

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Lucija Krišto i Ivana Križić

**SINTEZA NOVIH KINUKLIDINIJEVIH SPOJEVA KAO MOGUĆIH POVRŠINSKI
AKTIVNIH TVARI**

Zagreb, 2015.

Ovaj je rad izrađen u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ines Primožič i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujemo dr. sc. Ines Primožič na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju prilikom izrade eksperimentalnog dijela te na susretljivosti, pomoći i stručnim savjetima pri pisanju ovog rada. Također, veliko hvala na neprocjenjivom iskustvu i suradnji.

Zahvaljujemo dr. sc. Dariji Jurašin i dr. sc. Zoranu Štefaniću s Instituta Ruđer Bošković na određivanju termičkih svojstva i kristalnih struktura spojeva te pomoći oko prezentacije rezultata. Također, hvala izv. prof. dr. sc. Mirjani Skočibušić, PMF, Split na određenoj antibakterijskoj aktivnosti.

Zahvaljujemo jedna drugoj na prijateljstvu, motivaciji i strpljenju.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. STRUKTURA I SVOJSTVA KINUKLIDINA	2
2.2. SINTEZE OKSIMA	4
2.2.1. Mehanokemijske sinteze oksima.....	5
2.3. POVRŠINSKI AKTIVNE TVARI.....	9
2.3.1. Svojstva i podjela površinskih aktivnih tvari.....	9
2.3.2. Termička svojstva PAT	11
2.3.3. Kationske PAT	12
2.3.4. Derivati azabicikličkih spojeva kao PAT	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. OPĆE NAPOMENE	17
3.2. PRIPRAVA SPOJEVA.....	18
3.2.1. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidinijevog klorida (1).....	18
3.2.2. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidina (2).....	18
3.2.3. Priprava 1-metil-3-oksokinuklidinijevog klorida (3).....	19
3.2.4. Priprava 3-hidroksiimino-1-metilkinuklidinijevog klorida (4).....	20
3.2.4. Priprava <i>N</i> -dodecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (5).....	20
3.2.5. Priprava <i>N</i> -tetradecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (6)	21
3.2.6. Priprava <i>N</i> -heksadecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (7)	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. PRIPRAVA SPOJEVA.....	23
4.1.1. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidina	23
4.1.2. Kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina.....	28
4.1.4. Kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina kao površinski aktivne tvari..	31
4.1.5. Antibakterijski potencijal novih spojeva	33
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURNI IZVORI.....	36

1. UVOD

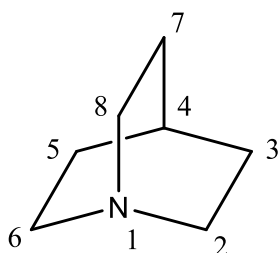
Veliki broj prirodnih i sintetskih supstancija koje su fiziološki aktivne u svojoj strukturi sadrže heterociklički sustav kinuklidina (1-azabicyklo[2,2,2]oktan) pa su pripremljeni i izučavani brojni derivati kinuklidina radi pronalazjenja novih lijekova. Među njima su redovito derivati sa supstituentima na položaju tri kinuklidinskog prostena kao što je i 3-hidroksiiminokinuklidin i njegovi derivati koji su poznati kao spojevi koji imaju muskarinsku ili antimuskarinsku aktivnost.

Cilj ovog rada bila je sinteza 3-hidroksiiminokinuklidina te njegova kvaternizacija s alifatskim lancima koji imaju 12, 14 i 16 ugljikovih atoma, a koji nisu do sada opisani u literaturi. Za ovakve spojeve koji imaju hidrofilni (kinuklidinijska jedinica) i hidrofobni dio (alifatski lanac) očekuje se da će se ponašati kao površinski aktivne tvari i u vodenoj otopini stvarati micelle. Nadalje, ovakav tip kationskih surfaktanata poznat je i po antibakterijskim svojstvima, pa je istražena i njihova moguća primjena u tu svrhu.

2. LITERATURNI PREGLED

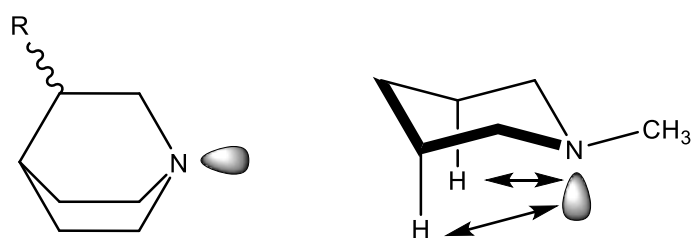
2. 1. STRUKTURA I SVOJSTVA KINUKLIDINA

Kinuklidin, 1-azabicyklo[2.2.2]oktan, je zasićen biciklički sustav s dušikovim atomom u premoštenju¹, (Slika 1).



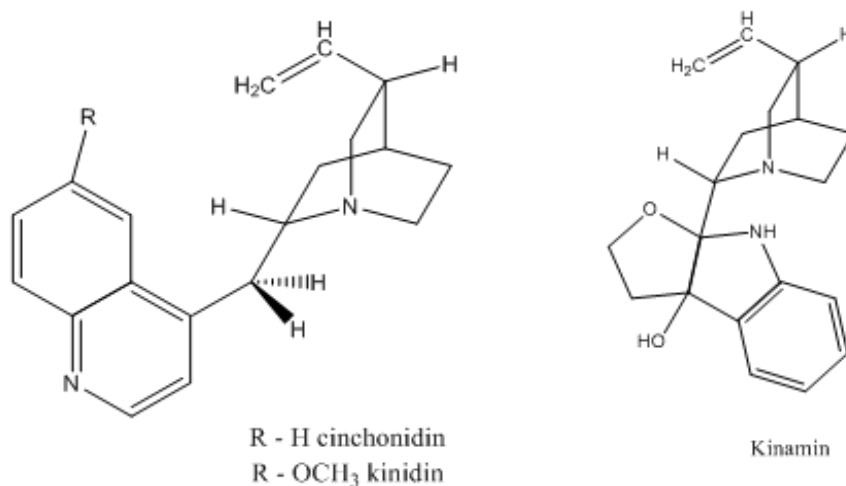
Slika 1. Struktura kinuklidina

Molekula kinuklidina je izrazito kemijski stabilna te ima relativno visoku bazičnost (pK_a 10,58). Bazičnost kinuklidina približno je jednaka bazičnosti alifatskih amina (dietilamin, pK_a 10,77) i *N*-alkilpiperidina (*N*-metilpiperidin, pK_a 10,08), (Slika 2).



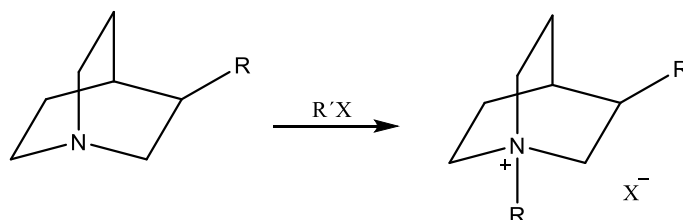
Slika 2. Utjecaj susjednih vodika na nukleofilnost kinuklidina i tercijarnog piperidina.

Heterociklički sustav kinuklidina, prisutan je kao strukturalna jedinica brojnih prirodnih i sintetskih, fiziološki aktivnih spojeva (Slika 3).²



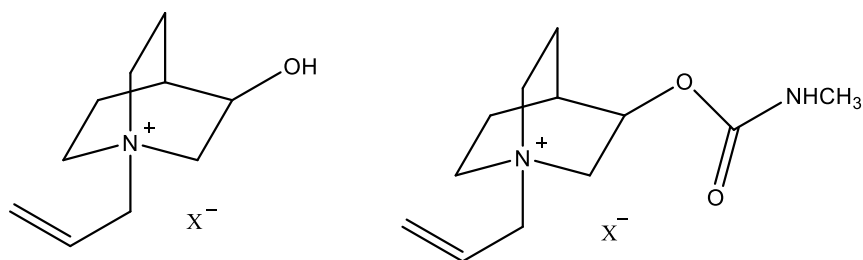
Slika 3. Kinuklidin kao strukturalna jedinica prirodnih spojeva

Od derivata kinuklidina koji su biološki aktivni te ih nalazimo u lijekovima i farmakološkim pripravcima. 3-supstituirani derivati kinuklidina prepoznati su kao muskarinski agonisti s potencijalom za liječenje Alzheimerove bolesti³, te kao obećavajuća klasa antikancerogenih sredstava sa širokim spektrom djelovanja.⁴ Kinuklidinski derivati reagiraju s alkil-halogenidima i lako je prirediti kvaterni, odnosno biskvaterni derivate kinuklidina (Shema 1).

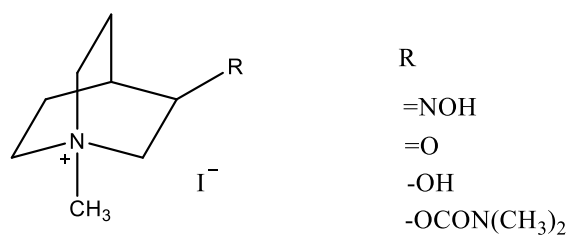


Shema 1. Priprava kvaternih derivata kinuklidina.

3-okso i 3-hidroksi kvaterni i biskvaterni derivati kinuklidina, te *N,N*- dimetilkarbamati kinuklidin-3-ola istraživani su kao antidoti pri trovanju organofosforinim spojevima. 3-hidroksi-*N*-alilni (Slika 4) i 3-okso-*N*-metilni kinuklidinijevi derivati (Slika 5) pokazali su se kao djelotvorni antidoti u slučaju trovanja somanom.²



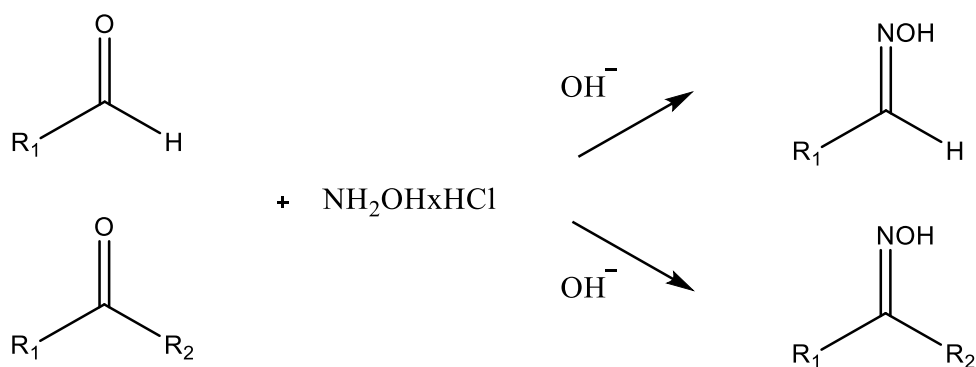
Slika 4. Strukture kvaternih 3-hidroksi i 3-metilkarbamoiloksi N-alilnih kinuklidinijevih derivate testiranih kao antidoti u slučaju trovanja somanom.



Slika 5. Neki kvaterni N-metil derivati kinuklidina evaluirani kao antidoti.

2. 2. SINTEZE OKSIMA

Oksimi su organski spojevi koji sadrže skupinu $R_2C=NOH$.⁵ Dobivaju se kondenzacijom aldehida ili ketona s hidroksilaminom. Oksimi izvedeni iz aldehida nazivaju se aldoksimi, a oni od ketona ketoksimi (Slika 6).



Slika 6. Sinteza aldoksima i ketoksima.

Oksimi su vrlo korisni organski spojevi.⁶ Koriste se za pročišćavanje, karakterizaciju i kao međuprodukti na putu dobivanja drugih funkcionalnih skupina. Oksimi se koriste i

kao zaštitne skupine. Ako želimo koristiti takve spojeve važno je, prema principima zelene kemije, upotrijebiti visokoučinkovite i ekološki prihvatljive metode.

Oksimi se koriste i za selektivne α -aktivacije te kao međuprodukti za dobivanje amida Beckmannovom pregradnjom.⁷ U anorganskoj kemiji oksimi se koriste kao svestrani ligandi. Pretvorba karbonilne funkcionalne skupine u oksim važna je u sintetskoj organskoj kemiji, ne samo zbog zaštite, pročišćavanja i karakterizacije karbonilne skupine nego i za razne transformacije funkcionalnih skupina poput nitrila, amina, itd.⁵

Uobičajeno, oksimi se pripremaju refluksiranjem alkoholne otopine karbonilnog spoja s hidroksilamin-hidrokloridom i piridinom.⁶ Postupak ima više nedostataka kao što su dugo vrijeme pripreme, toksičnost piridina i niski prinosi. Nedavno su se oksimi počeli sintetizirati iz nitrila, fosfonijevih spojeva te ketona, $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ i NaOAc u etanolu i pomoću mikrovalnog zračenja.

2. 2. 1. Mehanokemijske sinteze oksima

85% kemikalija koje se koriste u farmaceutskoj industriji su otapala čija je iskoristivost nakon recikliranja 50-80%, onečišćuju okoliš i energetski su zahtjevne s obzirom na proizvodnju, pročišćavanje i postupak recikliranja.⁸ Svijest o ekološkim problemima potaknuo je kemičare da razvijaju metode sinteze koje su manje štetne.⁹ Jedna od njih je i mehanokemija.

Mehanokemijske reakcije su reakcije potaknute apsorpcijom mehaničke energije.⁸ Mljevenje je pojam koji označava mehaničko djelovanje tvrde površine na materijal kako bi se usitnio materijal i smanjila veličina čestica. Mljevenje se može provoditi ručno u tarionku ili pomoću kugličnog mlina. Mljevenje dvije krutine može se provoditi bez dodatka tekućine, iako mali dodatak tekućine može jako ubrzati reakciju, a nekad i omogućiti reakciju između dvije krutine.

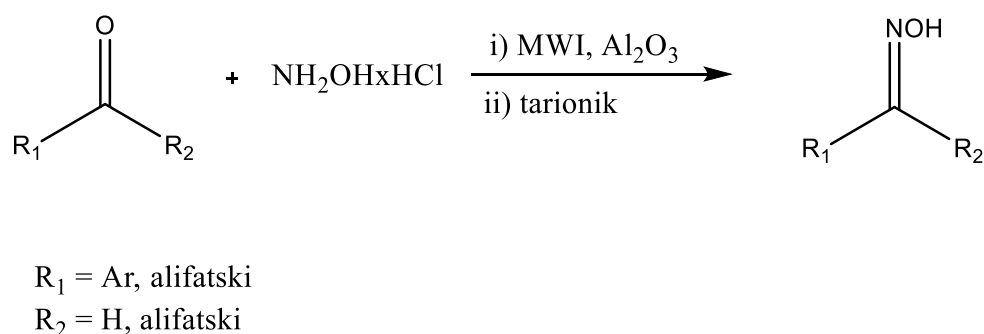
Mehanokemijske reakcije dijelimo na reakcije bez prisutnosti otapala, reakcije potpomognute otapalom ('liquid assisted grinding', (LAG)) i reakcije potaknute ionima i tekućinom („ion- and liquid assisted grinding“ (ILAG)).¹⁰ Najbolji rezultati dobivaju se

metodom potpomognutom otapalom, odnosno mljevenjem s vrlo malom količinom tekućine.⁸

Reakcije potpomognute otapalima omogućuju veću pokretljivost molekula pa ubrzavaju reakcije čvrstih tvari u odnosu na reakcije bez otapala. Kod reakcija potpomognutih otapalom dodana tekućina nema ulogu otapala već se smatra da samo povećava pokretljivost molekula.⁸ Priroda dodanog otapala može također imati utjecaja na novonastali produkt.

Kod reakcija potaknutih ionima i otapalom, katalitičke količine određenih soli mogu ubrzati i usmjeriti reakciju prema određenom produktu.¹⁰

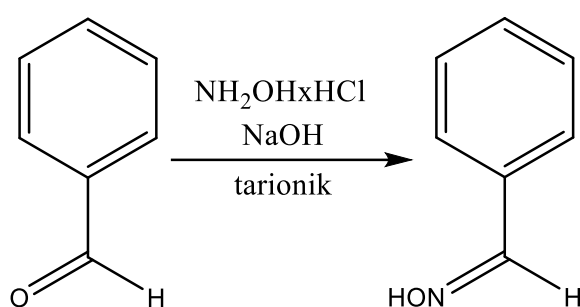
Autori rada G. L. Kad, M. Bhandari i ostali, razvili su novu ekološki prihvatljivu i čistu sintezu oksima pomoću mikrovalnog zračenja ili mljevenja u tarioniku, (Slika 7).⁶ Obje tehnike koristile su se bez otapala te su se dobili oksimi različitih prinosa. Ovakve metode smanjuju probleme s odlaganjem otpada te pružaju jednostavne i učinkovite primjere nekonvencionalne metodologije koje se mogu koristiti u sintezi. Smjesa aldehida ili ketona, hidroksilamina-hidroklorida te molekulskih sita mljevena je u tarioniku u određenom vremenu. Završetak reakcije pratio se pomoću TLC-a, reakcijska smjesa otopljena je u dietil-eteru te filtrirana. Filtrat je ispran vodom i sušen na bezvodnom Na₂SO₄. Otapalo se uparilo te je dobiven čisti oksim u prinosu između 12-79%. Važno je napomenuti da su samo aldoksimi dobiveni ovom metodom, dok kod ketona reakcije nije bilo. Keton je uspješno preveden u oksim samo uz pomoć mikrovalnog zračenja.



Slika 7. Sinteza oksima u tarioniku i uz pomoć mikrovalnog zračenja.

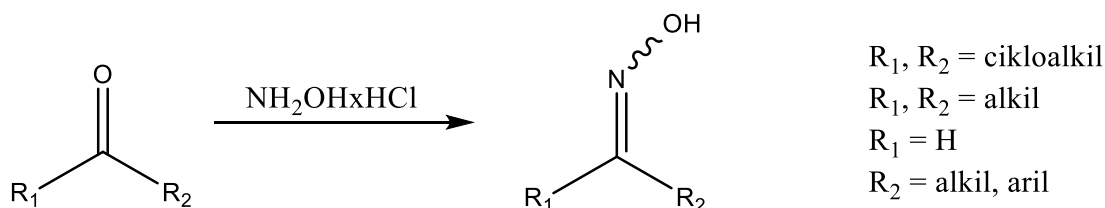
Christer B. Aakeröy sa suradnicima opisao je općenitu mehanokemijsku sintezu oksima iz aldehida, (Slika 8).¹¹ **Error! Bookmark not defined.** U tarioniku je smljeven aldehyd i hidroksilamin-hidroklorid te je dodan smrvljeni natrijev hidroksid. Smjesa se

dalje mljela uz dodatak 2-4 kapi metanola, na sobnoj temperaturi 2 minute. Reakcijska smjesa ostavljena je 5 minuta, nakon toga mljela se još 2 minute s dodatkom 2-4 kapi metanola. Reakcija je praćena pomoću TLC-a. Nakon završetka reakcije snimljen je NMR spektar kako bi se potvrdila pretvorba aldehida u oksim. Sirova smjesa isprana je vodom i ostavljena da se osuši na zraku. Nakon sušenja određeno je talište čistog produkta. Prinosi reakcija dobivenih nakon uobičajene ekstrakcije iznosili su 95-100%, dok su prinosi nakon ispiranja vodom bili nešto niži kod nekih aldoksima jer su topljivi u vodi.



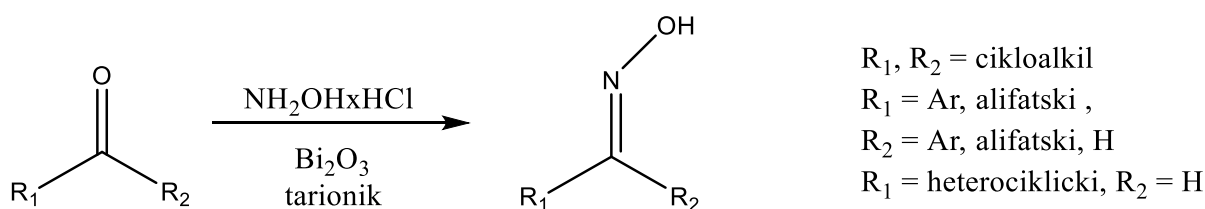
Slika 8. Sinteza aldoksima u tarioniku.

I. Damljanović sa suradnicima pokazala je da se i ciklički ketoni također mogu jednostavno prevesti u odgovarajući oksim mljevenjem u tarioniku (30-40 minuta) na sobnoj temperaturi, (Slika 9).¹² U tarioniku je smljeven ciklički keton, hidrosilamin-hidroklorid i natrijev hidroksid bez otapala. Isto tako reakcijsku smjesu nije bilo potrebno zagrijavati niti izlagati mikrovalnom zračenju. Izolirani su oksimi visoke čistoće u prinosu 85-100%. Kod aromatskih ketona reakcija je izostala, čak i nakon nekoliko sati mljevenja. Tek nakon dodatka male količine silikagela dogodila se uspješna pretvorba aromatskog ketona u odgovarajući oksim uz prinos do 98%.



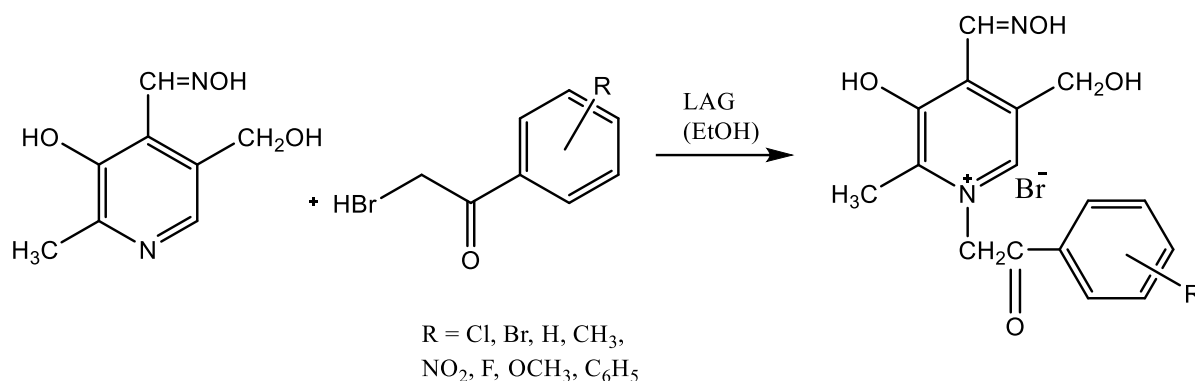
Slika 9. Sinteza cikličkih ketoksima u tarioniku.

L. Saika i suradnici u svom radu prikazali su tipičan postupak za pripremu oksima iz aldehida i ketona u tarioniku uz Bi_2O_3 , (Slika 10).⁷ Smjesa aldehida/ketona, hidroksilamina-hidroklorida i Bi_2O_3 usitnjena je i mljevena u tarioniku. Reakcija je praćena TLC-om. Nakon završetka reakcije u reakcijsku smjesu dodan je etil-acetat kako bi se nakon filtriranja odvojio Bi_2O_3 . U fitrat je dodana voda kako bi istaložio produkt. Talog je ofiltriran i osušen na vakuumu. Prinosi reakcija iznosili su 60-98%. Svoj postupak opisuju kao vrlo jednostavnu, brzu, učinkovitu i novu metodu za pripremu oksima, a Bi_2O_3 kao kemikaliju jednostavnu za korištenje, jeftinu i bezopasnu.



Slika 10. Sinteza oksima uz Bi_2O_3 .

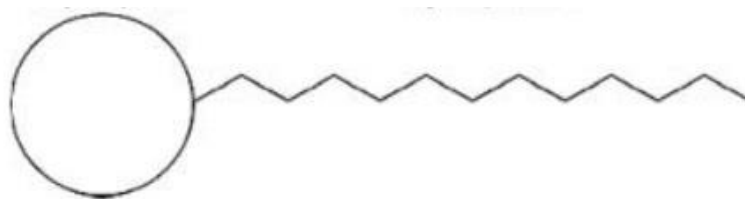
Osim za sintezu samog oksima, mehanokemija je uspješno upotrijebljena i za kvaternizaciju heterocikličkih aldoksima. V. Bušić, D. Gašo-Sokač i S. Kovač u svom su radu predstavile mehanokemijsku kvaternizaciju piridinskog prstena⁹, (Slika 11), derivata piridinijevog-4-aldoksima. U klasičnim uvjetima, nedostaci takve reakcije su dugo vrijeme reakcije (1-3 tjedna), visoka potrošnja energije i velike količine otpadnih otapala. Prikazale su učinkovit način pripreve piridinijevih kvaternih soli jednostavnim mljevenjem reaktanata u tarioniku s tučkom. Koristile su metodu mljevenja potpomognutog otapalom, jer je nakon mljevenja bez tekućine reakcija izostala. Smjesa piridoksal oksima i fenacil-bromida mljevena je u tarioniku uz silika gel i malu količinu etanola. Napredovanje reakcije pratilo se TLC-om. Nakon završetka reakcije smjesa je ekstrahirana vrućim acetonom. Silikagel je uklonjen filtriranjem pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja i prekristalizacije produkte su analizirali NMR-om i IR spektroskopijom. Dobiveni su produkti vrlo različitih prinosa.



Slika 11. Mehanokemijska kvaternizacija piridinskog prstena.

2.3. POVRŠINSKI AKTIVNE TVARI

Površinski aktivne tvari (PAT) su organske molekule, specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava, koje su građene od hidrofilne skupine (glava – „sklona“ vodi) te hidrofobnog alkilnog lanca (rep - „odbija“ vodu), (Slika 12).¹³



Slika 12. Tipična struktura površinski aktivne tvari.

2. 3. 1. Svojstva i podjela površinski aktivnih tvari

Polarni dio molekule sudjeluje u elektrostatskim interakcijama s okolnim molekulama (vodikove veze, dipolarne interakcije, ionske veze i sl.), a nepolarni dio molekule PAT asocira sa susjednim nepolarnim strukturama uslijed Londonovih/ Van der Waalsovih sila.¹⁴ Molekulska struktura površinski aktivnih tvari ukazuje na njihove neuobičajene osobine koje imaju najrazličitije primjene. Dva glavna svojstva PAT su adsorpcija na međupovršini i samoorganizacija u razne supramolekulske strukture (asocijate) iznad kritične micelizacijske koncentracije, (*cmc*, engl. critical micelle concentration).¹⁵

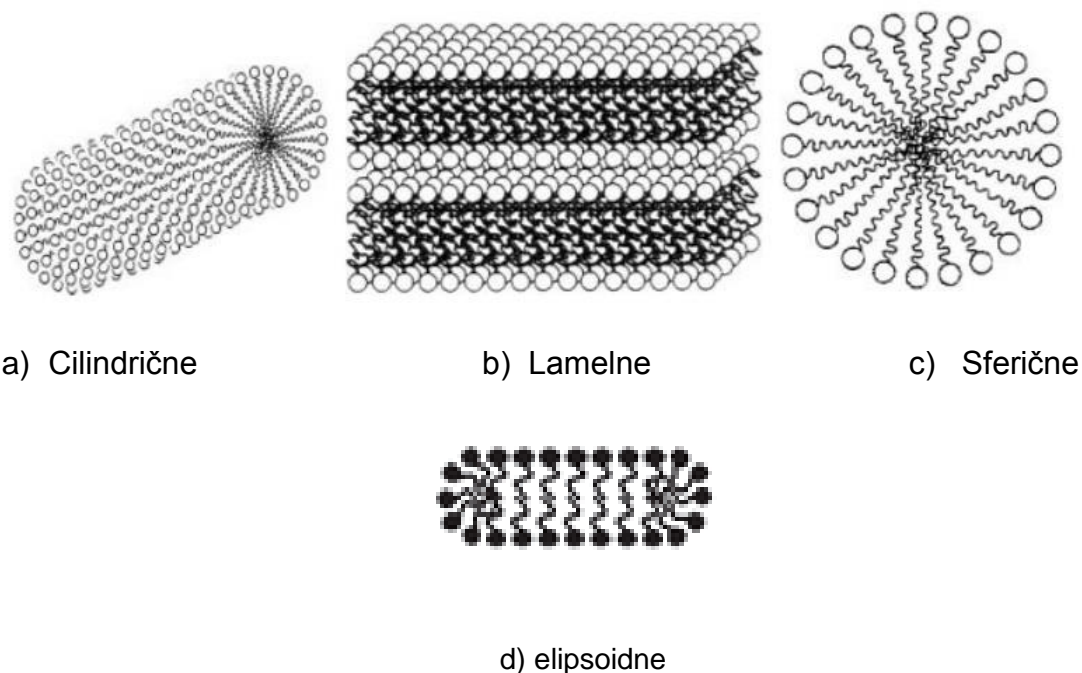
Prema naboju hidrofilne skupine površinski aktivne tvari svrstavaju se u četiri glavne kategorije:

1. anionske – hidrofilna skupina je negativno nabijena. Negativni naboj može potjecati od karboksilne, sulfatne, sulfonatne ili fosfatne skupine.
2. kationske – hidrofilna skupina je pozitivno nabijena. Po kemijskom sastavu su uglavnom kvaterne amonijeve soli.
3. neionske – hidrofilna skupina je nenabijena. Topljivost neionskih PAT u vodi potječe od funkcionalnih grupa u njihovoj strukturi s jakim afinitetom prema vodi.
4. amfoterne – u strukturi molekule sadrže i kationsku i anionsku grupu.^{16,17}

Otapanjem molekula PAT u vodi narušava se struktura vode. Molekule PAT u otopini nastoje izbjeći nepovoljan kontakt svojeg nepolarnog dijela molekule s vodom, te dolazi do kooperativnog djelovanja disperzijskih sila i vodikovih veza. S druge strane dolazi do hidratacije/solvatacije, koja je rezultat jakog dipol-dipol ili ion-dipol međudjelovanja hidrofilnih skupina i molekula vode. Kao posljedica tih međudjelovanja pri malim koncentracijama PAT dolazi do stvaranja monosloja na površini otopina/zrak s orijentacijom hidrofilnog dijela molekule prema vodenoj fazi dok se hidrofobni dio isključuje iz vode i strši u zrak.¹³ Smanjenje površinske energije vodenih otopina PAT postiže se kristalizacijom ili taloženjem PAT iz otopine, adsorpcijom na površine nastajanjem molekulskih asocijata, micela, različitih lamelnih struktura (vezikule, dvosloji) te mezofaza tekućih kristala.

PAT egzistiraju kao pojedinačne molekule (monomeri) do jedne granične koncentracije, kritične koncentracije za stvaranje micela. Porastom koncentracije dolazi do spontanog samoorganiziranja molekula PAT u stabilne nakupine koloidnih dimenzija tzv. micela.^{13,18} Micele nastaju iznad karakteristične koncentracije te u slučaju ionskih PAT, iznad karakteristične temperature koja se naziva Krafftova temperatura. Micele su termodinamički stabilne čestice u otopini čija se svojstva razlikuju od svojstva monomera. Pri *cmc* koncentraciji micelle mogu biti različitog oblika, elipsoidne, sferične, cilindrične (štapičaste), (Slika 13).¹³ Pri vrlo visokim koncentracijama PAT se samoorganiziraju u lamelne strukture koje se sastoje od dvosloja molekula PAT na čijoj se površini nalaze hidrofilne skupine. Dvosloji su

odvojeni slojem molekula vode a vrlo su slične lipidnim dvoslojima u biološkim sustavima.



Slika 13. Mogući strukturni oblici micela
Preuzeto iz R. J.Farn, *Chemistry and technology of Surfactants*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006.

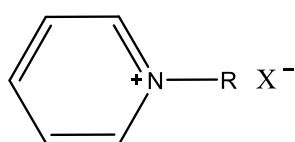
2. 3. 2. Termička svojstva PAT

Organske tvari zagrijavanjem, procesom taljenja, prelaze iz kristalnog stanja u izotropnu tekućinu. Za razliku od njih PAT ne prelaze izravno iz kristalnog stanja u stanje izotropne taline. Umjesto prijelaza iz 3D uređenja kristala u neuređenu izotropnu talinu, javlja se jedan ili više faznih prijelaza, koji rezultiraju nastajanjem različitih polimorfa i/ili mezofaza.¹⁸ Pod pojmom mezofaza ili mezomorfna stanja podrazumijevaju se tekući kristali ili mezogeni, koji posjeduju istovremeno svojstvo uređenosti kristalne rešetke i mobilnosti izotropne otopine.¹⁸ Tekuće kristalno stanje je mezomorfno stanje orijentacijske sređenosti dugog doseg a djelomične pozicijske sređenosti, odnosno potpune pozicijske nesređenosti, a pojavljuje se u određenom intervalu temperature, tlaka ili koncentracije.¹⁹ Razlikujemo tri glavne vrste tekuće kristalne mezofaze: lamelna, kubična i heksagonska. Lamelna faza sastoji se od dvosloja molekula PAT na čijoj se površini nalaze hidrofilne skupine. Taljenjem nastaju intramolekulske konformacijske promjene sve do potpune

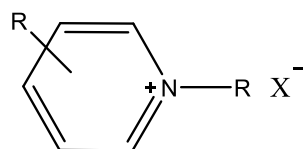
ragradnje kristalne rešetke. Termodinamički redosljed pojedinih mezofaza prilikom zagrijavanja ide od stabilne kristalne faze, stabilne kristalne faze pri povišenoj temperaturi, faze tekućeg kristala do izotropne tekućine.²⁰ Termičko ponašanje kristala PAT ovisi o molekulskom pakiranju, tj.o strukturi molekule (razgranatosti alkilnog lanca, vrsti polarne grupe).

2. 3. 3. Kationske PAT

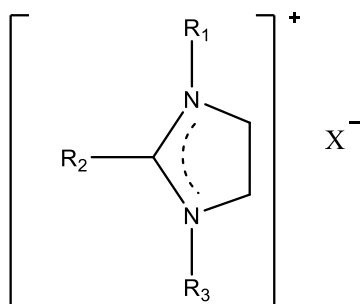
Kationski surfaktanti sastoje se od pozitivne "glave", obično s dušikovim atomom ili amidnom skupinom. Protuanion može biti halogenidni ion, sulfatna ili acetatna skupina.¹⁴ Najčešće su kvaterni amonijevi spojevi ($R^1R^2R^3R^4N^+X^-$, R=alkilna grupa, X=Cl⁻, Br⁻) te kvaterne soli piridinske osnove, (Slika 14).²¹ Kationske PAT su uglavnom blago kiseli i stoga nisu kompatibilni s lužnatim tvarima i otopinama.²² Također su kompatibilni s neionskim PAT, ali ne i s anionskim. Stabilni su na promjene pH.²¹ Primjena kationskih PAT je vrlo široka. Kvaterne amonijeve soli s jednim dugim alkilnim lancem (C₁₂₋₁₈) ili dva kraća alkilna lanca (C₈₋₁₀) koriste se i kao antimikrobne aktivne tvari.²³ Upravo zbog svojih antimikrobnih, antikorozijskih, antistatičnih i baktericidnih svojstava, kationske PAT često se koriste u dezinfekcijskim, farmaceutskim, kozmetičkim i industrijskim proizvodima.¹⁸



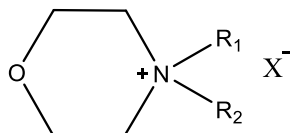
N-alkilpiridinijeva sol



soli alkil supstituiranih piridina



derivati imidazola



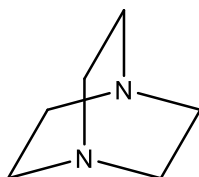
soli morfolina

Slika 14. Tipične strukture heterocikličkih kationskih PAT.

Preuzeto iz D. Myers, *Surfactant Science and Technology*, 3. Izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New

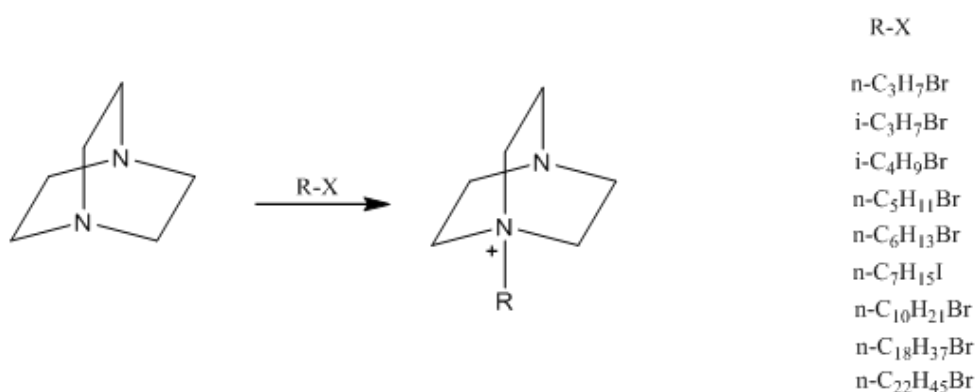
2. 3. 4. Derivati azabiciklièkih spojeva kao PAT

Ditercijarni amin 1,4 – diazabiciklo[2.2.2]oktan, DABCO, je biciklièki organski spoj strukturno slièan kinuklidinu, (Slika 15).²⁴



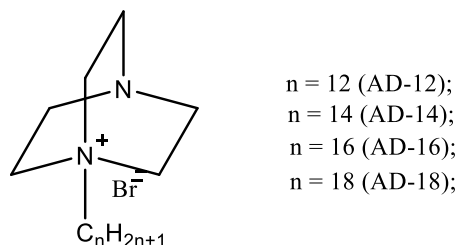
Slika 15. Struktura 1,4 – diazabiciklo[2.2.2]oktana.

Derivati DABCO, između ostalog, istraživani su i kao kationske površinski aktivne tvari. DABCO predstavlja najkorisniju vrstu za pripremu širokog spektra kationskih neprirodnih lipida i ostalih korisnih materijala. R. Engel i suradnici²⁴ u svom radu objavili su sintezu kvaternih amonijevih polikationskih lipida i njihovih prekursora, koristeći DABCO kao polazni spoj, (Shema 2). Osnovni problem u sintezi spojeva bio je pravilan izbor otapala, koji će osigurati sintezu na samo jednom dušikovom atomu, monoalkilaciju. Svi sintetizirani spojevi dobiveni su u dobrom iskorištenju koristeći etil-acetat kao otapalo. Materijali dobiveni na ovaj način mogu se koristiti kao jednostavni kationski sintetski ekvivalenti lipida ili prekursori u složenijim spojevima.



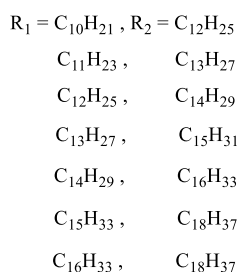
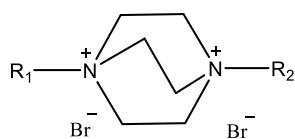
Shema 2. Priprava kvaternih derivate DABCO.

Zakharova²⁵ i suradnici također su istraživali hidrofobne derivate 1,4,-diazabiciklo[2.2.2]oktana, (Slika 16). Povećanjem hidrofobnosti PAT dolazi do opadanja kritične micelizacijske koncentracije te smanjenja hidrodinamičkog radijusa i agregacijskog broja micela.



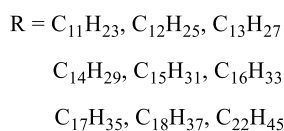
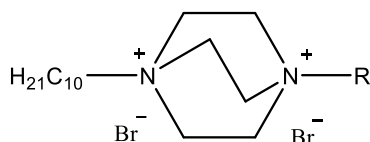
Slika 16. Neki hidrofobni derivati 1,4,-diazabiciklo[2.2.2]oktana.

Postoje brojna istraživanja faznih prijelaza, čvrsto-čvrsto, za alkane i njihove derivate. Do faznih prijelaza redovito dolazi nekoliko stupnjeva ispod tališta.²⁶ Fazni prijelaz je posljedica rotacije alkilnog lanca. Razlikuje dvije vrste rotacije; u jednoj dolazi do konformacijske promjene dok kod druge konformacijska promjena izostaje. U svojim istraživanjima Imamura i suradnici^{26,27,28} bavili su se faznim prijelazima simetričnih i asimetričnih soli DABCO. Fazne promjene istražene se pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), infracrvene apsorpcijske spektroskopije, Ramanove spektroskopije te ionske vodljivosti bromidnih iona. U svom radu Imamura i suradnici²⁷ opisali su fazne promjene asimetrične soli DABCO, s dva alkilna lanca različitih duljina, (Slika 17). DSC mjerenja pokazala su postojanje metastabilne faze koja je prelazila u stabilnu fazu presporo da bi bila praćena.



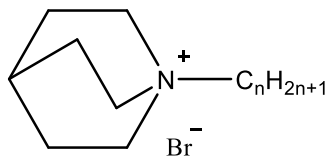
Slika 17. Asimetrične kvaterne soli 1,4 – diazabiciklo[2.2.2]oktana s alkilnim lancima različitih duljina.

Također su istraživane asimetrične soli DABCO, koje su se sastojale od dvije alkilne skupine od kojih je jedna bila stalna a druga se mijenjala od $n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$ do $n\text{-C}_{22}\text{H}_{45}$, (Slika 18). DSC mjerenja pokazala su postojanje metastabilne faze. Za alkilne lance $13 \leq n \leq 18$, pri sobnoj temperaturi, dolazi do postupnog prelaska u stabilnu fazu. Što je bila veća razlika u duljini lanaca to je prijelaz bio brži. Za alkilni lanac $n=12$ te $n=22$ ne nastaje stabilna faza.²⁸



Slika 18. Asimetrične kvaterne soli 1,4 – diazobiciklo[2.2.2]oktana.

Na temelju istraživanja dobiveni su rezultati faznih prijelaza soli DABCO. Kod simetričnih soli javlja se jedan fazni prijelaz praćen povećanjem ionske vodljivosti halogenih aniona. Temperaturna ovisnost IR spektra pokazala je povećano nestajanje karakteristične vrpce na temperaturi faznog prijelaza. To pokazuje da rotacija alkilnog lanca uključuje konformacijske promjene. Kod asimetričnih soli također dolazi do povećanja ionske vodljivosti halogenih aniona, metastabilno stanje javlja se zagrijavanjem na temperaturu faznog prijelaza te hlađenjem na sobnu temperaturu. Također su istraživani fazni prijelazi alkilkinuklidinijevog bromida, ABCO, koji sadrži samo jedan dušik, (Slika 19). Pokazalo se da se kod većine soli ABCO javljaju tri fazna prijelaza ovisno o duljini alkilnog lanca. Na najvišoj istraživanoj temperaturi dogodio se najveći porast ionske vodljivosti bromidnog aniona.



$n = 10, 11, 12, 13, 14,$
 $15, 16, 17, 18, 22$

Slika 19. Kvaterne soli 1-azabiklo[2.2.2]oktana.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1. OPĆE NAPOMENE

Sve upotrebene kemikalije i otapala bile su analitičke čistoće ili su pročišćavane standardnim postupcima opisanim u literaturi. Spojevi 3-oksokinuklidinijev klorid, hidroksilamonijev klorid, dodecil-bromid, tetradecil-bromid i heksadecil-bromid su komercijalno dostupni i nisu bili dodatno pročišćavani.

Tijek reakcija, identifikacija i kontrola čistoće pripremljenih spojeva ispitivana je tankoslojnom kromatografijom (TLC), infracrvenom spektroskopijom (IR), te ^1H i ^{13}C nuklearnom magnetskom rezonancijom.

Tankoslojna kromatografija rađena je na pločicama aluminijeva oksida (DC Aluminiumoxid 60 F₂₅₄, neutral, Merck) te silikagela (HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck). Supstancije su detektirane reverzibilnom adicijom joda.

IR spektri su snimljeni na Perkin-Elmer FT-IR Spectrum Two spektrometru. Kruti uzorci snimani su kao pastile kalijevog bromida, a tekući uzorci na pločicama natrijeva klorida. Vrijednosti valnih brojeva izraženi su u cm^{-1} .

NMR spektri snimljeni su na Bruker AV300 i/ili AV600 u deuteriranim otapalima na sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm), a kao unutrašnji standard korišteni su tetrametilsilan (TMS), ili nedeuterirani udio otapala. Konstante sprege, J , izražene su u Hz. Signali su označeni kao s=singlet, d=dublet, t=triplet, dd=dublet dubleta, m=multiplet

Tališta su određena na uređaju Büchi Melting Point B-540 u otvorenim kapilarama.

Elementna analiza (C, H, N) rađena je na instrumentu Perkin-Elmer PE 2400, Series II CHNS/O Analyser.

Mehanokemijska sinteza rađena je u kugličnom mlinu Retsch MM200, u posudici od nehrđajućeg čelika volumena 10 mL uz jednu kuglicu od istog materijala. Frekvencija mljevenja bila je 25 Hz, a vrijeme mljevenja od 1 min do najdulje 120 min.

3. 2. PRIPRAVA SPOJEVA

3. 2. 1. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidinijevog klorida (1)

3-oksokinuklidinijev klorid (1,56 g, 9,7 mmol) i hidroksilamonijev klorid (1,73 g, 24,9 mmol) otopljeni su u suhom etanolu (25,5 mL) uz dodatak suhog piridina (7,2 mL).²⁹ Reakcijska smjesa zagrijava se 40 sati na uljnoj kupelji uz miješanje mehaničkom mješalicom na temperaturi 120 °C. Dobivena reakcijska smjesa uparena je pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču. Dobiveni produkt ispran je s metanolom (4 mL) te profiltriran. koji je prekrizaliziran iz smjese metanol - izopropanol. Dobiveno je 1,15 g (78%) 3-hidroksiiminokinuklidinijevog klorida **1** (*t.t.* 234-236 °C, uz raspad).

Mehanokemijska sinteza– kapljevnom potpomognuto mljevenje, LAG: U smjesu 3-oksokinuklidinijevog klorida (33,8 mg,) i hidrokisilamonijevog klorida (11,1 mg) dodana je katalitička količina etanola (20µL).. Reakcijska je smjesa mljevena u mlinu. Nakon određenog vremena (npr. 1, 5, 10, 20, 30, 60, 110 i 170 minuta) uzorak reakcijske smjese (~ 1 mg) je uziman i pripravljena je KBr pastila te snimljen IR spektar. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (aluminijev oksid, CHCl₃ : CH₃OH = 9 : 1) te nisu uočeni nusprodukti. Sve reakcije provedene su pri sobnoj temperaturi uz dodatak 100 mg KBr

Paralelno s ovom reakcijom je rađena reakcija bez dodatka otapala te reakcija kada je dodana i ekvimolarna količina natrijevog hidroksida.

3. 2. 2. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidina (2)

Zasićenoj vodenoj otopini 1,15 g (6,5 mmola) 3-hidroksiiminokinuklidinijevog klorida **1** dodana je zasićena vodena otopina 1,0 g (3,2 mmola) Ba(OH)₂ x 8H₂O.²⁹ Nakon uparavanja uz podtlak vodene sisaljke i kontinuirane ekstrakcije acetonom izolirano

je 0,48 g sirovog produkta koji je pročišćen prekrizacijom iz redistirane vode. Dobiveno su bijeli kristali spoja **2** 0,41 g (38 %), (t.t. 212-213 °C).

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 945 (N-O); 1665 (C=N); 2852-3142 (O-H)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: η 1,61-1,80 (m, 4H); 2,48-2,53 (m, 1H); 2,71-2,92 (m, 4H); 3,50 (s, 2H); 10,34 (s, 1H, C=N-OH)

¹³C NMR (APT) (DMSO-d₆) δ /ppm: η 26,420 (C5, C8); 28,384 (C4); 46,803 (C6, C7); 51,869 (C2); 162,224 (C3)

Mehanokemijska sinteza– kapljevinom potpomognuto mljevenje, LAG: U smjesu 3-oksokinuklidina (24,7 mg) i hidrokisilamonijevog klorida (11,1 mg) dodana je katalitička količina etanola (20 μ L).. Reakcijska je smjesa mljevena u mlinu. Nakon određenog vremena (1, 5, 10, 20, 30, 50 minuta) uzorak reakcijske smjese (~ 1 mg) je uzet i pripravljena je KBr pastila te snimljen IR spektar. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (aluminijev oksid, CHCl₃ : CH₃OH = 9 : 1) te nisu uočeni nusprodukti. Sve reakcije provedene su pri sobnoj temperaturi uz dodatak 100 mg KBr. Paralelno s ovom reakcijom rađena je reakcija bez dodatka otapala.

3. 2. 3. Priprava 1-metil-3-oksokinuklidinijevog klorida (3)

U okrugloj tikvici od 50 ml otopljen je 1 mmol kinuklidin-3-ona³⁰ te 4 mmol metiljodida u 20 ml suhog acetona. Tako pripravljena reakcijska smjesa ostavljena je tjedan dana na sobnoj temperaturi zaštićena od svjetla. Nastali talog profiltriran je i ispran suhim eterom. Dobiveni su bijeli kristali spoja **3** (97,5%), t.t. 278°C, prekrizirani iz smjese etanol-voda.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2923, 1753, 1468, 1120, 1090, 945, 786, 479.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ /ppm: 2,01-2,17 (m, 2H, H5); 2,17-2,35 (m, 2H, H8); 2,70-2,74 (m, 1H, H4); 3,16 (s, 3H, NCH₃); 3,55-3,67 (m, 2H, H6); 3,67-3,80 (m, 2H, H7); 4,33 (s, 2H, H2).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ/ppm: 20,87 (C5 i C8); 36,54 (NCH₃); 52,55 (C4); 56,03 (C6 i C7); 67,10 (C2); 203,43 (C=O).

3. 2. 4. Priprava 3-hidroksiimino-1-metilkinuklidinijevog klorida (4)

Mehanokemijska sinteza– kapljevinom potpomognuto mljevenje, LAG: U smjesu *N*-metil-3-oksokinuklidinijevog klorida **3** (24,7 mg) i hidrokisilamonijevog klorida (11,1 mg) dodana je katalitička količina etanola (20 μL). Reakcijska je smjesa mljevena u mlinu. Nakon određenog vremena (npr. 5, 10, 20, 30, 60, 90, 110 i 170 minuta) uzorak reakcijske smjese (~ 1 mg) je uziman i pripravljena je KBr pastila te snimljen IR spektar. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (aluminijev oksid, CHCl₃ : CH₃OH = 9 : 1) te nije uočen očekivani produkt. Sve reakcije provedene su pri sobnoj temperaturi uz dodatak 100 mg KBr. Paralelno s ovom reakcijom rađena je reakcija bez dodatka otapala.

3. 2. 4. Priprava *N*-dodecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (5)

3-hidroksiiminokinuklidin **2** (0,72 g, 5,2 mmol) otopljen je u suhom acetonu (4 mL) te je dodan dodecil-bromid (2,07 mL, 8,6 mmol). Reakcijska smjesa zagrijavana je 48h na uljnoj kupelji uz miješanje mehaničkom mješalicom na temperaturi 50°C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na pločici silikagela. Dobivena reakcijska smjesa uparena je pod sniženim tlakom na rotacijskom uparivaču. Produkt je višekratno ispran heksanom, a potom prekrizaliziran iz acetonitrila. Dobiveni su bijeli kristali spoja **5**. (1,59g, 70,5 %), *t*_m=181,9-184,0 °C

IR(KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 945,1 (N-O); 1674,7 (C=N); 3019,8-3503,3 (O-H) .

¹H NMR (kloroform-d₁) δ/ppm: \uparrow 0,89 (t, 3H, *J*=7,3 Hz); 1,20-1,40 (m, 18H); 1,76-1,85 (m, 2H); 2,21-2,44 (m, 2H); 2,45-2,31 (m, 2H); 2,60-2,96 (m, 1H); 3,70-3,79 (m, 2H); 3,85-3,93 (m, 4H); 4,54 (s, 2H); 10,43 (s, 1H, C=N-OH).

^{13}C NMR (kloroform- d_1) δ /ppm: \uparrow 13,38; 22,04; 22,21; 23,26; 25,98; 26,07 (C5, C8); 31,33; 26,66 (C4); 46,84; 51,28; 54,76 (C6, C7); 57,79 ($\text{N}^+\text{-CH}_2$); 63,97 (C2); 150,16 (C=N-OH).

CHN analiza za $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{BrN}_2\text{O}$ (389,41): rač. C 58,60; H 9,58; N 7,19; nađ. C 58,53; H 9,71; N 7,03 %.

Mehanokemijska sinteza– kapljevinom potpomognuto mljevenje, LAG: 3-hidroksiiminokinuklidin **2** (50 mg, 0,35 mmol) pomiješan je s dodecil-bromidom (85,6 μL , 0,35 mmol), natrijevim jodidom (53,5 mg) te kalijevim bromidom (50 mg) uz dodatak acetona (20 μL). Smjesa je mljevena u mlinu 90 minuta. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (aluminijev oksid, CHCl_3 : CH_3OH = 9 : 1). Paralelno s ovom reakcijom rađena je reakcija bez dodatka natrijevog jodida.

3. 2. 5. Priprava *N*-tetradecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (**6**)

Spoj **6** dobiven je prema propisu za spoj **2** iz 3-hidroksiiminokinuklidina (0,2g, 1,4mmol) i tetradecil-bromida (0,78 mL, 2,8 mmol). Dobiveni su bijeli kristali spoja **6** prekrizalizirani iz acetonitrila (0,40 g, 83%), $t_f=182\text{-}187$ °C.

IR(KBr) $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 948,5 (N-O); 1669,3 (C=N); 3020,0-3509,0 (O-H) .

^1H NMR (kloroform- d_1) δ /ppm: \uparrow 0,90 (t, 3H, $J=7,3$ Hz); 1,19-1,45 (m, 22H); 1,78-1,86 (m, 2H); 2,20-2,41 (m, 2H); 2,41-2,28 (m, 2H); 2,60-2,98 (m, 1H); 3,67-3,75 (m, 2H); 3,83-3,90 (m, 4H); 4,54 (s, 2H); 10,42 (s, 1H, C=N-OH).

^{13}C NMR (kloroform- d_1) δ /ppm: \uparrow 13,28; 22,00; 22,19; 23,19; 25,32; 26,05 (C5, C8); 31,30; 26,60 (C4); 46,74; 51,12; 54,72 (C6, C7); 57,73 ($\text{N}^+\text{-CH}_2$); 63,95 (C2); 150,11 (C=N-OH).

CHN analiza za $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{BrN}_2\text{O}$ (417,47): rač. C 60.42; H 9.90; N 6.71; nađ. C 60.39; H 9.93; N 6.73 %

3. 2. 6. Priprava *N*-heksadecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevog bromida (7)

Spoj **7** dobiven je prema propisu za spoj **2** iz 3-hidroksiiminokinuklidina (1g, 7,1 mmol) i heksadecil-bromida (4,36 g, 14,3 mmol). Dobiveni su bijeli kristali spoja **7**. Prekristalizirani iz acetonitrila (4,56 g, 34,5%), $t_f=174,6-178,8$.

IR(KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 945,1 (N-O); 1674,7 (C=N); 3019,8-3503,3 (O-H) .

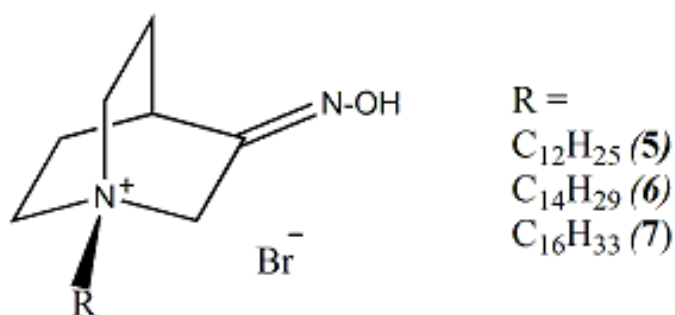
¹H NMR (kloroform-d₁) δ /ppm: \uparrow 0,88 (t, 3H, $J=7,3$ Hz); 1,17-1,46 (m, 26H); 1,73-1,81 (m, 2H); 2,19-2,44 (m, 2H); 2,40-2,30 (m, 2H); 2,61-2,97 (m, 1H); 3,69-3,76 (m, 2H); 3,84-3,92 (m, 4H); 4,54 (s, 2H); 10,41 (s, 1H, C=N-OH).

¹³C NMR (kloroform-d₁) δ /ppm: \uparrow 13,25; 22,18; 22,15; 23,11; 25,28; 26,19 (C5, C8); 31,11; 26,61 (C4); 46,69; 51,13; 54,71 (C6, C7); 57,71 (N⁺-CH₂); 63,92 (C2); 150,09 (C=N-OH).

CHN analiza za C₂₃H₄₅BrN₂O (445,52): rač. C, 62,01; H, 10,18; N, 6,29; nađ. C, 61,98; H, 10,21; N, 6,22 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu prikazana priprava novih, do sada u literaturi neistraženih, kvaternih derivata 3-hidroksiiminokinuklidina s alkilnim lancima različitih duljina (C_{12} , C_{14} i C_{16}) da bi se istražila njihova svojstva kao površinski aktivnih tvari te antibakterijska svojstva. Strukture novih pripremljenih spojeva prikazane su na shemi 3.

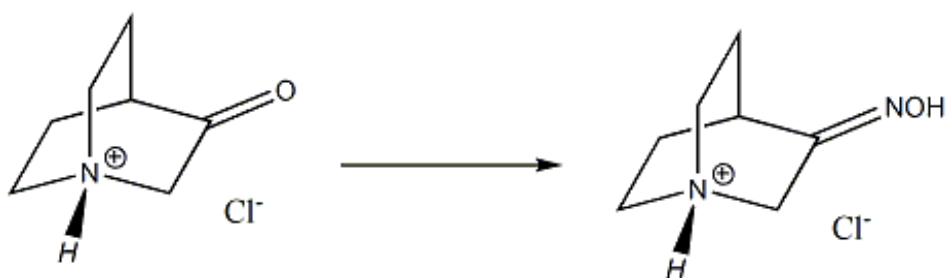


Shema 3. Kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina s alkilnim lancima različitih duljina.

4. 1. PRIPRAVA SPOJEVA

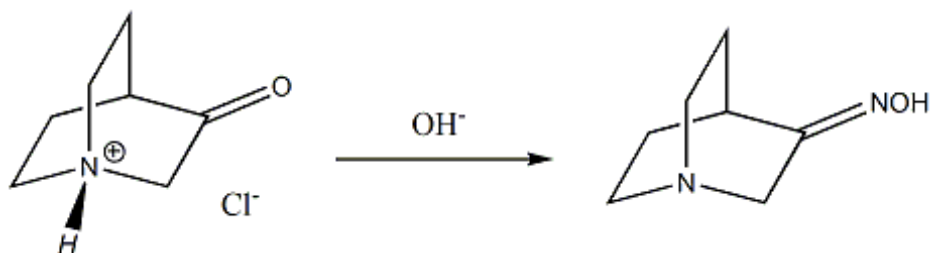
4.1.1. Priprava 3-hidroksiiminokinuklidina

Priprava spoja 1 provedena je standardnim postupkom, klasičnom metodom sinteze počevši od 3-oksokinuklidinijevog klorida i hidroksilamonijevog klorida prema postupku opisanom u literaturi, (Shema 4).²⁹



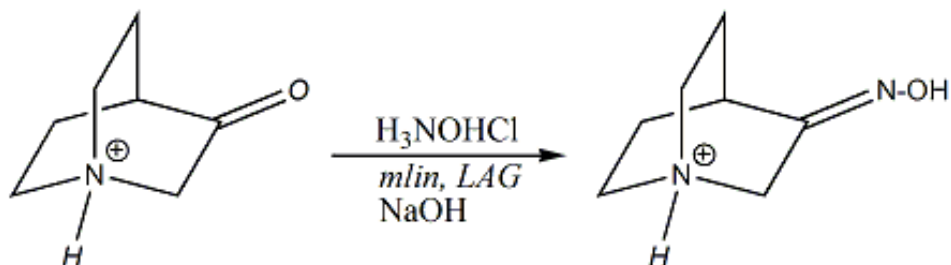
Shema 4. Priprava spoja 1.

Kao otapalo se koristi etanol uz dodatak piridina kao baze. Dušikov atom hidroksilamina u reagensu je protoniran i dodatak baze ga aktivira. Hidroksilamin nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom kinuklidin-3-ona. Reakcija se ne smije odvijati u prekiseloj sredini jer se hidroksilamin protonira te tada ne može nukleofilno napasti keton. Potom je spoj **2** sintetiziran reakcijom 3-hidroksiiminokinuklidinijevog klorida i barijevog hidroksida, (Shema 5) kako bi se kinuklidin pripremio za reakcije kvaternizacije.



Shema 5. Priprava spoja 2.

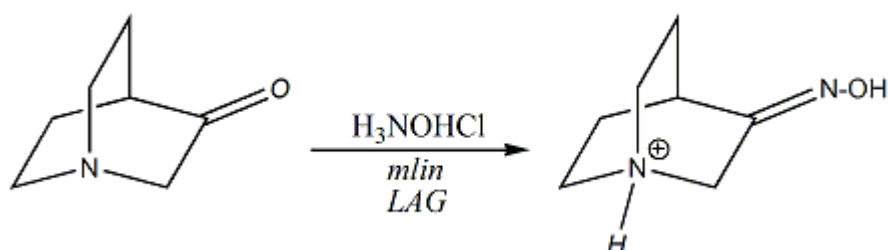
Mehanokemijske sintetske metode bez upotrebe otapala u nekim slučajevima uspješnije su od onih koje se odvijaju u otopini. Redovito se odvijaju u jednom stupnju, a iskorištenja mogu biti vrlo visoka. Mehanokemija se pokazala kao vrlo korisna metoda i za sintezu imina i oksima,^{31,32,33} Stoga su istražene mogućnosti priprave 3-hidroksiiminokinuklidina iz komercijalno dostupnih 3-oksokinuklidinijevog klorida i hidroksilamonijevog klorida. Prvo je isprobana reakcija uz dodatak natrijevog hidroksida kao baze u skladu s literaturnim navodima. Ova mehanokemijska sinteza provedena je u kugličnom mlinu pri sobnoj temperaturi, s 20 μ L etanola, u stehiometrijskom omjeru reaktanata i baze, (Shema 6).



Shema 6. Mehanokemijska sinteza spoja 1 uz dodatak NaOH kao baze.

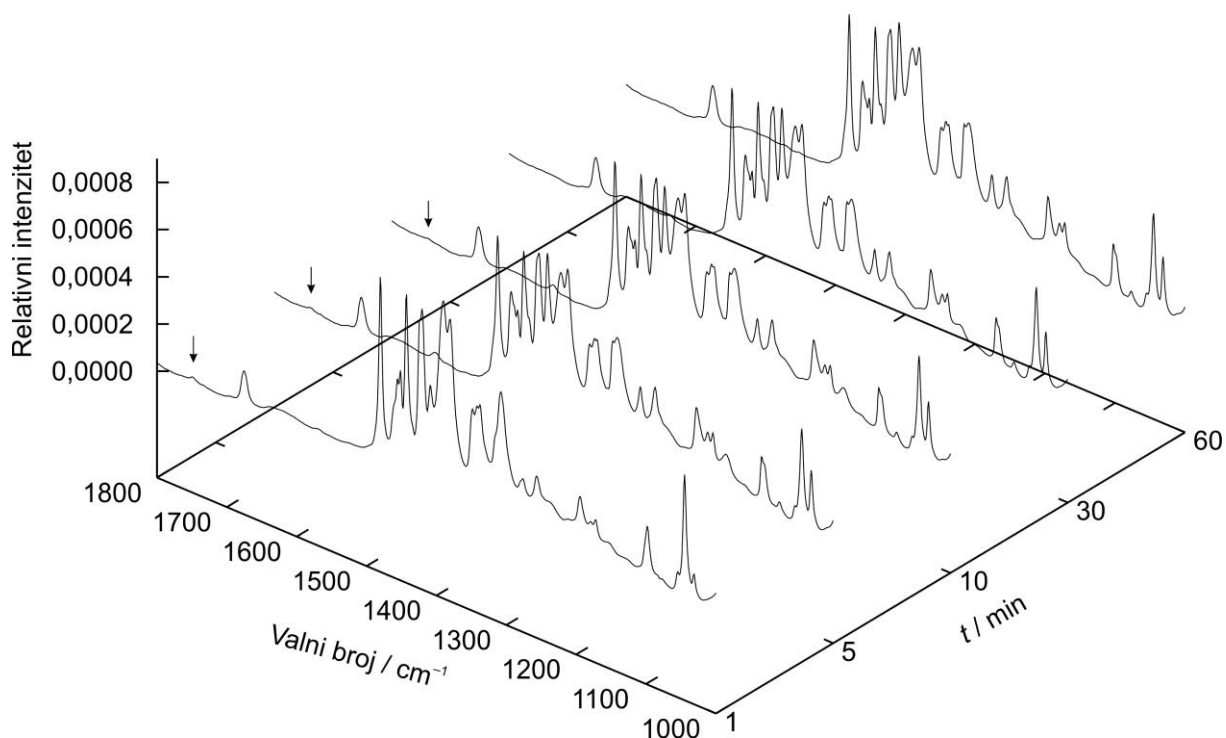
Reakcije su praćene IR spektroskopijom i tankoslojnom kromatografijom. Već nakon 5 minuta primjećeno je da je sav početni spoj izreagirao i nastao spoj 1. Kalijev bromid dodan je radi lakšeg rukovanja jer se radilo s malom količinom reaktanata, a ne interferira prilikom snimanja IR spektra.

Budući da je dušikov atom heterocikličkog kinuklidina bazičan (pK_a oko 11) pretpostavljeno je da nije potrebno dodavati bazu u reakciju ako se pripravi neprotonirati kinuklidin-3-on. Reakcija je provedena mljevenjem ekvimolarnih količina kinuklidin-3-ona i hidrosilamonijevog klorida uz dodatak 20 μ L etanola, (Shema 7).



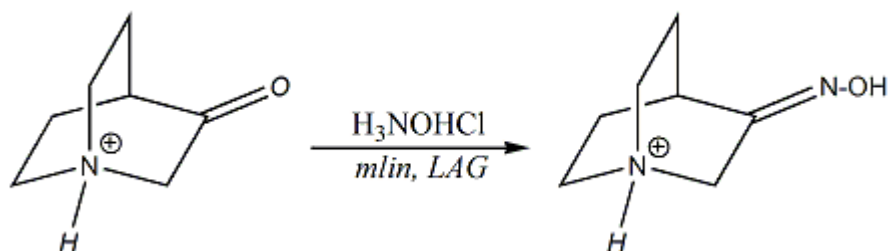
Shema 7. Mehanokemijska sinteza spoja 1 bez dodatka baze.

Tijek reakcije je praćen IR spektroskopijom tijekom 60 minuta. Budući da u reakciji nastaje i voda, područje od 2700 and 3500 cm^{-1} nije se moglo iskoristiti za praćenje reakcije (istezanja veza C–H aromatskih prstenova, metilne ili metilenske skupine, aldehidne skupine, vibracijske vrpce istezanja veza N–H i O–H). No, područje od 1800–600 cm^{-1} gdje se javljaju karakteristične vrpce istezanja oksimske veze C=N, te vrpce istezanja karboksilne skupine C=O bilo je pogodno za analizu. Na slici 20. prikazani su IR spektri snimljeni nakon 5, 10, 20, 30 i 50 minuta. Može se uočiti da je već nakon 1 minute nastalo 95% produkta. U tridesetoj minuti vrpca karboksilne skupine ketona (1735 cm^{-1}) potpuno iščezava te je postignuta kvantitativna pretvorba u oksim.



Slika 20. IR spektri snimljeni tijekom mehanokemijske sinteze spoja 1 iz 3-oksokinuklidina. Strelice označavaju položaj karbonilne skupine u spektrima.

Je li moguće sintetizirati oksim kinuklidin-3-ona ako nije u reakcijskoj smjesi prisutna slobodna baza htjeli smo provjeriti u reakciji 3-oksokinuklidinijevog klorida i hidrosilamonijevog klorida, (Shema 8).

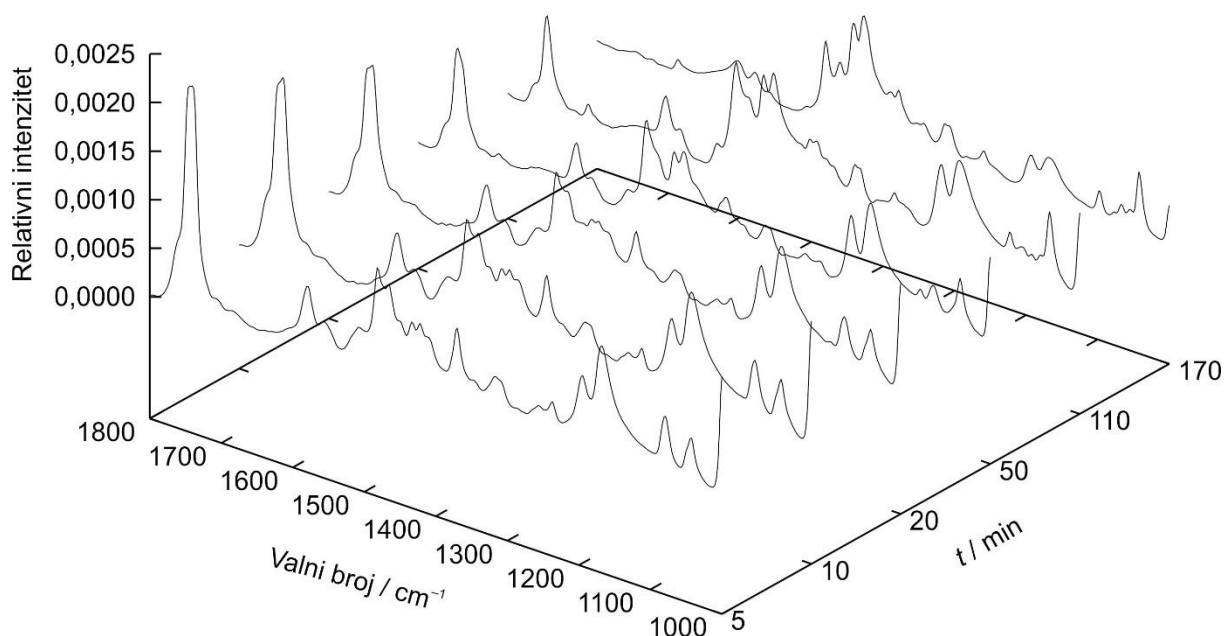


Shema 8. Mehanokemijska sinteza spoja 1 bez dodane baze i slobodnog dušika kinuklidina.

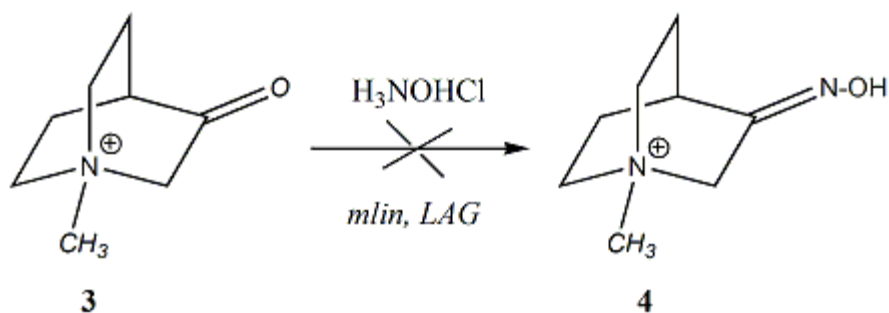
Ova mehanokemijska sinteza provedena je u kugličnom mlinu pri sobnoj temperaturi s 20 μ L etanola. Hidrosilamonijev klorid je dodan u suvišku. Reakcija je praćena u duljem vremenskom periodu, tijekom 170 minuta, (Slika 21). Ova reakcija s protoniranim heterociklom ide bitno sporije nego ona s neutralnim: nakon 170 minuta dogodi se potpuna konverzija ketona u oksim. Iako nije prisutna baza u reakcijskoj smjesi i nukleofil hidrosilamin je u potpunosti protoniran na početku reakcije, mljevenjem u mlinu reakcija polako napreduje. Ovo se može objasniti procesom

protoniranja i deprotoniranja kinuklidinskog dušika s karbonilnom i hidroksilnom skupinom prisutnom u reakcijskoj smjesi. Da bi potvrdili ovu hipotezu sintetiziran je kvaterni spoj **3** reakcijom kinuklidin-3-ona i metil-jodida. Mljevenje u mlinu *N*-metil-3-oksokinuklidinijevog jodida (**3**) i hidroksilamonijeg klorida pod istim uvjetima kao i u predhodnoj reakciji nije dobiven oksimski produkt **4**, (Shema 9). Time je potvrđena važnost kinuklidinskog dušika za deprotoniranje hidroksilamina te dobiven značajan uvid u mehanizam reakcije.

Sve mehanokemijske reakcije isprobane su i bez dodatka katalitičke količine otapala, no reakcije su se odvijale bitno sporije od onih u koje je dodana katalitička količina etanola.



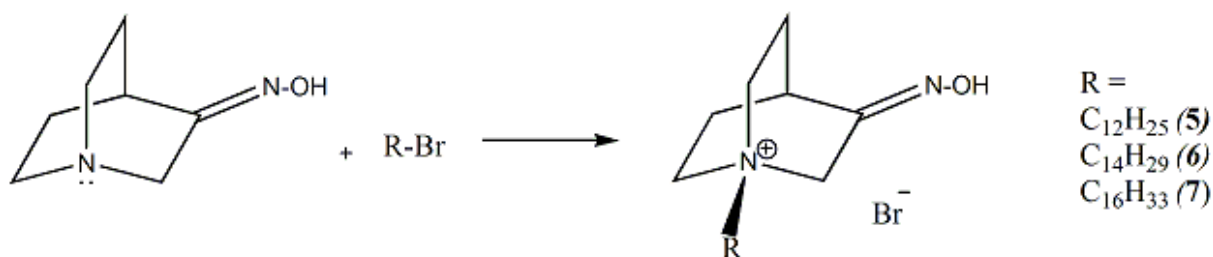
Slika 21. IR spektri snimljeni tijekom mehanokemijske sinteze spoja **1** iz potpuno protoniranih reaktanata bez dodatka baze.



Shema 9. Neuspješna mehanokemijska sinteza kvaternog oksima kinuklidina.

4. 1. 2. Kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina

Menšutkinovom reakcijom 3-hidroksiiminokinuklidina s dodecil-bromidom, tetradecil-bromidom odnosno heksadecil-bromidom u suhom acetonu pripravljeni su *N*-dodecil-3-hidroksiiminokinuklidinijev bromid (**5**), *N*-tetradecil-3-hidroksiiminokinuklidinijev bromid (**6**) i *N*-heksadecil-3-hidroksiiminijev bromid (**7**), (Shema 10). Reakcija se radi u suhom acetonu, jer tercijski amini, pa i derivati piridina, dovoljno su dobri nukleofili te reagiraju s kloriranim otapalima i pri sobnoj temperaturi.³⁴ Stoga se otapala kao kloroform i diklormetan ne smiju koristiti ako se reakcija radi s tercijskim aminima uz zagrijavanje i duži vremenski period. Dobivenim spojevima izračunato je iskorištenje te određeno talište, (Tablica 1).



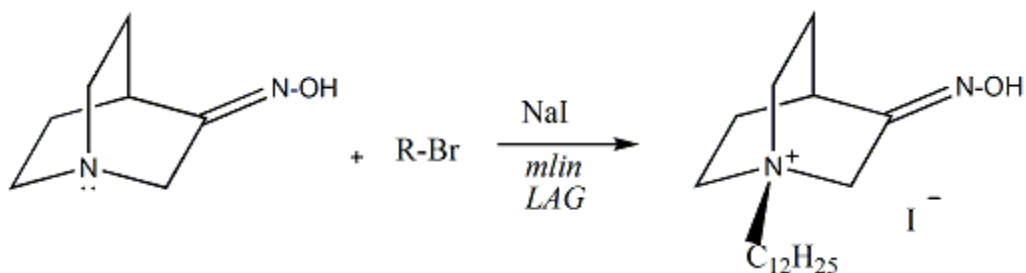
Shema 10. Priprava spojeva **5**, **6** i **7**.

Tablica 1. Tališta i iskorištenja u pripravi spojeva **5-7**.

SPOJ	R	ISKORIŠTENJE (nakon izolacije i pročišćavanja)	t _f /°C
5	C ₁₂ H ₂₅	70,5 %	181,9-184,0 uz raspad
6	C ₁₄ H ₂₉	83,0%	186,7-189,2 uz raspad
7	C ₁₆ H ₃₃	34,5%	174,6-178,8 uz raspad

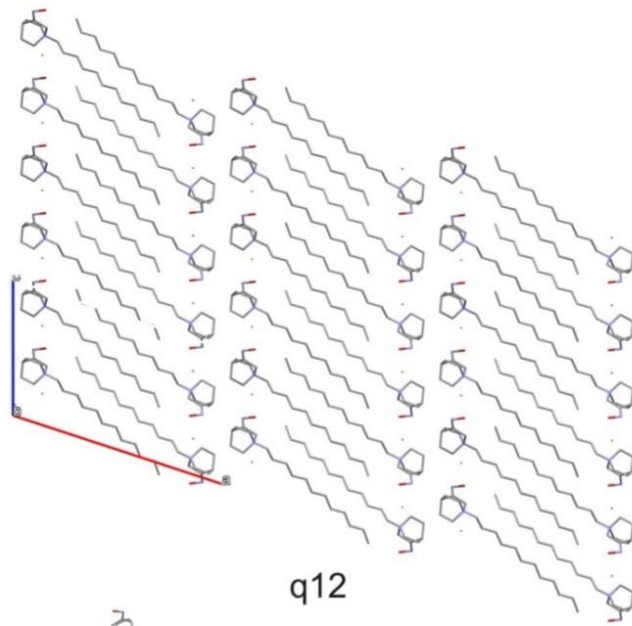
Iz literature je poznato da je i Menšutkinovu reakciju moguće izvesti mehanokemijskom sintezom.⁹ Pokušana je sinteza u mlinu mljevenjem reaktanata uz katalitičku količinu otapala. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom kroz dva sata ali nije primjećeno nastajanje produkta osim u tragovima. Zato je u reakcijsku smjesu pri sintezi spoja **5** dodan i natrijev jodid kako bi se alkil-bromid

preveo u odgovarajući alkil-jodid i tako dobio bolji elektrofil, (Shema 11). Praćenje reakcije tankoslojnom kromatografijom pokazalo je da u ovom slučaju primjenom mehanokemije nije moguće postići bolji prinos i brže reakcije. Stoga reakcije pripreve spojeva **6** i **7** nisu rađene budući da se reaktivnost alkil-halogenida smanjuje povećavanjem alkilnog lanca.

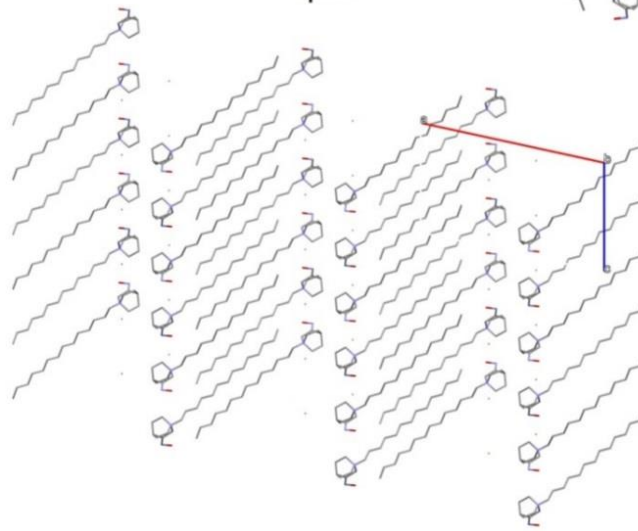


Shema 11. Mehanokemijska priprava spoja **5**.

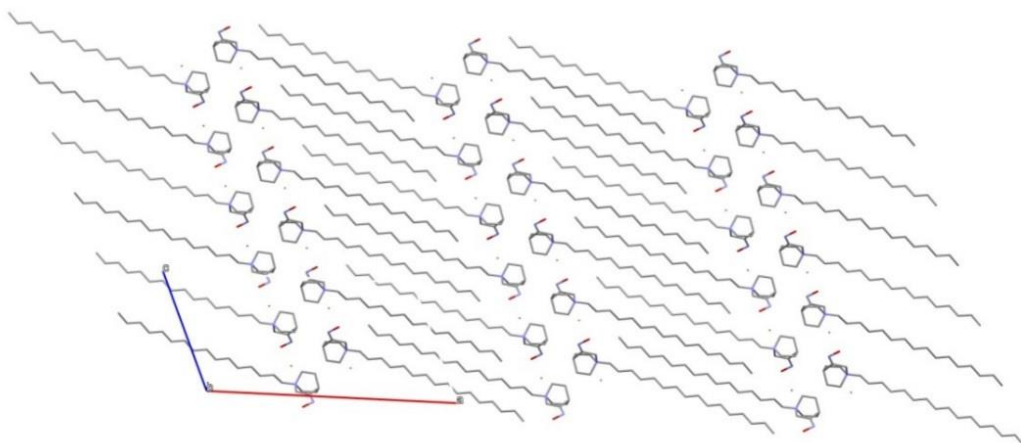
U suradnji s dr. sc. Darijom Jurašin i dr. sc. Zoranom Štefanićem, znanstvenim suradnicima s Instituta Ruđera Boškovića priređeni su monokristali sva tri kvaterna kinuklidinijeva spoja. Kristali su nastali polaganim uparavanjem skoro zasićene otopine acetonitrila pri sobnoj temperaturi i bili su pogodni za analizu difrakcije rentgenskog zračenja na monokristalu. Sva mjerenja provedena su na Xcalibur Nova X-ray difraktometru pri sobnoj temperaturi. Na slici 22. prikazane su kristalne strukture spojeva **5**, **6** i **7** duž b osi. Sve tri strukture kristaliziraju u prostornoj grupi $P 2_1/c$. Varijacije u duljini alkilnog lanca dovode do produljenja osi i malih promijena u kutu β , dok duljine b i c ostaju gotovo konstantne. Struktura je definirana međusobnim hidrofobnim interakcijama alifatskih lanaca koji čine slojeve. Način na koji se slažu molekule surfaktanata u kristalnoj fazi dobro je koreliran i s njihovim ponašanjem u vodnoj otopini.



q12



q14



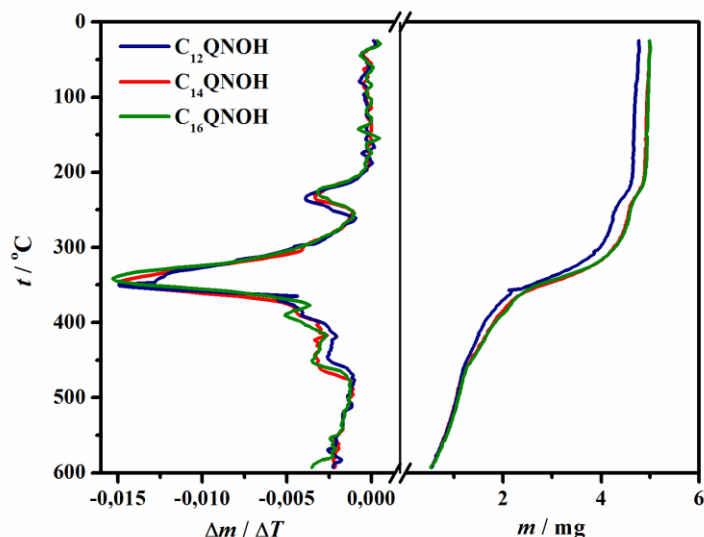
q16

Slika 22. Usporedba pakiranja u kristalnim strukturama spojeva **5** (q12), **6** (q14) i **7** (q16).

4. 1. 4. Kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina kao površinski aktivne tvari

U suradnji s dr. sc. Darijom Jurašin, znanstvenom suradnicom s Instituta Ruđera Boškovića ispitana su svojstva kvaternih derivata 3-hidroksiiminokinuklidina koji u svojoj strukturi sadrže dugački alkilni lanac **5-7** kao površinski aktivne tvari (PAT). Zbog svoje dualne prirode PAT pokazuju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva koja mogu doprinjeti boljoj biološkoj aktivnosti i dostupnosti. Skladištenje, rukovanje, rok trajanja te način primjene farmakološki aktivnih spojeva ovise i o njihovoj termičkoj stabilnosti. Prilikom zagrijavanja mnoge PAT ne prelaze izravno iz kristalnog u stanje izotropne taline. Umjesto prijelaza iz 3D uređenja kristala u neuređenu izotropnu talinu, javlja se jedan ili više faznih prijelaza, koji rezultiraju nastajanjem različitih polimorfa i/ili mezofaza. Termičko ponašanje kristala PAT ovisi o molekulskom pakiranju tj. o strukturi molekule.

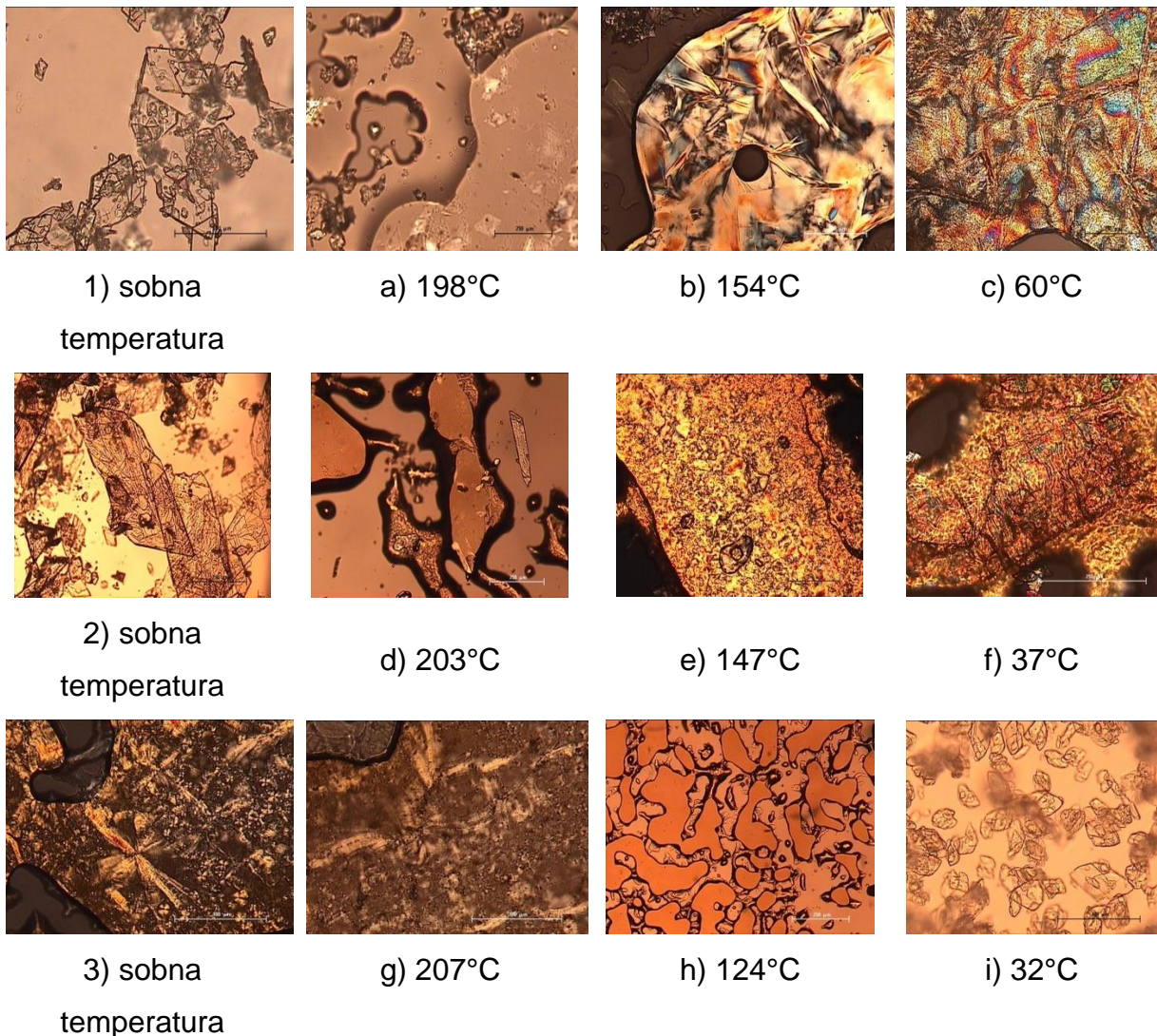
Taljenje svih ispitivanih kinuklidinijevih oksima prati početak raspada. Sam proces raspada odvija u nekoliko koraka što je vidljivo iz TGA-DTA krivulja, (Slika 23). Duljina alkilnog lanca ne utječe na termičku stabilnost ispitivanih spojeva – temperature početka, maksimuma i kraja raspada ne ovise o duljini alkilnog lanca.



Slika 23. TGA-DTA termogrammi kinuklidinijevih oksima.

Istraženi kinuklidinijevi oksimi prilikom zagrijavanja pokazuju svojstva karakteristična za PAT tj. umjesto izravnog prijelaza iz 3D uređenja kristala u neuređenu izotropnu

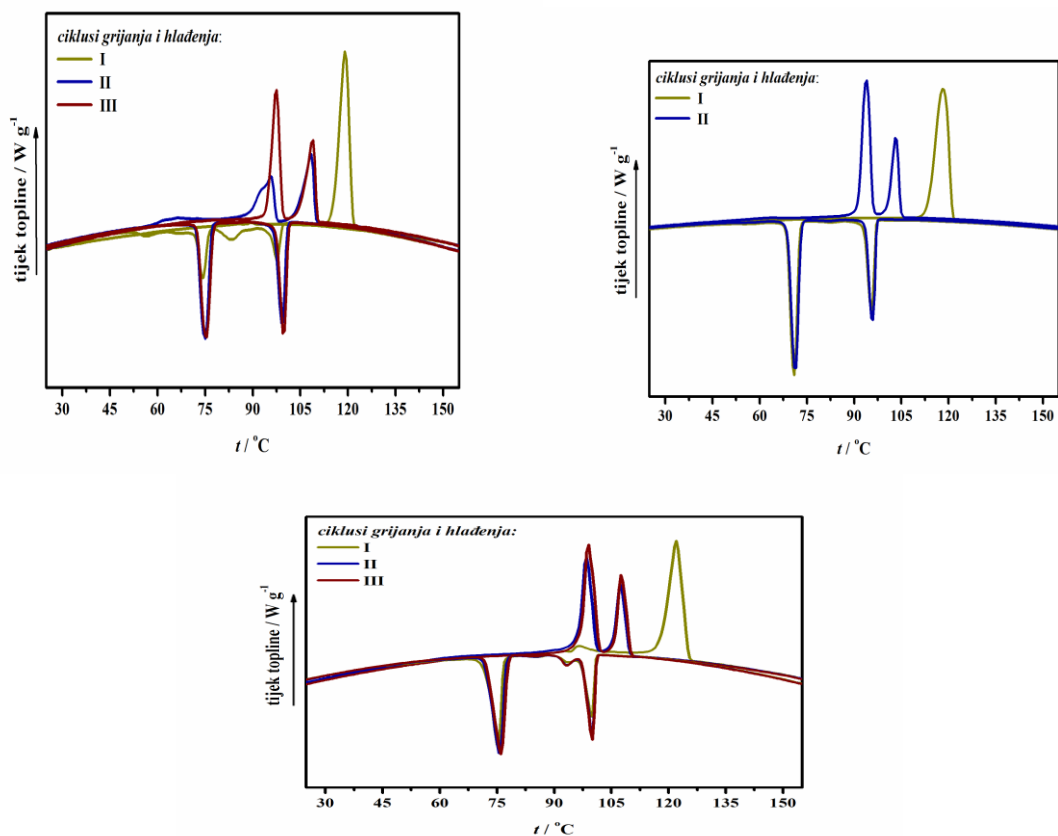
talinu, javlja se jedan ili više faznih prijelaza koji rezultiraju nastajanjem različitih polimorfa i/ili mezofaza. Mikrografije kinuklidinijevih oksima s različitom duljinom alkilnog lanca snimljene optičkim mikroskopom uz polarizirano svjetlo pri sobnoj temperaturi, grijanju (a, d, g) i hlađenju (b-c, e-f, h-i), prikazane su na slici 24.



Slika 24. Mikrografije kinuklidinijevih oksima snimljene optičkim mikroskopom: 1) spoj 5; 2) spoj 6; 3) spoj 7.

Povećanje duljine alkilnog lanca uzrokuje složenije termičko ponašanje istraženih kinuklidinijevih oksima što je vidljivo iz DSC krivulja, (Slika 25). Termičko ponašanje spoja 5 razlikuje se od onog opaženog kod spoja 6 i spoja 7. Npr. na DSC krivuljama hlađenja spoja 6 i spoja 7 opaženo je nekoliko maksimuma egzotermnih faznih prijelaza koji nisu opaženi kod spoja 5. Povećanjem duljine alkilnog lanca povećava

se i razlika u uzastopnim ciklusima grijanja i hlađenja na DSC krivuljama. Pri tome je kod spoja **7** vidljiva promjena čak i u trećem snimljenom ciklusu.



Slika 25. DSC krivulje grijanja i hlađenja snimane brzinom 10 °C/min: a) spoj **5**, b) spoj **6** i c) spoj **7**.

4. 1. 5. Antibakterijski potencijal novih spojeva

Patogene bakterije postaju sve rezistentnije na antimikrobne agense što postaje ozbiljna prijetnja zdravlju i smatra se jednim od najvećih izazova medicine danas, Poseban problem predstavljaju infekcije Gram-negativnim bakterijama za koje trenutno postoji vrlo mali broj efikasnih antibiotika. Stoga postoji potreba za pronalaženjem i razvojem antibiotika nove generacije koji mogu odgovoriti ovim izazovima. Spojevi **5-7** testirani su kao antimikrobni agensi u suradnji s izv. prof. dr. sc. Marijanom Skočibušić sa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u

Splitu. Rezultati su prikazani u tablici 2. Svi spojevi pokazali su dobru bakteriostatsku aktivnost i inhibiraju različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određena je u rasponu od 0,50 to 125,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$ i uspoređena sa standardima (gentamicinom i cefotaximom). Najveći spektar antibakterijskog djelovanja pokazao je spoj **5** koji je bolji antibiotik od *Gentamicina* kod *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, a u rangu je *Cefotaxima* kod *Enterococcus faecalis*. Spoj **6** se pokazao boljim od *Gentamicina* također kod *Pseudomonas aeruginose* ali i *Escherichie coli*.

Tablica 2. Antimikrobna aktivnost: minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) 3-hidroksiiminokinuklidinijevih spojeva 5-7 s različitim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.

Spoj:	5	6	7	<i>Gentamicin</i> *	<i>Cefotaxime</i> *
	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
<i>Bacillus cereus</i> ^a	26.5	58	58.3	4	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> ^a	0.5	62.5	50	4	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	0.9	28	125	1	0.5
<i>Clostridium perfringens</i> ^a	8.7	17.5	85	0.5	0.1
<i>Escherichia coli</i> ^b	35.5	17.9	13	32	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	3.9	27	50	8	0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	27.2	46	100	64	16
<i>Chronobacter sakazakii</i> ^b	23	27	27	8	8

*standard; ^a Gram-pozitivna bakterija; ^b Gram-negativna bakterija

5. ZAKLJUČAK

- Klasičnom sintetskom metodom s hidroksilaminom opisanom u literaturi te novim mehanokemijskim postupkom sintetizirani su 3-hidroksiiminokinuklidinijev klorid (**1**) i 3-hidroksiiminokinuklidin (**2**). Oksim je pripremljen mehanokemijski bez otapala (uz dodatak katalitičke količine etanola) i bez dodatka baze čak i kad je reakcija izvođena s 3-oksokinuklidinijevim kloridom. Pripremljen je i *N*-metil-3-oksokinuklidinijev jodid (**3**) te dokazano da je uloga kinuklidinijevog dušikovog atoma presudna za odvijanje reakcije bez dodane baze u slučaju potpuno protoniranih reaktanata.
- Klasičnom sintetskom metodom, Menšutkinovom reakcijom, pripremljena su tri nova, do sada u literaturi neopisana, spoja: *N*-dodecil-3-hidroksiiminokinuklidinijev bromid (**5**), *N*-tetradecil-3-hidroksiiminokinuklidinijev bromid (**6**) i *N*-heksadecil-3-hidroksiiminijev bromid (**7**). Mehanokemijska sinteza nije bila efikasna zamjena klasičnoj sintezi u suhom acetonu niti uz dodatak natrijevog jodida radi aktivacije elektrofila. Spojevi su okarakterizirani i određene su im kristalne strukture.
- Kinuklidinijevi oksimi **5**, **6** i **7** pokazuju svojstva karakteristična za površinski aktivne tvari: javlja se jedan ili više faznih prijelaza koji rezultiraju nastajanjem različitih polimorfa i/ili mezofaza. Utvrđeno je da duljina alkilnog lanca ne utječe na termičku stabilnost ispitivanih spojeva. Svi spojevi pokazali su dobra antibakterijska svojstva. Najveći spektar i najjače antibakterijsko djelovanje pokazao je *N*-dodecilni derivat **5** (*Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*), dok je spoj **6** pokazao dobru aktivnost i prema bakterijama *Escherichia coli*.

6. LITERATURNI IZVORI

-
- ¹ M. D. Mashkovsky, L. N. Yakhontov, *Progress in Drug Research* **13** (1969) 293-339.
- ² I. Primožič, S. Tomić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 401–409.
- ³ G. A. Bohme, S. R. Letchworth, O. Piot-Grosjean, G. J. Gatto, M.-C. Obinu, W. S. Caldwell, M. Laville, P. Brunel, R. Pellerin, J.-P. Leconte, *Drug Dev. Res.* **62** (2004) 26-40.
- ⁴ A. Venkateswaran, Y. T. Reddy, V. N. Sonar, V. Muthusamy, P. a Crooks, M. L. Freeman, K. R. Sekhar, *Bioor. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 7323-7326.
- ⁵ V. Meyer i A. Janny, *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft* **15** (1882) 1164–1167.
- ⁶ G. L. Kad, M. Bhandari, J. Kaur, R. Rathee and J. Singh, *Green Chemistry* **3** (2001) 275–277.
- ⁷ L. Saikia, J. M. Baruah i A. J. Thakur, *Organic and Medicinal Chemistry Letters* **1** (2011) 12
- ⁸ S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, i dr., *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 413–447.
- ⁹ V. Bušić, D. Gašo-Sokač, S. Kovač, *Croat. Chem. Acta* **86** (2013) 331–334.
- ¹⁰ T. Friščić, I. Halasz, V. Štrukil, M. Eckert-Maksić, R. E. Dinnebierd, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 367–378.
- ¹¹ C. B. Aakeröy, A. S. Sinha, K. N. Epa, C. L. Spartz i J. Desper, *Chem. Commun.* **48** (2012) 11289–11291.
- ¹² I. Damljanović, M. Vukičević i R. D. Vukičević, *Monatshefte für Chemie* **137** (2006) 301–305.
- ¹³ R. J.Farn, *Chemistry and technology of Surfactants*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006.
- ¹⁴ P. S Piispanen, *Synthesis and Characterization of Surfactants Based on Natural Products*, Doktorska disertacija, Kung Tekniska Hogskolan, Stockholm, 2002.

-
- ¹⁵ T. Jurkin, M. Gotić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 389-399.
- ¹⁶ D. Myers, *Surfactant Science and Technology*, 3. izdanje, *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, 2006.
- ¹⁷ M.J. Rosen, J. T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 4. izdanje, *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, 2012.
- ¹⁸ N. Filipović-Vinceković, V. Tomašić, *Solid-State Transitions of Surfactant Crystals, Thermal Behaviour of Dispersed Systems, Surfactant Science Series, Marcel Dekker Inc.*, New York, 2001.
- ¹⁹ D. Jurašin, *Odnos strukture i svojstava kationskih, oligomernih površinskih aktivnih tvari i kationskih smjesa*, Doktorska disertacija, *Prirodoslovno – matematički fakultet u Zagrebu*, Zagreb, 2010.
- ²⁰ N. Filipović-Vinceković, V. Tomašić, I. Pucić, Đ. Težak, *Journal of colloid and interface science* **188** (1997) 396-403.
- ²¹ T.F. Tadros, *Applied Surfactants: Principles and Applications*, *Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 2005.
- ²² M. Pavela-Vrančić, J. Matijević, *Primijenjena organska kemija u konzervaciji i restauraciji*, 1. Izdanje, *Prirodoslovno – matematički fakultet u Splitu*, Split, 2009.
- ²³ J. Falbe, *Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application*, *Springer – Verlag Heidenberg*, 1987.
- ²⁴ R. Engel, J. I. Rizzo, C. Rivera, M. Ramirez, M. L. Huang, D. Montenegro, C. Copodiferro, V. Behaj, M. Thomas, B. Klaritch – Vrana, J. F. Engel, *Chemistry and Physics of Lipids* **158** (2009) 61-69.
- ²⁵ L.Y. Zakharova, T.N. Pashirova, R. R. Kashapov, E. P. Zhil'tsova, N. K. Gaisin, O. I. Gnezdilo, A. B. Konov, S. S. Lukashensko, I. M. Magdeev, *Kinet. Catal.* **52** (2011) 179-185.
- ²⁶ J. Shimizu, K. Imamura, T. Nogami, H. Mikawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **59** (1986) 1443-1448.
- ²⁷ J. Shimizu, K. Imamura, T. Nogami, H. Mikawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **59** (1986) 2699-2705.

²⁸ J. Shimizu, K. Imamura, T. Nogami, H. Mikawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **59** (1986) 3367-3373.

²⁹ L. H. Sternbach, S. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 2215–2218.

³⁰ C. A. Grob, E. Renk, *Helv. Chim. Acta* **37** (1954) 1689- 1698.

³¹ G. Rothenberg, A. P. Downie, C. L. Raston, J. L. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 8701–8708.

³² O. Dolotko, J. W. Wiench, K. W. Dennis, V. K. Pecharsky, V. P. Balema, *New J. Chem.* **34** (2010) 25–28.

³³ D. Cinčić, I. Brekalo, B. Kaitner, *Chem. Comm.* **48** (2012) 11683–11685.

³⁴ Alexander B. Rudine, Michael G. Walter, and Carl C. Wamser, *J. Org. Chem.* **75** (2010) 4292–4295.

Popis kratica i simbola

ABCO	1-alkil-1-azobiciklo[2.2.2]oktan
<i>cmc</i>	kritična micelizacijska koncentracija
DABCO	1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktan
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
PAT	površinski aktivne tvari
TLC	tankoslojna kromatografija

SAŽETAK

Lucija Krišto i Ivana Križić

SINTEZA NOVIH KINUKLIDINIJEVIH SPOJEVA KAO MOGUĆIH POVRŠINSKI AKTIVNIH TVARI

SAŽETAK:

Pripravljene su nove, do sada u literaturi neopisane kvaterni derivati 3-hidroksiiminokinuklidina s alkilnim lancima različitih duljina (C_{12} , C_{14} i C_{16}) da bi se istražila njihova svojstva kao površinski aktivnih tvari. Komercijalno dostupni kinuklidin-3-on preveden je u ketoksim standardnim sintetskim postupkom i mehanokemijski. Opisana je po prvi put sinteza heterocikličkog oksima mehanokemijski bez otapala i bez korištenja dodatne baze, a reakcije su praćene FT-IR spektroskopijom. Kvaternizacijom oksima s odgovarajućim alkil-bromidima pripravljene su *N*-dodecil, *N*-tetradecil i *N*-heksadecil-3-hidroksiiminokinuklidinijevi bromidi. Svi pripravljene spojevi dobiveni su u dobrom iskorištenju te dokazani standardnim analitičkim metodama. Određena je i kristalna struktura te utjecaj duljine alkilnog lanca na termička svojstva novosintetiziranih kinuklidinijevih oksima. Svi novosintetizirani kinuklidinijevi oksimi pokazuju termotropni polimorfizam i mezomorfizam ovisno o duljini alkilnog lanca. Novi spojevi pokazali su i izvrsna antibakterijska svojstva, posebno *N*-dodecilni derivat kinuklidinijevog oksima.

Ključne riječi: sinteza heterocikličkog oksima / mehanokemijska sinteza / kvatrnizacijske reakcije / površinski aktivne tvari / antimikrobna svojstva

ABSTRACT

Lucija Krišto i Ivana Križić

SYNTHESIS OF NOVEL QUINUCLIDIUM COMPOUNDS AS POTENTIAL SURFACE ACTIVE AGENTS

ABSTRACT:

Three novel, differently substituted 3-hydroxyiminoquinuclidine derivatives were prepared in order to evaluate their potential as surface active agents. Firstly, 3-hydroxyiminoquinuclidine was prepared using classical synthetic methods and mechanochemical synthesis. For the first time, mechanochemical pathways for the transformation of *N*-heterocyclic carbonyl compound into oxime using hydroxylamine hydrochloride was explored. Reactions were performed without any base since the quinuclidinium moiety has an intrinsic basic nitrogen atom. Reactions were monitored by FT-IR spectroscopy. Quaternization of prepared 3-hydroxyiminoquinuclidine was carried out with dodecyl, tetradecyl and hexadecyl bromides. All compounds were prepared in satisfactory yields and characterized by standard analytical methods. Single crystal analysis was performed and thermic properties of potential surfactants were determined. Furthermore, all of the newly synthesized oxime surfactants were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity. The highest and broadest antibacterial activity was shown by the compound with *N*-dodecyl chain.

Keywords: synthesis of heterocyclic oximes / mechanochemical synthesis / quaternization reactions/ surface active agents / antimicrobial properties

ŽIVOTOPISI

Lucija Krišto

Rođena sam u Zagrebu 13.12.1990. Nakon završene opće gimnazije, upisala sam Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu kojeg sam završila 2014. godine. Trenutno sam studentica 1. godine istraživačkog smjera Diplomskog studija kemije, gdje sam kao glavne grane izabrala analitičku i organsku kemiju.

Sudjelovala sam na X. Susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem Darija Jurašin, Lucija Krišto, Ivana Križić, Irina Pucić, Ines Primožič, Srđanka Tomić: *Sinteza i termička svojstva kinuklidinijevih površinski aktivnih tvari* te na znanstvenom radu *Mechanochemical and Conformational Study of N - heterocyclic Carbonyl - Oxime Transformations* u časopisu *Croatica Chemica Acta*, **87** (2014) 155-162.

U suradnji s kolegicom Ivanom Križić napravila sam program te organizirala dječje znanstvene rođendane Educarena sportskog centra za djecu, gdje preko Student servisa radim nešto više od 3 godine. Program sadrži više od 10 eksperimenata prilagođenih dobi djece te raznovrsne igre znanstvene tematike koje djeci na zabavan način približavaju znanost.

Ivana Križić

Rođena sam u Zagrebu 09. ožujka 1990. godine. Završila sam Osnovnu školu „Granešina” te 2004. godine upisala II. Gimnaziju u Zagrebu nakon koje sam upisala Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno–matematičkom fakultetu. Godine 2014. stekla sam zvanje sveučilišne prvostupnice kemije te iste godine upisala Diplomski studij kemije, smjer Organska i Analitička kemija.

2014. godine s posterskim priopćenjem pod naslovom Darija Jurašin, Lucija Krišto, Ivana Križić, Irina Pucić, Ines Primožič, Srđanka Tomić: *Sinteza i termička svojstva kinuklidinijevih površinskih aktivnih tvari*, sudjelovala sam na X. Susretu mladih kemijskih inženjera. Iste godine koautorica sam u radu objavljenom u časopisu *Croatica Chemica Acta*; Ines Primožič, Tomica Hrenar, Krešimir Baumann, Lucija Krišto, Ivana Križić, Srđanka Tomić, *Mechanochemical and Conformational Study of N – heterocyclic Carbonyl – Oxime Transformations*, *Croatica Chemica Acta*, **87** (2014) 155-162. Tijekom studija radila sam na znanstvenim rođendanima u Dječjoj sportskoj akademiji.