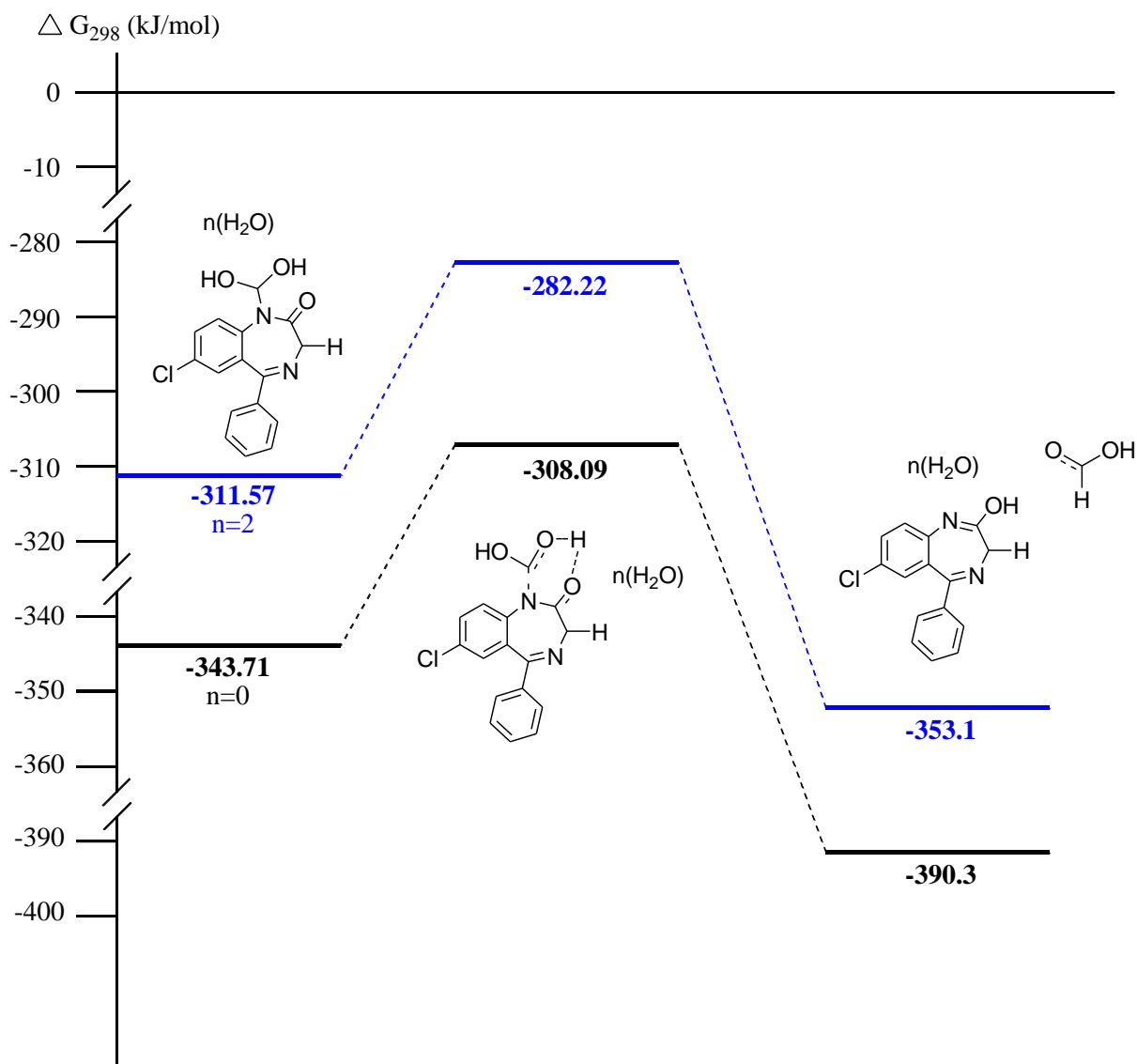
Shema 9: Prikaz utjecaja dodavanja eksplicitne vode u sustav sekundarne hidroksilacije diazepama

Iako su slobodne Gibbsove energije prijelaznih stanja (kada se uspoređuju primarna i sekundarna hidroksilacija) slične, sekundarnom hidroksilacijom dobivamo vrlo stabilne produkte (170-215 kJ/mol stabilniju u odnosu na primarno hidroksilirani diazepam). S obzirom na energije produkata nastalih primarnom demetilacijom, već se ovdje vidi da sekundarna hidroksilacija ima više smisla nego demetilacija odmah nakon prve hidroksilacije.



Slika 9: Prikaz najstabilnijeg prijelaznog stanja sekundarne hidroksilacije N1C atoma diazepama

Dodatna prednost sekundarne hidroksilacije postaje vidljiva u rezultatima demetilacije koja ju slijedi. Barijere procesa su daleko niže nego u primarnoj demetilaciji, a shematski je prikaz prikazan na shemi 10. Najnepovoljniji proces je onaj s četiri uključene vode i iznosi 36 kJ/mol, dok je najstabilniji onaj s uključenom jednom eksplicitnom molekulom vode (prikazanom na slici 9) te iznosi 23.34 kJ/mol. Osim puno nižih barijera prijelaznih stanja, i produkti nastali demetilacijom sekundarno hidroksiliranog su stabilniji od onih nastalih demetilacijom primarno hidroksiliranog diazepama.



Shema 10: Prikaz utjecaja dodavanja dvije eksplicitne vode u sustav demetilacije N1C atoma diazepama

Kada se sažmu podaci dobiveni za procese na N1C atomu vidi se da su primarna i sekundarna oksidacija kompetitivni procesi sa približno jednakim barijerama. Međutim, odcjepljivanje formijatne kiseline je i kinetički i termodinamički daleko povoljnije od odcjepljivanja formaldehida, dakle, vjerojatnije je da će nordiazepam nastati dvostrukom hidroksilacijom N1C atoma koju zatim slijedi demetilacija istoga.

4.3.3. Keto-iminolna tautomerija

Demetilacijom primarno hidroksiliranog diazepama bez prisutnosti eksplicitnih voda direktno nastaje nordiazepam bez potrebe za tautomerizacijom, dok je s dvije vode potrebno

računati tautomerizaciju. U ovom slučaju govorimo o prijenosu protona sa C2O na N1 atom diazepinskog prstena. Barijera procesa iznosi 72.99 kJ/mol, a keto-oblik je 6.34 kJ/mol nestabilniji od ishodnog produkta reakcije demetilacije, odnosno iminola.

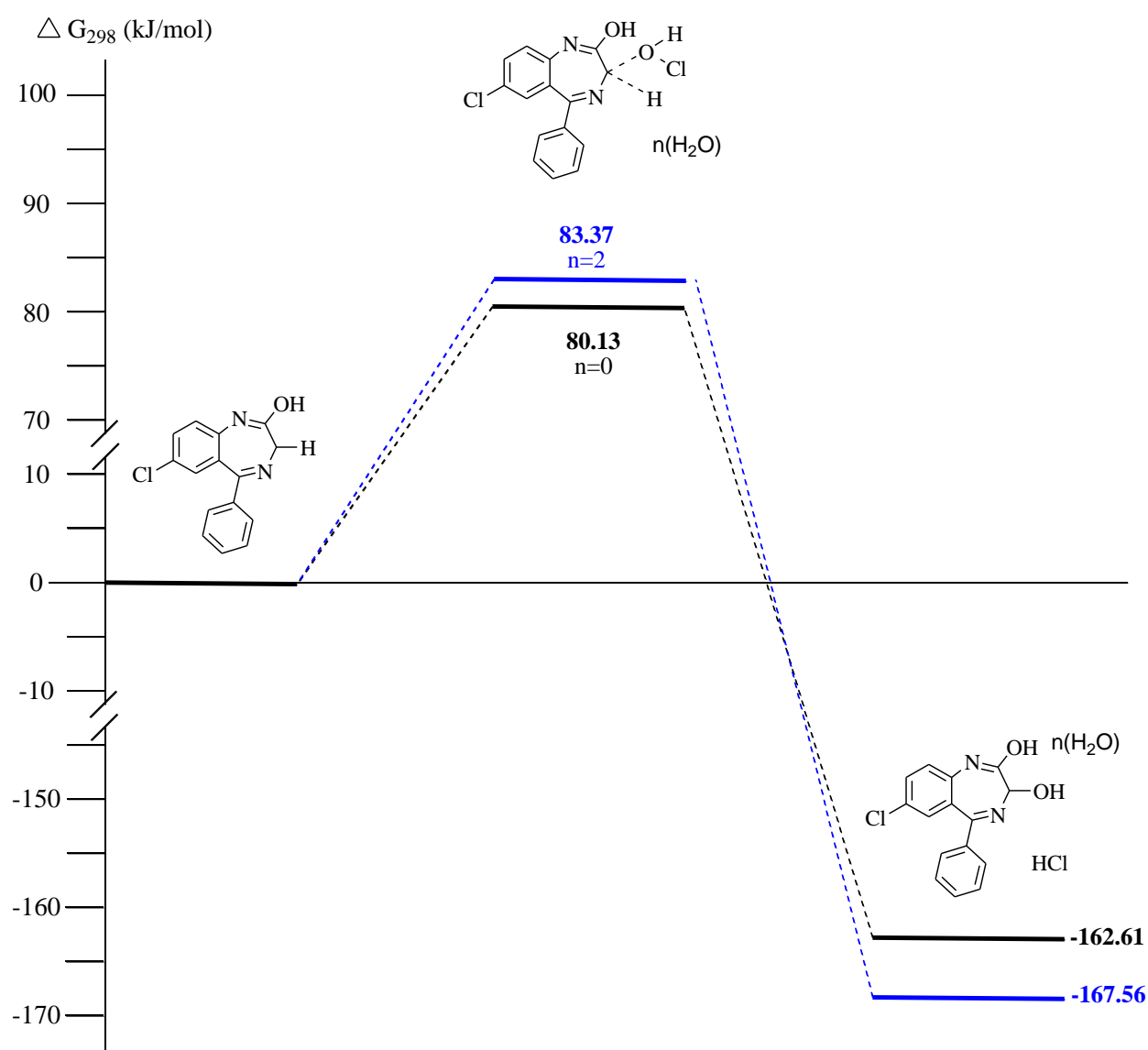
Prilikom demetilacije sekundarno hidroksiliranog diazepama u svakom slučaju slijedi tautomerizacija. Računanjem barijera prijenosa protona dobiveni rezultati ne iznenađuju – prijenos bez sudjelovanja vode je izrazito nepovoljan te iznosi 142 kJ/mol, dok je nastali produkt od ishodnog stabilniji za samo 38.53 kJ/mol. Već se dodatkom jedne eksplicitne molekule vode u sustav barijera procesa značajno smanjuje te iznosi 36.74 kJ/mol, dok je prijelazno stanje s dvije eksplicitne vode daleko niže te iznosi svega 9.5 kJ/mol. Tako nastali keto-oblik nordiazepama je čak 65 kJ/mol stabilniji od iminolnog oblika. U sva tri slučaja su za energije ishodnih molekula uzete energije produkata izračunate u procesu demetilacije.

Razlog velike razlike u barijerama procesa tautomerizacije nordiazepama kataliziranih dvijema vodama je u okolišu – nakon demetilacije primarno hidroksiliranog odvaja se formaldehid, dok se demetilacijom sekundarno hidroksiliranog odvaja mravlja kiselina. Općepoznato je da kiseline kataliziraju takve procese stoga je razlika od 63.5 kJ/mol opravdana.

Od ranije su poznate barijere prijelaznih stanja keto-iminolne tautomerije u oksazepamu. Bez dodanih eksplicitnih voda ono iznosi 200.75 kJ/mol, dok se sa dvije eksplicitne vode energija aktivacije smanjuje te iznosi 105.82 kJ/mol. (Božičević i Sremec, 2018.)

4.4. OKSIDACIJA NORDIAZEPAMA NA POLOŽAJU C3

Oksidacija nordiazepama može krenuti bilo iz keto-oblika ili iminolnog oblika. U oba se slučaja kao produkt dobiva oksazepam, također registrirani farmaceutik. Uspoređivanjem vrijednosti obaju procesa vidi se da je iminolni oblik nordiazepama povoljniji za oksidaciju na C3 položaju (prikazan na shemi 11). Barijera prijelaznog stanja keto-oblika bez dodanih eksplicitnih voda je 95.38 kJ/mol, dok je s dvije vode 104.49 kJ/mol. Razlog ponovno možemo pronaći u linearnom prijenosu hidroksilne skupine na hipokloritne kiseline na C3 atom diazepinskog prstena. Prijelazno stanje i keto i iminolnog oblika zadovoljava eksperimentalnu barijeru od 97.5 kJ/mol.



Shema 11: Prikaz utjecaja dodavanja eksplicitnih molekula vode u sustav oksidacije nordiazepama

4.5.DEMETILACIJA TEMAZEPAMA

S obzirom na rezultate dobivene na molekuli diazepama, odnosno visoku barijeru prijelaznog stanja demetilacije primarno hidroksiliranog diazepama, na temazepamu smo zanemarili navedeni proces. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 2, a za svaku reakciju je kao početna točka uzeta struktura dobivena IRC procedurom. Prvi stupac označava koliko je eksplicitnih voda dodano u sustav.

Tabela 2: Prikaz rezultata demetilacije temazepama uz bez te uz prisutstvo dvije eksplicitne vode

		ΔG (kJ/mol)		
		PRIMARNA	SEKUNDARNA	DEMETILACIJA
		OKSIDACIJA	OKSIDACIJA	
0 VODA	TS*	81.19	84.01	37.81
	Reaktant	0	0	0
	Produkt	-179.69	-196.78	-42.32
2 VODE	TS*	133.71	94.25	30.90
	Reaktant	0	0	0
	Produkt	-140.99	-196.06	-38.19

TS* - prijelazno stanje (engl. transition state)

U ovim se rezultatima zamjećuje sličan trend kao i u procesu demetilacije diazepama – za oksidacije su povoljniji uvjeti bez eksplicitnih voda uključenih u reakciju, dok je sama demetilacija vjerojatnija uz prisutstvo dviju voda. Također su i same barijere prijelaznih stanja vrlo slične onima dobivenima u reakcijama demetilacije diazepama.

5. ZAKLJUČAK

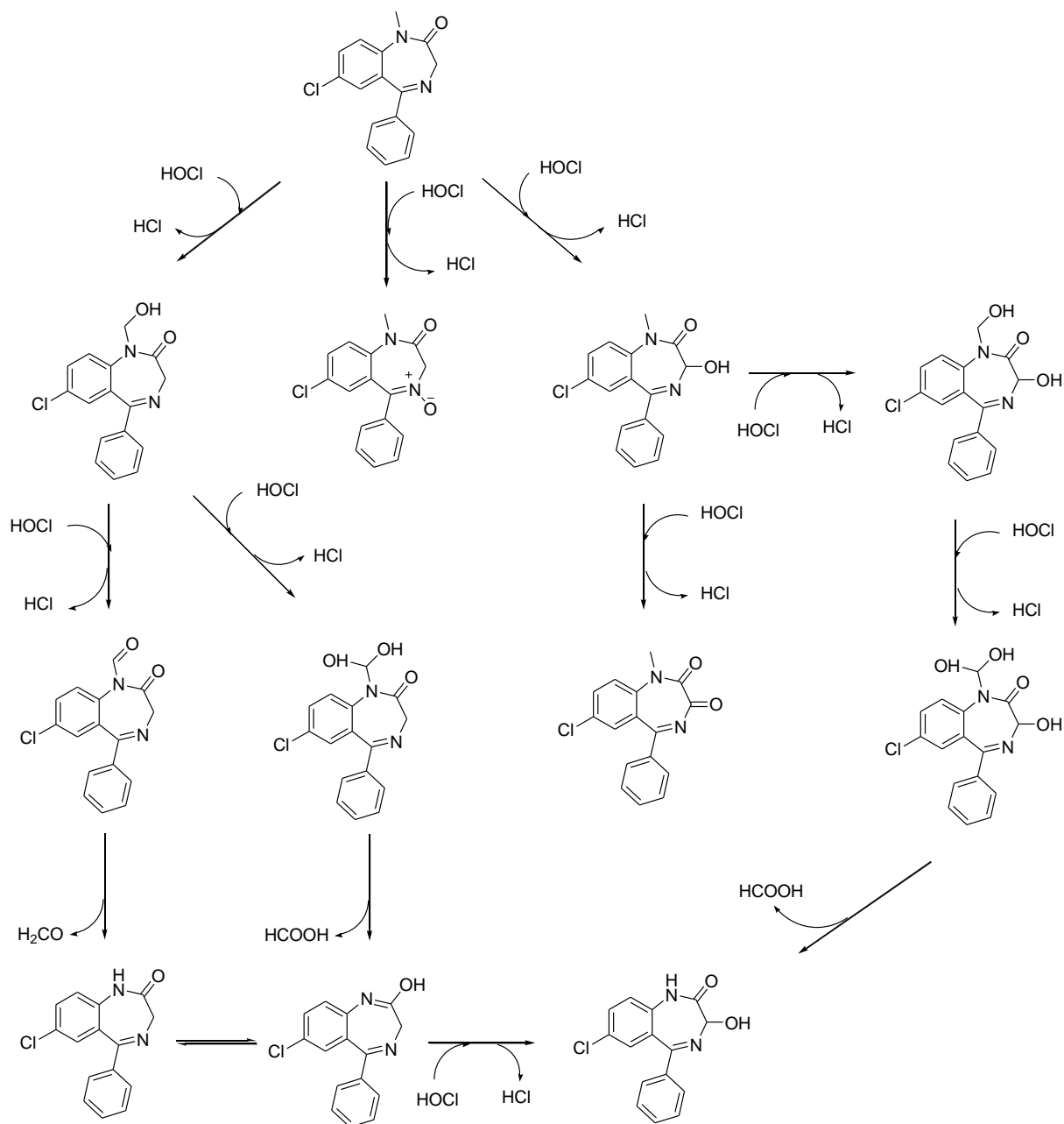
U ovome je radu pokazan mehanistički aspekt djelovanja hipokloritne kiseline kao oksidansa na diazepam. On se, kao jedan od najkorištenijih anksiolitika na svijetu, često može naći u otpadnim vodama, pogotovo velikih gradova. Osim u otpadnim vodama, diazepam se u okolini hipokloritne kiseline može pronaći i u ljudskome organizmu u stanjima upale. Potencijalna mjesta djelovanja hipokloritne kiseline su na N1C, C3 i N4 atomu u diazepinskom prstenu, a kombinacijom tih reakcija mogu nastati aktivni metaboliti.

Interpretacijom rezultata provedenih kvantno-kemijskih izračuna zaključuje se da je kinetički najpovoljniji proces oksidacija N4 atoma bez katalitičkog utjecaja vode prilikom čega nastaje N-oksid čija energetska barijera iznosi 47 kJ/mol. Međutim, nastali N-oksidi su nestabilne specije te taj proces nije termodinamički najpovoljniji.

Promatranjem preostalih potencijalnih reakcija (koje se sve odvijaju u više koraka) vidimo da su primarne oksidacije i na N1C i na C3 atomima međusobno kompetitivne sa energijama prijelaznih stanja koja se kreću oko 100-130 kJ/mol. Produkti nastali tim reakcijama su također termodinamički podjednako stabilni (130-150 kJ/mol stabilniji u odnosu na ishodnu molekulu diazepama). Demetilacija primarno hidroksiliranog N1C je moguća i vjerojatno se u nekoj mjeri događa, međutim, iako je barijera procesa energetski slična drugim konkurentnim opcijama, tako nastali produkti termodinamički su nestabilniji.

U konačnici, dva najkonkurentnija procesa su sekundarna oksidacija na C3, odnosno, na N1C. Barijere prijelaznih stanja su u prosjeku vrlo slične, kao i slobodne Gibbsove energije njihovih produkata. Međutim, nakon hidroksilacije na N1C dolazi do demetilacije uz nisku barijeru, a ipak nastaju vrlo stabilni produkti koji podliježu keto-iminolnoj tautomeriji čija je dinamička ravnoteža pomaknuta na stranu nastajanja keto-oblika.

Osim razjašnjavanja mehanističkog djelovanja hipokloritne kiseline na diazepam (prikazanog na shemi 12) koja se događa kako u okolišu tako i u ljudskome organizmu, pokazano je da se ona uspješno može primjenjivati kao zamjena za oksidacijske i demetilacijske reakcije ksenobiotika koji se *in vivo* odvijaju djelovanjem citokroma P450.



Shema 12: Prikaz svih mogućih reakcija oksidacije kojima može podleći molekula diazepam uz hipokloritnu kiselinu kao oksidans

6. LITERATURA

- Archer, G.A., Sternbach, L.H., 1968. Chemistry of benzodiazepines. *Chem. Rev.* 68, 747–784.
- Bickel, M.H., 1969. The pharmacology and biochemistry of N-oxides. *Pharmacol. Rev.* 21, 325–355.
- Black & Veatch Corporation, 2009. *White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Božičević, L., Sremec, H., Mehanizam racemizacije oksazepama. (Rad prijavljen na natječaj za Rektorovu nagradu) Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018.
- Carpinteiro, I., Rodil, R., Quintana, J.B., Cela, R., 2017. Reaction of diazepam and related benzodiazepines with chlorine. Kinetics, transformation products and in-silico toxicological assessment. *Water Res.* 120, 280–289.
- Frisch, MJ, Trucks, GW, Schlegel, HB, Scuseria, GE, Robb, MA, Cheeseman, JR, Scalmani, G, Barone, V, Petersson, GA, Nakatsuji, H i sur. *Gaussian 16 Rev. B.01*; Wallingford, CT, 2016.
- Fukuzaki, S., 2006. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Sci.* 11, 147–157.
- Greenblatt, D.J., Harmatz, J.S., Friedman, H., Locniskar, A., Shader, R.I., 1989. A large-sample study of diazepam pharmacokinetics. *Ther. Drug Monit.* 11, 652–657.
- Hok, L. Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila i ekotoksikološka analiza kloriranih produkata. (Rad za natječaj za Rektorovu nagradu) Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.
- Hurst, J.K., 2012. What really happens in the neutrophil phagosome? *Free Radic. Biol. Med.* 53, 508–520.
- Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2017. - www.halmed.hr (pristupljeno 9.12.2019.).
- Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2018. - www.halmed.hr (pristupljeno 9.12.2019.).
- Katzung, B.G.; M., 2015. *Basic & Clinical Pharmacology 13th Edition*, McGraw-Hill Medical.
- Medić-Šarić, M., Rendić, S., 2016. *Metabolizam lijekova i odabranih kesnobotika*.

- Mfuh, A.M., Larionov, O.V., 2015. Heterocyclic N-Oxides – An Emerging Class of Therapeutic Agents. *Curr. Med. Chem.* 22, 2819–2857.
- Mitchell, S., Smith, R., 2001. Trimethylaminuria: the fish malodor syndrome. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 517–21.
- Morgan, E.T., Goralski, K.B., Piquette-Miller, M., Renton, K.W., Robertson, G.R., Chaluvadi, M.R., Charles, K.A., Clarke, S.J., Kacevska, M., Liddle, C., Richardson, T.A., Sharma, R., Sinal, C.J., 2008. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 36, 205–216.
- Nordazepam. *Drugs.com*. (pristupljeno 9.12.19).
- Pattison, D.I., Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2007. Hypochlorous Acid-Mediated Protein Oxidation: How Important Are Chloramine Transfer Reactions and Protein Tertiary Structure? †. *Biochemistry* 46, 9853–9864.
- Pem, B., Vrček, V., 2018. Substituent effects on the stability of 1,4-benzodiazepin-2-one tautomers: A density functional study. *Int. J. Quantum Chem.* 118, e25523.
- Računalni klaster Isabella, SRCE – Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računalni centar Srce. <https://www.srce.unizg.hr/en/isabella-cluster>
- Sažetak opisa svojstava lijeka - Normabel 10 mg tablete - www.halmed.hr (pristupljeno 12.9.2019.)
- Sažetak opisa svojstava lijeka - Praxiten 15 mg tablete - www.halmed.hr (pristupljeno 12.9.2019.)
- Sažetak opisa svojstava lijeka - Temazepam 10 mg tablete - www.medicines.org.uk (pristupljeno 12.9.2019.)
- Sternbach, L.H., 1979. The benzodiazepine story. *J. Med. Chem.* 22, 1–7.
- Šakić, D., 2015. Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka (Doktorska disertacija). Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Šakić, D., Hanževački, M., Smith, D.M., Vrček, V., 2015. A computational study of the chlorination and hydroxylation of amines by hypochlorous acid. *Org. Biomol. Chem.* 13, 11740–11752. Local version is available at <http://andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html>
- Tandarić, T., 2016. Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila (Diplomski rad). Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zavod za organsku kemiju
- Wade, L.G., Simek, J.W., 2016. *Organic Chemistry*, 9. izdanje, Pearson, Glenview, IL.

Wick, J.Y., 2013. The History of Benzodiazepines. *Consult. Pharm.* 28, 538–548.

Yang, B., Xu, C., Kookana, R.S., Williams, M., Du, J., Ying, G., Gu, F., 2018. Aqueous chlorination of benzodiazepines diazepam and oxazepam: Kinetics, transformation products and reaction pathways. *Chem. Eng. J.* 354, 1100–1109.

7. SAŽETAK

Diazepam je danas jedan od najkorištenijih farmaceutika, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu te se kao takav u velikoj mjeri nalazi u otpadnim vodama koje se potom tretiraju hipokloritnom kiselinom. Hipokloritna se kiselina također može naći kao medijator upalnih stanja u ljudskome organizmu stoga je promatrana njegova sudbina u prisutstvu toga oksidansa. Pažnja je usmjerena na reaktivna mjesta u diazepamu – N1C, C3 te N4 atome te je računato koji su produkti vjerojatniji s obzirom da energetske barijere procesa te stabilnost samih produkata i kojim putevima oni nastaju. Rezultati dobiveni u ovome radu pokazali su da se hipokloritna kiselina uspješno može koristiti za proučavanje oksidacije i demetilacije ksenobiotika te je razjašnjen mehanizam tih reakcija na primjeru diazepama. Demetilaciji prethodi sekundarna hidroksilacija N1C atoma, dok će se oksidacija vjerojatnije odvijati na C3 nego na N4 atomima.

Mehanizmi oksidacije i demetilacije proučavani su kvantno-kemijskim modelima kojima su se računale energije produkata, prijelaznih stanja te reaktanata, dok su se strukture optimizirale na B3LYP funkcionalu u kombinaciji s 6-31/G(d) baznim skupom. Za simulaciju utjecaja vode kao otapala korišten je SMD model na istom baznom skupu te funkcionalu ($\epsilon=78.4$), dok je položaj eksplicitnih voda uključenih u reakciju određen modificiranom verzijom stohastičke metode.

Ključne riječi: diazepam, oksidacija, demetilacija, hipokloritna kiselina, računalna studija, nordiazepam, oksazepam

8. SUMMARY

Diazepam is one of the most used pharmaceuticals both in Croatia and in the world and can as such be found in waste waters which are treated with hypochlorous acid. Hypochlorous acid can also be found in the human body as a mediator of inflammation and was therefore observed as an oxidizing agent. This paper focused on reactive sites in the diazepam molecule – N1C, C3 and N4 atoms. Product stabilities and energy barriers of the processes were calculated. Results show that hypochlorous acid can successfully be used as a xenobiotic oxidizing and demethylating agent. Mechanisms of those paths were shown on the diazepam molecule. Secondary hydroxylation of the N1C atom precedes demethylation while oxydation is more likely to take place on C3 than N4 atom.

Oxidation and demethylation mechanisms were studied using quantum chemical models to calculate energies of reactants, transition states and products while the structures were optimized using B3LYP functional with 6-31/G(d) as standard basis. To simulate the effect of water as a solvent SMD model combined with the same standard basis and functional was used ($\epsilon=78.4$). The position of explicit water molecules included in the reaction was determined using a modified version of the stochastic method.

Key words: diazepam, oxidation, demethylation, hypochlorous acid, computer study, nordiazepam, oxazepam

Životopis

Helena Sremec rođena 27. srpnja 1995. završila je Osnovnu školu Petra Zrinskog 2010. godine u Zagrebu. Tada upisuje zagrebačku XV. gimnaziju, a po završetku 2014. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Farmacija.

Kroz svoj se studij Helena bavila istraživačkim radom te radom u studentskoj udruzi. 2018. je nagrađena Rektorovom nagradom za rad „Mehanizam racemizacije oksazepama“ u kategoriji individualnog znanstvenog rada, izrađen na Zavodu za organsku kemiju. Proširenjem toga rada 2018. objavljen je članak „Racemization of oxazepam and chiral 1,4-benzodiazepines. DFT study of the reaction mechanism in aqueous solution.“ u časopisu *Organic & biomolecular chemistry*. Također je imala usmeno izlaganje na Simpoziju studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS 2018.) te postersko izlaganje na *Computational chemistry day 2018.* godine.

Sudjelovala je na kongresu Sekcije za onkološko ljekarništvo Hrvatskog farmaceutskog društva 2018. kao i na 11. ISABS konferenciji (International Society for Applied Biological Sciences) 2019. godine.

Kroz rad u Udruzi studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske u mandatu 2018./2019. bila je članica Izvršnog odbora te obnašala ulogu Povjerenika za promidžbu i sponzorstva. Bila je član organizacijskog odbora 6. Kongresa Udruge (2019.), 16. EPSA Autumn Assemblyja (2019.) te pomogla organizaciju 4. Kongresa (2017.) i Natjecanja u kliničkim vještinama (2017.). 2017. godine je osvojila 3. mjesto na Natjecanju u konzultacijskim vještinama, a 2018. 1. mjesto na Natjecanju u kliničkim vještinama.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Mehanizam oksidacije diazepama hipokloritnom kiselinom. Kvantno-kemijska studija.

Helena Sremec

SAŽETAK

Diazepam je danas jedan od najkorištenijih farmaceutika, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu te se kao takav u velikoj mjeri nalazi u otpadnim vodama koje se potom tretiraju hipokloritnom kiselinom. Hipokloritna se kiselina također može naći kao medijator upalnih stanja u ljudskome organizmu stoga je promatrana njegova sudbina u prisutstvu toga oksidansa. Pažnja je usmjerena na reaktivna mjesta u diazepamu – N1C, C3 te N4 atome te je računato koji su produkti vjerojatniji s obzirom da energetske barijere procesa te stabilnost samih produkata i kojim putevima oni nastaju. Rezultati dobiveni u ovome radu pokazali su da se hipokloritna kiselina uspješno može koristiti za proučavanje oksidacije i demetilacije ksenobiotika te je razjašnjen mehanizam tih reakcija na primjeru diazepama. Demetilaciji prethodi sekundarna hidroksilacija N1C atoma, dok će se oksidacija vjerojatnije odvijati na C3 nego na N4 atomima.

Mehanizmi oksidacije i demetilacije proučavani su kvantno-kemijskim modelima kojima su se računale energije produkata, prijelaznih stanja te reaktanata, dok su se strukture optimizirale na B3LYP funkcionalu u kombinaciji s 6-31/G(d) baznim skupom. Za simulaciju utjecaja vode kao otapala korišten je SMD model na istom baznom skupu te funkcionalu ($\epsilon=78.4$), dok je položaj eksplicitnih voda uključenih u reakciju određen modificiranom verzijom stohastičke metode.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 21 grafički prikaz, 2 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: diazepam, oksidacija, demetilacija, hipokloritna kiselina, računalna studija, nordiazepam, oksazepam

Mentor: **Dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Valerije Vrčec, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Tin Weitner, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Mechanism of diazepam oxidation with hypochlorous acid. Quantum-chemical study.

Helena Sremec

SUMMARY

Diazepam is one of the most used pharmaceuticals both in Croatia and in the world and can as such be found in waste waters which are treated with hypochlorous acid. Hypochlorous acid can also be found in the human body as a mediator of inflammation and was therefore observed as an oxidizing agent. This paper focused on reactive places in the diazepam molecule – N1C, C3 and N4 atoms, the product stability and energy barriers of the processes were calculated. Results show that hypochlorous acid can successfully be used as a xenobiotic oxidizing and demethylating agent and mechanisms of those paths were shown on the diazepam molecule. Secondary hydroxylation of the N1C atom precedes its demethylation while oxidation is more likely to take place on C3 than N4 atom.

Oxidation and demethylation mechanisms were studied using quantum chemical models to calculate energies of reactants, transition states and products while the structures were optimized using B3LYP functional with 6-31/G(d) as standard basis. To simulate the effect of water as a solvent SMD model combined with the same standard basis and functional was used ($\epsilon=78.4$). The position of explicit water molecules included in the reaction was determined using a modified version of the stochastic method.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 21 figures, 2 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: diazepam, oxidation, demethylation, hypochlorous acid, computer study, nordiazepam, oxazepam

Mentor: **Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Valerije Vrčec, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tin Weitner, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.

