

# Sinteza novih piridoksaliminskih derivata potencijalnih višeciljnih lijekova

---

Čavlek, Aleksandra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*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:182:293663>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**

*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Aleksandra Čavlek

**Sinteza novih piridoksaliminskih derivata  
potencijalnih višeciljnih lijekova**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju  
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Aleksandra Čavlek

**Sinteza novih piridoksaliminskih derivata  
potencijalnih višeciljnih lijekova**

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Štrajer Gajdošik

Komentorica: prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Organska kemija

## **Sinteza novih piridoksaliminskih derivata potencijalnih višeciljnih lijekova**

**Aleksandra Čavlek**

**Rad je izrađen na:** Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Martina Šrajter Gajdošik

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

### **Sažetak:**

Zelena kemija ili održiva kemija je nov način razmišljanja koji se sve više primjenjuje u kemiji u svrhu očuvanja okoliša i ljudskog zdravlja. Dvanaest principa zelene kemije donijeli su P. Anastas i J. Warner 1998. godine. Mehanokemijska sinteza je metoda zelene sinteze u kojoj se primjenjuje mehanička sila koju uzrokuju različita tijela za miješanje. Sinteza potpomognuta tekućinom (LAG metoda) je vrsta mehanokemijske sinteze u koju se dodaje mala količina tekućine, njezina je uloga da pripomogne sintezi i nema ulogu otapala. Vitamin B6 je vitamin koji u svojoj strukturi ima različite funkcionalne skupine koje mu omogućuju različite kemijske modifikacije. Kvaterne amonijeve soli su organski spojevi gdje su na dušik vezane 4 različite skupine. Cilj ovog rada je sinteza kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata vitamina B6 tj. piridoksal hidroklorida. Sinteza novosintetiziranih spojeva se odvijala u vibracijskom mlinu tijekom 4 sata pomoću sinteze potpomognute tekućicom. Sintetizirane su dvije serije kvaternih soli sa različitim polaznim reaktantima koji su reagirali sa supstituiranim fenacil-bromidima. Struktura novosintetiziranih produkata je određena pomoću masene spektroskopije.

**Ključne riječi:** *zelena kemija, mehanokemijska sinteza, LAG metoda, kvaterne amonijeve soli, N-acilhidrazoni, vibracijski mlin.*

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Diplomski rad obuhvaća:** 34 stranice, 25 slika, 6 tablica i 34 literaturna navoda

**Rad prihvaćen:** 20. 9. 2024.

### **Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv. prof. dr. sc. Marija Jozanović, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajter Gajdošik, mentorica i članica
3. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, komentorica i članica
4. izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

**University Graduate study programme in Chemistry; research program**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Organic chemistry

## **Synthesis of novel pyridoxalimine derivatives as possible multitargeted drugs**

**Aleksandra Čavlek**

**The paper was created on:** Faculty of Food Technology Osijek

**Supervisor:** Martina Šrajer Gajdošik, Associate Prof., PhD

**Co-mentor:** Dajana Gašo-Sokač, Prof., PhD

### **Abstract:**

Green chemistry or sustainable chemistry is a new way of thinking that is increasingly applied in chemistry for the purpose of preserving the environment and human health. The twelve principles of green chemistry were adopted by P. Anastas and J. Warner in 1998. Mechanochemical synthesis is a method of green synthesis in which the mechanical force caused by various mixing bodies is applied. Liquid-assisted synthesis (LAG method) is a type of mechanochemical synthesis in which a small amount of liquid is added, its role is to assist the synthesis and it has no role as a solvent. Vitamin B6 is a vitamin that has different functional groups in its structure that allow it to undergo different chemical modifications. Quaternary ammonium salts are organic compounds where 4 different groups are attached to nitrogen. The aim of this work is the synthesis of quaternary salts of *N*-acylhydrazone derivatives of vitamin B6, i.e. pyridoxal hydrochloride. The synthesis of the newly synthesized compounds took place in a vibrating mill for 4 hours using liquid-assisted synthesis. Two series of quaternary salts were synthesized with different starting reactants that reacted with substituted phenacyl bromides. The structure of the newly synthesized products was determined using mass spectroscopy.

**Keywords:** *green chemistry, mechanochemical synthesis, LAG method, quaternary ammonium salts, N-acylhydrazones, vibrating mill.*

**Original in:** Croatian

**Thesis includes:** 34 pages, 25 figures, 6 tables and 34 references

**Thesis accepted:** 20. 9. 2024.

### **Reviewers:**

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

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje kuhača 20, Osijek

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

## *Zahvale*

*Prije svega, željela bih zahvaliti prof. dr. sc. Dajani Gašo-Sokač na ispunjenju moje želje za izradom diplomskog rada pod njezinim vodstvom. Hvala Vam na svim savjetima koje ste mi dali tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, ali i na onim životnim savjetima. S Vama rad u laboratoriju nikada nije bio dosadan, već ispunjen smijehom i ljubavlju prema znanosti.*

*Hvala prof. dr. sc. Vesni Rastiji s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku na izvođenju računalnog dijela ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim roditeljima, sestri, baki koji su mi uvijek bili podrška i vjetar u leđa prilikom ovog studija.*

*Hvala i mojim kolegama koji su postali i vrlo dobri prijatelji na obogaćivanju ovih studentskih dana vrlo lijepim uspomename.*

*Hvala još jednom,*

*Aleksandra*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	3
2.1. Zelena kemija.....	3
2.1.1. Dvanaest načela zelene kemije .....	4
2.1.2. Mehanokemija .....	5
2.1.3. Sinteza potpomognuta tekućinom (engl. <i>Liquid-Assisted Grinding</i> ).....	8
2.2. Vitamin B6.....	9
2.3. Hidrazoni.....	10
2.4. Piridoksal izonikotinoil hidrazon i piridoksal benzoil hidrazon.....	11
2.5. Kvaterne amonijeve soli.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Materijali i metode .....	16
3.2. Priprava kvaternih soli <i>N</i> -acilhidrazonskih derivata (serija <b>1-8</b> ).....	18
3.3. Priprava kvaternih soli <i>N</i> -acilhidrazonskih derivata (serija <b>9-16</b> ).....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
5. ZAKLJUČCI .....	32
6. LITERATURA.....	33

## 1. UVOD

Piridoksal je jedan od šest spojeva koji pripada skupini vitamina B6. Uz piridoksal, u skupinu vitamina B6 pripadaju i piridoksin, piridoksamin te njihovi fosforilirani oblici: piridoksin-5'-fosfat, piridoksal-5'-fosfat i piridoksamin-5'-fosfat. Vitamin B6 je topljiv u vodi i ima važnu ulogu u organizmu gdje sudjeluje u metabolizmu te je sastavni dio koenzima. Vitamin B6 se sve više istražuje zbog mogućnosti kemijske modifikacije funkcijskih skupina koje su prisutne na piridinskoj jezgri (karbonilna, hidroksilna i amino).

Zelena kemija je nova grana kemije koja se sve više razvija u posljednjih 30-tak godina te je njezin cilj „pozeleniti“ kemijske postupke i sinteze te u krajnjem slučaju smanjiti zagađenje okoliša i štetni utjecaj na zdravlje ljudi. Temelje zelene kemije postavili su Paul Anastas i John Warner 1998. godine kada su definirali 12 načela zelene kemije. Mehanokemija je grana kemije koja proučava kemijske reakcije potaknute mehaničkom energijom, umjesto tradicionalnim otapalima ili zagrijavanjem. U mehanokemijskim procesima, reaktanti se dovode u kontakt putem brušenja, mljevenja ili kompresije, pri čemu dolazi do stvaranja novih spojeva ili struktura. Ova metoda često omogućava brže reakcije, s manje otapala i otpada, što ju čini održivijom i ekološki prihvatljivijom opcijom za sintezu kemikalija. Mehanokemija se sve više primjenjuje u razvoju novih materijala, farmaceutskih spojeva i katalizatora.

Mehanokemijska sinteza je metoda zelene kemije koja se koristi za sintezu kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata vitamina B6 primjenom mehaničke energije prouzrokovane metalnim kuglicama. Mehanokemijska sinteza se odvija u mlinovima pri različitim frekvencijama, a može biti potpomognuta tekućinom. Kod sinteze potpomognute tekućinom (engl. *liquid-assisted grinding*, LAG) dolazi do mljevenja reaktanata uz malu količinu tekućine. Kvaterne soli su spojevi s dušikom na koji su vezane četiri skupine, a dušik nosi pozitivan naboj. Mnogi lijekovi postoje u obliku kvaternih amonijevih soli zbog njihove stabilnosti. Uz kvaterni dušik značajna funkcijska skupina je i hidrazonska koja nastaje zamjenom karbonilnog kisikovog atoma u aldehidima ili ketonima s hidrazonskom ili *N*-acilhidrazonskom skupinom. Kombinacija hidrazona sa različitim funkcijskim skupinama u molekuli rezultira spojevima s jedinstvenim fizikalnim i kemijskim karakteristikama i potencijalno različitim biološkim aktivnostima.

Cilj ovog rada bio je sintetizirati kvaterne soli *N*-acilhidrazonskih derivata vitamina B6 s potencijalnim biološkim djelovanjem i primjenom u liječenju Alzheimerove bolesti.



Sintetizirano je 16 novih kvaternih soli čije su strukture potvrđene masenom spektroskopijom (engl. *mass spectroscopy*, MS).

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Zelena kemija

Zelena ili održiva kemija je dio kemije koji se bavi dizajniranjem kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili eliminiraju uporabu ili nastanak opasnih tvari. Glavni cilj zelene kemije je smanjenje štetnog utjecaja kemijskih sinteza na okoliš i ljudsko zdravlje. Koncept zelene kemije se počeo stvarati prije 30-ak godina. U godinama nakon stvorenog koncepta zelene kemije, različite organizacije i vlade država su prihvatile taj koncept i počele s razvojem različitih programa i inicijativa s ciljem podizanja svijesti o zelenoj kemiji [1].

Početak stvaranja svijesti o okolišu i njegovom očuvanju počinje 40-tih godina 20. stoljeća. Razvoj industrijalizacije bio je glavna prekretnica za razvoj svjetske ekonomije. Industrijalizacija je dovela do poboljšanja kvalitete svakodnevnog života, ali posljedično došlo je i do svjesnosti o negativnom utjecaju iste na okoliš. Porastom ljudske populacije i industrijalizacije, došlo je do povećanja proizvodnje hrane i proizvoda koje poboljšavaju kvalitetu ljudskog života, ali istovremeno i iscrpljivanja prirodnih resursa, a kao posljedica povećane proizvodnje došlo je i do povećanja zagađenja okoliša. Prve brige za okoliš javile su se nakon 1949. godine kada se održala Znanstvena konferencija Ujedinjenih naroda o očuvanju i korištenju resursa u Sjedinjenim Američkim Državama, dok su problemi o zagađenju okoliša stavljeni u fokus 1968. godine tijekom Međunarodne konferencije stručnjaka o znanstvenim osnovama racionalnog korištenja i očuvanja resursa biosfere. Stockholmskom konvencijom u Švedskoj 1972. godine, predstavnici različitih zemalja i pripadnici Ujedinjenih naroda upozoreni su na štetu koja može nastati prekomjernim iscrpljivanjem ekosustava te koje bi štetne posljedice mogle nastati za čovječanstvo. Osamdesetih godina 20. stoljeća održane su brojne konferencije s temom očuvanja okoliša. Deset godina nakon održavanja Stockholmske konvencije, osnovana je Svjetska komisija za okoliš i razvoj. Tijekom osnivanja komisije, sve se više počelo shvaćati da velik dio razvoja i industrijalizacije nije održiv te da mora doći do promjene. Tijekom sastanka ministara okoliša zemalja članica Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj 1985. godine, donesene su odluke o tri glavne gospodarske teme: gospodarski razvoj i okoliš, prevencija zagađenja i kontrola te informacije o okolišu koje su se zadržale do 1990. godine. Tim odlukama želio se smanjiti rizik korištenja kemijskih proizvoda te povećati prevenciju i kontrolu zagađenja okoliša. Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA) je pokrenula program „Alternativne sintetičke rute za

spriječavanje onečišćenja“ 1991. godine čiji je glavni cilj bio spriječiti proizvodnju toksičnih kemijskih proizvoda. EPA-in program mijenja ime 1992. godine te dobiva naziv „Zelena kemija“. Do promjene naziva je došlo zbog proširenja programa te su dodane nove teme poput ekološki prihvatljivijih otapala i sigurnijih kemijskih procesa [2].

Paul Anastas i John Warner su 1998. godine donijeli 12 načela zelene kemije u knjizi „Zelena kemija: Teorija i praksa“. Glavni cilj načela bio je razvoj novih tehnika u svrhu smanjenja utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje [2]. Načela su vodeći okvir za dizajn novih kemijskih proizvoda i procesa koji se mogu primijeniti na svaki dio kemijskog procesa, od korištenih sirovina, učinkovitosti i sigurnosti kemičara do toksičnosti kemikalija koje se koriste [1].

### **2.1.1. Dvanaest načela zelene kemije**

Začetnici zelene kemije, P. Anastas i J. Warner (1998.) predložili su 12 načela i time postavili temelje programa zelene kemije:

1. Prevencija - bolje je spriječiti stvaranje otpada, nego ga čistiti nakon što nastane.
2. Atomska ekonomija - reakcije sinteze trebaju biti osmišljene na način da se maksimalno ugrade svi atomi reaktanata koji se koriste u konačan produkt.
3. Manje opasna kemijska sinteza - kada god je moguće sinteza mora biti dizajnirana da koristi tvari koje imaju malu ili nikakvu toksičnost na ljudsko zdravlje i okoliš.
4. Dizajn sigurnijih kemikalija - produkti reakcija trebaju biti dizajnirani da zadrže učinkovitost, ali da im se smanji toksičnost.
5. Sigurnija otapala i pomoćna sredstva - pomoćna sredstva kao što su otapala i sredstva za odvajanje trebaju biti neškodljiva te bi njihova upotreba trebala biti smanjena kada je to moguće.
6. Dizajn za energetske učinkovitost - energetske potrebe kemijskih procesa trebaju biti prepoznate zbog utjecaja na okoliš i gospodarstvo te svedene na što je moguće manju mjeru. Preporuča se da se kemijske sinteze provode pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku.
7. Uporaba obnovljivih sirovina - materijali i sirovine koji se koriste trebaju biti obnovljivi kada god je to tehnički i ekonomski izvedivo.
8. Smanjiti derivatizaciju - nepotrebna derivatizacija (upotreba zaštitnih skupina, privremena modifikacija kemijskog ili fizikalnog svojstva) treba se svesti na najmanju

moguću mjeru ili izbjegavati kada je to moguće jer takvi postupci zahtijevaju dodatne reagense i stvaranje otpada.

9. Kataliza - preporuča se korištenje što selektivnijih katalitičkih reagensa koji su superiorniji od stehiometrijskih reagensa.
10. Dizajn za razgradnju - kemijski produkti bi trebali biti dizajnirani na način da se na kraju svoje funkcije razgrađuju na bezopasne produkte i ne štete okolišu i zdravlju čovjeka.
11. Analiza u stvarnom vremenu za sprječavanje onečišćenja - potrebno je razvijati analitičke metode kako bi se omogućilo praćenje i kontrola u stvarnom vremenu prije nastanka opasnih tvari.
12. Sigurnija kemija za prevenciju nesreća - tvari i kemijski procesi trebaju biti dizajnirani tako da se minimizira rizik od kemijskih nesreća (eksplozije, požari i izlaganje opasnim tvarima) [1].

Načela zelene kemije mogu se primijeniti na svaki kemijski postupak, bilo da se radi o laboratorijskim ili industrijskim procesima. Ključni ciljevi zelene kemije uključuju:

- Poboľšano iskorištavanje dostupnih reagensa za optimizaciju kemijskih procesa
- Smanjenje otpada tijekom pripreme i upotrebe kemikalija
- Proizvodnju putem unaprijedenih metoda koje manje štete okolišu
- Zamjenu toksičnih reagensa i proizvoda s ekvivalentnima koji imaju manji negativan utjecaj na okoliš
- Smanjenje energetske potrošnje pri proizvodnji ciljnih spojeva, koristeći obnovljive izvore energije ili brže metode sinteze
- Promicanje uporabe kemikalija koje su u skladu s načelima održivog razvoja [3].

### **2.1.2. Mehanokemija**

Mehanokemija je grana kemije koja proučava kemijske i fizikalno-kemijske transformacije tvari u svim agregacijskim stanjima nastale pod utjecajem mehaničke energije. Ona je metoda zelene kemije koja se temelji na mehaničkom mljevenju reaktanta i izazivanjem kemijske reaktivnosti primjenom mehaničke sile kao što je kompresija, smicanje ili trenje. Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) proglasila je mehanokemiju jednom od 10 kemija koje će promijeniti svijet. Posljednjih godina mehanokemija postaje alternativni pristup sintezi brojnih organskih spojeva [4].

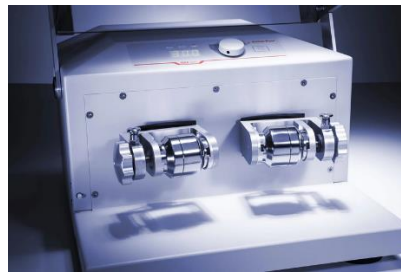
Mehanokemijska upotreba mehaničke sile za provođenja kemijskih reakcija ima dugu povijest u kemiji. Najjednostavnija i prva tehnika mehanokemijske sinteze je ručno mljevenje pomoću tarionika i tučka koja je poznata još od kamenog doba te se koristi još danas [5,6]. Najranija dokumentirana mehanokemijska reakcija najvjerojatnije je mljevenje minerala cinabarita u bakrenom tarioniku pri čemu se dobivala elementarna živa. Tarionik i tučak su bili standardni instrumenti u kemijskim laboratorijima alkemičara i kemičara. U ranom radu objavljenom 1820. godine Faraday opisuje redukciju srebrovog klorida mljevenjem s cinkom, kositrom, željezom i bakrom u tarioniku. To je nazvao „suhim načinom“ izazivanja reakcija [6].

Primjena mehanokemije za anorganske materijale poznata je još od davnina, dok je primjena mehanokemije u organskoj kemiji relativno nova pojava [5]. Organske mehanokemijske reakcije mogu se podijeliti u dvije kategorije. U prvu kategoriju spadaju reakcije gdje je došlo do pucanja kovalentnih veza te su se stvorile nove i nastao je novi produkt. Taj novonastali produkt se može razlikovati od produkta koji bi nastao pod istim uvjetima, kada bi se radilo o otopinskoj sintezi. U drugu kategoriju spadaju reakcije koje su uzrokovane sekundarnim interakcijama u molekulama poput vodikovih veza. Tada dolazi do supramolekularne reakcije i nastaju kokristali. Mehanokemija može svoju primjenu naći još u drugim disciplinama kao što su fizikalna i koloidna kemija, kemijsko inženjerstvo, fizika, metalurgija, mineralogija [6].

Mehanokemijske reakcije odvijaju se u tarioniku ili češće u vibracijskim ili planetarnim mlinovima koji omogućuju kontrolu uvjeta mljevenja i reproducibilnost sinteze. Glavne prednosti mehanokemije su: smanjena količina otapala koja se koristi u reakcijama, kraće vrijeme reakcije, visoka učinkovitost te povećana reaktivnost [4]. Uzrok povećane reaktivnosti kovalentnih veza je prisutna mehanička sila i naprezanja koja u pojedinim molekulama izazivaju visokoenergetske lokalne konfiguracije koje uzrokuju produljivanje veza. To produljivanje veza, čini molekule sklonijima za kemijsku reakciju [7]. Mehanokemijske reakcije u tarioniku, iako imaju svoje prednosti imaju i nedostatke, a to su stalan doticaj reaktanata sa zrakom i vlagom iz zraka, sporost metode ta činjenica da se ne mogu usitnjavati velike količine reaktanata [5]. S druge strane, suvremene mehanokemijske sinteze provode se u automatiziranim mlinovima u kojima se reakcijska smjesa nalazi unutar čeličnih, teflonskih ili polimetilmetakrilatnim (PMMA) posudicama u koje se stavljaju čelične kuglice i reakcijske smjese ne dolazi u doticaj sa zrakom i vlagom tijekom mljevenja. Posudica oscilira (vibracijski mlin) frekvencijom 25 – 30 Hz uslijed čega dolazi do miješanja reaktanata. Osim miješanja,

dolazi i do struganja reaktanata o stjenke posudice, a zbog velike brzine kuglica udarci o stjenke posudice dovode do raspršenja energije i postupnog zagrijavanja posudice [5,8].

Kuglični mlinovi predstavljaju najučinkovitije mlinove koji mogu prenijeti velike količine mehaničke energije na reaktante u relativno kratkom vremenu. Stvorena mehanička energija se prenosi na smjesu u mlinu u obliku impulsa kroz tijelo za mljevenje. Vibracijski mlinovi (**Slika 1.**) sastoje se od dvije posudice koje su pričvršćene na stezaljku i energično vibriraju pri različitim frekvencijama, najčešće 25 – 30 Hz. Medij za mljevenje čine kuglice, koje su najčešće izrađene od čelika. One udaraju jedne o drugu, uzorak i o stjenke posudice te uzorak prima tu mehaničku energiju u obliku impulsa kada je „zarobljen“ između kuglica. Volumeni posudica za vibracijske mlinove mogu varirati 1 - 50 mL. Promjer kuglica može iznositi od 1 mm do nekoliko centimetara [8].



**Slika 1.** Vibracijski mlin [9].

Planetarni mlin (**Slika 2.**) je dobio ime zbog posude za mljevenje koja se kreće poput planeta. Mlin se sastoji od kružne rotirajuće ploče s dvije ili više posuda za mljevenje koje se mogu okretati u istom ili suprotnom smjeru od rotirajuće ploče. Do sudaranja medija za mljevenje dolazi zbog rotacije ploča i posude pri čemu se na stjenkama posuda stvaraju različite sile udara i trenja. Posude za mljevenje su najčešće sferičnog oblika [8].



**Slika 2.** Planetarni mlin [8].

### 2.1.3. Sinteza potpomognuta tekućinom (engl. *Liquid-Assisted Grinding*)

Sinteza potpomognuta tekućinom spada u osnovne mehanokemijske metode uz sintezu bez primjene otapala (engl. *Neat Grinding*, NG) i sintezu potpomognutu ionskom tekućinom (engl. *Ion- and Liquid-Assisted Grinding*) [10]. LAG metoda je metoda u kojoj se koristi mala količina tekućine za poboljšanje ili za kontrolu reaktivnosti sustava. Smatra se proširenjem metode tradicionalne mehanokemijske tehnike u kojoj se ne koristi otapalo [4].

LAG metoda sinteze, u organskoj mehanokemiji, omogućuje modifikaciju reakcijskih uvjeta i optimizaciju sinteze uvođenjem ili mijenjanjem otapala potrebnog za sintezu [5]. Tekućina koja se dodaje u reakcijsku smjesu ima ulogu katalizatora, no još uvijek nije poznato kako doprinosi poboljšanju sinteze [5]. Organska otapala koja se dodaju u reakcije često čine 90 % mase reakcijske smjese. Organska otapala koja se koriste u procesima često nisu ekološki prihvatljiva te izazivaju zabrinutost za zdravlje i okoliš [7]. Smatra se da tekućina zapravo ima fizičku ulogu djelujući kao lubrikant u reakciji i pruža medij za olakšavanje molekularne difuzije [11]. Smanjenim korištenjem otapala, dimenzijalnost kemijske reakcije je smanjena sa tri na dva čije je kemijska interakcija moguća samo kroz interakciju molekularnih reaktanata [7]. LAG metodu empirijski karakterizira parametar  $\eta$  koji opisuje kakva je mehanokemijska reaktivnost reakcijskog sustava. Jednadžba (1) prikazuje da parametar  $\eta$  ovisi o volumenu dodane tekućine u reakcijom sustavu (izražen u  $\mu\text{L}$ ) i masi reaktanata u sustavu (izražen u  $\text{mg}$ ) [12].

$$\eta = \frac{V(\text{tekućina} / \mu\text{L})}{m(\text{reaktant} / \text{mg})} \quad (1)$$

Vrijednosti empirijskog faktora u sintezi bez otapala iznosi  $\eta = 0 \mu\text{L}/\text{mg}$ , dok je vrijednost faktora za otopinske reakcije  $\eta > 12 \mu\text{L}/\text{mg}$ . Vrijednost empirijskog faktora u LAG sintezi mora iznositi  $\eta = 0 - 2 \mu\text{L}/\text{mg}$  [4].

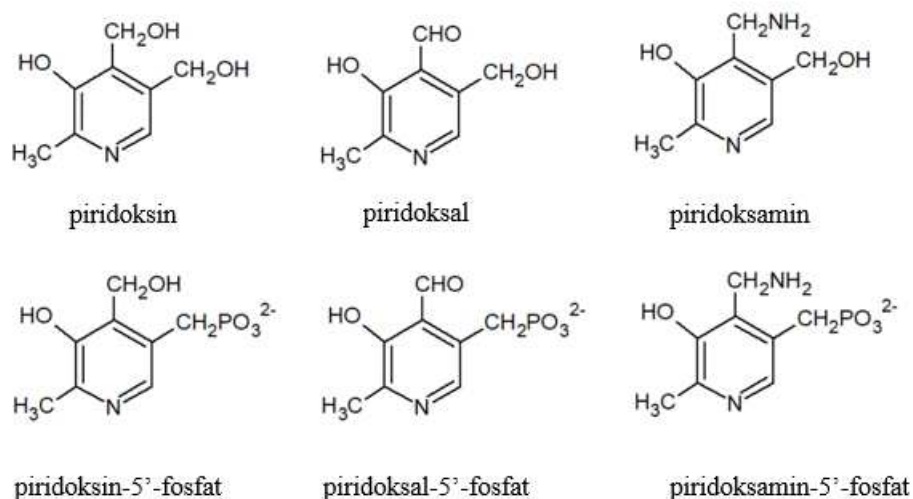
Umjesto otopine koja pospješuje sintezu, u reakcijske sustave se mogu dodati i krutine. Najčešće krutine koje se dodaju su abrazivne i kemijske inertne tvari. Koriste se kao pomoćna sredstva za mljevenje tj. njihov je zadatak pojačati mehaničko djelovanje kuglica za miješanje čime smjesa postaje praškastijom. Čvrste stvari koje se dodaju u sintezu su pogodne za organokemijske reakcije jer mekani organski reaktanti prilikom miješanja mogu stvoriti materijal sličan vosku koji se teško može usitniti. Čvrsti aditivi mogu u reakcijskim smjesama

poslužiti kao sredstvo za „razrjeđenje“ krutine i povećati selektivnost reakcije, a primjer takvog aditiva su kiseli ili bazični katalizatori poput bazičnog aluminija [5].

## 2.2. Vitamin B6

Vitamini su organske molekule koje su u malim količinama nužne za normalno funkcioniranje ljudskog i životinjskog organizma. Ljudski organizam ne može proizvoditi vitamine te ih stoga treba redovito uzimati hranom [13]. Vitamini B skupine spadaju u skupinu vitamina koji su topljivi u vodi. Skupinu vitamina B čini 8 strukturno različitih vitamina te se oni nazivaju i B kompleksom: B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (pantotenska kiselina), B6, B7 (biotin), B9 (folna kiselina) i B12 (različiti kobalamini) [14].

Vitamin B6 čine 3 oblika vitamina: piridoksin, piridoksal i piridoksamin i njihovi fosforilirani oblici. Do razlike u strukturi dolazi zbog različitih funkcijskih skupina na piridinskom prstenu u položaju 4. Piridoksin sadrži hidroksilnu (-OH), piridoksal karbonilnu (-CHO), a piridoksamin amino skupinu (-NH<sub>2</sub>) (Slika 3.) [13]. Fosforilirani oblik piridoksala, piridoksal-5'-fosfat, najaktivniji je fosforilirani oblik vitamina B6. Piridoksal fosfat i piridoksamin fosfat najvažniji su koenzimi uključeni u brojne biokemijske reakcije kao što su metabolizam aminokiselina, ugljikohidrata, masnih kiselina, lipida, sintezu nukleinskih kiselina, serotonina, dopamina, noradrenalina i gama-aminomaslačne kiseline [15].



Slika 3. Strukture vitamina B6.

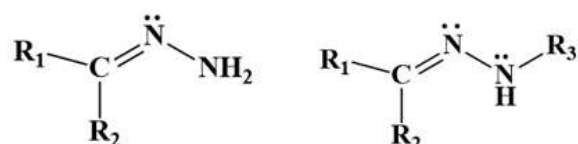


Ljudi i životinje nemaju mogućnost sinteze vitamina B6 u organizmu stoga se mora unositi hranom. Nedostatak ovog vitamina doprinosi razvoju različitih neuroloških bolesti poput epileptičke encefalopatije koja nastaje zbog grešaka u radu enzima. Pojedini lijekovi, hormonske terapije, manjak sna i loša prehrana su jedni od razloga zbog kojih dolazi do deficita vitamina B6 u ljudskom organizmu [13].

Upravo zbog važnosti molekula iz skupine B vitamina kemičari dugi niz godina usmjeravaju svoje napore u sintezu različitih strukturno modificiranih derivata vitamina B i ispituju njihovu potencijalnu primjenu. Kao posljedica toga brojni derivati vitamina B su odobreni kao lijekovi ili su kandidati za lijekove koji su u kliničkoj fazi ispitivanja. Međutim osim piridoksal-fosfata i samog piridoksina samo su tri derivata (piritinol, cicletanin i pirisudanol) ušli u praksu kao lijekovi [16].

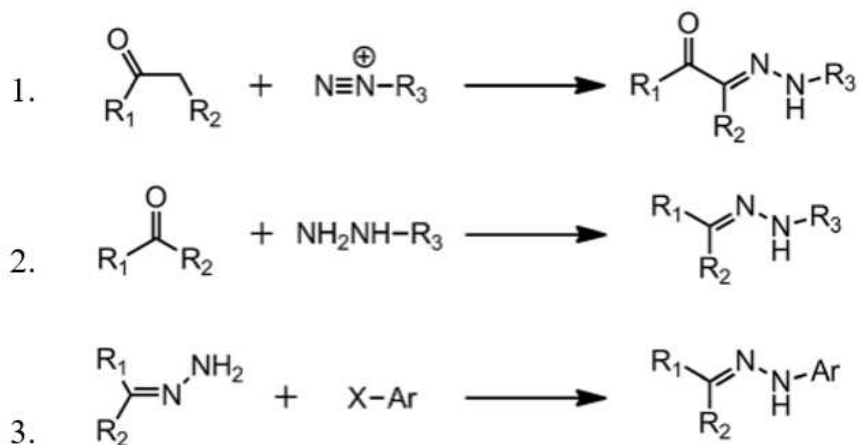
### 2.3. Hidrazoni

Hidrazoni su skupina organskih spojeva sa skupinom C=N-NH<sub>2</sub> koji nastaju reakcijom aldehida ili ketona s hidrazinom (**Slika 4.**) [17,18]. Srodni su ketonima i aldehydima koji sadrže karbonilnu skupinu (C=O) jer je kod hidrazona prisutna C=N veza tj. kisik je zamijenjen -NH<sub>2</sub> skupinom. Dvostruka veza hidrazona je konjugirana sa slobodnim elektronskim parom dušika. Dušik iz veze je nukleofilan, dok je ugljik nukleofilne i elektrofilne prirode [19,20].



**Slika 4.** Opća formule hidrazona.

Hidrazoni se mogu sintetizirati na 3 različita načina. Prvi način je reakcija kopulacije između aril-diazonijevih soli i β-keto estera ili kiselina. Ovakva reakcija poznata je pod imenom Japp-Klingemannova reakcija. Drugi način je reakcija kondenzacije između hidrazina i ketona ili aldehida. Treći način je reakcijom supstitucije između aril-halogenida i nesupstituiranog hidrazona (**Shema 1.**). Dobiveni produkti sami kristaliziraju u otopini što pojednostavljuje proces pročišćavanja [21].

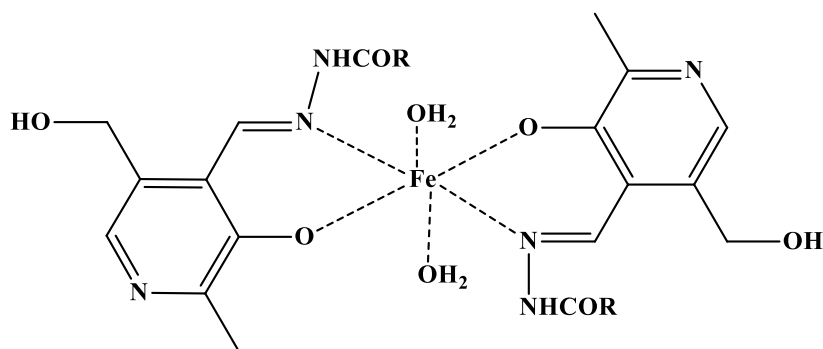


**Shema 1.** Načini sinteze hidrazona [21].

Hidrazoni pokazuju velik biološki i farmakološki učinak. Mogu djelovati antimikrobno, protuupalno, antifungalno, antituberkulozno, antikancerogeno, antitrombocitno, antimalarično i antikonvulzivno [20].

#### 2.4. Piridoksal izonikotinoil hidrazon i piridoksal benzoil hidrazon

Edwards i suradnici su sintetizirali 14 acilhidrazonskih derivata piridoksala reakcijom piridoksala s acilhidrazonima opće formule RCONHNH, pri čemu R predstavlja različite funkcije skupine (R= metilna, fenilna, *p*-hidrofenilna, *p*-metilfenilna, *p*-aminofenilna, *p*-*tert*-butilfenilna, *p*-metoksifenilna, *m*-klorfenilna, *m*-fluorfenilna, *m*-bromfenilna, piridin, furan i tiofen). Dobiveni spojevi su pokazali sposobnost keliranja željeza (**Slika 5.**) i njegove migracije kroz biološke membrane [22].



**Slika 5.** Način keliranja željeza [22].

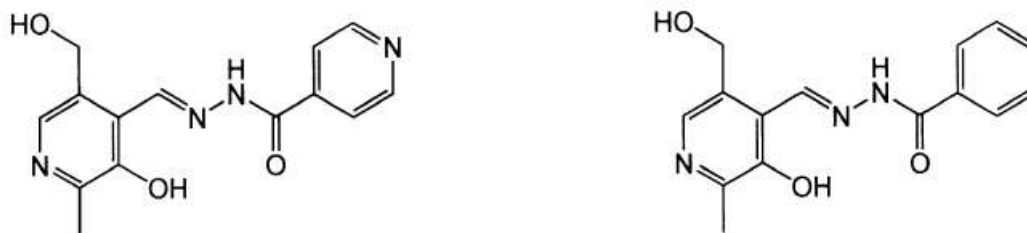
Željezo je vrlo važan element u organizmu koji sudjeluje u mnogim staničnim procesima poput transporta kisika pomoću hemoglobina, prijenosu elektrona u proizvodnji energije i sintezi deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA). Željezo je ključan element u proteinima kao što su hemoglobin, mioglobin i citokrom, a djeluje i kao kofaktor za brojne enzime. Pohranjuje se u obliku feritina, a kroz serum se prenosi transferinom [23,24,25].

U fiziološkim uvjetima kada je  $\text{pH} = 7,4$ , željezo je u organizmu prisutno u obliku  $\text{Fe}^{2+}$ . Pri tim uvjetima  $\text{Fe}^{2+}$  lako oksidira i prelazi u  $\text{Fe}^{3+}$  oblik. Oksidirani oblik željeza je podložan hidrolizi te dolazi do taloženja netopljivih željezovih hidroksida ako nije prisutan kelator [23,24]. Pri toj  $\text{pH}$  vrijednosti ( $\text{pH} = 7,4$ ), koncentracija  $\text{Fe}^{3+}$  ne smije prijeći granicu od  $10^{-17}$  mol/dm<sup>3</sup>. Organizam sam prepoznaje kada dođe do povećane koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  u organizmu pa se sprječava oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  oblika. Željezo se prekomjerno taloži u organizmu kao posljedica bolesti  $\beta$ -talasemije i kroničnih anemija koje zahtijevaju dugotrajnu transfuziju krvi [27].  $\beta$ -talasemija je vrsta anemije karakterizirana smanjenjem ili potpunom nemogućnosti sinteze  $\beta$ -globinskog lanca hemoglobina [28]. Ukoliko je koncentracija željeza u organizmu povećana i kada željezo nije vezano za specifične ligande sudjeluje u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) koje uzrokuju oksidativni stres stanica [23]. Slobodno željezo također ubrzava acidozu inhibicijom oksidativne fosforilacije u mitohondrijima.

Lijek koji se nalazi na tržištu kao kelator željeza je deferoksamin. Lijek je niske toksičnosti, ali su njegovi nedostaci vrlo visoka cijena i slaba apsorpcija u crijevima što predstavlja ograničenja u njegovoj primjeni. Istraživanja su stoga usmjerena na pronalazak novih lijekova koji bi imali jeftiniju proizvodnju i veliku učinkovitost tijekom oralne primjene. Provedbom *in vivo* i *in vitro* ispitivanja, pokazalo se da je piridoksal izonikotinoil hidrazon učinkovito kelirajuće sredstvo koje bi se moglo koristiti u liječenju  $\beta$ -talasemije [26].

Piridoksal izonikotinoil hidrazon (engl. *Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone*, PIH) i njegov analog piridoksal benzoil hidrazon (**Slika 6.**) su spojevi koji imaju mogućnost keliranja željeza u organizmu [26]. PIH se vrlo jednostavno sintetizira kondenzacijom piridoksala i izonikotinoil hidrazona pri čemu nastaje Schiffova baza [29]. Izonikotinoil hidrazon je lijek sa antituberkuloznim djelovanjem [16]. PIH je kristalinična tvar koja može postojati u obliku soli ili različitih hidrida. Boja mu varira od svijetlo žute do narančaste. Slabo je topljiva u vodenom mediju pri neutralnom  $\text{pH}$ . Topljivost PIH predstavljala je značajno ograničenje u farmaceutskoj industriji stoga je razvijen i topljiv oblik soli ( $\text{PIH} \cdot 2\text{HCl}$ ). PIH je tridentantni ligand koji može biti slobodan ili se može vezati s  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  ionima preko fenolatnih atoma

kisika, iminskog dušika i karbonilnog kisika u stehiometrijskom omjeru 1 : 2, ali PIH ima veći afinitet za  $Fe^{3+}$  u odnosu na  $Fe^{2+}$  [29,22,23].



**Slika 6.** Piridoksal izonikotinoil hidrazon i piridoksal benzoil hidrazon [23].

Pretpostavlja se da PIH i njegov kompleks sa željezom ulazi u stanice pomoću pasivne difuzije zbog lipofilnosti koja je razlog njihove učinkovitosti. Lipofilnost uzrokuje skladištenje željeza u organizmu i zbog te mogućnosti ima veći kapacitet u odnosu na deferoksamin. *In vitro* istraživanja pokazuju trendove u mobilizaciji željeza pomoću PIH-ovih analoga zbog njihove lipofilnosti, a ne zbog afiniteta za željezo. Učinkovitost analoga se smanjuje jer kelator nema pristup unutarstaničnom željezu. Lipofilnost analoga također utječe i na brzinu apsorpcije kroz gastrointestinalni epitel. Kompleksi PIH-a i njegovih analoga se željezom se zbog lipofilnosti izlučuju fecesom [23].

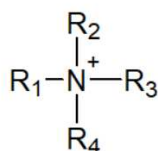
Ponka i Richardson (1988.) proveli su istraživanje koje je pokazalo da analozi PIH-a: piridoksal benzoil hidrazon, piridoksal *p*-metoksibenzoil hidrazon i piridoksal *m*-fluorobenzoil hidrazon pokazuju veću aktivnost na molekularnoj razini od PIH-a i deferoksamina u stanicama hepatocita, makrofagima i retikulocitima. Provedbom daljih istraživanja navedenih spojeva, pri  $pH = 7,5$ , ligandi su prisutni u stanici kao neutralne molekule koje lako pronalaze unutarstanično željezo. PIH i neki njegovi analozi pokazuju jednaku selektivnost za  $Fe^{3+}$  u usporedbi sa deferoksaminom, dok je ona smanjena u odnosu sa kelirajućim sredstvima aminokarboksilne kiseline, etilendiaminoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) i dietilentriaminopentanske kiseline (engl. *diethylenetriaminepentaacetic acid*, DTPA) [26].

P. Ponka i suradnici (1984.) proveli su istraživanje o različitim kelatorima i njihovom efektu vezanja željeza u prisutnosti ili odsutnosti PIH-a u nezrelim crvenim krvnim stanicama, retikulocitima [23,30]. Kelatori koji imaju visoki afinitet se željezo, poput deferoksamina, EDTA i DTPA nisu uspjeli vezati veliku količinu željeza zbog otežanog prolaska kroz staničnu membranu. Drugu skupinu korištenih kelatora su činili 2,2'-bipiridin i 1,10-fenantrolin. Ti su

spojevi uspjeti prijeći staničnu membranu i vezati željezo, ali nastali kompleks nije uspio prenijeti željezo u izvanstanični prostor. Ovo istraživanje je pokazalo 3 svojstva koja su potrebna da bi došlo do vezanja unutarstaničnog željeza: popustnost membrane za kelator, afinitet prema željezu koji mora biti snažniji od staničnog liganda i propustnost membrane za kompleks željezo-kelator [30].

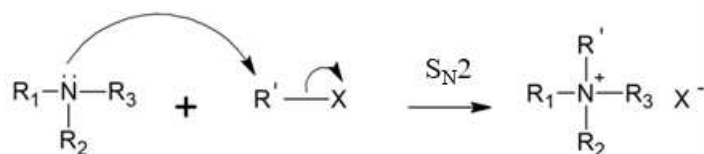
## 2.5. Kvaterne amonijeve soli

Kvaterne amonijeve soli su kemijski spojevi u kojima su na centralnom atomu dušika vezane 4 različite skupine (**Slika 7.**). Dušik tada nosi pozitivan naboj [31].



**Slika 7.** Opća formula kvaternih amonijevih soli [31].

Amonijeve soli nastaju  $S_N2$  reakcijom između tercijarnog amina i primarnog alkil-halogenida (**Shema 2.**).  $S_N2$  je reakcija u kojoj dolazi do nukleofilne supstitucije odnosno nukleofilnog napada dušika na elektrofilni ugljikov atom primarnog alkil-halogenida [31].



**Shema 2.** Mehanizam nastanka kvaternih amonijevih soli [31].

Kvaterne soli su čvrste ionske tvari i imaju visoko talište. Bolje su topljive u vodi i nepolarnim organskim otapalima u odnosu na amine. Ovakve soli se sintetiziraju kada se želi izolirati ili okarakterizirati amin. Sinteza topljivih amonijevih soli je dokaz za prisutnost amino skupine. Kvaterne soli se koriste i kao sredstvo za odvajanje amina od spojeva s manjom bazičnošću. Postupak se odvija u lijevku za odjeljivanje u procesu ekstrakcije. Također imaju i ulogu katalizatora faznog prijenosa što znači da kvaterne amonijeve soli mogu prenositi ionske reagense u organske otapala i na taj način im omogućiti povoljniji medij za otapanje, koje bez njih ne bi bilo moguće [32].

Mnogi lijekovi su prisutni u obliku amonijevih soli zbog njihove stabilnosti jer se ne raspadaju u procesima oksidacije i nemaju neugodan miris. Zbog svoje topljivosti u vodi, kvaterne amonijeve soli mogu se koristiti i kao djelatne tvari u sirupima i otopinama za injekcije. Primjer lijeka koji je prisutan u obliku kvaterne amonijeve soli je efedrin-hidroklorid koji se koristi za liječenje prehlada i alergija [32].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali i metode

Korištene kemikalije i otapala bile su analitičke čistoće (*pro analysi*) te nisu dodatno pročišćavane prije korištenja u sintezama. Sinteze su rađene u vibracijskom mlinu tvrtke Anton Paar (Slika 8.).



**Slika 8.** Vibracijski mlin.

Tijek reakcije praćen je pomoću tankoslojne kromatografije (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) uz stacionarnu fazu silikagela. Kao eluens za razvijanje kromatograma korištena je smjesa otapala kloroform : metanol u omjeru 6:1 (v/v). Razvijeni kromatogrami su promatrani pod ultraljubičastom lampom (engl. *ultraviolet*, UV) pri valnim duljinama 254 i 336 nm.

Tališta novosintetiziranih komponenata određena su pomoću „Stuart Melting Point Apparatus SMP3“ aparata.

## Kemikalije korištene u sintezi

3-klor-*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid;

$C_{15}H_{14}ClN_3O_3$ ,  $M = 319,74$  g/mol

*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid;  $C_{15}H_{15}N_3O_3$ ,  $M = 286,29$  g/mol

fenacil-bromid;  $C_8H_7BrO$  (Sigma-Aldrich)

2-brom-4'-fluoracetofenon;  $C_8H_6BrFO$  (Aldrich)

2-brom-4'-kloracetofenon;  $C_8H_6BrClO$  (Acros Organics)

2, 4'-dibromacetofenon;  $C_8H_6Br_2O$  (Acros Organics)

2-brom-4'-nitroacetofenon;  $C_8H_6BrNO_3$  (Aldrich)

2-brom-4'-metilacetofenon;  $C_9H_9BrO$  (Acros Organics)

2-brom-4'-metoksiacetofenon;  $C_9H_9BrO_2$  (Acros Organics)

2-brom-4'-fenilacetofenon;  $C_{14}H_{11}BrO$  (Acros Organics)

Natrijev hidrogenkarbonat;  $NaHCO_3$  (Gram Mol)

Aceton;  $C_3H_6O$  (Gram Mol)

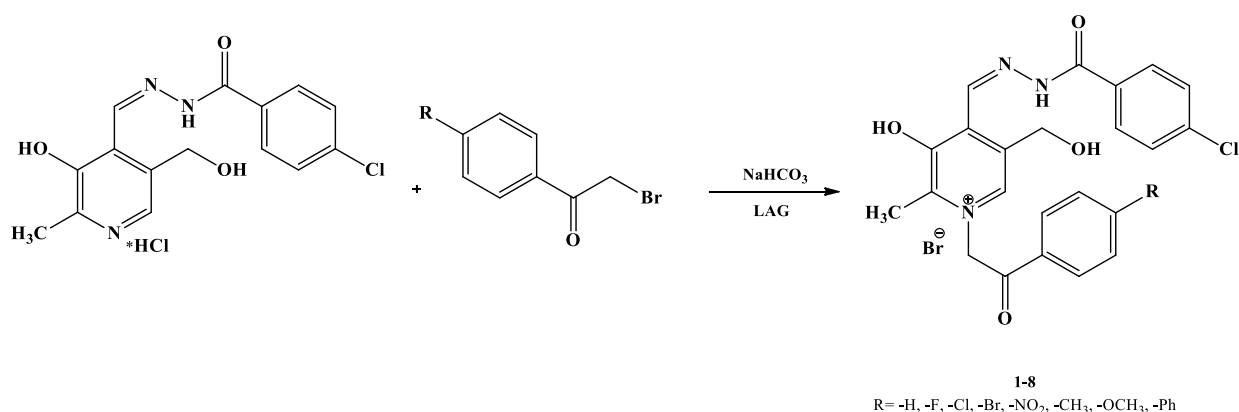
Kloroform;  $CHCl_3$  (Gram Mol)

Metanol;  $CH_3OH$  (Gram Mol)



### 3.2. Priprava kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata (serija 1-8)

Polazni spoj za prvu seriju ciljanih spojeva bio je 3-klor-*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid koji je kvaterniziran u reakciji s fenacil-bromidom i supstituiranim fenacil-bromidima (**Shema 3.**). U teflonsku posudu je stavljen prethodno izvagan polazni 3-klor-*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid (5 mmola), odgovarajući fenacil-bromid (5 mmola) i natrijev hidrogenkarbonat (5 mmola). U posudicu sa reaktantima pipetom je dodano 2 mL acetona. U teflonsku posudicu stavljeno je 20 čeličnih kuglica i sadržaj posudice miješan je pri frekvenciji 30 Hz četiri sata na vibracijskom mlinu. Tijekom četverosatne sinteze u mlinu, svakih sat vremena pratio se tijek reakcije TLC kromatografijom uz smjesu otapala kloroform : metanol u omjeru 6:1. Nakon 4 sata u posudicu je dodano 50 mL acetona, sadržaj oprezno preliven u čašu da se odvoje čelične kuglice. Dobiveni produkt iz reakcijske smjese odvojen je vakuum filtracijom, ispran metanolom te potom stavljen na sušenje u eksikator. Nakon sušenja dobivenim produktima određeno je talište i struktura potvrđena snimanjem spektra masa.



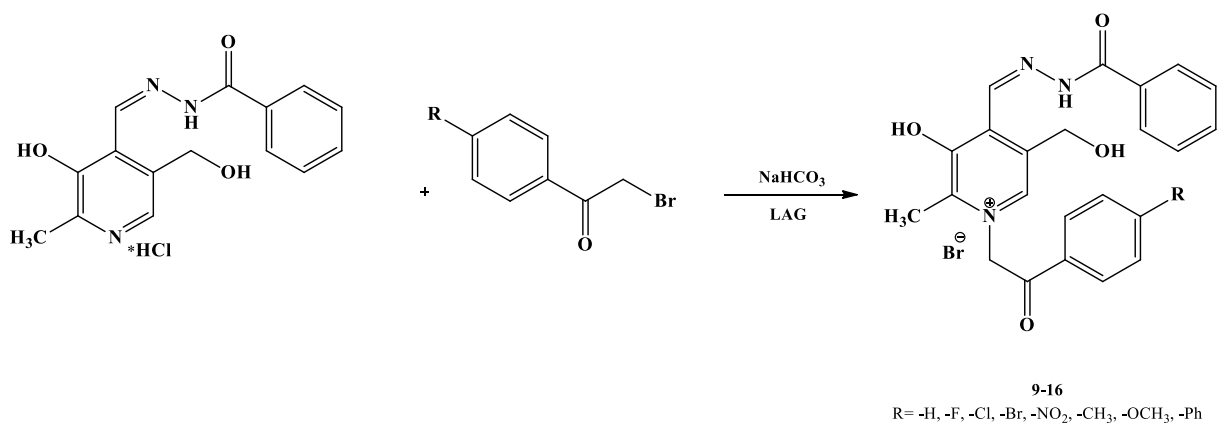
**Shema 3.** Reakcija priprave kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata **1-8**.

**Tablica 1.** Količina upotrijebljenih reaktanata za sintezu kvaternih soli **1-8**.

Reaktanti	n / mol	M / gmol <sup>-1</sup>	m / gram
3-klor- <i>N'</i> -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid	0,0005	365	0,178
fenacil-bromid	0,0005	199,05	0,0995
2-brom-4'-fluoracetofenon	0,0005	217,04	0,1085
2-brom-4'-kloracetofenon	0,0005	233,49	0,1160
2, 4'-dibromacetofenon	0,0005	274,97	0,1314
2-brom-4'-nitroacetofenon	0,0005	244,04	0,1220
2-brom-4'-metilacetofenon	0,0005	213,08	0,1065
2-brom-4'-metoksiacetofenon	0,0005	229,08	0,1145
2-brom-4'-fenilacetofenon	0,0005	275,14	0,1375

### 3.3. Priprava kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata (serija 9-16)

Polazni reaktant za 2. seriju je *N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid koji stupa u reakciju kvaternizacije sa fenacil-bromidom i supstituiranim fenacil-bromidima. Postupak pripreve koji se koristio bio je jednak kao za pripravu serije spojeva **1 – 8 (Shema 4.)**.



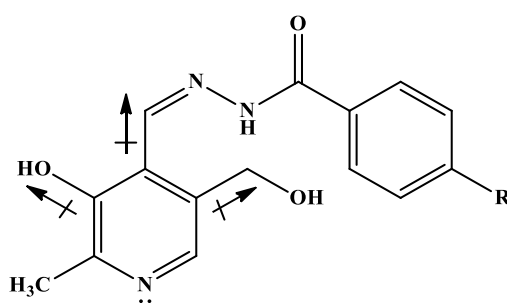
**Shema 4.** Shema reakcije pripreve kvaternih soli *N*-acilhidrazonskih derivata (serija 9-16).

**Tablica 2:** Količina upotrijebljenih reaktanata za sintezu kvaternih soli (serija 9-16).

Reaktanti	n / mol	M / gmol <sup>-1</sup>	m / gram
<i>N'</i> -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid	0,0005	321,05	0,1608
fenacil-bromid	0,0005	199,05	0,0995
2-brom-4'-fluoracetofenon	0,0005	217,04	0,1085
2-brom-4'-kloracetofenon	0,0005	233,49	0,1160
2, 4'-dibromacetofenon	0,0005	274,97	0,1314
2-brom-4'-nitroacetofenon	0,0005	244,04	0,1220
2-brom-4'-metilacetofenon	0,0005	213,08	0,1065
2-brom-4'-metoksiacetofenon	0,0005	229,08	0,1145
2-brom-4'-fenilacetofenon	0,0005	275,14	0,1375

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog rada bio je sintetizirati nove kvaterne soli derivate *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksal hidroklorida. Ranija istraživanja su pokazala da se ciljane kvaterne soli teško mogu pripremiti konvencionalnom sintezom, sinteza u acetonu pri temperaturi refluksa. Samo su dva spoja od ciljane serije spoja **1-16** priređena konvencionalnom metodom uz vrlo malo iskorištenje [33]. Pretpostavljeno je da skupine prisutne na piridinskom prstenu svojim negativnim induktivnim efektom odvlače elektronsku gustoću i na taj način smanjuju nukleofilnost dušika i otežavaju reakciju fenacil-bromidima (**Slika 9**).



**Slika 9.** Induktivni efekt skupina na piridinskom prstenu.

Umjesto konvencionalne sinteze ciljane spojeve **1-16** pokušalo se pripremiti mehanokemijskom sintezom. Polazne sirovine *N*-acilhidrazonski derivati piridoksal hidroklorida, fenacil-bromid ili supstituirani fenacil bromidi (R= -F, -Cl, -Br, -NO<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Ph) i natrijev hidrogenkarbonat stavljeni su u teflonske posudice u koje je potom dodano 2 mL acetona te je sadržaj miješan na vibracijskom mlinu 4 sata. Praćenjem tijekom reakcije tankoslojnom kromatografijom, nastanak produkta je bio vidljiv već nakon 60 minuta. U **tablicama 3. i 4.** prikazane su kemijske formule nosintetiziranih spojeva kao i njihove molarne mase, tališta i iskorištenja. U **tablici 5.** prikazana je usporedba iskorištenja produkata prve i druge serije. Na **slikama 10. - 25.** prikazani su MS spektri masa nosintetiziranih spojeva, u pozitivnom ili negativnom modu.

**Tablica 3.** Iskorištenja reakcija sinteze kvaternih soli **1-8**.

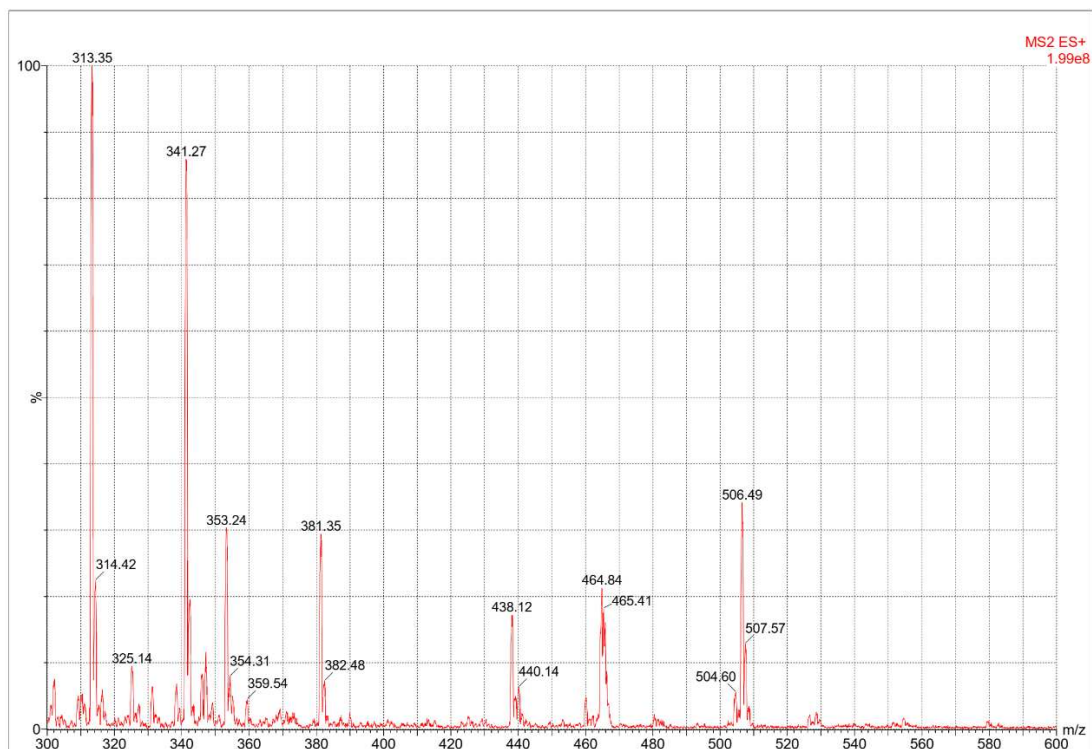
Spoj	Kemijska formula	M / gmol <sup>-1</sup>	M (-Br) / gmol <sup>-1</sup>	t <sub>i</sub> / °C	Iskorištenje / %
<b>1</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	518,79	438,88	230 – 235 (karbonizacija)	13,61
<b>2</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	536,78	456,87	225 – 230 (karbonizacija)	17,54
<b>3</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	553,23	473,33	218 – 225 (karbonizacija)	21,84
<b>4</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub>	597,68	517,78		19,40
<b>5</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Br	563,97	438,88	220 – 223 (karbonizacija)	14,07
<b>6</b>	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	532,81	452,91	-	2,70
<b>7</b>	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Br	548,81	468,91	-	29,77
<b>8</b>	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	594,88	514,98	-	23,87

**Tablica 4.** Iskorištenja reakcija sinteze kvaternih soli **9-16**.

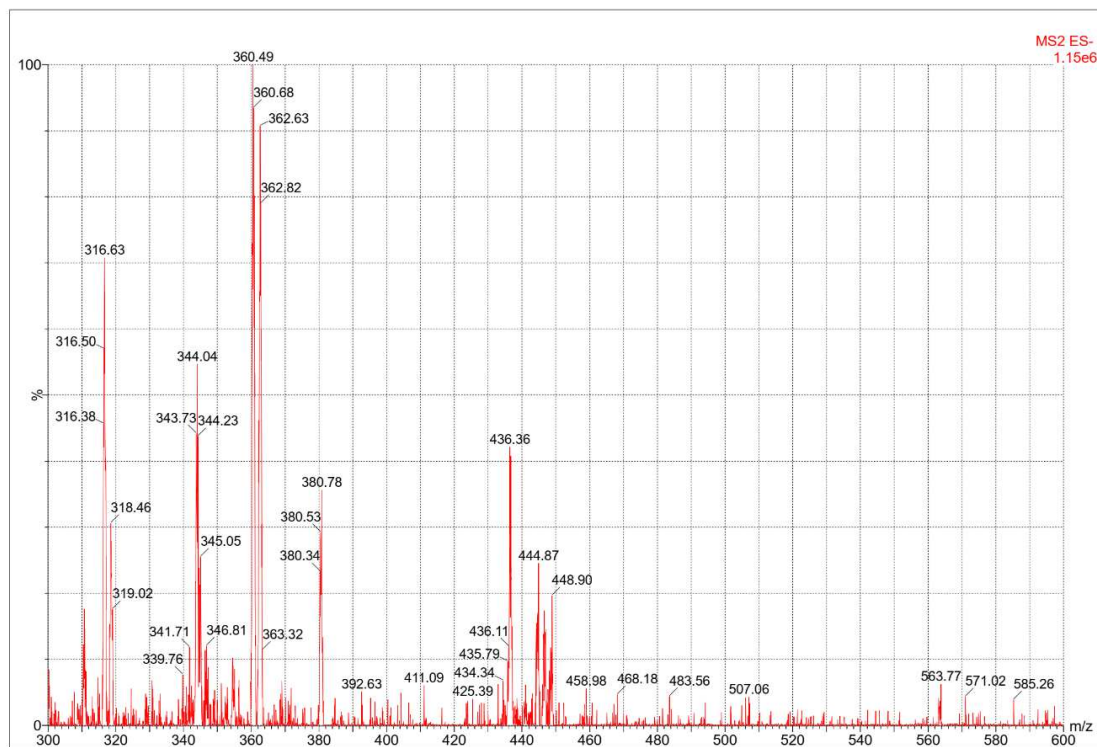
Spoj	Kemijska formula	M / gmol <sup>-1</sup>	M (-Br) / gmol <sup>-1</sup>	Iskorištenje / %
<b>9</b>	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	483,34	404,44	17,42
<b>10</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	502,33	422,43	10,32
<b>11</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	518,79	438,88	20,63
<b>12</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub>	563,24	483,33	14,77
<b>13</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Br	529,34	449,44	10,81
<b>14</b>	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	498,37	418,46	22,63
<b>15</b>	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Br	516,38	434,46	12,65
<b>16</b>	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br	560,44	480,53	1,17

**Tablica 5.** Usporedbe iskorištenja s obzirom na skupine na benzenskoj jezgri.

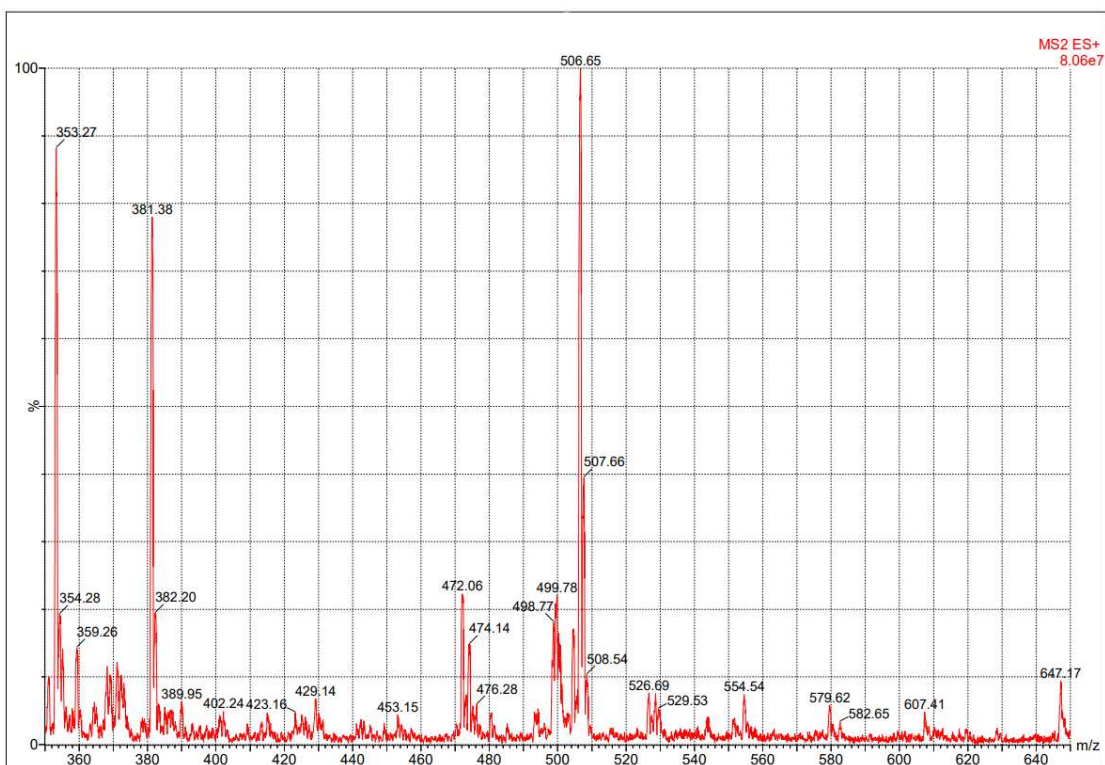
Suptituent	Iskorištenja u seriji 1 – 8 (%)	Iskorištenja u seriji 9 – 16 (%)
-H	13,61	17,42
-F	17,54	10,32
-Cl	21,84	20,63
-Br	19,40	14,77
-NO <sub>2</sub>	14,07	10,81
-CH <sub>3</sub>	2,70	22,63
-OCH <sub>3</sub>	29,77	12,65
-Ph	23,87	1,17



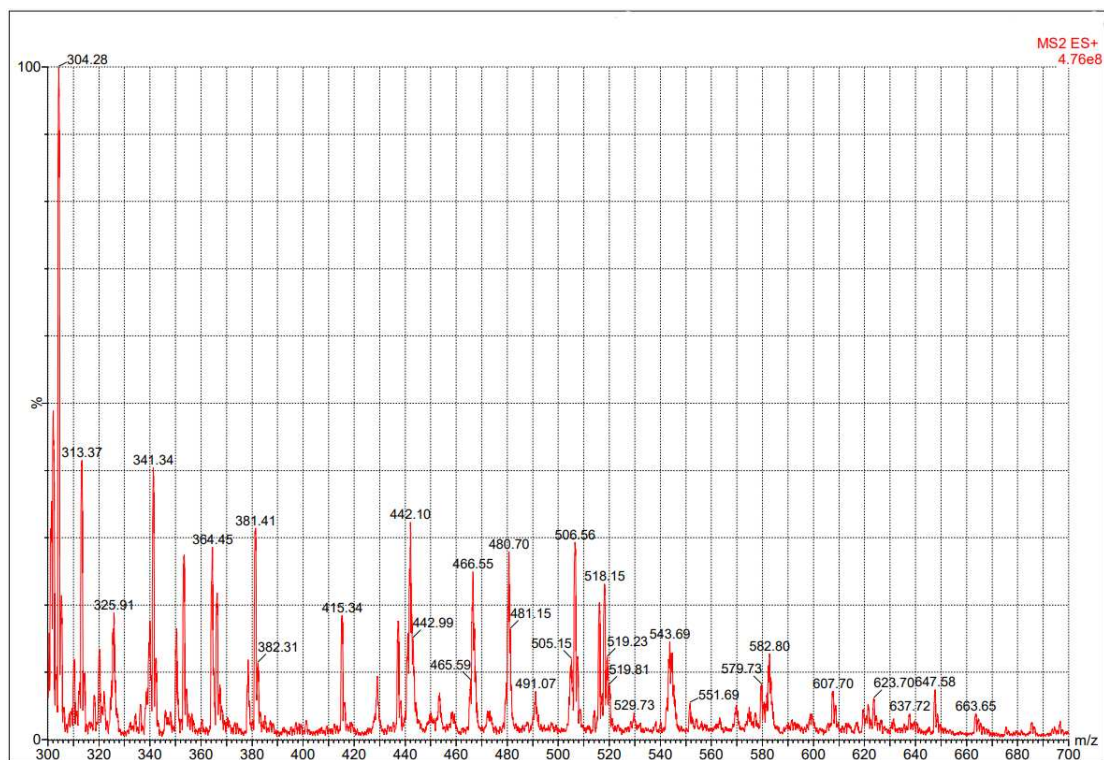
**Slika 10.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-feniletil)piridinjev bromid (**1**).



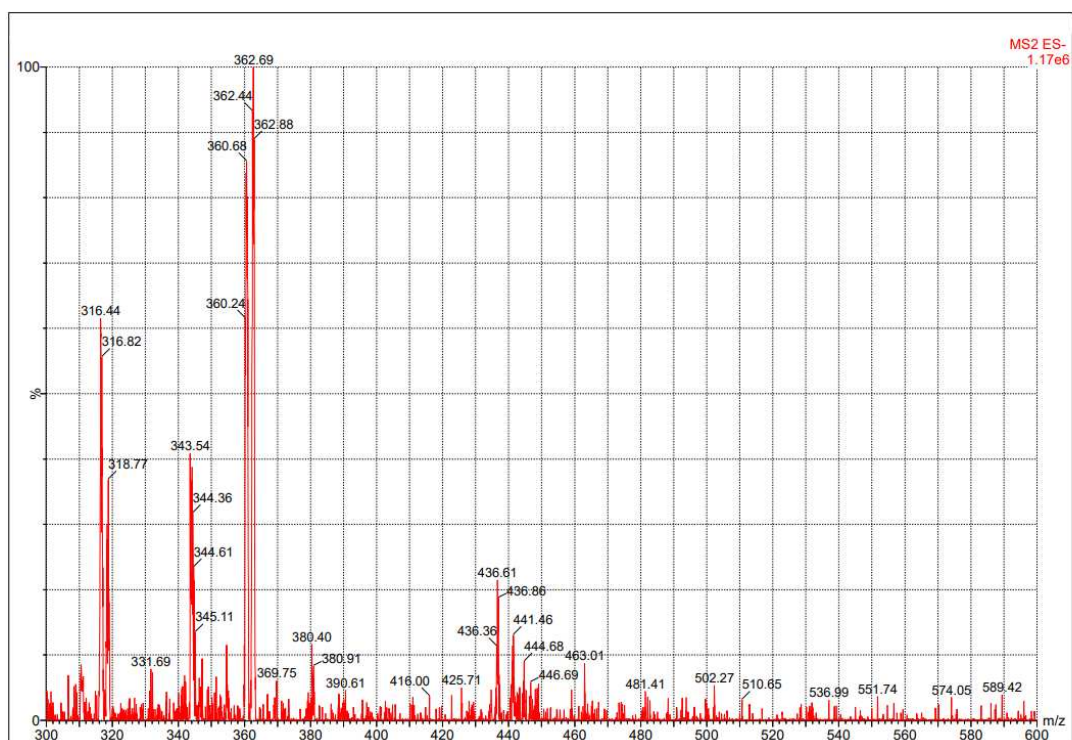
**Slika 11.** MS spektar negativen mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-feniletil)piridinjev bromid (**2**).



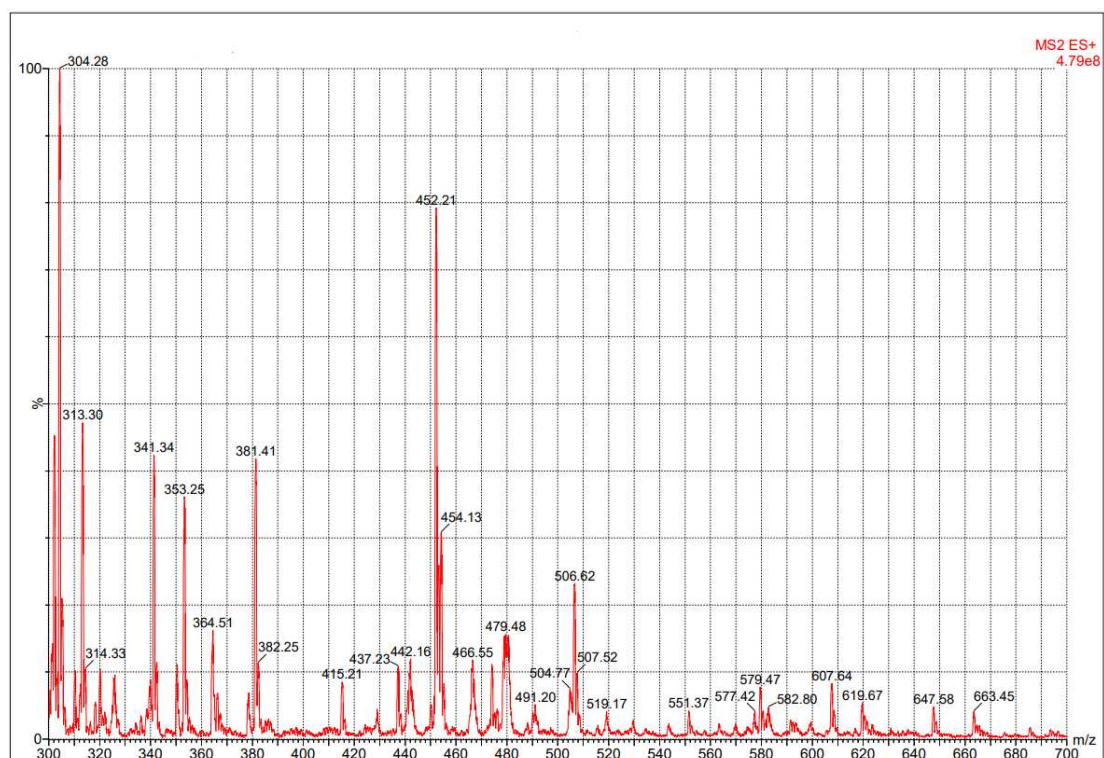
**Slika 12.** MS spektar negativni mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-1-(2-(4-fluorofenil)-2-oksoetil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridinijev bromid-1bromid (**3**).



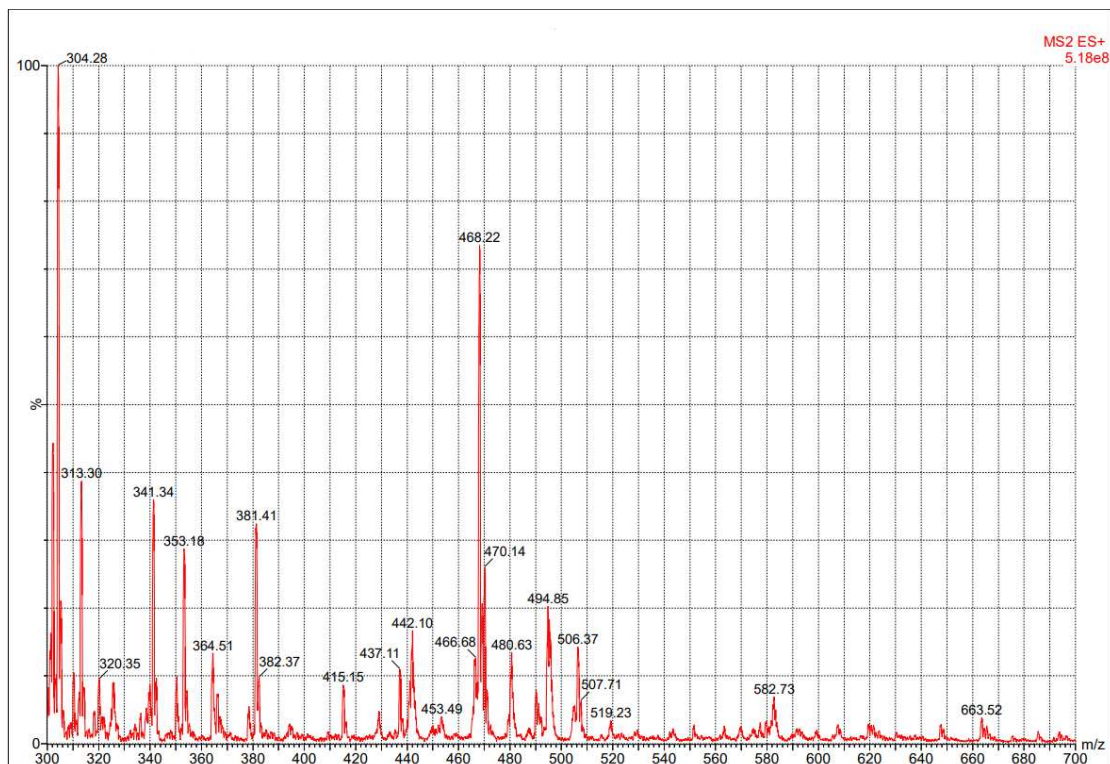
**Slika 13.** MS spektar pozitivni mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-1-(2-(4-klorfenil)-2-oksoetil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridinijev bromid (**4**).



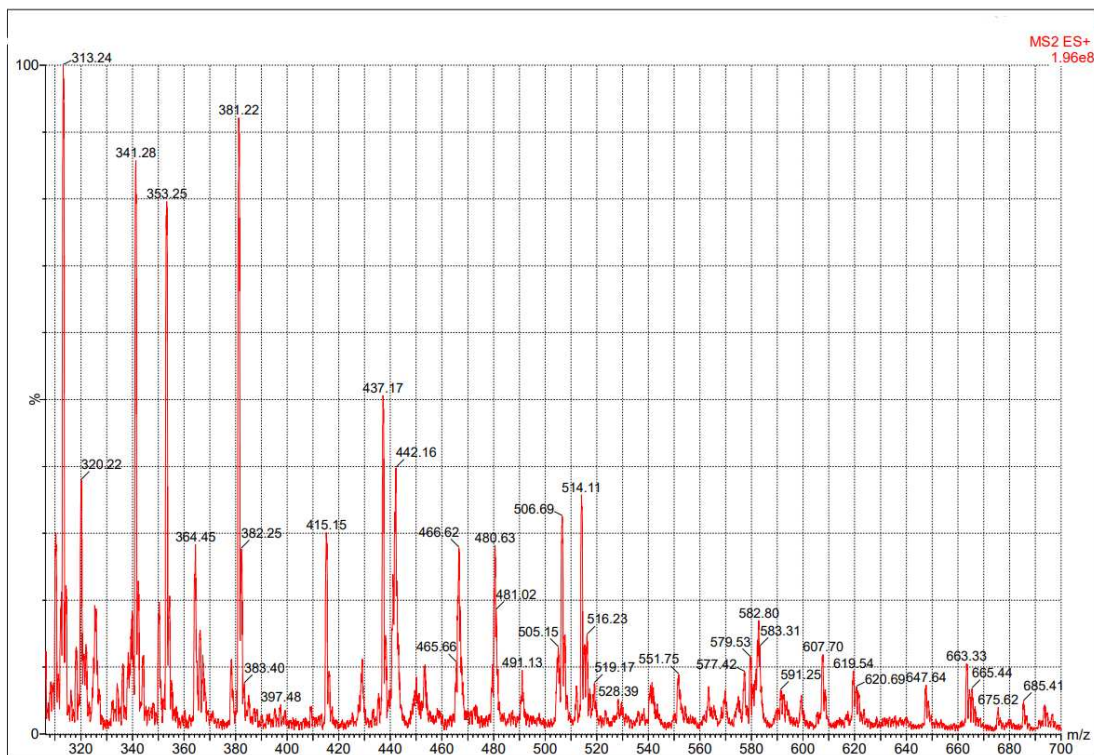
**Slika 14.** MS spektar negativan mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoilb)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridin bromid (**5**).



**Slika 15.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazonom)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-(p-tolil)etil)piridinijev bromid (**6**).

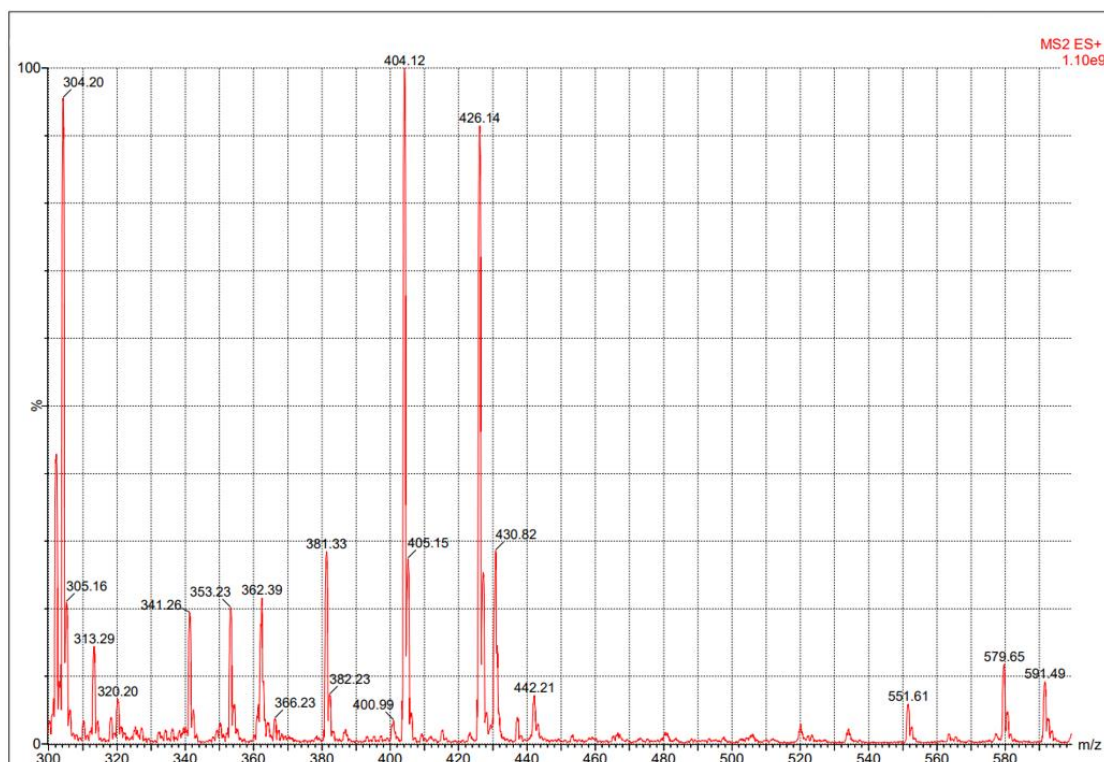


**Slika 16.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-1-(2-(4-metoksifenil)-2-oksoetil)-2-metilpiridinijev bromid (**7**).

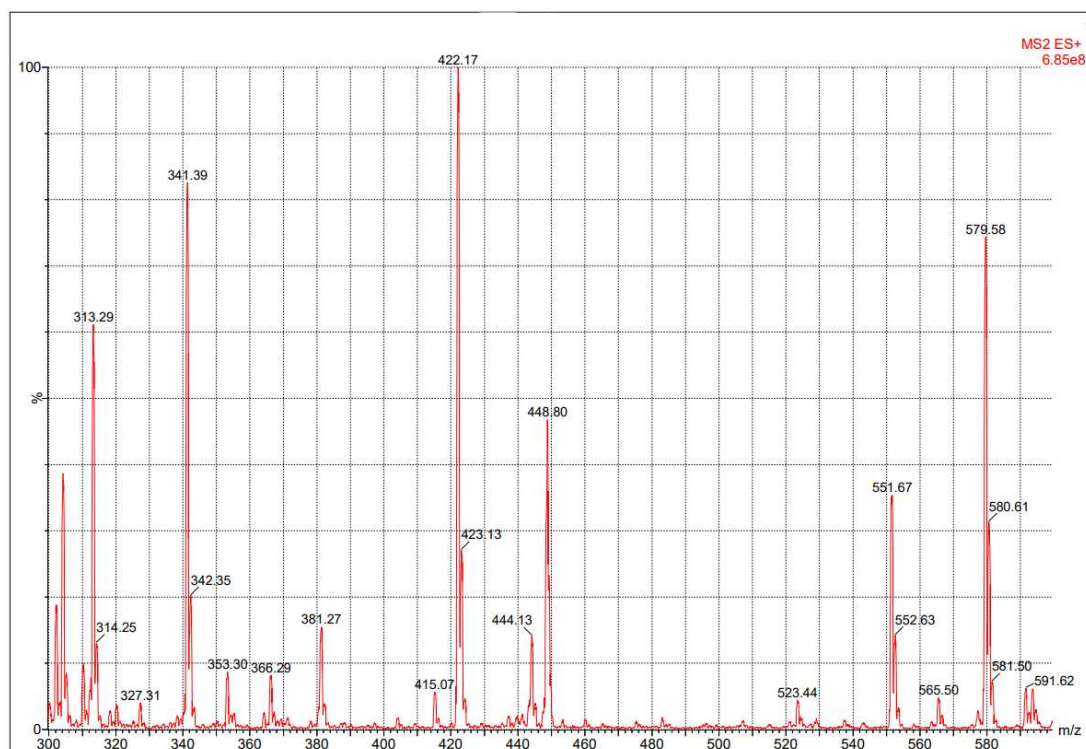


**Slika 17.** MS spektar pozitivan mod spoja 1-(2-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oksoetil)-4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridinijev bromid (**8**).

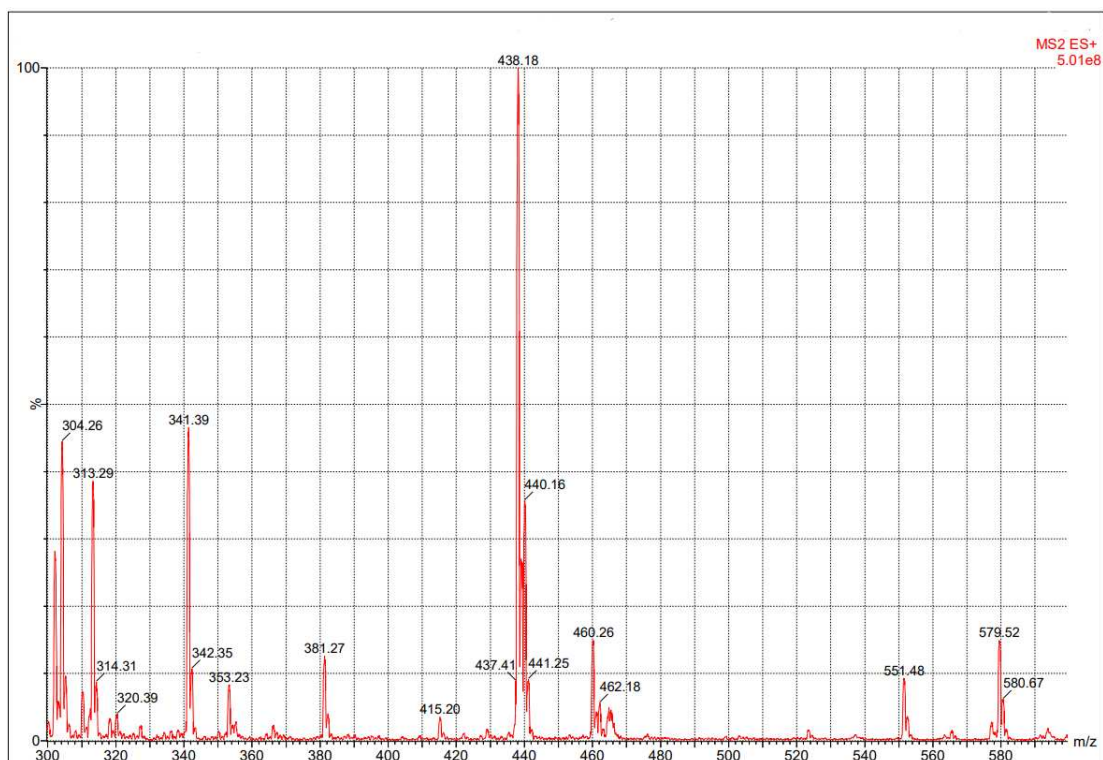




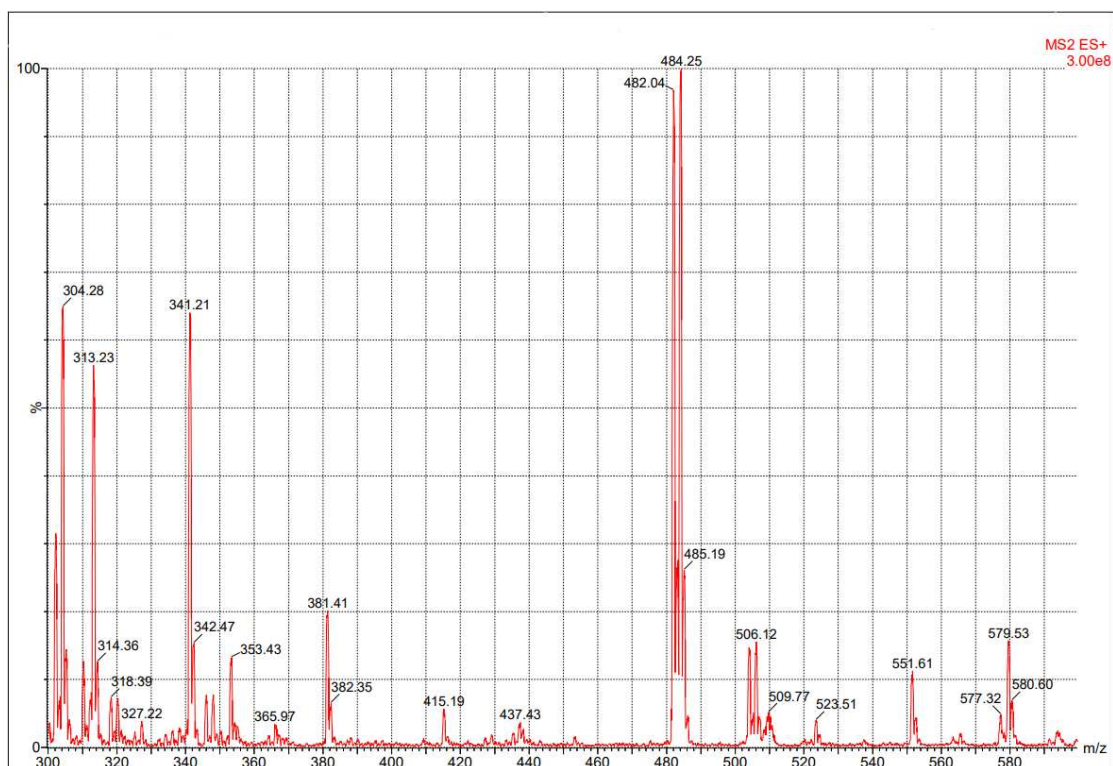
**Slika 18.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-oko-2-feniletil)piridinijev bromid (**9**).



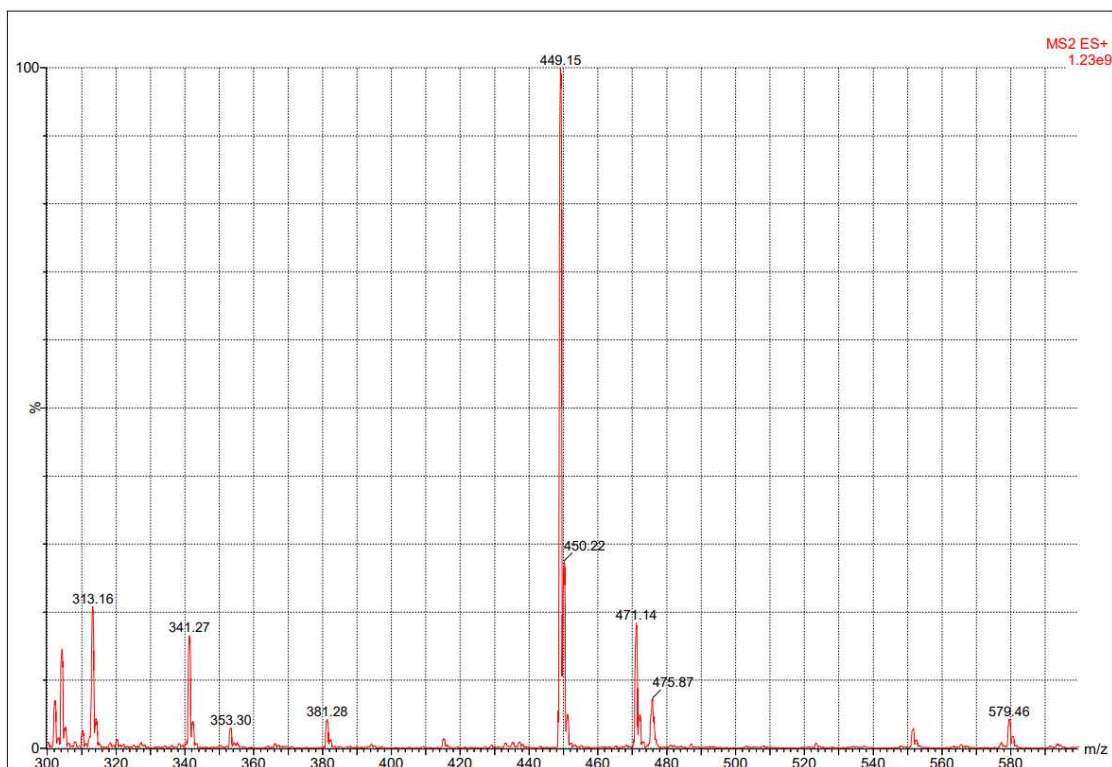
**Slika 19.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-oko-2-feniletil)piridinijev bromid (**10**).



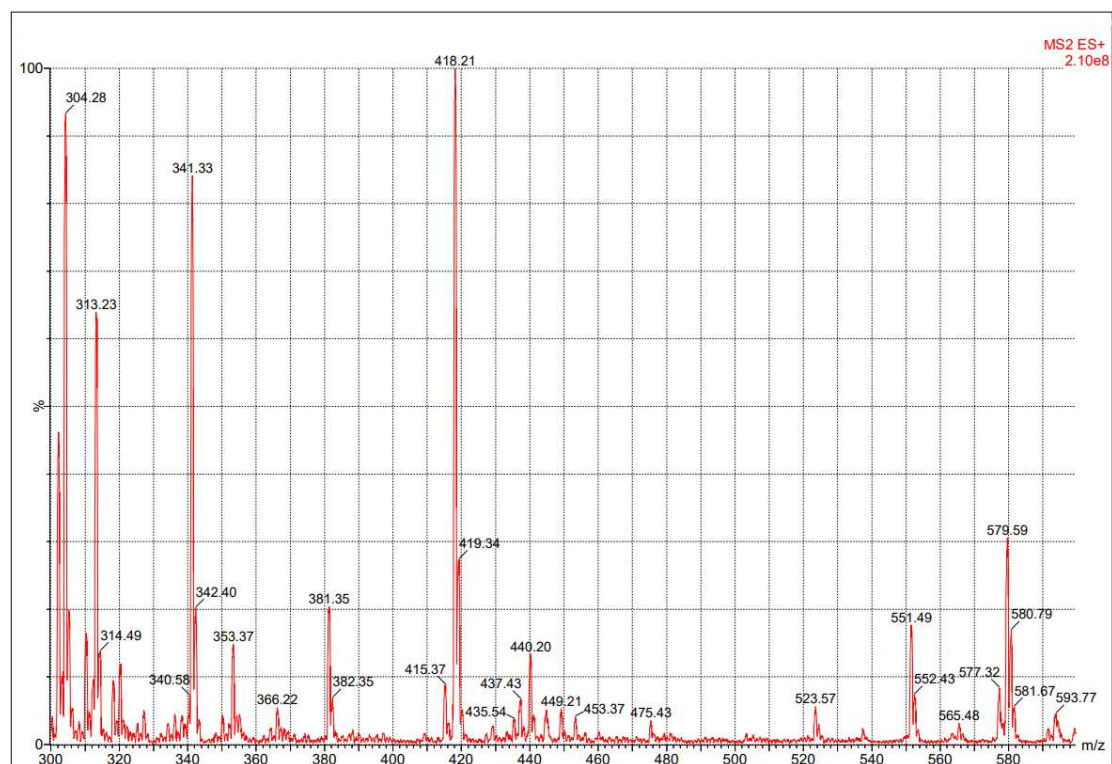
Slika 20. MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-1-(2-(4-klorfenil)-2-okoetil)-3-hidroksi-5-(hidrokismetil)-2-metilpiridinijev bromid (**11**).



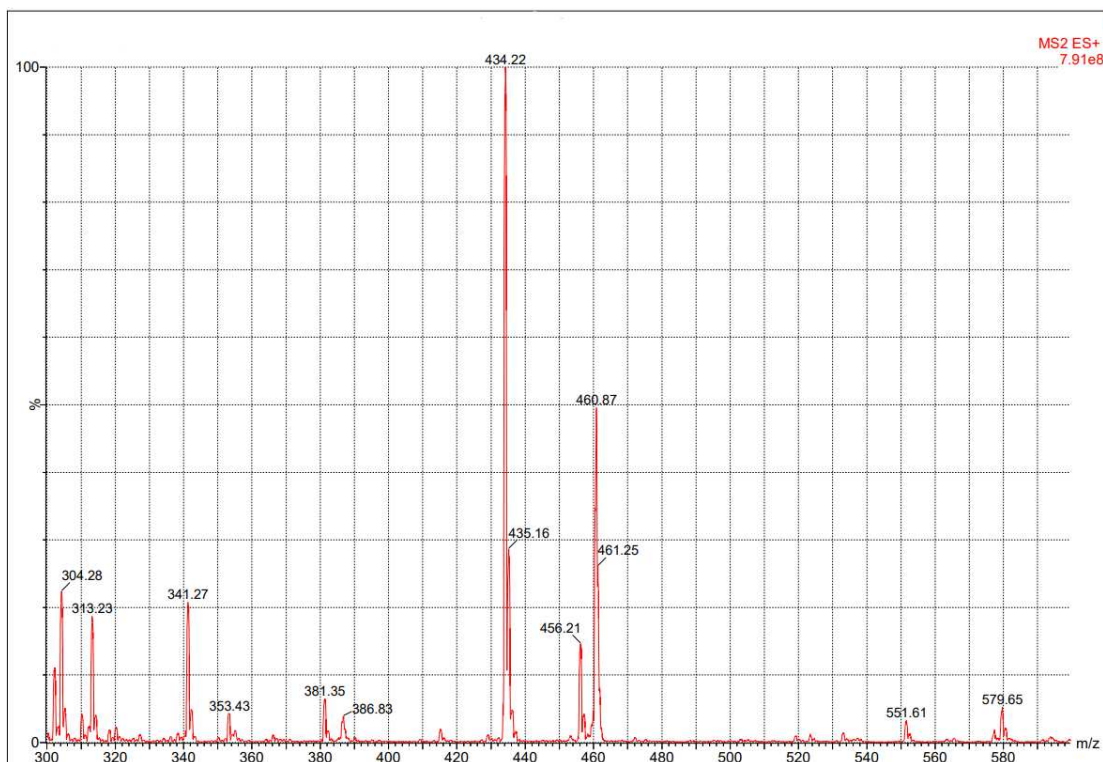
Slika 21. MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)me)-1-(2-(4-klorfenil)-2-okoetil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridinijev bromid (**12**).



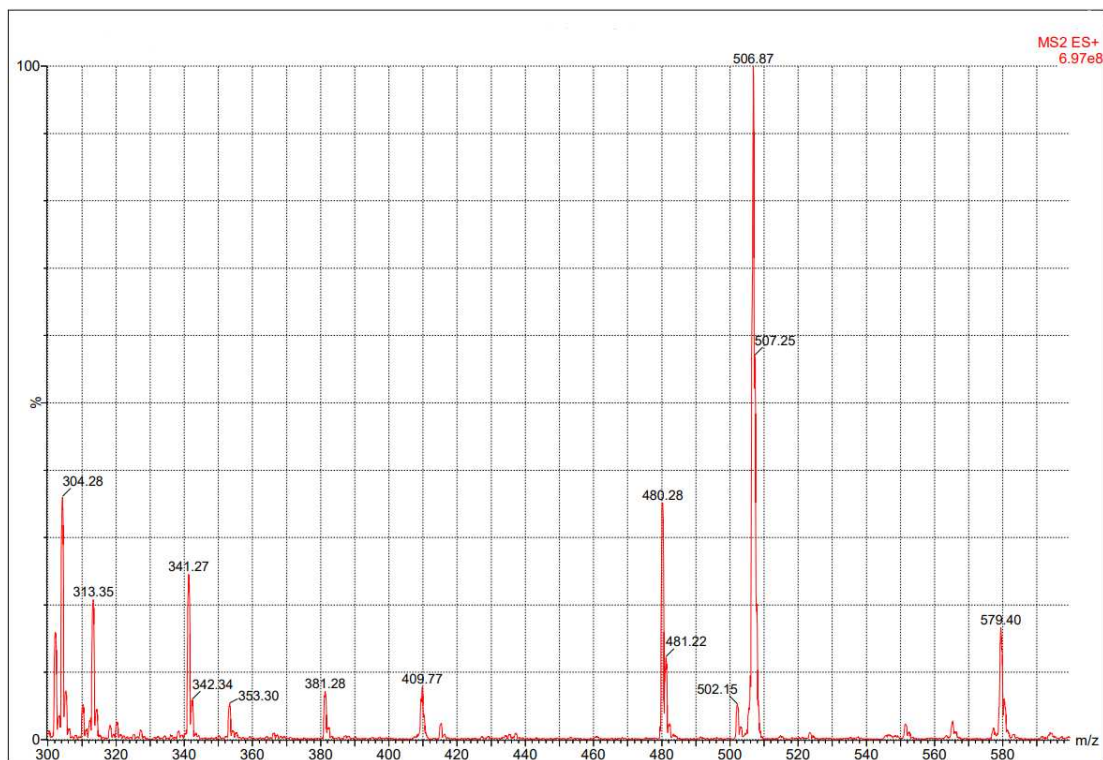
**Slika 22.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid (**13**).



**Slika 23.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-(p-tolil)etil)piridinijev bromid (**14**).



**Slika 24.** MS spektar pozitivan mod spoja 4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-1-(2-(4-metoksifenil)-2-okoetil)-2-metilpiridinijev bromid (**15**).



**Slika 25.** MS spektar pozitivan mod spoja 1-(2-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oksoetil)-4-((2-benzoilhidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridinijev bromid (**16**).

Topljivost je ključan fizikalno-kemijski parametar u farmaceutskoj industriji, posebno kada se biraju spojevi za razvoj novih lijekova. Topljivost u vodi igra značajnu ulogu u ADMET svojstvima, uključujući apsorpciju lijeka, njegovu distribuciju u organizmu i bioraspoloživost. ADMET je akronim koji se koristi u farmakokinetici i farmakologiji za označavanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti te opisuje kako se farmaceutski spoj ponaša unutar organizma. Također, u fazi ispitivanja spojeva, topljivost je presudna jer netopljivost i agregacija molekula često dovode do neuspjeha u ranim fazama istraživanja potencijalnih lijekova. Zbog toga se procjena topljivosti provodi već u početnim fazama otkrivanja lijeka. U programu SwissAdme izračunata su ADME, farmakokinetička i svojstva slična lijekovima za spojeva **1-8** [24].

**Tablica 6.** ADME izračunate vrijednosti, farmakokinetička i svojstva slična lijekovima spojeva **1-8**.

Spoj	Csp <sup>3</sup>	RB	HBA	HBD	TPSA	XLOGP3	MLOGP	ESOL Log S	Topljivost u vodi	GIA	BBBP	PgpS	LR
<b>1</b>	0.13	8	5	3	102.87	3.19	1.73	-4.47	umjerena	visoka	ne	da	da (0)
<b>2</b>	0.13	8	6	3	10.87	3.29	2.11	-4.63	umjerena	visoka	ne	da	da (0)
<b>3</b>	0.13	8	5	3	102.87	3.82	2.21	-5.07	umjerena	visoka	ne	da	da (0)
<b>4</b>	0.13	8	5	3	102.87	3.88	2.34	-5.38	umjerena	visoka	ne	da	da (1)
<b>5</b>	0.13	9	7	3	148.69	3.02	0.88	-4.54	umjerena	niska	ne	ne	da (0)
<b>6</b>	0.17	8	5	3	102.87	3.56	1.94	-4.78	umjerena	visoka	ne	da	da (0)
<b>7</b>	0.17	9	6	3	112.10	3.16	1.42	-4.55	umjerena	visoka	ne	da	da (0)
<b>8</b>	0.10	9	5	3	102.87	4.82	2.73	-5.96	umjerena	visoka	ne	da	da (1)

**Legenda:**\*MW (molekularna masa, g/mol), Csp<sup>3</sup> (udio ugljikovih atoma u sp<sup>3</sup> hibridizaciji), RB (broj rotirajućih veza), HBA (broj akceptora vodikove veze), HBD (broj donora vodikove veze), TPSA (topološka polarna površina), XLOGP3 i MLOGP (deskriptori lipofilnosti), ESOL Log S (logaritam molarne topljivosti u vodi), topljivost u vodi (klasa topljivosti prema Log S ljestvici), GIA (apsorpcija u gastrointestinalnom traktu), BBBP (prolaznost kroz krvno-moždanu barijeru), PgpS (P-glikoproteinski supstrat) (ako je "da", može se eliminirati iz moždanih stanica), LR (broj kršenja Lipinskog pravila).

Za spojeve **1-8** računalno je određena mogućnost daljnjeg razvoja kao potencijalnog lijeka (Leadliability). Spojevi prolaze kroz želučanu barijeru, ali ne mogu prijeći iz krvi u mozak, što je pogodno za lijekove koji nisu namijenjeni djelovanju na središnji živčani sustav (CNS). Ako su namijenjeni za djelovanje na CNS, takvo svojstvo je nepovoljno. Nijedan spoj se ne može

izdvojiti kao vodeći za daljnji razvoj lijekova zato što svi imaju molekulsku masu veću od 350, a neki su izrazito lipofilni. Osim topljivosti, značajna informacija za svaku molekulu je i toksičnost koja je za spojeve 1-8 računalno određena.

- **Spoj 1** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka toksičnost (klasa III). Molekule koje sadrže ove podstrukture mogu biti toksične. Lijek-inducirana oštećenje jetre. Molekule koje sadrže ove podstrukture mogu biti ne-biorazgradive.
- **Spoj 2** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka toksičnost (klasa III). Ljudska hepatotoksičnost. Lijek-inducirana oštećenje jetre. Umjerena kancerogenost. Negenotoksična kancerogenost. Osjetljivost kože. Toksičnost za vodeni okoliš. Ne-biorazgradiva.
- **Spoj 3** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka toksičnost (Klasa III). Ljudska hepatotoksičnost. Lijek-inducirana oštećenje jetre. Umjerena kancerogenost. Negenotoksična kancerogenost.
- **Spoj 4** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka toksičnost (Klasa III). Ljudska hepatotoksičnost. Lijek-inducirana ozljeda jetre. Umjerena kancerogenost. (jedna strukturna značajka). Negenotoksična kancerogenost. (2 strukturne značajke).
- **Spoj 5** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka (Klasa III). Ljudska hepatotoksičnost. Lijek-inducirana ozljeda jetre. Mutageni učinak. Kancerogenost. Umjerena toksičnost za dišne puteve.
- **Spoj 6** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka (Klasa III). Lijek-inducirana ozljeda jetre. Visoka kancerogenost. Genotoksična kancerogenost. Negenotoksična kancerogenost. Toksičnost za vodeni okoliš. Osjetljivost kože. Ne-biorazgradiva.
- **Spoj 7** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka (Klasa III). Lijek-inducirana ozljeda jetre. Visoka kancerogenost. Negenotoksična kancerogenost. Toksičnost za vodeni okoliš. Osjetljivost kože. Ne-biorazgradiva.
- **Spoj 8** - sadrži funkcijske skupine povezane s povećanom toksičnošću. Visoka (Klasa III). Ljudska hepatotoksičnost. Lijek-inducirana ozljeda jetre. Umjerena kancerogenost. Genotoksična kancerogenost. Negenotoksična kancerogenost. Toksičnost za vodeni okoliš. Osjetljivost kože. Ne-biorazgradiva.

## 5. ZAKLJUČCI

- ✓ Eksperimentalni rad imao je za cilj sintezu novih kvaternih soli derivata *N*-acilhidrazonskih spojeva piridoksal hidroklorida. Ranija istraživanja pokazala su da konvencionalna metoda sinteze, pri refluksu u acetonu, nije bila dovoljno efikasna za ovu seriju spojeva, što se očitovalo kroz niska iskorištenja. Samo su dva spoja iz serije sintetizirana uz vrlo niska iskorištenja konvencionalnom sintezom.
- ✓ Alternativna metoda, mehanokemijska sinteza, isprobana je s ciljem poboljšanja učinkovitosti. Ova metoda je pokazala veću efikasnost, s prvim tragovima produkata zabilježenim već nakon 60 minuta, a različiti spojevi imali su različita iskorištenja, koja su varirala ovisno o supstituentima na benzenskoj jezgri.
- ✓ Iskorištenja sinteza prve serije spojeva **1-8** kretala su se između 2,70 i 29,77 %.
- ✓ Iskorištenja sinteza druge serije spojeva **9-16** kretala su se između 1,17 i 22,63 %.
- ✓ Proučena je i topljivost spojeva u vodi, ključan parametar u farmaceutskoj industriji zbog njegovog utjecaja na ADMET svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost). Spojevi **1-8** su pokazali umjerenu topljivost, što ih čini potencijalnim kandidatima za daljnja istraživanja. Međutim, zbog njihove visoke molekularne mase i lipofilnosti, nijedan spoj nije izdvojen kao idealan za razvoj lijekova.
- ✓ Također, ispitani su toksični profili sintetiziranih spojeva te je većina pokazala potencijalno visok rizik od toksičnosti, uključujući hepatotoksičnost, kancerogenost i toksičnost za okoliš. Ovi rezultati ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se smanjila toksičnost i poboljšala farmakokinetička svojstva spojeva.
- ✓ Ukupno gledajući, mehanokemijska sinteza pokazala se kao bolja metoda u odnosu na konvencionalnu sintezu za ovu seriju spojeva, no daljnje optimizacije i ispitivanja bit će potrebne kako bi se poboljšale karakteristike spojeva za farmaceutske primjene.
- ✓ Strukture novosintetiziranih spojeva su potvrđene masenom spektroskopijom.

## 6. LITERATURA

1. P. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* 301 – 312.
2. B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. G. Tótolí, A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado, Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J.*, **2019**, *27(1)*, 1 – 8.
3. J. Isac-García, J. A. Dobado, F. G. Calvo-Flores, H. Martínez-García, *Experimental Organic Chemistry: Laboratory Manual*, Amsterdam, Elsevier, **2015**. p. 412.
4. P. Ying, J. Yu, W. Su, Liquid-Assisted Grinding Mechanochemistry in the Synthesis of Pharmaceuticals. *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363* (5), 1246 – 1271.
5. J. G. Hernández, T. Frišćić, Metal-catalyzed organic reactions using mechanochemistry. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (29), 4253-4265.
6. L. Takacs, The historical development of mechanochemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 7649-7659.
7. F. Cuccu, L. De Luca, F. Delogu, E. Colacino, N. Solin, R. Mocci, A. Porcheddu, Mechanochemistry: New Tools to Navigate the Uncharted Territory of “Impossible” Reactions. *ChemSusChem.* **2022**, *15*, e202200362 (1 – 41).
8. D. Hasa, W. Jones, Screening for new pharmaceutical solid forms using mechanochemistry: A practical guide. *Adv Drug Deliv Rev.* **2017**, *117*, 147 – 161.
9. <https://www.medicalexpo.com/prod/anton-paar/product-94325-840457.html>  
(23. 9.2024.)
10. S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, T. Frišćić, F. Grepioni, K. D. M. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. G. Orpen, I. Parkin, W. C. Shearousw, J. Steed, D. C. Waddell, Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 413 - 447.
11. T. Frišćić, W. Jones, Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (3), 1621 – 1637.
12. T. Frišćić, S. L. Childs, S. A. A. Rizvi, W. Jones, The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *CrystEngComm*, **2009**, *11*, 418 – 426.
13. J. Rosenberg, T. Ischebeck, F. M. Commichau, Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnol Adv.* **2016**, *35* (1), 31 – 40.



14. H. Hellmann, S. Mooney, Vitamin B6: a molecule for human health?. *Molecules*, **2010**, *15* (1), 442 – 459.
15. J. Chawla, D. Kvarnberg, Hydrosoluble vitamins. *Handb Clin Neurol*. **2014**, *120*, 891 - 914.
16. Y. G. Shtyrlin, A. S. Petukhov, A. D. Strel'nik, N. V. Shtyrlin, A. G. Iksanova, M. V. Pugachev, R. S. Pavelyev, M. S. Dzyurkevich, M. R. Garipov, K. V. Balaki, Chemistry of pyridoxine in drug design. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2019**, *68* (5), 911 – 945.
17. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic chemistry*, Oxford, Oxford University press, **2012**. p. 232.
18. D. Kanzari-Mnallah, S. Salhi, M. Knorr, J.-L. Kirchhoff, C. Strohmam, M. Lotfi Efrif, A. B. Akacha, Synthesis of isomeric  $\beta$ -cycloalkoxyphosphonated hydrazones containing a dioxaphosphorinane ring: Configurational and conformational investigation and molecular docking analysis, *J. Mol. Struct.* **2024**, *1317*, 139035.
19. G. Uppal, S. Bala, S. Kamboj, M. Saini, Therapeutic Review Exploring Antimicrobial Potential of Hydrazones as Promising Lead. *Der Pharma Chemica*. **2011**, *3* (1), 250 – 268.
20. G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam, A review exploring biological activities of hydrazones. *J Pharm Bioall Sci*, **2014**, *6* (2), 69 – 80.
21. X. Su, I. Aprahamian, Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1963-1981.
22. J. T. Edward, M. Gauthler, F. L. Chubb, P. Ponka, Synthesis of New Acylhydrazones as Iron-Chelating Compounds. *J. Chem. Eng. Dana*. **1988**, *33*, 538 – 540.
23. J. L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka, *Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues*, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2002**, *509*, 205 – 529.
24. J. L. Buss, J. Neuzil, P. Ponka, Oxidative stress mediates toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *421*, 1 – 9.
25. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Zagreb, Školska knjiga, **2013**, p. 704.
26. D. Richardson, L. Wis Vitolo, E. Baker, J. Webb, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. *Biol Metals*. **1989**, *2*, 69 – 76.
27. R. Origa,  $\beta$ -Thalassemia. *Genet Med.* **2017**, *19* (6), 609 – 619.
28. D. R. Richardson, P. Polka, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone nad its analogs: potential orally effective iron-chelating agens for the treatment of iron overload disease. *J. Lab Clin Med.* **1998**, *131* (4), 306 – 315.

29. P. Kovaříková, M. Mokrý, J. Klimeš, K. Vávrová, HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 105 – 112.
30. P. Ponka, R. W. Grady, A. Wilczynska, H. M. Schulman, The effect of various chelating agents on the mobilization of iron from reticulocytes in the presence and absence of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1984**, *802* (3), 447 – 489.
31. J. McMurry, *Fundamentals of Organic Chemistry*, Belmont, Brooks/Cole, **2011**, p. 405 – 412.
32. L. G. Wade, *Organska kemija*, Zagreb Školska knjiga, **2017**, p. 882 – 885.
33. A. Horvat, Sinteza kvaternih soli *N*-acihidrazinskih derivata heterocikličkih spojeva, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2023.
34. <http://www.swissadme.ch/about.php> (23. 9. 2024.)