

# Kvantno-kemijska studija enantiomerizacije oksazepama

---

Hok, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:371285>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



**Lucija Hok**

**Kvantno-kemijska studija enantiomerizacije  
oksazepama**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Organska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za organsku kemiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i suvoditeljstvom dr. sc. Davora Šakića, višeg asistenta-poslijedoktoranda sa Zavoda za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Najiskrenije zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na nesebičnoj pomoći i uloženom vremenu prilikom izrade ovog rada, ali i na svemu što sam od njega naučila u proteklih nekoliko godina.

Posebno zahvaljujem komentoru dr. sc. Davoru Šakiću na svim dragocjenim savjetima i pomoći, ali i na podršci i prijateljskom razgovoru kada god je bilo potrebno.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na svemu!

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Stereokemija .....	1
1.1.1. Kiralnost i optička aktivnost .....	1
1.1.2. Konfiguracijska nestabilnost.....	3
1.1.3. Važnost enantiomerizacije prilikom razvoja lijekova.....	3
1.2. Benzodiazepini .....	5
1.2.1. Povijest benzodiazepina.....	5
1.2.2. Upotreba benzodiazepina u Hrvatskoj .....	6
1.2.3. Kemijska struktura .....	6
1.2.4. Mehanizam djelovanja .....	7
1.2.5. Važnost stereokemije u interakciji s biomolekulama .....	11
1.2.6. Kinetika racemizacije oksazepama .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>18</b>
3.1. Osnove kvantno-kemijskih izračuna.....	18
3.2. Metode i parametri kvantno-kemijskih izračuna .....	20
3.3. Solvatacijski efekti.....	21
3.4. Korištene računalne metode .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>23</b>
4.1. Predloženi mehanizmi enantiomerizacije .....	25
4.2. (i) C3-H/H izmjena .....	26
4.3. (ii) Keto-enolna tautomerija .....	28
4.4. (iii) Protoniranje C3-OH i eliminacija H <sub>2</sub> O.....	30
4.5. (iv) Prsten-lanac tautomerija.....	33
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>48</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	<b>50</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Stereokemija

#### 1.1.1. Kiralnost i optička aktivnost

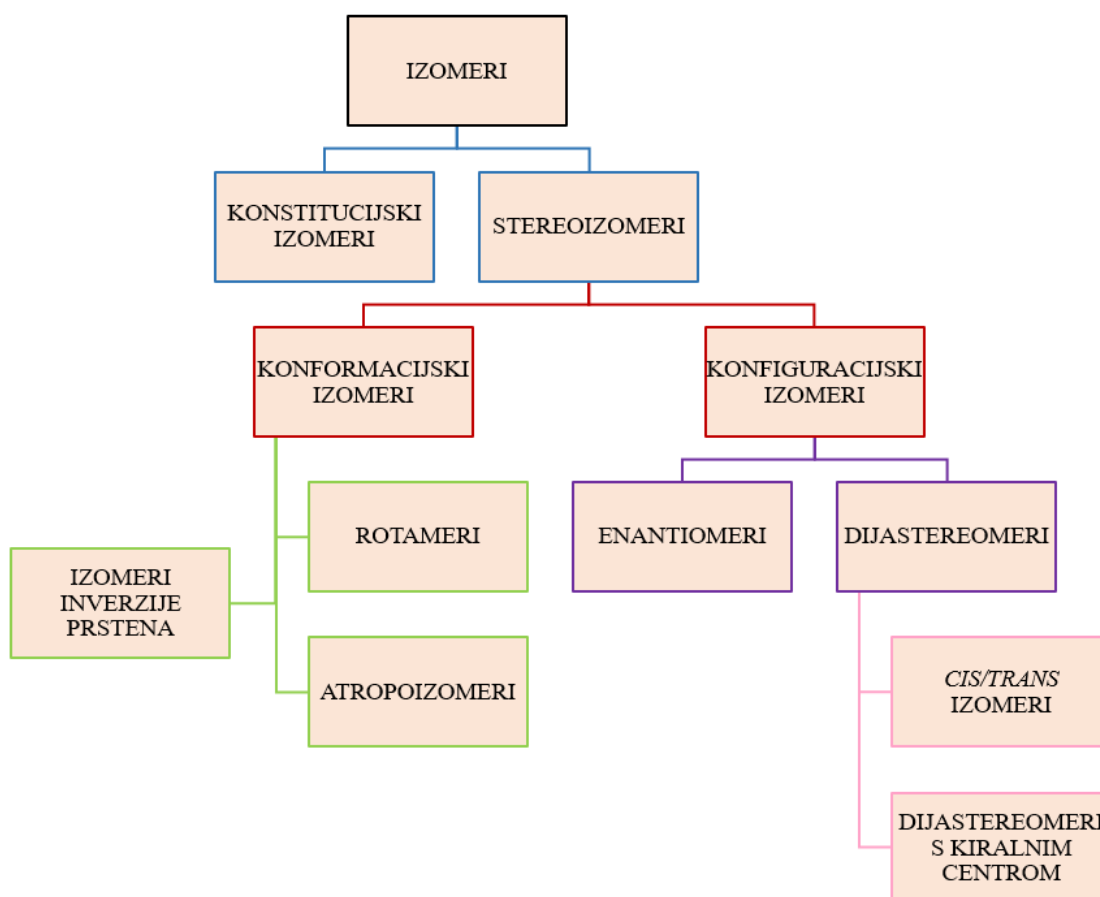
Prostorni odnosi između atoma unutar molekule mogu znatno utjecati na fizička, kemijska i biološka svojstva spojeva. Izomeri koji se razlikuju samo u prostornom rasporedu sastavnih atoma ili skupina nazivaju se stereoizomeri. Konformacijski stereoizomeri pri sobnoj temperaturi lako prelaze jedan u drugi, dok kod konfiguracijskih stereoizomera međusobna pretvorba nije laka, nego je najčešće praćena kidanjem veza. Konfiguracijski stereoizomeri se dijele na enantiomere i dijastereomere koji mogu biti *cis/trans* izomeri ili dijastereomeri s kiralnim centrom (Slika 1). Konfiguracijski stereoizomeri koji pokazuju optičku aktivnost su kiralne molekule. Kiralnost je posljedica asimetrije, tj. odsustva pojedinih elemenata simetrije, kao što su ravnina, os ili centar simetrije. Enantiomeri su kiralne molekule koje se odnose kao predmet i njegova zrcalna slika, a međusobno se ne mogu preklopiti. Središte asimetrije u takvim molekulama je ugljikov atom na koji su vezana četiri različita atoma ili skupine, tzv. kiralni centar ili asimetrični ugljikov atom. Osim asimetričnih ugljikovih atoma, skupini stereogenih jedinica pripadaju i dvostruko vezani ugljikovi atomi u *cis/trans* izomerima. Enantiomeri imaju jednaka kemijska i fizička svojstva, osim što zakreću ravninu linearno polariziranog svjetla za isti kut, ali u suprotnom smjeru. Molekule s  $n$  kiralnih centara imaju  $2^n$  stereoizomera. Pojedini stereoizomeri s dva ili više kiralnih centara sadrže ravninu simetrije pa su optički neaktivni, a nazivaju se mezo-spojevi. Kiralni spojevi nemaju simetrične (akiralne) konformacije i niti jedna od njihovih konformacija se ne izmjenjuje sa svojom zrcalnom slikom. Akiralni spojevi mogu rotirati i imati kiralne konformacije, ali te kiralne konformacije mogu prelaziti u svoje zrcalne slike (Wade, 2017).

Iako je kiralnost potreban uvjet za optičku aktivnost, kiralni spojevi ne moraju nužno biti optički aktivni. Takvo je ponašanje karakteristično za racemat, smjesu jednakih količina enantiomera. Budući da svaki enantiomer zakreće ravninu polariziranog svjetla za isti iznos, ali u suprotnom smjeru, optička aktivnost neće biti uočena (Pine, 1994).

Konfiguracijski stereoizomeri koji nisu u zrcalnom odnosu, tj. ne odnose se kao predmet i njegova zrcalna slika, nazivaju se dijastereomeri. Za razliku od enantiomera, dijastereomeri imaju različita fizička i kemijska svojstva. Kemijsko razdvajanje enantiomera (optičko razdvajanje ili rezolucija) se temelji upravo na toj činjenici.

Enantiomerno čisti spoj (sredstvo za razdvajanje) kompleksira ili reagira s enantiomerima i nastaje par diastereomera. Pretvorba enantiomera u diastereomere omogućava njihovo razdvajanje na temelju različitih fizičkih svojstava, a zatim se sredstvo za razdvajanje odcjepljuje od čistih enantiomera. Fizikalno razdvajanje enantiomera uključuje kiralnu kromatografiju kod koje je stacionarna faza presvučena kiralnim molekulama koje s enantiomerima tvore diastereomerne komplekse različitih energija vezanja i konstanti ravnoteže kompleksiranja. Odvajanje enantiomera je posljedica različitog vremena zadržavanja na koloni (Ahuja i Scypinski, 2001; Watson, 1999).

Torzijska kiralnost ili atropoizomerizam je vrsta kiralnosti koja ne zahtijeva asimetriju. Javlja se kada ograničenje rotacije oko jednostruke veze omogućuje razdvajanje dvaju izomera. Najpoznatiji primjer su bifenilni spojevi, npr. poliklorirani bifenili (PCB) kod kojih je, neveznim odbijanjem velikih skupina u orto-položajima pojedinih aromatičnih prstena, ograničena slobodna rotacija oko jednostruke veze koja spaja dva prstena (Pine, 1994).



Slika 1. Klasifikacija izomera (Smith, 2009).

### 1.1.2. Konfiguracijska nestabilnost

Konfiguracijska nestabilnost stereoizomernih lijekova može se promatrati na dvije razine, makroskopskoj i mikroskopskoj. Makroskopska i statistička razina obuhvaća proces formiranja ravnotežne smjese dvaju stereoizomera polazeći od jednog stereoizomera, dok mikroskopska i molekularna razina podrazumijeva reverzibilnu konverziju jednog stereoizomera u drugi i odvija se kinetikom prvog reda (Reist i sur., 2003).

Racemizacija je makroskopski i statistički proces ireverzibilne transformacije jednog enantiomera u racemičnu smjesu (1). Također se definira i kao proces gubitka optičke aktivnosti neke supstancije tijekom vremena. Konstanta brzine racemizacije ( $k_{rac}$ ) se odnosi na brzinu formiranja racemične smjese, tj. proces u kojem 50 % molekula početnog enantiomera konvertira u drugi enantiomer.



Enantiomerizacija je mikroskopski proces koji se događa na molekularnoj razini, a predstavlja reverzibilnu konverziju jednog enantiomera u drugi (2). Enantiomer mijenja konfiguraciju prolazeći kroz prijelazno stanje i/ili preko međuprodukta. Konstanta brzine enantiomerizacije ( $k_{enant}$ ) se odnosi na proces konverzije  $R \rightarrow S$  ili  $S \rightarrow R$ , a jednaka je polovini konstante brzine racemizacije:  $k_{enant} = \frac{1}{2}k_{rac}$ .



Slično enantiomerizaciji, proces pretvorbe jednog dijastereomera u drugi, promatrano na molekularnoj razini, naziva se dijastereomerizacija. Makroskopski proces formiranja ravnotežne smjese dvaju dijastereomera, počevši od jednoga, naziva se mutarotacija. Za razliku od enantiomera, dijastereomeri se razlikuju u energiji, što znači da udio dijastereomera u ravnotežnoj smjesi neće biti jednak. Posljedica različitih energija dvaju dijastereomera jesu i različite konstante brzine pretvorbe dijastereomera 1 u dijastereomer 2 u odnosu na reverzibilni proces (Reist i sur., 1995; Maskill, 1990).

### 1.1.3. Važnost enantiomerizacije prilikom razvoja lijekova

Ljudsko tijelo kiralni je sustav: proteini i peptidi sastavljeni su od L-aminokiselina, energiju dobivamo iz D-ugljikohidrata, DNA molekula i  $\alpha$ -uzvojnica (sekundarna struktura proteina) desno su zavijene. U takvom kiralnom okolišu, procesi kao što su apsorpcija, vezanje na proteine plazme i DNA, transport, interakcija s enzimima i receptorima te metabolizam, mogu se značajno razlikovati za pojedine enantiomere.

Posljedica toga može biti različita farmakokinetika, farmakodinamika te terapijski i neželjeni učinci za pojedine enantiomere i njihovu ekvimolarnu smjesu (Smith, 2009).

U nekim metaboličkim putevima događaju se reakcije inverzije konfiguracije, najčešće u sekvencijskom nizu od dvije ili tri reakcije pri čemu nastaju jedan ili dva stabilna intermedijera (Reist i sur., 1995). Nekoliko racemaza je izolirano, identificirano i karakterizirano:  $\alpha$ -metilacil-CoA racemaza, racemaza N-acilaminokiselina, racemaza bademove kiseline, alanin, aspartat, glutamat i hidantoin racemaza. Također, u reakcijama oksidoredukcije, konjugacije i u ravnotežnim reakcijama sulfoksid/sulfid te N-oksid/tercijarni amin, može doći do enzimatski kataliziranih kiralnih inverzija (Reist i sur., 2003). Klasičan primjer je oksidacija optički aktivnih sekundarnih alkohola pomoću dehidrogenaza do ketona, koji mogu biti enzimatski reducirani do sekundarnih alkohola suprotne konfiguracije. Radi se o gubitku  $sp^3$  centra, tj. nastanku  $sp^2$  ugljikovog atoma koji „ne pamti“ prethodnu konfiguraciju pa je vjerojatnost da će nastati enantiomer suprotne konfiguracije 50 % (Reist i sur., 1995).

Primjer ireverzibilne kiralne inverzije kao metaboličke aktivacije, nastanak je aktivnih S-enantiomera iz neaktivnih R-enantiomera protuupalnih 2-arilpropanskih kiselina, poznatijih kao profena. Epimerizaciji prethodi konjugacija s acetil-CoA koju katalizira CoA-ligaza dugog lanca. Reakcija konjugacije je enantioselektivna, samo neaktivni R-enantiomer podliježe reakciji.  $\alpha$ -metilacil-CoA racemaza katalizira nastanak smjese S- i R-acil-CoA tioestera, a nakon stereo-neselektivne hidrolize, konačna je smjesa obogaćena S-enantiomerom profena (Tegeder i sur., 2003; Mayer, 1990; Hutt i Caldwell, 1983).

Najpoznatiji i najtragičniji primjer koji govori o važnosti stereokemije u farmaciji je talidomid. Njegova upotreba kao sedativa i antiemetika u trudnoći započela je 50-ih godina prošloga stoljeća i trajala sve do 1961. godine kada je povučen s tržišta zbog teratogenosti. Rezultat njegove široke upotrebe u Europi, Australiji i Japanu je rođenje 10 000 djece s fokomelijom – sindromom koji se manifestira malformacijama i redukcijom udova te raznim drugim poremećajima vida, sluha, kardiovaskularnog i reproduktivnog sustava, kao posljedica inhibicije angiogeneze i faktora rasta (Kim i Scialli, 2011; Timbrell, 2009). Talidomid je kiralni lijek koji se primjenjuje kao racemična smjesa. Teratogeni učinak se pripisuje S-enantiomeru talidomida, dok se R-talidomid smatra sigurnim i zaslužnim za sedativno djelovanje. Talidomidska katastrofa ne bi bila izbjegnuta da se u terapiji primjenjivao čisti R-enantiomer jer u organizmu dolazi do brze racemizacije katalizirane bazičnim medijem i serumskim albuminom (Teo i sur., 2004).



Keto-enolna tautomerija je glavni mehanizam racemizacije talidomida, a odvija se u dva koraka: prijenos protona s kiralnog centra na kisikov atom susjedne karbonilne skupine i rotacija glutarimidnog prstena (Tian i sur., 2012).

Dramatične razlike u djelovanju i toksičnosti pojedinih enantiomera te napredak tehnologije u razvoju i istraživanju lijekova, potakle su FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i EMA (engl. *European Medicines Agency*) da 1992., odnosno 1993. godine donesu nove zahtjeve za razvoj kiralnih lijekova i njihovo stavljanje na tržište ([www.fda.gov](http://www.fda.gov); [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Kiralno-specifični zahtjevi uključuju adekvatnu proizvodnu kontrolu (uklanjanje diastereomernih onečišćenja), ispitivanje stabilnosti (racemizacija tijekom skladištenja), evaluacija farmakokinetike (krivulje doza-odgovor za različite enantiomere) i ispravna interpretacija različitih podataka o farmakokinetičkim svojstvima dobivenima na animalnim i humanim modelima. Prema smjernicama, sastav kiralnog lijeka primijenjenog u farmakološkim, toksikološkim i kliničkim studijama mora biti poznat. Lijekovi koji su prethodno registrirani kao racemati postaju kandidati za *chiral switch* (tj. razvoj enantiomera s boljim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim profilom), što osigurava pravo na produljenje patentne zaštite. Zahtjevi regulatornih agencija doveli su do toga da se danas na tržište u najvećoj mjeri plasiraju pojedinačni enantiomeri, a ne smjese enantiomera ili diastereomera kao što je to bilo ranije (Agranat i sur., 2002).

## 1.2. Benzodiazepini

### 1.2.1. Povijest benzodiazepina

Osim barbiturata i nekih tradicionalnih lijekova kao što su pripravci valerijane i broma, do sredine 20. stoljeća medicina nije raspolagala lijekovima za liječenje psihičkih poremećaja. Istraživanja i sinteze prvih anksiolitika, započetih 40-ih godina, najavila su novo razdoblje u farmaciji, tzv. *psihofarmakološku revoluciju* (Lacković, 2001). Prvi benzodiazepin – klordiazepoksid, sintetizirao je Sternbach sa suradnicima iz Hoffman-La Rocha, reakcijom između 6-kloro-2-klorometil-4-fenilkinazolin-3-oksida i metilamina. Klordiazepoksid je pokazao sedativno, miorelaksirajuće i antikonvulzivno djelovanje, a 1960. godine registriran je pod trgovačkim imenom Librium® (Foye i sur., 2008; Sternbach, 1971). Tri godine kasnije na tržište je došao 3-10 puta potentniji diazepam, poznatiji kao Valium®, koji je do danas ostao najkorišteniji lijek iz ove skupine (Foye i sur., 2008; Sternbach, 1979). Oksazepam je sintetiziran 1961. godine, a registriran je kao Serax® 1965. godine. Od tada je sintetizirano više od 3000 benzodiazepina i 4000 njihovih derivata, a preko stotinu spojeva registrirano je za terapijsku uporabu u različitim zemljama svijeta.

Danas su benzodiazepini najpopularniji anksiolitici, ali i jedna od najčešće propisivanih skupina lijekova uopće. Ubrajaju se u lijekove s najširim indikacijskim područjem, a o njihovoj masovnoj popularnosti govore i termini nastali u medijima kao što su *Benzodiazepinska Bonanza* i *Valiumomanija*, koji se povezuju s neracionalnom potrošnjom benzodiazepina, često i bez liječničke preporuke (Lacković i Jakovljević, 2001a).

### 1.2.2. Upotreba benzodiazepina u Hrvatskoj

ATK (anatomsko-terapijsko-kemijski) sustav klasifikacije lijekova svrstava benzodiazepine u skupinu N (lijekovi s učinkom na živčani sustav), te dalje u podskupine: N05 (psiholeptici), N05B (anksiolitici), N05BA (derivati benzodiazepina) ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Oksazepam prema ATK klasifikaciji ima šifru N05BA04 ([www.hzzo.hr](http://www.hzzo.hr)).

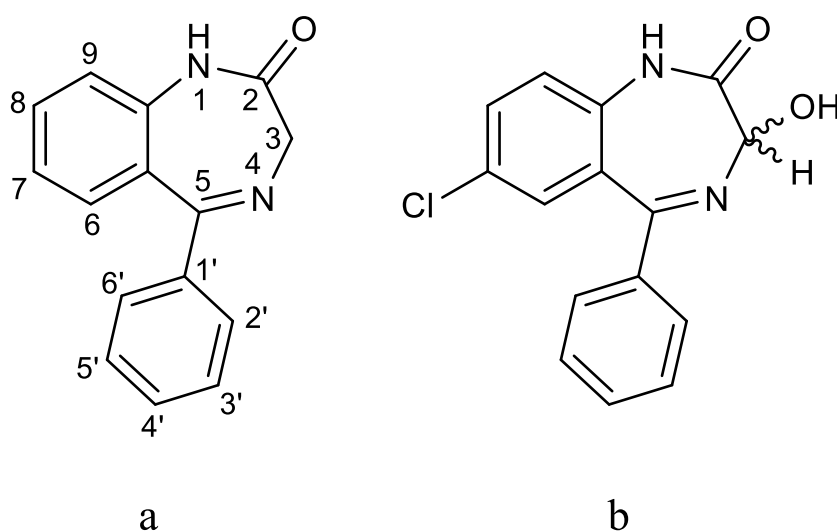
U Republici Hrvatskoj psiholeptici zauzimaju drugo mjesto na popisu najkorištenijih lijekova prema ukupnoj potrošnji u 2016. godini (105.43 definiranih dnevnih doza na 1000 stanovnika na dan), te na trećem mjestu prema financijskoj potrošnji (344 milijuna kuna). Oksazepam pripada skupini 50 najkorištenijih lijekova u 2016. godini, a zauzima 49. mjesto (5.53 DDD/1000 stanovnika/dan). Financijska potrošnja oksazepama u 2016. godini iznosi 15 milijuna kuna ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

U potrošnji anksiolitika (u DDD/1000 stanovnika/dan) prati se stalan rast od 2.7 % godišnje tijekom posljednjih nekoliko godina (2012.-2016.), a potrošnja čini 72 % potrošnje svih psiholeptika u 2016. godini. Gotovo cjelokupna potrošnja anksiolitika otpada na benzodiazepine, od toga 7 % na oksazepam (Draganić i sur., 2018).

### 1.2.3. Kemijska struktura

Benzodiazepini su biciklički spojevi kod kojih je benzenski prsten povezan s heterocikličkim sedmeročlanim prstenom s dva atoma dušika na položajima 1 i 4 (Slika 2. a). U farmaceutskoj kemiji se 1,4-diazepinski prsten smatra *privilegiranom strukturom* (Smith i sur., 2014). Termin je prvi put upotrijebio Evans 1988. godine kako bi opisao benzodiazepinsku osnovu koju su posjedovali spojevi razvijeni kao nepeptidni antagonisti kolecistokininskih receptora (Evans i sur., 1988). Privilegirana struktura je molekulska osnova, a dodavanje funkcionalnih skupina osnovnoj strukturi ili generiranje kiralnih centara omogućuje farmaceutskom kemičaru dobivanje spektra molekula različitih svojstava s različitim terapijskim učinkom (Costantino i Barlocco, 2006; Patchett i Nargund, 2000).

Oksazepam je 1,4-benzodiazepin-2-on s hidroksilnom skupinom na položaju C3 (Slika 2. b). C3-OH skupina modulira aktivnost na način da smanjuje antikonvulzivno djelovanje i poremećaje koordinacije pokreta pacijenata (Bogatskii i sur., 1974). Oksazepam pripada skupini kratkodjelujućih benzodiazepina ( $t_{1/2} = 4-8$  h) jer se nakon glukuronidacije OH skupine u položaju C3 vrlo brzo eliminira iz organizma uzrokujući minimalne kumulativne učinke dugotrajnom upotrebom, za razliku od dugodjelujućih benzodiazepina (Foye i sur., 2008).



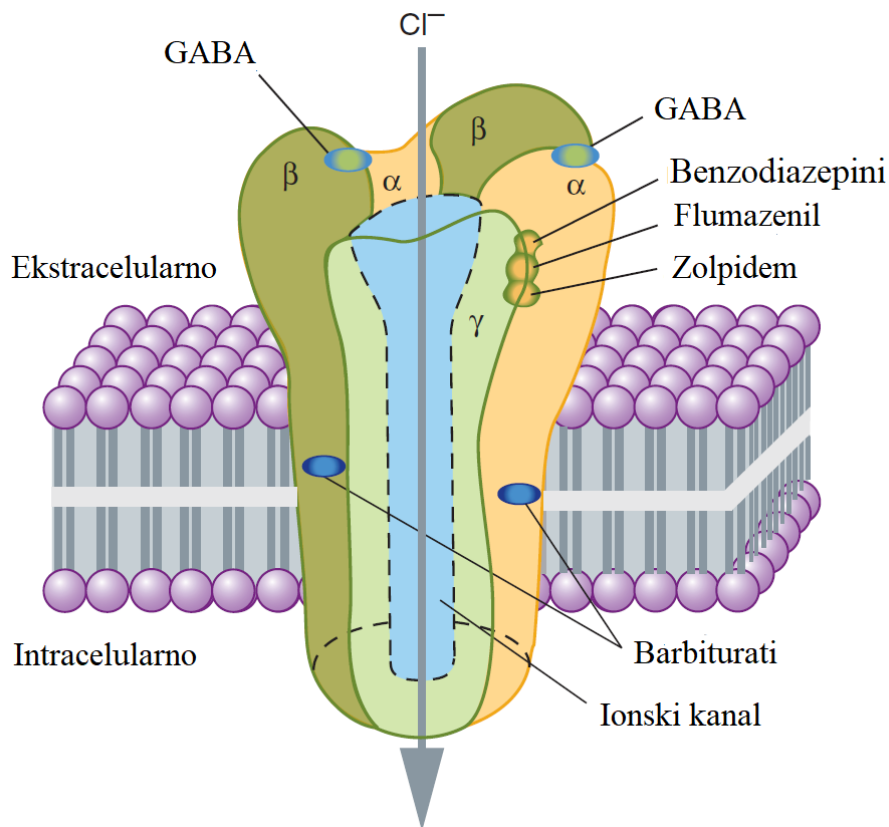
Slika 2. a) Osnovna struktura 1,4-benzodiazepin-2-ona s numeriranim atomima. b) Struktura oksazepama.

#### 1.2.4. Mehanizam djelovanja

U patofiziologiju anksioznosti su uključeni neurotransmiteri  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA), noradrenalin i serotonin, a smatra se da je njihova anatomsko i funkcionalna interakcija vrlo složena. Zapaženo je da stimulacija neurona u *locusu coeruleusu*, koji sadrže visoke koncentracije noradrenalina, dovodi do stanja agitacije i straha u eksperimentalnih životinja (Redmond i Huang, 1979). Benzodiazepini moduliraju otpuštanje noradrenalina stimulacijom inhibitornih GABA receptora lociranih na noradrenergičkim neuronima (Harary i Kellogg, 1989).

GABA<sub>A</sub> receptor je o ligandu ovisan ionski kanal koji pripada Cys-loop porodici zbog prisutnosti cisteinske petlje u N-terminalnoj domeni (Wafford, 2005). Kanal je hetero-oligomerni glikoprotein sastavljen od pet različitih proteinskih podjedinica koje okružuju središnju poru, selektivno propusnu za kloridne ione (Slika 3).

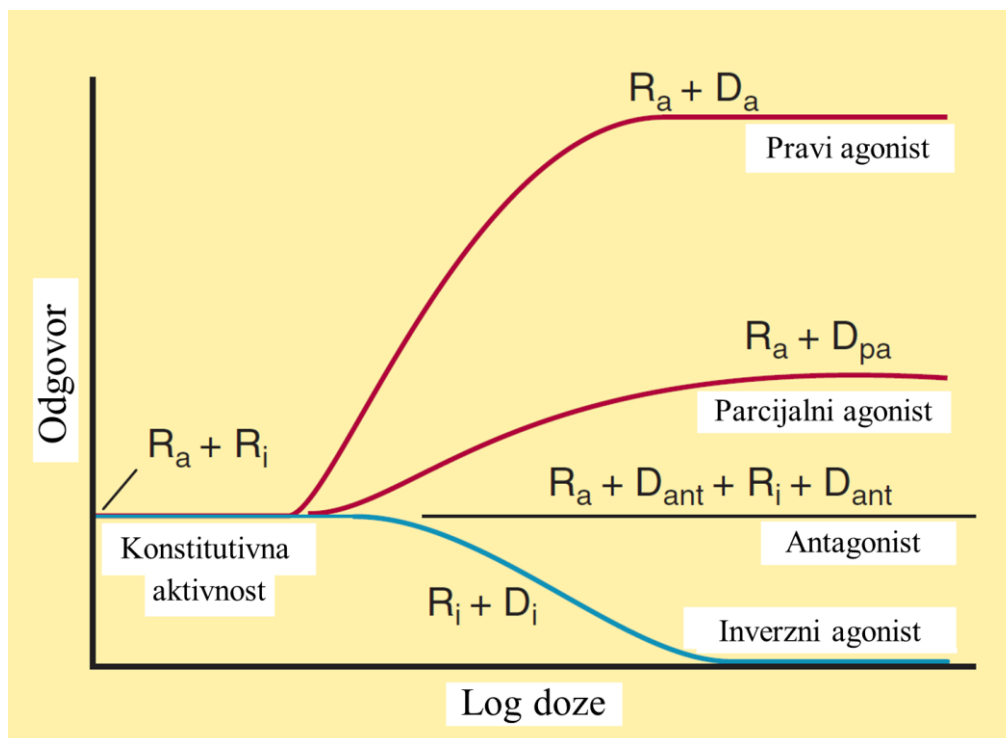
Danas je poznato 18 podjedinica ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ -  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ -  $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon 1$ -  $\epsilon 3$ ,  $\theta$  i  $\pi$ ) koje se mogu različito povezivati i tvoriti molekularno različite oblike GABA<sub>A</sub> receptora (Trevor, 2015). U mozgu 60 % GABA<sub>A</sub> receptora sadrži kombinaciju  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  i  $\gamma 2$  podjedinica (GABA<sub>A1a</sub> izoforma) (Sieghart i sur., 1999). Endogeni ligand GABA<sub>A</sub> receptora je GABA, inhibitorni neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu. Vežanje GABA-e dovodi do otvaranja kanala i ulaska kloridnih aniona u neurone, što rezultira hiperpolarizacijom i smanjenom podražljivošću neurona.



Slika 3. Model GABA<sub>A</sub> receptora s označenim podjedinicama i veznim mjestima najvažnijih liganada (Trevor, 2015).

Benzodiazepini se vežu na benzodiazepinsko vežno mjesto između  $\alpha$  i  $\gamma$  podjedinice, a djeluju kao pozitivni alosterički modulatori (Slika 3). Naime, benzodiazepini ne uzrokuju direktno otvaranje kloridnog kanala, nego promjenom konformacije receptora povećavaju učestalost vezanja GABA-e na receptor, što u konačnici dovodi do pojačane propusnosti za kloridne ione.

Smatra se da GABA<sub>A</sub> receptor egzistira u tri spontano oscilirajuća konformacijska stanja: aktivnom, neutralnom i neaktivnom (Slika 4). Postojanje neutralnog stanja upućuje na zaključak da GABA<sub>A</sub> receptor intrinzički posjeduje bazalnu, tj. konstitutivnu aktivnost, što znači da postoji propusnost za kloridne ione i bez prisutnosti endogenog liganda (GABA). Agonisti (benzodiazepini) ili parcijalni agonisti (imidazetil) benzodiazepinskog veznog mjesta stabiliziraju aktivno stanje i povećavaju afinitet i potentnost GABA-e za receptor maksimalno ili submaksimalno, a to rezultira povećanom propusnošću za kloridne ione. Inverzni (DMCM<sup>1</sup>) ili parcijalni inverzni (RO 15-4513<sup>2</sup>) agonisti reduciraju bazalnu propusnost kloridnih iona, stabilizirajući neaktivno konformacijsko stanje receptora. Kompetitivni antagonisti (flumazenil) se vežu podjednako na oba konformacijska oblika (aktivno i neaktivno), tj. stabiliziraju neutralno stanje receptora. Oni nemaju učinak na funkciju GABA<sub>A</sub> receptora niti na propusnost kanala, nego onemogućuju endogenom ligandu i alosteričkim modulatorima da se vežu na svoja vezna mjesta (Foye i sur., 2008).



Slika 4. Prikaz ovisnosti odgovora receptora i logaritma doze pravog, parcijalnog i inverznog agonista te antagonista.  $R_a$  i  $R_i$  označavaju aktivnu, odnosno neaktivnu konformaciju receptora, dok  $D_a$ ,  $D_{pa}$ ,  $D_i$  i  $D_{ant}$  označavaju pravi, parcijalni odnosno inverzni agonist te antagonist (Katzung, 2015).

<sup>1</sup> metilni ester 6,7-dimetoksi-4-etil- $\beta$ -karbolin-3-karboksilne kiseline

<sup>2</sup> eksperimentalni anksiogenik

Osnovni učinci benzodiazepina su sedacija, hipnoza, amnezija, anestezija, miorelaksacija i antikonvulzivno djelovanje. Najčešće se koriste kao anksiolitici i sedativi/hipnotici, u terapiji anksioznih poremećaja i napadaja panike, posttraumatskog stresnog poremećaja, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, nesanice i poremećaja spavanja. Također su korisni u odvikavanju od ovisnosti o alkoholu i drugim sedativima/hipnoticima. U psihijatriji se mogu koristiti i kod maničnih poremećaja ili hiperekscitabilnosti uzrokovane drogama te kao dijagnostička sredstva. Učinak anterogradne amnezije koristi se u premedikaciji prije operacija ili neugodnih dijagnostičkih zahvata (Trevor, 2015). Diazepam i lorazepam primjenjuju se i kao anestetici, ali uvijek u kombinaciji s drugim lijekovima (Eilers i Yost, 2015). U liječenju epilepsije i drugih konvulzivnih napadaja koriste se klonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam i klorazepat. Imaju primjenu i kao miorelaksansi u terapiji neuromuskularnih poremećaja (Porter i Meldrum, 2015). Lorazepam i diazepam se koriste za prevenciju povraćanja kod kemoterapije (McQuaid, 2015).

Iako se danas koriste pretežno kao depresori središnjeg živčanog sustava, zbog privilegirane strukture i s time povezanog širokog spektra učinaka na različite biološke molekule, potencijal njihove primjene je veoma velik. U istraživanjima su benzodiazepinski derivati pokazali antiproliferativno djelovanje na stanice melanoma i HeLa stanice, citotoksični učinak na stanice zaražene virusom hepatitisa B i na stanice Burkittovog limfoma, inhibiciju histonske deacetilaze, cisteinskih proteaza, kaspaza i g-sekretaze, antagonističko djelovanje na CGRP receptore, receptore bradikinina i endotelina. Navedeni učinci omogućuju njihovu potencijalnu primjenu u liječenju tumora, imunodeficijencija, Alzheimerove bolesti, malarije, migrene, boli i upale te kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti (Spencer i sur., 2010). Također su uočeni njihovi učinci kao antagonista kolecistokininskih receptora A i B (potencijalna terapija gastroezofagealne refluksne bolesti i karcinoma jednjaka), antagonista neurokinina, antagonista HIV transaktivatora Tat i inhibitora reverzne transkriptaze (terapija AIDS-a), antagonista oksitocina, antagonista čimbenika aktivacije trombocita i inhibitora GpIIb/IIIa receptora (antikoagulacijsko djelovanje), agonista  $\kappa$  opioidnih receptora (analgetsko djelovanje), inhibitora Ras farnezil transferaze, blokatora kalcijevih kanala, inhibitora fosfodiesteraze IV, inhibitora Src tirozin kinaze, inhibitora gastrina te kao mogući lijekovi za sistemski eritematozni lupus i reumatoidni artritis (Horton i sur., 2003; Ellman, 1996). Heteroaromatski diazepini su inhibitori bromodomena, proteinskih struktura prisutnih u velikom broju transkripcijskih faktora i regulatora aktivnosti kromatina, zbog čega se ispituju kao potencijalni lijekovi za određene tipove karcinoma (Smith i sur., 2014).

Unatoč pozitivnim svojstvima (velika terapijska širina, niska toksičnost, širok spektar primjene, dobra podnošljivost, brzi učinak i visoka djelotvornost), benzodiazepini su ozloglašeni zbog razvoja ovisnosti kod dugotrajne primjene. Nagli prestanak uzimanja ovih lijekova dovodi do sindroma ustezanja (nesanica, tremor, pojačano znojenje, gastrointestinalni simptomi, razdražljivost, psihoze, konvulzije) i rebound efekta<sup>3</sup>. Razvoj tolerancije i ovisnosti može se izbjeći paralelnom primjenom serotoninskih anksiolitika ili antidepresiva, tako što se nakon akutne faze liječenja, doze benzodiazepina postupno smanjuju i prekida se njihova primjena, dok se terapija održavanja i prevencije ponovne pojave epizode anksioznog poremećaja nastavlja s lijekovima koji ne izazivaju ovisnost (Lacković i Jakovljević, 2001b). Rastući problem je korištenje ovih lijekova kao rekreacijskih droga ili facilitatora zločina, prvenstveno silovanja i pljački (Kim i sur., 2016). U posljednjih desetak godina u internetskoj prodaji pojavili su se tzv. *dizajnerski* benzodiazepini, koji nisu registrirani za upotrebu u farmakoterapiji, niti su na popisu nedozvoljenih supstancija. Prodaju se preko interneta kao *kemikalije za kemijska istraživanja*, a upotrebljavaju se kao rekreacijske droge ili u kriminalne svrhe (Høiseth i sur., 2016; Moosmann i sur., 2014).

#### 1.2.5. Važnost stereokemije u interakciji s biomolekulama

*In vivo* studije pokazuju razliku u farmakokinetici i farmakodinamici enantiomera benzodiazepina (Nguyen i sur., 2006). S(+)-enantiomeri lorazepam i oksazepam lakše istiskuju diazepam i flurazepam s receptora na sinapsama iz mozga štakora, nego R(-)-enantiomeri (Nguyen i sur., 2006; Lu i Yang, 1990; Möhler i Okada, 1977). Vezanje benzodiazepina na GABA<sub>A</sub> receptor također je stereoselektivno: S(+)-enantiomeri vežu se većim afinitetom od R(-)-enantiomera (Papini i sur., 2006; Salvadori i sur., 1989). Posljedično, S(+)-oksazepam je 100-200 puta potentniji anksiolitik i sedativ u odnosu na R(-)-oksazepam (Mohler i Richards, 1983). Isto vrijedi za vezanje na bromodomene. Uočeno je da R-enantiomeri određenih eksperimentalnih benzodiazepina ulaze u sterički sukob s aminokiselinskim ostacima na bromodomenama (Guasch i sur., 2015). Stereoselektivnost je prisutna i kod enzimatske hidrolize u eksperimentalnih životinja – jetrene esteraze prvenstveno hidroliziraju R(-)-oksazepam acetat, dok hidrolaze mozga preferiraju S(+)-enantiomer kod miševa (Yang i sur., 1990; Maksay i sur., 1978). Esteraze u ljudskom mozgu pokazuju jednaku selektivnost prema S(+)-enantiomeru oksazepam acetata (Yang i sur., 1993).

---

<sup>3</sup> Rebound efekt se javlja nakon simptoma ustezanja kao posljedica naglog prekida liječenja, a označava ponovnu pojavu simptoma zbog kojih je bolesnik liječen, ali u pojačanom obliku.

S obzirom da je prostorni raspored skupina u molekuli ključan za interakciju s enzimima, receptorima, transportnim proteinima ili DNA, stereoselektivnost pri vezanju na biomolekule nije nužno ograničena na konfiguracijske izomere, nego je uočena i kod konformera (npr. atropoizomera). Iako su atropoizomeri diazepama izoenergetski (Pem i Vrček, 2018), *M*-oblik se dominantno veže na albumin (Pistolozzi i Bertucci, 2008), dok  $\alpha$ -1-kiseli glikoprotein ima stereospecifični afinitet za *P*-atropoizomer (Fitos i sur., 2007), što utječe na koncentraciju konformera u plazmi, na raspodjelu, metabolizam i eliminaciju.

Stereoselektivnost je uočena i kod metabolizma ksenobiotika u ljudi. Diazepam se katalitičkim djelovanjem CYP2C19 N-demetilira, pri čemu nastaje nordiazepam. Nordiazepam je prokiralni lijek koji se hidroksilira na položaju C3 djelovanjem CYP3A4, stvarajući oksazepam, većim dijelom (gotovo 90 %) kao *S*-enantiomer (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

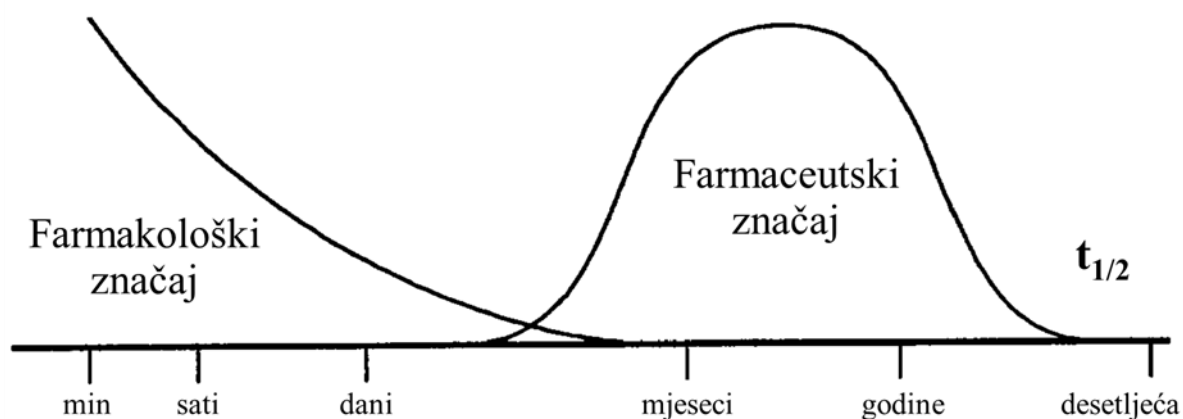
Neki autori tvrde da mehanizam kiralne inverzije oksazepama *in vivo* ne može biti tautomerizacija jer se enantiomeri oksazepama vežu na albumin različitim afinitetom. Različiti afinitet vezanja na albumin za posljedicu ima inhibiciju napada hidroksilnih iona (ili vode) što usporava epimerizaciju i racemizaciju *in vivo*. U serumu tretiranih zečeva nađene su različite koncentracije enantiomera, a dodatkom čistog enantiomera u izoliranu plazmu racemizacija nije uočena (Pham-Huy i sur., 2002). He i suradnici su pokazali da je *in vitro* kiralna inverzija oksazepama i lorazepama temperaturno ovisna, odnosno inhibirana je sniženjem temperature vodene otopine na oko 10 °C (He i sur., 2004).

#### 1.2.6. Kinetika racemizacije oksazepama

Poznavanje optičke stabilnosti stereoizomera od velike je važnosti za farmakologiju i farmaceutsku tehnologiju. Za istraživanje i razvoj lijekova relevantne su dvije vremenske skale: farmakološka i farmaceutska (Slika 5). Farmakološka vremenska skala (engl. *pharmacological time scale*) se odnosi na vrijeme zadržavanja lijeka u organizmu pri fiziološkim uvjetima (37 °C, pH = 7.4). Ako je poluvrijeme izomerizacije ( $t_{1/2}$ ) lijeka dulje od mjesec dana, nema farmakološki i terapijski značaj jer je većina lijekova u tom periodu u potpunosti eliminirana iz organizma. Vrlo kratko  $t_{1/2}$  izomerizacije (u sekundama ili minutama) je značajno u pogledu interakcija lijek-transportni protein, lijek-receptor ili lijek-enzim. Ako se  $t_{1/2}$  izomerizacije poklapa s farmakološkom vremenskom skalom, vrlo je važno poznavati kinetiku izomerizacije takvoga lijeka.



Poluvrijeme izomerizacije u tjednima, mjesecima ili godinama od velikog je značaja za farmaceutsku tehnologiju jer je nužno održati optičku čistoću lijeka tijekom procesa proizvodnje i predviđenog roka trajanja proizvoda. Farmaceutska vremenska skala (engl. *pharmaceutical time scale*) se odnosi na vrijeme potrebno za proizvodnju lijeka i predviđeni rok trajanja (Reist i sur., 1995; Testa i sur., 1993).



Slika 5. Farmakološka i farmaceutska vremenska skala (Reist i sur., 1995).

Većina reakcija racemizacije i epimerizacije imaju farmaceutski, a ne farmakološki značaj (Testa i sur., 1993). Međutim, velik broj benzodiazepina s asimetričnim C3-atomom karakterizira optička nestabilnost, tj. racemizacija unutar farmakološke vremenske skale. Stabilnost stereoizomera je relativan pojam, a ovisi o uvjetima u kojima se izomer nalazi, tj. definirana je temperaturom, vrijednošću pH, dielektričnom konstantom otapala i ionskom jakošću. Oksazepam pokazuje izrazitu kiralnu nestabilnost pri fiziološkim uvjetima, a zbog brze racemizacije teško je izolirati optički aktivan oksazepam. Zbog toga se, prilikom ispitivanja kinetike, C3-OH skupina esterificira, a reakcijski uvjeti optimiziraju na način da je moguće simultano odrediti enantiomere oksazepama i njegova derivata te ispitati brzinu hidrolize i racemizacije estera i oksazepama. U kinetičkim ispitivanjima najčešće se koristi oksazepam acetat (Aso i sur., 1988). Sličnih je farmakoloških svojstava kao i oksazepam, zbog čega se koristi i kao kiralni prolijek za ispitivanje enantioselektivnosti mikrosomalnih i citosolnih esteraza u različitim tkivima (Yang i sur., 1993; Yang i sur., 1990; Maksay i sur., 1978).

Enantiomeri oksazepama podliježu racemizaciji u kiselim, neutralnim i bazičnim uvjetima. Energetska barijera racemizacije ( $\Delta G^\ddagger$ ) određena je eksperimentalno. Literaturni podaci o konstanti brzine racemizacije ( $k_{rac}$ ) variraju od  $0.16 \text{ min}^{-1}$  ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) (Yang i Lu, 1992) do  $0.04 \text{ min}^{-1}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 8$ ) (Schoetz i sur., 2000) [ostale  $k_{rac}$  iz literature:  $0.0016 \text{ min}^{-1}$  ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ , ( $\Delta G^\ddagger = 90.6 \text{ kJ/mol}$ ) (Aso i sur., 1988)]. Prema Eyringovoj jednadžbi (3), navedene  $k_{rac}$  odgovaraju energetske barijeri racemizacije u rasponu od 87 do 91 kJ/mol.

$$\Delta G(T) = -RT \ln \left( k_{rac} \frac{h}{k_B T} \right) \quad (3)$$

$\Delta G$ , energetska barijera racemizacije

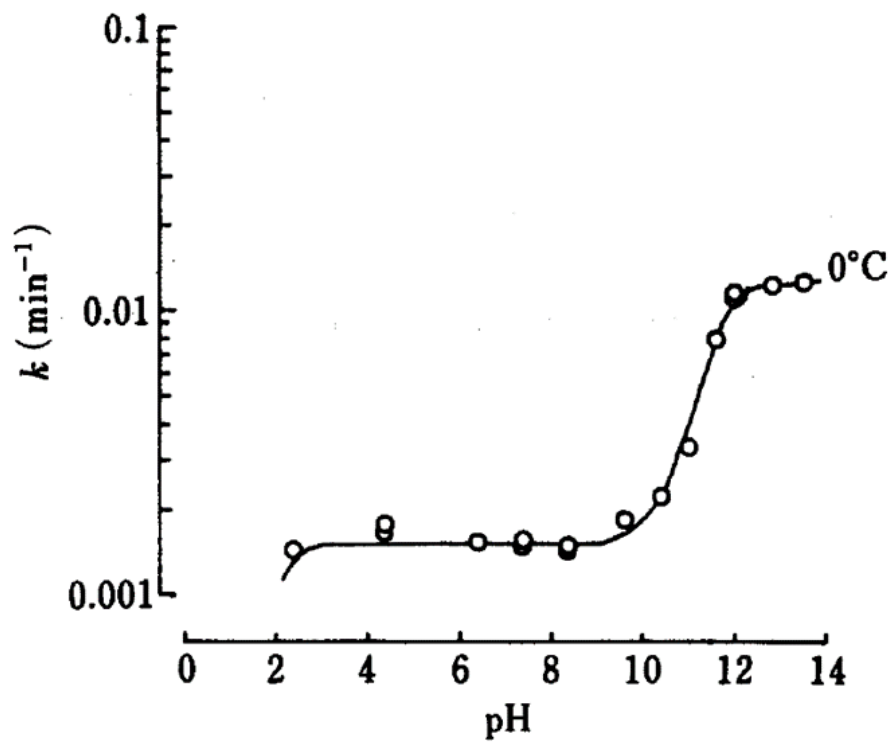
$R$ , opća plinska konstanta =  $8.31441 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$

$T$ , temperatura [K]

$h$ , Planckova konstanta =  $6.626176 \times 10^{-34} \text{ Js}$

$k_B$ , Boltzmannova konstanta =  $1.380662 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$

U rasponu pH od 2 do 10, vrijednost konstante brzine racemizacije oksazepama se ne mijenja. Pri niskom pH,  $k_{rac}$  je niska, dok u području višeg pH,  $k_{rac}$  raste od  $\text{pH} = 10$  do  $\text{pH} \approx 12$ , nakon čega postiže konstantu vrijednost (Slika 6). U literaturi je pretpostavljeni položaj protoniranja N4 atom ( $\text{pK}_{a1} = 1.5$ ), a deprotoniranja C3-OH skupina ( $\text{pK}_{a2} = 11.5$ ) (Yang i Lu, 1992; Aso i sur., 1988; Barrett i sur., 1973). Kinetičkim ispitivanjima na oksazepam acetatu, Yang i Bao su uočili da u bazičnim uvjetima dolazi do izmjene vodikovog atoma C3-H s onima u otapalu te pretpostavili da je mehanizam racemizacije u alkalnoj otopini keto-enolna tautomerija (Yang i Bao, 1994). S obzirom na konstantnu vrijednost  $k_{rac}$  pri uvjetima  $\text{pH} = 2$ - $10$ , može se pretpostaviti da se racemizacija i u neutralnom odvija mehanizmom intramolekulskog protoniranja. Ispitivanjima na C3-metil- i C3-etil-eterima oksazepama u kiselim uvjetima, Yang je pretpostavio da se racemizacija odvija preko C3-karbokationa (Yang, 1994).



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti konstante racemizacije oksazepama o pH vrijednosti pri 0 °C (Aso i sur., 1988).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Proučavanje enantiomerizacije farmaceutika od velikog je značaja u istraživanju i razvoju lijekova. Iako enantiomeri imaju jednaka fizikalna i kemijska svojstva, zbog prostornog usmjerenja supstituenata vezanih na kiralni ugljikov atom, mogu se razlikovati u interakciji s drugim kiralnim molekulama. Takve razlike su posebice vidljive u kiralnom okolišu kakvo je ljudsko tijelo. Zbog razlika u interakciji s enzimima, receptorima, transportnim proteinima ili DNA, enantiomeri mogu pokazivati različita farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, a samim time i različite terapijske i neželjene učinke. Talidomidaska katastrofa je zasigurno najbolnija lekcija farmaciji o važnosti potpune karakterizacije stereoizomernih oblika farmaceutika, uključujući ispitivanje farmakološko-toksikoloških svojstava pojedinih enantiomera. Upravo su takve dramatične razlike u djelovanju različitih enantiomera potakle regulatorne agencije za lijekove da postrože zahtjeve za davanje odobrenja prilikom stavljanja kiralnih lijekova na tržište. Proizvođači lijekova danas moraju obaviti kompletnu stereokemijsku karakterizaciju kiralnih lijekova kako se tragedija ovakvih razmjera ne bi nikada ponovila.

Zbog napretka tehnologije i zahtjeva tržišta, u posljednjih dvadesetak godina, ispitivanje kiralnosti lijekova postalo je goruća tema u akademskoj zajednici i farmaceutskoj industriji. U prilog tome govori i Nobelova nagrada za kemiju dodijeljena 2001. godine dr. Knowlesu, prof. Sharplessu i prof. Noyoriju za razvoj asimetrične sinteze enantiomernih lijekova upotrebom kiralnih katalizatora (Borman, 2001). Analiza tržišta lijekova iz 2006. godine pokazala je da udio kiralnih lijekova u upotrebi iznosi 56 %, a 88 % lijekova registriranih do 2006. godine su racemične smjese dvaju enantiomera (Nguyen i sur., 2006). Slična analiza lijekova registriranih 2015. godine pokazuje da 44 % lijekova pripada skupini malih molekula s jednim ili više kiralnih centara, mase od 250 do 800 Da, a svi su registrirani kao pojedinačni enantiomeri (Calcaterra i D'Acquarica, 2018).

Ispitivanje mehanizma enantiomerizacije oksazepamama značajno je iz više razloga. Oksazepam je aktivni metabolit diazepamama, danas najpropisivanijeg anksiolitika. Uočeno je da različiti enantiomeri oksazepamama pokazuju različita farmakokinetička i farmakodinamička svojstva (različit afinitet vezanja na albumin i GABA<sub>A</sub> receptor), što je korisna informacija farmaceutskim kompanijama pri planiranju *chiral switch*-a. Osim toga, oksazepam pokazuje izrazitu kiralnu nestabilnost pri fiziološkim uvjetima te može poslužiti kao model ispitivanja mehanizma enantiomerizacije strukturno sličnih C3-monosupstituiranih benzodiazepina. Poznavanje mehanizma enantiomerizacije omogućit će modifikaciju strukture s ciljem smanjenja optičke labilnosti unutar farmakološke vremenske skale.

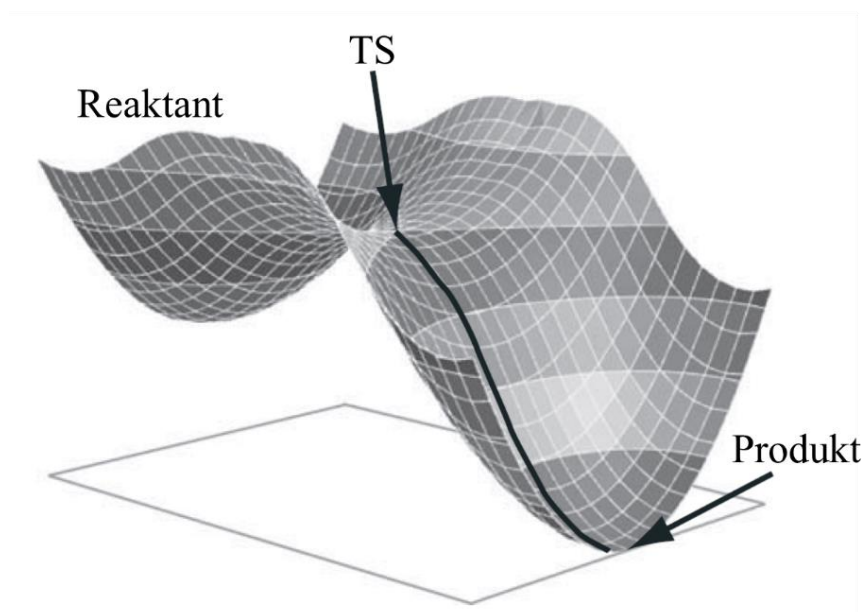
U literaturi je predloženo više mehanizama enantiomerizacije oksazepama, međutim niti jedan nije potvrđen kao glavni reakcijski put. U ovom je radu, upotrebom kvantno-kemijskih metoda, ispitana relevantnost predloženih mehanizama te prihvaćen reakcijski put u skladu s eksperimentalnim kinetičkim podacima pronađenima u literaturi. Kvantno-kemijske metode igraju važnu ulogu u proučavanju stereokemijskih procesa optički labilnih farmaceutika jer, za razliku od eksperimentalne kemije, pružaju izvrsnu mogućnost karakterizacije nestabilnih i kratkoživućih specija.

### 3. MATERIJALI I METODE<sup>4</sup>

#### 3.1. Osnove kvantno-kemijskih izračuna

Kvantno-kemijske metode pripadaju metodama molekuskog modeliranja, tj. metodama elektronske strukture. Najvažnija informacija, kao rezultat kvantno-kemijskih izračuna je elektronska energija. Izračunava se rješavanjem Schrödingerove jednačbe, u skladu s odabranom teorijskom metodom, i neophodna je za procjenu relativne termodinamičke stabilnosti.

Strukturne promjene unutar molekule (duljina veze, vrijednosti veznih i diedarskih kuteva) uzrokuju promjene energije i ostalih svojstava molekuskog sustava (Foresman i Frisch, 1996). Geometrijska optimizacija je metoda energijske minimizacije, tj. iteracijski postupak određivanja molekulske strukture u minimumima elektronske energije pomoću optimizacijskih algoritama unutar određenog koordinativnog sustava koji opisuje položaj svih jezgara (npr. korištenjem kartezijskih koordinata). Ploha potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES) je matematička funkcija koja svakoj molekulskoj strukturi pridružuje odgovarajuću energiju (Slika 7).



Slika 7. Prikaz PES-a za opću reakciju nastajanja produkata iz reaktanata preko prijelaznog stanja (TS) koje povezuje dva minimuma (Bachrach, 2014).

<sup>4</sup> Dio Materijali i metode objavljen je u djelomično izmijenjenom obliku u radu za Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine pod naslovom Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila i ekotoksikološka analiza kloriranih produkata.

PES definira način na koji energija molekuskog sustava varira s promjenama u njegovoj strukturi. Geometrijskom optimizacijom lociraju se stacionarne točke na PES-u. Stacionarna točka u kojoj su sve komponente gradijenta energije jednake nuli, a sve svojstvene vrijednosti matrice drugih derivacija pozitivne predstavlja minimum energije i može odgovarati reaktantima, međuproduktima ili produktima. Stacionarna točka u kojoj je jedna svojstvena vrijednost matrice drugih derivacija negativna, a sve ostale pozitivne naziva se sedlasta točka prvog reda i označava prijelazno stanje (engl. *transition state*, TS) koje povezuje dva minimuma.

Za potpunu karakterizaciju stacionarne točke potreban je frekvencijski račun na odgovarajućoj teorijskoj razini. Frekvencijski račun izračunava frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge i viših derivacija energije u odnosu na atomske koordinate te rješavajući vibracijske Schrödingerove jednadžbe. Uz prikaz svih dostupnih vibracija atoma u molekuli, frekvencijskim računom dobivamo i informaciju odgovara li optimizirana struktura minimumu na PES-u (reaktanti, međuprodukti i produkti) ili prijelaznom stanju. Ako postoji samo jedna imaginarna vibracijska frekvencija, dobiven je minimum u svim smjerovima osim u smjeru vibracije s imaginarnom frekvencijom, što predstavlja strukturu prijelaznog stanja za kemijsku reakciju na toj plohi potencijalne energije. Ukoliko je locirana stacionarna točka s dvije i više imaginarnih frekvencija potrebno je dodatno optimizirati strukturu dok se ne locira stacionarna točka s jednom (TS) ili bez (minimum) imaginarnih frekvencija. Postojanje jedne imaginarne frekvencije karakterizira točku kao prijelazno stanje, no potrebno je primijeniti dodatne procedure kako bi se došlo do zaključka koje minimume ispitivano prijelazno stanje povezuje. Za potvrdu traženog reakcijskog puta, kojeg definira TS, potrebno je pratiti oba reakcijska smjera prema gradijentu intrinzičke reakcijske koordinate (engl. *intrinsic reaction coordinate*, IRC). IRC je računalna tehnika kojom se parcijalno optimizira struktura duž reakcijske koordinate (Hratchian, 2005; Fukui, 1981). Početna točka u IRC računu odgovara strukturi prijelaznog stanja, a njezina se geometrija postupno optimizira do (među)produkata (napredni smjer) i reaktanata (povratni smjer). Dobivene strukture, nakon dodatne geometrijske optimizacije daju minimume koji odgovaraju reaktantima i (među)produktima povezanih tim prijelaznim stanjem.

Ukupna elektronska energija izračunata geometrijskom optimizacijom odgovara minimumu na PES-u. U stvarnosti molekula nema tu energiju jer nikada nije u stanju potpunog mirovanja, nego ima određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje.

Energija nulte točke (engl. *zero-point energy*, ZPE) se računa kao zbroj elektronske energije i tzv. *korekcije nulte točke*, energije koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K (Cramer, 2004). Entalpija i entropija molekule se računaju kao različiti doprinosi translacijskog, vibracijskog i rotacijskog gibanja molekule pribrojani ZPE-u, a izvode se iz frekvencijskog računa. Tu je uključena aproksimacija idealnog plina za translacijsko gibanje, kao i aproksimacija rigidnog rotora za rotacijsko gibanje. U izračunima se mogu podesiti parametri za temperaturu (zadana temperatura iznosi 298 K) i tlak (zadani tlak iznosi 1 atm) te izotopi pojedinih elemenata (Foresman i Frisch, 1996).

### 3.2. Metode i parametri kvantno-kemijskih izračuna

U izradi ovog rada korištene su metode Teorije funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT). DFT metode se temelje na Kohn-Shamovoj teoriji koja nalaže da energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu (Becke, 1992; Pople i sur., 1992; Hohenberg i Kohn, 1964). DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu „reagiraju“ na kretanje drugih elektrona te se orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile u molekuli u ravnoteži. Prikladnim odabirom DFT parametara mogu se dobiti izračuni koji su usporedivi s puno zahtjevnijim *ab-initio* metodama. Parametri koje je potrebno odabrati su funkcional i bazni skup prikladan za odgovarajući opis modeliranog kemijskog sustava.

Funkcional je funkcija elektronske gustoće. DFT funkcionali se međusobno razlikuju prema opisu funkcionala izmjene, funkcionala korelacije i udjela HF (Hartree-Fock) funkcionala, kao dopune člana izmjene kod hibridnih funkcionala. Najpoznatiji i jedan od češće korištenih funkcionala je B3LYP (Becke Three Parameter Hybrid Functionals), koji se sastoji od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP), kojeg su razvili Lee, Yang i Parr, te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni (Becke, 1988).

Bazni skup je baza vektorskog prostora u kojoj se zapisuju molekulske orbitale. Odabirom baznog skupa opisuje se valna funkcija s konačnim brojem baznih funkcija. Što je veći broj baznih funkcija koje opisuju valnu funkciju, to je uglavnom točniji opis molekularnih orbitala (Foresman i Frisch, 1996). Bazni skupovi se dijele prema broju primitivnih gaussiana za opis unutarnjih orbitala, broju i kombinaciji primitivnih gaussiana koji čine složenu osnovnu funkciju za opis valentnih orbitala te prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Često korištena kombinacija je skupina Popleovih baznih skupova (Ditchfield i sur., 1971), s notacijom 6-31G i dodatnim difuznim i/ili polarizacijskim funkcijama.



Kod opisivanja nabijenih sustava nužan je dodatak difuzne funkcije (označava se s „+“) kako bi se dobro opisao sustav. Općenito, pravilnom varijacijom baznog skupa mogu se postići točniji rezultati.

### 3.3. Solvatacijski efekti

Većina organskih reakcija se odvija u otopini pa je nužno izračunati interakciju otapala i otopljene tvari kako bi se opisali solvatacijski efekti. Najčešće korišteni pristupi su implicitna i eksplicitna solvatacija, odnosno kombinacija tih dvaju pristupa.

Implicitna solvatacija podrazumijeva model polarizabilnog kontinuuma. Proces solvatacije u ovim modelima se promatra kao niz sljedećih procesa: nastanak solvatacijske šupljine u polarizabilnom kontinuumu, ulazak promatrane molekule u nastalu šupljinu i relaksacija kontinuuma oko molekule (Bachrach, 2014). U ovom su radu Gibbsove energije solvatacije izračunate koristeći CPCM solvatacijski model na odgovarajućoj teorijskoj razini s UFF atomskim radijusom i elektrostatskim skalarnim faktorom 1.1 (standardna vrijednost u Gaussian09 programu). UFF šupljine su odabrane kako bi se osigurao položaj sfera otapala oko lakih i teških atoma što je važno za prijelazna stanja koja uključuju transfer protona. Korištena relativna permitivnost otapala iznosi  $\epsilon = 78.4$ , što odgovara dielektričnoj konstanti vode.

Eksplicitnim dodavanjem molekula otapala u kemijski okoliš promatranog sustava simuliraju se solvatacijske ljuske. Najčešće se simulira samo prva solvatacijska ljuska koja se nalazi u bliskom kontaktu sa sustavom i time se razlikuje od otapala koje nije u izravnom dodiru s otopljenom tvari. Za svaku kemijsku strukturu potrebno je odrediti optimalan broj molekula otapala u solvatacijskoj ljusci, pri čemu struktura sa solvatacijskom ljuskom tvori zasebnu kemijsku speciju.

Supramolekulski solvatacijski model obuhvaća kombinaciju implicitnog i eksplicitnog opisa otapala. Računalno je najzahtjevniji, ali daje najtočnije podatke, (Pliego, 2004), zbog čega je ovaj pristup korišten u svim solvatacijskim izračunima u ovom radu.

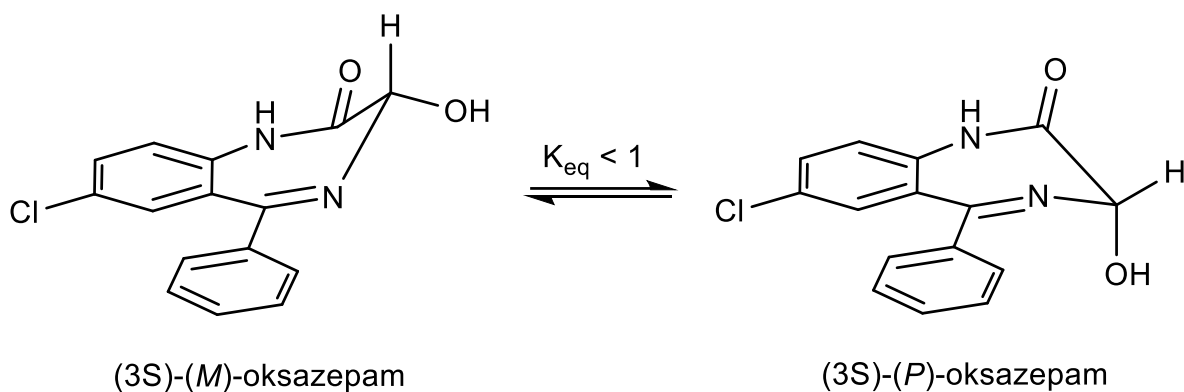
### 3.4. Korištene računalne metode

Svi računi su provedeni upotrebom programskog paketa Gaussian09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009), na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu ([www.srce.hr](http://www.srce.hr)) i klasteru Andrija na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ([andrija.pharma.hr](http://andrija.pharma.hr)).

U svrhu vizualizacije dobivenih rezultata, korišten je program GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA). Sve su geometrije optimizirane koristeći DFT funkcional B3LYP koji je najčešće korištena hibridna metoda (Becke, 1993). Za opis molekulskih orbitala korišten je bazni skup 6-31+G(d) koji se često koristi za kvantno-kemijske račune u organskoj kemiji. Kompleksi reaktanata, produkata, međuprodukata i prijelaznih stanja optimizirani su s 1-4 eksplicitno dodane molekule vode kako bi se točnije opisala prva solvacijska ljuska. Za implicitnu solvataciju korišten je SMD solvacijski model (otapalo voda,  $\alpha = 1.2$ ). U svrhu pronalaska najstabilnijih rotamera aldehida i hidrata otvorenog prstena oksazepama (Slika 13), korišten je PCMODEL (PCMODEL, version 10.0, Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN). PCMODEL je program za molekulsko modeliranje koji kombinira dva pristupa prilikom konformacijske analize: rotaciju veza za prethodno definirane kutove i stohastičku pretragu u kojoj se nasumično mijenjaju koordinate određenih atoma kako bi se molekuli promijenio oblik.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

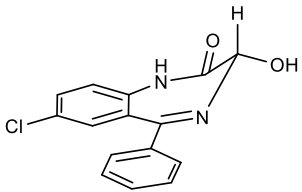
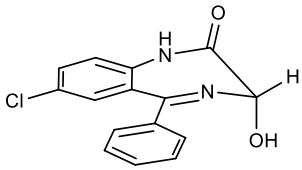
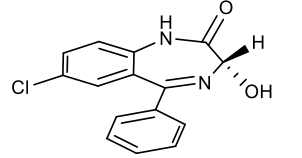
Oksazepam pripada skupini 3-supstituiranih 1,4-benzodiazepin-2-ona s kiralnim centrom u položaju C3. Oksazepam može postojati u četiri konfiguracije koje se odnose kao dijastereomeri. *M* i *P* konformacije nisu izoenergetske jer supstituent preferira pseudoekvatorijalni položaj. *S*-enantiomer preferira konformaciju *M*, a *R*-enantiomer konformaciju *P* (Pem i Vrček, 2018) (Slika 8).



Slika 8. Atropoizomeri (3S)-oksazepama. Kod *M*-konformera supstituent je u pseudoekvatorijalnom položaju, dok je kod *P*-konformera smješten pseudoaksijalno.

Računalnom analizom dijastereomera utvrđeno je da su (3S)-(*M*)- i (3R)-(*P*)-dijastereomeri oksazepama izoenergetski, a od (3S)-(*P*)- i (3R)-(*M*)-dijastereomera stabilniji su u prosjeku za 26 kJ/mol (Tablica 1). U ovom su radu računi provedeni na *S*-enantiomeru oksazepama, uzimajući u obzir ekvivalentnost energija *S*- i *R*-enantiomera (Hok i sur., 2018; Božičević i Sremec, 2018). Također je locirano prijelazno stanje inverzije prstena koje povezuje dva atropoizomera (Slika 8) s eksplicitno dodanim molekulama vode ( $n = 1-4$ ). Uočeno je da eksplicitna solvatacija nema značajan učinak na energiju konformacijske promjene atropoizomera, a barijera u odnosu na stabilniji atropoizomer *S*-(*M*)-oksazepam u prosjeku iznosi 75 kJ/mol.

Tablica 1. Prikaz relativnih slobodnih energija atropoizomera oksazepama i prijelaznog stanja inverzije prstena (Slika 8) s eksplicitnom i implicitnom solvatacijom, izračunatih na B3LYP/6-31+G(d) razini, pri čemu  $n$  označava broj eksplicitno dodanih molekula vode.

	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)					
	Plinovita faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ ) $n$				
Atropoizomeri oksazepama	0	1	2	3	4	
 (3S)-(M)-oksazepam	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
 (3S)-(P)-oksazepam	28.7	26.1	23.2	40.7	17.2	20.3
 TS inverzije prstena	69.4	68.9	72.0	84.4	72.8	75.6

#### 4.1. Predloženi mehanizmi enantiomerizacije

U literaturi je predloženo nekoliko mehanizama enantiomerizacije oksazepama (Slika 9). Međutim, niti jedan od njih nije potvrđen kao glavni reakcijski put. Mogući mehanizmi epimerizacije oksazepama su sljedeći:

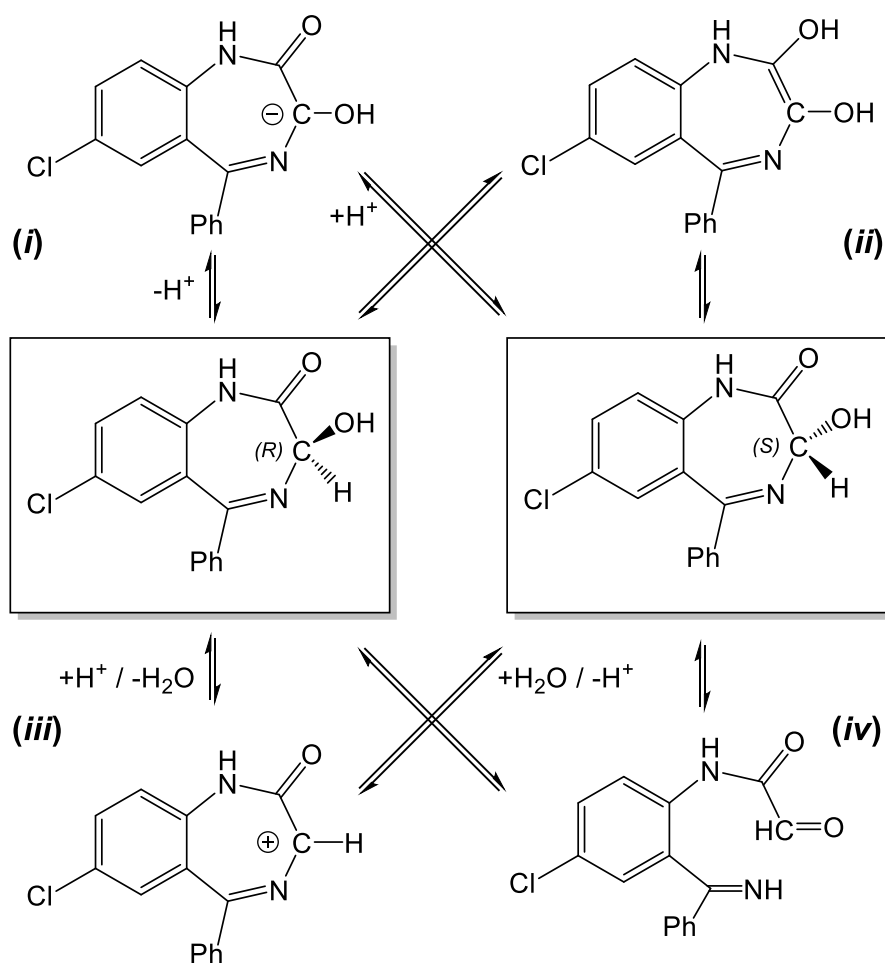
(i) Najjednostavniji proces odgovara deprotoniranju kiralnog C3-atoma pri čemu nastaje karbanionski međuprodukt (Testa i sur., 2016). Acido-bazna ravnoteža dovodi do konfiguracijske izomerizacije na C3 položaju oksazepama jer gubitkom  $sp^3$  kiralnog centra nakon deprotoniranja, vjerojatnost da će ponovno nastati isti enantiomer iznosi 50 %.

(ii) Neki autori pretpostavljaju da se racemizacija oksazepama događa istim mehanizmom kao i kod talidomida (Tian i sur., 2012), tj. da dolazi do keto-enolne tautomerije. Intramolekulskim transferom protona s C3 položaja na C2=O karbonilnu skupinu, dolazi do gubitka  $sp^3$  kiralnog centra i nastanka  $sp^2$  prokiralnog C-atoma, nakon čega je vjerojatnost nastanka oba enantiomera jednaka (Fedurcova i sur., 2006; Oswald i sur., 2002; Aso i sur., 1988).

(iii) Proces racemizacije oksazepama može biti iniciran protoniranjem C3-OH skupine nakon čega slijedi spontana eliminacija vode. Nastali karbokationski međuprodukt podliježe reverzibilnoj hidrataciji, što može dovesti do interkonverzije konfiguracije na stereogenom C3-ugljkovom atomu (Trapp i sur., 2002).

(iv) Kao mogući mehanizam racemizacije oksazepama na C3-položaju predloženo je reverzibilno otvaranje benzodiazepinskog prstena (engl. *ring-chain tautomerism*) (Testa i sur., 2016; Šunjić i sur., 1979; Štromar i sur., 1974). Međutim, nastali aldehidni međuprodukt nikada nije dokazan (Yang i Lu, 1992).

Sumarno, prvi mehanizam odgovara bazno-kataliziranoj, a treći kiselo-kataliziranoj reakciji, pri čemu nastaju karbanion, odnosno karbokation. Drugi i četvrti mehanizam pripadaju neutralnim tautomerizacijskim procesima u kojima nastaje enolna, odnosno aldehidna specija. S obzirom da je eksperimentalnim kinetičkim studijama utvrđeno da barijera racemizacije oksazepama iznosi 87-91 kJ/mol, u ovom je radu pretpostavljeno da procesi s približno jednakom energijom aktivacije igraju ulogu u enantiomerizaciji oksazepama.

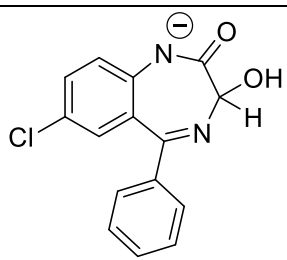
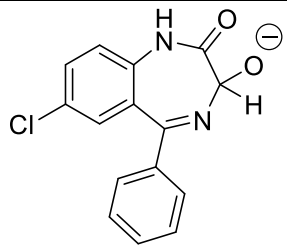
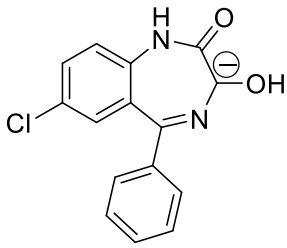


Slika 9. Četiri različita mehanizma enantiomerizacije oksazepama predložena u literaturi: (i) C3-H/H izmjena, (ii) keto-enolna tautomerija, (iii) C3-OH protoniranje, eliminacija H<sub>2</sub>O te rehidracija (iv) prsten-lanac tautomerija.

#### 4.2. (i) C3-H/H izmjena

Deprotoniranje C3-H atoma i reprotoniranje nastalog C3-karbaniona predstavlja najjednostavniju reakciju (S<sub>E</sub>1 mehanizam). Neki autori predlažu C3-H položaj kao mjesto deprotoniranja (Yang i Bao, 1994), ali i amidna skupina (N1-H) te hidroksilna C3-OH također mogu biti potencijalna mjesta deprotoniranja (Popović i sur., 2003; Yang i Lu, 1992; Barrett i sur., 1973). Ako je C3-H/H izmjena odgovorna za proces enantiomerizacije oksazepama, pretpostavlja se da je C3-H atom najkiseliji u oksazepamu. Kvantno-kemijskim izračunima utvrđena je relativna kiselost predloženih mjesta deprotoniranja (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz relativnih slobodnih energija aniona oksazepama s eksplicitnom i implicitnom solvatacijom, izračunatih na B3LYP/6-31+G(d) razini, pri čemu  $n$  označava broj eksplicitno dodanih molekula vode.

Anioni oksazepama	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)					
	Plinovita faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ )				
		$n$				
	0	1	2	3	4	
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	115.0	47.8	24.0	8.5	17.8	15.3
	39.7	70.4	70.8	75.6	81.8	78.9

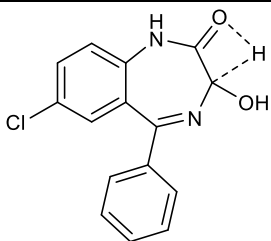
Oksazepam posjeduje tri moguća mjesta deprotoniranja: N1-H, C3-OH i C3-H položaj. Odgovarajući anioni su optimizirani u plinovitoj fazi bez eksplicitne i implicitne solvatacije, zatim u plinovitoj fazi s implicitnom solvatacijom te koristeći supramolekulski model koji uključuje  $n = 1-4$  eksplicitno dodanih molekula vode. U sva tri slučaja, anion nastao deprotoniranjem N1-H položaja je najstabilniji što znači da je N1-H položaj najkiseliji u oksazepamu. To je potvrđeno i eksperimentalno u najnovijoj studiji protolitičke ravnoteže oksazepama (Popović i sur., 2003). Naime, autori tvrde da su analizom  $^{13}\text{C}$  NMR spektra uočili da do gubitka protona dolazi upravo na N1-H položaju. Iz toga proizlazi zaključak da konstanta disocijacije kiseline,  $\text{pK}_{\text{a}2} = 11.5$ , odgovara disocijaciji N1-H skupine.

C3-karbanion je najmanje stabilna specija. To je potvrđeno i eksperimentalnom analizom brzine H/D izmjene C3 kiralnog centra gdje autori tvrde da zamjena protona deuterijem na položaju C3 nije uočena (Štromar i sur., 1974). Eksperimentalnim i računalnim metodama je utvrđeno da C3-H/H izmjena nije mogući mehanizam koji doprinosi optičkoj nestabilnosti oksazepama.

#### 4.3. (ii) Keto-enolna tautomerija

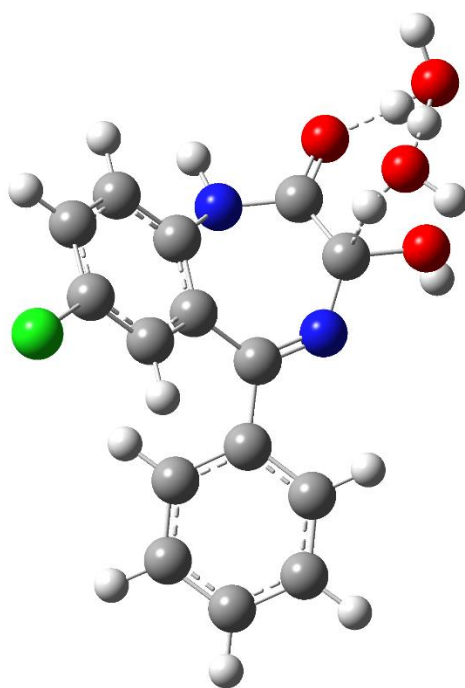
Mehanizam keto-enolne tautomerije je povezan s C3-H/H izmjenom, opisanom u prethodnom poglavlju. Tautomerna ravnoteža uključuje intramolekularni proton transfer od C3-ugljikovog atoma do C2=O karbonilne skupine i izravno ovisi o kiselosti C3-H skupine. S obzirom da C3-H nije mjesto deprotoniranja u oksazepamu, keto-enolna tautomerija nije mogući mehanizam enantiomerizacije oksazepama. To je potvrđeno i kinetičkim kvantno-kemijskim izračunima (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz energetske barijere intramolekulskog proton transfera od C3-H do C2=O u odnosu na minimum (3S)-*M*-oksazepam, s eksplicitnom i implicitnom solvatacijom, izračunatih na B3LYP/6-31+G(d) razini, pri čemu *n* označava broj eksplicitno dodanih molekula vode.

	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)					
	Plinovita faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ ) <i>n</i>				
Prijelazno stanje prijenosa H <sup>+</sup> od C3-H do C2=O	0	1	2	3	4	
	323.6	326.5	252.3	211.0	182.8	188.0



Locirana su prijelazna stanja s 0-4 eksplicitno dodane molekule vode. Eksplicitna solvatacija olakšava prijenos protona (Slika 10), a korištenje supramolekulskog pristupa omogućava točnije opisivanje procesa keto-enolne tautomerije. Energetska barijera enolizacije oksazepama je vrlo visoka,  $\Delta G^\ddagger \approx 320$  kJ/mol. Dodatkom eksplicitnih voda barijera se smanjuje na  $\approx 180$  kJ/mol ( $n = 3$ ). Međutim, barijera je i dalje znatno viša od eksperimentalno predviđene energije aktivacije procesa racemizacije u oksazepamu ( $\Delta G^\ddagger = 87$ - $91$  kJ/mol). Kod talidomida, dodatak dvaju eksplicitnih molekula vode reducira energetska barijeru enolizacije na  $\approx 30$  kcal/mol (125 kJ/mol) jer voda djeluje kao most za prijenos protona putem Grotthusovog mehanizma (Tian i sur., 2012). Takav katalitički efekt kod oksazepama nije uočen. Moguće da je prijelazno stanje enolizacije destabilizirano zbog geometrije nastale tijekom reakcije, koja slični enolu. Enolni oblik oksazepama izrazito je nestabilan u usporedbi s ostalim tautomernim oblicima: od keto oblika je nestabilniji za 111 kJ/mol, a od iminolnog za 60 kJ/mol (modelno otapalo = voda) (Pem i Vrčec, 2018). Također, u slučaju oksazepama ne postoji eksperimentalna potvrda postojanja enolne forme (Achour i sur., 1994; Maupas i Fleury, 1982).



Slika 10. Struktura prijelaznog stanja enolizacije oksazepama s dvije eksplicitne molekule vode optimizirano na B3LYP/6-31+G(d) razini [ $\text{NImag}/(\text{cm}^{-1}) = 1$  (868.39i)].

Bazični medij katalizira proces enolizacije jer OH<sup>-</sup> ioni olakšavaju disocijaciju protona (Tian i sur., 2012). Da je keto-enolna tautomerija mehanizam racemizacije oksazepama, povećanje pH bi dovelo do povećanja konstante brzine racemizacije. Međutim, kod oksazepama u rasponu pH = 2-10 ne dolazi do promjene  $k_{rac}$  (Slika 6). To je dodatna potvrda da enolizacijski proces ne doprinosi stereokemijskoj nestabilnosti oksazepama. Osim toga, kao što je ranije opisano, neki autori smatraju da se racemizacija oksazepama *in vivo* ne odvija keto-enolnom tautomerijom (Pham-Huy i sur., 2002). Zaključno, niska kiselost C3-H skupine, visoka barijera proton transfera i nestabilni enolski međuprodukt su termodinamička i kinetička potvrda da se racemizacija u oksazepamu ne odvija mehanizmom keto-enolne tautomerije.

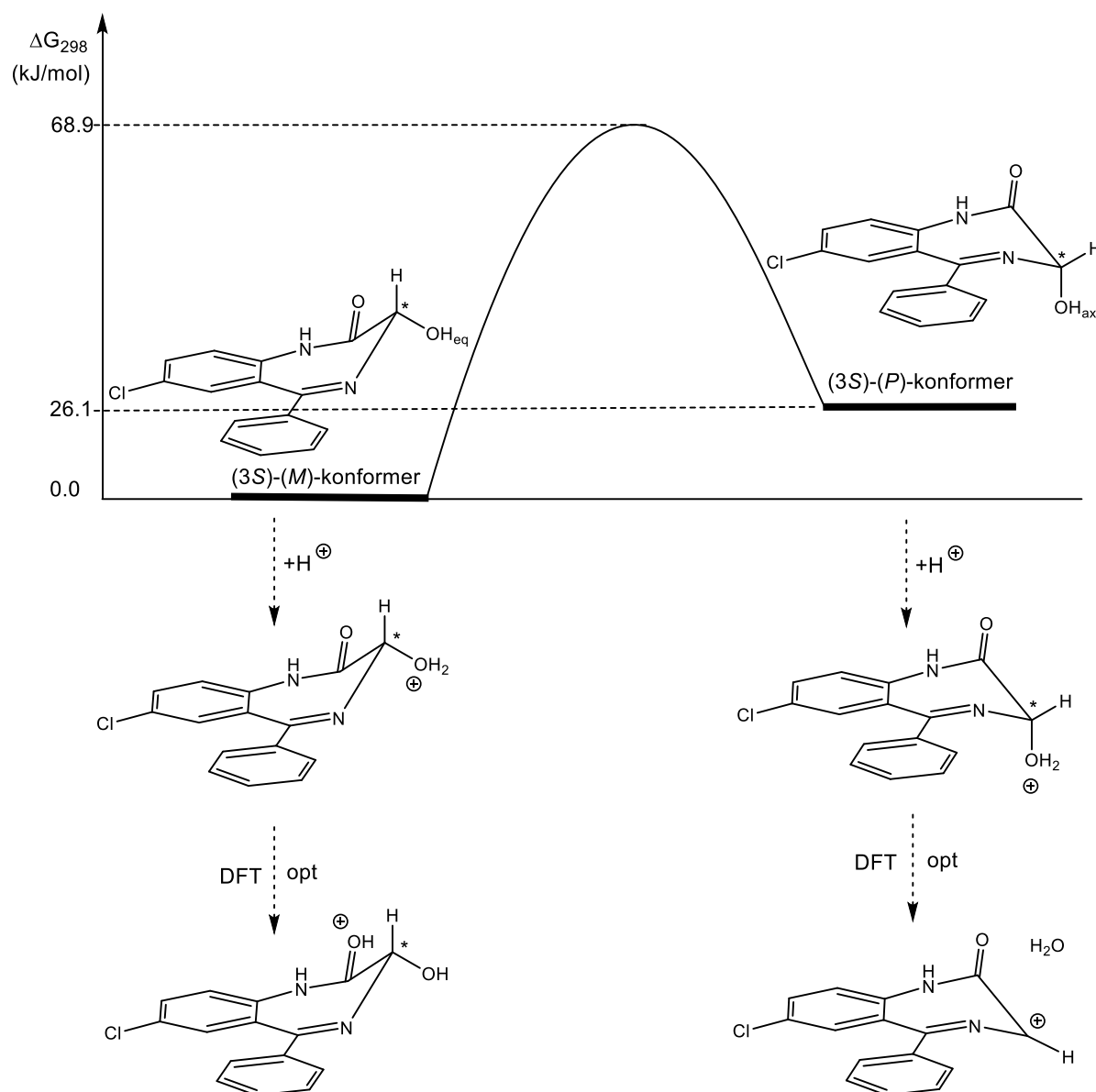
#### 4.4. (iii) Protoniranje C3-OH i eliminacija H<sub>2</sub>O

U kiselom mediju može doći do protoniranja C3-OH skupine oksazepama i do spontane eliminacije molekule vode. Nastali karbokation na položaju C3 je podložan reverzibilnoj hidrataciji, pri čemu može doći do inverzije konfiguracije. Neki autori smatraju da je upravo mehanizam koji uključuje nastanak karbokationa odgovoran za enantiomerizaciju oksazepama (Trapp i sur., 2002).

Kiselo-katalizirane reakcije farmaceutika su relevantne pri fiziološkim uvjetima. Npr. kiseli uvjeti u želucu kataliziraju nastanak 3-O-etiloksazepama u prisutnosti alkohola. Etilni derivat oksazepama se apsorbira u krvotok u istom obimu kao i oksazepam, ali je manje učinkovit pa istovremena primjena etanola s oksazepamom za posljedicu ima smanjenje farmakološkog učinka oksazepama u miševa (Yang TJ i Yang SK, 1995).

U ovom je radu kvantno-kemijskim izračunima ispitana relativna stabilnost kationa nastalih protoniranjem C2=O, C3-OH i N4 položaja u oksazepamu. Nakon protoniranja C3-OH skupine u stabilnijem *M*-atropoizomeru oksazepama s C3-OH skupinom u pseudoekvatorijalnom položaju, tijekom optimizacije dolazi do spontanog prijenosa H<sup>+</sup> na susjednu karbonilnu skupinu (C2=O) (Slika 11). To je posljedica veće bazičnosti C2=O skupine (Tablica 4). Ako se protonira C3-OH skupina manje stabilnog, *P*-atropoizomera oksazepama, tijekom optimizacije dolazi do spontane eliminacije vode zbog čega stabilna struktura s C3-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> skupinom nije locirana. To sugerira nastanak karbokationa bez kinetičke barijere (engl. *barrierless process*) na C3-položaju, koji može ponovno reagirati s vodom i dovesti do inverzije konfiguracije. Da bi došlo do nastanka karbokationa, oksazepam mora egzistirati u nestabilnijoj *P*-konformaciji.

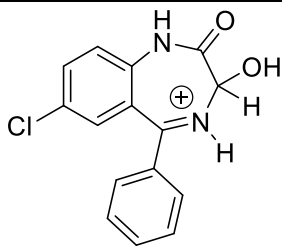
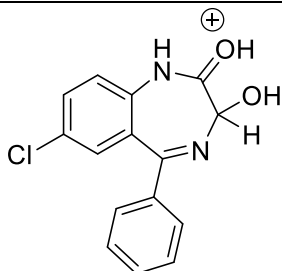
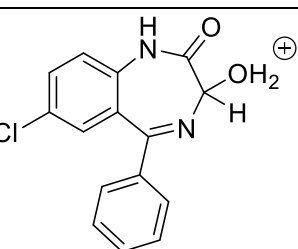
Energetska barijera interkonverzije dvaju atropoizomera iznosi  $\approx 75$  kJ/mol (Tablica 1), što je unutar eksperimentalno predviđene energetske barijere racemizacije oksazepama. Ako se racemizacija oksazepama odvija prethodno opisanim mehanizmom, smanjenjem pH trebalo bi doći do povećanja vrijednosti konstante brzine racemizacije. Međutim, eksperimentalno dobiven pH profil racemizacije oksazepama pokazuje da ne dolazi do promjene  $k_{\text{rac}}$  u rasponu pH = 2-10 (Slika 6), što znači da protoniranje C3-OH i posljedična eliminacija H<sub>2</sub>O nije mehanizam odgovoran za stereokemijsku nestabilnost oksazepama.



Slika 11. Energetski profil interkonverzije između S-(M)- i S-(P)-atropoizomera oksazepama bez eksplicitne solvatacije na B3LYP/6-31+G(d) razini (DFT).

Nakon računalne analize kationa oksazepama, uočeno je da je C3-OH skupina najmanje bazična (Tablica 4). Kako bi se usporedila relativna bazičnost C2=O, C3-OH i N4 položaja, izračunate su energije njihovih konjugiranih kiselina te uspoređene njihove energije. Iminska skupina C5=N4 je preferirani položaj protoniranja u oksazepamu, pri čemu nastaje C5-karbokation. C3-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> konjugirana kiselina je najmanje stabilna: N4-H<sup>+</sup> konjugirana kiselina je stabilnija za 127.5 kJ/mol ( $n = 4$ ). Također, eksperimentalni rezultati u kiselom mediju ukazuju da protoniranje na položaju C3-OH nije uočeno (Barrett i sur., 1973). Iz svega navedenog može se zaključiti da protoniranje C3-OH i posljedična eliminacija H<sub>2</sub>O ne doprinosi stereokemijskoj nestabilnosti oksazepama.

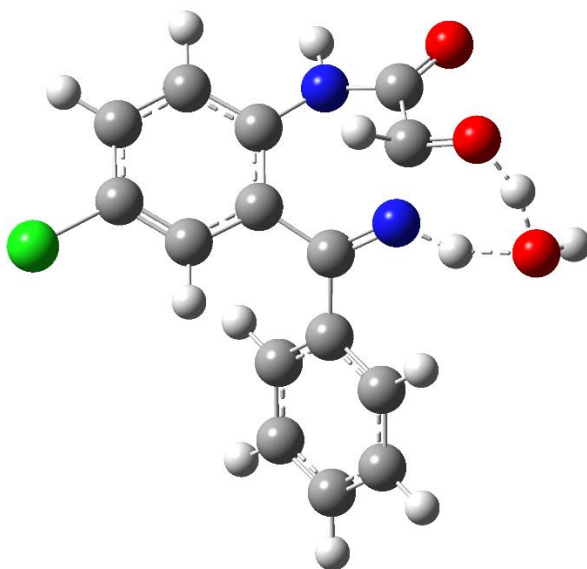
Tablica 4. Prikaz relativnih slobodnih energija kationa oksazepama s eksplicitnom i implicitnom solvatacijom, izračunatih na B3LYP/6-31+G(d) razini, pri čemu  $n$  označava broj eksplicitno dodanih molekula vode.

Kationi oksazepama	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)				
	Plinovita faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ )			
		$n$			
	0	1	2	3	4
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	119.5	79.5	62.6	55.5	49.6
	156.2	131.8*	100.2*	136.2*	135.0*

\* Kako bi se spriječio spontani prelazak H<sup>+</sup> na C2=O tijekom optimizacije, provedena je parcijalna optimizacija (fiksirani su svi atomi u C3-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> skupini)

#### 4.5. (iv) Prsten-lanac tautomerija

Reverzibilno otvaranje prstena je također predloženo kao reakcijski mehanizam stereoizomerizacije asimetričnog C3-atoma u oksazepamu, međutim detaljan mehanizam nije opisan (Testa i sur., 2016; Šunjić i sur., 1979; Štromar i sur., 1974). U ovom je radu kvantno-kemijskim metodama utvrđeno da je proces reverzibilnog otvaranja prstena potaknut intramolekulskim proton transferom s C3-OH skupine na iminski N4 atom. Locirano je prijelazno stanje s jednom eksplicitnom molekulom vode (Slika 12), koja olakšava prijenos protona i kidanje N4-C3 veze. IRC računima je potvrđeno da locirano prijelazno stanje povezuje ishodni *S*-(*M*)-oksazepam s aldehidnim međuproduktom otvorenog prstena (Slika 13). Eksplicitnim dodavanjem dvije i više molekula vode ne dolazi do izravnog otvaranja prstena, nego nastaje zwitter-ionski međuprodukt. Otvaranje prstena nakon nastanka zwitter-ionskog međuprodukta je izvan okvira ovog rada.

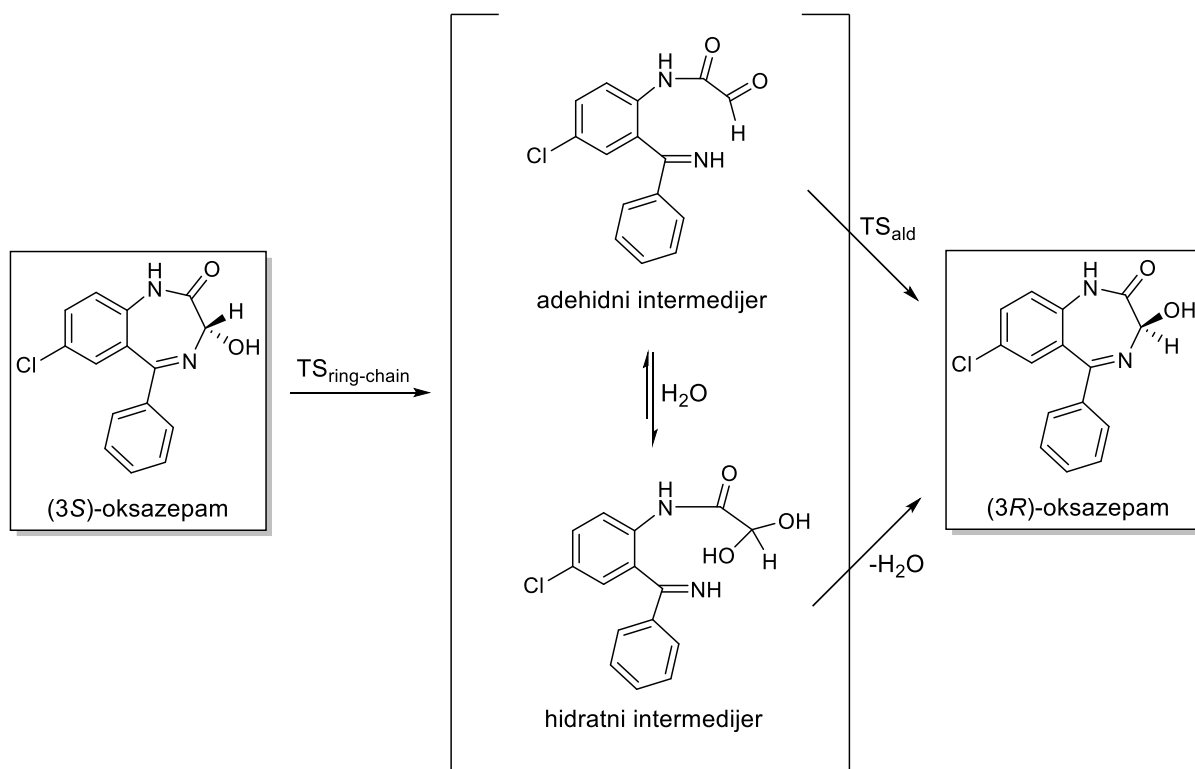


Slika 12. Struktura prijelaznog stanja proton transfera s C3-OH skupine na N4 atom uz istovremeno otvaranje prstena u oksazepamu. Struktura je optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini s jednom eksplicitnom molekulom vode [ $\text{NImag}/(\text{cm}^{-1}) = 1 (1159.16i)$ ].

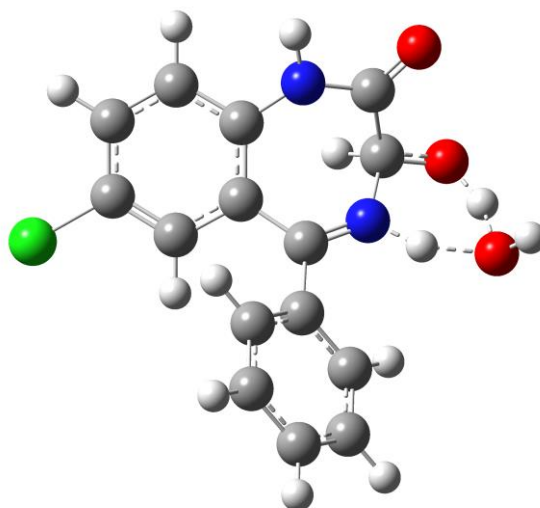
U reakcijskoj shemi prikazanoj na Slici 13, proton transfer  $\text{C3OH} \rightarrow \text{N4}$  ( $\text{TS}_{\text{ring-chain}}$ ) je korak koji određuje brzinu racemizacije oksazepama, a izračunata energetska barijera, u odnosu na minimum (3*S*)-(*M*)-oksazepam, iznosi  $\Delta G^\ddagger = 82.8 \text{ kJ/mol}$  ( $n = 1$ ).

Između četiri mehanizma predložena u literaturi i razmotrena u ovom radu, jedino proces prsten-lanac tautomerije zadovoljava eksperimentalno predviđenu energetska barijeru racemizacije oksazepama od 91 kJ/mol.

Nastali aldehidni međuprodukt s otvorenim prstenom u vodenom okolišu egzistira u brzom ravnoteži s hidratnim međuproduktom koji je za 17.1 kJ/mol stabilniji od aldehida. Prelazak iz aldehidne u hidratnu speciju i obratno odvija se bez kinetičke barijere (engl. *barrierless process*) (Guthrie i Pitchko, 2000). Povratna reakcija zatvaranja prstena i formiranja enantiomera oksazepama suprotne konfiguracije, može se odvijati na dva načina: intramolekulskom adicijom imina N4 na karbonilnu skupinu C3=O u aldehidu (TS<sub>ald</sub>) ili dehidratacijom hidrata. Energija prijelaznog stanja proton transfera N4-H → C3=O, tj. adicije N4 na C3=O, u odnosu na aldehidni međuprodukt oksazepama, iznosi  $\Delta G^\ddagger = 25.3$  kJ/mol ( $n = 1$ ) (Slika 14). Dehidratacija hidrata spontani je proces u vodenom mediju, iz čega se može zaključiti da je zatvaranje prstena oksazepama znatno brži proces od njegova otvaranja.

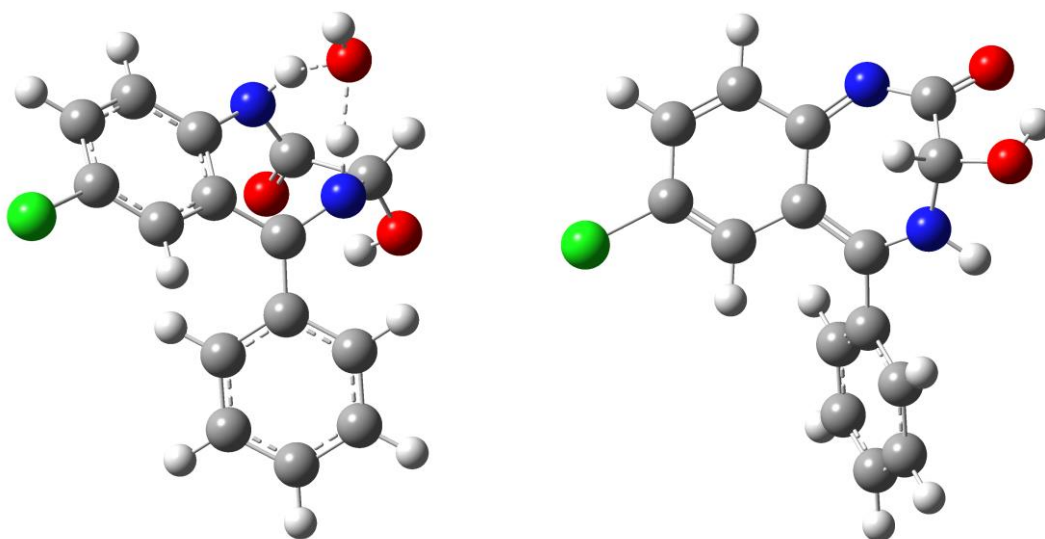


Slika 13. Reakcijski mehanizam otvaranja prstena (3S)-oksazepama i nastanak aldehidnog i hidratnog međuprodukta koji su u ravnoteži u vodenoj otopini. Intramolekulskom adicijom N4 imina na C3=O karbonilnu skupinu u aldehidu ili dehidratacijom hidrata dolazi do zatvaranja prstena i inverzije konfiguracije, tj. nastanka (3R)-oksazepama.



Slika 14. Struktura prijelaznog stanja adicije imina N4 na karbonilnu skupinu C3=O u aldehidu i formiranje (3R)-oksazepama (TS<sub>ald</sub>). Struktura je optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini s jednom eksplicitnom molekulom vode [NImag/(cm<sup>-1</sup>) = 1 (1159.48i)].

Analogni intramolekulski transfer protona s N1-H skupine na N4 atom kinetički je nepovoljniji od prijenosa protona s C3-OH skupine na N4 atom [(*n* = 0,  $\Delta G^\ddagger = 290.2$  kJ/mol); (*n* = 1,  $\Delta G^\ddagger = 298.2$  kJ/mol)] (Slika 15, lijevo). Pritom ne dolazi do kidanja N4-C3 veze, nego nastanka produkta prikazanog na slici 15 (desno).



Slika 15. Struktura prijelaznog stanja proton transfera s N1-H na N4 s jednom eksplicitnom vodom [NImag/(cm<sup>-1</sup>) = 1 (319.44i)] (lijevo) i produkt prethodno opisanog proton transfera (desno), pri čemu je vidljivo da ne dolazi do kidanja N4-C3 veze. Strukture su optimizirane na B3LYP/6-31+G(d) razini.

Na temelju provedene računalne analize može se zaključiti da, osim prsten-lanac tautomerije, niti jedan mehanizam ranije predložen u literaturi ne zadovoljava eksperimentalni zahtjev za energijom aktivacije  $\Delta G^\ddagger < 91$  kJ/mol. Prsten-lanac tautomerija u oksazepamu je potaknuta intramolekulskim proton transferom, što znači da u mehanizam nije uključena kiselo-bazna kataliza. To je u skladu s eksperimentalno dobivenim pH-profilom racemizacije oksazepama koji pokazuje da je  $k_{\text{rac}}$  u rasponu pH = 8-10 konstantna. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da proces enantiomerizacije oksazepama u vodi pri pH = 2-10, slijedi mehanizam prsten-lanac tautomerije.



## 5. ZAKLJUČAK

Oksazepam pokazuje izrazitu kiralnu nestabilnost pri fiziološkim uvjetima (37 °C, pH = 7.4), odnosno racemizira unutar farmakološke vremenske skale. S obzirom da različiti enantiomeri oksazepama zbog različitog prostornog usmjerenja skupina vezanih na kiralni centar, reagiraju s biomolekulama različitim afinitetom, bilo je nužno istražiti mehanizam enantiomerizacije. U literaturi su predložena četiri različita mehanizma, a u ovome radu je napravljena računalna analiza kako bi se provjerila njihova relevantnost. S obzirom da je eksperimentalnim kinetičkim studijama utvrđeno da barijera racemizacije oksazepama iznosi 87-91 kJ/mol, u ovom je radu pretpostavljeno da procesi s približno jednakom energijom aktivacije igraju ulogu u racemizaciji oksazepama.

(i) Prvi predloženi mehanizam uključuje deprotoniranje kiralnog C3-atoma, tj. gubitak  $sp^3$  kiralnog centra i nastanak karbaniona. Ponovnim protoniranjem nastaje enantiomer suprotne konfiguracije. Oksazepam posjeduje tri moguća mjesta deprotoniranja: N1-H, C3-OH i C3-H položaj. Računalnom analizom relativne stabilnosti konjugiranih baza navedenih položaja, utvrđeno je da je C3-H atom najmanje kiseo, dok je najkiseliji vodikov atom u N1-H položaju. Osim toga, s obzirom da se radi o bazno-kataliziranoj reakciji, pH profil racemizacije oksazepama bi pokazivao porast  $k_{rac}$  prilikom povećanja pH, što nije slučaj. Iz svega navedenog se može zaključiti da prvi predloženi mehanizam nije odgovoran za stereokemijsku nestabilnost oksazepama.

(ii) Drugi predloženi mehanizam obuhvaća keto-enolnu tautomeriju, proces koji se nalazi u pozadini racemizacije većine kiralnih molekula (npr. talidomid). Keto-enolna tautomerija je izravno povezana s kiselošću C3-H atoma, s obzirom da uključuje intramolekulski proton transfer  $C3-H \rightarrow C2=O$ , što dovodi u pitanje relevantnost ovog mehanizma. Kinetičkim izračunima je pokazano da su barijere enolizacije s 0-4 eksplicitno dodanim molekulama vode daleko iznad eksperimentalno predviđene barijere racemizacije od 91 kJ/mol. Osim toga, enolni produkt je najmanje stabilna tautomerna forma oksazepama, što predstavlja i termodinamičku potvrdu da enolizacija nije mehanizam u pozadini enantiomerizacije oksazepama.

(iii) Treći mehanizam pretpostavlja protoniranje C3-OH skupine, nakon čega slijedi spontana eliminacija vode i formiranje karbokationa. Rehidratacija dovodi do inverzije konfiguracije. Oksazepam posjeduje tri moguća mjesta protoniranja: C2=O, C3-OH i N4 položaj. Računalnom analizom relativne stabilnosti konjugiranih kiselina navedenih položaja, utvrđeno je da je C3-OH skupina najmanje bazična.

Prilikom optimizacije manje stabilnog konformera (3S)-(P)-oksazepama s C3-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> skupinom dolazi do spontane eliminacije vode, što sugerira da se radi o procesu bez kinetičke barijere. Jedina barijera u ovom slučaju bila bi ona interkonverzije iz (M)- u (P)-atropoizomer, koja se nalazi unutar eksperimentalno predviđene barijere racemizacije oksazepama. Međutim, pH profil racemizacije nalaže da je  $k_{\text{rac}}$  u rasponu pH = 8-10 konstanta, iz čega proizlazi zaključak da ovaj bazno-kataliziran proces nije odgovoran za enantiomerizaciju oksazepama.

(iv) Posljednji mehanizam razrađen u ovome radu predlaže intramolekulski proton transfer s C3-OH na N4 i posljedično kidanje veze C3-N4, kao mehanizam enantiomerizacije oksazepama. Otvaranjem prstena nastaje aldehidni međuprodukt koji u vodenom mediju egzistira u ravnoteži s hidratnim oblikom. Zatvaranje prstena u aldehidu se odvija napadom imina N4 na C3=O, a u hidratu spontanom dehidratacijom, pri čemu dolazi do inverzije konfiguracije. Kinetičkim izračunima je utvrđeno da je otvaranje prstena proces koji određuje brzinu racemizacije, a nalazi se unutar eksperimentalno predviđene energetske barijere od 91 kJ/mol. Dodatna potvrda tome da je prsten-lanac tautomerija odgovorna za stereokemijsku nestabilnost oksazepama, predstavlja i slaganje s pH profilom racemizacije. Naime, intramolekulski transfer protona nije niti kiselo niti bazno kataliziran proces pa predviđa konstantnu  $k_{\text{rac}}$  u spomenutom pH rasponu.

Kao što je već spomenuto, poznavanje mehanizma enantiomerizacije oksazepama važno je iz više razloga. Zbog optičke nestabilnosti, oksazepam može poslužiti kao modelna molekula za predviđanje mehanizma enantiomerizacije strukturno sličnih benzodiazepina, kao što su lorazepam, lormetazepam i temazepam. Sljedeći korak u istraživanju optičke nestabilnosti benzodiazepina mogao bi obuhvaćati ispitivanje mehanizma enantiomerizacije navedenih benzodiazepina, ali i benzodiazepina koji ne posjeduju C3-OH skupinu kao što su cinazepam, 3-metilklonazepam, etil loflazepat i drugi. Poznavanje njihova mehanizma i kinetike racemizacije moglo bi u budućnosti olakšati farmaceutskoj industriji *chiral switch* ili ciljanu sintezu benzodiazepina sa smanjenom optičkom nestabilnošću.

## 6. LITERATURA

Achour R, Cherkaoui MZ, Essassi EM, Zniber R. Synthesis of New Adamantylated Heterocycles. *Synth Commun*, 1994, 24, 2899-2905.

Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. San Diego, Academic Press, 2001, str. 372-374.

Aso Y, Yoshioka S, Shibasaki T, Uchiyama M. The kinetics of the racemization of oxazepam in aqueous solution. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36, 1834-1840.

Bachrach SM. Computational Organic Chemistry. 2nd ed., New Jersey, John Wiley & Sons, 2014, str. 29-41.

Barrett J, Franklin Smyth W, Davidson LE. An examination of acid-base equilibria of 1,4-benzodiazepines by spectrophotometry. *J Pharm Pharmacol*, 1973, 25, 387-393.

Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phys Rev A*, 1988, 38, 3098-3100.

Becke AD. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J Chem Phys*, 1992, 96, 2155-2160.

Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*, 1993, 98, 5648-5652.

Benzodiazepines: How they work and how to withdraw, 2002., [www.benzo.org.uk](http://www.benzo.org.uk), pristupljeno 16. 4. 2018.

Bogatskii AV, Andronati SA, Vikhlyayev YI, Zhilina ZI, Klygul' TA, Ryakhin VF. 1,4-benzodiazepines, their cyclic homologs and analogs XVI. Synthesis, properties, and pharmacological activity of 3-substituted 1,2-dihydro-3h-1,4-benzodiazepin-2-ones. *Khim Farm Zh*, 1974, 8, 13-18.

Borman S. Asymmetric catalysis wins. Chemistry Nobel honors Knowles, Noyori, Sharpless for chiral syntheses. *Chemical & Engineering News*, 2001, 79, 5.

Božičević L, Sremec H. Mehanizam racemizacije oksazepama. Rad prijavljen na natječaj za Rektorovu nagradu, 2018.

Calcaterra A, D'Acquarica I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147, 323-340.

Costantino L, Barlocco D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, 2006, 13, 65-85.

Cramer CJ. Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models. 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2004, str. 356-357.

Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J Chem Phys*, 1971, 54, 724.

Dopunska lista lijekova, 2018., <http://www.hzzo.hr>, pristupljeno 11. 4. 2018.

Draganić P, Škribulja M, Oštarčević S. Potrošnja lijekova u Hrvatskoj 2012. – 2016. Zagreb, Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2018, str. 122-123.

Eilers H, Yost S. General anesthetics. U: Basic & clinical pharmacology. 13th ed., Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 421-439.

Ellman JA. Design, synthesis, and evaluation of small-molecule libraries. *Acc Chem Res*, 1996, 29, 132-143.

Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, Lundell GF, Veber DF, Anderson PS, Chang RSL, Lotti VJ, Cerino DJ, Chen TB, Kling PJ, Kunkel KA, Springer JP, Hirshfieldt J. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1988, 31, 2235-2246.

Fedurcova A, Vančova M, Mydlova J, Lehotay J, Krupčík J, Armstrong DW. Interconversion of oxazepam enantiomers during HPLC separation. Determination of thermodynamic parameters. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2006, 29, 2889-2900.

Fitos I, Visy J, Zsila F, Mady G, Simonyi M. Conformation selectivity in the binding of diazepam and analogues to alpha1-acid glycoprotein. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 4857-4862.

Foresman JB, Frisch A. Exploring chemistry with electronic structure methods. 2nd ed., Pittsburgh, Gaussian, Inc., 1996, str. 3-90.

Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6th ed., Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. str. 615-624.

Fukui K. The path of chemical-reactions - The IRC approach. *Acc Chem Res*, 1981, 14, 363-368.

Gaussian 09, Revision A.02. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr., Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam NJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GaussView, Version 5. Dennington R, Keith T, Millam J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.

Guasch L, Yapamudiyansel W, Peach ML, Kelley JA, Barchi Jr. JJ, Nicklaus MC. Experimental and chemoinformatics study of tautomerism in a database of commercially available screening samples. *J Chem Inf Model*, 2016, 56, 2149-2161.

Guthrie JP, Pitchko V. Hydration of Carbonyl Compounds, an Analysis in Terms of No Barrier Theory: Prediction of Rates from Equilibrium Constants and Distortion Energies. *J Am Chem Soc*, 2000, 122, 5520-5528.

Harary N, Kellogg C. The relationship of benzodiazepine binding sites to the norepinephrine projection of the adult rat. *Brain Res*, 1989, 492, 293-299.

He H, Liu Y, Sun C, Wang X, Pham-Huy C. Effect of temperature on enantiomer separation of oxazepam and lorazepam by HPLC on a  $\beta$ -cyclodextrin derivatized bonded chiral stationary phase. *J Chromatogr Sci*, 2004, 42, 62-66.

Høiseth G, Tuv SS, Karinen R. Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases. *Forensic Sci Int*, 2016, 268, 35-38.

Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*, 1964, 136, 864-871.

Hok L, Božičević L, Sremec H, Šakić D, Vrček V. U pripremi za tisak, 2018.

Horton DA, Bourne GT, Smythe ML. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chem Rev*, 2003, 103, 893-930.

Hratchian HP, Schlegel HB. Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J Chem Theory and Comput*, 2005, 1, 61-69.

Hutt AJ, Caldwell J. The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids-a novel route with pharmacological consequences. *J Pharm Pharmacol*, 1983, 35, 693-704.

Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2016. godini, 2017., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 25. 3. 2018.

Katzung BG. Introduction: The Nature of Drugs & Drug Development & Regulation. U: Basic & clinical pharmacology. 13th ed., Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 7.

Kim JK, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci*, 2011, 122, 1-6.

Kim J, Yum H, Jang M, Shin I, Yang W, Baeck S, Suh JH, Lee S, Han SB. A comprehensive and sensitive method for hair analysis in drug-facilitated crimes and incorporation of zolazepam and tiletamine into hair after a single exposure. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408, 251-263.

Klaster Andrija, 2011., <http://andrija.pharma.hr>, pristupljeno 20. 4. 2018.

Klaster Isabella, 2007., <http://www.srce.hr/isabella>, pristupljeno 20. 4. 2018.

Lacković Z. Povijest benzodiazepina. U: Benzodiazepini u suvremenoj medicini. Jakovljević M, Lacković Z, Hotujac Lj, Relja M, Šagud M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2001, str. 7.

Lacković Z, Jakovljević M. Benzodiazepini: za ili protiv? U: Benzodiazepini u suvremenoj medicini. Jakovljević M, Lacković Z, Hotujac Lj, Relja M, Šagud M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2001, str. 3-5a.

Lacković Z, Jakovljević M. Zaključak o benzodiazepinima. U: Benzodiazepini u suvremenoj medicini. Jakovljević M, Lacković Z, Hotujac Lj, Relja M, Šagud M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2001, str. 247b.

Lu XL, Yang SK. Resolution of enantiomeric lorazepam and its acyl and O-methyl derivatives and racemization kinetics of lorazepam enantiomers. *J Chromatogr*, 1990, 535, 229-238.

Maksay G, Tegyei Z, Otvos L. Stereospecificity of esterases hydrolyzing oxazepam acetate. *J Pharm Sci*, 1978, 67, 1208-1210.

Maskill H. *The Physical Basis of Organic Chemistry*. Oxford, Oxford University Press, 1990, str. 167-168.

Maupas B, Fleury MB. Incidence of the dehydration step on the electrochemical behaviour of 3-hydroxy-2-one benzodiazepine compounds (oxazepam and lorazepam) in aqueous acid media at the mercury electrode. *Electrochim Acta*, 1982, 27, 141-147.

Mayer JM. Stereoselective metabolism of anti-inflammatory 2-arylpropionates. *Acta Pharm Nord*, 1990, 2, 197-216.

McQuaid KR. *Drugs used in the treatment of gastrointestinal diseases*. U: Basic & clinical pharmacology. 13th ed., Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 1052-1079.

Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science*, 1977, 198, 849-851.

Möhler H, Richards JC. *Benzodiazepine receptors in the central nervous system*. U: The benzodiazepines. From molecular biology to clinical practice. Costa E, urednik, New York, Raven Press, 1983, str. 93-116.

Moosmann B, Bisel P, Auwärter V. Characterization of the designer benzodiazepine diclazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Drug Test Anal*, 2014, 6, 757-763.

Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci*, 2006, 2, 85-100.

Oswald P, Desmet K, Sandra P, Krupčík J, Majek P, Armstrong DW. Determination of the enantiomerization energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical fluid chromatography. *J Chromatography B*, 2002, 779, 283-295.

Papini O, Bertucci C, Pereira da Cunha S, Guinaim dos Santos NA, Lanchote VL. Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples. *J Pharmaceut Biomed*, 2006, 40, 389-396.

Patchett AA, Nargund RP. Privileged Structures - An Update. *Annu Rep Med Chem*, 2000, 35, 289-298.

PCMODEL, version 10.0, Gilbert KE, Midland MM. Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN, 2014.

Pem B, Vrček V. Substituent effects on the stability of 1,4-benzodiazepin-2-one tautomers: A density functional study. *Int J Quantum Chem*, 2018, 118, 8.

Pham-Huy C, Vilain-Pautet G, He H, Chikhi-Chorfi N, Galons H, Thevenin M, Claude JR, Warnet JM. Separation of oxazepam, lorazepam and temazepam enantiomers by HPLC on a derivatized cyclodextrin-bonded phase: Application to the determination in plasma. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 54, 287-299.

Pine SH. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 132-178.

Pistolozzi M, Bertucci C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: A circular dichroism study. *Chirality*, 2008, 20, 552-558.

Pliego JR Jr. Basic hydrolysis of formamide in aqueous solution: A reliable theoretical calculation of the activation free energy using the cluster-continuum model. *Chem Phys*, 2004, 306, 273-280.

Pople JA, Gill PMW, Johnson BG. Kohn-Sham density-functional theory within a finite basis set. *Chem Phys Lett*, 1992, 199, 557-560.

Popović GV, Sladić DM, Stefanović VM, Pfenndt LB. Study on protolytic equilibria of lorazepam and oxazepam by UV and NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31, 693-699.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure drugs. U: Basic & clinical pharmacology. 13th ed., Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 396-420.

Redmond DEJ, Huang YH. New evidence for a locus ceruleus–norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci*, 1979, 25, 2149-2162.



Reist M, Testa B, Carrupt PA. Drug Racemization and Its Significance in Pharmaceutical Research. U: Handbook of Experimental Pharmacology Volume 153. Starke K, Born GYR, Eichelbaum M, Ganten D, Herken H, Hofmann F, Limbird LE, Rosenthal W, Rubanyi G, urednici, Berlin, Springer-Verlag, 2003, str. 91-112.

Reist M, Testa B, Carrupt PA, Jung M, Schurig V. Racemization, enantiomerization, diastereomerization, and epimerization: Their meaning and pharmacological significance. *Chirality*, 1995, 7, 396-400.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 258, 317-318.

Salvadori P, Bertucci C, Domenici E, Giannaccini G. Chiral 1,4-benzodiazepin-2-ones: relationship between stereochemistry and pharmacological activity. *J Pharmaceut Biomed*, 1989, 7, 1735-1742.

Schoetz G, Trapp O, Schurig V. Dynamic Micellar Electrokinetic Chromatography. Determination of the Enantiomerization Barriers of Oxazepam, Temazepam, and Lorazepam. *Anal Chem*, 2000, 72, 2758-2764.

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, Adamiker D. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 1999, 34, 379-385.

Smith SG, Sanchez R, Zhou MM. Privileged diazepine compounds and their emergence as bromodomain inhibitors. *Chem Biol*, 2014, 21, 1-11.

Smith SW. Chiral toxicology: it's the same thing...only different. *Toxicol Sci*, 2009, 110, 4-30.

Spencer J, Rathnam RP, Chowdhry BZ. 1,4-benzodiazepin-2-ones in medicinal chemistry. *Future Med Chem*, 2010, 2, 1441-1449.

Sternbach LH. 1,4-benzodiazepines. Chemistry and some aspects of the structure-activity relationship. *Angew Chern internat Edit*, 1971, 10, 34-43.

Sternbach LH. The benzodiazepine story. *J Med Chem*, 1979, 22, 1-7.

Štromar M, Šunjić V, Kovač T, Klasinc L, Kajfež F. Chiral 1,4-benzodiazepines. VIII. Concerning the rate of H/D exchange and optical stability of the chiral centre C(3). *Croat Chem Acta*, 1974, 46, 265-274.

Šunjić V, Oklobdžija M, Lisini A, Segar A, Kajfež F, Srzić D, Klasinc L. Chiral 1,4-benzodiazepines-kinetics of degenerate nucleophilic exchange of C(3)-hydroxy group. *Tetrahedron*, 1979, 35, 2531-2537.

Tegeder I, Williams K, Geisslinger G. Metabolic Chiral Inversion of 2-Arylpropionic Acids. U: Handbook of Experimental Pharmacology Volume 153. Starke K, Born GYR, Eichelbaum M, Ganten D, Herken H, Hofmann F, Limbird LE, Rosenthal W, Rubanyi G, urednici, Berlin, Springer-Verlag, 2003, str. 341-354.

Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD, Laskin OL. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43, 311-327.

Testa B, Carrupt PA, Gal J. The So-called "Interconversion" of Stereoisomeric Drugs: An Attempt at Clarification. *Chirality*, 1993, 5, 105-111.

Testa B, Vistoli G, Pedretti A. Mechanism and pharmaceutical consequences of processes of stereoisomerisation – A didactic excursion. *Eur J Pharm Sci*. 2016, 88, 101-123.

Tian C, Xiu P, Meng Y, Zhao W, Wang Z, Zhou R. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions. *Chem Eur J*, 2012, 18, 14305-14313.

Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. New York, Informa Healthcare, 2009, str. 370-373.

Trapp O, Trapp G, Schurig V. Direct calculation and computer simulation of the enantiomerization barrier of oxazepam in dynamic HPLC experiments – a comparative study. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 54, 301-313.

Trevor AJ. Sedative-Hypnotic Drugs. U: Basic & clinical pharmacology. 13th ed., Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 369-383.

Wade LG ml. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 169-209.

Wafford KA. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5, 47-52.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 270-273.

Yang SK. Acid-catalysed stereoselective heteronucleophilic substitution and racemization of 3-O-methyloxazepam and 3-O-ethyloxazepam. *Chirality*, 1994, 6, 175-184.

Yang SK, Bao Z. Base-Catalyzed Racemization of 3-O-Acyloxazepam. *Chirality*, 1994, 6, 321-328.

Yang SK, Huang A, Huang JD. Enantioselectivity of esterases in human brain. *Chirality*, 1993, 5, 565-568.

Yang SK, Liu K, Guengerich FP. Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction. *Chirality*, 1990, 2, 150-155.

Yang SK, Lu XL. Resolution and stability of oxazepam enantiomers. *Chirality*, 1992, 4, 443-446.

Yang TJ, Yang SK. Acid-catalyzed reaction of ethanol and oxazepam and its pharmacological consequence. *J Food Drug Anal*, 1995, 3, 173-183.

## 7. SAŽETAK

### KVANTNO-KEMIJSKA STUDIJA ENANTIOMERIZACIJE OKSAZEPAMA

Oksazepam je aktivni metabolit najpropisivanijeg anksiolitika diazepama. Pri fiziološkim uvjetima pokazuje značajnu stereokemijsku nestabilnost, zbog čega je poznavanje mehanizma enantiomerizacije oksazepama izrazito važno. U literaturi su predložena četiri mehanizma enantiomerizacije. U ovome radu je kvantno-kemijskim izračunima provjerena njihova relevantnost. Najjednostavniji mehanizam uključuje deprotoniranje kiralnog centra i nastanak karbaniona, međutim, malo je vjerojatan zbog niske kiselosti C3-H skupine. Također je predložen mehanizam keto-enolne tautomerije, ali kinetičkim i termodinamičkim izračunima je utvrđeno da nije relevantan za opis enantiomerizacije oksazepama. Treći mehanizam uključuje protoniranje C3-OH skupine, dehidraciju uz nastanak karbokationa te reverzibilnu hidrataciju. S obzirom da je C3-OH skupina najmanje bazičan položaj, ovaj mehanizam se ne smatra odgovornim za enantiomerizaciju. Izračunati parametri za četvrti mehanizam prsten-lanac tautomerije sukladni su eksperimentalno izmjerenoj energijskoj barijeri od 91 kJ/mol, a uključuje prijenos protona s C3-OH na N4 atom. Stoga je zaključeno da je, između predloženih mehanizama, prsten-lanac tautomerija jedini mogući mehanizam enantiomerizacije oksazepama.

## SUMMARY

### QUANTUM-CHEMICAL STUDY OF ENANTIOMERIZATION OF OXAZEPAM

Oxazepam is an active metabolite of diazepam, the most prescribed anxiolytic drug. Under physiological conditions oxazepam displays extreme chiral instability so examination of reaction mechanism underlying the enantiomerization of oxazepam is very important. Four different mechanisms, possibly involved in this epimerization, were proposed in the literature. In this work, quantum-chemical models were used to search for all feasible reaction pathways. The most simple enantiomerization process corresponds to a deprotonation pathway in which the proton at the chiral C3-atom is eliminated and the carbanion intermediate is formed. The computational results exclude the C3-H/H exchange as a possible mechanism because the C3-carbanion is calculated as the least stable species. Keto-enol tautomerization is also suggested as possible mechanism. But, thermodynamic and kinetic calculations confirm that enolization is not reaction mechanism underlying the enantiomerization of oxazepam. The third mechanism includes the protonation of the C3-OH group followed by the elimination of water. The resulting carbocation intermediate undergoes reversible hydration. The protonation of C3-OH group resulted in the least stable protonated species so this mechanism is not operative in stereochemical instability of oxazepam. The fourth mechanism which include the intramolecular proton transfer from the C3-OH to the imine N4 atom, fits within the targeted barrier limit ( $\Delta G^\ddagger < 91$  kJ/mol) set by experiments. According to computational results, the enantiomerization of oxazepam follows the mechanism of the ring-chain tautomerism. No other mechanism, suggested earlier in the literature, matches the experimental data in terms of Gibbs free energy.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### KVANTNO-KEMIJSKA STUDIJA ENANTIOMERIZACIJE OKSAZEPAMA

**Lucija Hok**

#### SAŽETAK

Oksazepam je aktivni metabolit najpropisivanijeg anksiolitika diazepama. Pri fiziološkim uvjetima pokazuje značajnu stereokemijsku nestabilnost, zbog čega je poznavanje mehanizma enantiomerizacije oksazepama izrazito važno. U literaturi su predložena četiri mehanizma enantiomerizacije. U ovome radu je kvantno-kemijskim izračunima provjerena njihova relevantnost. Najjednostavniji mehanizam uključuje deprotoniranje kiralnog centra i nastanak karbaniona, međutim, malo je vjerojatan zbog niske kiselosti C3-H skupine. Također je predložen mehanizam keto-enolne tautomerije, ali kinetičkim i termodinamičkim izračunima je utvrđeno da nije relevantan za opis enantiomerizacije oksazepama. Treći mehanizam uključuje protoniranje C3-OH skupine, dehidraciju uz nastanak karbokationa te reverzibilnu hidraciju. S obzirom da je C3-OH skupina najmanje bazičan položaj, ovaj mehanizam se ne smatra odgovornim za enantiomerizaciju. Izračunati parametri za četvrti mehanizam prsten-lanac tautomerije sukladni su eksperimentalno izmjerenoj energijskoj barijeri od 91 kJ/mol, a uključuje prijenos protona s C3-OH na N4 atom. Stoga je zaključeno da je, između predloženih mehanizama, prsten-lanac tautomerija jedini mogući mehanizam enantiomerizacije oksazepama.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 15 grafičkih prikaza, 4 tablice i 101 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oksazepam, enantiomerizacija, kvantno-kemijska studija

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

Komentor: **Dr. sc. Davor Šakić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

**Dr. sc. Davor Šakić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Dr. sc. Hrvoje Rimac**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### QUANTUM-CHEMICAL STUDY OF ENANTIOMERIZATION OF OXAZEPAM

**Lucija Hok**

#### SUMMARY

Oxazepam is an active metabolite of diazepam, the most prescribed anxiolytic drug. Under physiological conditions oxazepam displays extreme chiral instability so examination of reaction mechanism underlying the enantiomerization of oxazepam is very important. Four different mechanisms, possibly involved in this epimerization, were proposed in the literature. In this work, quantum-chemical models were used to search for all feasible reaction pathways. The most simple enantiomerization process corresponds to a deprotonation pathway in which the proton at the chiral C3-atom is eliminated and the carbanion intermediate is formed. The computational results exclude the C3-H/H exchange as a possible mechanism because the C3-carbanion is calculated as the least stable species. Keto-enol tautomerization is also suggested as possible mechanism. But, thermodynamic and kinetic calculations confirm that enolization is not reaction mechanism underlying the enantiomerization of oxazepam. The third mechanism includes the protonation of the C3-OH group followed by the elimination of water. The resulting carbocation intermediate undergoes reversible hydration. The protonation of C3-OH group resulted in the least stable protonated species so this mechanism is not operative in stereochemical instability of oxazepam. The fourth mechanism which include the intramolecular proton transfer from the C3-OH to the imine N4 atom, fits within the targeted barrier limit ( $\Delta G^\ddagger < 91$  kJ/mol) set by experiments. According to computational results, the enantiomerization of oxazepam follows the mechanism of the ring-chain tautomerism. No other mechanism, suggested earlier in the literature, matches the experimental data in terms of Gibbs free energy.

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

Thesis includes: 54 pages, 15 figures, 4 tables and 101 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oxazepam, enantiomerization, quantum-chemical study

Mentor: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

**Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018.