

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Lucija Božičević i Helena Sremec

**MEHANIZAM RACEMIZACIJE OKSAZEPAMA**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju i Zavodu za analitičku kemiju  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc.  
Valerija Vrčeka i dr. sc. Davora Šakića, te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade  
u akademskoj godini 2017./2018.

## SADRŽAJ RADA

1. UVOD .....	1
1.1. STEREOKEMIJA .....	1
1.1.1. DEFINICIJA STEREOKEMIJE I STEREOIZOMERA .....	1
1.1.2. VAŽNOST STEREOKEMIJE U BIOLOŠKIM SUSTAVIMA .....	2
1.1.3. VAŽNOST STEREOKEMIJE U FARMACIJI .....	3
1.1.3.1. TALIDOMID .....	3
1.1.3.2. (ES) OMEPRAZOL .....	4
1.2. TAUTOMERIZACIJA .....	5
1.2.1. DEFINICIJA TAUTOMERIZACIJE .....	5
1.2.2. PROTOTROPNE TAUTOMERIZACIJE – MEHANIZAM I KONSTANTA RAVNOTEŽE .....	6
1.2.3. KETO-ENOLNA TAUTOMERIJA .....	7
1.2.4. KETO-IMINOLNA TAUTOMERIJA .....	7
1.2.5. PRSTEN-LANAC TAUTOMERIJA .....	8
1.3. BENZODIAZEPINI .....	9
1.3.1. MEHANIZAM DJELOVANJA .....	9
1.3.2. TERAPIJSKE INDIKACIJE .....	9
1.3.3. BENZODIAZEPINI U HRVATSKOJ .....	10
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. RAČUNALNA KEMIJA .....	13
3.2. RAČUNALNE METODE .....	13
3.3. RAČUNALNE TEHNIKE .....	14
3.3.1. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA .....	14
3.3.2. FREKVENCIJSKI RAČUN I INTRINZIČKE REAKCIJSKE KOORDINATE ..	15
3.3.3. IZRAČUN ENERGIJE .....	16
3.3.4. SOLVATACIJSKI RAČUNI .....	16
3.4. KORIŠTENE RAČUNALNE METODE I TEHNIKE .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1. MOGUĆI MEHANIZMI RACEMIZACIJE .....	18
4.1.1. PROCES C3-H/H IZMJENE .....	18
4.1.2. KETO-ENOLNA TAUTOMERIZACIJA .....	22
4.1.3. KETO-IMINOLNA TAUTOMERIZACIJA .....	24
4.1.4. N1-N4 TAUTOMERIZACIJA .....	25

4.1.5. SOLVOLITSKE REAKCIJE .....	27
4.1.6. PRSTEN-LANAC TAUTOMERIZACIJA .....	33
5. ZAKLJUČAK .....	37
6. ZAHVALE .....	39
7. POPIS LITERATURE .....	40
8. SAŽETAK .....	44
9. SUMMARY .....	45
10. PRILOZI .....	46

## 1. UVOD

### 1.1. STEREOKEMIJA

#### 1.1.1. DEFINICIJA STEREOKEMIJE I STEREOIZOMERA

Stereokemija je grana kemije kojoj su u središtu proučavanja trodimenzijske strukture molekula. Stereoizomeri su tvari iste molekulske mase s jednako raspoređenim i povezanim atomima u molekuli, ali u trodimenzijskomtrodimenzijskom rasporedu ti su atomi različito orijentirani. Najčešća vrsta stereoizomera su enantiomeri. Enantiomeri su molekule koje se međusobno odnose kao zrcalne slike, odnosno kao lijeva i desna ruka. Takav oblik kiralnosti posjeduju molekule koje sadrže asimetrični ugljikov atom, kojeg nazivamo stereocentrom, a njegova je specifičnost da ima vezana 4 različita supstituenta. Razlika dvaju enantiomera je u prostornom rasporedu dviju skupina ili atoma vezanih na asimetrični ugljikov atom. (McMurry, 2003)

Trodimenzijska konfiguracija stereocentra određuje se kao R ili S primjenom CIP pravila nomenklature. CIP je kratica koja proizlazi iz prezimena autora pravila: Cahn, Ingolda i Preloga, koji je za svoj doprinos u istraživanju stereokemije kemijskih reakcija i struktura dobio Nobelovu nagradu 1975. godine. CIP pravila određivanja konfiguracije uključuju identifikaciju kiralnih centara u molekuli nakon čega slijedi dodjela prioriteta supstituentima vezanim na kiralne ugljikove atome te se prema njihovom rasporedu u prostoru određuje apsolutna konfiguracija kiralnog centra kao R ili S (ako je supstituent najmanjeg prioriteta (4) najudaljeniji od promatrača i ostali su supstituenti orijentirani u smjeru kazaljke na satu (od 1 prema 3) radi se o R-izomeru ili je u pitanju S-izomer ako su supstituenti od 1 do 3 orijentirani u obrnutom smjeru od smjera kazaljke na satu). Prioriteti se supstituentima dodjeljuju na temelju atomskog broja atoma u supstituentu koji je vezan izravno na kiralni atom pri čemu supstituenti kod kojih je atomski broj atoma vezanog na kiralni ugljik veći imaju veći prioritet. (Cahn i sur., 1966)

Enantiomeri različitih konfiguracija mogu biti izolirani kao zasebne specije, ali isto tako mogu egzistirati u obliku racemične smjese kod koje je omjer dvaju enantiomera 50:50. Reakciju u kojoj iz enantiomerno čistog spoja nastaje racemična smjesa nazivamo racemizacijom. (McMurry, 2003). Ako iz enantiomera R-konfiguracije nastane enantiomer S-konfiguracije i obratno, govorimo o inverziji konfiguracije. Optički stabilne molekule su one

kiralne molekule kod kojih ne dolazi do racemizacije, odnosno inverzije konfiguracije na kiralnom centru.

Iako enantiomeri imaju ista kemijska i fizikalna svojstva, drukčije su njihove reakcije s drugim kiralnim molekulama. Upravo iz te činjenice proizlazi važnost poznavanja stereokemije određene molekule u biokemiji i farmaciji s obzirom na to da je naš organizam izrazito kiralan okoliš (Voet i Voet, 2003). Stereokemija je ključna kako za vezanje endogenih molekula na receptore i ostvarivanje biološkog učinka, tako i za farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lijekova.

Atropizomeri su još jedna vrsta stereoizomera koji se razmatraju u ovom radu. Do njihova nastanka dolazi kad je rotacija oko jednostruke veze zapriječena steričkim ili elektronskim smetnjama. Zbog toga postoji energijska barijera interkonverzije dvaju atropizomera koja je dovoljno visoka da je moguće izolirati pojedini stereoizomer. S obzirom na ranije naveden značaj stereokemije, atropizomerizaciju je također potrebno razmotriti prilikom dizajna novih lijekova te osigurati da barijere budu ili dovoljno visoke da se lijek može izolirati kao čisti atropizomer ili dovoljno niske da je moguće proizvesti smjesu konzistentnog sastava (Clayden, LaPlante i sur., 2009).

### 1.1.2. VAŽNOST STEREOKEMIJE U BIOLOŠKIM SUSTAVIMA

Kiralnost i optička aktivnost od izuzetne su važnosti u biološkim sustavima, s obzirom na to da su gotovo sve važne makromolekule kiralne. Aminokiseline, ugljikohidrati i nukleinske kiseline samo su neke od kiralnih molekula neophodnih za funkcioniranje organizma. U biljnom je svijetu zamijećeno kako različiti stereoizomeri mogu imati i različita biološka svojstva, poput (+) –limonena koji ima miris naranče dok (-) -limonen ima miris limuna (McMurry, 2003).

Tako su, primjerice, sve aminokiseline u ljudskom organizmu L-enantiomeri. Pretpostavlja se kako je odabir između L- i D-izomera bio slučajan, ali kad se odabir jednom dogodio, ostao je evolucijski očuvan sve do danas (Stryer i sur., 2013). Važnost stereokemije u interakcijama bioloških molekula proizlazi iz činjenice da je ljudski organizam ima sposobnost da kod sinteze optički aktivnih spojeva gotovo uvijek proizvodi čisti stereoizomer, dok se kemijskom sintezom dobivaju uglavnom racemične smjese pa je stereoizomere potrebno izolirati (Voet i Voet, 2003).

Enzimi su možda i jedna od najvažnijih komponenata ljudskog organizma. Proteini su izgrađeni od aminokiselina, a upravo iz te činjenice proizlazi i velika ovisnost njihove funkcionalnosti o stereokemiji. Kiralnost aminokiselina utječe na asimetričnost aktivnog mjesta u enzimu, zbog čega će interakcija enzim-supstrat biti stereospecifična. Upravo je ovakva specifičnost prepoznavanja supstrata iskorištena i kod nekih lijekova, poput primjerice agonista faktora otpuštanja gonadotropina (GnRH) koji se koriste u terapiji nekih karcinoma. Oni su peptidomimetici koji se u organizmu vežu na receptore za GnRH i isprva oponašaju njegovo djelovanje, ali zbog svoje modificirane strukture na receptore djeluju dulje i snažnije od endogenog hormona i dovode do desenzitizacije i internalizacije receptora za GnRH. Modifikacija u njihovoj strukturi je zamjena L-glicina na položaju 6 D-aminokiselinama čime se onemogućuje djelovanje peptidazama koje inače razgrađuju GnRH na tom položaju. Peptidaze ne mogu prepoznati D-aminokiselinu, već samo L- te je ovakvom zamjenom omogućeno izrazito produljeno djelovanje agonistima GnRH i u konačnici smanjenje osjetljivosti receptora. (Millar, 2005)

Ciljne molekule raznih lijekova su receptori proteinske strukture koje specifično vežu svoj endogeni ligand pa je i iz tog razloga važno voditi računa o stereokemiji prilikom sinteze novih lijekova jer će o tome ovisiti farmakodinamička svojstva i učinak lijeka.

### 1.1.3. VAŽNOST STEREOKEMIJE U FARMACIJI

#### 1.1.3.1. TALIDOMID

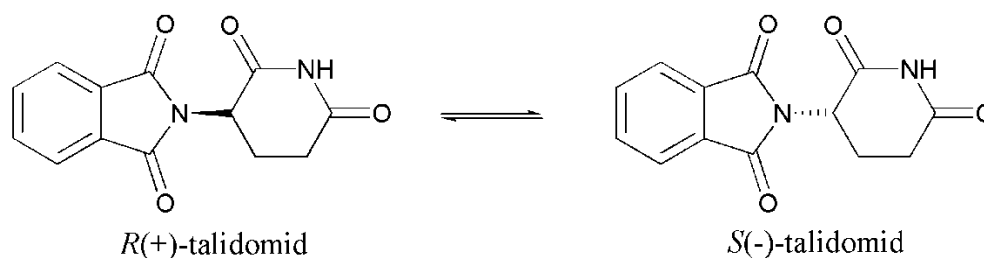
Registriran 1957., talidomid se narednih nekoliko godina koristio kao sedativ koji su, među ostalima, koristile i trudnice, kojima je propisivan i kao antiemetik u prvom tromjesečju trudnoće. Razlog povlačenja lijeka su bile tisuće djece rođene s kongenitalnim malformacijama, koji su s talidomidom povezani tek 1961., nakon dviju neovisnih studija. Naknadno su utvrđene povećane stope spontanih pobačaja u tom periodu. Nakon talidomida, počelo se puno pažnje pridavati utjecaju lijekova u trudnoći te je to bio začetak ispitivanja teratogenosti budućih lijekova (Vargesson, 2015).

Usprkos njegovoj velikoj toksičnosti i skandalu povezanom s njome (nazvanim „talidomidska katastrofa“), talidomid se i danas koristi u drugim indikacijama, primjerice u liječenju multiplog mijeloma i erythema nodosum leprosum (ENL), upalne bolesti povezane s

gubom, a intenzivno se radi na istraživanju derivata talidomida i njihovih potencijalnih dobiti u terapiji karcinoma ili nekih autoimunih bolesti (Kishimoto i Millrine, 2017).

Talidomid se sastoji od dva heterociklička prstena – glutarimida i ftalimida te kiralnog ugljikovog atoma. R(+)-enantiomer je siguran, dok je S(-)-enantiomer onaj koji uzrokuje kongenitalne malformacije u fetusu (Vargesson, 2015).

Iako se talidomid prodavao kao racemat, odnosno, ekvimolarna smjesa enantiomera, nesreća nije mogla biti izbjegnuta ni da se primjenjivao čisti R(+)-enantiomer. Zbog tautomernih reakcija, dolazi do pretvorbe R(+)-enantiomera u S(-)- i ponovnog nastanka racemata (Slika 1.).



**Slika 1.** Ravnotežna racemizacija talidomida

Sam mehanizam racemizacije nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da dolazi do prijenosa protona s kiralnog ugljikovog atoma na bliži karbonilni kisik uz posredovanje dvije molekule vode u takozvanom „vodenom mostu“. Tu reakciju slijedi rotacija glutarimidnog prstena te ponovni transfer protona na kiralni C-atom. Mehanizam je ovisan o pH medija. Naime, u jako kiselom mediju, do racemizacije gotovo i ne dolazi, dok se njena brzina povećava povišenjem pH pa možemo govoriti o bazno-kataliziranoj reakciji u kojem će „vodeni most“ zapravo stvarati hidroksidni ion i molekula vode (Tian i sur., 2012).

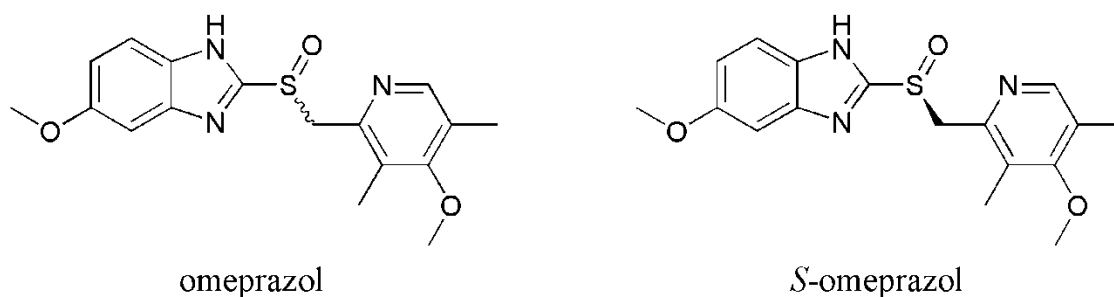
#### 1.1.3.2.(ES)OMEPRAZOL

Esomeprazol i omeprazol su ireverzibilni inhibitori  $H^+/K^+$  protonske pumpe (IPP) koja se specifično nalazi samo na membrani parijetalnih stanica želuca. Blokadom te protonske pumpe, oni inhibiraju prijenos vodikovih iona u lumen želuca te na taj način smanjuju njegov aciditet. Oba su lijeka prolijekovi koji se apsorbiraju te se aktiviraju tek na mjestu djelovanja, u želucu (Lindberg, 2007). Oba lijeka se koriste u terapiji gastričkih poremećaja kao što su



gastroezofagealna ulkusna bolest (GERB) te gastrični ulkus sa daleko boljim učincima od njihovih prethodnika u terapiji istih indikacija – antagonista H<sub>2</sub> receptora (McQuaid, 2015).

Prvi otkriven i registriran je bio omeprazol od strane farmaceutske tvrtke Astra (danas AstraZeneca) (Lindberg, 2007). On je racemična smjesa R- i S-enantiomera (Slika 2.). Za razliku od prethodno spomenutog talidomida, enantiomeri omeprazola su optički stabilni, te ne dolazi do racemizacije prilikom korištenja čistog enantiomera. Po isteku patentne zaštite, kompanija je kao novi lijek registrirala S-enantiomer omeprazola, nazvan esomeprazol, te na taj način uspjela produžiti trajanje patentne zaštite (USPTO Patent Database, 1997). S-enantiomer je imao bolja farmakokinetička svojstva, primjerice, značajno veću bioraspoloživost od svoga prethodnika, stoga pokazuje bolje djelovanje te dovodi do smanjenog lučenja H<sup>+</sup> iona i, posljedično, sprječava zakiseljavanje želuca (Thitiphuree i Thalley, 2000).



**Slika 2.** Strukture racemičnog omeprazola (lijevo) i njegovog S-enantiomera (desno)

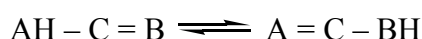
## 1.2. TAUTOMERIZACIJA

### 1.2.1. DEFINICIJA TAUTOMERIZACIJE

Tautomerizacija predstavlja poseban oblik izomerizacije i ima značajnu ulogu u organskoj i farmaceutskoj kemiji, biokemiji te farmakologiji. Tautomerizacija (grč. tauto = isto, meros = dio) podrazumijeva postojanje spoja u obliku izomera koji su u međusobnoj ravnoteži. Proces transformacije izomera je povratna reakcija te se samo oni izomeri koji iznimno brzo prelaze iz jednog oblika u drugi mogu smatrati tautomerima. Tautomerizacije mogu biti prototropne, kationtropne ili aniontropne, a opisana je i tautomerizacija otvaranjem prstena i njegovim ponovnim zatvaranjem. Prilikom navedenih procesa dolazi do migracije dvostrukih veza, atoma ili skupina unutar molekule (Raczynska, 2005). Tautomerizacija je jedan od mogućih mehanizama racemizacije i ovom radu u tom kontekstu razmatrat će se keto-enolnatautomerijate prsten-lanac tautomerija kao oblici prototropnih tautomerizacija.

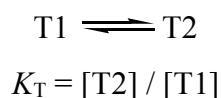
## 1.2.2. PROTOTROPNE TAUTOMERIZACIJE – MEHANIZAM I KONSTANTA RAVNOTEŽE

Prototropne tautomerizacije, prema Međunarodnoj uniji za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC), jesu one kod kojih se događa pomak protona s atoma A na drugi atom B uz istovremeni pomak  $\pi$ -elektrona s atoma B na atom A. Mogu se opisati općenitom jednačicom (Cruz-Cabeza i sur., 2010):



Preduvjet za odvijanje prototropnih tautomerizacija je amfiprotičnost molekule, odnosno svojstvo molekule da posjeduje kiseli fragment koji može dati proton i bazični fragment koji ga može primiti (Filipović i Lipanović, 1995). Ovakva tautomerizacija je intramolekulski proces u plinovitoj fazi ili polarnim neprotičnim otapalima, a može biti katalizirana polarnim protičnim otapalima poput vode te kiselinama ili bazama (Pem, 2017). U vodi je ova reakcija katalizirana nastajanjem „vodenog mosta“ koji pomaže u prijenosu protona s jednog dijela molekule na drugi izmjenom protona između molekule i mosta voda te unutar voda u mostu. Takav učinak otapala stabilizira parcijalne naboje koji nastaju tijekom samog prijenosa (Vrček, Pem, 2017). Kod kiselokataliziranih procesa, kiselina će predati proton bazičnom fragmentu i nakon pregrađivanja molekule, kiseli fragment predat će proton konjugiranoj bazi, dok će kod bazne katalize baza uzeti proton s kiselog centra, a nastala konjugirana kiselina predati proton bazičnom fragmentu.

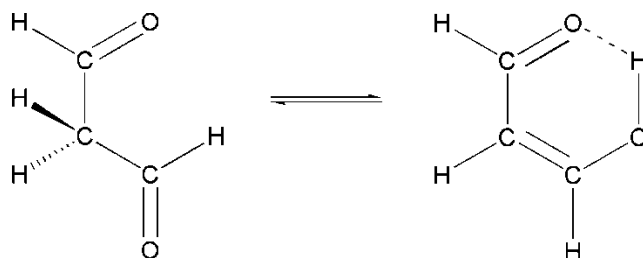
Proces tautomerizacije može se opisati jednostavnom ravnotežom:



gdje su T1 i T2 tautomeri, a  $K_T$  konstanta ravnoteže tautomerizacije.

### 1.2.3. KETO-ENOLNA TAUTOMERIJA

Keto-enolna tautomerija jedan je od najčešćih i najopsežnije istraživanih mehanizama tautomerizacije, a opisana je kao svojstvo karbonilnih spojeva koji na svojem  $\alpha$ -ugljikovom atomu imaju vodikov atom čijim se prijelazom na kisikov atom u karbonilu odvija transformacija u odgovarajući enolni oblik. (Wu i Lien, 1996) U većini slučajeva keto-oblik je stabilnija specija, uz ostalo, zbog elektronegativnosti kisika koji privlači  $\pi$ -elektrone prema sebi, što podrazumijeva pomak kemijske ravnoteže prema obliku u kojem je veza između ugljika i kisika dvostruka. Keto-tautomer uglavnom je glavni ravnotežni oblik, dok je enolni-oblik manje stabilan i teško ga je izolirati. Ipak, to ne umanjuje važnost enola u brojnim reakcijama molekula koje postoje u ovakvoj ravnoteži u biološkim sustavima (Cucinotta i sur., 2006). U prvom redu, stoga što je enolni oblik često reaktivniji (nukleofilniji) u odnosu na keto-oblik. Postoje i iznimke, poput malondialdehida (Slika 3.) koji je stabilniji u svojoj enolnoj formi iz dvaju razloga. Prvi razlog je stabilizacija molekule zbog nastanka konjugiranog sustava u enolnoj formi, a drugi je mogućnost stvaranja intramolekulske vodikove veze između karbonilne i hidroksilne skupine. Na stabilizaciju enolnih formi, osim navedenog, mogu utjecati i smještaj i karakteristike supstituenata (elektron-akceptorskih i elektron-donorskih) koji utječu na delokalizaciju  $\pi$ -elektrona u strukturi (Buemi i Zuccarello, 2004).

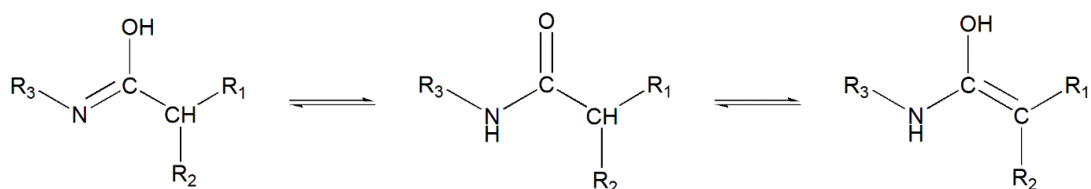


**Slika 3.** Prikaz ravnotežne reakcije između keto- (lijevo) i enolne-forme (desno) malondialdehida.

### 1.2.4. KETO-IMINOLNA TAUTOMERIJA

Keto-iminolna tautomerija je slična keto-enolnoj tautomeriji, ali za razliku od karbonilnih spojeva na kojima dolazi do keto-enolne tautomerije, ona se odvija kod amida koji su derivati karbonilnih kiselina u kojima je hidroksilna skupina zamijenjena amino skupinom. Kao i kod keto-enolne tautomerije, keto oblik je i ovdje stabilnija forma, odnosno glavna ravnotežna specija. Međutim, zanimljivi su sustavi kod kojih se mogu u isto vrijeme

odvijati i keto-enolna i keto-iminolna tautomerija. U takvim slučajevima nije lako procijeniti koji će od tih dvaju tautomernih oblika (enol ili iminol) biti stabilniji i time zastupljeniji u ravnotežnoj smjesi (Pem, 2017). Upravo je oksazepam, koji je tema ovog rada, molekula koja u svojoj strukturi sadrži fragment na kojem se mogu odvijati obje reakcije te će se u ovome radu razmotriti ravnoteže ovih oblika kod oksazepama.



**Slika 4.** Shematski prikaz ravnotežne smjese između iminolne (lijevo), keto i enolne forme (desno).

#### 1.2.5. PRSTEN-LANAC TAUTOMERIJA

Kod prsten-lanac tautomerije, tautomeri molekule su lančasti i prstenasti oblik. Reakcijski koraci, kojima se odvija transformacija ovakvih tautomera, jesu otvaranje prstena i nastajanje lančaste forme te potom ponovna ciklizacija do prstenaste strukture (Valters, 2012). Primjer ovakve tautomerije nalazimo kod molekula monosaharida poput glukoze ili fruktoze, koje reakcijama u kojima nastaju poluketali ili poluacetalni prelaze u svoje cikličke forme šesteročlanog prstena piranoze ili peteročlanog prstena furanoze (Stryer, 2013).

U ovom će radu biti razmatran ranije objašnjen prototropni tip ovakve tautomerizacije kod kojeg će nakon intramolekulskog prijenosa protona doći do otvaranja prstena, a njegovom ponovnom ciklizacijom može doći do racemizacije proučavanog spoja.

#### 1.2.6. N1-N4 TAUTOMERIZACIJA

Ovaj oblik tautomerizacije povezan je s mehanizmima racemizacije i objašnjen je detaljnije kasnije u ovom radu. U pozadini je jednostavna prototropna tautomerizacija kod koje će se prijenos protona u oksazepamu odvijati između najkiselijeg atoma u molekuli (N1) koji će svoj proton predati najbazičnijem atomu u molekuli oksazepama (N4).

### 1.3. BENZODIAZEPINI

#### 1.3.1. MEHANIZAM DJELOVANJA

Benzodiazepini pripadaju skupini psihoaktivnih lijekova koji djeluju na svim dijelovima neuralne osi. Alosterički su modulatori GABA A receptora, pentamernog receptora koji nastaje različitim spajanjem različitih  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinica, s time da se benzodiazepini vežu na takozvano „benzodiazepinsko mjesto“, koje se uglavnom nalazi na spoju  $\alpha 1$  i  $\gamma 2$  podjedinica, različito od vezanja prirodnog liganda, gamaaminomaslačne kiseline (GABA, eng.  $\gamma$ -amino butric acid). Djeluju na način da alosterički pospješuju vezanje GABA-e na svoj receptor i na taj način utječu na frekvenciju otvaranja kanala. U sredini receptora se nalazi kloridni kanal koji se, vezanjem GABA-e, otvara i propušta kloridne ione u citoplazmu postsinaptičkog živca, uzrokujući njegovu hiperpolarizaciju i na taj način interferirajući s prenošenjem signala u mozgu (dodatno pojačavaju inhibitorno djelovanje GABA-e) (Trevor, 2015).

#### 1.3.2. TERAPIJSKE INDIKACIJE

Već pri nižim dozama benzodiazepini pokazuju sedativno i anksiolitičko djelovanje, te o dozi ovisnu anterogradnu amneziju. U višim dozama uzrokuju hipnozu, a neki (diazepam, lorazepam, midazolam) i anesteziju. Upravo su zbog hipnotskog djelovanja te izazivanja anterogradne amnezije pogodni za upotrebu prije operativnih ili drugih neugodnih medicinskih zahvata, poput endoskopije ili bronhoskopije.

Klonazepam, nitrazepam, lorazepam i diazepam se mogu koristiti u terapiji epileptičnih napada, dugodjelujući benzodiazepinski derivati, poput diazepama, se mogu koristiti u terapiji alkoholizma, dok lorazepam suprimira simptome delirium tremensa. Lorazepam i oksazepam su posebno pogodni u terapiji alkoholizma kod pacijenata s kompromitiranom funkcijom jetre jer se metaboliziraju na inaktivne metabolite koji se ne nakupljaju u organizmu (Trevor i Masters, 2015).

To su lijekovi širokog terapijskog indeksa, odnosno velike razlike između minimalne terapijske i maksimalne doze koja ne uzrokuje toksično djelovanje. Zbog brzog otklanjanja simptoma anksioznosti ili pak nesаницe uz minimalne nuspojave te postojanja antidota u slučaju trovanja (antagonist GABA A receptora – flumazenil), imaju i negativnu stranu – jako su adiktivni lijekovi. Pojava tolerancije se povezuje sa smanjenjem osjetljivosti receptora,

iako sam mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (Trevor, 2015). Zbog pojavnosti fizičke i psihičke ovisnosti, u terapiji su se isprobavali razni lijekovi s djelovanjem na središnji živčani sustav – pregabalin, kaptodiam, valproat, paroksetin, triciklički antidepresivi i flumazenil, no autori analize nisu mogli izvući čvrste dokaze (Baandrup, 2018).

Danas se benzodiazepine ispituje kao pomoćnu terapiju u nekim drugim psihičkim oboljenjima, primjerice shizofreniji, zbog neadekvatnog odgovora pacijenata na terapiju klasičnim antipsihoticima. No, nema odgovarajućih dokaza da bi mogli značajno utjecati, ni u monoterapiji ni kao pomoćna terapija antipsihoticima za otklanjanje simptoma kao što su anksioznost, agitacija ili disruptivno ponašanje (Dold, 2012). Još je jedna analiza proučavala utjecaj korištenja benzodiazepina u terapiji antipsihoticima-uzrokovane tardivne diskinezije, ali također nisu pronađeni dokazi o učinkovitosti (Bergman, 2018).

### 1.3.3. BENZODIAZEPINI U HRVATSKOJ

Pravilno propisivanje benzodiazepina postao je javno-zdravstveni problem. To su lijekovi koji mogu uzrokovati psihičku i fizičku ovisnost, no i danas se koriste u dugotrajnoj terapiji. Prema izvješću Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode za 2016. godinu, na listi 50 najkorištenijih lijekova po dozvoljenoj dnevnoj dozi na 1000 stanovnika na dan (DDD/1000 stanovnika/dan) nalaze se četiri anksiolitika iz skupine benzodiazepina – diazepam, alprazolam, oksazepam i lorazepam, a od toga se dva nalaze u prvih 10 – diazepam na 4. mjestu, a alprazolam na 8. mjestu ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Razlog tolikoj potrošnji anksiolitika bismo mogli pronaći u činjenici da ih pacijeni preferiraju pred alternativama, zbog problema i nelagodnosti prilikom prestanka uzimanja terapije, ali i zbog njihove brze sposobnosti da otklone simptome bez početnih nuspojava (Vlastelica, 2012). Povremenoj zloupotrebi su sklone mlađe osobe, dok su kontinuiranoj sklonije starije koje lijekove nabavljaju kod liječnika opće medicine zbog insomnije ili anksioznosti (Ciraulo i Greenblatt, 1995).

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Poznavanje stereokemije određene molekule, kao i mehanizama racemizacije od iznimne je važnosti za predviđanje i kontroliranje terapijskog učinka brojnih lijekova. Biološke mete lijekova uglavnom su različiti receptori ili enzimi koji su, s obzirom na to da su proteini, kiralne molekule. Specifične interakcije takvih meta s lijekovima između ostalog su i stereoselektivne, odnosno stereospecifične. Zbog toga je važno moći predvidjeti ponašanje određenog kiralnog spoja u fiziološkim uvjetima s obzirom na njegovu optičku stabilnost kako bi se mogla kvalitetno opisati farmakodinamička i farmakokinetička svojstva takvog lijeka. Racemizacija u organizmu može pojačati ili smanjiti učinak određenog lijeka zbog utjecaja na afinitet prema meti. Isto vrijedi i za transportne proteine koji sudjeluju u distribuciji kiralnog te se na taj način mijenja bioraspoloživost lijeka. Moguće je također da dva enantiomera pokazuju različite farmakodinamičke učinke zbog kojih može doći do neželjenih posljedica uslijed primjene lijeka (talidomidska katastrofa, vidi gore).

Ukoliko je neki ispitivani lijek optički nestabilna molekula, poznavanjem mehanizma racemizacije mogu se u vezu dovesti struktura i (kinetička) stabilnost svakog od izomera. Na temelju poznavanja mehanističkih i strukturnih parametara racemizacije, moguće je (re)dizajnirati pripremu derivata, dodavanjem ili promjenom raznih supstituenata, te na taj način povećati optičku stabilnost spoja. Međutim, mehanizme racemizacije u većini je slučajeva teško odrediti jer je potrebno detaljno proučiti sve strukture koje sudjeluju u tom procesu, uključujući strukture prijelaznih stanja i svih međuprodukata. Budući da se radi o vrlo nestabilnim specijama, koje je teško detektirati, karakterizirati ili izolirati, nedostatak potpunih informacija ograničava razumijevanje reakcijskog mehanizma. Štoviše, prijelazna stanja, koja su ključna za definiranje reakcijskih puteva, nisu stvarne strukture, već pripadaju u sferu kinetičkih i matematičkih modela. Iz svega navedenog proizlazi da je za proučavanje onih reakcija, koje su teško dostupne zahvatu instrumentalnih metoda, potrebno primijeniti one metode i pristupe koji omogućuju uvjerljiv i kvantitativan prikaz. Jedan takav pristup je svakako računalna kemija koja može biti iznimno korisna upravo pri karakterizaciji ovakvih procesa, jer može dati točne informacije o svim relevantnim molekulama neovisno o njihovoj kinetičkoj ili termodinamskoj nestabilnosti.

U ovom radu kvantno-kemijskim računalnim tehnikama ispitat će se stabilnost, strukturna svojstva i međusobni energijski odnos reaktanata, produkata i međuprodukata, koji sudjeluju u predloženim mehanizmima racemizacije oksazepama. Opsežnim pregledom

literature otkriveno je nekoliko mogućih mehanizama, koji su ili proturječni ili su tek prijedlog temeljen na preliminarnim eksperimentalnim rezultatima. Među važnijim se izmjerenim parametrima nalaze oni kinetički koji omogućuju točnu procjenu za barijeru racemizacije oksazepama, ili, točnije, određivanje slobodne Gibbsove energije aktivacije.

Kvantno-kemijski pristup omogućuje izračun slobodne Gibbsove energije aktivacije za te procese pa se teorijske vrijednostimogu usporediti s eksperimentalno dobivenim podacima iz kinetičkih studija. Pritom se reakcijski mehanizmi, kojima je izračunata Gibbsova energija aktivacije jednaka (ili manja) onoj eksperimentalnoj barijeri, mogu smatrati relevantnima za konačni opis racemizacije oksazepama. Podatci dobiveni teorijskim istraživanjem reakcijskog mehanizma racemizacije oksazepama mogu se primijeniti na strukturno slične benzodiazepine, koji posjeduju kiralne centre, te time odrediti strukturne značajke koje bitno utječu na optičku stabilnost predstavnika ove skupine farmaceutika.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. RAČUNALNA KEMIJA

Računalna kemija je grana kemije koja kemijske strukture i reakcije promatra numerički te primjenom zakona fizike i njihovih aproksimacija (primjerice rješavanjem Schrödingerove jednadžbe s Born-Oppenheimerovom aproksimacijom) daje kao rezultat energiju kao najbitniju informaciju kvantno-kemijskih izračuna (Hok, 2017). Usporedbom razlika u energijama i molekularnim svojstvima između pojedinih struktura može se dobiti uvid u kemijske reakcije ili fenomene bez potrebe za eksperimentalnim ispitivanjem fizikalno-kemijskih svojstava molekula uključenih u iste ili ispitivanja tijekom kemijskih reakcija. Računalna kemija tako može dati uvid u svojstva i energije struktura koje je inače nemoguće izolirati, poput kratkoživućih struktura intermedijera i struktura prijelaznih stanja. Metode računalne kemije mogu se koristiti u samostalnim istraživanjima reakcijskih mehanizama ili kao podrška eksperimentalnim ispitivanjima (Šakić, 2015).

#### 3.2. RAČUNALNE METODE

Računalne metode koje se koriste za kvantno-kemijske izračune kojima se određuje elektronska struktura razlikuju se prema aproksimacijama koje se koriste pri rješavanju Schrödingerove jednadžbe. Aproksimacije je potrebno uvesti jer se Schrödingerova jednadžba može egzaktno riješiti samo za sustave s jednim elektronom. Razlikujemo semi-empirijske, *ab initio* te metode funkcionala gustoće (DFT, *Density functional theory*) (Tandarić, 2016).

Semi-empirijske metode koriste parametre dobivene iz eksperimenata za procjenu promjene geometrije za postizanje što niže energije sustava. U ovoj metodi ne koriste se unutrašnji (nevalentni) elektroni, a loše su opisane i elektronske interakcije. Izračuni su brzi na ovoj metodi, ali točnost same metode ovisi o sličnosti računanog sustava i sustava iz kojeg su uzimani eksperimentalni parametri.

*Ab initio* metode opisuju ponašanje jednog elektrona u polju svih drugih elektrona. Kod ovih se metoda Schrödingerova jednadžba odvaja u mnogo jedno-elektronskih jednadžbi koje se rješavaju zasebno. Upravo zbog toga, ove metode su iznimno precizne i daju konzistentne rezultate, ali su u isto vrijeme i veoma dugotrajne i jako su zahtjevne za računalnim resursima. Povećanjem sustava koji se računa, eksponencijalno se povećavaju

potrebni računalni resursi. Dije se na Hartree-Fock metodu koja zanemaruje elektronsku korelaciju i post-Hartree-Fock metode koje je uzimaju u obzir.

DFT metode temelje se na Kohn-Sham teoremu koji u vezu dovodi energiju osnovnog stanja sustava i elektronsku gustoću molekule. Ona je po svojem iterativnom postupku računa srodna HF-metodama (opisuje ponašanje svakog elektrona u odnosu na elektronsku gustoću sustava), ali s obzirom na to da točan oblik funkcionala koji povezuje gustoću elektrona s energijom nije poznat, uvode se eksperimentalni parametri, te su DFT metode usporedive i sa semi-empirijskima. Popularnost DFT metoda nalazi se u točnosti i konzistentnosti rezultata dobivenih tim metodama, koja je usporediva s *ab initio* metodama, ali s manjim potrebama za računalnim resursima i boljim skaliranjem računalnih resursa s povećanjem sustava koji se računa (Šakić, 2015).

U ovom radu korišten je funkcional B3-LYP iz porodice DFT metoda na 6-31+G(d) baznom skupu. Elektronska gustoća dobiva se iz Kohn-Sham orbitala koje su linearne kombinacije baznih funkcija, a potom se korištenjem funkcionala iz te elektronske gustoće dobiva konačni izračun energije. B3-LYP funkcional jedan je od danas najčešće korištenih DFT funkcionala. B označava Becke funkcional izmjene, LYP korelacijski funkcional kojeg su razvili Lee, Yang i Parr, a 3 označava da je funkcional kombinacija 3 parametra, jer se uz dva već navedena tu nalazi i određeni udio HF (Hartree-Fock) izmjene (Becke, 1988). Bazni skupovi opisuju valnu funkciju konačnim brojem baznih funkcija, pri čemu je opis molekularskih orbitala to kvalitetniji što je broj baznih funkcija veći. Bazni skupovi razlikuju se prema broju primitivnih gaussiana koji opisuju unutrašnje orbitale ili od kojih su sastavljene složene osnovne funkcije za opis valentnih orbitala te prisutnosti polarizacijskih ili difuzijskih funkcija. Bazni skup, 6-31+G(d), korišten u ovom radu ima tako 6 primitivnih gaussiana koji opisuju unutarnje orbitale, dok se valentne orbitale opisuju složenim funkcijama dobivenih kontrakcijom tri (3), odnosno jednog (1) gaussiana. Plus označava postojanje difuzne funkcije, a *d* primjenu *d* polarizacijskih funkcija (Hok, 2017).

### 3.3. RAČUNALNE TEHNIKE

#### 3.3.1. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA

Geometrijska optimizacija vrsta je izračuna koji se koriste u računalnoj kemiji, a kojom se traži struktura energijskog minimuma u blizini početne strukture. Ovaj proces odvija

se na plohi potencijalne energije koja je složena matematička funkcija koja molekulskim strukturama pridružuje odgovarajuće energije, te svaka točka te plohe odgovara drugačijoj strukturi. Minimumi koje ovim optimizacijskim procesom želimo odrediti na toj su plohi točke u „potencijalnoj jami“ u kojima pomak u bilo kojem smjeru znači povišenje energije sustava. Takve strukture su kritične, odnosno stacionarne točke što znači da prva derivacija energije s obzirom na promjenu atomskih koordinata iznosi nula. Lociranje strukture s energijskim minimumom postupak je koji kreće iz strukture promatrane molekule generirane u nekom od programa za vizualiziranje (u ovom radu GaussView) koja se iteracijskim variranjem atomskih položaja u koordinatnom sustavu (u kartezijevom koordinativnom sustavu) dovodi do točke u kojoj se prva derivacija energije spusti ispod određene konvergencijske vrijednosti. Pri svakoj iteraciji računa se energija i gradijent sila. Pozitivna vrijednost gradijenta odgovara porastu, a negativna sniženju energije sustava. Maksimumi su također stacionarne točke. Sedlasta točka prvog reda stacionarna je točka koja predstavlja poveznicu dvaju lokalnih minimuma, odnosno prijelazno stanje. Svaka će uspješna geometrijska optimizacija završiti lokalizacijom stacionarne točke na plohi potencijalne energije, ali ne i njezinom karakterizacijom pa su stoga potrebni dodatni podatci kako bi se moglo odrediti je li određena točka minimum ili prijelazno stanje (Tandarić, 2016).

### 3.3.2. FREKVENCIJSKI RAČUN I INTRINZIČKE REAKCIJSKE KOORDINATE

Frekvencijski račun na odgovarajućoj teorijskoj razini nam je nužan za karakterizaciju stacionarnih točaka dobivenih geometrijskom optimizacijom treba. Tim se postupkom izračunavaju sve frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge (i viših) derivacije energije u odnosu na atomske koordinate. Uz prikaz svih vrsta vibracija u molekuli i atoma koji u njima sudjeluju, frekvencijski račun daje i informaciju je li određena stacionarna točka minimum ili prijelazno stanje. Kod minimuma nema imaginarnih frekvencija (vibracije s negativnim predznakom), dok kod struktura prijelaznog stanja postoji samo jedna imaginarna frekvencija. Ta imaginarna frekvencija označava reakcijsku koordinatu u kojem je ta struktura maksimum. Ako struktura ima više imaginarnih frekvencija, potrebno ju je dodatno optimizirati dok ne dođe do točke minimuma ili prijelaznog stanja.

Za provjeru povezanosti strukture prijelaznog stanja s istraživanim reakcijskim putem, koristi se izračun intrinzičke reakcijske koordinate (IRC). Ishodišna točka IRC računa je dobiveno prijelazno stanje koje se potom slijedeći gradijent najveće promjene energije u oba

reakcijska smjera postupno optimizira do (među)produkata ili reaktanata. Dobivene strukture potrebno je dodatno optimizirati kako bi se mogle odrediti energije kompleksa/konformera reaktanata i produkata kao lokalnih minimuma iz kojeg nastaje prijelazno stanje. Predloženi mehanizam je potvrđen ako su definirani svi koraci i sve strukture (Hok, 2017).

### 3.3.3. IZRAČUN ENERGIJE

Energija koju dobijemo optimizacijom strukture i određivanjem minimuma odgovara ukupnoj elektronskoj energiji molekule, ali su potrebne dodatne korekcije za energiju koja je poveziva s termodinamičkim parametrima. Molekule nisu bez vibracija pri temperaturi od 0 K, već imaju određeno vibracijsko gibanje pa se stoga uvodi energija nulte točke („zero point energy“, ZPE) koja se izražava kao zbroj elektronske energije i energije najnižeg vibracijskog stanja molekule. Energija nulte točke korigira se različitim doprinosima translacijskog, rotacijskog i vibracijskog gibanja molekule koji se izražavaju kao entalpija i entropija. Kod podešavanja parametara izračuna moguće je podesiti temperaturu i tlak, a u ovom će radu to biti na 298 K i 1 atm. Apsolutna Gibbsova slobodna energija, koju smo koristili za određivanje termodinamskih parametara reakcijskih puteva, jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom:

$$G = H - TS.$$

### 3.3.4. SOLVATACIJSKI RAČUNI

U prirodi pa tako i organizmu, većina se reakcija odvija u otopinama. Frekvencijskim računom dobivaju se energije izračunate u vakuumu pa je potrebno solvatacijskim modelima opisati interakcije otapala i ispitivanih struktura. Otapalo može utjecati na energiju i geometriju struktura, te je ključno odabrati dobar solvatacijski model za što točniji opis kemijskog sustava. Otapalo, promjenom energija i geometrija struktura, utječu na mehanizam reakcije, dok pojedine molekule otapala mogu biti katalizatori pojedinih reakcijskih puteva.

Solvatacijski se efekti mogu opisati implicitnom solvatacijom, gdje se utjecaj otapala opisuje djelovanjem dielektričnog polja otapala na promatranu strukturu ili eksplicitnom solvatacijom, gdje se modeliraju molekule otapala u interakciji sa solvatiranom strukturom. Kombinacijom tih dvaju pristupa, takozvanim supramolekulskim pristupom, proučava se i

učinak pojedinačnih molekula otapala u prvoj solvatacijskoj ljusci i učinak dielektričnog polja otapala. Implicitna solvatacija koristi model polarizabilnog kontinuuma. To podrazumijeva da se solvatacija odvija na način da prvo nastaje solvatacijska šupljina u polarizabilnom kontinuumu, nakon čega molekula ulazi u tu šupljinu, a kontinuum oko nje se relaksira. Iz interakcije solvatacijske šupljine i molekule dobiva se Gibbsova slobodna energija solvatacije koja utječe na promjenu energijskog gradijenta kod geometrijske optimizacije. Eksplicitna solvatacija podrazumijeva što točniji opis prve solvatacijske ljuske u kojoj su molekule otapala intermolekulskim vezama vezane na ispitivanu molekulu čime joj ograničavaju slobodu kretanja, a time i reaktivnost. Takvo određivanje posebno je komplicirano kad je otapalo mala molekula (kao npr. voda), zbog čega je teško odrediti optimalan broj, položaj i međusobne interakcije molekula otapala smještenih u prvoj solvatacijskoj ljusci. U ovom radu korišten je supramolekularni pristup, zbog značajnog utjecaja vode u prvoj solvatacijskoj ljusci na mehanizam reakcija (Šakić, 2015).

### 3.4. KORIŠTENE RAČUNALNE METODE I TEHNIKE

Geometrijske optimizacije, frekvencijski i solvatacijski računi provedeni su uporabom programskog paketa Gaussian09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009). Vizualizacija dobivenih rezultata provedena je pomoću programa GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.). Za provedbu računa korišten je klaster Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu ([www.srce.hr](http://www.srce.hr)). DFT funkcional B3-LYP korišten je za optimizaciju geometrija, dok je za opis orbitala korišten bazni skup 6-31+G(d). Kompleksi reaktanata, produkata i prijelaznih stanja optimizirani su dodavanjem do dvije eksplisitne molekule vode za opis prve solvatacijske ljuske. Eksplicitne vode dodavane su u programu GaussView, a različite konfiguracije molekula otapala oko zadane strukture su dobivene korištenjem modificirane verzije stohastičke metode (<http://andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html>; Saunders, 2004). Modeliranje implicitne solvatacije izrađeno je korištenjem SMD modela na B3-LYP/6-31+G(d) razini.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

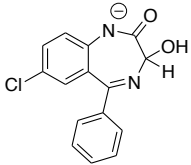
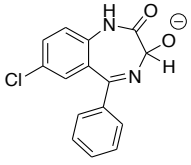
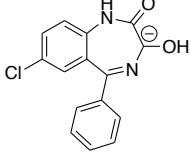
Gibbsova slobodna energija aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ) za proces racemizacije u oksazepamu je određena eksperimentalno. U nekoliko kinetičkih studija konstanta brzine reakcije  $k$  je izmjerena te vrijednost varira od  $0.16 \text{ min}^{-1}$  ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7) (Yang i Lu, 1992) do  $0.02 \text{ min}^{-1}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Schoetz i sur. 2000) [ostale mjerene vrijednosti za  $k$  su:  $0.014 \text{ min}^{-1}$  ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,  $\Delta G^\ddagger = 90.6$ )] (Aso i sur. 1988). Prema Eyringovoj jednadžbi, ove vrijednosti odgovaraju barijeri slobodne energije u rasponu  $87 - 91 \text{ kJ/mol}$ . Pretpostavka je da svi procesi čija je aktivacijska barijera manja ili slična eksperimentalnoj barijeri ( $\Delta G^\ddagger \leq 91 \text{ kJ/mol}$ ) mogu doprinijeti izmjerenoj konstanti brzine reakcije. U potrazi za svim mogućim reakcijskim putevima koji odgovaraju racemizaciji oksazepama, korišteni su kvantno-kemijske modeli za izračun geometrija i energija za međuprodukte i strukture prijelaznih stanja. Sve one reakcije, za koje izračunata barijera ( $\Delta G^\ddagger$ ) prelazi granicu određenu eksperimentom, nisu relevantne za mehanistički opis racemizacije oksazepama.

### 4.1. MOGUĆI MEHANIZMI RACEMIZACIJE

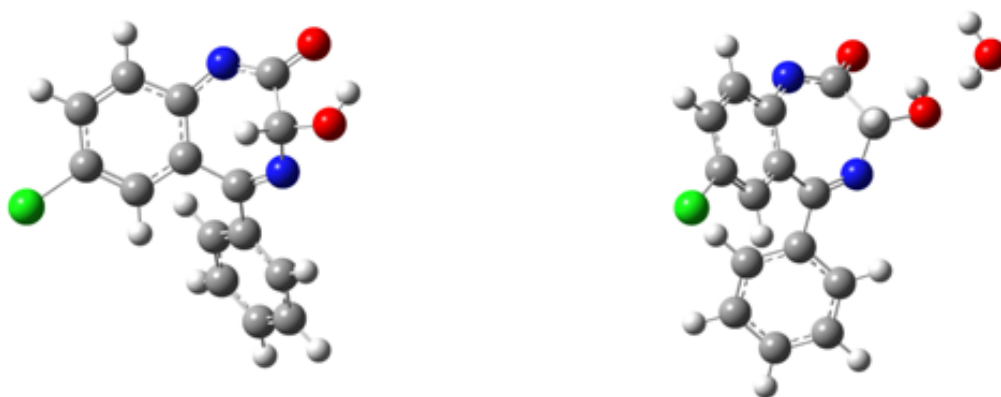
#### 4.1.1. PROCES C3-H/H IZMJENE

Deprotonacija C3-H atoma i reprotonacija nastalog C3-karbaniona je najjednostavnija reakcija ( $S_E1$  mehanizam) kojom bi se mogao opisati mehanizam racemizacije oksazepama. U nekim je radovima, C3-H položaj predložen kao moguće mjesto deprotonacije (Yang i Bao, 1994), ali amidna (N1-H) i hidroksilna (C3-OH) skupina također su predložene kao moguća mjesta deprotonacije (Yang i Lu, 1992; Popović i sur., 2003; Lam i Carlier, 2005). Ako je C3-H/H izmjena operativan proces, očekuje se da C3-H pozicija bude ona najkiselija. Za određivanje strukture koja odgovara deprotoniranom obliku oksazepama, tj. za procjenu najvjerojatnijeg mjesta deprotonacije, korišteni su kvantno-kemijski izračuni.

**Tablica 1.** Relativne Gibbsove slobodne energije ( $\Delta G_{298}$ ) za tri aniona oksazepama izračunata na B3LYP/6-31+G(d) razini.

Anion oksazepama	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)			
	Plinska faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ )		
		$n^a$		
	0	1		$\Delta pK_a^b$
	0.0	0.0	0.0	0.0
	115.0	47.8	24.0	4.2
	39.7	70.4	70.8	12.4

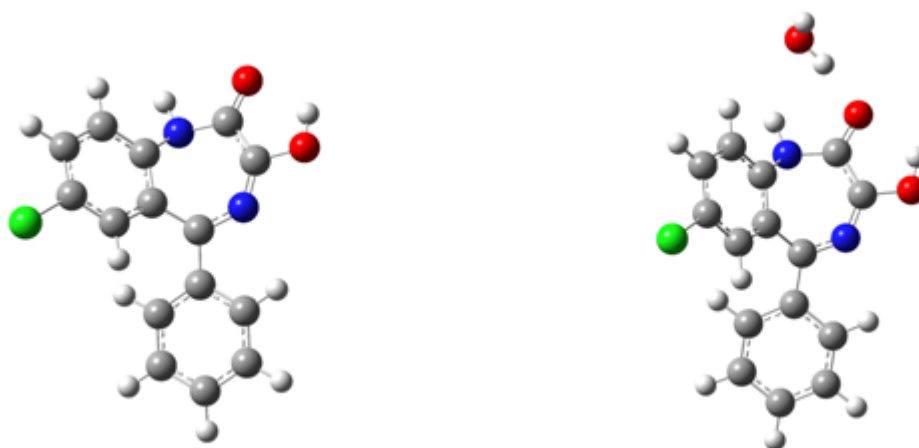
<sup>a</sup> Broj eksplicitnih molekula voda ( $n = 0 - 1$ ) korištenih u SCRF=SMD solvacijskim modelima. <sup>b</sup> Relativna kiselost (u kurzivu, izračunato za  $n = 1$ ) se može predvidjeti usporedbom relativne stabilnosti aniona dobivenih nakon deprotonacije različitih kiselih grupa. Stabilniji anion će biti dobiven deprotonacijom jače kiseline (kiselijeg mjesta deprotonacije).



**Slika 5.** Strukturni prikaz N1-aniona oksazepama bez eksplicitne vode (lijevo) i s jednom eksplicitnom vodom (desno).

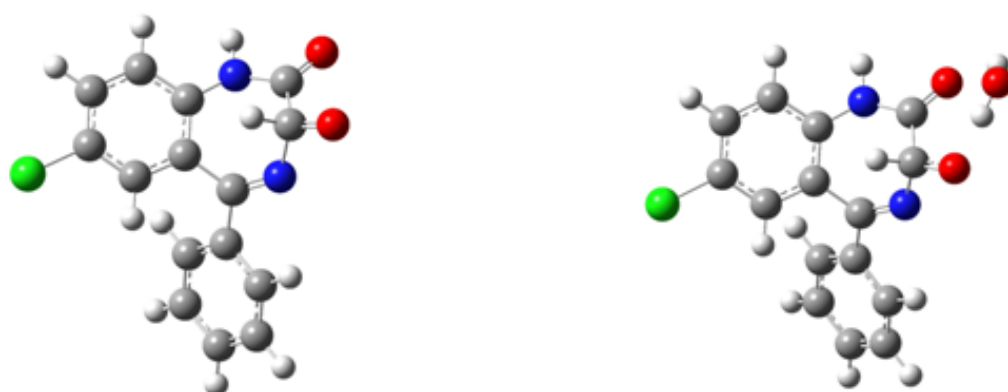
Molekula oksazepama ima tri moguća položaja deprotonacije: na N1-, C3-O, te C3-atomu. Tri odgovarajuće strukture aniona (tj. konjugiranih baza) su optimizirane u plinskoj fazi, u implicitnom otapalu (vodi), te u supramolekulskom modelu koji uključuje jednu eksplicitnu molekulu vode. U svakom slučaju, anion, koji je nastao deprotonacijom na N1-H položaju (Slika 5.), je onaj najstabilniji (Tablica 1). To odgovara nedavno objavljenoj studiji o proteolitičkoj ravnoteži oksazepama (Popović i sur., 2003). Tvrdnju da je N1-H položaj najkiseliji, autoritemelje na analizi odgovarajućih  $^{13}\text{C}$  NMR spektara. Veća kiselost N1-H, u usporedbi s C3-OH ili C3-H položajima, može se objasniti rezonantnom stabilizacijom rezultirajućeg N1-aniona. Prema tome, proizlazi da konstanta kiselosti ( $\text{p}K_{\text{a}2} = 11.6$ ) (Barrett i sur., 1973) oksazepama odgovara deprotonaciji N1-H skupine.





**Slika 6.** Strukturni prikaz C3-aniona oksazepama bez eksplicitne vode (lijevo) i s jednom eksplicitnom vodom (desno).

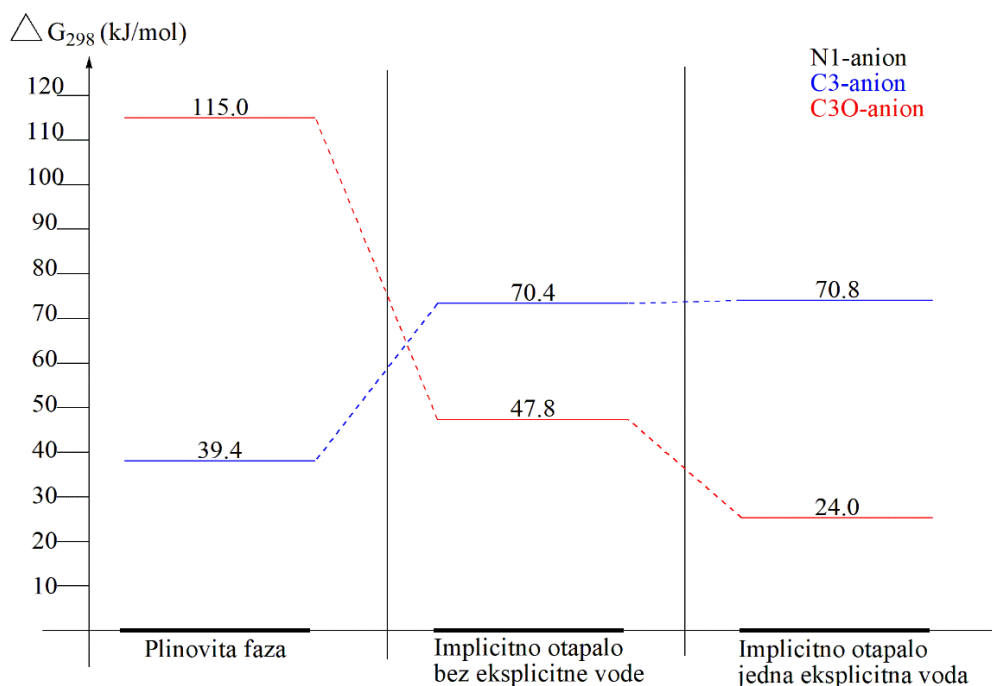
Prema teorijskim proračunima C3-karbanion (Slika 6.) je najmanje stabilna specija (Tablica 1), što znači da je C3-H proton značajno manje kiseo od N1-H (ili C3-OH). Relativna razlika u kiselosti dva protona (N1-H i C3-H)  $\Delta pK_a = 12.4$  (za  $n = 1$ ). To odgovara eksperimentalnim rezultatima zabrzinu H/D izmjene na C3 kiralnom centru (Štromar i sur., 1974). Autori tvrde da u oksazepamu nije primijećena C3-H izmjena (deuteracija), tj. da nije primijećena deprotonacija C3-H skupine.



**Slika 7.** Strukturni prikaz O-aniona oksazepama bez eksplicitne vode (lijevo) i s jednom eksplicitnom vodom (desno).

S obzirom na dobivene rezultate, voda dodana kao implicitno otapalo ili kao eksplicitna molekula, značajno utječe na promjenu slobodne Gibbsove energije. Budući da je

N1-anion najstabilniji, on je uzet kao relativna 0 s kojom su uspoređivani ostali anioni. Na niže navedenom prikazu (slika 8.) vidi se kako je u plinovitoj fazi C3-anion značajno stabilniji od C3O-aniona (Slika 7.). No, već smještanjem struktura u implicitno otapalo, a pogotovo dodatkom jedne eksplicitne vode se situacija mijenja – C3O-anion postaje stabilniji.

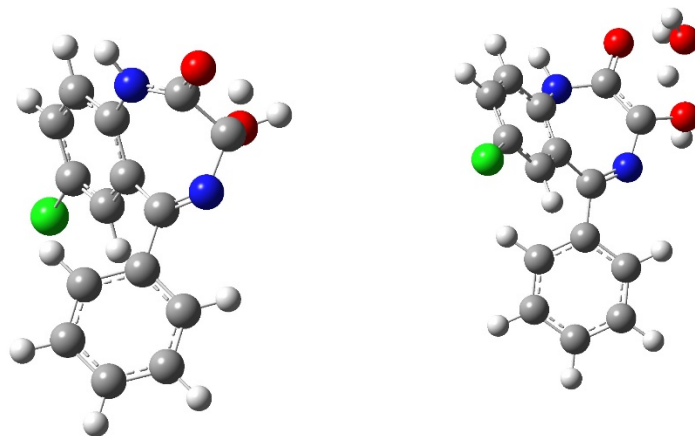


**Slika 8.** Prikaz utjecaja vode na relativnu stabilnost anionskih specija oksazepama

Zaključak je kako kvantno-kemijski izračuni podržavaju odabrane eksperimentalne rezultate (Šunjić i sur. 1979; Popović i sur., 2003) te stoga rješavaju prijašnje kontroverze o mjestu deprotonacije oksazepama. Nadalje, računalni rezultati u kombinaciji s eksperimentalnima isključuju C3-H/H izmjenu kao mogući mehanizam koji pridonosi optičkoj nestabilnosti oksazepama.

#### 4.1.2.. KETO-ENOLNA TAUTOMERIZACIJA

Keto-enolna preraspodjela oksazepama je blisko povezana s ranije opisanim procesom C3-H/H izmjene. Ova ravnoteža tautomerizacije uključuje intramolekularni prijenos protona s C3-ugljika na C2=O kisik, te je ovisan o kiselosti C3-H skupine. Prema nekim literaturnim podacima te našim računalnim rezultatima (vidi iznad), C3-H položaj nije primarno mjesto deprotonacije u oksazepamu, što smanjuje zastupljenost ovakvog tipa tautomerizacije.



**Slika 9.** Struktura prijelaznog stanja za keto-enolnu tautomeriju u oksazepamu (B3LYP/6-31+G(d) razina) bez eksplicitnih voda (lijevo) i s jednom molekulom vode (desno).

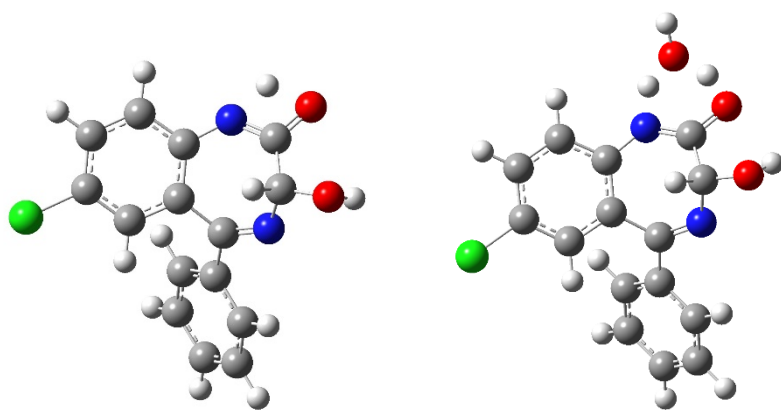
U ovom dijelu, predstavljamo dodatne kinetičke argumente koji potvrđuju kako mehanizam racemizacije oksazepama nije keto-enolna tautomerija zbog svojih visokih energetske barijere. Locirali smo prijelazno stanje (slika 9.) za enolizaciju u oksazepamu u kojoj jedna eksplicitna molekula vode pomažu intramolekularni prijenos protona s C3-H na C2=O položaj. Veoma je čest slučaj da eksplicitne molekule vode pomažu u prijenosu protona, pogotovo kod keto-enolne tautomerizacije. Uključivanje molekule vode u izračune nužno je kako bi se ispravno opisao proces enolizacije i dobila što točnija vrijednost energetske barijere ovog procesa (Yamabe i sur., 2004 i Duarte i Toro-Labbé, 2004).

U slučaju enolizacije u oksazepamu, slobodne energije aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ), tj. izračunate razlike energija između strukture lociranog prijelaznog stanja i reaktanta, je bila 339,08 kJ/mol. Ako se uključi jedna eksplicitna molekula vode, izračunata barijera se spušta na 253,42 kJ/mol. Vrijednost slobodne energije aktivacije za proces enolizacije gotovo je 3 puta viša od eksperimentalno utvrđene barijere racemizacije iz čega proizlazi kako nije moguće da oksazepam racemizira keto-enolnom tautomerijom. Enolni oblik benzodiazepinskog sustava je jako nestabilan u usporedbi s ostalim tautomernim oblicima (Pem i Vrčec, 2017). U slučaju oksazepama nisu nađeni eksperimentalni dokazi o njegovom postojanju (Maupas i Fleury, 1982 i Achour i sur., 1994)

Enolizacija je uobičajeno katalizirana u baznom mediju, tj. konstanta brzine reakcije se može povećati povećanjem pH vrijednosti. No, u slučaju oksazepama, nikakva promjena brzine reakcije racemizacije nije primjećena u rasponu pH od 2 do 10 (Yang i Lu, 1992 i Aso i sur., 1988). Neslaganje tih dviju činjenica dodatna je potvrda kako enolizacija nije mehanizam raemizacije oksazepama. Zbog niske kiselosti C3-H skupine, visoke energetske barijere za prijenos protona te vrlo nestabilnog enolnog međuprodukta, termodinamički i kinetički nije vjerojatno da se racemizacija oksazepama odvija procesom enolizacije.

#### 4.1.3.. KETO-IMINOLNA TAUTOMERIZACIJA

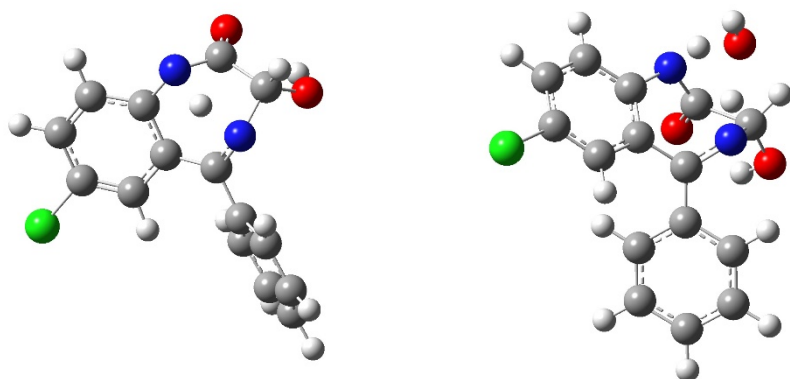
Osim keto-enolne tautomerije, u oksazepamu se događaju još dvije tautomerizacije koje za razliku od keto-enolne samostalno neće dovesti do racemizacije, ali se iz nastalih tautomera određenim mehanizmima koji će biti objašnjeni u idućem poglavlju o solvolitičkim reakcijama može dogoditi promjena konfiguracije. Prva takva tautomerija je keto-iminolna tautomerija koja se u oksazepamu odvija na laktamskom dijelu prstena. Kod keto-iminolne tautomerije događa se intramolekulski prijenos protona sa N1 atoma na kisik u C2=O skupini (Slika 10.) pri čemu se elektroni premještaju u dvostruku vezu između N1=C2. Iako su, kao i enolne forme, iminolne forme također manje stabilne od keto forme, iminoli su u većini slučajeva kod 1,4-benzodiazepin-2-ona pa tako i oksazepama stabilniji od enola, što znači da je njihov ukupni udio u ravnoteži veći. Većina reakcija poput alkilacija, aminacija ili halogenacija na ovakvim se benzodiazepinima odvijaju na N1-atomu što se može objasniti većom nukleofilnosti, a time i reaktivnosti iminolne specije, unatoč njenoj manjoj stabilnosti u odnosu na keto-formu (Pem i Vrček, 2017). Sukladno navedenome, slobodne energije aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ) za iminolizaciju dobivene kvantno kemijskim izračunima, niže su od onih za enolizaciju. Bez eksplicitnih voda barijera iznosi 200,75 kJ/mol, a kad je proces potpomognut jednom eksplicitnom molekulom vode, barijera se snižava na 113,17 kJ/mol što je znatno bliže eksperimentalno dobivenoj vrijednosti, ali i dalje previsoko, pogotovo uzmemo li u obzir da su potrebni i daljnji koraci kako bi došlo do racemizacije.



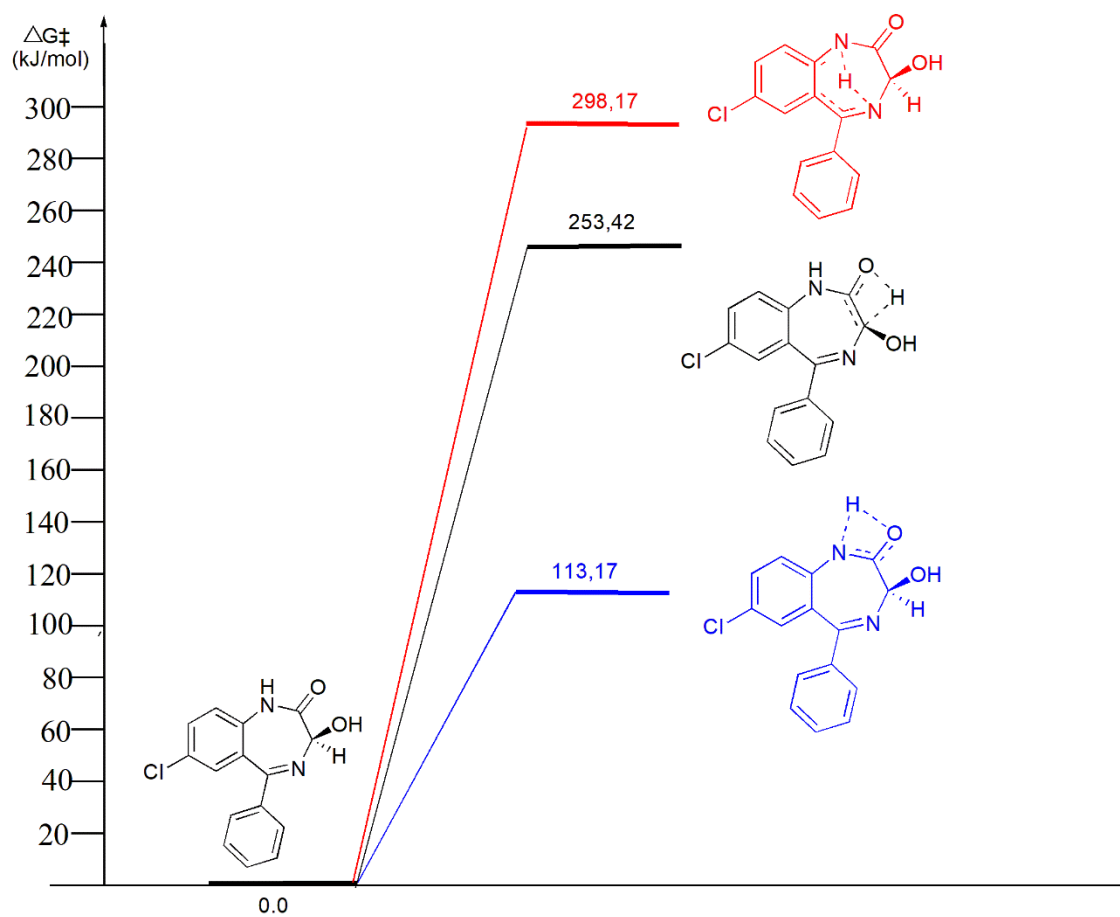
**Slika 10.** Struktura prijelaznog stanja za keto-iminolnu tautomeriju u oksazepamu (B3LYP/6-31+G(d) razina) bez eksplicitnih voda (lijevo) i s jednom molekulom vode (desno).

#### 4.1.4. N1-N4 TAUTOMERIZACIJA

Druga tautomerizacija koja je moguća u oksazepamu, a nije samostalno odgovorna za racemizaciju je intramolekulska prototropna tautomerizacija koja uključuje prijenos protona s najkiselijeg N1-atoma koji će svoj proton najlakše otpustiti na najbazičniji atom u oksazepamu koji će taj proton najlakše primiti, a to je N4 (Slika 11.). Ovaj tip tautomerizacije prema dobivenim kvantno-kemijskim izračunima energetski je „najskuplji“ proces. Bez dodatka eksplicitnih voda barijera za ovaj proces iznosi 300,11 kJ/mol, a uz dodatak jedne eksplicitne vode koja sudjeluje u prijenosu protona, barijera se gotovo uopće ne snižava i iznosi 298,17 kJ/mol. S obzirom na to da je ova barijera i više nego trostruko veća od eksperimentalno postavljene granice, može se sa sigurnošću reći kako ovaj tip tautomerizacije nije zaslužan za racemizaciju oksazepama.



**Slika 11.** Struktura prijelaznog stanja za N1-N4 tautomerizaciju u oksazepamu (B3LYP/6-31+G(d) razina) bez eksplicitnih voda (lijevo) i s jednom molekulom vode (desno).

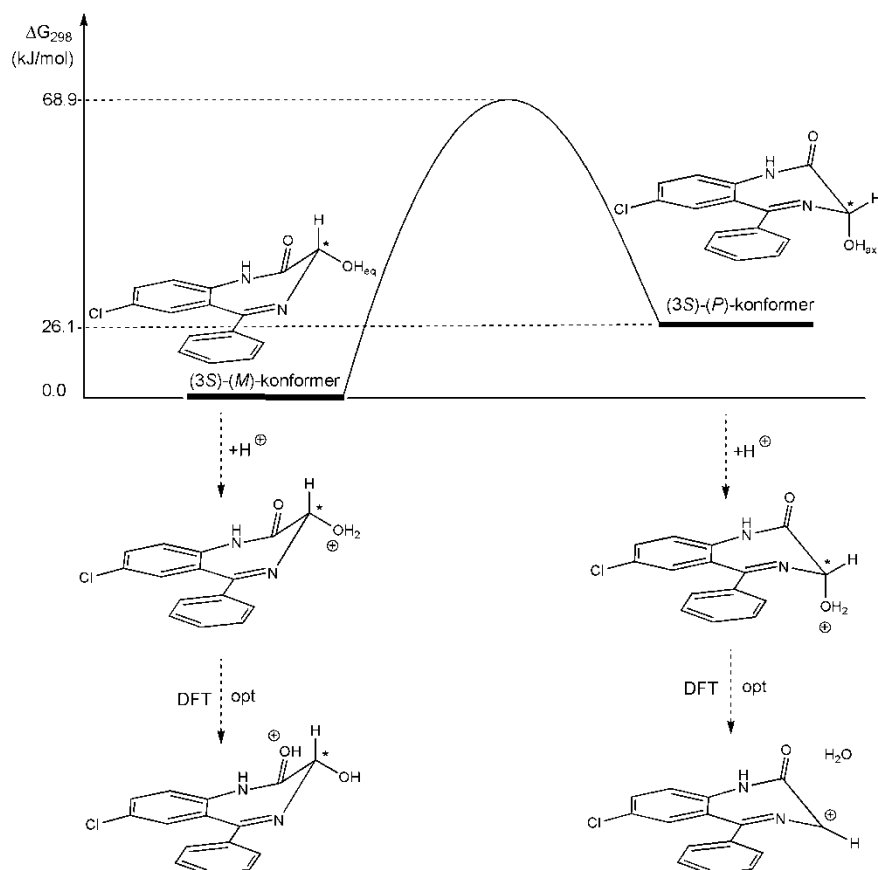


**Slika 12.** Usporedba vrijednosti slobodnih energija aktivacije za keto-enolnu, keto-iminolnu i N1-N4 tautomerizaciju izračunatih na teorijskoj razini B3LYP/6-31+G(d).

#### 4.1.5. SOLVOLITSKE REAKCIJE

U kiselom je vodenom mediju moguće protoniranje C3-OH skupine oksazepama, koju slijedi eliminacija vode. Nastali karbokation smješten na C3-poziciji podliježe reverzibilnu hidraciju koja dovodi do racemizacije u oksazepamu. Zato su neki autori predložili ovaj mehanizam kao objašnjenje primjećene interkonverzije konfiguracije na stereogenom C3-ugljiku u oksazepamu (Trapp i sur. 2002).

Kiselo-katalizirane reakcije oksazepama su uistinu relevantne u fiziološkim uvjetima. Primjerice, kiselo-katalizirana etanoliza oksazepama u kiselom mediju želuca je prikazana kao proces s bitnim farmakološkim i stereogenim uvjetima (Yang i Yang, 1995). U ovom dijelu rada, promatramo mehanizam solvolitičke reakcije koja vjerojatno pomaže stereokemijsku nestabilnost oksazepama.



**Slika 13.** Energijski profil (gore) za interkonverziju između *S,M*- i *S,P*-atropizomera oksazepama izračunati na B3LYP razini. Dodatak  $H^+$  na svaki od dva konformera je napravljen ručno; protonirane geometrije su konvergirale prema prikazanim strukturama tijekom geometrijske optimizacije na DFT razini.

Kao što je ranije spomenuto, u kiselom mediju reakcija počinje protoniranjem hidroksilne skupine na C3 atomu. Prilikom traženja protoniranih formi, nije pronađena stabilna struktura sa C3–OH<sub>2</sub><sup>+</sup> skupinom. Ukoliko se protonira stabilniji M-atropizomer (C3-OH skupina u pseudoekvatorijalnom položaju), jedan proton iz C3-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> skupine tijekom geometrijske optimizacije strukture prelazi na karbonilnu skupinu susjednog C2 atoma (shema 2). Do ovakvog prijelaza protona dolazi zbog činjenice da je karbonilna skupina na C2 atomu bazičnija od hidroksilne skupine na C3. Unatoč tome, prema eksperimentalnim podacima vidi se kako nije primijećena protonacija karbonilne skupine (Barrett i sur., 1973).

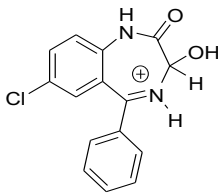
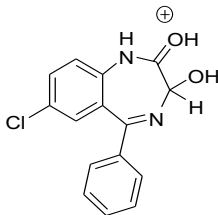
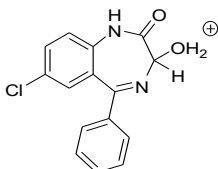
Ako se protoniranje C3-OH skupine dogodi na manje stabilnom P-atropizomeru, tijekom geometrijske optimizacije dogodit će se spontana eliminacija molekule vode. To prikazuje proces bez barijere kojim se formira karbokation na C3 atomu (shema 2). Moguće je da će nastali karbokation ponovno reagirati s vodom pri čemu se događa enantiomerizacija C3 kiralnog centra.

Da bi se dogodila ova reakcija, oksazepam mora egzistirati u nestabilnijoj P-konformaciji. Izračunata barijera međusobnog prelaska jednog atropizomera u drugi je 68.9 kJ/mol, što je unutar limita energetske barijere ( $\Delta G^\ddagger \leq 91$  kJ/mol) koja je izračunata eksperimentalno. Slične energetske barijere ovog procesa izmjerene su (73 – 89 kJ/mol) i izračunate (70 – 90 kJ/mol) kod brojnih 1,4-benzodiazepina (Lam i Carlier, 2005). Iz priloženih izračunatih kinetičkih podataka, kiselo kataliziranu reakciju nije moguće isključiti kao mogući mehanizam reakcije racemizacije.

Međutim, eksperimentalno utvrđeni pH profil racemizacije oksazepama nalaže kako nije primijećena promjene brzine racemizacije u pH području 2-10 (Aso i sur. 1988; Šunjić i sur., 1979). Ta činjenica postavlja opravdane sumnje prema protonaciji oksazepama kao mehanizmu racemizacije.



**Tablica 2.** Relativne slobodne energije ( $\Delta G_{298}$ ) protoniranih formi oksazepama izračunate na B3LYP/6-31+G(d) razini.

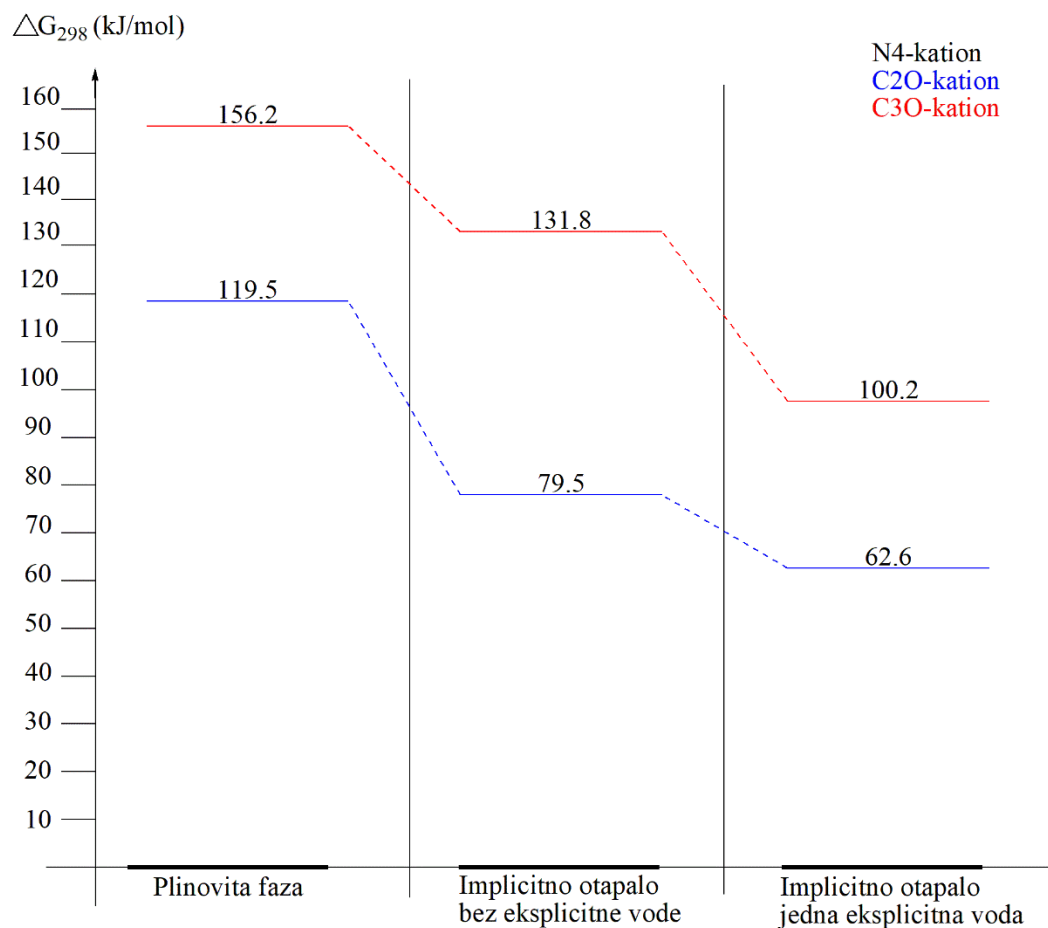
Kation oksazepama	$\Delta G_{298}$ (kJ/mol)		
	Plinovita faza	Voda ( $\epsilon = 78.3553$ )	
		$n^a$	
	0	1	
	0.0	0.0	0.0
	119.5	79.5	62.6
	156.2	131.8 <sup>b</sup>	100.2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Broj eksplicitnih molekula vode ( $n = 0 - 1$ ) korišten u SCRF=SMD solvatacijskom modelu izračuna. <sup>b</sup>Izvedena je parcijalna optimizacija geometrije (C3-O veza fiksirana) kako bi se izbjegla spontana eliminacija vode.

Dodatni dokaz koji negira ovu reakciju kao kandidata za mehanizam racemizacije oksazepama dolazi iz računalne analize potencijalnih mjesta protonacije u ovom 1,4-benzodiazepinu. Molekula oksazepama može se protonirati na C2=O, C3-OH i N4 pozicijama. Kako bi se usporedile njihove relativne bazičnosti izračunate su relativne stabilnosti (Tablica 2.) njihovih protoniranih formi, odnosno njihovih konjugiranih kiselina. Iz dobivenih rezultata vidi se kako je preferirano mjesto protonacije C5=N4, s obzirom na to da je nastali karbokation lociran na C5 atomu najstabilnija struktura. Suprotno od toga,

protoniranjem C3-OH skupine dobiva se najmanje stabilna protonirana specija koja je 127.5 kJ/mol ( $n=4$ ) nestabilnija od N4-protonirane forme. Stoga, može se zaključiti kako reakcija koja započinje protonacijom C3-OH skupine nije mogući mehanizam racemizacije oksazepama.

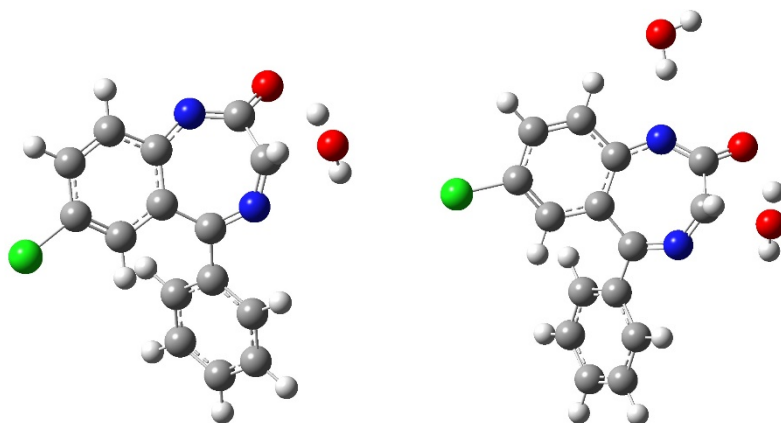
Ako u ovom slučaju promatramo utjecaj vode kao implicitnog otapala te eksplicitno dodane molekule, također se vide njeni utjecaji. Značajno smanjuje slobodne Gibbs-ove energije i na taj način stabilizira katione. Oba kationa u implicitnom otapalu i s jednom eksplicitnom vodom postaju za 56 kJ/mol stabilniji nego u plinovitoj fazi (Slika 14.).



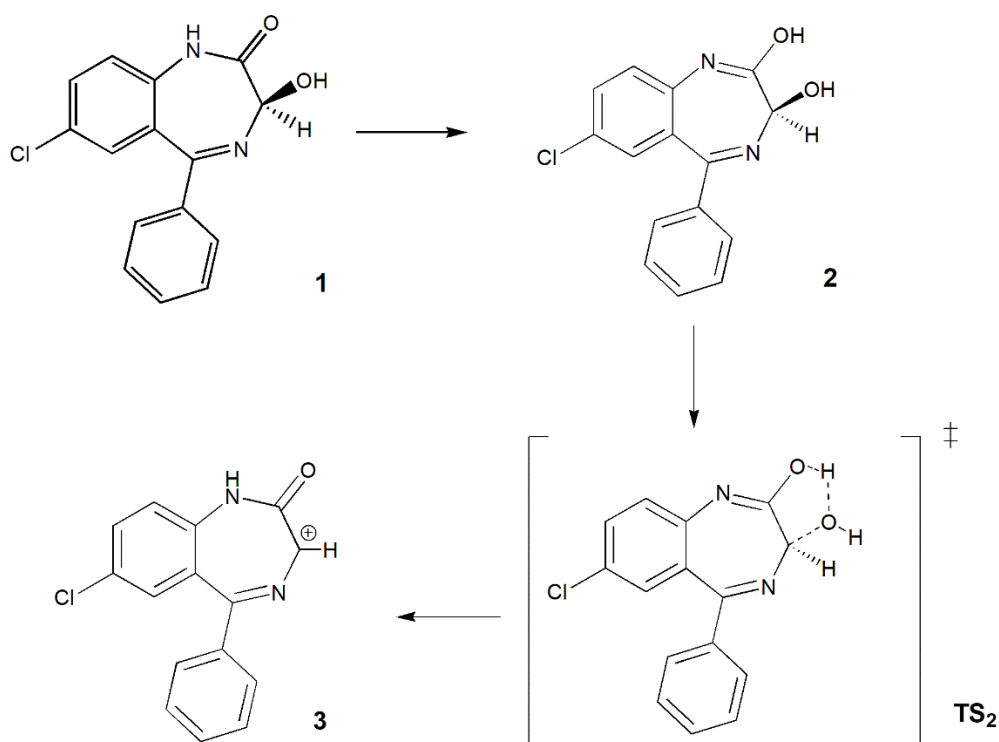
**Slika 14.** Prikaz utjecaja vode na stabilnost kationskih specija oksazepama

Drugi mehanizam koji bi mogao dovesti do protoniranja C3-OH skupine i posljedično eliminacije vode kreće iz ranije opisane iminolne forme. Ideja za takav mehanizam proizlazi

iz činjenice da bi hidroksilna skupina iminola mogla predati svoj proton drugim atomima u oksazepamu. Tijekom ovakvog procesa prijenos protona događa se s C2-OH skupine nastale u procesu keto-iminolne tautomerizacije na C3-OH u manje stabilnom P-izomeru nakon čega kako je i ranije opisano dolazi do eliminacije vode, a ponovna hidratacija nastalog karbokationa rezultira nastankom racemične smjese (Slika 16.). Međutim, slobodne energije aktivacije za ovaj proces izračunate kvantno-kemijski su 156.83 kJ/mol za proces s 0 voda i 173.10 kJ/mol za proces s jednom vodom, koja u ovom slučaju ne sudjeluje u prijenosu protona već je smještena u blizini N1 atoma i vodikovim vezama se povezuje s molekulom te djeluje kao solvator, odnosno isključivo pomaže točniji opis prve solvacijske ljuske (Slika 15.). I u ovom je slučaju energetska barijera znatno viša od eksperimentalno postavljene te ga možemo eliminirati kao mehanizam racemizacije.

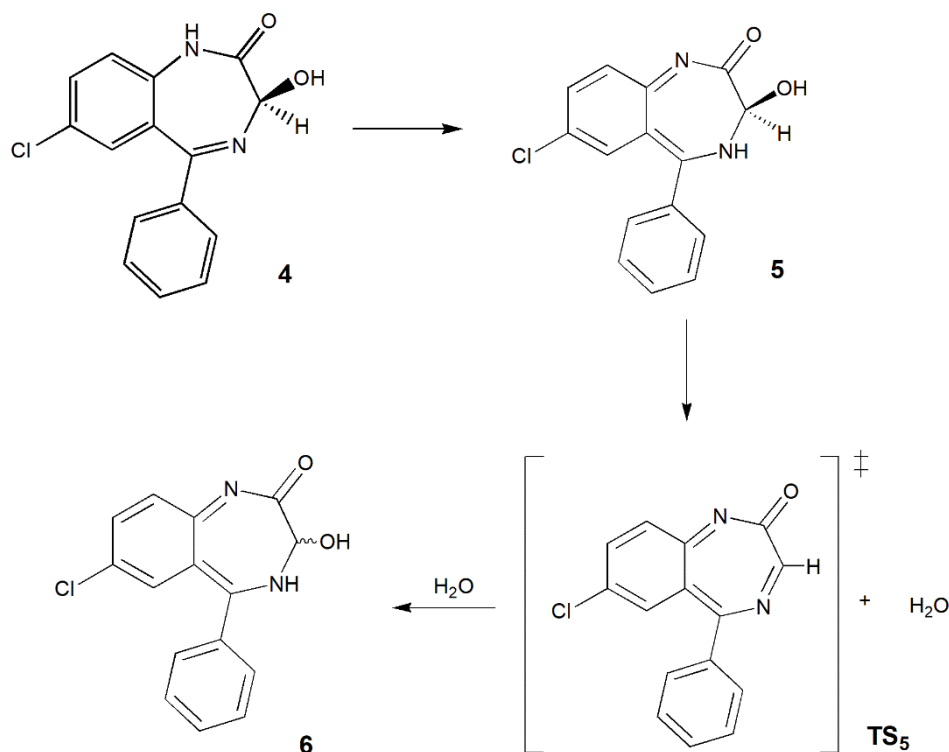


**Slika 15.** Struktura prijelaznog stanja za prijenos protona s C2-OH skupine na C3-OH i eliminacija vode: lijevo bez eksplicitno dodanih voda, desno s jednom eksplicitnom vodom (solvatorom) na N1 atomu (izračunato na B3LYP/6-31+G(d) razini).



**Slika 16.** Mehanizam nastanka karbokationa eliminacijom vode nakon prijenosa protona s C2-OH na C3-OH u iminolnoj formi oksazepama.

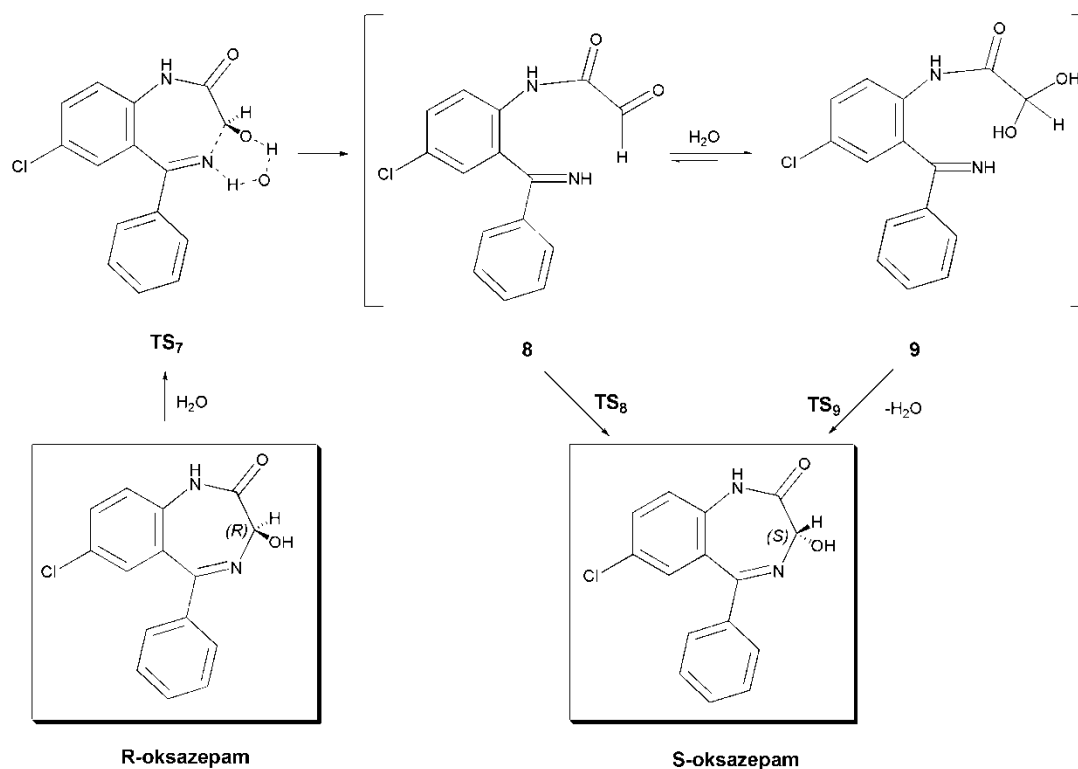
Osim dviju već navedenih solvolitskih reakcija, kao jedan od alternativnih mehanizama racemizacije predložena je i treća reakcija koja kreće iz produkta N4-tautomerizacije (vidi prethodno poglavlje). Kod te reakcije pretpostavka je da nakon protoniranja najbazičnijeg atoma u oksazepamu dolazi do eliminacije vode i nastanka dvostruke veze između C3 i N4 atoma, a ponovnom adicijom vode na nastalu dvostruku vezu dolazi do racemizacije (Slika 17.). Ovaj mehanizam nije u ovom radu detaljno ispitan kvantno-kemijskim računima zbog činjenice da je nastajanje N4-tautomera, kako je objašnjeno u prethodnom poglavlju, energetski puno „skuplji“ proces od eksperimentalno potvrđene barijere racemizacije oksazepama i zbog toga je ovakav mehanizam moguće automatski eliminirati kao proces kojim dolazi do racemizacije.



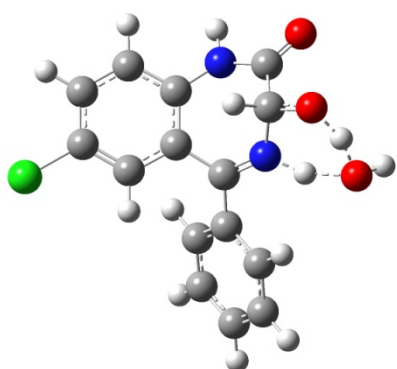
**Slika 17.** Mehanizam racemizacije dehidratacijom N4-tautomera oksazepama.

#### 4.1.6. PRSTEN-LANAC TAUTOMERIZACIJA

Reverzibilno otvaranje benzodiazepinskog prstena (Slika 18.) također je predloženo kao jedan od mogućih procesa odgovornih za stereoizomerizaciju asimetričnog C3 položaja u oksazepamu (Testa i sur., 2016; Štromar i sur., 1974; Šunjić i sur., 1979), ali nema pokušaja određivanja detalja mehanizma ovog procesa. Naši računalni rezultati dobiveni prilikom ispitivanja ovog procesa bez vode i s jednom vodom pokazuju kako je ova reakcija inicirana intramolekulskim prijenosom protona s C3-OH na N4-atom (imin). Struktura prijelaznog stanja (slika 18.) okarakterizirana je jednom imaginarnom frekvencijom ( $-1159\text{ cm}^{-1}$ ), koja odgovara vodom-potpomognutom prijenosu protona povezanom s kidanjem veze N4-C3. IRC izračun dokazuje kako je prijelazno stanje prikazano na slici 19. poveznica početne strukture oksazepama i forme otvorenog aldehida koji je produkt reakcije. Analogni intramolekularni prijenos protona s najkiselijeg N1-H na N4 atom skuplji je proces (Slika 12.) te rezultira tautomerom koji nije sklon cijepanju N4-C3 veze (vidi 4.1.5.).



**Slika 18.** Reverzibilno otvaranje benzodiazepinskog prstena. Zbog pojednostavljenja, samo je jedna eksplicitna voda uključena kroz proces.



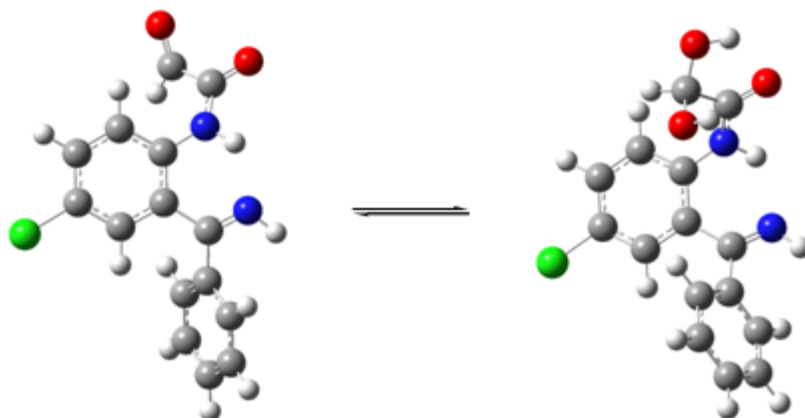
**Slika 19.** Struktura prijelaznog stanja za vodom-potpomognuti intramolekularni prijenos protona povezan s cijepanjem N4-C3 veze izračunat na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.

Korak koji određuje brzinu reakcije je prijenos protona sa hidroksilne skupine na C3 na N4 atom, a izračunata energetska barijera ( $\Delta G^\ddagger = 82.8$  kJ/mol) u skladu je s eksperimentalnom vrijednosti od 91 kJ/mol. Mehanizam pucanja prstena je ispitivan sa i bez

pomoći eksplicitne vode. No, barijera je bez pomoći vode previsoka ( $\Delta G^\ddagger = 137.8$  kJ/mol), odnosno, prelazi eksperimentalno postavljenu barijeru.

Od četiriju ispitanih mehanizama koji su predloženi u literaturi, otvaranje benzodiazepinskog prstena jedini je proces koji se uklapa u graničnu vrijednost barijere koja je eksperimentalno postavljena.

Akiralni intermedijer otvorenog aldehida egzistira u brzom ravnoteži s hidratnom formom (slika 20.), koja je prema izračunima stabilnija za 17.1 kJ/mol. Ta se ravnoteža odvija bez kinetičke barijere (Guthrie i Pitchko, 2000). Povratna reakcija, odnosno zatvaranje benzodiazepinskog prstena, može se događati simultano sa dehidracijom hidratne forme ili intramolekularnom adicijom imina N4 na karbonilnu skupinu (C3=O) u aldehidu. Energija adicije N4 na C3=O uz posredovanje jedne molekule vode, u odnosu na aldehidni međuprodukt, iznosi  $\Delta G^\ddagger = 25.3$  kJ/mol, dok je dehidracija hidrata spontani proces u vodenom mediju, iz čega se vidi kako je zatvaranje prstena brža reakcija od otvaranja prstena.



**Slika 20.** Ravnotežna reakcija izmjene aldehidne (lijevo) i hidratne (desno) forme oksazepama otvorenog prstena.

Sukladno rezultatima dobivenim računalnom analizom, tvrdimo kako enantiomerizacija oksazepama u vodi (pH=2-10) slijedi mehanizam ring-chain tautomerizma. Niti jedan drugi mehanizam predložen ranije u literaturi ne odgovara eksperimentalno dobivenim podacima za Gibbsovu slobodnu energiju. Prsten-lanac tautomerija u oksazepamu pokreće intramolekularni prijenos protona, što znači da nisu potrebne kisela ili bazna kataliza,

što se slaže s pH profilom reakcije oksazepama koji pokazuje kako je brzina racemizacije konstantna u pH području od 2 do 10. Dodatna potvrda prsten-lanac tautomerizma kao ključnog procesa stereoizomerizacije oksazepama dolazi od drugih autora koji su primijetili kako je ovaj tip reakcije odgovoran za enantiomerizaciju niza heterocikličkih sustava (Escale i sur. 1976; Minkin, Granovskii i sur., 2000).



## 5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu razmatran mogući mehanizam racemizacije oksazepama korištenjem računalnih metoda. Kvantno-kemijskim izračunima ispitani su brojni literaturni i alternativni mehanizmi racemizacije na teorijskoj razini B3LYP/6-31+G(d).

Najjednostavniji mehanizam racemizacije je mehanizam deprotonacije i reprotonacije na C3- položaju. Prema DFT izračunima najstabilniji anion koji nastaje, a time je definirano i najkiselije mjesto u molekuli, je N1-anion. U tom je anionu negativni naboj bolje delokaliziran, nego u ostalim anionima oksazepama. . Zbog toga je mehanizam deprotonacije na C3 stereocentru manje vjerojatan proces, te svakako ne predstavlja glavni mehanizam racemizacije. U molekuli oksazepama može doći do keto-enolne, keto-iminolne te N4-N1 tautomerizacije. Od tih triju tautomerizacija, jedino se keto-enolna tautomerizacija može izravno povezati s procesom racemizacije, dok preostale dvije tautomerizacije daju početne spojeve prikladne za solvolitske reakcije racemizacije. Svi tautomerizacijski mehanizmi koji su ispitani ne odgovaraju eksperimentalno utvrđenoj barijeri racemizacije oksazepama. Zbog nestabilnih struktura odgovarajućih prijelaznih stanja, te su reakcije kinetički vrlo nepovoljne.

Oksazepam može egzistirati u obliku dvaju atropoizomera – (*M*) i (*P*). Izmjena dviju formi može se smatrati brzim predravnotežnim procesom. dok je sam prelazak jednog atropoizomera u drugi unutar eksperimentalne barijere. (*P*)-atropoizomer je nestabilniji te kod takvog atropizomera nakon protoniranja C3-OH skupine dolazi do spontane eliminacije vode. To je kiselo-bazno katalizirani proces, te bi se promjenom pH medija reakcija trebala ubrzati ili usporiti. No, eksperimentima je utvrđeno da u rasponu pH 2-10 ne dolazi do promjene konstante brzine reakcije racemizacije, te je time i ovaj mehanizam manje vjerojatan. Dodatno, u radu je dokazano da je najpovoljnije mjesto protonacije iminski dušik N4 , a ne ciljana alkoholna skupina na C3 atomu.

Jedini mehanizam koji zadovoljava parametre dobivene eksperimentima (pH profil, konstanta brzine kemijske reakcije) je prsten-lanac tautomerija, prilikom koje, uz posredovanje jedne molekule vode dolazi do intramolekulskog prijenosa protona s C3-OH na N4 atom, uz istovremeno otvaranje diazepinskog prstena te nastanka aldehida. Nastali aldehid podliježe brzom ravnotežnoj hidrataciji u aldolni oblik, u kojem se dehidratacijom, te kasnije

adicijom N4 na C3 atom, ponovno zatvara benzodiazepinski prsten. Predloženi mehanizam će se dalje istraživati u drugim benzodiazepinskim lijekovima koji podliježu racemizaciji.

## 6. ZAHVALE

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku i dr. sc. Davoru Šakiću na svom strpljenju i vremenu koje su uspjeli pronaći za naša česta pitanja, podršci i poticajima koji su nam pomogli da dovršimo rad te na svom znanju koje su nam prenijeli pri izradi ovog rada.

Zahvaljujemo i kolegici Luciji Hok, koja je od početka do kraja bila uz nas, u svakom trenutku spremna pomoći na bilo koji način i pružiti ohrabrenje kad bismo malo posustale, ali i uskočiti svojim savjetima i uputama za bilo što što nam je zatrebalo.

Zahvaljujemo i svima ostalima, pogotovo obitelji i prijateljima, koji su nam pomogli prilikom izrade ovog rada te nas podržavali.

## 7. POPIS LITERATURE

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.

Baandrup L, Ebdrup BH, Rasmussen JØ, Lindschou J, Gluud C, Glenthøj BY. Pharmacological interventions for benzodiazepine discontinuation in chronic benzodiazepine users. Cochrane Database of Systematic Reviews 2018, *Issue 3*. Art. No.: *CD011481*.

Barrett, J, Smyth, WF, Davidson IE. 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.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, 27.

Bergman H, Bhoopathi PS, Soares-Weiser K. Benzodiazepines for antipsychotic-induced tardive dyskinesia. Cochrane Database of Systematic Reviews 2018, *Issue 1*. Art. No.: *CD000205*.

Buemi G, Zuccarello F. DFT study of the intramolecular hydrogen bonds in the amino and nitro-derivatives of malonaldehyde. *Chem Phys*, 2004, 306, 115-129

Ciraulo DC, Greenblatt DJ. Sedative-, hypnotic-, anxiolytic-related disorders, U: Kaplan HI, Sadock BJ ur. *Comprehensive textbook of psychiatry/VI*, vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, 872-887.

Clayden J, Moran WJ, Edwards PJ, LaPlante SR. The challenge of atropisomerism in drug discovery. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48, 6398 – 6401.

Cruz-Cabeza AJ, Schreyer A, Pitt WR. Annular tautomerism: experimental observations and quantum mechanics calculations. *J Comput Aided Mol Des*, 2010, 24, 575–586

Cucinotta CS, Ruini A, Catellani A, Stirling A. Ab Initio Molecular Dynamics Study of the Keto–Enol Tautomerism of Acetone in Solution. *Chem Phys Chem*, 2006, 7, 1229 – 1234

Dold M, Li C, Tardy M, Khorsand V, Gillies D, Leucht S. Benzodiazepines for schizophrenia. Cochrane Database of Systematic Reviews 2012, *Issue 11*. Art. No.: CD006391.

Escale R, Jacquier R, Ly B, Petrus F, Verducci J. Effect of substituents on ring-chain tautomerism in 5-hydroxy-2-isoxazoline series. *Tetrahedron*, 1976, 32, 1369-1373

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, 432-566.

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. 2000, *J Am Chem Soc*, 122, 5520-5528.

Hok L. Rad za Natječaj za Rektorovu nagradu: Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila i ekotoksikološka analiza kloriranih produkata. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Izješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini, 2016, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)

Kishimoto T, Millrine D. A Brighter Side to Thalidomide: Its Potential Use in Immunological Disorders. *Trends Mol Med*, 2017, 23, 348-361.

Lam PCH, Carlier PR. Experimental and Computational Studies of Ring Inversion of 1,4-Benzodiazepin-2-ones: Implications for Memory of Chirality Transformations. *J Org Chem*, 2005, 70, 1530-1538.

Lindberg P. Omeprazole. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2007, Elsevier, 215-217

McMurry J. *Fundamentals of organic chemistry*. London, Thompson Learning, 2003, 177-181.

McQuaid KR. *Basic & Clinical Pharmacology* 13<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Education, 2015, 1538-1541

Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 2005, 88, 5–28.

Pem B. *Kvantno-kemijsko istraživanje tautomerizacije odabranih farmaceutika*. Zagreb, 2017.

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

Raczyńska ED, Kosińska W, Ośmiałowski B, Gawinecki R. Tautomericequilibriumrelation to pi-electron delocalization. *Chem Rev*, 2005, 105, 3561-3612.

Saunders M. Stochastic Search for Isomers on a Quantum Mechanical Surface. *J Comput Chem*, 2004, 25, 621

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

Šakić D. Doktorski rad: Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.

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.

Tandarić T. Diplomski rad: Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.

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.

Thitiphuree S, Thalley NJ. Esomeprazole, a new proton pump inhibitor: pharmacological characteristics and clinical efficacy. *Int J Clin Pract*, 2000, 54, 537-541.

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.

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, Basic & Clinical Pharmacology 13<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Education, 2015, 564-572

Trevor AJ, Masters SB. Basic & Clinical Pharmacology 13<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Education, 2015, 585-586

USPTO Patent Database, 11 April 1997

Valters R, Flitsch W. Ring Chain Tautomerism. New York, Plenum Press, 1985, 1-5

Vargesson, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2015, 105, 140–156.

Minkin VI, Garnovskii AD, Elguero J, Katritzky AR, Denisko OV. The Tautomerism of Heterocycles Five-Membered Rings with Two or More Heteroatoms. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Vol. 76, New York, Academic Press, 2000, 252-260

Vlastelica M, Jelaska M. Zašto su benzodiazepini još uvijek u širokoj primjeni? *Acta Med Croatica*, 2012, 137-140

Voet D, Voet JG. Biochemistry. Wiley international edition, 2004, 75-76, 460-462.

Vrček V, Pem B. Substituent effects on the stability of 1,4-benzodiazepin-2-one tautomers. A density functional study. *Int J Quantum Chem*. 2017, e25523

Wu CC, Lien MH. Ab Initio Study on the Substituent Effect in the Transition State of Keto-Enol Tautomerism of Acetyl Derivatives. *J Phys Chem*, 1996, 100, 594-600

Yang SK, Bao Z. Base-catalyzed racemization of 3-O-acyloxazepam. *Chirality* 1994, 6, 321-328.

Yang SK, Lu X-L. 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.

## 8. SAŽETAK

Lucija Božičević i Helena Sremec  
Mehanizam racemizacije oksazepama

Optička je stabilnost od iznimne važnosti u farmaceutskoj kemiji i biomedicini. U ovom je radu računalnim metodama detaljno istražen mehanizam racemizacije oksazepama, benzodiazepina koji pokazuje optičku nestabilnost u fiziološkim uvjetima. Na temelju eksperimentalnih kinetičkih rezultata određena je Gibbsova slobodna energija aktivacije  $\Delta G^\ddagger = 87 - 91$  kJ/mol. Ta je vrijednost postavljena kao kriterij za procjenu relevantnosti mehanizama izračunatih kvantno-kemijskim metodama. Također, eksperimentalni pH profil reakcije pokazuje kako su brzina reakcije racemizacije i odgovarajući parametar  $\Delta G^\ddagger$  konstantni u pH području 2-10.

U radu su korišteni kvantno-kemijski modeli kako bi se izračunale energije reaktanata, produkata, međuprodukata i prijelaznih stanja istraživanih reakcijskih mehanizama. Strukture su optimizirane korištenjem funkcionala B3LYP te baznog skupa 6-31+G(d). Gibbsove energije solvatacije određene su solvatacijskim modelom SMD na B3LYP/6-31+G(d) razini ( $\epsilon = 78.4$ ). Položaj eksplicitnih molekula vode određen je modificiranom verzijom stohastičke metode.

Proučavani su razni literaturno predloženi i alternativni reakcijski putovi: C3-H/H izmjena, keto-enolna, keto-iminolna i N1,N4-tautomerizacija, solvolitska reakcija te prsten-lanac pregrađivanje kao posebna vrsta tautomerizacije. Od svih navedenih procesa jedino mehanizam prsten-lanac tautomerizacija odgovara eksperimentalno definiranim kriterijima. Taj reakcijski put ne ovisi o kiselosti, odnosno bazičnosti vodenog medija, a izračunata barijera racemizacije je manja od 91 kJ/mol.

Rezultati dobiveni za mehanistički opis racemizacije oksazepama mogu se primijeniti i na strukturno slične benzodiazepine koji posjeduju kiralni centar. To je korisno za razvoj i pripravu novih benzodiazepinskih derivata s povećanom optičkom stabilnosti, što je za lijekove iznimno važno jer je ljudski organizam kiralan, kao i biološke mete lijekova. Stereokemijska svojstva molekula mogu uvelike utjecati na farmakodinamička i na farmakokinetička svojstva lijeka, pa su mehanističke informacije o racemizaciji važan doprinos u dizajnu optički stabilnih farmaceutika.

**Ključne riječi:** racemizacija, oksazepam, tautomerizacija, prsten-lanac tautomerizacija, računalna studija



## 9. SUMMARY

Lucija Božičević i Helena Sremec  
Racemization mechanism of oxazepam

Optical stability is of utmost importance in pharmaceutical chemistry and biomedicine. In this study, using computational methods, racemization mechanism of oxazepam is investigated. Oxazepam is a benzodiazepine drug which displays chiral instability under physiological conditions. Based on experimental kinetic results the free energy barrier range  $\Delta G^\ddagger = 87 - 91$  kJ/mol was determined. This value has been set as a criteria for assessment of mechanisms calculated using quantum chemical methods. Furthermore, experimental pH profile of this reaction shows that the reaction rate constant and corresponding  $\Delta G^\ddagger$  parameter is constant in the pH range of 2 - 10.

In this study, quantum chemical models were used to calculate energies of reactants, products, intermediates and transition state of reaction mechanisms of interest. Structures were optimized with the B3-LYP functional and the standard basis set 6-31+G(d). The Gibbs energies of solvation were determined using the SMD continuum solvation model at the B3-LYP/6-31+G(d) level ( $\epsilon = 78.4$ ). Configurations of water complexes were created using a locally modified version of the stochastic search method.

Mechanisms proposed earlier in literature and alternative mechanisms, such as C3-H/H exchange, keto-enol, keto-iminol and N1,N4-tautomerization, solvolytic reaction and ring-chain tautomerism, as a specific type of tautomerization, were examined. Of all suggested mechanisms, only the ring-chain tautomeric rearrangement accurately reproduces experimental rate constant. This reaction pathway does not depend on pH of the water medium and the calculated racemization barrier is less than 91 kJ/mol.

Results from this study can be applied to structurally similar benzodiazepines. This could be useful in development of new derivatives with increased optical stability, which is important due to the fact that human organism is a chiral medium as are the drug targets. Stereochemistry of molecules has an important role in interactions of drugs and biological targets, therefore it is extremely useful in development of new therapeutics to know the racemisation mechanism in optically unstable ones.

**Key words:** racemization, oxazepam, tautomerization, ring-chain tautomerism, computational study

## 10. PRILOZI

**Prilog 1.** Geometrije lociranih minimuma i prijelaznih stanja optimiziranih na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.

**Slika 5.**

### a) N1-anion bez eksplicitnih voda

C	-0.46637800	-0.45280900	-0.01654700
C	-0.61590200	-1.76265800	0.56214100
C	0.87079700	0.15075800	-0.21294300
C	1.58299200	-2.64107800	0.50588100
C	1.82981000	-1.90832400	-0.85648200
O	2.55884000	-3.27015800	0.96774300
N	1.92935900	-0.49851300	-0.56852400
N	0.36728400	-2.57142900	1.04594000
C	-1.95691200	-2.22783200	0.74296000
C	-3.06699500	-1.49884000	0.36289700
H	-4.06876800	-1.89518200	0.50545100
C	-2.88349700	-0.23172500	-0.21487600
C	-1.61455100	0.28682800	-0.38601600
H	-1.49283400	1.27138300	-0.82680100
H	-2.07175200	-3.20617500	1.20154500
O	3.01401100	-2.39565900	-1.43458800
C	1.06010600	1.62141600	0.02574300
C	0.33919100	2.31796800	1.00994800
C	2.02619900	2.32555100	-0.71441500
C	0.57383800	3.67572700	1.24558000
H	-0.39963500	1.78934600	1.60513200
C	2.25610400	3.68236700	-0.48605800
H	2.59766600	1.78128600	-1.45997100
C	1.52960800	4.36632200	0.49566400
H	0.00966600	4.19179700	2.01972700
H	3.00483400	4.20847400	-1.07509200
H	1.70871800	5.42451300	0.67492800
H	0.99660200	-2.10452300	-1.54973000
Cl	-4.30413300	0.70621500	-0.72934200
H	3.44000600	-2.87247200	-0.68437300

### b) N1-anion s jednom eksplicitnom vodom

C	0.23561000	-0.62903900	-0.15332500
C	-0.65527300	-1.47064900	-0.90626400
C	-0.02524000	0.81898500	0.00778700
C	-2.57723900	-0.12073400	-1.19123100
C	-2.34587800	0.48951200	0.23229400
O	-3.54929200	0.35135500	-1.82306500
N	-1.19466300	1.34641700	0.16020900
N	-1.76693200	-1.09033700	-1.60007200
C	-0.28192000	-2.84499600	-1.02943300
C	0.85010800	-3.37465700	-0.44097000

H	1.09122200	-4.42877800	-0.54730500
C	1.69020900	-2.52846400	0.30104400
C	1.39973300	-1.18412900	0.42920000
H	2.06499900	-0.54399200	1.00004800
H	-0.94234500	-3.47531200	-1.61848500
O	-3.50035600	1.22699500	0.58656500
C	1.12446800	1.78378000	-0.01909800
C	2.25452200	1.57219500	-0.82629300
C	1.05697700	2.96629200	0.73800800
C	3.28704600	2.51292400	-0.87455900
H	2.31777100	0.67278800	-1.43175800
C	2.09077700	3.90211700	0.69745600
H	0.17448200	3.13728700	1.34671800
C	3.21276100	3.67974700	-0.10917600
H	4.14831100	2.33330600	-1.51456500
H	2.02153900	4.80773100	1.29666600
H	4.01906800	4.40955400	-0.14167700
H	-2.20197400	-0.30763200	0.97745000
Cl	3.13887000	-3.20184400	1.07833000
H	-3.96351900	1.31762600	-0.28452400
O	-5.32990900	-0.11618100	2.25360000
H	-4.67145700	0.41819300	1.75023600
H	-5.55122400	-0.83663700	1.64518200

Slika 6.

**a) C3-anion bez eksplicitnih voda**

C	-0.47996100	0.33472600	0.15311900
C	-1.81120200	0.11223900	0.58868900
C	0.48237800	-0.76671100	0.00394900
C	-2.21316600	-2.27638000	0.28070300
C	-1.05216700	-2.53924200	-0.52612800
O	-3.17805400	-3.07432200	0.34474800
N	0.12214900	-1.97509400	-0.45065000
N	-2.17033100	-1.15637500	1.14306700
C	-2.75445100	1.14389600	0.57784400
C	-2.41659200	2.44622700	0.19363300
H	-3.14275000	3.25176400	0.22645600
C	-1.10883200	2.66607200	-0.23497900
C	-0.16544900	1.64865800	-0.27751900
H	0.82923600	1.85970500	-0.65251600
H	-3.76850100	0.93362100	0.91419500
O	-1.13697800	-3.72764900	-1.25172900
H	-2.00582700	-4.09899000	-1.00101700
C	1.93251500	-0.53334100	0.10525200
C	2.48740800	0.49670000	0.90465700
C	2.85425200	-1.38780000	-0.55212100
C	3.86647300	0.67614900	1.01849200
H	1.82502500	1.15046900	1.46559300
C	4.22920800	-1.20407700	-0.43833800

H	2.45444800	-2.20223000	-1.14747400
C	4.75764400	-0.16693800	0.34485200
H	4.24709500	1.47825500	1.64965200
H	4.90090300	-1.87797300	-0.96911000
H	5.83296300	-0.02673500	0.43361800
H	-3.04507900	-1.12266600	1.65870100
Cl	-0.64225500	4.29939800	-0.76598900

**b) C3-anion s jednom eksplicitnom vodom**

C	-0.00318700	0.48441700	-0.05225100
C	1.35265900	0.69073300	-0.40183300
C	-0.58077700	-0.86899900	0.06184200
C	2.44888600	-1.43468700	0.03287500
C	1.38761500	-2.04646800	0.75929600
O	3.63253600	-1.89252300	0.08313800
N	0.09660700	-1.89573200	0.57279900
N	2.13556300	-0.40559700	-0.88063000
C	1.91561500	1.97076600	-0.37343400
C	1.15468500	3.09713600	-0.04420800
H	1.58540400	4.09297400	-0.06317400
C	-0.17697000	2.89347000	0.31071600
C	-0.74735400	1.62686900	0.32721700
H	-1.77981800	1.51023600	0.63593900
H	2.95998700	2.09192500	-0.65417000
O	1.77956100	-3.13270200	1.54247700
H	2.73526800	-3.22787600	1.36425300
C	-2.02092900	-1.09841000	-0.16206100
C	-2.78704200	-0.30866600	-1.05212100
C	-2.68973000	-2.17602300	0.46918600
C	-4.13981900	-0.56562700	-1.28020700
H	-2.30753800	0.50424400	-1.59070700
C	-4.04009800	-2.42732600	0.24278500
H	-2.11414100	-2.81060200	1.13534600
C	-4.78592700	-1.62410500	-0.63240600
H	-4.69015200	0.06309400	-1.97872200
H	-4.51992300	-3.25974300	0.75598100
H	-5.84056000	-1.82410800	-0.80982600
H	2.98571800	-0.09787400	-1.34752800
Cl	-1.17001300	4.29435900	0.77139500
O	5.43777300	-0.28179400	-1.18182200
H	4.87187000	-0.96448300	-0.73290800
H	5.85420800	0.20508000	-0.45610900

**Slika 7.**

**a) C3O-anion bez eksplicitnih voda**

C	0.58812700	0.16175000	0.03019200
C	1.74892100	-0.32520600	-0.62293900
C	-0.61142500	-0.71425700	0.22144600
C	1.44904200	-2.83349700	-0.42649700

C	0.75678200	-2.62254000	0.98369500
O	1.74444400	-3.89022400	-0.95310100
N	-0.56733600	-1.94852000	0.56606000
N	1.84122200	-1.63575700	-1.08731500
C	2.81954300	0.56044100	-0.86818900
C	2.77967800	1.88568200	-0.45105500
H	3.61748000	2.55066600	-0.63744500
C	1.65050500	2.34054000	0.23278600
C	0.56893900	1.50005500	0.46094300
H	-0.31000800	1.87834800	0.97239000
H	3.70536800	0.18648400	-1.37755600
O	0.61882100	-3.66599500	1.72407400
C	-1.96616200	-0.11684000	-0.03567500
C	-2.18451900	0.89275500	-0.98912000
C	-3.07817300	-0.62253700	0.66297000
C	-3.47071100	1.38316300	-1.23637300
H	-1.34526300	1.28900600	-1.55437800
C	-4.35929300	-0.12758300	0.42405500
H	-2.90677100	-1.41962100	1.38023000
C	-4.56439300	0.87988900	-0.52767600
H	-3.61571300	2.15812600	-1.98671200
H	-5.20352100	-0.52929000	0.98109800
H	-5.56486500	1.26447900	-0.71527200
H	2.52405700	-1.80863000	-1.81925300
H	1.36817700	-1.78355800	1.43841600
Cl	1.59685700	4.01781100	0.80283000

**b) C3O-anion s jednom explicitnom vodom**

C	-0.27924600	0.61178300	-0.04031000
C	0.60457300	1.44392000	-0.77062000
C	0.00228100	-0.84849700	0.12755100
C	2.72863700	0.08076900	-0.75958600
C	2.35372800	-0.45919200	0.67599500
O	3.76566100	-0.12435200	-1.36673200
N	1.15662200	-1.34459200	0.38446800
N	1.78044000	0.95331400	-1.34019000
C	0.26074200	2.79456200	-0.98201500
C	-0.90781600	3.33702200	-0.46097800
H	-1.15302700	4.38219100	-0.62230700
C	-1.74998100	2.51892500	0.29527700
C	-1.44965100	1.17831000	0.49557500
H	-2.12732300	0.55264500	1.06701900
H	0.93992200	3.42870900	-1.54772100
O	3.30810200	-1.06167100	1.32648700
C	-1.13799600	-1.81206300	-0.03739400
C	-2.22172200	-1.56433600	-0.89676000
C	-1.10034700	-3.03759000	0.65252700
C	-3.23842200	-2.51032900	-1.06156400
H	-2.26505100	-0.63267100	-1.45418700
C	-2.11816900	-3.97719800	0.49555700

H	-0.24879500	-3.23317200	1.29715100
C	-3.19452600	-3.71901800	-0.36266600
H	-4.06293700	-2.30108100	-1.74015100
H	-2.07223700	-4.91609000	1.04351600
H	-3.98747500	-4.45366400	-0.48630900
H	2.16798400	1.48668700	-2.11266700
H	1.93757100	0.45389900	1.19250400
Cl	-3.22473800	3.20275700	0.99566000
O	5.81932700	-0.08276200	0.99508500
H	4.91884000	-0.44975800	1.23760800
H	5.75639900	-0.09775200	0.02713600

**Slika 9.**

**a) prijelazno stanje keto-enolne tautomerizacije bez eksplicitnih voda**

C	-0.56239900	0.11486900	-0.02218000
C	-1.77794900	-0.20093100	-0.67011300
C	0.54772100	-0.87285900	0.22750100
C	-1.66102200	-2.58660200	-0.39518300
C	-0.93548200	-2.61440100	0.91128800
O	-1.80996800	-3.79587400	-0.81840600
N	0.41570700	-2.09163100	0.62953000
N	-2.08659500	-1.52701900	-1.07010100
C	-2.72272900	0.79254100	-0.94959000
C	-2.50908500	2.10982700	-0.56012900
H	-3.24842700	2.87610300	-0.76734500
C	-1.33414000	2.42180800	0.12580900
C	-0.37333600	1.44958800	0.37810500
H	0.54101500	1.72311000	0.89207100
H	-3.64710700	0.52438700	-1.45555900
O	-1.58747500	-1.78474400	1.88574400
H	-1.88202800	-2.37947400	2.58833500
C	1.94782100	-0.39450400	-0.00815200
C	2.98956600	-0.90768900	0.78360900
C	2.26393500	0.50417200	-1.04121300
C	4.31019200	-0.52393700	0.55380500
H	2.74358300	-1.61077200	1.57261800
C	3.58896900	0.87549700	-1.28084500
H	1.47627000	0.90341700	-1.67407000
C	4.61534000	0.36764200	-0.48041800
H	5.10345200	-0.92127300	1.18201700
H	3.81738500	1.56169800	-2.09241800
H	5.64555200	0.66435800	-0.66046100
H	-2.67420700	-1.65796100	-1.89044400
Cl	-1.05868900	4.07077800	0.66189200
H	-1.32642600	-4.12143800	0.16462200

**b) prijelazno stanje keto-enolne tautomerizacije s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.09096900	-0.58682100	-0.18317200
C	-0.98373000	-1.19638100	-0.85888500

C	0.18356900	0.89364900	-0.03000100
C	-2.79247400	0.47682400	-0.69447400
C	-2.16632000	1.34065500	0.27145500
O	-4.05524800	0.41319200	-0.82518700
N	-0.82274800	1.66611400	0.20039000
N	-2.03254900	-0.43535100	-1.44196500
C	-1.02311400	-2.59237200	-0.99331800
C	-0.02385900	-3.39904200	-0.45337200
H	-0.06002200	-4.47712800	-0.57103000
C	1.01647100	-2.79603500	0.25258600
C	1.07780900	-1.41254800	0.38439700
H	1.90305700	-0.96099800	0.92361000
H	-1.84663700	-3.05431400	-1.53374500
O	-2.96557700	2.46866600	0.61638000
H	-2.72501100	3.19762900	0.01735400
C	1.52978400	1.53875700	-0.08243600
C	2.54488500	1.05989100	-0.92904000
C	1.78782000	2.68440700	0.69167700
C	3.78058200	1.70753400	-1.00063000
H	2.36374200	0.18755600	-1.55092200
C	3.02512300	3.32335400	0.62844400
H	1.00223800	3.06266900	1.33830500
C	4.02801400	2.83862900	-0.21905800
H	4.54821300	1.32768500	-1.67031600
H	3.20916600	4.20145500	1.24271600
H	4.99198100	3.33860200	-0.26936200
H	-2.67089800	-1.01167300	-1.98381600
Cl	2.27042400	-3.79475800	0.97613800
H	-3.13112000	0.58439100	1.44113700
O	-4.21145600	0.39952500	1.64797600
H	-4.32413800	-0.53906000	1.88649200
H	-4.46563900	0.50466900	0.60787100

**Slika 10.**

**a) prijelazno stanje keto-iminolne tautomerizacije bez eksplicitnih voda**

C	-0.18555700	-0.61992100	-0.07500100
C	0.25540200	-1.82089600	0.54579900
C	0.70288400	0.57216400	-0.23608500
C	2.65090400	-1.50456900	0.35747500
C	2.60160200	-0.70247900	-0.92149400
O	3.67147400	-1.79793600	1.07676000
N	1.94690200	0.54780900	-0.57748200
N	1.57877900	-2.01030100	0.93932300
C	-0.67041800	-2.84750600	0.80625400
C	-1.99605200	-2.73613400	0.41083400
H	-2.69884600	-3.54108200	0.60023700
C	-2.41425900	-1.57731200	-0.25349600
C	-1.53339100	-0.52832600	-0.47627300
H	-1.88617600	0.37450000	-0.96243200

H	-0.31993700	-3.74425700	1.30833400
O	3.85345600	-0.48988400	-1.50197800
H	4.38404100	0.05471900	-0.89525300
C	0.12167300	1.92331800	0.03768800
C	-0.83593500	2.12316100	1.04634500
C	0.58129200	3.03338300	-0.69162700
C	-1.31919100	3.40407100	1.32151700
H	-1.19135400	1.28046900	1.63202100
C	0.08610000	4.30927800	-0.42609900
H	1.32785000	2.87954400	-1.46428200
C	-0.86463200	4.49925500	0.58262000
H	-2.05005900	3.54453500	2.11356400
H	0.44178100	5.15674000	-1.00638800
H	-1.24824800	5.49473500	0.79089000
Cl	-4.08059200	-1.44184000	-0.79305600
H	2.02233000	-1.27307100	-1.66231000
H	2.62694500	-2.34045600	1.72567700

**b) prijelazno stanje keto-iminolne tautomerizacije s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.04154400	0.58083500	-0.20625000
C	-1.16931400	1.17323500	0.24018300
C	0.18280200	-0.89483500	-0.37795200
C	-2.71898100	-0.61633200	-0.13206900
C	-1.95691700	-1.06122600	-1.37531100
O	-3.73134300	-1.31164700	0.25063200
N	-0.72640600	-1.65600200	-0.88479100
N	-2.32410300	0.44446200	0.55209300
C	-1.20904700	2.56389400	0.45974600
C	-0.11084900	3.37159700	0.20110600
H	-0.16320300	4.44406500	0.35881700
C	1.06655700	2.78505600	-0.27629700
C	1.15086900	1.41281200	-0.45990700
H	2.07871800	0.97262700	-0.80847100
H	-2.13209800	3.00391700	0.82624700
O	-2.69115700	-1.94869900	-2.16331200
H	-3.10498000	-2.60471300	-1.57516300
C	1.44942100	-1.55449100	0.06226600
C	2.17994000	-1.08815800	1.16807300
C	1.89873900	-2.70282300	-0.61259300
C	3.33270900	-1.75490500	1.58917400
H	1.83840600	-0.21351500	1.71390900
C	3.05610400	-3.36003300	-0.19831400
H	1.32714300	-3.06769200	-1.46003600
C	3.77700900	-2.88873100	0.90452600
H	3.88077200	-1.38836900	2.45325000
H	3.39741500	-4.24073300	-0.73629900
H	4.67856200	-3.40280000	1.22790500
H	-3.19415400	0.54238500	1.57806700
Cl	2.45613200	3.79909100	-0.63352800
H	-1.75640200	-0.18613200	-2.00955600



H	-4.12092600	-0.77027800	1.29265800
O	-4.08694700	0.05901200	2.18122200
H	-4.87788800	0.62276800	2.17091800

**Slika 11.**

**a) prijelazno stanje N1-N4 tautomerizacije bez eksplicitnih voda**

C	0.69419200	0.18616700	-0.13819000
C	1.52619500	1.32616400	-0.43145900
C	-0.73772600	0.32244700	-0.37325100
C	0.03811600	3.01394400	0.28044100
C	-1.42449000	2.71493500	-0.15454800
O	0.31667600	3.46352700	1.37714100
N	-1.25570900	1.44791100	-0.91443400
N	0.90970400	2.53706800	-0.69682700
C	2.91887500	1.16169400	-0.57444000
C	3.50672300	-0.06466600	-0.33188300
H	4.58388700	-0.18461200	-0.39306600
C	2.69922200	-1.17624900	-0.00424800
C	1.32810200	-1.07422500	0.06880100
H	0.74027200	-1.96452000	0.24809600
H	3.51427300	2.03102800	-0.83375200
O	-2.26915000	2.63951900	0.94490900
H	-1.73105500	2.85523300	1.73261300
C	-1.67381900	-0.81339200	-0.20501000
C	-1.63548600	-1.63285400	0.93941200
C	-2.69265000	-1.01698700	-1.15423500
C	-2.58422000	-2.64046300	1.11807700
H	-0.89829900	-1.44938000	1.71546900
C	-3.61624400	-2.04596200	-0.98808400
H	-2.74083800	-0.35997400	-2.01610600
C	-3.56661500	-2.86033900	0.14897800
H	-2.55805300	-3.24890900	2.01808100
H	-4.38469700	-2.20597200	-1.73967400
H	-4.29740600	-3.65327400	0.28457200
H	-0.12878200	1.99959300	-1.32412200
Cl	3.47492300	-2.72837200	0.27552500
H	-1.81220900	3.44262800	-0.87578300

**b) prijelazno stanje N1-N4 tautomerizacije s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.83682800	-0.16350200	0.23247600
C	1.24496600	-1.34455000	-0.47383700
C	-0.58230700	-0.06806600	0.61450700
C	-0.95402800	-2.08423700	-0.99706000
C	-1.99075500	-2.06025400	0.18759900
O	-1.30343100	-1.55568000	-2.04534600
N	-1.15499800	-1.17154000	1.11127100
N	0.34893900	-2.43353700	-0.67679900
C	2.57988400	-1.45225600	-0.87436400

C	3.49655600	-0.43655200	-0.60806100
H	4.52974900	-0.53358900	-0.92661000
C	3.08059500	0.72212900	0.05862000
C	1.76149000	0.87161400	0.46489300
H	1.45243400	1.76398600	1.00020800
H	2.88679700	-2.34466300	-1.41054600
O	-3.20300600	-1.57711600	-0.23636200
H	-3.05560100	-1.22365400	-1.14077100
C	-1.39680400	1.09830900	0.31273700
C	-1.00451800	2.05912600	-0.64925400
C	-2.62720200	1.26622400	0.99053500
C	-1.82168700	3.15079900	-0.92079200
H	-0.08550500	1.91843100	-1.20791600
C	-3.43694200	2.36260500	0.71446400
H	-2.91231600	0.53639700	1.74011000
C	-3.03498200	3.30656800	-0.23772000
H	-1.52256000	3.87606500	-1.67207100
H	-4.37691400	2.48772500	1.24424200
H	-3.66748900	4.16481100	-0.44940600
H	0.37197700	-3.01903400	0.27756400
Cl	4.24113100	1.99919500	0.38435300
H	-2.10069200	-2.98885400	0.74595300
H	-0.47273500	-1.91980200	1.56658500
O	0.09956600	-3.28331800	1.71632900
H	0.84443800	-3.50742400	2.29192700

**Slika 13.**

**a) (3S) – (M) – konformer oksazepama bez eksplicitnih voda**

C	-0.54781100	0.29911100	0.01758000
C	-0.99614400	1.47725800	-0.62327900
C	0.90699500	0.01380000	0.21014100
C	1.01345100	2.93815700	-0.43948100
C	1.33866800	2.24404300	0.89412000
O	1.71060300	3.83199200	-0.89567900
N	1.77012000	0.89389400	0.58027700
N	-0.09926400	2.45932300	-1.09055200
C	-2.36855200	1.66683000	-0.85491300
C	-3.30308100	0.72887700	-0.43399000
H	-4.36190500	0.88814400	-0.60959000
C	-2.86221900	-0.41343800	0.24092200
C	-1.50771600	-0.63290000	0.45502600
H	-1.18115500	-1.53544300	0.95975700
H	-2.70301400	2.57103400	-1.35730600
O	2.32187400	2.95857000	1.57656300
C	1.40531700	-1.37260700	-0.03773700
C	0.81628900	-2.21198100	-0.99826800
C	2.52533300	-1.83732300	0.67387600
C	1.33563800	-3.48546000	-1.24251100
H	-0.03821300	-1.86554300	-1.57234500

C	3.03515600	-3.11260800	0.43683800
H	2.98543000	-1.18292900	1.40732400
C	2.44245000	-3.94134700	-0.52247800
H	0.87555700	-4.11873800	-1.99659800
H	3.89580700	-3.46182500	1.00145400
H	2.84188600	-4.93524700	-0.70740400
H	-0.36916800	2.99774600	-1.90759600
H	0.44313400	2.23392800	1.53406700
Cl	-4.03480900	-1.58793800	0.81219800
H	2.84492500	3.44431600	0.91063900

**b) (3S)-(P)- konformer oksazepama bez eksplicitnih voda**

C	-0.52599900	0.15662900	-0.00720400
C	0.54747200	-0.85949800	0.22388200
C	-1.73924400	-0.17537600	-0.65816300
C	-1.78878600	-2.67933500	-0.41092100
C	-0.31864900	1.49271600	0.39022500
H	0.59978600	1.75662800	0.90284000
C	-1.26712700	2.47173200	0.12824600
C	-2.44246300	2.15612900	-0.56111200
C	-2.67102700	0.84052500	-0.94126800
H	-3.59565500	0.58354600	-1.45212700
H	-3.17480700	2.92682900	-0.77815900
N	-2.04142100	-1.48134900	-1.06876900
C	1.96473700	-0.44659300	-0.01049000
C	2.30962500	0.48739400	-1.00240500
C	2.98951700	-1.04825100	0.74049100
C	3.64771400	0.80870500	-1.23992900
C	4.32359600	-0.71521000	0.51217600
H	2.72149600	-1.77646800	1.49898500
C	4.65753500	0.21327000	-0.47984500
H	3.89941400	1.52260700	-2.01981900
H	5.10451400	-1.18041200	1.10809500
H	5.69836800	0.47038600	-0.65899400
O	-2.20632500	-3.73413400	-0.85410600
Cl	-0.98487700	4.12237800	0.65260200
C	-0.97634100	-2.57733800	0.89593000
N	0.35280400	-2.07638200	0.59776100
H	1.53487200	0.95000500	-1.60688400
H	-2.71771900	-1.58210600	-1.81948200
O	-1.68992900	-1.89809800	1.92235400
H	-1.72311100	-0.94518800	1.73984000
H	-0.87725400	-3.59726300	1.26486800

**c) prijelazno stanje inverzije prstena (konverzije (3S)-(M)-konformera u (3S)-(P)-konformer) bez eksplicitnih voda**

C	1.53610400	1.28127400	-0.09115100
C	-0.87310700	2.71479100	0.04715400
C	0.31796900	0.56976200	0.05327500

C	1.50193600	2.68499500	-0.21866100
C	0.32035500	3.40670000	-0.15873500
C	-0.86934900	1.33272800	0.14801900
H	2.43825100	3.22108800	-0.35455400
H	0.32827600	4.48747500	-0.25450900
H	-1.80980300	0.82317400	0.30687800
N	2.82271400	0.73445500	-0.08827500
C	3.35075000	-0.49731800	0.24509400
O	4.53244400	-0.57568600	0.54433200
C	0.18342300	-0.91648700	0.12468100
N	1.07970000	-1.82777200	0.22372700
C	2.51381200	-1.77832400	0.16548300
H	2.88100300	-2.40219800	0.99146600
C	-1.21315600	-1.49068400	0.06352500
C	-3.73909600	-2.71025700	-0.09275000
C	-1.69007200	-2.27362400	1.12293900
C	-2.00973300	-1.33177400	-1.08047300
C	-3.26202600	-1.94508500	-1.16102800
C	-2.95071000	-2.87067200	1.05018100
H	-1.06565000	-2.41706100	2.00029200
H	-1.64582100	-0.73734800	-1.91506500
H	-3.86358600	-1.82426200	-2.05824900
H	-3.31283700	-3.46734000	1.88348300
H	-4.71717200	-3.18049800	-0.15235700
Cl	-2.38626400	3.59676600	0.17404500
H	3.56493900	1.42867000	-0.08544400
O	2.89852000	-2.34654900	-1.08677700
H	2.30166100	-3.10176600	-1.23464400

**Tablica 2. – Kationi oksazepama**

**N4-kation**

**a) bez eksplicitnih voda**

C	0.12367000	-0.62096400	-0.00797200
C	1.17401000	-1.42058500	0.53104100
C	0.19956700	0.83297700	-0.13101500
C	3.19587900	0.04021000	0.38728300
C	2.59257200	0.72298000	-0.85526100
O	4.29944600	0.36068600	0.78611400
N	1.34989800	1.40569700	-0.42811900
N	2.39932700	-0.89794700	0.99083500
C	0.95833600	-2.79634900	0.70354300
C	-0.23420200	-3.39610200	0.32178700
H	-0.37268600	-4.46465400	0.45148100
C	-1.25218600	-2.62022300	-0.25154600
C	-1.08078200	-1.25304800	-0.40151000
H	-1.87321300	-0.66026900	-0.84323200
H	1.74897200	-3.40659900	1.13155400
O	3.45206300	1.67184700	-1.35715900
C	-0.96753300	1.69816800	0.06521800

C	-1.91319800	1.40181900	1.07018200
C	-1.12671500	2.86380200	-0.71689800
C	-2.98200000	2.26500800	1.29625000
H	-1.78907300	0.52074200	1.69175800
C	-2.20930000	3.70942300	-0.49603500
H	-0.43896900	3.07796100	-1.53144700
C	-3.13331700	3.41521000	0.51416200
H	-3.69578700	2.04274200	2.08359600
H	-2.34073900	4.59046200	-1.11673700
H	-3.97470000	4.07997200	0.68703300
H	2.31957800	-0.01723500	-1.62005600
Cl	-2.73243800	-3.37267000	-0.76657700
H	4.24555100	1.69329700	-0.77823500
H	2.86635800	-1.41145200	1.73462700
H	1.43069600	2.42194400	-0.40456200

**b) s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.10370300	-0.44285300	-0.21959300
C	1.48425800	-0.59615300	0.11033200
C	-0.58541700	0.84216100	-0.21454400
C	2.44077400	1.68400600	-0.13726100
C	1.38960100	1.99686500	-1.22086100
O	3.28372300	2.52177300	0.14066300
N	0.05596500	1.93359700	-0.58447100
N	2.34072900	0.46121700	0.45985300
C	2.01938500	-1.89403000	0.19039400
C	1.25001600	-3.01258000	-0.09434400
H	1.69005900	-4.00352000	-0.04383000
C	-0.09478100	-2.86070600	-0.46654500
C	-0.66235000	-1.59915300	-0.51297900
H	-1.70242100	-1.49041400	-0.79740600
H	3.06159400	-2.01220100	0.47209500
O	1.56613100	3.26787000	-1.71833500
C	-1.98873500	0.97999700	0.19360000
C	-2.49082700	0.23295300	1.27972100
C	-2.83352200	1.89718200	-0.46876600
C	-3.80504500	0.41612100	1.70215600
H	-1.84373600	-0.46021600	1.80784700
C	-4.15159200	2.05839400	-0.05154700
H	-2.47795700	2.44086100	-1.34071800
C	-4.63624100	1.32413600	1.03731900
H	-4.18121200	-0.14768200	2.55039300
H	-4.80415400	2.74657100	-0.58018700
H	-5.66396000	1.45575100	1.36326800
H	1.41180100	1.24397700	-2.02103100
Cl	-1.04994400	-4.26109100	-0.86171000
H	2.32658400	3.66497700	-1.23823300
H	3.13737600	0.22182300	1.07231700
H	-0.38703500	2.84497200	-0.47259600
O	4.62254800	-0.36498500	1.98684300

H	4.65775300	-0.50924900	2.94619300
H	5.43292400	0.12390000	1.76742000

**C2=O kation**

**a) bez eksplicitnih voda**

C	-0.52927700	-0.32950000	-0.01172600
C	-0.86809900	-1.56183900	0.58993700
C	0.88535600	0.10907000	-0.21300000
C	1.26308200	-2.73347200	0.41013000
C	1.50317600	-2.06925700	-0.94080200
O	2.20815900	-3.49483900	0.88431200
N	1.82060100	-0.69682200	-0.60789400
N	0.14348300	-2.47085600	1.05387700
C	-2.20064700	-1.92280700	0.81295100
C	-3.22791400	-1.08179700	0.40217500
H	-4.26390500	-1.36328200	0.55777600
C	-2.91136500	0.12646800	-0.23167400
C	-1.58351400	0.50422500	-0.42228200
H	-1.35750500	1.45042600	-0.90064100
H	-2.43829100	-2.86990600	1.29083100
O	2.52480000	-2.67854700	-1.64663200
C	1.24546400	1.52368200	0.03550700
C	0.57806600	2.29155100	1.00942800
C	2.30878900	2.10196400	-0.68443100
C	0.97012100	3.60644800	1.25917500
H	-0.23034800	1.85906100	1.59182600
C	2.68490300	3.42039200	-0.44274600
H	2.82142000	1.51302400	-1.43788200
C	2.01863800	4.17467000	0.53035000
H	0.45779200	4.18610200	2.02149400
H	3.49503900	3.86316000	-1.01483900
H	2.31551000	5.20263000	0.71823000
H	0.57819000	-2.17876400	-1.52891100
Cl	-4.18729600	1.17110800	-0.77677200
H	3.35394800	-2.20047100	-1.46381500
H	-0.05090200	-2.94220600	1.93653400
H	2.07013000	-3.82655900	1.79324400

**b) s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.15342900	-0.59749700	0.20436900
C	-1.02686500	-1.26399900	-0.19225500
C	0.21619400	0.88384200	0.39398500
C	-2.69157200	0.45491000	0.29251900
C	-1.88305800	0.88136800	1.51092900
O	-3.76227400	1.11716900	-0.00694300
N	-0.72780800	1.56181400	0.96411600
N	-2.24423300	-0.55046900	-0.44084200
C	-1.03839200	-2.64536600	-0.41325900
C	0.11190200	-3.39743600	-0.20670000

H	0.10287500	-4.47089100	-0.36291100
C	1.27966600	-2.75605000	0.22386300
C	1.30514600	-1.37643300	0.41308500
H	2.22262700	-0.89468900	0.73170400
H	-1.95433000	-3.13691200	-0.73091000
O	-2.60737700	1.70089900	2.36105500
C	1.41113100	1.62306400	-0.08092100
C	2.14120300	1.19710800	-1.20661600
C	1.79731000	2.80501000	0.57917700
C	3.22997000	1.94050200	-1.66306000
H	1.84891400	0.29866300	-1.74249200
C	2.89428300	3.53506600	0.12913100
H	1.23776800	3.13279200	1.44914900
C	3.61167000	3.10647900	-0.99374600
H	3.77912300	1.60905100	-2.53964400
H	3.19405600	4.43682200	0.65526900
H	4.46639100	3.67846800	-1.34379300
H	-1.62652900	-0.03020800	2.07333600
Cl	2.71739500	-3.69049300	0.51506500
H	-2.44871700	2.62690400	2.10422900
H	-2.80866500	-0.84894000	-1.23812000
H	-4.19844500	0.80696400	-0.85255600
O	-4.64907400	-0.04836700	-2.25685100
H	-5.52236600	-0.47812000	-2.23887300
H	-4.60642700	0.42805200	-3.10452200

### **C3-OH kation**

#### **a) bez eksplicitnih voda**

C	-0.17349900	-0.61559000	-0.00266200
C	0.40457700	-1.77650800	0.56867100
C	0.56702500	0.66310400	-0.18482800
C	2.83362500	-1.30969800	0.41509800
C	2.51669600	-0.47374700	-0.83794400
O	4.00045300	-1.41584200	0.78255700
N	1.81195600	0.70756400	-0.55977200
N	1.75014600	-1.82321000	1.03126200
C	-0.37239900	-2.92722700	0.75387000
C	-1.70205900	-2.96530300	0.35082600
H	-2.29167500	-3.86527900	0.49084700
C	-2.26770300	-1.83769400	-0.25434900
C	-1.51883400	-0.67705000	-0.41724500
H	-1.97478800	0.19309500	-0.87532700
H	0.07424400	-3.80712900	1.20946600
O	3.87249700	-0.00660100	-1.25752400
C	-0.12151200	1.94899300	0.04904200
C	-1.11113300	2.06887100	1.04458700
C	0.24652500	3.08778500	-0.69372100
C	-1.71027500	3.30271000	1.29446100
H	-1.39247500	1.20782200	1.64311600
C	-0.36932800	4.31276100	-0.45380100

H	0.99869400	2.99835900	-1.47102700
C	-1.34611400	4.42367500	0.54301200
H	-2.46026700	3.38856700	2.07514600
H	-0.09348700	5.18108400	-1.04500200
H	-1.82294900	5.38140200	0.73120300
H	2.15355500	-1.07282800	-1.68132900
Cl	-3.92074700	-1.88188500	-0.79710800
H	1.95543400	-2.42478300	1.82562000
H	4.49113600	-0.33196900	-0.69058300
H	3.84341000	0.98226900	-1.21209100

**b) s jednom eksplicitnom vodom**

C	0.70723700	-0.51365300	-0.01935900
C	0.73461400	-1.81945700	-0.56789000
C	-0.52660900	0.30897000	0.06246200
C	-1.66263800	-2.47225300	-0.54871600
C	-1.84722600	-1.54324500	0.66444700
O	-2.60905100	-3.12884000	-0.96678300
N	-1.70198000	-0.17083600	0.33791200
N	-0.41953500	-2.46134400	-1.08670200
C	1.95187500	-2.50634300	-0.67484900
C	3.13582300	-1.94092800	-0.21768400
H	4.07027400	-2.48639000	-0.29782400
C	3.10979500	-0.66709800	0.36175600
C	1.91698100	0.04074800	0.44703400
H	1.91449600	1.03361700	0.88195200
H	1.96806300	-3.50119400	-1.11224200
O	-3.27119600	-1.75943700	1.05473500
C	-0.43601100	1.77129700	-0.17134500
C	0.36737600	2.28774300	-1.20407300
C	-1.19094000	2.65651900	0.62076500
C	0.39295900	3.65998500	-1.45388400
H	0.95173500	1.61683600	-1.82711500
C	-1.14404000	4.02917200	0.38227900
H	-1.77528000	2.26838700	1.45088300
C	-0.35858000	4.53217500	-0.66086200
H	1.00214400	4.04807200	-2.26494700
H	-1.70931000	4.70744100	1.01507000
H	-0.32529800	5.60159200	-0.84847900
H	-1.25832300	-1.86851400	1.53033700
Cl	4.58144600	0.04119100	0.96687200
H	-0.28218100	-3.13501200	-1.83612800
H	-3.62927300	-2.40772300	0.54284600
H	-3.85728000	-0.82242400	0.97850800
O	-4.38691200	0.42192500	0.87111900
H	-5.21533700	0.56694500	0.38135000
H	-3.65483800	0.89242700	0.41744000

**Slika 15.**



**a) prijelazno stanje prijenosa protona s C2-OH na C3-OH u iminolnoj formi oksazepama bez eksplicitnih voda (ova geometrija odgovara spoju TS<sub>2</sub> na slici 16.)**

C	-0.48172300	-0.53759000	-0.02389300
C	-0.34565200	-1.92915600	0.30367700
C	0.68550500	0.31563000	-0.22842300
C	2.03766200	-2.32260800	0.39664100
C	2.25389900	-1.39218000	-0.81239000
O	3.07152700	-2.76787700	0.96358500
N	1.81785900	-0.15042300	-0.67874500
N	0.79138600	-2.58251700	0.69351900
C	-1.53829300	-2.70471400	0.35675100
C	-2.78420300	-2.16309600	0.11836000
H	-3.67462200	-2.78227300	0.16631300
C	-2.89664800	-0.79158600	-0.17806500
C	-1.77491000	0.00695300	-0.24082300
H	-1.87757400	1.05525300	-0.49621800
H	-1.43191600	-3.75351800	0.61572600
O	4.13642500	-1.34338200	-0.71779700
H	4.34213900	-0.45816700	-0.36450000
C	0.62509200	1.78632900	-0.00857500
C	-0.08219900	2.32398800	1.08082700
C	1.33448600	2.65485400	-0.85579200
C	-0.07442400	3.69934300	1.31809300
H	-0.61881800	1.66274400	1.75462100
C	1.32815200	4.03000500	-0.62544100
H	1.87771900	2.24145900	-1.70031100
C	0.62512300	4.55601000	0.46349600
H	-0.61415600	4.10044600	2.17168000
H	1.86865800	4.69203700	-1.29683000
H	0.62200300	5.62773400	0.64412800
Cl	-4.48602400	-0.10122200	-0.48434300
H	2.29868200	-1.83824900	-1.80682300
H	4.07075200	-1.99912600	0.08966700

**b) prijelazno stanje prijenosa protona s C2-OH na C3-OH u iminolnoj formi oksazepama s jednom eksplicitnom vodom**

C	-0.13884000	0.52380700	-0.18175200
C	-1.55659600	0.54853000	0.02879800
C	0.59782200	-0.73380400	-0.29780500
C	-2.23412000	-1.78317700	0.02379000
C	-1.20272200	-2.10281600	-1.07086000
O	-2.88818600	-2.75044900	0.49823600
N	0.05658400	-1.80763200	-0.80061100
N	-2.36792700	-0.51902000	0.34216400
C	-2.19505000	1.81838900	0.04465500
C	-1.49578000	2.99375100	-0.14724400
H	-2.01268400	3.94820100	-0.13420400
C	-0.10497000	2.94937100	-0.34866900
C	0.56442800	1.74347900	-0.35566000

H	1.63415600	1.72451900	-0.52924200
H	-3.26436200	1.84320700	0.23113000
O	-1.37589700	-3.98417300	-0.99139700
H	-0.57701500	-4.29083200	-0.52375400
C	2.03055700	-0.83561500	0.08579100
C	2.52222900	-0.16080800	1.21707500
C	2.89878500	-1.66529500	-0.64502000
C	3.85214000	-0.31831400	1.60941500
H	1.85726900	0.46758400	1.80175500
C	4.23085300	-1.80843500	-0.25954300
H	2.52185400	-2.18187300	-1.52265700
C	4.71056100	-1.13690800	0.87008400
H	4.21626700	0.19797000	2.49343500
H	4.89616300	-2.44051800	-0.84167900
H	5.74854400	-1.25045600	1.17149500
Cl	0.78259300	4.44622700	-0.60105300
H	-1.53874000	-2.10808900	-2.10876900
H	-2.12338500	-3.85462700	-0.28618400
O	-4.95178200	0.34787200	1.41188200
H	-5.51290200	-0.36242900	1.75547400
H	-4.11871300	-0.09088500	1.13213300

**Slika 19. Struktura prijelaznog stanja za jednom vodom potpomognuti intramolekularni prijenos protona povezan s cijepanjem N4-C3 (ova geometrija odgovara prijelaznom stanju TS<sub>7</sub> na slici 18.)**

C	-0.69810200	-0.46017600	0.01053600
C	-0.76327300	-1.75227700	0.59745100
C	0.57041700	0.28596100	-0.08949100
C	1.63079600	-2.56337000	0.54182000
C	1.82519600	-1.77355900	-0.78756000
O	2.46153200	-3.27046400	1.06671600
N	1.67598300	-0.32786400	-0.36774800
N	0.35514500	-2.41822700	1.11102100
C	-2.02415600	-2.36308000	0.74642700
C	-3.18561600	-1.75002500	0.30053200
H	-4.14528200	-2.24381900	0.41410300
C	-3.10724500	-0.49659400	-0.31877100
C	-1.88615600	0.14459400	-0.45143700
H	-1.83851700	1.12073400	-0.92079700
H	-2.08064400	-3.34631600	1.20622600
O	2.99633800	-1.96417600	-1.40292300
C	0.61151300	1.75217000	0.13635100
C	-0.23912200	2.36237800	1.07658000
C	1.54323600	2.54289500	-0.56315100
C	-0.15579500	3.73392200	1.31530500
H	-0.94894000	1.76130300	1.63659500
C	1.61279500	3.91493300	-0.32854200
C	0.76615100	4.51315800	0.61028200
H	-0.80849100	4.19245600	2.05300500
H	2.32974600	4.51650400	-0.88003400

H	0.82547400	5.58287800	0.79269100
H	0.17978900	-3.09415900	1.84867000
H	0.95531600	-2.00788200	-1.43190600
Cl	-4.56573700	0.26827100	-0.91996100
H	3.74359800	-1.06000400	-1.09654700
H	2.71775600	0.11955800	-0.35422100
O	4.10597700	0.05069700	-0.70576800
H	4.74725700	-0.03781500	0.01577700
H	2.20796200	2.08454000	-1.28933800

**Slika 20.**

**a) aldehidna forma oksazepama otvorenog prstena (ova geometrija odgovara spoju 8 na slici 18.)**

C	-0.03549100	0.07655600	-0.44193900
C	-1.45608700	-0.03729900	-0.43239500
C	0.86741100	-1.10174500	-0.59167800
C	-3.27166100	-1.69475800	0.01564700
C	-2.23464400	1.13009500	-0.36404100
C	-1.65123300	2.38988500	-0.25242600
H	-2.27248500	3.27808200	-0.20246600
C	-0.26218000	2.49571600	-0.24824700
C	0.53254900	1.35840900	-0.35210300
H	1.61055200	1.46725500	-0.37305900
H	-3.31449900	1.06028400	-0.44646100
C	2.27606000	-1.01254000	-0.08754400
C	2.55586000	-0.58919000	1.22224500
C	3.33634800	-1.42555500	-0.91105700
C	3.86667800	-0.59706200	1.70213700
H	1.74510500	-0.26912400	1.87114000
C	4.64903000	-1.41512700	-0.43546600
H	3.13279100	-1.73377700	-1.93385800
C	4.91640300	-1.00537300	0.87371700
H	4.06798500	-0.28202700	2.72254300
H	5.46155300	-1.72241000	-1.08844500
H	5.93743700	-1.00080000	1.24577600
O	-3.79600100	-2.76225900	-0.26317700
O	-5.06331300	-0.61565300	1.22754400
C	-3.87655100	-0.82023100	1.12939700
H	-3.15807700	-0.44804800	1.89006900
N	0.41304100	-2.16519700	-1.16145300
H	1.11603700	-2.90771100	-1.18778500
Cl	0.49523500	4.07570600	-0.13783200
N	-2.07283600	-1.29298200	-0.52589800
H	-1.52727200	-2.00885400	-1.01527800

**b) hidratna forma oksazepama otvorenog prstena (ova geometrija odgovara spoju 9 na slici 18.)**

C	-0.19127200	0.39650800	-0.69687600
C	1.22235900	0.48379500	-0.76474100

C	-0.93051000	-0.86493800	-1.00408400
C	3.04395300	-1.20332900	-0.43666300
C	3.46919000	-0.65826800	0.95576500
O	3.61161700	-2.21665800	-0.85038500
N	-0.43999200	-1.65721100	-1.89312700
N	1.99802600	-0.64823800	-1.11151400
C	1.84500500	1.71788500	-0.53998600
C	1.10954300	2.85314600	-0.20712700
H	1.60762100	3.80225600	-0.03813700
C	-0.27847800	2.75813300	-0.12506600
C	-0.92290200	1.54995500	-0.37138400
H	-2.00482000	1.50216000	-0.31848000
H	2.92073400	1.79830600	-0.66019900
O	2.48596700	-1.06768700	1.89995200
C	-2.20489600	-1.14947500	-0.27275100
C	-3.31842400	-1.64867800	-0.96881200
C	-2.28917500	-0.98357600	1.11997100
C	-4.49105100	-1.97807600	-0.28712100
H	-3.27335600	-1.75494700	-2.05021300
C	-3.45653900	-1.33105500	1.80201100
H	-1.43364700	-0.60101600	1.66984700
C	-4.56073100	-1.82479500	1.10076800
H	-5.35052700	-2.34841400	-0.83963500
H	-3.50375300	-1.21383600	2.88138700
H	-5.47227600	-2.08460900	1.63247500
Cl	-1.22817800	4.18024300	0.27439100
H	1.56371400	-1.26142000	-1.80393900
H	-1.01353900	-2.49774700	-2.00269200
H	3.48572700	0.42767900	1.02466000
H	2.61898900	-2.01622500	2.06938700
O	4.73613300	-1.15074000	1.24444700
H	4.88175100	-1.90088600	0.62782500