# ŠTUDIJA SINTEZE NESIMETRIČNIH TETRAOKSANOV IN VREDNOTENJE NJIHOVE POTENCIALNE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Katarina Starkl Renar

**Doktorska disertacija**
**Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana**
**Ljubljana, Slovenija**

**Mentor:** prof. dr. Jernej Iskra, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

**Komisija za oceno doktorske disertacije:**
prof. dr. Stojan Stavber, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. ddr. Boris Turk, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Andrej Cör, član, Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Koper, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL




Katarina Starkl Renar

# ŠTUDIJA SINTEZE NESIMETRIČNIH TETRAOKSANOV IN VREDNOTENJE NJIHOVE POTENCIALNE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

**Doktorska disertacija**

# STUDY OF THE SYNTHESIS OF UNSYMMETRICAL TETRAOXANES AND EVALUATION OF THEIR POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

**Doctoral Dissertation**

**Mentor:** prof. dr. Jernej Iskra

Ljubljana, Slovenija, april 2016

*Prihodnost pripada tistim, ki verjamejo v lepoto svojih sanj.*
*(Eleanor Roosvelt)*

# Zahvala

Za financiranje se zahvaljujem davkoplačevalcem, Javni agenciji za raziskovalno dejavnost (ARRS: programa Mladi raziskovalci PR-05023 in Kemija za trajnostni razvoj P1-0134 ter Slovensko-indijski bilateralni projekt BI-IN/15-17-010) in Odseku za fizikalno in organsko kemijo, saj brez denarja ni muzike.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Jerneju Iskri za vodenje in strokovno pomoč pri razvijanju teme doktorske disertacije in soustvarjanju njene končne podobe. Zahvaljujem se mu tudi za razumevanje in podporo pri nepredvidljivih dogodkih v delovnem okolju, za spoštovanje različnih mnenj kemijskega in farmacevtskega sveta ter za nekaj življenjskih nasvetov.

Zahvaljujem se komisiji za oceno doktorske disertacije, prof. dr. Stojanu Stavberju, prof. ddr. Borisu Turku in prof. dr. Andreju Cörju, da si je vzela čas za branje in oceno mojega dela. Zahvaljujem se Maši Matijaševič za lektoriranje in številne decimalne vejice.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pri mojem delu pomagali pri karakterizaciji mojih spojin. Celotni ekipi Nacionalnega centra za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti, dr. Dušanu Žigonu za masnospektrometrične analize, dr. Maji Ponikvar Svet za elementne analize in dr. Maticu Lozinšku za rentgensko difrakcijo. Zahvaljujem se izr. prof. Marjanu Jerebu in doc. dr. Krištofu Kranjcu, da sta mi omogočila uporabo naprav za merjenje tališč v njihovem laboratoriju na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pri mojem delu pomagali pri določanju biološke aktivnosti mojih spojin. Prof. dr. Andreju Cörju, dr. Mitji Raku in Katji Šuster z Univerze na Primorskem za pomoč pri določanju protibakterijske aktivnosti. Prof. ddr. Borisu Turku in Lovru Kramerju z Oddelka za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo z Instituta »Jožef Stefan« za določitev protitumorske aktivnosti. Prof. dr. Sandeepu Chaudharyju in njegovi ekipi z Malaviya National Institute of Technology v Jaipurju za določitev protituberkulozne aktivnosti v okviru slovensko-indijskega bilateralnega projekta.

Zahvaljujem se Minki Ferfila za skrb in pomoč. Zahvaljujem se sodelavcem in nadrejenim za prijetno sobivanje na delovnem mestu. Zahvaljujem se izr. prof. dr. Jerneju Iskri in prof. dr. Stojanu Stavberju za podporo in življenjske nasvete. Zahvaljujem se zdajšnjim in bivšim sodelavcem za prijetno vzdušje in kolegialnost, vemo, kako zelo smo si olajšali turbulentne dni v laboratoriju. Zahvaljujem se tudi študentki farmacije Jacqueline Kajtna, ki mi je pomagala z delčkom eksperimentiranja.

Zahvaljujem se družini in prijateljem za podporo in vse lepe trenutke doma in po svetu. Vse se spreminja, vi pa ostajate isti in nezamenljivi.

# Povzetek

Artemisinin je najpomembnejši predstavnik naravnih peroksidov, zelo pomembne skupine naravnih produktov. Artemisinin in njegovi polsintezni derivati so učinkovina izbora za zdravljenje malarije, poleg tega imajo tudi protivirusno, protitumorsko, protibakterijsko in protivnetno delovanje, za delovanje pa je odločilna peroksidna skupina. Zaradi slabših farmakokinetičnih lastnosti artemisinina je prišlo do razvoja sinteznih cikličnih peroksidov, ki jih je tudi lažje in ceneje pridobivati. Med sinteznimi peroksidi so še posebej zanimivi 1,2,4,5-tetraoksani, saj imajo v svoji strukturi dve peroksidni skupini. Nesimetrični tetraoksani, to so 1,2,4,5-tetraoksani z različnima substituentama na mestih 3 in 6, imajo zaradi strukturne raznolikosti tudi velik potencial za morebitno uvajanje v terapijo. Naraščajoča vloga artemisininov in sinteznih peroksidov v terapiji ter nedvoumni dokazi o široki bioaktivnosti tetraoksanov povečujejo interes za razvoj novih sinteznih metod za njihovo pridobivanje.

Sinteza nesimetričnih tetraoksanov poteka iz karbonilnih spojin in vodikovega peroksida v dveh stopnjah, zato smo naredili podrobno študijo reakcije med karbonilnimi spojinami in vodikovim peroksidom. Produkti prve stopnje reakcije so *gem*-dihidroperoksidi, ki niso komercialno dostopni, zato jih je potrebno predhodno sintetizirati. Pri reakciji med karbonilno spojino in vodikovim peroksidom so se *gem*-dihidroperoksidi tvorili preko α-hidroperoksialkoholov. Razvili smo preprost sintezni postopek za sintezo teh nestabilnih intermediatov, ki do sedaj niso bili dostopni. α-hidroperoksialkohole smo tudi okarakterizirali. Primarna adicija vodikovega peroksida na karbonilno skupino je ravnotežna. Ko se v naslednjem koraku tvori *gem*-dihidroperoksid, je spojina stabilna in se ne more pretvoriti nazaj v α-hidroperoksialkohol. Druga stopnja sinteze nesimetričnih tetraoksanov je bila kislinsko katalizirana ciklokondenzacija sintetiziranih *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin. Glavna ovira reakcije je tvorba številnih stranskih produktov, zato smo preučili vpliv reakcijskih pogojev na selektivnost tvorbe nesimetričnih tetraoksanov. Selektivnost reakcije je odvisna od reakcijskega časa, temperature, topila, količine dodane kisline ter reaktivnosti izhodnih spojin za reakcijo peroksidacije in Baeyer-Villigerjeve premestitve. Fluorirani alkoholi dodatno aktivirajo ciklokondenzacijo, zato reakcija poteče tudi v manj kislih pogojih. Premajhna aktivacija ciklizacije je vodila do nastanka heksaoksonanov, prevelika aktivacija pa do tvorbe laktonov in bolj stabilnega simetričnega tetraoksana, ki je lahko nastal iz izhodnih spojin.

Razvito metodo za sintezo tetraoksanov smo uporabili za sintezo strukturno definiranega sklopa nesimetričnih tetraoksanov, ki smo jih uporabili za vrednotenje njihovega biološkega delovanja. Nekateri izmed manj polarnih tetraoksanov so na dveh tumorskih celičnih linijah pokazali dobro protitumorsko aktivnost, ki je bila primerljiva z aktivnostjo artemisinina, ki se že uveljavlja v protitumorski terapiji. Sintetizirani tetraoksani so imeli obetavno protituberkulozno delovanje, aktivnost posameznih peroksidov je bila primerljiva z rifampicinom. Testirani peroksidi niso imeli protibakterijskega delovanja proti štirim drugim bakterijskim vrstam (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis*).

# Abstract

Artemisinin is the most important member belonging to natural peroxides, an important group of natural products. Artemisinin and its semi-synthetic derivatives have been recommended as a first-line treatment for malaria. Furthermore, artemisinins also exhibit antitumor, antiviral, antibacterial and anti-inflammatory activity, for which an endoperoxidic group is essential. In order to improve the pharmacokinetic properties of artemisinin, synthetic peroxides have been developed, which are also easier and cheaper to produce. Amongst synthetic peroxides, 1,2,4,5-tetraoxanes might exhibit enhanced pharmacological activity due to two peroxide groups. Unsymmetrical tetraoxanes, *i.e.* 1,2,4,5-tetraoxanes with different substituents at the positions 3 and 6 of tetraoxane ring, may hold better potential for application into therapy due to a wider structural scope. An increasing role of artemisinins and synthetic peroxides in therapy and indications of potent biological activity of tetraoxanes are boosting interest for the development of new approaches for synthesis of tetraoxanes.

As unsymmetrical tetraoxanes can only be prepared from carbonyl compounds and hydrogen peroxide in a two-step procedure, the reaction between carbonyl compounds and hydrogen peroxide was subjected to a close study. *gem*-Dihydroperoxides, the products of the first step of the reaction, are not commercially available. Hence, they have to be synthesized before the cyclization reaction. The reaction between carbonyl compound and hydrogen peroxide yielded *gem*-dihydroperoxide through the formation of α-hydroperoxyalcohol. The convenient procedure for synthesis of unstable α-hydroperoxyalcohols was developed and the products were also characterized. The first addition of hydrogen peroxide to the ketone is equilibria. Once *gem*-dihydroperoxide is formed in the next step, the product is stable and it cannot revert back to α-hydroperoxyalcohol and hydrogen peroxide. The second step of the synthesis of unsymmetrical tetraoxanes was an acid-catalysed cyclocondenzation of previously synthesized *gem*-dihydroperoxides and carbonyl compounds. The main obstacle of this reaction is the formation of many side products. For this purpose, the influence of reaction conditions on selective production of unsymmetrical tetraoxanes was studied. The selectivity of the reaction is influenced by factors, such as reaction time, temperature, solvent, amount of acid and reactivity of starting material for either peroxidation or Baeyer-Villiger reaction. The cyclization reactions performed in fluorinated solvents proceed in less acidic conditions. Insufficient activation of reaction gave hexaoxonanes. Excessive activation yielded lactones and a more stable symmetrical tetraoxane formed from starting material.

The method developed for the synthesis of tetraoxanes was applied for the synthesis of structurally defined unsymmetrical tetraoxanes which were used for the evaluation of their biological activity. Some of the less polar tetraoxanes exihibited good antitumor activity against two tumor cell lines comparable to antitumor activity of artesunate which has already entered antitumor clinical trials. Synthesized tetraoxanes had a promising antitubercular activity, comparable to the activity of rifampicin. None of the tested peroxides had antibacterial activity against four bacteria species (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis*).

# Kazalo

**Sheme** **xvii**

**Slike** **xxi**

**Tabele** **xxiii**

**Kratice** **xxv**

**1 Uvod** **1**
1.1 Razvoj strukture cikličnih peroksidov iz artemisinina ... 2
1.2 Biološka aktivnost artemisininov in 1,2,4,5-tetraoksanov ... 3
1.2.1 Biološka aktivnost artemisinina in njegovih polsinteznih derivatov ... 3
1.2.1.1 Protiparazitsko delovanje artemisininov ... 4
1.2.1.2 Protitumorsko delovanje artemisininov ... 4
1.2.1.3 Protivirusno delovanje artemisininov ... 5
1.2.1.4 Protivnetno delovanje artemisininov ... 6
1.2.1.5 Protiglivično in protibakterijsko delovanje ... 6
1.2.2 Biološka aktivnost 1,2,4,5-tetraoksanov ... 7
1.2.2.1 Protiparazitsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 7
1.2.2.1.1 Protimalarijsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 7
1.2.2.1.1.1 Hibridne učinkovine za zdravljenje malarije ... 13
1.2.2.1.1.2 Mehanizem protimalarijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov ... 14
1.2.2.1.2 Antitoksoplazmozno delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 16
1.2.2.1.3 Antihelmintsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 16
1.2.2.2 Protitumorsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 17
1.2.2.3 Protibakterijsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov ... 19
1.3 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov ... 19
1.3.1 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin ... 21
1.3.1.1 Dvostopenjska sinteza ... 21
1.3.1.2 Enostopenjska sinteza ... 26
1.3.2 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz maskiranih izhodnih spojin ... 29
1.3.2.1 Enostopenjska sinteza iz *gem*-dihidroperoksidov in spojine z maskirano karbonilno spojino ... 29
1.3.2.2 Enostopenjska sinteza iz maskiranih *gem*-dihidroperoksidov in karbonilne spojine ... 30
1.3.3 Intramolekularna sinteza bicikličnih 1,2,4,5-tetraoksanov ... 31

**2 Namen dela** **33**

**3 Materiali in metode** **35**
3.1 Materiali in metode, ki smo jih uporabili pri študiji sinteze nesimetričnih tetraoksanov....35
3.2 Materiali in metode, ki smo jih uporabili pri vrednotenju biološkega delovanja tetraoksanov....37

**4 Rezultati in razprava** **39**
4.1 Študija pretvorbe karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom v *gem*-dihidroperokside....39
4.1.1 Identifikacija in karakterizacija α-hidroperoksialkoholov....40
4.1.2 Vpliv topila na tvorbo HPA....46
4.1.3 Vpliv količine dodanega $H_2O_2$ na tvorbo HPA....47
4.1.4 Stabilnost α-hidroperoksialkoholov na primeru HPA 2c....48
4.1.5 Sinteza strukturno različnih HPA....49
4.1.6 Sinteza *gem*-dihidroperoksidov za nadaljnjo sintezo TO....53
4.1.7 Eksperimentalno delo....56
4.1.7.1 Eksperimentalni podatki za sintezo α-hidroperoksialkoholov....56
4.1.7.2 Eksperimentalni podatki za sintezo *gem*-dihidroperoksidov....65
4.2 Študija sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in ketonov....70
4.2.1 Študija vpliva reakcijskih pogojev ciklokondenzacije na modelnih substratih....71
4.2.2 Vpliv količine kisline na ciklokondenzacijo....74
4.2.3 Vpliv topila na ciklizacijo modelnih substratov....76
4.2.4 Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na obroču izhodnih spojin na selektivnost ciklizacije....78
4.2.5 Vpliv reaktivnosti ketona na ciklokondenzacijo z DHP 3d....82
4.2.6 Vpliv reaktivnosti DHP na ciklokondenzacijo s ketonom....83
4.2.7 Sinteza nesimetričnih TO z estrsko funkcionalno skupino....87
4.2.8 Nadaljnje kemijske pretvorbe TO z estrsko skupino....88
4.2.9 Eksperimentalno delo....89
4.2.9.1 Tipičen eksperimentalni postopek pri optimizaciji sinteze 3-fenil-12-metil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekana (4ad)....89
4.2.9.2 Tipičen eksperimentalni postopek za sintezo 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksida 3 in karbonilne spojine 1....91
4.2.9.3 Tipičen eksperimentalni postopek za hidrolizo estrov 1,2,4,5-tetraoksanov 4ab, 4bk in 5b....101
4.2.9.4 Tipičen eksperimentalni postopek za tvorbo natrijeve soli 1,2,4,5-tetraoksanov 9ab, 9bk in 9b....102
4.3 Vrednotenje biološkega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov....104
4.3.1 Vrednotenje protibakterijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov....106
4.3.1.1 Protibakterijsko delovanje proti *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*....106
4.3.1.2 Protituberkulozno delovanje....108
4.3.2 Vrednotenje protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov....109
4.3.3 Eksperimentalno delo....112
4.3.3.1 Sinteza peroksidov, ki smo jih uporabljali v eksperimentih testiranja biološke aktivnosti....112

4.3.3.2 Eksperimentalni postopki za testiranje protibakterijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov....114
4.3.3.2.1 Eksperimentalni postopki za testiranje protibakterijskega delovanja proti *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*....114
4.3.3.2.2 Eksperimentalni postopki za testiranje antituberkuloznega delovanja....115
4.3.3.3 Eksperimentalni postopki za testiranje protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov....115

**5 Zaključki** **117**

**Literatura** **119**

**Bibliografija** **135**

**Biografija** **137**

# Sheme

Shema 1.1: Kemijska struktura artemisinina. ..... 2
Shema 1.2: Polsintezni derivati artemisinina. ..... 3
Shema 1.3: Skelet najpomembnejših skupin sinteznih peroksidov. ..... 3
Shema 1.4: Struktura najperspektivnejših sinteznih peroksidov. ..... 3
Shema 1.5: Struktura 1,2,4,5-tetraoksanov iz prve študije o protimalarijskem delovanju 1,2,4,5-tetraoksanov. ..... 7
Shema 1.6: *In vitro* ($IC_{50}$ v nM) in *in vivo* (znižanje parazitemije, P) antimalarijska aktivnost derivatov WR148999 (**U1-U5**) in tetraoksana iz dihidrokarvona (**U6**). ..... 8
Shema 1.7: Primer *cis* in *trans* simetričnega *bis*-steroidnega tetraoksana s protimalarijskim delovanjem. ..... 8
Shema 1.8: Razmerje med strukturo in protimalarijsko aktivnostjo pri nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanskih derivatih holne kisline. ..... 9
Shema 1.9: Spiro dimetilni (**U9**) in intramolekularni (**U10**) derivat holne kisline. ..... 10
Shema 1.10: Strukturni sklopi novejših dispiro 1,2,4,5-tetraoksanov. ..... 11
Shema 1.11: Tetraoksanski dimeri s podano *in vivo* protimalarijsko aktivnostjo. ..... 11
Shema 1.12: Primeri struktur spiro in nespiro tetraoksanov s šibkejšim protimalarijskim delovanjem. ..... 12
Shema 1.13: Strukturi polarnih tetraoksanov brez protimalarijske aktivnosti. ..... 13
Shema 1.14: Strukturni sklopi tetraoksanskih hibridov. ..... 14
Shema 1.15: Predviden mehanizem reduktivne cepitve peroksidne vezi v tetraoksanu. ..... 15
Shema 1.16: Predviden mehanizem alkilacije hema. ..... 15
Shema 1.17: Struktura tetraoksana z *in vivo* delovanjem proti *T. gondii*. ..... 16
Shema 1.18: Strukture 1,2,4,5-tetraoksanov z *in vivo* delovanjem proti mikroorganizmu *Fasciola Hepatica* (znižanje parazitemije, P). ..... 16
Shema 1.19: Bicikličen tetraoksan z aktivnostjo proti parazitu *Schistosoma mansoni* in tetraoksanski hibrid z delovanjem proti parazitu *Schistosoma japonicum.* ..... 17
Shema 1.20: Predstavniki najbolj nevrotoksičnih simetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s podanimi $IC_{50}$ vrednostmi za njihovo nevrotoksično in protimalarijsko delovanje. ..... 17
Shema 1.21: Najboljši 1,2,4,5-tetraoksanski kandidati z *in-vitro* protitumorskim delovanjem iz posameznega strukturnega sklopa. ..... 18
Shema 1.22: Struktura steroidnih 1,2,4,5-tetraoksanov s protituberkuloznim delovanjem. ..... 19
Shema 1.23: Primer strukture simetričnega in nesimetričnega tetraoksana. ..... 19
Shema 1.24: Sinteza simetričnih in nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z vodikovim peroksidom iz karbonilne spojine. ..... 20
Shema 1.25: Kislinsko katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin ter strukture možnih stranskih produktov reakcije. ..... 21
Shema 1.26: S $H_2SO_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz steroidnih *gem*-dihidroperoksidov. ..... 21

Shema 1.27: S $H_2SO_4$ katalizirana ciklokondenzacija androstanskih *gem*-dihidroperoksidov s 4-substituiranimi cikloheksanoni. ....22
Shema 1.28: S $H_2SO_4$ katalizirana sinteza nesimetričnega tetraoksana s cikloheksanskim skeletom. ....22
Shema 1.29: S $HBF_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov. ....22
Shema 1.30: Selektivnost pri sintezi dispiro tetaoksana. ....23
Shema 1.31: Selektivnost pri sintezi spiro tetraoksanov. ....23
Shema 1.32: S $HBF_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v fluoriranih alkoholih v prisotnosti $H_2O_2$. ....24
Shema 1.33: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, katalizirana s fosfomolibdensko kislino (PMA). ....24
Shema 1.34: Primerjava izkoristka kislinsko in kovinsko katalizirane sinteze nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana. ....24
Shema 1.35: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z $Re_2O_7$. ....25
Shema 1.36: Selektivnost kovinsko katalizirane sinteze nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana v odvisnosti od funkcionalizacije izhodnih spojin. ....25
Shema 1.37: Sinteza tetraoksanskega prekurzorja z $Re_2O_7$ za sintezo druge generacije analogov RKA128. ....25
Shema 1.38: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z Bi(III) katalizatorjem. ....26
Shema 1.39: *»One-pot«* sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v fluoriranih alkoholih. ....26
Shema 1.40: *»One-pot«* sinteza strukturno različnih nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov. 27
Shema 1.41: Neselektivnost reakcije pri *»one-pot«* sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz substituiranih benzaldehidov in tereftaldehida. ....27
Shema 1.42: Problem selektivnosti pri *»one-pot«* sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v sistemu $H_2O_2$/MTO/$HBF_4$/TFE. ....28
Shema 1.43: Z $Re_2O_7$ katalizirana *»one-pot«* sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov. 28
Shema 1.44: Z jodom katalizirana *»one-pot«* sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz substituiranih benzaldehidov. ....29
Shema 1.45: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in acetalov. ....29
Shema 1.46: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz primarnih *gem*-dihidroperoksidov in acetalov. ....30
Shema 1.47: Sinteza alkoksi-substituiranih 1,2,4,5-tetraoksanov iz ortoestrov. ....30
Shema 1.48: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s kondenzacijo trimetilsililnih derivatov *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin. ....31
Shema 1.49: Intramolekularna tvorba 1,2,4,5-tetraoksana iz pentan-2,4-diona. ....31
Shema 1.50: Intramolekularna tvorba 1,2,4,5-tetraoksana iz 1,3-diketonov. ....31
Shema 1.51: Sinteza bicikličnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz triketonov preko ozonidnega intermediata. ....32
Shema 1.52: Intramolekularna sinteza 1,2,4,5-tetraoksana iz 1,6-dialdehida. ....32
Shema 4.1: Predlagan potek pretvorb cikloheksanona z vodikovim peroksidom. ....40
Shema 4.2: Pretvorba ketona v DHP preko HPA. ....40
Shema 4.3: Razpad HPA **2c** v keton **1c** in $H_2O_2$ v dvofaznem sistemu (DKM in $H_2O$). ..48
Shema 4.4: Pretvorba ketona v DHP preko intermediata HPA. ....49
Shema 4.5: Stabilnost HPA **2c** v kislem. ....49
Shema 4.6: Peroksidacija adamantan-2-ona **1k** and acetona **1l**. ....52
Shema 4.7: Peroksidacija aldehidov **1m-1r** v ustrezni HPA **2m-2r** s podanimi konverzijami. ....53
Shema 4.8: Sinteza *gem*-dihidroperoksidov **3a-3d**, **3k** in **3s**. ....54

Shema 4.9: Sinteza *gem*-dihidroperoksida **3e**. ..... 54
Shema 4.10: Trostopenjska sinteza DHP **3t**. ..... 55
Shema 4.11: Sinteza DHP **3u**. ..... 55
Shema 4.12: Primer strukture simetričnega in nesimetričnega TO. ..... 70
Shema 4.13: Možni produkti pri kislinsko katalizirani ciklokondenzaciji DHP in karbonilne spojine. ..... 70
Shema 4.14: Shematski prikaz eksperimentalnega postopka analize reakcijske zmesi. ..... 71
Shema 4.15: Stabilnost nesimetričnega TO **4ad** v prisotnosti $HBF_4$ v TFE pri 22 °C. ..... 74
Shema 4.16: Konverzija HO v TO in lakton**.** ..... 74
Shema 4.17: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih spojin DHP **3d** in ketona **1a.** ..... 75
Shema 4.18: Reakcija med DHP **3d** in ketonom **1a** v HFIP pri različnih dodatkih kisline. ..... 76
Shema 4.19: Sinteza nesimetričnih TO iz DHP **3d**. ..... 82
Shema 4.20: Sinteza nesimetričnega TO **4es.** ..... 84
Shema 4.21: Vpliv reakcijskih pogojev na sintezo nesimetričnega TO **4ak** iz DHP **3a** in ketona **1k**. a) Vpliv količine ketona **1k** na distribucijo tvorjenih cikličnih peroksidov (0,2 ekv. $HBF_4$ v TFE, 22 °C, 1 min). b) Časovna odvisnost distribucije nastalih cikličnih peroksidov pri reakciji med DHP **3a** in 2 ekv. ketona **1k** z 1 ekv. $HBF_4$ v TFE pri 0 °C. ..... 86
Shema 4.22: Sinteza nesimetričnih tetraoksanov z estrsko skupino. ..... 88
Shema 4.23: Hidroliza estrov TO **4ab**, **4bk** in **5b** ter tvorba natrijevih soli. ..... 88
Shema 4.24: Strukture peroksidnih spojin, ki smo jih uporabili v študiji biološke aktivnosti. ..... 105

# Slike

Slika 4.1: Sledenje peroksidacije **1a** s $H_2O_2$ z *»in-situ«* IR spektroskopijo. a) IR spekter ketona **1a**, HPA **2a**, DHP **3a** in MeCN. b) Časovni potek spreminjanja intenzitet karakterističnih signalov v IR spektru za posamezno komponento reakcijske zmesi. c) 3D IR spekter peroksidacije **1a** v HPA **2a** in DHP **3a**. .....42
Slika 4.2: Sledenje peroksidacije **1b** s $H_2O_2$ z *»in-situ«* IR spektroskopijo. a) IR spekter ketona **1b**, HPA **2b**, DHP **3b** in MeCN. b) Časovni potek spreminjanja intenzitet karakterističnih signalov v IR spektru za posamezno komponento reakcijske zmesi. c) 3D IR spekter peroksidacije **1b** v HPA **2b** in DHP **3b** po povišanju temperature na 40 °C. 43
Slika 4.3: $^1$H NMR spekter HPA **2b** (a) in DHP **3b** (b) z označenimi signali protonov na enakem položaju, ki imajo drugačen kemijski premik v NMR spektru. .....44
Slika 4.4: Prikaz ene izmed dveh molekul HPA **2c**, ki sestavljata asimetrično enoto kristalne strukture HPA **2c**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): O−O 1.464(1); C−O(OH) 1.442(2); C−O(H) 1.405(2). .....45
Slika 4.5: Prikaz pakiranja molekul HPA **2c,** ki se v kristalni strukturi med seboj povezujejo z O–H···O vodikovimi vezmi v stebre. Vodikovi atomi, vezani na ogljikove atome, zaradi preglednosti niso izrisani. .....46
Slika 4.6: Prikaz asimetrične enote kristalne strukture spojine HPA **2i**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): S−O 1.524(1), O−O 1.471(1), C−O(OH) 1.438(2), C−O(H) 1.394(2).....51
Slika 4.7: Prikaz osnovne celice in pakiranja molekul v kristalni strukturi HPA **2i**, v kateri se molekule med seboj povezujejo z intermolekulskimi vodikovimi vezmi in tvorijo plasti. .....52
Slika 4.8: Prikaz ene izmed dveh enakih molekul, ki sestavljata asimetrično enoto kristalne strukture spojine DHP **3t**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): O−O 1.466(2), 1.467(2); C−O(OH) 1.417(3), 1.418(3). .....55
Slika 4.9: Prikaz molekul DHP **3t**, ki se v kristalni strukturi povezujejo v verige z O–H···O=C vodikovimi vezmi. .....55
Slika 4.10: Vpliv DMSO na rast bakterij. .....106
Slika 4.11: Vpliv tetraoksanov in artesunata pri koncentraciji 128 μg/ml na rast bakterij. .....107
Slika 4.12: Preživetje tumorskih celic HeLa (levo) in A549 (desno) po 6-urni inkubaciji s sinteznimi peroksidi. .....111

# Tabele

Tabela 4.1: Vpliv topila na peroksidacijo ketona **1a**. ....47
Tabela 4.2: Vpliv količine dodanega $H_2O_2$ na peroksidacijo ketona **1b.** ....48
Tabela 4.3: Peroksidacija cikloheksanonskih derivatov z vodno raztopino $H_2O_2$ z azeotropno destilacijo vode iz raztopine v MeCN.[a] ....50
Tabela 4.4: Vpliv reakcijskih pogojev na ciklizacijo DHP **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a.** ....73
Tabela 4.5: Ciklizacija DHP **3d** in ketona **1a** v različnih topilih....78
Tabela 4.6: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4ad.**[a] ....79
Tabela 4.7: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4bc**.[a] ....80
Tabela 4.8: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4ak**.[a] ....81
Tabela 4.9: Sinteza nesimetričnega tetraoksana **4dk** iz adamantanona **1k.** ....83
Tabela 4.10: Sinteze nesimetričnih TO iz ketona **1a** in ustreznega DHP.[a] ....85
Tabela 4.11: Vpliv reakcijskih pogojev na izkoristek sinteze TO **4bs**.[a] ....87
Tabela 4.12: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih substratov (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a** v TFE (22 °C, 60 min). ....89
Tabela 4.13: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih substratov (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a** v MeCN (22 °C, 5 min). ....90
Tabela 4.14: Izkoristek nastalih cikličnih peroksidov in njihova distribucija pri ciklizaciji 1,1-dihidroperoksi-4-metilcikloheksana **3a** in adamantan-2-ona **1k** v TFE pri različnih pogojih. ....90
Tabela 4.15: *In vitro* protituberkulozna aktivnost sintetiziranih peroksidov. ....108
Tabela 4.16: *In vitro* citotoksična aktivnost sintetiziranih peroksidov na dveh tumorskih celičnih linijah HeLa in A549. ....110

# Kratice

A. u. ... površina pod krivuljo
A549 ... celice človeškega pljučnega adenocarcinoma
ACT ... artemisininska kombinirana terapija (angl. artemisinin combination therapy)
ATR-IR ... infrardeča spektroskopija z ojačanim popolnim odbojem
$Bi(OTf)_3$ ... bizmutov triflat
DHP ... *gem*-dihidroperoksid
DKM ... diklorometan
DMSO ... dimetilsulfoksid
$ED_{50}$ ... srednji efektivni odmerek, t. j. odmerek, ki povzroči farmakološki učinek pri 50 % članov preizkusne populacije
ekv ... ekvivalent
Et ... etil
EtOAc ... etil acetat
FDA ... Zvezni urad za živila in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
HeLa ... celice človeškega adenokarcinoma maternične vratu
HFIP ... heksafluoroizopropanol
HIV ... virus humane imunske pomanjkljivosti
HO ... 1,2,4,5,7,8-heksaoksonan
HPA ... hidroperoksialkohol
HR-MS ... masna spektroskopija visoke ločljivosti
HTS ... rešetanje visoke ločljivost (angl. high-through screening)
$IC_{50}$ ... srednja inhibitorna koncentracija, t. j. koncentracija, ki povzroči 50% inhibicijo določene aktivnosti (v oklepaju so navedeni sevi plazmodija, za katere velja vrednost)
iPr ... Izo-propil
IR ... infrardeča spektroskopija
Me ... metil
MeOH ... metanol
MIK ... minimalna inhibitorna koncentracija
mol% ... molski odstotek
MTO ... metil trioksorenij
MTT ... 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NADH ... reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NF-κB ... transkripcijski jedrni faktor
NMR ... nuklearna magnetna resonanca
P ... znižanje parazitemije v odstotkih
*Pf*ATP6 ... od kalcija odvisna adenozin trifosfataza *Plasmodium falciparum*
*Pf*TCTP ... plazmodijev s translacijo kontroliran tumorski protein (angl. translationally controlled tumor protein)
Ph ... fenil

| | | |
|---|---|---|
| PMA | ... | fosfomolibdenska kislina |
| s. t. | ... | sobna temperatura |
| Sp1 | ... | specifični protein 1 |
| tBu | ... | *terc*-butil |
| TFE | ... | 2,2,2-trifluoroetanol |
| TLC | ... | tankoplastna kromatografija |
| TMSOTf | ... | trimetilsilil trifluorometansulfonat |
| TO | ... | 1,2,4,5-tetraoksan |

# Poglavje 1

# Uvod

Naravni produkti so spojine s farmakološkim delovanjem in izvorom v naravnih virih, kot so rastline, živali in mikroorganizmi [1]. Zdravila iz naravnih produktov, še posebej iz rastlin, imajo že tisočletja pomembno vlogo v tradicionalni medicini. Sprva so bila ta zdravila v obliki surovih rastlinskih izvlečkov, kot na primer tinktur, čajev, praškov in drugih farmacevtskih pripravkov rastlinskega izvora [2]. Ta zdravila so kompleksne zmesi, ki lahko vsebujejo na stotine kemijsko različnih substanc, od katerih so ponavadi le nekatere oz. samo ena od njih odgovorna za njihovo biološko delovanje. Zaradi majhne vsebnosti bioaktivnih učinkovin v rastlinah predstavljajo večinski del rastlinskega izvlečka proteini, sladkorji in tanini brez farmakološkega delovanja, ki močno otežujejo kontrolo kakovosti surovih rastlinskih izvlečkov in pripravkov iz njih [3]. Temu se je mogoče izogniti z izolacijo zdravilnih učinkovin iz surove zmesi naravnih produktov, kar so prvič uspešno storili pred več kot 200 leti, ko so izolirali morfij iz makovih semen [4]. Tako se je začelo polnjenje baz podatkov z naravnimi produkti, njihovo podatkovno rešetanje ter razvoj presejalnih pristopov, ki bi olajšali uporabo naravnih produktov v procesu razvoja zdravil [5].

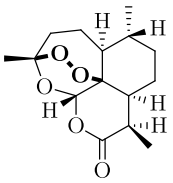
Naravni produkti lahko v nespremenjeni obliki služijo kot zdravilne učinkovine ali pa kot spojine vodnice za polsintezne ali sintezne derivate [6]. V prid pomembnosti naravnih produktov govori tudi statistika FDA (Food and Drug Administration), saj naravni produkti in njihovi polsintezni ali sintezni derivati predstavljajo 38 % vseh odobrenih zdravil [7]. Do leta 1940 so med odobrenimi zdravili prednjačili nespremenjeni naravni produkti (43 % vseh odobrenih zdravil) pred njihovimi polsinteznimi in sinteznimi derivati (14 % vseh odobrenih zdravil), potem pa se je začel postopni vzpon derivatov naravnih produktov, saj imajo v primerjavi z nespremenjenimi naravnimi produkti ojačeno biološko učinkovitost, izboljšane farmakokinetične lastnosti in so bolj varni. V 21. stoletju tako predstavljajo polsintezni in sintezni derivati 28 % vseh odobrenih zdravil, nespremenjeni naravni produkti pa samo še 5 % [7].

Razcvet zdravil iz naravnih produktov je trajal do leta 1990, ko je bilo približno 80 % zdravil na tržišču naravnih produktov ali pa njihovih polsinteznih ali sinteznih analogov. Zanimanje farmacevtske industrije za razvoj zdravil iz naravnih produktov je potem upadlo zaradi osredotočenosti na eksperimentalno rešetanje visoke ločljivosti (angl. high-throughput screening, HTS) knjižnic spojin sinteznega izvora [4]. Kljub temu je bilo v letih od 1981 do 2010 med novimi zdravili še vedno 4 % naravnih produktov, 22 % njihovih polsinteznih derivatov in 13 % sinteznih spojin s farmakoforom, ki je izviral iz naravnega produkta; skupno torej skoraj 40 % vseh novih zdravil [8]. Številni naravni produkti in njihovi polsintezni ali sintezni derivati so še v procesu kliničnih testiranj, leta 2013 jih je bilo kar 31 v tretji fazi kliničnih študij ali pa že v postopku registracije [9].

Zelo pomembna skupina naravnih produktov so peroksidi. Iz naravnih virov je bilo izoliranih več kot 600 peroksidov, večinoma iz rastlin družine nebinovk (*Asteraceae*), vendar se naključno pojavijo tudi v približno desetih drugih vrstah rastlin. Najdemo jih še v morskih nevretenčarjih, še posebej pogosti so v spužvah. Strukturno uvrščamo naravne perokside v različne skupine, in sicer med maščobne kisline, terpene, steroide, lipide in ostale metabolite. Večina teh peroksidov ima tudi farmakološko delovanje, kot na primer protitumorsko, protibakterijsko, protiparazitsko, protiglivično, protivirusno [10,11].

## 1.1 Razvoj strukture cikličnih peroksidov iz artemisinina

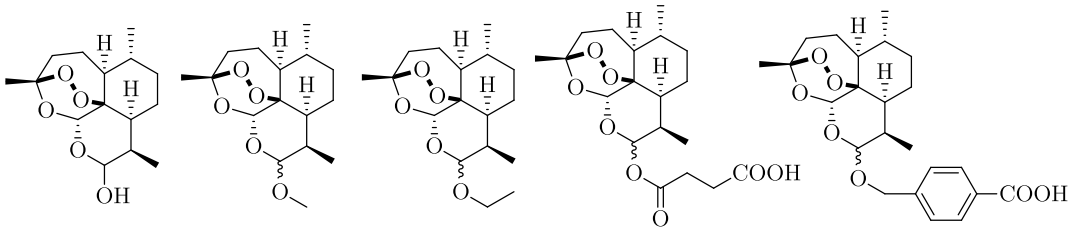
Ena najpomembnejših zdravilnih rastlin iz družine nebinovk je enoletni pelin (*Artemisia annua*) in se v tradicionalni kitajski medicini uporablja že več kot dva tisoč let. Sprva so ga uporabljali za zdravljenje hemeroidov, od 4. stoletja dalje pa kot antipiretik. V 16. stoletju so se pojavili prvi zapisi o njegovem antimalarijskem delovanju. Za farmakološko delovanje te zdravilne rastline je odgovorna spojina artemisinin, to je seskviterpenski trioksanski lakton z molekulsko formulo $C_{15}H_{22}O_5$ (Shema 1.1). Artemisinin ali qinghaosu ima v svoji strukturi peroksidno vez, ki je nepogrešljiva pri njegovi bioaktivnosti [12,13]. Dandanes se artemisinin in nekateri njegovi polsintezni analogi uporabljajo za zdravljenje malarije, najpogosteje v kombinaciji z drugim antimalarikom z drugačnim mehanizmom delovanja, kar imenujemo artemisininska kombinirana terapija (ACT). Od leta 2001 je ACT celo zdravilo izbora za zdravljenje nekomplicirane malarije, ki jo povzroča *P. falciparum* [14].



artemisinin

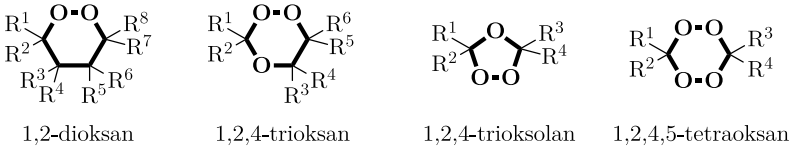
Shema 1.1: Kemijska struktura artemisinina.

Slaba topnost artemisinina tako v polarnih kot v nepolarnih topilih je ovirala njegovo uporabo v antimalarijski farmakoterapiji, zato je prišlo do razvoja polsinteznih derivatov artemisinina [15]. Najpomembnejši polsintezni derivati so etri in estri dihidroartemisinina (Shema 1.2). Etra, artemeter in artemotil, imata močnejšo protimalarijsko delovanje v primerjavi z artemisininom, boljše farmakokinetične lastnosti in ojačano lipofilnost. Slednje jima omogoča intramuskularno aplikacijo in s tem podaljšano sproščanje. Vodotopne estre, artesunat in artelinsko kislino, pa je mogoče aplicirati intravensko in zato delujejo zelo hitro [16].



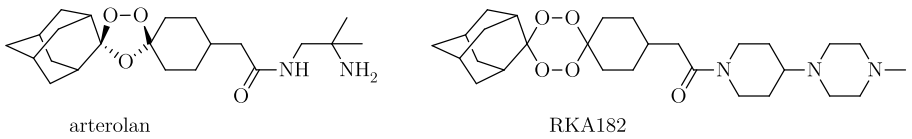

Shema 1.2: Polsintezni derivati artemisinina.

Gonilo razvoja sinteznih peroksidov sta bili želja po izboljšanju farmakokinetičnih lastnosti artemisinina in njegovih polsinteznih derivatov ter težnja po zmanjšanju stroškov njegovega pridobivanja z namenom, da bi peroksidni antimalariki postali bolj dostopni širšemu krogu bolnikov. Sintezni peroksidi bi tako imeli močno poenostavljeno kemijsko strukturo v primerjavi z artemisininom, vendar bi kljub temu ohranili biološko aktivnost. Najpomembnejše skupine sinteznih peroksidov so 1,2-dioksani, 1,2,4-trioksani, 1,2,4-trioksolani in 1,2,4,5-tetraoksani (Shema 1.3) [15]. Glede na to, da je za bioaktivnost odločilna peroksidna skupina, so med sinteznimi peroksidi najbolj perspektivni 1,2,4,5-tetraoksani, saj imajo v osnovnem skeletu dve peroksidni skupini [17].




Shema 1.3: Skelet najpomembnejših skupin sinteznih peroksidov.

Pomembnost sinteznih peroksidov v antimalarijski terapiji se je potrdila leta 2011, ko je prišla na trg prva kombinacija sinteznega peroksida arterolana z antimalarikom kinolinskega tipa piperakinom (Shema 1.4) [18]. RKA182, najperspektivnejši tetraoksanski derivat za uvedbo v protimalarijsko terapijo [19], je trenutno v fazi predkliničnih testiranj [20].




Shema 1.4: Struktura najperspektivnejših sinteznih peroksidov.

## 1.2 Biološka aktivnost artemisininov in 1,2,4,5-tetraoksanov

Osnova za raziskovanje biološke aktivnosti 1,2,4,5-tetraoksanov so bili dokazi o širokem farmakološkem delovanju artemisinina in njegovih polsinteznih derivatov.

### 1.2.1 Biološka aktivnost artemisinina in njegovih polsinteznih derivatov

Najpomembnejše je protiparazitsko delovanje artemisininov, saj so že uveljavljeni kot protimalarijske učinkovine. Delujejo pa tudi proti nekaterim drugim praživalim in črvom

ter so v klinični študiji za zdravljenje okužb, ki jih povzroča parazit *Schistosoma*. V kliničnih študijah se vrednoti tudi njihovo protitumorsko, protivirusno in celo antipsihotično delovanje. Poleg tega imajo tudi *in vivo* protivnetno ter *in vitro* protibakterijsko in protiglivično delovanje [21].

#### 1.2.1.1 Protiparazitsko delovanje artemisininov

Kot že omenjeno, je terapevtsko najpomembnejše farmakološko delovanje artemisininov protimalarijska aktivnost, saj so se že uveljavili kot zdravilo izbora za zdravljenje malarije [14]. Način, kako dosežejo protimalarijsko delovanje, še ni popolnoma pojasnjen, saj je bilo predlaganih več mehanizmov, med katerimi je najširše sprejet "hemski model" [22,23]. V tem modelu Fe(II) ion, ki je vezan v hem ali pa prost v intracelularni tekočini [22], aktivira artemisinin s cepitvijo peroksidne vezi [24]. Tako nastanejo iz artemisinina prosti ogljikovi radikali, ki naključno alkilirajo okoliške molekule, kot so hem [25], hemoproteini [26], *Pf*TCTP [27,28] in *Pf*ATP6aza [29]. Z alkilacijo hema tudi preprečijo njegovo polimerizacijo v hemozoin, kar povzroči akumulacijo hema in še dodaten oksidativni stres v parazitu in posledično njegovo smrt [30].

Poleg antimalarijskega imajo artemisinini protiparazitsko delovanje tudi proti praživalim iz rodov *Toxoplasma, Trypanosoma* in *Leishmania* ter antihelmintsko proti črvom iz rodov *Schistosoma* in *Fasciola* [21,31]. Številna klinična testiranja v zadnjih letih so potrdila koristnost artemisininov pri zdravljenju bilharzije, ki jo povzroča parazit *Schistosoma*. Meta-analize kliničnih študij kažejo, da artemisinini sicer niso bolj učinkoviti v terapiji te tropske bolezni od zdravila izbora prazikvantela, vendar pa kombiniranje obeh učinkovin deluje sinergistično in poveča verjetnost ozdravljenja okužbe. Artemisnini so v nasprotju s prazikvantelom bolj toksični za juvenilne stadije *Schistosome*, zato so primerni za profilakso [32,33].

Delovanje artemisininov proti ostalim parazitom je še v fazi *in vitro* ter *in vivo* testiranj. V živalskih modelih je mogoče z artemisinini pozdraviti okužbo s *Fasciolo hepatico* [34-36], pri čemer je za antihelmintski učinek artemisininov, tako kot pri antimalarijskem delovanju, potrebna aktivacija z železom in posledična tvorba prostih radikalov [36]. Ob optimalnem doziranju je dodatek artemisininov k triklabendazolu, ki je zdravilo izbora za zdravljenje okužb s *Fasciolo*, deloval sinergistično v *in vivo* testiranjih [37].

Medtem ko so že znani dokazi o *in vivo* učinkovitosti artemisininov proti toksoplazmozi [38], pa so trenutno pokazali le *in vitro* delovanje proti povzročitelju spalne bolezni (*Trypanosoma brucei*) [39]. Predviden mehanizem delovanja tako proti *Toxoplasmi* [40] kot tudi *Trypanosomi* [39] je inhibicija parazitove od kalcija odvisne ATPaze s posledičnim nakopičenjem kalcija, ki ustavi rast parazita.

#### 1.2.1.2 Protitumorsko delovanje artemisininov

O protitumorski aktivnosti artemisininov so prvič poročali leta 1993, ko so odkrili *in vitro* citotoksičnost artemisininskih derivatov za celice Erhlichovega ascitesa [41]. Med številnimi biološkimi aktivnostmi artemisininov veliko obeta njihova protitumorska aktivnost, saj se je učinkovitost artemisininov pri zdravljenju različnih vrst raka potrdila tudi v kliničnih študijah [21,42,43]. Artesunat je odraslemu moškemu po dvomesečni terapiji uspešno zmanjšal ploščatocelični tumor grla za 70 % [44], v kombinaciji z drugim citostatikom pa je podaljšal preživetje bolnika z metastatičnim očesnim melanomom [45]. Artemeter je zavrl napredovanje bolezni in znižal gostoto tumorja pri odraslem bolniku z makroadenomom hipofize [46]. V študijah na večjem številu bolnikov je dodajanje artesunata v farmakoterapijo nedrobnoceličnega pljučnega raka upočasnilo napredovanje bolezni [47], dihidroartemisinin pa je pri bolnicah z napredovanim rakom materničnega

vratu izboljšal simptome [48]. Pilotna študija na manjšem številu bolnikov z rakom debelega črevesa je pokazala, da ima artesunat antiproliferativni učinek na tej vrsti raka [49]. Trenutno poteka tudi prva klinična študija protitumorske terapije artemisininov, in sicer je v prvi fazi kliničnih testiranj uporaba artesunata za zdravljenje metastaziranega raka dojk (NCT00764036).

Odmerek artemisinina oz. njegovega polsinteznega derivata je pri protitumorski terapiji podoben kot pri protimalarijski. Iz tega bi lahko sklepali, da bi bila uporaba artemisininov tudi za zdravljenje raka varna, saj so stranski učinki pri protimalarijski terapiji redki, največkrat so poročali o nevrotoksičnosti [21]. Glede na to, da gre pri zdravljenju raka za kronično terapijo, je pomembno, da so stranski učinki tudi pri dolgotrajnem odmerjanju čim manjši.

Tako kot za antimalarijsko je za protitumorsko delovanje tudi odločilna peroksidna skupina v molekuli [42]. Protitumorski učinki artemisininov zajemajo ustavitev celičnega cikla, zmanjševanje proliferacije in spodbujanje apoptoze tumornih celic, preprečevanje angiogeneze in sposobnosti invazije rakastih celic v tkiva ter metastaziranja [21,50]. Artemisinini dosežejo selektivno toksičnost zaradi povečane količine transferinskih receptorjev na tumorskih celicah in večjega privzema železa v celice ter povečane občutljivosti na oksidativni stres zaradi primanjkljaja antioksidantnih encimov. Poleg oksidativnega stresa pa artemisini v tumorskih celicah povzročijo še spremembo v izražanju onkogenov in tumor supresorskih genov, ki niso v povezavi z metabolizmom železa, zato je jasno, da dosežejo svoj protitumorski učinek tudi s specifičnim vplivom na celične procese [50]. Selektivnost artemisininov in zmanjšanje stranskih učinkov je mogoče še ojačati preko tvorbe predzdravila v obliki konjugatov s transferinom, ki imajo močnejše protitumorsko delovanje in lahko vstopajo v celico tudi s specifičnim transportom preko transferinskega receptorja. Predzdravilo se po vstopu v celico aktivira v endosomu, ko se zaradi znižanega pH-ja sprosti železo iz transferina [21,51]. Vsem prej opisanim protitumorskim učinkom navkljub pa bi bila, podobno kot pri antimalarijski terapiji, tudi pri uvedbi artemisininov v zdravljenje raka najboljša strategija kombinirane farmakoterapije, to je kombinacija artemisinov in že uveljavljene citotoksične učinkovine [51]. Z dodatkom artemisininov klasični kemoterapiji je možno doseči tudi kemosenzitacijo, to je ponovna občutljivost odpornih rakavih celic na uveljavljena protitumorska zdravila [42].

#### 1.2.1.3 Protivirusno delovanje artemisininov

Že v začetku 80-ih let 20. stoletja so se pojavila prva namigovanja o protivirusnem delovanju artemisininov [52]. *Herpesviridae* je najpomembnejša družina virusov, katerih rast inhibirajo artemisinini, in sicer gre za citomegaloviruse, herpes simplex virus 1 ter Epstein-Barr virus [21,53]. V kliničnem primeru so z artesunatom uspešno inhibirali replikacijo citomegalovirusa in ozdravili virusno okužbo pri 12-letnem bolniku, ki se je po presaditvi krvotvornih matičnih celic okužil s citomegalovirusom. Posledično se je začela klinična študija za preventivno zdravljenje potencialnih okužb s citomegalovirusom z artesunatom na bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic [54], ki je trenutno v tretji fazi (NCT00284676). V drugem kliničnem primeru so 14-letnega bolnika z artesunatom ozdravili okužbe s humanim herpes virusom 6B, ki je povzročil miokarditis [55]. Artemisinini imajo protivirusno aktivnost *in vitro* tudi proti virusom hepatitisa B in C, govejemu virusu diareje in celo HIV-1 [21,53,56].

Mehanizem protivirusnega delovanja artemisininov ni pojasnjen, vendar so na modelu citalomegalovirusa pokazali, da artemisinini dosežejo svoj učinek specifično z zaviranjem aktivacije transkripcijskih faktorjev NF-κB in Sp1 [57,58]. Na živalskem modelu so pokazali, da dodatek Fe(II) ojača protivirusno delovanje artesunata, na podlagi česar je

moč sklepati, da je nastanek radikalov pomemben tudi pri tem farmakološkem delovanju. V tem primeru radikali ne delujejo s povzročanjem oksidativnega stresa v celicah, ampak s preprečevanjem proinflamatornih učinkov virusne okužbe preko specifičnih mehanizmov [59].

#### 1.2.1.4 Protivnetno delovanje artemisininov

Raziskovanje protivnetnega delovanja artemisinina se je začelo z odkritjem imunosupresivnega učinka artemisinina *in vitro* ter *in vivo* v zadnjih dveh desetletjih 20. stoletja [60-62]. Glede na to, da so artemisinini v telesu sposobni tvorbe prostih radikalov, je presenetljivo, da imajo tudi protivnetno delovanje. Na primeru alergijske astme so celo pokazali, da ima artesunat antioksidativne lastnosti, ki jih doseže z inhibicijo ali indukcijo celičnih signalnih poti [63]. Protivnetno delovanje artemisininov zajema zaščito pred avtoimunimi boleznimi (revmatoidni artritis, lupus eritematozus, lupus nefritis) in alergijskimi reakcijami (alergijski kontaktni dermatitis, alergijska astma, alergijska anafilaksa). V eksperimentalnih *in vivo* študijah so celo pokazali, da bi lahko bili artemisinini potencialno uporabni tudi za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni in endometrioze [21]. Vse te učinke dosežejo artemisinini z imunomodulacijo različnih celic imunskega odziva preko specifičnega delovanja na celične signalne poti [64,65].

Na podlagi tega, da lahko bolniki s toksoplazmozo razvijejo nekatere simptome shizofrenije in da artemisinini zdravijo okužbe s parazitom *Toxoplasma gondii*, so v klinični študiji preverjali učinkovitost artemisinina v kombinaciji z antipsihotiki za blaženje simptomov shizofrenije. Dodajanje artemisinina antipsihotični terapiji ni utišalo simptomov, je pa znižalo število protiteles proti prehranskemu antigen gliandinu, ki je vodotopni del glutena. Tako so se pojavile špekulacije, da bi lahko bili artemisinini uporabni tudi pri zdravljenju celiakije in ostalih boleznih, ki so povezane z avtoimunim odzivom na gluten [66].

#### 1.2.1.5 Protiglivično in protibakterijsko delovanje

Artemisinini imajo *in vitro* protiglivično delovanje proti vrstam *Cryptococcus neoformans* [67] in *Aspergillus fumigatus* [68], na rast vrste *Candida albicans* [67] pa niso imeli vpliva. Predviden mehanizem delovanja je podoben protimalarijskemu, in sicer preko oksidativnega stresa [67]. Ostale predvidene tarče, ki so jih določili s proteomskimi študijami, so mitohondrijska NADH dehidrogenaza, protein in encimi celične stene ter geni, povezani z biosintezo ergosterola [68].

Artemisinin in njegovi derivati imajo *in vitro* protibakterijsko delovanje proti *Helicobacter Pylori*, to je bakterija, ki povzroča gastritis [69]. Poleg tega tudi ojačajo *in vitro* protibakterijsko delovanje β-laktamskih antibiotikov predvidoma z inhibicijo bakterijskih obrambnih mehanizmov, kot sta efluks črpalka [70] in encim NO sintetaza z antioksidativnim delovanjem [71]. Nekateri konjugati dihidroartemisnina s kinoloni so pokazali *in vitro* protituberkulozno delovanje [72].

Glede na podatke iz literature je možno sklepati, da artemisinini sami nimajo protibakterijskega delovanja ali pa ga imajo v zelo redkih primerih. Razlog, da artemisnini oz. njihovi radikali ne dosežejo baktericidnega delovanja, bi lahko bil v privzemu artemisninov v bakterijsko celico. Primer, ki potrjuje to razlago, so konjugati artemisnina s sideroforjem mikobaktinom, ki je normalno zasidran v celični membrani nekaterih bakterij in služi za dostavo železa v celice. Z vezavo artemisnina na mikobaktin se doseže ciljano dostavo artemisnina v celico in to skupaj z železovimi ioni, kar je idealno okolje za nastanek radikalov. Tovrstni konjugati imajo močno protituberkulozno delovanje tudi proti multirezistentnemu sevu *Mycobacterium tuberculosis* [73].

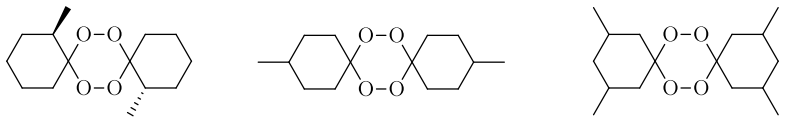
### 1.2.2 Biološka aktivnost 1,2,4,5-tetraoksanov

Vzporedno s spoznavanjem farmakološkega delovanja artemisininov se je postopoma povečevalo tudi vedenje o biološki aktivnosti 1,2,4,5-tetraoksanov, ki se je od protimalarijskega delovanja najprej razširilo na delovanje proti drugim parazitom (*Schistosoma spp.* in *Fasciola spp.*). Sledilo je še odkritje protitumorskega in protibakterijskega učinka 1,2,4,5-tetraoksanov [17]. V edini študiji protivirusnega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov tako hibridni molekuli 1,2,4,5-tetraoksanov s protivirusno učinkovino azidotiminom kot tudi sam 1,2,4,5-tetraoksan niso imeli *in vitro* aktivnosti proti HIV-1 [74].

#### 1.2.2.1 Protiparazitsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

##### 1.2.2.1.1 Protimalarijsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

V nasprotju z artemisininom in njegovimi polsinteznimi derivati se 1,2,4,5-tetraoksani še niso uveljavili v antimalarijski terapiji. Prvi je o biološkem delovanju 1,2,4,5-tetraoksanov poročal Vennerstrom s sodelavci [75] v začetku 90-ih let prejšnjega stoletja. Preprosti dispiro simetrični 1,2,4,5-tetraoksani (Shema 1.5) so imeli močno *in vitro* ter *in vivo* antimalarijsko delovanje, ki je bilo primerljivo z učinkom artemisinina. Na miših, okuženih s *Plasmodium berghei*, pa je bil protimalarijski učinek najboljšega kandidata iz te študije, 1,2,4,5-tetraoksana WR148999 (Shema 1.5), v primerjavi z artemisininom daljši [76]. S tem se je začelo obdobje iskanja sinteznih poti za pripravo strukturno raznolikih 1,2,4,5-tetraoksanov in izčrpno testiranje njihove protimalarijske aktivnosti, da bi našli spojino s čim močnejšim protiparazitskim delovanjem in čim boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi.



WR148999

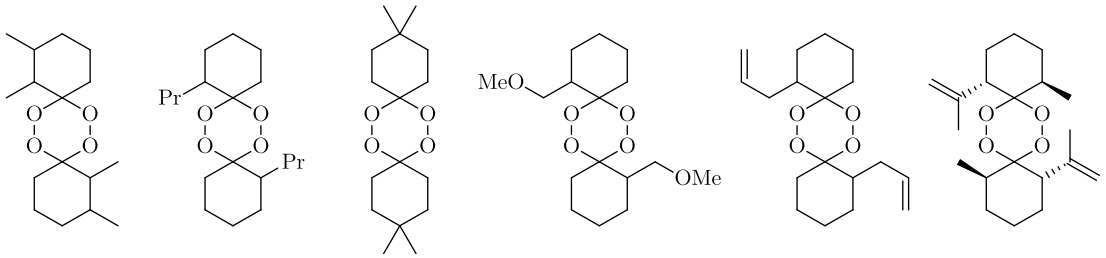
($ED_{50}$=382 mg/kg)

($ED_{50}$ artemisinina je 607 mg/kg)

Shema 1.5: Struktura 1,2,4,5-tetraoksanov iz prve študije o protimalarijskem delovanju 1,2,4,5-tetraoksanov.

Strukturne modifikacije WR148999 so pokazale, da uvedba dodatne metilne skupine na cikloheksalidenski obroč (**U1**, Shema 1.6) ali podaljšanje metilne skupine v daljšo alkilno verigo (**U2**) praviloma zniža *in vitro* jakost protimalarijskega delovanja [77], dimetilna substitucija na enem od cikloheksalidenskih ogljikov (**U3**) pa ga popolnoma izniči [77,78]. Z uvedbo estrske ali etrske skupine na to mesto se sicer poveča *in vitro* protimalarijsko aktivnost, vendar so spojine *in vivo* neučinkovite (z izjemo subkutane aplikacije tovrstnega metilnega etra (**U4**). Primerljivo protimalarijsko delovanje po peroralni aplikaciji ima le alilna substituenta na tem mestu (**U5**) [79]. Glede na to, da polarnejši analogi WR148999 niso imeli ojačanega protimalarijskega delovanja, so predvidevali, da je biološka uporabnost pri peroralni aplikaciji najverjetneje odvisna od metabolizma prvega prehoda in ne omejene topnosti učinkovine [76]. Tudi simetrični 1,2,4,5-tetraoksani, ki izhajajo iz (+)-dihidrokarvona (**U6**), so po enkratnem peroralnem odmerku odpravili parazitemijo v testnih živalih [80]. Shema 1.6 podaja *in vitro* nanomolarne $IC_{50}$ vrednosti za posamezen substrat z definiranim sevom *P. falciparum* ter

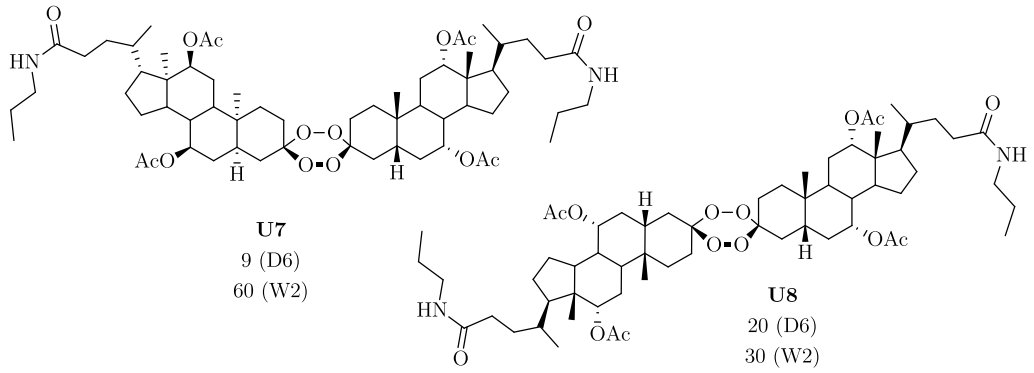
odstotek znižanja parazitemije *P. bergei in vivo* po 6. dnevu (subkutana aplikacija, odmerek 64 mg/kg/dan, **U1**) oz. po 3. dnevu (peroralna aplikacija, enkratna doza 100 mg/kg, **U4-U6**). $IC_{50}$ vrednosti artemisinina so 8,2 nM (D6), 7,3 nM (W2), 2,8 nM (K1) in 3,4 nM (W2). Arteeter je *in vivo* 100 % znižal parazitemijo po 6. dnevu (subkutana aplikacija). Artemisinin je *in vivo* 98 % znižal parazitemijo po 3. dnevu (peroralna aplikacija).




| **U1** | **U2** | **U3** | **U4** | **U5** | **U6** |
|---|---|---|---|---|---|
| 50 (D6) | 76 (D6) | >1000 (D6) | 15 (K1) | 19 (K1) | 6.9 (K1) |
| 43 (W2) | 51 (W2) | >1000 (W2) | 16 (W2) | 23 (W2) | 6.6 (W2) |
| P: 97% | | | P: 18% | P: 93% | P: 99,9% |

Shema 1.6: *In vitro* ($IC_{50}$ v nM) in *in vivo* (znižanje parazitemije, P) antimalarijska aktivnost derivatov WR148999 (**U1-U5**) in tetraoksana iz dihidrokarvona (**U6**).

Vzporedno z razvojem dispiro cikloheksilidenskih 1,2,4,5-tetraoksanov so se razvijali tudi 1,2,4,5-tetraoksani s spiro ali dispiro steroidno substituento. Prvi bis-steroidni 1,2,4,5-tetraoksanski derivati so imeli holestanski steroidni skelet in nekaj razredov šibkejše delovanje kot artemisinin [81]. Z zamenjavo holestana z derivati holne kisline (substitucija na mestu 24) so dobili aktivnejše bis-steroidne tetraoksane, nadaljnja derivatizacija kisline ali estra v amide je vodila v spojine z močnim *in vitro* protimalarijskim delovanjem (npr. amidi, Shema 1.7) [82,83]. Tudi stereokemija je pomembna in cis dispiro *bis*-steroidni tetraoksani (**U7**, Shema 1.7) so praviloma bolj antimalarijsko aktivni kot trans izomeri (**U8**) [83]. Shema 1.7 podaja tudi *in vitro* nanomolarne $IC_{50}$ vrednosti za posamezen substrat z definiranim sevom *P. falciparum.* $IC_{50}$ vrednosti artemisinina so 8,6 nM (D6) in 7,3 nM (W2).



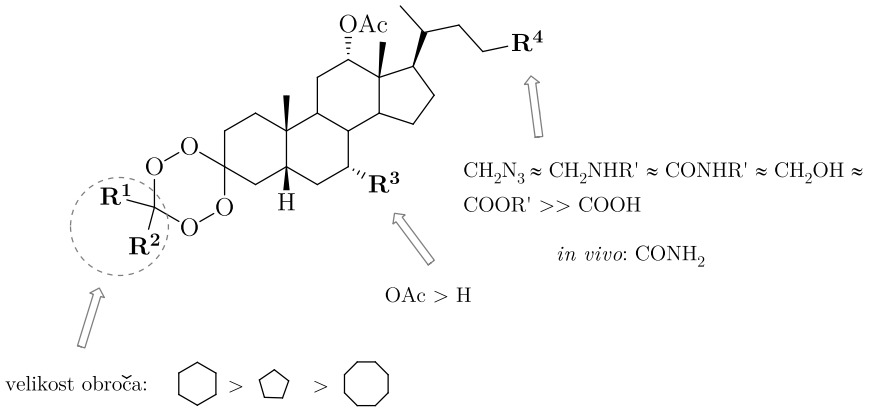

**U7**
9 (D6)
60 (W2)

**U8**
20 (D6)
30 (W2)

Shema 1.7: Primer *cis* in *trans* simetričnega *bis*-steroidnega tetraoksana s protimalarijskim delovanjem.

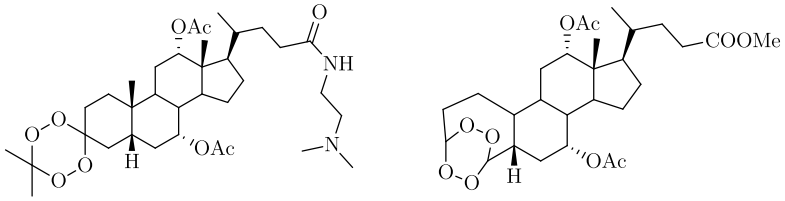
Nesimetrični dispiro 1,2,4,5-tetraoksanski derivati holne kisline imajo en steroiden skelet zgornjega tetraoksana zamenjan z drugim cikličnim obročem. *In vitro* testi so pokazali, da je cikloheksalidenska spiro substituenta bolj ugodna za protimalarijsko

aktivnost kot večji ali manjši obroči ($R^1$ in $R^2$, Shema 1.8) [84]. Velik vpliv na delovanje ima tudi substituenta na mestu 4 v cikloheksanskem obroču in derivat z Me substituento je imel najboljšo aktivnost, pri tem pa stereokemija metilne skupine vpliva na delovanje [84,85]. Na podlagi *in vitro* meritev antimalarijskega delovanja C24-substituiranih nesimetričnih tetraoksanov holne kisline je opazno, da ima karboksilna kislina občutno manjše delovanje od svojih estrskih, amidnih, aminskih, alkoholnih in azidnih derivatov ($R^4$, Shema 1.8) [86]. Opisanim trendom sledijo tudi nesimetrični tetraoksanski derivati deoksiholne kisline ($R^3$=H, Shema 1.8), ki pa imajo tako *in vitro* kot *in vivo* praviloma šibkejšo antimalarijsko aktivnost kot ustrezni derivati holne kisline [85]. Med steroidnimi tetraoksani so imeli najmočnejše *in vivo* protimalarijsko delovanje po peroralni aplikaciji testnim živalim derivati 4-metilcikloheksalidensko substituirani tetraoksani holne kisline s primarno amidno skupino ($R^1$,$R^2$=4''-(R)-metilcikloheksaliden, $R^3$=OAc, $R^4$=$CONH_2$, Shema 1.8). Pri teh amidnih derivatih holne kisline stereokemija metilne skupine ni bistveno vplivala na aktivnost [87]. Pred kratkim so poročali tudi o steroidnem tetraoksanu ($R^1$,$R^2$=cikloheksaliden, $R^3$=OAc, $R^4$=CONHPr, Shema 1.8), ki je prvi primer tetraoksana z dobrim *in vivo* protimalarijskim delovanjem tudi proti jetrni obliki parazita. S tem se je povečala perspektiva tetraoksanov, saj bi lahko delovali protimalarijsko proti dvema stadijema plazmodija in infekcijo preprečevali tako v jetrih kot v eritrocitih, kar bi povečalo verjetnost za uspešnost terapije [88].




Shema 1.8: Razmerje med strukturo in protimalarijsko aktivnostjo pri nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanskih derivatih holne kisline.

Dispiro derivati holne kisline imajo najmočnejše antimalarijsko delovanje, a dispiro struktura ni nujen pogoj, saj imajo tudi spiro derivati holne kisline z dimetilno skupino (**U9**, Shema 1.9) na tetraoksanskem obroču močno protimalarijsko delovanje [89]. Vseeno pa je spiro struktura 1,2,4,5-tetraoksanov bistvena za protimalarijsko delovanje tudi pri steroidnih tetraoksanih, saj je imel intramolekularni tetraoksanski derivat holne kisline z vodikom na mestih 3 in 6 tetraoksanskega obroča (**U10**, Shema 1.9) le šibko antimalarijsko aktivnost [90].

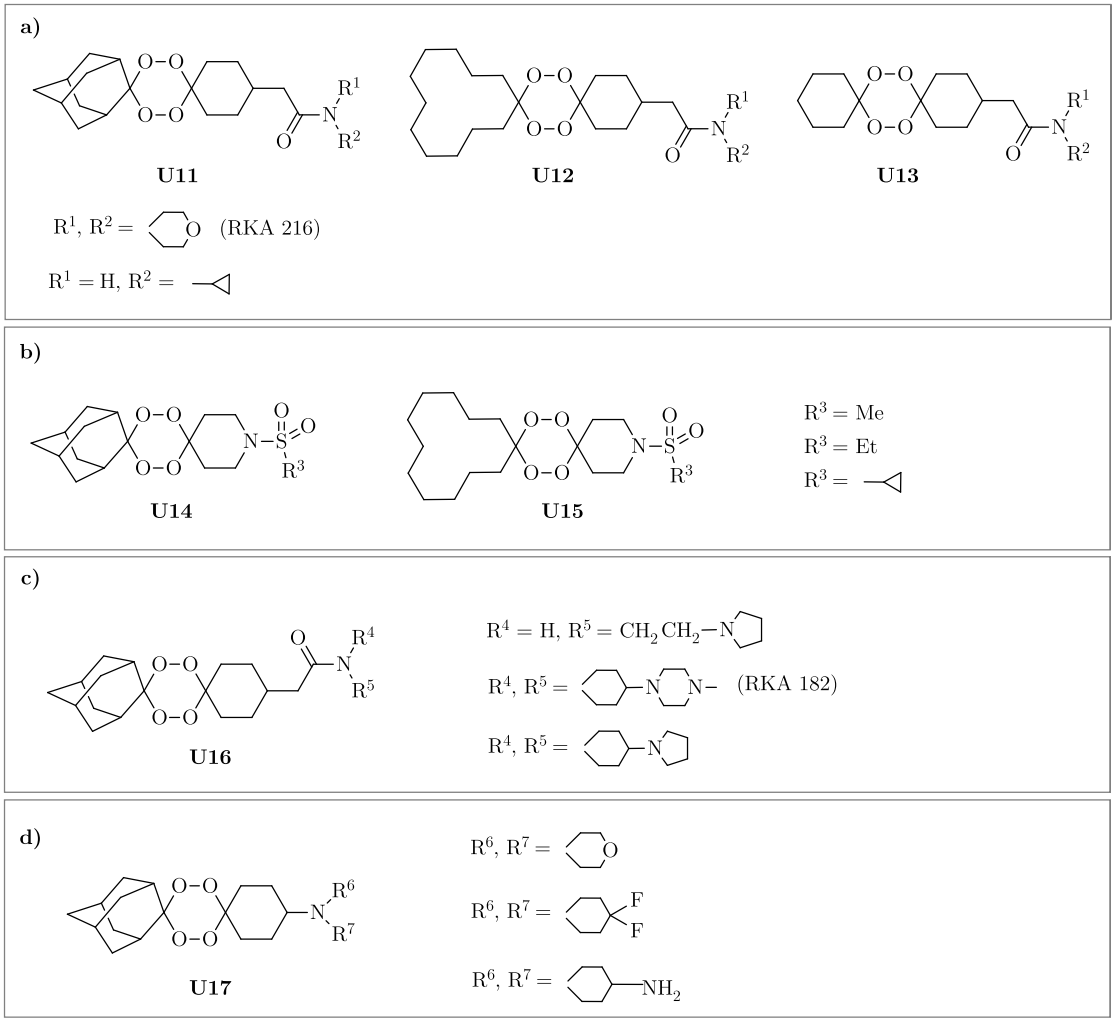



**U9** **U10**

Shema 1.9: Spiro dimetilni (**U9**) in intramolekularni (**U10**) derivat holne kisline.

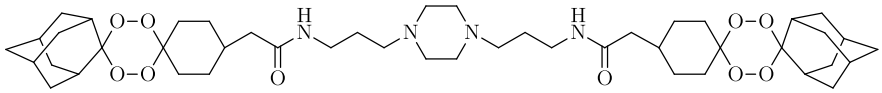
Strukturno enostavnejši nesimetrični dispiro 1,2,4,5-tetraoksani z dvema cikloheksalidenskima substituentama bi lahko bili boljši kot dispiro steroidni tetraoksani, saj je njihova sinteza cenejša, dosežejo pa lahko tudi večjo strukturno pestrost. Nekateri od teh dispiro cikloheksalidenskih tetraoksanov so imeli protimalarijsko delovanje [86,91]. Tudi v primeru strukturno enostavnejših TO se je pokazala podobna porazdelitev aktivnosti in TO s karboksilno kislinsko skupino je imel *in vitro* protimalarijsko delovanje značilno slabše v primerjavi z estri, amidi, amini, alkoholom in azidom. Aminski in azidni derivati so imeli ob višjih subkutalnih odmerkih tudi *in vivo* protimalarijsko delovanje [86]. *In vitro* protimalarijsko delovanje so imeli tudi dicikloheksalidenski tetraoksani z gvanidinsko ali sečninsko skupino [92].

Serija raziskav, v katerih so študirali različne strukturne tipe TO, ki bi bili uporabni za peroralno aplikacijo, je pokazala, da so najbolj obetavni 1,2,4,5-tetraoksani za uvedbo v antimalarijsko terapijo dispiro 1,2,4,5-tetraoksani z adamantilidensko skupino. Pri nesimetričnih dispiro 1,2,4,5-tetraoksanih z amidom v stranski verigi cikloheksalidena (npr. RKA 216, Shema 1.10a) se je pokazalo, da imajo 1,2,4,5-tetraoksani, ki izvirajo iz adamantanona (**U11**), močnejše protimalarijsko delovanje v primerjavi s tistimi, ki izvirajo iz ciklododekanona (**U12**) ali cikloheksanona (**U13**) [93]. V tetraoksansko strukturo so po vzoru artemisininskega polsinteznega derivata artemisona uvedli metabolično inertno polarno sulfonsko skupino (Shema 1.10b) [94], kar je posledično poskrbelo za manjšo nevrotoksičnost od artemisininskih derivatov, ki so trenutno v terapiji [95]. Tudi pri dispiro 1,2,4,5-tetraoksanih s spirosulfonilpiperidinilno substituento so imeli derivati z adamantalidensko skupino (**U14**) močnejše protimalarijsko delovanje kot tisti s ciklododekansko (**U15**). V nadaljnjem razvoju se je zaradi ojačanja protimalarijske aktivnosti obdržala adamantilidenska substituenta, v stransko verigo pa so poleg amida uvedli še nasičen aza heterocikel (piperidin, piperazin, pirol) (**U16**, Shema 1.10c). Iz te serije spojin izvira tudi predklinični kandidat RKA 182 [19]. Z namenom izboljšanja metabolične stabilnosti so analogom RKA 182 zamenjali amidno skupino z aminsko (**U17**, Shema 1.10d) [96].

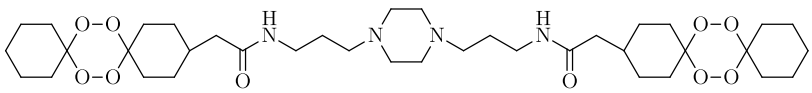



Shema 1.10: Strukturni sklopi novejših dispiro 1,2,4,5-tetraoksanov.

Vsi zgoraj opisani 1,2,4,5-tetraoksani (Shema 1.10) imajo močno *in vivo* protimalarijsko delovanje, primerljivo z jakostjo artesunata. Da bi še izboljšali jakost protimalarijskega delovanja teh derivatov, so pripravili dimerni analog RKA182 (**U18**, Shema 1.11). V dimerni obliki je imel primerljivo *in vivo* protimalarijsko aktivnost tudi cikloheksalidenski derivat (**U19**), oba dimera pa sta bila manj učinkovita od artesunata pri odmerku 30mg/kg (Shema 1.11) [97].



**U18 (**P je 64,5%)

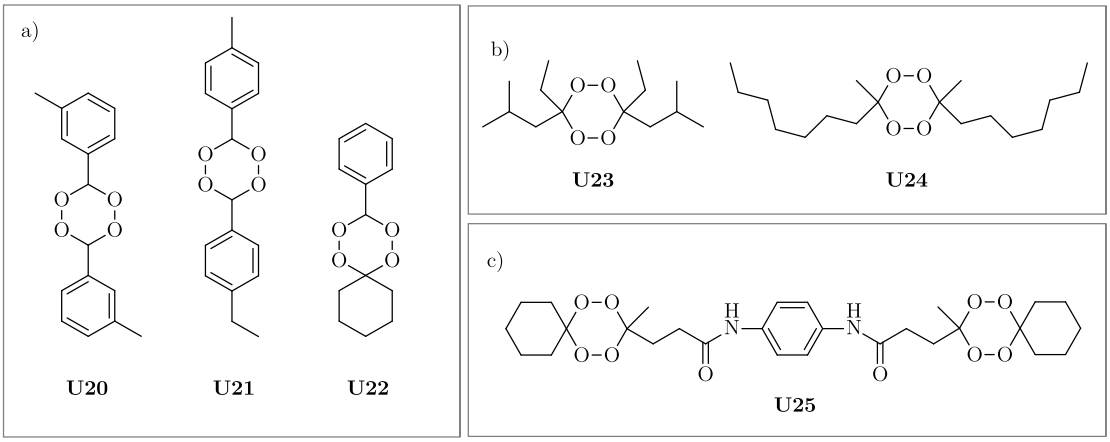


**U19** (P je 63,9%)

(P artesunata je 99,7%)

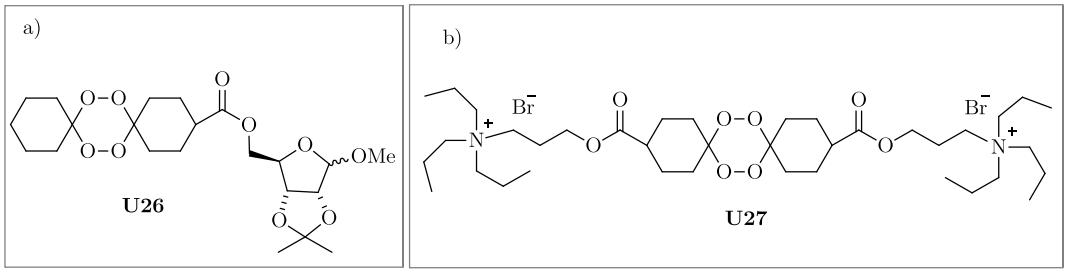
Shema 1.11: Tetraoksanski dimeri s podano *in vivo* protimalarijsko aktivnostjo.

Med raziskovanjem 1,2,4,5-tetraoksanov so ugotovili, da je za dobro protimalarijsko delovanje najboljša dispiro substitucija 1,2,4,5-tetraoksanov. Spiro in nespiro substituirani tetraoksani imajo sterično oviran dostop do peroksidne vezi, kar onemogoča njeno cepitev in nastanek radikalov. Pri *in vitro* študiji protimalarijskega delovanja simetričnih in nesimetričnih TO, pripravljenih iz benzaldehidnih derivatov (Shema 1.12a), so ugotovili, da so imeli tako nespiro (**U20**, **U21**) kot tudi spiro tetraoksani (**U22**) nekaj razredov šibkejše protimalarijsko delovanje od artemisinina [98-102]. Artemisinin je imel tudi nekajkrat močnejšo *in vitro* protimalarijsko aktivnost od dialkil substituiranih 1,2,4,5-tetraoksanov (**U23, U24,** Shema 1.12b), pri katerih se je pokazalo, da z naraščanjem lipofilnosti pada protimalarijska aktivnost [103]. Poleg polarnosti obstajajo tudi drugi efekti, ki vplivajo na jakost protimalarijske aktivnosti tetraoksanov. Tak primer so dialkilni 1,2,4,5-tetraoksani z metilnima substituentama na mestih 3 in 6 (**U24**, Shema 1.12b), ki imajo popolnoma izničeno protimalarijsko delovanje [103]. Podobno se je pokazalo tudi pri spirotetraoksanskih dimerih, kjer so imele spojine s cikloheksalidensko in dialkilno substituento precej šibkejše protimalarijsko delovanje (**U25**, Shema 1.12c) [97]. Eden od vplivov, ki oslabi protimalarijsko delovanje tetraoksanov, je tudi sterično oviranje dostopa hema do peroksidne vezi, ki prepreči redukcijo vezi s hemskim Fe(II) [104].




Shema 1.12: Primeri struktur spiro in nespiro tetraoksanov s šibkejšim protimalarijskim delovanjem.

Kljub temu, da je dispiro substitucija tetraoksanskega obroča izrazito povečala protimalarijsko delovanje, pa so pomembni tudi drugi faktorji. Vzrok za slabo *in vivo* aktivnost spojin je lahko tudi slaba biološka uporabnost in/ali metabolična nestabilnost [104]. Tak primer so bili dispiro 1,2,4,5-tetraoksani z ribofuranozo v stranski verigi (**U26**, Shema 1.13a), ki niso imeli protimalarijskega učinka [105]. Razlog za šibko delovanje polarnih 1,2,4,5-tetraoksanov bi lahko bil oviran transport skozi biološke membrane in hitrejši očistek spojine iz telesa zaradi konjugacij hidroksilne skupine v fazi II metabolizma [105]. Drugi polarni tetraoksani, ki so bili tudi brez antimalarijskega delovanja, so bili 1,2,4,5-tetraoksan s kvarternimi amonijevimi solmi v stranski verigi (**U27**, Shema 1.13). Odsotnost biološke aktivnosti teh spojin bi lahko pripisali oteženi interakciji s parazitovo fosfolipidno membrano zaradi povečane polarnosti [106], kar pa je brez dvoma presenetljivo, saj imajo kvarterne amomijeve soli tudi *in vivo* protimalarijsko delovanje [107].




Shema 1.13: Strukturi polarnih tetraoksanov brez protimalarijske aktivnosti.

#### 1.2.2.1.1.1 Hibridne učinkovine za zdravljenje malarije

Pri zdravljenju malarije se odsvetuje monoterapija zaradi hitre prilagoditve plazmodija in razvoja rezistenčnih sevov na antimalarijske zdravilne učinkovine. Slednje lahko preprečimo s kombinirano farmakoterapijo, kot je na primer ACT. Druga možnost, v katero se je v zadnjih letih usmerilo tudi področje raziskovanja protimalarijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov, je sinteza hibridnih učinkovin ali dualnih inhibitorjev [108]. To so spojine, ki imajo v svoji strukturi kemijsko povezani dve zdravilni učinkovini z različnim mehanizmom delovanja.

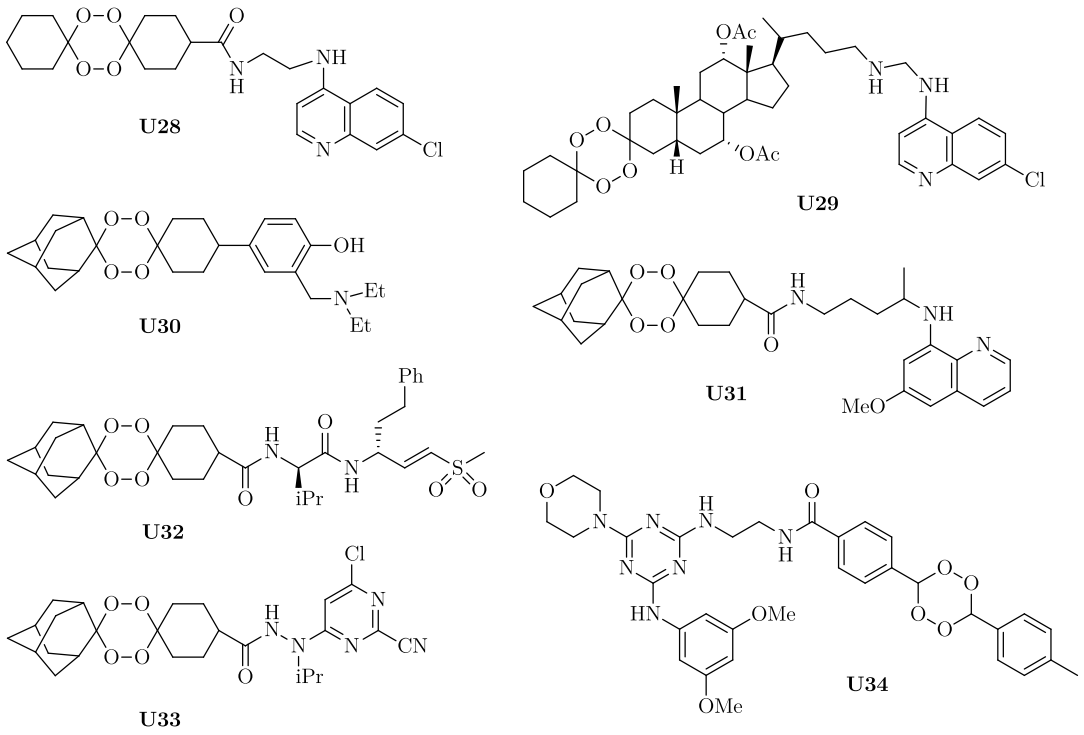
Prvi tak poskus so bili tetraoksanski hibridi s 4-aminokinolini, ki so sintezni analogi kinina. Hibridi z dispiro cikloheksalidenskim tetraoksanskim fragmentom (**U28**, Shema 1.14) so bili *in vitro* učinkovitejši od artemisinina ali kinolinskih antimalarikov, svoje aktivnosti pa niso izgubili niti *in vivo* [109]. Ob povezavi aminokinolinskega dela s tetraoksanskim preko steroidnega skeleta (**U29**, Shema 1.14) namesto cikloheksalidenskega se je protimalarijska aktivnost hibridov znižala [109].

Naslednji hibridi so bili manoksani (**U30**, Shema 1.14), to so hibridi med tetraoksanom in fenolom z aminsko skupino v stranski verigi. Slednji je odločilen strukturni fragment nekaterih antimalarikov kinolinskega tipa, kot npr. amodiakina in pironaridina, ki dosežejo protimalarijsko delovanje z nekovalentno vezavo na hematin in tako inhibirajo detoksifikacijo hema. Najboljši manoksanski hibrid (**U30**) je imel v primerjavi z artesunatom in amodiakinom močnejše antimalarijsko delovanje tako *in vitro* kot *in vivo* [110].

Najnovejši pristop, ki prav tako spada h konjugacijam s kinolinskim obročem, so hibridi z 8-aminokinolini, ki imajo drugačen mehanizem delovanja od 4-substituiranih analogov. Tetraoksan-8-aminokinolinski hibridi (**U31**, Shema 1.14) s peroksidnim delom molekule inhibirajo parazita v eritrocitih, z 8-aminokinolinskim delom pa v jetrih še preden se sporociti sprostijo v krvni obtok. Najboljši kandidat iz te serije hibridov je *in vivo* učinkovito odpravil parazitemijo v okuženih miših [111].

Tetraoksane so kemijsko povezali v hibride tudi s falcipainskimi inhibitorji, ki preprečujejo hidrolizo hemoglobina v aminokisline in tako povzročijo izstradanje parazita. Tetraoksan-vinilsulfonski hibridi (**U32**, Shema 1.14) so imeli močno protimalarijsko delovanje *in vitro*, vendar je bil za to odločilen dispiro tetraoksanski del molekule, saj so hibridi tega strukturnega tipa *in vitro* le šibko inhibirali izoliran encim falcipain-2 [112]. Nasprotno pa so tetraoksan-pirimidinonitrilni hibridi (**U33**, Shema 1.14) *in vitro* poleg močnega antimalarijskega učinka izkazali močno inhibicijo falcipaina. *In vivo* študija je tudi razkrila občutno zmanjšanje parazitemije in podaljšano preživetje miši [113].

V tetraoksan-triazinskih hibridih (**U34**, Shema 1.14) naj bi triazinski del molekule deloval sinergistično s tetraoksanskim, saj imajo tak strukturni fragment tudi inhibitorji dihidrofolat reduktaze, ki je tudi potencialna plazmodijeva tarča. Kljub temu sintetizirani hibridi niso imeli protimalarijske aktivnosti ali pa zelo skromno [114], za kar bi lahko bil odgovoren tudi ne-spiro tetraoksanski del molekule.

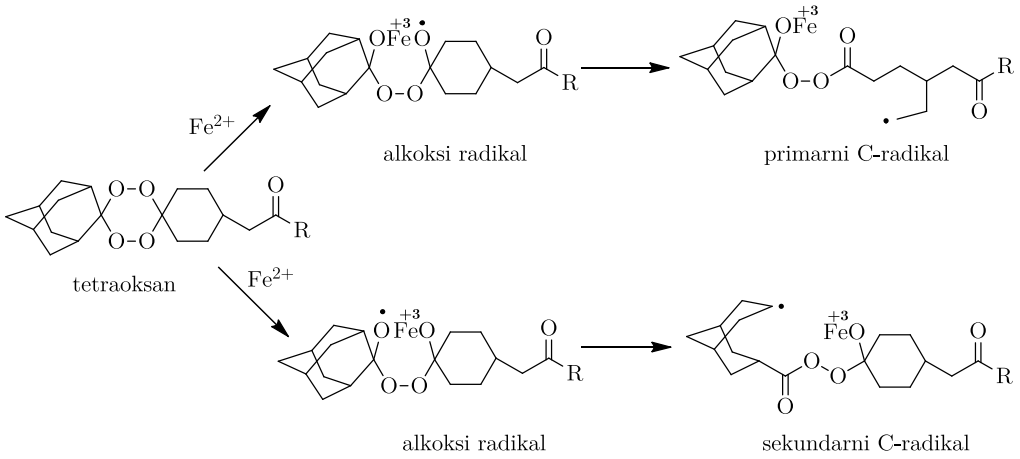



Shema 1.14: Strukturni sklopi tetraoksanskih hibridov.

#### 1.2.2.1.1.2 Mehanizem protimalarijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

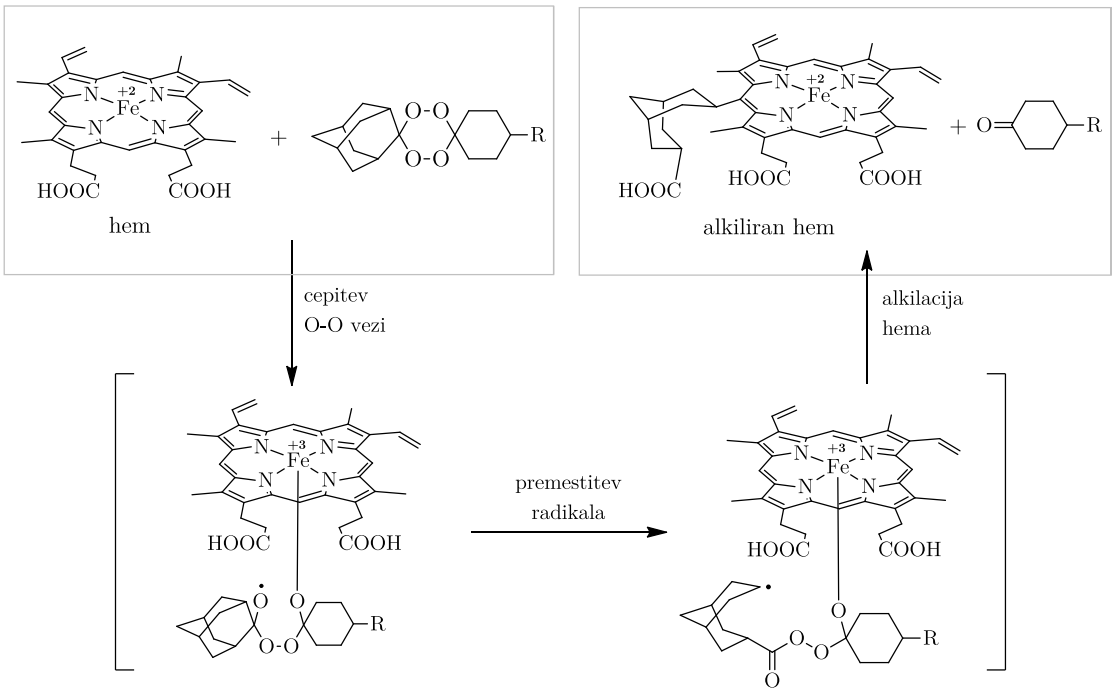
Mehanizem protimalarijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov še ni popolnoma pojasnjen in temelji na hipotezah o mehanizmu protimalarijskega delovanja artemisininov. Najširše sprejeta hipoteza je, da 1,2,4,5-tetraoksani svoje protiparazitsko delovanje dosežejo s povzročitvijo oksidativnega stresa preko radikalov, ki nastanejo po cepitvi peroksidne vezi s Fe(II). Radikali alkilirajo različne celične tarče, najpogosteje se omenja hem [22]. Poleg alkilacije hema pa so radikali, nastali iz 1,2,4,5-tetraoksanov, sposobni tudi oksidativne razgradnje fosfolipidov, kar prispeva k protiparazitskemu delovanju teh spojin [115]. Z molekulskim sidranjem so zavrnili vlogo *Pf*ATP6 kot možne tarče 1,2,4,5-tetraoksanov, saj niso našli povezave med vezavno energijo peroksidov in jakostjo protimalarijskega delovanja [116].

Prvi predlagan mehanizem razcepa peroksidne vezi različnih dispiro 1,2,4,5-tetraoksanov (bis-steroidnih, bis-cikloheksilidenskih in nesimetričnih z eno steroidno in eno cikloheksilidensko substituento) s Fe(II) je predvidel nastanek za parazita toksičnih alkoksi radikalov (Shema 1.15), ki se naj ne bi naknadno premestili v C-radikale [87]. Kljub temu širše sprejeta teorija mehanizma delovanja peroksidnih antimalarikov podpira nastanek C-radikalov (Shema 1.15) [117].




Shema 1.15: Predviden mehanizem reduktivne cepitve peroksidne vezi v tetraoksanu.

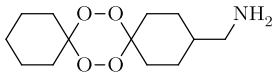
Na 1,2,4,5-tetraoksanih s spiroadamantansko skupino so po reduktivni cepitvi peroksidne vezi s Fe(II) pokazali nastanek tako primarnih kot sekundarnih C-radikalov (Shema 1.15), vendar pa so bili le sekundarni C-radikali sposobni vezave na hemov porfirinski obroč (Shema 1.16). Razlog je bližnja spiroadamantanska skupina, ki zaradi svoje voluminoznosti ovira dostop železu do kisika, kar je potrdila tudi računalniška simulacija. Aktivacija 1,2,4,5-tetraoksanov z železom je torej v precejšnji meri odvisna od vrste in velikosti substituent na mestih 3 in 6 tetraoksanskega obroča [118]. S študijo molekulskega sidranja so tudi potrdili povezavo med zasenčenostjo peroksidne vezi in antimalarijskim delovanjem. Dispiro cikloheksilidenski 1,2,4,5-tetraoksani, katerih substituente ovirajo dostop Fe(II) do peroksidne vezi, imajo tako bistveno manjše antimalarijsko delovanje. Največji negativni vpliv na delovanje imata funkcionalni skupini na C-atomih zraven kvarternega tetraoksanskega C-atoma, ki sta v jukstapoziciji s peroksidno vezjo [119].




Shema 1.16: Predviden mehanizem alkilacije hema.

#### 1.2.2.1.2 Antitoksoplazmozno delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

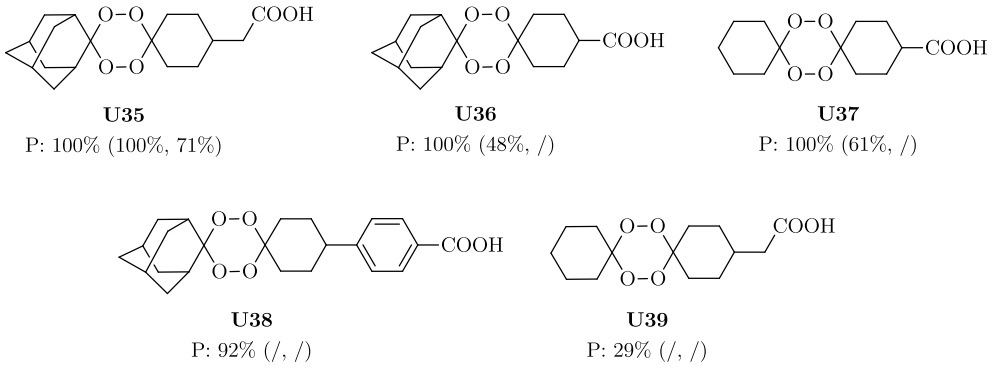
*Toxoplasma gondii* je tako kot *Plasmodium spp.* intracelularni parazit, vendar napade vse sesalske celice, ne samo eritrocitov. Nekatere metabolne poti obeh parazitov so sorodne, zato imajo lahko nekatere učinkovine protiparazitski učinek proti obema vrstama praživali. Dicikloheksalidenski tetraoksan z aminsko skupino v stranski verigi (Shema 1.17) je bil prvi tetraoksan, na katerem so pokazali *in vivo* aktivnost proti *Toxoplasma gondii* [92]. Aplikacija tetraoksana testnim živalim je podaljšala njihovo preživetje, vendar pa jih ni uspela popolnoma zavarovati pred parazitom. Jakost aktivnosti testiranega tetraoksana je bila primerljiva z aktivnostjo artemisinina.




Shema 1.17: Struktura tetraoksana z *in vivo* delovanjem proti *T. gondii*.

#### 1.2.2.1.3 Antihelmintsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

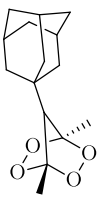
Paraziti iz rodu *Fasciola* prav tako kot plazmodij razgrajujejo hemoglobin, pri čemer se sprosti Fe(II), ki aktivira nastanek radikalov iz artemisininov in sinteznih peroksidov, zato ni presenetljivo, da imajo peroksidi tudi delovanje proti *Fasciola spp.* [120]. Na trioksolanih so pokazali njihovo delovanje proti mikroorganizmu *Fasciola hepatica* (veliki metljaj) in ugotovili, da je za aktivnost tetraoksana odločilna spiroadamantanska skupina ter karboksilna kislina v stranski verigi cikloheksanskega obroča [121]. Potem so načrtovali tudi dispiro 1,2,4,5-tetraoksane s temi strukturnimi fragmenti (Shema 1.18) [122,123]. Vrednotenje njihove antihelmintske aktivnosti je pokazalo, da so bili tetraoksani bolj učinkoviti v primerjavi z analognimi trioksolani. Slednji so za odtenek bolje znižali parazitemijo pri odrasli *F. hepatici*, 1,2,4,5-tetraoksani pa pri juvenilni obliki tega parazita [123]. Shema 1.18 pod posamezno spojino navaja znižanje parazitemije v testiranih podganah po šestih dnevih po enkratnem peroralnem odmerku 100 mg/kg (50 mg/kg, 25 mg/kg).



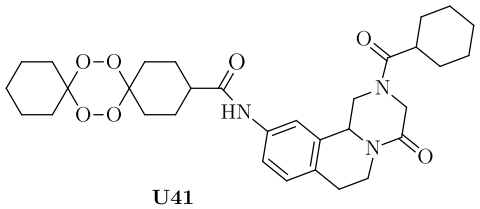

Shema 1.18: Strukture 1,2,4,5-tetraoksanov z *in vivo* delovanjem proti mikroorganizmu *Fasciola Hepatica* (znižanje parazitemije, P).

1,2,4,5-Tetraoksani imajo protiparazitske sposobnosti *in vivo* tudi na drugih parazitih. Na miših so pokazali, da je peroralna aplikacija visokih doz (300mg/kg) nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana s spiroadamantansko skupino in karboksilno kislino **U36** (Shema 1.18) delovala antihelmintsko proti parazitu *Echinosoma caproni* [123]. Nekateri biciklični 1,2,4,5-tetraoksani so imeli dobro *in vitro* delovanje proti odraslim parazitom *Schistosoma mansoni* [124,125], ena od teh spojin (**U38**, Shema 1.18) pa tudi spodbudno *in vivo* delovanje, saj je močno znižala količino črvov v testnih živalih [124]. Tudi

tetraoksan z adamantilidensko substituento (**U40**, Shema 1.19) je *in vivo* delno znižal parazitemijo s *S. mansoni* [126]. Hibridne molekule s kovaletno povezanim prazikvantelom in 1,2,4,5-tetraoksani (**U41**, Shema 1.19) so imele *in vivo* močnejšo aktivnost proti juvenilni obliki *Schistosoma japonicum*, proti odraslim parazitom pa primerljivo s prazikvantelom [127].



**U40**

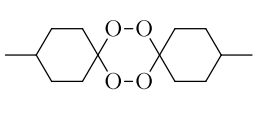


**U41**

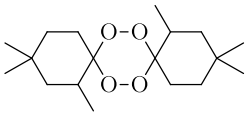
Shema 1.19: Bicikličen tetraoksan z aktivnostjo proti parazitu *Schistosoma mansoni* in tetraoksanski hibrid z delovanjem proti parazitu *Schistosoma japonicum.*

#### 1.2.2.2 Protitumorsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

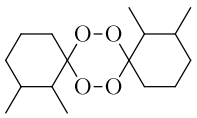
Tako kot artemisinini so tudi 1,2,4,5-tetraoksani potencialne protitumorske učinkovine. Začetki raziskav protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov so temeljili na študiji o varnosti teh spojin zaradi potencialne nevrotoksičnosti, ki je tudi najnevarnejši stranski učinek artemisinina in njegovih polsinteznih derivatov. Tako so citotoksičnost na nevroblastomski rakavi celični liniji tetraoksanskega derivata WR148999 (Shema 1.5) najprej ovrgli [128], potem pa je Vennerstrom s sodelavci [77] na 17 simetričnih dispiro tetraoksanskih derivatih s cikloheksanskim skeletom (Shema 1.20) potrdil nevrotoksičnost teh spojin. Nevrotoksični so bili tudi 1,2,4,5-tetraoksani, ki niso imeli antimalarijskega delovanja. Shema 1.20 prikazuje tudi $IC_{50}$ vrednosti za nevtrotoksičost (NB2a, nM) in za protimalarijsko aktivnost (seva D6 in W2, nM) posameznih spojin. Dihidroartemisinin ima $IC_{50}$ proti NB2a 220 nM, artemeter pa $351 \cdot 10^3$ nM.



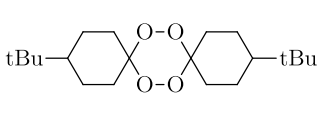
**U42**
1100 (NB2a)
23 (D6)
21 (W2)



**U43**
1400 (NB2a)
>1000 (D6)
>1000 (W2)



**U44**
2100 (NB2a)
50 (D6)
43 (W2)



**U45**
3400 (NB2a)
>300 (D6)
160 (W2)

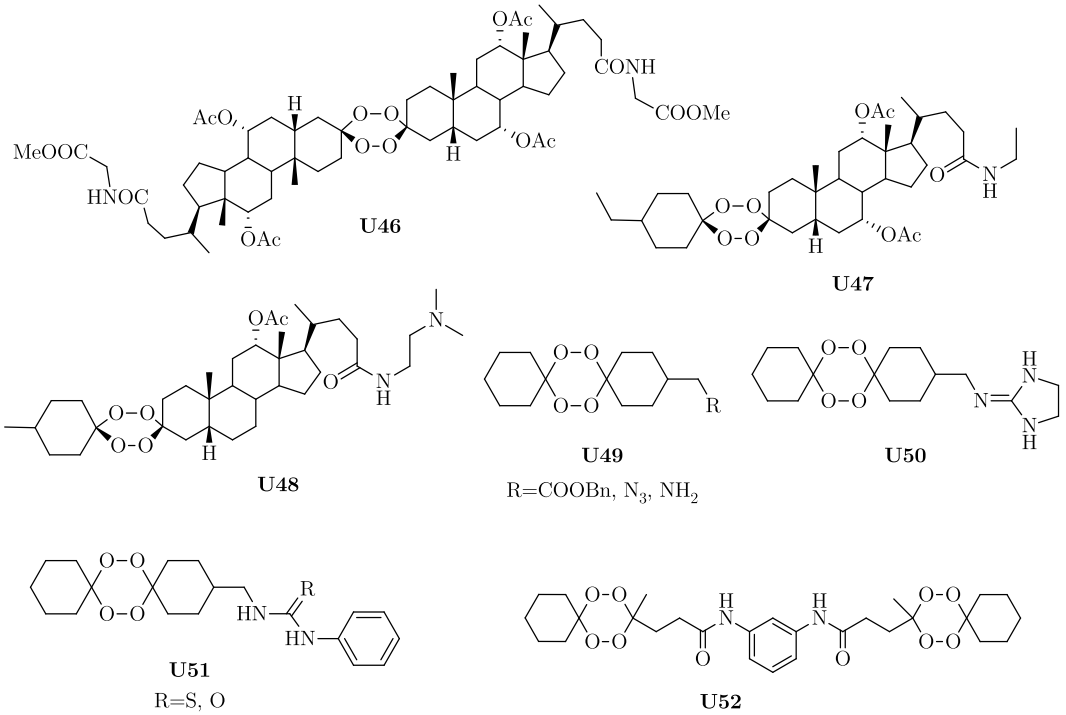
Shema 1.20: Predstavniki najbolj nevrotoksičnih simetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s podanimi $IC_{50}$ vrednostmi za njihovo nevrotoksično in protimalarijsko delovanje.

Prvo obširno študijo protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov na različnih malignih celičnih linijah je naredil Opsenica s sodelavci [82]. *In-vitro* antiproliferativno delovanje tetraoksanov je pokazal na številnih simetričnih in nesimetričnih tetraoksanskih derivatih s steroidnim skeletom, in sicer bis-steroidnih derivatih holne kisline (**U46**, Shema 1.21) s citotoksičnostjo na 14 različnih rakastih celičnih linijah [82,83], cikloheksil substituiranih tetraoksanskih derivatih holne (**U47**, Shema 1.21) [85,87,129,130] in deoksiholne kisline (**U48**, Shema 1.21) [85] s citotoksičnostjo na približno 60 rakavih celičnih linijah.

Opsenica s sodelavci [92] je poročal tudi o protitumorskem delovanju nekaterih dispiro cikloheksalidenskih tetraoksanov s funkcionalnimi skupinami v stranski verigi (**U49-U51**, Shema 1.21). Med njimi so imeli derivati s tiosečninsko skupino (**U51,** R=S, Shema 1.21) najmočnejšo aktivnost proti štirim tumorskim celičnim linijam.

S pomočjo *in silico* modela na osnovi eksperimentalnih podatkov so pokazali, da je za protitumorsko delovanje steroidnih tetraoksanov na HeLa (rak materničnega vratu) in FemX (človeški maligni melanom) celičnih linijah odločilna hidrofobnost spojin in njihova sposobnost doniranja vodikove vezi [131]. Žižak s sodelavci [129] je pokazal, da steroidni tetraoksani povzročijo apoptotsko smrt HeLa tumorskih celic *in vitro*. Podobno kot pri protimalarijskem delovanju steroidni tetraoksani svoj protitumorski učinek dosežejo s povzročanjem oksidativnega stresa v tumornih celicah preko tvorbe radikalov. Radikali nastanejo po cepitvi peroksidne vezi z železom, zato je tudi mogoče doseči selektivno toksičnost tetraoksanov, saj je koncentracija železa v tumorskem tkivu večja kot v ostalih tkivih [129]. Pred kratkim so poročali tudi o *in vitro* protitumorskem delovanju tetraoksanskih dimerov (**U52**, Shema 1.21) na tumorski celični liniji debelega črevesa (HT29-AK) in levkemični celični liniji (HL60), ki so prav tako uspešno sprožili apoptozo [97]. Hibridna molekula 1,2,4,5-tetraoksana in protivirusne učinkovine azidotimina je bila citotoksična za HeLa celice, sam 1,2,4,5-tetraoksan **U36** (Shema 1.18) brez azidotimina pa ne [74].

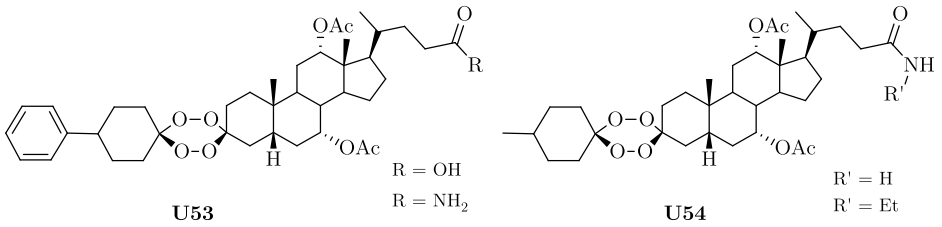
Po drugi strani pa so bili nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksani z različno substituiranim fenilnim obročem (Shema 1.12a) netoksični na štirih rakavih celičnih linijah (SK-MEL, KB, BT-549, SK-OV-3) [99,100], za kar bi lahko bil kriv tudi ne-spiro tetraoksanski del molekule, saj se med drugim tudi po tem razlikujejo od 1,2,4,5-tetraoksanov s protitumorskim delovanjem.




Shema 1.21: Najboljši 1,2,4,5-tetraoksanski kandidati z *in-vitro* protitumorskim delovanjem iz posameznega strukturnega sklopa.

#### 1.2.2.3 Protibakterijsko delovanje 1,2,4,5-tetraoksanov

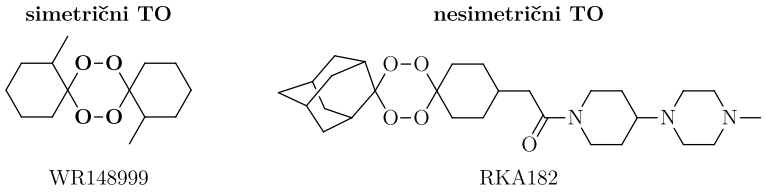
1,2,4,5-Tetraoksani so potencialne učinkovine tudi za zdravljenje tuberkuloze, saj so bili tetraoksanski derivati holne kisline *in vitro* aktivni proti *Mycobacterium tuberculosis* (sev H37Rv) v nizkih mikromolarnih območjih. Njihova jakost je za nekaj razredov nižja v primerjavi z že uveljavljenimi tuberkulostatiki, saj so 4-fenilcikloheksan substituirani derivati holne kisline (**U53**, Shema 1.20) približno 25-krat manj aktivni kot izoniazid in 60-krat manj kot rifampin [84]. Nekoliko močnejše delovanje imajo 4-metilcikloheksan substituirani derivati holne kisline (**U54**), ki so približno 2-krat bolj učinkoviti kot njihovi 4-fenilcikloheksan substituirani analogi (**U53**), vendar bo potrebno za dosego učinkovitega protituberkuloznega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov ojačati njihovo aktivnost, saj so bili v tem koncentracijskem območju citotoksični za zdrave celice (Vero celična linija) [130].




Shema 1.22: Struktura steroidnih 1,2,4,5-tetraoksanov s protituberkuloznim delovanjem.

## 1.3 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov

Naraščajoča vloga artemisininov in sinteznih peroksidov v terapiji ter nedvoumni dokazi o široki bioaktivnosti tetraoksanov povečujejo interes za razvoj novih sinteznih metod za njihovo pridobivanje. Še posebej zanimivi so nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksani, to so 1,2,4,5-tetraoksani z različnima substituentama na mestih 3 in 6, saj imajo zaradi strukturne raznolikosti velik potencial za morebitno uvajanje v terapijo (Shema 1.23).



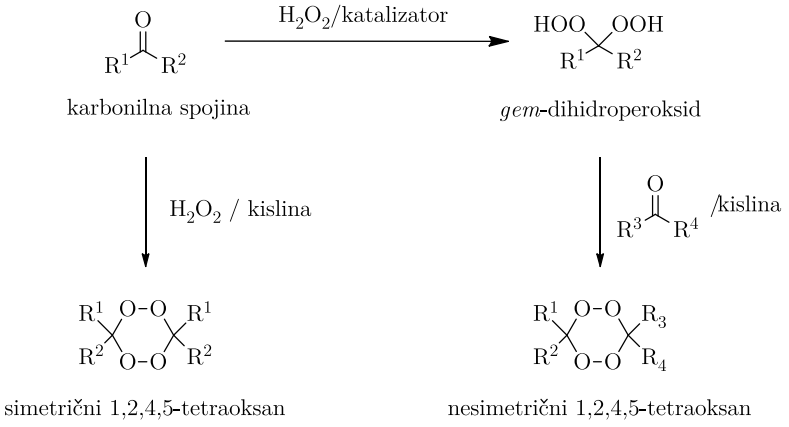

Shema 1.23: Primer strukture simetričnega in nesimetričnega tetraoksana.

Sinteza 1,2,4,5-tetraoksanov poteka iz karbonilnih spojin. Oksidanta, ki se uporabljata za tovrstno reakcijo, sta ozon in vodikov peroksid. Slednji je boljši, saj je manj toksičen in varnejši za delo, vendar pa se pri reakciji med karbonilno spojino in $H_2O_2$ pojavijo težave z neselektivnostjo peroksidacije in tvorijo se številni peroksidni produkti. To je bil razlog, da se je za sintezo simetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov tradicionalno uporabljala ozonoliza enol etrov [132,133], olefinov [134] ali O-alkil oksimov [135,136] kljub zelo nizkim izkoristkom sinteze in potrebi po predhodni derivatizaciji ketona. Boljša in najširše uporabljena metoda za pridobivanje 1,2,4,5-tetraoksanov je sinteza iz karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom.

Problem neselektivnosti tvorbe 1,2,4,5-tetraoksanov pri reakciji med karbonilno spojino in $H_2O_2$ se je zmanjšal s katalizo reakcije, za katero se uporabljajo protična ali aprotična kislina, MTO, $Re_2O_7$ ali jod [137]. Medtem ko je sinteza simetričnih 1,2,4,5-

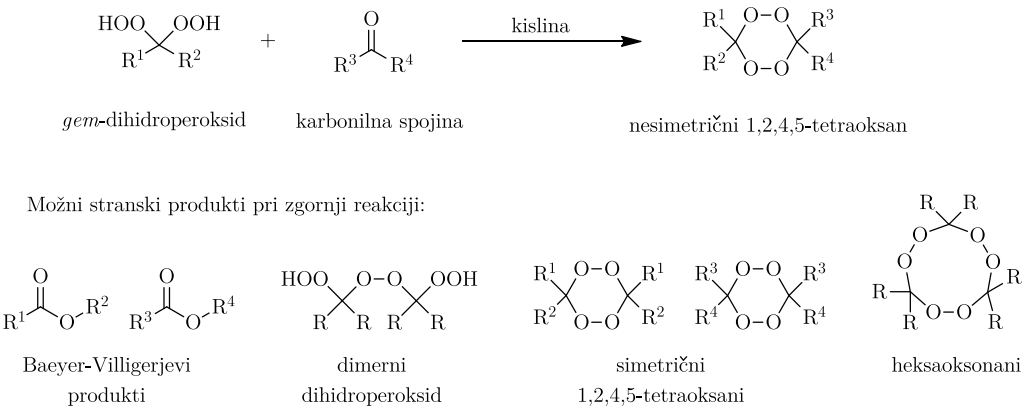
tetraoksanov mogoča z direktno ciklokondenzacijo karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom, katalizirana s kislino in kovinskim katalizatorjem, poteka sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz karbonilnih spojin v dveh stopnjah preko *gem*-dihidroperoksidov (DHP), ki se v prisotnosti kisline in/ali dodatnega katalizatorja ciklizirajo s karbonilno spojino ali s spojino z maskirano karbonilno skupino (npr. acetali) (Shema 1.24) [138]. *Gem*-dihidroperoksidi so intermediati v sintezi nesimetričnih tetraoksanov in niso komercialno dostopni, zato jih je potrebno predhodno sintetizirati. Za sintezo DHP so bile razvite številne metode [138,139].

Najširše uporabljene metode za sintezo tako simetričnih kot nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov dandanes temeljijo na reakcijah ketonov ali aldehidov z vodikovim peroksidom ali *gem*-dihidroperoksidom, ki so katalizirane s protično ali aprotično kislino, MTO, $Re_2O_7$ ali jodom [137]. Kljub velikemu številu sinteznih metod za sintezo 1,2,4,5-tetraoksanov ostaja razvoj preproste in učinkovite tovrstne metode velik izziv, saj so metode močno odvisne od številnih spremenljivk, npr. temperatura, pH, katalizator, topilo, struktura in koncentracija reaktantov, ravnotežje med reaktanti in prekurzorji cikličnih peroksidov [140].




Shema 1.24: Sinteza simetričnih in nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z vodikovim peroksidom iz karbonilne spojine.

Glavna ovira kislinsko katalizirane ciklizacije *gem*-dihidroperoksidov s karbonilno spojino je neselektivnost zaradi tvorbe Baeyer-Villigerjevih produktov, dimernih dihidroperoksidov in/ali cikličnih peroksidov, to so simetrični 1,2,4,5-tetraoksani in 1,2,4,5,7,8-heksaoksonani (Shema 1.25) [141]. Najpomembnejše se je izogniti nastanku 1,2,4,5,7,8-heksaoksonanov, ki so farmakološko inertni [142] in se jih težko loči od sintetiziranih nesimetričnih tetraoksanov zaradi podobne polarnosti.

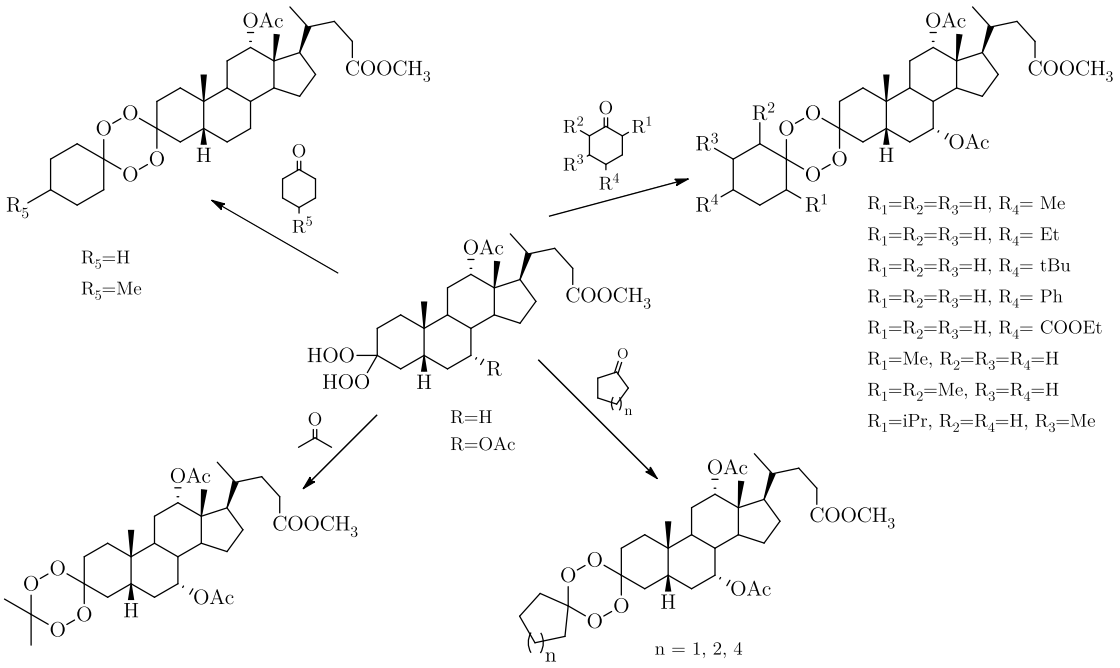



Shema 1.25: Kislinsko katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin ter strukture možnih stranskih produktov reakcije.

## 1.3.1 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin

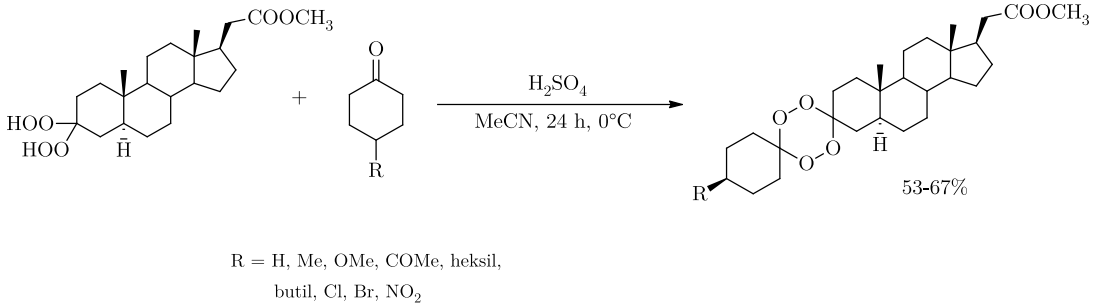
### 1.3.1.1 Dvostopenjska sinteza

Enostavna metoda za pripravo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov je torej kondenzacija *gem*-dihidroperoksidov s karbonilno spojino, ki je katalizirana z žveplovo kislino pri 0 °C v zmesi DKM in MeCN. Opsenica s sodelavci [84] je to metodo razvil za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s steroidnim skeletom. V nadaljnjih študijah so jo uspešno uporabili na številnih tovrstnih substratih, pri čemer so keton s preprostejšo strukturo ciklizirali z *gem*-dihidroperoksidnim derivatom holne [84,87,89,130] ali deoksiholne kisline [85] (Shema 1.26).




Shema 1.26: S $H_2SO_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz steroidnih *gem*-dihidroperoksidov.

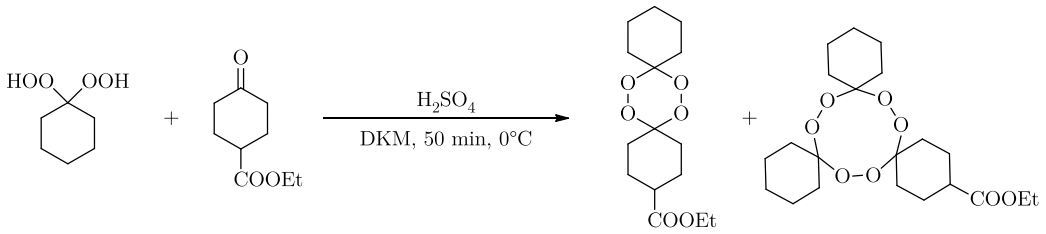
To metodo je uporabila tudi Das s sodelavci pri ciklokondenzaciji androstanonskih steroidnih *gem*-dihidroperoksidov s 4-substituiranimi cikloheksanoni (Shema 1.27), vendar je namesto 2-kratnega presežka ketona uporabila več kot 100-kratni presežek [143].




R = H, Me, OMe, COMe, heksil, butil, Cl, Br, $NO_2$

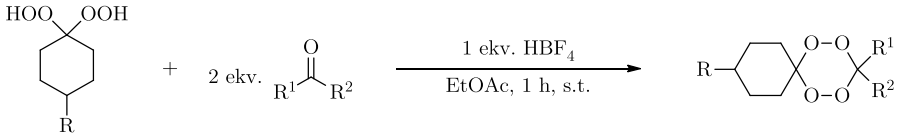
Shema 1.27: S $H_2SO_4$ katalizirana ciklokondenzacija androstanskih *gem*-dihidroperoksidov s 4-substituiranimi cikloheksanoni.

$H_2SO_4$ je bila kot katalizator za ciklokondenzacijo *gem*-dihidroperoksida in ketona uporabljena tudi na preprostejših substratih s cikloheksanskim skeletom. Opsenica s sodelavci [86,91] je tako 1,1,-dihidroperoksicikloheksan v DKM cikliziral z metil 4-oksocikloheksankarboksilatom v nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan z 28 % izkoristkom (Shema 1.28). Pri tej sintezi se je pokazal problem neselektivnosti reakcije, saj je kot stranski produkt nastal tudi mešan 1,2,4,5,7,8-heksaoksonan.




Shema 1.28: S $H_2SO_4$ katalizirana sinteza nesimetričnega tetraoksana s cikloheksanskim skeletom.

Prav tako kislinsko katalizirano sintezo dispiro nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov je uporabil Amewu s sodelavci [93], le da je uporabil etilacetat kot topilo in $HBF_4$ kot kislino za kondenzacijo *gem*-dihidroperoksidov s cikloheksanskim skeletom z drugim cikličnim ketonom (Shema 1.29).



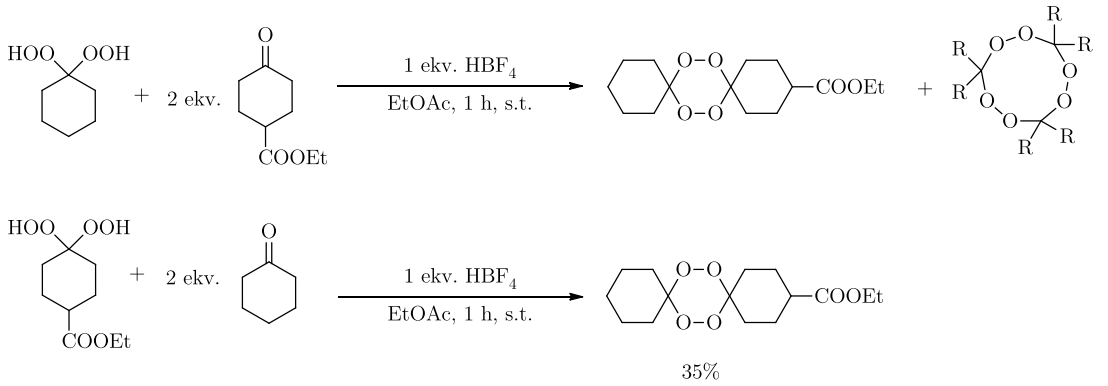

R = H
R = $CH_2COOEt$
R = COOEt

$R^1$, $R^2$ = -$(CH_2)_5$-
$R^1$, $R^2$ = -$(CH_2)_{11}$-
$R^1$, $R^2$ = -$(CH_2)_2$-CO-$(CH_2)_2$-
$R^1$, $R^2$ =



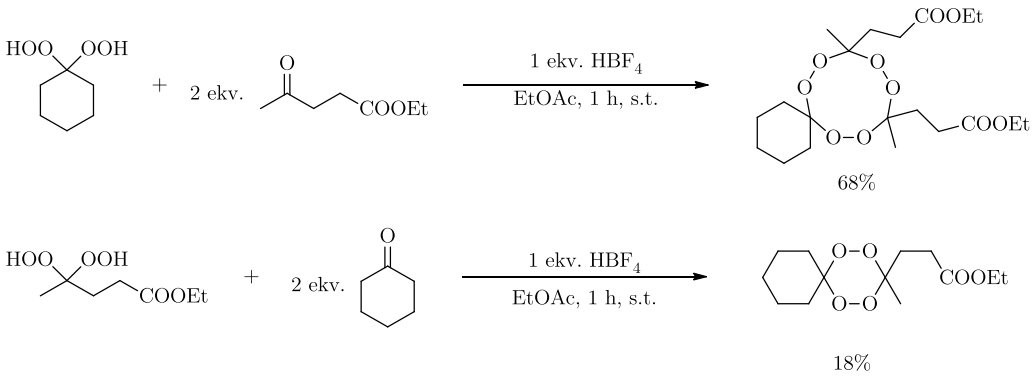
Shema 1.29: S $HBF_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov.

Ugotovili so, da je selektivnost pri sintezi močno odvisna od reaktivnosti izhodnih spojin, saj so v primeru kondenzacije *gem*-dihidroperoksidnega derivata cikloheksanona z etil 4-oksocikloheksan karboksilatom poleg nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana dobili tudi 1,2,4,5,7,8-heksaoksonan kot stranski produkt. Občutno zmanjšano tvorbo tega stranskega produkta so dosegli z obrnjeno reakcijo, ko so najprej pripravili estrski *gem*-dihidroperoksid in ga ciklizirali s cikloheksanonom (Shema 1.30) [93].



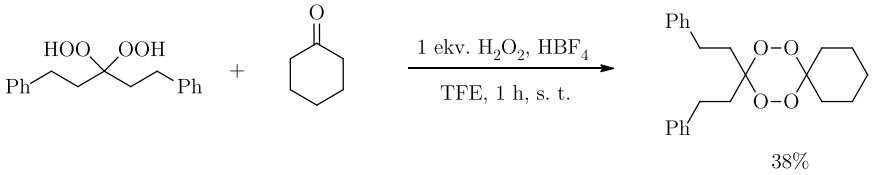

Shema 1.30: Selektivnost pri sintezi dispiro tetaoksana.

Pomembnost reaktivnosti izhodnih spojin je bila še bolj izražena pri sintezi spiro derivata iz cikloheksanona in etil levulinata oz. njunih pripadajočih *gem*-dihidroperoksidov. V primeru, ko so 1,1-dihidroperoksicikloheksan kondenzirali z etil levulinatom, so dobili z 68 % izkoristkom le 1,2,4,5,7,8-heksaoksonan, ki je vseboval eno cikloheksanonsko in dve etil levulinatni substituenti (Shema 1.31). Obrnjena sinteza s predhodno pripravljenim *gem*-dihidroperoksidom iz etil levulinata in cikloheksanonom pa je vodila do nastanka nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana (Shema 1.31). Slab izkoristek sinteze (18 %) so avtorji pripisali nestabilnosti izhodnega *gem*-dihidroperoksida. Iz tega lahko sklepamo, da je za izboljšanje selektivnosti sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov bolj smotrno predhodno spremeniti v *gem*-dihidroperoksid keton, ki je manj reaktiven.



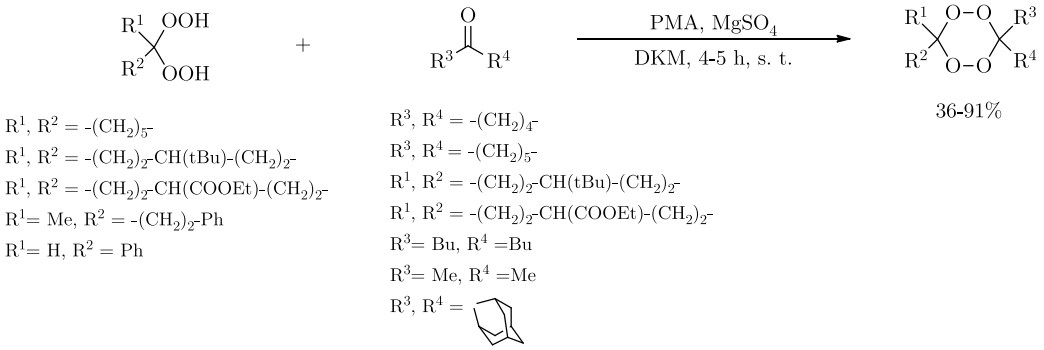

Shema 1.31: Selektivnost pri sintezi spiro tetraoksanov.

Iskra s sodelavci je ugotovil, da fluorirani alkoholi aktivirajo tvorbo 1,2,4,5-tetraoksanov in povečajo slektivnost reakcije [144]. Na podlagi tega, je Franco s sodelavci v trifluoroetanolu sintetiziral spiro tetraoksan iz dialkilnega *gem*-dihidroperoksida in cikloheksanona, v reakcijsko zmes pa je dodal še vodno raztopino $H_2O_2$ (Shema 1.32) [102].



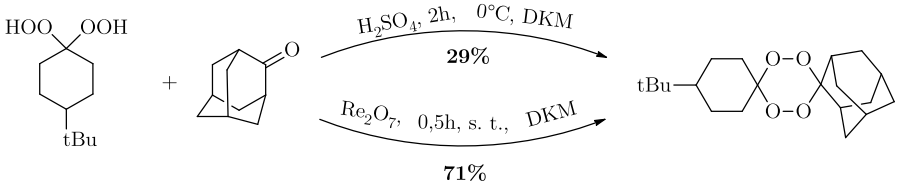

Shema 1.32: S $HBF_4$ katalizirana sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v fluoriranih alkoholih v prisotnosti $H_2O_2$.

Yan s sodelavci [145] je za katalizo sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov vpeljal novo kislino. Uporabil je fosfomolibdensko kislino (PMA, $H_3PMo_{12}O_{40}$) in z dodatkom brezvodnega $MgSO_4$ v reakcijsko zmes preprečil tvorbo PMA hidrata. S tem je omogočil boljši stik katalizatorja z reagenti, zmanjšal nastanek stranskih produktov in tako uspešno sintetiziral 16 nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z izkoristki 36–91 % (Shema 1.33).



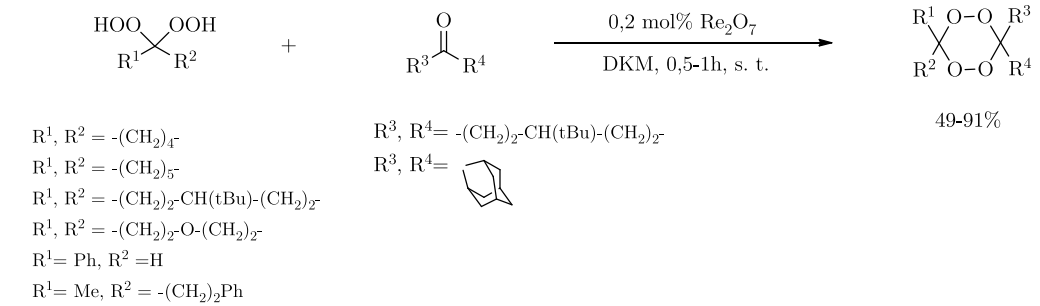

Shema 1.33: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, katalizirana s fosfomolibdensko kislino (PMA).

Namesto kisline je za katalizo reakcije *gem*-dihidroperoksidov s karbonilnimi spojinami mogoče uporabiti tudi kovinske katalizatorje. Ghorai s sodelavci [146] je primerjal učinkovitost ciklokondenzacije s tradicionalno uporabljeno $H_2SO_4$ [86] in s kovinskim katalizatorjem $Re_2O_7$ ter pokazal, da je izkoristek sinteze boljši v primeru uporabe renijevega katalizatorja (29 % izkoristek v primeru $H_2SO_4$ katalize, 71 % pri uporabi $Re_2O_7$, Shema 1.34).



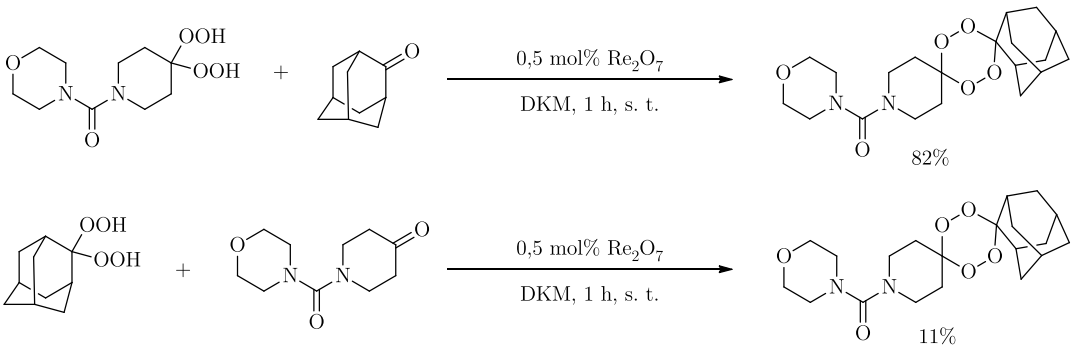

Shema 1.34: Primerjava izkoristka kislinsko in kovinsko katalizirane sinteze nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana.

Ghorai je metodo nato razširil na več substratov in sintetiziral 12 nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov (Shema 1.35). Izhodne *gem*-dihidroperokside, ki so izhajali iz različnih cikloalkanonov, piranona, benzaldehida ali 4-fenil-butan-2-ona, je ciklokondenziral s 4-*terc*-butilcikloheksanonom ali adamantan-2-onom.



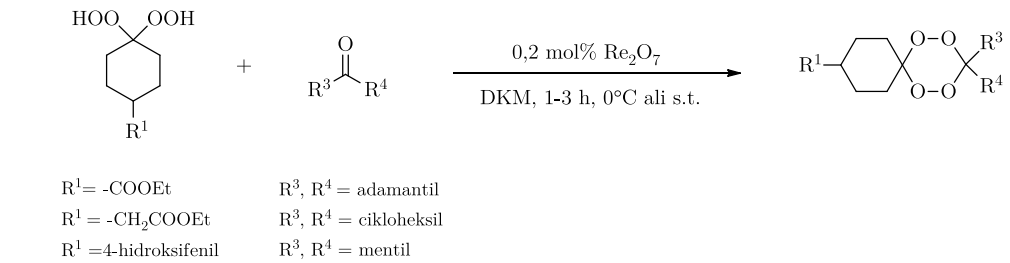

Shema 1.35: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z $Re_2O_7$.

Tudi v tej študiji so pokazali, da je mogoče močno vplivati na izkoristek sinteze nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana, če obrnemo funkcionalizacijo *gem*-dihidroperoksida in ketona (Shema 1.36). Eden glavnih razlogov za veliko razliko v izkoristku teh dveh sintez je podvrženost adamantalidenskega *gem*-dihidroperoksida Baeyer-Villigerjevi oksidaciji, saj se v kislem hitreje pretvori v lakton kot pa ciklizira s ketonom.




Shema 1.36: Selektivnost kovinsko katalizirane sinteze nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana v odvisnosti od funkcionalizacije izhodnih spojin.

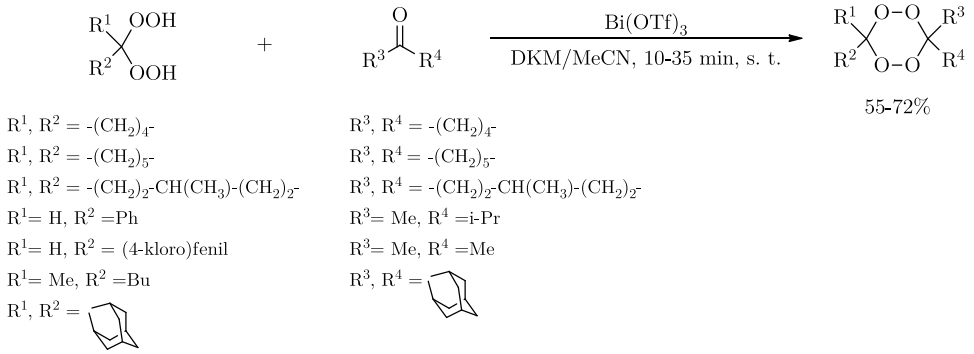
To sintezno metodo so uporabili tudi za načrtovanje tetraoksanskih prekurzorjev pri sintezi hibridnih antimalarikov [110,112,113] in druge generacije analogov antimalarijskega 1,2,4,5-tetraoksana RKA 182 (Shema 1.37) [96]. Pri slednji študiji so ugotovili, da sintetiziranega nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana ni bilo moč ločiti s kromatografijo od adamantan-2-ona, zato so ga za nadaljnje pretvorbe na stranski verigi uporabili v zmesi z izhodnim ketonom.




Shema 1.37: Sinteza tetraoksanskega prekurzorja z $Re_2O_7$ za sintezo druge generacije analogov RKA128.

Sashidhara s sodelavci [147] je sintetiziral 12 nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, pri čemer je namesto kisline za kondenzacijo *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin v

1,2,4,5-tetraoksan kataliziral z bizmutovimi katalizatorji, med katerimi je bil najbolj učinkovit bizmutov triflat (Shema 1.38).

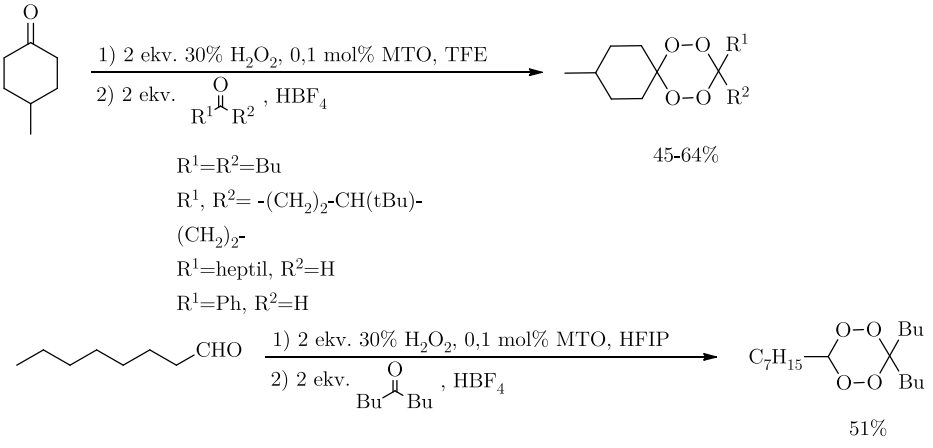



Shema 1.38: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov z Bi(III) katalizatorjem.

### 1.3.1.2 Enostopenjska sinteza

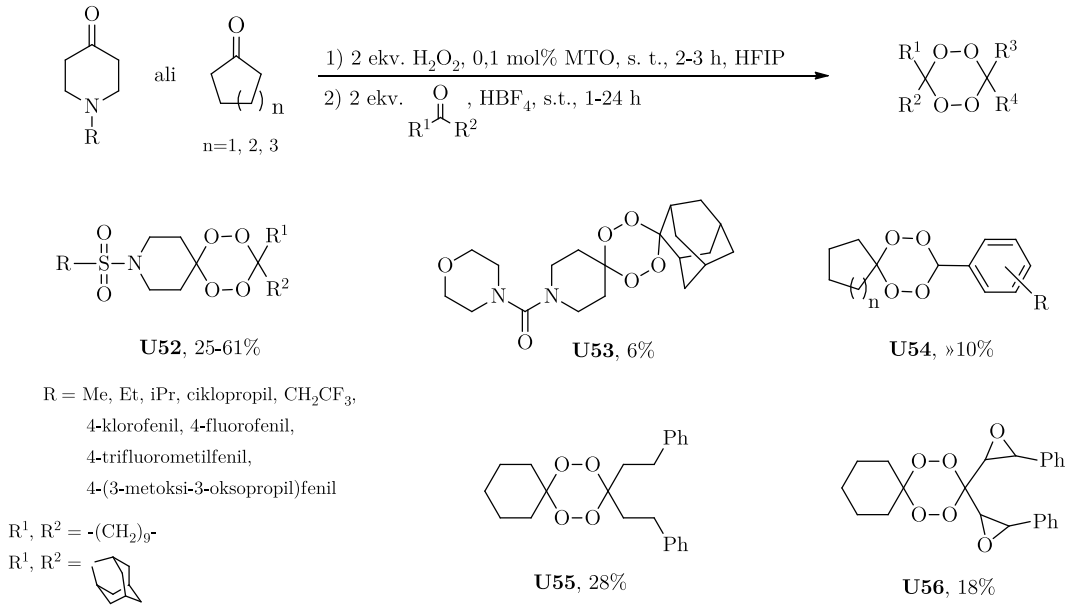
Pri sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s kondenzacijo karbonilne spojine z *gem*-dihidroperoksidom je potrebno slednjega predhodno sintetizirati in izolirati. Temu se je možno izogniti tako, da se *gem*-dihidroperoksid pripravi ''*in-situ*'' iz karbonilne spojine in vodikovega peroksida, čemur se potem doda druga karbonilna spojina, ki tvori z *gem*-dihidroperoksidom nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan. Pri tovrstni sintezi je zelo pomembno, da se izhodna karbonilna spojina kvantitativno in selektivno pretvori v *gem*-dihidroperoksid ter da se ne uporabi presežnega vodikovega peroksida, saj se tako prepreči tvorbo stranskih produktov.

Prvo tovrstno *»one-pot«* sintezo petih nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov je izpeljal Iskra s sodelavci, pri kateri je izkoristil aktivirajoč vpliv fluoriranega alkohola kot topila pri reakcijah z vodikovim peroksidom [144]. Modelno spojino 4-metilcikloheksanon je v TFE ($CF_3CH_2OH$) z dvema ekvivalentoma $H_2O_2$ in katalitsko količino MTO najprej pretvoril v *gem*-dihidroperoksid, ki je po dodatku druge karbonilne spojine cikliziral v nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan (Shema 1.39). Ciklizacija je uspela tako z acikličnim in cikličnim ketonom kot tudi z alifatskim aldehidom ter benzaldehidom. Ob zamenjavi topila v HFIP, ki je bolj aktivirajoče, je mogoče kot izhodno spojino uporabiti tudi aldehid ter jo v drugi stopnji ciklokondenzirati s ketonom v nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan (Shema 1.39).



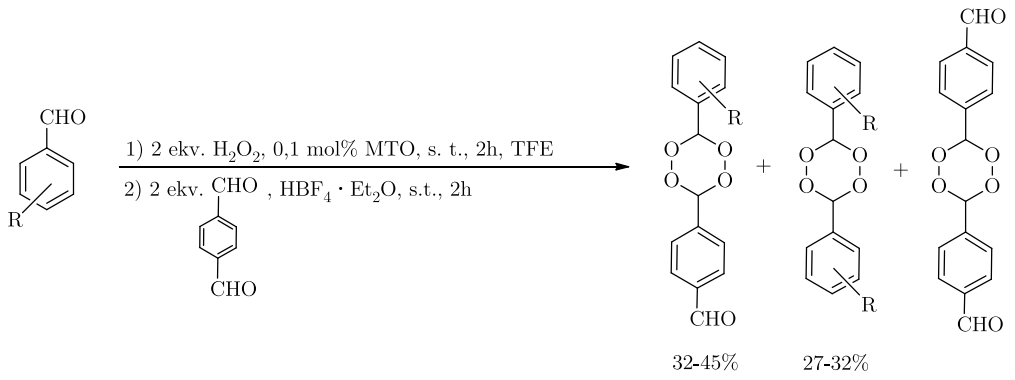

Shema 1.39: *»One-pot«* sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v fluoriranih alkoholih.

Široko aplikativnost metode so izkoristili številni drugi raziskovalci, ki so z njo sintetizirali nesimetrične 1,2,4,5-tetraoksane iz sulfonamidov in adamantan-2-ona oz. ciklododekanona (**U52**, Shema 1.40) [94], iz morfolinsečnine in adamantan-2-ona (**U53**) [94], iz cikloalkanonov in substituiranih benzaldehidov (**U54**) [98] ter iz cikloheksanona in 1,3-difenilpentan-3-ona ter njegovega nenasičenega derivata (**U55** in **U56,** Shema 1.40**)** [102]. V slednjem primeru je potekla tudi epoksidacija.



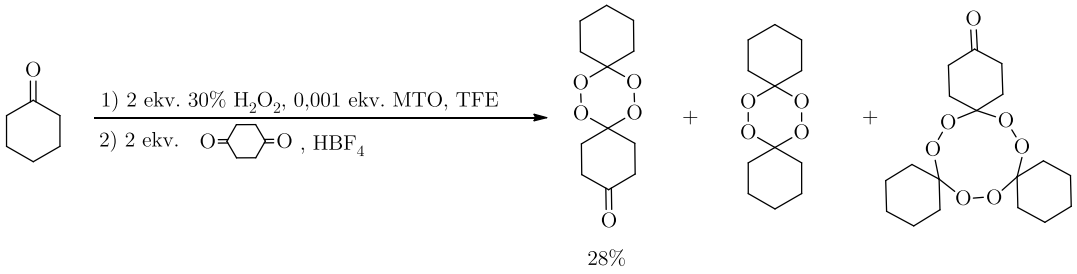

Shema 1.40: *»One-pot«* sinteza strukturno različnih nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov.

Metoda pa ima tudi svoje omejitve, saj so nekateri poročali o težavah z neselektivnostjo reakcije [93,98,99]. Pri »one-pot« sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz cikloalkanonov in substituiranih benzaldehidov (Shema 1.40) so zaznali nastanek neznanih stranskih produktov, ki so močno ovirali čiščenje želenega produkta s kolonsko kromatografijo [98]. V primeru ciklizacije substituiranih benzaldehidov s tereftaldehidom [99] je poleg nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana (Shema 1.41) nastalo nekaj simetričnega 1,2,4,5-tetraoksana iz substituiranega benzaldehida Zaznali so tudi nastanek simetričnega 1,2,4,5-tetraoksana iz tereftaldehida (Shema 1.41), vendar ga niso uspeli izolirati. Vzrok za neselektivnost naj bi bila slaba reaktivnost tereftaldehida.



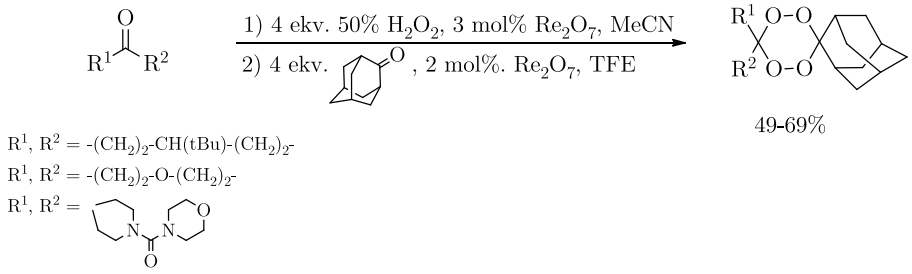

Shema 1.41: Neselektivnost reakcije pri *»one-pot«* sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz substituiranih benzaldehidov in tereftaldehida.

S problemi neselektivnosti pri »*one-pot*« sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov se je srečal tudi Amewu s sodelavci [93], ko je pri uporabi cikloheksanona in cikloheksa-1,4-diona poleg nastanka nesimetričnega tetraoksana opazil tudi simetričen 1,2,4,5-tetraoksan in mešan 1,2,4,5,7,8-heksaoksonan (Shema 1.42).



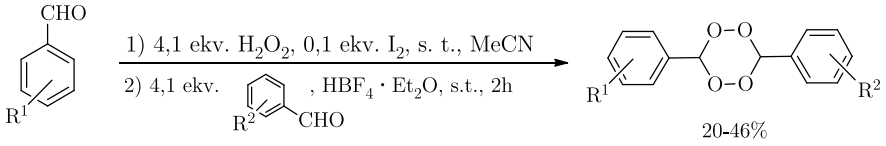

Shema 1.42: Problem selektivnosti pri »*one-pot*« sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov v sistemu $H_2O_2$/MTO/$HBF_4$/TFE.

Kljub temu, da je bil MTO največkrat uporabljen kot katalizator za »*one-pot*« sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, pa ni edini renijev katalizator, ki omogoča tovrstno sintezo. Ghorai s sodelavci [146] je priredil svojo metodo sinteze 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksida in ketona (Shema 1.35) in $Re_2O_7$ uporabil tudi za »*one-pot*« sintezo teh spojin (Shema 1.43). V primerjavi z reakcijo, katalizirano z MTO, je pri sintezi uporabil bolj koncentrirano (50 %) vodno raztopino $H_2O_2$ v presežku. Za izboljšanje selektivnosti v drugem koraku je izvajal reakcijo v fluoriranih alkoholih, saj je v primeru uporabe DKM nastajal tudi simetrični 1,2,4,5-tetraoksan iz »*in-situ*« pripravljenega *gem*-dihidroperoksida.




Shema 1.43: Z $Re_2O_7$ katalizirana »*one-pot*« sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov.

Glede na to, da je peroksidacija izhodne karbonilne spojine ključen korak pri »*one-pot*« sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, je mogoče namesto renijevih katalizatorjev uporabiti tudi jod, ki se je izkazal kot dober katalizator za peroksidacijo karbonilnih spojin brez dodatka kisline [148]. Tako je Kumar s sodelavci [100,101] v prvi stopnji pretvoril različno substituirane benzaldehide z vodikovim peroksidom in jodom kot katalizatorjem v *gem*-dihidroperokside. Tako tvorjeni *gem*-dihidroperoksid je potem s pomočjo kislinske katalize cikliziral z drugim substituiranim benzaldehidom in tako sintetiziral 22 aromatskih nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov (Shema 1.44), brez nastanka 1,2,4,5-simetričnih tetraoksanov kot stranskih produktov. Kljub selektivni tvorbi želenih produktov pa ima metoda nekaj pomanjkljivosti, in sicer skromne izkoristke (20–46 %) in pa omejenost na benzaldehide, saj reakcija ne deluje s cikličnimi ketoni.

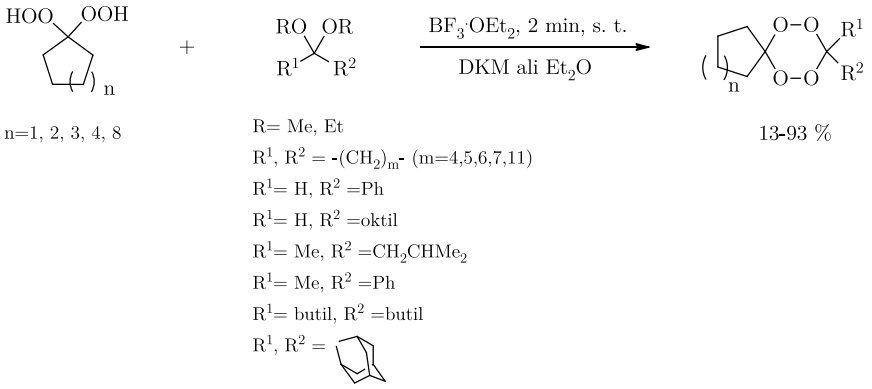



Shema 1.44: Z jodom katalizirana »*one-pot*« sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz substituiranih benzaldehidov.

## 1.3.2 Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz maskiranih izhodnih spojin

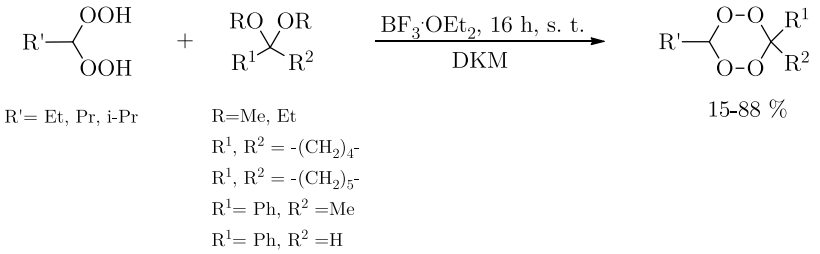
### 1.3.2.1 Enostopenjska sinteza iz *gem*-dihidroperoksidov in spojine z maskirano karbonilno spojino

Za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov je mogoče namesto karbonilne spojine uporabiti tudi acetale ali ketale in Terent'ev s sodelavci [149] je opravil ciklokondenzacijo katalizirano z 0,1-1,4 ekvivalenta $BF_3 \cdot OEt_2$ in na ta način sintetiziral 24 nesimetričnih tetraoksanov iz cikloalkilidenskih *gem*-dihidroperoksidov ali adamantiliden *gem*-dihidroperoksidom. Te *gem*-dihidroperokside je kondenziral z dimetil ali dietil acetali, pripravljenimi iz cikličnih, alifatskih, alkilaromatskih ketonov ali adamantanona (Shema 1.45). V večini ciklizacij je potekla tudi kompetitivna reakcija ciklizacije *gem*-dihidroperoksida v simetrični tetraoksan, ki jo je bilo mogoče omiliti z uporabo velikih presežkov acetala.



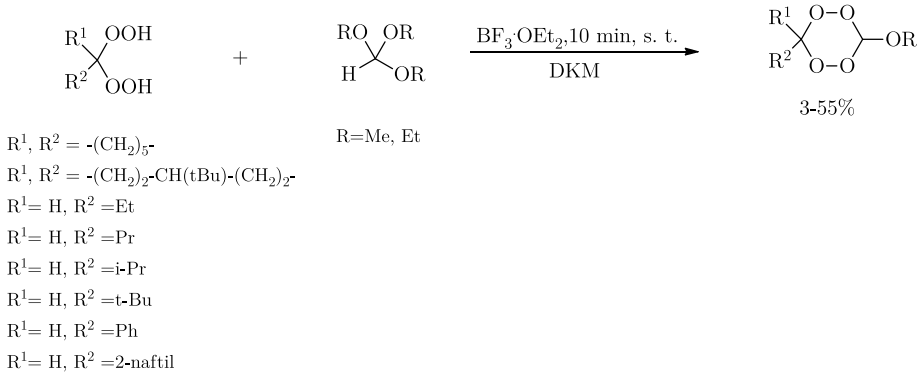

Shema 1.45: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in acetalov.

Hamann s sodelavci [150] je priredil prej omenjeno metodo, da je omogočala sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz primarnih *gem*-dihidroperoksidov in acetalov s ciklopentanskim ali cikloheksanskim skeletom (Shema 1.46). Za uspešno pretvorbo je uporabil 1,4 ekvivalenta $BF_3 \cdot OEt_2$ in podaljšal reakcijski čas na 16 ur. Izkoristki šestih tako sintetiziranih tetraoksanov so bili skromni (15–50 %). Ciklizaciji pod enakimi pogoji so bili podvrženi tudi primarni *gem*-dihidroperoksidi in acetali, pripravljeni iz benzaldehida oz. acetofenona, ki so zreagirali v nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan z boljšimi izkoristki (54–88 %, Shema 1.46).




Shema 1.46: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz primarnih *gem*-dihidroperoksidov in acetalov.

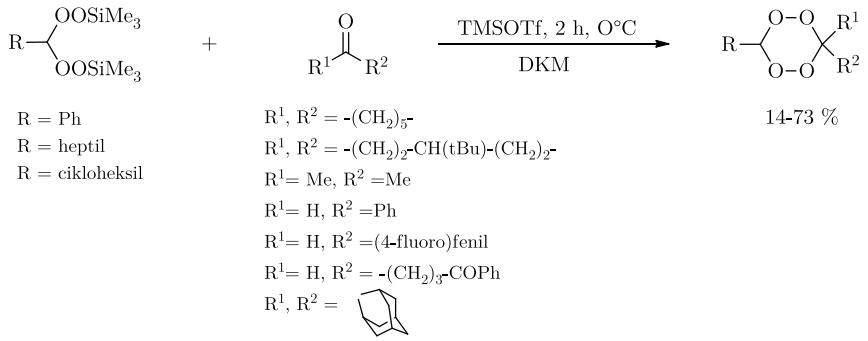
Acetale so v reakciji s primarnimi in sekundarnimi *gem*-dihidroperoksidi nadomestili tudi z ortoestri, pri čemer so nastali alkoksi-substituirani 1,2,4,5-tetraoksani (Shema 1.47). Izkazalo se je, da so produkti dokaj nestabilni v kislem mediju, zato je bilo potrebno reakcijo prekiniti že po 10 minutah [150].




Shema 1.47: Sinteza alkoksi-substituiranih 1,2,4,5-tetraoksanov iz ortoestrov.

#### 1.3.2.2 Enostopenjska sinteza iz maskiranih *gem*-dihidroperoksidov in karbonilne spojine

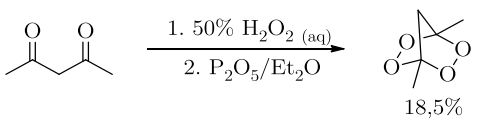
Naslednja možnost priprave nesimetričnih tetraoksanov je uporaba maskiranih DHP. Ta metoda je sicer redko uporabljena, DHP pa se predhodno pretvori v trimetilsililne derivate *gem*-dihidroperoksidov s TMSCl. Nadaljnja reakcija ciklizacije s karbonilno spojino je katalizirana s trimetilsilil trifluorometansulfonatom (TMSOTf). Nojima s sodelavci [151] je na tak način cikliziral primarne sililirane derivate *gem*-dihidroperoksidov z aldehidi ali ketoni in izoliral 10 nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov (Shema 1.48). Kljub temu, da so bili izkoristki pretvorb skromni (14–73 %), je bila prednost tega sinteznega postopka selektivnost, saj ni prišlo do tvorbe simetričnih tetraoksanov [151].




Shema 1.48: Sinteza nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov s kondenzacijo trimetilsililnih derivatov *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin.

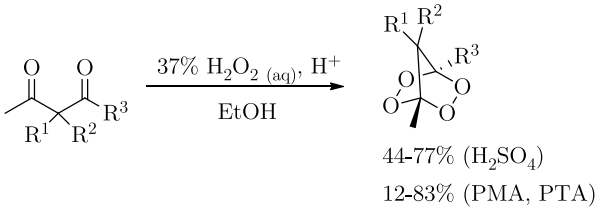
### 1.3.3 Intramolekularna sinteza bicikličnih 1,2,4,5-tetraoksanov

Milas s sodelavci je leta 1963 iz pentan-2,4-diona, vodikovega peroksida in eterne raztopine $P_2O_5$ intramolekularno sintetiziral biciklični 1,2,4,5-tetraoksan, majhna količina slednjega pa je nastala tudi, ko je namesto $P_2O_5$ uporabil $H_2SO_4$ (Shema 1.49) [152].



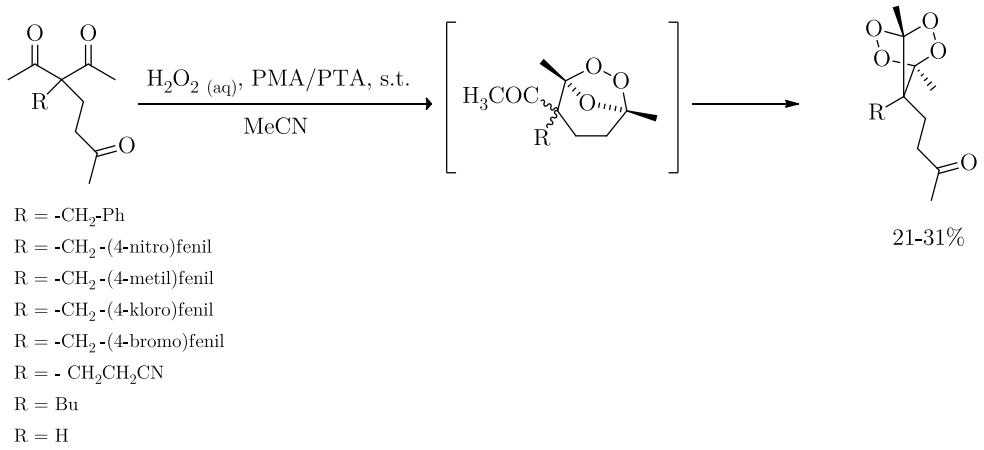

Shema 1.49: Intramolekularna tvorba 1,2,4,5-tetraoksana iz pentan-2,4-diona.

Po navdihu te študije je Terent'ev s sodelavci razvil metodo za kislinsko katalizirano sintezo bicikličnih tetraoksanov iz 1,3-diketonov in vodikovega peroksida. Kot katalizator je uporabil različne kisline ($H_2SO_4$, $HClO_4$, $HBF_4$, $BF_3$) (Shema 1.50) [153].



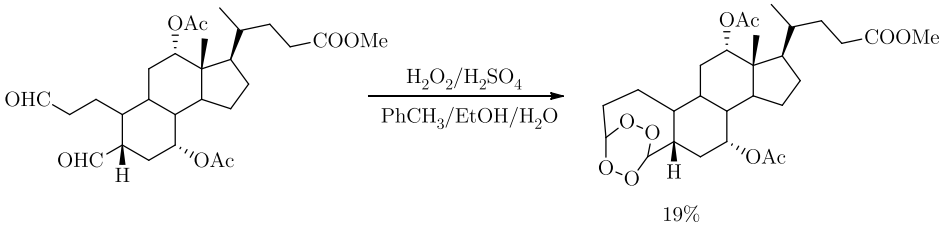

Shema 1.50: Intramolekularna tvorba 1,2,4,5-tetraoksana iz 1,3-diketonov.

Namesto klasične močne kisline je pri tem tipu pretvorbe mogoče kot katalizator uporabiti tudi fosfomolibdensko ali fosfovolframovo kislino, kar omogoča sintezo bicikličnih tetraoksanov iz 1,3-diketonov, ki se zlahka oksidirajo (Shema 1.51) [154]. S pomočjo istega katalizatorja in etrsko raztopino $H_2O_2$ je mogoče s skromnimi izkoristki (21–31 %) iz triketonov sintetizirati biciklične 1,2,4,5-tetraoksane preko bicikličnih ozonidov, ki so intermediati v reakciji (Shema 1.51) [155].




Shema 1.51: Sinteza bicikličnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz triketonov preko ozonidnega intermediata.

Intramolekularna tvorba tetraoksanov je mogoča tudi iz dialdehidov. Pri kislinsko katalizirani ciklizaciji 1,6-dialdehida s steroidnim skeletom v prisotnosti $H_2O_2$ se je z 19 % izkoristkom tvoril nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan (Shema 1.52), ki je imel skromno protimalarijsko aktivnost v primerjavi z artemisininom [90].




Shema 1.52: Intramolekularna sinteza 1,2,4,5-tetraoksana iz 1,6-dialdehida.

# Poglavje 2

# Namen dela

Peroksidna vez postaja vedno pomembnejši farmakofor v biološko aktivnih spojinah, saj je od leta 2001 naravna peroksidna spojina artemisinin učinkovina izbora za zdravljenje malarije. Pomembnost peroksidnih zdravilnih učinkovin je bila potrjena s podelitvijo Nobelove nagrade za fiziologijo in medicino 2015 za odkritje artemisinina. Hkrati se v farmacevtski kemiji povečuje tudi vloga sinteznih peroksidov, predvsem zaradi lažjega in cenejšega pridobivanja v primerjavi z naravnimi. V sklopu raziskav doktorskega študija smo zato raziskali dvostopenjsko sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov in vrednotili njihove morebitne protibakterijske in protitumorske lastnosti.

Študijo sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom smo razdelili v dve poglavji. V prvem poglavju smo raziskali pretvorbo karbonilnih spojin v *gem*-dihidroperokside, ki so izhodne spojine za sintezo nesimetričnih tetraoksanov. Okarakterizirali smo α-hidroperoksialkohole in raziskali njihovo vlogo pri pretvorbi karbonilnih spojin v *gem*-dihidroperokside. V drugem poglavju smo raziskali reakcijo ciklokondenzacije *gem*-dihidroperoksidov s karbonilnimi spojinami, pri čemer smo kot katalizator uporabili le kislino in se izognili uporabi dragih kovinskih katalizatorjev, ki so bili do sedaj uveljavljeni v pretvorbah tega tipa. Posebno pozornost smo namenili študiji vpliva reakcijskih pogojev na selektivnost tvorbe nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, saj so stranski produkti glavna ovira pri sintezi tovrstnih spojin. Razvili smo metodo za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov in jo uporabili za sintezo strukturno definiranega sklopa nesimetričnih tetraoksanov, ki jih smo uporabili za vrednotenje njihove protibakterijske aktivnosti proti petim sevom bakterij (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis, M. tuberculosis*) in protitumorske aktivnosti proti dvema tumorskima celičnima linijama (HeLa, A549).

V sklopu našega raziskovanja smo tako skušali preveriti in ovrednotiti naslednjo hipotezo: »Iz karbonilnih spojin in vodikovega peroksida je mogoče brez uporabe kovinskih katalizatorjev sintetizirati nesimetrične 1,2,4,5-tetraoksane, ki imajo potencialno protibakterijsko in protitumorsko aktivnost.«

**Raziskave v okviru doktorske disertacije sem razdelila na naslednja poglavja:**

4.1 Študija pretvorbe karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom v *gem*-dihidroperokside

4.2 Študija sinteze nesimetričnih tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in ketonov

4.3 Vrednotenje biološkega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

# Poglavje 3

# Materiali in metode

## 3.1 Materiali in metode, ki smo jih uporabili pri študiji sinteze nesimetričnih tetraoksanov

**Uporabljeni reagenti in topila**
Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri delu, so komercialno dostopne in jih je mogoče kupiti pri znanih proizvajalcih (Sigma Aldrich, Merck, Fluka, Alfa Aesar). Uporabljali smo 30 % vodno raztopino vodikovega peroksida proizvajalca Sigma Aldrich.

100 % vodikov peroksid smo pripravili tako, da smo v bučko natehtali ustrezno maso 30 % vodikovega peroksida, dodali 2,5 ml MeCN/mmol $H_2O_2$ in 20 minut odparevali na rotavaporju pri temperaturi kopeli 25 °C. Sledil je še en dodatek 2,5 ml MeCN/mmol $H_2O_2$ in ponovno 20-minutno rotavapiranje.

**Rotavapiranje in termostatiranje reakcij**
Za rotavapiranje smo uporabljali rotavaporja Büchi Rotavapor R-124 in Büchi Rotavapor RE111. Reakcije, ki smo jih izvajali pri 40 °C, smo termostatirali v vodni kopeli z aparaturo Elektromehanika Labonova Ultra 2000.

**Tankoplastna kromatografija (TLC)**
TLC analizo smo izvajali na ploščah Silica gel/TLC-cards DC-Alufolien-Kieselgel proizvajalca Fluka z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo kot orositvena reagenta uporabljali vanilin-žveplovo kislino ali raztopino kalijevega permanganata. Za boljšo vizualizacijo produktov smo najprej razvili TLC ploščo, potem pa smo jo poškropili z vanilin-žveplovo kislino ali jo potopili v raztopino kalijevega permanganata in segrevali s pištolo na vroč zrak.

Vanilin-žveplovo kislino smo pripravili tako, da smo 0,5 g vanilina raztopili v 100 ml 80 % etanolne raztopine $H_2SO_4$. Raztopino kalijevega permanganata smo pripravili tako, da smo 1,5 g $KMnO_4$, 10 g $K_2CO_3$ in 1,25 ml 10 % NaOH raztopili v 200 ml destilirane vode.

**Kolonska kromatografija**
Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Kieselgel 60 proizvajalca Fluka s premerom delcev 0,063–0,2 mm.

**Infrardeča spektrometrija (IR)**
IR spektroskopske meritve so bile opravljene na Perkin Elmer spektrofotometru (Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR Spectrometer).

Reakcije smo v realnem času opazovali z ATR IR sondo ReactIR™ 45 na sintezni delovni postaji Easymax 102 Mettler-Toleda.

**Jedrska magnetna resonanca (NMR)**
$^{1}$H in $^{13}$C NMR spektri so bili posneti na Kemijskem inštitutu (NMR center) z Varian Inova 300 spektrometrom (300 MHz) pri 25 °C ali -20 °C. Za spektre, posnete v $CDCl_3$, so kemijski premiki (δ) podani v ppm glede na tetrametilsilan kot interni standard. Za spektre, posnete v DMSO-d6, je bil DMSO uporabljen kot interni standard. Za $^{1}$H NMR spektre, posnete v $D_2O$, smo uporabili kemijski premik vode za interni standard. Pri merjenju $^{13}$C NMR spektrov v $D_2O$ pa smo v vzorec dodali MeOH, ki smo ga uporabili za interni standard.

**Rentgenska strukturna analiza**
Rentgenska difrakcija na monokristalih je bila opravljena na difraktometru Agilent New Gemini Dual opremljenim z Atlas CCD detektorjem, bakrovo ter molibdenovo rentgensko cevjo z grafitnim monokromatorjem, in Oxford Cryojet hladilnim sistemom. Uporabljena je bila rentgenska svetloba Cu *Kα* z valovno dolžino 1,54184 Å ali pa Mo *Kα* valovne dolžine 0,71073 Å. Za zaščito spojin pred razpadom so bile meritve na kristalih opravljene pod zaščitnim tokom suhega dušika pri temperaturi 150 K. S programsko opremo *CrysAlis$^{Pro}$* [156] so bili obdelani uklonski podatki, kar je vključevalo tako empirično absorpcijsko korekcijo s *SCALE3 ABSPACK* algoritmom, kakor tudi analitično absorpcijsko korekcijo na podlagi opisa kristalnih ploskev [157]. Reševanje in piljenje kristalnih struktur je potekalo v programskem paketu *Olex2* [158] z uporabo programov *Superflip* [159]/*EDMA* [160], *SHELXT* [161] in *SHELXL-2014/7* [162]. Slike kristalnih struktur so bile pripravljene v programu *DIAMOND* [163].

**Masna spektroskopija (MS)**
Masni spektri (ESI) in HR-MS so bili posneti na Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass v Centru za masno spektroskopijo na Institutu »Jožef Stefan«.

**Elementna analiza**
Elementno analizo so naredili na Institutu »Jožef Stefan« na Oddelku za anorgansko kemijo in tehnologijo z aparaturo elementni analizator Vario EL cube, Elementar.

**Določevanje tališča**
Tališča smo določili v steklenih kapilarah na Institutu »Jožef Stefan« z aparaturo za merjenje tališč in vrelišč Buchi Melting Point M-560 ali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani z mikroskopom Leica Galen III.

**Varnost**
Čeprav nismo imeli pri delu nobenih težav, je potrebna previdnost pri delu s kemikalijami (uporaba zaščitne halje, zaščitnih očal, rokavic, digestorija), saj so vodikov peroksid in ostali peroksidni produkti, ki smo jih sintetizirali, nevarne snovi.

## 3.2 Materiali in metode, ki smo jih uporabili pri vrednotenju biološkega delovanja tetraoksanov

**Centrifugiranje**
Pri testiranju protibakterijskega delovanja sintetiziranih spojin smo za centrifugiranje raztopine bakterij uporabljali centrifugo Eppendorf miniSpin.

**Merjenje absorbance**
Pri testiranju protibakterijskega delovanja sintetiziranih spojin smo merili absorbanco s Tekan Infinite 200 pri valovni dolžini 612 nm, pri čemer smo z mikrotitrskih plošč odstranili pokrov. Pri testiranju protitumorskega delovanja sintetiziranih spojin smo merili absorbanco s čitalcem mikrotiterskih plošč Tecan Infinite M1000 pri valovni dolžini 570 nm, pri čemer smo z mikrotitrskih plošč odstranili pokrov.

**Priprava 'Lysogeny broth' (LB) gojišča**
Za pripravo tekočega LB gojišča smo v pol litra vode zmešali 5 g peptona (Biolife), 5 g NaCl (Merck) in 2,5 g kvasnega ekstrakta (Biolife). Za pripravo agar LB gojišča smo tej mešanici dodali še 11,5 g agarja (Biolife).

**Inkubacija**
Med testiranjem protibakterijskega delovanja sintetiziranih spojin smo uporabljali inkubator Sanyo, v katerem smo inkubirali pri 37 °C in stresali s 120 obrati na minuto. Pri testiranju protitumorskega delovanja sintetiziranih spojin smo uporabljali inkubator Binder C-150, v katerem smo inkubirali 48 ur pri 37°C, 5% $CO_2$ atmosferi in več kot 95 % vlažnosti.

**Mikrotitrske plošče**
Med testiranjem protibakterijskega in protitumorskega delovanja sintetiziranih spojin smo uporabljali prozorne mikrotitrske plošče s 96 jamicami.

# Poglavje 4

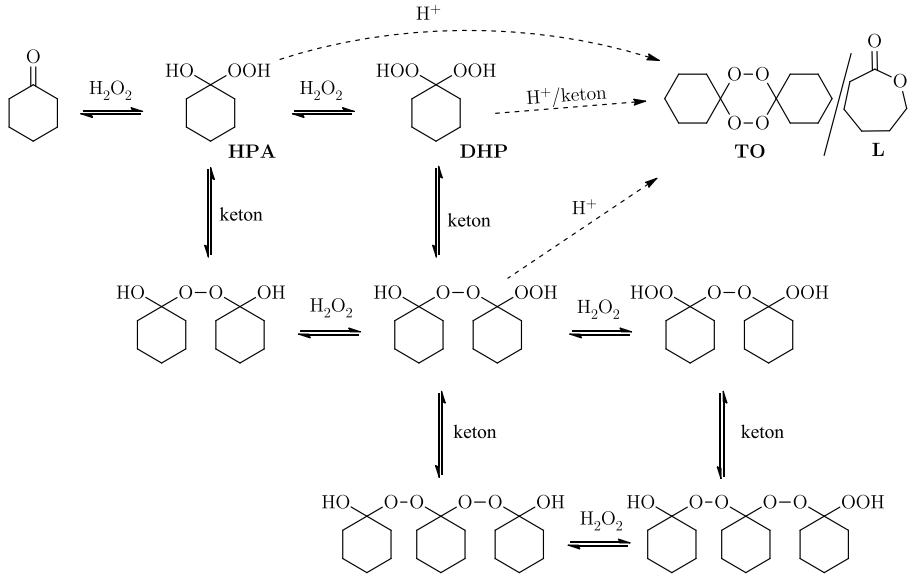
# Rezultati in razprava

## 4.1 Študija pretvorbe karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom v *gem*-dihidroperokside

Najpomembnejša skupina sinteznih biološko aktivnih peroksidov so ciklični peroksidi (1,2,4-trioksani, 1,2,4-trioksolani, 1,2,4,5-tetraoksani). Njihova sinteza zajema reakcije karbonilnih spojin, alkenov in drugih derivatov z ozonom, molekularnim ali singletnim kisikom ali vodikovim peroksidom [138]. Med naštetimi reagenti je vodikov peroksid varnejši in lažji za uporabo kot ozon ali singletni kisik [164]. Po začetni peroksidaciji karbonilne skupine tvorimo ciklične perokside s kislinsko katalizirano ciklizacijo hidroperoksidov ali druge karbonilne spojine. Podobni reakcijski pogoji vodijo tudi v Baeyer-Villigerjevo oksidacijo, v kateri se ketoni pretvorijo v laktone in so posledično laktoni tudi glavni stranski produkti pri reakcijah ciklizacije. Neklasični mehanizem Baeyer-Villigerjeve oksidacije celo predvideva, da se laktoni tvorijo preko 1,2,4,5-tetraoksanov (Shema 4.1).

Čeprav so bile narejene obsežne raziskave na področju reakcij karbonilnih spojin z vodikovim peroksidom, pa ostajata kontrola poteka reakcije in tvorba želenih produktov nepopolno pojasnjeni. Pri reakciji se velikokrat tvorijo različni peroksidni produkti, ki pa jih je pogosto težko identificirati in/ali izolirati zaradi nestabilnosti ali podobnosti z drugimi peroksidnimi produkti. Kompleksnost reakcije se še poveča, ko se $H_2O_2$ dodatno aktivira s kislino ali kovinskim katalizatorjem, kar povzroči dodatno dimerizacijo, ciklizacijo in peroksidacijo (Shema 4.1). Ena od najzanimivejših peroksidnih spojin so hidroperoksi alkoholi (HPA), ki so ekvivalentni Crigree-jevim intermediatom v Baeyer-Villigerjevi oksidaciji [165,166].

Prvi je o tvorbi HPA poročal Rieche leta 1931, in sicer po ozonolizi heptanala [167]. Pri reakcijah alifatskih aldehidov s $H_2O_2$ se pogosto tvorijo HPA, ketoni pa reagirajo s $H_2O_2$ v *gem*-dihidroperokside [168-173]. V zadnjih letih so HPA pridobili povečano pozornost, saj so jih uporabili kot reagent v primerih številnih reakcij, kot na primer sulfoksidacija [174], alkoksikarbonilacija preko Miniscijeve reakcije [175], funkcionalizacija olefinov [176], radikalska premestitev Beckmannovega tipa [177]. Kljub temu so HPA zelo izmuzljivi in so jih zato dodajali v reakcijo v obliki zmesi s ketonom, saj je bila izolacija nemogoča zaradi njihove nestabilnosti. Izjeme so β-substituirani HPA s trifluorometilno ali halogensko substituento. Edini izoliran in popolnoma okarakteriziran HPA je 2-bromo-1-peroksiciklohekSanol, ki je stabiliziran z bromovim atomom na β poziciji [174]. Najnovejše metode za kemijsko sintezo HPA zajemajo kislinsko katalizirano ali nekatalizirano adicijo $H_2O_2$ na karbonilno skupino v topilu ali pogojih brez topila [174,175,177-179].

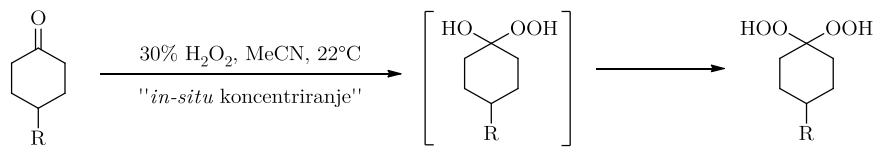



Shema 4.1: Predlagan potek pretvorb cikloheksanona z vodikovim peroksidom.

Odkrili smo, da je vodno raztopino vodikovega peroksida za reakcijo peroksidacije mogoče aktivirati z azeotropno destilacijo vode iz reakcijske zmesi [180]. Ketone je torej mogoče učinkovito pretvoriti v ustrezne *gem*-dihidroperokside, ta reakcija pa poteče v nevtralnem mediju zaradi odsotnosti kisline in kovinskega katalizatorja. Posledično je mogoče izolirati nestabilne DHP (npr. 1,1,4,4-tetrahidroperoksicikloheksan), česar druge metode ne omogočajo. Poleg tega smo opazili tudi manj stranskih peroksidnih produktov ali produktov Baeyer-Villigerjeve oksidacije. Vse to omogoča podrobnejši vpogled v reakcijo med vodikovim peroksidom in ketoni. Naše delo se je najprej usmerilo v raziskovanje vloge HPA v pretvorbi ketonov v DHP, potem pa smo različne HPA izolirali in okarakterizirali.

### 4.1.1 Identifikacija in karakterizacija α-hidroperoksialkoholov

α-Hidroperoksialkohol naj bi bil prvi produkt, ki nastane pri peroksidaciji ketonov in se potem pretvori naprej v DHP. Zaradi nestabilnosti HPA in pomanjkanja literaturnih podatkov za njihovo izolacijo bi bila za opazovanje teh pretvorb primerna *in-situ* ATR-IR metoda spremljanja reakcije. Med sintezo DHP iz ketonov in vodne raztopine $H_2O_2$ z azeotropno desitilacijo vode iz reakcijske zmesi smo v nekaterih primerih opazili vmesni peroksidni produkt, za katerega smo na podlagi NMR spektra predvidevali, da je α-hidroperoksialkohol (HPA, Shema 4.2). Ta intermediat smo poskušali identificirati s spremljanjem reakcije z *»in-situ«* ATR-IR sondo, saj smo želeli pokazati, da se keton najprej peroksidira v neidentificiran peroksidni produkt, predvidoma HPA, ki se potem pretvori v DHP.




**1a**, R=Me
**1b**, R=COOEt

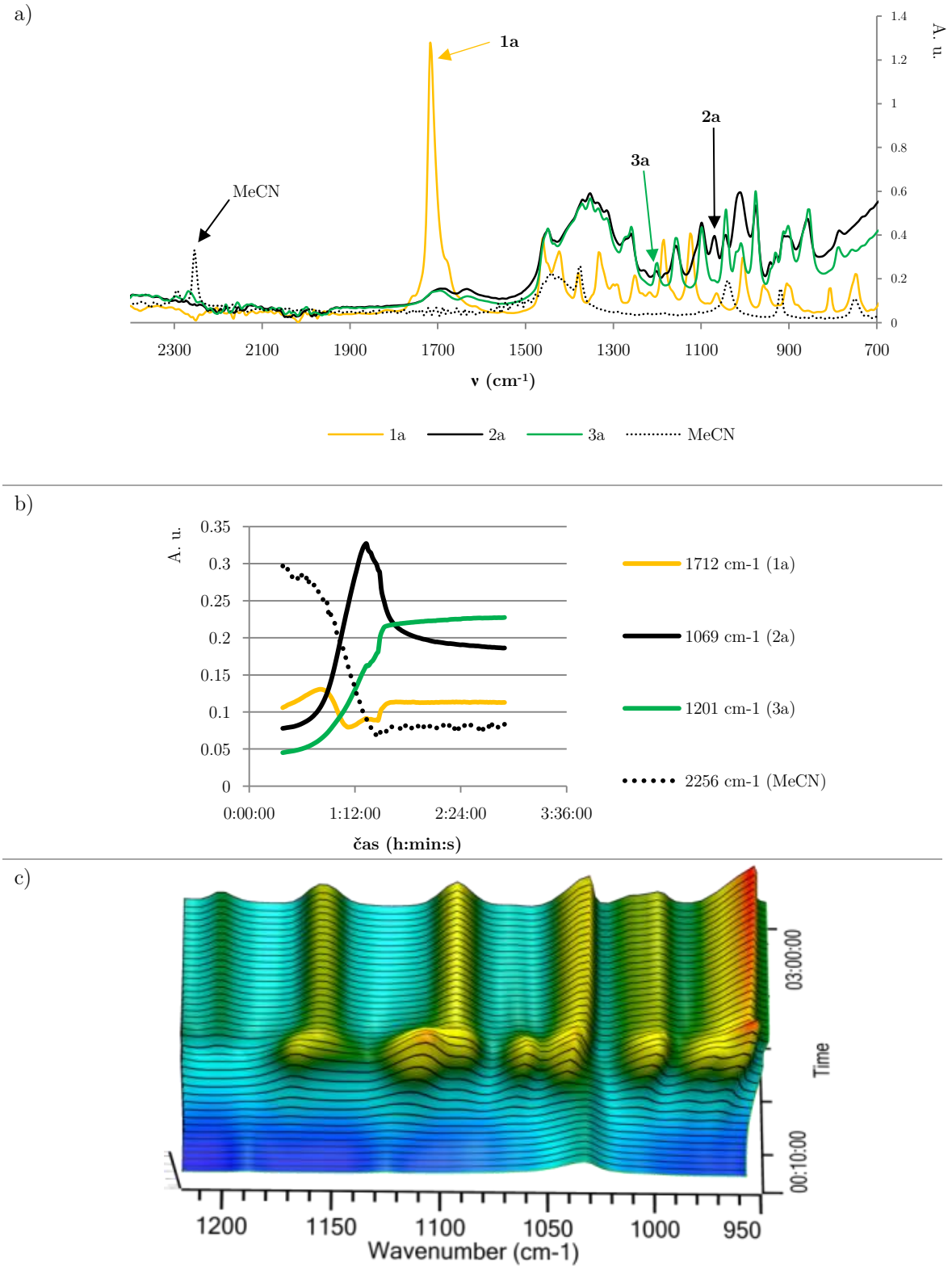
**2a**, R=Me
**2b**, R=COOEt

**3a**, R=Me
**3b**, R=COOEt

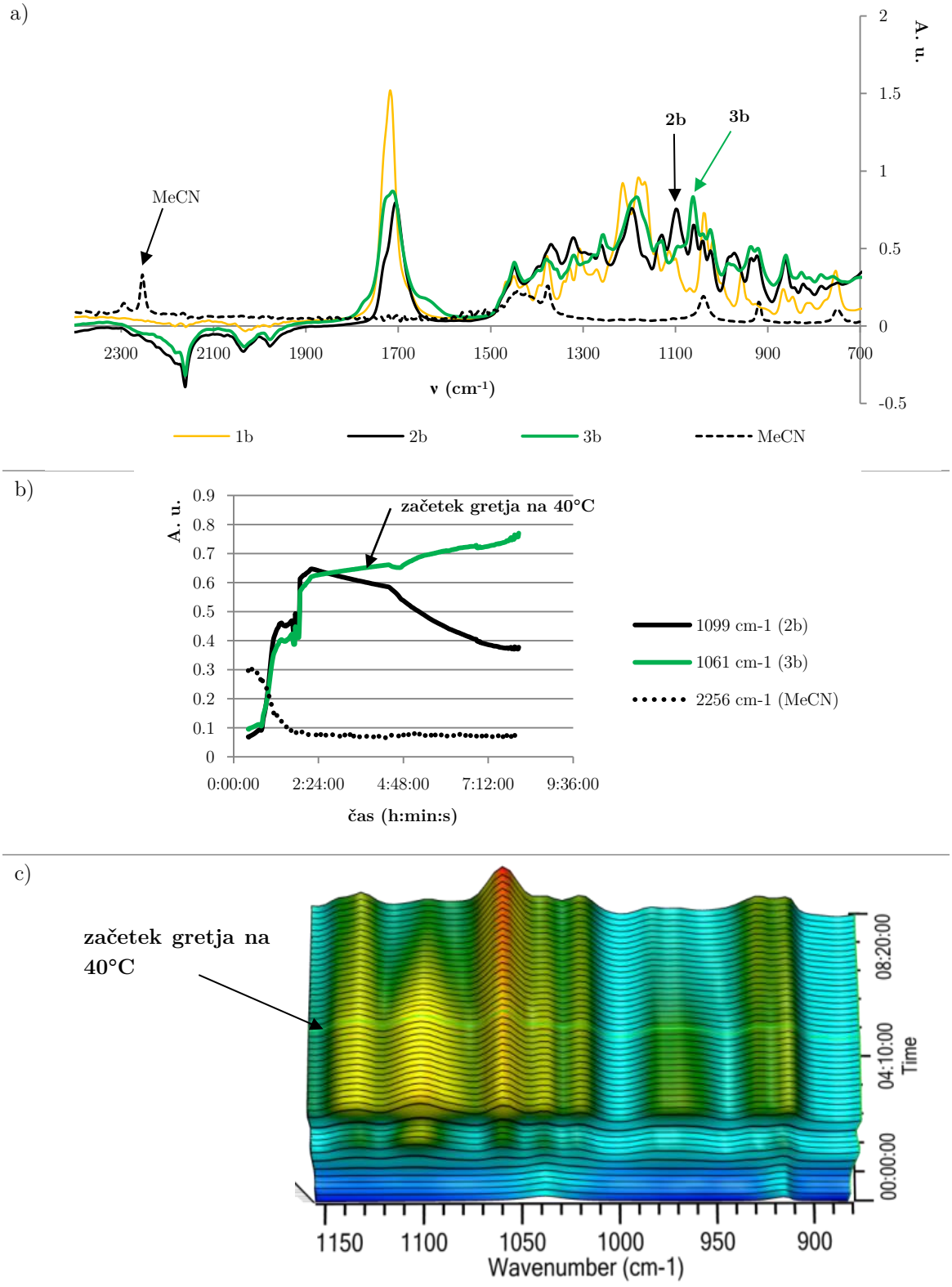
Shema 4.2: Pretvorba ketona v DHP preko HPA.

4-Metilcikloheksanon **1a** smo raztopili v MeCN, dodali 4 ekv. $H_2O_2$ in mešali reakcijo na 25 °C, medtem ko smo znižali pritisk in odparevali topilo. Na začetku so vsi signali narasli zaradi odparevanja MeCN in posledičnega koncentriranja reakcijske zmesi (Slika 4.1b). Takoj ko je bila koncentracija dovolj visoka in ko je bila voda odstranjena iz reakcijske zmesi, se je keton **1a** začel postopno pretvarjati v končni produkt *gem*-dihidroperoksid. Ob podrobni analizi smo med potekom reakcije opazili, da so se pred nastankom DHP 3a pojavljali signali, ki so hkrati izginili v nekaj minutah, kar je kazalo na nastanek vmesnega produkta (Slika 4.1c). Slika 4.1a prikazuje IR spektre MeCN, izhodnega ketona **1a**, izoliranega produkta DHP **3a** (karakteristični signali na 976 $cm^{-1}$, 1043 $cm^{-1}$, 1156 $cm^{-1}$ in 1201 $cm^{-1}$) in vmesnega produkta 4-metil-1-peroksicikloheksanola **2a**, ki smo ga pripravili po postopku opisanem v Tabeli 4.3 (karakteristični signali v IR spektru na 1010 $cm^{-1}$, 1069 $cm^{-1}$, 1116 $cm^{-1}$ and 1182 $cm^{-1}$). Časovna odvisnost intenzitete karakterističnih signalov za posamezno komponento reakcijske zmesi na Sliki 4.1b prikazuje, da je najprej nastal HPA **2a.** DHP **3a** se je začel tvoriti s časovnim zamikom, ko so začneli signali vmesnega produkta HPA **2a** že postopno izgubljati intenziteto. Podobno lahko opazimo tudi na Sliki 4.1c, kjer je potek reakcije prikazan s 3D IR spektrom.

Nato smo z ATR-IR sondo opazovali tudi pretvorbo manj reaktivnega ketona, pri katerem bi bila postopna pretvorba v DHP preko HPA še bolj očitna. Izbrali smo etil 4-oksocikloheksancaboksilat **1b** in reakcijo opravili po identičnem eksperimentalnem postopku kot pri **1a**. Ugotovili smo, da se je po odparevanju tvoril HPA **2b**, ki se je pri 25 °C zelo počasi pretvarjal naprej v DHP **3b** (Slika 4.2b). Slika 4.2a prikazuje IR spektre MeCN, izhodnega ketona **1b**, izoliranega produkta DHP **3b** (karakteristični signali na 1061 $cm^{-1}$ in 938 $cm^{-1}$) in vmesnega HPA **2b**, ki smo ga pripravili po postopku opisanem v Tabeli 4.3 (karakterističen signali v IR spektru na 986 $cm^{-1}$ in 1099 $cm^{-1}$). Časovna odvisnost intenzitete karakterističnih signalov za posamezno komponento reakcijske zmesi na Sliki 4.2b prikazuje, da je najprej nastal HPA **2b**, ki se je pri 25 °C zelo počasi pretvarjal naprej v DHP **3b**. Hitra konverzija v DHP **3b** se je zgodila šele, ko smo povišali temperaturo na 40 °C. Signali na 986 $cm^{-1}$ in 1099 $cm^{-1}$ (Slika 4.2), ki pripadajo HPA **2b**, so se začeli postopno nižati. Hkrati je nastajal DHP **3b**, zato se je povečevala intenziteta ostalih signalov, od katerih sta bila najintenzivnejša signala na 1061 $cm^{-1}$ in 938 $cm^{-1}$ (Slika 4.2). Podobno lahko opazimo tudi na Sliki 4.2c, kjer je potek reakcije prikazan s 3D IR spektrom.

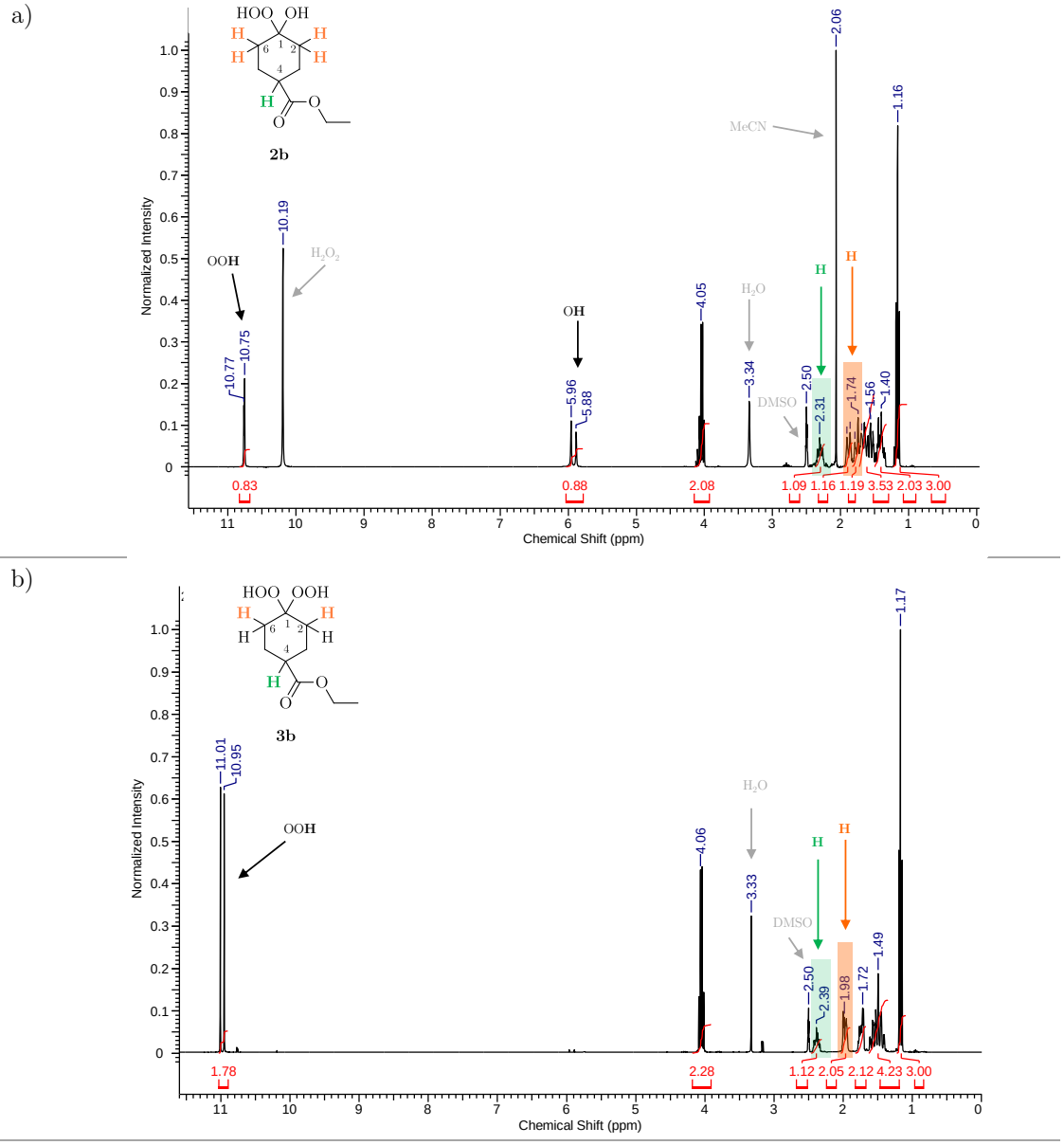



Slika 4.1: Sledenje peroksidacije **1a** s $H_2O_2$ z *»in-situ«* IR spektroskopijo. a) IR spekter ketona **1a**, HPA **2a**, DHP **3a** in MeCN. b) Časovni potek spreminjanja intenzitet karakterističnih signalov v IR spektru za posamezno komponento reakcijske zmesi. c) 3D IR spekter peroksidacije **1a** v HPA **2a** in DHP **3a**.



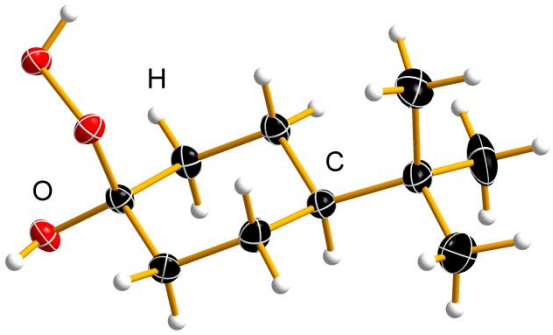

Slika 4.2: Sledenje peroksidacije **1b** s $H_2O_2$ z *»in-situ«* IR spektroskopijo. a) IR spekter ketona **1b**, HPA **2b**, DHP **3b** in MeCN. b) Časovni potek spreminjanja intenzitet karakterističnih signalov v IR spektru za posamezno komponento reakcijske zmesi. c) 3D IR spekter peroksidacije **1b** v HPA **2b** in DHP **3b** po povišanju temperature na 40 °C.

Glede na to, da se je **1b** pretvoril v HPA **2b**, ki se je pri 25 °C zelo počasi pretvarjal v DHP **3b**, smo poskušali izolirati HPA **2b**. Po odparevanju smo vzeli vorec iz reakcijske zmesi, ga raztopili v DMSO-d6 in ga analizirali z NMR. Analiza je razkrila, da je prišlo do konverzije karbonilnega C-atoma v $sp^3$ hibridiziran C-atom s podobno strukturo, kot jo ima DHP **3b**. Očitno razliko smo opazili na protonu, vezanem na C-4 atom (Slika 4.3) s signalom na 2,26-2,33 ppm (signal tega protona pri DHP je na 2,34-2,44 ppm), in protonih, vezanih na C-2 oz. C-6 atom s signali na 1,73-1,82 in 1,84-1,93 ppm (DHP ima le en signal na 1,93-2,02). Opazili smo tudi dva signala za OOH (10,75 ppm in 10,77 ppm) in dva signala za OH (5,88 ppm in 5,96 ppm). V $^{13}$C NMR spektru je signal od C-1 atoma nižje (100,0 in 100,5 ppm) kot pri DHP (107,2 ppm). Na podlagi dveh signalov za OOH in OH v $^1$H NMR spektru in dveh signalov za C-1 atom v $^{13}$C NMR spektru lahko sklepamo, da sta se tvorila dva izomera HPA **2b**.

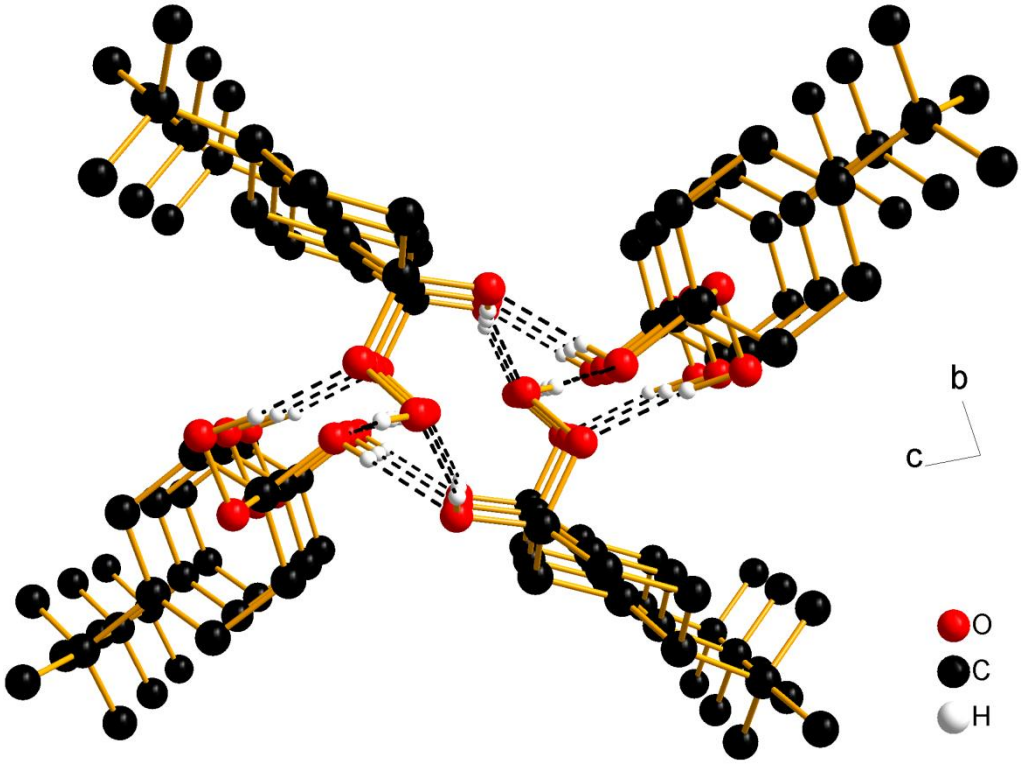



Slika 4.3: $^1$H NMR spekter HPA **2b** (a) in DHP **3b** (b) z označenimi signali protonov na enakem položaju, ki imajo drugačen kemijski premik v NMR spektru.

HPA **2b** smo poskusili izolirati, vendar ga nismo uspeli ločiti od ostalih komponent reakcijske zmesi, ker je bil oljnat in je razpadel v izhodni keton, ko smo ga poskušali ločiti od $H_2O_2$ z dvofazno ekstrakcijo. Literaturni podatki o karakterizaciji HPA si nasprotujejo zaradi nestabilnosti teh spojin in možnosti razpada v izhodne spojine celo med samo analizo. Zaradi težav s stabilnostjo smo kot substrat izbrali 4-*terc*-butilcikloheksanon **1c**, saj smo predvidevali, da bi bil ustrezen HPA **2c** lahko trden, kar bi nam omogočalo kristalizacijo in določitev njegove strukture z rentgensko analizo. Z namenom selektivne tvorbe **2c** smo raztopili 1 mmol ketona **1c** in 1,2 ekv. 30 % $H_2O_2$ v 10 ml MeCN in skoncentrirali pod znižanim pritiskom. Po 20 min smo dodali še 10 ml MeCN in ponovno skoncentrirali reakcijsko zmes. Nastal je trden produkt reakcije, ki smo ga sprali s heksanom, da smo odstranili nezreagiran keton **1c**. Trden produkt (142 mg) smo analizirali z NMR spektroskopijo in ponovno smo opazili enake značilnosti kot pri HPA **2b**. Karbonilni C-atom se je pretvoril v $sp^3$ hibridiziran C-atom, ki je imel v $^{13}C$ NMR spektru signal na 100 ppm, kar je občutno nižje kot DHP (107.7 ppm). V $^1H$ NMR spektru so imeli protoni na C-2 atomu dva signala na 1,48-1,54 ppm in 1,96-2,00 ppm (DHP ima le enega na 2,05-2,14 ppm), videli smo tudi dva singleta na 5,82 ppm (OH) in 10,63 ppm (OOH). NMR analiza je torej potrdila, da smo sintetizirali le eno izomero trdnega HPA **2c**. Monokristale produkta smo pripravili z difuzijo par heksana v raztopino spojine **2c** v etil acetatu pri -20 °C. Dobljene kristale smo analizirali z rentgensko difrakcijo, ki je potrdila strukturo HPA **2c** (Slika 4.4). Molekule so se v kristalni strukturi med seboj povezovale z O–H···O vodikovimi vezmi v stebre vzdolž kristalografske osi *a* (Slika 4.5).




Slika 4.4: Prikaz ene izmed dveh molekul HPA **2c**, ki sestavljata asimetrično enoto kristalne strukture HPA **2c**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): O−O 1.464(1); C−O(OH) 1.442(2); C−O(H) 1.405(2).



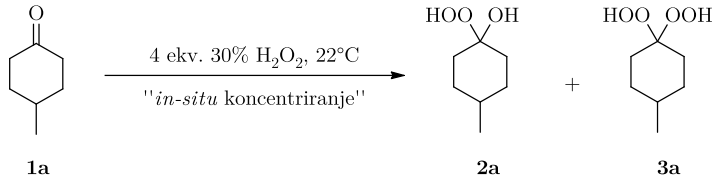

Slika 4.5: Prikaz pakiranja molekul HPA **2c,** ki se v kristalni strukturi med seboj povezujejo z O–H···O vodikovimi vezmi v stebre. Vodikovi atomi, vezani na ogljikove atome, zaradi preglednosti niso izrisani.

### 4.1.2 Vpliv topila na tvorbo HPA

Našo študijo peroksidacije ketonov smo nadaljevali s preučevanjem vloge topila, ki bi na nastanek HPA lahko vplivalo s svojo polarnostjo in tvorbo azeotropa z vodo. Znano je, da je reakcije mogoče pospešiti s koncentriranjem topila zaradi boljše interakcije med molekulami reaktantov [181] in topilo lahko pri tem vpliva na reaktivnost [180]. Za modelni substrat smo izbrali 4-metilcikloheksanon **1a**, ker je oljnat in zato po odparevanju topila iz reakcijske zmesi nastane homogena zmes.

Keton **1a** in 4 ekv. 30 % vodne raztopine $H_2O_2$ smo raztopili v 10 ml topila, skoncentrirali pod znižanim pritiskom in še enkrat ponovili dodatek topila in koncentriranje. Konverzijo v peroksidna produkta **2a** in **3a** smo določili po koncu koncentriranja reakcijske zmesi (45 min). Nato smo reakcijsko zmes pustili 24 h na 22 °C in še enkrat analizirali pretvorbo z NMR spektroskopijo (Tabela 4.1). Po 45 min je konverzija ketona **1a** približno sovpadala s količino vode v azeotropu z različnimi topili. Tako je bila reaktivnost v MeOH manjša, čeprav so bile razlike majhne (80–93 % konverzija). Bolj izrazita razlika je bila v selektivnosti tvorbe obeh peroksidnih produktov **2a** in **3a**. Pri reakciji v polarnem protičnem topilu MeCN je nastalo 82 % DHP **3a**, v manj polarnih topilih se je tvorilo več HPA **2a**, polarna protična (MeOH, EtOH) pa so bila še manj reaktivna kot nepolarna topila (heksan, toluen). Poseben primer je bil dimetoksietan (DME), saj se je po 45 min tvoril le HPA **2a** (89 %). Po 24 h je bil vpliv topila manj pomemben, saj je v vseh topilih prišlo do 87–100 % konverzije ketona **1a** in HPA **2a** v DHP **3a**.

Tabela 4.1: Vpliv topila na peroksidacijo ketona **1a**.




**1a** **2a** **3a**

| **topilo**[a] | **čas** | **Distribucija produktov v reakcijski zmesi**[b] **(%)** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **1a** | **2a** | **3a** |
| MeOH (0) | 45 min | 20 | 55 | 25 |
| | 24 h | / | / | 100 |
| EtOH (4) | 45 min | 15 | 61 | 24 |
| | 24 h | 7 | 5 | 88 |
| EtOAc (8,5) | 45 min | 12 | 23 | 65 |
| | 24 h | 5 | / | 95 |
| MeCN (15,2) | 45 min | 7 | 11 | 82 |
| | 24 h | 6 | / | 94 |
| DME (10) | 45 min | 11 | 89 | / |
| | 24 h | 7 | / | 93 |
| DKM (1) | 45 min | 16 | 49 | 35 |
| | 24 h | 5 | 5 | 90 |
| $Et_2O$ (1,3) | 45 min | 12 | 30 | 59 |
| | 24 h | 7 | 5 | 87 |
| heksan (5,6) | 45 min | 11 | 36 | 53 |
| | 24 h | 10 | / | 90 |
| toluen (19) | 45 min | 15 | 55 | 30 |
| | 24 h | 7 | 6 | 87 |

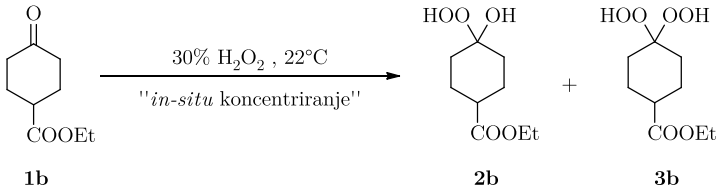
[a] V oklepaju je navedena količina vode v azeotropu v plinski fazi [182-184]. [b] Distribucijo produktov smo določili na podlagi $^1$H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

### 4.1.3 Vpliv količine dodanega $H_2O_2$ na tvorbo HPA

Študijo smo nadaljevali z raziskovanjem vpliva količine dodanega $H_2O_2$ v reakcijo na tvorbo HPA in njegovo nadaljnjo pretvorbo v DHP (Tabela 4.2). Peroksidacijo ketona smo opazovali na primeru manj reaktivnega ketona **1b**, ko je reagiral z 1, 2 ali 4 ekv. $H_2O_2$. Reakcijske zmesi smo analizirali po 45 minutah, 24 urah in 7 dneh.

V skladu s pričakovanji po ATR-IR eksperimentu (Slika 4.2c) je iz ketona **1b** po odparevanju nastal HPA **2b**, njegova nadaljnja pretvorba v DHP **3b** pa je bila odvisna od količine dodanega $H_2O_2$ in dolžine reakcije. Ko smo uporabili le 1 ekv. $H_2O_2$, se je po odparevanju keton **1b** večinsko pretvoril v HPA **2b**. V zmesi s $H_2O_2$ in ketonom **1b** je bil stabilen 7 dni, po 7 dneh je bila pretvorba ketona **1b** v HPA **2b** 86 % (Tabela 4.2). Ko smo uporabili 2 ekv. $H_2O_2$, se je s podaljšanjem časa že začelo tvoriti malo DHP **3b** (10 % po 7 dneh, Tabela 4.2). Presežek 4 ekv. $H_2O_2$ je pripeljal do popolne pretvorbe ketona **1b** v DHP **3b**, vendar šele po 7 dneh (6 % konverzija v DHP **3b** po 45 min, 81 % po 24 h, Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Vpliv količine dodanega $H_2O_2$ na peroksidacijo ketona **1b.**




**1b** **2b** **3b**

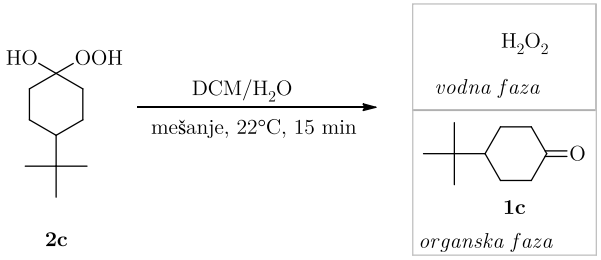
| **ekv. $H_2O_2$** | **čas** | **Distribucija produktov v reakcijski zmesi[a] (%)** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **1b** | **2b** | **3b** |
| 1[b] | 45 min | 23 | 77 | 0 |
| | 24 h | 20 | 80 | 0 |
| | 7 dni | 14 | 86 | 0 |
| 2[b] | 45 min | 18 | 82 | 0 |
| | 24 h | 5 | 93 | 2 |
| | 7 dni | 17 | 73 | 10 |
| 4[b] | 45 min | 9 | 85 | 6 |
| | 24 h | 4 | 15 | 81 |
| | 7 dni | 0 | 0 | 100 |

[a] Distribucijo produktov smo določili na podlagi $^1$H NMR spektra surove reakcijske zmesi. [b] Število ekv. $H_2O_2$ je podano relativno glede na količino dodanega ketona **1b**.

### 4.1.4 Stabilnost α-hidroperoksialkoholov na primeru HPA 2c

Potem ko smo potrdili strukturo HPA **2c**, smo želeli določiti še njegovo stabilnost. Že predhodno smo opazili, da je **2c** delno razpadel v NMR cevki, če smo uporabili kot topilo $CDCl_3$. Po drugi strani pa je bilo z uporabo DMSO-$d_6$ mogoče posneti dober spekter HPA **2c**, razpad HPA pa je močno upočasnil dodatek $H_2O_2$ v cevko. Izoliran HPA, ki je raztopljen v organskih topilih, je nagnjen k razpadu nazaj do ketona. V zmesi s $H_2O_2$ je ostal HPA nespremenjen več mesecev samo pri -20 °C, pri višjih temperaturah pa se je počasi pretvoril v ustrezen DHP.

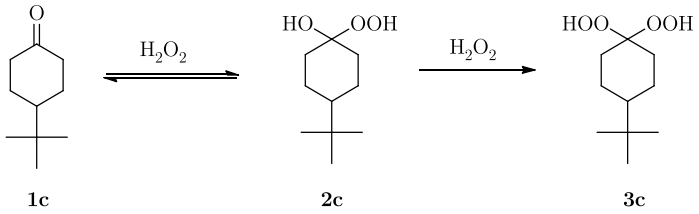
Opravili smo še dodatni eksperiment, v katerem smo potrdili nestabilnost HPA v organskih topilih. HPA **2c** smo raztopili v DKM in dodali vodo ter tako naredili dvofazen sistem. HPA **2c** je takoj razpadel v keton **1c**, ki je ostal v organski fazi, medtem ko se je $H_2O_2$ ekstrahiral v vodno fazo (Shema 4.3).




**2c**

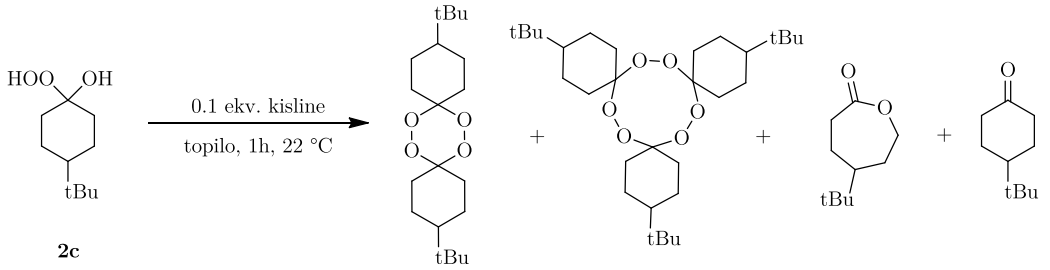
Shema 4.3: Razpad HPA **2c** v keton **1c** in $H_2O_2$ v dvofaznem sistemu (DKM in $H_2O$).

Pod enakimi pogoji je bil DHP **3c** stabilen daljši čas. Iz tega lahko sklepamo, da je samo prva adicija $H_2O_2$ na keton ravnotežna. V trenutku, ko pride do tvorbe DHP, pa je produkt stabilen in je pretvorba nazaj v HPA in $H_2O_2$ zelo počasna (Shema 4.4).




Shema 4.4: Pretvorba ketona v DHP preko intermediata HPA.

HPA so nestabilni tudi v bazičnih pogojih in po dodatku 0,1 ekv. amina ali NaOH razpadejo nazaj v izhodne ketone. Po drugi strani pa so v kislem bolj stabilni, vendar je to odvisno od dodane kisline. Enourni reakciji HPA **2c** v 1 M MeCN z 0,1 ekv. $HBF_4$ ali 0,1 ekv. $H_2SO_4$ so nastali večinoma ciklični peroksidi (86–89 %, Shema 4.5), med katerimi je bil delež HO **6c** 2-krat večji kot delež TO **5c**. Z zamenjavo topila v TFE (0,1 ekv. $HBF_4$, 1 h, 22 °C) smo vplivali na distribucijo cikličnih peroksidov in TO **5c** je postal večinski produkt (Shema 4.5). V nasprotju s $HBF_4$ in $H_2SO_4$ pa je po dodatku 0,1 ekv. HCl v raztopino HPA **2c** v MeCN prišlo do pretežnega razpada v izhodni keton **1c** (Shema 4.5).




| kislina | topilo | 5c | 6c | 7c | 1c |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_2SO_4$ | MeCN | 23 | 61 | 10 | 6 |
| $HBF_4$ | MeCN | 27 | 62 | 7 | 4 |
| $HBF_4$ | TFE | 58 | 5 | 31 | 6 |
| HCl | MeCN | 5 | 14 | / | 81 |

Shema 4.5: Stabilnost HPA **2c** v kislem.

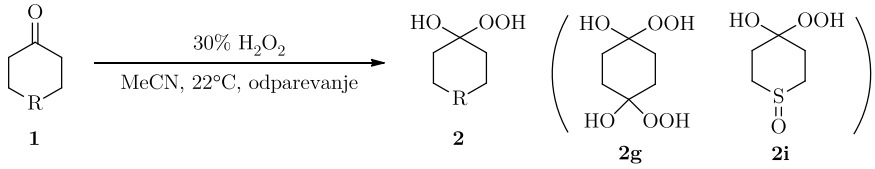
### 4.1.5 Sinteza strukturno različnih HPA

Po študiji reakcijskih pogojev smo se poglobili v reaktivnost $H_2O_2$ z različnimi karbonilnimi spojinami in stabilnost nastalih HPA. V primeru, ko je iz ketona ali aldehida nastal trden HPA, smo lahko z organskimi topili sprali preostanek nezreagirane karbonilne spojine in/ali $H_2O_2$ in tako izolirali čist HPA. Oljnati HPA so bili manj stabilni in zato smo lahko izolirali HPA le v zmesi s $H_2O_2$, za katerega smo ugotovili, da stabilizira HPA zaradi vpliva na ravnotežje. To je bilo še posebej izrazito pri manj reaktivnih ketonih, ko je bila nadaljnja konverzija v DHP zelo počasna. Ne glede na to, ali so bili HPA izolirani sami ali v zmesi z $H_2O_2$, smo v $^1$H NMR spektru opazili karakteristične signale za OH (cca 5 ppm) in za OOH (cca 10 ppm). V $^{13}$C NMR spektru

so bili signali za C-atom ob peroksidni vezi na cca 100 ppm, kar je bilo občutno nižje kot pri ostalih peroksidnih produktih (DHP, ciklični peroksidi, dimeri), ki imajo signale med 107 ppm in 112 ppm.

Cikloheksanonski derivati **1a-1i** so med azeotropno destilacijo vode iz reakcijske zmesi z MeCN reagirali s $H_2O_2$ in nastali so HPA **2a-2i**. Stopnjo konverzije je določala struktura izhodnega ketona in pri večini ketonov je za dobro konverzijo zadostoval že dodatek 1,2-2 ekv. $H_2O_2$ (Tabela 4.3). Pri manj reaktivnih ketonih **1e** in **1i** pa je bilo za dobro konverzijo potrebno dodati 4-kratni presežek $H_2O_2$. Nadaljnja konverzija teh HPA v DHP je bila počasna, zato smo kljub presežku $H_2O_2$ izolirali HPA **2e** in **2i**. Pri ostalih ketonih je postopek izolacije temeljil na fizikalnih lastnostih HPA. Ko so se tvorili trdni produkti (**2c**, **2d**, **2g**, **2i**), smo presežni $H_2O_2$ sprali s polarnim topilom (MeCN ali DKM/EtOAc (8/2)), zaradi česar je bil izkoristek nižji. Oljnati HPA (**2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2h**, **2j**) so med izolacijo začeli razpadati, zato smo v reakcijski zmesi morali pustiti $H_2O_2$, ki je stabiliziral nastali produkt. Poseben primer je bil hlapen ciklopentanon **1j**, saj smo morali z azeotropno destilacijo vnaprej pripraviti 100 % $H_2O_2$ in šele potem dodati keton **1j** ter potem mešati 45 min. S pomočjo $^1$H NMR spektroskopije smo v reakcijski zmesi določili 20 % konverzijo ketona **1j** v HPA **2j**. Strukture HPA smo dodatno potrdili z njihovo pretvorbo v DHP z dodatkom acetonitrila in $H_2O_2$ ter koncentriranjem reakcijske zmesi.

Tabela 4.3: Peroksidacija cikloheksanonskih derivatov z vodno raztopino $H_2O_2$ z azeotropno destilacijo vode iz raztopine v MeCN.[a]



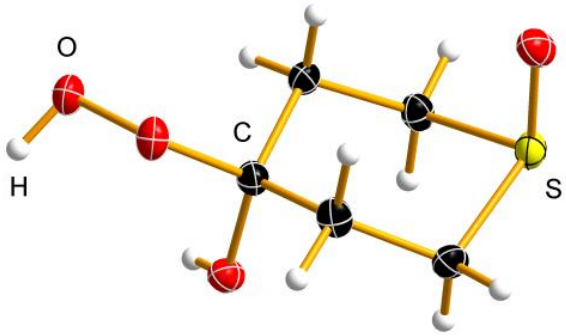

**1** **2** **2g** **2i**

| Keton (1) | R | ekv $H_2O_2$ | Konverzija 1[b] (%) | Izkoristek 2[c] (%) |
|---|---|---|---|---|
| **1a** | CHMe | 1,2 | 93 | /[g] |
| **1b** | CHCOOEt | 2 | 78 | /[g] |
| **1c** | CH*t*Bu | 1,2 | 86 | 76 |
| | | 4 | 100 | /[g] |
| **1d** | CHPh | 1,2 | 91 | 38 |
| | | 4 | 100 | /[g] |
| **1e** | CHNHAc | 4 | 100 | /[g] |
| **1f** | $CH_2$ | 1,5 | 89 | /[g] |
| **1g**[d] | C=O | 2 | /[h] | 90 |
| **1h** | O | 2 | 100 | /[g] |
| **1i**[e] | S | 4 | 100 | 71 |
| **1j**[f] | / | 1,2 | 20 | /[g] |

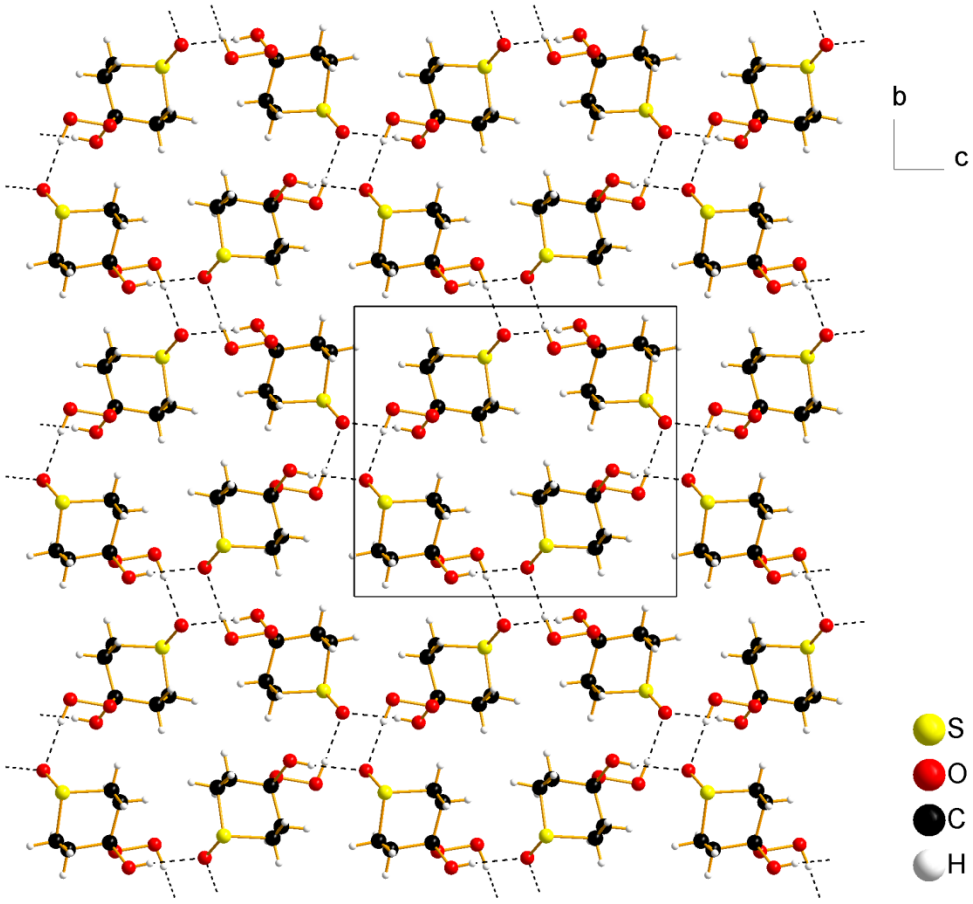
[a]1 mmol ketona in ustrezno količino vodne raztopine 30 % $H_2O_2$ v 10 ml MeCN smo skoncentrirali pod znižanim tlakom ter ponovno dodali 10 ml MeCN in skoncentrirali. [b]Konverzijo ketona **1** v HPA **2** smo določili na podlagi $^1$H NMR analize surove reakcijske zmesi. [c]Izkoristek HPA **2** smo določili po spiranju reakcijske zmesi z organskimi topili, s katerimi smo odstranili nezreagiran keton in $H_2O_2$. [d]Po koncentriranju reakcijske zmesi v MeCN smo dodali 1 ml MeCN in po 12-urnem mešanju na 22 °C smo suspenzijo filtrirali in sprali z MeCN ter tako izolirali HPA **2g**, v katerem sta se obe karbonilni skupini pretvorili v HPA. [e]Žveplov atom se je med reakcijo oksidiral in izolirali smo sulfoksidiran HPA **2i**. [f] Zaradi hlapnosti ketona smo z azeotropno destilacijo vnaprej pripravili 100 % $H_2O_2$ in šele potem dodali keton **1j**. [g] Reakcijska zmes je bila oljnata in zato HPA nismo uspeli ločiti od $H_2O_2$. [h] Konverzije ketona **1g** v HPA nismo moglii

določiti, saj se je produkt oboril iz acetonitrila.

Zanimiv primer je bila peroksidacija ketona **1i**, ki je imel v obroču tudi žveplov atom, saj lahko $H_2O_2$ reagira tako s karbonilno skupino kot tudi z žveplom. Ko smo 1 mmol ketona **1i** in 1 ekv. 30 % vodne raztopine $H_2O_2$ v 10 ml MeCN skoncentrirali pod znižanim tlakom, po 20 min dodali še 10 ml MeCN in ponovno skoncentrirali, smo dobili kompleksno zmes peroksidnih produktov in izhodnega ketona. V primeru dodatka 2 ekv. $H_2O_2$ sta po drugem odparevanju v reakcijski zmesi nastali dve izomeri enega peroksidnega produkta. Ko smo uporabili 4 ekv. $H_2O_2$, se je že po prvem odparevanju tvoril enak produkt **2i** z razmerjem izomer 64:36. Oborino smo sprali z MeCN in izolirali kristale, za katere je NMR analiza pokazala, da gre za le eno izomero nastalega HPA **2i**. Potem smo kristale analizirali z rentgensko difrakcijo (Slika 4.6). Ugotovili smo, da je poleg adicije ene molekule $H_2O_2$ na karbonilno skupino prišlo tudi do sulfoksidacije žveplovega atoma. Molekule so se povezovale med seboj z O–H···O=S vodikovimi vezmi v centrosimetrične obroče, sestavljene iz štirih molekul, in tvorijo plasti (Slika 4.7). Če smo reakcijsko zmes, ki je nastala po prvem odparevanju pri reakciji ketona **1i** z 4 ekv. $H_2O_2$, pustili reagirati še 24 ur po odparevanju, sta se obe izomeri HPA **2i** začeli pretvarjati v drug produkt, ki ga zaradi netopnosti tako v polarnih kot nepolarnih topilih nismo mogli identificirati.

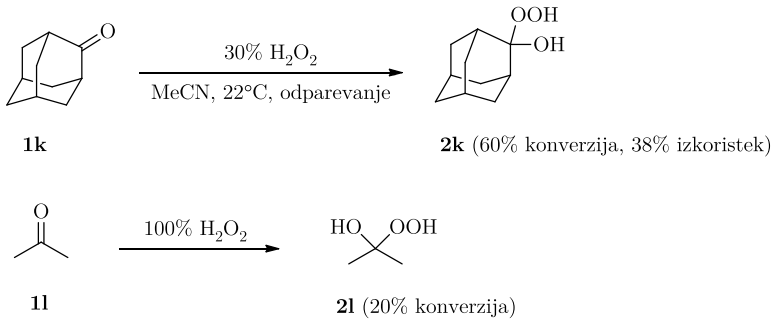



Slika 4.6: Prikaz asimetrične enote kristalne strukture spojine HPA **2i**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): S−O 1.524(1), O−O 1.471(1), C−O(OH) 1.438(2), C−O(H) 1.394(2).



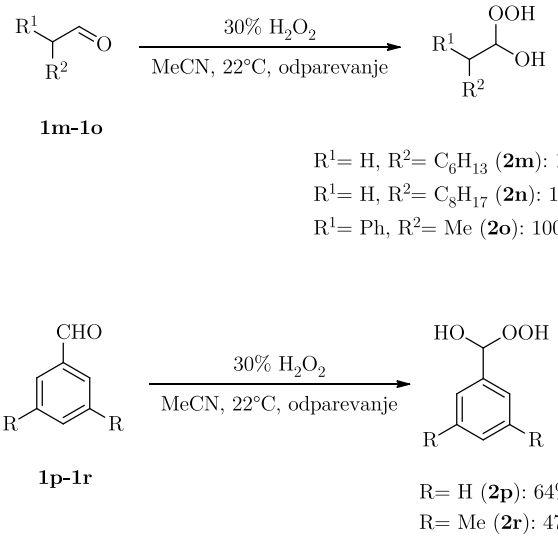

Slika 4.7: Prikaz osnovne celice in pakiranja molekul v kristalni strukturi HPA **2i**, v kateri se molekule med seboj povezujejo z intermolekulskimi vodikovimi vezmi in tvorijo plasti.

Peroksidacije večjih cikličnih ketonov, npr. ciklodekanona in ciklododekanona, ni bilo mogoče ustaviti po prvi adiciji $H_2O_2$ na karbonilno spojino, zato smo lahko izolirali le DHP. Adamantan-2-on **1k** je tvoril trden HPA **2k** (Shema 4.6), čigar strukturo smo potrdili z elementno analizo. Med alifatskimi ketoni smo uspeli aceton **1l** delno pretvoriti s predpripravljenim 100 % $H_2O_2$ v HPA **2l**, vendar je bila konverzija le 20 % (Shema 4.6). Tako kot pri peroksidaciji daljših cikličnih ketonov tudi pri daljših alifatskih ketonih (npr. 2-nonanon, 5-nonanon) nismo uspeli izolirati ustreznih HPA, ampak le DHP.




Shema 4.6: Peroksidacija adamantan-2-ona **1k** and acetona **1l**.

Na koncu smo preverili še možnost sinteze HPA iz aldehidov. Za pretvorbo alifatskih aldehidov, oktanala **1m** in dekanala **1n**, smo za kvantitativno pretvorbo v ustrezna HPA **2m** in **2n** potrebovali 4 ekv. $H_2O_2$ (Shema 4.7). HPA **2n** je bil po reakciji v trdnem agregatnem stanju, zato smo lahko preostanek $H_2O_2$ sprali z organskimi topili in izolirali 22 % HPA **2n** Vzrok za nizek izkoristek HPA **2n** kljub dobri konverziji je bilo odstranjevanje $H_2O_2$ s spiranjem s polarnim topilom, s čimer smo v organsko fazo delno sprali tudi HPA **2n**. Benzil aldehid **1o** je bil bolj reaktiven, zato smo za kvantitativno pretvorbo v HPA **2o** potrebovali le 1,2 ekv. $H_2O_2$. Z enako količino $H_2O_2$ sta benzaldehida **1p** in **1r** reagirala v ustrezne HPA **2p** in **2r** s 64 % oz. 47 % konverzijo (Shema 4.7).



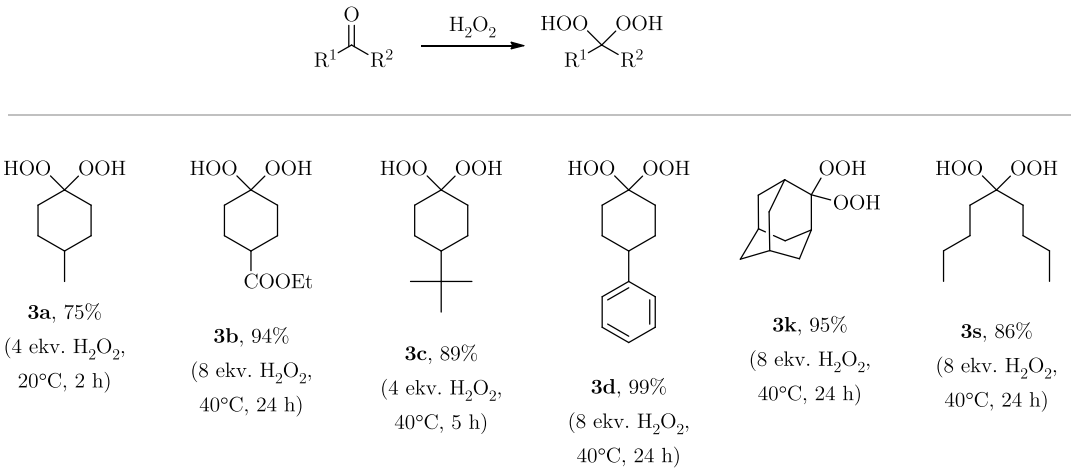

Shema 4.7: Peroksidacija aldehidov **1m-1r** v ustrezni HPA **2m-2r** s podanimi konverzijami.

### 4.1.6 Sinteza *gem*-dihidroperoksidov za nadaljnjo sintezo TO

*Gem*-dihidroperoksidi so intermediati v sintezi nesimetričnih tetraoksanov, ki niso komercialno dostopni, zato jih je potrebno predhodno sintetizirati. Za sintezo DHP so bile razvite številne metode [138,139]. Klasični pristop je zajemal ozonolizo ketalov, alkenov ali enol etrov v prisotnosti etrske raztopine $H_2O_2$. Izkoristki so bili ponavadi nizki zaradi slabe selektivnosti in tvorbe številnih peroksidnih spojin. Boljša bi bila direktna peroksidacija karbonilnih spojin s $H_2O_2$, vendar je reakcija prav tako neselektivna in produkt v primeru peroksidacije cikloheksanona so poimenovali kar kompleks med cikloheksanonom in vodikovim peroksidom [185]. Metoda za povečanje selektivnosti pri sintezi DHP je bila uporaba kataliziranih procesov s kislinami [169,186-188], kovinskimi kompleksi [147,189,190], jodom [148,168] in fluoriranimi alkoholi [103,141,144]. Tvorba DHP je mogoča tudi fotokemično s kisikom [171,172]. Leta 2010 je Itoh s sodelavci objavil prvo nekatalizirano sintezo DHP z uporabo 5 ekv. 35 % vodne raztopine $H_2O_2$ v dimetoksietanu (DME) [191]. V okviru diplomske naloge [192] smo podrobno raziskali reakcijo nekatalizirane peroksidacije ketonov in ugotovili, da poteče reakcija med ketonom in $H_2O_2$ med koncentriranjem reakcijske zmesi. To metodo smo tudi uporabili za sintezo DHP, ki smo jih uporabili kot izhodne spojine za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov.

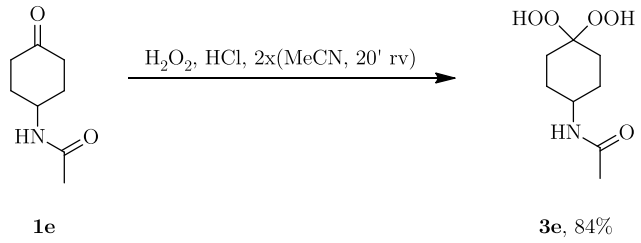
Sinteza DHP z metodo *»in-situ«* koncentriranja reakcijske zmesi je potekala tako, da smo keton in ustrezno količino 30 % vodne raztopine $H_2O_2$ raztopili v MeCN. Raztopino smo koncentrirali pod znižanim tlakom 20 min, potem smo ponovno dodali MeCN in spet

koncentrirali pod znižanim tlakom 20 min. Reakcijsko zmes smo pustili reagirati pri 20 °C ali 40 °C. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo. Na stopnjo pretvorbe ketona v DHP vpliva količina $H_2O_2$, čas in temperatura reakcije, zato smo pogoje sinteze posameznega DHP prilagajali glede na reaktivnost izhodnega ketona. S tem postopkom smo sintetizirali DHP **3a-3d, 3k** in **3s** z izkoristki 75–99 % (Shema 4.8).



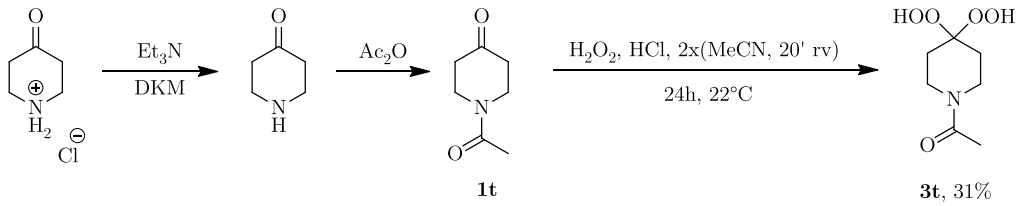

Shema 4.8: Sinteza *gem*-dihidroperoksidov **3a-3d**, **3k** in **3s**.

Reakcija peroksidacije amidnega DHP **3e** je bila počasna kljub gretju koncentrirane reakcijske zmesi na 40 °C in podaljšanju reakcijskega časa. Odločili smo se, da bomo reakcijo pospešili s kislinsko katalizo in zato v reakcijsko zmes že pred koncentriranjem dodali HCl, ki so jo že uporabljali kot katalizator pri sintezi DHP [84]. S to modifikacijo metode smo pripravili DHP **3e** s 84 % izkoristkom (Shema 4.9).



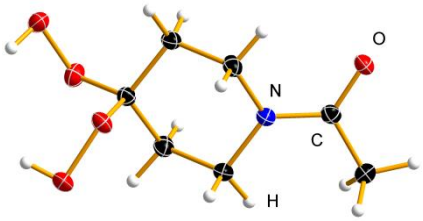

Shema 4.9: Sinteza *gem*-dihidroperoksida **3e**.

Kislinsko katalizo smo uporabili tudi pri sintezi DHP **3t**. Izhodni keton za pripravo DHP **3t** smo pripravili iz 4-piperidinon monohidrat hidroklorida (Shema 4.10). Sol smo z organsko bazo najprej pretvorili v sekundarni amin, ki smo ga acetilirali z acetanhidridom v piperidon **1t**. Keton **1t** smo brez dodatnega čiščenja uporabili za reakcijo s $H_2O_2$, ki je potekla med koncentriranjem reakcijske zmesi v prisotnosti katalitskih količin HCl, in sintetizirali smo DHP **3t** s celokupnim izkoristkom 31 % po treh stopnjah.

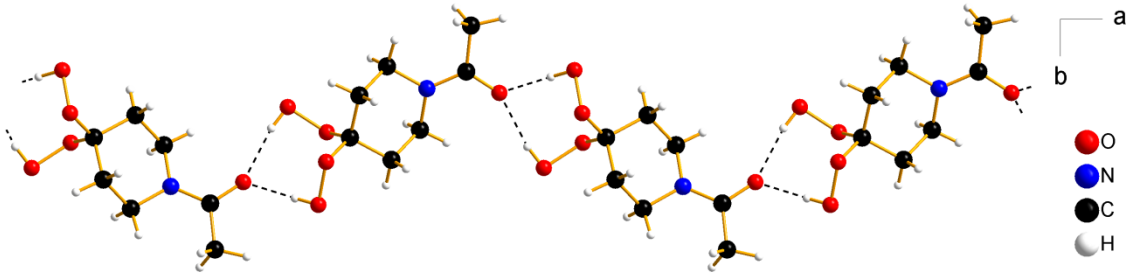



Shema 4.10: Trostopenjska sinteza DHP **3t**.

DHP **3t** je bil po reakciji kristaliničen in tako smo lahko določili tudi kristalno strukturo spojine (Slika 4.8). Molekule so se v kristalni strukturi povezovale v verige z O–H···O=C vodikovimi vezmi (Slika 4.9).

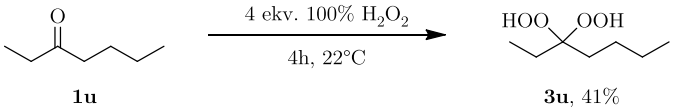



Slika 4.8: Prikaz ene izmed dveh enakih molekul, ki sestavljata asimetrično enoto kristalne strukture spojine DHP **3t**. Termični elipsoidi so izrisani s 50 % verjetnostjo, vodikovi atomi pa kot kroglice s poljubnim premerom. Izbrane vezne razdalje (Å): O–O 1.466(2), 1.467(2); C–O(OH) 1.417(3), 1.418(3).




Slika 4.9: Prikaz molekul DHP **3t**, ki se v kristalni strukturi povezujejo v verige z O–H···O=C vodikovimi vezmi.

Poseben primer je bil 3-heptanon **1u**, saj ima nizko vrelišče in bi nam med koncentriranjem reakcijske zmesi izhlapel, še preden bi reagiral s $H_2O_2$. Za sintezo DHP **3u** smo zato z azeotropnim odparevanjem predhodno pripravili 100 % $H_2O_2$, mu dodali keton **1u** in reakcijsko zmes mešali 4 ure pri 22 °C. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo smo izolirali 41 % DHP **3u** (Shema 4.11).




Shema 4.11: Sinteza DHP **3u**.

## 4.1.7 Eksperimentalno delo

### 4.1.7.1 Eksperimentalni podatki za sintezo α-hidroperoksialkoholov

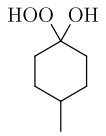
Eksperimentalni postopki za sintezo α-hidroperoksialkoholov so se razlikovali glede na stabilnost HPA. Trdne HPA smo izolirali v obliki čistega produkta (eksperimentalni postopek 1). Za njih smo poleg končnega izkoristka podali tudi stopnjo konverzije v zmesi z $H_2O_2$ pred čiščenjem produkta (eksperimentalni postopek 2). Oljnatih HPA nismo mogli izolirati, zato smo jih karakterizirali v zmesi s $H_2O_2$ ter podali konverzijo v HPA (eksperimentalni postopek 2). Oljnate HPA, ki so nastali iz lahko hlapnih ketonov, smo pripravili s 100 % $H_2O_2$ in jih prav tako karakterizirali v zmesi s $H_2O_2$ ter podali konverzijo v HPA (eksperimentalni postopek 3). HPA, ki smo jim določili le konverzijo, smo karakterizirali na podlagi primerjave NMR spektra s sorodnimi HPA iz literature in trdnimi HPA, ki smo jih mi detajlno okarakterizirali. Oljnate HPA, ki smo jih sintetizirali iz ketonov, smo tudi nadalje pretvorili v DHP in tako posredno dokazali njihovo identiteto [180,192].

**Tipičen eksperimentalni postopek za pripravo trdnih HPA (Eksperimentalni postopek 1):** 1 mmol ketona ali aldehida smo raztopili v 10 ml MeCN in potem dodali 1,2, 1,5, 2 ali 4 (125 mg, 170 mg, 226 mg ali 453 mg) 30 % vodne raztopine $H_2O_2$. Raztopino smo koncentrirali pod znižanim tlakom 20 minut, potem dodali še 10 ml topila in ponovno koncentrirali pod znižanim tlakom 20 minut. Produkt smo takoj po odparevanju izolirali s spiranjem z organskimi topili. S heksanom smo odstranili preseženo izhodno spojino, z zmesjo DKM/EtOAc (8/2) pa presežni $H_2O_2$, razen v primeru **2g**, ko smo nastalo suspenzijo le filtrirali in sprali z MeCN.

**Tipičen eksperimentalni postopek za pripravo oljnatih HPA (Eksperimentalni postopek 2):** 1 mmol ketona ali aldehida smo raztopili v 10 ml MeCN in potem dodali 1,2, 2 ali 4 (125 mg, 226 mg ali 453 mg) 30 % vodne raztopine $H_2O_2$. Raztopino smo koncentrirali pod znižanim tlakom 20 minut, potem dodali še 10 ml topila in ponovno koncentrirali pod znižanim tlakom 20 minut. Takoj po odparevanju smo reakcijsko zmes prenesili v NMR cevko in konverzijo izhodne karbonilne spojine v hidroperoksialkohol določili s pomočjo $^1$H NMR spektroskopije. Oljnate produkte smo zaradi težav pri izolaciji produktov iz reakcijske zmesi karakterizirali v prisotnosti nezreagiranega $H_2O_2$ (kemijski premik pri 10,20 ppm), preostanka karbonilne spojine in MeCN (kemijski premik pri 2,06 ppm).

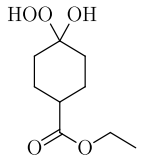
**Tipičen eksperimentalni postopek za pripravo hlapnih HPA (Eksperimentalni postopek 3):** 100 % vodikov peroksid smo pripravili tako, da smo v bučko natehtali 1,2 mmol (125 mg) 30 % vodne raztopine $H_2O_2$, dodali 10 ml MeCN in 20 minut skoncentrirali pod znižanim tlakom. Sledil je še en dodatek 10 ml MeCN in ponovno 20-minutno azeotropno odparevanje vode. Tako pripravljenemu 100 % $H_2O_2$ smo dodali 1 mmol ketona in pustili reakcijsko zmes 30 min na 22 °C. Reakcijsko zmes smo prenesili v NMR cevko in konverzijo izhodne karbonilne spojine v hidroperoksialkohol določili s pomočjo $^1$H NMR spektroskopije. Oljnate produkte smo zaradi težav pri izolaciji produktov iz reakcijske zmesi karakterizirali v prisotnosti nezreagiranega $H_2O_2$ (kemijski premik pri 10,20 ppm), preostanka karbonilne spojine in MeCN (kemijski premik pri 2,06 ppm).

**1-Hidroperoksi-4-metilcikloheksanol (2a)**



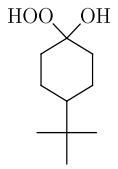

$C_7H_{14}O_3$, $M_r$=146,18
**Izhodne spojine:** 112 mg 4-metilcikloheksanona (**1a**) in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 93 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,85 in 0,87 (2d, 3H, *J*=2,4 Hz), 1,04-1,18 (m, 2H), 1,27-1,52 (m, 5H), 1,73-1,79 (m, 1H), 1,85-1,93 (m, 1H), 5,72 in 5,82 (2s, 1H), 10,63 in 10,66 (2s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 21,8, 31,0, 31,1, 31,5, 33,2, 33,5, 100,3, 101,1.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3410, 3343, 3236, 2950, 2925, 2861, 1475, 1459, 1446, 1403, 1371, 1355, 1314, 1260, 1222, 1165, 1142, 1114, 1094, 1072, 1048, 1010, 984, 972, 942, 915, 861.

**Etil 4-hidroksi-4-hidroperoksicikloheksankarboksilat (2b)**




$C_9H_{16}O_5$, $M_r$=204,22
**Izhodne spojine:** 170 mg etil 4-oksocikloheksankarboksilata (**1b**) in 2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 82 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,15 (t, 3H, *J*=7 Hz), 1,34–1,90 (m, 8H), 2,26–2,33 (m, 1H), 4,03 (q, 2H, *J*=7 Hz), 5,88 (s, 0,5H), 5,96 (s, 0,5H), 10,75 (s, 0,5H), 10,77 (s, 0,5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 14,2, 25,3, 32,4, 32,5, 41,1, 41,4, 100,0, 100,5, 174,8, 174,9.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3356, 2942, 1704, 1447, 1368, 1319, 1260, 1193, 1128, 1096, 1059, 1040, 1023, 972, 936, 921, 860.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_9H_{16}O_5Na$: 227,0895, izmerjeno: 227,0892.

**1-Hidroperoksi-4-terc-butilcikloheksanol (2c)**




$C_{10}H_{20}O_3$, $M_r$=188,26
**Izhodne spojine:** 154 mg 4-*terc*-butilcikloheksan-2-ona (**1c**) in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 1
**Izkoristek:** 76 % belega prahu (142 mg stabilnejšega izomera)
**Tališče:** 64–67 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,82 (s, 9H), 0,95–1,31 (m, 5H), 1,47–1,52 (m, 2H), 1,96–2,01 (m, 2H), 5,82 (s, 1H), 10,63 (s, 1 H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =23,4, 27,5, 32,0, 34,2, 46,8, 100,2.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3458, 3302, 2952, 2868, 1445, 1393, 1365, 1193, 1125, 1104, 1074, 982, 962, 930, 908, 763, 743.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{10}H_{20}O_3Na$: 211,1310, izmerjeno: 211,1283.
**Rentgenska strukturna analiza**: $C_{10}H_{20}O_3$, $M_r$ = 188,26, triklinska prostorska skupina $P\bar{1}$; dimenzije osnovne celice: $a$ = 6,3433(2) Å, $b$ = 11,3153(4) Å, $c$ = 15,3085(6) Å, $\alpha$ = 81,588(3)°, $\beta$ = 82,680(3)°, $\gamma$ = 83,937(3)°, $V$ = 1073,86(7) Å$^3$ in $Z$ = 4, $\rho_{izračunana}$ = 1,164 g/cm$^3$, pri 150 K; Mo $K\alpha$, $\mu$ = 0,084 mm$^{-1}$, 17673 izmerjenih uklonov, 4510 uklonov z $I > 2\sigma(I)$, 5367 neodvisnih uklonov, $R_{int}$ = 0,0178; 392 parametrov, $R_1$ [$I > 2\sigma(I)$] = 0,0480, $wR_2$ (vsi ukloni) = 0,1398, $S$ = 1,038, $\Delta\rho_{min}/\Delta\rho_{maks}$ = −0,267/0,755 eÅ$^{-3}$.

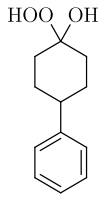
**Sinteza HPA 2c iz ketona 1c s prebitnim $H_2O_2$ brez izolacije:**

**Izhodne spojine:** 154 mg 4-*terc*-butilcikloheksan-2-ona (**1c**) in 4 ekv. $H_2O_2$

**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2 (uporabili smo 10 ml MeOH namesto MeCN pri prvem koncentriranju pod znižanim tlakom)

**Konverzija v HPA:** 100 % (dva izomera)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,82–0,83 (2s, 9H), 0,95–0,99 (m, 1H), 1,10–1,31 (m, 4H), 1,47–1,59 (m, 2H), 1,82–1,85 (m, 1H), 1,96–2,00 (m, 1H), 5,70 (s, 0,5H), 5,81 (s, 0,5H), 10,63 (s, 0,5H), 10,67 (s, 0,5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,87–0,88 (2s, 9H), 0,98–1,08 (m, 1H), 1,19–1,36 (m, 2H), 1,47–1,59 (m, 2H), 1,65–1,78 (m, 2H), 1,95–2,02 (m, 1H), 2,11–2,19 (m, 1H), 2,80 (brs, 0,5H), 3,00 (s, 0,5H), 7,99 (s, 0,5H), 8,03 (s, 0,5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =23,4, 27,5, 32,0, 33,9, 34,2, 46,8, 47,2, 100,2, 101,1.

**1-Hidroperoksi-4-fenil-cikloheksanol (2d)**




$C_{12}H_{16}O_3$, $M_r$=208,25
**Izhodne spojine:** 174 mg 4-fenilcikloheksan-2-ona (**1d**) in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 1
**Izkoristek:** 38 % belega prahu (80 mg stabilnejšega izomera)
**Tališče:** 83–86 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,43–1,72 (m, 6H), 2,04–2,08 (m, 2H), 2,47–2,64 (m, 1H), 5,98 (s, 1 H), 7,13–7,30 (m, 5H), 10,77 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =30,4, 34,1, 42,6, 100,0, 125,9.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3294, 2936, 2859, 1603, 1494, 1434, 1284, 1232, 1163, 1137, 1054, 1025, 987, 967, 940, 905, 754.

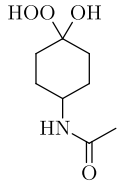
**Sinteza HPA 2d iz ketona 1d s prebitnim $H_2O_2$ brez izolacije:**

**Izhodne spojine:** 4-fenilcikloheksan-2-on **1d** (174 mg) in 4 ekv. $H_2O_2$

**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2 (uporabili smo 10 ml MeOH namesto MeCN pri prvem koncentriranju pod znižanim tlakom)

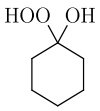
**Konverzija v HPA**: 100 %

**N-(4-Hidroperoksi-4-hidroksicikloheksil)acetamid (2e)**




$C_8H_{15}NO_4$, $M_r$=189,21
**Izhodne spojine:** 155 mg N-(4-oksocikloheksil)acetamida (**1e**) in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 100 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,31–1,46 (m, 4H), 1,54–1,61 (m, 2H), 1,76 (2xs, 3H), 1,75–1,80 (m, 1H), 1,86–1,91 (m, 1H), 3,48–3,61 (m, 1H), 5,89 (s, 0,5H), 5,94 (s, 0,5H), 7,70 (d, 0,5H, *J*=8Hz), 7,72 (d, 0,5H, *J*=8Hz), 10,73 (s, 0,5H), 10,77 (s, 0,5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 22,7, 28,5, 31,8, 32,0, 46,4, 46,6, 99,9, 100,5, 168,4.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3303, 2944, 2807, 1612, 1555, 1371, 1329, 1223, 1115, 1054, 982, 935, 872.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_8H_{15}NO_4Na$: 212,0899; izmerjeno: 212,0903.

### 1-Hidroperoksicikloheksanol (2f)



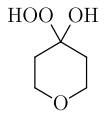

$C_6H_{12}O_3$, $M_r$=132,16
**Izhodne spojine:** 98 mg cikloheksanona (**1f**) z 1,5 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 89 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,29–1,61 (m, 10H), 5,77 (s, 1H), 10,63 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 22,7, 25,2, 33,9, 100,7.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3398, 3234, 2936, 1865, 2850, 1695, 1476, 1443, 1408, 1360, 1320, 1280, 1257, 1195, 1162, 1141, 1103, 1082, 1052, 1036, 982, 929, 874, 845, 786.

### 1,4-Dihidroperoksicikloheksan-1,4-diol (2g)



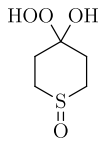

$C_6H_{12}O_6$, $M_r$=180,16
**Izhodne spojine:** cikloheksa-1,4-dion **1g** (112 mg) in 6 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** Keton **1g** (112 mg) in 6 ekv. $H_2O_2$ smo raztopili v 10 ml MeCN ter reakcijsko zmes skoncentrirali pod znižanim tlakom. Dodali smo 1 ml MeCN in 12 ur mešali pri 22 °C ter izolirali 162 mg (90 %) HPA **2g** v obliki belega prahu.
**Čiščenje:** spiranje z zmesjo DKM/EtOAc (8/2)
**Izkoristek:** 90 % belega prahu (162 mg)
**Tališče:** 79–80 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,53–1,72 (m, 8H), 5,89 (s, 2H), 10,77 (s, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 30,4, 100,7.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3272, 2954, 1433, 1372, 1259, 1124, 988, 939, 867.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_6H_{12}O_6Na$: 203,0532; izmerjeno: 203,0535.
**Elementna analiza (CHNS):** izračunano za $C_6H_{12}O_6.H_2O$: 36,36 % C, 7,12 % H; izmerjeno: 36,28 % C, 7,18 % H.

**4-Hidroperoksitetrahidro-4H-piran-4-ol (2h)**



$C_5H_{10}O_4$, $M_r$=134,13
**Izhodne spojine:** 100 mg tetrahidro-4H-piran-4-ona (**1h**) in 2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 100 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,57–1,71 (m, 4H), 3,46–3,63 (m, 4H), 6,14 (s, 1H), 10,89 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 34,9, 64,4, 98,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3259, 2972, 2878, 1632, 1471, 1422, 1389, 1352, 1305, 1273, 1237, 1202, 1147, 1093, 1012, 984, 952, 932, 870, 834.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_5H_{10}O_4Na$: 157,0477, izmerjeno: 157,0475.

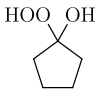
**4-Hidroperoksi-4-hidroksitetrahidro-4H-tiopiran 1-oksid (2i)**



$C_5H_{10}O_4S$, $M_r$=166,20
**Izhodne spojine:** 116 mg tetrahidro-4H-tiopiran-4-ona (**1i**) in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 1
**Izkoristek:** 71 % belega prahu (118 mg stabilnejšega izomera)
**Tališče:** 103–104 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,89–1,97 (m, 2H), 2,07–2,17 (m, 2H), 2,59–2,69 (m, 2H), 2,76–2,82 (m, 2H), 6,36 (s, 0,5H), 11,09 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =24,5, 43,6, 98,0.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3266, 3114, 1415, 1360, 1196, 1150, 1096, 982, 917, 860, 810, 779. $C_5H_{10}O_4SNa$: 189.0198, izmerjeno: 189,0202.
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_5H_{10}O_4S$: 36,13 % C, 6,06 % H, 19,29 % S; izmerjeno: 35,96 % C, 5,79 % H, 19,53 % S.
**Rentgenska strukturna analiza**: $C_5H_{10}O_4S$, $M_r$ = 166,19, monoklinska prostorska skupina $P2_1/c$; dimenzije osnovne celice: $a$ = 5,6985(2) Å, $b$ = 10,4236(3) Å, $c$ = 11,5952(3) Å, $\beta$ = 91,809(3)°, $V$ = 688,40(3) Å$^3$ in $Z$ = 4, $\rho_{izračunana}$ = 1,604 g/cm$^3$, pri 150 K; Cu $K\alpha$, $\mu$ = 3,859 mm$^{-1}$, 2291 izmerjenih uklonov, 1219 uklonov z $I > 2\sigma(I)$, 1324 neodvisnih uklonov, $R_{int}$ = 0,0171; 131 parametrov, $R_1$ [$I > 2\sigma(I)$] = 0,0301, $wR_2$ (vsi ukloni) = 0,0823, $S$ = 1,075, $\Delta\rho_{min}/\Delta\rho_{maks}$ = −0,262/0,352 eÅ$^3$.

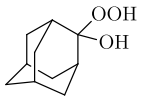
**Sinteza HPA 2i iz ketona 1i s prebitnim $H_2O_2$ brez izolacije:**
**Izhodne spojine:** 116 mg tetrahidro-4H-tiopiran-4-ona (**1i**) in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2 (reakcijsko zmes smo skoncentrirali le enkrat)
**Konverzija v HPA:** 100 % (dva izomera v razmerju 64:36 v korist bolj stabilnega)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,76–1,97 (m, 2H), 2,07–2,17 (m, 2H), 2,59–2,69 (m, 2H), 2,76–2,82 (m, 2H), 6,32 (s, 0,5H), 6,36 (s, 0,5H), 11,05 (s, 0,5H), 11,09 (s, 0,5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =24,5, 24,6, 43,6, 43,8, 98,0, 98,8.

**1-Hidroperoksiciklopentanol (2j)**




$C_5H_{10}O_3$,$M_r$=118,13
**Izhodne spojine:** ciklopentanon **1j** (84 mg) in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 3
**Konverzija v HPA:** 20 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,52–1,64 (m, 4H), 1,81–1,90 (m, 4H), 6,08 (s, 1H), 10,99 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 23,7, 36,2, 104,9.

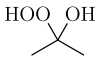
**2-Hidroperoksiadamantan-2-ol (2k)**




$C_{10}H_{16}O_3$, $M_r$=184,23
**Izhodne spojine:** 150 mg adamantan-2-ona **1k** in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Tališče:** začetek razpada pri 85 °C
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 1
**Izkoristek:** 37 % belega prahu (68 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,48–1,60 (m, 6H), 1,73 (bs, 2H), 1,88–1,95 (m, 6H), 5,73 (s, 1H, OH), 10,54 (s, 1H, OOH).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 26,5, 27,0, 33,4, 33,8, 34,4, 37,1, 102,6.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3464, 3312, 2931, 2912, 2890, 2853, 1452, 1414, 1377, 1363, 1353, 1338, 1319, 1301, 1240, 1193, 1113, 1104, 1072, 1062, 1022, 985, 916, 891, 884, 865, 839.
**Elementna analiza (CHNS):** izračunano 65,19 % C, 8,75 % H; izmerjeno 65,19 % C, 8,33 % H.

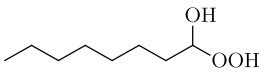
**Sinteza HPA 2k iz ketona 1k z $H_2O_2$ brez izolacije:**
**Izhodne spojine:** adamantan-2-on **1k** (150 mg) in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA**: 60 %

**2-Hidroperoksipropan-2-ol (2l)**



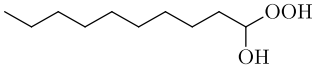

$C_3H_8O_3$, $M_r$=92,09
**Izhodne spojine:** 58 mg acetona **1l** in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 3
**Konverzija v HPA:** 25 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =1,25 (s, 6H), 5,91 (s, 1H), 10,77 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 25,3, 100,7.

**1-Hidroperoksioktan-1-ol (2m)** [168]




$C_8H_{18}O_3$, $M_r$=162,23
**Izhodne spojine:** 128 mg oktanala **1m** in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 100 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,85 (t, 3H, *J*=6,7 Hz), 1,24 (m, 10H), 1,34–1,50 (m, 2H), 4,84 (q, 1H, *J*=6,1 Hz), 6,36 (d, 1H, *J*=6,2 Hz), 11,34 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 14,0, 22,1, 24,5, 28,7, 28,9, 31,3, 33,3, 100,3.

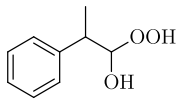
**1-Hidroperoksidekan-1-ol (2n)**




$C_{10}H_{22}O_3$, $M_r$=190,28
**Izhodne spojine:** 156 mg dekanala **1n** in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 1
**Izkoristek:** 22 % belega prahu (43 mg)
**Tališče:** 71–73 °C (lit. 61 °C [193]).
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,85 (t, 3H, *J*=6,7 Hz), 1,24 (m, 14H), 1,36–1,50 (m, 2H), 4,84 (q, 1H, *J*=5,9 Hz), 6,37 (d, 1H, *J*=6,4 Hz), 11,34 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 14,0, 22,2, 24,5, 28,7, 28,9, 29,0, 29,1, 31,3, 33,2, 100,3.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3398, 2954, 2917, 2850, 1470, 1432, 1376, 1356, 1279, 1244, 1207, 1134, 1106, 1069, 1010, 986, 927, 877.

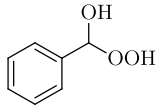
**Sinteza HPA 2n iz ketona 1n s prebitnim $H_2O_2$ brez izolacije:**
**Izhodne spojine:** 156 mg dekanala **1n** in 4 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA**: 100 %

**1-Hidroperoksi-2-fenilpropan-1-ol (2o)**



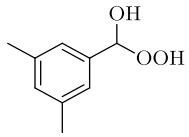

$C_9H_{12}O_3$, $M_r$=168,19
**Izhodne spojine:** 98 mg 2-fenilpropanala **1o** in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 100 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,20 (d, 3H, *J*=7,2 Hz), 2,78–2,93 (m, 1H), 4,94–4,99 (m, 1H), 6,50 in 6,65 (2xd, 1H, *J*=6 Hz), 7,14–7,37 (m, 5H), 11,41 in 11,42 (2xs, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 17,1, 42,8, 43,1, 102,7, 102,9, 126,0, 126,1, 127,9, 128,0, 128,3, 143,2, 143,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3347, 3030, 2978, 2936, 1603, 1496, 1453, 1356, 1337, 1130, 1050, 1016, 966, 912, 873.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_9H_{12}O_3Na$: 191,0684, izmerjeno: 191,0681.

**Hidroperoksi(fenil)metanol (2p)** [194]




$C_7H_8O_3$, $M_r$=140,14
**Izhodne spojine:** 106 mg benzaldehida **1p** in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 64 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 5,90 (d, 1H, *J*=5,8 Hz), 7,22 (d, 1H, *J*=5,8 Hz), 7,29–7,52 (m, 5H), 11,75 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 99,8, 126,7, 128,0, 128,5, 138,5.

**(3,5-Dimetilfenil)(hidroperoksi)metanol (2r)**




$C_9H_{12}O_3$, $M_r$=168,19
**Izhodne spojine:** 134 mg 3,5-dimetilbenzaldehida **1r** in 1,2 ekv. $H_2O_2$
**Pogoji:** eksperimentalni postopek 2
**Konverzija v HPA:** 47 %
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 2,26 (s, 6H), 5,80 (d, 1H, *J*=5,9 Hz), 6,93–9,96 (m, 1H), 7,34–7,37 (m, 2H), 7,11 (d, 1H, *J*=5,9 Hz), 11,68 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 20,6, 99,8, 124,4, 129,7, 136,0, 136,9, 138,3.

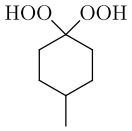
#### 4.1.7.2 Eksperimentalni podatki za sintezo *gem*-dihidroperoksidov

*Gem*-dihidroperokside (**3a-3e**, **3k**, **3s**, **3t-u**), ki smo jih uporabili za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, smo sintetizirali po naši objavljeni metodi z *in situ* koncentriranjem vodikovega peroksida [180]. 1 mmol ketona smo raztopili v 10 ml MeCN in potem dodali 4 ali 8 mmol (453 mg ali 906 mg) 30 % vodne raztopine $H_2O_2$. Raztopino smo koncentrirali pod znižanim tlakom 20 min, potem smo ponovno dodali 10 ml MeCN in spet koncentrirali pod znižanim tlakom 20 min. Reakcijsko zmes smo pustili 2–24 ur na 20–40 °C. DHP smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM/EtOAc (8/2), razen če je navedeno drugače). Za sintezo DHP **3e** smo v reakcijsko zmes poleg 1 mmol N-(4-oksocikloheksil)acetamida **1e** (155 mg), 8 ekv. 30 % $H_2O_2$ in MeCN dodali še 1 kapljico HCl. DHP **3e** nismo čistili s kolonsko kromatografijo, ampak smo nastalo oborino le sprali z majhno količino EtOAc, da smo odstranili presežen $H_2O_2$ in preostanek izhodnega ketona.

Zaradi hlapnosti 3-hepatanona **1u** smo DHP **3u** pripravili z mešanjem ketona **1u** z 4 ekv. predpripravljenjega 100 % $H_2O_2$ 4 ure na 22 °C. 100 % vodikov peroksid smo pripravili tako, da smo v bučko natehtali 453 mg 30 % vodikovega peroksida, dodali 10 ml MeCN in 20 minut skoncentrirali pod znižanim tlakom. Sledil je še en dodatek 10 ml MeCN in ponovno 20-minutno azeotropno odparevanje vode.

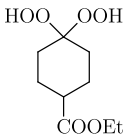
DHP **3t** smo pripravili iz 4-piperidinon monohidrat hidroklorida, kot je opisano spodaj.

**1,1-Dihidroperoksi-4-metilcikloheksan (3a)** [148]



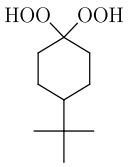

$C_7H_{14}O_6$, $M_r$=162,18
**Reagenti:** 4-metilcikloheksanon (112 mg) in 4 ekv. $H_2O_2$ (453mg)
**Pogoji:** 20 °C, 2 h
**Izkoristek:** 75 % belega prahu (122 mg)
**Tališče** 55–58 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,87 (d, 3H, *J*=6 Hz), 1,00–1,14 (m, 2H), 1,28–1,38 (m, 3H), 1,49–1,54 (m, 2H), 1,98–2,02 (m, 2H), 10,82 (s, 1H), 10,88 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 21,6, 29,1, 30,5, 31,2, 107,8.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3350, 2928, 2860, 1446, 1378, 1255, 1098, 1043, 974.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_7H_{13}O_6$: 161,0814; izmerjeno: 161,0811.

**Etil 4,4-dihidroperoksicikloheksan karboksilat (3b)** [187]



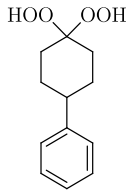

$C_9H_{16}O_6$, $M_r$=220.22
**Reagenti:** etil 4-oksocikloheksankarboksilat (170 mg) in 8 ekv. $H_2O_2$ (906 mg)
**Pogoji:** 40 °C, 24 h
**Čiščenje:** kolonska kromatografija (mobilna faza: DKM/MeOH (20/1))
**Izkoristek:** 94 % brezbarvne poltrdne snovi (206 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,17 (t, 3H, *J*=6 Hz), 1,40–1,61 (m, 4H), 1,71–1,78 (m, 2H), 1,93–2,02 (m, 2H), 2,34–2,44 (m, 1H), 4,05 (q, 3H, *J*=6 Hz), 10,96 (s, 1H), 11,01 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 14,1, 24,7, 28,1, 40,9, 59,8, 107,2, 174,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3440, 3340, 2942, 1675, 1370, 1290, 1266, 1239, 1062, 1035, 927, 860.
**HR-MS** [M-H]$^-$ izračunano za $C_9H_{15}O_6$: 219,0869; izmerjeno: 219,0866.

**1,1-Dihidroperoksi-4-(*terc*-butil)cikloheksan (3c)** [148]



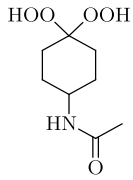

$C_{10}H_{20}O_4$, $M_r$=204,26
**Reagenti:** 4-*terc*-butilcikloheksanon (154 mg) in 4 ekv. $H_2O_2$ (453 mg)
**Pogoji:** 40 °C, 5 h
**Izkoristek:** 89 % belega prahu (182 mg)
**Tališče** 82–84 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,83 (s, 9H), 0,96–1.30 (m, 5H), 1,58 (m, 2H), 2,10 (m, 2H), 10,82 (s, 1H), 10,89 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 23,0, 27,5, 29,7, 32,0, 46,9, 107,7.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3415, 2952, 1366, 1053, 906.
**HR-MS [M-H]**$^-$ izračunano za $C_{10}H_{19}O_4$: 203,1283; izmerjeno: 203,1277.

### (4,4-Dihidroperoksicikloheksil)benzen (3d)



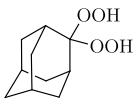

$C_{12}H_{16}O_4$, $M_r$=224,25
**Reagenti:** 4-fenilcikloheksanon (154 mg) in 8 ekv. $H_2O_2$ (906 mg)
**Pogoji:** 40 °C, 5 h.
**Izkoristek:** 99 % belega prahu (221 mg)
**Tališče** 123–125 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,43–1,72 (m, 6H), 2,17 (d, 2H, *J*=12 Hz), 2,53–2,63 (m, 1H), 7,15–7,31 (m, 5H), 10,95 (s, 1H), 11,03 (s, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 29,6, 29,8, 42,6, 107,4, 126,0, 126,6, 128,3, 146,3.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3216, 2938, 1394, 1123, 1051.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_{12}H_{15}O_4$: 223,0970, izmerjeno: 223,0971.
**Elementna analiza** izračunano za $C_{12}H_{16}O_4$: 64,27 % C, 7,19 % H, 28,54 % O, izmerjeno: 64,23 % C, 7,14 % H.

### N-(4-Dihidroperoksicikloheksil)acetamid (3e)



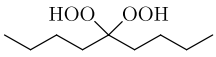

$C_8H_{15}NO_5$, $M_r$=205,21
**Izkoristek:** 84 % belih kristalov (173 mg)
**Tališče** 140–142 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,27–1,53 (m, 4H), 1,57–1,67 (m, 2H), 1,77 (s, 3H), 1,92–2,01 (m, 2H), 3,54–3,66 (m, 1H), 7,75 (m, 1H, *J*=7,6 Hz), 11,00 (brs, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] =22,7, 27,6, 27,9, 46,3, 107,2, 168,4.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3322, 3210, 2929, 2866,1616, 1569, 1494, 1443, 1394, 1373, 1294, 1249, 1187, 1144, 1115, 1056, 1029, 985, 962, 933, 878, 853.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_8H_{14}NO_5$: 204,0872, izmerjeno: 204,0876 .

**2,2-Dihidroperoksiadamantan (3k)** [148]



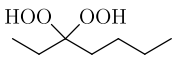

$C_{10}H_{16}O_4$, $M_r$=200,23
**Reagenti:** adamantan-2-on (150 mg) in 4 ekv. $H_2O_2$ (453 mg)
**Pogoji:** 40 °C, 24 h
**Izkoristek:** 95 % belega prahu (193 mg)
**Tališče** 98,2–100,8 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,50–1,65 (m, 6H), 1,75–1,92 (m, 6H), 2,17 (s, 2H), 10,72 (s, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 26,7, 30,8, 33,3, 36,8, 109,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3341, 2908, 1424 1093, 1057, 993, 919.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_{10}H_{15}O_4$: 199,0970; izmerjeno: 199,0974.

**5,5-Dihidroperoksinonan (3s)** [148]



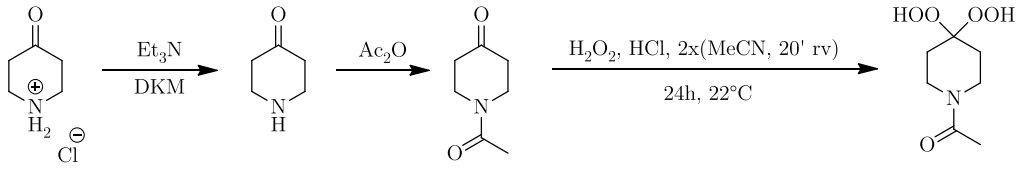

$C_9H_{20}O_4$, $M_r$=192,25
**Reagenti:** nonan-5-on (142 mg) in 8 ekv. $H_2O_2$ (906 mg)
**Pogoji:** 40 °C, 24 h
**Izkoristek:** 86 % belega prahu (166 mg)
**Čiščenje:** kolonska kromatografija (mobilna faza: DKM/EtOAc (9/1))
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,87 (t, 3H, *J*= 6 Hz), 1,23–1,33 (m, 8H), 1,47–1,52 (m, 4H), 10,77 (s, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 13,9, 22,4, 25,3, 28,9, 111,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3415, 2960, 2933, 2873, 1457, 1380, 1259, 1134, 1078, 967.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_9H_{19}O_4$: 191,1283, izmerjeno: 191,1288.

**3,3-Dihidroperoksiheptan (3u)**




$C_7H_{16}O_4$, $M_r$=164,20
**Reagenti:** heptan-3-on (114 mg) in 4 ekv. $H_2O_2$ (453 mg)
**Pogoji:** 22 °C, 4 h.
**Čiščenje:** kolonska kromatografija (mobilna faza: DKM/EtOAc (9/1))
**Izkoristek:** 41 % brezbarvnega olja (68 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,80–0,90 (m, 6H), 1,21–1,30 (m, 4H), 1,46–1,56 (m, 4H), 10,78 (s, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 8,0, 13,9, 22,1, 22,5, 25,3, 28,4, 111,8.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3421, 2961, 2874, 1491, 1380, 1348, 1289, 1263, 1244, 1213, 1155, 1094, 1056, 1131, 1094, 1056, 984, 944, 892, 853.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_7H_{15}O_4$: 163,0970; izmerjeno: 163,0974.

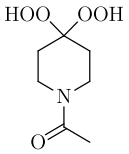
**Sinteza N-acetil-piperidin-1,1-diil dihidroperoksida (3t):**




**3t**

4-piperidinon monohidrat hidroklorid (920 mg, 6 mmol) smo raztopili v 6 ml DKM, dodali 2 ekv. $Et_3N$ (850 µl) ter mešali eno uro pri 22 °C. Potem smo dodali 1 ekv. $Ac_2O$ (582 µl) in mešali še 3 ure. Reakcijski zmesi smo dodali vodo in produkte ekstrahirali z DKM, organsko fazo posušili z $Na_2SO_4$, jo skoncentrirali na rotavaporju in dobili N-acetil-piperidin-4-on, ki smo ga brez dodatnega čiščenja raztopili v 15 ml MeCN, dodali 2,4 ml 30 % vodne raztopine $H_2O_2$. (4 ekv.) in 6 kapljic HCl. Reakcijsko zmes smo 20 minut koncentrirali pod znižanim tlakom, dodali še 15 ml MeCN in ponovili koncentriranje. Reakcijsko zmes smo pustili 24 h na 22 °C in po spiranju z MeOH smo izolirali 356 mg DHP **3t** (31 % izkoristek) v obliki belega prahu.

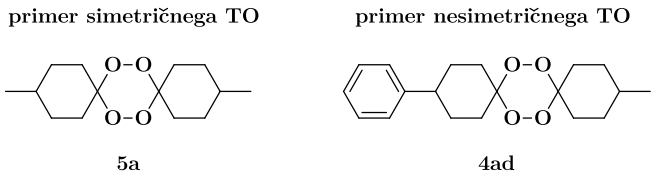
**N-Acetil-piperidin-1,1-diil dihidroperoksid (3t)**




$C_7H_{13}NO_5$, $M_r$=191,18
**Tališče** 143–145 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,67–1,70 (m, 2H), 1,77–1,81 (m, 2H), 2,00 (s, 3H), 3,31–3,47 (m, 8H), 11,21 (brs, 2H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 21,3, 29,4, 30,2, 37,7, 42,6, 106,6, 168,2.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3243, 2864, 1594, 1486, 1426, 1353, 1261, 1244, 1134, 1052, 960, 859, 808.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_7H_{12}NO_5$: 190,0715, izmerjeno: 190,0712.
**Elementna analiza** izračunano za $C_7H_{13}NO_5$: 43,98 % C, 6,85 % H, 7,33 % N, 41,84 % O; izmerjeno: 43,92 % C, 6,80 % H, 7,13 % N.
**Rentgenska strukturna analiza**: $C_7H_{13}NO_5$, $M_r$ = 191,18, ortorombska prostorska skupina $Pna2_1$; dimenzije osnovne celice: $a$ = 15,9436(3) Å, $b$ = 6,8382(2) Å, $c$ = 15,7425(4) Å, $V$ = 1716,32(6) Å$^3$ in $Z$ = 8, $\rho_{izračunana}$ = 1,480 g/cm$^3$, pri 150 K; Mo $K\alpha$, $\mu$ = 0,126 mm$^{-1}$, 13297 izmerjenih uklonov, 3367 uklonov z $I > 2\sigma(I)$, 3536 neodvisnih uklonov, $R_{int}$ = 0,0174; 339 parametrov, $R_1$ [$I > 2\sigma(I)$] = 0,0262, $wR_2$ (vsi ukloni) = 0,0688, $S$ = 1,037, Flack $x$ = 0,2(3), $\Delta\rho_{min}/\Delta\rho_{maks}$ = −0,162/0,259 eÅ$^{-3}$.

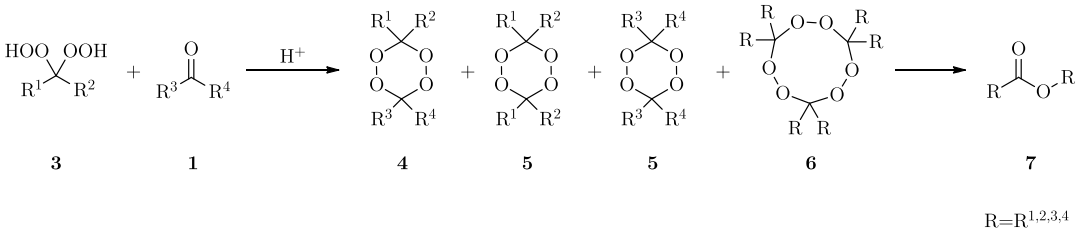
## 4.2 Študija sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksidov in ketonov

1,2,4,5-Tetraoksani (TO) so sintezni analogi artemisinina, ki ima protiparazitsko, protitumorsko, protivirusno, protivnetno, protiglivično in protibakterijsko delovanje [21]. Osnovni strukturni fragment 1,2,4,5-tetraoksanov je šestčlenski obroč z dvema peroksidnima skupinama, ki sta odločilni za njihovo farmakološko aktivnost. Simetrični TO imajo enake substituente na mestih 3 in 6 tetraoksanskega obroča, nesimetrični TO pa različne (Shema 4.12). Nesimetrični TO lahko zato dosežejo večjo strukturno raznolikost kot simetrični TO in posledično obetajo več na področju farmacevtske kemije.




Shema 4.12: Primer strukture simetričnega in nesimetričnega TO.

Naraščujoča vloga artemisininov in sinteznih peroksidov v terapiji ter nedvoumni dokazi o njihovi široki biološki aktivnosti povečujeta interes za razvoj novih sinteznih metod za pridobivanje TO, med katerimi so najbolj perspektivni nesimetrični TO. Nesimetrične TO (**4**, Shema 4.13) je mogoče sintetizirati s ciklokondenzacijo *gem*-dihidroperoksidov (DHP, **3**) in karbonilnih spojin (**1**) pod kislimi reakcijskimi pogoji, vendar ciklizacijo ponavadi spremlja tvorba številnih stranskih in razpadnih produktov. Poleg nastanka nesimetričnih TO (**4**) lahko reakcija vodi tudi do tvorbe obeh simetričnih TO (**5**), 1,2,4,5,7,8-heksaoksonanov (HO, **6**) ter do njihove nadaljnje reakcije v produkte Baeyer-Villigerjeve premestitve (**7**). Pri sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov je bistveno, da se izognemo tvorbi 1,2,4,5,7,8-heksaoksonanov in tudi simetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, saj jih je zaradi podobne polarnosti pogosto težko ločiti od nesimetričnih TO. Poleg otežene ločbe pa stranski produkti tudi nižajo izkoristek sinteze nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov.



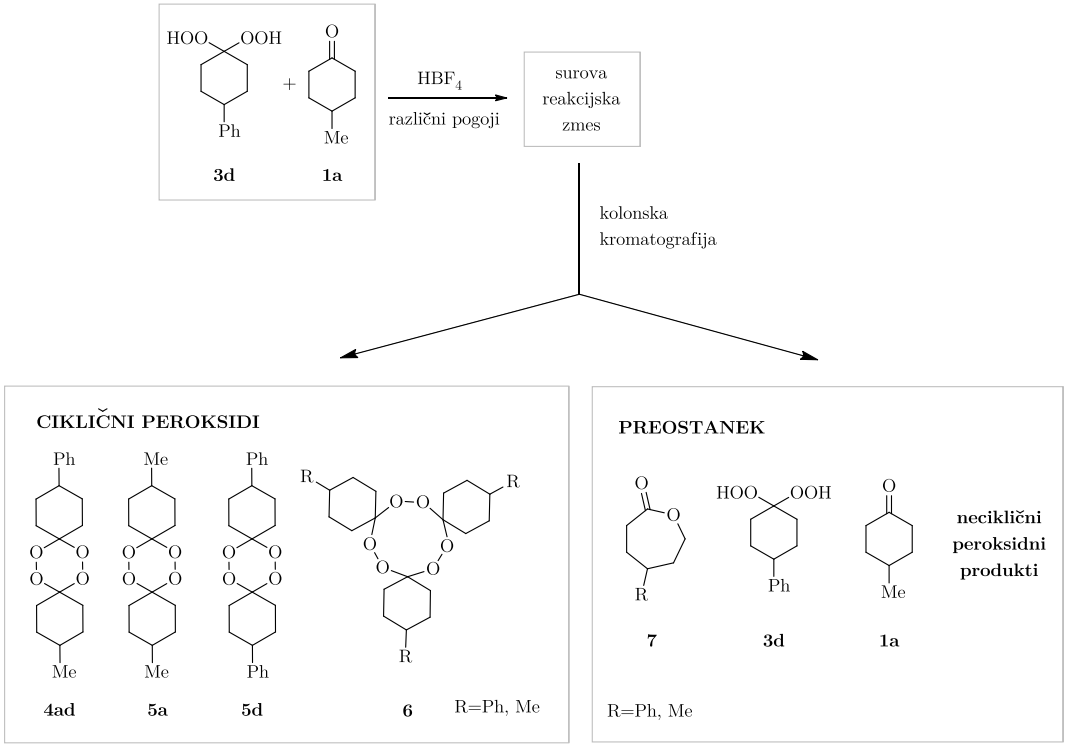

Shema 4.13: Možni produkti pri kislinsko katalizirani ciklokondenzaciji DHP in karbonilne spojine.

V sklopu naše študije o ciklizaciji *gem*-dihidroperoksidov in ketonov v nesimetrične 1,2,4,5-tetraoksane smo preučevali vpliv različnih reakcijskih pogojev na ciklokondenzacijo (topilo, temperatura, reakcijski čas, količina kisline, količina dodanega ketona). Raziskovali smo tudi vpliv strukture ketona ali DHP na ciklizacijo, ko smo različne DHP ciklizirali z modelnim ketonom in obratno. Za potrebe testiranja biološke aktivnosti tetraoksanov smo sintetizirali še serijo načrtno strukturno definiranih nesimetričnih TO in jih nato še dodatno kemijsko modificirali.

### 4.2.1 Študija vpliva reakcijskih pogojev ciklokondenzacije na modelnih substratih

Kislinsko katalizirano ciklokondenzacijo DHP in ketona v nesimetrični TO spremljajo številne stranske reakcije, zato smo želeli raziskati vpliv reakcijskih pogojev za selektivno tvorbo nesimetričnih TO, saj v znanstveni literaturi ni dostopnih teh osnovnih študij. Pri tem smo se najprej poglobili v študijo vpliva kombinacije topila, temperature in reakcijskega časa, ki bi zagotavljala optimalno aktivacijo ciklizacije in selektivni nastanek nesimetričnega TO.

Kot modelna substrata za študij reakcijskih pogojev smo uporabili (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzen **3d** in 4-metilcikloheksanon **1a** v prisotnosti enega ekvivalenta $HBF_4$ (Shema 4.14). Reakcijo smo študirali v treh topilih (diklorometan, acetonitril in 2,2,2-trifluoroetanol) pri dveh različnih temperaturah (0 °C, 22 °C) in produkte reakcije analizirali po 5 minutah ali eni uri. Analiza reakcijske zmesi z NMR spektroskopijo je zelo kompliciran, zato smo ciklične perokside (TO, HO) ločili od preostalih produktov in ostanka izhodnih spojin s pomočjo kolonske kromatografije, saj so vsi ciklični peroksidi prvi eluiran produkt. Distribucijo cikličnih peroksidov smo določili na podlagi karakterističnih signalov za posamezni ciklični peroksid s pomočjo $^1$H NMR spektra, kot je opisano v eksperimentalnem delu. Ravno tako smo analizirali drugo frakcijo, ki je vsebovala izhodni spojini in ostale produkte.




Shema 4.14: Shematski prikaz eksperimentalnega postopka analize reakcijske zmesi.

Najprej smo preučili potek reakcije v TFE, ki je predstavnik fluoriranih alkoholov. To so topila, za katera so že pokazali, da omogočajo selektivno in kontrolirano sintezo simetričnih TO in HO iz ketonov [141], saj tvorijo s peroksidi elektrofilno aktiviran kompleks ter tako aktivirajo perokside v različnih oksidacijskih reakcijah [195]. V sklopu študija reakcijskih pogojev za ciklokondenzacijo DHP in ketonov smo želeli preveriti, če tudi pri tovrstni reakciji fluorirani alkoholi pripomorejo k povečani selektivnosti pri

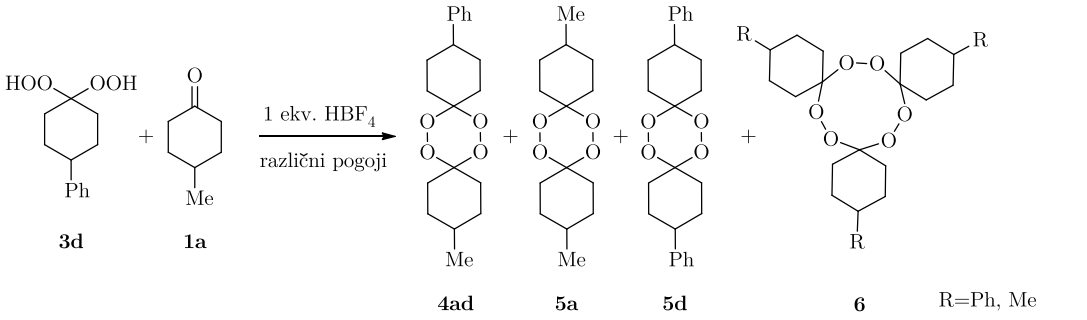
tvorbi nesimetričnih TO in zmanjšajo količino nastalih stranskih produktov. Ko smo opravili enourno reakcijo med ekvimolarnima količinama DHP **3d** in ketonom **1a** v TFE pri 22 °C, smo izolirali le 25 % cikličnih peroksidov (Tabela 4.4), reakcija pa je večinoma potekla do produktov Baeyer-Villigerjeve oksidacije (**7**). Izmed cikličnih peroksidov je nastal predvsem simetrični TO **5d** (98 %, Tabela 4.4). S skrajšanjem reakcijskega časa na 5 minut se sicer ni zmanjšala količina nastalih laktonov, saj je prišlo do samo 3 % povišanja izkoristka nastalih cikličnih peroksidov, smo pa opazili spremenjeno distribucijo cikličnih peroksidov.

Pri reakciji pri nižji temperaturi (0 °C) je bil izkoristek cikličnih peroksidov višji (44 % po eni uri, 78 % po 5 minutah, Tabela 4.4), z večjim deležem nesimetričnega TO **4ad** (86 % po eni uri in po 5 minutah, Tabela 4.4). Zanimivo pa je, da sta kot stranska produkta v 5-minutni reakciji nastala simetrični TO **5a** in HO.

Potem smo preučili različne reakcijske pogoje v MeCN, kjer je bil izkoristek cikličnih peroksidov po eni uri pri 22 °C podobno nizek (21 %) kot v TFE, le da je nastalo manj simetričnega TO **5d** (**4ad**:**5d**=43:57, Tabela 4.4). S skrajšanjem reakcije na 5 minut je v skladu z zmanjšano aktivacijo s topilom nastalo manj produktov Baeyer-Villigerjeve oksidacije, večinsko pa je nastal nesimetrični TO **4ad** (94 % vseh cikličnih peroksidov, Tabela 4.4). Podoben efekt smo opazili pri nižji temperaturi, kjer je reakcija vodila do nastanka HO, v največjem deležu (44 % vseh cikličnih peroksidov, Tabela 4.4) pa je nastal po 5 min.

Podobnim trendom kot v MeCN so sledile reakcije, ki smo jih izvajali v DKM, le da so bili izkoristki nižji. Izkoristek cikličnih peroksidov in distribucija le-teh sta si bila podobna ne glede na dolžino reakcije, ki smo jo izvajali pri 22 °C (Tabela 4.4). Izkoristek cikličnih peroksidov se je povečal za približno 15 % pri nižji reakcijski temperaturi, ponovno pa smo opazili neodvisnost izkoristka od reakcijskega časa. Podobno kot v MeCN so v reakcijah v DKM pri 0 °C začeli nastajati HO **6**, njihova količina pa se je prav tako s podaljševanjem reakcijskega časa znižala v prid nesimetričnemu TO **4ad**.

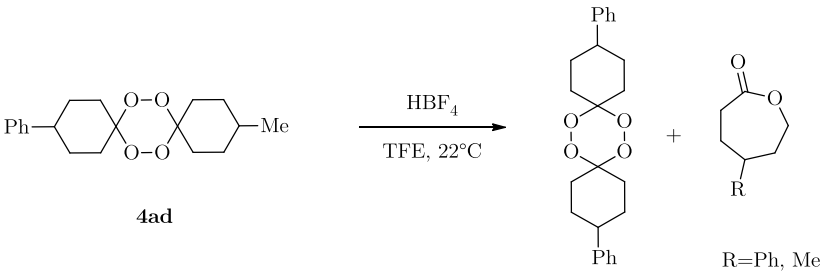
Tabela 4.4: Vpliv reakcijskih pogojev na ciklizacijo DHP **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a.**




| topilo[a] | t (min) | T (°C) | ciklični peroksidi (%)[b] | Distribucija cikličnih peroksidov[c] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **4ad** (%) | **5a** (%) | **5d** (%) | **6** (%) |
| TFE | 60 | 22 | 25 | 2 | / | 98 | / |
| TFE | 5 | 22 | 28 | 29 | / | 71 | / |
| TFE | 60 | 0 | 44 | 86 | / | 14 | / |
| TFE | 5 | 0 | 78 | 86 | 5 | / | 9 |
| MeCN | 60 | 22 | 21 | 43 | / | 57 | / |
| MeCN | 5 | 22 | 65 | 94 | 6 | / | / |
| MeCN | 60 | 0 | 86 | 79 | 6 | / | 15 |
| MeCN | 5 | 0 | 74 | 50 | 6 | / | 44 |
| DKM | 60 | 22 | 35 | 82 | / | 18 | / |
| DKM | 5 | 22 | 39 | 86 | / | 14 | / |
| DKM | 60 | 0 | 50 | 93 | / | / | 7 |
| DKM | 5 | 0 | 51 | 78 | / | 5 | 17 |

[a] Ekvimolarni množini **3d** in **1a** smo zmešali v topilu (0,25 M), dodali 1 ekv. $HBF_4$ in mešali eno uro pri 0 °C oz. 22 °C. [b] Skupni izkoristek cikličnih peroksidov po ločitvi cikličnih peroksidov s kolonsko kromatografijo od preostalih komponent reakcijske zmesi. [c] Distribucijo cikličnih peroksidov smo določili s pomočjo $^1$H NMR spektra iz zmesi cikličnih peroksidov po kolonski kromatografiji.

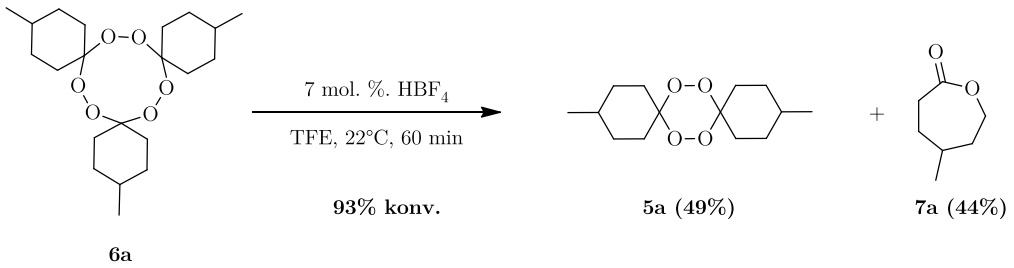
Delež nesimetričnega TO **4ad** se je pri reakciji med DHP **3d** in ketonom **1a** z 1 ekv. $HBF_4$ v TFE pri 22 °C s podaljšanjem reakcijskega časa iz 5 min na 60 min zmanjšal (Tabela 4.4), kar je kazalo na nestabilnost TO v kislih pogojih v TFE. To smo želeli tudi preveriti z dodatnimi eksperimentom, v katerem smo izoliran nesimetrični TO **4ad** mešali v TFE s $HBF_4$. Po enournem mešanju TO **4ad** z 1 ekv. $HBF_4$ v TFE (0,25 M) je popolnoma razpadel in izolirali smo le še 38 % **5d**, ostalo so bili laktoni (Shema 4.15). Da bi dobili boljši vpogled v razpad TO **4ad** v kislem, smo še 10-kratno zmanjšali količino dodane kisline in ga tako mešali še z 0,1 ekv. $HBF_4$ v TFE. Po eni uri ga je razpadlo 38 % v TO **5d** in laktone (Shema 4.15), po 24 urah pa je popolnoma razpadel do enakih razpadnih produktov, med katerimi so prevladovali laktoni (Shema 4.15). Iz zgornjih eksperimentov o stabilnosti TO **4ad** (Shema 4.15) bi lahko sklepali, da se iz razpadnih produktov nesimetričnega TO **4ad** tvori simetrični TO **5d**.




| ekv. $HBF_4$ | t (h) | 5d | 7 | 4ad |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 38 | 62 | / |
| 0.1 | 1 | 14 | 24 | 62 |
| 0.1 | 24 | 25 | 75 | / |

Shema 4.15: Stabilnost nesimetričnega TO **4ad** v prisotnosti $HBF_4$ v TFE pri 22 °C.

Iz rezultatov lahko povzamemo, da je le optimalna aktivacija reakcije med DHP **3d** in ketonom **1a** vodila do selektivne tvorbe nesimetričnega TO **4ad** z dobrim izkoristkom. Prekomerna aktivacija je sprva vodila do povečane tvorbe simetričnega TO **5d**, potem pa do razpada cikličnih peroksidov v laktone **7**, kar je močno znižalo izkoristek tvorbe cikličnih peroksidov. Preveč deaktivirani pogoji reakcije so vodili v nastanek HO, ki se je s podaljševanjem reakcijskega časa pretvarjal v nesimetrični TO **4ad**. Slednje smo tudi potrdili z modelnim eksperimentom, v katerem smo HO **6** mešali v 0,25 M $HBF_4$ v TFE. Po eni uri smo na podlagi $^1$H NMR analize ugotovili, da je prišlo do 93 % konverzije HO v TO **5a** in lakton **7a**.




Shema 4.16: Konverzija HO v TO in lakton**.**

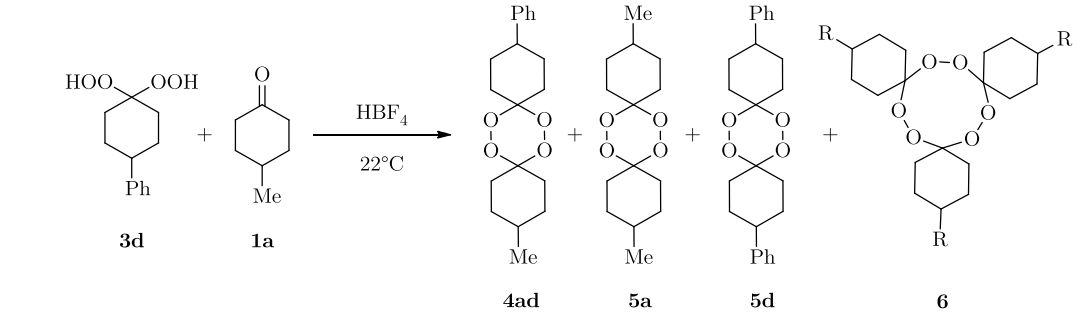
### 4.2.2 Vpliv količine kisline na ciklokondenzacijo

Študijo vpliva reakcijskih pogojev smo nadaljevali s podrobnejšim vpogledom v vlogo količine kisline na izkoristek tvorbe cikličnih peroksidov in selektivnost tvorbe nesimetričnih TO, zato smo nastavili reakcije z različno količino kislin (od 0,01 do 2 ekv. $HBF_4$). Vlogo količine kisline na nastanek cikličnih peroksidov pri ciklizaciji DHP **3d** in ketona **1a** smo natančneje preučili v TFE (Shema 4.17a) in MeCN (Shema 4.17b). Reakcije smo izvajali pri 22 °C, v TFE 60 min, v MeCN pa 5 min. Tako kot pri študiji vpliva pogojev smo se tudi tu držali enakega eksperimentalnega postopka (Shema 4.14).

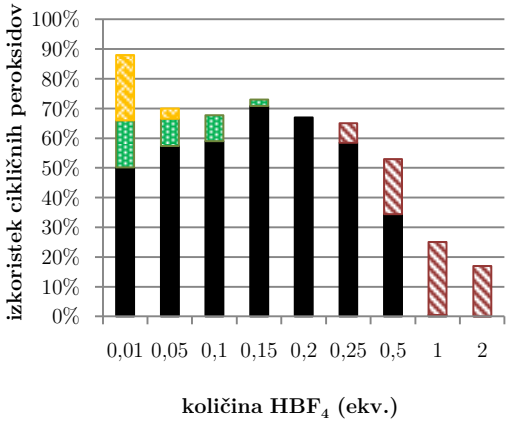
Že v prejšnjem poglavju smo ugotovili, da je pri reakciji med DHP **3d** in ketonom **1a** z dodatkom 1 ekv. $HBF_4$ v TFE po 1 uri nastalo le 25 % cikličnih peroksidov, od katerih je bilo 98 % simetričnega TO **5d**. S povečanjem količine kisline na 2 ekv. $HBF_4$ smo dosegli večji razpad cikličnih peroksidov v laktone (ostalo je le 17 % cikličnih peroksidov,

Shema 4.17a), med cikličnimi peroksidi pa se je tvoril samo simetrični TO **5d**, ki je očitno od nastalih cikličnih peroksidov najbolj stabilen v kislem. Zmanjševanje količine kisline pod 1 ekv. je postopno povečevalo izkoristek nastalih cikličnih peroksidov, delež simetričnega TO **5d** se je zmanjševal, delež nesimetričnega TO **4ad** pa povečeval. V reakciji z dodatkom 0,2 ekv. $HBF_4$ je med cikličnimi peroksidi nastal le nesimetrični TO **4ad**, in sicer s 67 % izkoristkom. Z nadaljnjim nižanjem količine kisline se izkoristek cikličnih peroksidov ni bistveno spreminjal, v zmesi izoliranih cikličnih peroksidov pa je začel poleg nesimetričnega TO **4ad** nastajati simetrični TO **5a**. Nižji dodatek kisline (pod 0,1 ekv. $HBF_4$**)** je vodil v nastanek manjšega deleža TO **4ad** in nastanek heksaoksonanov (Shema 4.17a).

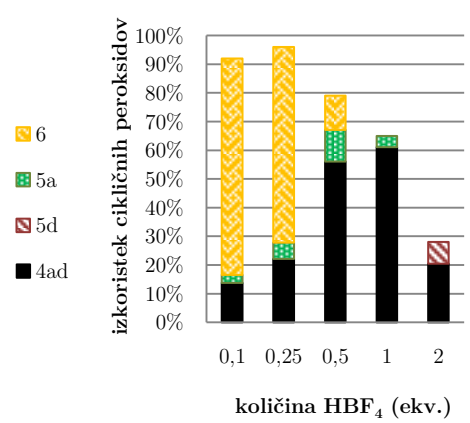
Reakcije z različno količino kisline smo izvajali tudi v MeCN. Reakcijo med DHP **3d** in ketonom **1a** v MeCN smo izvajali le 5 min, da bi zaradi krajšega reakcijskega časa in odsotnosti dodatne aktivacije s topilom dobili še vpogled v potek reakcije pri manjši aktivaciji ciklizacije (Shema 4.17b). Opazili smo podobne trende kot pri reakcijah v TFE. Tudi tu je prišlo pri večjih dodatkih $HBF_4$ (2 ekv., Shema 4.17b) do povečanega razpada cikličnih peroksidov, delež nesimetričnega TO **4ad** pa se je začel zmanjševati na račun povečevanja količine nastalega simetričnega TO **5d**. Z zmanjševanjem kisline se je začel v zmesi cikličnih peroksidov sprva pojavljati simetrični TO **5a**, potem pa še heksaoksonani **6**, medtem ko se je delež nesimetričnega TO **4ad** zmanjšal. Izkazalo se je, da sta pri reakciji z dodatkom 0,5 ekv. $HBF_4$ v MeCN izkoristek in distribucija cikličnih peroksidov zelo podobna kot pri 0,05 ekv. $HBF_4$ v TFE, kar je potrdilo večjo jakost aktivacije reakcije s fluoriranimi alkoholi. Ko smo v MeCN še zmanjšali količino kisline pod 0,1 ekv $HBF_4$, se je rahlo povečal izkoristek nastalih cikličnih peroksidov, delež le-teh pa se je močno prevesil v korist HO.




a) POGOJI: TFE, 60 min




b) POGOJI: MeCN, 5 min



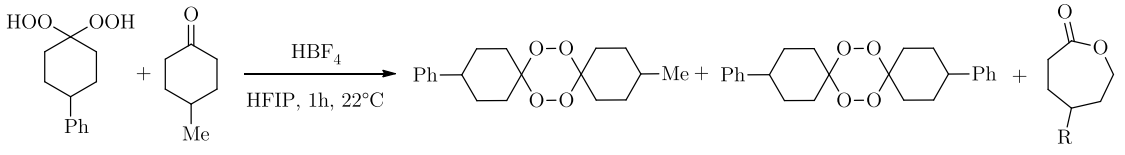

Shema 4.17: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih spojin DHP **3d** in ketona **1a.**

Podobno kot pri študiji reakcijskih pogojev smo ugotovili, da sta na aktivacijo ciklizacije DHP in ketona močno vplivala topilo in količina dodane kisline. Preveč aktivirani pogoji so vodili do nastanka simetričnega TO **5d** in naprej do razpada TO v Baeyer-Villigerjeve produkte. Premajhna aktivacija ciklizacije je najprej zmanjšala delež nesimetričnega TO **4ad** v korist naraščajočega deleža simetričnega TO **5a** in potem do pretežnega nastanka HO **6**. V primeru zelo šibke aktivacije je bila konverzija izhodnih spojin **3d** in **1a** nepopolna. Kaže, da je določena količina kisline potrebna, da dosežemo pogoje, ko se preferenčno tvorijo TO in ne HO. Od te mejne količine dalje pa s povečevanjem količine kisline dosežemo le večji razpad TO v laktone.

### 4.2.3 Vpliv topila na ciklizacijo modelnih substratov

S predhodnimi eksperimenti smo pokazali, da topilo brez dvoma vpliva na aktivacijo reakcije ciklokondenzacije in distribucijo cikličnih peroksidov, zato smo v okviru svoje študije preverili še vplive različnih topil (HFIP, TFE, MeCN, DKM, heksan, EtOH, $H_2O$) na potek ciklizacije DHP **3d** in ketona **1a**. Reakcije v teh topilih smo izvajali eno uro pri 22 °C in primerjali nastale produkte v reakcijski zmesi.

Predhodno smo že pokazali, da je mogoče ciklokondenzacijo DHP **3d** in ketona **4ad** dodatno aktivirati s TFE. Drugi predstavnik fluoriranih alkoholov je heksafluoroisopropanol (HFIP), ki aktivira prenos kisika še močneje kot TFE [141]. Pri reakciji med DHP **3d** in ketonom **1a** v HFIP pri 22 °C in z $1 \cdot 10^{-2}$ $HBF_4$ so po eni uri reakcije bili v reakcijski zmesi prisotni le Baeyer-Villigerjevi produkti (Shema 4.18). Če smo se želeli izogniti popolnemu razpadu nastalih cikličnih peroksidov v Baeyer-Villigerjeve produkte, smo morali v reakcijo v HFIP dodati manj $HBF_4$. Pri znižanju na $1 \cdot 10^{-3}$ ekv. kisline smo po reakciji uspeli izolirati 11 % cikličnih peroksidov, od česar sta nastala nesimetrični TO **4ad** (81 % vseh cikličnih peroksidov) in simetrični TO **5d** (19 % vseh cikličnih peroksidov). Skrajšanje reakcije na 5 min ni pripomoglo k znižanju obsega Baeyer-Villigerjeve oksidacije cikličnih peroksidov, saj smo jih izolirali le 6 %, zato smo še dodatno znižali količino kisline. Niti razpolovljena količina kisline ($5 \cdot 10^{-4}$ ekv.) ni pripeljala reakcije do večje tvorbe cikličnih peroksidov (15 %), spremenila se je distribucija le-teh in nastal je le nesimetrični TO **4ad**. Dodatek le $1 \cdot 10^{-4}$ ekv. $HBF_4$ v HFIP ni zadostoval za sprožitev ciklizacije med DHP **3d** in ketonom **1a**, po smo reakciji izolirali pretežno izhodne spojine. V vseh opisanih reakcijah v HFIP, kjer smo za ciklizacijo DHP **3d** in ketona **1a** uporabili $5 \cdot 10^{-4}$ ekv. $HBF_4$ ali več, smo pretežno izolirali Baeyer-Villigerjeve produkte, kar potrjuje močno aktivacijo ciklizacije DHP in ketonov v HFIP, ki vodi do razpada nastalih TO v laktone.




**3d** **1a**

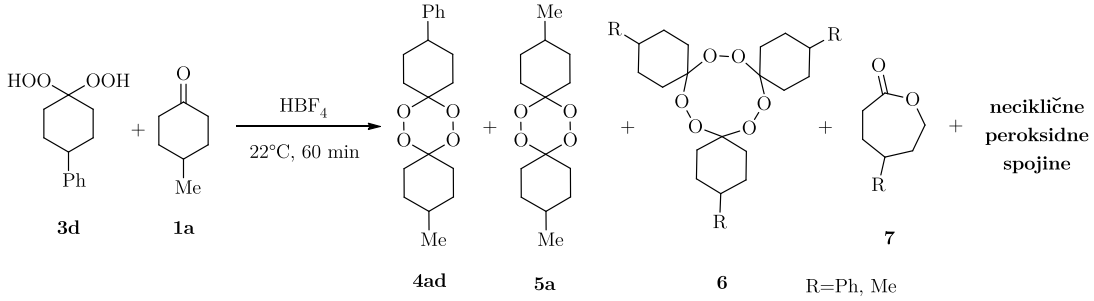
| **$HBF_4$ (ekv.)** | **4ad** | **5d** | **7** |
|---|---|---|---|
| $1 \cdot 10^{-2}$ | / | / | 100 |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | 9 | 2 | 89 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | 15 | / | 85 |

Shema 4.18: Reakcija med DHP **3d** in ketonom **1a** v HFIP pri različnih dodatkih kisline.

Drug predstavnik fluoriranih alkoholov, TFE, je manj intenzivno aktiviral reakcijo ciklizacije DHP **3d** in ketona **1a** kot HFIP. Enourna ciklizacija z dodatkom 0,1 ekv. $HBF_4$ v TFE je vodila do dobrega izkoristka tvorbe cikličnih peroksidov (67 %, Tabela 4.5), nesimetrični TO **4ad** je bil večinski produkt, medtem ko so nastali tudi produkti Baeyer-Villigerjeve premestitve. Kljub temu da je ciklizacija z 0,1 ekv. kisline v MeCN po eni uri vodila do podobno visokega izkoristka cikličnih peroksidov (66 %, Tabela 4.5), pa lahko iz distribucije cikličnih peroksidov zaključimo, da topilo dodatno ne aktivira ciklizacije v tetraoksane, saj je glavni produkt reakcije HO (88 % vseh cikličnih peroksidov, Tabela 4.5), preostanek pa predstavljajo nezreagirane izhodne spojine in neciklične peroksidne spojine s karakterističnimi signali okoli 9,5 ppm v $^1$H NMR spektru, ki kažejo na nepopolno ciklizacijo. V DKM je reakcija podobno potekla kot v MeCN, le da so ciklični peroksidi nastali z malo manjšim izkoristkom in večjim deležem nesimetričnega TO **4ad**.

Heksan, etanol in voda so bila manj primerna topila za ciklizacijo DHP **3d** in ketona **1a** v prisotnosti $HBF_4$, zato smo poleg reakcije z 0,1 ekv $HBF_4$ opravili še enourno reakcijo z 1 ekv. kisline. Konverzija izhodnih spojin v ciklične peroksidne produkte v heksanu je bila v prisotnosti 0,1 ekv $HBF_4$ slaba (13 %, Tabela 4.5), s povečanjem količine kisline na 1 ekv. pa se je izboljšala (45 %, Tabela 4.5). Kljub različni količini kisline je bila distribucija cikličnih peroksidov podobna, približno 60 % je bilo nesimetričnega TO, ostalo so bili HO (Tabela 4.5). V etanolu sta izhodni spojini v prisotnosti 0,1 ekv. kisline sicer delno reagirali med sabo (68 % konverzija, Tabela 4.5), vendar nista ciklizirali in tvorili so se samo neciklični peroksidni produkti s številnimi singleti okoli 9,5 ppm v $^1$H NMR spektru. Za ciklizacijo DHP **3d** in ketona **1a** je bilo potrebno dodati 1 ekv. $HBF_4$ in izolirali smo 40 % cikličnih peroksidov (Tabela 4.5), nastali so pretežno heksaoksonani (81 % vseh cikličnih peroksidov). V vodi do reakcije med DHP **3d** in ketonom **1a** sploh ni prišlo ne glede na dodatek kisline (0,1 ekv. ali 1 ekv. $HBF_4$, Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Ciklizacija DHP **3d** in ketona **1a** v različnih topilih.




| topilo[a] | $HBF_4$ (ekv) | Pretvorba DHP (%)[b] | Izkoristek nastalih produktov[c] | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **4ad** (%) | **5a** (%) | **6** (%) |
| TFE | 0,1 | 100[d] | 58 | 8 | / |
| MeCN | 0,1 | 94[e] | 7 | / | 59 |
| DKM | 0,1 | 100[e] | 20 | / | 27 |
| heksan | 0,1 | 46[e] | 8 | / | 4 |
| | 1 | 100[d] | 27 | / | 18 |
| EtOH | 0,1 | 68[e] | / | / | / |
| | 1 | 100[e] | 7 | / | 33 |
| $H_2O$ | 0,1 | 0 | / | / | / |
| | 1 | 0 | / | / | / |

[a] Ekvimolarni množini **3d** in **1a** ali **3a** in **1d** smo zmešali v topilu (0,25 M), dodali 0,1 ekv. ali 1 ekv. $HBF_4$ in mešali eno uro pri 22 °C. [b] Konverzijo izhodnega DHP **3d** smo izračunali iz $^1$H NMR spektra surove reakcijske zmesi na podlagi integralov za aromatske protone in karakterističnega peaka za OOH signale DHP **3d** (9.1 ppm). [c] Porazdelitev cikličnih peroksidov po njihovi izolaciji s kolonsko kromatografijo. [d] Večinski preostanek reakcijske zmesi predstavljajo laktoni. [e] Tvorile so se tudi neciklične peroksidne spojine.

Po pričakovanjih smo v sklopu študije vpliva topil na kislinsko katalizirano ciklokondenzacijo DHP **3d** in ketone **1a** ugotovili, da reakcijo najbolj aktivirajo fluorirani alkoholi. HFIP jo je celo tako aktiviral, da so pretežno nastajali laktoni kljub zniževanju količine dodane kisline. V TFE je ciklizacija dobro potekla in nastalo je manj laktona. Ostala topila so manj aktivirala ciklizacijo, v MeCN in heksanu je prišlo do ciklizacije, vendar je nastalo veliko heksaoksonanov. Za tvorbo cikličnih peroksidov v heksanu in etanolu je bilo potrebno 10-kratno povečati količino kisline, v vodi pa do ciklokondenzacije sploh ni prišlo.

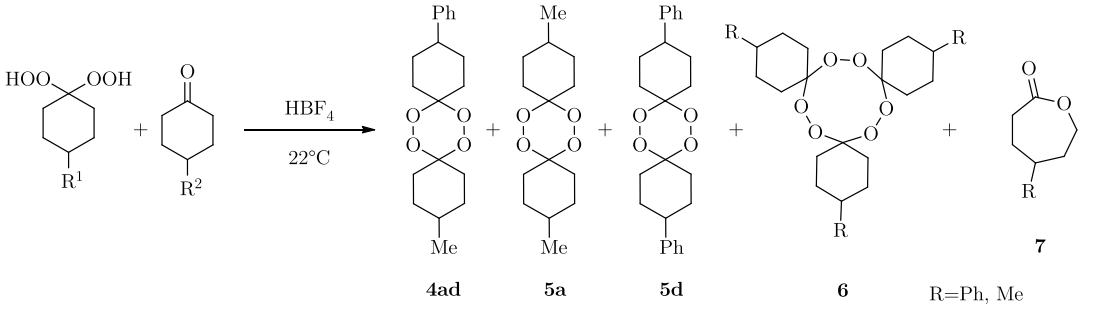
### 4.2.4 Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na obroču izhodnih spojin na selektivnost ciklizacije

Nadalje nas je zanimalo, ali ciklokondenzacija poteče enako ne glede na to, katera izmed izhodnih spojin je v ketonski obliki in katera v dihidroperoksidni. Vpliv reaktivnosti izhodnih spojin na selektivnost tvorbe cikličnih peroksidov smo preverili s primerjavo nastalih produktov v reakcijah, kjer smo zamenjali vlogi DHP in ketona. Primerjavo smo opravili na treh primerih, kjer smo pri sintezi nesimetričnega TO kombinirali po dve spojini z različno reaktivnostjo cikloheksanonskega obroča za Baeyer-Villigerjevo oksidacijo in opazovali izkoristek ter selektivnost tvorbe nesimetričnega TO. Nesimetrični TO **4ad** ima le eno od izhodnih spojin močno podvrženo Baeyer-Villigerjevi oksidaciji

(**1a**), nesimetrični TO **4bc** nobene, TO **4ak** pa obe. Osnovni cikloheksanoni se razlikujejo tudi po reaktivnosti za reakcijo dihidroperoksidacije (**1k** > **1a** > **1c** ~ **1b** > **1d**).

Predhodno smo že ugotovili, da v reakciji z 0,2 ekv. $HBF_4$ v TFE pri 22 °C po eni uri nastane 67 % nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana **4ad** iz (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a**. Za primerjavo smo pri enakih pogojih nastavili reakcijo z zamenjanima vlogama izhodnih spojin, in sicer med 1,1-dihidroperoksi-4-metilcikloheksanom **3a** in 4-fenilcikloheksanonom **1d**. Pri istih reakcijskih pogojih je nastalo 96 % cikličnih peroksidnih produktov – poleg nesimetričnega TO **4ad** (52 % vseh cikličnih peroksidov) so nastali tudi HO **6** (37 % vseh cikličnih peroksidov) in simetrični TO **5a** (12 % vseh cikličnih peroksidov) (Tabela 4.6). Tudi v spremenjenih pogojih, ko smo reakcijo izvajali v MeCN z 1 ekv. $HBF_4$ (22 °C, 5 min), smo dobili višje izkoristke nastalih cikličnih peroksidov (61 % oz. 47 %), ko smo za ciklizacijo uporabili DHP **3d** in keton **1a**. Nasprotno kot v TFE pa zamenjava položaja substituent v reakciji ciklizacije v MeCN ni bistveno vplivala na distribucijo cikličnih peroksidov, saj je v obeh primerih skoraj selektivno nastal nesimetrični TO **4ad**.

Tabela 4.6: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4ad.**[a]



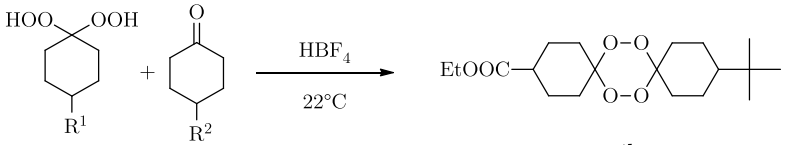

| $R^1$ | $R^2$ | $HBF_4$ (ekv.) | topilo | t (min) | Izkoristek nastalih produktov[a] 4ad (%) | 5a (%) | 5d (%) | 6 (%) | 7 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ph (**3d**) | Me (**1a**) | 0,2 | TFE | 60 | 67 | / | / | / | 33 |
| Me (**3a**) | Ph (**1d**) | | | | 50 | 11 | / | 35 | 4 |
| Ph (**3d**) | Me (**1a**) | 1 | MeCN | 5 | 61 | 4 | / | / | 35 |
| Me (**3a**) | Ph (**1d**) | | | | 47 | / | / | / | 53 |

[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin (**3d** in **1a**, **3a** in **1d**) smo zmešali v topilu (0,25 M), dodali 0,2 ekv. ali 1 ekv. $HBF_4$ in mešali 1 h ali 5 min pri 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili ciklične perokside od laktonov, izračunali distribucijo med njimi in preračunali izkoristke za posamezni produkt.

Nadalje smo naredili analogno študijo na dveh podobno reaktivnih 4-substituiranih cikloheksanonskih derivatih (*terc*-butil **1c** in COOEt **1b**). Z uporabo prej omenjenih pogojev (0,2 ekv. $HBF_4$, TFE, 22 °C, 1 h) smo najprej iz DHP **3b** in ketona **1c** sintetizirali nesimetrični TO **4bc** s 53 % izkoristkom (Tabela 4.7). Kljub temu, da nobena od izhodnih spojin ni močno podvržena Baeyer-Villigerjevi oksidaciji, pa je pri zamenjanih funkcionalnih skupinah pri izhodnih spojinah (DHP **3c** in keton **1b)** pri enakih pogojih nastalo le 35 % nesimetričnega TO **4bc**. Razlog za nižji izkoristek TO **4bc** je bila preferenčna tvorba simetričnega TO **5c** iz DHP **3c**, le-ta pa je med postopkom ciklizacije tudi delno razpadel v keton **1c** in lakton **7c**. Pri obeh reakcijah so nastali še številni drugi stranski produkti (simetrična TO **5b** in **5c**, lakton **7b**), pri reakciji med DHP **3b** in ketonom **1c** pa je ostalo še nekaj nezreagiranega ketona. Potem smo preverili še pogoje v MeCN (1 ekv $HBF_4$, MeCN, 22 °C, 5 min) in po reakciji izolirali

35 % oz. 36 % nesimetričnega TO **4bc** ne glede na položaj substituent izhodnih spojin. Stranski produkti pri obeh reakcijah so bili enaki kot pri reakcijah v TFE, vendar pa se pri sintezi **4bc** DHP **3c** ni večinsko pretvoril v simetrični TO **5c,** ampak v lakton **7c**. Položaj substituent očitno ne vpliva na izkoristek nesimetričnega TO, če sta oba izhodna DHP podobno reaktivna in če izvajamo reakcijo v topilu, ki samo po sebi dodatno ne aktivira reakcij peroksidov.

Tabela 4.7: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4bc**.[a]




**3** **1** **4bc**

| $R^1$ | $R^2$ | $HBF_4$ (ekv) | topilo | t (min) | Izkoristek 4bc (%)[b] |
|---|---|---|---|---|---|
| COOEt (**3b**) | tBu (**1c**) | 0,2 | TFE | 60 | 53 |
| tBu (**3c**) | COOEt (**1b**) | | | | 35[c, d] |
| COOEt (**3b**) | tBu (**1c**) | 1 | MeCN | 5 | 35 |
| tBu (**3c**) | COOEt (**1b**) | | | | 36[c] |

[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin (**3b** in **1c**, **3c** in **1b**) smo zmešali v topilu (0,25 M), dodali 0,2 ekv. ali 1 ekv. $HBF_4$ in mešali 1 h ali 5 min pri 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili TO **4bc** od ostalih produktov in izračunali izkoristek sinteze. [b] Preostanek reakcijske zmesi so predstavljali TO **5b**, TO **5c**, lakton **7b** in keton **1c**. [c] V preostanku reakcijske zmesi je bil tudi lakton **7c**. [d] Glavni stranski produkt je bil TO **5c**.

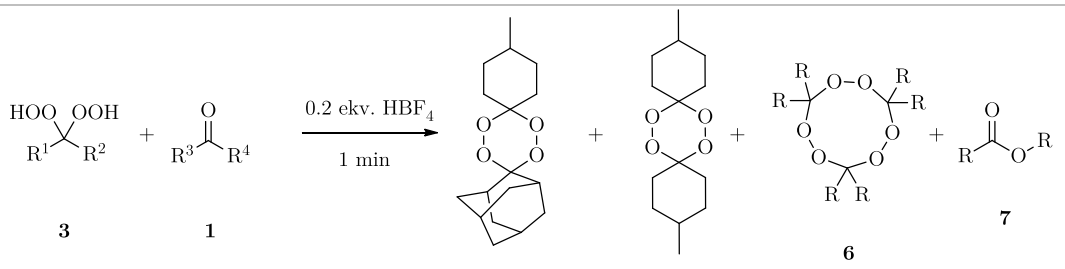
Zadnji modelni strukturni par sta bila DHP in keton s 4-metilcikloheksanskim in adamantanskim skeletom, ki sta oba tekom ciklizacije močneje podvržena Baeyer-Villigerjevi oksidaciji. To je še posebej izrazito pri spojinah z adamantanskim skeletom, saj je bil kljub številnim sinteznim metodam za pridobivanje tetraoksanov simetrični TO z dvema adamantilidenskima pridobljen le z ozonolizo, pa še to z zelo nizkim izkoristkom (4 %) [135]. Zaradi podvrženosti razpadu v lakton smo reakcijski čas med paroma 1,1-dihidroperoksi-4-metilcikloheksanom **3a** in adamantan-2-onom **1k** oz. 2,2-dihidroperoksiadamantanom **3k** in 4-metilcikloheksanonom **1a** z 0,2 ekv. kisline v TFE pri 22 °C skrajšali na 1 minuto. Ko sta v takih pogojih reagirala DHP **3k** in 4-metilcikloheksanon **1a**, smo med tetraoksani večinsko izolirali simetrični TO **5a** (68 %, Tabela 4.8), ostalo je bil nesimetrični TO **4ak** (32 %, Tabela 4.8). Množinsko razmerje med TO **4ak** in **5a** se je prevesilo v korist nesimetričnega TO **4ak** (**4ak**:**5a**=57:43, Tabela 4.8), ko smo pri enakih pogojih zamenjali skelet izhodnih spojin in uporabili DHP **3a** in adamantanon **1k**, saj je DHP **3a** manj reaktiven za Baeyer-Villigerjevo oksidacijo od DHP **3k**. V obeh primerih je bil izkoristek sinteze nesimetričnega TO **4ak** nizek, 13 % oz. 17 % (Tabela 4.8), zaradi poudarjenega razpada nastalih TO v laktone.

Ko sta bila oba izhodna DHP podvržena reakciji Baeyer-Villigerjeve premestitve, je bila razlika v aktivaciji in selektivnosti ciklizacije med fluoriranimi alkoholi in acetonitrilom zelo očitna. Ko smo opravili enominutno reakcijo z 0,2 ekv. $HBF_4$ v MeCN, je v primeru reakcije med DHP **3k** in ketonom **1a** prišlo do pretežnega razpada izhodnega DHP **3k** v lakton. Manjši delež izhodnih spojin je cikliziral, med cikličnimi peroksidi so prevladovali heksaoksonani (19 %), tvorba TO je bila manjša. Ko smo zamenjali položaj hidroperoksidne skupine izhodnih spojin in opravili reakcijo med DHP **3a** in ketonom **1k**, pa izhodni spojini sploh nista reagirali med sabo. DHP **3a** je

popolnoma cikliziral v simetrični TO **5a**, keton **1k** pa je ostal v reakcijski zmesi nespremenjen.

Preverili smo tudi možnosti povišanja izkoristka sinteze TO **4ak** v TFE z znižanjem reakcijske temperature na 0 °C, da bi se zmanjšali razpad TO **4ak** v Baeyer-Villigerjeve produkte. To nam ni uspelo, daj smo v teh pogojih naleteli na veliko tvorbo heksaoksonanov. Ponovno smo primerjali vpliv položaja hidroperoksidne in ketonske skupine izhodnih spojin, zato smo nastavili reakcijo med DHP **3k** in 4-metilcikloheksanonom **1a** ter DHP **3a** in adamantanonom **1k** (Tabela 4.8). Spet smo potrdili, da je za sintezo TO **4ak** slednja izbira boljša, saj je bil izkoristek cikličnih peroksidov 10 % višji (52 %, Tabela 4.8), distribucija pa bolj v korist nesimetričnega TO **4ak**.

Tabela 4.8: Vpliv položaja hidroperoksidnih skupin na selektivnost tvorbe nesimetričnega TO **4ak**.[a]




| DHP (3) | keton (1) | topilo | T (°C) | Izkoristek produktov[a] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4ak (%) | 5a (%) | 6 (%) | 7 (%) |
| **3k** | **1a** | TFE | 22 | 13 | 28 | / | 59 |
| **3a** | **1k** | | | 17 | 13 | / | 70 |
| **3k** | **1a** | MeCN | 22 | 4 | 4 | 19 | 73 |
| **3a** | **1k** | | | / | 100[b] | / | / |
| **3k** | **1a** | TFE | 0 | 7 | 9 | 25 | 58 |
| **3a** | **1k** | | | 26 | 4 | 22 | 48 |

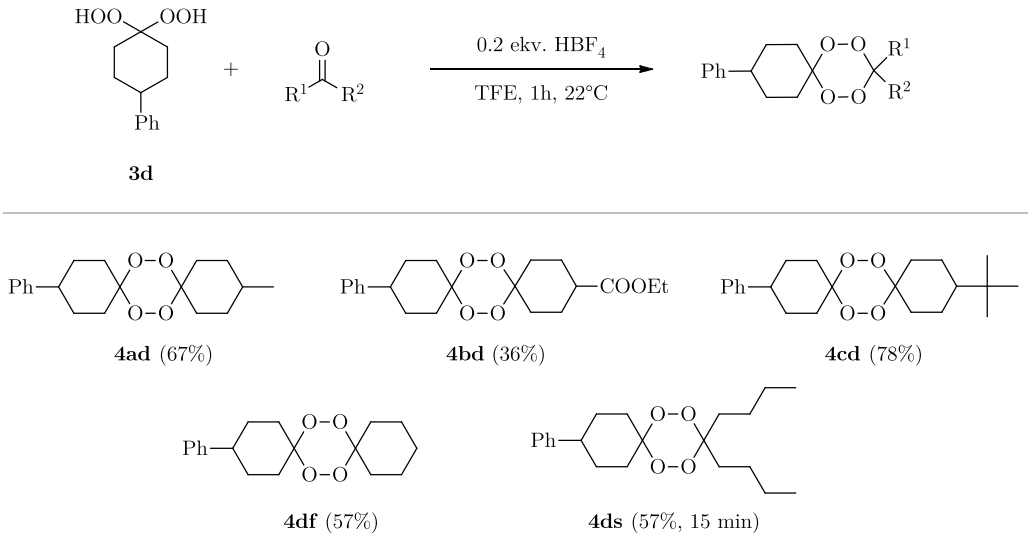
[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin (**3k** in **1a**, **3a** in **1k**) smo zmešali v TFE (0,25 M), dodali 0,2 ekv. $HBF_4$ in mešali 1 min pri 0 °C ali 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili ciklične perokside od laktonov, izračunala distribucijo med njimi in preračunala izkoristke za posamezni produkt. [b] Izhodni keton **1k** ni reagiral z DHP **3a** in je ostal nespremenjen v reakcijski zmesi.

Iz zgornjih treh primerov, pri katerih smo primerjali vpliv položaja hidroperoksidne in ketonske skupine na tvorbo nesimetričnih TO, je jasno, da reaktivnosti izhodnega DHP in ketona odločilno vplivata na nastanek produktov. Višjo selektivnost tvorbe nesimetričnega TO dosežemo z uporabo DHP tistega ketona, ki je manj reaktiven za reakcijo dihidroperoksidacije, bolj reaktivnega pa uporabimo v ketonski obliki. Podobno velja tudi za reaktivnost ketona za Baeyer-Villigerjevo oksidacijo, kjer je zopet bolje predhodno pretvoriti manj reaktiven keton v DHP in bolj reaktivnega uporabiti kot keton za ciklokondenzacijo. Zaradi občutljivosti ciklokondenzacije DHP in ketona pa ni mogoče uporabiti univerzalnih reakcijskih pogojev, ampak je potrebna optimizacija reakcijskih pogojev (temperatura, čas, količina kisline) za vsak posamezen substrat.

### 4.2.5 Vpliv reaktivnosti ketona na ciklokondenzacijo z DHP 3d

Potem ko smo ugotovili, da je pri sintezi nesimetričnega TO **4ad** bolje uporabiti DHP **3d** kot **3a**, smo želeli preveriti, kakšen vpliv ima reaktivnost ketona na sintezo nesimetričnih TO.

Najboljše reakcijske pogoje iz prejšnjega poglavja (0,2 ekv. $HBF_4$, TFE, 22 °C, 60 min) smo tako poskušali uporabiti pri sintezi drugih nesimetričnih TO iz (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in različnih ketonov oz. aldehidov. Ko je DHP **3d** reagiral z etil 4-oksocikloheksilkarboksilatom **1b**, 4-*terc*-butilcikloheksanonom **1c** oz. cikloheksanonom **1f**, je med cikličnimi peroksidi selektivno nastal ustrezen nesimetrični TO. S pomočjo kolonske kromatografije smo izolirali nesimetrične TO **4bd**, **4cd** in **4df** z izkoristki 36–78 % (Shema 4.19). Nadalje smo testirali aciklični alifatski keton in v primeru reakcije med DHP **3d** in 5-nonanonom **1s** je po enourni reakciji poleg nesimetričnega TO **4ds** nastal tudi simetrični TO **5d** (5 %). Nastanku slednjega smo se izognili s skrajšanjem reakcijskega časa na 15 min, **4ds** pa smo izolirali z 57 % izkoristkom.

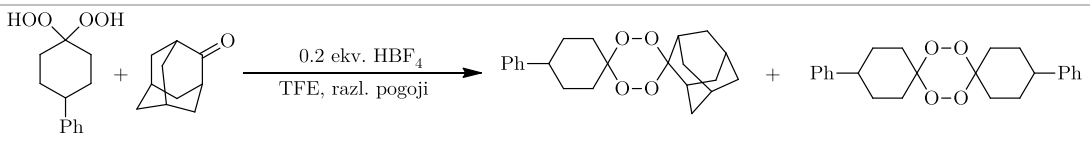



Shema 4.19: Sinteza nesimetričnih TO iz DHP **3d**.

Kot smo razložili in še dodatno pokazali v poglavju o študiji vpliva substituent, je adamantanski skelet močno podvržen Baeyer-Villigerjevi oksidaciji. To nas je napeljalo, da smo še dodatno raziskali pogoje ciklizacije DHP **3d** in adamantan-2-ona **1k** v nesimetrični TO **4dk**. Za ciklizacijo DHP **3d** in adamantan-2-ona **1k** (Tabela 4.9) so prej uporabljeni pogoji (0,2 ekv. $HBF_4$, TFE, 22 °C, 60 min) preveč aktivirajoči, saj je poleg nesimetričnega TO **4dk** nastal še simetrični TO **5d** (**4dk**:**5d**=77:23, Tabela 4.9). S skrajšanjem reakcijskega časa na 1 minuto sta se izkoristek nastalih cikličnih peroksidov in distribucija praktično ohranila, po pričakovanjih je bilo nekaj procentov manj **5d**, nastali pa so tudi HO (6 % vseh cikličnih peroksidov, Tabela 4.9). Kljub temu, da je po enominutni reakciji ostalo še nekaj nezreagiranih izhodnih spojin, pa smo v reakcijski zmesi že opazili znaten delež adamantanskega laktona, zato smo nastavili reakcijo pri 0 °C in po enourni reakciji z 0,2 ekv. $HBF_4$ je ob podobnem izkoristku cikličnih peroksidov (58 %) poleg TO **4dk** nastalo tudi nekaj simetričnega TO (6 % vseh cikličnih peroksidov). Reakcijski čas smo zato skrajšali na 5 minut in v reakciji je selektivno nastal nesimetrični TO **4dk**, ki smo ga izolirali s 47 % izkoristkom. Izkoristek smo želeli

povečati s še dodatnim skrajšanjem reakcije, in sicer na 1 minuto, vendar reakcija ni potekla do konca.

Tabela 4.9: Sinteza nesimetričnega tetraoksana **4dk** iz adamantanona **1k.**




**3d** **1k** **4dk** **5d**

| T (°C) | čas (min) | ciklični peroksidi (%)[a] | Distribucija cikličnih peroksidov[b] 4dk (%) | 5d (%) | HO |
|---|---|---|---|---|---|
| 22 | 60 | 55 | 77 | 23 | / |
| 22 | 1 | 52[c] | 76 | 18 | 6 |
| 0 | 60 | 58 | 93 | 7 | / |
| 0 | 5 | 47 | 100 | / | / |
| 0 | 1 | 14[c] | 100 | / | / |

[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin **3d** in **1a** smo zmešali v TFE (0,25 M), dodali 0,2 ekv. $HBF_4$ in mešali 1–60 min pri 0 °C ali 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili ciklične perokside od laktonov, izračunali distribucijo med njimi in preračunali izkoristke za posamezni produkt. [b] Skupni izkoristek cikličnih peroksidov po ločitvi cikličnih peroksidov s kolonsko kromatografijo od preostalih komponent reakcijske zmesi. [b] Distribucijo cikličnih peroksidov smo določili s pomočjo $^1$H NMR spektra iz zmesi cikličnih peroksidov po kolonski kromatografiji. [c] Nepopolna konverzija izhodnega DHP.

Raziskali smo tudi možnost sinteze nesimetričnih TO iz DHP **3d** in aldehidov v TFE z 0,2 ekv. $HBF_4$ (22 °C, 60 min). Ciklizacijo DHP **3d** z benzaldehidom **1p** ali oktanalom **1m** v nesimetrični TO je spremljala stranska reakcija tvorbe simetričnih tetraoksanov in heksaoksonanov. Nastalih nesimetričnih in simetričnih TO ter heksaoksonanov nismo uspeli ločiti med seboj s kolonsko kromatografijo, zato smo analizirali sestavo zmesi cikličnih peroksidov z NMR spektroskopijo. Na podlagi analize zmesi cikličnih peroksidov po ločitvi le-teh s kolonsko kromatografijo od necikličnih komponent reakcijske zmesi smo ugotovili, da je pri ciklizaciji DHP **3d** z benzaldehidom **1p** neselektivno nastalo 77 % tetraoksanov, poleg nesimetričnega TO **4dp** sta se tvorila tudi oba simetrična TO **5d** in **5p**. V enakih pogojih je pri poskusu ciklizacije DHP **3d** in oktanala **1m** nastala zmes različnih cikličnih peroksidov, poleg nesimetričnega TO **4dm** in simetričnega TO **5d** še heksaoksonani. Vzrok za slabo selektivnost tvorbe nesimetričnih TO iz DHP in aldehidov je najverjetneje prevelika reaktivnost aldehidov, ki se delno peroksidirajo že v prisotnosti DHP, kar močno poveča verjetnost tvorbe simetričnih TO, heksaoksonanov in ostalih peroksidnih produktov ter posledično negativno vpliva na selektivnost tvorbe nesimetričnih TO po dodatku kisline.

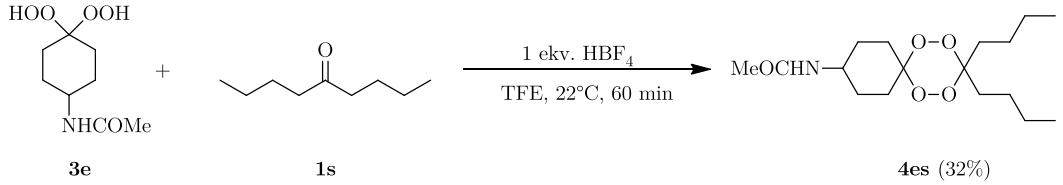
### 4.2.6 Vpliv reaktivnosti DHP na ciklokondenzacijo s ketonom

Raziskovanje smo nadaljevali z eksperimenti, ki bi nam pojasnili, kako je učinkovitost ciklizacije odvisna od strukture DHP. Predhodno uporabljene pogoje za sintezo TO **4ad** (0,2 ekv. $HBF_4$, TFE, 22 °C, 60 min) smo poskušali prenesti na sintezo drugih 1,2,4,5-tetraoksanov iz različnih DHP in 4-metilcikloheksanona **1a** kot modelnega ketona.

Za ciklizacijo DHP **3c** s ketonom **1a** smo z uporabo prej omenjenih pogojev v TFE uspeli sintetizirati nesimetričen TO **4ac**, vendar smo izolirali še simetrični TO **5c** (množinsko razmerje **4ac**:**5c**=90:10, Tabela 4.10). Temu smo se izognili s 50 % znižanjem količine dodane kisline (0,1 ekv.) in izolirali čist TO **4ac** s 70 % izkoristkom (Tabela

4.10). Tudi pri sintezi **4ab** so ti pogoji zelo aktivirajoči in poleg nesimetričnega TO **4ab** je nastal tudi simetrični TO **5b**, vendar sta se tetraoksana med seboj dovolj razlikovala v polarnosti in smo ju uspešno ločili s kolonsko kromatografijo. Pri sintezi **4ab** s prepolovljenim dodatkom kisline (0,1 ekv. $HBF_4$) smo dosegli 67 % izkoristek, ki je bil 14 % boljši od izkoristka v prej optimiziranih pogojih, predvsem na račun manjše konverzije DHP **3c** v tetraoksan **5c**. Podobno visok izkoristek (57 %) tvorbe nesimetričnega TO **4ab** smo dobili, ko smo opravili enominutno reakcijo med DHP **3b** in ketonom **1a** v TFE in v prisotnosti 1 ekv. $HBF_4$.

Nato smo se usmerili v DHP z amidno funkcionalno skupino, ki omogoča nadaljnjo funkcionalizacijo. Pri ciklizaciji DHP N-(4,4-dihidroperoksicikloheksil)acetamida **3e** in ketona **1a** v prisotnosti 0,2 ekv $HBF_4$ smo imeli po dvofazni ekstrakciji namreč veliko izgubo mase, saj je ostalo še dosti nezreagiranega DHP **3e**, ki je ostal v vodni fazi. V organski fazi je poleg nesimetričnega TO **4ae** in HO ostalo veliko nezreagiranega ketona **1a**. S povečanjem količine kisline na 1 ekv. smo dosegli boljšo konverzijo in izolirali smo nesimetričen TO **4ae** s 60 % izkoristkom, z znižanjem reakcijskega časa na 30 minut pa smo povečali izkoristek še za 10 % (Tabela 4.10). Tudi DHP iz piperidona **3t** je reagiral pod enakimi reakcijskimi pogoji in izolirali smo 87 % TO **4at** (Tabela 4.10). DHP z amidno skupino **3e** smo ciklizirali še z alifatskim ketonom 5-nonanonom **1s**, prav tako v prisotnosti 1 ekv. $HBF_4$, in po enourni reakciji izolirali 32 % nesimetričnega TO **4es** (Shema 4.20).

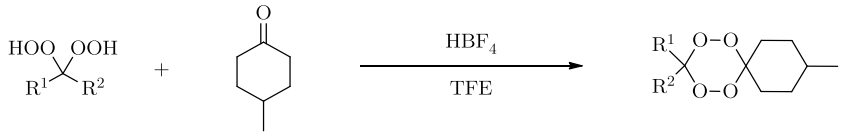



**3e** **1s** **4es** (32%)

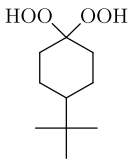
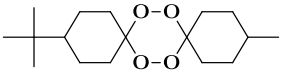
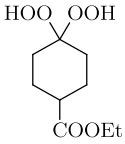
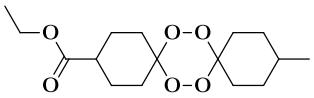
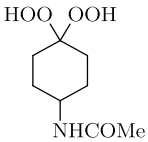
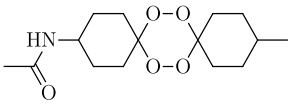
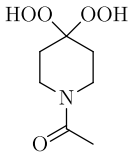
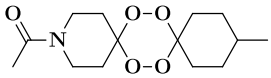
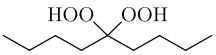
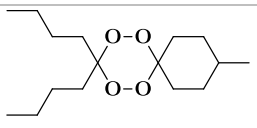
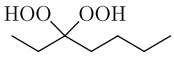
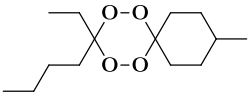
Shema 4.20: Sinteza nesimetričnega TO **4es.**

Ciklizacija alifatskih DHP **3s** in **3u** s ketonom **1a** z 0,2 ekv. $HBF_4$ v TFE ni bila mogoče pri 22 °C, saj je med ciklizacijo prišlo do nastanka laktona **7a** in razpada alifatskega DHP v ustrezni keton. Reakcijsko temperaturo smo zato znižali na 0 °C. Ciklizacijo DHP **3s** in ketona **1a** smo ustavili po eni uri in izolirali 70 % nesimetričnega TO **4as**. Reakcijski čas smo pri sintezi TO **4au** še skrajšali na 15 min in izolirali 59 % produkta.

Tabela 4.10: Sinteze nesimetričnih TO iz ketona **1a** in ustreznega DHP.[a]




**3** **1a**

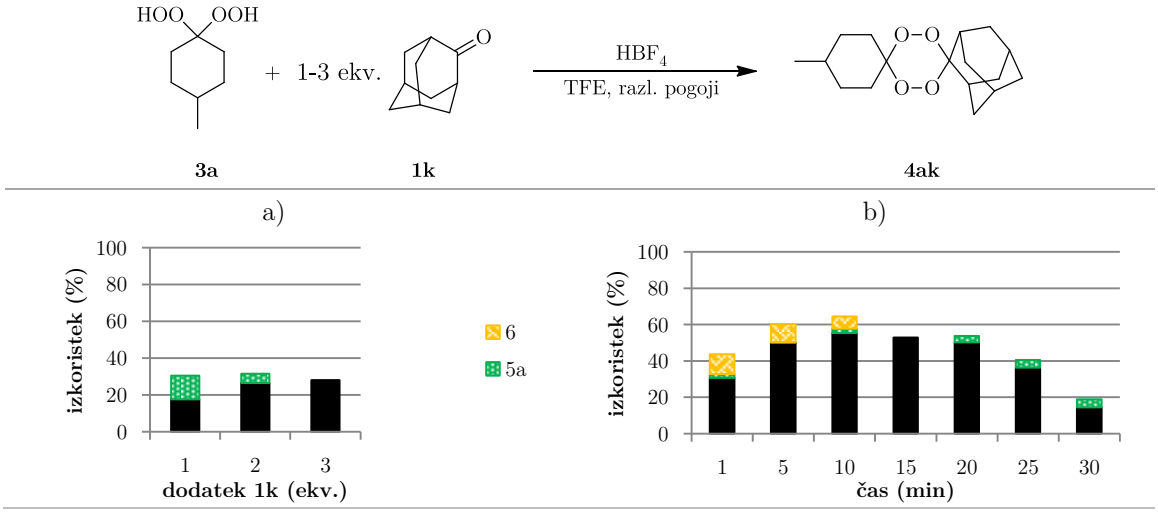
| **DHP (3)** | **$HBF_4$ (ekv)** | **T (°C)** | **čas (min)** | **Izkoristek TO 4 (%)** | **Nesimetrični TO (4)** |
|---|---|---|---|---|---|
|  **3c** | 0,2 | 22 | 60 | 50[b] |  **4ac** |
| | 0,1 | 22 | 60 | 70 | |
|  **3b** | 0,2 | 22 | 60 | 53 |  **4ab** |
| | 0,1 | 22 | 60 | 67 | |
| | 1 | 22 | 1 | 57 | |
|  **3e** | 1 | 22 | 60 | 60 |  **4ae** |
| | 1 | 22 | 30 | 70 | |
|  **3t** | 1 | 22 | 30 | 87 |  **4at** |
|  **3s** | 0,2 | 0 | 60 | 70 |  **4as** |
|  **3u** | 0,2 | 0 | 15 | 59 |  **4au** |

[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin smo zmešali v TFE (0,25 M), dodali 0,1–1 ekv. $HBF_4$ in mešali 1–60 min pri 0 °C ali 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili ciklične perokside od ostalih produktov in preračunali izkoristke za posamezni produkt. [b] Neselektivni nastanek nesimetričnega TO **4ac**, saj smo skupaj s TO **4ac** izolirali še simetrični TO **5c** (13 % izkoristek).

Med študijo vpliva položaja hidroperoksidne in ketonske skupine na potek ciklizacije smo že ugotovili, da je zelo težavna sinteza nesimetričnega TO iz spojin, ki sta obe močno reaktivni za reakcijo dihidroperoksidacije in Baeyer-Villigerjevo oksidacijo. Pri sintezi nesimetričnega TO **4ak** iz DHP **3k** in ketona **1a** so ne glede na reakcijske pogoje večinsko nastali laktoni, izkoristek TO **4ak** je bil 26 % ali manj, pa še to v zmesi s TO **5a** in/ali heksaoksonani. Zaradi kompleksnosti reakcijskega sistema smo želeli raziskati vplive reakcijskih pogojev na tvorbo nesimetričnega TO **4ak** in poiskati pogoje, v katerih bi lahko izolirali nesimetrični TO **4ak**. Glede na rezultate (Tabela 4.8) smo predvidevali, da bo to lažje doseči, če bomo za izhodne spojine izbrali DHP **3a** in keton **1k**.

Pri enominutni reakciji med DHP **3a** in ketonom **1k** z 0,2 ekv. $HBF_4$ pri 22 °C sta med cikličnimi peroksidi nastala TO **4ak** in **5a**, večinsko pa so nastali laktoni (Tabela 4.8). Nastanek simetričnega TO **5a** smo želeli zmanjšati s povečevanjem količine dodanega adamantanona **1k** v reakcijo, saj je med ciklizacijo močno podvržen reakciji Baeyer-Villigerjeve premestitve. Ko smo pri danih pogojih (0,2 ekv. $HBF_4$, 22 °C, 1 min) povišali količino adamantanona **1k** na 2 ekv., je med cikličnimi peroksidi imel največji delež TO **4ak** (Shema 4.21a). Dodaten presežek adamantanona **1k** (3 ekv.) je vodil do izolacije nesimetričnega TO **4ak** z 28 % izkoristkom (Shema 4.21a).

Pri enominutni reakciji med DHP **3a** in ketonom **1k** z 0,2 ekv. $HBF_4$ pri 0 °C se je poleg TO **4ak** tvoril tudi znaten delež HO (Tabela 4.8). Predvidevali smo, da se bo količina nastalega HO v reakciji nižala s povečevanjem količine kisline, kar smo opazili v predhodni študiji. V reakciji smo uporabili tudi presežek ketona **1k**, saj se je v prejšnjem primeru izkazalo, da zmanjša stopnjo Baeyer-Villigerjeve oksidacije med potekom ciklizacije. Najprej smo nastavili enominutno reakcijo med DHP **3a** in ketonom **1k** z 2 ekv. $HBF_4$ pri 0 °C, po kateri smo izolirali 47 % cikličnih peroksidov. V zmesi cikličnih peroksidov je bilo največ nesimetričnega TO **4ak** (70 %, Shema 4.21b), malo simetričnega TO **5a** (5 % cikličnih peroksidov) in znaten delež HO (25 % cikličnih peroksidov). Glede na manjšo stabilnost HO v primerjavi s TO smo količino nastalega HO uspeli zmanjšati s podaljšanjem reakcijskega časa (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, Shema 4.21b). Sčasoma se je zmanjševala količina nastalih HO in simetričnega TO **5a.** Po 15-minutni reakciji je v teh pogojih (2 ekv. ketona **1k**, 1 ekv. $HBF_4$, 0 °C) med cikličnimi peroksidi selektivno nastal nesimetrični TO **4ak** s 53 % izkoristkom (Shema 4.21b).



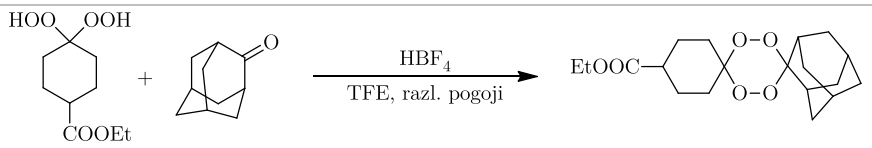

Shema 4.21: Vpliv reakcijskih pogojev na sintezo nesimetričnega TO **4ak** iz DHP **3a** in ketona **1k**. a) Vpliv količine ketona **1k** na distribucijo tvorjenih cikličnih peroksidov (0,2 ekv. $HBF_4$ v TFE, 22 °C, 1 min). b) Časovna odvisnost distribucije nastalih cikličnih peroksidov pri reakciji med DHP **3a** in 2 ekv. ketona **1k** z 1 ekv. $HBF_4$ v TFE pri 0 °C.

### 4.2.7 Sinteza nesimetričnih TO z estrsko funkcionalno skupino

Naslednji korak v našem raziskovanju je bila sinteza nekaterih nesimetričnih TO z estrsko skupino zaradi možnosti nadaljnje modifikacije te funkcionalne skupine, kar smo želeli izkoristiti pri testiranjih biološkega delovanja. Tako smo iz DHP **3b** in ustreznega ketona z 0,2 ekv. $HBF_4$ (60 min, 22 °C) sintetizirali serijo nesimetričnih TO z estrsko skupino **4ab, 4bc, 4bk, 4bm, 4bp** in **4bs** (Shema 4.22). Kot smo že poudarili pri TO **4ab**, stranska reakcija tvorbe simetričnih TO sicer niža izkoristke sinteze nesimetričnih TO z estrsko skupino, vendar pa je zaradi dovoljšne razlike v polarnosti mogoče vse TO ločiti med seboj s kolonsko kromatografijo. Sintezo nesimetričnih TO z estrsko funkcionalno skupino **4ab** in **4bc**, ki smo ju sintetizirali iz DHP **3b**, smo opisali že v prejšnjih poglavjih.

Delo smo nadaljevali s sintezo nesimetričnega TO **4bk** iz DHP **3b** in adamantanona **1k**, ki je zaradi nagnjenosti k Baeyer-Villigerjevi oksidaciji ponovno zahtevala dodatno optimizacijo reakcijskih pogojev. Zaradi nizkega izkoristka ciklizacije (28 %, Tabela 4.11) DHP **3b** in ketona **1k** z 0,2 ekv. $HBF_4$ med enourno reakcijo pri 22 °C smo se odločili izboljšati izkoristek z modifikacijo vsakega od reakcijskih pogojev (količina dodane kisline, čas, temperatura, Tabela 4.11). Tako smo prepolovili količino kisline (0,1 ekv. $HBF_4$, 60 min, 22 °C) in iz reakcijske zmesi izolirali 51 % TO **4bk**. Izkoristek se je še izboljšal za 5 %, ko smo skrajšali reakcijski čas na 5 min (0,2 ekv. $HBF_4$, 5 min, 22 °C). K izboljšanju izkoristka pa je najbolj pripomoglo znižanje temperature reakcije na 0 °C (0,2 ekv. $HBF_4$, 5 min, 22 °C), ko smo po reakciji izolirali 66 % nesimetričnega TO **4bk**.

Tabela 4.11: Vpliv reakcijskih pogojev na izkoristek sinteze TO **4bs**.[a]

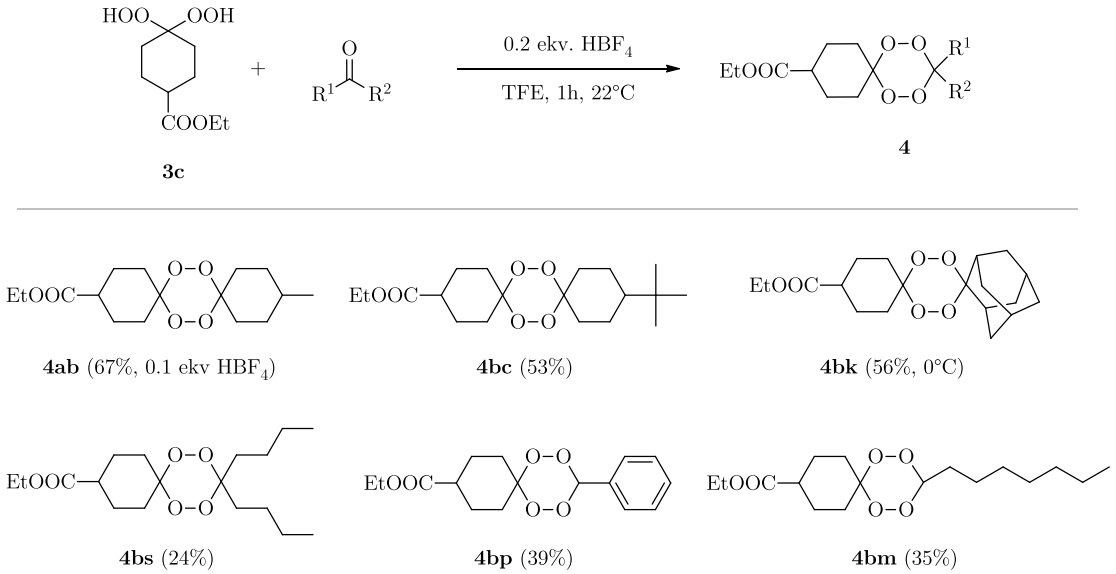



**3b** **1k** **4bk**

| $HBF_4$ (ekv) | T (°C) | čas (min) | Izkoristek TO 4bk (%) |
|---|---|---|---|
| 0,2 | 22 | 60 | 28 |
| 0,1 | 22 | 60 | 51 |
| 0,2 | 22 | 5 | 56 |
| 0,2 | 0 | 60 | 66 |

[a] Ekvimolarni množini izhodnih spojin smo zmešali v TFE (0,25 M), dodali 0,1 ali 0,2 ekv. $HBF_4$ in mešali 5 min ali 60 min pri 0 °C ali 22 °C. S pomočjo kolonske kromatografije smo ločili TO **4bk** od ostalih produktov in preračunali izkoristke za posamezni produkt.

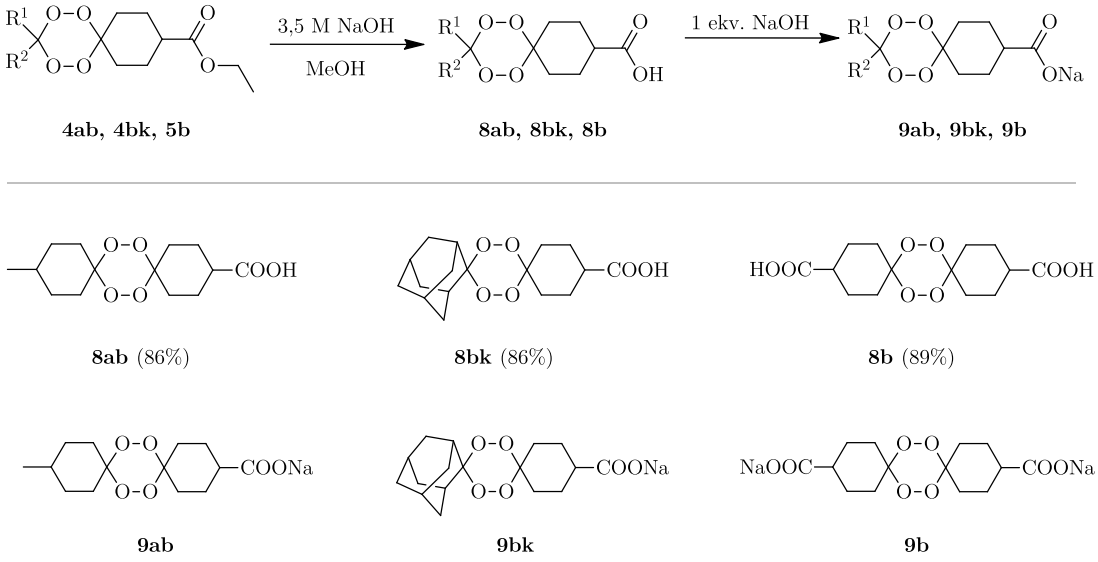
Izkoristek ciklizacije DHP **3b** in 5-nonanona **1s** v optimiziranih pogojih je bil le 24 %, saj je reaktivnost ketona **1s** slaba in zato DHP **3b** hitreje ciklizira s samim seboj v simetričen TO **5b** kot pa s ketonom **1s** v nesimetrični TO **4bs**. Pri ciklizaciji DHP **3b** z aldehidoma **1m** in **1r** smo sicer dobili mešanico različnih cikličnih in necikličnih peroksidnih produktov, vendar je bilo zaradi zadostne razlike v polarnosti nesimetričnih TO od ostalih produktov mogoče izolirati **4bp** in **4bm** z 39 % oz. 35 % izkoristkom.




Shema 4.22: Sinteza nesimetričnih tetraoksanov z estrsko skupino.

### 4.2.8 Nadaljnje kemijske pretvorbe TO z estrsko skupino

Za potrebo testiranja biološke aktivnosti tetraoksanov smo želeli pripraviti tudi bolj polarne substrate, saj imajo polarnejši TO pogosto boljše farmakokinetične lastnosti. S tem namenom smo estra TO **4ab** in **4bk** hidrolizirali z močno bazo [196] ter izolirali kislini **8ab** in **8bk**, le-ti pa potem pretvorili še v njuni pripadajoči natrijevi soli **9ab** in **9bk** (Shema 4.23). Enak postopek smo uporabili tudi za diestrski simetrični TO **5b**, iz katerega smo po hidrolizi pridobili dikislino **8b** in po nevtralizaciji z 2 ekv. natrijevega hidroksida dobili vodotopno sol **9b**.



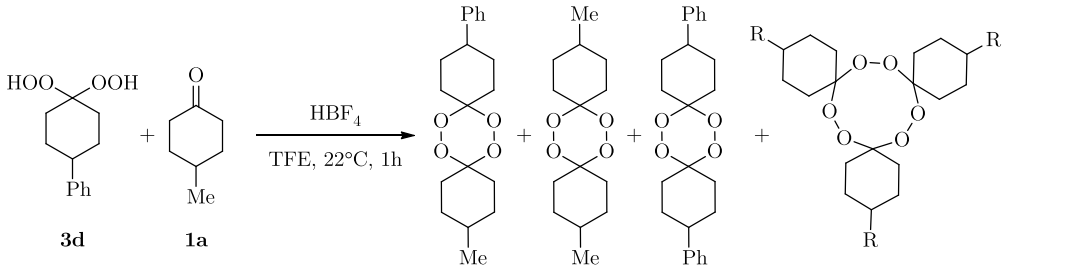

Shema 4.23: Hidroliza estrov TO **4ab**, **4bk** in **5b** ter tvorba natrijevih soli.

## 4.2.9 Eksperimentalno delo

### 4.2.9.1 Tipičen eksperimentalni postopek pri optimizaciji sinteze 3-fenil-12-metil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekana (4ad)

4-metilcikloheksanon **1a** (28 mg, 0,25 mmol) smo raztopili v 1 ml topila (TFE, MeCN ali DKM) in dodali (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** (56 mg, 0,25 mmol). V primeru izvajanja reakcije pri 0 °C smo reakcijsko zmes ohladili na 0 °C. Po dodatku ustrezne količine $HBF_4$ (0,01–2 ekv.) smo reakcijsko zmes mešali določen čas (5 min, 60 min, 24 h) pri določeni temperaturi (0 °C ali 22 °C). V reakcijsko zmes smo dolili 10 ml DKM in jo dvakrat spirali s 15 ml nasičene raztopine NaCl. Združene organske frakcije smo sušili z brezvodnim $Na_2SO_4$ in skoncentrirali na rotavaporju pod znižanim pritiskom. Ciklične peroksidne produkte smo ločili od preostale reakcijske zmesi kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM/heksan (9/1)). Na podlagi mase zbranih frakcij in množinskega razmerja med produkti, ki smo ga določili s pomočjo $^1$H NMR analize, smo izračunali izkoristek cikličnih peroksidov in razmerje med različnimi cikličnimi peroksidi. Distribucijo posameznih cikličnih peroksidov smo določili na podlagi integralov karakterističnih signalov v $^1$H NMR spektru pri -20 °C (karakteristični signal za **4ad** na 3,24–3,36 ppm in 3,01–3,16, **5a** na 3,01–3,16, **5d** na 3,24–3,36 ppm, **6** na 2,05–2,70).

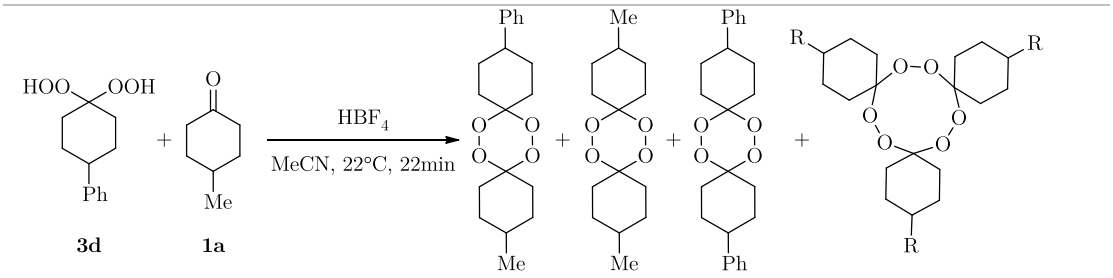
Tabela 4.12: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih substratov (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a** v TFE (22 °C, 60 min).




**3d** **1a** **4ad** **5a** **5d** **6**

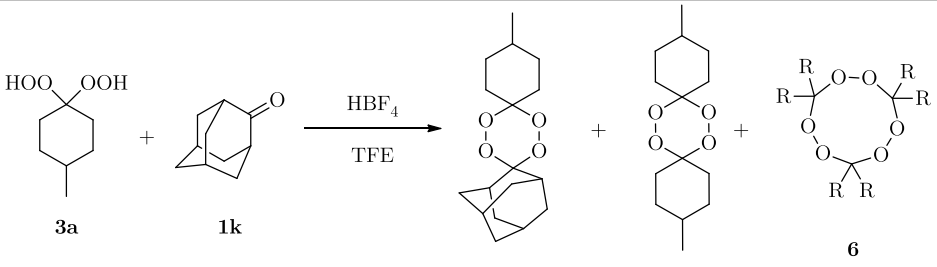
| **ekv. $HBF_4$** | **ciklični peroksidi (%)** | **Distribucija cikličnih peroksidov** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **4ad** (%) | **5a** (%) | **5d** (%) | **6** (%) |
| 2 | 17 | 1 | / | 99 | / |
| 1 | 25 | 2 | / | 98 | / |
| 0,5 | 53 | 65 | / | 35 | / |
| 0,25 | 65 | 90 | / | 10 | / |
| 0,2 | 67 | 100 | / | / | / |
| 0,15 | 73 | 97 | 3 | / | / |
| 0,1 | 67 | 88 | 13 | / | / |
| 0,05 | 70[g] | 82 | 13 | / | 5 |
| 0,01 | 88[g] | 57 | 18 | / | 25 |

Tabela 4.13: Vpliv količine $HBF_4$ na ciklizacijo modelnih substratov (4,4-dihidroperoksicikloheksil)benzena **3d** in 4-metilcikloheksanona **1a** v MeCN (22 °C, 5 min).




| ekv. $HBF_4$ | ciklični peroksidi (%) | Distribucija cikličnih peroksidov | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **4ad** (%) | **5a** (%) | **5d** (%) | **6** (%) |
| 2 | 28 | 73 | / | 27 | / |
| 1 | 65 | 94 | 6 | / | / |
| 0,5 | 79 | 71 | 14 | / | 15 |
| 0,25 | 96 | 23 | 6 | / | 71 |
| 0,1 | 92 | 15 | 3 | / | 82 |

Tabela 4.14: Izkoristek nastalih cikličnih peroksidov in njihova distribucija pri ciklizaciji 1,1-dihidroperoksi-4-metilcikloheksana **3a** in adamantan-2-ona **1k** v TFE pri različnih pogojih.

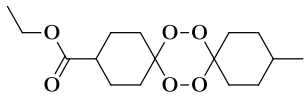



| ekv. **1k** | ekv. $HBF_4$ | T (°C) | t (min) | ciklični peroksidi (%) | Distribucija cikličnih peroksidov | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | **4ak** (%) | **5a** (%) | **6** (%) |
| 2 | 0,2 | 22 | 1 | 31 | 84 | 16 | / |
| 3 | 0,2 | 22 | 1 | 28 | 100 | / | / |
| 1 | 0,2 | 0 | 60 | 53 | 69 | 26 | 5 |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 52 | 54 | 21 | 25 |
| 2 | 1 | 0 | 1 | 44 | 70 | 5 | 25 |
| 2 | 1 | 0 | 5 | 60 | 84 | / | 16 |
| 2 | 1 | 0 | 10 | 64 | 86 | 4 | 10 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 53 | 100 | / | / |
| 2 | 1 | 0 | 20 | 54 | 93 | 7 | / |
| 2 | 1 | 0 | 25 | 40 | 90 | 10 | / |
| 2 | 1 | 0 | 30 | 19 | 77 | 23 | / |

#### 4.2.9.2 Tipičen eksperimentalni postopek za sintezo 1,2,4,5-tetraoksanov iz *gem*-dihidroperoksida 3 in karbonilne spojine 1

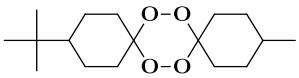
0,25 mmol predhodno pripravljenega *gem*-dihidroperoksida in 0,25 mmol ketona smo raztopili v 0,9 ml TFE in dodali 100 µl 0,5 M $HBF_4$ v TFE (0,2 ekv, 0,05 mmol): Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri 22 °C, razen če je navedeno drugače: v reakcijsko zmes smo dolili 10 ml DKM in jo dvakrat spirali s 15 ml nasičene raztopine NaCl. Združene organske frakcije smo sušili z brezvodnim $Na_2SO_4$ in skoncentrirali na rotavaporju pod znižanim pritiskom. Nesimetrični 1,2,4,5-tetraoksan smo ločili od reakcijske zmesi s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM/heksan (9/1), razen če je navedeno drugače). Strukturo 1,2,4,5-tetraoksanov **4au**, **4cd** in **4ds** smo določili na podlagi primerjave NMR spektrov s sorodnimi simetričnimi 1,2,4,5-tetraoksani.

**3-Metil-12-etoksikarbonil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4ab)**



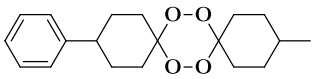
$C_{16}H_{26}O_6$, $M_r$=314,37
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 0,1 ekv. $HBF_4$
**Izkoristek:** 67 % belega prahu (53 mg)
**Tališče** 44–48 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,11–1.28 (m, 2H), 1,25 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,41–2,00 (m, 13H), 2,34–2,44 (m, 1H), 2,91 (brs, 1H), 3,02 (brs, 1H), 4,12 (q, 2H, *J*=7,2 Hz)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,11–1,28 (m, 2H), 1,26 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,45–2,03 (m, 13H), 2,35–2,47 (m, 1H), 2,86–3,10 (m, 2H), 4,12 (q, 2H, *J*=7,2 Hz)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 21,3, 21,4, 23,8 (br), 24,6 (br), 28,1 (br), 28,9 (br), 29,9, 30,4, 31,3 (br), 31,6, 31,9, 41,5, 41,7, 60,4, 107,3, 108,4, 174,5
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2928, 2869, 1728, 1458, 1438, 1365, 1342, 1319, 1259, 1191, 1176, 1126, 1096, 1064, 1046, 1020, 975, 990, 939, 912, 896, 884, 862.
**HR-MS** [$MNa^+$] izračunano za $C_{16}H_{26}O_6Na$: 337,1587; izmerjeno: 337,1636.

**3-Metil-12-*terc*-butil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4ac)** [144]



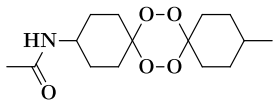
$C_{17}H_{30}O_4$; $M_r$=298,41
**Izhodne spojine:** 51 mg DHP **3d** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 0,1 ekv $HBF_4$, 22 °C, 60 min
**Izkoristek:** 70 % belega prahu (52 mg)
**Tališče** 156–159 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,86 (2s, 9H), 0,92 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,02–1,36 (m, 5H), 1,40–1,91 (m, 11H), 3,05 (br, 1H), 3,17 (br, 1H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,86 (s, 9H), 0,92 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,02–1,36 (m, 5H), 1,41–1,85 (m, 11H), 3,02–3,14 (1H, m), 3,14–3,23 (1H, m).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,4, 21,5, 22,8 (br), 33,1 (br), 27,5, 27,6, 29,0 (br), 29,9 (br), 30,4 (br), 31,2 (br), 31,4 (br), 31,6, 31,7, 31,9 (br), 32,3, 47,4, 47,5 (2s), 108,1 (2s).
**IR $\nu_{max}$** ($cm^{-1}$) 2948, 2867, 1439, 1367, 1346, 1314, 1259, 1195, 1097, 1066, 1048, 1011, 978, 936, 906.

**3-Fenil-12-metil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4ad)**



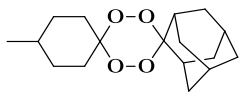
$C_{19}H_{26}O_4$, $M_r$=318,41
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 28 mg ketona **1a**
**Izkoristek:** 67 % poltrdne snovi (52 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,91–0,95 (m, 3H), 1,14–1,34 (m, 2H), 1,40–1,94 (m, 13H), 2,55–2,66 (m, 1H), 3,07 (br, 1H), 3,28 (br, 1H), 7,16–7.33 (m, 1H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,91–0,95 (m, 3H), 1,12–1,32 (m, 2H), 1,41–1,97 (m, 13H), 2,56–2,70 (m, 1H), 3,01–3,16 (m, 1H), 3,24–3,36 (m, 1H), 7,20–7,36 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,4, 21,5, 29,6 (br), 31,4 (br), 31,6, 31,7, 43,5, 43,6, 107,7, 107,9, 108,3, 108,4, 126,2, 126,8, 128,4, 145,8
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2933, 2902, 2859, 1731, 1466, 1443, 1377, 1358, 1339, 1320, 1278, 1243, 1192, 1176, 1129, 1103, 1091, 1058, 1022, 994, 924, 894, 862, 753
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_{19}H_{26}O_4$: 71,67 % C, 8,23 % H, 20,10 % O; izmerjeno: 71,89 % C, 7,84 % H.

**3-Acetamido-12-*metil*-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4ae)**



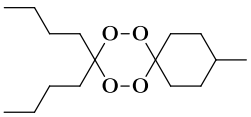
$C_{15}H_{25}NO_5$, $M_r$=299,36
**Izhodne spojine:** 51 mg DHP **3e** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 1 ekv. $HBF_4$, 30 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/MeOH (20/1)
**Izkoristek:** 70 % belega prahu (52 mg)
**Tališče** 147–149 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,13–1,28 (m, 2H), 1,38–1,85 (m, 11H), 1,86–1,97 (m, 2H), 1,97 (s, 3H), 3,00 (br, 2H), 3,82–3,96 (m, 1H), 5,33–5,39 (2d, 2H, *J*=8,3 Hz).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,10–1,27 (m, 2H), 1,34–1,85 (m, 11H), 1,86–2,01 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 3,01–3,12 (m, 2H), 3,83–3,97 (m, 1H), 5,51 (d, 1H, *J*=8,3 Hz), 5,56 (d, 1H, *J*=8,3 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,3, 21,4, 23,4, 27,5 (br), 28,1 (br), 28,9 (br), 29,9 (br), 30,3 (br), 31,2 (br), 31,6, 47,0, 47,1, 107,0, 108,4, 169,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3307, 2927, 2870, 1637, 1547, 1464, 1440, 1358, 1259, 1241, 1075, 1047, 1005, 975, 896.
**HR-MS** [$MH^+$] izračunano za $C_{15}H_{26}NO_5$: 300,1811; izmerjeno: 300,1814.
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_{15}H_{25}NO_5$: 60,18 % C, 8,42 % H, 4,68 % N, 26,72 % O; izmerjeno: 59,90 % C, 8,31 % H, 4,61 % N.

**Adamantan-2-spiro-3'-9'-metilcikloheksil-1',2',4',5'-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4ak)** [147]



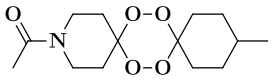
$C_{17}H_{26}O_4$, $M_r$=294,39
**Izhodne spojine:** 40 mg DHP **3a** in 75 mg ketona **1k** (2 ekv.)
**Pogoji:** 1 ekv. $HBF_4$, 0 °C, 15 min
**Izkoristek:** 40 % poltrdne snovi (29 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,11–1,37 (m, 2H), 1,37–2,11 (m, 19H), 3,06 (br, 1H), 3,21 (br, 1H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,12–1,31 (m, 2H), 1,40–1,82 (m, 13H), 1,82–2,06 (m, 6H), 3,03–3,15 (m, 1H), 3,15–3,21 (m, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,4, 27,1, 29,1 (br), 30,1 (br), 30,5 (br), 31,4 (br), 31,7, 33,1, 34,2 (br), 37,0, 108,0, 110,3.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2914, 2859, 1446. 1353, 1258, 1161, 1100, 1079, 1063, 1046, 996, 974, 922, 895.

**3,3-Dibutil-9-metil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4as)** [144]



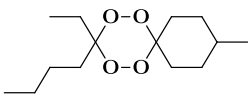
$C_{16}H_{30}O_4$, $M_r$=286,41
**Izhodne spojine:** 51 mg DHP **3s** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 0 °C, 60 min
**Izkoristek:** 70 % brezbarvnega olja (50 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,86–0,95 (m, 6H), 0,92 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,11–1,82 (m, 18H), 2,19 (br, 2H), 3,03 (br, 1H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,90 (t, 3H, *J*=6,4 Hz), 0,93 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 0,94 (t, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,11–1,76 (m, 18H), 2,15–2,31 (m, 2H), 3,01–3,13 (m, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 13,9, 21,3, 21,4, 21,5, 22,9, 24,0 (br), 25,7 (br), 29,1 (br), 30,3 (br), 31,4 (br), 31,6, 31,7, 31,8, 33,4 (br), 107,8, 108,1, 110,6, 111,0.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2955, 2931, 2963, 1457, 1446, 1380, 1338, 1312, 1261, 1199, 1152, 1098, 1048, 1006, 980, 901.

**N-Acetil-12-metil-7,8,15,16-tetraoksa-3-azadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4at)**



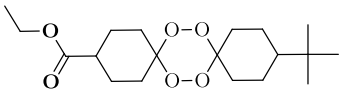
$C_{14}H_{23}NO_5$, $M_r$=285,34
**Izhodne spojine:** 48 mg DHP **3t** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 1 ekv. $HBF_4$, 30 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/MeOH (20/1)
**Izkoristek:** 87 % belega prahu (62 mg)
**Tališče** 128–130 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,94 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,12–1,30 (m, 2H), 1,43–1,80 (m, 8H), 2,12 (s, 3H), 2,43 (br, 2H), 3,04 (br, 1H), 3,52 (br, 2H), 3,67 (br, 2H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,94 (d, 3H, *J*=6,4 Hz), 1,10–1,29 (m, 2H), 1,45–1,79 (m, 8H), 2,14 (s, 1,5H), 2,16 (s, 1,5H), 2,31–2,56 (m, 2H), 3,02–3,10 (m, 1H), 3,43–3,84 (m, 4H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,3, 28,9 (br), 29,8 (br), 30,1 (br), 30,3 (br), 31,3 (br), 31,6, 37,0 (br), 38,1 (br), 41,9 (br), 42,9 (br), 106,3, 108,8, 168,8.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2955, 2926, 2870, 2858, 1634, 1464, 1440, 1426, 1346, 1267, 1240, 1162, 1074, 1042, 1005, 897.
**HR-MS** [$MH^+$] izračunano za $C_{14}H_{24}NO_5$: 286,1654; izmerjeno: 286,1660.
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_{14}H_{23}NO_5$: 58,93 % C, 8,12 % H, 4,91 % N, 28,04 % O; izmerjeno: 59,06 % C, 7,99 % H, 4,63 % N.

**3-Butil-3-etil-9-metil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4au)**



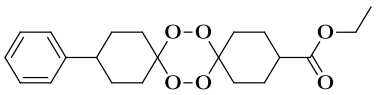
$C_{14}H_{26}O_4$, $M_r$=258,35
**Izhodne spojine:** 40,5 mg DHP **3u** in 28 mg ketona **1a**
**Pogoji:** 0 °C, 15 min
**Izkoristek:** 59 % brezbarvnega olja (38 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,89–0,98 (m, 9H), 1,12–1,82 (m, 14H), 2,08–2,41 (brs, 2H), 2,92–3,17 (brs, 1H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,87–0,98 (m, 9H), 1,11–1,80 (m, 14H), 2,16–2,37 (m, 2H), 3,00–3,13 (m, 1H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 6,7 (br), 8,0 (br), 13,9, 21,4, 22,9, 23,6 (br), 24,0 (br), 25,9 (br), 27,1 (br), 29,1 (br), 30,0 (br), 30,4 (br), 31,4 (br), 31,7, 33,0 (br), 107,8, 111,17.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2953, 2931, 2863, 1446, 1380, 1349, 1312, 1286, 1259, 1200, 1155, 1098, 1075, 1048, 1007, 977, 933, 901.

**3-*terc*-Butil-12-etoksikarbonil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4bc)** [145]



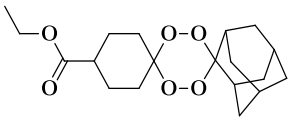
$C_{19}H_{32}O_6$, $M_r$=356.22
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 47,5 mg ketona **1c**
**Izkoristek:** 53 % belega prahu (70 mg)
**Tališče** 70–73 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,87 (s, 9H), 1,04–1,14 (m, 1H), 1,20–1,35 (m, 2H), 1,26 (t, 3H, *J*=7,1 Hz), 1,42–1,52 (m, 3H), 1,65–2,00 (m, 9H), 2,36–2,47 (m, 1H), 2,92 (brs, 1H), 3,16 (brs, 1H), 4,14 (q, 2H, *J*=7,1 Hz).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,86 (s, 9H), 1,02–1,15 (m, 1H), 1,15–1,35 (m, 2H), 1,26 (2t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,42–1,62 (m, 3H), 1,64–2,05 (m, 9H), 2,34–2,48 (m, 1H), 2,82–3,08 (m, 1H), 3,11–3,21 (m, 1H), 4,13 (2q, 2H, *J*=7,2 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 22,7 (br), 23,1 (br), 23,8 (br), 24,5 (br), 27,6, 28,1 (br), 29,7 (br), 30,2 (br), 31,8 (br), 32,0 (br),32,3, 41,5, 41,7, 47,4, 47,5, 60,4, 107,3, 108,3, 174,6.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2952, 2868, 1726, 1466, 1439, 1392, 1366, 1346, 1316, 1278, 1259, 1223, 1192, 1139, 1128, 1059, 1025, 1012, 978, 966, 929, 909, 861.
**HR-MS** [$MNa^+$] izračunano za $C_{19}H_{32}O_6Na$: 379,2097; izmerjeno: 379,2094.

**3-Fenil-12-etoksikarbonil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4bd)**



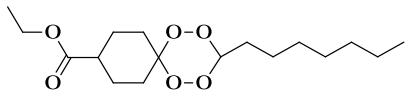
$C_{21}H_{28}O_6$, $M_r$=376,44
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 42,5 mg ketona **1b**
**Izkoristek:** 36 % poltrdne snovi (34 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,25 (t, 3H, *J*=7,1 Hz), 1,46–2,04 (m, 14H), 2,34–2,48 (m, 1H), 2,56–2,67 (m, 1H), 2,93 (brs, 1H), 3,29 (brs, 1H), 4,14 (q, 2H, *J*=7,1 Hz), 7,17–7,32 (m, 5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 1,27 (t, 3H, *J*=7,1 Hz), 1,48–2,07 (m, 14H), 2,37–2,49 (m, 1H), 2,56–2,68 (m, 1H), 2,87–3,07 (m, 1H), 3,22–3,32 (m, 1H), 4,14 (q, 2H, *J*=7,1 Hz), 7,21–7,36 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 23,9 (br), 24,7 (br), 28,2 (br), 29,6 (br), 30,3 (br), 31,9 (br), 41,5, 41,7, 43,5, 43,6, 60,4, 107,5, 107,9, 126,3, 126,8, 128,4, 145,7, 174,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2937, 2866, 1726, 1495, 1447, 1365, 1341, 1317, 1194, 1176, 1130, 1066, 1056, 935, 923, 861.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{21}H_{28}O_6Na$: 399,1784; izmerjeno: 399,1789.

**Adamantan-2-spiro-3'-9'-etoksikarbonil-1',2',4',5'-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4bk)** [122]



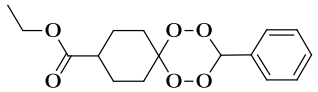
$C_{19}H_{28}O_6$, $M_r$=352,42
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 37,5 mg ketona **1k**
**Pogoji:** 60 min, 0 °C
**Izkoristek:** 56 % belega prahu (49 mg)
**Tališče** 83–86 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,24 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,47–2,00 (m, 20H), 2,37–2,47 (m, 1H), 2,91(brs, 1H), 3,15 brs, 1H), 4,13 (q, 2H, *J*=7,2 Hz)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] =1,26 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,47–2.00 (m, 20H), 2,37–2,47 (m, 1H), 2,95–3,00 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 4,13 (q, 2H, *J*=7,2 Hz)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 23,9 (br), 24,6 (br), 27,0, 28,2 (br), 30,0 (br), 33,1, 34,3 (br), 36,9, 41,6, 60,4, 107,1, 110,4, 174,5
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2933, 2902, 2859, 1731, 1466, 1442, 1378, 1360, 1320, 1278, 1243, 1222, 1192, 1174, 1130, 1103, 1090, 1059, 1042, 1023, 994, 941, 925, 894, 862.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{19}H_{28}O_6Na$: 375,1810; izmerjeno: 375,1786.

**3-Heptil-9-etoksikarbonil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4bm)**



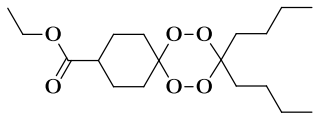
$C_{17}H_{30}O_6$, $M_r$=330,42
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 32 mg aldehida **1m**
**Izkoristek:** 35 % brezbarvnega olja (57 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,88 (t, 3H, *J*=6,7 Hz), 1,25 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,24–1,60 (m, 14H), 1,70–1,99 (m, 5H), 2,36–2,45 (m, 1H), 2,81–2,90 (m, 1H), 4,14 (q, 2H, *J*=7,2 Hz), 5,80 (t, 1H, *J*=5,3 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,0, 14,2, 22,6, 23,4, 23,7, 24,6, 28,5, 28,9, 29,2, 29,7, 30,4, 31,6, 41,6, 60,4, 107,8, 108,6, 174,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2929, 2858, 1731, 1448, 1378, 1317, 1255, 1192, 1177, 1132, 1065, 957, 938, 915, 862.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{17}H_{30}O_6Na$: 353,1940; izmerjeno: 353,1942.

**3-Fenil-9-etoksikarbonil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4bp)**



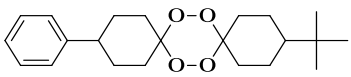
$C_{12}H_{16}O_6$, $M_r$=308,13
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 26,5 mg aldehida **1p**
**Izkoristek:** 39 % belega prahu (30 mg)
**Tališče** 71–72 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,26 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,57–2,09 (m, 7H), 2,41–2,50 (m, 1H), 2,97–3,04 (m, 1H), 4,15 (q, 2H, *J*=7,2 Hz), 6,67 (s, 1H), 7,38–7,59 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 23,9, 24,6, 28,7, 30,4, 41,5, 60,5, 107,9, 108,0, 127,5, 128,7, 131,1, 131,4, 174,5.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2985, 2957, 2939, 2872, 1729, 1456, 1443, 1433, 1362, 1317, 1295, 1258, 1196, 1178, 1126, 1064, 1037, 1008, 993, 984, 939, 921, 909, 860, 843, 754.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{12}H_{16}O_6Na$: 331,1158; izmerjeno: 331,1152.

**3,3-Dibutil-9-etoksikarbonil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4bs)**



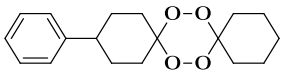
$C_{18}H_{32}O_6$, $M_r$=344,44
**Izhodne spojine:** 55 mg DHP **3b** in 35,5 mg ketona **1s**
**Izkoristek:** 24 % brezbarvnega olja (41 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,92 (m, 6H), 1,25 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,35 (m, 8H), 1,49–1,70 (m, 3H), 1,71–1,98 (m, 6H), 2,19 (brs, 2H), 2,33–2,46 (m, 1H), 2,85 (brs, 1H), 4,13 (q, 2H, *J*=7,2 Hz).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,90 (t, 3H, *J*=7,0 Hz), 0,95 (t, 3H, *J*=6,7 Hz), 1,26 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,24–1,43 (m, 8H), 1,50–1,62 (m, 3H), 1,69–2,05 (m, 6H), 2,17–2,25 (m, 2H), 2,35–2,47 (m, 1H), 2,88–2,96 (m, 1H), 4,13 (q, 2H, *J*=7,2 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 13,9, 14,2, 22,9, 24,0 (br), 25,8 (br), 28,4 (br), 29,7, 30,3 (br), 33,5 (br), 41,6, 60,4, 106,9, 111,2, 174,6.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2956, 2868, 1731, 1466, 1442, 1367, 1345, 1319, 1275, 1258, 1223, 1194, 1127, 1138, 1065, 978, 937, 928, 908, 864.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{18}H_{32}O_6Na$: 367,2097; izmerjeno: 367,2095.

**3-Fenil-12-*terc*-butil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4cd)**



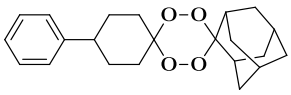
$C_{22}H_{32}O_4$, $M_r$=360,49
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 38,5 mg ketona **1c**
**Izkoristek:** 78 % belega prahu (70 mg)
**Tališče 148–152** °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,82–0,92 (m, 9H), 1,03–1,15 (m, 1H), 1,17–1,57 (m, 4H), 1,58–2,08 (m, 10H), 2,54–2,68 (m, 1H), 3,25 (brs, 2H), 7,16–7,34 (m, 5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,84–0,89 (m, 9H), 1,01–1,17 (m, 1H), 1,17–1,38 (m, 2H), 1,41–1,58 (m, 2H), 1,60–1,96 (m, 10H), 2,55–2,69 (m, 1H), 3,14–3,36 (m, 2H), 7,19–7,37 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 22,8 (br), 23,1 (br), 27,5, 27,6, 29,6 (br), 32,0 (br), 32,1, 43,5, 43,6, 47,4, 47,5, 107,6, 107,8, 108,1, 108,3, 126,2, 126,8, 128,4, 145,8.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3028, 2947, 2865, 1603, 1494, 1441, 1394, 1367, 1344, 1319, 1301, 1279, 1242, 1184, 1157, 1127, 1057, 1029, 979, 925, 903, 872.

**3-Fenil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (4df)**



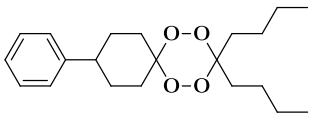
$C_{18}H_{24}O_4$, $M_r$=304,38
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 25,5 mg ketona **1f**
**Izkoristek:** 57 % belega prahu (43 mg)
**Tališče** 125–129 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,40–1,98 (m, 15H), 2,32 (brs, 2H), 2,55–2,65 (m, 1H), 3,27 (brs, 1H), 7,16–7,32 (m, 5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 1,39–1,95 (m, 15H), 2,18–2,32 (m, 1H), 2,36–2,47 (m, 1H), 2,56–2,67 (m, 1H), 3,27 (m, 1H), 7,20–7,35 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,9 (br), 22,1 (br), 25,4 (br), 29,6 (br), 31,8 (br), 43,6, 107,6, 108,3, 126,2, 126,8, 128,4, 145,8.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 3028, 2997, 2944, 2864, 1603, 1494, 1442, 1360, 1341, 1278, 1243, 1185, 1158, 1124, 1071, 1057, 1029, 980, 947, 924, 905, 872, 854, 824, 760, 700.
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_{18}H_{24}O_4$: 71,03 % C, 7,95 % H, 21,03 % O; izmerjeno: 71,02 % C, 7,84 % H.

**Adamantan-2-spiro-3'-9'-fenil-1',2',4',5'-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4dk)**



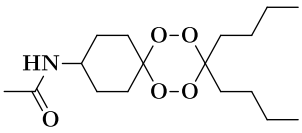
$C_{22}H_{28}O_4$, $M_r$=356.46
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 37 mg ketona **1k**
**Pogoji:** 0 °C, 5 min
**Izkoristek:** 47 % brezbarvnega olja (42 mg)
**Tališče:** 103–106 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,52–2,13 (m, 20H), 2,54–2,67 (m, 1H), 3,21 (brs, 1H), 3,28 (brs, 1H), 7,16–7,32 (m, 5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 1,58–2,06 (m, 20H), 2,57–2,68 (m, 1H), 3,18–3,25 (m, 1H), 3,26–3,35 (m, 1H), 7,20–7,37 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 27,1, 29,6 (br), 31,9 (br), 33,1, 34,2 (br), 36,9, 43,6, 107,5, 110,4, 126,2, 126,8, 128,4. 145,8.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2934, 2908, 2860, 1653, 1495, 1470, 1449, 1376, 1355, 1337, 1313, 1281, 1242, 1222, 1181, 1125, 1105, 1091, 1079, 1058, 1031, 997, 934, 925, 910, 870.
**Elementna analiza (CHNS)** izračunano za $C_{22}H_{28}O_4$: 74,13 % C, 7,92 % H, 17,95 % O; izmerjeno: 73,86 % C, 8,04 % H.

**3,3-Dibutil-9-fenil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4ds)**



$C_{21}H_{32}O_4$, $M_r$=348,48
**Izhodne spojine:** 56 mg DHP **3d** in 35,5 mg ketona **1s**
**Izkoristek:** 57 % belega prahu (50 mg)
**Tališče:** 73–77 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,84–1,02 (m, 6H), 1,23–1,48 (m, 8H), 1,49–1,99 (m, 9H), 2,24 (m, 2H), 2,55–2,67 (m, 1H), 3,24 (m, 1H), 7,16–7,34 (m, 5H).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,88–0,98 (m, 6H), 1,22–1,45 (m, 8H), 1,56–1,95 (m, 9H), 2,18–2,34 (m, 2H), 2,56–2,68 (m, 1H), 3,21–3,32 (m, 1H), 7,20–7,36 (m, 5H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 13,9, 22,9, 24,1 (br), 25,9 (br), 29,5 (br), 30,4 (br), 32,0 (br), 33,3 (br), 43,6, 107,3, 111,2, 126,2, 126,8, 128,4, 145,9.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2956, 2932, 2869, 1604, 1494, 1447, 1378, 1352, 1320, 1268, 1240, 1220, 1183, 1143, 1058, 1023, 1006, 972, 931, 921, 903, 880.

**3-Acetamido-9,9-dibutil-1,2,4,5-tetraoksaspiro[5.5]undekan (4es)**

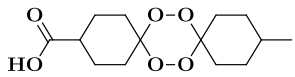


$C_{17}H_{31}NO_5$, $M_r$=329,43
**Izhodne spojine:** 51 mg DHP **3e** in 28 mg ketona **1s**
**Pogoji:** 1 ekv. $HBF_4$, 60 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/MeOH (20/1)
**Izkoristek:** 32 % belega prahu (27 mg)
**Tališče** 99–101 °C.
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,91 (m, 6H), 1,34 (m, 10H), 1,52–1,96 (m, 7H), 1,96 (3H, s), 2,08–2,30 (m, 2H), 2,95 (brs, 1H), 3,32–3,94 (m, 1H), 5,55 (1H, NH, *J*=7,9 Hz).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,87 (t, 3H, *J*=6,8Hz), 0,91 (t, 3H, *J*=6,5Hz), 1,21–1,79 (m, 10H), 1,50–1,65 (m, 3H), 1,69–1,79 (m, 2H), 1,82–1,93 (m, 2H), 1,96 (3H, s), 2,14–2,17 (m, 2H), 2,96–3,01 (d, 1H), 3,80–3,92 (m, 1H), 5,78 (d, 1H, NH, *J*=7,8 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 13,9, 22,8, 23,4, 24,1 (br), 25,7 (br), 27,7 (br), 29,9 (br), 33,3 (br), 47,0, 106,6, 111,3, 169,4.
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 3310, 2953, 2868, 1647, 1550, 1444, 1367, 1324, 1150, 1057, 915, 699.
**HR-MS** [$MH^+$] izračunano 330,2280, izmerjeno: 330,2285.

#### 4.2.9.3 Tipičen eksperimentalni postopek za hidrolizo estrov 1,2,4,5-tetraoksanov 4ab, 4bk in 5b

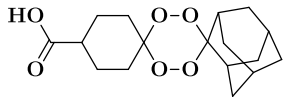
0,28 mmol predhodno izoliranega estra tetraoksana **4ab**, **4bk** ali **5b** (**5b** je bil pripravljen po objavljeni metodi [141]) smo raztopili v 4 ml metanola, dodali 200 mg NaOH in 1,5 ml destilirane vode ter mešali 2 uri pri 22 °C. Reakcijski zmesi smo dodali destilirano vodo in jo sprali s diklorometanom. Vodno fazo smo nakisali s koncentrirano HCl in nato ekstrahirali produkt z DKM (v primeru **8b** pa s $CHCl_3$/MeOH (7/3)). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim $Na_2SO_4$, skoncentrirali pod znižanim tlakom in izolirali tetraoksane **8ab, 8bk** in **8b** s karboksilno funkcionalno skupino.

**12-Metil-3-karboksi-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (8ab)**



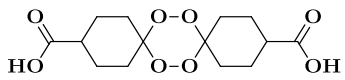
$C_{14}H_{22}O_6$, $M_r$=286,32
**Izkoristek:** 86 % belega prahu (70 mg)
**Tališče** 128–130 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 0,87 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 0,98–1,14 (m, 2H), 1,41–1,87 (m, 13H), 2,32–2,43 (m, 1H), 2,67–2,83 (m, 1H), 2,89 (brs, 1H), 12,18 (brs, 1H)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,13–1,32 (m, 2H), 1,41–2,05 (m, 13H), 2,40–2,53 (m, 1H), 2,81–3,10 (m, 2H), 12,39 (brs, 1H)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 0,93 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,11–1,28 (m, 2H), 1,45–2,01 (m, 13H), 2,40–2,53 (m, 1H), 2,90 (br, 1H), 3,01 (br, 1H), 11,17 (brs, 1H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,4, 23,6 (br), 24,4 (br), 28,0 (br), 29,0 (br), 30,3 (br), 31,4 (br), 31,6, 31,7, 41,1, 41,3, 107,2, 108,4, 180,3
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2949, 2928, 2867, 1694, 1443, 1342, 1320, 1258, 1247, 1219, 1160, 1097, 1068, 1048, 1020, 976, 932, 911, 894, 879.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_{14}H_{21}O_6$: 285,1338; izmerjeno: 285,1332.

**Adamantan-2-spiro-3'-9'-karboksi-1',2',4',5'-tetraoksaspiro[5.5]undekan (8bk)** [122]



$C_{17}H_{24}O_6$, 324,37
**Izkoristek:** 86 % belega prahu (78 mg)
**Tališče** 160–162 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,42–2,14 (m, 20H), 2,42–2,52 (m, 1H), 2,92 (brs, 1H), 3,15 (brs, 1H), 11,18 (brs, 1H)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20 °C)** δ [ppm] = 1,49–2,07 (m, 20H), 2,43–2,52 (m, 1H), 1,92–3,03 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 12,22 (br, 1H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]** = 23,7 (br), 24,4 (br), 27,0, 28,2 (br), 30,1 (br), 33,1, 34,2 (br), 36,9, 41,3, 107,0, 110,5, 180,6
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2934, 2910, 2858, 1703, 1449, 1430, 1361, 1342, 1320, 1281, 1263, 1215, 1130, 1104, 1090, 1061, 997, 938, 926, 915, 874.
**HR-MS [M-H]$^-$** izračunano za $C_{17}H_{23}O_6$: 323,1495; izmerjeno: 323,1490.

**3,12-Dikarboksi-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (8b)** [106]

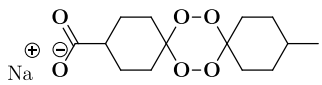


$C_{14}H_{20}O_8$, $M_r$=316,30
**Izkoristek**: 89 % belega prahu (79 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 1,43–1,91 (m, 14H), 2,33–2,45 (m, 2H), 2,73 (brs, 2H), 12,19 (brs, 2H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, DMSO-d6)** δ [ppm] = 23,7 (br), 24,4 (br), 27,6 (br), 29,7 (br), 40,5, 40,6, 107,4, 175,8
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2929, 2627, 1685, 1463, 1422, 1342, 1317, 1259, 1220, 1137, 1064, 986, 976, 935, 907, 746.
**HR-MS** [**M-H**]$^-$ izračunano za $C_{14}H_{19}O_8$: 315,1080; izmerjeno: 315,1085

### 4.2.9.4 Tipičen eksperimentalni postopek za tvorbo natrijeve soli 1,2,4,5-tetraoksanov 9ab, 9bk in 9b

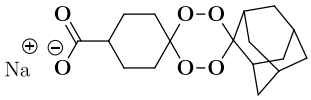
0,14 mmol predhodno izolirane kisline tetraoksana **8ab, 8bk** in **8b** smo raztopili v 1 ml metanola in dodali 0,5 ml 0,28M raztopine NaOH (v primeru **8b** 0,56M NaOH) ter mešali 1 uro pri 22 °C. Reakcijski zmesi smo dodali acetonitril, odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili kvantitativno pretvorbo v natrijevo sol **9ab**, **9bk** in **9b**.

**Natrijev 12-metil-7,8,15,16-tetraoksa-dispiro[5.2.5.2]heksadekan-3-karboksilat (9ab)**



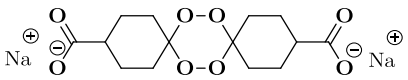
$C_{14}H_{21}NaO_6$, $M_r$=308,30
**Izkoristek:** 100 % belega prahu (48 mg)
**Tališče** 155–159 °C (mikroskop).
**$^1$H NMR (300 MHz, $D_2O$)** δ [ppm] = 0,89 (d, 3H, *J*=6,6 Hz), 1,02–1,16 (m, 2H), 1,44–1,93 (m, 13H), 2,21–2,28(m, 1H), 2,95 (brs, 2H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $D_2O$, int. stand. MeOH)** δ [ppm] = 21,2, 21,3, 26,0 (br), 28,9 (br), 30,3 (br), 31,4 (br), 31,4, 31,5, 45,7, 45,8, 109,6, 110,3, 185,0.
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2954, 2929, 2863, 1560, 1463, 1417, 1365, 1341, 1297, 1235, 1156, 1127, 1097, 1067, 1046, 989, 975, 937, 917, 884, 786.
**HR-MS** [**MH**$^+$] izračunano za $C_{14}H_{22}NaO_6$: 309,1314; izmerjeno: 309,1321.

**Natrijev adamantan-2-spiro-3'-9'-karboksilat-1',2',4',5'-tetraoksaspiro[5.5]undekan (9bk)**



$C_{17}H_{23}NaO_6$, $M_r$=346,56
**Izkoristek:** 100 % belega prahu (43 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $D_2O$)** δ [ppm] = 1,46–2,01 (m, 20H), 2,20–2,30 (m, 1H), 3,00 (brs, 1H), 3,10 (brs, 1H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $D_2O$, int. stand. MeOH)** δ [ppm] = 25,9 (br), 27,2, 30,9 (br), 33,3, 34,7 (br), 36,8, 45,7, 109,5, 112,5, 185,0
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 2907, 2858, 1560, 1449, 1408, 1363, 1344, 1228, 1132, 1105, 1091, 1079, 1060, 998, 924, 914, 886, 827, 802, 788
**HR-MS** [**MH$^+$**] izračunano za $C_{17}H_{24}NaO_6$: 347,1471; izmerjeno: 347,1467.

**Natrijev 7,8,15,16-tetraoksa-dispiro[5.2.5.2]heksadekan-3,12-dikarboksilat (9b)**



$C_{14}H_{18}O_8Na_2$, $M_r$=360,27
**Izkoristek:** 100 % belega prahu (50 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $D_2O$)** δ [ppm] = 1,47–1,88 (m, 14H), 2,20–2,29 (m, 2H), 2,97 (brs, 2H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $D_2O$)** δ [ppm] = 25,3 (br), 28,1 (br), 30,1 (br), 45,0, 109,0, 184,5
**IR $\nu_{max}$ (cm$^{-1}$)** 3394, 2958, 2868, 1573, 1544, 1412, 1366, 1340, 1292, 1264, 1232, 1185, 1132, 1072, 1060, 992, 972,940, 917,8311, 791.
**HR-MS** [**MH$^+$**] izračunano za $C_{14}H_{19}O_8Na_2$: 361,0875; izmerjeno: 361,0871.

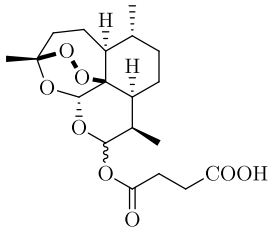
## 4.3 Vrednotenje biološkega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

Naravni produkti s peroksidno skupino v svoji kemijski strukturi imajo široko farmakološko delovanje, vendar se še niso popolnoma uveljavili v terapiji zaradi slabše dostopnosti [10,197]. Težnja po lažjem pridobivanju in izboljšanju farmakokinetičnih lastnosti je tako poglavitni razlog za razvoj sinteznih spojin s peroksidno skupino, kot so na primer 1,2,4,5-tetraoksani [15].

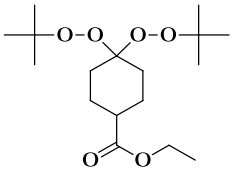
Kot smo natančneje opisali že v uvodu, so najpomembnejši predstavniki bioaktivnih peroksidov artemisinin in njegovi polsintezni derivati, ki so že več kot desetletje zdravilo prvega izbora za zdravljenje malarije [14]. Artemisinini imajo tudi protiparazitske, protitumorske, protivirusne, protivnetne, protiglivične in protibakterijske lastnosti [21,56]. V nasprotju s farmakološkim delovanjem artemisininov je biološka aktivnost 1,2,4,5-tetraoksanov precej slabše raziskana. Največ je znanega o njihovem protimalarijskem delovanju, nekaj pa tudi o njihovi protihelmintski, protitumorski in protibakterijski aktivnosti. V okviru naše študije smo se zato lotili vrednotenja biološkega delovanja sintetiziranih nesimetričnih in simetričnih TO. Preverili smo njihovo morebitno protibakterijsko delovanje proti petim različnim sevom bakterij (*M. tuberculosis*, *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*) ter njihovo protitumorsko delovanje na dveh celičnih linijah (HeLa in A549).

Strukture testiranih peroksidov smo načrtno izbrali (Shema 4.24). Med tetraoksani smo izbrali nepolarne TO brez funkcionalnih skupin, ki so bili prvi tetraoksani, ki so jim določili biološko aktivnost [75]. Znano je, da spiro skupine na tetraoksanskem obroču ojačajo njihovo biološko delovanje, zato smo testirali tetraoksane z dispiro, spiro in nespiro strukturo. Primerjali smo tudi aktivnost tetraoksanov z adamantilidensko in 4-metilcikloheksalidensko spiro skupino. Močna nepolarnost je povezana s slabo topnostjo v biološko sprejemljivih topilih in posledično imajo take spojine slabo biološko uporabnost [15], zato smo pripravili tudi nekaj polarnejših tetraoksanskih derivatov z amidno in estrsko skupino. Njihova prednost je tudi možnost nadaljnje modifikacije, pri čemer lahko vpeljemo v strukturo dodatne substituente, ki izboljšajo biološko uporabnost. Poleg tega pa lahko tetraoksane z modifikacijo amidne ali estrske skupine preko mostu povežemo z drugo molekulo, ki lahko služi za tarčno dostavo ali pa izboljša farmakološke lastnosti, in sicer s sinergističnim delovanjem ali pa ima enako farmakološko delovanje, ki ga doseže po drugačnem mehanizmu delovanja. Želeli smo preučiti tudi biološko aktivnost vodotopnih tetraoksanov, zato smo v študijo zajeli tudi TO s karboksilno kislino in njihove ustrezne natrijeve soli. Jakost delovanja tetraoksanov smo primerjali tudi z artesunatom, ki je predstavnik naravnih peroksidov, in z necikličnim peretrom, ki vsebuje dve peroksidni skupini tako kot tetraoksani.

artesunat

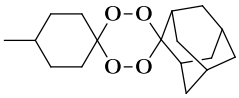


pereter

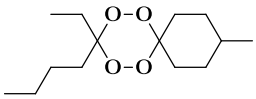


**10b**

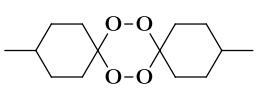
TO brez funkcionalnih skupin



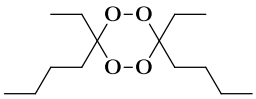
**4ak**



**4au**

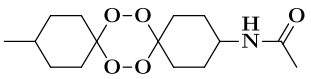


**5a**

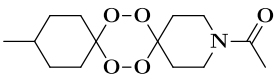


**5u**

TO z amidno skupino

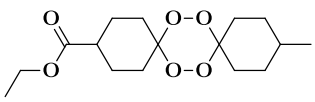


**4ae**

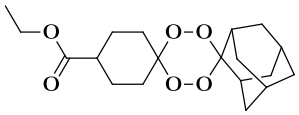


**4at**

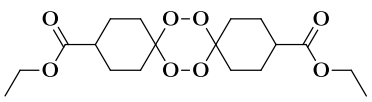
TO z estrsko skupino



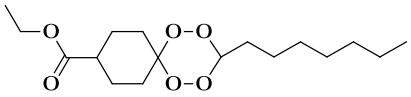
**4ab**



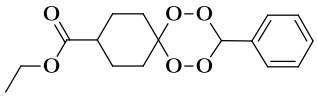
**4bk**



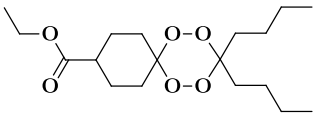
**5b**



**4bm**

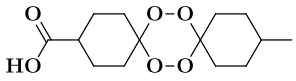


**4bp**

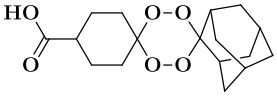


**4bs**

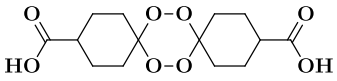
karboksilne kisline TO



**8ab**

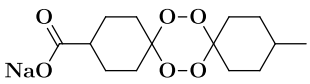


**8bk**

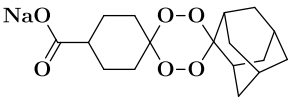


**8b**

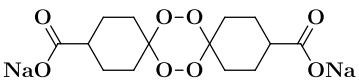
natrijeve soli TO



**9ab**



**9bk**



**9b**

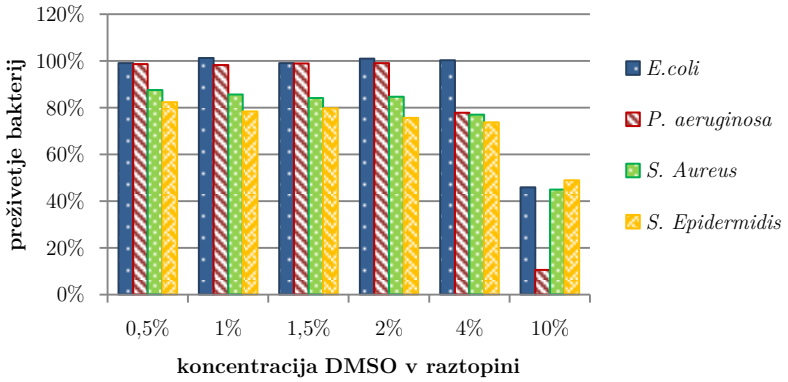
Shema 4.24: Strukture peroksidnih spojin, ki smo jih uporabili v študiji biološke aktivnosti.

### 4.3.1 Vrednotenje protibakterijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

#### 4.3.1.1 Protibakterijsko delovanje proti *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*

Raziskovanje biološkega delovanja tetraoksanov smo začeli s testiranjem morebitnega protibakterijskega delovanja 14 sintetiziranih simetričnih in nesimetričnih tetraoksanov proti 4 različnim sevom bakterij (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*). Aktivnost sintetiziranih tetraoksanov smo nameravali primerjati tudi s protibakterijskim delovanjem artesunata. Vsem peroksidom smo želeli določiti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) [198], to je najnižja koncentracija spojine, ki bi vidno preprečila rast bakterij v določenih pogojih. Začetna koncentracija peroksidov, s katero smo tretirali bakterijske celice na mikrotitrskih ploščah, je bila 128 μg/ml. Zaradi slabe topnosti večine sintetiziranih tetraoksanov v vodnih medijih smo za izboljšanje topnosti peroksidov v gojišču kot kotopilo uporabili DMSO (1,3 % v posamezni jamici mikrotitrske plošče).

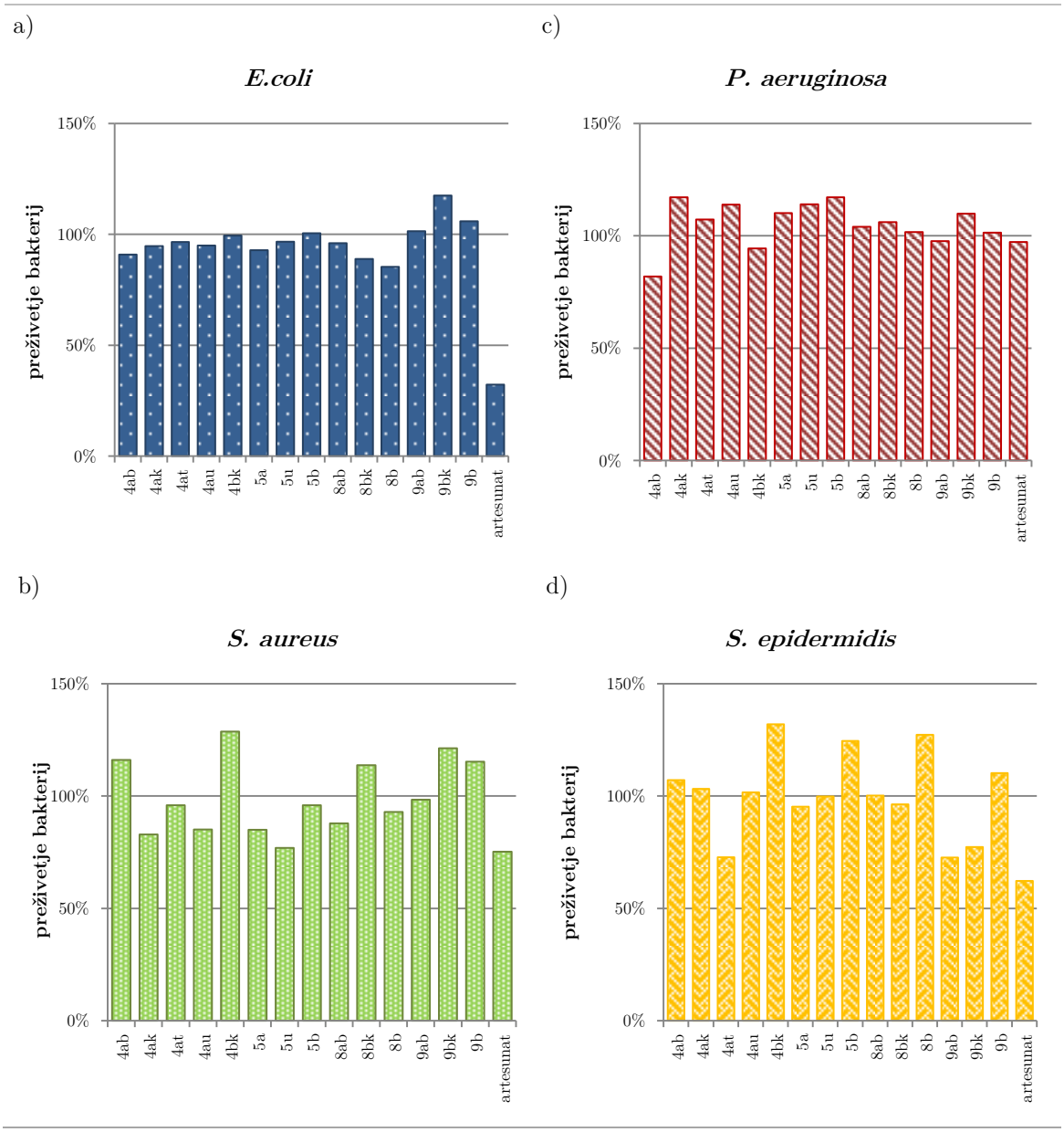
Najprej smo preverili vpliv DMSO na rast vseh 4 sevov bakterij, da bi preprečili lažno pozitivne rezultate. Bakterije smo inkubirali čez noč v raztopini z 0,5–10 % DMSO (Slika 4.10). Ugotovili smo, da so bile na prisotnost DMSO manj občutljive bakterije *E. coli* in *P. aeruginosa*, saj 4 % oz. 2 % raztopina DMSO ni vplivala na njihovo rast. Nasprotno pa je na rast bakterij *S. aureus* in *S. epidermidis* vplivala že 0,5 % raztopina DMSO, saj je preživetje bakterij po inkubaciji približno 80 %. Na podlagi teh rezultatov smo negativno kontrolo *E. coli* in *P. aeruginosa* inkubirali brez dodanega DMSO, v negativno kontrolo *S. aureus* in *S. epidermidis* pa smo dodali še 1,3 % DMSO.




Slika 4.10: Vpliv DMSO na rast bakterij.

Testiranje protibakterijske aktivnosti tetraoksanov smo začeli s koncentracijo peroksidov 128 μg/ml, ki bi jo potem logaritemsko zniževali, da bi določili minimalno inhibitorno koncentracijo za posamezno spojino za določeno bakterijo. Niti artesunat niti kateri od 14 testiranih tetraoksanov ni preprečil vidnega razrasta celic po inkubaciji čez noč, zato smo določili odstotek preživetja bakterij s pomočjo merjenja absorbance raztopine bakterij, tretiranih s peroksidno spojino, in absorbance negativne kontrole (Slika 4.11). Ugotovili smo, da je le v enem primeru prišlo do več kot 50 % inhibicije rasti bakterij, in sicer z artesunatom pri inkubaciji z *E. coli* (32 % preživetje, Slika 4.11a). Majhno zmanjšanje preživetja *E. coli* sta povzročila tudi TO z estrsko skupino **8b** in **8bk** (85 % in 89 % preživetje). Edini peroksid, ki je vplival na rast *P. aeruginose* je bil TO z adamantilidensko in cikloheksadiensko substituento **4ab**, ki je zmanjšal preživetje na 82 % (Slika 4.11b). Tudi pri *S. aureus* in *S. epidermidis* je artesunat povzročil največjo

inhibicijo rasti bakterij med vsemi testiranimi spojinami (75 % oz. 62 % preživetje, Slika 4.11c in Slika 4.11d). Do podobnega odstotka preživetja *S. aureus* je prišlo po tretiranju bakterij z nespiro TO **5u** (77 %, Slika 4.11c). Nekateri tetraoksani s cikloheksalidensko substituento **4ak**, **4au**, **5a** in **8ab** so prav tako zmanjšali preživetje *S aureus* za več kot 10 %. Zmanjšano rast *S. epidermidis* so poleg artesunata povzročili še amidni TO **4at**, natrijeva sol **9ab** (oba 73 % preživetje, Slika 4.11d) in estrski TO **8bk (**77 % preživetje, Slika 4.11).




Slika 4.11: Vpliv tetraoksanov in artesunata pri koncentraciji 128 μg/ml na rast bakterij.

Iz rezultatov (Slika 4.11) lahko sklepamo, da artesunat in sintetizirani tetraoksani nimajo protibakterijskega delovanja proti testiranim sevom bakterij (*E. coli, P. aeruginosa, S. epidermidis, S. aureus*). Negativni rezultati so malo presenetljivi, ker imajo tako artemisinini kot tudi sintezni peroksidi široko biološko delovanje [56], ker se vodikov peroksid uporablja za zdravljenje nekaterih bakterijskih infekcij [199] in tudi za

dezinfekcijo medicinskih površin [200]. Vzroka, da tetraoksani nimajo protibakterijskega delovanja, bi lahko bila neučinkovita dostava peroksidnih spojin v bakterijsko celico, kar so že pokazali na mikobakterijah [73], ali pa zadostna katalazna aktivnost v testiranih sevih bakterij, ki bi preprečevala nastalim radikalom baktericidno delovanje [200].

#### 4.3.1.2 Protituberkulozno delovanje

Protibakterijsko aktivnost 16 sintetiziranih tetraoksanov in peretra proti bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* so nam določili na Malaviya National Institute of Technology v Jaipurju. Sintetiziranim peroksidom so določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). Začetna koncentracija spojine, s katero so tretirali bakterije na mikrotitrskih ploščah, je bila 25 µg/ml. Koncentracijo so nato postopno zmanjševali, dokler po inkubaciji ni prišlo do razrasta bakterij. Kot referenco pri testiranju protituberkulozne aktivnosti so uporabili rifampicin.

Rezultati (Tabela 4.15) kažejo, da ima med sintetiziranimi peroksidi najboljše protituberkulozno delovanje spiro nesimetrični tetraoksan **4bp**. Njegova MIK vrednost je bila v istem redu velikosti kot MIK rifampicina. Presenetljivo je, da je protituberkulozna aktivnost spiro tetraoksana **4bp** boljša od aktivnosti ostalih dispiro tetraoksanov, saj so bili v dosedanjih študijah biološkega delovanja najbolj aktivni prav dispiro tetraoksani. Za inhibicijo rasti mikobakterij je bila v primerjavi z aktivnostjo TO **4bp** potrebna dvakrat višja koncentracija dispiro tetraoksanov z adamantilidensko substituento **4ak** in **9bk**. Ta rezultat sovpada z dosedanjimi študijami protimalarijskega delovanja tetraoksanov, saj so bili tudi v teh dispiro tetraoksanih z adamantilidensko skupino učinkovitejši kot tisti s substituiranimi cikloheksalidenskimi substituentami. Tetraoksanske kisline so imele manjše ali enako protituberkulozno delovanje kot njihove pripadajoče soli. Ostali tetraoksani, neciklični peroksidni derivat **10b** in artesunat niso imeli protituberkuloznega učinka.

Tabela 4.15: *In vitro* protituberkulozna aktivnost sintetiziranih peroksidov.

| testirana spojina | | MIK (µg/ml) |
|---|---|---|
| | **4ak** | 3,1 |
| | **5a** | 12,5 |
| amidi | **4ae** | 12,5 |
| | **4at** | 12,5 |
| estri | **4ab** | 12,5 |
| | **4bk** | 12,5 |
| | **4bm** | 25 |
| | **4bp** | 0,8 |
| | **4bs** | 25 |
| | **5b** | 25 |
| kisline | **8ab** | 6,3 |
| | **8bk** | 6,3 |
| | **8b** | 12,5 |
| soli | **9ab** | 6,3 |
| | **9bk** | 3,1 |
| | **9b** | 6,3 |
| pereter | **10b** | 25 |
| artesunat | | 25 |
| rifampicin | | 0,1 |

### 4.3.2 Vrednotenje protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

Raziskovanje potencialnega biološkega delovanja sintetiziranih tetraoksanov smo nadaljevali s testiranjem protitumorske aktivnosti 14 sintetiziranih peroksidov na dveh tumorskih celičnih linijah (HeLa in A549) in jo primerjali s protitumorsko aktivnostjo artesunata, za katerega so v prejšnjih študijah že dokazali citotoksično aktivnost na rakavih celičnih linijah [42]. Na podlagi razmerja med metabolično aktivnostjo preživelih celic po 48-urni inkubaciji s peroksidi ter metabolično aktivnostjo netretiranih celic smo peroksidnim spojinam določili koncentracijo, ki je povzročila 50 % zmanjšanje metabolične aktivnosti tumorskih celic po 48-urni inkubaciji.

Rezultati (Tabela 4.16) kažejo, da so imeli številni sintetizirani tetraoksani dobro protitumorsko delovanje. Artesunat je bil sicer najbolj citotoksičen za tumorsko celično linijo HeLa, vendar je bila citotoksičnost dveh tetraoksanov s cikloheksalidensko substituento **4ab** in **5a** v podobnem koncentracijskem območju. Metabolično aktivnost HeLa so dobro inhibirali tudi diestrski tetraoksan **5b**, nefunkcionaliziran TO **4ak** in amidna derivata **4at** ter **4ae**. V nasprotju z artesunatom je bila koncentracija, ki je bila potrebna za 50 % zmanjšanje celične viabilnosti A549, pri vseh TO s protitumorsko aktivnostjo nižja kot tista za zmanjšanje celične viabilnosti HeLa. Tetraoksani s cikloheksalidensko skupino **5a**, **4ab** in **4ak** so bili celo bolj toksični za tumorske celice A549 kot artesunat, ki je imel podobno $EC_{50}$ vrednost kot diestrski tetraoksan **5b** in amidna TO **4at** ter **4ae**. Medsebojna primerjava protitumorske aktivnosti tetraoksanov **4ak** in **5a**, estrov **4ab** in **4ak** ter kislin **8ab** in **8bk** je pokazala, da imajo tetraoksani s 4-metilcikloheksanonsko substituento na tetraoksanskem skeletu močnejšo protitumorsko aktivnost kot tetraoksani z adamantansko.

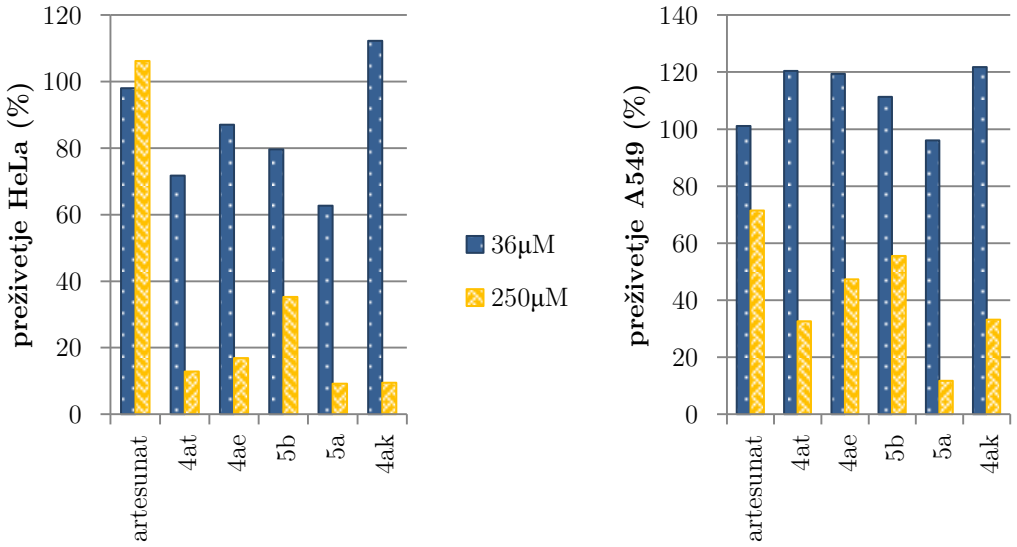
Nekateri tetraoksani so imeli slabše protitumorsko delovanje. Tetraoksana z estrsko skupino **4bk** in **8ab** sta imela nekaj razredov velikosti nižjo jakost citotoksičnosti za obe celični liniji od prej omenjenih tetraoksanov. Polarnejše tetraoksanske kisline **8** in soli **9**, ki bi bile zaradi boljše vodotopnosti potencialno zanimivejše za nadaljnje študije zaradi možnosti peroralne aplikacije, so bile šibko toksične oz. netoksične v koncentracijah do 250 μM na testiranih tumorskih celicah. Kljub dvema peroksidnima skupinama v svoji strukturi je bil šibko toksičen oz. netoksičen v koncentracijah do 250 μM tudi neciklični peroksidni derivat **10b**, kar je potrdilo pomembnost rigidnosti peroksidne vezi v cikličnih strukturah za delovanje biološko aktivnih peroksidov.

Tabela 4.16: *In vitro* citotoksična aktivnost sintetiziranih peroksidov na dveh tumorskih celičnih linijah HeLa in A549.

| testirana spojina | | HeLa (μM) | | A549 (μM) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $EC_{50}$[a] | 95 % interval zaupanja[b] | $EC_{50}$[a] | 95 % interval zaupanja[b] |
| | **4ak** | 13,6 | 10,2-17,9 | 6,4 | 4,2-9,8 |
| | **5a** | 7,7 | 6,8-8,8 | 2,1 | 1,4-3,2 |
| amidi | **4ae** | 27,7 | 13,6-56,7 | 16,1 | 11,5-22,5 |
| | **4at** | 17 | 13,6-21,4 | 11 | 9,1-13,3 |
| estri | **4ab** | 6,7 | 6,2-7,3 | 4,6 | 4,0-5,3 |
| | **4bk** | 95,5 | 73,3-124 | 52,6 | 44,2-62,4 |
| | **5b** | 13,5 | 10,4-17,5 | 10,1 | 6,5-15,6 |
| kisline | **8ab** | 93,6 | 56,3-156 | 72 | 57,9-89,9 |
| | **8bk** | /[c] | /[c] | 225 | 189-267 |
| | **8b** | /[c] | /[c] | /[c] | /[c] |
| soli | **9ab** | /[c] | /[c] | /[c] | /[c] |
| | **9bk** | /[c] | /[c] | /[c] | /[c] |
| | **9b** | /[c] | /[c] | /[c] | /[c] |
| pereter | **10b** | /[c] | /[c] | 187 | 152-229 |
| artesunat | | 5,3 | 4,4-6,4 | 9,8 | 8,0-11,9 |

[a] Koncentracija spojine, pri kateri se celična viabilnost zmanjša za 50 %. [b] Koncentracijski interval, v katerem se s 95 % gotovostjo nahaja $EC_{50}$ za določeno spojino. [c] Testirana spojina je bila netoksična za dano celično linijo v koncentracijah do 250 μM.

Opravili smo tudi eksperiment, v katerem smo primerjali preživetje tumorskih celic po 6-urni inkubaciji s peroksidnimi spojinami (**4ak**, **4at**, **4ae**, **5a**, **5b** in artesunat) pri dveh različnih koncentracijah (36 μM in 250 μM, Slika 4.12). Artesunat je delno zmanjšal celično viabilnost le pri 250 μM dodatku celicam A549. Pri nižji koncentraciji (36 μM) tudi testirani tetraoksani niso povzročili zmanjšanja celične viabilnosti tumorskih celic A549, vendar pa so vsi tetraoksani razen TO **4ak** delno znižali celično viabilnost HeLa celic. Ta efekt je bil še bolj izražen pri višji koncentraciji (250 μM), saj so pri obeh celičnih linijah vsi testirani tetraoksani zmanjšali celično viabilnost na manj kot 50 %. Glede na to, da v 6-ih urah še ne pride do podvojitve celic, bi lahko sklepali, da so tetraoksani bolj toksični od artesunata in bi bila zato ob njihovi morebitni uporabi v terapiji večja verjetnost pojava neželenih učinkov. Druga razlaga bi bila, da tetraoksani delujejo citotoksično po drugačnem mehanizmu kot artesunat, najverjetneje z nespecifičnim delovanjem na strukturo celične membrane. Zadnja možnost bi lahko bila, da so celične tarče tetraoksanov mitohondrijske oksidoreduktaze, saj smo zmanjšano celično viabilnost določali preko znižane metabolične aktivnosti mitohondrijev (MTT test). Za nedvoumno potrditev katerega od teh sklepanj bi bili potrebni dodatni eksperimenti.




Slika 4.12: Preživetje tumorskih celic HeLa (levo) in A549 (desno) po 6-urni inkubaciji s sinteznimi peroksidi.

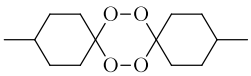
## 4.3.3 Eksperimentalno delo

### 4.3.3.1 Sinteza peroksidov, ki smo jih uporabljali v eksperimentih testiranja biološke aktivnosti

Nesimetrične TO (**4ab**, **4ae**, **4ak**, **4at**, **4au** in **4bk)**, TO s karboksilno kislino **(8b, 8ab** in **8bk**) in natrijeve soli TO (**9b, 9ab** in **9bk)** smo sintetizirali po postopku, ki smo ga opisali v prejšnjem poglavju.

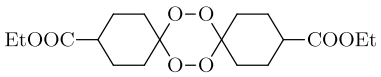
Simetrične TO (**5a**, **5b** in **5u)** smo sintetizirali po objavljeni metodi [141]. 2 mmol 30 % vodne raztopine $H_2O_2$ in 2 mmol 54 % etrske raztopine $HBF_4$ smo raztopili v ustrezni količini fluoriranega alkohola (TFE ali HFIP). Pri sintezi **5b** in **5u** smo v reakcijsko zmes dodali še 0,5 mg MTO. Potem smo dodali še 2 mmol ustreznega ketona in mešali pri 22 °C. V reakcijsko zmes smo dolili 10 ml DKM in jo dvakrat spirali s 15 ml nasičene raztopine NaCl. Združene organske frakcije smo sušili z brezvodnim $Na_2SO_4$ in skoncentrirali na rotavaporju pod znižanim pritiskom. Tetraoksan smo ločili od preostale reakcijske zmesi s kolonsko kromatografijo.

**3,12-Dimetil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (5a)** [141]



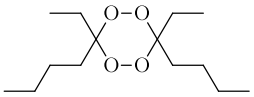

$C_{14}H_{24}O_4$, $M_r$=256,34
**Izhodne spojine:** 224 mg ketona **1a**, 226 mg $H_2O_2$ in 272 µl $HBF_4$
**Pogoji:** 2 ml TFE, 60 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/heksan (9/1)
**Izkoristek:** 75 % belega prahu (192 mg)
**Tališče** 65–67 °C (mikroskop)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,92 (d, 6H, *J*=6,4 Hz), 1,11–1,31 (m, 4H), 1,39–1,83 (m, 12H), 3,04 (br, 2H)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20°C)** δ [ppm] = 0,92 (d, 6H, *J*=6,6 Hz), 1,11–1,30 (m, 4H), 1,41–1,78 (m, 12H), 3,02–3,13 (m, 2H)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 21,3, 21,4, 29,0 (br), 29,9 (br), 30,5 (br), 31,4, 31,6, 31,7, 108,1, 108,2
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2950, 2926, 2858, 1440, 1367, 260, 1166, 1100, 1075, 1046, 1020, 1007, 992, 979, 928, 896

**3, 12-Dietoksikarbonil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2]heksadekan (5b)** [141]




$C_{18}H_{28}O_8$, $M_r$=372,41
**Izhodne spojine:** 340 mg ketona **1a**, 226 mg $H_2O_2$, 272 µl $HBF_4$ in 0,5 mg MTO
**Pogoji:** 4 ml HFIP, 5 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/EtOAc (8/2)
**Izkoristek:** 74 % belega prahu (277 mg)
**Tališče** 103–104 °C (mikroskop)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,26 (t, 6H, *J*=7,2 Hz), 1,42–2,02 (m, 14H), 2,35–2,45 (m, 2H), 2,87 (br, 2H), 4,14 (q, 4H, *J*=7,2 Hz)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, -20°C)** δ [ppm] = 1,26 (t, 6H, *J*=7,2 Hz), 1,48–1,59 (m, 2H), 1,69–2,02 (m, 12H), 2,36–2,47 (m, 2H), 2,86–2,99 (m, 2H), 4,14 (q, 4H, *J*=7,2 Hz)
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 23,8 (br), 24,6 (br), 28,1 (br), 30,3 (br), 41,5, 41,6, 60,.4, 107,49, 174,5
**IR $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$)** 2984, 2958, 2943, 2872, 1717, 1443, 1381, 1356, 1341, 1320, 1264, 1182, 1135, 1096, 1062, 1038, 1022, 986, 941, 920, 859
**HR-MS** [$MNa^+$] izračunano za $C_{18}H_{28}O_8Na$: 395,1682; izmerjeno: 395,1672.

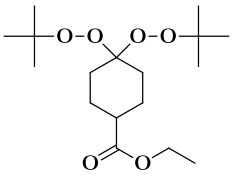
**3,6-Dietil-3,6-dibutil-1,2,4,5-tetraoksan (5u)** [103]




$C_{14}H_{28}O_4$, $M_r$=260,37
**Izhodne spojine:** 228 mg ketona **1a**, 226 mg $H_2O_2$, 272 µl $HBF^4$ in 0,5 mg MTO
**Pogoji:** 2 ml TFE, 60 min
**Mobilna faza kolonske kromatografije:** DKM/heksan (9/1)
**Izkoristek:** 38 % brezbarvnega olja (100 mg)
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 0,87–0,98 (m, 12H), 1,25–1,42 (m, 8H), 1,55–1,71 (m, 4H), 1,18–1,29 (m, 4H).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 6,6 (br), 8,0 (br), 13,9, 22,9, 24,0 (br), 25,7 (br), 26,8 (br), 30,4 (br), 33,1 (br), 110,8.

*Bis*-pereter **10b** smo sintetizirali po objavljeni metodi [168]. V 0,5 ml MeCN smo raztopili 12,5 mg $I_2$ in 0,36 ml $^t$BuOOH (1 mmol, 60 % raztopina v dekanu). Potem smo dodali 170 mg etil 4-oksocikloheksankarboksilata (0,5 mmol) in mešali 24 ur pri 22 °C. V reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim pritiskom, dolili 10 ml DKM in jo sprali najprej z 0,1 M raztopino $N_2S_2O_3$, potem pa še z destilirano vodo. Združene organske frakcije smo sušili z brezvodnim $Na_2SO_4$ in skoncentrirali na rotavaporju pod znižanim pritiskom. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (heksan/EtOAc (9/1)) in izolirali 100 mg brezbarvnega olja **10b** (60 % izkoristek).

**Etil 4,4-*bis*(*terc*-butilperoksi)cikloheksankarboksilat (10b)**



$C_{17}H_{32}O_6$, $M_r$=332,43
**$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 1,24 (s, 9H), 1,25 (t, 3H, *J*=7,2 Hz), 1,26 (s, 9H), 1,44–1,59 (m, 3H), 1,68–1,90 (m, 4H), 2,18–2,37 (m, 3H), 4,13 (q, 4H, *J*=7,2 Hz).
**$^{13}$C NMR (76 MHz, $CDCl_3$)** δ [ppm] = 14,2, 25,1, 26,7, 26,8, 29,5, 42,1, 60,2, 79,1, 79,3, 106,1, 175,4.
**HR-MS** [**MNa$^+$**] izračunano za $C_{17}H_{32}O_6Na$: 355,2095, izmerjeno 355,2097.

### 4.3.3.2 Eksperimentalni postopki za testiranje protibakterijskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

#### 4.3.3.2.1 Eksperimentalni postopki za testiranje protibakterijskega delovanja proti *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*

Testiranje protibakterijskega delovanja smo opravili v sodelovanju s Fakulteto za vede o zdravju na Univerzi na Primorskem. *In vitro* protibakterijsko aktivnost sintetiziranih peroksidov smo vrednotili na štirih vrstah bakterijskih celic, in sicer *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) in *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Na mikrotitrske plošče smo nanesli 50 µl raztopine bakterij (število bakterij v posamezni jamici med $1 \cdot 10^5$ in $3 \cdot 10^6$) in 50 µl raztopine peroksida s koncentracijo 256 µg/ml (koncentracija peroksida v posamezni jamici 128 µg/ml) ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Protibakterijsko aktivnost posameznega peroksida smo želeli določiti na podlagi bistrosti raztopine v jamici, vendar pa so se prav v vseh primerih razrasle bakterije in povzročile motnost v raztopini. Zato smo odstotek preživelih bakterij po inkubaciji s posameznim peroksidom določili z merjenjem absorbance v jamicah pri 612 nm, ki smo jo primerjali z absorbanco netretiranih bakterij. V raztopini netretiranih bakterij iz družine *Staphylococcus* je bilo tudi 1,28 % DMSO (oz. MeOH), saj smo ugotovili, da je tak dodatek DMSO delno zavrl rast bakterij. Eksperiment smo opravili v treh bioloških ponovitvah s štirimi tehničnimi ponovitvami.

Vpliv DMSO na rast bakterij smo preverjali tako, da smo čez noč inkubirali bakterije z 10 %, 4 %, 2 %, 1,5 %, 1 % in 0,5 % raztopino DMSO. Odstotek preživelih bakterij po inkubaciji s posameznim peroksidom smo določili z merjenjem absorbance v jamicah pri 612 nm, ki smo jo primerjali z absorbanco netretiranih bakterij. Eksperiment smo opravili v treh bioloških ponovitvah s štirimi tehničnimi ponovitvami.

Bakterije, ki smo jih uporabili za testiranje protibakterijske aktivnosti peroksidov, smo pripravili tako, da smo čez noč inkubirali eno kolonijo bakterij v 10 ml LB gojišča pri 37 °C. Odpipetirali smo 1,8 ml namnoženih bakterij, jih centrifugirali 3 min na 13400 obratih na minute, potem pa supernatant zamenjali z 1,8 ml svežega LB gojišča. Tako pripravljeno raztopino bakterij smo potem redčili do koncentracij $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$. Za testiranje protibakterijskega delovanja peroksidov smo v mikrotitrske plošče nanašali raztopine bakterij z redčenjem $10^{-2}$ (*E. coli, S. aureus, S. epidermidis*) ali $10^{-3}$ (*P. aeruginosa*). Število bakterij smo določili tako, da smo raztopine bakterij s koncentracijo $10^{-5}$, $10^{-6}$ in $10^{-7}$ razmazali na petrijevko z LB agar gojiščem, jih inkubirali čez noč pri 37 °C ter prešteli namnožene kolonije.

Raztopine peroksidov s koncentracijo 10 mg/ml smo pripravili tako, da smo 5 mg posameznega peroksida raztopili v 0,5 ml DMSO. Namesto DMSO smo za raztapljanje **9ab** in **9bk** uporabili metanol, za **9b** pa gojišče. Tako pripravljeno raztopino smo najprej 10-kratno redčili z gojiščem do koncentracije 1 mg/ml, potem pa smo to raztopino še naprej redčili v razmerju 256:744 ter dobili raztopine, ki smo jih uporabili za nanos na mikrotitrsko ploščo (koncentracija peroksida 256 μg/ml).

#### 4.3.3.2.2 Eksperimentalni postopki za testiranje antituberkuloznega delovanja

Testiranje protituberkuloznega delovanja so nam opravili na Malaviya National Institute of Technology v Jaipurju. Za merjenje protituberkulozne aktivnosti sintetiziranih peroksidov je bil uporabljen *in vitro* MTB MABA test. Bakterije so bile pripravljene v svežem LJ gojišču, resuspendirane v 7H9-S gojišču (7H9 gojišče, 0,1 % kasitona, 0,5 % glicerola, nadomestne oleinske kisline, albumin, dekstroza in katalaza [OADC]), prirejene za McFarland standarde in razredčene v razmerju 1:20. Na mikrotitrske ploščice je bilo nanešeno 100 μl tako pripravljene raztopine bakterij. Raztopine peroksidov so bile segrete na sobno temperaturo in redčene v 7H9-S gojišču na 4-kratno vrednost testirane koncentracije spojine. Dvojno zaporedno raztapljanje vsakega peroksida je bilo pripravljeno direktno v sterilni mikrotitrski plošči s 96 jamicami z uporabo 100 μl 7H9-S gojišča. Pripravljeni sta bili tudi kontrolna raztopina rasti bakterij brez antibiotika in sterilna slepa raztopina. Sterilna voda je bila dodana v vse jamice, da bi preprečili izhlapevanje med inkubacijo. Inkubacija pokritih mikrotitrskih plošč, zavitih v plastično vrečko, je trajala 7 dni pri 37 °C pri normalnem tlaku. Po inkubaciji se je v vsako jamico dodalo 30 μl raztopine alamar blue in potem plošče inkubiralo še čez noč. Sprememba barve raztopine iz modre (oksidirana oblika alamar blue) v roza (reducirana oblika) je bila posledica rasti bakterij. MIK vrednost je bila določena kot najnižja koncentracija peroksida, pri kateri še ni prišlo do spremembe barve.

### 4.3.3.3 Eksperimentalni postopki za testiranje protitumorskega delovanja 1,2,4,5-tetraoksanov

Protitumorsko delovanje so nam določili na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Institutu »Jožef Stefan«. Protitumorsko aktivnost sintetiziranih peroksidov so vrednotili na dveh tumorskih celičnih linijah, in sicer na celicah človeškega adenokarcinoma materničnega vratu (HeLa) in pljučnega adenocarcinoma (A549).

Celice Hela (ECACC) in A549 (DSMZ) so gojili v gojišču MEM (Gibco) z 10 % govejim serumom (Sigma), 2 mM L-glutaminom, 100 enotami penicilina in 100 μg/mL streptomicina (Invitrogen) ter 1 % neesencialnih aminokislin (Invitrogen) pri 37 °C in 5 % $CO_2$.

Na mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami so nasadili 3000 celic in jih inkubirali preko noči, da so se pritrdile. Nato so celicam dodali ustrezno koncentracijo redčene spojine v gojišču (med 250 μM in 0,1 μM) in jih inkubirali 48 h. Celicam so nato odstranili gojišče,

jim dodali 0,5 mg/l 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevega bromida (MTT, Sigma) v svežem gojišču ter inkubirali 2 uri. Celične oksidoreduktaze, odvisne od NAD(P)H, reducirajo tetrazolijevo barvilo v netopen formazan, katerega količina sovpada s številom metabolno aktivnih celic. Nastale kristale formazana so raztopili v DMSO ter izmerili absorbanco pri 570 nm.

Celično viabilnost (CV, %) so opredelili kot $A_{570}$(tretirane celice)/$A_{570}$(netretirane celice), nato pa so s programom GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) načrtali graf log(koncentracija spojine) v odvisnosti od CV. Točke so prilegali Hillovi krivulji CV=100/(1+10^((log($EC_{50}$)-log(koncentracija spojine)*k)), kjer je $EC_{50}$ koncentracija spojine, pri kateri se celična viabilnost zmanjša za 50 %, k pa je naklon Hillove krivulje. Eksperiment so opravili v treh bioloških ponovitvah s tremi tehničnimi ponovitvami.

# Poglavje 5

# Zaključki

V okviru doktorske disertacije smo raziskovali dvostopenjsko reakcijo med karbonilno spojino in vodikovim peroksidom za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov ter vrednotili biološko aktivnost strukturno definiranim tetraoksanom. Doktorsko disertacijo smo razdelili v tri poglavja.

V prvem poglavju smo raziskali prvo stopnjo reakcije pri sintezi nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz karbonilnih spojin in vodikovega peroksida, pri kateri so končni produkti *gem*-dihidroperoksidi. Zaradi boljšega stika med molekulami reaktantov smo reakcijo izvajali s koncentriranjem reakcijske zmesi (karbonilna spojina, 30 % vodna raztopina vodikovega peroksida, topilo), nevtralni pogoji pa so nam omogočili globlji vpogled v potek reakcije. Opazili smo, da se med reakcijo tvori nestabilen intermediat, ki se nato pretvori v *gem*-dihidroperoksid. Nekatere od teh intermediatov smo uspeli izolirati in okarakterizirati, njihovo strukturo pa smo nedvoumno potrdili s kristalno strukturo, ki je dokazala, da gre za α-hidroperoksialkohole. Sledilo je študiranje vpliva reakcijskih pogojev na tvorbo α-hidroperoksialkoholov. Topilo na potek reakcije lahko vpliva s svojo polarnostjo in tvorbo azeotropa z vodo med koncentriranjem reakcijske zmesi. Po koncu koncentriranja je konverzija 4-metilcikloheksanona sovpadala s količino vode v azeotropu, tako da je bila najslabša v metanolu, najboljša pa v acetonitrilu, vendar so bile razlike majhne. Po daljšem reakcijskem času so bile razlike še manj opazne, večinsko pa je nastal *gem*-dihidroperoksid. Naslednji reakcijski pogoj, ki smo ga opazovali, je bil vpliv količine dodanega vodikovega peroksida na primeru peroksidacije manj reaktivnega ketona etil 4-oksocikloheksankarboksilata. Po koncu koncentriranja reakcijske zmesi se je pretvoril v ustrezni α-hidroperoksialkohol, čigar nadaljnja pretvorba je bila odvisna od količine dodanega vodikovega peroksida. Če smo uporabili ekvimolarno količino vodikovega peroksida, se α-hidroperoksialkohol ni pretvarjal dalje v *gem*-dihidroperoksid in je ostal stabilen 7 dni. Pri reakciji s presežkom vodikovega peroksida se je s podaljševanjem časa začel tvoriti *gem*-dihidroperoksid, z uporabo večjih presežkov vodikovega peroksida pa je ta pretvorba potekala hitreje. Preverili smo tudi stabilnost α-hidroperoksialkoholov, saj smo že med snemanjem NMR spektrov ugotovili, da v kloroformu zelo hitro razpadejo, v DMSO pa ostanejo dovolj stabilni za čas trajanja analize. Z dodatkom vodikovega peroksida lahko podaljšamo stabilnost α-hidroperoksialkoholov v DMSO. S pomočjo primerjave stabilnosti α-hidroperoksialkoholov in *gem*-dihidroperoksidov med dvofazno ekstrakcijo smo ugotovili, da je prva adicija molekule vodikovega peroksida na keton ravnotežna. V trenutku, ko pride do tvorbe *gem*-dihidroperoksida, pa je produkt stabilen in se ne more več pretvoriti nazaj v α-hidroperoksialkohol in vodikov peroksid. V bazičnih pogojih so α-hidroperoksialkoholi nestabilni in razpadejo nazaj v ketone, v kislem pa pride do večinskega nastanka cikličnih peroksidov. Sintetizirali smo tudi strukturno

različne α-hidroperoksialkohole. Trdne α-hidroperoksialkohole smo lahko izolirali v obliki čistih produktov, oljnate pa smo analizirali v zmesi z vodikovim peroksidom.

V drugem poglavju smo raziskali ciklokondenzacijo *gem*-dihidroperoksidov in karbonilnih spojin v prisotnosti kisline. Tvorbo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov ponavadi spremljajo številne stranske reakcije in posledični nastanek simetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov, 1,2,4,5,7,8-heksaoksonanov in produktov Baeyer-Villigerjeve premestitve. Ti stranski produkti otežujejo ločbo in nižajo izkoristek želenega produkta. Najprej smo študirali vpliv reakcijskih pogojev (topilo, temperatura, reakcijski čas) in ugotovili, da je le optimalna kombinacija reakcije med *gem*-dihidroperoksidom in ketonom vodila do selektivnega nastanka nesimetričnega 1,2,4,5-tetraoksana z dobrim izkoristkom. Prekomerna aktivacija je sprva vodila do povečane tvorbe bolj stabilnega od simetričnih tetraoksanov, ki se je lahko tvoril iz izhodnih produktov, in potem v tvorbo laktonov. Prevelika deaktivacija je vodila do nastanka 1,2,4,5,7,8-heksaoksonanov, ki so se s podaljševanjem časa pretvoril v manj stabilni simetrični tetraoksan, ki se je lahko tvoril iz izhodnih produktov. Na aktivacijo je možno vplivati tudi z dodatkom različne količine kisline v reakcijsko zmes in posledično pri preveliki oz. premajhni aktivaciji reakcije opazimo prej opisane trende. Tudi topilo močno vpliva na reakcijo. Fluorirani alkoholi dodatno aktivirajo reakcijo ciklizacije, vendar pa pri reakcijah v heksafluoroizopropanolu pride do večinske tvorbe laktonov kljub zelo majhni količini dodane kisline. Trifluoroetanol je optimalno aktiviral reakcijo. Kljub temu, da acetonitril in diklorometan nista dodatno aktivirala ciklokondenzacije, so se tvorili ciklični peroksidi, med katerimi so prevladovali 1,2,4,5,7,8-heksaoksonani. Heksan, etanol in voda so bili za ciklizacijo manj primerna topila. Ugotovili smo, da položaj hidroperoksidne in karbonilne skupine izhodnih spojin močno vpliva na selektivnost tvorbe nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov. V *gem*-dihidroperoksid je bolje pretvoriti keton, ki je manj reaktiven tako za reakcijo peroksidacije kot tudi za Baeyer-Villigerjevo oksidacijo. Pokazali smo, da sta reaktivnosti obeh izhodnih spojin ključnega pomena za potek reakcije, tako da ni mogoče uporabiti univerzalne metode za sintezo nesimetričnih 1,2,4,5-tetraoksanov iz določenega *gem*-dihidroperoksida in različnih ketonov oz. določenega ketona in različnih *gem*-dihidroperoksidov. Manjša variabilnost reakcijskih pogojev pri sintezi nesimetričnih tetraoksanov je pri določenem *gem*-dihidroperoksidu in spreminjanju strukture ketonov. Sintetizirali smo tudi načrtno strukturno definirane tetraoksane z estrsko funkcionalno skupino, ki smo jo tudi dodatno kemijsko modificirali in s tem potrdili, da so tetraoksani stabilne molekule in omogočajo kemijske spremembe neperoksidnega dela molekule.

V okviru tretjega poglavja smo sintetiziranim tetraoksanom vrednotili biološko delovanje. Niti testirani tetraoksani niti artesunat niso imeli protibakterijskega učinka proti štirim testiranim sevom bakterij (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* in *S. epidermidis*). Trije izmed sintetiziranih nesimetričnih tetraoksanov so imeli obetavno protituberkulozno aktivnost. Številni tetraoksani so imeli dobro protitumorsko delovanje proti dvema tumorskima celičnima linijama (A549, HeLa). Med njimi so imeli boljše protitumorske lastnosti manj polarni tetraoksani, polarnejši tetraoksani pa so bili le šibko citotoksični ali pa sploh niso bili. Tetraoksani s 4-metilcikloheksanonsko substituento na tetraoksanskem skeletu so imeli močnejšo protitumorsko aktivnost kot tetraoksani z adamantansko. Za dobro protitumorsko aktivnost peroksidnih spojin je potrebna rigidna ciklična struktura, saj je imela neciklična spojina z dvema peroksidnima skupinama šibko proti tumorsko delovanje oz. je bila brez njega.

# Literatura


[1] Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports.* 2007;24(6):1225-1244.

[2] Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences.* 2005;78(5):431-441.

[3] Drašar P, Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. *Journal of Chromatography B.* 2004;812(1–2):3-21.

[4] Li JW-H, Vederas JC. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science.* 2009;325(5937):161-165.

[5] Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2008;13(19–20):894-901.

[6] Foye WO, Lemke TL, Williams DA. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja.* Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

[7] Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today.* 2016;21(2):204-207.

[8] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products.* 2012;75(3):311-335.

[9] Butler MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports.* 2008;25(3):475-516.

[10] Dembitsky VM. Bioactive peroxides as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2008;43(2):223-251.

[11] Dembitsky VM, Gloriozova TA, Poroikov VV. Natural peroxy anticancer agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* 2007;7(6):571-589.

[12] Rosenthal PJ. *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery.* New Jersey: Humana Press; 2001.

[13] Klayman D. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science.* 1985;228(4703):1049-1055.

[14] *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010.* World Health Organization, http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf (zadnji dostop 6.4.2016); 2010.

[15] Iskra J. Antimalarial peroxides: from artemisinin to synthetic peroxides. V: Ortega MP, Gil IC, eds. *New Developments in Medicinal Chemistry.* New York: Nova Publishers; 2009:131-170.

[16] Opsenica DM, Šolaja BA. Antimalarial peroxides. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2009;74(11):1155-1193.

[17] Kumar N, Singh R, Rawat DS. Tetraoxanes: Synthetic and Medicinal Chemistry Perspective. *Medicinal Research Reviews.* 2012;32(3):581-610.

[18] Anthony M, Burrows J, Duparc S, Moehrle J, Wells T. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malaria Journal.* 2012;11(1):316.

[19] O'Neill PM, Amewu RK, Nixon GL, Bousejra ElGarah F, Mungthin M, Chadwick J, Shone AE, Vivas L, Lander H, Barton V, Muangnoicharoen S, Bray PG, Davies J, Park BK, Wittlin S, Brun R, Preschel M, Zhang K, Ward SA. Identification of a 1,2,4,5-Tetraoxane Antimalarial Drug-Development Candidate (RKA 182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins. *Angewandte Chemie International Edition.* 2010;49(33):5693-5697.

[20] Flannery EL, Chatterjee AK, Winzeler EA. Antimalarial Drug Discovery: Approaches and Progress towards New Medicines. *Nature reviews. Microbiology.* 2013;11(12):849-862.

[21] Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WSF. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology & Therapeutics.* 2014;142(1):126-139.

[22] O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. *Molecules.* 2010;15(3):1705-1721.

[23] Li J, Zhou B. Biological Actions of Artemisinin: Insights from Medicinal Chemistry Studies. *Molecules.* 2010;15(3):1378-1397.

[24] Butler AR, Gilbert BC, Hulme P, Irvine LR, Renton L, Whitwood AC. EPR Evidence for the Involvement of Free Radicals in the Iron-Catalysed Decomposition of Qinghaosu (Artemisinin) and Some Derivatives; Antimalarial Action of Some Polycyclic Endoperoxides. *Free Radical Research.* 1998;28(5):471-476.

[25] Robert A, Benoit-Vical F, Claparols C, Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(38):13676-13680.

[26] Ying-Zi Y, Little B, Meshnick SR. Alkylation of proteins by artemisinin: Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochemical Pharmacology.* 1994;48(3):569-573.

[27] Bhisutthibhan J, Pan X-Q, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, Dame JB, Meshnick SR. The Plasmodium falciparum Translationally Controlled Tumor Protein Homolog and Its Reaction with the Antimalarial Drug Artemisinin. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(26):16192-16198.

[28] Eichhorn T, Winter D, Büchele B, Dirdjaja N, Frank M, Lehmann W-D, Mertens R, Krauth-Siegel RL, Simmet T, Granzin J, Efferth T. Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of Plasmodium falciparum. *Biochemical Pharmacology.* 2013;85(1):38-45.

[29] Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature.* 2003;424(6951):957-961.

[30] Kannan R, Sahal D, Chauhan VS. Heme-Artemisinin Adducts Are Crucial Mediators of the Ability of Artemisinin to Inhibit Heme Polymerization. *Chemistry & Biology.* 2002;9(3):321-332.

[31] Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharmaceutical Research.* 2011;28(11):2758-2770.

[32] Liu R, Dong H-F, Guo Y, Zhao Q-P, Jiang M-S. Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors.* 2011;4(1):201.

[33] Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A. Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis. *Plos One.* 2012;7(9):e45867.

[34] O'Neill JF, Johnston RC, Halferty L, Brennan GP, Keiser J, Fairweather I. Adult triclabendazole-resistant Fasciola hepatica: morphological changes in the tegument and gut following in vivo treatment with artemether in the rat model. *Journal of Helminthology.* 2009;83:151-163.

[35] Keiser J, Veneziano V, Rinaldi L, Mezzino L, Duthaler U, Cringoli G. Anthelmintic activity of artesunate against Fasciola hepatica in naturally infected sheep. *Research in Veterinary Science.* 2010;88(1):107-110.

[36] Keiser J, Morson G. Fasciola hepatica: Tegumental alterations in adult flukes following in vitro and in vivo administration of artesunate and artemether. *Experimental Parasitology.* 2008;118(2):228-237.

[37] Duthaler U, Smith TA, Keiser J. In Vivo and In Vitro Sensitivity of Fasciola hepatica to Triclabendazole Combined with Artesunate, Artemether, or OZ78. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010;54(11):4596-4604.

[38] Dunay IR, Chan WC, Haynes RK, Sibley LD. Artemisone and Artemiside Control Acute and Reactivated Toxoplasmosis in a Murine Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009;53(10):4450-4456.

[39] Mishina YV, Krishna S, Haynes RK, Meade JC. Artemisinins Inhibit Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei rhodesiense In Vitro Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51(5):1852-1854.

[40] Nagamune K, Beatty WL, Sibley LD. Artemisinin Induces Calcium-Dependent Protein Secretion in the Protozoan Parasite Toxoplasma gondii. *Eukaryotic Cell.* 2007;6(11):2147-2156.

[41] Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingré TM, El-Feraly FS, Kampinga HH, Konings AWT. Cytotoxicity of Artemisinin-Related Endoperoxides to Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Journal of Natural Products.* 1993;56(6):849-856.

[42] Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. Antitumor Activity of Artemisinin and Its Derivatives: From a Well-Known Antimalarial Agent to a Potential Anticancer Drug. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012:247597-247614.

[43] Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today.* 2010;15(15–16):668-678.

[44] Singh NP, Verma KB. Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated with artesunate. *Archive of Oncology.* 2002;10(4):279-280.

[45] Berger TG, Dieckmann D, Efferth T, Schultz ES, Funk JO, Baur A, Schuler G. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma - first experiences. *Oncology Reports.* 2005;14(6):1599-1603.

[46] Singh NP, Panwar VK. Case Report of a Pituitary Macroadenoma Treated With Artemether. *Integrative Cancer Therapies.* 2006;5(4):391-394.

[47] Zhang Z, Yu S, Miao L, Huang X, Zhang X, Zhu Y, Xia X, Li D. Artesunate combined with vinorelbine plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: A randomized controlled trial. *Journal of Chinese Integrative Medicine.* 2008;6(2):134-138.

[48] Jansen FH, Adoubi I, Comoe J.C K, De Cnodder T, Jansen N, Tschulakow A, Efferth T. First study of oral artenimol-R in advanced cervical cancer: Clinical benefit, tolerability and tumor markers. *Anticancer Research.* 2011;31(12):4417-4422.

[49] Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed MEM, Cowan M, Finlayson C, Kovacsevics H, Jansen H, Kremsner PG, Efferth T, Kumar D. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2015;2(1):82-90.

[50] Firestone GL, Sundar SN. Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2009;11:e32.

[51] Lai H, Singh N, Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Investigational New Drugs.* 2013;31(1):230-246.

[52] Qian R, Li Z, Yu J, Ma DJ. The immunologic and antiviral effect of qinghaosu. *Journal of Traditional Chinese Medicine.* 1982;2(4):271-276.

[53] Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;47(6):804-811.

[54] Shapira MY, Resnick IB, Chou S, Neumann AU, Lurain NS, Stamminger T, Caplan O, Saleh N, Efferth T, Marschall M, Wolf DG. Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;46(9):1455-1457.

[55] Hakacova N, Klingel K, Kandolf R, Engdahl E, Fogdell-Hahn A, Higgins T. First therapeutic use of Artesunate in treatment of human herpesvirus 6B myocarditis in a child. *Journal of Clinical Virology.* 2013;57(2):157-160.

[56] Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2008;29(10):520-527.

[57] Schreiber A, Härter G, Schubert A, Bunjes D, Mertens T, Michel D. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2009;10(2):191-209.

[58] Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong S-M, Hauber I, Olbrich A, Kronschnabl M, Stamminger T, Huang E-S. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *Journal of Molecular Medicine.* 2002;80(4):233-242.

[59] Kaptein SJF, Efferth T, Leis M, Rechter S, Auerochs S, Kalmer M, Bruggeman CA, Vink C, Stamminger T, Marschall M. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Research.* 2006;69(2):60-69.

[60] Shen M, Ge HL, He YX, Song QL, Zhang HZ. Immunosuppressive action of Qinghaosu. *Scientia Sinica. Series B, Chemical, biological, agricultural, medical & earth sciences / Chung-kuo k"o hsueh yuan, chu pan.* 1984;27(4):398-406.

[61] Tawfik AF, Bishop SJ, Ayalp A, El-Feraly FS. Effects of artemisinin, dihydroartemisinin and arteether on immune responses of normal mice. *International Journal of Immunopharmacology.* 1990;12(4):385-389.

[62] Sun XX, S.; Long, Z.; Zhang, Z.; Tu, Y. Experimental study on the immunosuppressive effects of Qinghaosu and its derivatives. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1991;11:37-38.

[63] Ho WE, Cheng C, Peh HY, Xu FG, Tannenbaum SR, Ong CN, Wong WSF. Anti-malarial drug artesunate ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma. *Free Radical Biology and Medicine.* 2012;53(3):498-507.

[64] Shakir L, Hussain M, Javeed A, Ashraf M, Riaz A. Artemisinins and immune system. *European Journal of Pharmacology.* 2011;668(1-2):6-14.

[65] Shi C, Li H, Yang Y, Hou L. Anti-Inflammatory and Immunoregulatory Functions of Artemisinin and Its Derivatives. *Mediators of Inflammation.* 2015:435713-443519.

[66] Dickerson F, Stallings C, Vaughan C, Origoni A, Goga J, Khushalani S, Yolken R. Artemisinin reduces the level of antibodies to gliadin in schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2011;129(2):196-200.

[67] Galal AM, Ross SA, Jacob M, ElSohly MA. Antifungal Activity of Artemisinin Derivatives. *Journal of Natural Products.* 2005;68(8):1274-1276.

[68] Gautam P, Upadhyay S, Hassan W, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram C, Gade W, Basir S, Singh Y, Sarma P. Transcriptomic and Proteomic Profile of Aspergillus fumigatus on Exposure to Artemisinin. *Mycopathologia.* 2011;172(5):331-346.

[69] Goswami S, Bhakuni RS, Chinniah A, Pal A, Kar SK, Das PK. Anti-Helicobacter pylori Potential of Artemisinin and Its Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012;56(9):4594-4607.

[70] Li B, Yao Q, Pan X-C, Wang N, Zhang R, Li J, Ding G, Liu X, Wu C, Ran D, Zheng J, Zhou H. Artesunate enhances the antibacterial effect of $\beta$-lactam antibiotics against Escherichia coli by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;66(4):769-777.

[71] Zeng Q-P, Xiao N, Wu P, Yang X-Q, Zeng L-X, Guo X-X, Zhang P-Z, Qiu F. Artesunate potentiates antibiotics by inactivating heme-harbouring bacterial nitric oxide synthase and catalase. *BMC Research Notes.* 2011;4(1):1-8.

[72] Zhou F-W, Lei H-S, Fan L, Jiang L, Liu J, Peng X-M, Xu X-R, Chen L, Zhou C-H, Zou Y-Y, Liu C-P, He Z-Q, Yang D-C. Design, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin–fluoroquinolone conjugates as a novel type of

potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2014;24(8):1912-1917.

[73] Miller MJ, Walz AJ, Zhu H, Wu C, Moraski G, Möllmann U, Tristani EM, Crumbliss AL, Ferdig MT, Checkley L, Edwards RL, Boshoff HI. Design, Synthesis, and Study of a Mycobactin−Artemisinin Conjugate That Has Selective and Potent Activity against Tuberculosis and Malaria. *Journal of the American Chemical Society.* 2011;133(7):2076-2079.

[74] Aminake MN, Mahajan A, Kumar V, Hans R, Wiesner L, Taylor D, de Kock C, Grobler A, Smith PJ, Kirschner M, Rethwilm A, Pradel G, Chibale K. Synthesis and evaluation of hybrid drugs for a potential HIV/AIDS-malaria combination therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2012;20(17):5277-5289.

[75] Vennerstrom JL, Fu HN, Ellis WY, Ager AL, Wood JK, Andersen SL, Gerena L, Milhous WK. Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: a new class of antimalarial peroxides. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1992;35(16):3023-3027.

[76] Vennerstrom JL, Ager AL, Andersen SL, Grace JM, Wongpanich V, Angerhofer CK, Hu JK, Wesche DL. Assessment of the antimalarial potential of tetraoxane WR 148999. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2000;62(5):573-578.

[77] Vennerstrom JL, Dong YX, Andersen SL, Ager AL, Fu HN, Miller RE, Wesche DL, Kyle DE, Gerena L, Walters SM, Wood JK, Edwards G, Holme AD, McLean WG, Milhous WK. Synthesis and antimalarial activity of sixteen dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: Alkyl-substituted 7,8,15,16-tetraoxadispiro 5.2.5.2 hexadecanes. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2000;43(14):2753-2758.

[78] McCullough KJ, Wood JK, Bhattacharjee AK, Dong Y, Kyle DE, Milhous WK, Vennerstrom JL. Methyl-Substituted Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: Correlations of Structural Studies with Antimalarial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2000;43(6):1246-1249.

[79] Dong Y, Matile H, Chollet J, Kaminsky R, Wood JK, Vennerstrom JL. Synthesis and Antimalarial Activity of 11 Dispiro-1,2,4,5-tetraoxane Analogues of WR 148999. 7,8,15,16-Tetraoxadispiro[5.2.5.2]hexadecanes Substituted at the 1 and 10 Positions with Unsaturated and Polar Functional Groups. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1999;42(8):1477-1480.

[80] Dong Y, McCullough KJ, Wittlin S, Chollet J, Vennerstrom JL. The structure and antimalarial activity of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes derived from (+)-dihydrocarvone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2010;20(22):6359-6361.

[81] Todorovic NM, Stefanovic M, Tinant B, Declercq JP, Makler MT, Solaja BA. Steroidal geminal dihydroperoxides and 1,2,4,5-tetraoxanes: Structure determination and their antimalarial activity. *Steroids.* 1996;61(12):688-696.

[82] Opsenica D, Pocsfalvi G, Juranic Z, Tinant B, Declercq JP, Kyle DE, Milhous WK, Solaja BA. Cholic acid derivatives as 1,2,4,5-tetraoxane carriers: Structure and antimalarial and antiproliferative activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2000;43(17):3274-3282.

[83] Opsenica R, Angelovski G, Pocsfalvi G, Juranic Z, Zizak Z, Kyle D, Milhous WK, Solaja BA. Antimalarial and antiproliferative evaluation of bis-steroidal tetraoxanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003;11(13):2761-2768.

[84] Šolaja BA, Terzić N, Pocsfalvi G, Gerena L, Tinant B, Opsenica D, Milhous WK. Mixed Steroidal 1,2,4,5-Tetraoxanes: Antimalarial and Antimycobacterial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2002;45(16):3331-3336.

[85] Terzic N, Opsenica D, Milic D, Tinant B, Smith KS, Milhous WK, Solaja BA. Deoxycholic acid-derived tetraoxane antimalarials and antiproliferatives. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2007;50(21):5118-5127.

[86] Opsenica I, Opsenica D, Smith KS, Milhous WK, Solaja BA. Chemical stability of the peroxide bond enables diversified synthesis of potent tetraoxane Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2008;51(7):2261-2266.

[87] Opsenica I, Terzic N, Opsenica D, Angelovski G, Lehnig M, Eilbracht P, Tinant B, Juranic Z, Smith KS, Yang YS, Diaz DS, Smith PL, Milhous WK, Dokovic D, Solaja BA. Tetraoxane antimalarials and their reaction with Fe(II). *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006;49(13):3790-3799.

[88] Terzić N, Konstantinović J, Tot M, Burojević J, Djurković-Djaković O, Srbljanović J, Štajner T, Verbić T, Zlatović M, Machado M, Albuquerque IS, Prudêncio M, Sciotti RJ, Pecic S, D'Alessandro S, Taramelli D, Šolaja BA. Reinvestigating Old Pharmacophores: Are 4-Aminoquinolines and Tetraoxanes Potential Two-Stage Antimalarials? *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;59(1):264-281.

[89] Opsenica DM, Terzic N, Smith PL, Yang Y, Anova L, Smith KS, Solaja BA. Mixed tetraoxanes containing the acetone subunit as antimalarials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2008;16(14):7039-7045.

[90] Opsenica D, Pocsfalvi G, Milhous WK, Solaja BA. Antimalarial peroxides: the first intramolecular 1,2,4,5-tetraoxane. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2002;67(7):465-471.

[91] Opsenica I, Terzic N, Opsenica D, Milhous WK, Solaja B. 7,8,15,16-tetraoxa-dispiro [5.2.5.2] hexadecane-3-carboxylic acid derivatives and their antimalarial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2004;69(11):919-922.

[92] Opsenica DM, Radivojević J, Matić IZ, Štajner T, Knežević-Ušaj S, Đurković-Đaković O, Šolaja BA. Tetraoxanes as inhibitors of apicomplexan parasites Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii and anti-cancer molecules. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2015;80(11):1339-1359.

[93] Amewu R, Stachulski AV, Ward SA, Berry NG, Bray PG, Davies J, Labat G, Vivas L, O'Neill PM. Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes; synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2006;4(24):4431-4436.

[94] Ellis GL, Amewu R, Sabbani S, Stocks PA, Shone A, Stanford D, Gibbons P, Davies J, Vivas L, Charnaud S, Bongard E, Hall C, Rimmer K, Lozanom S, Jesus M, Gargallo D, Ward SA, O'Neill PM. Two-step synthesis of achiral dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes with outstanding antimalarial activity, low toxicity, and high-stability profiles. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2008;51(7):2170-2177.

[95] Haynes RK. From Artemisinin to New Artemisinin Antimalarials: Biosynthesis, Extraction, Old and New Derivatives, Stereochemistry and Medicinal Chemistry Requirements. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2006;6(5):509-537.

[96] Marti F, Chadwick J, Amewu RK, Burrell-Saward H, Srivastava A, Ward SA, Sharma R, Berry N, O'Neill PM. Second generation analogues of RKA182: synthetic tetraoxanes with outstanding in vitro and in vivo antimalarial activities. *Medicinal Chemical Communications.* 2011;2(7):661-665.

[97] Amewu RK, Chadwick J, Hussain A, Panda S, Rinki R, Janneh O, Ward SA, Miguel C, Burrell-Saward H, Vivas L, O'Neill PM. Synthesis and evaluation of the antimalarial, anticancer, and caspase 3 activities of tetraoxane dimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2013;21(23):7392-7397.

[98] Atheaya H, Khan SI, Mamgain R, Rawat DS. Synthesis, thermal stability, antimalarial activity of symmetrically and asymmetrically substituted tetraoxanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2008;18(4):1446-1449.

[99] Kumar N, Khan SI, Atheaya H, Mamgain R, Rawat DS. Synthesis and in vitro antimalarial activity of tetraoxane-amine/amide conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2011;46(7):2816-2827.

[100] Kumar N, Khan SI, Beena, Rajalakshmi G, Kumaradhas P, Rawat DS. Synthesis, antimalarial activity and cytotoxicity of substituted 3,6-diphenyl- 1,2,4,5 tetraoxanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2009;17(15):5632-5638.

[101] Kumar N, Khan SI, Sharma M, Atheaya H, Rawat DS. Iodine-catalyzed one-pot synthesis and antimalarial activity evaluation of symmetrically and asymmetrically substituted 3,6-diphenyl 1,2,4,5 tetraoxanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2009;19(6):1675-1677.

[102] Franco LL, de Almeida MV, e Silva LFR, Vieira PPR, Pohlit AM, Valle MS. Synthesis and Antimalarial Activity of Dihydroperoxides and Tetraoxanes Conjugated with Bis(benzyl)acetone Derivatives. *Chemical Biology & Drug Design.* 2012;79(5):790-797.

[103] Zmitek K, Stavber S, Zupan M, Bonnet-Delpon D, Charneau S, Grellier P, Iskra J. Synthesis and antimalarial activities of novel 3,3,6,6-tetraalkyl-1,2,4,5-tetraoxanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2006;14(23):7790-7795.

[104] Fernandez I, Robert A. Peroxide bond strength of antimalarial drugs containing an endoperoxide cycle. Relation with biological activity. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2011;9(11):4098-4107.

[105] Opsenica IM, Smith KK, Gerena L, Gaica S. Ribofuranose as a carrier of tetraoxane and 4-aminoquinoline antimalarial pharmacophores. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2008;73(11):1021-1025.

[106] Kumura N, Furukawa H, Kobayashi M, Onyango AN, Izumi M, Nakajima S, Kim HS, Wataya Y, Baba N. Synthesis of Novel Conjugates of Tetraoxane Endoperoxide with Bis(Quaternary Ammonium Salts). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 2009;73(1):217-220.

[107] Calas M, Ancelin ML, Cordina G, Portefaix P, Piquet G, Vidal-Sailhan V, Vial H. Antimalarial activity of compounds interfering with Plasmodium falciparum

phospholipid metabolism: Comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2000;43(3):505-516.

[108] Oliveira R, Miranda D, Magalhães J, Capela R, Perry MJ, O'Neill PM, Moreira R, Lopes F. From hybrid compounds to targeted drug delivery in antimalarial therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2015;23(16):5120-5130.

[109] Opsenica I, Opsenica D, Lanteri CA, Anova L, Milhous WK, Smith KS, Solaja BA. New chimeric antimalarials with 4-aminoquinoline moiety linked to a tetraoxane skeleton. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2008;51(19):6216-6219.

[110] Chadwick J, Amewu RK, Marti F, Garah FB-E, Sharma R, Berry NG, Stocks PA, Burrell-Saward H, Wittlin S, Rottmann M, Brun R, Taramelli D, Parapini S, Ward SA, O'Neill PM. Antimalarial Mannoxanes: Hybrid Antimalarial Drugs with Outstanding Oral Activity Profiles and A Potential Dual Mechanism of Action. *ChemMedChem.* 2011;6(8):1357-1361.

[111] Miranda D, Capela R, Albuquerque IS, Meireles P, Paiva I, Nogueira F, Amewu R, Gut J, Rosenthal PJ, Oliveira R, Mota MM, Moreira R, Marti F, Prudencio M, O'Neill PM, Lopes F. Novel Endoperoxide-Based Transmission-Blocking Antimalarials with Liver- and Blood-Schizontocidal Activities. *Acs Medicinal Chemistry Letters.* 2014;5(2):108-112.

[112] Oliveira R, Newton AS, Guedes RC, Miranda D, Amewu RK, Srivastava A, Gut J, Rosenthal PJ, O'Neill PM, Ward SA, Lopes F, Moreira R. An Endoperoxide-Based Hybrid Approach to Deliver Falcipain Inhibitors Inside Malaria Parasites. *ChemMedChem.* 2013;8(9):1528-1536.

[113] Oliveira R, Guedes RC, Meireles P, Albuquerque IS, Gonçalves LM, Pires E, Bronze MR, Gut J, Rosenthal PJ, Prudêncio M, Moreira R, O'Neill PM, Lopes F. Tetraoxane–Pyrimidine Nitrile Hybrids as Dual Stage Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2014;57(11):4916-4923.

[114] Kumar N, Khan SI, Rawat DS. Synthesis and Antimalarial-Activity Evaluation of Tetraoxane-Triazine Hybrids and Spiro piperidine-4,3 '-tetraoxanes. *Helvetica Chimica Acta.* 2012;95(7):1181-1197.

[115] Kumura N, Furukawa H, Onyango AN, Izumi M, Nakajima S, Ito H, Hatano T, Kim H-S, Wataya Y, Baba N. Different behavior of artemisinin and tetraoxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2009;160(2):114-120.

[116] Garah FB-E, Stigliani J-L, Coslédan F, Meunier B, Robert A. Docking Studies of Structurally Diverse Antimalarial Drugs Targeting PfATP6: No Correlation between in silico Binding Affinity and in vitro Antimalarial Activity. *ChemMedChem.* 2009;4(9):1469-1479.

[117] O'Neill PM, Posner GH. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2004;47(12):2945-2964.

[118] Bousejra-El Garah F, Wong MH-L, Amewu RK, Muangnoicharoen S, Maggs JL, Stigliani J-L, Park BK, Chadwick J, Ward SA, O'Neill PM. Comparison of the Reactivity of Antimalarial 1,2,4,5-Tetraoxanes with 1,2,4-Trioxolanes in the Presence of Ferrous Iron Salts, Heme, and Ferrous Iron

Salts/Phosphatidylcholine. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2011;54(19):6443-6455.

[119] Tonmunphean S, Wijitkosoom A, Tantirungrotechai Y. Influence of stereoisomer of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes on their binding mode with heme and on antimalarial activity: molecular docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2004;12(9):2005-2012.

[120] Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends in Parasitology.* 2007;23(11):555-562.

[121] Zhao Q, Vargas M, Dong Y, Zhou L, Wang X, Sriraghavan K, Keiser J, Vennerstrom JL. Structure−Activity Relationship of an Ozonide Carboxylic Acid (OZ78) against Fasciola hepatica. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2010;53(10):4223-4233.

[122] Wang X, Zhao Q, Vargas M, Dong Y, Sriraghavan K, Keiser J, Vennerstrom JL. The activity of dispiro peroxides against Fasciola hepatica. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011;21(18):5320-5323.

[123] Kirchhofer C, Vargas M, Braissant O, Dong Y, Wang X, Vennerstrom JL, Keiser J. Activity of OZ78 analogues against Fasciola hepatica and Echinostoma caproni. *Acta Tropica.* 2011;118(1):56-62.

[124] Ingram K, Yaremenko IA, Krylov IB, Hofer L, Terent'ev AO, Keiser J. Identification of Antischistosomal Leads by Evaluating Bridged 1,2,4,5-Tetraoxanes, Alphaperoxides, and Tricyclic Monoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2012;55(20):8700-8711.

[125] Cowan N, Yaremenko IA, Krylov IB, Terent'ev AO, Keiser J. Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine derivatives against Schistosoma mansoni. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2015;23(16):5175-5181.

[126] Keiser J, Ingram K, Vargas M, Chollet J, Wang X, Dong Y, Vennerstrom JL. In Vivo Activity of Aryl Ozonides against Schistosoma Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012;56(2):1090-1092.

[127] Duan WW, Qiu SJ, Zhao Y, Sun HA, Qiao CH, Xia CM. Praziquantel derivatives exhibit activity against both juvenile and adult Schistosoma japonicum. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2012;22(4):1587-1590.

[128] Wesche DL, DeCoster MA, Tortella FC, Brewer TG. Neurotoxicity of artemisinin analogs in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1994;38(8):1813-1819.

[129] Žižak Ž, Juranić Z, Opsenica D, Šolaja B. Mixed steroidal tetraoxanes induce apoptotic cell death in tumor cells. *Investigational New Drugs.* 2009;27(5):432-439.

[130] Opsenica D, Kyle DE, Milhous WK, Solaja BA. Antimalarial, antimycobacterial and antiproliferative activity of phenyl substituted mixed tetraoxanes. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2003;68(4-5):291-302.

[131] Cvijetic IN, Zizak ZP, Stanojkovic TP, Juranic ZD, Terzic N, Opsenica IM, Opsenica DM, Juranic IO, Drakulic BJ. An alignment independent 3D QSAR

study of the antiproliferative activity of 1,2,4,5-tetraoxanes. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2010;45(10):4570-4577.

[132] Griesbaum K, Kim WS, Nakamura N, Mori M, Nojima M, Kusabayashi S. Ozonolysis of vinyl ethers in solution and on polyethylene. *The Journal of Organic Chemistry.* 1990;55(25):6153-6161.

[133] Nakamura N, Nojima M, Kusabayashi S. Ozonolysis of vinyl ethers. Evidence for intramolecular oxygen transfer from a carbonyl oxide moiety to a methoxyvinyl group. *Journal of the American Chemical Society.* 1987;109(16):4969-4973.

[134] Griesbaum K, Krieger-Beck P, Beck J. Dispiro-1,2,4-trioxolane durch Ozonolyse von Cycloalkylidencycloalkanen auf Polyethylen. *Chemische Berichte.* 1991;124(2):391-396.

[135] Dong Y, Vennerstrom JL. Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes via Ozonolysis of Cycloalkanone O-Methyl Oximes: A Comparison with the Peroxidation of Cycloalkanones in Acetonitrile−Sulfuric Acid Media. *The Journal of Organic Chemistry.* 1998;63(23):8582-8585.

[136] Ito Y, Yokoya H, Umehara Y, Matsuura T. Formation of ketone diperoxides from ozonation of O-methyloximes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 1980;53(8):2407-2408.

[137] Terent'ev AO, Borisov DA, Vil' VA, Dembitsky VM. Synthesis of five- and six-membered cyclic organic peroxides: Key transformations into peroxide ring-retaining products. *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 2014;10:34-114.

[138] Zmitek K, Zupan M, Iskra J. alpha-Substituted organic peroxides: synthetic strategies for a biologically important class of gem-dihydroperoxide and perketal derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2007;5(24):3895-3908.

[139] Ramirez A, Woerpel KA. Synthesis of 1,2-Dioxolanes by Annulation Reactions of Peroxycarbenium Ions with Alkenes. *Organic Letters.* 2005;7(21):4617-4620.

[140] Yadav N, Sharma C, Awasthi SK. Diversification in the synthesis of antimalarial trioxane and tetraoxane analogs. *RSC Advances.* 2014;4(11):5469-5498.

[141] Zmitek K, Stavber S, Zupan M, Bonnet-Delpon D, Iskra J. Fluorinated alcohol directed formation of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes by hydrogen peroxide under acid conditions. *Tetrahedron.* 2006;62(7):1479-1484.

[142] Dong Y, Creek D, Chollet J, Matile H, Charman SA, Wittlin S, Wood JK, Vennerstrom JL. Comparative Antimalarial Activities of Six Pairs of 1,2,4,5-Tetraoxanes (Peroxide Dimers) and 1,2,4,5,7,8-Hexaoxonanes (Peroxide Trimers). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51(8):3033-3035.

[143] Das AM, Hazarika MP. Synthesis of some novel steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes. *RSC Advances.* 2015;5(26):19818-19822.

[144] Iskra J, Bonnet-Delpon D, Bégué J-P. One-pot synthesis of non-symmetric tetraoxanes with the H2O2/MTO/fluorous alcohol system. *Tetrahedron Letters.* 2003;44(33):6309-6312.

[145] Yan X, Chen J, Zhu Y-T, Qiao C. Phosphomolybdic Acid Catalyzed Synthesis of 1,2,4,5-Tetraoxanes. *Synlett.* 2011(19):2827-2830.

[146] Ghorai P, Dussault PH. Broadly Applicable Synthesis of 1,2,4,5-Tetraoxanes. *Organic Letters.* 2009;11(1):213-216.

[147] Sashidhara KV, Avula SR, Ravithej Singh L, Palnati GR. A facile and efficient Bi(III) catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides and 1,2,4,5-tetraoxanes. *Tetrahedron Letters.* 2012;53(36):4880-4884.

[148] Zmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. Iodine as a catalyst for efficient conversion of ketones to gem-dihydroperoxides by aqueous hydrogen peroxide. *Organic Letters.* 2006;8(12):2491-2494.

[149] Terent'ev AO, Kutkin AV, Starikova ZA, Antipin MY, Ogibin YN, Nikishina GI. New preparation of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Synthesis.* 2004(14):2356-2366.

[150] Hamann H-J, Hecht M, Bunge A, Gogol M, Liebscher J. Synthesis and antimalarial activity of new 1,2,4,5-tetroxanes and novel alkoxy-substituted 1,2,4,5-tetroxanes derived from primary gem-dihydroperoxides. *Tetrahedron Letters.* 2011;52(1):107-111.

[151] Kim H-S, Tsuchiya K, Shibata Y, Wataya Y, Ushigoe Y, Masuyama A, Nojima M, J. McCullough K. Synthetic methods for unsymmetrically-substituted 1,2,4,5-tetroxanes and of 1,2,4,5,7-pentoxocanes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 1999(13):1867-1870.

[152] Milas NA, Mageli OL, Golubovic A, Arndt RW, Ho JCJ. Studies in Organic Peroxides. XXIX. The Structure of Peroxides Derived from 2,4-Pentanedione and Hydrogen Peroxide. *Journal of the American Chemical Society.* 1963;85(2):222-226.

[153] Terent'ev AO, Borisov DA, Chernyshev VV, Nikishin GI. Facile and Selective Procedure for the Synthesis of Bridged 1,2,4,5-Tetraoxanes; Strong Acids As Cosolvents and Catalysts for Addition of Hydrogen Peroxide to beta-Diketones. *Journal of Organic Chemistry.* 2009;74(9):3335-3340.

[154] Terent'ev AO, Yaremenko IA, Vil VA, Moiseev IK, Kon'kov SA, Dembitsky VM, Levitsky DO, Nikishin GI. Phosphomolybdic and phosphotungstic acids as efficient catalysts for the synthesis of bridged 1,2,4,5-tetraoxanes from $\beta$-diketones and hydrogen peroxide. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2013;11(16):2613-2623.

[155] Yaremenko IA, Terent'ev AO, Vil VA, Novikov RA, Chernyshev VV, Tafeenko VA, Levitsky DO, Fleury F, Nikishin GI. Approach for the Preparation of Various Classes of Peroxides Based on the Reaction of Triketones with H2O2: First Examples of Ozonide Rearrangements. *Chemistry - A European Journal.* 2014;20(32):10160-10169.

[156] *CrysAlisPro* 1.171.38.41, Rigaku Oxford Diffraction. 2015.

[157] Clark RC, Reid JS. The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Crystallographica Section A.* 1995;51(6):887-897.

[158] Dolomanov OV, Bourhis LJ, Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography.* 2009;42(2):339-341.

[159] Palatinus L, Chapuis G. SUPERFLIP– a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions. *Journal of Applied Crystallography.* 2007;40(4):786-790.

[160] Palatinus L, Prathapa SJ, van Smaalen S. EDMA: a computer program for topological analysis of discrete electron densities. *Journal of Applied Crystallography.* 2012;45(3):575-580.

[161] Sheldrick G. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A.* 2015;71(1):3-8.

[162] Sheldrick G. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C.* 2015;71(1):3-8.

[163] Brandenburg K. *DIAMOND – Visual Structure Information System, v. 3.1, Crystal Impact GbR* Bonn, Nemčija; 1997-2005.

[164] Goti A, Cardona F. Hydrogen Peroxide in Green Oxidation Reactions: Recent Catalytic Processes. V: Tundo P, Esposito V, eds. *Green Chemical Reactions.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2008:191-212.

[165] Dilthey W, Inckel M, Stephan H. Die Oxydation der Ketone mit Perhydrol [Enium, XXXV]. *Journal für Praktische Chemie.* 1940;154(6-10):219-237.

[166] Renz M, Meunier B. 100 Years of Baeyer–Villiger Oxidations. *European Journal of Organic Chemistry.* 1999;4:737-750.

[167] Rieche A. *Alkylperoxyde und ozonide: studien über peroxydischen sauerstoff.* Dresden in Leipzig: T. Steinkopff; 1931.

[168] Zmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. The Effect of Iodine on the Peroxidation of Carbonyl Compounds. *Journal of Organic Chemistry.* 2007;72(17):6534-6540.

[169] Azarifar D, Najminejad Z, Khosravi K. Synthesis of gem-Dihydroperoxides from Ketones and Aldehydes Using Silica Sulfuric Acid as Heterogeneous Reusable Catalyst. *Synthetic Communications.* 2012;43(6):826-836.

[170] Azarifar D, Khosravi K. AlCl3.6H2O as a catalyst for simple and efficient synthesis of gem-dihydroperoxides from ketones and aldehydes using aqueous H2O2. *Journal of the Iranian Chemical Society.* 2011;8(4):1006-1013.

[171] Cui L, Tada N, Okubo H, Miura T, Itoh A. Efficient synthesis of gem-dihydroperoxides with molecular oxygen and anthraquinone under visible light irradiation with fluorescent lamp. *Green Chemistry.* 2011;13(9):2347-2350.

[172] Tada N, Cui L, Okubo H, Miura T, Itoh A. An Efficient Synthesis of gem-Dihydroperoxides with Molecular Oxygen and Anthracene under Light Irradiation. *Advanced Synthesis & Catalysis.* 2010;352(14-15):2383-2386.

[173] Azarifar D, Khosravi K, Soleimanei F. Stannous Chloride Dihydrate: A Novel and Efficient Catalyst for the Synthesis of gem-Dihydroperoxides from Ketones and Aldehydes. *Synthesis-Stuttgart.* 2009(15):2553-2556.

[174] Carnell AJ, Clegg W, Johnstone RAW, Parsy CC, Sanderson WR. 2-Bromocyclohexanone Perhydrate—X-ray Crystal Structure and Conformational Effects on Reactivity in Sulfoxidations. *Tetrahedron.* 2000;56(35):6571-6575.

[175] Regan CF, Pierre F, Schwaebe MK, Haddach M, Jung ME, Ryckman DM. A Facile Synthesis of 5-Halopyrimidine-4-Carboxylic Acid Esters via a Minisci Reaction. *Synlett.* 2012;03:443-447.

[176] Blank O, Raschke N, Heinrich MR. Hydroperoxides and aryl diazonium salts as reagents for the functionalization of non-activated olefins. *Tetrahedron Letters.* 2010;51(13):1758-1760.

[177] Prechter A, Heinrich MR. Hydrogen Peroxide and Arenediazonium Salts as Reagents for a Radical Beckmann-Type Rearrangement. *Synthesis.* 2011;10:1515-1525.

[178] Rozhko E, Solmi S, Cavani F, Albini A, Righi P, Ravelli D. Revising the Role of a Dioxirane as an Intermediate in the Uncatalyzed Hydroperoxidation of Cyclohexanone in Water. *The Journal of Organic Chemistry.* 2015;80(12):6425-6431.

[179] Pierce CJ, Hilinski MK. Chemoselective Hydroxylation of Aliphatic sp3 C–H Bonds Using a Ketone Catalyst and Aqueous H2O2. *Organic Letters.* 2014;16(24):6504-6507.

[180] Starkl Renar K, Pecar S, Iskra J. Activation of aqueous hydrogen peroxide for non-catalyzed dihydroperoxidation of ketones by azeotropic removal of water. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2015;13(36):9369-9372.

[181] Orita A, Uehara G, Miwa K, Otera J. Rate acceleration of organic reaction by immediate solvent evaporation. *Chemical Communications.* 2006(45):4729-4731.

[182] Smallwood IM. *Handbook of Organic Solvent Properties.* New York: Wiley; 1996.

[183] *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 55 ed. Cleaveland: CRC Press; 1974-1975.

[184] 1,2-dimethoxyethane: chemical product info at chemindustry.ru. http://chemindustry.ru/Dimethoxyethane.php (zadnji dostop: 6.4.2016).

[185] Kharasch MS, Sosnovsky G. Structure of Peroxides Derived from Cyclohexanone and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Organic Chemistry.* 1958;23(9):1322-1326.

[186] Martyn DC, Ramirez AP, Beattie MJ, Cortese JF, Patel V, Rush MA, Woerpel KA, Clardy J. Synthesis of spiro-1,2-dioxolanes and their activity against Plasmodium falciparum. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2008;18(24):6521-6524.

[187] Liu Y-H, Deng J, Gao J-W, Zhang Z-H. Triflic Acid-Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a Magnetically Separable Catalyst for Synthesis of gem-Dihydroperoxides. *Advanced Synthesis & Catalysis.* 2012;354(2-3):441-447.

[188] Surya Prakash GK, Shakhmin A, Glinton KE, Rao S, Mathew T, Olah GA. Poly(N-vinylpyrrolidone)-H2O2 and poly(4-vinylpyridine)-H2O2 complexes: solid H2O2 equivalents for selective oxidation of sulfides to sulfoxides and ketones to gem-dihydroperoxides. *Green Chemistry.* 2014;16(7):3616-3622.

[189] Ghorai P, Dussault PH. Mild and Efficient Re(VII)-Catalyzed Synthesis of 1,1-Dihydroperoxides. *Organic Letters.* 2008;10(20):4577-4579.

[190] Li Y, Hao H-D, Zhang Q, Wu Y. A Broadly Applicable Mild Method for the Synthesis of gem-Diperoxides from Corresponding Ketones or 1,3-Dioxolanes. *Organic Letters.* 2009;11(7):1615-1618.

[191] Tada N, Cui L, Okubo H, Miura T, Itoh A. A facile catalyst-free synthesis of gem-dihydroperoxides with aqueous hydrogen peroxide. *Chemical Communications.* 2010;46(10):1772-1774.

[192] Starkl K. *Sinteza potencialno biološko aktivnih hidroperoksidov z vodikovim peroksidom = Synthesis of potential bilogically active hydroperoxides with*

*hydrogen peroxide : [diplomska naloga]*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2012.

[193] Rieche A. Über Peroxyde der Äther, der Carbonyl-Verbindungen und die Ozonide. *Angewandte Chemie.* 1958;70(9):251-266.

[194] Chapurkin VV, Rakhimov AI, Chapurkin SV. Synthesis and features of thermolysis of fluorine-containing aromatic 1-hydroxy-1-hydroperoxides and 1,1′-dihydroperoxides. *Russian Journal of General Chemistry.* 2009;79(2):242-245.

[195] Neimann K, Neumann R. Electrophilic Activation of Hydrogen Peroxide: Selective Oxidation Reactions in Perfluorinated Alcohol Solvents. *Organic Letters.* 2000;2(18):2861-2863.

[196] Kumura N, Furukawa H, Onyango AN, Izumi M, Nakajima S, Ito H, Hatano T, Kim H-S, Wataya Y, Baba N. Antimalarial artemisinin and tetraoxane endoperoxides behave differently in the oxidative degradation of unsaturated phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2009;160:S28-S29.

[197] Jung M, Kim H, Lee K, Park M. Naturally Occurring Peroxides with Biological Activities. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* 2003;3(2):159-165.

[198] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols.* 2008;3(2):163-175.

[199] Chaithongwongwatthana S, Limpongsanurak S, Sitthi-Amorn C. Single hydrogen peroxide vaginal douching versus single-dose oral metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet.* 2003;86 Suppl 2:S379-384.

[200] Rutala WA, Weber DJ. *CDC - Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.* Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf (zadnji dostop: 6.4.2016).

# Bibliografija

## Objave v povezavi z delom

### Članki v revijah

#### Izvirni znanstveni članek

**1.** Starkl Renar K, Pečar S, Iskra J. Activation of aqueous hydrogen peroxide for non-catalyzed dihydroperoxidation of ketones by azeotropic removal of water. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2015;13(36):9369-9372

#### Pregledni znanstveni članek

**2.** Starkl K, Mravljak J. Zdravljenje in preprečevanje malarije = Antimalarial therapy and prophylaxis. *Farmacevtski vestnik*. 2013;64(5), 371-379.

### Prispevek na konferenci

#### Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

**3.** Starkl K, Iskra J. Selectivity in the synthesis of unsymmetrical tetraoxanes. V: 7. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana = 7th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference, 20.-22. 5. 2015, Ljubljana. Rešetič A (ur.), et al. *Zbornik : 2. del = Proceedings : part 2*. Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, 2015,1,241-250.
**4.** Starkl K, Kramer L, Turk B, Iskra J. Sinteza in protitumorsko delovanje nesimetričnih 1,2,4,5 - tetraoksanov = Synthesis and antitumor activity of unsymmetrical 1,2,4,5 - tetraoxanes. V: Slovenski kemijski dnevi 2015, Ljubljana, 24. - 25. september 2015 = Slovenian Chemical Days 2015, Ljubljana, September 24 - 25, 2015. Kaučič V (ur.), et al. *Zbornik referatov in povzetkov*. Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo, 2015, 6 strani.

#### Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljeno predavanje)

**5.** Starkl K, Kramer L, Turk B, Iskra J. Synthesis of unsymmetrical 1,2,3,5-tetraoxanes and evaluation of their antitumor activity. V: Chaudary S (ur.), Joshi J (ur.). *International Conferences on Current Challenges in Drug Discovery Research : CCDDR 2015, 23-25 November 2015, Jaipur, Rajasthan (India)*. New Delhi: Excel India Publishers, 2015, str. 41.

**Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci**

**6.** Starkl K, Kramer L, Turk B, Iskra J. Unsymmetrical 1,2,4,5-tetraoxanes and their antitumor activity. V: Prpar Mihevc S (ur.), Prunk M (ur.), Pungerčar J (ur.). *10th Young researchers' day, 31 March, 2016, Ljubljana : program and abstract book*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2016, str. 6.
**7.** Starkl K, Iskra J. Overcoming the selectivity issue in the synthesis of unsymmetrical tetraoxanes. V: Kavčič N (ur.), et al. *9th Young researchers' day, April 7, 2015, Ljubljana : program and abstract book*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2015, str. 22.
**8.** Starkl K, Rak M, Cör A. Synthesis and antimicrobial activity of 1,2,4,5-tetraoxane derivatives. V: 15th Tetrahedron Symposium, 24-27 June 2014, London, UK. *Challenges in bioorganic and organic medicinal chemistry*, 2014.
**9.** Starkl K, Iskra J. Non-catalyzed synthesis of gem-dihydroperoxides. V: 8th Young Researchers' Day, February 18, 2014, Ljubljana. Žunič V (ur.), et al. *Program and abstract book*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2014, str. 25.
**10.** Starkl K, Žmitek K, Iskra J. Synthesis and bioactivity of synthetic peroxides. V: Fourth Annual Conference [of] Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, CIPKeBiP, Ljubljana, 10-12 June, 2013. Zorec R (ur.), et al. *Superresolution microscopy*. Ljubljana: Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, 2013.

# Biografija

Rodila sem se 23. 2. 1988 v Ljubljani. Po končani gimnaziji sem nadaljevala izobraževanje na Fakulteti za farmacijo, v okviru katere sem 7. 9. 2012 diplomirala pod mentorstvom prof. dr. Slavka Pečarja in somentorstvom doc. dr. Jerneja Iskre ter si s tem pridobila naziv magistra farmacije. Istega leta sem se kot mlada raziskovalka zaposlila v Laboratoriju za organsko in bioorgansko kemijo Odseka za fizikalno in organsko kemijo na Institutu »Jožef Stefan«, kjer sem pod mentorstvom doc. dr. Jerneja Iskre opravljala svoje doktorsko usposabljanje na bolonjskem študiju tretje stopnje na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologije.