

Kvantno-kemijsko istraživanje tautomerizacije odabranih farmaceutika

Pem, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:227778>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-02**



Repository / Repozitorij:

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



Barbara Pem

**Kvantno-kemijsko istraživanje
tautomerizacije odabranih farmaceutika**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2017.

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

Željela bih zahvaliti svom mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na nesebičnoj pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog rada, te na energiji i vremenu koje je uložio prenoseći mi svoje veliko znanje.

Posebno se zahvaljujem komentoru dr. sc. Davoru Šakiću na savjetima, pomoći i podršci u svakoj fazi izrade ovog rada.

Sadržaj

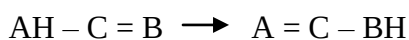
1. Uvod	1
1.1. Tautomerizacija	1
1.2. Ravnoteža tautomerizacijske reakcije	1
1.3. Mehanizam tautomerne konverzije	3
1.4. Kompeticija keto-enolne i keto-iminolne tautomerije	3
1.5. Važnost tautomerizacije	4
1.6. Racemizacija	6
1.7. Tautomerizacija u farmaceutskoj kemiji	6
1.8. Djelovanje i značaj odabranih lijekova	9
2. Obrazloženje teme	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Računalna kemija	12
3.2. Konformacijska analiza	12
3.3. Geometrijska optimizacija strukture	12
3.4. Izračun Gibbsove energije	13
3.5. Korištene metode	14
4. Rezultati i rasprava	15
4.1. Relativne Gibbsove energije keto, enolnih i iminolnih tautomera	15
4.2. Energije anionskih specija	20
4.3. Značaj rezultata za istraživane molekule	23
5. Zaključak	25
6. Literatura	27
7. Sažetak/ Summary	34
8. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card	36

1. Uvod*

1.1. Tautomerizacija

Tautomerizacija je ravnotežni proces konverzije jednog oblika molekule u drugi, koji se odvija intramolekulskim pomakom atoma. Reakcija tautomerizacije uključuje pucanje i formiranje kemijskih veza (Guasch i sur., 2016). Tautomeri se međusobno strukturno razlikuju, tj. imaju različitu raspodjelu veza, atoma ili funkcionalnih skupina. Najčešći oblik tautomerizacije je tzv. prototropička tautomerizacija, koja obuhvaća pomak vodikovog kationa (protona) s jedne funkcionalne skupine molekule na drugu, uz istovremenu preraspodjelu π -elektrona i preslagivanje dvostruke veze. Drugi oblici tautomerizacije mogu uključivati pomak kationske ili anionske skupine, ciklizaciju ili otvaranje prstena, te promjenu valencije atoma u molekuli (Sayle, 2010; Raczyńska i sur., 2005).

Opća jednadžba prototropičke tautomerizacije demonstrira pomak protona s atoma A na atom B, te pomak π -elektrona u suprotnom smjeru. Prototropička tautomerizacija odvija se u molekulama s amfiprotičnim svojstvima. Amfiprotične molekule posjeduju kiseli centar (A) koji može otpustiti proton i bazični centar (B) koji ga može primiti (Filipović i Lipanović, 1995).



Ako A i C predstavljaju atome ugljika, a B kisik, jednadžba opisuje keto-enolnu tautomeriju. Ako se na položaju A nalazi dušik, opisana je keto-iminolna tautomerija. (Raczyńska i sur., 2005).

1.2. Ravnoteža tautomerizacijske reakcije

Tautomerizacija je ravnotežna reakcija koja se opisuje ravnotežnom konstantom tautomerizacije K_T . Konstanta K_T definira se kao omjer ravnotežnih koncentracija tautomera pod određenim uvjetima (Raczyńska i sur., 2005).



$$K_T = [T_B] / [T_A] \quad (2)$$

* Dio uvoda u djelomično izmijenjenom obliku objavljen je u radu za Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine pod naslovom Računalna studija tautomerizacije benzodiazepina.

$$pK_T = -\log K_T \quad (3)$$

Ovisnost pK_T o standardnim molarnim Gibbsovim energijama (ΔG) obaju tautomera pokazuje sljedeća jednadžba (R je opća plinska konstanta, a T apsolutna temperatura).

$$pK_T = [\Delta G(T_B) - \Delta G(T_A)] / (2,303RT) \quad (4)$$

Vidljivo je da konstanta ravnoteže za reakciju tautomerizacije ovisi o razlici Gibbsovih energija tautomera, odnosno o njihovoj relativnoj stabilnosti. Dakle, udio svakog tautomera u smjesi može se predvidjeti određivanjem njihovih Gibbsovih energija (Filipović i Lipanović, 1995).

Konstanta K_T također je povezana s ravnotežnom konstantom disocijacije kiseline, prema sljedećim izrazima:

$$pK_T = pK_a(T_B) - pK_a(T_A) \quad (5)$$

$$pK_T = [\Delta G_{\text{dis}}(T_B) - \Delta G_{\text{dis}}(T_A)] / (2,303RT) \quad (6)$$

gdje je $\Delta G_{\text{dis}}(T)$ promjena Gibbsove energije za reakciju deprotonacije tautomera. Pomak protona ovisi o kiselobazičnim svojstvima funkcionalnih skupina, prvenstveno o sposobnosti kiselog centra da otpusti proton (Raczyńska i sur., 2005).

Vrijednosti $\Delta G(T)$ i K_T ovisne su o raznim učincima na delokalizaciju elektrona u pojedinom tautomeru. Ti učinci mogu proizlaziti iz same strukture molekule. Stabilniji će biti tautomer u kojem π -elektroni pripadaju najelektronegativnijem elementu (Raczyńska i sur., 2005). Elektron-donorske skupine (alkoksi ili amino), vezane na tautomerni fragment, povećavaju taj učinak (Eberlin i Williams, 2002; Rappoport i Yamataka, 2000; Sklenak i sur., 1998). Suprotno djeluju elektron-akceptor (poput nitro skupine), omogućavajući delokalizaciju elektrona (Angelini i sur., 2007). Stabilnost tautomera povećava uspostava aromatizacije, produžene konjugacije ili formiranje intramolekulske vodikove veze (McCann i sur., 2015). Doprinos stabilizaciji, odnosno destabilizaciji pojedinog oblika daju i sterički učinci te elektrostatsko odbijanje (Angelini i sur., 2007). Uvjeti u kojima se molekula nalazi, poput temperature, tlaka, agregatnog stanja, otapala, prisutnosti kiselina, baza, iona ili radikala te vezanje na aktivno mjesto proteina također mogu promijeniti odnos među tautomerima (Raczyńska i sur., 2005).

1.3. Mehanizam tautomerne konverzije

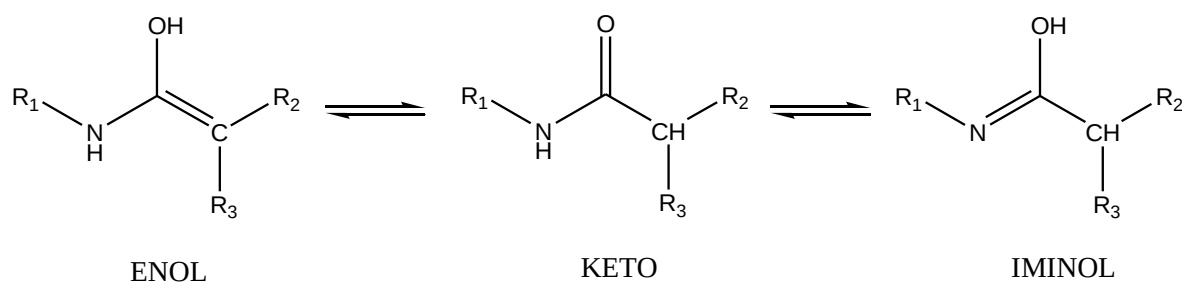
Tautomerizacija se može odvijati direktnim intramolekulskim prijenosom vodika s kiselog centra molekule na bazični centar. Takav prijenos najčešće se odvija u plinovitoj fazi ili aprotičnim otapalima i zahtijeva prisutnost funkcionalnih skupina u molekuli koje su jake kiseline, odnosno baze. U slučajevima keto-enolne tautomerije, kiseli i bazični centri uglavnom su slabi ($pK_a > 14$) te se tautomerizacija odvija uz katalizator. Katalizator je najčešće polarno protično otapalo, poput vode ili etanola, koje formira kompleks s tautomernom molekulom (Raczyńska i sur., 2005).

Molekule vode u kompleksu s tautomernom molekulom olakšavaju tautomerizaciju formirajući tzv. *vodeni most* (Sun i sur., 2005). Molekula vode izvrstan je posrednik u prijenosu protona zbog svojih amfiprotičnih svojstava (Alagona i sur., 2010). Proton se prenosi s kiselog centra tautomerne molekule na prvu molekulu vode u lancu. Ta molekula vode potom predaje vlastiti proton susjednoj molekuli, koja svoj proton predaje bazičnom centru. Pretpostavlja se da formiranje vodenog mosta snižava energetska barijeru tautomerne konverzije zbog formiranja vodikovih veza koje stabiliziraju parcijalni naboj prijelaznog stanja te zbog optimizacije geometrije prijelaznog stanja (D'Cunha i sur., 2013). Most od jedne ili dviju molekula vode omogućuje uspostavu šesteročlanog ili osmeročlanog prstena u prijelaznom stanju, što je znatno energetski povoljnije od napetog četveročlanog prstena koji se formira tijekom direktnog prijenosa protona (Valadbeigi i Farrokhpour, 2015).

Kiseline i baze također kataliziraju tautomernu konverziju. Opća kiselina protonira bazični centar te njezina konjugirana baza uzima proton s kiselog centra molekule (Lienhard i Wang, 1969). Suprotno tome, opća baza uzima proton kiselim centru, a potom konjugirana kiselina predaje proton bazičnom centru (Perrin, 1989). Ketonizacija (povratak u keto oblik), uključuje identične procese, ali obrnutim redoslijedom (Chiang i sur., 1988).

1.4. Kompeticija keto-enolne i keto-iminolne tautomerije

Molekule koje u strukturi sadrže više od dviju konjugiranih kiselih i bazičnih funkcionalnih skupina mogu postojati u više tautomernih oblika, tj. njihova je tautomerna ravnoteža složena (Raczyńska i sur., 2005). Enolizacija i iminolizacija kompetitivni su procesi u molekuli koja posjeduje $-CH-C(=O)-NH-$ fragment (Sklenak i sur., 1998). Zastupljenost pojedinog oblika ovisi o njihovoj relativnoj stabilnosti (Filipović i Lipanović, 1995).



Slika 1. Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija u molekulama s -CH-C(=O)-NH-fragmentom.

U amidnim sustavima očekuje se najveća stabilnost keto tautomera, jer velika elektronegativnost kisika dovodi do odvlačenja π -elektrona prema karbonilu i formiranja dvostruke veze C=O (Raczyńska i sur., 2005). Uz to, amino skupina vezana na karbonil djeluje kao elektron-donor. Kompeticija enolizacije i iminolizacije proučavana je na određenim sustavima poput acetamida (Sklenak i sur., 1998), sukcinimida (Valadbeigi i Farrokhpour, 2015), hidantoina (Allegretti i sur., 2000), N-hidroksiureje (Remko i von der Lieth, 2004) te lijekovima poput prilokaina (Heshmatipour i sur., 2016). Tim je pokusima potvrđena teorijska pretpostavka da će najstabilniji i najzastupljeniji biti keto tautomer. U svim navedenim slučajevima iminolni oblik bio je značajno stabilniji od enola. Dušik ima manji afinitet prema protonu od ugljika, stoga lakše otpušta proton formirajući iminolni tautomer (Hare i sur., 2001). Međutim, inverzija redoslijeda stabilnosti enola i iminola utvrđena je kod barbiturne kiseline (Delchev, 2004; Senthilkumar i Kolandaivel, 2002), što upućuje na zaključak da relativna stabilnost enola u odnosu na iminol ovisi o strukturnim svojstvima molekule, kao što su supstituenti, mogućnost produžene konjugacije ili stvaranja intramolekulske vodikove veze.

1.5. Važnost tautomerizacije

Organska kemija, biokemija, farmaceutska kemija, farmakologija, molekularna biologija samo su neke od disciplina u kojima se znanstvenici često susreću s tautomernim sustavima. Ljudski organizam prepun je tautomera, počevši od bioamina poput histamina, aminokiselina (histidin, arginin), dušičnih baza i profirina. Razumijevanje procesa

tautomerizacije važno je u rasvjetljavanju mehanizama mnogih organskih i biokemijskih procesa (Raczyńska i sur., 2005).

Tautomeri se međusobno razlikuju po fizikalno-kemijskim osobinama i reaktivnosti (Guasch i sur., 2015). Već je spomenuto da tautomeri imaju različite vrijednosti konstante disocijacije kiseline. Uz to, razlikuju se i u hidrofobnosti. Vrijednosti $\log P$, omjera koncentracije molekule u oktanolu i vodi, variraju s promjenom sastava tautomerne smjese. Budući da o hidrofobnosti ovise apsorpcija, distribucija i mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, tautomerni oblici imat će različitu sposobnost penetracije u tkiva (Connolly Martin, 2009).

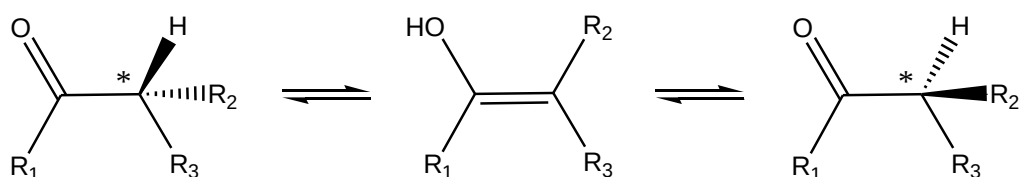
C=C i C=N dvostruke veze prisutne u enolima i iminolima dobre su mete nukleofilnog napada (D'Cunha i sur., 2013), zbog čega su enolni i iminolni tautomeri često identificirani kao reaktivni međuprodukti u adicijskim i supstitucijskim reakcijama. Halogeniranje (Eberlin i Williams, 2002; Nanda i sur., 1999) i deuteriranje benzodiazepina (Yang, 1997; Yang i Bao, 1994); nitrozilacija malonske kiseline i elektrofilne supstitucije na malonamidu; adicija alkohola na ketene; adicija vode na ketenimine ili adicija tritilnog kationa na acetanhidrid (Sklenak i sur., 1998) potvrđene su reakcije čiji mehanizam uključuje formiranje enolne specije. Iminolni tautomer ključan je u reakcijama kloriranja (Šakić i sur., 2014) i alkiliranja (Mishra i sur., 2006) amida. Tautomeri se također mogu razlikovati u stabilnosti. Identifikacija tautomera koji je stabilniji na zraku ima primjenu u farmaceutskoj tehnologiji (Pertejo i sur., 2014).

Tautomerni oblici mogu pokazivati različit afinitet vezanja za proteine plazme, enzime i receptore. To može biti posljedica promjene najzastupljenijeg konformera molekule, jer se tautomeri mogu razlikovati u najstabilnijoj konformaciji koju poprimaju. Isto tako, ponekad je konverzija u manje stabilan tautomer potrebna za uspostavu najpovoljnijih van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija s aktivnim mjestom (Nagy, 2016). Primijećeno je da proteini često velikim afinitetom vežu upravo tautomer koji u vodenoj otopini postoji u vrlo malom udjelu (Connolly Martin, 2009).

Konačno, ksenobiotici nisu jedine molekule podložne tautomernoj konverziji. Ona se odvija u ljudskom organizmu, s mogućim ozbiljnim posljedicama. Tautomerizacija dušičnih baza dovodi do točkastih mutacija zbog pogrešnog sparivanja prilikom sinteze DNA (Wojnarowska i sur., 2011; Alagona i sur., 2010). Struktura enzima i receptora može se izmijeniti enolizacijom amidnih skupina i posljedičnom racemizacijom peptida. *D*-enantiomeri aminokiselina pronađeni su u životinjskim tkivima (Rappoport i Yamataka, 2000).

1.6. Racemizacija

Dvije molekule koje se razlikuju samo u prostornom rasporedu dviju skupina na asimetričnom C-atomu međusobno su kiralne i nazivaju se enantiomerima. Smjesa jednakih udjela oba enantiomera naziva se racemičnom smjesom. Racemizacija je proces u kojem enantiomerno čisti spoj prelazi u racemičnu smjesu (Pine, 1994). Racemizacija je posljedica enantiomerne konverzije, koja se može odvijati preko tautomernog međuprodukta (Slika 2)



Slika 2. Enolizacija kao mehanizam racemizacije

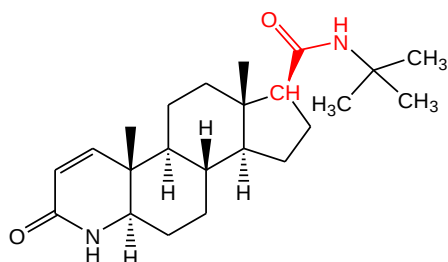
Eliminacijom protona gubi se kiralni centar. U 50% slučajeva, prilikom ponovne ketonizacije doći će do inverzije konfiguracije jer proton može prići ugljikovu atomu s obje strane molekule.

Racemizacija kiralnih molekula od iznimne je važnosti za farmaceutsku kemiju, jer se enantiomeri razlikuju u reaktivnosti s drugim kiralnim molekulama, poput enzima i receptora. Stoga enantiomeri mogu imati različita farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, a samim time i različite terapijske ili neželjene učinke (Smith, 2009). Najpoznatiji primjer dramatičnih razlika u djelovanju enantiomera svakako je talidomid. *R*-talidomid siguran je lijek sa sedativnim i antiemetičkim učinkom, dok je *S*-talidomid snažan teratogen. Teratogeni učinci *S*-talidomida otkriveni su tek nakon pet godina njegove široke upotrebe kao antiemetika u trudnoći, što je dovelo do rađanja 10.000 djece s teškim malformacijama (Kim i Scialli, 2011; Teo i sur., 2004). Terapijska primjena enantiomerno čistog *R*-talidomida nije moguća zbog brze racemizacije u organizmu, koja se odvija upravo preko enolnog tautomera (Tian i sur., 2012).

1.7. Tautomerizacija u farmaceutskoj kemiji

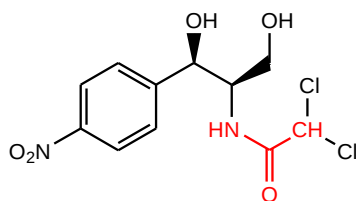
Procjenjuje se da oko četvrtina lijekova danas na tržištu ima mogućnost tautomerizacije. (Connolly Martin, 2009). Keto-enolna i keto-iminolna tautomerija posebno su često

zastupljene. Pretraživanjem literature pronađeno je više od 85 farmaceutika koji posjeduju -CH-C(=O)-NH- fragment, te mogu formirati enole i iminole (Francetić, ured., 2015; Katzung i Trevor, ured., 2015; Kim i sur., 2011). S tog popisa izdvojeno je 15 lijekova za ovo istraživanje (Slika 3).



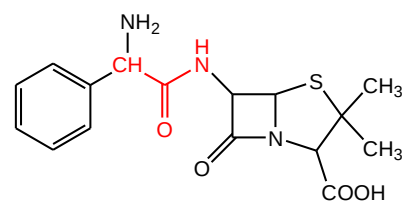
1, finasterid (Mostrafin®)

G04CB01



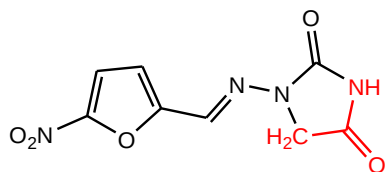
2, kloramfenikol (Chloramphenicol®)

J01BA01



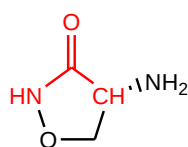
3, ampicilin (Ampicilin Sandoz®)

J01CA01



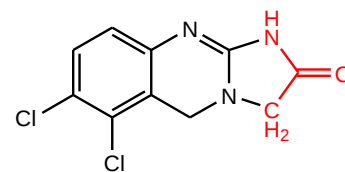
4, nitrofurantoin (Ninur®)

J01XE01



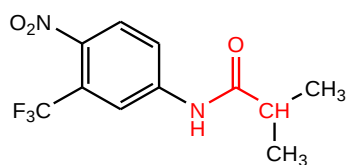
5, cikloserin (Seromycin®)

J04AB01



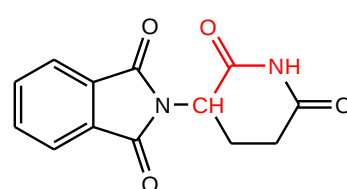
6, anagrelid (Thromboreductin®)

L01XX35



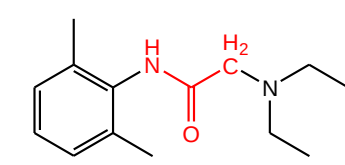
7, flutamid (Prostandril®)

L02BB01



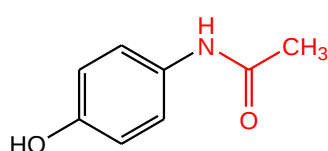
8, talidomid (Thalidomide Celgene®)

A04AX02



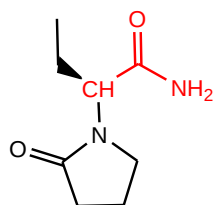
9, lidokain (Dolokain®)

N01BB02/C01BB01



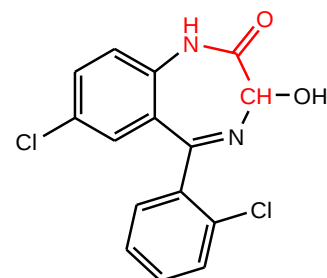
10, paracetamol (Lupocet®)

N02BE01



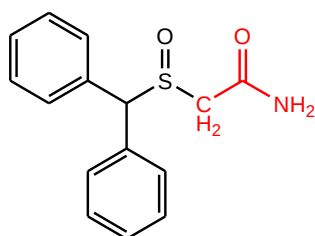
11, levetiracetam (Nirval®)

N03AX14



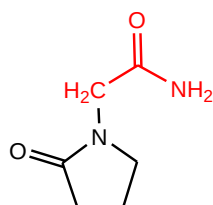
12, oksazepam (Praxiten®)

N05BA04



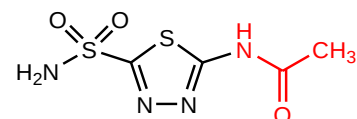
13, modafinil (Provigil®)

N06BA07



14, piracetam (Oikamid®)

N06BX03



15, acetazolamid (Diamox®)

S01EC01

Slika 3. Odabrani lijekovi s $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragmentom. Uz strukturu molekule navedeno je generičko i trgovačko ime te ATK šifra. Traženi fragment označen je crveno.

1.8. Djelovanje i značaj odabranih lijekova

ATK (anatomsko-terapijsko-kemijski) klasifikacijski sustav lijekove svrstava u 14 glavnih skupina, s obzirom na sustav organa na koji djeluju (Francetić, ured., 2015). U ovom istraživanju ispitivani su lijekovi iz pet skupina: lijekovi s učinkom na urogenitalni sustav, lijekovi za liječenje sustavnih infekcija, lijekovi za liječenje zloćudnih tumora, lijekovi s učinkom na živčani sustav te lijekovi s učinkom na osjetila. Odabrani lijekovi pripadaju različitim podskupinama s obzirom na terapijsku primjenu i kemijsku strukturu, demonstrirajući učestalost amidnog fragmenta u strukturi lijekova.

Prema ATK sustavu, skupina G obuhvaća lijekove za liječenje bolesti urogenitalnog sustava i spolne hormone. Jedini predstavnik te skupine je finasterid. Finasterid je po mehanizmu djelovanja inhibitor 5- α -reduktaze, koji se koristi u terapiji benigne hiperplazije prostate (Matijević i sur., 2015).

Skupina J (lijekovi za liječenje sustavnih infekcija) ima četiri predstavnika: kloramfenikol, ampicilin, nitrofurantoin i cikloserin. Sva su četiri lijeka antibiotici, no kloramfenikol, ampicilin i nitrofurantoin imaju široki spektar djelovanja pa se koriste za sustavne bakterijske infekcije, dok je cikloserin isključivo antituberkulotik (Francetić i sur., 2015). Kloramfenikol je inhibitor sinteze bakterijskih proteina. Danas mu je primjena ograničena na infekcije oka, gdje pokazuje učinkovitost zbog dobrog prodiranja u očno tkivo (Deck i Winston, 2015b). Ampicilin je β -laktamski antibiotik, inhibitor sinteze bakterijske stanične stijenke. Koristi se u liječenju mnogih sustavnih infekcija (Francetić i sur., 2015). Nitrofurantoin je antimikrobni lijek koji oštećuje bakterijsku DNA. Primjenjuje se kao prva linija terapije nekomplikiranih infekcija donjih mokraćnih puteva (Deck i Winston, 2015a; Francetić i sur., 2015). Cikloserin djeluje kao inhibitor sinteze stanične stijenke bakterije *M. tuberculosis*. Danas se primjenjuje specifično protiv oblika tuberkuloze rezistentnih na primarnu terapiju (Caminero i sur., 2010).

Anagrelid, flutamid i talidomid pripadaju skupini L (zloćudni tumori i imunomodulacija), no prema terapijskom djelovanju veoma se razlikuju (Vrhovac i sur., 2015). Anagrelid je jedini poznati selektivni inhibitor proliferacije megakariocita, koji se koristi u terapiji esencijalne trombocitemije te ima potencijal primjene i u drugim mijeloproliferativnim bolestima (Pescatore i Lindley, 2000). Flutamid suprimira učinak testosterona (antagonist je androgenih receptora) i primjenjuje se kod karcinoma prostate (Vrhovac i sur., 2015). Talidomid se svrstava u ovu skupinu zbog imunomodulacijskog, protuupalnog i antineoplastičkog djelovanja, jer se kao sedativ/hipnotik više ne primjenjuje. U

Hrvatskoj je registriran kao prva linija liječenja multiplog mijeloma u bolesnika starijih od 65 godina ili nepogodnih za visoke doze kemoterapije, dok je u SAD-u odobren za terapiju komplikacija lepore (Vrhovac i sur., 2015; Teo i sur., 2004).

Skupina N (lijekovi za živčani sustav) ima čak šest predstavnika. Lidokain spada u podskupinu lokalnih anestetika. Danas je zlatni standard naspram kojeg se svi novi lokalni anestetici uspoređuju (Drasner, 2015). Uz to je antiaritmik male kardiotoksičnosti i lijek izbora za prekidanje ventrikularne tahikardije (Hume i Grant, 2015), stoga ga se opravdano može stvrstati i u skupinu C (lijekovi za liječenje bolesti kardiovaskularnog sustava). U podskupini lijekova za liječenje boli nalazi se paracetamol, jedan od najpopularnijih analgetika i antipiretika te jedan od najčešće korištenih lijekova kod djece. Paracetamol zauzima 50. mjesto na popisu najkorištenijih lijekova u Hrvatskoj u 2015. godini (Bertolini i sur., 2006; www.halmed.hr). Sljedeći lijek je levetiracetam, antiepileptik oksopirolidonske strukture, posebno učinkovit protiv parcijalnih konvulzivnih napadaja (Ivančan i sur, 2015; Porter i Meldrum, 2015). Iz podskupine anksiolitika prisutan je oksazepam, benzodiazepin koji djeluje kao depresor središnjeg živčanog sustava. Među komercijalno je najuspješnijim lijekovima, zauzimajući 45. mjesto na popisu 50 najkorištenijih lijekova u Hrvatskoj (Trevor, 2015; www.halmed.hr). Konačno, čak dva lijeka pripadaju podskupini psihostimulansa i nootropika. Modafinil je lijek za rijetke bolesti, odobren za terapiju narkolepsije u SAD-u. Posjeduje simpatomimetički učinak, potiče budnost i aktivnost središnjeg živčanog sustava. Aktivno se ispituje za brojne druge indikacije poput miotonične distrofije, traumatskih ozljeda mozga, poremećaja nedostatka pažnje i hiperaktivnosti, depresije itd. (Kumar, 2008). Piracetam je u Hrvatskoj registriran za terapiju disleksije, afazije i mioklonusa, a ima veliki potencijal terapije drugih poremećaja moždane funkcije (Ivančan i sur, 2015; Malykh i Sadaie, 2010).

Na kraju, jedini predstavnik skupine S (lijekovi s učinkom na osjetila) je acetazolamid. Acetazolamid je oftalmik s diuretičkim učinkom, najčešće korišten kod glaukoma, premda ima primjenu i u liječenju epilepsije. Zanimljiv je kao prototip inhibitora karboanhidraze. (Sam i sur., 2015; Porter i Meldrum, 2015).

Svi odabrani lijekovi danas su u kliničkoj primjeni. Ukupno se primjenjuju za više od 30 indikacija i ukorijenjeni su u modernoj medicinskoj praksi. Uz iznimku modafinila, svi su lijekovi dostupni na hrvatskom tržištu (Francetić, ured., 2015). S obzirom na njihovu raširenost, od velike je važnosti prikupljanje znanja o molekulskim karakteristikama ovih supstanci. Gibbsove energije tautomera ovih molekula računane su po prvi puta u ovom radu.

2. Obrazloženje teme

Primarne osobine svakog lijeka su učinkovitost i sigurnost. Za razumijevanje tih osobina, potrebno je karakterizirati sve aspekte molekule koji na njih mogu imati utjecaja. To obuhvaća i istraživanje tautomerizacije. Tautomerne specije imaju različitu raspodjelu elektrona u strukturi, oblik molekule, fizikalno-kemijska svojstva i reaktivnost. Sklonost lijeka tautomernoj konverziji utječe stoga na sve aspekte farmakokinetike i farmakodinamike (apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju, djelovanje i toksičnost). Uz to, tautomerizacija je jedan od mehanizama enantiomerne konverzije.

U ovom se radu namjeravaju po prvi put ispitati relativne stabilnosti tautomera određenih farmaceutika. Iako je značaj tautomerizacije za reaktivnost i svojstva organskih molekula prepoznat, primjena tih spoznaja u farmaceutskoj kemiji ostaje ograničena. Brojni lijekovi sadrže strukturne elemente koji omogućuju stvaranje tautomernih formi. Određivanje Gibbsove slobodne energije keto, enolnog i iminolnog oblika svake molekule omogućit će uvid u sastav tautomerne smjese tih spojeva, a time i procjenu sklonosti određenim reakcijama.

Odabrani spojevi važni su i često korišteni lijekovi u modernoj medicini te se svakodnevno primjenjuju na velikom broju pacijenata. Produbljivanje znanja o njihovim svojstvima izvan i unutar ljudskog organizma ključno je za interpretaciju farmakokinetičkih i farmakodinamičkih obilježja lijeka, razvoj učinkovitijih i sigurnijih načina liječenja te dizajn strukturnih analoga poboljšanih svojstava.

U istraživanju se koriste računalne metode elektronske strukture koje omogućuju istraživanje nestabilnih i kratkoživućih specija, čija je eksperimentalna detekcija i/ili izolacija *in vitro* otežana ili onemogućena.

3. Materijali i metode

3.1. Računalna kemija

Računalna kemija bavi se proučavanjem kemijskih struktura i reakcija pomoću računalnih modela. Modeli omogućavaju proučavanje struktura i reakcija bez upotrebe eksperimentalnog rada. Energija molekule i svojstva povezana s energijom mogu se određivati *in silico* koristeći računalne programe. Molekulsko-mehanički programi koriste zakone klasične (njutnovske) fizike, dok se kvantno-mehanički programi, korišteni u ovom radu, temelje na zakonima kvantne mehanike.

3.2. Konformacijska analiza

Rotacijski konformeri (rotameri) su oblici iste molekule nastali rotacijom oko jednostrukih veza. Iz razlike u orijentaciji pojedinih funkcionalnih skupina proizlazi razlika u energiji, jer pojedini položaji dovode do nepovoljnih elektronskih ili steričkih interakcija. Kako bi se dobio najtočniji dojam o energetske razlikama dvaju tautomera, potrebno je uspoređivati Gibbsove energije najstabilnijih rotamera. Stoga se provodi konformacijska analiza, tj. određuje se energija svakom rotameru kako bi se identificirao najstabilniji. Broj mogućih rotamera molekule ovisi o broju jednostrukih veza i međusobno različitih atoma u njezinoj strukturi. Za jednostavne molekule s manjim brojem rotamera konformacijska analiza provedena je „ručno“, upotrebom programa za vizualizaciju struktura GaussView. Za pronalaženje konformera velikih molekula korišten je program za molekulsko modeliranje PCMODEL. PCMODEL pretražuje strukturu rotirajući odabrane veze za unaprijed zadane kuteve i/ili nasumično mijenjajući koordinate određenih atoma kako bi molekuli promijenio oblik. Ručnom ili računalnom pretragom generirane su početne strukture, koje je potrebno optimizirati kako bi se pronašli stabilni konformeri.

3.3. Geometrijska optimizacija strukture

Geometrijska optimizacija je postupak lociranja stacionarnih točaka na plohi potencijalne energije (PES – Potential Energy Surface). Ploha potencijalne energije složena je matematička funkcija koja opisuje ovisnost energije o udaljenostima između atoma u molekuli. Promjenom udaljenosti mijenja se i energija te je moguće računati gradijent energije kao prvu derivaciju navedene funkcije. Mjesto na plohi potencijalne energije u kojem je

gradijent energije jednak nuli, naziva se stacionarnom točkom i može predstavljati minimum ili maksimum energije. Minimum na plohi potencijalne energije predstavlja stabilnu konformaciju molekule, dok maksimum predstavlja prijelazno stanje. Globalni minimum odgovara najstabilnijoj konformaciji, tj. onoj najniže energije.

Početna struktura molekule, preuzeta iz baze podataka ili generirana u programu za vizualizaciju poput GaussViewa, uglavnom ne odgovara minimumu, nego određenoj točki u njegovoj blizini. Stoga je strukturu potrebno modificirati geometrijskom optimizacijom dok se ne locira minimum. Geometrijska optimizacija je iteracijski postupak kojim se koordinate atoma mijenjaju u smjeru snižavanja energije sustava, čime se mijenjaju geometrijski parametri molekule (duljine veza, vezni i diedarski kutevi, rotacije). Svaku promjenu koordinata prati promjena energije. Optimizacija se kreće u smjeru smanjenja energije sustava, što se očituje negativnom vrijednošću gradijenta energije. Postupak je završen kad se iznos prve derivacije funkcije snizi ispod određenog konvergencijskog praga, tj. postane približno jednak nuli.

3.4. Izračun Gibbsove energije

Za određivanje iznosa Gibbsove energije sustava potrebno je provesti frekvencijski račun. Frekvencijskim računom izračunavaju se više derivacije energije u ovisnosti o međuatomskim udaljenostima, čime se dobivaju vibracije atoma u molekuli. Minimum na plohi potencijalne energije ne uzima u obzir vibracijsko gibanje, već daje samo iznos ukupne elektronske energije. Stvarne molekule uvijek se nalaze u nekom vibracijskom stanju. Elektronskoj energiji pribraja se energija najnižeg vibracijskog stanja (tzv. korekcija nulte točke), a zatim se pribrajaju i doprinosi translacijskog, rotacijskog i vibracijskog gibanja koji proizlaze iz frekvencijskog računa. Time se dobivaju entalpija i entropija, iz kojih se izračuna Gibbsova energija, kao entalpija umanjena za umnožak entropije i apsolutne temperature. Analiza se standardno provodi na temperaturi od 298.15 K i tlaku od 1 atm, koristeći pritom osnovne izotope za svaki element. Frekvencijski račun također potvrđuje da optimizirana struktura odgovara minimumu na plohi potencijalne energije (sve vibracije moraju biti pozitivne).

3.5. Korištene metode

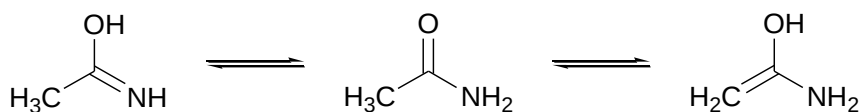
Konformacijska analiza određenih molekula provedena je koristeći program PCMODEL. Zadano polje sila bilo je MMX, jer omogućuje modeliranje i neutralnih i anionskih struktura. Pretraga je provedena metodom rotacije jednostrukih veza za unaprijed zadane kuteve (stohastičko pretraživanje nije uključeno). Analiza je obuhvatila sve konformere u energijskom rasponu od 10 kcal/mol od najstabilnije pronađene strukture. Geometrijske optimizacije, frekvencijski račun i solvacijski računi provedeni su uz upotrebu programskog paketa Gaussian09. Za vizualizaciju rezultata korišten je program GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.). Svi računi provedeni su na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu (www.srce.hr) i klasteru Andrija Zavoda za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (andrija.pharma.hr). Za optimizaciju struktura korišten je DFT funkcional B3LYP. Za opis molekulskih orbitala neutralnih molekula korišten je bazni skup 6-31G(d), a za anione 6-31+G(d).

4. Rezultati i rasprava

Studija je provedena na 15 farmaceutika s $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragmentom. Kriteriji za odabir molekula bili su: a) klinička važnost, b) strukturna raznolikost (različit „kemijski okoliš“ promatranog fragmenta) i c) veličina, odnosno jednostavnost molekule, kako izvršenje računa ne bi bilo komputacijski i vremenski prezahtjevno. Za sve molekule izračunata je Gibbsova energija keto, enolnog i iminolnog tautomera, te su određene relativne Gibbsove energije kao razlike energija enola/iminola i pripadnog keto oblika. Za sve je tautomere provedena konformacijska analiza i za usporedbu korišten najstabilniji konformer. Dodatno su računate energije C i N aniona svake molekule, kako bi se ispitalo odgovaraju li razlike stabilnosti enola i iminola razlikama stabilnosti pripadnih aniona.

4.1. Relativne Gibbsove energije keto, enolnih i iminolnih tautomera

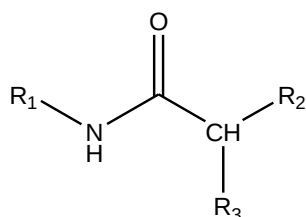
Acetamid je najmanja struktura koja sadrži $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragment (Slika 4) i kao takva prikladan kemijski sustav za komparativno proučavanje tautomera. Relativne Gibbsove energije tautomera acetamida prvi su računali Sklenak i suradnici (1998.). U ovom su radu ti računi ponovljeni na B3LYP/6-31G(d) teorijskoj razini, kako bi se omogućila usporedba s ostalim istraživanim molekulama. Keto tautomer acetamida je najstabilniji. U odnosu na keto oblik, relativna Gibbsova energija enola iznosi +136,8 kJ/mol, a iminola +63,5 kJ/mol. Ove će se vrijednosti koristiti za usporedbu s energijama istraživanih lijekova (Sklenak i sur, 1998).



Slika 4. Tautomerne ravnoteže u strukturi acetamida.

Slika 5 prikazuje fragment strukture podložan tautomerizaciji, koji je zajednički svim ispitivanim lijekovima. Molekule lijekova međusobno se razlikuju u strukturi i funkcionalnim skupinama vezanim za taj fragment. Stabilnost tautomera svake molekule ovisit će o vrsti i položaju atoma i kemijskih veza u blizini fragmenta. Svim se molekulama energija računa u plinovitoj fazi (u vakuumu), što omogućuje usporedbu intrinzičnih efekata molekulske

strukture (supstitucijskih efekata) na stabilnost tautomera. Relativne Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog oblika lijekova prikazane su u tablici 1.



Slika 5. Strukturni fragment karakterističan za sve istraživane lijekove.

Tablica 1. Funkcionalne skupine vezane za -CH-C(=O)-NH- fragment odabranih lijekova (1-15) te relativne Gibbsove energije keto, enolnog i iminolnog tautomera izračunate na B3LYP/6-31Gg(d) teorijskoj razini u vakuumu. Crveno su označene najveće, a zeleno najmanje vrijednosti ΔG_{298} za svaki tautomerni oblik.

LIJEK	FUNKCIONALNE SKUPINE VEZANE ZA PROMATRANI FRAGMENT			ΔG_{298} (kJ/mol)		
	R1	R2	R3	keto	iminol	enol
1, finasterid	-C(CH ₃) ₃	-CH ₂ R	-CR ₃	0,0	83,7	126,2
2, kloramfenikol	-CHR ₂	-Cl	-Cl	0,0	62,7	113,6
3, ampicilin	-CHR ₂	-Ar	-NH ₂	0,0	63,7	90,8
4, nitrofurantoin	-C(=O)-NR ₂	-NR ₂	-H	0,0	70,9	107,8
5, cikloserin	-O-R	-NH ₂	-CH ₂ R	0,0	27,1	104,1
6, anagrelid	-CR=NR	-NR ₂	-H	0,0	71,8	117,0
7, flutamid	-Ph	-CH ₃	-CH ₃	0,0	58,1	111,0
8, talidomid	-C(=O)-R	-N-C(=O)-R	-CH ₂ R	0,0	82,2	78,7
9, lidokain	-Ph	-NR ₂	-H	0,0	51,2	100,0
10, paracetamol	-Ph	-H	-H	0,0	59,2	134,7
11, levetiracetam	-H	-N-C(=O)-R	-CH ₂ CH ₃	0,0	63,3	105,2
12, oksazepam	-Ph	-OH	-N=R	0,0	43,9	101,1
13, modafinil	-H	-S(=O)-R	-H	0,0	78,8	76,0
14, piracetam	-H	-N-C(=O)-R	-H	0,0	61,7	99,0
15, acetazolamid	-Ar	-H	-H	0,0	29,1	124,5

Iz rezultata je vidljivo da je keto oblik najstabilniji tautomer u svim slučajevima. Takav je rezultat u skladu s literaturnim navodima o stabilnosti keto oblika amida. U 13 od 15 slučajeva iminolni tautomer stabilniji je od enola, što je također sukladno literaturnim podacima. Inverzija stabilnosti izračunata je u 2 slučaja (talidomid, 8 i modafinil, 13), što je objašnjivo s obzirom da je struktura tih molekula u enolnom obliku stabilizirana produženom konjugacijom, odnosno vodikovom vezom. Uz iznimku tih dvaju lijekova, relativne energije enolnih tautomera veće su od 80 kJ/mol, stoga je njihov udio u ravnotežnoj smjesi tautomera neznatan. Također, samo su iminoli cikloserina (5) i acetazolamida (15) dovoljno stabilni ($\Delta G < 30$ kJ/mol) kako bi se njihov udio u tautomernoj smjesi mogao smatrati značajnim.

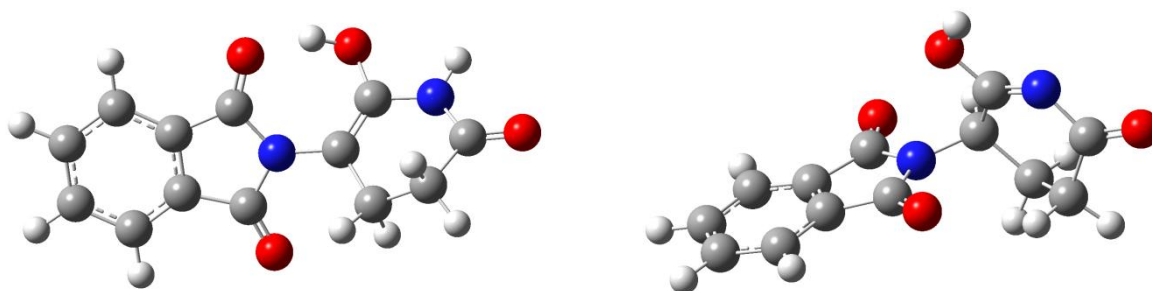
Relativne Gibbsove energije iminola kreću se od +27,1 kJ/mol (cikloserin, 5) do +83,7 kJ/mol (finasterid, 1). U usporedbi s relativnom Gibbsovom energijom iminola acetamida (+63 kJ/mol), u pojedinim molekulama lijekova dolazi do stabilizacije, a u drugim do relativne destabilizacije. Na stabilnost iminola cikloserina (5) utječe atom kisika vezan za amidni dušik. Kisik kao elektronegativan element delokalizira π -elektrone i stabilizira C=N vezu iminolne forme. Drugi po redu, samo 2 kJ/mol nestabilniji, jest iminol acetazolamida (15). U acetazolamidu amidni je dušik vezan za heteroaromatski prsten (tiadiazol). Aromatski sustavi također imaju učinak delokalizacije elektrona, a u iminolnom obliku acetazolamida dolazi do produžene konjugacije, što dodatno stabilizira sustav. Poznato je, naime, da su konjugirani sustavi stabilniji od nekonjugiranih (Pine, 1994). Iminoli u kojima je na amidni dušik vezan benzenski prsten: flutamid (7), lidokain (9), paracetamol (10) i oksazepam (12), također su stabilizirani. Ipak, njihove relativne Gibbsove energije iznose 40-60 kJ/mol, što upućuje na zaključak da je benzen manje efektan u stabilizaciji iminolne forme. Relativne Gibbsove energije iminola N-nesupstituiranih molekula (levetiracetam, 11 i piracetam, 14), kao i energija iminola kloramfenikola (2) i ampicilina (3) (kojima je supstituent alkil), približno odgovaraju vrijednosti dobivenoj za iminolni oblik acetamida. U slučaju ampicilina i kloramfenikola, moguće je zaključiti da alkilni supstituent nema značajniji utjecaj na stabilnost iminolne specije. Iminol modafinila (13) također nema supstituent na N atomu, međutim njegov rezultat odskake od ostalih za +15 kJ/mol. Relativna nestabilnost iminolne forme modafinila posljedica je zapravo stabilizacije keto tautomera intramolekulskom N-H $\cdots$ O vodikovom vezom, koja je slabija u iminolnom obliku. Destabilizacija iminolnih formi nitrofurantoina (4) i anagrelida (6) može se objasniti povećanom napetošću peteročlanog prstena unutar kojeg se formira dvostruka C=N veza. Energijski nepovoljna napetost prstena očito nije kompenzirana produljenom konjugacijom do koje dolazi u iminolnim formama tih dvaju lijekova. Nestabilnost iminolne forme talidomida (8) može se objasniti nepovoljnom

interakcijom elektronskog oblaka slobodnog elektronskog para kisika iz iminolnog fragmenta sa slobodnim elektronskim parom dušika ftalimidne skupine. Konačno, najnestabilniji iminol (finasterid, 1) za supstituent ima *t*-butil, sterički zahtjevnu alkilnu skupinu. Premda u slučaju kloramfenikola i ampicilina nije primijećen znatniji efekt, u ovom slučaju alkilna skupina mjerljivo destabilizira iminol. Uzrok destabilizacije vjerojatno su sterički efekti.

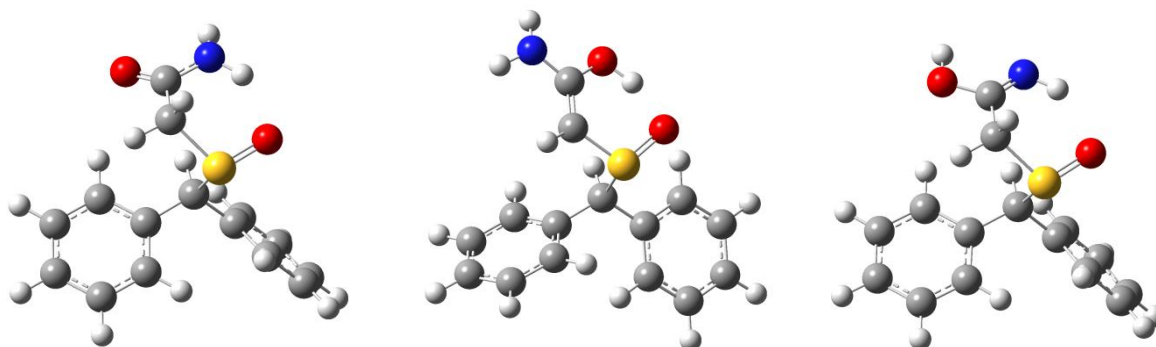
Relativne Gibbsove energije enolnih formi variraju od +76,0 kJ/mol do +134,7 kJ/mol. Najstabilniji su enoli modafinila (13) i talidomida (8). U slučaju modafinila, enol stabilizira sulfoksidna skupina, već prikazanim mehanizmom delokalizacije zbog produžene konjugacije. Također, u enolnom obliku prisutna je O-H $\cdots$ O vodikova veza, koja je snažnija od N-H $\cdots$ O veze u keto formi. U slučaju talidomida, stabilizacija enolne strukture također se temelji na formiranju intramolekulske O-H $\cdots$ O vodikove veze. Enolna forma ampicilina (3) također je relativno stabilizirana, zbog produljene konjugacije s benzenskim prstenom (uz amino skupinu koja se također nalazi na ugljiku). Većina lijekova ima relativne energije enolnih formi u rasponu 100-120 kJ/mol. Enole nitrofurantoina (4), cikloserina (5), anagrelida (6), lidokaina (9), levetiracetama (11) i piracetama (14) stabiliziraju amino ili amidne skupine, dok je enol oksazepam (12) supstituiran hidroksilnom skupinom. Najsnajzniji učinak vidljiv je kod amida, što je ponovno rezultat produžene konjugacije. Amino i hidroksilna skupina nisu jaki stabilizatori vjerojatno zbog svojeg dvojakog učinka: induktivno elektron-akceptorsko djelovanje olakšava formiranje C=C veze, ali suprotstavlja mu se rezonantan elektron-donorski efekt. Primarni amini jače stabiliziraju od sekundarnih. Iz usporedbe piracetama (14) i levetiracetama (11), molekula koje se razlikuju samo u R₃ supstituentu, može se krivo zaključiti da etilna skupina destabilizira enol. Poznato je, naime, da su višesupstituirani enoli (odnosno višesupstituirane C=C veze u enolu) stabilniji (Pine, 1994). No, u slučaju levetiracetama, etilna skupina sterički ometa formiranje intramolekulke vodikove veze, odnosno interakciju enolnog vodika s amidnim kisikom pa je to razlog da je nesupstituirani piracetam (derivat bez etilne skupine) relativno stabilniji. S druge strane, enol flutamida (7) na α -ugljiku ima vezane dvije metilne skupine, pa do izražaja dolazi efekt stabilizacije dvostruke veze u enolu flutamida, u odnosu na enol acetamida. Slično vrijedi za enol finasterida (1), gdje je α -ugljik vezan za peteročlani prsten steroidnog sustava. Enol kloramfenikola (2) po stabilnosti odgovara enolu flutamida, no umjesto metilnih supstituenata na α -ugljiku ima vezane kloridne skupine. Kloridni supstituent očito ima učinak analogan alkilnom. Najmanje stabilni enoli pripadaju paracetamolu (10) i acetazolamidu (15). U obje strukture nema supstituenata na α -ugljiku te se relativna Gibbsova energija enolnog oblika približava relativnoj energiji enola acetamida. Zanimljivo je da među ispitivanim strukturama

ne postoji lijek kojemu je enolna forma, u odnosu na keto oblik, manje stabilna od enolne forme acetamida. Svi promatrani supstituenti pokazuju određeni stabilizacijski učinak. Čini se da je za formiranje enola najmanje povoljan smještaj α -ugljika na terminalno mjesto u strukturi.

Talidomid i modafinil jedini su istraživani lijekovi čiji je enolni oblik stabilniji od iminolnog, stoga je posebno zanimljivo dodatno proučiti intramolekulske interakcije prisutne u tim molekulama. Enolna forma talidomida stabilizirana je intramolekulskom vodikovom vezom između OH skupine enola i ftalimidnog kisika. Ista vodikova veza može se formirati u iminolnom obliku. Međutim, u tom slučaju dolazi do nepovoljne interakcije elektronskih oblaka kisika i dušika u tautomernom fragmentu, koja poništava stabilizacijski učinak vodikove veze. Za iminolnu formu talidomida zapravo je energetski povoljnija konformacija u kojoj vodikova veza nije prisutna. U najpovoljnijoj konformaciji iminolne forme dolazi do sukoba elektronskih oblaka slobodnih elektronskih parova kisika iz iminolnog fragmenta i dušika ftalimidne skupine. U strukturi iminolnog oblika talidomida nije moguće izbjeći nepovoljne elektrostatske interakcije, što rezultira njegovom destabilizacijom u odnosu na enolni oblik. U iminolnom obliku modafinila također je moguća nepovoljna interakcija elektronskih oblaka kisika i dušika, koja se izbjegava rotacijom OH skupine. Međutim, takva konformacija omogućuje formiranje N-H $\cdots$ O vodikove veze, koja je slabija od O-H $\cdots$ O veze prisutne u enolnoj formi. Snažnija O-H $\cdots$ O vodikova veza značajno stabilizira enolni oblik, što rezultira inverzijom stabilnosti iminola i enola.



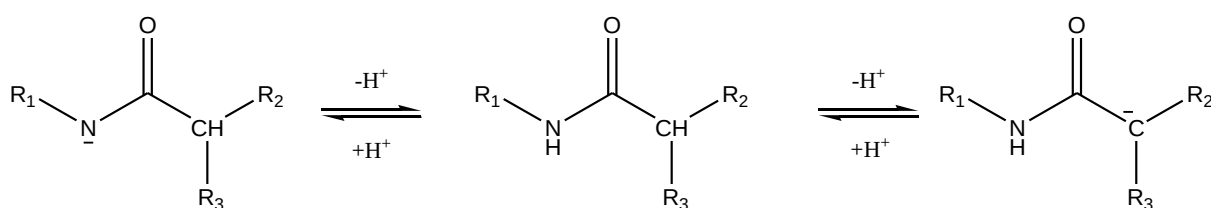
Slika 6. Struktura najstabilnijih konformera enolnog i iminolnog oblika talidomida.



Slika 7. Strukture najstabilnijih konformera keto, enolnog i iminolnog oblika modafinila.

4.2. Energije anionskih specija

U poglavlju 1.1.2. prikazana je povezanost ravnotežne konstante tautomerizacije s ravnotežnom konstantom disocijacije kiseline. Tautomerna konverzija ovisi o sposobnosti kiselog centra molekule da otpusti proton. U promatranim slučajevima molekula posjeduje dva kisela centra: amidni dušik i α -ugljik. Veća stabilnost iminola u odnosu na enol može se objasniti većom kiselošću NH u odnosu na CH položaj. Kiselost pojedine specije može se procijeniti na temelju Gibbsove energije pripadnog aniona (Slika 8). Stoga je za svaku od 15 molekula određena Gibbsova energija C i N aniona. Relativne Gibbsove energije izračunate su kao razlika energija C aniona i N aniona, te su uspoređene s razlikama energija enola u odnosu na iminol (Tablica 2).

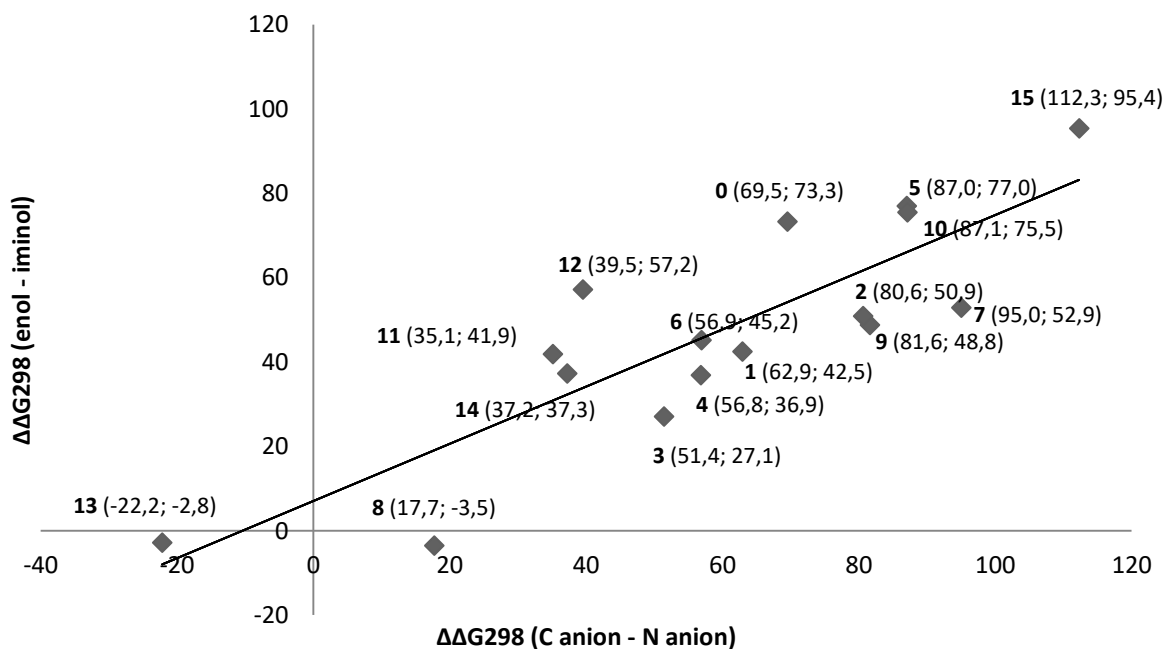


Slika 8. Reakcije disocijacije protona s N i C kiselih centara.

Tablica 2. Relativne Gibbsove energije enola odabranih lijekova (1 – 15) u odnosu na iminol, izračunate na B3LYP/6-31G(d) teorijskoj razini, te relativne Gibbsove energije pripadnih C-aniona u odnosu na N-anion, izračunate na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.

LIJEK	$\Delta\Delta G_{298}$	
	enol – iminol	C anion – N anion
0 , acetamid	73,3	69,5
1 , finasterid	42,5	62,9
2 , kloramfenikol	50,9	80,6
3 , ampicilin	27,1	51,4
4 , nitrofurantoin	36,9	56,8
5 , cikloserin	77,0	87,0
6 , anagrelid	45,2	56,9
7 , flutamid	52,9	95,0
8 , talidomid	-3,5	17,7
9 , lidokain	48,8	81,6
10 , paracetamol	75,5	87,1
11 , levetiracetam	41,9	35,1
12 , oksazepam	57,2	39,5
13 , modafinil	-2,8	-22,2
14 , piracetam	37,3	37,2
15 , acetazolamid	95,4	112,3

Literaturni podatci sugeriraju da se na temelju kiselosti N i C atoma u fragmentu može predvidjeti redoslijed stabilnosti tautomera. Dobiveni rezultati naizgled potvrđuju tu hipotezu: stabilnost N-aniona u odnosu na C-anion veća je kod onih molekula kojima je iminol stabilniji od enola, i obrnuto (uz iznimku talidomida). Međutim, potrebno je podrobnije proučiti dobivene vrijednosti. Koristeći prikazane podatke izrađen je regresijski pravac kako bi se vizualizirao odnos između promjena relativnih Gibbsovih energija (Slika 9).

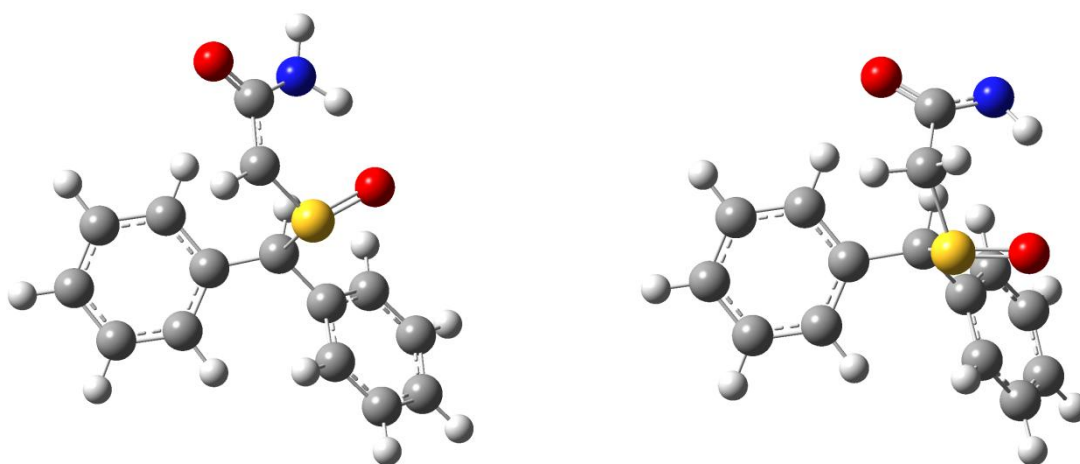


Slika 9. Graf ovisnosti relativne Gibbsove energije enola u odnosu na iminol o relativnoj Gibbsovoj energiji C-aniona u odnosu na N-anion.

Graf ovisnosti relativnih Gibbsovih energija enola u odnosu na iminol o relativnim Gibbsovim energijama C-aniona u odnosu na N-anion upućuje na postojanje linearne povezanosti između tih dviju varijabli. Međutim, koeficijent determinacije r^2 iznosi 0,7216, što znači da se ne može donijeti zaključak o postojanju korelacije. Rasipanje pojedinih točaka posljedica je kompleksnih intramolekulskih interakcija koje proizlaze iz same strukture neutralnih, odnosno anionskih specija. U neutralnim specijama (keto, enolu i iminolu) vodik koji je sastavni dio tautomernog fragmenta može sudjelovati u formiranju intramolekulske vodikove veze. N i C anioni, pošto su otpustili vodikov kation, gube tu mogućnost, i stabilizacijski učinak koji vodikova veza pruža. S druge strane, u anionu je prisutan slobodni elektronski par, čime je otvorena mogućnost za elektronske interakcije. Različiti stabilizirajući i/ili destabilizirajući efekti, koji mogu biti prisutni u jednom obliku (neutralnom ili anionskom), a ne i u drugom, dovode do odstupanja točaka na grafu od idealnog pravca.

Posebno je zanimljiv talidomid (8), kao jedina od istraživanih molekula gdje je enol stabilniji od iminola, a C anion manje stabilan od N aniona. Već je spomenuto da je za relativnu stabilnost enola zaslužna intramolekulska vodikova veza, čije je formiranje u iminolnom obliku nepovoljno. Anioni nemaju vodik koji bi mogao formirati vodikovu vezu, stoga njihove relativne energije odražavaju utjecaje elektrostatskih interakcija. U anionima, kao i u iminolu, dolazi do sukoba elektronskih oblaka karbonilnog kisika i ftalimidnog dušika.

Interakcije prisutne u talidomidnim oblicima vrlo su složene i vjerojatno su prisutni i neki drugi efekti. Talidomid je zanimljivo usporediti s modafinilom, jer su vrijednosti $\Delta\Delta G_{298}$ enola u donosu na iminol veoma bliske (unutar očekivane pogreške računalne metode), dok se vrijednosti $\Delta\Delta G_{298}$ C aniona u odnosu na N anion značajno razlikuju. Kod modafinila relativna stabilnost C aniona prati relativnu stabilnost enola. Pošto u C anionu nije moguća stabilizacija O-H...O vodikovom vezom, uzrok je ponovno elektrostatske prirode. U C anionu ne dolazi do nepovoljne interakcije slobodnog elektronskog para dušika sa slobodnim elektronskim parom karbonilnog kisika. Iz ova je dva primjera vidljivo kako je relativna stabilnost enola u odnosu na iminol rezultat složenih interakcija u molekulskoj strukturi, te nije isključivo ovisna o kiselosti C i N položaja.



Slika 10. Strukture C i N aniona modafinila.

4.3. Značaj rezultata za istraživane molekule

Od 15 promatranih struktura lijekova, iznosi ΔG_{298} tautomera najveći su kod finasterida (+83,7/+126,2 kJ/mol). Iminolni i enolni oblici tog lijeka vrlo su nestabilni, vjerojatno zbog steričkih razloga, te u tautomernoj smjesi egzistira isključivo keto oblik. Najveći dio promatranih lijekova ima vrlo nestabilnu enolnu, no stabilniju iminolnu formu. Piracetam, levetiracetam, oksazepam, flutamid, ampicilin, lidokain i paracetamol formiraju iminole koji su za 40-60 kJ/mol manje stabilni od keto oblika, dok su iminolne forme cikloserina i acetazolamida samo oko 30 kJ/mol nestabilnije. U tim slučajevima prisutnost iminola u ravnoteži tautomera ne može se zanemariti. Ipak, važno je naglasiti da će udio

iminola u ravnoteži biti vrlo malen (samo 0,0018% za cikloserin, gdje je $\Delta G_{298} = +27,1$ kJ/mol).

Iako je u ravnotežnoj smjesi udio iminola malen, reaktivnost toga tautomernog oblika mnogo je veća. Stoga se mogu očekivati reakcije, poput alkiliranja i halogeniranja, na N atomu iminolne forme, koji je mnogo nukleofilniji od N atoma u keto obliku. Tako bi dominantni produkt reakcije tih molekula s klorom bio bi N-klorirani derivat. Ipak, treba uzeti u obzir i druge čimbenike. Amidna skupina lidokaina sterički je zaštićena metilnim skupinama u *orto*-položaju, što može ometati adiciju na amidni dušik. U slučajevima talidomida i modafinila, gdje dolazi do inverzije stabilnosti enola i iminola, može doći i do reakcija na α -ugljiku. Također, enolizacija talidomida potvrđen je mehanizam njegove racemizacije. Dobiveni rezultati, dakle, u skladu su s literaturnim navodima.

Važno je imati na umu da provedeni računi demonstriraju relativnu stabilnost tautomera u plinovitoj fazi. Utjecaj medija i drugih okolišnih čimbenika nije razmotren, premda može biti velik. Formiranje enola oksazepama, npr., veoma je nepovoljno u vakuumu. Ipak, ono se odvija u alkalnim otopinama i uzrokuje racemizaciju oksazepama (Yang i Bao, 1994). Sljedeći koraci istraživanja trebali bi obuhvatiti ispitivanja stabilnosti tautomera u vodi i drugim otapalima, na različitim temperaturama i uz prisutnost kiselina ili baza, kako bi se stekao bolji dojam o tautomernoj ravnoteži u farmaceutskoj formulaciji i ljudskom organizmu.

5. Zaključak

Prototropička tautomerizacija najčešći je oblik tautomerizacije. Prototropički tautomeri razlikuju se u položaju jednog vodikovog atoma (protona) i jedne dvostruke veze. Pojedine molekule mogu imati više od dva tautomerna oblika. Primarni i sekundarni amidi s najmanje jednim vodikom vezanim za α -ugljikov atom mogu formirati tri tautomera: keto, enol i iminol. Sva tri oblika egzistiraju u ravnoteži, u omjeru koji je određen njihovim relativnim stabilnostima, kao i utjecajima okoliša.

Tautomeri zbog različite raspodjele elektrona imaju različita svojstva. Enoli i iminoli uglavnom su reaktivniji od keto oblika, i često su intermedijeri u reakcijama poput halogeniranja i alkiliranja. Razlikuju se i u obliku, najstabilnijoj konformaciji, fizikalnim svojstvima i interakciji s biomolekulama. Posebno je važno istaknuti da enolizacija dovodi do racemizacije. Sve navedeno utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku molekule lijeka, kao i na proizvodnju, stabilnost i formulaciju.

Enoli i iminoli amidnih molekula uglavnom su nestabilne i kratkožive specije, pa je otežana njihova izolacija i proučavanje *in vitro*. Računalne metode pružaju izvrsne mogućnosti predviđanja relativnih energija i odnosa među tautomerima. Kvantno-kemijski programi omogućuju lociranje najstabilnije konformacije, optimizaciju i određivanje Gibbsove energije svakog tautomera.

Kompeticija enolizacije i iminolizacije javlja se u više od 80 farmaceutika danas prisutnih na tržištu. Za ovo istraživanje izdvojeno je 15 molekula, različite strukture i djelovanja. Očekivano, keto tautomer pokazao je najveću stabilnost. Enol je stabilniji od iminola u samo dva slučaja. Najstabilniji iminoli na amidnom dušiku imaju supstituiran kisik ili heteroaromatsku skupinu. Benzenski prsten također stabilizira iminol, dok alkilni supstituent nema značajan učinak. Najmanje stabilnim iminolima tautomerna konverzija otežana je sterički. Enoli su u gotovo svim slučajevima previše nestabilni kako bi imali značajan udio u ravnotežnoj smjesi tautomera. Značajna stabilizacija enola primijećena je u molekulama kod koji je prisutna delokalizacija stvaranjem produžene konjugacije ili formiranje intramolekulske vodikove veze. Amini, amidi, hidroksilna i alkilne skupine također mogu stabilizirati, a najmanje je stabilan enol C-nesupstituiranih lijekova. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim navodima o stabilizaciji tautomera.

Rezultati pokazuju da za samo jednu molekulu (finasterid) možemo zanemariti tautomerne oblike i razmatrati samo keto speciju. Svi ostali lijekovi imaju dovoljno stabilne

iminole da se o njima treba voditi računa prilikom određivanja karakteristika lijeka. Iminolni tautomeri acetazolamida i cikloserina veoma su stabilni i značajni. U slučaju talidomida i modafinila, i enol postaje značajna specija. Enolizacija talidomida od posebne je važnosti zbog racemizacije, koja u potpunosti mijenja farmakološke značajke lijeka.

Ovo istraživanje donosi nove spoznaje o često korištenim lijekovima na svjetskom tržištu. Potpuna karakterizacija tautomernih oblika važna je za razumijevanje ponašanja lijeka izvan i unutar ljudskog organizma. Također, može pružiti smjernice u razvoju strukturnih analoga poboljšanih svojstava.

Sljedeći korak u istraživanju mogao bi obuhvaćati provođenje računa na višim teorijskim razinama (zbog poboljšanja preciznosti rezultata), proširenje studije na veći broj molekula farmaceutika te ispitivanje mehanizma i energetske barijere tautomerne konverzije.

6. Literatura

Alagona G, Ghio C, Nagy PI. The catalytic effect of water on the keto–enol tautomerism. Pyruvate and acetylacetone: a computational challenge. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, 12, 10173-10188.

Allegretti PE, Labadie GR, González Sierra M, Furlong JJP. Mass spectrometric analysis and theoretical calculations of the occurrence of tautomeric structures of hydantoins. *Afinidad LVII*, 2000, 485, 41-49.

Angelini G, De Maria P, Fontana A, Pierini M, Siani G. Ionization and tautomerization of 2-nitrocyclohexanone in aqueous solution. *J Org Chem*, 2007, 72, 4039-4047.

Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: New vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*, 2006, 12, 250-275.

Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10, 621-629.

Chiang Y, Kresge AJ, Santaballa JA, Wirzl J. Ketonization of acetophenone enol in aqueous buffer solutions. Rate-equilibrium relations and mechanism of the “uncatalyzed” reaction. *J Am Chem Soc*, 1988, 110, 5506-5510.

Connolly Martin Y. Let’s not forget tautomers. *J Comput Aided Mol Des*, 2009, 23, 693-704.

D'Cunha C, Morozov AN, Chatfield DC. Theoretical study of HOCl-catalyzed keto–enol tautomerization of β -cyclopentanedione in an explicit water environment. *J Phys Chem A*, 2013, 117, 8437-8448.

Deck DH, Winston, LG. Miscellaneous antimicrobial agents: disinfectants, antiseptics and sterilants. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 865-872. A

Deck DH, Winston, LG. Tetracyclines, macrolides, clindamycin, chloramphenicol, streptogramins and oxazolidinones. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str.788-798. B

Delchev VB. DFT ab initio study of the keto-enol tautomerism of barbituric acid. *J Struct Chem*, 2004, 45, 570-578.

Drasner K. Local anesthetics. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 440-454.

Eberlin A, Williams LH, Halogenation of enol tautomers of 2-cyanoacetamide and malonamic acid. *J Chem Soc, Perkin Trans. 2*, 2002, 7, 1316-1319.

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

Francetić I, ured. Farmakoterapijski priručnik 7. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2015.

Francetić I, Makar-Aušperger K, Bilušić M, Lovrenčić-Huzjan A, Herceg M. Sustavne infekcije. U: Farmakoterapijski priručnik 7. Izdanje. Francetić i sur., ured., Medicinska naklada, 2015, Zagreb, str. 382-484.

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

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

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

Hare MC, Marimanikkuppam SS, Kass SR. Acetamide enolate: formation, reactivity, and proton affinity. *Int J Mass Spectrom*, 2001, 210, 153-163.

Heshmatipour F, Beyramabadi A, Morsali A, Heravi MM. A DFT study on the geometry, spectroscopic properties, and tautomerization of the local anaesthetic drug prilocaine. *J Struct Chem*, 2016, 57, 1096-1103.

Hume JR, Grant AO. Agents used in cardiac arrhythmias. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 224-248.

Ivančan V, Makar-Aušperger K, Bilušić M, Lovrenčić-Huzjan A, Herceg M. Živčani sustav. U: Farmakoterapijski priručnik 7. Izdanje. Francetić i sur., ured., Medicinska naklada, 2015, Zagreb, str. 597-706.

Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini, 2016., www.halmed.hr, pristupljeno 15.4.2017.

Katzung BG, Trevor AJ, ured. Basic and clinical pharmacology 13th edition. McGraw-Hill Education, 2015.

Kim EJ, Matuszek AM, Yu B, Reynisson J. Theoretical investigations into the role of aryl nitrenium ions' stability on their mutagenic potential. *Aust J Chem*, 2011, 64, 910-915.

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

Klaster Andrija, 2011., <http://andrija.pharma.hr/Andrija/HOME.html>, pristupljeno 23.04.2017.

Klaster Isabella, 2007., <http://www.srce.hr/isabella>, pristupljeno 23.04.2017.

Kumar R. Approved and investigational uses of modafinil. An evidence-based review. *Drugs*, 2008, 68, 1803-1839.

Lienhard GE, Wang TC. On the Mechanism of Acid-Catalyzed Enolization of Ketones. *J Am Chem Soc*, 1969, 91, 1146-1153.

Malykh AG, Sadaie R. Piracetam and piracetam-like drugs: From basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*, 2010, 70, 287-312.

Matijević R, Vračić H, Pasini J, Makar-Aušperger K. Urogenitalni sustav i spolni hormoni. U: Farmakoterapijski priručnik 7. Izdanje. Francetić i sur., ured., Medicinska naklada, 2015, Zagreb, str. 311-358.

McCann BW, McFarland S, Acevedo O. Benchmarking continuum solvent models for keto–enol tautomerizations. *J Phys Chem A*, 2015, 119, 8724-8733.

Mishra JK, Rao JS, Sastry GN, Panda G. Regioselective aminoethylation of 1,4-benzodiazepin-2-one under conventional heating and microwave irradiation. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 3357-3360.

Nagy PI. Replacement of oxygen by sulfur in small organic molecules. 3. Theoretical studies on the tautomeric equilibria of the 2OH and 4OH-substituted oxazole and thiazole and the 3OH and 4OH-substituted isoxazole and isothiazole in the isolated state and in solution. *Int J Mol Sci*, 2016, 17, 1094.

Nanda N, Sheshadri BS, Mayanna SM. Mechanism of oxidation of diazepam by 1-chlorobenzotriazole in acidic medium. A kinetic approach. *React Kine Catal Lett*, 1999, 67, 35-41.

PCMODEL, version 10.0, Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402.

Pem B. Računalna studija tautomerizacije benzodiazepina. Rad za Rektorovu nagradu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Perrin CL. Proton Exchange in Amides: Surprises from Simple Systems. *Acc Chem Res*, 1989, 22, 268-275.

Pertejo P, García-Valverde M, Peña P, Cordero NA, Torroba T, González-Ortega A. Experimental and theoretical studies on the effect of the oxo group in 1,4-benzodiazepines. *Org Biomol Chem*, 2014, 12, 4905-4916.

Pescatore SL, Lindley C. Anagrelide: a novel agent for the treatment of myeloproliferative disorders. *Exp Opin Pharmacother*, 2000, 1, 537-546.

Pine SH. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 163-175.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure drugs. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 396-420.

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

Rappoport Z, Yamataka H. Calculated amide/enol of amide energy differences for several interesting amide systems. *Chem Commun*, 2000, 21, 2101-2102.

Remko M, von der Lieth CW. Theoretical study of molecular structure, reactivity, lipophilicity, and solubility of N-hydroxyurea, N-hydroxythiourea, and N-hydroxysilaurea. *Struct Chem*, 2004, 15, 285-294.

Sam R, Pearce D, Ives HE. Diuretic agents. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, ured., McGraw-Hill Education, 2015, str. 249-470.

Sayle RA. So you think you understand tautomerism?. *Comput Aided Mol Des*, 2010, 24, 485-496.

Senthilkumar K, Kolandaivel P. Quantum chemical studies on tautomerism of barbituric acid in gas phase and in solution. *J Comput Aid Mol Des*, 2002, 16, 263-272.

Sklenák S, Apeloig Y, Rappoport Z. Calculated pK_{enol} values for enols of carboxylic acid derivatives HC=C(OH)X (X = OH, NH₂, NMe₂, OMe, OCHO, F, Cl, Br). *J Am Chem Soc*, 1998, 120, 10359-10364.

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

Sun Y, Li H, Liang W, Han S. Theoretical study of the effect of water in the process of proton transfer of glycineamide. *J Phys Chem B*, 2005, 109, 5919-5926.

Šakić D, Šonjić P, Tandarić T, Vrček V. Chlorination of N-methylacetamide and amide-containing pharmaceuticals. Quantum-chemical study of the reaction mechanism. *J Phys Chem A*, 2014, 118, 2367-2376.

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

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.

Trevor AJ. Sedative-hypnotic drugs. U: Basic and clinical pharmacology 13th edition. Katzung BG, Trevor AJ, urednici, McGraw-Hill Education, 2015, str. 369-383.

Valadbeigi Y, Farrokhpour H. Simple and water-assisted tautomerism in succinimide. *Struct Chem*, 2015, 26, 539-545.

Vrhovac R, Belev B, Anić B, Makar-Aušperger K, Ostojić Kolonić S. Zloćudni tumori i imunomodulacija. U: Farmakoterapijski priručnik 7. Izdanje. Francetić i sur., ured., Medicinska naklada, 2015, Zagreb, str. 485-562.

Wojnarowska Z, Paluch M, Pionteck J. The tautomerization phenomenon of glibenclamide drug monitored by means of volumetric measurements. *J Chem Phys*, 2011, 135, 214506.

Yang SK. Base-catalyzed keto-enol tautomerism of diazepam. *J Chin Chem Soc - Taip*, 1997, 44, 401-406.

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

7. Sažetak

Kvantno-kemijsko istraživanje tautomerizacije odabranih farmaceutika

Prototropička tautomerizacija je ravnotežna reakcija pomaka protona s kiselog centra molekule na bazični, uz istovremeni pomak π -elektrona u suprotnom smjeru. Molekule koje posjeduju $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragment postoje u tri tautomerna oblika: keto, enol i iminol. Među takvim molekulama nalazi se značajan broj lijekova. Tautomeri se međusobno razlikuju po fizikalno-kemijskim osobinama, stoga je karakterizacija tautomerne smjese važna za razumijevanje farmakokinetike i farmakodinamike lijekova, kao i za postupke proizvodnje i oblikovanja. Udio svakog tautomera u ravnotežnoj smjesi ovisi o njihovim relativnim stabilnostima. Gibbsova energija molekule može se odrediti *in silico*, koristeći računalne programe bazirane na zakonima kvantne mehanike. U ovom radu ispitane su stabilnosti tautomera 15 molekula farmaceutika. Keto oblik najstabilniji je u svim slučajevima. Iminolni oblik većine molekula dovoljno je stabilan kako bi se smatrao značajnim dijelom ravnotežne smjese, za razliku od enola čiji se udio zbog nestabilnosti može zanemariti. Supstituenti na amidnom dušiku i α -ugljiku utječu na energije tautomera: najjači su stabilizatori elektron-akceptorske skupine, aromatski sustavi i strukture koje omogućuju uspostavu produžene konjugacije. Stabilnost se može povećati i uspostavom intramolekulske vodikove veze. Ispitivani lijekovi koriste se u terapiji velikog broja pacijenata širom svijeta. Karakterizacija tautomera pomoći će u produbljivanju razumijevanja njihovih fizikalno-kemijskih osobina te u izgradnji srodnih lijekova poboljšanih svojstava.

Summary

Quantum chemical study of tautomerization in select pharmaceuticals

Prototropic tautomerization is an equilibrium reaction that includes a proton shift from the acidic centre of a molecule to the basic centre, with the simultaneous shift of π -electrons in the opposite direction. Molecules possessing the $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragment exist in three tautomeric forms: keto, enol and iminol. Among such molecules is a large number of pharmaceuticals. Tautomers differ in physico-chemical properties. The characterisation of the tautomeric equilibrium is thus important for the understanding of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, as well as for their manufacturing and formulation. The percentage of each tautomer in the equilibrium depends on their relative stabilities. The Gibbs energy of a molecule can be determined *in silico*, using computer programs based on the laws of quantum mechanics. In this thesis the stabilities of tautomers of 15 molecules were examined. Keto form is the most stable in all cases. Iminolic form of most molecules is stable enough to be considered a significant part of the tautomeric mix, while the enolic form is very unstable, so its presence can be deemed negligible. Substituents on the amidic nitrogen and the α -carbon affect the energies of tautomers: electron-accepting groups, aromatic structures and conjugated systems possess the strongest stabilizing effect. Stability of tautomers can also be increased by the formation of an intramolecular hydrogen bond. The analyzed pharmaceuticals are widely used for treatment of patients all over the world. Characterization of their tautomers will help increase the understanding of their physico-chemical properties and aid in design of related drugs with improved features.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KVANTNO-KEMIJSKO ISTRAŽIVANJE TAUTOMERIZACIJE ODABRANIH FARMACEUTIKA

Barbara Pem

SAŽETAK

Prototropička tautomerizacija je ravnotežna reakcija pomaka protona s kiselog centra molekule na bazični, uz istovremeni pomak π -elektrona u suprotnom smjeru. Molekule koje posjeduju $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragment postoje u tri tautomerna oblika: keto, enol i iminol. Među takvim molekulama nalazi se značajan broj lijekova. Tautomeri se međusobno razlikuju po fizikalno-kemijskim osobinama, stoga je karakterizacija tautomerne smjese važna za razumijevanje farmakokinetike i farmakodinamike lijekova, kao i za postupke proizvodnje i oblikovanja. Udio svakog tautomera u ravnotežnoj smjesi ovisi o njihovim relativnim stabilnostima. Gibbsova energija molekule može se odrediti *in silico*, koristeći računalne programe bazirane na zakonima kvantne mehanike. U ovom radu ispitane su stabilnosti tautomera 15 molekula farmaceutika. Keto oblik najstabilniji je u svim slučajevima. Iminolni oblik većine molekula dovoljno je stabilan kako bi se smatrao značajnim dijelom ravnotežne smjese, za razliku od enola čiji se udio zbog nestabilnosti može zanemariti. Supstituenti na amidnom dušiku i α -ugljiku utječu na energije tautomera: najjači su stabilizatori elektron-akceptorske skupine, aromatski sustavi i strukture koje omogućuju uspostavu produžene konjugacije. Stabilnost se može povećati i uspostavom intramolekulske vodikove veze. Ispitivani lijekovi koriste se u terapiji velikog broja pacijenata širom svijeta. Karakterizacija tautomera pomoći će u produbljivanju razumijevanja njihovih fizikalno-kemijskih osobina te u izgradnji srodnih lijekova poboljšanih svojstava.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 10 grafičkih prikaza, 2 tablice i 62 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tautomerizacija, enolizacija, iminolizacija, farmaceutici, računalna studija

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

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

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

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

Dr. sc. Mirela Matić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF TAUTOMERIZATION IN SELECT PHARMACEUTICALS

Barbara Pem

SUMMARY

Prototropic tautomerization is an equilibrium reaction that includes a proton shift from the acidic centre of a molecule to the basic centre, with the simultaneous shift of π -electrons in the opposite direction. Molecules possessing the $-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ fragment exist in three tautomeric forms: keto, enol and iminol. Among such molecules is a large number of pharmaceuticals. Tautomers differ in physico-chemical properties. The characterisation of the tautomeric equilibrium is thus important for the understanding of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, as well as for their manufacturing and formulation. The percentage of each tautomer in the equilibrium depends on their relative stabilities. The Gibbs energy of a molecule can be determined *in silico*, using computer programs based on the laws of quantum mechanics. In this thesis the stabilities of tautomers of 15 molecules were examined. Keto form is the most stable in all cases. Iminolic form of most molecules is stable enough to be considered a significant part of the tautomeric mix, while the enolic form is very unstable, so its presence can be deemed negligible. Substituents on the amidic nitrogen and the α -carbon affect the energies of tautomers: electron-accepting groups, aromatic structures and conjugated systems possess the strongest stabilizing effect. Stability of tautomers can also be increased by the formation of an intramolecular hydrogen bond. The analyzed pharmaceuticals are widely used for treatment of patients all over the world. Characterization of their tautomers will help increase the understanding of their physico-chemical properties and aid in design of related drugs with improved features.

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

Thesis includes: 42 pages, 10 figures, 2 tables and 62 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tautomerization, enolization, iminolization, pharmaceuticals, computational study

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

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

Reviewers: **Valerije Vrček, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić, Ph.D. *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.