

KONFORMACJE SALBUTAMOLU W PRÓŻNI ORAZ ŚRODOWISKU WODNYM

SALBUTAMOL CONFORMATION IN VACUUM AND WATER ENVIRONMENT

Kacper Czaja, Małgorzata A. Broda*

Uniwersytet Opolski, Wydział Chemii ul. Oleska 48, 45-052 Opole

**e-mail: broda@uni.opole.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Analiza konformacyjna salbutamolu

2. Konformacje modelowych układów – fragmentów strukturalnych salbutamolu

2.1. Alkohol salicylowy

2.2. 2-(Metyloamino)propan-2-ol

3. Oddziaływanie salbutamolu z cząsteczką wody

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Kacper Czaja jest absolwentem studiów licencjackich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W 2022 obronił pracę licencjacką pt. „Wpływ protonowania na konformację salbutamolu w próżni oraz środowisku wodnym”. Obecnie jest magistrantem wydziału chemii UO. Zajmuje się badaniem właściwości leków i ich oddziaływań z nośnikiem jakim jest β -cyklodekstryna.



Prof. dr hab. Małgorzata A. Broda

Studia magisterskie w latach 1977-1982 w Instytucie Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Od 1982 asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Wrocławskiego w zespole prof. J. P. Hawranka. Praca doktorska pt: „Relaksacja oscylacyjna w halogenofenolach” przygotowana pod kierunkiem prof. J. P. Hawranka. Habilitacja w 2009 r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tytuł rozprawy habilitacyjnej: „Stereoelektronowe właściwości pochodnych α,β -dehydroaminokwasów”. Od 1993 roku adiunkt w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Opolskiego. Od 2011 – kierownik Zakładu Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego. W roku 2020 – tytuł profesora nauk chemicznych. Zainteresowania naukowe: Spektroskopia oscylacyjna układów z wiązaniem wodorowym; badanie relaksacji oscylacyjnej na podstawie analizy kształtu pasm; właściwości modelowych peptydów i α,β -dehydropeptydów; modelowanie molekularne właściwości strukturalnych i spektroskopowych związków o znaczeniu biologicznym.



<http://orcid.org/0000-0002-4092-3593>

ABSTRACT

Salbutamol is a short acting, selective beta-2 adrenergic receptor agonist used to treat asthma, bronchitis, as well as prevent exercise induced bronchospasms. Although it is a small molecule, it has considerable conformational freedom. It has four polar groups (-OH and -NH) that can form a variety of intramolecular hydrogen bonds that stabilize individual conformations. It is well known, that such a intramolecular interactions greatly impact molecular properties, because the bioactive conformation of a given ligand could be stabilized by intramolecular hydrogen bonds.

The aim of our research is to determine the preferred conformation of salbutamol, and to characterize the intramolecular interactions that stabilize its various conformers, both in a gas phase and in water modeled as a continuous dielectric. The analysis was carried out by B3LYP-D3 and MP2 methods with the 6-311++G(d,p) basis set. The relative energies and geometrical parameters of intramolecular H-bonds are presented for six selected salbutamol conformers. Moreover, calculated monohydrates of lowest energy salbutamol conformer allow to estimate the interaction energy with water molecule and geometrical parameters of preferred complexes.

Keywords: salbutamol, conformational analysis, B3LYP functional, dispersion correction, hydrogen bond, interaction with water

Słowa kluczowe: salbutamol, analiza konformacyjna, funkcjonal B3LYP, oddziaływania dyspersyjne, wiązanie wodorowe, oddziaływanie z wodą

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

β -AR	– β -adrenoreceptor
B3LYP	– funkcjonal wymiennie-korelacyjny Becke'go -Lee-Yanga-Parra
BSSE	– błąd superpozycji bazy (ang. <i>basis set superposition error</i>)
CP	– poprawka równoważenia bazowego (ang. <i>counterpoise correction</i>)
D3	– empiryczna poprawka Grimme'a na oddziaływania dyspersyjne
DFT	– teoria funkcjonału gęstości (ang. <i>Density Functional Theory</i>)
PCM	– model ciągłego polaryzowalnego rozpuszczalnika (ang. <i>Polarizable Continuum Model</i>)
SABA	– krótko działający β_2 -agonista
LABA	– długo działający β_2 -agonista
Ultra-LABA	– ultra długo działający β_2 -agonista

WPROWADZENIE

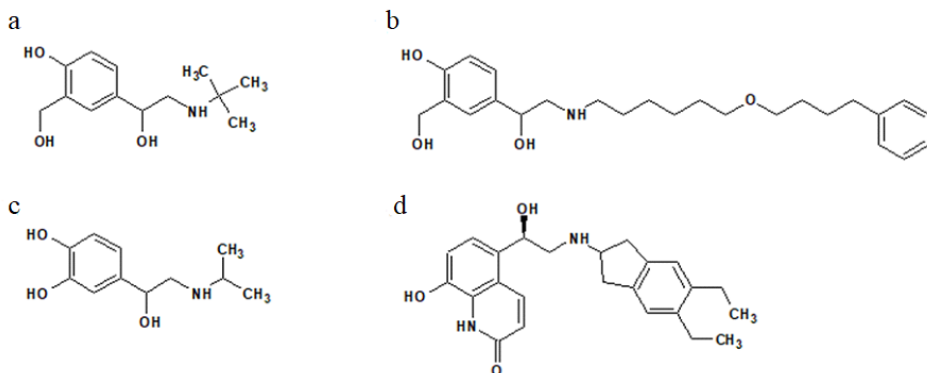
Astma jest najczęstszą przewlekłą chorobą wieku dziecięcego i najpowszechniejszym schorzeniem układu oddechowego, na które choruje około 10% społeczeństwa [1, 2]. Patofizjologia astmy jest złożona i charakteryzuje się przewlekłym stanem zapalnym dróg oddechowych. Nadreaktywność tych dróg, czyli nadmierne reakcje na czynniki takie jak wirusy, alergeny czy ćwiczenia, prowadzi do nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ucisku w klatce piersiowej czy kaszlu [1, 3].

Aktualnie jednym z najczęściej stosowanych środków leczniczych w astmie oskrzelowej jest salbutamol, który jest również znany jako albuterol. Powoduje krótkotrwały rozkurcz oskrzeli, przez co jest zaliczany do krótko działających β -agonistów (SABA) receptora β_2 -adrenergicznego (β_2 -AR) [4]. W ostrym ataku astmy preferowane jest stosowanie tego leku, ze względu na szybkie rozpoczęcie działania (3-5 minut). W ciągu 15-30 minut dochodzi do maksymalnego rozszerzenia oskrzeli, które utrzymuje się nieprzerwanie przez 3-4 godziny [2]. Oprócz leczenia astmy u ludzi jest on również wykorzystywany jako środek leczniczy w weterynarii do leczenia ciężkiej astmy u koni. Jego stosowanie przyczynia się do poprawy funkcji płuc koni o około 70% podczas wystąpienia zwężenia dróg oddechowych [5].

Oprócz SABA występują jeszcze długodziałający β -agonisty (LABA) i ultradługo działający β -agonisty (ultra-LABA). Zapewniają one trwałe złagodzenie objawów ze względu na dłuższy czas działania [6]. Agonisty β -AR o działaniu selektywnym są powszechnie zaleceni na całym świecie do leczenia chorób związanych z drogami oddechowymi. Niemniej jednak, nawet w zwykłych dawkach, mogą one wiązać się z ryzykiem wystąpienia hiperlaktatemii i kwasicy mleczanowej. Mechanizm, za pomocą którego te substancje działają, nadal nie jest w pełni zrozumiany. Przypuszcza się, że salbutamol może wpływać na przekierowanie metabolizmu kwasu pirogronowego z cyklu Krebsa w kierunku produkcji kwasu mlekowego [7].

Pierwsze próby rozkurczania dróg oddechowych za pośrednictwem β -agonistów są szacowane na około 5000 lat temu w medycynie chińskiej. W tym celu stosowane były zioła *ma huang*. Dopiero w 1855r. w Yamanashi zidentyfikowano i wydzielono czystą substancję aktywną z tej rośliny i nazwano ją efedryną [6, 8]. Rozwój farmaceutyków stosowanych do rozkurczu dróg oddechowych nastąpił na początku XX wieku, kiedy zrozumiano w większym stopniu zastosowanie efedryny. Pierwszy czysty β -agonista pojawił się w latach czterdziestych ubiegłego wieku [6]. Była to izoprenalina, która stała się powszechnym lekiem używanym do leczenia astmy. Nie była ona jednak selektywna, co było jednym z powodów poszukiwania jej analogów o lepszych właściwościach. W 1968 roku zespół Glaxo zsyntezował pierwszy selektywny lek, który był agonistą β_2 -adrenoreceptora i nazwany został salbutamol [6]. Minimalizował on nie tylko skutki uboczne związane z nieselektywnym agonistą β , jakim był izoprenalina, ale także miał korzystniejszy czas działania [6, 9]. Zespół badawczy w firmie Glaxo przeprowadził kolejne badania, modyfikując salbutamol, co zaowocowało stworzeniem salmeterolu, reprezentującego LABA. Ten farmaceutyk wykazuje zdolność do utrzymania działania rozszerzającego oskrzela przez okres 12 godzin. Ostatnie badania przyczyniły się do opracowania nowych substancji, takich jak indakaterol, charakteryzujących się

możliwością dawkowania raz dziennie, przez co zaliczane są do kategorii ultra-LABA [6].



Rysunek 1. Struktury β -agonistów: (a) salbutamol; (b) salmeterol; (c) izoprenalina; (d) indakaterol
Figure 1. Structures of β -agonists: (a) salbutamol; (b) salmeterol; (c) isoprenaline; (d) indacaterol

Salbutamol zaliczany jest do amin katecholowych. Charakteryzują się one obecnością pierścienia benzenowego z łańcuchem bocznym zawierającym dwa atomy węgla oraz grupę aminową. W pozycji 3 i 4 pierścienia benzenowego występują podstawniki z grupami hydroksylowymi [10]. Katecholaminy dzielą się na naturalne, takie jak adrenalina i noradrenalina, oraz syntetyczne, do których należą m.in. salbutamol i izoprenalina [11]. Zwiększenie odporności salbutamolu na procesy metaboliczne i wydłużenie czasu jego działania wynika z modyfikacji jego struktury, czyli zastąpienie grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia benzenowego grupą hydroksymetylową. Innym przekształceniem w strukturze omawianego leku jest wydłużenie łańcucha bocznego, co przyczynia się do poprawy jego selektywności względem β -AR [10].

Salbutamol był pierwszym lekiem rozszerzającym oskrzela uwzględnionym na międzynarodowej liście antydingowej, gdzie określono jego dopuszczalne stężenie w moczu. Jednakże, ten próg został ustalony na podstawie badań przeprowadzonych na zdrowych, niewytrenowanych osobach, co może nieodpowiednio odzwierciedlać sytuację sportowców cierpiących na astmę. Według obecnych wytycznych Agencji Antydingowej (WADA), salbutamol może być przepisywany w dawce do 1600 μ g na 24 godziny [12]. Agonisty receptorów β_2 -adrenergicznych znajdują się na liście substancji zakazanych z powodu zwiększenia wydajności sportowej. Stwierdzono, że stosowanie salbutamolu może poprawić wytrzymałość sportowców, którzy nie cierpią na astmę. Dodatkowo wiadomo, że stosowany on krótkotrwale powoduje zwiększenie siły i masy mięśniowej u zdrowych osób, do czego przyczynia się jego działanie anaboliczne [10, 13]. Warto również podkreślić, że astma wywołana wysiłkiem fizycznym (EIA), a astma jako choroba układu oddechowego, na którą choruje wiele osób na całym świecie to nie jest ta sama dolegliwość. EIA jest często spotykana zwłaszcza u sportowców uprawiających zimowe dyscypliny wytrzymałościowe, takie jak biegi narciarskie czy biathlon [14, 15]. W wyniku wysiłku następuje utrata ciepła i wody z błony śluzowej oskrzeli oraz ochłodzenie i wysuszenie dróg oddechowych, co spowodowane jest wdy-

chaniem dużych ilości zimnego, suchego powietrza podczas intensywnego wysiłku [16].

Kilka substancji, agonistów β -AR, takich jak clenbuterol, salbutamol i raktopamina, znajduje zastosowanie w żywieniu zwierząt gospodarskich, powodując wyższy stosunek masy mięśniowej do tłuszczowej. β -Agonisty, gdy są przyjmowane w dawkach od 5 do 10 razy wyższych niż dawki terapeutycznej, znacząco poprawiają beztłuszczową masę mięśniową tusz i współczynnik konwersji paszy u zwierząt [17]. Jednak, spożycie mięsa zawierającego te substancje stwarza ryzyko dla zdrowia ludzkiego, ponieważ może prowadzić do poważnych konsekwencji, takich jak zatrucia pokarmowe, schorzenia układu krążenia i dysfunkcje ośrodkowego układu nerwowego [18, 19]. Od 1990 roku zarejestrowano liczne przypadki ostrego zatrucia pokarmowego, związane ze spożyciem mięsa zanieczyszczonego β -agonistami, ze względu na to, że są stabilne i trudne do degradacji w organizmach zwierzęcych. Ponadto badania nad β -agonistami o długotrwałym działaniu wskazują na potencjalne zwiększenie ryzyka ostrej astmy oraz w niektórych przypadkach, nawet zgonu. W wielu krajach, w tym w Unii Europejskiej i Chinach, te substancje zostały zakazane ze względu na ich potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego [18, 19].

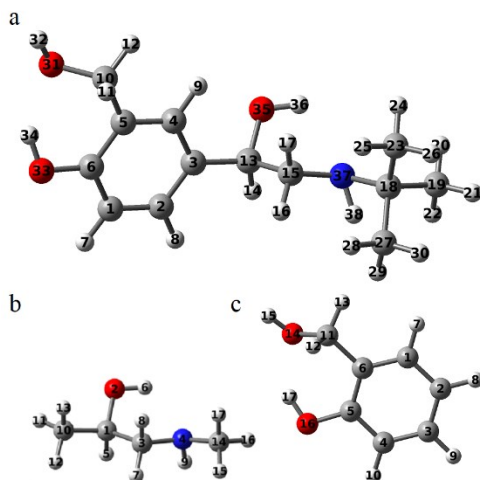
Celem tej pracy jest określenie konformacyjnych właściwości salbutamolu - cząsteczki małej, ale o dużym znaczeniu biologicznym. Zidentyfikowane zostaną wewnętrzcząsteczkowe oddziaływania wpływające na stabilność tego związku, a wyznaczone struktury geometryczne porównane z dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Ponadto, dla znalezionej w pierwszym etapie badań najniższej energetycznej struktury salbutamolu, wyznaczone zostaną monohydraty aby, uwzględniając oddziaływania specyficzne, nieco dokładniej scharakteryzować wpływ polarnego rozpuszczalnika.

W tym miejscu Autorzy pragną zaznaczyć, że celem niniejszej pracy nie jest wyznaczenie energii wewnętrzcząsteczkowych wiązań wodorowych stabilizujących poszczególne konformery salbutamolu. Ten problem jest dużo szerszy i wykracza poza tematykę tej pracy. Porównanie energii dwóch konformerów (z wiązaniem wodorowym i tzw. „otwartego”) nie daje informacji o energii wiązania wodorowego, ponieważ zerwanie tego wiązania, np. poprzez rotację grupy protono-donorowej, zwykle prowadzi do formy, w której występują inne oddziaływania, stabilizujące bądź destabilizujące badaną konformację. Metody dające informację o energii wewnętrzcząsteczkowych wiązań wodorowych zostały opisane w literaturze [20, 21].

1. ANALIZA KONFORMACJNA SALBUTAMOLU

Obliczenia, których wyniki zostaną przedstawione w tej pracy wykonane zostały przy użyciu programu Gaussian 16 [22] we Wrocławskim Centrum Sieciowo-Superkomputerowym (WCSS). Obejmują one analizę konformacyjną izolowanej cząsteczki salbutamolu o konfiguracji R, jak i kompleksu tego związku z jedną cząsteczką wody. Dodatkowo obliczenia przeprowadzono dla mniejszych, modelowych układów (alkohol salicylowy i 1-(metyloamino)propan-2-ol), które

można potraktować jako strukturalne fragmenty salbutamolu. Do obliczeń zastosowany został funkcjonal hybrydowy B3LYP [23] oraz baza funkcyjna 6-311++G(d,p) [24]. Aby uwzględnić oddziaływania dyspersyjne, które są niedoszacowane w metodzie B3LYP, zastosowana została empiryczna poprawka D3 Grimme'a [25]. Taka metoda obliczeń daje wiarygodne wyniki dla układów stabilizowanych niekowalencyjnymi oddziaływaniami [26]. Ponadto, dla wybranych układów przeprowadzono obliczenia optymalizacji struktury geometrycznej metodą MP2/6-311++G(d,p) [27]. Badania dotyczą właściwości salbutamolu w dwóch środowiskach: w próżni oraz w wodzie. Wpływ rozpuszczalnika został oszacowany przy wykorzystaniu modelu ciągłego dielektryka, czyli metody PCM (z ang. Polarizable Continuum Model) [28]. Brak urojonych częstości drgań stanowił dowód na to, że określona struktura geometryczna jest minimum energetycznym danej cząsteczki.



Rysunek 2. Schemat numeracji cząsteczek: (a) salbutamolu; (b) 1-(metyloamino)propan-2-olu i (c) alkoholu salicylowego

Figure 2. Numbering scheme of (a) salbutamol; (b) 1-(methylamino)propan-2-ol and (c) salicylic alcohol

Na rysunku 2 pokazana jest numeracja atomów w cząsteczce salbutamolu. Geometrie początkowe salbutamolu zostały uzyskane poprzez modyfikację wybranych kątów torsyjnych, aby uwzględnić wszystkie możliwe oddziaływania $-O-H\cdots O$, $-O-H\cdots N$ i $-N-H\cdots O$ w analizowanej cząsteczce. Po optymalizacji geometrii tych struktur uzyskano ponad 50 konformerów salbutamolu w próżni, których energie względne mieszczą się w zakresie od 0 do około 10 kcal/mol dla metody B3LYP-D3. Wpływ poprawki Grimme'a D3 na energie względne salbutamolu nie jest duży, modyfikuje jedynie nieznacznie kolejność energetyczną konformerów o średniej energii. Sześć, niskoenergetycznych konformerów salbutamolu jest przedstawionych na rysunku 3, gdzie zaznaczone zostały stabilizujące je wiązania wodorowe oraz podano ich długość. Ich energie względne,

obliczone za pomocą funkcjonału B3LYP z poprawką na oddziaływania dyspersyjne (oznaczone jako B3LYP-D3), oraz metodą MP2 zostały zebrane w tabeli 1. W obu metodach najniżej energetyczne są konformery **A** i **B**.

Aby oszacować wpływ wody jako ciągłego dielektryka na właściwości konformacyjne salbutamolu, znalezione w wysokiej próżni konformery poddane zostały ponownej optymalizacji uwzględniając polarne środowisko. Potwierdzono, że wszystkie struktury znalezione w próżni są również minimami w środowisku wodnym, a ich kolejność energetyczna uległa niewielkim zmianom. Natomiast zmalała różnica w energii tych konformerów i mieści się ona w zakresie do około 7 kcal/mol. Najniżej energetyczną strukturą pozostają konformery **A** i **B**.

O stabilizacji poszczególnych struktur salbutamolu decydują przede wszystkim wiązania wodorowe wewnątrzcząsteczkowe w dwóch fragmentach cząsteczki: oddziaływania pomiędzy grupami hydroksylowymi będącymi podstawnikami przy pierścieniu aromatycznym oraz pomiędzy grupami NH i OH w środkowej części struktury. Pomędzy tymi fragmentami oddziaływania niekowalencyjne na ogół nie występują, o czym świadczy nieznaczna różnica energii (około 0,3 i 0,07 kcal/mol odpowiednio w próżni i w wodzie) pomiędzy konformerami **A** i **B**, w których pierścień aromatyczny z podstawnikami jest obrócony o około 180°.

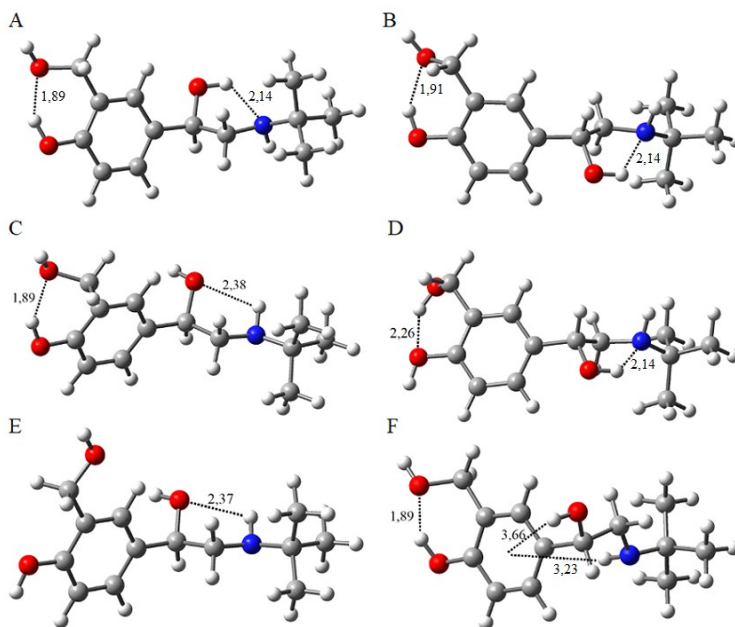
Stabilność konformerów **A** i **B** wynika z dwóch wiązań wodorowych w wymienionych fragmentach salbutamolu. Pierwsze to oddziaływanie –O(35)-H(36)...N(37) o długości wynoszącej 2,14 Å, a drugie to wiązanie –O(33)-H(34)···O(31), gdzie odległość H(34)···O(31) wynosi 1,89 Å. Uwzględnienie wpływu polarnego rozpuszczalnika powoduje skrócenie obu tych wiązań wodorowych odpowiednio do 2,07 Å dla O(35)-H(36)...N(37) i 1,86 Å dla –O(33)-H(34)···O(31). Optymalizacja struktur geometrycznych obu konformerów za pomocą metody MP2 dała bardzo podobne wyniki. Długości wiązań wodorowych stabilizujących salbutamol w próżni wynoszą odpowiednio 2,13 Å i 1,89 Å.

Struktura **C** to kolejny pod względem energii wśród otrzymanych konformerów salbutamolu w próżni, o energii względnej 1,37 kcal/mol. Jest również, podobnie jak konformer **A**, stabilizowany przez dwa wiązania wodorowe. Pierwsze z nich to analogiczne oddziaływanie między grupami będącymi podstawnikami pierścienia benzenowego, gdzie odległość H(34)···O(31) jest identyczna jak w konformerze **A**. Natomiast drugie wiązanie wodorowe to –N(37)-H(38)···O(35), gdzie odległość H(38)···O(35) wynosi 2,38 Å. Ponieważ jest to jedyna różnica pomiędzy konformerami **C** i **A**, to porównując ich energie możemy wywnioskować, że oddziaływanie –NH···O w środkowym fragmencie salbutamolu jest o około 1 kcal/mol słabsze niż wiązanie wodorowe –OH···N. Nieco inny jest wpływ rozpuszczalnika na energię względną tej struktury. Zwykle polarne otoczenie powoduje zmniejszenie energii pomiędzy poszczególnymi konformerami, natomiast

w przypadku konformeru **C** energia względna wzrasta w wodzie do 2 kcal/mol. Jest to spowodowane zwiększeniem długości wiązania wodorowego $-N(37)-H(38)\cdots O(35)$ do 2,41 Å i, co z tym jest związane, pewnym osłabieniem tego oddziaływania [29, 30].

Kolejnym pod względem energii jest konformer **D**, w którym podobnie jak w konformerze **A** występuje wiązanie wodorowe $O(35)-H(36)\cdots N(37)$ o identycznej geometrii, którego długość wynosi 2,14 Å. Natomiast różni się on od najniższej energetycznej struktury **A** ułożeniem grup $-OH$ w pierścieniu benzenowym, pomiędzy którymi tworzy się oddziaływanie $-O(31)-H(32)\cdots O(33)$. Jest ono zdecydowanie dłuższe niż w strukturze **A**, bo odległość $H(32)\cdots O(33)$ wynosi 2,26 Å, co wskazuje, że jest ono słabsze. Dokładniej możliwe oddziaływania w tej części salbutamolu przedstawione są w dalszej części artykułu, gdzie energia możliwych wiązań wodorowych $-O-H\cdots O$ badana była, stosując alkohol salicylowy jako modelowy układ. Polarne otoczenie powoduje niewielkie skrócenie obu wiązań wodorowych stabilizujących tą strukturę (2,08 i 2,23 Å odpowiednio dla wiązań $O(35)-H(36)\cdots N(37)$ i $-O(31)-H(32)\cdots O(33)$) i zmniejszenie energii względnej do 1,20 kcal/mol. Wyniki uzyskane metodą MP2 dla tego konformeru są niemal identyczne zarówno jeśli chodzi o energię względną jak i parametry strukturalne obu wiązań wodorowych.

Konformer **E** uzyskany został po optymalizacji, kiedy geometrią startową była struktura salbutamolu w kryształach [31]. Jego energia względna jest dość wysoka i wynosi około 5 kcal/mol, zarówno dla izolowanej cząsteczki jak i w wodzie. Stabilizowany jest jedynie przez oddziaływanie $-N(37)-H(38)\cdots O(35)$, o geometrii bardzo podobnej jak w konformerze **C**, natomiast podstawniki przy pierścieniu aromatycznym są ustawione tak, że pomiędzy grupami hydroksylowymi nie występuje wiązanie wodorowe. Taka konformacja jest korzystna pod względem możliwości tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych stabilizujących strukturę kryształu. Zerwanie jednego wewnątrzcząsteczkowego wiązania $O-H\cdots O$ pozwala na utworzenie trzech międzycząsteczkowych wiązań stabilizujących strukturę kryształu. Dwóch przez grupę $-O(31)-H(32)$, w których występuje raz jako donator a raz jako akceptor protonu, oraz jednego przez grupę $-O(33)-H(34)$ [31].



Rysunek 3. Wybrane konformery salbutamolu w próżni wyznaczone metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p)
 Figure 3. Selected conformers of salbutamol in vacuum calculated using B3LYP-D3/6-311++G(d,p) method

Tabela 1. Energie względne wybranych konformerów salbutamolu w próżni oraz środowisku wodnym obliczone metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p)

Table 1. Relative energies of selected salbutamol conformers in vacuum and water environment calculated by B3LYP-D3/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p) methods

Konformer	Energia względna [kcal/mol]			
	Próżnia		Woda	
	B3LYP-D3	MP2	B3LYP-D3	MP2
A	0,00	0,00	0,00	0,00
B	0,28	0,24	0,07	0,06
C	1,37	1,65	1,97	2,19
D	1,35	1,38	1,20	1,29
E	4,91	5,69	4,85	5,54
F	1,70	1,22	2,12	1,59

Ostatni konformer salbutamolu, który nieco dokładniej będzie opisany to struktura **F**. Jego energia względna wynosi 1,70 i 1,22 kcal/mol odpowiednio dla metod B3LYP-D3 i MP2, czyli jest to jeden z niskoenergetycznych konformerów salbutamolu, pomimo że zmiana kąta dwuściennego między atomami N(37) -C(15) - C(13) - O(35) do około 174° powoduje zerwanie wiązań między grupami -N(37)-H(38) i -O(35)-H(36) i wydaje się, że struktura ta jest stabilizowana jedynie przez wiązanie wodorowe -O(33)-H(34)···O(31) o identycznej geometrii co w strukturach **A**, **B** i **C**. Jednak bliższe przyjrzenie się odległościom międzyatomowym, ujawnia możliwość stabilizujących oddziaływań typu OH···π

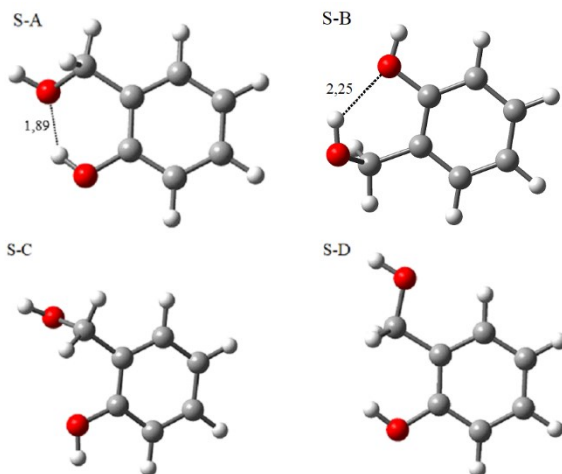
i $N-H \cdots \pi$ do elektronów sekstetu aromatycznego w pierścieniu benzenowym. Energia takiego oddziaływania, przy najkorzystniejszym wzajemnym ułożeniu oddziaływujących grup, może wynosić nawet 2 kcal/mol [32, 33], co jest porównywane z energią słabszych wiązań wodorowych $O-H \cdots O$.

2. KONFORMACJE MODELOWYCH UKŁADÓW – FRAGMENTÓW STRUKTURALNYCH SALBYTAMOLU

2.1. ALKOHOL SALICYLOWY

W celu oszacowania energii możliwych wiązań wodorowych $-O-H \cdots O$ w cząsteczce salbutamolu zbudowane zostało kilka konformerów alkoholu salicylowego. W wyniku optymalizacji geometrii tych struktur uzyskano 4 konformery (rys.4), których energie względne w próżni i w otoczeniu wody przedstawione są w tabeli 2. Ponadto, aby zweryfikować energie otrzymane funkcjonalem B3LYP-D3 wykonaliśmy obliczenia typu *single point* metodą MP2 stosując tą samą bazę funkcyjną 6-311++(Gd,p).

Najniższą energię wśród otrzymanych konformerów alkoholu salicylowego ma struktura **S-A**, w której występuje wiązanie wodorowe $-O(16)-H(17) \cdots O(14)$. Odległość $H(17) \cdots O(14)$ wynosi 1,89 Å, czyli jest identyczna jak w strukturach **A**, **B**, **C** i **F** salbutamolu.



Rysunek 4. Konformery alkoholu salicylowego w próżni wyznaczone metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p)
Figure 4. Conformers of salicylic alcohol in vacuum calculated using B3LYP-D3/6-311++G(d,p) method

Drugim pod względem energii ($\Delta E=1,59$ kcal/mol) jest konformer **S-B**. Różnica pomiędzy konformerami **S-A** i **S-B** polega na innym ułożeniu grup $-OH$ przy pierścieniu benzenowym i utworzeniu wiązania wodorowego $-O(14)-H(15) \cdots O(16)$.

To oddziaływanie jest dłuższe niż to występujące w konformerze **S-A**, bo odległość $H(32)\cdots O(33)$ wynosi 2,25 Å, w związku z tym można przypuszczać, że jest słabsze niż oddziaływanie $-O(16)-H(17)\cdots O(14)$ właśnie o około 1,5 kcal/mol w próżni o 1,2 kcal/mol w otoczeniu wody. Takie też różnice energetyczne występują pomiędzy strukturami **A** i **D** salbutamolu, w których ułożenie podstawników przy pierścieniu aromatycznym odpowiada właśnie odpowiednio konformerom **S-A** i **S-B**. Pozostałe dwa konformery alkoholu salicylowego mają wyraźnie wyższe energie, ponieważ ułożenie podstawników nie pozwala na występowanie stabilizujących wiązań wodorowych $O-H\cdots O$. Wyniki uzyskane metodą MP2 są zbliżone do wyników DFT.

Tabela 2. Energie względne konformerów alkoholu salicylowego w próżni oraz środowisku wodnym obliczone metodami B3LYP-D3/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP-D3/6-311++G(d,p)
Table 2. Relative energies of salicylic alcohol conformers in vacuum and water environment calculated by B3LYP-D3/6-311++G(d,p) and MP2/6-311++G(d,p)// B3LYP-D3/6-311++G(d,p) methods

Konformer	Energia względna [kcal/mol]			
	Próżnia		Woda	
	B3LYP-D3	MP2	B3LYP-D3	MP2
S-A	0,00	0,00	0,00	0,00
S-B	1,59	1,62	1,16	1,17
S-C	4,61	4,36	2,98	2,67
S-D	5,53	6,07	4,70	5,56

2.2. 2- (METYLOAMINO)PROPAN-2-OL

Kolejną modelową cząsteczką, którą można traktować jako fragment struktury salbutamolu jest 1-(metyloamino)propan-2-ol. Jego wszystkie konformery w próżni, zoptymalizowane metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p), zostały przedstawione na rysunku 5, a ich energie względne w próżni i w wodzie zebrane zostały w tabeli 3. Dodatkowo wykonano obliczenia *single point* metodą MP2/6-311++G(d,p) i wyniki tych obliczeń również są podane w tabeli 5.

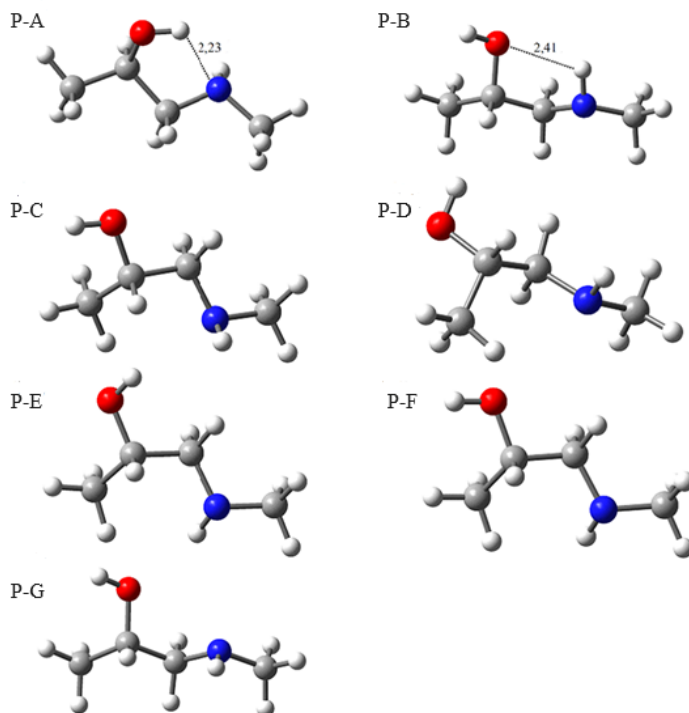
Najniżej energetyczną strukturą jest konformer **P-A**, stabilizowany głównie przez wiązanie wodorowe $O(2)-H(6)\cdots N(4)$ o długości 2,23 Å. Jest ono zauważalnie dłuższe niż analogiczne wiązanie występujące w konformerach **A**, **B** i **D** salbutamolu, co prawdopodobnie wynika z efektu sterycznego grupy *tert*-butylowej. Kolejny pod względem energii jest konformer **P-B** o energii wyższej o 1,8 i 1,6 kcal/mol odpowiednio w próżni i w wodzie. Występuje w nim oddziaływanie $-N(4)-H(9)\cdots O(2)$ o długości 2,41 Å, podobne do tego jakie stabilizuje konformery **C** i **E** salbutamolu. W pozostałych konformerach wiązania wodorowe pomiędzy grupami OH i NH nie występują a ich energia względna jest w zakresie od 3,5 do 5,7 kcal/mol.

W konformerze o najwyższej energii (**P-G**) dodatkowo jest niekorzystna bliskość wolnych par elektronowych atomów azotu i tlenu.

Tabela 3. Energie względne konformerów 1-(metyloamino)propan-2-olu w próżni oraz środowisku wodnym obliczone metodami B3LYP-D3/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p)// B3LYP-D3/6-311++G(d,p)

Table 3. Relative energies of 1-(methylamino)propan-2-ol conformers in vacuum and water environment calculated by B3LYP-D3/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p)// B3LYP-D3/6-311++G(d,p) methods

Konformer	Energia względna [kcal/mol]			
	Próżnia		Woda	
	B3LYP-D3	MP2	B3LYP-D3	MP2
P-A	0,00	0,00	0,00	0,00
P-B	1,81	2,10	1,63	1,86
P-C	3,45	3,75	3,04	3,33
P-D	3,54	3,89	2,90	3,18
P-E	3,58	3,88	2,79	3,02
P-F	3,73	4,11	2,94	3,25
P-G	5,64	6,04	3,27	3,48



Rysunek 5. Konformery 1-(metyloamino)propan-2-olu w próżni obliczone metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p) z uwzględnieniem poprawki dyspersyjnej D3.

Figure 5. Conformers of 1-(methylamino)propan-2-ol in vacuum calculated using B3LYP-D3/6-311++G(d,p) method

3. ODDZIAŁYWANIA SALBUTAMOLU Z CZĄSTECZKĄ WODY

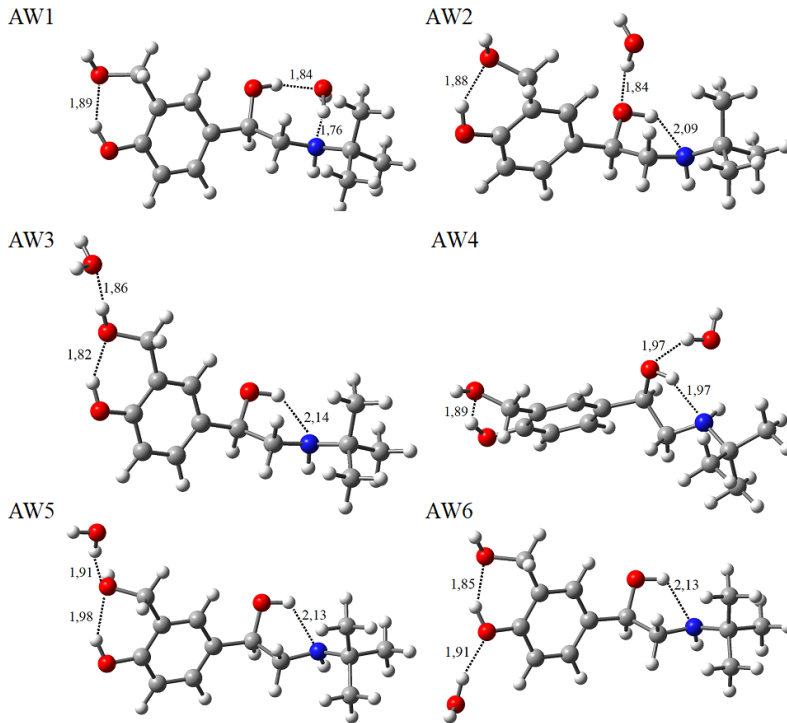
Ostatnim etapem badań dotyczących właściwości konformacyjnych salbutamolu było obliczenie struktur kompleksów jego najniższej energetycznego konformeru **A** z jedną cząsteczką wody, której możliwe położenie były wybrane na podstawie intuicji chemicznej w pobliżu polarnych grup (-OH, -NH) salbutamolu. Aby sprawdzić, czy uwzględnienie oddziaływań dyspersyjnych ma wpływ na energię wiązań wodorowych stabilizujących te kompleksy oraz jak duży jest ten wpływ, obliczenia wykonane były trzema metodami: B3LYP/6-31+G(d,p) z uwzględnieniem i bez uwzględnienia poprawki dyspersyjnej D3 oraz metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p).

Na rysunku 6 pokazanych jest sześć obliczonych monohydratów, a w tabeli 4 ich energia względna oraz energia oddziaływania międzymolekularnego, która została wyznaczona jako różnica pomiędzy energią kompleksu i obu składników w geometrii jaką przyjmują w hydracie. Energia oddziaływania została skorygowana ze względu na błąd superpozycji bazy (BSSE) [34] przez zastosowanie poprawki równoważenia bazowego (ang. *counterpoise correction, CP*) [35].

Najniższym energetycznym kompleksem jest **AW1**, w którym cząsteczka wody tworzy wiązanie wodorowe zarówno z grupą O(35)-H(36) jak i atomem azotu – N(37). W pierwszym oddziaływaniu woda jest akceptorem protonu a w drugim – donorem protonu. Energia tych dwóch oddziaływań wynosi 13,8 kcal/mol, a ich długości wynoszą odpowiednio 1,84 Å i 1,76 Å. Aby mogła powstać ta struktura musiało zostać zerwane wiązanie wodorowe wewnątrzcząsteczkowe O(35)-H(36)···N(37), które stabilizowało konformer **A** salbutamolu. W kolejnym, pod względem energii, kompleksie **AW2** cząsteczka wody, jako donor protonu, oddziałuje jedynie z grupą O(35)-H(36), a wszystkie wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania są zachowane, a nawet wiązanie O(35)-H(36)···N(37) jest krótsze (2,09 Å) niż w izolowanym salbutamolu. W kompleksach **AW3** – **AW6** występują oddziaływania O-H···O, o energii od 5,5 do 8,5 kcal/mol, w których woda, działając jako donor bądź akceptor protonu, nie zmienia znacząco konformacji salbutamolu.

Takie wyniki modelowania kompleksów salbutamolu tylko z jedną cząsteczką wody, mimo że układ jest bardzo uproszczony, są zgodne z danymi eksperymentalnymi. Analizując struktury salbutamolu, który tworzy kompleksy z białkami [36-38] można zauważyć, że najwięcej krótkich kontaktów salbutamol – białko występuje do grup -O(35)-H(36) i -N(37)-H(38).

Warto zauważyć, że uwzględnienie w obliczeniach poprawki Grimme'a na oddziaływania dyspersyjne wyraźnie zwiększa energię oddziaływania. Wzrost wynosi od 15% aż do 50% w przypadku kompleksu **AW2**. Podobnej wielkości wzrost energii wiązania wodorowego po uwzględnieniu oddziaływań dyspersyjnych obserwowany był dla monohydratów uracylu [39].



Rysunek 6. Kompleksy najniższej energetycznego konformeru salbutamolu z jedną cząsteczką wody, wyznaczone metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p)

Figure 6. Complexes of the lowest energy conformer of salbutamol with one water molecule, obtained using B3LYP-D3/6-311++G(d,p) method

Tabela 4. Energia względna (ΔE) oraz energia oddziaływania (E_{oddz}) [kca/mol] kompleksów konformeru A salbutamolu z jedną cząsteczką wody, obliczone metodą B3LYP/6-31+G(d,p) z uwzględnieniem i bez uwzględnienia poprawki dyspersyjnej D3 oraz metodą B3LYP-D3/6-311++G(d,p)

Table 4. Relative energies (ΔE) and interaction energies (E_{oddz}) [kca/mol] of salbutamol conformer A complexes with one water molecule calculated using the B3LYP/6-31+G(d,p) method with and without D3 dispersion correction and B3LYP-D3/6-311++G(d,p) method

Kompleks	Kompleksy salbutamolu z cząsteczką wody					
	B3LYP/6-31+G(d,p)		B3LYP -D3/6-31+G(d,p)		B3LYP -D3/6-311++G(d,p)	
	ΔE	E_{oddz}	ΔE	E_{oddz}	ΔE	E_{oddz}
AW1	0,00	-10,65	0,00	-14,40	0,00	-13,78
AW2	0,73	-6,84	1,47	-10,30	1,32	-9,93
AW3	0,66	-6,32	3,27	-7,31	2,96	-7,17
AW4	0,96	-6,27	3,32	-8,67	3,09	-8,37
AW5	1,38	-4,43	3,34	-5,80	3,11	-5,69
AW6	2,46	-4,88	4,32	-6,56	3,93	-6,52

UWAGI KOŃCOWE

Tematem niniejszej pracy były właściwości konformacyjne salbutamolu badane metodami DFT i MP2. Przedstawiono wyniki obliczeń funkcjonalem B3LYP izolowanej cząsteczki oraz sześciu kompleksów najniższej energetycznego konformeru z jedną cząsteczką wody. Modelowanie prowadzone było z zastosowaniem poprawki Grimme'a aby uwzględnić oddziaływania dyspersyjne. Zastosowano bazę funkcyjną 6-311++G(d,p). Analizując otrzymane wyniki można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Preferencje konformacyjne salbutamolu są przede wszystkim zależne od wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań pomiędzy polarnymi grupami -OH i -NH. Znaleziona najniższej energetyczna forma salbutamolu, zarówno w próżni jak i w otoczeniu wody, jest stabilizowana przez dwa wiązania wodorowe: -O(35)-H(36)...N(37) w środkowej części salbutamolu i -O(33)-H(34)...O(31) pomiędzy grupami hydroksylowymi będącymi podstawnikami przy pierścieniu aromatycznym.

2. Energia oddziaływania salbutamolu z cząsteczką wody może sięgać 14 kcal/mol i jest największa kiedy woda oddziałuje jednocześnie z grupami -O(35)-H(36) i -N(37)-H(38). Ten wniosek jest zgodny z analizą oddziaływań w kompleksach salbutamolu z białkami.

3. Podczas modelowania za pomocą funkcjonału B3LYP wiązań wodorowych salbutamolu z cząsteczką wody konieczne należy wziąć pod uwagę oddziaływania dyspersyjne. Udział tych oddziaływań w całkowitej energii wiązania może sięgać nawet 50%.

PODZIĘKOWANIE

Wszystkie obliczenia wykonano przy pomocy sprzętu i oprogramowania WCSS. Autorzy dziękują również za wsparcie finansowe w ramach Uniwersytetu Opolskiego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Quirt, K. J. Hildebrand, J. Mazza, F. Noya, H. Kim, *AACI*, 2018, **14**, 50.
- [2] H. A. N. Abood, *Biomed. Biotechnol. Res. J.*, 2021, **5**, 435.
- [3] M. Alimohammady, M. Jahangiri, F. Kiani, H. Tahermansouri, *Med. Chem. Res.*, 2018, **27**, 95.
- [4] M. I. Saleh, Y. M. Koh, S. C. Tan, A. L. Aishah, *Analyst*, 2000, **125**, 1569.
- [5] M. S. Varegg, K. M. Kloverod, M. K. Austnes, N. Siwinska, M. Slowikowska, A. Zak, A. Niedzwiedz, *J., Vet. Intern. Med.*, 2019, **33**, 976.
- [6] C. K. Billington, R. B. Penn, I. P. Hall, *Handb. Exp. Pharmacol.* 2017, **237**, 23.
- [7] H. Najout, M. Moutawakil, A. Elkoundi, N. Doghmi, H. Bekkali, *J. Med. Case Rep.*, 2020, **8**, 2050313X20969027.
- [8] P. Andrzejowski, W. Carroll, *Arch. Dis. Child.*, 2016, **101**, 194.
- [9] V. A. Cullum, J. B. Farmer, D. Jack, G. P. Levy, *Br. J. Pharmacol.*, 1969, **35**, 141.
- [10] A. Pokrywka, M. Bujalska-Zadrożny, A. Mamcarz, *Doping w sporcie*, PZWL, Warszawa, 2020.
- [11] A. Gumienieczek, *Wprowadzenie do analizy środków leczniczych*, PZWL, Warszawa, 2021.
- [12] F. Pillard, M. Lavit, V. L. Cances, J. Rami, G. Houin, A. Didier, D. Riviere, *Respir. Res.*, 2015, **16**, 155.

- [13] A. O. von Bueren, R. Ma, M. Schlumpf, W. Lichtensteiger, *Br. J. Sports Med.*, 2007, **41**, 874.
- [14] K. H. Carlsen, *Breathe*, 2005, **2**, 163.
- [15] K. H. Carlsen, S. D. Anderson, L. Bjermer, S. Bonini, V. Brusasco, W. Canonica, J. Cummiskey, L. Delgado, S. R. Del Giacco, F. Drobnic, T. Haahtela, K. Larsson, P. Palange, T. Popov, P. van Cauwenberge, *Allergy*, 2008, **63**, 492.
- [16] R. A. Tan, S. L. Spector, *Sports Med.*, 1998, **25**, 1.
- [17] C. Juan, C. Iguialada, F. Moragues, N. León, J. Mañes, *J. Chromatogr. A.*, 2010, **1217**, 6061.
- [18] C. J. Xu, H. Gao, N. Pan, M. Jang, Y. Huang, K. Zhu, P. Gong, S. Lv, *Int. J. Food Prop.*, 2019, **22**, 1183.
- [19] Y. Yan, J. Ning, X. Cheng, Q. Lv, S. Teng, W. Wang, *Foods*, 2022, **12**, 76.
- [20] M. Jabłoński, A. Kaczmarek, A. J. Sadlej, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 10890.
- [21] M. Jabłoński, *Molecules*, 2020, **25**, art. no. 5512
- [22] J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, *Gaussian 16, Revision C.01*, M., Inc., Wallingford CT, 2016.
- [23] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- [24] R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1980, **72**, 650.
- [25] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich and H. Krieg, *J. Chem. Phys.*, 2010, **132**, 154104.
- [26] L. A. Burns, A. Vázquez-Mayagoitia, B. G. Sumpter, C. D. Sherrill, *J. Chem. Phys.*, 2011, **134**, art. no. 084107
- [27] M. J. Frisch, M. Head-Gordon, J. A. Pople, *Chem. Phys. Lett.*, 1990, **166**, 275.
- [28] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2999.
- [29] T. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 48.
- [30] K. Wendler, J. Thar, S. Zahn, B. Kirchner, *J. Phys. Chem. A*, 2010, **114**, 9529.
- [31] J. P. Beale, N. C. Stephenson, *JPP*, 1972, **24**, 277.
- [32] H. Nagasawa, S. Ogawa, W. Kashihara, T. Isozaki, K. Hirata, S. I. Ishiuchi, M. Fujii, T. Suzuki, *J. Chem. Phys.*, 2024, **160**, 024303.
- [33] H. Sasaki, S. Daicho, Y. Yamada, Y. Nibu, *J. Chem. Phys.*, 2013, **117**, 3183.
- [34] F. B. van Duijneveldt, J. G. C. M. V. D. van de Rijdt, J. H. van Lenthe, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 1873.
- [35] S. F. Boys, F. Bernardi, *Mol. Phys.*, 1970, **19**, 553.
- [36] Warne T., Moukhametzianov R., Baker J. G., Nehmé R., Edwards P. C., Leslie A. G. W., Schertler G. F. X., Tate C. G., *Nature*, 2011, **469**, 241.
- [37] T. Warne, P. C. Edwards, A. S. Dorfe, A. G. W. Leslie, C. G. Tate, *Science*, 2019, **364**, 775.
- [38] Yang F., Ling S., Zhou Y., Zhang Y., Lv P., Liu S., Fang W., Sun W., Hu L. A., Zhang L., Shi P., Tian C., *Natl. Sci. Rev.*, 2021, **8**, art. no. nwa284
- [39] K. Rzepiela, A. Buczek, T. Kupka, T. Kar, M. A. Broda, *Wiad. Chem.*, 2023, **77**, 7.