

# Ispitivanje mogućnosti primjene eutektičkih otapala u reakcijama kvaternizacije

---

Lovrić, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:859321>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Josipa Lovrić

**Ispitivanje mogućnosti primjene eutektskih  
otapala u reakcijama kvaternizacije**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Josipa Lovrić

**Ispitivanje mogućnosti primjene eutektskih  
otapala u reakcijama kvaternizacije**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

## Ispitivanje mogućnosti primjene eutektičkih otapala u reakcijama kvaternizacije

Josipa Lovrić

**Rad je izrađen na:** Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Komentor:** izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

### Sažetak

Zbog problematike korištenja štetnih organskih otapala u sintetskim procesima, sve se veća pažnja posvećuje eutektičkim otapalima kao ekološki prihvatljivijom alternativom u odnosu na tradicionalna organska otapala, prvenstveno zbog svoje dostupnosti, biorazgradivosti, nehlapljivosti, stabilnosti i mogućnosti recikliranja. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida ( $\text{ChCl}$ ) u reakcijama kvaternizacije. Kvaternizacija je izvedena na nikotinamidu pomoću elektrofila 2-bromacetofenona. Posljednjih godina intenzivno se ispituje moguća sinteza kvaternih soli derivata piridina, uključujući kvaternih soli nikotinamida, te njihova primjena kao antibakterijska, antifungalna, antidotska i antikancerogena sredstva.

**Diplomski rad obuhvaća:** 37 stranica, 26 slika, 8 tablica, 36 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** eutektička otapala, kolin-klorid, kvaternizacija, nikotinamid

**Rad prihvaćen:** 17.09.2019.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Tomislav Balić, predsjednik
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentor i član
3. izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, komentor i član
4. doc. dr. sc. Marija Jozanović, zamjenica člana

**Rad je pohranjen:** u knjižnici Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Chemistry**

**Graduate Study of Chemistry; Research Study**

**Scientific Area: Natural Sciences**

**Scientific Field: Chemistry**

**Examination of the possibility of using eutectic solvents in quaternization reactions**

**Josipa Lovrić**

**Thesis completed at:** Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** assist. prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD

**Co-supervisor:** assoc. prof. Dajana Gašo-Sokač, PhD

**Abstract**

Due to the problems regarding the usage of harmful organic solvents in the synthesis processes, increasing attention is being given to eutectic solvents as a environmentally acceptable alternative to the traditional organic solvents. This is primarily due to their availability, biodegradability, non-volatility, stability and recycling capabilities. In this thesis, the possibility of using eutectic solvents based on choline chloride (ChCl) in the quaternization reactions is investigated. Quaternization was performed on nicotinamide using 2-bromoacetophenone as an electrophile. In recent years, the possible synthesis of quaternary salts of pyridine derivatives, including quaternary salts of nicotinamide, and their use as antibacterial, antifungal, antidotic and anticancerogenic agents has been extensively investigated.

**Thesis includes:** 37 pages, 26 figures, 8 tables, 36 references

**Original in:** Croatian

**Key words:** deep eutectic solvents, choline chloride, quaternization, nicotinamide

**Thesis accepted:** 17.09.2019.

**Reviewers:**

1. assist. prof. Tomislav Balić, PhD; chair
2. assist. prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. assoc. prof. Dajana Gašo-Sokač, PhD; co-supervisor and member
4. assist. prof. Marija Jozanović, PhD; substitute member

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Kuhačeva 20, Osijek, Croatia



Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "*Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva*" (UIP-2017-05-6593).

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 2. LITERATURNI PREGLED.....                                     | 2  |
| 2.1. Zelena kemija .....  | 2  |
| 2.1.1. Eutektička otapala.....                                  | 4  |
| 2.1.1.1. Primjena eutektičkih otapala u organskoj sintezi ..... | 9  |
| 2.2. Heterociklički aromatski spojevi.....                      | 12 |
| 2.2.1. Piridin i njegovi derivati .....                         | 13 |
| 2.3. Priprava kvaternih amonijevih soli.....                    | 16 |
| 2.3.1. Primjena kvaternih amonijevih soli.....                  | 18 |
| 2.4. Metode identifikacije.....                                 | 20 |
| 2.4.1. Infracrvena spektroskopija (IR).....                     | 20 |
| 2.4.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) .....              | 22 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                    | 25 |
| 3.1. Materijali i metode.....                                   | 25 |
| 3.2. Priprava eutektičkih otapala .....                         | 26 |
| 3.3. Priprava kvaterne soli nikotinamida.....                   | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....                                    | 30 |
| 5. ZAKLJUČAK.....   | 35 |
| 6. LITERATURA .....   | 36 |

# 1. UVOD

Velika svjesnost o štetnom utjecaju kemikalija na okoliš, posebno pesticida, kao i svojevršno buđenje ekološke svijesti znanstvenika i institucija, potaknulo je objavljivanje knjige *Tiho proljeće* Rachel Carson 1962. godine. Ekološki bestseller pobudio je interes o razvoju pokreta za zaštitu okoliša te koncepta „zelene“ kemije kojim se nastoji postići razvoj ekološki sigurnijih kemikalija i proizvodnih procesa. Prema definiciji najpoznatije agencije za zaštitu okoliša, Američke agencije za zaštitu okoliša (eng. *Environmental Protection Agency*, EPA), „zelena“ kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju tvari opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš.

„Čisti“ kemijski procesi postali su veliki izazov za znanstvenike, posebno u području organske sinteze i organske kemije. Kao rezultat razvijene su ekološki prihvatljivije metode za sintezu organskih molekula u kojima se nastoji zamijeniti uporaba hlapljivih i opasnih organskih otapala sa ekološki prihvatljivijim otapalima i povećati učinkovitost sinteze.

Posljednja dva desetljeća sve veća pažnja posvećivala se istraživanju ionskih tekućina, organskih soli koje se tale pri temperaturi nižoj od 100 °C, a imaju specifična svojstva. Međutim, zbog slabe biorazgradivosti i toksičnosti ionskih tekućina, kao alternativa ionskim tekućinama, sve više se ispituju eutektička otapala, ekološki prihvatljivija otapala upravo zbog svoje biorazgradivosti, netoksičnosti, niske hlapljivosti, sintetske dostupnosti te mogućnosti recikliranja i ponovne uporabe [1, 2, 3].

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene eutektičkih otapala u reakciji kvaternizacije nikotinamida i 2-bromacetofenona. Zadatak je utvrditi da li su eutektička otapala na bazi kolin-klorida (ChCl) pogodan medij za sintezu kvaternih soli nikotinamida.

Prvi dio ovoga rada obuhvaćao je pripremu eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida. U drugom dijelu rada izvedene su sinteze kvaternih soli reakcijama kvaternizacije nikotinamida konvencionalnim putem pomoću elektrofila 2-bromacetofenona. Organske sinteze provedene su u eutektičkim otapalima. Treća faza rada obuhvaćala je pročišćavanje dobivenih sirovih produkata prekrizacijom iz odgovarajućeg otapala, određivanje tališta te njihovu identifikaciju spektroskopskim metodama IR, <sup>1</sup>H-NMR i <sup>13</sup>C-NMR.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Zelena kemija

Pokret za zaštitu okoliša, poznat kao „zelena“ kemija utemeljen je 1990. godine u SAD-u, a od 1995. pokrenut je program Green Chemistry Challenge Awards Program s ciljem prepoznavanja i razvijanja fundamentalnih i razvojnih kemijskih industrijskih metodologija kojima se postiže prevencija onečišćivača kroz smanjenje izvora onečišćenja [4]. „Zelena“ kemija je po definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša (EPA-e) definirana kao program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju tvari opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš [5]. Glavni ciljevi „zelene“ kemije su postići sigurnije, čistije i energetski učinkovitije kemijske procese, zaštita okoliša i ekonomska dobit, a ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih pravaca poput katalize, biokatalize, uporabe alternativnih obnovljivih sirovina, alternativnih reakcijskih medija (voda, ionske kapljevine, superkritični fluidi), alternativnih reakcijskih uvjeta (aktivacija primjenom mikrovalnog i ultrazvučnog zračenja) kao i novim fotokatalitičkim reakcijama [5, 6].

P.T. Anastas i J.C. Warner su 1998. godine predstavili 12 načela „zelene“ kemije (*Tablica 1*). Nemoguće je istodobno maksimalno zadovoljiti svih 12 načela „zelenog“ procesa, ali se tijekom pojedine sinteze pokušava zadovoljiti i primijeniti što veći broj načela.

*Tablica 1.* 12 načela „zelene“ kemije [7]

#### 1. **Prevenција nastanka otpada**

Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.

---

#### 2. **Atomska ekonomičnost**

Kemijsku sintezu treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni produkt.

---

#### 3. **Sinteza manje opasnih kemikalija**

Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne upotrebljavaju i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.

---

#### 4. **Stvaranje sigurnijih kemikalija**

Produkte sinteze treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.

---

#### 5. **Uporaba sigurnijih otapala i pomoćnih tvari**

Uporabu pomoćnih kemijskih tvari treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.

---

#### 6. **Dizajn za učinkovitu energiju**

Sintetske procese treba obavljati pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku kako bi se energetska zahtjevi sveli na minimum.

---

#### 7. **Uporaba obnovljivih sirovina**

Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.

---

#### 8. **Redukcija procesa**

Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštita funkcijskih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskog procesa itd.).

---

#### 9. **Kataliza**

Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama.

---

#### 10. **Dizajniranje razgradljivijih produkata**

Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.

---

#### 11. **Kontrola procesa**

Potrebno je primijenjivati i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.

---

#### 12. **Sigurnost**

Kemijski procesi trebaju biti dizajnirani tako da smanjuju potencijal nastanka eksplozije i požara.

Zbog problematike korištenja hlapljivih i opasnih organskih otapala, cilj 5. načela je odabrati ekološki prihvatljivija „zelena“ otapala koja bi prema smjernicama „zelene“ kemije trebala biti jednostavna za upotrebu, kemijski i fizikalno stabilna, niske hlapljivosti te jednostavna za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe [2].

### 2.1.1. Eutektička otapala

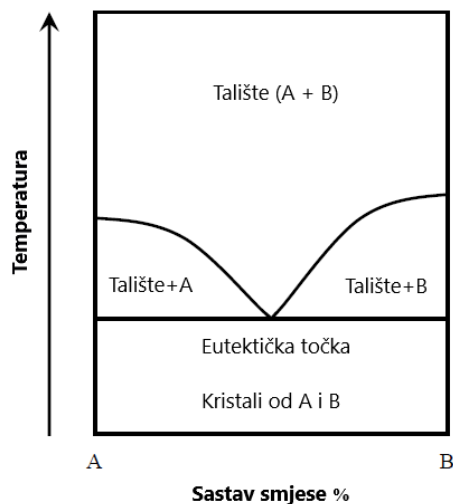
Većina organskih otapala uzrokuju brojne negativne učinke na okoliš i ljudsko zdravlje, ali ona su nažalost još uvijek neizbježna, a njihovo je korištenje u kemijskoj i biotehnološkoj industriji veliko. Pokušavajući unaprijediti proizvodnju industrijski važnih kemikalija u ekološkom i ekonomskom pogledu, sve više se istražuje primjena nekonvencionalnih otapala, među kojima se ističu ionske tekućine i eutektička otapala.

Tijekom posljednja dva desetljeća, ionske tekućine (eng. *Ionic Liquids*, ILs) su privukle veliku pažnju znanstvenika. Ionske tekućine su organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C. Specifičnost ionskih tekućina je što, za razliku od klasičnih otapala, nisu građene od molekula već od iona. Kationi su velike organske molekule niske simetrije koje su različito supstituirane, a sadrže pozitivno nabijen dušikov, sumporov ili fosforov atom. Anioni su najčešće halidi, tetrafluoroborat, heksafluorofosfat, nitrat, sulfat, acetat, dicijanamid, trifluoroacetat. Zbog neznatne hlapljivosti, nezapaljivosti, velike toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti, intenzivno se proučavaju kao „zelena“ zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala. Nisko talište ovih spojeva je posljedica niske energije kristalne strukture zbog velikih i asimetričnih kationa te slabih interakcija između iona uzrokovanih delokalizacijom naboja na anionu i kationu [1]. Bitno je napomenuti da se ionske kapljevine ubrajaju u polarna otapala slične polarnosti kao alkoholi, a s različitim spojevima ostvaruju interakciju pomoću vodikovih veza, dipol-dipol, van der Waalsovih interakcija te elektrostatskih interakcija. S obzirom na brojne mogućnosti kombiniranja kationa i aniona mogu se mijenjati fizikalna svojstva ionskih tekućina (viskoznost, gustoća, površinska napetost). Unatoč tomu, korištenje ionskih tekućina je često izazov zbog njihove slabe biorazgradivosti i održivosti.

U posljednje vrijeme se, kao alternativa ionskim tekućinama, sve više ispituju i upotrebljavaju eutektička otapala. Iako imaju slična fizikalno-kemijska svojstva kao i ionske tekućine, ekološki su prihvatljivija alternativa zbog svoje biorazgradivosti, netoksičnosti i sintetske dostupnosti [3]. Osim navedenog, sintetske procese u njima moguće je provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku što ujedno smanjuje energetske zahtjeve.

Eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su smjesa dviju ili više komponenti u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego

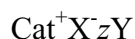
pojedinačne komponente smjese, što je rezultat nastanka nekovalentnih intermolekularnih interakcija, primjerice vodikovih veza ili van der Waalsovih interakcija (*Slika 1.*). Najniža temperatura na kojoj eutektik može postojati u tekućoj fazi naziva se eutektička točka.



*Slika 1.* Fazni dijagram dvokomponentnog sustava [8]

Spadaju u četvrtu generaciju ionskih tekućina, a dobivaju se miješanjem akceptora vodikovih veza (kvaterne amonijeve soli ili metalne soli) i donora vodikovih veza (amidi, karboksilne kiseline, alkoholi, šećeri) u različitim omjerima [9]. Kombiniranjem različitih akceptora i donora vodikove veze, kreiraju se eutektička otapala željenih fizikalno-kemijskih svojstava, odnosno moguće je postići točno željenu Lewisovu ili Brønstedovu kiselost, viskoznost, polarnost, točku leđišta i provodnost [10].

Eutektička otapala mogu se opisati općom formulom:



gdje  $\text{Cat}^+$  predstavlja bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, a  $X^-$  Lewisovu bazu, odnosno halogenidni anion. Kompleksne anionske vrste se formiraju između  $X^-$  i Lewisove ili Brønstedove kiseline Y (z se odnosi na broj Y molekula koje međudjeluju s anionom). S obzirom na vrstu kompleksirajućeg agensa (Y), eutektička otapala dijele se na 4 tipa (*Tablica 2.*).

**Tablica 2.** Podjela eutektičkih otapala [11]

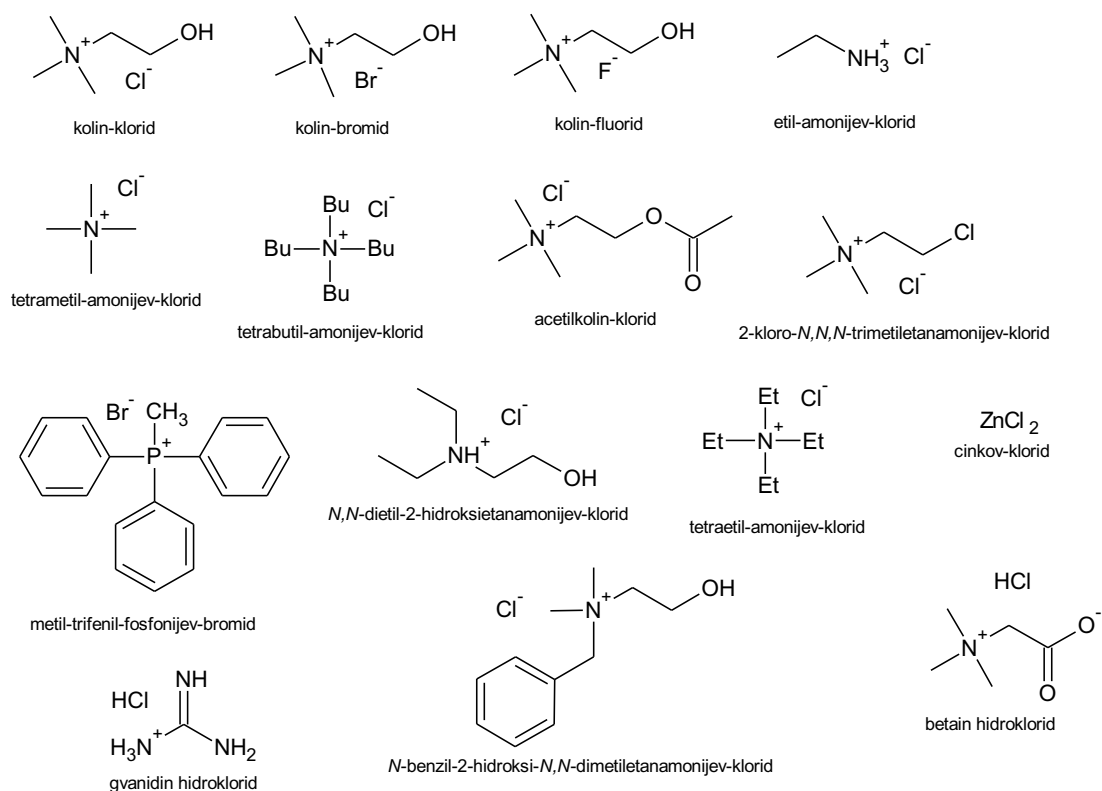
| TIP     | OPĆA FORMULA  |
|---------|---|
| TIP I   | $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$ , M=Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In  |
| TIP II  | $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \times y\text{H}_2\text{O}$ , M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe                                     |
| TIP III | $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$ , Z=CONH <sub>2</sub> , COOH, OH   |
| TIP IV  | $\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+ \times \text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}^-$ , M=Al, Zn i Z=CONH <sub>2</sub> , OH |

Eutektička otapala *tip I* sastoje se od metalne soli,  $\text{MCl}_x$  i kvaterne amonijeve soli. Raspon takvih soli, koje tvore eutektičke smjese sa dovoljno niskim talištem, je ograničen. Iz tog razloga upotrebljavaju se hidrirane metalne soli u kombinaciji sa organskim solima (npr. kolin-klorid), tvoreći *tip II* eutektičke smjese. Hidrirane metalne soli su relativno jeftine i otporne na vlagu čime je omogućena njihova primjena u raznim industrijskim procesima. *Tip III* eutektička otapala sastoje se od organskih soli (npr. kolin-klorid) i donora vodikovih veza (eng. *Hydrogen Bond Donor*, HBD). Ovaj tip eutektičkih otapala ima veliku prednost jer omogućuje otapanje mnogih vrsta prijelaznih metala, uključujući kloride i okside, relativno su jeftine, nereaktivne s vodom i biorazgradive. Imaju širok raspon primjene zbog velikog broja HBD-a pri čemu se mogu dizajnirati raznovrsna otapala tako da odgovaraju određenoj namjeni (**Slika 2.**).

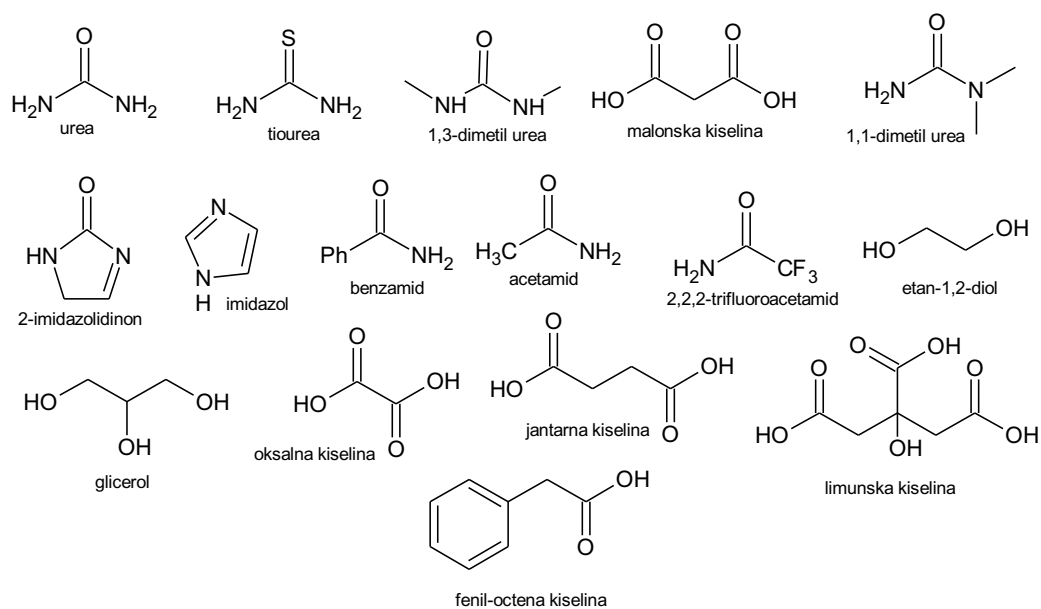
Nedavna istraživanja pokazala su da kombinacije metalnih halogenida i uree mogu formirati eutektičku smjesu s talištem nižim od 150 °C. Dokazano je da prijelazni metali mogu biti korišteni za dobivanje eutektičke smjese te je time formiran *tip IV* eutektičke smjese. Primjer *tip IV* eutektičke smjese je  $\text{ZnCl}_2$  i donor vodikove veze (urea, acetamid, etilen glikol, 1,6-heksandiol itd.) [11].

Najčešće korišteno eutektičko otapalo kolin-klorid/urea (ChCl/U) ubraja se u *tip III* eutektičkih otapala (**Slika 3.**). Abbott i suradnici (2003.) su prvi put opisali svojstva eutektičke smjese ChCl/U u molarnom omjeru 1:2. Miješanjem navedene dvije komponente sa visokim talištima (302 °C za ChCl i 133 °C za U) uz zagrijavanje na 80 °C, dobivena je smjesa koja je pri sobnoj temperaturi u tekućoj fazi i posjeduje nisko talište ( $t_f=12$  °C).

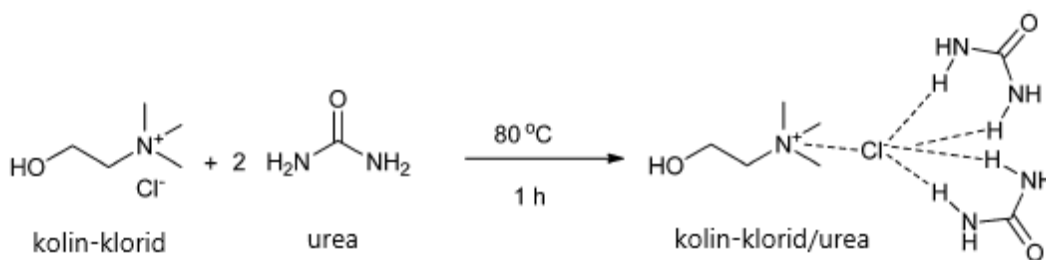
## Akceptori vodikove veze



## Donori vodikove veze



**Slika 2.** Primjeri akceptora i donora vodikovih veza koji tvore eutektička otapala [10, 13]



**Slika 3.** Priprema eutektičkog otapala kolin-klorid/urea [13]

Kada su komponente koje tvore eutektičko otapalo prirodni metaboliti, takva otapala nazivaju se prirodnim eutektičkim otapalima (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Pošto se ova otapala sastoje od spojeva prirodnog podrijetla (aminokiseline, organske kiseline, šećeri, derivati kolina), u potpunosti se uklapaju u koncept zelene kemije [14].

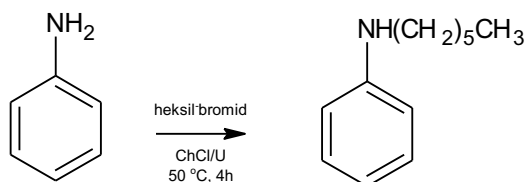
Iako još uvijek nije istražena toksičnost na okoliš, eutektička otapala smatraju se „zelenijom“ alternativom u odnosu na ionske tekućine. Eutektička otapala su ekološki prihvatljiva alternativa tradicionalnim otapalima, prvenstveno zbog svoje dostupnosti, biorazgradivosti, stabilnosti, nehlapljivosti, netoksičnosti, te mogućnosti direktne uporabe u sintezi bez dodatnog pročišćavanja [10, 15]. Zbog iznimnih svojstava koje posjeduju i pristupačne cijene u odnosu na klasična organska otapala, primijenjuju se u području katalize/biokatalize, organske sinteze, ekstrakcije, elektrokemije, obrade metala, te proizvodnji biodizela [11, 14].

Većina eutektičkih otapala bazirana je na kolin-kloridu, kvaternoj amonijevoj soli,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ . Prije svega, kolin-klorid je relativno jeftina, biorazgradiva i netoksična organska sol, poznatija kao vitamin B<sub>4</sub>, koja se može ekstrahirati iz biomase ili sintetizirati iz fosilnih goriva [2, 11]. Vitamin se široko upotrebljuje kao dodatak stočnoj hrani, a osobito peradi. Potiče rast i razvoj životinja, poboljšanje kvalitete mesa i jaja, te pospješuje pravilno funkcioniranje imunološkog i živčanog sustava. Nadalje, pomaže u održavanju cjelovitosti stanične membrane i normalnom razvoju hrskavica, čime se kod

peradi sprječava peroza<sup>1</sup>. Nadalje, bitno svojstvo ChCl/U otapala je sposobnost recikliranja, odnosno mogućnost ponovnog korištenja istog otapala nakon izolacije željenog produkta. Reakcijski produkti mogu se izolirati iz eutektičkog otapala ekstrakcijom pomoću organskih otapala koji se ne miješaju s ChCl/U, kao što su eter ili etil-acetat. Ponovna uporaba ChCl/U moguća je nakon otparavanja upotrijebljenog organskog otapala iz eutektika. Međutim, reakcijski produkti koji nisu topivi u vodi mogu se odvojiti miješanjem reakcijske smjese s vodom, pri čemu se izolirani produkt odvoji filtracijom, a voda otpari iz otapala. Ovaj način izolacije produkta je vrlo jednostavan i ne zahtijeva korištenje štetnih organskih otapala [16].

### 2.1.1.1. Primjena eutektičkih otapala u organskoj sintezi

Najznačajnije područje primjene eutektičkih otapala je u organskoj sintezi. Singh i suradnici (2011.) predstavili su zanimljiv primjer selektivnog mono *N*-alkiliranja primarnih aromatskih amina koristeći eutektičko otapalo koje je imalo dvostruku ulogu, točnije ulogu otapala i katalizatora u reakciji (*Slika 4.*, *Slika 5.*). Reakcija se odvijala relativno kratko (~4h) na temperaturi 50 °C.



**Slika 4.** Selektivno mono *N*-alkiliranje primarnog aromatskog amina pomoću alkilbromida u eutektičkom otapalu ChCl/U [17]

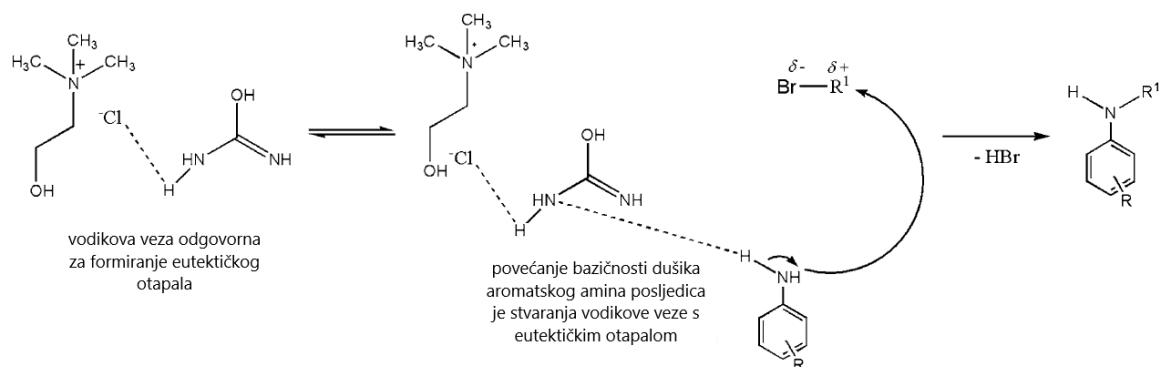
Produkt je izoliran ekstrakcijom pomoću etil-acetata, a eutektik ChCl/U ponovno upotrijebljen. Recikliranje eutektičkog otapala pokazalo je male gubitke reaktivnosti, odnosno početno iskorištenje koje je iznosilo 78 % nakon pete ponovljene upotrebe istog eutektika smanjilo se na 65 %.

---

<sup>1</sup> Peroza je poremećaj kod peradi koji je karakteriziran deformacijom kostiju nogu. Uzrokovan je deficijencijom mangana (Mn) i nedostatkom vitamina (biotin, kolin, nikotinska kiselina, folna kiselina) u prehrani peradi.



Autori su ispitali tri različita eutektika za selektivno *N*-alkiliranje aromatskih amina. U **Tablici 3.** prikazani su rezultati iz kojih se mogu vidjeti iskorištenja reakcija kao i smanjenje potrebnog vremena reakcije ukoliko se reakcija provodi u eutektičkom otapalu ChCl/U u odnosu na druga dva.

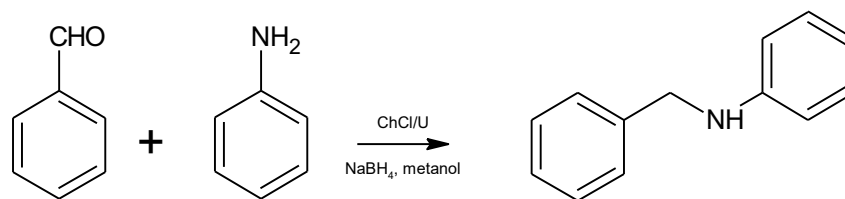


**Slika 5.** Pretpostavljeni mehanizam mono *N*-alkiliranja primarnog aromatskog amina u eutektičkom otapalu ChCl/U [17]

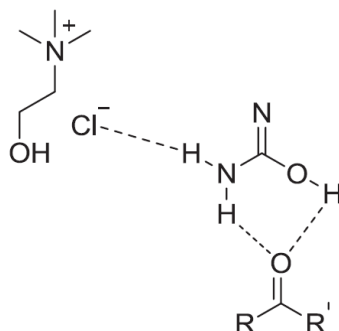
**Tablica 3.** Utjecaj biorazgradivog medija na *N*-alkilaciju anilina s heksil-bromidom [17]

| Biorazgradivi medij | Vrijeme reakcije / h | Iskorištenje / % |
|---------------------|----------------------|------------------|
| glicerol            | 10                   | 55               |
| DES ChCl/glicerol   | 8                    | 65               |
| DES ChCl/urea       | 4                    | 78               |

Saberi i suradnici (2014.) predlažu jednostavnu sintezu sekundarnih amina reduktivnom aminacijom aldehida/ketona u prisutnosti eutektičkog otapala ChCl/U i reducensa NaBH<sub>4</sub> u metanolu (**Slika 6.**). Sintaza *N*-benzilanilina u ChCl/U uz prisutnost NaBH<sub>4</sub> rezultirala je niskim prinosom (20 %). Nizak prinos reakcije posljedica je slabe topljivosti NaBH<sub>4</sub> u ChCl/U. Iz tih razloga, reakcija se odvija u metanolu (2 mL), prikladnom otapalu za otapanje NaBH<sub>4</sub>, pri čemu je nakon 45 minuta produkt izoliran u 92 %-tnom iskorištenju. Autori su pretpostavili da eutektik katalizira samu reakciju formiranjem vodikove veze s karbonylnim spojem i sa iminom pri čemu se povećava elektrofilnost ugljika (**Slika 7.**).

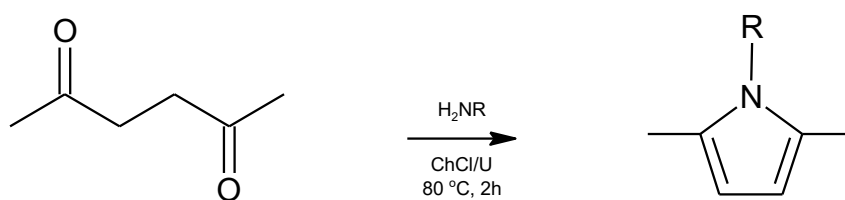


**Slika 6.** Reduktivna aminacija aldehida/ketona u eutektičkom otapalu ChCl/U [18]



**Slika 7.** Formiranje vodikove veze između karbonilnog spoja i eutektičke smjese ChCl/U [18]

Veliko područje primjene eutektičkih otapala je i u reakcijama ciklizacije. Handy i Lavender (2013.) u svom radu predlažu sintezu supstituiranih pirola Paal-Knorr reakcijom (*Slika 8.*).



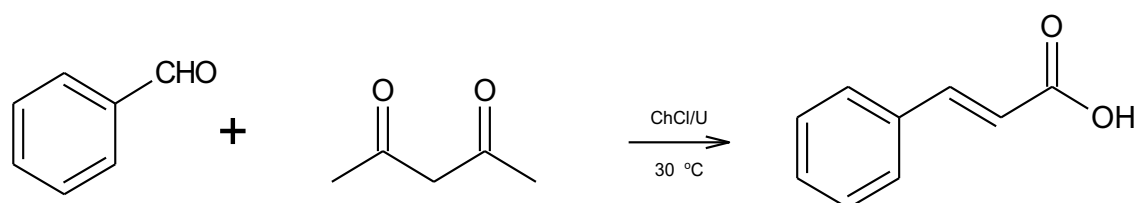
**Slika 8.** Paal-Knorr reakcija ciklizacije u eutektičkom otapalu ChCl/U [19]

Prve reakcije proučavane u eutektičkim otapalima bile su reakcije jednostavnih amina s 2,5-heksadionom. Miješanjem ekvimolarne količine diona i amina u ChCl/U na 80 °C tijekom 2h rezultiralo je dobivanjem produkata u relativno visokom iskorištenju (*Tablica 4.*).

**Tablica 4.** Paal-Knorr reakcija s 2,5-heksadionom u ChCl/U [19]

| R (amin)  | Vrijeme reakcije (h) | Iskorištenje (%) |
|-----------|----------------------|------------------|
| benzil    | 2                    | 98               |
| heksil    | 2                    | 99               |
| sec-butil | 2                    | 92               |

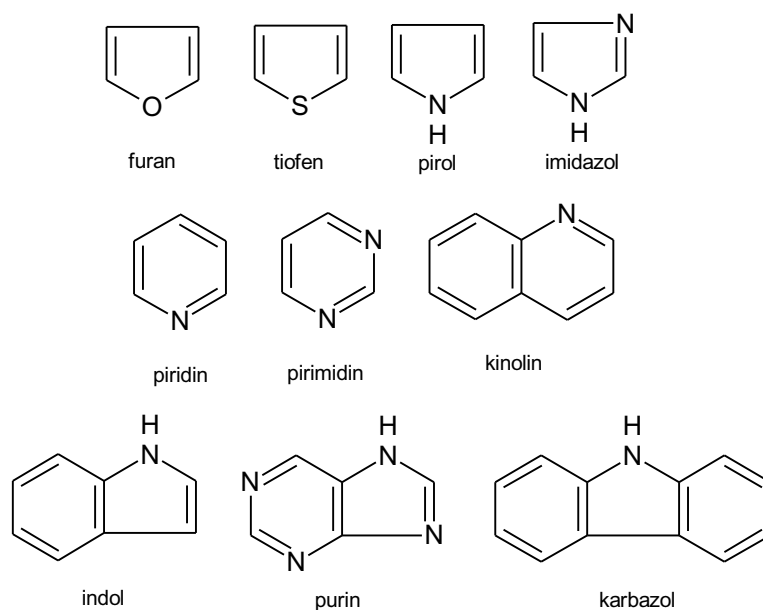
Istraživanja ukazuju i na široku primjenu eutektičkih otapala u reakcijama kondenzacije. Pawar i suradnici (2011.) predložili su Perkinovu kondenzaciju u sintezi cimetine kiseline u ChCl/U (*Slika 9*). Nastali produkt izoliran je u 92 %-tnom iskorištenju, netopljiv je u vodi što omogućava jednostavan način izolacije produkta i mogućnost ponovnog korištenja eutektičkog otapala.



**Slika 9.** Perkinova reakcija kondenzacije u eutektičkom otapalu ChCl/U [20]

## 2.2. Heterociklički aromatski spojevi

Heterociklički spojevi su ciklički organski spojevi čiji se prsten, osim ugljikovih atoma, sastoji od najmanje jednog atoma drugog elementa koji se naziva heteroatom. Najčešći heteroatomi heterocikličkih spojeva su kisik, sumpor i dušik. Kod heterocikličkih aromatskih spojeva izražen je aromatski karakter: ciklički su, planarni, stabilni spojevi, imaju po jednu *p*-orbitalu na svakom atomu u prstenu i zadovoljavaju Hückel-ovo pravilo, odnosno pravilo  $(4n+2)$   $\pi$ -elektrona [21]. Njihova najčešća podjela je na peteročlane, šesteročlane i kondenzirane heteroatomske spojeve (*Slika 10*).

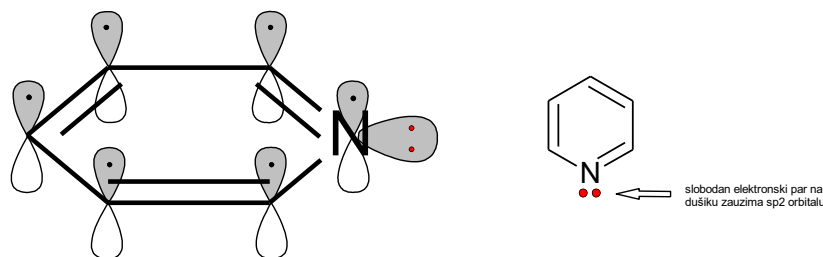


**Slika 10.** Najznačajniji predstavnici heterocikličkih aromatskih spojeva

Heterocikli su vrlo rasprostranjeni i važni spojevi. Sastavni su dijelovi mnogih organskih spojeva poput alkaloida, vitamina, lijekova, pesticida, aminokiselina, nukleinskih kiselina, enzima, koenzima, prirodnih i sintetskih boja što ukazuje na njihovu iznimnu važnost.

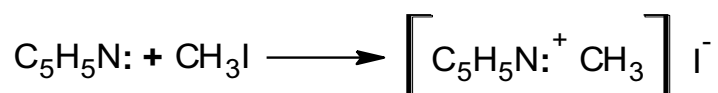
### 2.2.1. Piridin i njegovi derivati

Piridin je ciklički, planaran, potpuno konjugiran aromatski organski spoj koji u svojoj strukturi sadrži dušik kao heteroatom. Posjeduje  $6\pi$ -elektrona u cikličkom konjugiranom sustavu  $p$ -orbitala koje se međusobno preklapaju (**Slika 11.**). Piridin sadrži jedan nepodijeljeni elektronski par koji je lokaliziran na dušikovom atomu i nije dio delokaliziranog  $\pi$ -elektronskog sustava aromatskog prstena [21, 22].



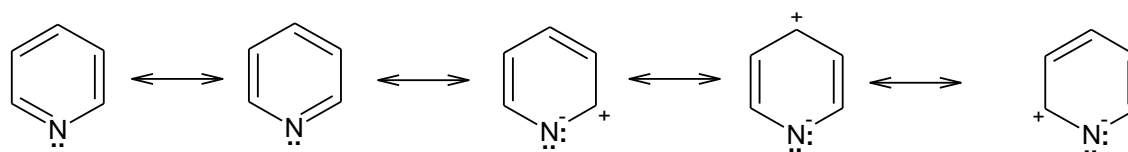
**Slika 11.** Struktura piridina

Slobodan elektronski par na dušiku u piridinu nije uključen u aromatski sekstet kao u slučaju pirola, kao posljedica toga piridin se ponaša kao baza te s kiselinama daje soli, i kao nukleofil i s alkilirajućim reagensima daje kvaternarne amonijeve soli (**Slika 12.**).



**Slika 12.** Dobivanje kvaternih amonijevih soli iz piridina

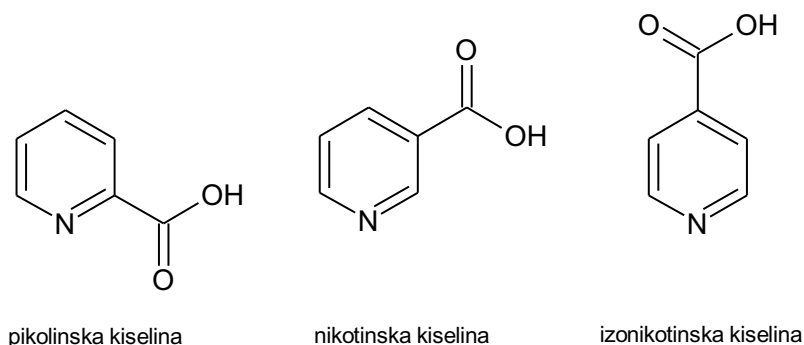
Elektronegativni dušikov atom u piridinu uzrokuje induktivnu polarizaciju što dodatno stabilizira mezomerne strukture (**Slika 13.**) u kojima je parcijalno negativan naboj na dušiku, a parcijalno pozitivan naboj na ugljiku, smješten uglavnom na α- i γ- pozicijama [23].



**Slika 13.** Rezonantne strukture piridina

Piridin osim u reakcijama koje se odvijaju na dušiku piridinskog prstena podliježe i reakcijama elektrofilne i nukleofilne aromatske supstitucije.

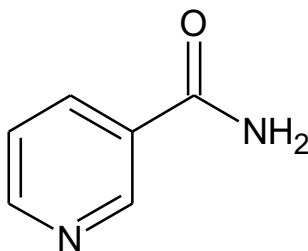
Piridin i njegovi derivati vrlo su važni i rasprostranjeni spojevi, a prvenstveno služe kao prekursori pesticida i lijekova. Topljiv je u vodi i alkoholu, a poput mnogih amina ima vrlo neugodan miris i otrovan je. Piridinski prsten sastavni je dio mnogih spojeva, uključujući vitamine i koenzime. Iz piridina se sintetiziraju tri izomerne piridin-karboksilne kiseline: pikolinska, nikotinska i izonikotinska kiselina (*Slika 14.*).



*Slika 14.* Izomerne piridin-karboksilne kiseline

Nikotinska kiselina dobivena je oksidacijom alkaloida nikotina koji se može pronaći u biljkama porodice *Solanaceae*, naročito u duhanu. Nikotinska kiselina zajedno sa amidom te kiseline (nikotinamid) pripada u vitamine B-kompleksa. Za nikotinamid su se upotrebljavali različiti nazivi: niacinamid, amid nikotinske kiseline, vitamin B3, vitamin PP i 3-piridinkarboksamid. Danas je uobičajeno da se nikotinamid zajedno s nikotinskom kiselinom označava kao niacin. Nedostatak nikotinske kiseline uzrokuje bolest pod nazivom pelagra. Osim što je sastavni dio vitamina, nikotinamid (*Slika 15.*) je sastavni dio koenzima nikotinamid-adenin-dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) i nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata ( $\text{NADP}^+$ ) koji su neophodni za odvijanje metaboličkih procesa. Poznato je preko 200 dehidrogenaza čije djelovanje ovisi o  $\text{NAD}^+$  ili  $\text{NADP}^+$ , a sudjeluju u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, aminokiselina i masnih kiselina.  $\text{NAD}^+$  sudjeluje kao izravni oksidans u metaboličkim procesima glikolize, razgradnje masnih kiselina i Krebsovom ciklusu, pri čemu se reducira u NADH. Tim procesima, ugljikovi atomi iz molekule glukoze oslobađaju se u obliku  $\text{CO}_2$ , a elektroni dobiveni tim procesima, prenose se u obliku NADH respiracijskim lancem na  $\text{O}_2$  [24]. Nedostatak niacina izaziva stoga promjene u procesu glikolize, ciklusu limunske kiseline i respiratornom lancu. Ljudski organizam može sintetizirati  $\text{NAD}^+$  iz triptofana, ali odnos nastalog  $\text{NAD}^+$  i utrošenog

triptofana je 1:60 i takav način opskrbe organizma nije prihvatljiv, te je potrebno vitamin uzimati putem balansirane prehrane.

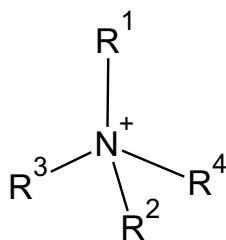


*Slika 15.* Nikotinamid

Nikotinamid  $C_6H_6ON_2$  i nikotinska kiselina  $C_6H_5O_2N$  bijeli su igličasti kristali. Nikotinska kiselina u reakciji s mineralnim kiselinama daje odgovarajuće piridinijeve soli (bazni karakter nikotinske kiseline), a u reakciji s alkalijama daje odgovarajuće soli karboksilne skupine. Nikotinska kiselina se dobro otapa u vodi i etanolu, a otopine reagiraju kiselo. Vodene otopine nikotinamida su neutralne. Nikotinamid se dobro otapa u vodi (1 g u 1 mL vode), što je najviša topljivost nekog spoja, a osim dobre topljivosti u vodi topljiv je u etanolu i glicerolu [25].

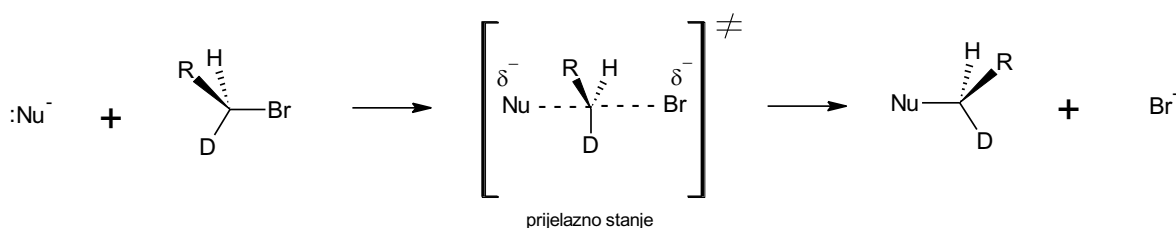
### 2.3. Priprava kvaternih amonijevih soli

Kvaterne amonijeve soli su soli poliatomskih pozitivno nabijenih iona,  $R_4N^+$  (*Slika 16.*), gdje R predstavlja vodikov atom, alkilnu ili arilnu skupinu [26]. Kvaterne amonijeve soli pripadaju skupini amina, a srodne su i anorganskim amonijevim solima. S obzirom da imaju četiri supstituenta kovalentno vezana na dušikov atom, razlikuju se od amonijeva iona, primarnih ( $1^\circ$ ), sekundarnih ( $2^\circ$ ) i tercijarnih ( $3^\circ$ ) amonijevih kationa jer posjeduju trajno pozitivan naboj, neovisan o pH vrijednosti otopine u kojoj se nalaze [27]. Kvaterne amonijeve soli ne podliježu kiselo-baznim reakcijama kao jednostavni amini, nereaktivni su u usporedbi s jakim elektrofilima, oksidansima ili kiselinama, a vrlo su stabilni u odnosu na većinu nukleofila.



**Slika 16.** Opća strukturna formula kvaternog amonijevog kationa

Kvaterne amonijeve soli dobivaju se alkilacijom 3° amina, odnosno reakcijom kvaternizacije. Reakcije kvaternizacije slijede S<sub>N</sub>2 mehanizam, tj. nukleofilnu supstituciju drugog reda (**Slika 17.**). U jednom koraku odvija se nukleofilni napad dušika na ugljikov atom, na kojemu se nalazi halogen, uz istovremeni odlazak halogena.

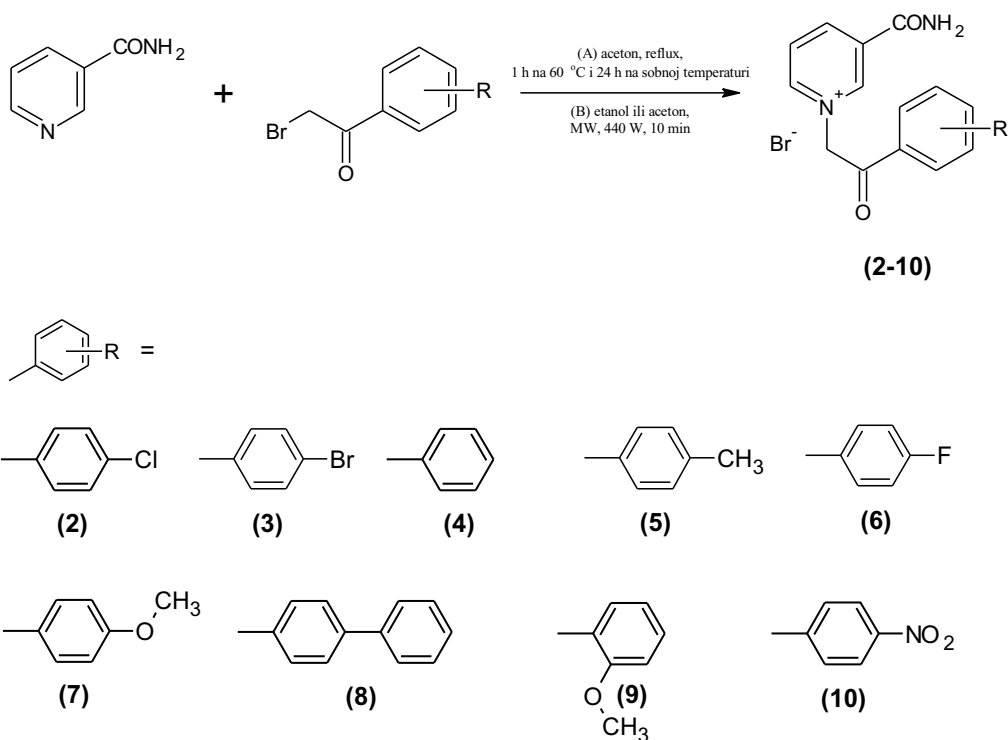


**Slika 17.** S<sub>N</sub>2 mehanizam

Reakcije kvaternizacije su reakcije nastanka kvaternih amonijevih soli u kojima alkil-halogenidi reagiraju s amonijakom, 1°, 2° i 3° aminom. U svakom koraku reakcije nastaje nova C-N veza. Budući da reakcija slijedi S<sub>N</sub>2 mehanizam, alkil-halogenid mora biti metil-halogenid, CH<sub>3</sub>X ili primarni alkil-halogenid, RCH<sub>2</sub>X.

Kvaterne soli piridina pripadaju u skupinu heterocikličkih spojeva koji sadrže atom dušika. Zadnjih nekoliko godina ispituje se moguća sinteza kvaternih soli derivata piridina (piridoksal-oksima, nikotinamida i izonikotinamida) te njihova primjena kao antimikrobnih, antidotskih i antifungalnih spojeva (**Slika 18.**) [28].





**Slika 18.** Konvencionalna (A) i mikrovalna (B) sinteza derivata nikotinamida sa supstituiranim 2-bromacetofenonima [28]

### 2.3.1. Primjena kvaternih amonijevih soli

Kvaterne amonijeve soli, uključujući piridinijeve soli intenzivno se istražuju i brojnim ispitivanjima svojstava potkrepljuju svoju raznoliku primjenu. Zbog jednostavne pripreme i strukturne raznolikosti upotrebljavaju se kao tenzidi, dezinfekcijska, antiseptička i antibakterijska sredstva, antioksidansi, omekšivači tkanina, te kao antikancerogene tvari [22, 29].

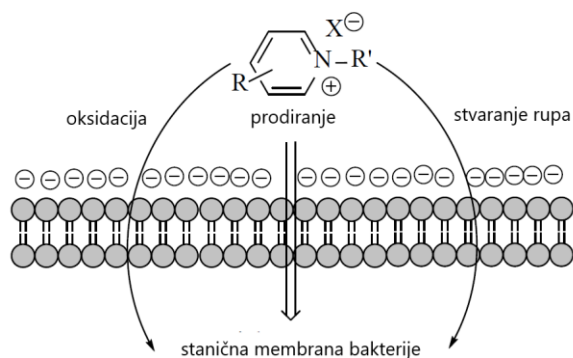
Piridinijeve soli predstavljaju potencijalne antidote, odnosno supstance koje sprječavaju ili poništavaju djelovanje otrova, a posjeduju svojstva inhibicije, letalne sinteze i interakcije s određenim supstancama. Organofosforni (OP) spojevi široko su primijenjivani kao pesticidi i živčani bojni otrovi. Acetilkinesteraza (AChE) je ciljani enzim kojeg inhibiraju organofosforni spojevi. S obzirom na fiziološku i biokemijsku ulogu AChE u živčanom sustavu, enzim se i danas sustavno izučava, budući da univerzalni

antidot koji bi imao zadovoljavajuću učinkovitost pri otrovanju organofosfornim spojevima još ne postoji. Tijekom više od pet desetljeća, radi pronalaska djelotvornih antidota, testiraju se i primijenjuju razni oksimi (piridinijevi, imidazolijevi, kinuklidinijevi) kao terapijska sredstva u slučaju otrovanja organofosfornim spojevima [30, 31].

Mnoga istraživanja pokazala su kako neke kvaterne amonijeve soli posjeduju antimikrobno, antiparazitno i antifungalno djelovanje. Nekoliko kvaternih amonijevih spojeva, uključujući kvaterne soli nikotinamida s različitim duljinama lanaca, posjeduju antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.

Zbog svoje amfipatske strukture, kvaterni amonijevi spojevi imaju mehanizam djelovanja sličan površinski aktivnim tvarima (detergentima). Pozitivno nabijene „glave“ kvaternih amonijevih spojeva reagiraju sa negativno nabijenim fosfolipidima stanične stijenke bakterije, nakon čega hidrofobnim interakcijama alkilni „rep“ kvaternih amonijevih spojeva prodire u unutarstanični prostor bakterije stvarajući rupe, nakon čega slijedi prodiranje cijelih molekula unutar stanice bakterije. Nakupljanje kvaternih amonijevih spojeva i prijenos oksidativnog halogenidnog aniona na biološke receptore pojačava antibakterijski učinak, što za posljedicu ima ispuštanje citoplazmatskog sadržaja bakterije, dovodi do gubitka uređenosti stanične membrane i u konačnici dovodi do stanične smrti [29, 32]. Antibakterijski mehanizam kvaternih piridinijevih spojeva prikazan je na *Slici 19*. Međutim, vidljiva je razlika u otpornosti prema kvaternim amonijevim spojevima između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Istraživanja pokazuju da kvaterni amonijevi spojevi pokazuju bolju aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, nego protiv Gram-negativnih bakterija i gljivica. Razlog tome je vanjska membrana Gram-negativnih bakterija, pri čemu je kvaternim amonijevim spojevima otežan pristup te su one otpornije od Gram-pozitivnih bakterija. Kod Gram-negativnih bakterija, kvaterni amonijevi spojevi moraju proći vanjsku membranu, a zatim dolaze u interakciju sa unutarnjom membranom i unutarstaničnim komponentama [33]. Istraživanja su pokazala da je antimikrobni učinak povezan s duljinom alkilnog lanca kvaternih amonijevih spojeva. Kod Gram-pozitivnih bakterija, kao što je *Staphylococcus aureus*, antimikrobni se učinak povećava s duljinom alkilnog lanca i dostiže maksimum pri spojevima s 12 – 14 C-atoma, a kod Gram-negativnih bakterija, primjerice *Escherichia coli*, optimalna aktivnost postignuta je duljinom alkilnog lanca s 14 – 16 C-atoma [34]. Zbog svoje stabilnosti i niske reaktivnosti, kvaterni amonijevi spojevi predstavljaju ozbiljan problem jer je neizbježna njihova bioakumulacija u okolišu. Posljedica toga je izloženost mikrobiološke populacije

takvim spojevima u vrlo niskim koncentracijama koja bi mogla dovesti do pojave rezistencije. Iz tog razloga, sve veći naglasak je na sintezi kvaternih amonijevih spojeva koji su biorazgradivi [29].



**Slika 19.** Antibakterijski mehanizam djelovanja kvaternih piridinijevih spojeva [32]

## 2.4. Metode identifikacije

### 2.4.1. Infracrvena spektroskopija (IR)

Infracrvena spektroskopija (eng. *Infrared Spectroscopy*, IR) je jedna od najčešće korištenih metoda za strukturnu karakterizaciju organskih spojeva, polimera, poliatomnih anorganskih molekula i organometalnih spojeva, a temelji se na interakciji molekula s IR zračenjem. IR zračenje je elektromagnetsko zračenje u rasponu valnih duljina od 0,7  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ . S obzirom na valnu duljinu zračenja, infracrveno područje može se podijeliti na blisko, srednje i daleko područje (**Tablica 5**).

**Tablica 5.** Podjela IR područja prema valnim duljinama i valnim brojevima

| PODRUČJE | VALNA DULJINA                         | VALNI BROJ                                    |
|----------|---------------------------------------|---|
| blisko   | 0,7 $\mu\text{m}$ – 2,8 $\mu\text{m}$ | 1400 $\text{cm}^{-1}$ – 3600 $\text{cm}^{-1}$ |
| srednje  | 2,8 $\mu\text{m}$ – 50 $\mu\text{m}$  | 3600 $\text{cm}^{-1}$ – 200 $\text{cm}^{-1}$  |
| daleko   | 50 $\mu\text{m}$ – 500 $\mu\text{m}$  | 200 $\text{cm}^{-1}$ – 20 $\text{cm}^{-1}$    |

Da bi molekula apsorbirala IR zračenje mora postojati promjena dipolnog momenta koji se mijenja zbog vibracije određenog dijela molekule. Kada molekula apsorbira IR zračenje molekulske vibracije se pobuđuju, razmak između jezgara je veći, jače je razdvajanje naboja što rezultira većom promjenom dipolnog momenta. U srednjem području IR zračenja odvija se promjena vibracijskih razina većine molekula, dok su u dalekom području naglašene promjene u rotacijskim razinama molekule.

Molekulske vibracije dijele se na vibracije istezanja (eng. *stretching*) i vibracije savijanja (eng. *bending*). Vibracije koje izazivaju promjene u duljini veze nazivaju se istezanje, dok vibracije koje izazivaju promjene u kutu veze nazivamo savijanje. Istezanje može biti simetrično i asimetrično, dok se vibracije savijanja dijele na: ljuľanje (eng. *rocking*), sjeckanje (eng. *scissoring*), klanjanje (eng. *wagging*) i uvrćanje (eng. *twisting*).

IR spektar dobiva se mjerenjem apsorpcije IR zraćenja, te iz njega možemo dobiti važne informacije o kemijskoj prirodi i molekulskoj strukturi spoja. Svaki IR spektar može se podijeliti u dva područja: područje funkcijskih skupina (eng. *functional group region*) ( $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) i područje otiska prsta (eng. „*fingerprint*“ *region*) ( $< 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) [21].

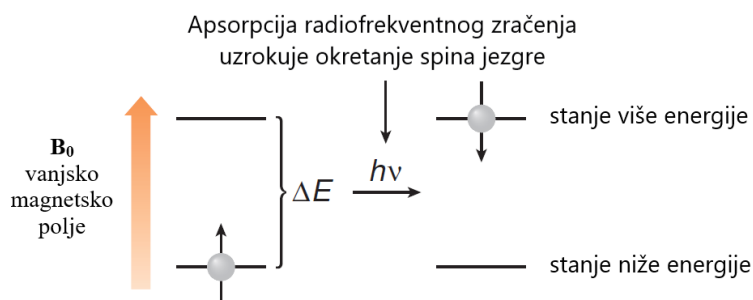
Najčešće korišćeni instrumenti u IR spektroskopiji su klasićni IR spektrometar i FTIR spektrometar (eng. *Fourier Transform Infrared spectrometer*). Klasićni IR spektrometar sastoji se od izvora zraćenja, monokromatora i detektora. Ova vrsta uređaja je mnogo ogranićena budući da detektor mjeri kolićinu energije za svaku određenu frekvenciju. Iz tog razloga razvijena je FTIR spektroskopija koja je nadoknadila sve nedostatke klasićne IR spektroskopije. Prednost FTIR spektroskopije je mogućnost mjerenja svih frekvencija istovremeno s visokim protokom ćime se smanjuje vrijeme potrebno za analizu. To je omogućeno korišćenjem interferometra koji sadrži žićani razdjelnik koji ulaznu zraku raspršuje na dvije zrake, odnosno, jedna zraka reflektira se od ravnog zrcala koje je nepomićno, a druga se zraka reflektira od zrcala koje se može pomicati. Rezultat je interferencija tih dviju zraka, a signal koji sadrži informaciju o svakoj frekvenciji koja dolazi od izvora zraćenja naziva se interferogram. Iz interferograma se pomoću Fourierovih transformacija dobiva karakteristićan IR spektar molekule.

## 2.4.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) je jedna od najvažnijih spektroskopskih metoda pri određivanju strukture tvari. Koristi se u medicinskoj dijagnostici, prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji, poljoprivredi, te u kemijskoj industriji.

NMR kao spektroskopska metoda za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva temeljena je na apsorpciji energije jezgre u području radiovalova ( $10^2 - 10^5$  m). Elementarne čestice atoma (elektroni, protoni i neutroni) karakterizira svojstvo koje se naziva spin. Budući da se jezgra atoma sastoji od protona i neutrona, vrtnja pozitivno nabijenih protona inducira magnetsko polje, odnosno magnetski moment jezgre ( $\mu$ ) što omogućava efekt nuklearne magnetske rezonancije. Magnetski moment jezgre definira se spinskim kvantnim brojem  $I$ . Jezgre koje rotiraju i posjeduju kvantni broj spina različiti od nule ( $I \neq 0$ ), ponašaju se kao magnetni dipoli, odnosno kao mali magneti. Jezgre s neparnim atomskim brojem ili neparnim masenim brojem imaju nuklearni spin i mogu se detektirati NMR spektroskopijom. Izotopi koji zadovoljavaju taj uvjet i koji se najčešće koriste pri proučavanju organskih spojeva su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  [21, 35].

Kada se nabijena čestica, poput protona, giba oko svoje osi, ponaša se kao mali magnet s magnetskim momentom uzduž osi vrtnje. U odsutnosti vanjskog magnetskog polja  $B_0$ , proton ima nasumičnu orijentaciju. Kada se na proton podvrgne vanjsko magnetsko polje  $B_0$ , magnetski moment protona usmjerava se paralelno sa vanjskim poljem ( $\alpha$ -spin, stabilno stanje – niža energija) ili antiparalelno ( $\beta$ -spin, nestabilno stanje – viša energija). Razlika u energijama ( $\Delta E$ ) između  $\alpha$ -spina i  $\beta$ -spina proporcionalna je jačini vanjskog magnetskog pola  $B_0$ . Energija se apsorbira kada se proton podvrgne djelovanju radiofrekventnog zračenja (*Slika 20.*). U tom trenutku proton zauzima antiparalelnu orijentaciju u odnosu na vanjsko magnetsko polje, dolazi do apsorpcije i odašilje se NMR signal. Proces apsorpcije energije od strane jezgre naziva se magnetska rezonancija. Apsorpcija energije ovisi o jakosti magnetskog polja i frekvenciji. Prema tome, rezonanciju u NMR spektru omogućuje jakost magnetskog polja ili frekvencija radiovalnog zračenja.



**Slika 20.** Prelazak jezgre u više energetska stanje nakon apsorpcije energije [21]

Spektralni parametri NMR-a su: kemijski pomak ( $\delta$ ), konstanta sprege spin – spin ( $J$ ) i zasjenjenje. Kemijski pomak je mjera koliko je neki signal udaljen od standardnog rezonancijskog signala čiji se položaj označava nulom. Izražava se u ppm (eng. *parts per million*). Kao standard koristi se tetrametilsilan (TMS) koji se dodaje u uzorak prije snimanja spektra. Molekula TMS-a sadrži metilne skupine koje su bogate elektronima, pri čemu su njihovi protoni zasjenjeni i apsorbiraju energiju pri višem magnetskom polju u odnosu na većinu organskih molekula. Stoga, većina NMR signala javlja se pri nižem magnetskom polju (lijevo) u odnosu na signal TMS-a koji je osamljen i vrlo oštar (singlet). Međutim, kemijski pomak odražava i elektronsku okolinu jezgre i funkcija je elektronske gustoće oko jezgre. Elektroni u molekuli su nabijene čestice u gibanju koje također stvaraju magnetsko polje koje je suprotno magnetskom polju spektrometra. Stoga, proton osjeća slabije magnetsko polje u odnosu na „goli“ proton u identičnim uvjetima, točnije, elektroni zasjenjuju proton od primijenjenog magnetskog polja [21]. Kako su protoni različito zasjenjeni elektronima, zahtijevaju različitu primijenjenu jačinu magnetskog polja da bi se javila ista efektivna jačina polja na kojoj dolazi do apsorpcije. Svi protoni apsorbiraju na istoj efektivnoj jačini polja, ali na različitim vrijednostima primijenjenog vanjskog polja, ovisno o elektronskoj okolini. Signali zasjenjenih protona nalaze se u visokom magnetskom polju, tj. u području niske frekvencije, dok se signali nezasjenjenih protona nalaze u području niskog magnetskog polja, tj. u području visoke frekvencije. Kemijski pomak kao funkcija elektronske gustoće oko jezgre ovisi o: induktivnom efektu, rezonancijskom efektu, anizotropnom efektu, hibridizacijskom efektu i temperaturi.

Kod aromatskih spojeva dolazi do delokalizacije elektrona u aromatskom prstenu. Ukoliko se aromatski spoj nalazi u jakom magnetskom polju, inducira se struja  $\pi$ -

elektronskog prstena koja je suprotna primijenjenom magnetskom polju. Pod tim utjecajem protoni aromatskih spojeva su nezasjenjeni, a do rezonancije dolazi obično u nižem polju [21].

Konstanta sprege ( $J$ ) predstavlja razmak između vrpca u multipletu, a izražava se u Hz. NMR signal promatrane jezgre se zbog sprezanja sa susjednom jezgrom cijepa u multiplet prema pravilu  $2nI + 1$ , gdje je  $n$  broj susjednih jezgara, a  $I$  spinski kvantni broj jezgre. Prema multipletnosti signali se dijele na: singlet (s), dublet (d), triplet (t), kvartet (q), kvintet, sekstet, septet itd.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Tijek kemijske reakcije i preliminarna identifikacija spojeva obavljena je pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) na komercijalno dostupnim pločicama silikagela DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, dimenzija 10x20 cm, debljine sloja 0,2 mm, a za vizualizaciju izoliranih komponenata je korištena UV-svjetlost pri valnim duljinama 254 i 366 nm. Kromatogrami su razvijani u sustavu otapala kloroform : metanol (6:2).

Talište je određeno na uređaju „Stuart Melting Point Apparatus SMP3“.

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR) snimani su na instrumentu Varian XL-GEM 300 u DMSO-*d*<sub>6</sub> u Centru za NMR Instituta „Ruđer Bošković“. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm) kao unutrašnjem standardu, a signali su označeni kao s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet, m-multiplet, bs-široki signal.

Infracrveni spektri snimljeni su na uređaju Cary 630 FTIR, Agilent Technologies. Za snimanje IR spektara korišten je ATR (eng. *Attenuated total reflection*) nastavak. Transmisija je mjerena u spektru od 4000 do 650  $\text{cm}^{-1}$ . Za detekciju je korišten DTGS (eng. *Deuterated triglycine sulfate*) detektor, a za korekciju spektra korištena je Happ Genzelova apodizacija. Rezultati su obrađeni pomoću Agilent MicroLab Software-a.

#### **Kemikalije korištene u radu:**

nikotinamid, 122,13 g/mol,  $t_f=129,5$  °C (Sigma-Aldrich)

2-bromacetofenon, 199,05 g/mol,  $t_f=136$  °C (Acros Organics)

kolin-klorid (ChCl), 139,62 g/mol,  $t_f=302$  °C (Acros Organics)

urea (U), 60,06 g/mol,  $t_f=133$  °C (Gram mol)

malonska kiselina (MalK), 104,06 g/mol,  $t_f=135-137$  °C (Fisher Scientific UK)

jabučna kiselina (JabK), 134,09 g/mol,  $t_f=130$  °C (Sigma-Aldrich)



oksalna kiselina (OksK), 90,04 g/mol,  $t_f=189-191$  °C (Acros Organics)

limunska kiselina (LimK), 192,12 g/mol,  $t_f=153$  °C (Gram mol)

glicerol (Gly), 92,09 g/mol,  $t_f=17,8$  °C (Kemika)

mliječna kiselina (MliK), 90,08 g/mol,  $t_f=16,8$  °C (Acros Organics)

vinska kiselina (VinK), 150,09 g/mol,  $t_f=171-174$  °C (Fisher Scientific UK)

levulinska kiselina (LevK), 116,11 g/mol,  $t_f=33-35$  °C (Acros Organics)

*trans*-cimetna kiselina (*trans*-CimK), 148,16 g/mol,  $t_f=133$  °C (Acros Organics)

*N*-metilurea (*N*-MU), 74,08 g/mol,  $t_f=103$  °C (Acros Organics)

salicilna kiselina (SalK), 138,12 g/mol,  $t_f=158,6$  °C (Gram mol)

U radu su korištena otapala: kloroform, metanol, apsolutni etanol, etil-acetat.

Sve upotrebljene kemikalije i reagensi u sintezi bili su analitičke čistoće, *pro analysi*.

## 3.2. Priprava eutektičkih otapala

Pripremljeno je petnaest eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida. Otapala su pripremljena zagrijavanjem na 80 °C uz miješanje oko 4 sata. Svi atomi prisutni u početnim sirovinama inkorporirani su u nastali produkt, pri čemu je atomska učinkovitost za sva pripremljena otapala 100 %-tna. Prilikom pripreme eutektičkih otapala nisu nastali međuprodukti, te otapala nije bilo potrebno pročišćavati. U **Tablici 6.** prikazani su omjeri komponenata u priređenim eutektičkim smjesama.

**Tablica 6.** Korištena eutektička otapala

| DES                      | MNOŽINSKI OMJERI KOMPONENTI |
|--------------------------|-----------------------------|
| ChCl/OksK                | 1:1<br>(10g : 6,42g)        |
| ChCl/JabK                | 1:1<br>(10g : 9,6g)         |
| ChCl/MalK                | 1:1<br>(10g : 7,5g)         |
| ChCl/LimK                | 1:1<br>(6g : 17,8g)         |
| ChCl/MliK                | 1:2<br>(5g : 5,34mL)        |
| ChCl/VinK                | 1:1<br>(5g : 5,38g)         |
| ChCl/LevK                | 1:2<br>(5g : 7,3mL)         |
| ChCl/ <i>trans</i> -CimK | 1:1<br>(5g : 5,31g)         |
| ChCl/ <i>N</i> -MU       | 1:3<br>(5g : 7,42g)         |
| ChCl/SalK                | 1:1<br>(5g : 4,95g)         |
| ChCl/U                   | 1:2<br>(5g : 4,3g)          |
| ChCl/U                   | 1:3<br>(5g : 6,44g)         |
| ChCl/Gly                 | 1:2<br>(5g : 5,22mL)        |
| ChCl/Gly                 | 1:3<br>(5g : 7,83mL)        |
| ChCl/Gly                 | 1:4<br>(5g : 10,44mL)       |

Tijekom zagrijavanja krute polazne sirovine se rastale i smjesa postaje tekuća. Nakon miješanja dviju komponenti, nastaje otapalo, stabilno pri sobnoj temperaturi (*Slika 21.*).

Sva otapala su u tekućem i bezbojnom obliku, osim ChCl/JabK, ChCl/LimK i ChCl/VinK koji su žute boje.

Eutektička otapala ChCl/MliK, ChCl/LevK i ChCl/Gly pripremaju se brže zbog prisutnosti polazne tekuće komponente.

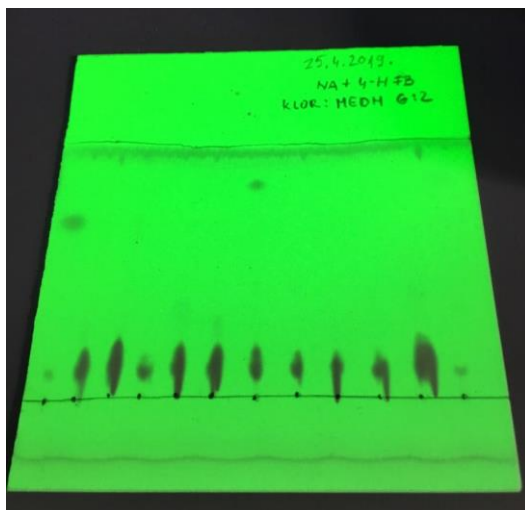


*Slika 21.* Komponente eutektičkog otapala: ChCl (lijevo), LevK (desno), eutektičko otapalo ChCl/LevK (1:2) nakon miješanja dviju komponenti (sredina)

### 3.3. Priprava kvaterne soli nikotinamida

Kvaternizacija nikotinamida i 2-bromacetofenona izvedena je u petnaest različitih eutektičkih otapala. Nikotinamid (0,122 g; 1 mmol) i 2-bromacetofenon (0,199 g; 1 mmol) pomiješani su uz dodatak 2,3 mL određenog eutektičkog otapala. Dobivena smjesa zagrijavana je u uljnoj kupelji na 80 °C uz miješanje oko 5 sati. Tijekom zagrijavanja bezbojna reakcijska smjesa prelazi u žutu do žuto-narančaste. Tijekom reakcija praćen je TLC kromatografijom uz smjesu otapala kloroform : metanol (6:2) koja je ukazala na prisutnost produkta u svim sintezama. Nakon zagrijavanja, u reakcijske smjese dodano je 10 mL apsolutnog etanola uslijed čega je došlo do taloženja produkta u dvanaest eutektičkih otapala koji su izdvojeni vakuum filtracijom. U sintezama provedenim u eutektičkim otapalima ChCl/MliK, ChCl/VinK i ChCl/N-MU nije izoliran produkt, iako je preliminarno identificiran TLC kromatografijom.

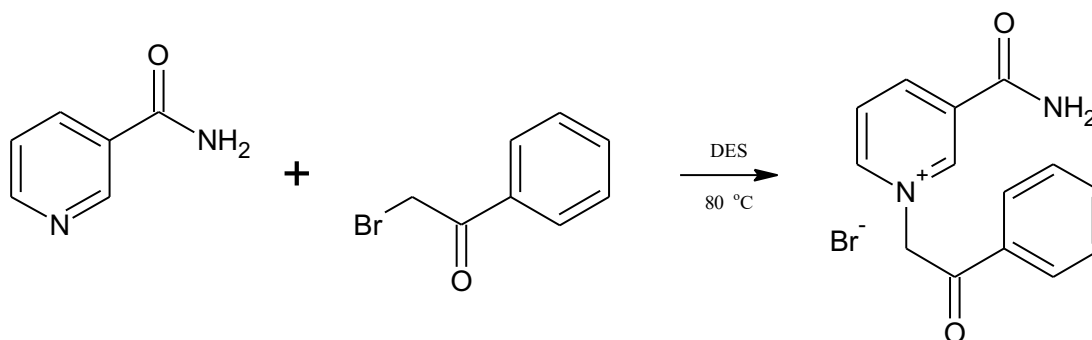
Svi izolirani produkti su kromatografski relativno čisti (*Slika 22.*), ali radi identifikacije ih je potrebno dodatno prekrystalizirati iz etil-acetata.



*Slika 22.* Preliminarna identifikacija produkata pomoću tankoslojne kromatografije u sustavu otapala kloroform : metanol (6:2)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene eutektičkih otapala, kao ekološki prihvatljivijeg reakcijskog medija u odnosu na standardna organska otapala, u reakciji kvaternizacije nikotinamida sa 2-bromacetofenonom (*Slika 23.*), te utvrditi koje eutektičko otapalo je najprikladnije za buduće sinteze kvaternih soli nikotinamida.



*Slika 23.* Priprava 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletil)-piridinijeva bromida u eutektičkim otapalima

U prvoj fazi rada pripremljeno je petnaest različitih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida. Druga faza rada obuhvaćala je pripravu kvaterne soli nikotinamida u eutektičkim otapalima. Nikotinamid je kvaterniziran 2-bromacetofenonom u petnaest eutektičkih otapala, pri čemu je 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletil)-piridinijev bromid (produkt, 321,17 g/mol, 236,5–238 °C) uspješno pripremljen i izoliran u dvanaest eutektičkih otapala. U tri eutektička otapala (ChCl/MliK, ChCl/VinK, ChCl/*N*-MU) TLC kromatografija pokazala je neznatnu količinu produkta kojeg nije bilo moguće izolirati.

Najveće iskorištenje dobiveno je u eutektičkom otapalu ChCl/U (1:2), a iznosilo je 62,31 %. To je u skladu s literaturom budući da se većina istraživanja primjene eutektičkih otapala u organskim sintezama provode upravo u tom sustavu otapala i ono se pokazalo kao najprihvatljivije u velikom broju istraživanja. Najmanje iskorištenje dobiveno je u reakciji koja se odvijala u eutektičkom otapalu ChCl/LimK (1:1), a iznosilo je svega 3,12 % (*Tablica 7.*).

**Tablica 7.** Iskorištenje reakcije kvaternizacije u različitim eutektičkim otapalima

| DES                   | Masa / g | Iskorištenje / % |
|-----------------------|----------|------------------|
| ChCl/OksK (1:1)       | 0,12     | 37,38            |
| ChCl/JabK (1:1)       | 0,12     | 37,38            |
| ChCl/MalK (1:1)       | 0,13     | 40,50            |
| ChCl/LimK (1:1)       | 0,01     | 3,12             |
| ChCl/MliK (1:2)       | *        | *                |
| ChCl/VinK (1:1)       | *        | *                |
| ChCl/LevK (1:2)       | 0,14     | 43,61            |
| ChCl/trans-CimK (1:1) | 0,11     | 34,27            |
| ChCl/N-MU (1:3)       | *        | *                |
| ChCl/SalK (1:1)       | 0,13     | 40,50            |
| ChCl/U (1:2)          | 0,20     | 62,31            |
| ChCl/U (1:3)          | 0,12     | 37,38            |
| ChCl/Gly (1:2)        | 0,16     | 49,84            |
| ChCl/Gly (1:3)        | 0,16     | 49,84            |
| ChCl/Gly (1:4)        | 0,19     | 59,19            |

\* identificiran TLC-om, ali nije izoliran

Zhuravlev i suradnici, 2010. izvršili su kvaternizaciju nikotinamida s 2-bromacetofenonom klasičnim putem u klasičnom organskom otapalu kao mediju. Reakciju kvaternizacije provodili su u bezvodnom alkoholu pri čemu su nakon 1h zagrijavanja u vodenoj kupelji dobili produkt u 44 %-tnom iskorištenju. Ista reakcija je u ovom diplomskom radu provedena umjesto u etanolu u različitim eutektičkim otapalima od kojih je najveće iskorištenje dobiveno u eutektičkom otapalu ChCl/U (1:2), a iznosilo je 62,31 %.

Nadalje, Siber i suradnici, 2019. proveli su istu reakciju kvaternizacije na dva načina: klasičnim putem i pod utjecajem mirovalnog zračenja. Kvaternizaciju nikotinamida klasičnim putem provodili su u acetonu pri čemu su nakon 1h zagrijavanja na 60 °C dobili produkt u 25 %-tnom iskorištenju. Međutim, uspješno su izvršili kvaternizaciju nikotinamida s 2-bromacetofenonom pod utjecajem mikrovalnog zračenja pri snazi od 440 W u etanolu i acetonu. Nakon 10 minuta mikrovalnog zračenja pri snazi od 440 W dobili su produkt u 93 %-tnom iskorištenju u etanolu, odnosno u 73 %-tnom iskorištenju u

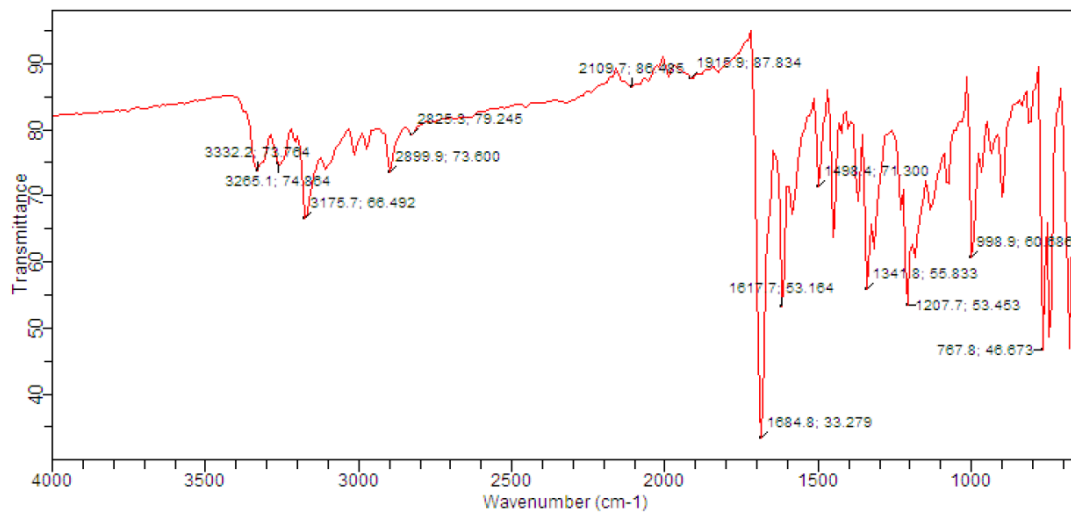
acetonu. Prinosi u reakciji izvedenoj pod utjecajem mikrovalnog zračenja su znatno veći nego u klasičnoj sintezi te je produkt dobiven u kraćem reakcijskom vremenu u odnosu na klasičnu sintezu. U ovom slučaju, mikrovalna sinteza zadovoljava zahtjeve „zelene“ kemije kao što su kraće reakcijsko vrijeme, povećan prinos i smanjena potrošnja energije.

U trećoj fazi rada dobiveni sirovi produkti pročišćavani su prekrizacijom iz etil-acetata. Nakon izolacije i pročišćavanja sirovih produkata, dobivena je kromatografski čista kvaterna sol nikotinamida kojoj je određeno talište i snimljeni IR, <sup>1</sup>H-NMR i <sup>13</sup>C-NMR spektri.

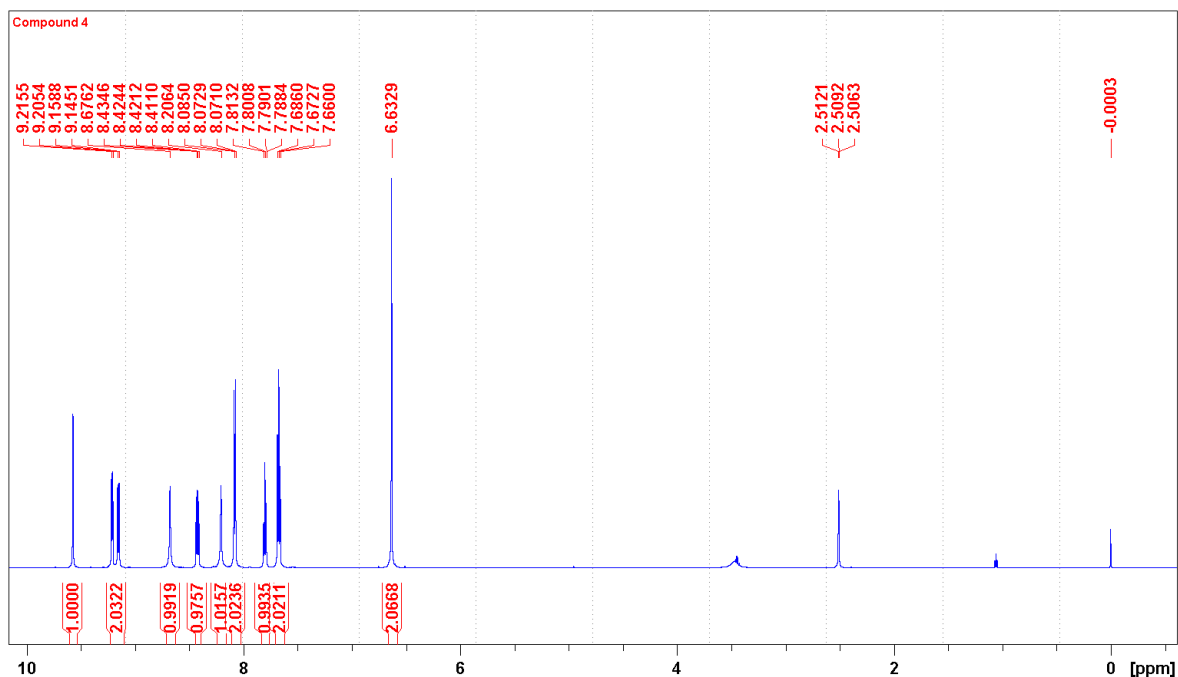
Struktura dobivenog spoja 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletal)-piridinijeva bromida određena je spektroskopskim metodama IR spektroskopije, NMR spektroskopije, elementarnom analizom (*Tablica 8*).

**Tablica 8.** Karakterizacija 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletal)-piridinijeva bromida

|   |   |
|---|---|
| <b>IR (KBr) <math>\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}</math></b>  | 3333.2, 3265.1, 3175.7, 2899.9, 2825.3, 2109.8, 1915.9, 1984.8, 1617.7, 1493.4, 1341.8, 1207.7, 888.9, 767.8  |
| <b><sup>1</sup>H NMR (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)<br/><math>\delta/\text{ppm}</math></b>   | 9.57 (1H, s, H-2), 9.21 (1H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz, H-6), 9.15 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-4), 8.67 (1H, br s, <i>NHa</i> ), 8.42 (1H, dd, <i>J</i> = 8.0, 6.1 Hz, H-5), 8.21 (1H, br s, <i>NHb</i> ), 8.08 (2H, dd, <i>J</i> = 8.2, 1.1 Hz, H-10, H-14), 7.80 (1H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz, H-12), 7.68 (2H, t, <i>J</i> = 8.2 Hz, H-11, H-13), 6.63 (2H, s, H-7) |
| <b><sup>13</sup>C NMR (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>)<br/><math>\delta/\text{ppm}</math></b>  | 189.5 (C-8), 163.4 (CONH <sub>2</sub> ), 149.1 (C-4), 147.1 (C-2, C-6), 139.5 (C-12), 132.2 (C-9), 130.1 (C-10, C-14), 129.2 (C-11, C-13), 125.6 (C-3, C-5), 66.1 (C-7);  |
| <b>Elementarna analiza<br/>za C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<br/>(<i>M</i><sub>r</sub> = 321.2 g/mol)</b> | rač.: C 52.36, H 4.08, N 8.72, O 9.96 %; nađ.: C 52.40, H 3.78, N 8.74 %.   |

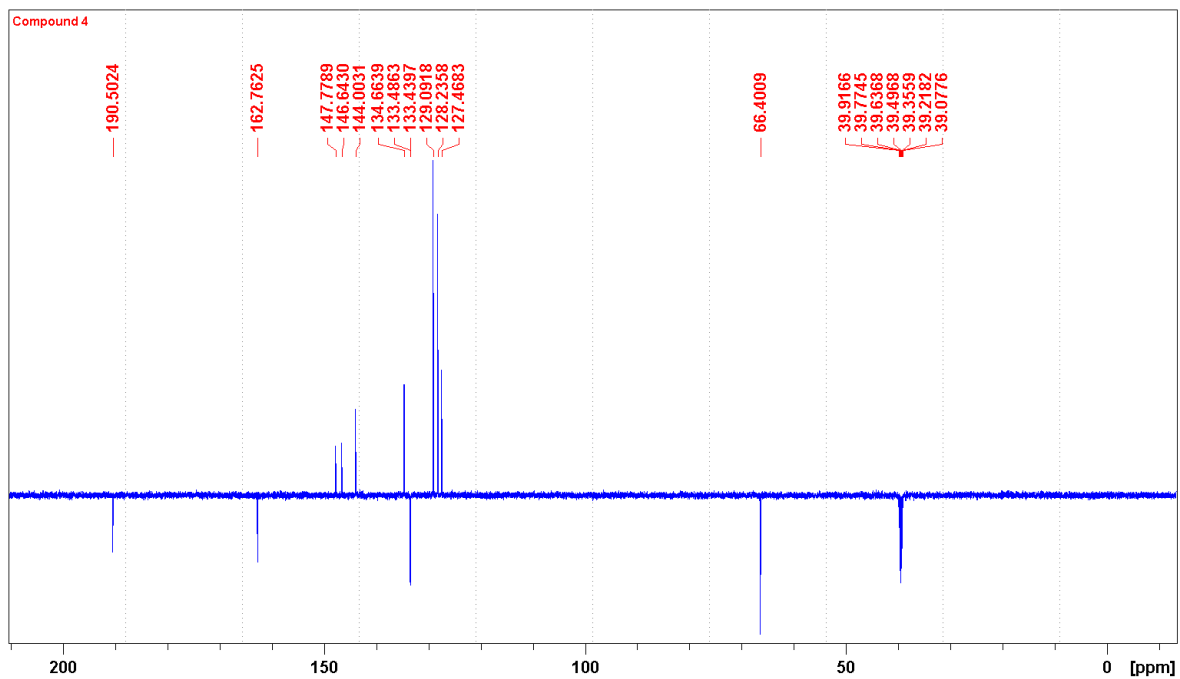


**Slika 24.** IR spektar 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletil)-piridinijevog bromida



**Slika 25.** <sup>1</sup>H NMR spektar 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletil)-piridinijevog bromida





**Slika 26.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 3-karbamoil-1-(2-okso-2-feniletil)-piridinijevog bromida

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je ispitana mogućnost primjene eutektičkih otapala, kao ekološki prihvatljivijeg reakcijskog medija u odnosu na standardna organska otapala (metanol, etanol, aceton), u reakciji kvaternizacije nikotinamida i 2-bromacetofenona.

Uspješno je sintetizirano 15 eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida (ChCl) kao akceptora vodikove veze i uree, malonske, jabučne, oksalne, limunske, mliječne, vinske, levulinske, salicilne, *trans*-cimetne kiseline, glicerola i *N*-metiluree, kao donora vodikove veze.

U 12 od 15 priređenih otapala uspješno je sintetizirana kvaterna sol u iskorištenju koje se kretalo između 34 % (ChCl/*trans*-CimK) i 62 % (ChCl/U). Znatno niže bilo je iskorištenje u eutektičkom otapalu kod kojeg je donor vodikove veze bila limunska kiselina i ono je iznosilo svega 3 %.

Prinos reakcije provedene u eutektičkom otapalu ChCl/U (1:2) više se od prinosa reakcije provedene u klasičnom otapalu etanolu (44 %) i acetonu (25 %) [28, 36].

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti da postoji potencijal i mogućnost primjene eutektičkih otapala kao zamjena za klasična organska otapala tim više što su to „dizajnirana“ otapala, te različitim kombinacijama donora i akceptora vodikove veze mogu se prirediti različite smjese.

## 6. LITERATURA

1. M. C. Bubalo, K. Radošević, I. R. Redovniković, J. Halambek, J. Vorkapić-Furač, V. Gaurina Srček, *Kem. Ind.* **63** (2014), 163-171.
2. M. C. Bubalo, M. Panić, K. Radošević, I. R. Redovniković, *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **11** (2016), 164-168.
3. G. Degam, Deep Eutectic Solvents Synthesis Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, Theses and Dissertations, South Dakota, 2017.
4. M. Jukić, S. Đaković, Ž. Filipović-Kovačević, J. Vorkapić-Furač, *Kem. Ind.* **53** (2004), 217-224.
5. M. Jukić, S. Đaković, Ž. Filipović-Kovačević, V. Kovač, J. Vorkapić-Furač, *Kem. Ind.* **54** (2005), 255-272.
6. V. Bušić, Nove ekološki prihvatljive metode kvaternizacije derivata piridina, disertacija, Osijek, 2015.
7. P. T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998.
8. V. Fischer, Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents and Low-Melting Mixtures, Dissertation, Pfaffenhofen an der Ilm, 2015.
9. A. M. Popescu, C. Donath, V. Constantin, *Bulg. Chem. Commun.* **46** (2014), 452-457.
10. Q. Zhang, K. D. O. Vigier, S. Royer, F. Jerome, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012), 7108-7146.
11. E. L. Smith, A.P. Abbott, K. S. Ryder, *Chem. Rev.* **114** (2014), 11060-11082.
12. A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah, *Chem. Commun.* **1** (2003), 70-71.
13. P. Liu, J. W. Hao, L. P. Mo, Z. H. Zhang, *RSC Adv.* **5** (2015), 48675-48704.
14. A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2** (2014), 1063-1071.
15. M. Molnar, J. Klenkar, T. Tarnai, *Synthetic Commun.* **47** (2017), 1040-1045.
16. T. S. Handy, Deep Eutectic Solvents in Organic Synthesis, *Ionic Liquids – Current State of the Art*, InTech, 2015.
17. B. Singh, H. Lobo, G. Shankarling, *Catal. Lett.* **141** (2011), 178-182.
18. D. Saberi, J. Akbari, S. Mahdudi, A. Heydari, *J. Mol. Liq.* **196** (2014), 208-210.

19. S. Handy, K. Lavender, *Tetrahedron Lett.* **54** (2013), 4377-4379.
20. P. M. Pawar, K. J. Jarag, G. S. Shankarling, *Green Chem.* **13** (2011), 2130-2134.
21. J. G. Smith, *Organic Chemistry*, 3rd ed., McGraw Hill, New York, 2011.
22. A. A. Altaf, A. Shahzad, Z. Gul, N. Rasool, A. Badshah, B. Lal, E. Khan, *J. Drug Des. Med. Chem.* **1** (2015), 1-11.
23. J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, 5th ed., Wiley-VCH, United Kingdom, 2010.
24. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 1.izd., Školska knjiga, Zagreb, 2013.
25. Z. Kniewald, *Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena*, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 1993.
26. K. Hegstad, S. Langsrud, B. T. Lunestad, A. A. Scheie, M. Sunde, S. P. Yazdankhah, *Microb. Drug Resist.* **16** (2010), 91-104.
27. L. Bazina, *Kvaterni amonijevi spojevi – antimikrobni potencijal i bakterijska rezistencija*, Kemijski seminar I, 2017.
28. T. Siber, V. Bušić, D. Zobundžija, S. Roca, D. Vikić-Topić, K. Vrandečić, D. Gašo-Sokač, *Molecules* **24** (2019), 1001.
29. M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.* **1** (2015), 288-303.
30. I. Primožić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **53** (2004), 401-409.
31. M. Jakanović, M. Prostran, *Curr. Med. Chem.* **16** (2009), 2177-2188.
32. V. Bušić, H. Pavlović, S. Roca, D. Vikić-Topić, D. Gašo-Sokač, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017), 425-433.
33. M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe, *ChemMedChem* **7** (2012), 22-31.
34. T. Zhao, G. Sun, *J. Appl. Microbiol.* **104** (2008), 824-830.
35. J. D. Roberts, *Nuclear magnetic resonance: applications to organic chemistry*, McGraw-Hill Book Company, Inc, 1959.
36. O. E. Zhuravlev, N. V. Verolainen, L. I. Voronchikhina, *Russ. J. Gen. Chem.* **80** (2010), 1025-1028.