

# **Stabilnost limunske kiseline u vodenim otopinama. <sup>1</sup>H NMR studija**

---

**Tokić, Matko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:744603>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Matko Tokić**

**Stabilnost limunske kiseline u vodenim  
otopinama.**

**$^1\text{H}$  NMR studija**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

*Veliko hvala mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći  
tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se brojnim prijateljima i kolegama na pomoći i društvu tijekom studiranja, a  
posebno zahvaljujem prijatelju Marku Zlodiju na suradnji i pomoći prilikom izrade  
eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.*

*Najveća zahvala ide mojoj obitelji, zbog razumijevanja, pomoći i bezuvjetnoj podršci tijekom  
školovanja i studiranja.*

# SADRŽAJ

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | UVOD .....  | 1  |
| 1.1.   | Limunska kiselina.....  | 1  |
| 1.2.   | NMR .....   | 2  |
| 2.     | OBRAZLOŽENJE TEME .....   | 5  |
| 3.     | MATERIJALI I METODE .....   | 6  |
| 3.1.   | Materijali .....  | 6  |
| 3.1.1. | Kemikalije .....  | 6  |
| 3.1.2. | Pribor i instrumenti.....   | 6  |
| 3.1.3. | Programski alati.....   | 7  |
| 3.2.   | Metode .....  | 8  |
| 3.2.1. | $^1\text{H}$ NMR spektroskopija .....   | 8  |
| 3.2.2. | Sinteza nanočestica .....   | 8  |
| 4.     | RASPRAVA I REZULTATI.....   | 9  |
| 4.1.   | Interpretacija $^1\text{H}$ NMR spektara limunske kiseline .....                          | 9  |
| 4.2.   | Utjecaj aeracije na stabilnost limunske kiseline u vodenoj otopini.....                   | 11 |
| 4.3.   | Utjecaj pH vodene otopine na stabilnost limunske kiseline .....                           | 12 |
| 4.3.1. | Utjecaj koncentracije limunske kiseline u vodenoj otopini na $^1\text{H}$ NMR spektar.... | 15 |
| 4.4.   | Utjecaj zagrijavanja na stabilnost limunske kiseline u vodenoj otopini.....               | 17 |
| 5.     | ZAKLJUČAK .....   | 22 |
| 6.     | LITERATURA .....  | 23 |
| 7.     | SAŽETAK/SUMMARY .....   | 24 |
| 7.1.   | Sažetak.....  | 24 |
| 7.2.   | Summary.....  | 25 |

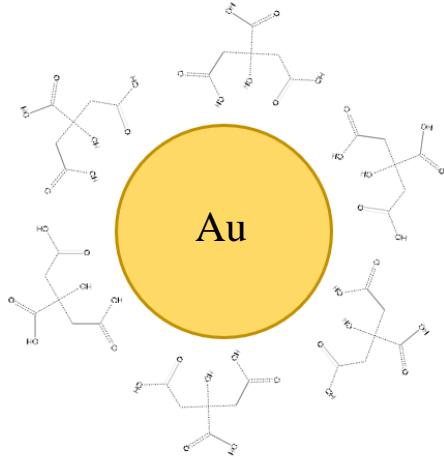
# 1. UVOD

## 1.1. Limunska kiselina

Limunska kiselina izolirana je iz limuna još u 18. stoljeću te zbog dugogodišnje povijesti istraživanja danas je jedna od najkorištenijih organskih kiselina u svijetu. Ova slaba organska kiselina ima tri karboksilne skupine u svojoj strukturi ( $pK_a1 = 3.13$ ,  $pK_a2 = 4.76$ ,  $pK_a3 = 6.39$ ) (Kirimura i sur., 2011). U obliku bijele prozirne krutine bez mirisa, limunska kiselina se javlja u čistom i monohidratnom obliku te je vrlo topljiva u vodi i drugim organskim otapalima poput etanola, acetonitrila i 2-propanola (Daneshfar i sur., 2011). Karakterizira je kemijska inertnost, ekološka prihvatljivost i jednostavnost proizvodnje, što je čini široko primjenjivom u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Koristi se kao antioksidans, konzervans, korigens okusa te u kombinaciji sa solima limunske kiseline kao pufer (Ciriminna i sur., 2017).

Važno je napomenuti da limunska kiselina ima značajnu ulogu na staničnoj razini, sudjelujući u Krebsovom ciklusu, također poznatom kao „Ciklus limunske kiseline“. U ovom aerobnom metaboličkom procesu proizvodnje energije, limunska kiselina služi kao prijenosnik dva ugljikova atoma (Ciriminna i sur., 2017).

U okviru ovog diplomskog rada, limunska kiselina se spominje u kontekstu sinteze nanočestica zlata. U toj sintezi, limunska kiselina djeluje kao reducens koji reducira ione zlata u elementarno zlato, istovremeno djelujući i kao stabilizator koji formira zaštitni sloj oko nanočestica zlata, sprječavajući njihov daljnji rast i agregaciju manjih čestica u veće (Ghosh i sur., 2011). Nastale nanočestice zlata posjeduju poboljšana svojstva i pogodne su za upotrebu u biomedicinske svrhe kao što su antispeticke obloge, nosači lijekova i gena, te kao biosenzori (Pem i sur., 2021).



Slika 1: Skica nanočestice zlata obložene molekulama limunske kiseline (tzv. coating agent)

## 1.2. NMR

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje strukture organskih i anorganskih molekula. Također se često koristi i u kombinacijama s drugim analitičkim tehnikama za određivanje strukture makromolekula, ali i za istraživanja različitih biokemijskih procesa (Wade, 2017).

NMR je tehnika koja proučava jezgre s neparnim atomskim brojem jer one posjeduju svojstvo koje se naziva nuklearni spin. Najčešće jezgre koje se proučavaju NMR spektroskopijom su  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{31}\text{P}$ . Proton ( $^1\text{H}$ ) posjeduje svojstvo nuklearnog spina odnosno njegova jezgra ima neparni atomski broj 1 te se može predočiti kao pozitivni naboj koji zbog svoje rotacije stvara vlastito magnetsko polje nasumične orijentacije. Primjenom jačeg vanjskog magnetskog polja većina orijentacija magnetskog polja protona poprimit će isti vektorski smjer kao vanjsko magnetsko polje, a dio će poprimiti suprotan vektorski smjer (vidi sliku 2). Jezgra čije je magnetsko polje u smjeru vanjskog magnetskog polja nalazi se u nižem energetskom stanju i takvo stanje se naziva  $\alpha$  spinsko stanje, a jezgra koja se orijentira na način da joj je magnetsko polje u suprotnom smjeru od vanjskog magnetskog polja nalazi se u višem energetskom stanju koje se naziva  $\beta$  spinsko stanje (vidi sliku 2). Energetska razlika između ta dva spinska stanja će biti veća ako je vanjsko magnetsko

polje jače. Proporcionalan odnos između energetske razlike između dva stanja i jačine magnetskog polja opisuje jednadžba:

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \vec{B}$$

gdje je:

$\Delta E$  = energetska razlika između alfa i beta spinskog stanja

$h$  = Planckova konstanta

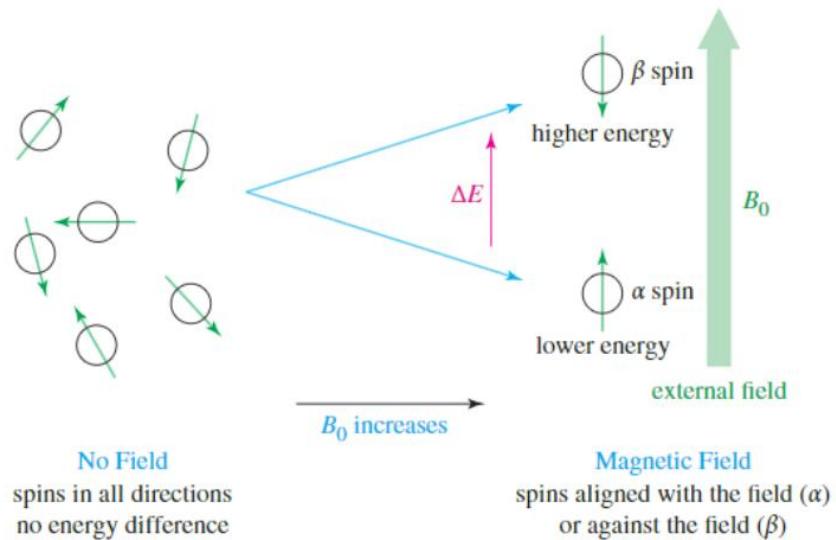
$\vec{B}$  = jačina vanjskog magnetnog polja

$\gamma$  = žiromagnetski omjer

Energetska razlika ( $\Delta E$ ) može se izraziti kao umnožak Planckove konstante ( $h$ ) i frekvencije ( $v$ ) pa dobivamo konačni oblik jednadžbe:

$$v = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot \vec{B}$$

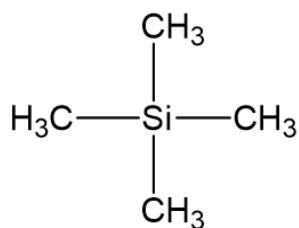
Ako jezgra protona apsorbira elektromagnetsko zračenje čija je energija odnosno frekvencija jednaka energetskoj razlici između  $\alpha$  i  $\beta$  spinskog stanja, dolazi do prijelaza iz  $\alpha$  u  $\beta$  spinsko stanje. Takvu apsorpciju elektromagnetskog zračenja mjeri NMR uređaj, a frekvencija tog zračenja zove se Larmor frekvencija ili frekvencija rezonancije.



Slika 2: Orientacija magnetskih polja protona nakon primjene vanjskog magnetskog polja određene jačine (Wade, 2017).

NMR spektar koji prikazuje intenzitet apsorpcije (y-os) u ovisnosti o jačini magnetskog polja (x-os), odnosno frekvenciji rezonancije. S obzirom na to da su razlike u magnetskim poljima pri kojima različiti protoni apsorbiraju vrlo male, praktični razlozi su doveli do zamjene jačine magnetskog polja ili frekvencije rezonancije s kemijskim pomakom ( $\delta$ ) na x-osi. Kemijski pomak je veličina koja pokazuje razliku između frekvencije rezonancije nekog protona u molekuli i frekvencije rezonancije protona u referentnoj molekuli tetrametilsilanu. Tetrametilsilan se koristi kao referentni spoj zbog toga što su njegovi protoni izrazito zasjenjeni, što rezultira apsorpcijom svih ostalih protona pri nižim magnetskim poljima od njegovih protona (vidi sliku 3).

Kemijski pomak za određeni proton u organskoj molekuli izračunava se kao razlika između frekvencije rezonancije (izraženih u Hz) promatranog protona i protona iz tetrametilsilana. Taj rezultat se zatim dijeli s ukupnom frekvencijom spektrometra (izraženom u MHz) zbog čega korištenje kemijskog pomaka omogućava usporedbu spektara između različitih NMR uređaja koji se razlikuju po ukupnoj frekvenciji odnosno jačini magneta. Mjerna jedinica za kemijski pomak je ppm (parts per million) (Wade, 2017).



*Slika 3: Kemijska struktura tetrametilsilana (TMS)*

Osim intenziteta apsorpcije i jačine magnetskog polja pri kojem određeni proton apsorbira, NMR spektar pruža informacije o spiskom sprezanju. Spinsko sprezanje odnosi se na utjecaj protona koji se nalaze na susjednim ugljikovim atomima te imaju različito kemijsko okruženje, na izgled spektra promatranog protona.

Cijepanje signala je recipročno svojstvo, što znači da ako proton A utječe na signal protona B, isto tako proton B utječe na signal protona A. Općenito, broj signala za promatrani proton ovisi o broju različitih susjednih protona, te se računa prema principu  $N+1$ . Na primjer, proton okružen s tri

kemijski ekvivalentna protona daje signal u obliku kvarteta, dok proton okružen s četiri kemijski ekvivalentna protona daje signal u obliku kvinteta (Clayden i sur., 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ovo istraživanje je provedeno u okviru projekta koji se provodi na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Prethodna istraživanja o pripremi nanočestica zlata u prisutnosti cisteina, provedena putem NMR studija, otkrila su da dolazi do oksidacije i dimerizacije cisteina u cistin u reakcijskim uvjetima priprave nanočestica (smjesa HAuCl<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub> i cisteina u vodi) (Pem i sur., 2021). Potaknuti tim rezultatima kao nastavak spomenutog projekta, provedene su dvije nove NMR studije s ciljem ispitivanja subbine limunske kiseline tijekom priprave nanočestica zlata.

Jedna NMR studija istražuje promjene u strukturi limunske kiseline tijekom pripreme nanočestica zlata (Zlodi, 2023). Budući da se priprava nanočestica zlata s limunskom kiselom odvija u vodenoj otopini, druga NMR studija, odnosno ovaj diplomski rad, fokusiran je na ispitivanje stabilnosti limunske kiseline u vodenim otopinama. Stabilnost limunske kiseline provjerava se u uvjetima koji odgovaraju onima tijekom sinteze nanočestica zlata kako bi se provjerila stabilnost limunske kiseline tijekom priprave istih.

Osim promjena u strukturi limunske kiseline, u ovom diplomskom radu istražuje se i objašnjava utjecaj različitih fizikalno-kemijskih uvjeta na mjerljive promjene u <sup>1</sup>H NMR spektru. Potrebno je detaljno provjeriti kako promjene reakcijskih uvjeta mogu utjecati na kemijski pomak ili intenzitet signala u <sup>1</sup>H NMR spektrima. Te su informacije nužne za tumačenje spektralnih promjena uočenih tijekom priprave nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije**

Citrat monohidrat (limunska kiselina, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich)

Tetrakloraurat trihidrat (1%tna otopina, HAuCl<sub>4</sub> x3H<sub>2</sub>O) – korišten za sintezu nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline

Milli-Q voda (H<sub>2</sub>O) – ultrafiltracijom pročišćena deionizirana voda od proizvođača Millipore.

Deuterirana voda (D<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich) - deuterijskim izotopom obilježena voda koja je potrebna za NMR snimanja.

Ftalatni pufer – korišten za održavanje kiselosti vodene otopine limunske kiseline pri pH vrijednosti 4.

Klorovodična kiselina (HCl) – korištena za zakiseljavanje vodene otopine limunske kiseline na pH vrijednost 1.

##### **3.1.2. Pribor i instrumenti**

Za izradu ovog diplomskog rada korišten je laboratorijski pribor: automatska pipeta, okrugla tikvica, Liebigovo hladilo, uljna kupelj, magnetski mješač, grijalica s magnetskom miješalicom, metalni stalak, hvataljke i termometar. Koristila se i NMR kapilara s deuteriranom vodom potrebnom kao izvor „lock“ signala za NMR snimanje spektara. Za snimanje NMR spektara korišten je NMR instrument Varian INOVA 400 koji proizvodi magnetsko polje jačine 9,4T što uzrokuje rezonanciju <sup>1</sup>H protonskih jezgara na frekvenciji od 400MHz.



*Slika 4: NMR instrument Varian INOVA 400*

### 3.1.3. Programske alati

OpenVnmrJ VERSION 3.1 REVISION A - programski sustav za snimanje, interpretaciju i vizualizaciju NMR spektara.

MestReNova - program za interpretaciju NMR spektara. U ovom diplomskom radu koristio se za analizu snimljenih spektara, korekciju bazne linije, precizno očitavanje kemijskog pomaka određenih signalata, komparaciju dva ili više spektara i korekciju rezidualnog signala vode.

NMRium – online platforma koja na temelju određene baze podataka stvara NMR spektre za zadanu strukturu spoja. U ovom diplomskom korištena je kao dodatna potvrda dobivenih rezultata zbog nedostatka znanstvene literature.

ChemSketch – program za crtanje kemijskih struktura.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. $^1\text{H}$ NMR spektroskopija

Priprema uzorka za NMR analizu i „Pre – SAT“:

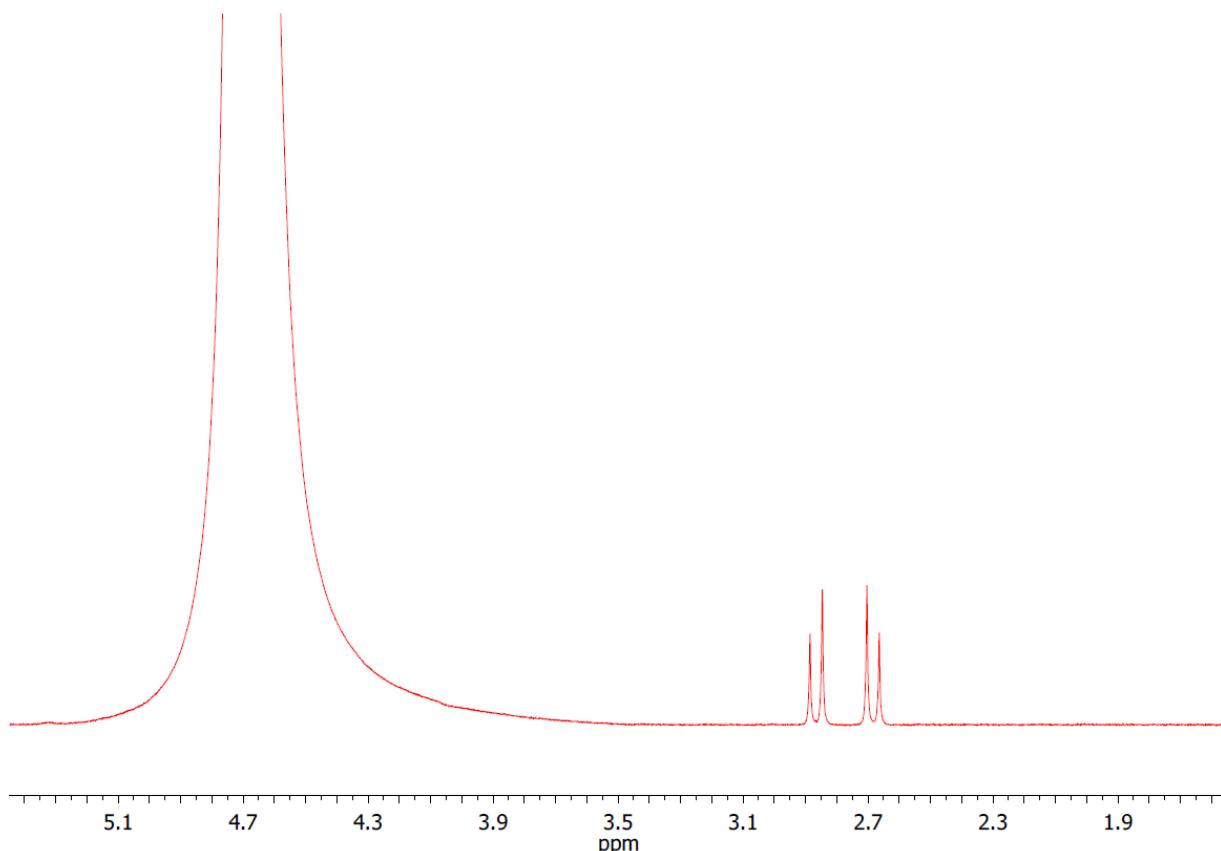
U čistu i suhu NMR cjevčicu stavi se oko 0,5 mL uzorka. U kapilaru za određivanje tališta stavi se oko 10  $\mu\text{L}$  deuterirane vode te se ista zataljena stavlja u NMR cjevčicu sa uzorkom. Deuterirana voda se može i izravno dodati u uzorak, no tada je potrebno uračunati razrjeđenje uzorka. Za visoku razlučivost NMR spektrometra potrebno je homogeno i konstantno magnetno polje koje se postiže uz pomoć posebnog „lock“ – sustava u NMR spektrometru. Također, zbog bolje rezolucije NMR spektra za neka snimanja korištena je funkcija „Pre-SAT“. Presaturacija je tehnika koja se koristi za suprimiranje nepoželjnih signala otapala tijekom NMR snimanja. Ona uključuje emitiranje zračenja specifične radiofrekvencije kako bi se saturirao neki nepoželjni signal. Ova tehnika je u eksperimentu ovog diplomskog rada korištena za presaturaciju signala vode. Rezultat je supresija signala vode i bolja rezolucija spektra (Mo i Raftery, 2008).

### 3.2.2. Sinteza nanočestica

U prethodno očišćenu i posušenu okruglu tikvicu s magnetskim mješačem dodaje se 0,5 mL, 1%-tne vodene otopine tetrakloraurata trihidrata ( $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) i 50 mL MilliQ vode. Smjesa se zagrijava do vrenja na uljnoj kupelji uz refluks koristeći Liebigovo hladilo za kondenzaciju. Nakon što se smjesa zagrijala do vrenja dodaje se 0,25 – 2 mL 34 mM vodena otopina citrat monohidrata (limunska kiselina) i nastavlja se zagrijavanje 15 minuta. Nakon toga smjesa se ostavlja hladiti na sobnoj temperaturi. Promjena boje smjese iz bezbojne u ljubičastu ili tamnocrvenu upućuje na nastajanje nanočestica zlata. Uloga limunske kiseline u toj sintezi je redukcija tetrakloraurata trihidrata u elementarno zlato i stabilizacija nastalih nanočestica zlata. Veličina nanočestica zlata ovisi o volumenu dodane 34mM vodene otopine citrat monohidrata (Ghosh i sur., 2011).

## 4. RASPRAVA I REZULTATI

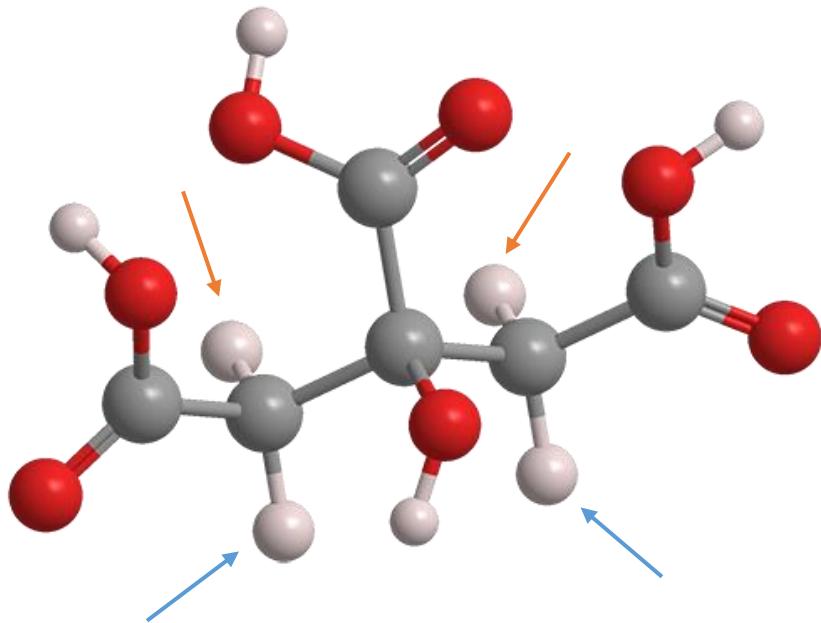
### 4.1. Interpretacija $^1\text{H}$ NMR spektara limunske kiseline



Slika 5:  $^1\text{H}$  NMR spektar limunske kiseline u teškoj vodi

Na slici 5 prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar limunske kiseline u vodenoj otopini koncentracije 0,05M. U području nižeg magnetskog polja vidi se signal vode (oko 4,7 ppm), a u području višeg magnetskog polja par dubleta. Par dubleta nalazi se pri uprosječenom kemijskom pomaku od 2,78 ppm. Signal odgovara protonima dvije  $-\text{CH}_2$  skupine u molekuli limunske kiseline. Protoni se u  $-\text{CH}_2$  skupini razlikuju odnosno nisu kemijski ekvivalentni te razlikujemo  $\text{H}_a$  i  $\text{H}_b$  proton.  $\text{H}_a$  i  $\text{H}_b$  protoni se nazivaju dijastereoizomernim protonima što znači da zamjenom  $\text{H}_a$  protona za neki atom X nastaje jedan spoj, a zamjenom  $\text{H}_b$  protona za isti atom X nastaje novi spoj koji se od prvog

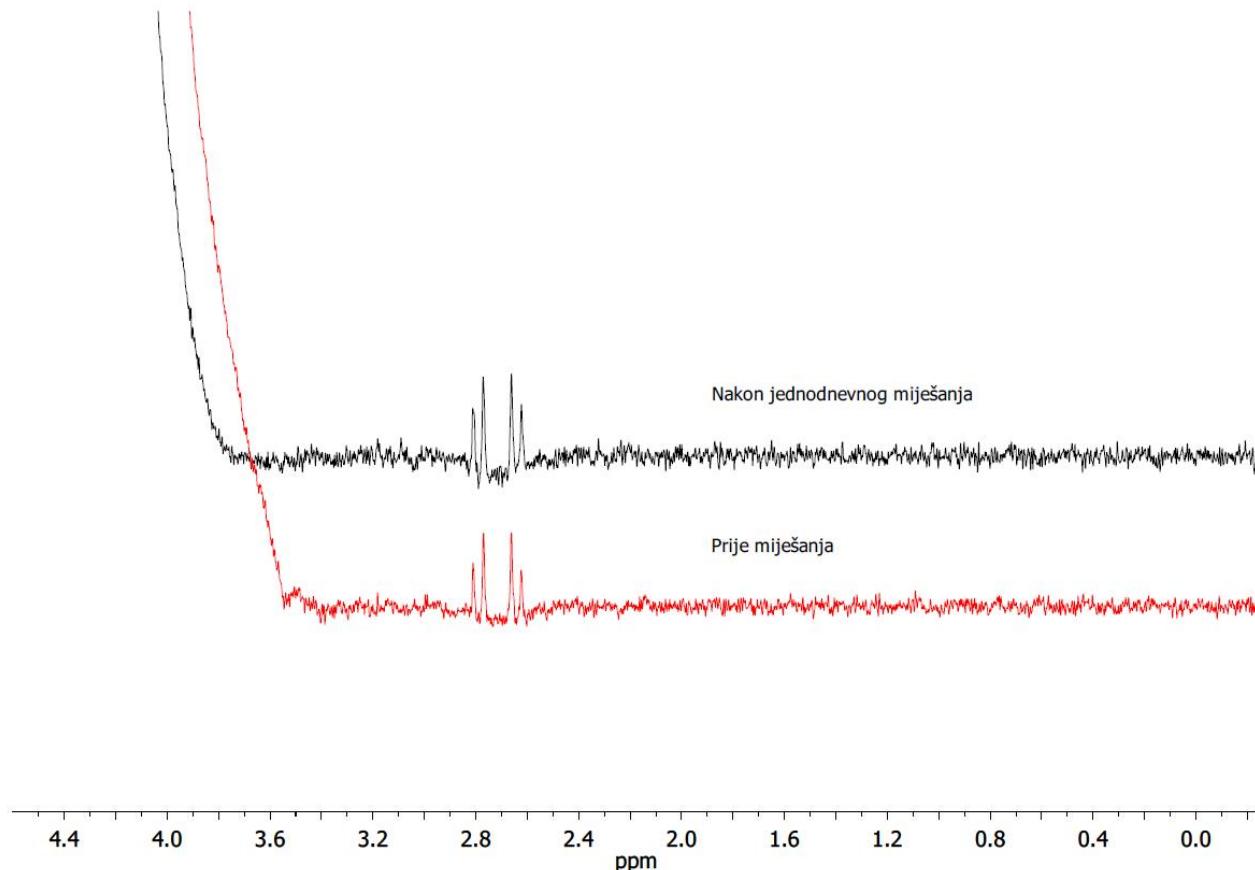
razlikuje samo u konfiguraciji (Wade, 2017). Dakle, ako je  $-\text{CH}_2$  skupina prokiralna i nalazi se kraj kiralnog ili prokiralnog C ugljikovog atoma, protoni u toj  $-\text{CH}_2$  skupini neće biti kemijski ekvivalentni te će imati različitu kemijsku okolinu. To se također jasno vidi iz trodimenzijske strukture limunske kiseline (vidi sliku 6).



Slika 6: Trodimenzijska struktura limunske kiseline. Plavim strelicama su označeni  $\text{H}_a$  protoni, a narančastim strelicama  $\text{H}_b$  protoni (<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/citric-acid.html>)

Budući da ti protoni nisu kemijski ekvivalentni oni se međusobno sprežu u dublete i rezoniraju pri različitim magnetskim poljima. Zato se na spektru vidi par dubleta pri čemu jedan dublet pripada  $\text{H}_a$  protonima, a drugi  $\text{H}_b$  protonima. U „običnim“ alkalnim fragmentima kemijski pomak  $-\text{CH}_2$  skupine iznosi oko 1,2 – 1,5 ppm, no u ovom slučaju apsorpcija je pomaknuta prema nižem magnetskom polju zbog utjecaja susjednih karboksilnih skupina koje induktivno privlače elektrone i na taj način smanjuju zasjenjenje tih protonskih jezgri. Potrebno je napomenuti da signali hidroksilne i karboksilne skupine nisu vidljivi u  $^1\text{H}$  NMR spektru jer su izmjenjljivi, odnosno protoni tih skupina se izmjenjuju s deuterijem iz otapala ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

#### 4.2. Utjecaj aeracije na stabilnost limunske kiseline u vodenoj otopini

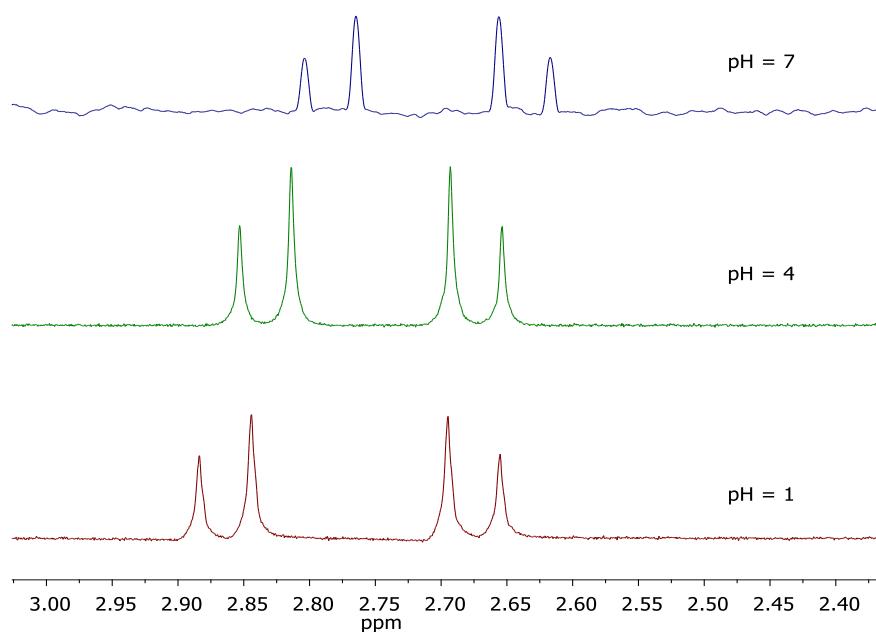


Slika 7:  $^1\text{H}$  NMR spektar limunske kiseline prije i nakon jednodnevнog miješanja otopine.

Proces aeracije je proces uvođenja zraka i prisutnih plinova u neku smjesu odnosno u ovom slučaju otopinu limunske kiseline. Unošenje zraka i prisutnih plinova u ovom eksperimentu se izvodi jednostavnim miješanjem otopine uz pomoć magnetske miješalice na zraku. Iz usporedbe prikazana dva  $^1\text{H}$  NMR spektra (slika 7) vidi se da nakon jednodnevne aeracije ne dolazi do promjene u strukturi limunske kiseline, a ni do drugih mjerljivih promjena u  $^1\text{H}$  NMR spektru što znači da proces aeracije ne utječe na stabilnost limunske kiseline. Uprosječeni kemijski pomaci oba spektra su na 2,71 ppm. Za ovaj pokus koristila se mala koncentracija vodene otopine limunske kiseline u vrijednosti od 1,3 mM zbog čega su dobiveni spektri lošije rezolucije. Ispitivanje je

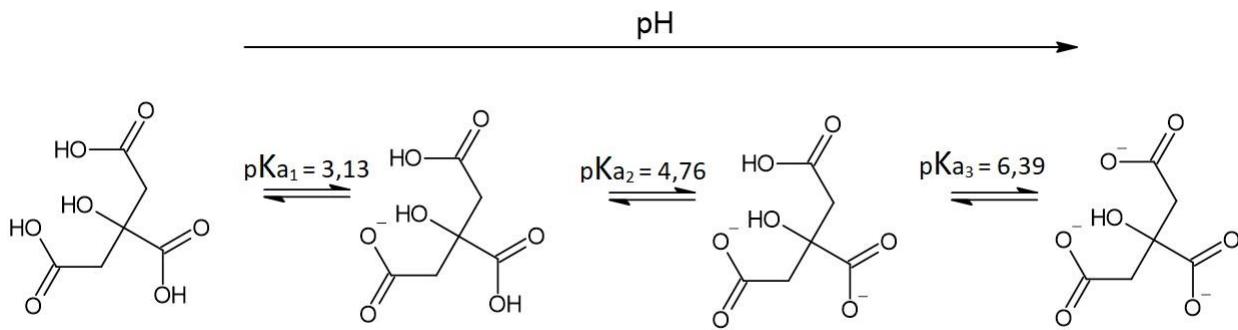
provedeno kako bi se provjerila mogućnost oksidacije limunske kiseline u uvjetima priprave nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline.

#### 4.3. Utjecaj pH vodene otopine na stabilnost limunske kiseline



Slika 8:  $^1\text{H}$  NMR spektar limunske kiseline u vodi pri različitim pH vrijednostima otopine.

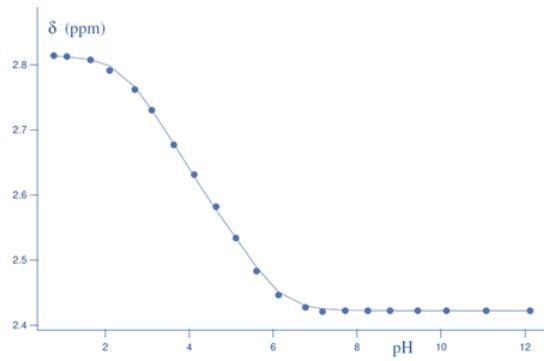
Iz usporedbe triju  $^1\text{H}$  NMR spektara (vidi sliku 8), vidi se da zakiseljavanjem vodene otopine limunske kiseline ne dolazi do promjene u strukturi limunske kiseline. Dva para dubleta, karakteristična za limunsку kiselinu, vidljiva su u rasponu pH vrijednosti od 1 do 7. To znači da je limunska kiselina stabilna u neutralnom i kiselim mediju. Iako je izgled spektra ostao isti došlo je do pomaka signala limunske kiseline (vidi sliku 8). Smanjenjem kiselosti vodene otopine protonski signali limunske kiseline se pomiču prema području višeg magnetskog polja, odnosno s porastom pH vrijednosti otopine kemijski pomaci imaju manju vrijednost. Porastom pH povećava se stupanj ionizacije limunske kiseline (vidi sliku 9).



Slika 9: Promjena stupnja ionizacije limunske kiseline s porastom pH vrijednosti

Zbog povećanog stupnja ionizacije limunske kiseline povećava se broj slobodnih elektrona koji zasjenjuju jezgre susjednih protona (protoni  $-\text{CH}_2$  skupine) pa se zbog toga kemijski pomaci limunske kiseline pomiču prema području višeg magnetskog polja. Uprosječeni kemijski pomak odnosno aritmetička sredina između dva dubleta pri  $\text{pH} = 1$  nalazi se na 2.77 ppm, što odgovara kemijskom pomaku nedisocirane limunske kiseline. Smanjenjem kiselosti odnosno porastom pH vodene otopine dolazi do pomaka uprosječenog signala prema višem magnetskom polju odnosno nižim vrijednostima kemijskog pomaka na 2.75 ppm pri  $\text{pH}=4$  te 2.71 ppm pri približno  $\text{pH}=7$ .

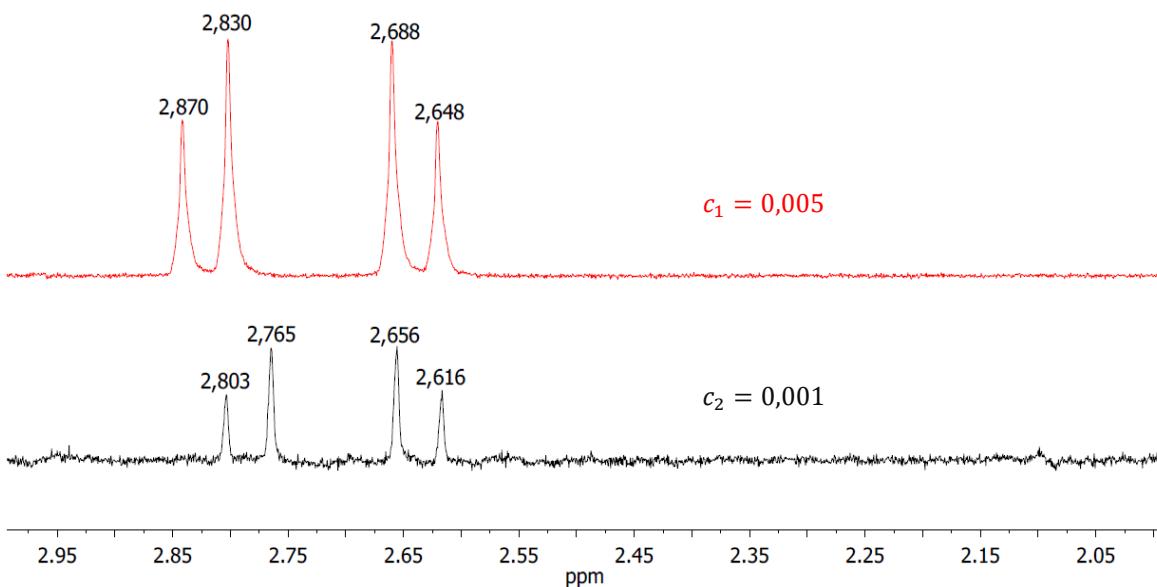
Razumijevanje dosega promjene kemijskih pomaka uslijed promjene pH otopine služi kao referentna točka za usporedbu s eventualnim promjenama u  $^1\text{H}$  NMR spektrima u drugim uvjetima (temperatura, ionska jakost...). Slične promjene kemijskih pomaka limunske kiseline u ovisnosti o pH vrijednosti vodene otopine objavljene su i ranije. Opisao ih je tim znanstvenika pod vodstvom Sergia Madrufe u znanstvenom radu „Ionization and Conformational Equilibria of Citric Acid: Delocalized Proton Binding in Solution“, a stilizirani prikaz eksperimentalnih rezultata (vidi sliku 10) preuzet je iz tog znanstvenog rada. Iz dijagrama je očito da sa smanjenjem kiselosti medija dolazi do pomaka signala metilenskih skupina ( $-\text{CH}_2$ ) u područje višeg magnetskog polja odnosno uprosječena vrijednost kemijskog pomaka se smanjuje.



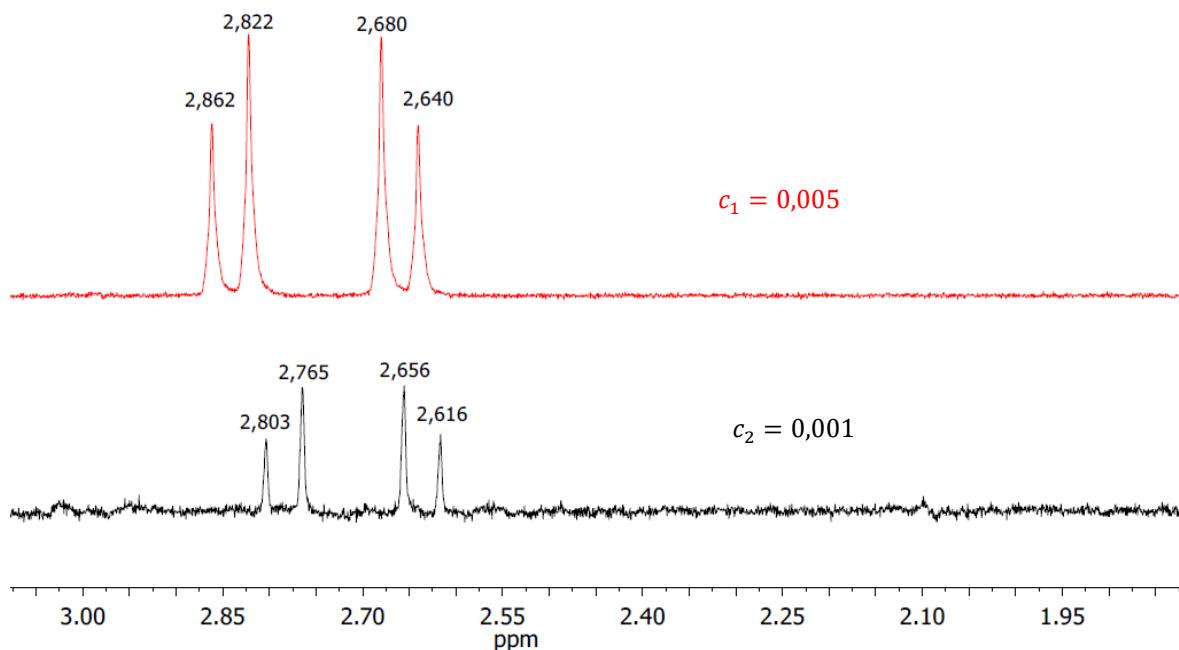
Slika 10: Ovisnost kemijskog pomaka limunske kiseline uslijed promjene pH vodene otopine  
(Madurga i sur., 2017)

#### 4.3.1. Utjecaj koncentracije limunske kiseline u vodenoj otopini na $^1\text{H}$ NMR spektar

a)

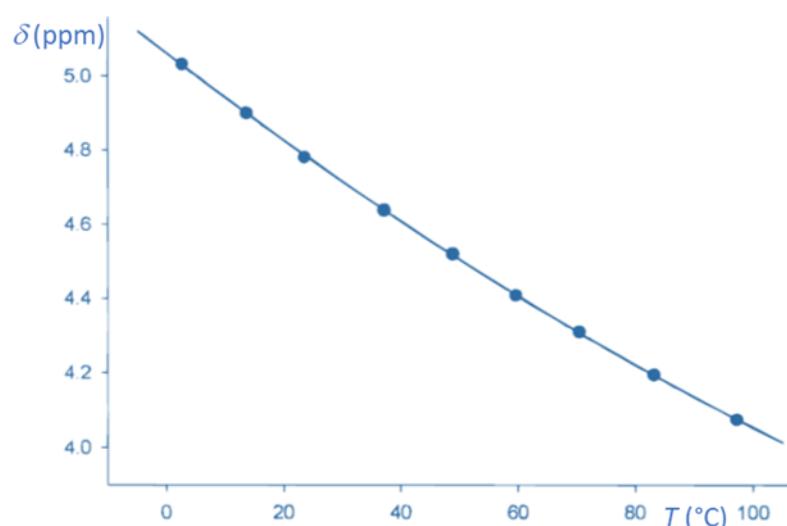


b)



Slika 11:  $^1\text{H}$  NMR spektar limunske kiseline pri različitim koncentracijama prije (a) i nakon (b) korekcije rezidualnih signala vode ( 4.660 ppm).

Za ispravnu usporedbu dva  $^1\text{H}$  NMR spektra potrebno je napraviti korekciju rezidualnih signala vode (HDO). Ti su signali također ovisni o kiselosti medija, o vrsti i koncentraciji otopljene tvari te o temperaturi (vidi sliku 12). Na prikazanim spektrima (vidi sliku 11) može se uočiti da se nakon korekcije rezidualnog signala vode mijenjaju vrijednosti kemijskog pomaka ( $^1\text{H}$  NMR spektar, crvena linija). Promjena vrijednosti kemijskog pomaka nakon korekcije je u ovom slučaju vrlo mala, no svejedno prisutna i potrebno ju je uvrstiti kako bi se precizno usporedili  $^1\text{H}$  NMR spektri. Inače se korekcija signala može provesti i u odnosu prema signalu tetrametilsilana (TMS) koji često služi kao interni standard za NMR mjerjenja. Signal TMS-a daje referentnu vrijednost od 0.0 ppm i nije ovisan o promjeni otapala ili kiselosti medija. Slično vrijedi i za rezidualne signale organskih deuteriranih otapala poput acetona ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ), dimetilsulfokksida ( $\text{DMSO-d}_6$ ) ili kloroform-a ( $\text{CDCl}_3$ ), čiji se signali nalaze na 2.05 ppm, 2.50 ppm, odnosno 7.26 ppm (Fulmer i sur., 2010).

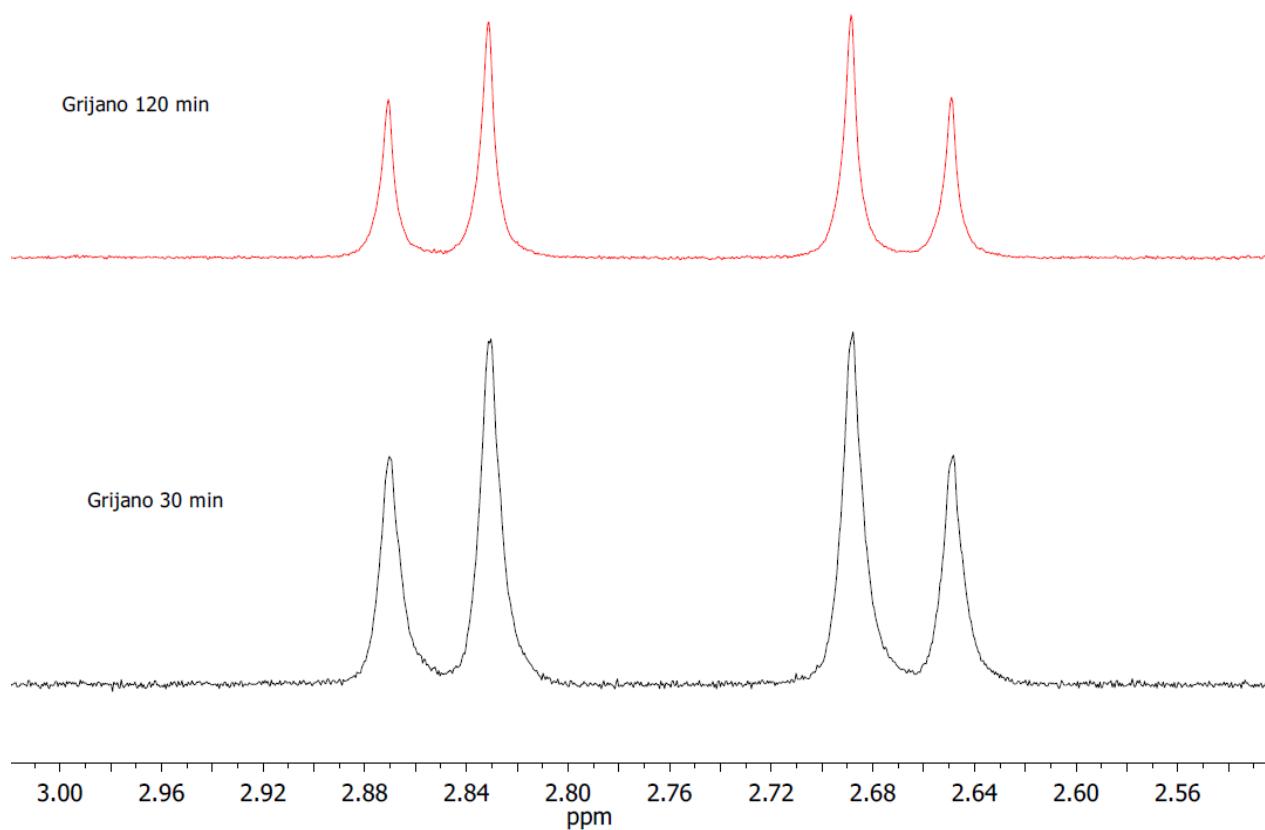


Slika 12: Ovisnost vrijednosti kemijskog pomaka HDO u  $^1\text{H}$  NMR spektru o temperaturi uzorka.

Iz usporedbe  $^1\text{H}$  NMR spektra limunske kiseline koncentracije 0,005M i koncentracije 0,001M može se zaključiti kako se povećanjem koncentracije limunske kiseline, njezin signal se pomiče prema nižim vrijednostima magnetnoga polja odnosno prema većim kemijskim pomacima. U ovom slučaju pomak spektra je vrlo mali te iznosi 0,041 ppm. To se događa zbog toga što se povećanjem koncentracije limunske kiseline povećava i kiselost same otopine. Slično kao i u prethodnom primjeru povećanjem kiselosti otopine smanjuje se stupanj ionizacije limunske kiseline odnosno smanjuje se broj slobodnih elektrona koji zasjenjuju jezgre susjednih protona

(protoni -CH<sub>2</sub> skupine). Zbog toga se spektar pomiče prema višim vrijednostima kemijskog pomaka odnosno prema nižim magnetskim poljima.

#### 4.4. Utjecaj zagrijavanja na stabilnost limunske kiseline u vodenoj otopini

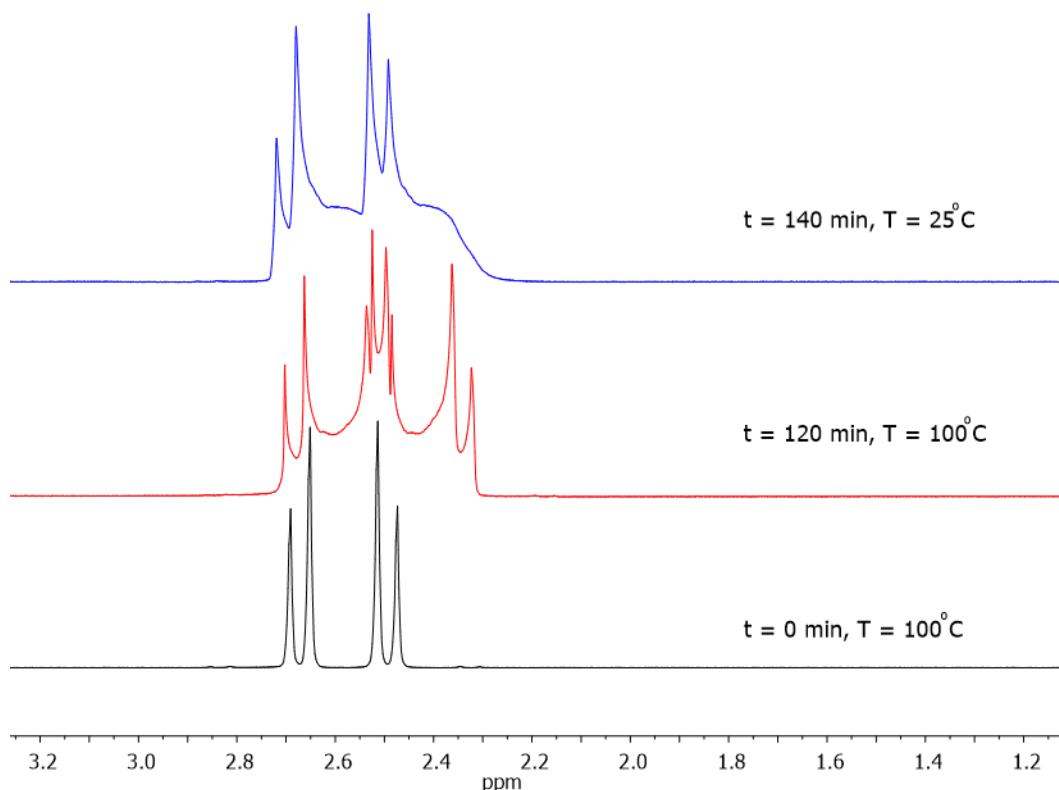


Slika 13: <sup>1</sup>H NMR spektar limunske kiseline u vodi pri zagrijavanju na 100°C.

Zagrijavanjem na 100 °C vodene otopine limunske kiseline koncentracije 0,005 M pri pH ≈ 7, tijekom 120 minuta ne dolazi do vidljivih promjena u <sup>1</sup>H NMR spektru limunske kiseline (vidi sliku 13). Također se i uprosječena vrijednost kemijskog pomaka nije promijenila te iznosi 2,75

ppm. Dakle, limunska kiselina je pri uvjetima zagrijavanja vodene otopine na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  stupnjeva stabilna. Takvi uvjeti odgovaraju reakcijskim uvjetima pri sintezi nanočestica zlata što znači da u vremenskom rasponu od 15 minuta, potrebnom za pripravu nanočestica zlata obloženih limunskom kiselinom, ne dolazi do kemijskih promjena limunske kiseline zbog utjecaja povišene temperature. Zbog toga se ranije uočeno stvaranje acetona tijekom sintetskog postupka može pripisati oksidaciji limunske kiseline zbog redukcije tetrakloraurata trihidrata u elementarno zlato (Zlodi, 2023).

Međutim, ukoliko se ista procedura zagrijavanja limunske kiseline ponovi pri nižem pH vodene otopine, dolazi do vidljivih promjena u  $^1\text{H}$  NMR spektru (vidi sliku 14).



*Slika 14:  $^1\text{H}$  NMR spektar otopine limunske kiseline u vodi pri  $\text{pH}=1$  u različitim vremenskim intervalima i pri različitim temperaturama*

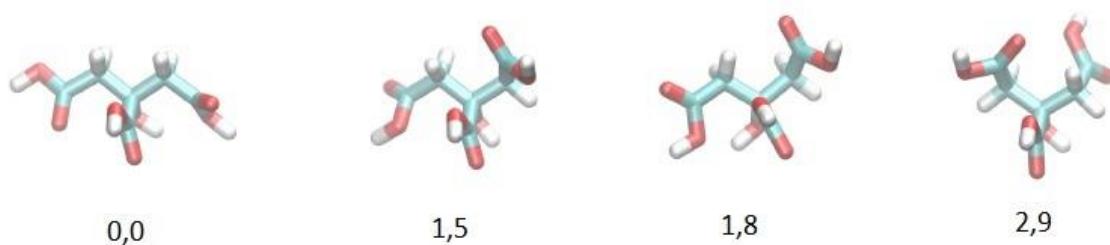
Nakon 30 minuta zagrijavanja limunske kiseline pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  u kiselom vodenom mediju ( $\text{pH} = 1$ ), u spektru se pojavljuju novi signali, odnosno dva nova dubleta. Produljenim grijanjem ne dolazi do nikakvih drugih promjena u spektru (slika 14, crvena linija). Novi su signali pomaknuti u više

magnetsko polje za otprilike 0.2 ppm-a. Osim toga, pojavu novih signala prati i vidljivo proširenje svih signala odnosno smanjena rezolucija spektra što ukazuje na odvijanje dinamičkog procesa, odnosno moguću ravnotežu u kojoj sudjeluje limunska kiselina i neka druga specija u kojoj su metilenski signali pocijepani na sličan način.

Nakon hlađenja uzorka na sobnu temperaturu (slika 14, plava linija), novonastali signali se smanjuju i postepeno nestaju tako da su u spektru vidljivi samo početni signali limunske kiseline. To je potvrda da je zagrijavanjem pri pH = 1 pomaknuta kemijska ravnoteža, odnosno povećana konstanta ravnoteže u smjeru nastanka manje stabilnijeg produkta.

Postoje barem dvije mogućnosti koje se mogu prikazati kao ravnotežni proces kojem podliježe limunska kiselina: konformacijska ravnoteža i ravnotežna reakcija dehidratacije. Oba su procesa opisana u literaturi, što potvrđuje relevantnost ovih mehanističkih prijedloga. U svakom slučaju, ovo je prva NMR evidencija o ravnotežnom procesu kojem podliježe limunska kiselina tijekom zagrijavanja ( $T = 100 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) vodene otopine pri pH = 1.

Dokazano je da konformacijske ravnoteže ovise o ionizacijskom stanju limunske kiseline, odnosno o pH vodene otopine (Madurga i sur., 2017). U tom znanstvenom radu opisane su četiri različite konformacije limunske kiseline u protoniranom stanju kao i njihove relativne slobodne energije s obzirom na konformaciju najniže energije (vidi sliku 15).

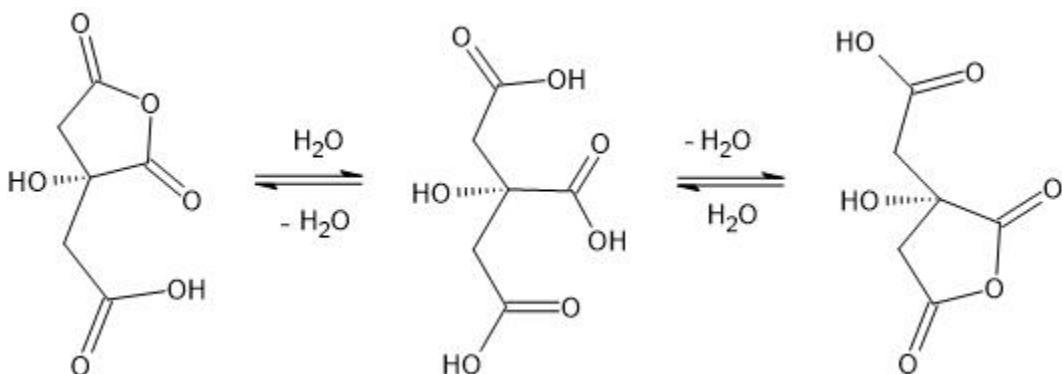


*Slika 15: Konformeri potpuno neionizirane limunske kiseline i njihova relativna slobodna energija (G) u odnosu na konformer najniže energije izražena u kcal/mol (Madurga i sur., 2017)*

Međutim, s obzirom na male razlike u relativnim energijama različitih konformera limunske kiseline i s obzirom na relativno niske energetske barijere koje kinetički odvajaju pojedina konformacijska stanja, nije vjerojatno u  $^1\text{H}$  NMR spektrima vidjeti odvojene signale konformera. Zbog konformacijske dinamike, odnosno relativno velike brzine konformacijskih prijelaza, u odnosu na vremensku skalu NMR snimanja, signali različitih konformera bili bi uprosjećeni što

znači da bi se u spektru video samo jedan dublet. To je suprotno onome što se vidi u  $^1\text{H}$  NMR spektru limunske kiseline koja je zagrijana na 100 C pri pH=1 (vidi sliku 14).

Druga mogućnost, odnosno spomenuta ravnotežna reakcija dehidratacije limunske kiseline, je vjerojatniji mehanizam kojim se mogu protumačiti uočene promjene u  $^1\text{H}$  NMR spektrima. Do dehidratacije očekivano dolazi pri nižoj pH vrijednosti i uz zagrijavanje. To je kiselo katalizirani temperaturom potpomognuti proces u kojem dolazi do eliminacije molekule vode i zatvaranja anhidridnog pteročlanog prstena (vidi sliku 16). Između ostalog je to i povratna reakcija u kojoj sudjeluju sve tri karboksilne skupine. Budući da su dva oblika anhidrida limunske kiseline (vidi sliku 16) uključena u reakciji dehidratacije, ukupna je ravnoteža degenerirana što u  $^1\text{H}$  NMR spektru čini nove metilenske ( $-\text{CH}_2$ ) signale u dva anhidrida, kemijski i magnetski ekvivalentnima. Zbog toga u  $^1\text{H}$  NMR spektru vidimo samo jedan novi par dubleta.



*Slika 16: Kiselo katalizirana temperaturom potpomognuta reakcija dehidratacije limunske kiseline pri kojoj nastaje pteročlani anhidridni prsten*

Zbog iste dinamike procesa uprosječena je i kiralnost središnjeg ugljikovog atoma. Iako oba anhidrida imaju kiralni centar različite konfiguracije, on je u svojevrsnom “mezo-obliku” zbog simetrije reakcijskog sustava.

Novi signali koji odgovaraju nastalom ravnotežnom produktu (anhidrid limunske kiseline) nalaze se otprilike 0.2 ppm u višem magnetskom polju, odnosno imaju niži kemijski pomak u  $^1\text{H}$  NMR spektru od signala limunske kiseline. Budući da nisu poznati eksperimentalni kemijski pomaci za metilensku skupinu anhidrida limunske kiseline, u ovom diplomskom radu je za potvrdu nastajanja

anhidrida limunske kiseline provedena procjena relativne razlike kemijskih pomaka između metilenske skupine limunske kiseline i metilenske skupine anhidrida limunske kiseline. U tu je svrhu korištena online platforma NMRium koja na temelju nacrtane strukture spoja generira vrlo precizne NMR spektre. U NMRiumu generirani su  $^1\text{H}$  NMR spektri limunske kiseline i anhidrida limunske kiseline. Iz generiranih spektara izračunata je razlika između kemijskih pomaka dviju spomenutih  $-\text{CH}_2$  skupina te je dobiveno da je ona gotovo jednaka razlici dobivenoj eksperimentalnim radom. Osim toga signali  $-\text{CH}_2$  skupine anhidrida su isto kao i u eksperimentalnom radu pomaknuti prema višem magnetskom polju u odnosu na  $-\text{CH}_2$  skupinu limunske kiseline (vidi sliku 17). To dodatno potvrđuje nastajanje anhidrida limunske kiseline u uvjetima zagrijavanja na  $100^\circ\text{C}$  i sniženog pH na vrijednost 1.



Slika 17:  $^1\text{H}$  NMR spektri limunske kiseline i anhidrida limunske kiseline generirani u NMRiumu  
[\(<https://www.nmruium.org/nmruium>\)](https://www.nmruium.org/nmruium)

## 5. ZAKLJUČAK

Postupak sinteze nanočestica zlata uključuje zagrijavanje vodene otopine tetrakloraurata trihidrata uz refluks i dodavanja limunske kiseline uz dodatno zagrijavanje u trajanju od 15 minuta. Tijekom tog postupka uočena je reakcija oksidacije limunske kiseline sve do acetona, proces koji uključuje dvije uzastopne dekarboksilacije (Zlodi, 2023). Reakcije dekarboksilacije su ireverzibilne reakcije u kojima se molekula  $\text{CO}_2$  eliminira iz strukture limunske kiseline kao i iz reakcijske smjese. Osim oksidacije limunske kiseline uz istovremenu redukciju zlata, u tim reakcijskim uvjetima ne dolazi do drugih kemijskih promjena limunske kiseline. To je također potvrđeno ispitivanjima stabilnosti limunske kiseline u vodenoj otopini pri različitim reakcijskim uvjetima. Tijekom tih ispitivanja utvrđeno je kako ne dolazi do strukturalnih i kemijskih promjena limunske kiseline aeracijom, zakiseljavanjem ili refluksiranjem vodene otopine limunske kiseline. Iako se tijekom zakiseljavanja vodene otopine limunske kiseline struktura limunske kiseline ne mijenja, primjećen je pomak signala limunske kiseline prema nižem magnetskom polju. Do spomenutog pomaka dolazi zbog smanjenja stupnja ionizacije limunske kiseline prilikom zakiseljavanja što uzrokuje i smanjenje broja slobodnih elektrona koji zasjenjuju metilenske protone u limunskoj kiselini. Promjene u strukturi limunske kiseline vidljive su tek pri vrlo agresivnim reakcijskim uvjetima odnosno tijekom refluksiranja u izrazito kiselim uvjetima. Za vrijeme refluksa zakiseljene vodene otopine limunske kiseline dolazi do reakcije dehidratacije i zatvaranja peteročlanog anhidridnog prstena. To je, uspoređujući s reakcijama dekarboksilacije, ravnotežna povratna reakcija čija konstanta ravnoteže ovisi o temperaturi i mjerljiva je u NMR spektrima. Spomenute strukturalne promjene limunske kiseline koje se događaju tek pri vrlo agresivnim uvjetima refluksa zakiseljene vodene otopine, potvrđuju stabilnost limunske kiseline u reakcijskom mediju koji odgovara uvjetima tijekom priprave nanočestica zlata.

## 6. LITERATURA

Ciriminna R, Meneguzzo F, Delisi R i Pagliaro M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chem. Cent. J.*, 2017, 11, 22.

Citric acid, <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/citric-acid.html> Am. Chem. Soc., pristupljeno: 08.7.2023.

Clayden J, Greeves N i Warren SG. Organic chemistry. 2<sup>nd</sup> ed Oxford ; New York, Oxford University Press, 2012., str. 260 - 302.

Daneshfar A, Baghlan M, Sarabi R, Sahraei R, Abbasi S, Kaviyan H i Khezeli T. Solubility of citric, malonic, and malic acids in different solvents from 303.2 to 333.2 K. *Fuel Energy Abstr.*, 2011, 313.

Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE i Goldberg KI. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*, 2010, 29(9), 2176–2179.

Ghosh D, Sarkar D, Girigoswami A i Chattopadhyay N. A Fully Standardized Method of Synthesis of Gold Nanoparticles of Desired Dimension in the Range 15 nm–60 nm. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, 11(2), 1141–1146.

Kirimura K, Honda Y i Hattori T. 3.13 - Citric Acid. U *Compr. Biotechnol. Second Ed.*, Moo-Young M., urednik, Burlington, Academic Press, 2011, str. 135–142.

Madurga S, Nedyalkova M, Mas F i Garcés JL. Ionization and Conformational Equilibria of Citric Acid: Delocalized Proton Binding in Solution. *J. Phys. Chem. A*, 2017, 121(31), 5894–5906.

Mo H i Raftery D. Pre-SAT180, a Simple and Effective Method for Residual Water Suppression. *J. Magn. Reson. San Diego Calif* 1997, 2008, 190(1), 1–6.

NMRium, <https://www.nmrium.org/nmrium> pristupljeno: 16.6.2023.

Pem B, Toma M, Vrček V i Vinković Vrček I. Combined NMR and Computational Study of Cysteine Oxidation during Nucleation of Metallic Clusters in Biological Systems. *Inorg. Chem.*, 2021, 60(6), 4144–4161.

Wade L.G., Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 561-624.

Zlodi Marko, NMR studija priprave zlatnih nanočestica u prisutnosti citrata, Diplomski rad, 2023.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

### **7.1. Sažetak**

U okviru projekta koji proučava nanočestice zlata i provodi se na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, provedene su dvije NMR studije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Jedna od provedenih NMR studija istražuje strukturalne promjene limunske kiseline tijekom sinteze nanočestica uz upotrebu limunske kiseline. Druga NMR studija, odnosno ovaj diplomski rad, fokusira se na ispitivanje stabilnosti limunske kiseline u vodenim otopinama pri reakcijskim uvjetima koji su prisutni tijekom sinteze nanočestica zlata. Stabilnost limunske kiseline provjerena je u uvjetima aeracije, zakiseljavanja i refluksiranja vodene otopine limunske kiseline. Snimanjem  $^1\text{H}$  NMR spektara dokazano je da u navedenim reakcijskim uvjetima nije došlo do strukturalnih promjena limunske kiseline. Iako tijekom zakiseljavanja vodene otopine limunske kiseline nije došlo do promjene u strukturi limunske kiseline, primijećen je pomak signala limunske kiseline prema području nižeg magnetskog polja. Promjena u strukturi limunske kiseline javlja se tek nakon primjene vrlo agresivnih reakcijskih uvjeta, odnosno kiselim refluksiranjem vodene otopine limunske kiseline. Tijekom refluksa zakiseljene vodene otopine limunske kiseline dolazi do kiselo katalizirane i temperaturom potpomognute dehidratacije limunske kiseline uz zatvaranje peteročlanog anhidridnog prstena. Rezultati ovog diplomskog rada upućuju na stabilnost limunske kiseline pri reakcijskim uvjetima sinteze nanočestica zlata uz prisutnost limunske kiseline.

## 7.2. Summary

Within the project focused on gold nanoparticles, conducted at the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb, two NMR studies were carried out at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry in Zagreb. One of the conducted NMR studies investigates the structural changes of citric acid during the synthesis of nanoparticles using citric acid. The second NMR study, which is the subject of this thesis, focuses on examining the stability of citric acid in aqueous solutions under the reaction conditions present during the synthesis of gold nanoparticles. The stability of citric acid was tested under conditions of aeration, acidification, and reflux of the citric acid solution. By recording  $^1\text{H}$  NMR spectra, it was demonstrated that there were no structural changes in citric acid under the mentioned reaction conditions. Although no structural changes occurred during the acidification of the citric acid solution, a shift in the signals of citric acid towards lower magnetic field regions was observed. The change in the structure of citric acid only occurred after applying highly aggressive reaction conditions, namely, the acidic reflux of the citric acid solution. During the reflux of the acidified citric acid solution, acid-catalyzed and temperature-assisted dehydration of citric acid took place, resulting in the closure of a five-membered anhydride ring. The results of this thesis indicate the stability of citric acid under the reaction conditions of gold nanoparticle synthesis in the presence of citric acid.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### STABILNOST LIMUNSKE KISELINE U VODENIM OTOPINAMA. <sup>1</sup>H NMR STUDIJA

**Matko Tokić**

#### SAŽETAK

U okviru projekta koji proučava nanočestice zlata i provodi se na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, provedene su dvije NMR studije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Jedna od provedenih NMR studija istražuje strukturalne promjene limunske kiseline tijekom sinteze nanočestica uz upotrebu limunske kiseline. Druga NMR studija, odnosno ovaj diplomski rad, fokusira se na ispitivanje stabilnosti limunske kiseline u vodenim otopinama pri reakcijskim uvjetima koji su prisutni tijekom sinteze nanočestica zlata. Stabilnost limunske kiseline provjerena je u uvjetima aeracije, zakiseljavanja i refluksiranja vodene otopine limunske kiseline. Snimanjem <sup>1</sup>H NMR spektara dokazano je da u navedenim reakcijskim uvjetima nije došlo do strukturalnih promjena limunske kiseline. Iako tijekom zakiseljavanja vodene otopine limunske kiseline nije došlo do promjene u strukturi limunske kiseline, primjećen je pomak signala limunske kiseline prema području nižeg magnetskog polja. Promjena u strukturi limunske kiseline javlja se tek nakon primjene vrlo agresivnih reakcijskih uvjeta, odnosno kiselim refluksiranjem vodene otopine limunske kiseline. Tijekom refluksa zakiseljene vodene otopine limunske kiseline dolazi do kiselo katalizirane i temperaturom potpomognute dehidratacije limunske kiseline uz zatvaranje pteročlanog anhidridnog prstena. Rezultati ovog diplomskog rada upućuju na stabilnost limunske kiseline pri reakcijskim uvjetima sinteze nanočestica zlata uz prisutnost limunske kiseline.

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

Rad sadrži: 25 stranica, 17 grafičkih prikaza, 0 tablica i 13 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: NMR, limunska kiselina, nanočestice zlata

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

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

**Dr. sc. Erim Bešić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.**

**Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.**

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### STABILITY OF CITRIC ACID IN AQUEOUS SOLUTIONS. <sup>1</sup>H NMR STUDY

**Matko Tokić**

#### SUMMARY

Within the project focused on gold nanoparticles, conducted at the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb, two NMR studies were carried out at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry in Zagreb. One of the conducted NMR studies investigates the structural changes of citric acid during the synthesis of nanoparticles using citric acid. The second NMR study, which is the subject of this thesis, focuses on examining the stability of citric acid in aqueous solutions under the reaction conditions present during the synthesis of gold nanoparticles. The stability of citric acid was tested under conditions of aeration, acidification, and reflux of the citric acid solution. By recording <sup>1</sup>H NMR spectra, it was demonstrated that there were no structural changes in citric acid under the mentioned reaction conditions. Although no structural changes occurred during the acidification of the citric acid solution, a shift in the signals of citric acid towards lower magnetic field regions was observed. The change in the structure of citric acid only occurred after applying highly aggressive reaction conditions, namely, the acidic reflux of the citric acid solution. During the reflux of the acidified citric acid solution, acid-catalyzed and temperature-assisted dehydration of citric acid took place, resulting in the closure of a five-membered anhydride ring. The results of this thesis indicate the stability of citric acid under the reaction conditions of gold nanoparticle synthesis in the presence of citric acid.

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

Thesis includes: 25 pages, 17 figures, 0 tables and 13 references. Original is in Croatian language.

Keywords: NMR, Citric acid, gold nanoparticles

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

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

The thesis was accepted: July 2023.