

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



KATARINA STARKL

**SINTEZA POTENCIALNO BIOLOŠKO AKTIVNIH
HIDROPEROKSIDOV Z VODIKOVIM PEROKSIDOM**

**SYNTHESIS OF POTENTIAL BIOLOGICALLY ACTIVE
HYDROPEROXIDES WITH HYDROGEN PEROXIDE**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan v Laboratoriju za organsko in bioorgansko kemijo Oddelka za fizikalno in organsko kemijo pod somentorstvom doc. dr. Jerneja Iskre in mentorstvom prof. dr. Slavka Pečarja, mag. farm. ^1H NMR in ^{13}C NMR meritve so bile izvedene na Kemijskem inštitutu. HR-MS in IR meritve, določanje tališč in elementne analize so bile opravljene na Inštitutu Jožef Stefan.

Zahvala

Zahvala mentorjema za vso strokovno pomoč, ideje in podporo pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se vsem, ki ste mi tekom študija dajali inspiracijo in motivacijo za študijske in prostočasne dejavnosti. Ni vas bilo malo. Najlepša hvala tistim, ki ste mi v zadnjih dveh letih pomagali vzpostavljati ravnovesje v življenju in ohranjati večni optimizem. In seveda hvala vsem, ki ste z mano potovali po svetu. Še kam bomo šli!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja (prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.) in somentorja (doc. dr. Jernej Iskra).

Katarina Starkl

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Saša Baumgartner

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	5
ABSTRACT	6
SEZNAM OKRAJŠAV	7
1 UVOD	8
1.1 ARTEMISININ	9
1.1.1 Vloga artemisinina v kitajski tradicionalni medicini	9
1.1.2 Farmakološka aktivnost artemisinina	9
1.1.3 Kemijska zgradba in farmakofor.....	9
1.2 ANTIMALARIJSKI PEROKSIDI	10
1.2.1 Artemisininski polysintezni analogi	11
1.2.2 Sintezni peroksidi	13
1.3 MEHANIZEM DELOVANJA PEROKSIDNIH ANTIMALARIKOV	15
1.3.1 Bioaktivacija artemisinina	16
1.3.2 Bioaktivacija neartemisininskih sinteznih analogov	18
1.3.3 Celična tarča artemisininskih radikalov	18
1.3.4 Mehanizem protitumornega delovanja artemisinina.....	20
1.4 SINTEZA TETRAOKSANOV	20
1.5 SINTEZA GEM-DIHIDROPEROKSIDOV	22
2 NAMEN DELA	27
3 MATERIALI IN METODE	28
4 EKSPERIMENTALNO DELO	30
4.1 VPLIV RAZLIČNIH REAKCIJSKIH POGOJEV	30
4.2 VPLIV RAZLIČNIH TOPIL	31
4.3 VPLIV RAZLIČNE KOLIČINE H ₂ O ₂	31
4.4 SINTEZA DIHIDROPEROKSIDOV (PREPARATIVNE METODE)	32
4.4.1 Sinteza 4-metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (<u>2a</u>)	32
4.4.2 Sinteza 2-metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (<u>2b</u>)	33
4.4.3 Sinteza 4-terc-Butilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (<u>2c</u>)	34
4.4.4 Sinteza 4-fenilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (<u>2d</u>)	35
4.4.5 Sinteza nonan-2,2-diil dihidroperoksida (<u>4a</u>)	36
4.4.6 Sinteza nonan-5,5-diil dihidroperoksida (<u>4b</u>)	37
4.4.7 Sinteza dihidrofuran-2(3H)-ona (<u>6</u>)	38
4.4.8 Sinteza ciklopentan-1,1-diil dihidroperoksida (<u>7b</u>).....	39

4.4.9	<i>Sinteza cikloheptan-1,1-diil dihidroperoksida (7c)</i>	40
4.4.10	<i>Sinteza ciklodekan-1,1-diil dihidroperoksida (7d)</i>	41
4.4.11	<i>Sinteza adamantan-1,1-diil dihidroperoksida (7e)</i>	42
4.4.12	<i>Sinteza 1,1,4,4-tetrahidroperoksicikloheksana (9a)</i>	43
4.4.13	<i>Sinteza 4,4-dihidroperoksitetrahydro-2H-piran (9b)</i>	44
4.4.14	<i>Sinteza 5α-holestan-3α,3β-dihidroperoksida (11a)</i>	45
4.4.15	<i>Sinteza 3,3-dihidroperoksiandrostan-17-ona (11b)</i>	46
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	47
5.1	POTEK REAKCIJE	47
5.2	VPLIV RAZLIČNIH REAKCIJSKIH POGOJEV	49
5.3	VPLIV TOPILA NA PRETVORBO KETONA V DIHIDROPEROKSID	53
5.4	VPLIV PRESEŽKA VODIKOVEGA PEROKSIDA NA PRETVORBO	56
5.5	SINTEZA DIHIDROPEROKSIDOV IZ RAZLIČNIH KETONOV	57
6	SKLEP	63
7	LITERATURA	64

POVZETEK

Leta 2010 je bilo po podatkih WHO 216 milijonov primerov okužb z malarijo in 655 tisoč smrtnih žrtev. Od leta 2001 je artemisininska kombinirana terapija zdravilo prvega izbora pri zdravljenju malarije, ki jo povzroča *P. falciparum*. To je kombinacija artemisinina ali njegovega derivata in antimalarika z drugačnim mehanizmom delovanja. Artemisinin, ki se je proti malariji uporabljal že v kitajski tradicionalni medicini, je seskviterpenski trioksanski lakton z endoperoksidno skupino, ki je odločilna za delovanje. Slaba topnost artemisinina v fiziološko sprejemljivih topilih je omogočala le peroralno aplikacijo, kar je vodilo k razvoju polysinteznih derivatov (v terapevtski uporabi sta artemeter in artesunat). Dodatne modifikacije so dvignile ceno zdravil, kar je nezaželeno zaradi nizke kupne moči ljudi, ki živijo v rizičnih območjih. To je sprožilo poenostavljanje strukture učinkovine in razvoj sinteznih peroksidov, med katerimi so najbolj učinkoviti trioksolani in tetraoksani. Zaradi dveh peroksidnih skupin v molekuli in potencialno močnejšega delovanja so za nadaljni razvoj novih antimalarikov najbolj zanimivi tetraoksani z nesimetrično strukturo. Kemijska sinteza teh učinkovin poteka iz dihidroperoksidov in ketonov ali ketalov. Dihidroperokside se pridobiva z ozonolizo, z vodikovim peroksidom ali s kisikom. Najenostavnejša je sinteza dihidroperoksidov iz ketonov in vodikovega peroksida v prisotnosti katalizatorja (kislina, jod ali kovinski katalizator). Leta 2010 so objavili prvo tovrstno nekatalizirano sintezo, kjer so keton in 30 % vodno raztopino vodikovega peroksida mešali v topilu, reakcijsko zmes pa po koncentriranju na rotavaporju očistili s kromatografijo. Ta postopek smo raziskali bolj podrobno. Ugotovili smo, da je za potek reakcije odločilno zvišanje koncentracije vodikovega peroksida med odparevanjem, kar smo potrdili tudi s spremljanjem reakcije z ATR-IR sondo. Pretvorba ketona v dihidroperoksid je bila najboljša pri uporabi 100 % vodikovega peroksida, slabša pri 30 % vodikovem peroksidu in se je še poslabšala, če smo 30 % vodikovemu peroksidu dodali topilo. Za večjo pretvorbo (nad 70 %) slabo reaktivnih ketonov je bilo potrebno pri reakciji uporabiti polarno topilo. Višanje ekvivalenta vodikovega peroksida pri reakcijah s slabo reaktivnimi ketoni je izboljšalo stopnjo pretvorbe. Dobro reaktivni ketoni so reagirali boljše s presežkom kot z ekvimolarno količino vodikovega peroksida, vendar je bila pretvorba ne glede na količino presežka podobna. Z našo metodo smo sintetizirali in izolirali dihidroperokside iz substituiranih cikloheksanonskih, acikličnih, cikličnih in steroidnih ketonov z izkoristki nad 67 %. Dodatna funkcionalna skupina na šestčlenskih cikličnih ketonih je močno vplivala na reaktivnost spojine.

ABSTRACT

WHO reported that there were 216 million cases of malaria and 655 thousand deaths in 2010. Artemisinin-based combination therapy is the first-line treatment for malaria caused by *P. falciparum* from 2001. It consists of artemisinin or its derivate and another antimalarial drug with a different mechanism of action. Artemisinin was used as an antimalarial drug in Chinese traditional medicine. Artemisinin is a sesquiterpene trioxane lactone, containing an endoperoxide bridge essential for its activity. Low solubility in physiologically acceptable solvents allowed only oral application, which led to the development of semi-synthetic derivates (artemeter and artesunate are currently used in therapy). The drawback of this approach is a higher price of drugs, especially considering that the purchasing power of patients in high-risk areas is very low. This led to the simplification of the basic structure and the development of synthetic peroxides, of which the most effective are trioxolanes and tetraoxanes. The most promising derivates are tetraoxanes with unsymmetrical structure because of the two endoperoxide groups and consequently better antimalarial activity. These compounds are synthesized from dihydroperoxides and ketones or ketals with ozone, hydrogen peroxide or oxygen. The easiest method for the synthesis of dihydroperoxides is from ketones with hydrogen peroxide in the presence of a catalyst (acid, iodine or metal catalyst). Uncatalyzed synthesis was first reported in 2010. Ketone and 30 % water solution of hydrogen peroxide were mixed in a solvent and after the concentration of the reaction mixture the product was purified by chromatography. This method was studied thoroughly in our research. We found out by the use of ATR-IR analysis that conversion from ketone to dihydroperoxide happened during the concentration of the reaction mixture. Application of 100 % hydrogen peroxide gave the best conversion of ketone to dihydroperoxide, while 30 % aqueous solution of hydrogen peroxide was less effective and even worse when solvent was added. The effect of solvent was evident in reaction with a less reactive ketone, where a polar solvent must be used for good conversion (more than 70 %). Increasing equivalent of hydrogen peroxide also gave better conversion. Ketones with a good converted to dihydroperoxide better when an excess of hydrogen peroxide was used, although the difference was small. We synthesized and purified dihydroperoxides from substituted cyclohexanones, acyclic, cyclic and steroidal ketones with yields over 67 %. An additional functional group of six-membered cyclic ketones had the major influence on reactivity of compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACT - artemisininska kombinirana terapija (ang. artemisinin-based combination therapy)

Art - artemisinin

CAN - cerijev amonijev nitrat

CSA - kafrasulfonska kislina

DHA - dihidroartemisinin

DHP - dihidroperoksid

DKM - diklorometan

DME - 1,2-dimetoksietan

DMSO - dimetilsulfoksid

ekv - ekvivalent

EtOAc - etil acetat

EtOH - etanol

HR-MS - masna spektroskopija visoke ločljivosti

IR - infrardeča spektroskopija

MeCN - acetonitril

MeOH - metanol

NMR - jedrska magnetna resonanca

PfATP6 - plazmodijeva od kalcija odvisna ATPaza

PMA - fosfomolibdenova kislina

PrOH - propanol

rv - rotavapiranje

s. t. - sobna temperatura

TCTP - s translacijo kontroliran tumorski protein (ang. translationally controlled tumor protein)

TFE - 2,2,2-trifluoroetanol

TLC - tankoplastna kromatografija

TMSOTf - trimetilsilil trifluorometansulfonat

VEGF - vaskularni endotelijski rastni faktor

WHO - svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)

1 UVOD

Malarija je bolezen, ki je razširjena med revnim prebivalstvom tropskega sveta. Leta 2010 je bilo po podatkih WHO 216 milijonov primerov okužb z malarijo, od česar jih je bilo 81 % v afriški regiji. Glavne žrtve malarije so otroci pod petim letom starosti (86 %). Incidenca malarije se je od leta 2000 znižala za 17 %, smrtnost zaradi nje pa za 26 %. Kljub temu napredku ostaja malarija velik svetovni zdravstveni problem, saj je leta 2010 zahtevala 655 tisoč smrtnih žrtev (91 % v afriški regiji) (1).

Farmacevtska industrija danes ne vlaga veliko sredstev v razvoj novih antimalarijskih zdravil. Večino dosedanjih zdravil (klorokin, meflokin, primakin, halofantrin) so razvili vladni in vojaški raziskovalni programi, nekatera so odkrili pri naključnem iskanju učinkovitosti naravnih produktov (artemisinin) ali pa so odkrili antimalarijsko aktivnost kot novo indikacijo pri že registriranih zdravilih (atovakon, tetraciklini, sulfonamidi) (2).

Odpornost mikroorganizmov na že uveljavljene zdravilne učinkovine spodbuja iskanje novih učinkovin z enako indikacijo in drugačnim mehanizmom delovanja. Eden od znanih primerov so tudi antimalariki, saj se je na svetu pojavila rezistenca na večino najpomembnejših klasičnih učinkovin (klorokin, kinin, meflokin). Prav rezistenca je glavna ovira v boju proti malariji (3).

Klorokin je zdravilo prvega izbora za zdravljenje malarije, ki jo povzroča *Plasmodium vivax*. V območjih, kjer se je pojavila odpornost na klorokin, se tako obliko malarije zdravi z artemisininsko kombinirano terapijo (ACT). ACT poleg artemisinina ali njegovega derivata (dihidroartemisinin (DHA), artemeter, artesunat) vsebuje še antimalarik z drugačnim mehanizmom delovanja. Od leta 2001 je ACT tudi zdravilo prvega izbora za zdravljenje nekomplikirane malarije, ki jo povzroča *P. falciparum*. V državah, kjer je malarija razširjena, je bil ACT sprejet kot nacionalni program za zdravljenje. Najpogostejši kombinaciji ACT-ja sta artesunat-meflokin, ki je manj učinkovit v območjih z rezistenco na meflokin, in artemeter-lumefantrin. Slednji je učinkovit povsod po svetu razen v Kambodži, kjer je leta 2009 WHO potrdila prisotnost tudi na artemisinin rezistentnih sevov *P. falciparum* (3).

1.1 ARTEMISININ

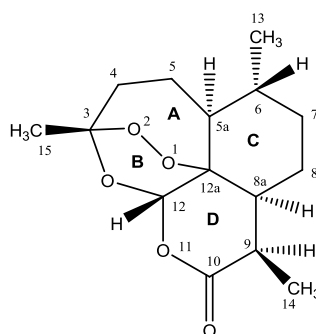
1.1.1 Vloga artemisinina v kitajski tradicionalni medicini

V kitajski tradicionalni medicini se enoletni pelin (*Artemisia annua*) uporablja že več kot dve tisočletji, sprva za zdravljenje hemeroidov, od 16. stoletja dalje pa tudi antipiretično. V 70. letih 20. stoletja so na Kitajskem med sistematičnim iskanjem farmakološko aktivnih snovi v zdravilnih rastlinah odkrili potencialno antimalarijsko aktivnost enoletnega pelina. V 80. letih prejšnjega stoletja so izolirali in določili strukturo aktivni substanci (artemisinin) in kasneje s klinično študijo potrdili njeno predvideno antimalarijsko aktivnost (2).

1.1.2 Farmakološka aktivnost artemisinina

Farmakološko delovanje artemisininov ni omejeno le na antimalarijsko aktivnost. Toksično delujejo tudi na nekatere druge parazite, in sicer na *Toxoplasma gondii* in *Leishmania spp.*. Poleg tega delujejo proti sevom *Shistosoma* kot antihelminthiki in se vse bolj uveljavljajo v tej terapiji. Artemisinini imajo nekaj protivirusnih lastnosti, saj zmanjšujejo podvojevanje virusov hepatitisa B in C, humanega virusa herpesa, HIV-1 in influence virusa A. Izkazujejo tudi fungicidne lastnosti proti *Pneumocystis carinii*, vendar le *in vitro*. Pomembno je protitumorno delovanje na tumorske celice različnih vrst raka: pljučni rak, rak črevesa, dojk in pankreasa ter levkemije (4).

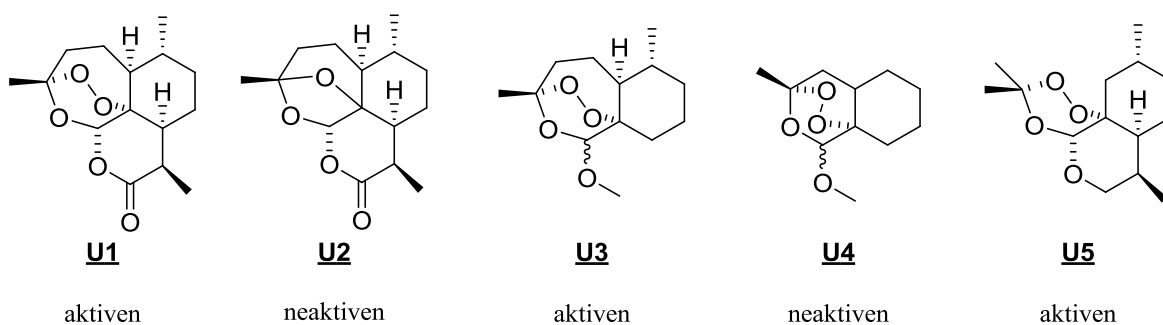
1.1.3 Kemijska zgradba in farmakofor



Slika 1: struktura artemisinina U1

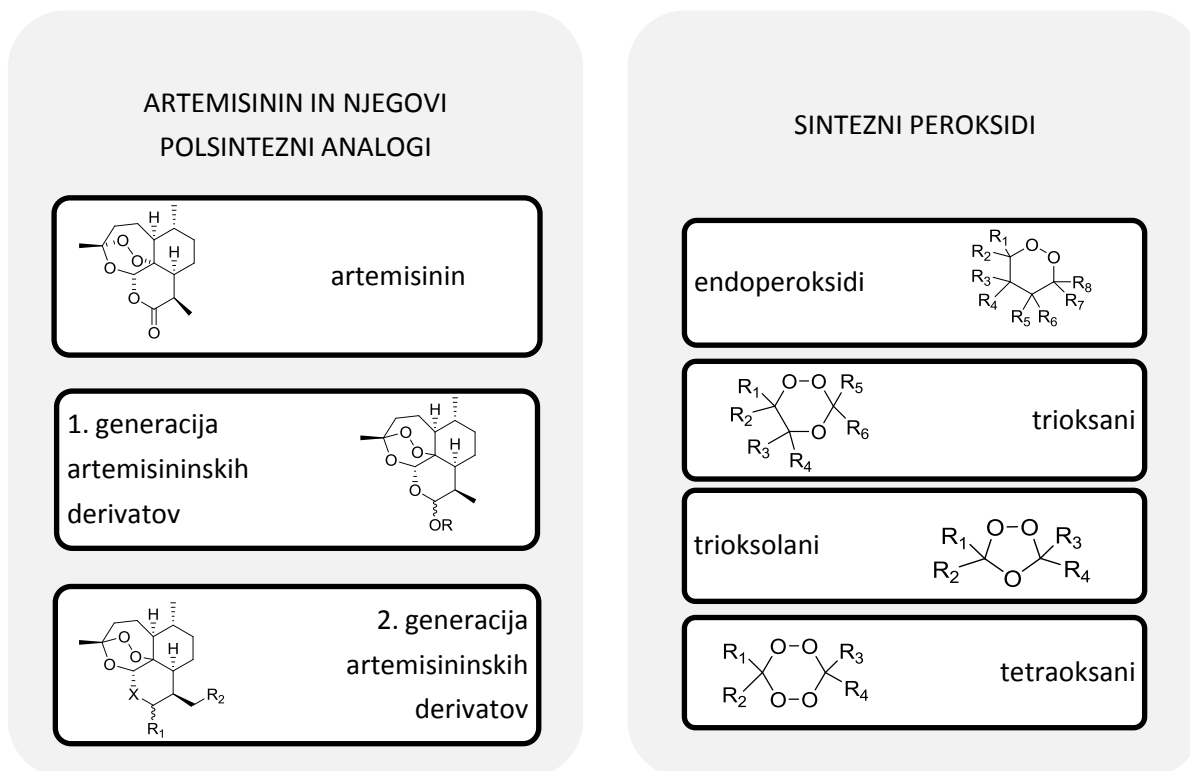
Artemisinin U1 (molekulska formula $C_{15}H_{22}O_5$) je seskviterpenski trioksanski lakton z endoperoksidno skupino, ki je odločilna za delovanje (Slika 1) (5). Dokaz za to je deoksoartemisinin U2, ki ima namesto peroksidne skupine le en sam kisikov atom in je

brez antimalarijske aktivnosti (Slika 2) (2). Z namenom poenostavljanja strukture in sinteze novih antimalarijskih derivatov so proučevali vpliv ostalih strukturnih elementov v artemisininu ter ugotovili, da za delovanje ni potreben laktonski obroč D **U3**. Nadaljnja modifikacija sedemčlenskega obroča A v šestčlenskega **U4** vodi do izgube aktivnosti. Kljub temu sedemčlenski obroč ni odločilen za delovanje, saj je triciklični analog BCD **U5** brez sedemčlenskega obroča A prav tako aktiven (Slika 2) (6).



Slika 2: proces ugotavljanja farmakofora; biološko aktivni in neaktivni analogi artemisina

1.2 ANTIMALARIJSKI PEROKSIDI



Slika 3: delitev antimalarijskih peroksidov s prikazano osnovno strukturo

1.2.1 Artemisinini polsintezni analogi

Slaba topnost artemisinina tako v hidrofilnih kot v fiziološko sprejemljivih lipofilnih topilih je omogočala le peroralno aplikacijo, kar je vodilo k razvoju polsinteznih derivatov (Slika 3) (6).

Prva generacija

Prvi polsintezni artemisinini derivati so bili preprosti etri, estri in karbonati dihidroartemisinina (Slika 4), ki je tudi njihov metabolični produkt. V visokih koncentracijah je DHA nevrotoksičen.

Artemeter in arteeter (Slika 4) sta predstavnika etrskih derivatov, ki se uporabljata v terapiji. V primerjavi z artemisininom sta bolj lipofilna, imata močnejšo antimalarijsko aktivnost in boljše farmakokinetične lastnosti. Artemeter je najširše uporabljen derivat v terapiji, in sicer v obliki intramuskularnih injekcij (Artenam, Artemos) ali v kombinaciji z lumefantrinom (Coartem®) (7).

Artesunat (estrski derivat) in artelinska kislina (Slika 4) imata izboljšane hidrofilne lastnosti in se uporabljata za intravensko aplikacijo pri bolnikih s hujšimi oblikami malarije. Artesunat se uporablja v kombinirani terapiji z meflokinom ali amodiakinom (Arsucam®). Artelinska kislina je hidrolitsko bolj stabilna od artesunata. Izmed vseh derivatov prve generacije ima najboljši farmakokinetični profil (najdaljši razpolovni čas in dosega najvišje plazemske koncentracije) in je najmanj toksična (7).

Karbonatni derivati imajo boljšo *in vivo* aktivnost kot **U1**, DHA in etrski derivati, a se zaradi nestabilnosti v fizioloških pogojih ne uporabljajo v terapiji (Slika 3; R=COOR₁) (7).

Druga generacija

Želja po izboljšanju metabolične stabilnosti, nižjih stroškov pridobivanja in manjši nevrotoksičnosti je vodila do različnih novih derivatov, in sicer s substitucijami na mestih C10 in C9 ter spremembo artemisininkega obroča D iz laktona v laktam (6). Derivati druge generacije so biološko aktivnejši od predhodne generacije.

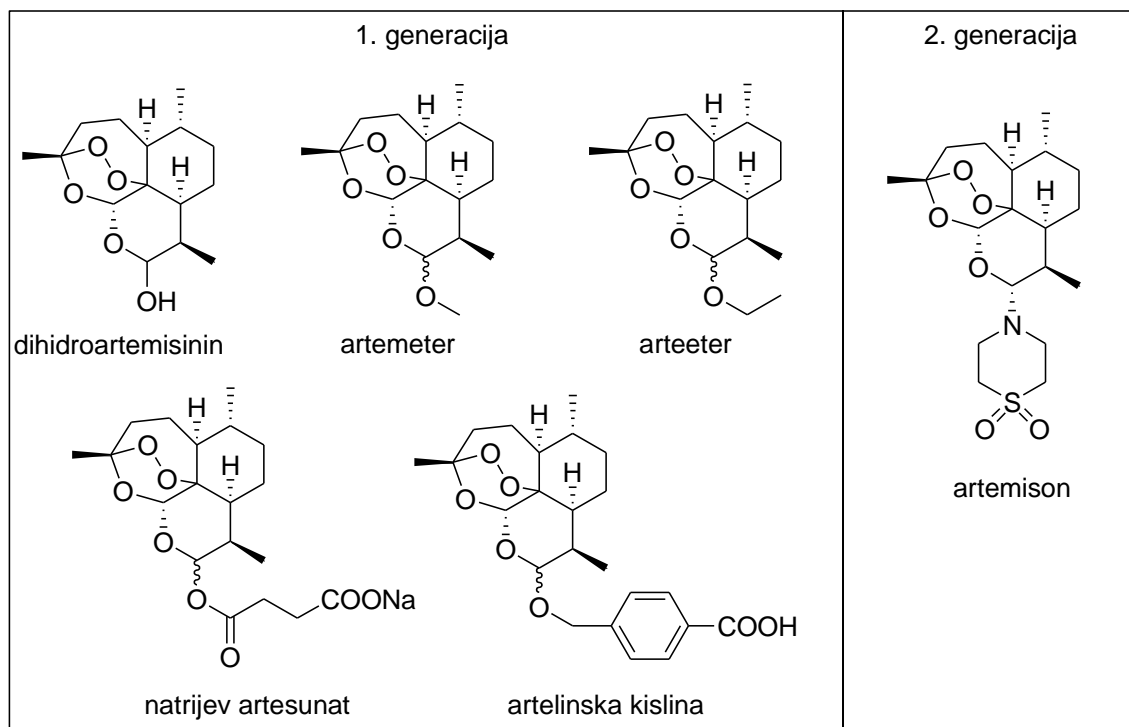
Na mestu C10 so bile uvedene različne funkcionalne skupine. C10-ariloksi in C10-alkilni derivati ne hidrolizirajo do DHA in imajo zato podaljšano delovanje (6). Slednje velja tudi za C10-trifluorometoksi derivate, ki so *in vitro* pokazali dobro aktivnost proti

P. falciparum, *in vivo* pa proti *P. bergi*, vendar pa je njihova sinteza zahtevna. Podobno aktivnost kot C10-fluorirani kažejo tudi C10-heteroarilni derivati (8).

Alkilamino skupina na C10 poveča hidrofilnost, kar izboljša farmakokinetične lastnosti in niža nevrotoksičnost. Bazična aminska skupina se protonira znotraj prebavne vakuole parazita, kar prepreči difuzijo iz nje in posledično okrepi delovanje. Najboljši kandidat iz te skupine z močno aktivnostjo proti *P. bergi* (cerebralna malarija), artemison (Slika 4), je v drugi fazi kliničnih študij (8).

Uvedba prostorsko velikih heterocikličnih substituent na C10 z etrsko ali estrsko vezjo je pokazala izboljšano antimalarijsko delovanje *in vivo* proti rezistentnim oblikam *P. yoelii*, pri čemer se je povezava preko etrske vezi izkazala za učinkovitejšo (8).

Odkritje močne antimalarijske aktivnosti 9-deoksoartemisina je vodila do sintez različnih C9-alkilnih derivatov (7). Laktami so v primerjavi z laktoni bolj stabilni v kislem, zato so razvili tudi 11-azaartemisinske derivate, ki imajo dokazano antimalarijsko aktivnost *in vitro* proti *P. falciparum* in *in vivo* proti *P. bergi*, zaradi laktamskega obroča pa so bolj stabilni v fizioloških pogojih (8).



Slika 4: pomembni predstavniki artemisinskih polysinteznih derivatov prve in druge generacije

1.2.2 Sintezni peroksidi

Derivati artemisinina imajo izboljšane lastnosti, vendar se z modifikacijo strukture njihova cena še zviša. Ceno lahko znižamo predvsem s poenostavitvijo strukture do najnujnejših strukturnih elementov, pri čemer je potrebno ohraniti aktivnost. Optimalna bi bila enostavna sinteza učinkovin iz poceni in komercialno dostopnih reagentov, kar je pripeljalo do razvoja različnih sinteznih antimalarijskih peroksidov.

Endoperoksidi

Endoperoksidi v svoji strukturi vsebujejo šestčlenski obroč, v katerem sta sosednja dva ogljikova atoma zamenjana s kisikovim. Naravni endoperoksid, ki ima antimalarijsko delovanje, se imenuje Yingzhaosu A (Slika 5). Njegov najučinkovitejši sintezni analog, arteflen (Slika 5), je prišel do druge faze kliničnih študij, vendar jih ni uspešno preстал (7).

Trioksani

1,2,4-Trioksani so pomembno odkritje, saj imajo občutno manj komplicirano strukturo kot artemisinin, kljub temu pa obdržijo osnovni 1,2,4-trioksanski obroč. Za antimalarijsko aktivnost je najpomembnejša substituenta na C3-atomu, ki mora biti spirocikloalkanska (6). Glavni predstavnik biciklični trioksanov je fenozan (Slika 5), ki ima močnejše delovanje proti multirezistentnim sevom, kot ga ima artemisinin (8). Adamantanska spiro skupina na mestu C3 deluje proti *P. yoelli*, 2-fluorofenilni derivat pa ima dvakrat močnejšo aktivnost kot arteeter (7).

Triksolani

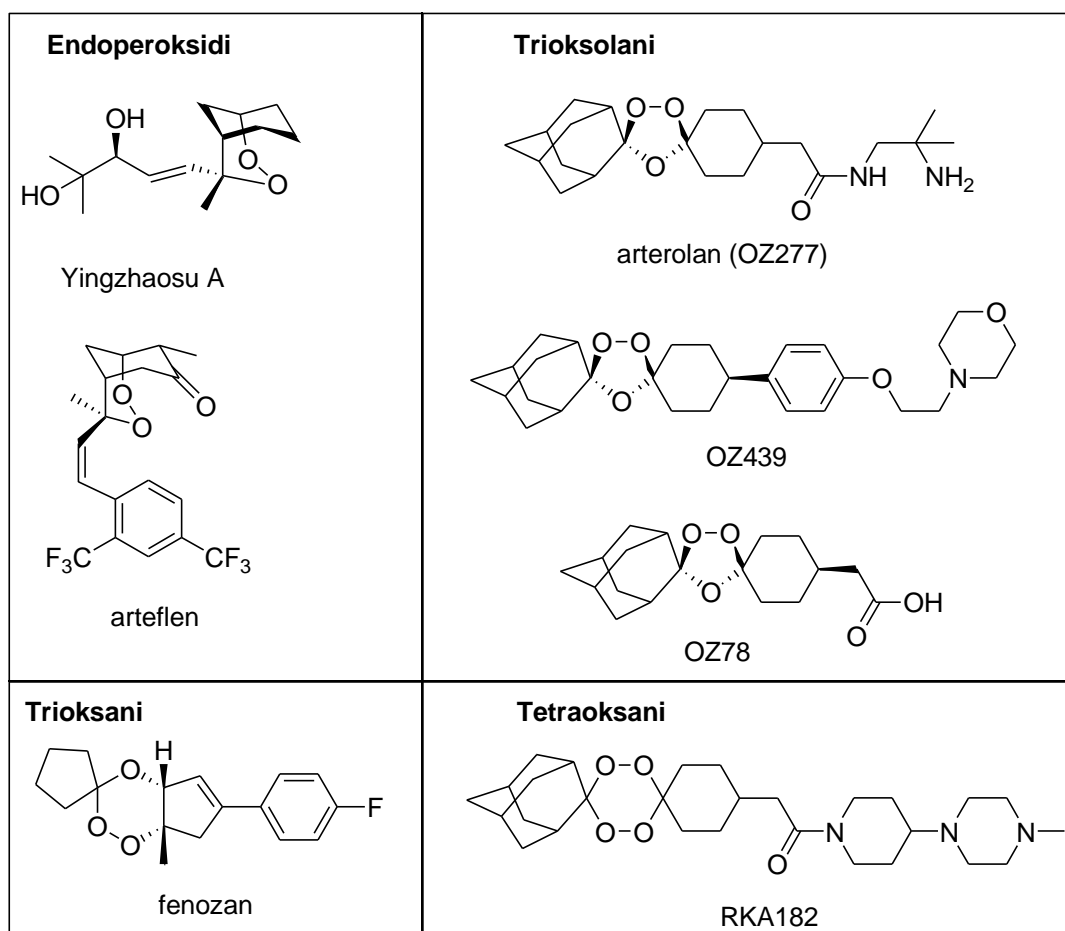
1,2,4-Triksolani ali ozonidi so aktivni proti *P. falciparum*. Arterolan (OZ277, Slika 5) je sintezni ozonid, ki je trenutno v tretji fazi kliničnih študij in bo najverjetneje prvi sintezni peroksid v terapevtski rabi. OZ439 (Slika 5) je iz druge generacije triksolanov s podobno antimalarijsko aktivnostjo kot arterolan, a je bolj primeren za peroralno aplikacijo (8). Triksolani imajo poleg antimalarijskega še antihelmintsko delovanje; OZ78 (Slika 5) je *in vivo* učinkovit proti povzročitelju fascioliasisa (*Fasciola hepatica*) (9).

Tetraoksani

1,2,4,5-Tetraoksani imajo v enem šestčlenskem obroču dve peroksidni skupini, kar bi lahko potenciralo njihovo antimalarijsko delovanje. Njihova prednost je tudi občutno večja stabilnost v primerjavi s trioksani ali triksolani. Aktivnost *in vitro* proti *P. falciparum* in *in vivo* proti *P. berghei* je primerljiva ali boljša od aktivnosti artemisinina, vendar na

aktivnost močno vplivajo substituenti (6). Dispirotetraoksani so učinkoviti proti *P. falciparum* in tudi analogi s preprosto strukturo (1,10-dimetil-7,8,15,16-tetraoksadispiro[5.2.5.2.]heksadekan) so *in vivo* aktivni proti *P. berghei* (8). Polarna aminska ali amidna skupina v tetraoksanskem skeletu izboljšata biorazpoložljivost, medtem ko adamantan izboljša možnost peroralne aplikacije dispiro tetraoksanov. Steroidni skelet močno poveča selektivnost tetraoksanov, bisteroidni tetraoksani pa imajo poleg antimalarijskega še močno protitumorno delovanje (6).

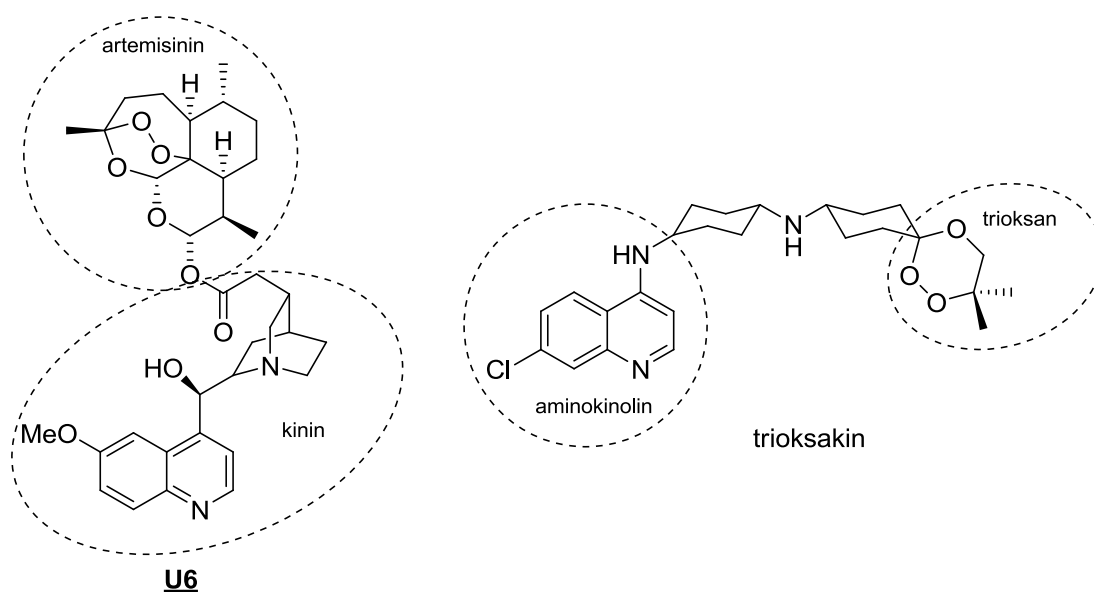
RKA182 (Slika 5) je dispiro-1,2,4,5-tetraoksan, ki ima na eni strani vezano adamantansko skupino, na drugi pa cikloheksanonsko, na katero je vezana polarna aminska struktura. Izbran je bil med rešanjem za kandidatom z najmočnejšo aktivnostjo in optimalno biorazpoložljivostjo. Stabilnejši je od ozonidov s podobno strukturo (OZ277), poleg tega pa ima še močnejše delovanje. Sinteza poteka v petih stopnjah z visokim izkoristkom (86 %) (10).



Slika 5: pomembnejši predstavniki sinteznih peroksidov

Dualni inhibitorji

Dualni inhibitorji imajo v svoji strukturi dve zdravilni učinkovini, ki sta med seboj povezani z mostom (linkerjem). Učinkovini imata praviloma različen mehanizem delovanja za enako indikacijo in zato delujeta sinergistično. Takšni tipi antimalarijskih učinkovin imajo združen artemisinini in kinolinski strukturni element. Od dualnih inhibitorjev sta znana artemisinin-kinin **U6** (Slika 6) in fluoriran artemisinini derivat-meflokin. Neartemisinini peroksidi so trioksakini, ki vsebujejo sintetični trioksan ali trioksolan ter aminokinolin, medtem ko tetraoksakini vključujejo tetraoksanski in aminokinolinski strukturni element (8).



Slika 6: primer dualnih inhibitorjev: artemisinin-kinin in trioksakin, ki so ga izbrali za predklinične študije

1.3 MEHANIZEM DELOVANJA PEROKSIDNIH ANTIMALARIKOV

Štiri vrste plazmodija okužijo tudi človeka: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* in *P. malariae*. Prenašajo jih ženski komarji vrste *Anopheles*, v katerih poteka spolni cikel plazmodija. S pikom prenesejo v človeški krvni obtok sporocite (nespolno obliko parazita), ki po približno pol ure vstopijo v parenhimske jetrne celice. V naslednjih 10 do 14 dneh se sporociti nespolno delijo in se razvijejo v merocite (prederitrocitna faza). Ko gostiteljska celica počne, se merociti sprostijo v krvni obtok. Nekateri merociti vstopijo nazaj v jetrne celice, kjer se spremenijo v hipnocyte (speča oblika parazita), ki povzročajo malarične napade še nekaj let po okužbi. Večina merocitov pa vstopi v rdeče krvne celice. Znotraj

eritrocita enojedrni merocit zraste v trofocit. Med zorenjem v eritrocitu parazit vstavlja svoje proteine in fosfolipide v eritrocitno membrano. Gostitelj hemoglobin prebavi in ga transportira v parazitovo prehrambeno vakuolo (11). Glavni vir aminokislin za parazita je razgradnja gostiteljevega hemoglobina. Pri tem se sprosti hem, v katerem poteče oksidacija vezanega železa, in tako nastane hematin. Fe(III) v hematinu je za parazita toksičen, zato ga polimerizira v inerten hemozoin (malarijski pigment) (5). Polimerizacijo katalizira parazitov encim hem polimeraza, na katerega delujejo nekatere zdravilne učinkovine (kinin, klorokin, meflokin) (11).

Po mitotični delitvi jedra trofocita nastane večjedrni šizont, ki se mitotično razdeli v enojedrne merocite. Po razpadu eritrocita se v krvni obtok sprostijo toksini, ki povzročijo za malarijo značilni vročino in mrzlico. Sproščeni merociti okužijo preostale eritrocite. V njih se iz merocitov tvorijo moški in ženski gametociti, ki se pri morebitnem piku komarja prenesejo v njegov prebavni trakt. Iz gametocitov nastanejo moške in ženske gamete in potem v komarju poteče spolni cikel plazmodija (11).

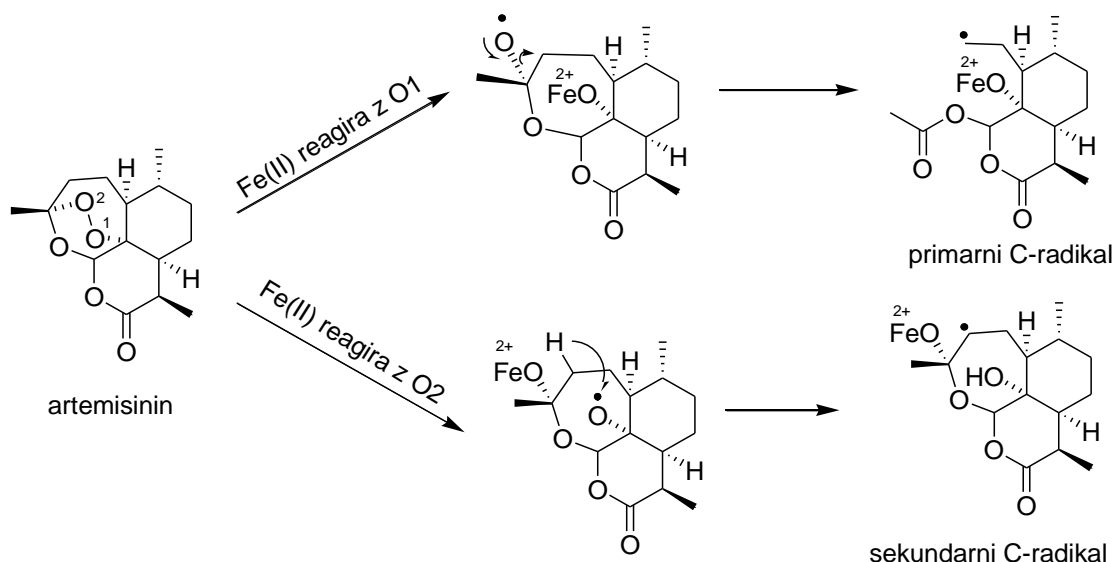
Mehanizem delovanja artemisininina še ni dokončno pojasnjen. Artemisinin v parazitovo celico vstopa skozi vezikel, ki povezuje parazitsko membrano z eritrocitom. To je vzrok za selektivno toksičnost, saj je akumulacija artemisininina in njegovih derivatov v parazitskih celicah v primerjavi s človeškimi veliko večja (2).

1.3.1 Bioaktivacija artemisininina

Bioaktivacijo artemisininina sproži dvovalentno železo Fe(II), ki je lahko vezano v hem ali prosto v intracelularni tekočini. Mehanizem razpada (metabolizma) artemisininina v parazitu opisujeta radikalski in ionski model, oba pa vodita do nastanka radikalov (12).

Model reduktivnega razpada (Reductive scission model):

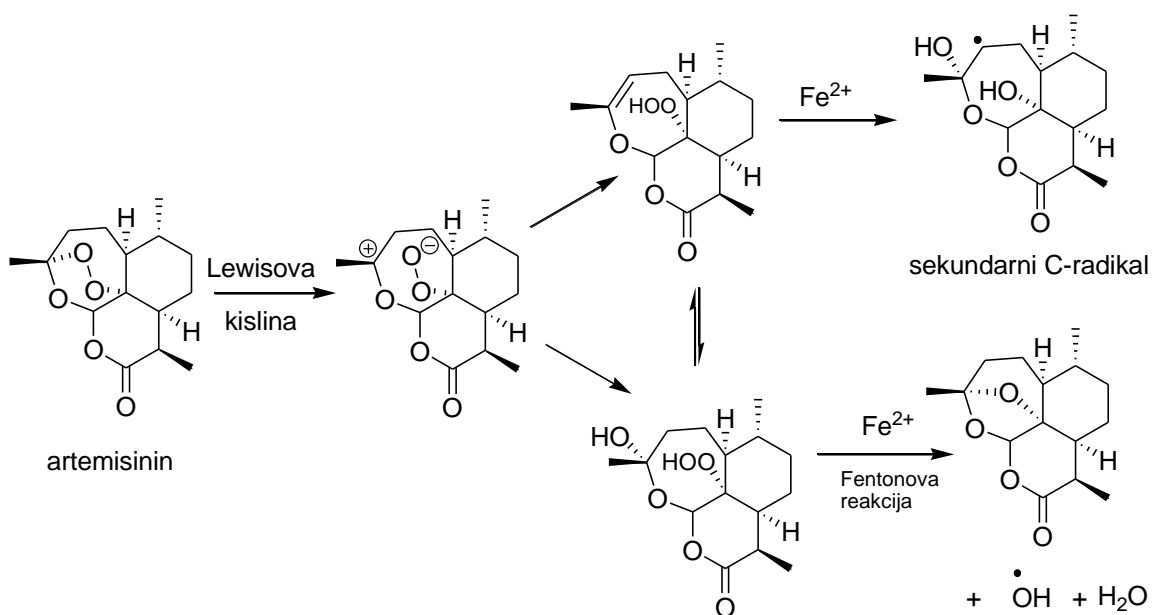
Vezava Fe(II) na artemisinin sproži prenos elektronov, kar povzroči reduktivni razpad endoperoksidnega mostu. Nastali kisikovi radikali se premestijo v primarne ali sekundarne ogljikove radikale. Slednje je posledica nesimetričnosti peroksidne vezi (Slika 7) (12).



Slika 7: model reduktivnega razpada artemisinina do reaktivnih vrst

Model odprtja endoperoksidnega obroča (Open peroxide model):

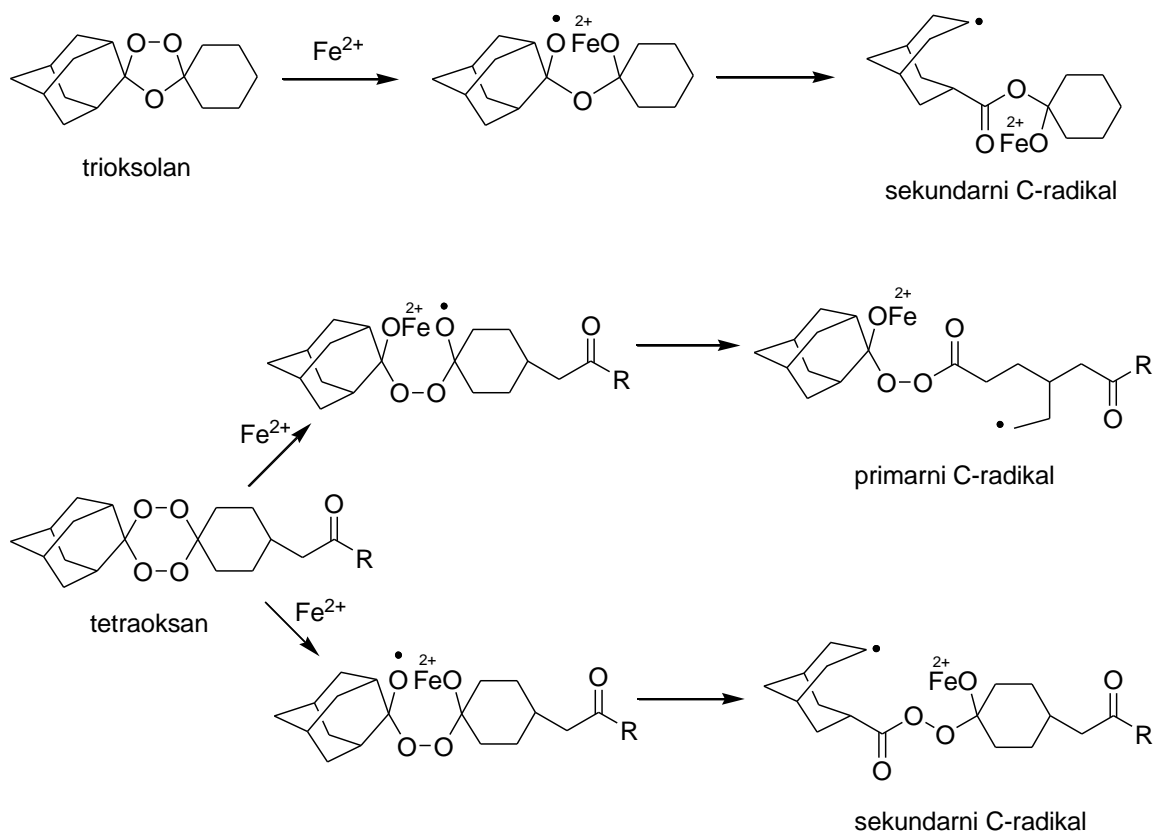
Protonacija peroksidne vezi ali kompleksacija z Fe(II) povzroči heterolitski razpad endoperoksidnega obroča, pri čemer v tem primeru Fe(II) deluje kot Lewisova kislina. Po reakciji z vodo nastane nenasičen hidroperekisid, ki z direktno oksidacijo povzroči ireverzibilne spremembe proteinov. Hidroperekisid lahko naprej reagira z Fe(II) po dveh možnih poteh. Pri prvi poteče Fentonova reakcija, pri kateri nastaja hidroksilni radikal, ki lahko oksidira aminokisliline. Druga pa privede do nastanka sekundarnega ogljikovega radikala (podobno kot pri prvem modelu) (Slika 8) (11).



Slika 8: model odprtja endoperoksidnega obroča

1.3.2 Bioaktivacija neartemisininskih sinteznih analogov

Predviden mehanizem bioaktivacije neartemisininskih sinteznih analogov je podoben kot radikalski mehanizem pri aktivaciji artemisinina. Bioaktivacijo učinkovine prav tako sproži dvovalentno železo, kar vodi do nastanka radikalov. Iz tetraoksanov nastanejo primarni in sekundarni ogljikovi radikali (13), iz trioksolanov pa samo sekundarni ogljikovi radikali (Slika 9) (14).



Slika 9: mehanizem nastanka radikalov iz dispiro-1,2,4-trioksolanov in dispiro-1,2,4,5-tetraoksanov

1.3.3 Celična tarča artemisininskih radikalov

Molekulska tarča artemisininskih radikalov, ki je odločilna za učinkovito antimalarijsko delovanje, ni znana. Možne celične tarče so različni proteini (najpomembnejša med njima sta hem in encim PfATP6), mitohondriji in parazitova celična membrana (Slika 10).

Hemski model

Hemski model predpostavlja, da artemisinin deluje znotraj parazitove vakuole. Po bioaktivaciji artemisinina s hemom nastanejo radikali, ki povzročijo alkiliranje tarčnih

proteinov v vakuoli. Hem je lahko poleg aktivatorja tudi eden od možnih tarčnih proteinov za aktiviran artemisinin. Alkiliran hem ne more polimerizirati v hemozin, poleg tega pa ustvarja še reduktivno okolje, ki ni primerno za biosintezo hemozina (15). Kljub temu hem najverjetneje ni glavna tarča, saj zdravljenje z artemisininom ne povzroči zmanjšane količine hemozina v parazitskih celicah (2). Artemisinin alkilira malarijski protein TCTP, ki se veže na hem. Ni znano, ali je alkiliranje TCTP vzrok za smrt parazita ali pa le ena od naključnih reakcij artemisinina s celičnimi proteini (2, 16).

PfATP6 model

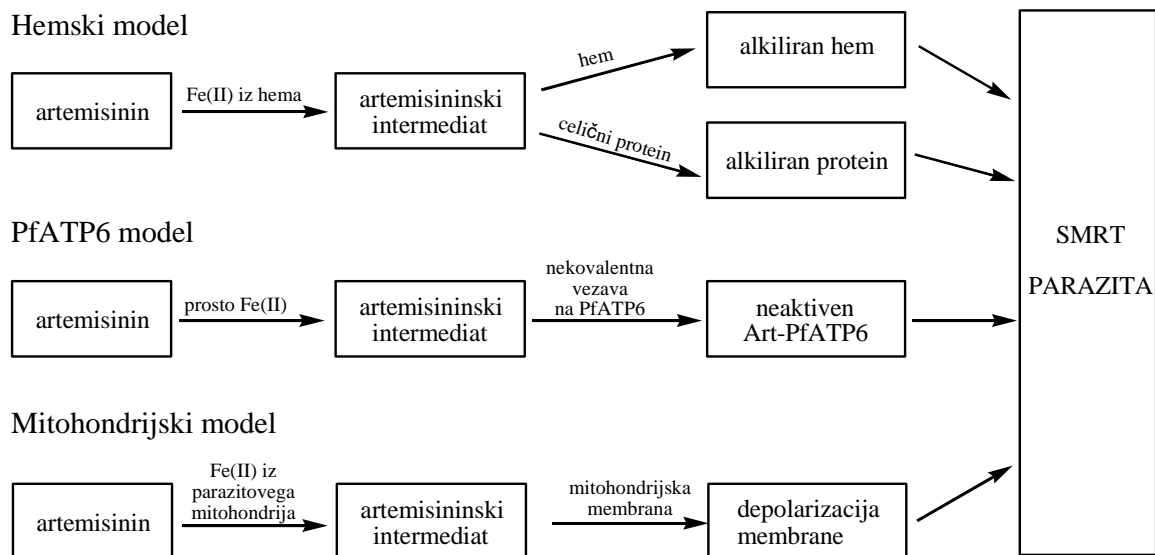
Encim PfATP6, ki je plazmodijeva od Ca^{2+} odvisna ATPaza, je še ena od možnih specifičnih celičnih tarč artemisininских radikalov. Po aktivaciji artemisinina s katalitskimi količinami Fe(II) se artemisinin s hidrofobnimi interakcijami (nekovalentno) veže v vezavno mesto encima, pri čemer ostane endoperoksidna skupina prosta. Po cepitvi peroksidne vezi in sledeči premestitvi elektrona nastanejo ogljikovi radikali, ki inhibirajo encim in povzročijo smrt parazita (5). To hipotezo izpodbija dejstvo, da imajo strukturno precej različni endoperoksidi (trioksani, tetraoksani) prav tako močno antimalarijsko delovanje, kljub temu da je vezava v tarčo odvisna od skeleta učinkovine in ne od peroksidne vezi (15).

Mitohondrijski model

Artemisinin povzroči izgubo mitohondrijske funkcije. Aktivacija artemisinina poteče specifično v parazitovem mitohondriju, kar vodi do nastanka reaktivnih kisikovih spojin. Radikali povzročijo depolarizacijo mitohondrijske membrane in ustavijo dihalno verigo. Artemisinin ne povzroči inhibicije dihalne verige v človeških mitohondrijih, ker aktivacija artemisinina poteče le v parazitskem mitohondriju (15).

Membranski model

Artemisinin se akumulira v nevtralnih lipidih in povzroči poškodbe parazitove membrane (12). V nasprotju z artemisininom tetraoksani povzročijo oksidacijo nenasičenih fosfolipidov tudi v anaerobnih pogojih (17).



Slika 10: modeli mehanizma delovanja artemisinina

1.3.4 Mehanizem protitumornega delovanja artemisinina

Protitumorno delovanje artemisinina dosežemo z aplikacijo višjih koncentracij, kot so potrebne za zdravljenje malarije. Antikancerogeni učinki artemisinina in njegovih derivatov so selektivno znižanje proliferacije, indukcija apoptoze, inhibicija angiogeneze in zvišanje oksidativnega stresa tumorskih celic. Artemisinini so citotoksični tudi proti rakavim celicam, ki so odporne na druge protitumorne učinkovine in obsevanja (12). Dihidroartemisinin inhibira vezavo VEGF na receptorje in manjša ekspresijo teh receptorjev, kar posledično inhibira angiogenezo (5).

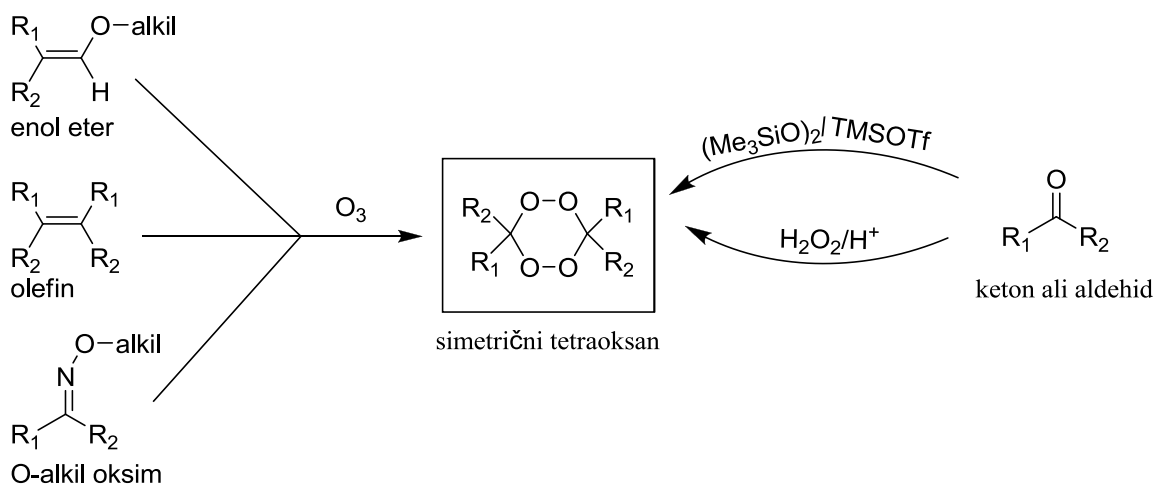
Inhibicija VEGF bi lahko dala dodatno vrednost zdravljenju cerebralne malarije z artemisinini, pri kateri imajo preživeli pogosto nevrološke motnje. Le-te nastanejo zaradi možganskih edemov in hemoragij, ki so posledica aktivacije endotelijskih celic in motenj v hepatoencefalni barieri (5).

1.4 SINTEZA TETRAOKSANOV

Nizka vsebnost artemisinina v naravnih virih (0,01–0,8 %) in posledično slabi izkoristki pri izolaciji učinkovine so spodbudili kemijsko sintezo te učinkovine, kar je preko delnih sintez vodilo do totalne sinteze leta 1983. Sledile so ji tudi uspešne biosinteze (15). Stroški pridobivanja artemisinina in njegovih derivatov so visoki, še posebej če upoštevamo kupno moč pacientov v državah tretjega sveta.

Učinkovine, ki bi lahko z nizko ceno pridobivanja in močnim delovanjem v prihodnosti veliko obetale v antimalarijski terapiji, so sintezni endoperoksidi. Med najbolj aktivnimi so triksolani in tetraoksani. Glavna sintezna pot za pridobivanje teh učinkovin je ozonoliza. Boljša, varnejša in cenejša je uporaba vodikovega peroksida, ki pa je zaenkrat mogoča le pri sintezi tetraoksanov.

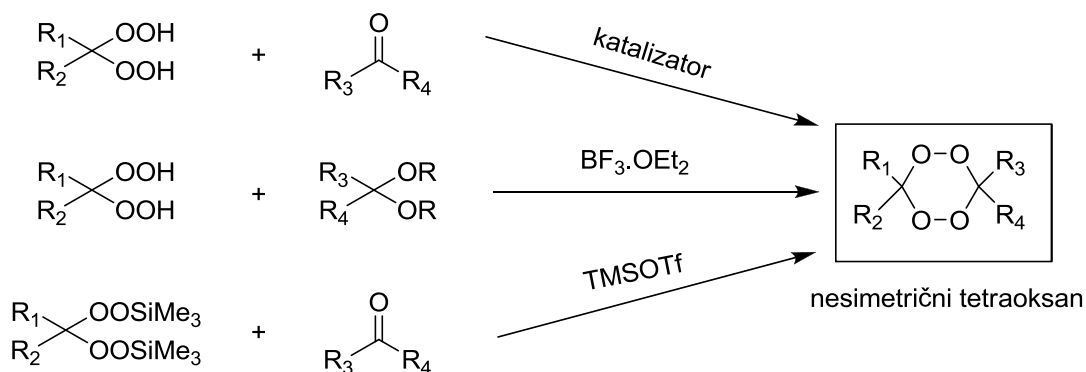
Simetrične tetraoksane lahko sintetiziramo iz različnih izhodnih spojin in z uporabo različnih katalizatorjev. Selektivna sinteza simetričnih tetraoksanov zajema predvsem reakcije olefinov, enol etrov ali O-alkil oksimov z ozonom. Enostavnejša sintezna pot pa je mogoča s kislinsko katalizirano ciklokondenzacijo ketonov z vodikovim peroksidom kot oksidantom, alternativno pa lahko uporabimo tudi trimetilsilil peroksid in TMSOTf (Shema 1) (18). Glavna ovira pri kislinsko kataliziranih peroksidacijah ketonov je neselektivnost, saj poleg tetraoksanov nastajajo tudi drugi ciklični produkti (npr. heksaoksonani), ki jih je težko ločiti od tetraoksanov. Poteče lahko tudi Bayer-Villigerjeva oksidacija cikličnih ketonov v laktone, ki je ravno tako kislinsko katalizirana reakcija. Slednja reakcija je še posebej izrazita pri cikličnih ketonih, ki se v glavnem uporabljajo za sintezo dispiro tetraoksanov. Izkazalo se je, da lahko selektivnost peroksidacije ketonov v tetraoksane usmerjamo z reakcijskimi pogoji, kjer je uporaba fluoriranih alkoholov ključnega pomena (19).



Shema 1: sintezne poti za pridobivanje simetričnih tetraoksanov

Zaradi potrebe po širšem strukturnem spektru tetraoksanov in natančnih strukturnih zahtev, ki so v molekuli pomembne pri modifikacijah lastnosti zdravilne učinkovine, so veliko bolj zanimivi substrati nesimetričnih tetraoksanov. Njihova sinteza poteka v dveh stopnjah.

Najprej prvo karbonilno spojino pretvorimo v *gem*-dihidroperoksid (DHP), le-ta pa se v sledeči stopnji ciklizira z drugo karbonilno spojino. Drugo stopnjo reakcije kataliziramo z H_2SO_4 , Re_2O_7 , s HBF_4 v fluoriranem alkoholu ali s kombinacijo $\text{MeReO}_3\text{-HBF}_4$. Namesto karbonilnih spojin se lahko v stopnji ciklizacije uporabijo tudi njihovi ketali, pri čemer je katalizator BF_3 eterat ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$). Na drugi strani se lahko uporabijo tudi trimetilsililni derivati DHP, kjer so kot katalizator uporabili TMSOTf (Shema 2) (18). Pri velikih razlikah v reaktivnosti med karbonilnima skupinama pa lahko reakcijo izvedemo v eni stopnji (20).

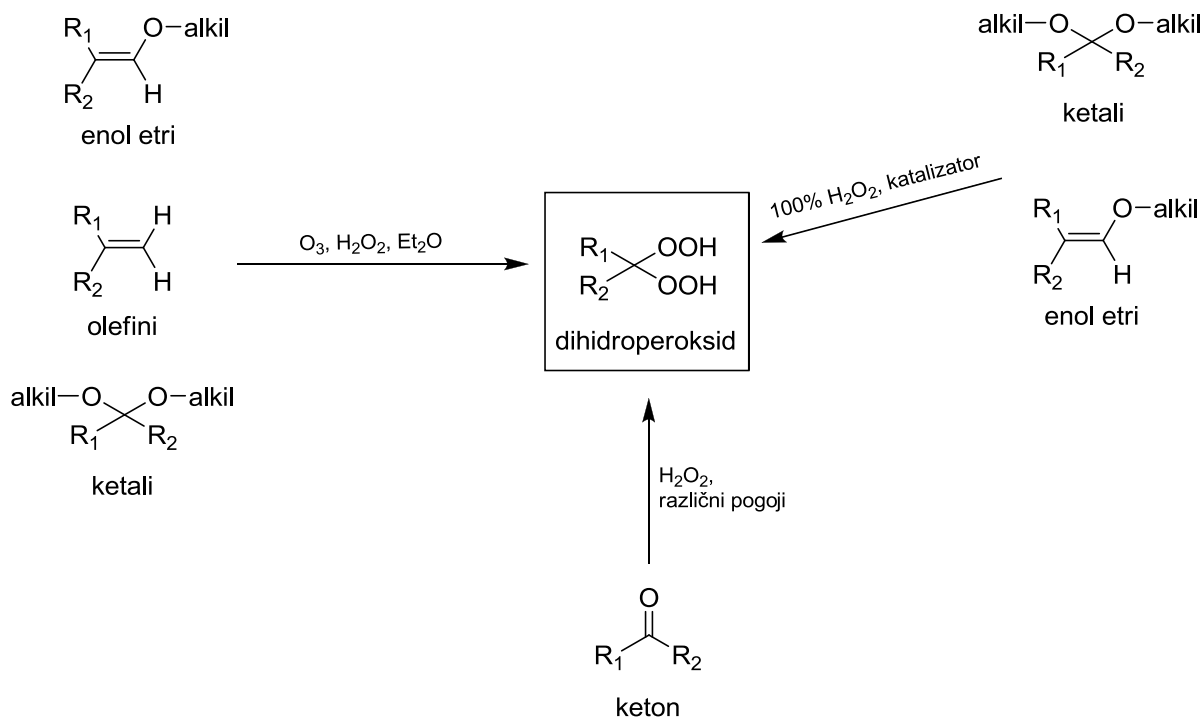


Shema 2: pridobivanje nesimetričnih tetraoksanov

1.5 SINTEZA GEM-DIHIDROPEROKSIDOV

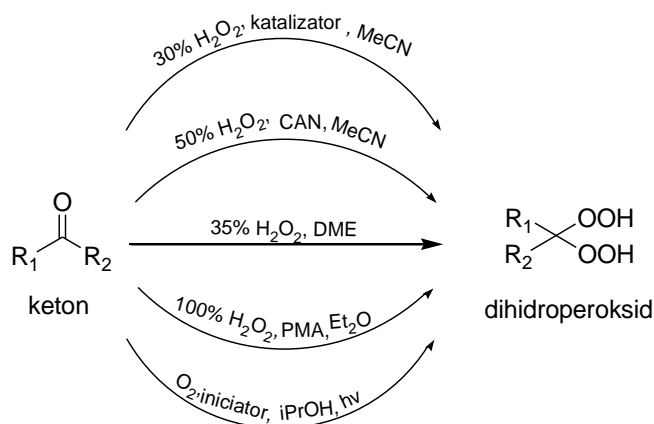
Najenostavnejša sintezna pot za *gem*-dihidroperokside bi bila peroksidacija karbonilne spojine z vodikovim peroksidom ali kisikom, vendar je ta reakcijska pot zahtevna zaradi neselektivnosti. Osnovna sintezna metoda za sintezo DHP je ozonoliza ketalov, alkenov ali enol etrov v prisotnosti etrske raztopine vodikovega peroksida (Shema 3). Iz izhodne spojine nastane ozonid, ki nato s pomočjo nukleofila (H_2O_2) razpade v DHP. Gre za večstopenjsko reakcijo, saj je potrebno izhodni ketal, alken ali enol eter največkrat predhodno sintetizirati. Slabost ozonolize so tudi nizki izkoristki reakcije (21).

Ozonoliza je bila dolgo časa tudi edina splošna pot za pripravo primarnih alifatskih DHP, vendar so izkoristki pri reakciji slabi (21). Alternativna metoda, ki vodi do primarnih DHP, je s CSA (kafrasulfonska kislina) katalizirana reakcija aldehydov s 70 % H_2O_2 v etru. Pri pretvorbah acikličnih in cikličnih alifatskih aldehydov so izkoristki nizki (34–64 %), benzaldehid pa daje 77 % izkoristek (22, 23).



Shema 3: shematski prikaz možnih izhodnih spojin pri sintezi DHP

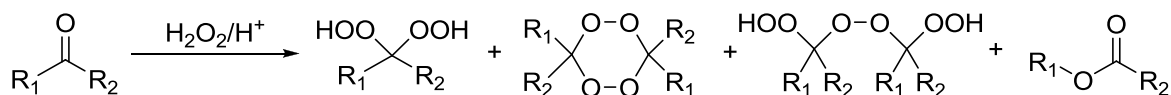
DHP iz alifatskih ketonov je mogoče pripraviti tudi s kisikom. Antracen je iniciator, ki pod vplivom svetlobe (ksenonova žarnica) tvori radikale. S pomočjo topila (izopropanola) in molekularnega kisika se tvorita izopropilni hidroksihidroperoksid in H_2O_2 , ki s ketonom reagirata do končnega produkta. Izkoristki so 60–90 %, pri acetofenonu pa le 15 % (Shema 4) (24). Namesto antracena je mogoče kot občutljivec uporabiti še antrakinson pod vplivom ultravijolične svetlobe. Izkoristki so splošno gledano boljši (nad 70 %), kar prav tako velja za acetofenon (33 % izkoristek) (25).



Shema 4: shematski prikaz možnih sintetskih poti za pridobivanje *gem*-dihidroperoksidov pod nevtralnimi reakcijskimi pogoji.

Neposredna pot za pripravo DHP je adicija vodikovega peroksida na ketone, ki v nevtralnem mediju brez prisotnosti katalizatorja daje zmes različnih produktov in posledično slabe izkoristke (21). Ko so v 60. letih prejšnjega stoletja raziskovali reakcijo cikloheksanona z H_2O_2 , so zmes produktov zaradi kompleksnosti imenovali kar cikloheksanon peroksid (26). Reakcije so zato katalizirane s kislinami, različnimi kovinskimi katalizatorji ali halogeni.

Kislinsko katalizirana sinteza DHP iz različnih cikličnih ali acikličnih ketonov z mravljično kislino je vodila do nizkih izkoristkov. Kislina se pri reakciji uporablja za povečanje selektivnosti in izkoristkov reakcije, vendar hkrati katalizira dimerizacije in ciklizacije hidroperoksidov, s čimer nastanejo tetraoksani in drugi stranski produkti (Shema 5) (21).



Shema 5: stranski produkti pri kislinsko katalizirani reakciji ketonov z H_2O_2

Izhodne spojine za pripravo DHP so lahko tudi ketali ali enol etri. Pri reakcijah je obvezna prisotnost kisline, kar pa povzroči možnost nastanka dimerov. Selektivnost dosežemo z uporabo velikih presežkov brezvodnega H_2O_2 . Kislinski katalizator pri reakciji je lahko volframova(VI) kislina (H_2WO_4) ali etrska raztopina borovega trifluorida ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$) (21). Nastanku stranskih produktov pri kislinsko kataliziranih sintezah DHP so se poskusili izogniti z uporabo nevtralnih pogojev (Shema 4). Ena od možnosti za takšne reakcije so renijevi(VII) katalizatorji, in sicer metiloksorenij (MeReO_3), renijev (VII) oksid (Re_2O_7) in trimetilsililoksorenat ($\text{Me}_3\text{SiOReO}_3$). Eden prvih uporabljenih katalizatorjev za tovrstno reakcijo je bil metiloksorenij, ki je pri reakciji ketonov s 30 % H_2O_2 v fluoriranih alkoholih dajal dobre izkoristke. Metoda je bila odkrita v sklopu študija "one-pot" sinteze nesimetričnih tetraoksanov, kjer so se DHP pojavili kot vmesni produkti reakcije (20). Višje izkoristke pri reakcijah (več kot 80 %) dajeta Re_2O_7 in $\text{Me}_3\text{SiOReO}_3$. Ker pa je renijev oksid cenovno primernejši, je bil preizkušen na večjem številu substratov (ciklični in aciklični ketoni). Pri reakciji sta potrebna minimalen presežek 50 % H_2O_2 in polarno topilo (MeCN), izkoristki pa so tipično večji od 80 %. Pri reakciji dobimo visoke izkoristke tudi, če kot izhodno spojino uporabimo benzaldehid (96 %) ali acetofenon (69 %) (27).

Občutno cenejša je sinteza DHP iz cikličnih in acikličnih ketonov z uporabo joda kot Lewisove kisline, ki daje dobre (60–98 %) izkoristke. Reakcija poteče tudi na benzaldehidu (55 %), pri acetofenonu pa je izkoristek manjši (18 %). V takih pogojih so alifatski aldehidi premalo reaktivni in produkt reakcije so ustrezni hidroksihidroperoksidi, kar je enako kot pri nekataliziranih reakcijah (28).

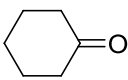
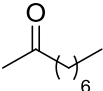
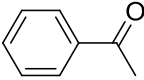
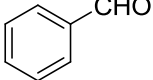
CAN (cerijev amonijev nitrat) deluje tudi kot Lewisova kislina, ki poveča elektrofilnost karbonilnega ogljikovega atoma in nukleofilne lastnosti vodikovega peroksida. V milih pogojih izhodni ciklični ali aciklični keton reagira hitro in s presežnim 50 % H_2O_2 v MeCN do DHP (82–96 % izkoristki). Pod takimi pogoji reagira benzaldehid enako dobro kot pri reakciji katalizirani z jodom, medtem ko daje acetofenon občutno boljše izkoristke (48 %) (29).

Naslednji v vrsti možnih katalizatorjev je stroncijev (II) klorid heksahidrat ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Reakcija poteka s presežkom 30 % vodne raztopine H_2O_2 v polarnem topilu (najbolje v MeCN). Aciklični in ciklični alifatski ketoni dajejo 90 ali več odstotni izkoristek reakcije, benzaldehid 54 %, benzofenon pa 45 %. Aciklični aldehidi se pretvorijo v hidroksihidroperoksido (30).

Poleg različno koncentriranih vodnih raztopin vodikovega peroksida se lahko pri pripravi DHP uporabi tudi etrska raztopina, reakcija pa je katalizirana s fosfomolibdenovo kislino ($\text{H}_3\text{MoO}_{12}\text{O}_{40} \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Metoda je uporabna za različne ketone in dioksolane, njena glavna prednost pa je, da zaradi milih pogojev omogoča obstanek nekaterih zaščitnih skupin v molekulah. Izkoristki pri cikličnih in acikličnih ketonih so tipično 90 % ali večji, benzaldehid daje 74 %, acetofenon pa 51 % (31).

Objavili so še sintezno pot, ki s 35 % vodno raztopino H_2O_2 brez prisotnosti katalizatorja omogoča pretvorbo različnih alifatskih ketonov v DHP. Reakcija lahko poteka v različnih topilih, najvišje izkoristke pa daje DME. Izkoristki so praviloma nad 70 %, acetofenon pa se pretvori le 13 % (32).

Tabela I: primerjava izkoristkov pretvorb različno reaktivnih karbonilnih spojin v ustrezne dihidroperokside pri različnih reakcijskih pogojih

izhodna spojina pogoji reakcije				
50 % H ₂ O ₂ , Re ₂ O ₇ , MeCN	79	94	69	96
30 % H ₂ O ₂ , I ₂ , MeCN	/	96	16	55
50 % H ₂ O ₂ , CAN, MeCN	87	95	48	51
30 % H ₂ O ₂ , SrCl ₂ ·6H ₂ O, MeCN	94	98	45	54
PMA, H ₂ O ₂ /Et ₂ O	95	/	51	74
hν, O ₂ , antracen, iPrOH	62	84	15	/
hν, O ₂ , antrakinon, iPrOH	85	71	33	/
35 % H ₂ O ₂ , DME	73	/	13	/

2 NAMEN DELA

V diplomskem delu bomo raziskali zanimivo reakcijo ketonov z vodikovim peroksidom v smeri nastanka hidroperoksidnih produktov. V raziskavah se bomo osredotočili na aktivacijo vodikovega peroksida za selektivno pretvorbo ketonov v odgovarjajoče dihidroperoksidge s 30 % vodno raztopino H_2O_2 brez prisotnosti katalizatorja. DHP so izhodna spojina za pripravo tetraoksanov, ki imajo potencialno antimalarijsko delovanje.

Proučevali bomo pretvorbo ketonov v DHP z uporabo 30 % vodne raztopine H_2O_2 brez prisotnosti katalizatorja. Najprej bomo sledili postopkom iz članka o prvi nekatalizirani sintezi *gem*-dihidroperoksidov (32) ter ugotovili, kakšen vpliv ima koncentriranje reakcijske zmesi na potek reakcije. Vpliv odparevanja topila na pretvorbo ketona v DHP bomo dodatno analizirali z ATR-IR sondo.

Sledilo bo proučevanje vpliva različnih koncentracij H_2O_2 (30 %, 100 %) in odparevanja topila (MeCN) na pretvorbo ketona v ustrezni DHP. Kot modelni spojini nam bosta služili dobro reaktiven 2-metilcikloheksanon in manj reaktiven nonan-2-on. Poiskali bomo optimalno topilo, ki bi povišalo selektivnost pretvorbe ketonov v DHP in dajalo dobro pretvorbo izhodnih spojin v produkte. Topila, ki jih bomo uporabili, bodo acetonitril, metanol, etanol, heksan, 1,2-dimetoksietan, dietil eter, toluen, diklorometan, etil acetat in trifluoroetanol.

V zadnjem sklopu raziskav bomo proučevali vpliv strukture ketona (ciklični, aciklični, steroidni) ter prisotnosti heteroatomov (nasičeni heterociklični ketoni) na reaktivnost in selektivnost nekatalizirane dihidroperoksidacije ketonov z H_2O_2 .

3 MATERIALI IN METODE

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 10 ml MeCN in 20 minut odparevali na rotavaporju. Sledil je še en dodatek 10 ml MeCN in ponovno 20 minutno rotavapiranje.

Rotavapiranje

Za rotavapiranje smo uporabljali rotavaporja Büchi Rotavapor R-124 in Büchi Rotavapor RE111.

Termostatiranje reakcij

Reakcije, ki smo jih izvajali pri 40 °C, smo termostatirali v vodni kopeli z aparaturo 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 uporabljali vanilin-žveplovo kislino kot orositveni reagent in jod silikagel. Vanilin-žveplovo kislino smo pripravili tako, da smo 0,5 g vanilina raztopili v 100 ml 80 % etanolne raztopine H₂SO₄. Za pripravo jod silikagela smo zmešali 10 g silikagela z 0,1 g joda v zaprti reagenčni steklenici. Za boljšo vizualizacijo produktov na TLC ploščah smo najprej obarvali ploščo z jodom, nato pa razvili TLC s škropljenjem z vanilin-žvepleno kislino in segrevanjem s pištolo na vroč zrak.

Kolonska kromatografija

Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Kieselgel 60 proizvajalca Fluka s premerom delcev 0,063–0,2 mm. Za izolacijo DHP smo kot mobilno fazo uporabili zmes DKM in EtOAc v razmerju 8 : 2.

Infrardeča spektrometrija (IR)

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

Pretvorbo 4-metilcikloheksanona z vodikovim peroksidom v DHP smo opazovali z ATR IR sondo ReactIR™ 45 na sintezni delovni postaji Easymax 102 Mettler-Toleda.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektri so bili posneti na Kemijskem inštitutu (NMR center) z Varian Inova 300 spektrometrom (300 MHz). Za spektre, posnete v CDCl_3 , so kemijski premiki (δ) podani v ppm glede na tetrametilsilan kot interni standard. Za spektre, posnete v DMSO, je bil DMSO uporabljen kot interni standard.

Določevanje tališča

Tališča smo določili v steklenih kapilarah na Inštitutu Jožef Štefan z aparaturo za merjenje tališč in vrelišč z ogrevano kopeljo iz silikonskega olja Buchi 535.

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 Inštitutu Jožef Štefan.

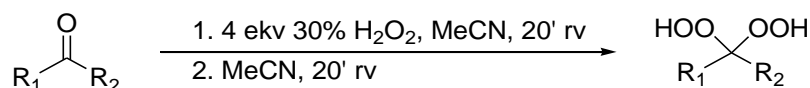
Elementna analiza

Elementne analize so bile narejene na Inštitutu Jožef Stefan na Oddelku za anorgansko kemijo in tehnologijo z aparaturo elementni analizator Vario EL cube, Elementar.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

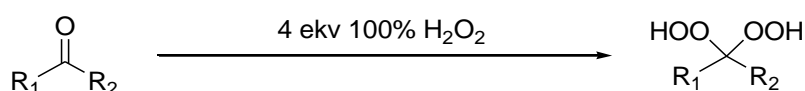
4.1 VPLIV RAZLIČNIH REAKCIJSKIH POGOJEV

Pogoji 1: 100 % H₂O₂ pripravljen "in-situ"



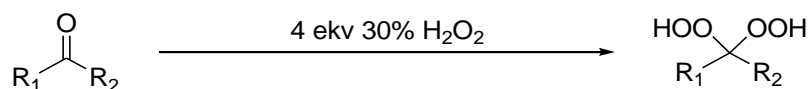
1,00 mmol ketona (112 mg 2-metilcikloheksanona **1b** ali 142 mg nonan-2-ona **3a**) smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 453 mg 30 % H₂O₂ (4,00 mmol, 4 ekv). Raztopino smo odparevali 20 minut na rotavaporju. Ponovno smo dodali 10 ml topila in 20 minut odparevali. Vzorec smo vzeli po 2. odparevanju in po 24 urah od začetka reakcije, ga raztopili v devteriranem DMSO ter raztopino zmrznili do analize. Pretvorbo smo določili na podlagi NMR spektra.

Pogoji 2: predhodnopripravljen 100 % H₂O₂



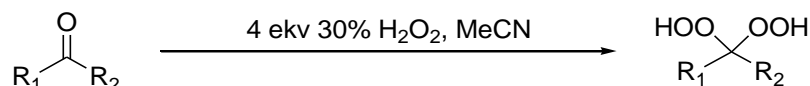
100 % H₂O₂ smo pripravili iz 453 mg (4,00 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Potem smo dodali 1,00 mmol ketona (112 mg **1b** ali 142 mg **3a**) in mešali. Vzorec smo vzeli po 45 minutah in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra.

Pogoji 3: 30 % H₂O₂



1,00 mmol ketona (112 mg **1b** ali 142 mg **3a**) smo zmešali s 453 mg 30 % H₂O₂ (4,00 mmol, 4 ekv) in mešali. Vzorec smo vzeli po 45 minutah in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra.

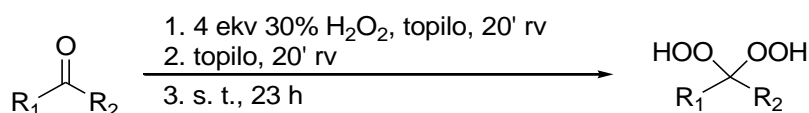
Pogoji 4: 30 % H₂O₂ v MeCN



1,00 mmol ketona (112 mg **1b** ali 142 mg **3a**) smo raztopili v 1 ml MeCN in dodali 453 mg 30 % H₂O₂ (4,00 mmol, 4 ekv) ter mešali 24 h. Vzorec smo vzeli po 45 minutah in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra.

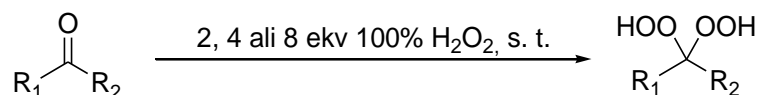
Podatki o pretvorbah pri reakcijah v pogojih 1-4 so zbrani v poglavju Rezultati in razprava (Tabela II in Tabela III).

4.2 VPLIV RAZLIČNIH TOPIL



1,00 mmol ketona (112 mg **1b** ali 142 mg **3a**) smo raztopili v 10 ml topila (heksan, toluen, Et₂O, DKM, EtOAc, MeCN, DME, EtOH, MeOH ali TFE) in dodali 453 mg 30 % H₂O₂ (4,00 mmol, 4 ekv). Odparevali smo 20 minut, dodali novih 10 ml istega topila in odparevali še 20 minut. Vzorec smo vzeli po 2. odparevanju in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra. Podatki o pretvorbah pri reakcijah so zbrani v poglavju Rezultati in razprava (Tabela IV in Tabela V).

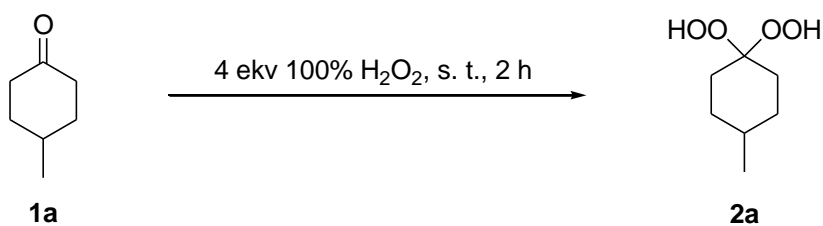
4.3 VPLIV RAZLIČNE KOLIČINE H₂O₂



Različno količino 30 % H₂O₂ (2,00 mmol, 2 ekv ali 4,00 mmol, 4 ekv ali 8,00 mmol, 8 ekv) smo raztopili v 10 ml MeCN in odparevali 20 minut na rotavaporju. Ponovno smo dodali 10 ml topila in 20 minut odparevali. Potem smo dodali 1,00 mmol ketona (112 mg **1b** ali 142 mg **3a**). Vzorec smo vzeli po 45 minutah in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra. Podatki o pretvorbah pri reakcijah so zbrani v poglavju Rezultati in diskusija (Tabela VI in Tabela VII).

4.4 SINTEZA DIHIDROPEROKSIDOV (PREPARATIVNE METODE)

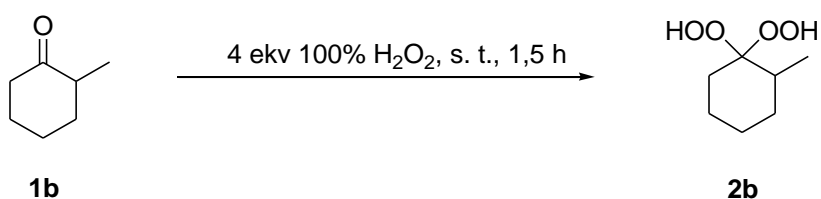
4.4.1 Sinteza 4-metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (**2a**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 453 mg (4,00 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 113 mg (1,00 mmol) ketona **1a** in pustili 2 uri pri s. t.. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 122 mg (75 % izkoristek) DHP **2a** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

4-Metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksid (2a)		M _r =162,18 g/mol
struktura		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆)	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-d ₆)	δ [ppm] = 21.6, 29.1, 30.5, 31.2, 107.8.	
MS (ESI)	m/z (%) = 161 [M-H] ⁻ (40), 111 (100).	
HR-MS	C ₇ H ₁₃ O ₄ izračunano: 161.0814 izmerjeno: 161.0811	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3350, 2928, 2860, 1446, 1378, 1255, 1098, 1043, 974.	

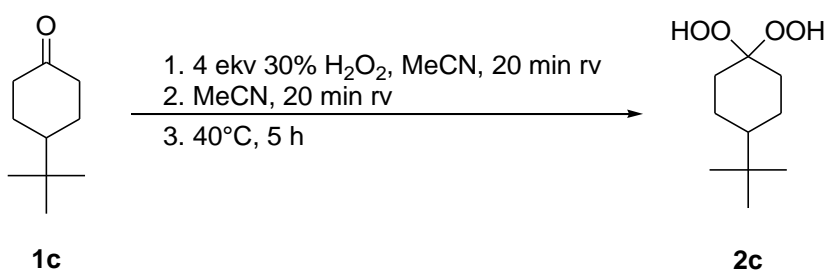
4.4.2 Sinteza 2-metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (**2b**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 481 mg (4,24 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 119 mg (1,06 mmol) ketona **1b** in pustili 1,5 ure pri s. t.. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 137 mg (80 % izkoristek) DHP **2b** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

2-Metilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksid (2b)		M _r = 162,18 g/mol
struktura 		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d6)	δ [ppm] = 0.96 (d, 3H, J=6 Hz), 1.30-1.61 (m, 7H), 1.74-1.78 (m, 1H), 2.05-2.14 (m, 1H), 10.72 (s, 1H), 10.79 (s, 1H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d6)	δ [ppm] = 14.4, 20.1, 22.2, 24.8, 29.4, 31.7, 110.0.	
MS (ESI)	m/z (%) = 161 [M-H] ⁻ (20), 143 (100).	
HR-MS	C ₇ H ₁₃ O ₄ izračunano: 161.0814 izmerjeno: 161.0813	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3415, 2939, 2865, 1447, 1378, 1066, 945.	

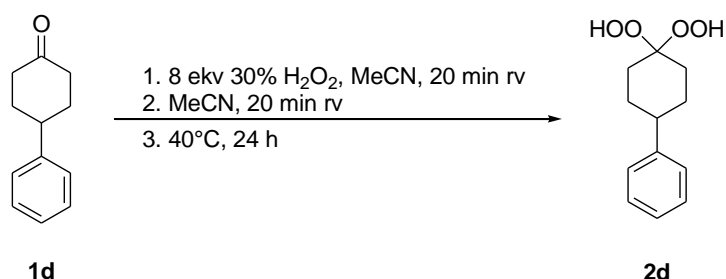
4.4.3 Sinteza 4-*tert*-Butilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (**2c**)



154 mg (1,00 mmol) ketona **1c** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 455 mg (4 ekv, 4,00 mmol) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 5 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 178 mg (89 % izkoristek) DHP **2c** v obliki belega prahu.

4-<i>tert</i>-Butilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksid (2c)		$M_r=204,26$ g/mol
struktura spojine		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆)	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-d ₆)	δ [ppm] = 23.0, 27.5, 29.7, 32.0, 46.9, 107.7.	
MS (ESI)	m/z (%) = 203 [M-H] ⁻ (60), 153 (100).	
HR-MS	C ₁₀ H ₁₉ O ₄ izračunano: 203.1283 izmerjeno: 203.1277	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3415, 2952, 1366, 1053, 906.	
T _{tal}	82.6 – 84.2 °C T _{tal} po literaturi: 79-81 °C (33)	

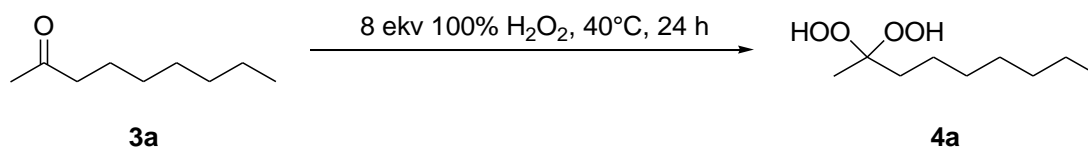
4.4.4 Sinteza 4-fenilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksida (**2d**)



174 mg (1,00 mmol) ketona **1d** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 455 mg (4,00 mmol, 1 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 221 mg (99 % izkoristek) DHP **2d** v obliki belega prahu.

4-Fenilcikloheksan-1,1-diil dihidroperoksid (2d)		$M_r = 224,25 \text{ g/mol}$
struktura 		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.43-1.72 (m, 6H), 2.17 (d, 2H, <i>J</i> =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-d ₆)	δ [ppm] = 29.6, 29.8, 42.6, 107.4, 126.0, 126.6, 128.3, 146.3.	
MS (ESI)	m/z (%) = 223 [M-H] ⁻ (60), 205 (100).	
HR-MS	C ₁₂ H ₁₅ O ₄ izračunano: 223.0970 izmerjeno: 223.0971	
IR ν_{\max} (KBr, cm ⁻¹)	3216, 2938, 1394, 1123, 1051.	
T _{tal}	123.1-125.4 °C	
elementna analiza (CHNS)	izračunano	izmerjeno
	C 64.27 %	C 64.23 %
	H 7.19 %	H 7.14 %

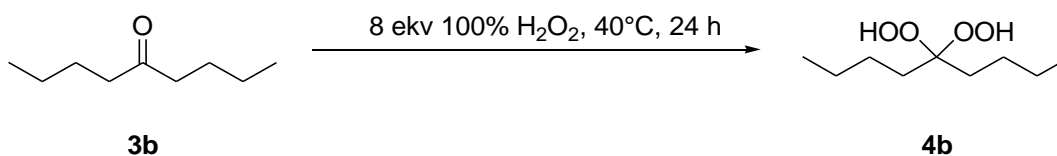
4.4.5 Sinteza nonan-2,2-diil dihidroperoksida (**4a**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 890 mg (7,85 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 139 mg (0,98 mmol) ketona **3a** in segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 154 mg (82 % izkoristek) DHP **4a** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

Nonan-2,2-diil dihidroperoksid (4a)		M _r =192,25 g/mol
struktura 		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 0.86 (t, 3H, J= 6 Hz), 1.22 (s, 3H), 1.20-1.36 (m, 10H), 1.52-1.57 (m, 2H), 10.88 (s, 2H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 13.9, 18.1, 22.1, 23.5, 28.6, 29.3, 31.2, 33.0, 109.6.	
MS (ESI)	m/z (%) = 191 [M-H] ⁻ (60), 141 (100).	
HR-MS (MS ESI -)	C ₉ H ₁₉ O ₄ izračunano: 191.1283 izmerjeno: 191.1282	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3416, 2957, 2927, 1856, 1466, 1375, 1132, 1099.	

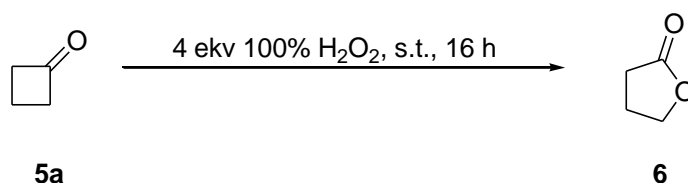
4.4.6 Sinteza nonan-5,5-diil dihidroperoksida (**4b**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 906 mg (8,00 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 142 mg (1,00 mmol) ketona **3b** in segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 166 mg (86 % izkoristek) DHP **4b** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

Nonan-5,5-diil dihidroperoksid (4b)		M _r =192,25 g/mol
struktura 		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	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-d ₆)	δ [ppm] = 13.9, 22.4, 25.3, 28.9, 111.5.	
MS (ESI)	m/z (%) = 191 [M-H] ⁻ (70), 141 (100).	
HR-MS	C ₉ H ₁₉ O ₄ izračunano: 191.1283 izmerjeno: 191.1288	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3415, 2960, 2933, 2873, 1457, 1380, 1259, 1134, 1078, 967.	

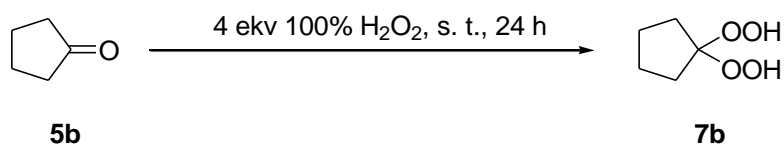
4.4.7 Sinteza dihidrofuran-2(3H)-ona (**6**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 880 mg (7,76 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 136 mg (1,94 mmol) ketona **5a** in pustili 16 ur pri s. t.. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 80 mg (48 % izkoristek) laktona **6** v obliki brezbarvne tekočine.

Dihidrofuran-2(3H)-on (6)		M_r = 86,09 g/mol
Struktura		
izgled spojine	brezbarvna tekočina	
rezultati analize (34)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 2.09-2.19 (m, 2H), 2.42 (t, 2H, J= 8 Hz), 4.26 (t, 2H, J= 6 Hz).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 21.8, 27.4, 68.3, 177.9.	
MS (ESI)	m/z (%) = 87 [MH] ⁺ (100).	
HR-MS	C ₄ H ₇ O ₂ izračunano: 87.0446 izmerjeno: 87.0444	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	2988, 1766, 1377, 1164, 1035, 990.	

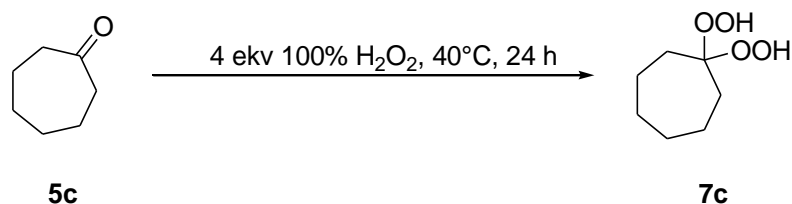
4.4.8 Sinteza ciklopentan-1,1-diil dihidroperoksida (**7b**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 943 mg (8,00 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 175 mg (2,00 mmol) ketona **5b** in pustili 24 ur pri s. t.. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 262 mg (94 % izkoristek) DHP **7b** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

Ciklopentan-1,1-diil dihidroperoksid (7b)		M _r = 134,13 g/mol
Struktura		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.57-1.62 (m, 4H), 1.74-1.79 (m, 4H), 11.24 (s, 2H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 24.2, 32.9, 119.8.	
HR-MS	C ₅ H ₉ O ₄ izračunano: 133.0501 izmerjeno: 133.0497	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3382, 2962, 2876, 1437, 1378, 1328, 1198, 1184, 1076, 969.	

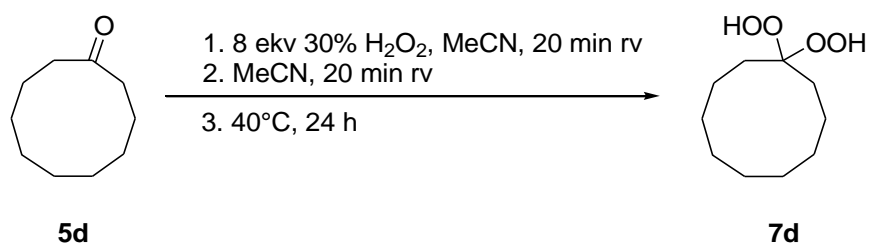
4.4.9 Sinteza cikloheptan-1,1-diil dihidroperoksida (**7c**)



100 % H₂O₂ smo pripravili iz 435 mg (3,84 mmol, 4 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂ po postopku opisanem v metodah dela. Dodali smo 108 mg (0,96 mmol) ketona **5c** in segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 106 mg (68 % izkoristek) DHP **7c** v obliki brezbarvne viskozne tekočine.

Cikloheptan-1,1-diil dihidroperoksid (7c)		M _r = 162,18 g/mol
struktura		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.48 (m, 8H), 1.74-1.77 (m, 4H), 10.84 (s, 2H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 22.5, 29.8, 32.4, 113.2.	
HR-MS	C ₇ H ₁₃ O ₄ izračunano: 161.0814 izmerjeno: 161.0811	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3399, 2925, 2857, 1457, 1365, 1175, 1010.	

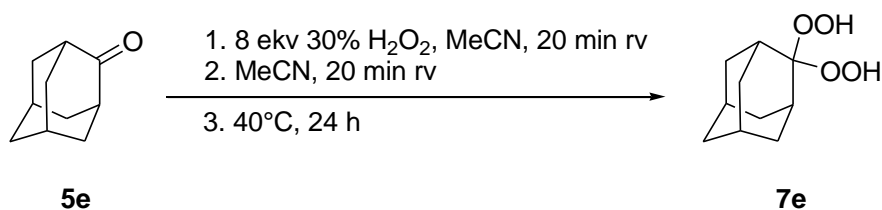
4.4.10 Sinteza ciklodekan-1,1-diil dihidroperoksida (**7d**)



156 mg (1,01 mmol) ketona **5d** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 917 mg (8,09 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 162 mg (78 % izkoristek) DHP **7d** v obliki belega prahu.

Ciklodekan-1,1-diil dihidroperoksid (7d)		$M_r=204,26$ g/mol
struktura 		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.42-1.57 (m, 14H), 1.70 (t, 4H, <i>J</i> = 6 Hz), 10.78 (s, 2H)	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 20.6, 23.0, 25.1, 25.4, 25.6, 112.8.	
HR-MS	C ₁₀ H ₁₉ O ₄ izračunano: 203.1283 izmerjeno: 203.1280	
IR ν_{\max} (KBr, cm ⁻¹)	3396, 2902, 1486, 1394, 1256, 1077.	
T _{tal}	96.1-96.8 °C	
elementna analiza	Izračunano C 58.80 % H 9.87 %	Izmerjeno C 58.87 % H 10.07 %

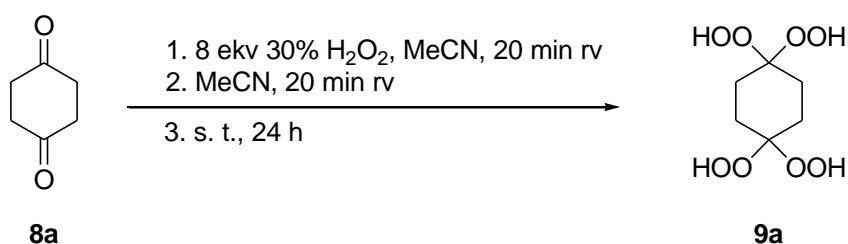
4.4.11 Sinteza adamantan-1,1-diil dihidroperoksida (**7e**)



153 mg (1,02 mmol) ketona **5e** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 924 mg (8,16 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 193 mg (95 % izkoristek) DHP **7e** v obliki belega prahu.

Adamantan-1,1-diil dihidroperoksid (7e)		M_r =200,23 g/mol
struktura 		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	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-d ₆)	δ [ppm] = 26.7, 30.8, 33.3, 36.8, 109.5.	
MS (ESI)	m/z (%) = 199 [M-H] ⁻ (100), 181 (70).	
HR-MS	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ izračunano: 199.0970 izmerjeno: 199.0974	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3341, 2908, 1424, 1093, 1057, 993, 919.	
T _{tal}	98.2-100.8 °C (lit. 86-88 °C z razpadom (35))	

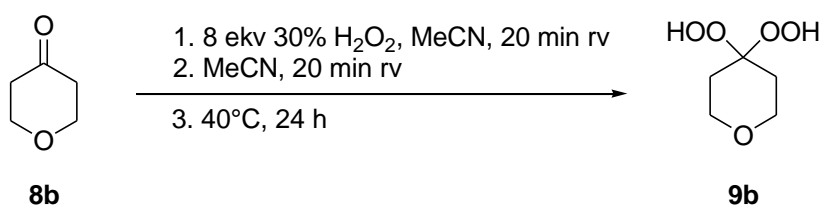
4.4.12 Sinteza 1,1,4,4-tetrahydroperoksicikloheksana (**9a**)



153 mg (1,00 mmol) ketona **8a** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 906 mg (8,00 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo pustili 24 ur pri s. t.. Produkt reakcije je bil DHP **9a** v obliki belorumenega prahu (351 mg). Iz ¹H in ¹³C NMR spektroskopskih podatkov smo ugotovili, da je nastal samo en produkt s 100 % pretvorbo. Produkt smo identificirali na osnovi ¹H in ¹³C NMR, IR in HR-MS spektroskopskih podatkov in njihove primerjave s sorodnimi produkti, vendar ga zaradi njegove nestabilnosti nismo uspeli izolirati.

1,1,4,4-Tetrahydroperoksicikloheksan (9a)		$M_r=212,15\text{g/mol}$
struktura		
izgled spojine	belorumena amorfna snov	
rezultati analize		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.72 (s, 8H), 11.10 (s, 2H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 26.1, 107.9.	
MS (ESI)	m/z (%) = 211 [M-H] ⁻ (100), 161 (20), 111 (30), 110 (35).	
HR-MS	C ₆ H ₁₁ O ₈ izračunano: 211.0454 izmerjeno: 211.0455	
IR ν_{max} (KBr, cm ⁻¹)	3264, 2839, 1370, 1364, 1070, 955.	

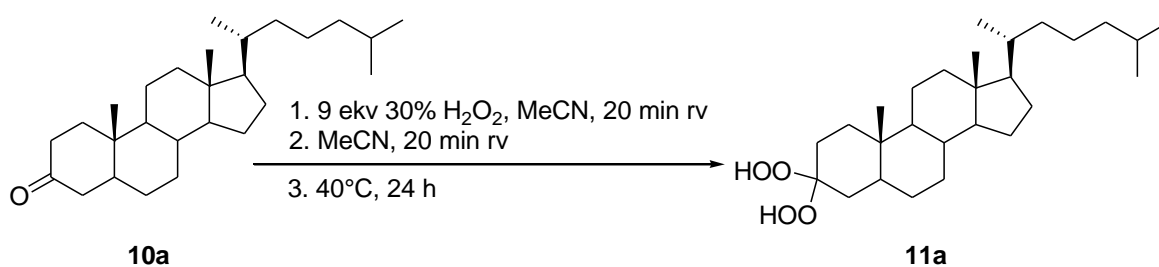
4.4.13 Sinteza 4,4-dihidroperoksitetrahidro-2H-piran (**9b**)



100 mg (1,00 mmol) ketona **8b** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 906 mg (8,00 mmol, 8 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 24 ur na 40 °C. Produkt reakcije je bil DHP **9b** v obliki brezbarvne viskozne tekočine. Iz ¹H in ¹³C NMR spektroskopskih podatkov smo ugotovili, da je nastal samo en produkt s 95 % pretvorbo (332 mg). Produkt smo identificirali na osnovi ¹H in ¹³C NMR, IR in HR-MS spektroskopskih podatkov in njihove primerjave s sorodnimi produkti, vendar ga zaradi njegove nestabilnosti nismo uspeli izolirati.

4,4-Dihidroperoksitetrahidro-2H-piran (9b)		M _r =150,13 g/mol
struktura 		
izgled spojine	brezbarvna viskozna tekočina, ki je po nekaj dneh v zamrzovalniku kristalizirala	
rezultati analize (28)		
¹ H NMR (300MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.73-1.77 (m, 4H), 3.46-3.63 (m, 4H), 11.11 (s, 2H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 30.7, 63.9, 105.6.	
MS (ESI)	m/z (%) = 149 [M-H] ⁻ (100).	
HR-MS	C ₅ H ₉ O ₅ izračunano: 149.0450 izmerjeno: 149.0446	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3265, 2821, 1353, 1307, 1232, 1145, 1095, 1013, 964.	

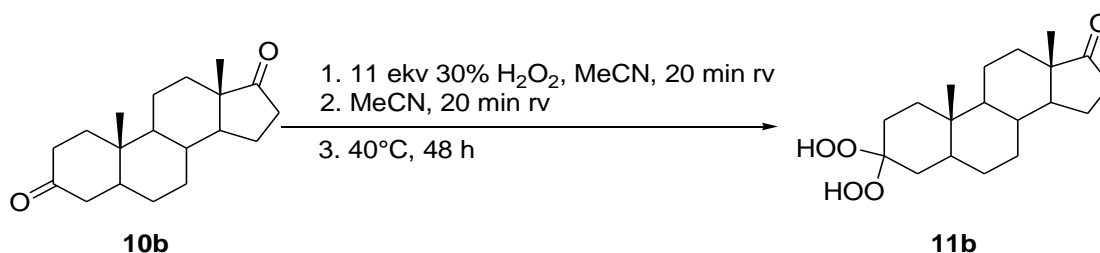
4.4.14 Sinteza 5 α -holestan-3 α ,3 β -dihidroperoksida (**11a**)



75 mg (0,19 mmol) ketona **10a** smo raztopili v 5 ml MeCN in dodali 197 mg (1,75 mmol, 9 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 5 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 24 ur na 40 °C, potem pa še 6 dni pustili pri s. t.. Produkt reakcije je bil DHP **11a** (100 % pretvorba) v obliki belega prahu, ki smo ga identificirali z ¹H NMR spektroskopskimi podatki in primerjavo z znanim produktom, vendar ga zaradi njegove netopnosti v različnih topilih in zmesih topil nismo uspeli izolirati s kolonsko kromatografijo.

5α-Holestan-3α,3β-dihidroperoksid (11a)		$M_r=436,67 \text{ g/mol}$
Struktura		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize (27)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 0.62 (s, 3H), 0.74 (s, 3H), 0.82-1.94 (m, 41H), 10.83 (s, 1H), 10.87 (s, 1H).	
IR ν_{max} (KBr, cm ⁻¹)	3350, 2932, 2866, 1446, 1374, 1115, 1031.	

4.4.15 Sinteza 3,3-dihidroperoksiandrostan-17-ona (**11b**)



60 mg (0,21 mmol) ketona **10b** smo raztopili v 10 ml MeCN in dodali 260 mg (2,29 mmol, 11 ekv) 30 % vodne raztopine H₂O₂. Odparevali smo 20 minut na rotavaporju, potem dodali 10 ml MeCN in še 20 minut odparevali. Reakcijsko zmes smo segrevali 48 ur na 40 °C. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: 20 % EtOAc/DKM) in izolirali 47 mg (67 % izkoristek) DHP **11b** v obliki belega prahu.

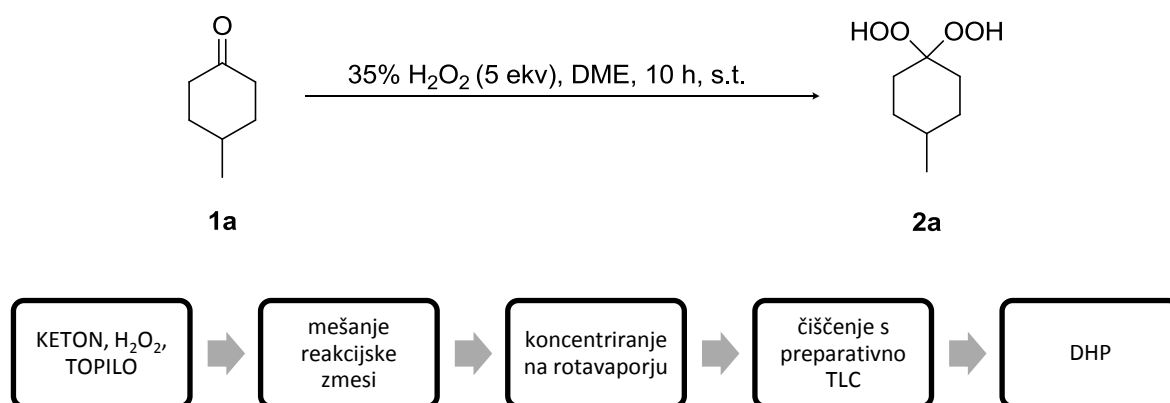
3,3-Dihidroperoksiandrostan-17-on (11b)		M_r =338,44 g/mol
struktura		
izgled spojine	bel prah	
rezultati analize (33)		
¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 0.65-2.42 (m, 28H), 10.84 (s, 1H), 10.89 (s, 1H).	
¹³ C NMR (76 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 11.3, 13.5, 20.0, 21.4, 25.5, 27.6, 30.4, 31.3, 31.9, 34.4, 34.5, 35.3, 35.5, 41.7, 47.1, 50.6, 53.6, 108.1, 219.8.	
MS (ESI)	m/z (%) = 337 [M-H] ⁻ (100), 287 (70).	
HR-MS	C ₁₉ H ₂₉ O ₅ izračunano: 337.2015 izmerjeno: 337.2023	
IR ν _{max} (KBr, cm ⁻¹)	3299, 2934, 1705, 1440, 1380, 1257, 1142, 1062, 1029, 984.	
T _{tal}	160.6-161.3 °C (lit. 161-161.5 °C z razpadom (33))	

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 POTEK REAKCIJE

Sinteza dihidroperoksidov iz ketonov in vodikovega peroksida je katalizirana s kislino, različnimi kovinskimi katalizatorji ali elementarnim jodom (21). Leta 2010 je Itoh s sodelavci objavil prvo tovrstno nekatalizirano sintezo DHP. V raztopino ketona (3 mmol) v DME (3 ml, 1 mmol ketona/1ml) so dodali 35 % vodikov peroksid (15 mmol, 5 ekv). Po mešanju reakcijske zmesi pri sobni temperaturi so jo skoncentrirali pod znižanim pritiskom in jo brez izolacije očistili s preparativno TLC (Slika 11). Reakcijo so uspešno izvedli tudi v nekaterih drugih topilih (izopropanol, MeCN, EtOAc) (32).

Iskra s sodelavci je v preteklosti razvil metodo sinteze DHP v skoraj identičnih reakcijskih pogojih (1 mmol ketona, 1 ml MeCN/1 mmol ketona, 4 ekv 30 % H₂O₂), ampak katalizirano z 10 molskih % joda. Med raziskovanjem so naredili tudi slepi poskus (reakcija brez dodatka joda), ki po izolaciji ni kazal pretvorbe v DHP in je s tem pokazal, da so katalitske količine joda nujno potrebne za pretvorbo ketona v DHP (28, 33).



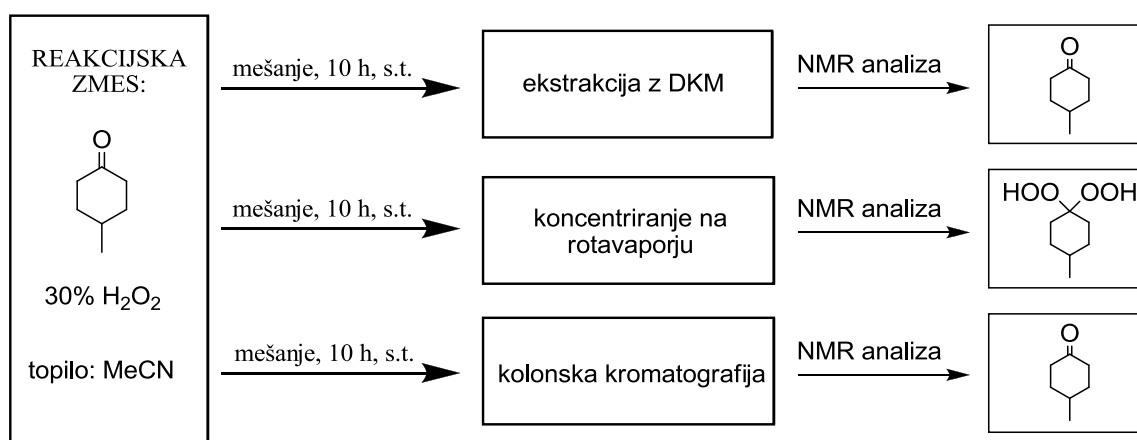
Slika 11: shematski prikaz postopka sinteze DHP iz ketonov, ki ga je razvil Itoh s sodelavci (32)

Na podlagi opisanih preteklih izkušenj smo želeli raziskati, kako točno je prišlo do pretvorbe ketona v dihidroperoksid pri nekatalizirani sintezni metodi. Izvedli smo tri vzporedne reakcije po literaturni metodi (Slika 12), pri katerih smo keton (4-metilcikloheksanon **1a**) raztopili v MeCN in dodali 5 ekvivalentov 30 % vodne raztopine H₂O₂. Po 10 urah mešanja pri sobni temperaturi smo preverili pretvorbo s TLC, ki je pokazal liso za **1a** in H₂O₂ (Slika 12). Kljub rezultatom TLC smo se lotili različnih metod

izolacije. Iz dosedanjega raziskovanja sintez DHP je razvidno, da jih je mogoče izolirati z ekstrakcijo iz reakcijske zmesi z DKM (21). Po ekstrakciji smo naredili NMR analizo surovega reakcijskega produkta, ki je pokazala prisotnost samo izhodne spojine. S tem smo dokazali, da do pretvorbe **1a** v DHP ne pride med reakcijo, t.j. med mešanjem pri sobni temperaturi (Slika 12).

Pretvorba ketona v DHP je lahko katalizirana s kislino, zato smo se želeli prepričati, ali pretvorbo katalizira silikagel tekom izolacije oz. čiščenja. Morebitni vpliv silikagela na reakcijo smo tako preverili z nanosom reakcijske zmesi direktno na kolonsko kromatografijo. V zbranih frakcijah je bil samo **1a**, kar smo potrdili z NMR analizo. V preostanku na koloni, ki smo ga eluirali z bolj polarnim topilom, je prevladoval H₂O₂ (Slika 12).

Zadnja možnost je bila, da pretvorba poteče med koncentriranjem reakcijske zmesi na rotavaporju. Tako smo v tretjem eksperimentu reakcijsko zmes po 10 urah mešanja pri sobni temperaturi skoncentrirali pod znižanim tlakom, MeCN smo odstranili v 30 minutah in vzeli vzorec za NMR analizo, ki je pokazala 98 % pretvorbo **1a** v DHP **2a** (Slika 12).



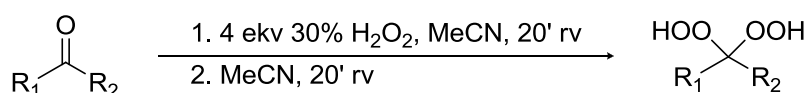
Slika 12: shematski prikaz pridobljenih spojin po reakciji v enakih pogojih, a z različno izolacijo

5.2 VPLIV RAZLIČNIH REAKCIJSKIH POGOJEV

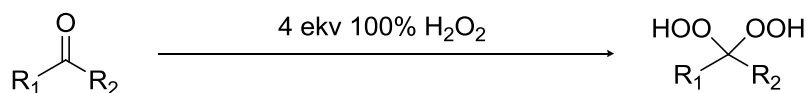
Pri nadaljnjem proučevanju poteka reakcije smo želeli pojasniti vpliv koncentracije vodikovega peroksida, saj je iz zgoraj navedenih rezultatov jasno, da reakcija poteče med koncentriranjem reakcijske zmesi. Acetonitril tvori z vodo azeotropno zmes in zato po odparevanju reakcijske zmesi v bučki ostane skoraj 100 % H₂O₂. Vpliv koncentracije H₂O₂ na reakcijo smo preverili na dveh modelnih spojinah z različno reaktivnostjo – 2-metilcikloheksanonu **1b** in 2-nonanonu **3a**.

Izvedli smo 4 vzporedne reakcije pod različnimi pogoji, ki so opisani v eksperimentalnem delu: s 100 % H₂O₂ pripravljenim "in-situ" (pogoji 1), s predhodno pripravljenim 100 % H₂O₂ (pogoji 2), s 30 % H₂O₂ (pogoji 3) in s 30 % H₂O₂ raztopljenim v 1 ml acetonitrila (pogoji 4) (Shema 6).

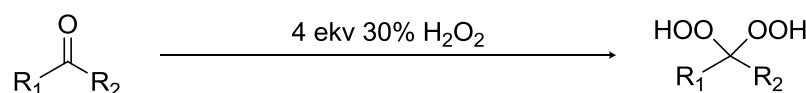
POGOJI 1:



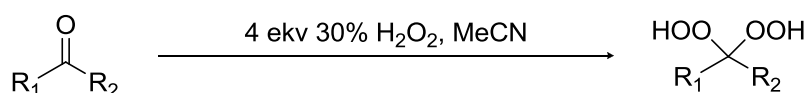
POGOJI 2:



POGOJI 3:



POGOJI 4:

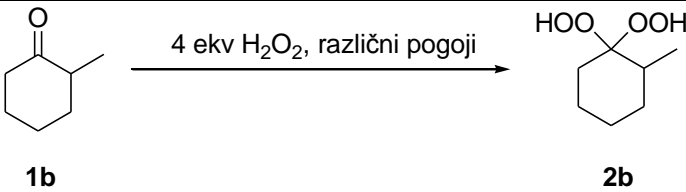


Shema 6: shematski prikaz različnih uporabljenih pogojev za pretvorbo ketona v DHP

Pri obeh modelnih spojinah se je pokazalo, da je šla reakcija slabše v samo 30 % H₂O₂ (pogoji 3) ali 30 % H₂O₂ raztopljenem v MeCN (pogoji 4). Dobro reaktiven keton **1b** je po daljšem času kljub vsemu reagiral s H₂O₂ (Tabela II), a je bila pretvorba manj kot 50 %,

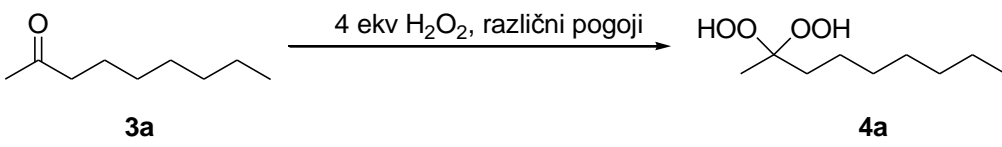
pri slabo reaktivnem ketonu **3a** pa je tudi po 24 urah v reakcijski zmesi ostala samo izhodna spojina (Tabela III). Primerjava reakcij **1b** s 100 % H₂O₂ po 45 minutah je pokazala, da reakcija z "in situ" pripravljenim 100 % H₂O₂ (pogoji 1) daje višjo pretvorbo v DHP **2b** kot reakcija s predhodno pripravljenim 100 % H₂O₂ (pogoji 2). Tudi po 24 urah reakcije je pretvorba pri pogojih 1 boljša, poleg tega pa je reakcija selektivna, medtem ko v pogojih 2 nastanejo še drugi produkti poleg **2b**. Podobno reaktivnost smo opazili tudi pri manj reaktivnem ketonu **3a**. Peroksidacija je potekla selektivno le s 100 % H₂O₂, pri čemer je pri "in situ" metodi nastalo nekaj več DHP **4a**.

Tabela II: vpliv različnih reakcijskih pogojev na pretvorbo 2-metilcikloheksanona **1b** v DHP **2b**

				% pretvorbe v DHP ^a	
pogoji reakcije				t=45 min	t=24h
pogoji	konc. H ₂ O ₂	topilo	rotavapor		
1	30 %	MeCN	2x20'	82	96
2	100 %	/	/	59	75 ^b
3	30 %	/	/	0	42
4	30 %	MeCN	/	0	11

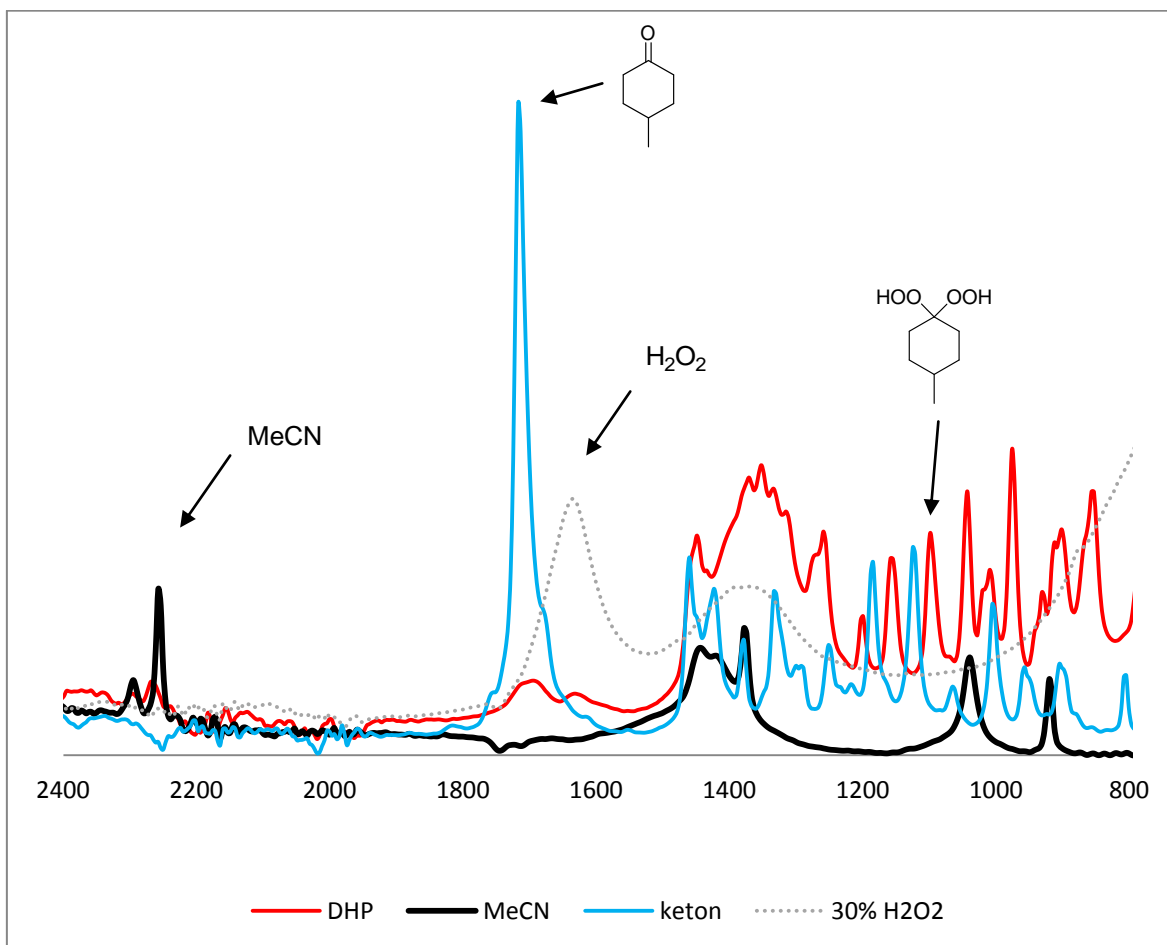
^a Pretvorbo v **2b** smo določili iz NMR spektra surove reakcijske zmesi glede na **1b**. ^b Iz NMR spektra je razvidno, da nastane več peroksidnih produktov.

Tabela III: vpliv različnih reakcijskih pogojev na pretvorbo nonan-2-ona **3a** v DHP **4a**

				% pretvorbe v DHP ^a	
pogoji reakcije				t=45 min	t=24h
pogoji	konc. H ₂ O ₂	topilo	rotavapor		
1	30 %	MeCN	2x20'	4	74
2	100 %	/	/	5	68
3	30 %	/	/	0	0
4	30 %	MeCN	/	0	0

^a Pretvorbo v **4a** smo določili iz NMR spektra surove reakcijske zmesi glede na **3a**.

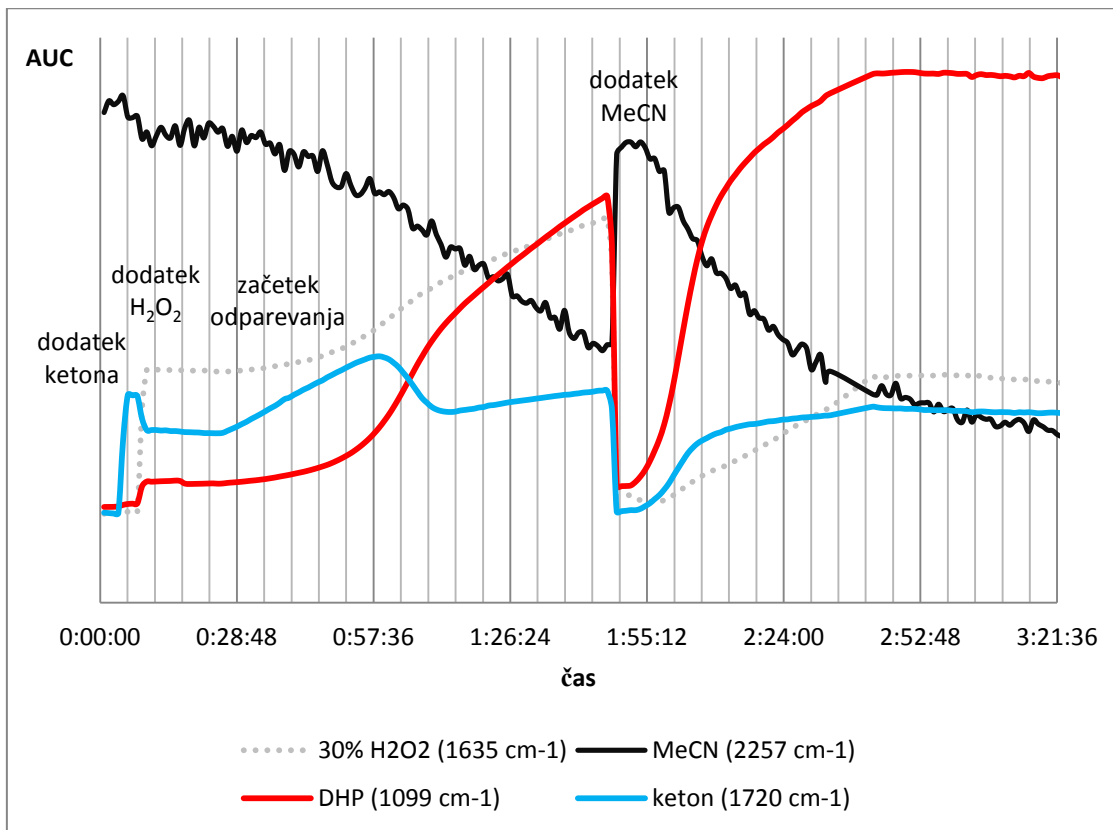
Za nedvoumno potrditev predvidevanj o vplivu koncentriranja reakcijske zmesi na aktivacijo ketona smo dogajanje med reakcijo opazovali z ATR-IR sondo na aparaturi EasyMax. Pred poskusom smo posneli IR spektre za reagente (**1a** in 30 % H₂O₂), topilo (MeCN) in produkt (DHP **2a**). Iz spektrov smo za vsako spojino določili signal s karakteristično valovno dolžino za časovno sledenje poteka reakcije. Karakteristične valovne dolžine so: 2257 cm⁻¹ za MeCN, 1720 cm⁻¹ za keton **1a**, 1635 cm⁻¹ za 30 % H₂O₂ in 1099 cm⁻¹ za DHP **2a** (Slika 13).



Slika 13: referenčni IR spektri MeCN, ketona **1a**, 30 % H₂O₂ in DHP **2a** z označenimi karakterističnimi signali za posamezno spojino

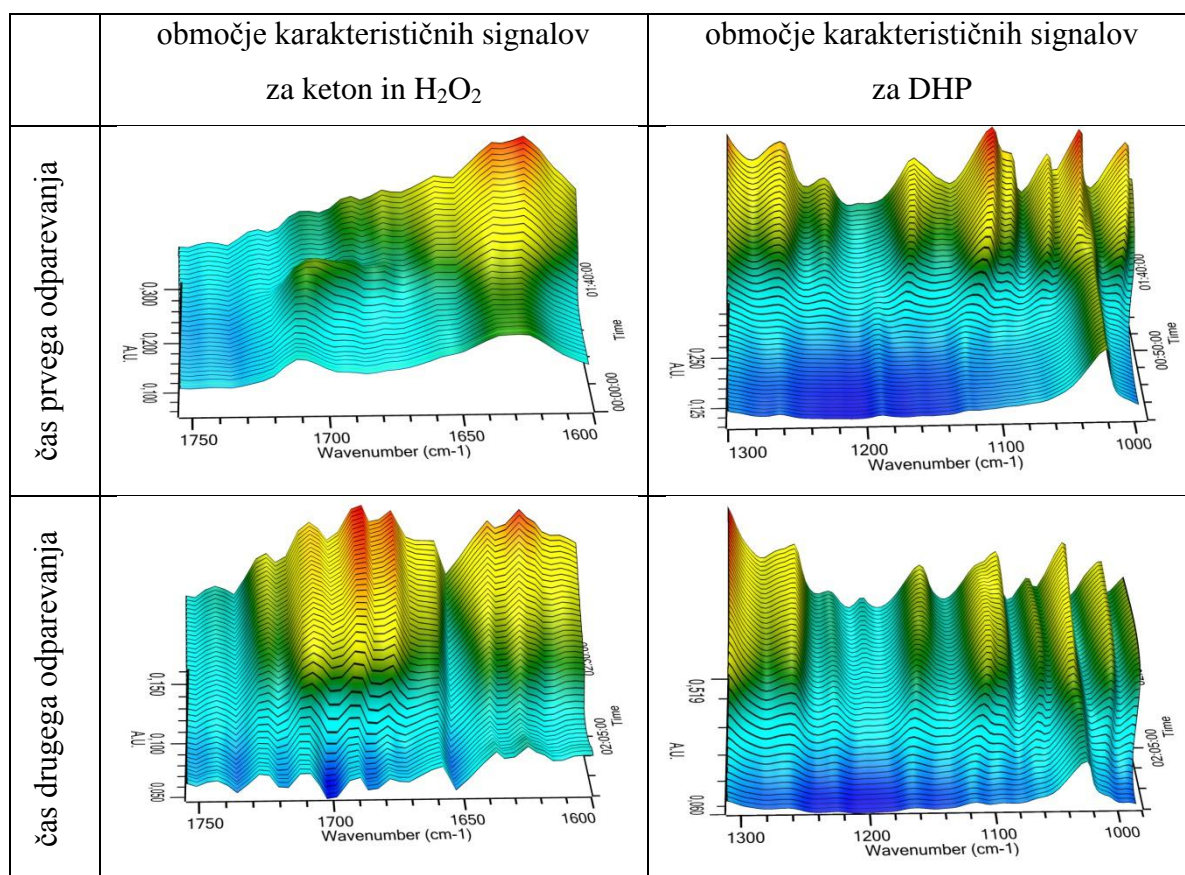
Poskus, s katerim smo sledili časovni potek reakcije, smo naredili tako, da smo v 2,5 ml MeCN raztopili 1 mmol ketona **1a**, po 4 minutah smo dodali 4 ekv 30 % H₂O₂ in mešali 15 minut. Ker v tem času ni prišlo do sprememb v IR spektru, smo začeli s počasnim odparevanjem topila pod znižanim tlakom, pri čemer smo nastavili temperaturo reaktorja na 20 °C. Po eni uri in 34 minutah smo spet dodali 2,5 ml MeCN in nadaljevali s hitrim

odparevanjem (Slika 14). Reakcijo smo ustavili po 5 urah in 10 minutah (7 ur od začetka reakcije), potem ko že več kot 4 ure ni bilo sprememb v IR spektru reakcijske zmesi.



Slika 14: časovni potek spreminjanja intenzitet karakterističnih signalov za vse komponente reakcije

Analiza intenzitete karakterističnih signalov tekom reakcije je potrdila predvidevanja, da je za reakcijo med ketonom in H₂O₂ potrebno koncentriranje reakcijske zmesi. Na začetku se je zaradi odparevanja MeCN zviševala koncentracija reagentov, kar je povzročilo večanje intenzitet njihovih signalov. Po približno 30 minutah odparevanja smo opazili, da se je po prvotnem naraščanju intenziteta signala za izhodno spojino **1a** začela manjšati. Hkrati se je začela povečevati strmina intenzitete karakterističnega signala za DHP. Po ponovnem dodatku MeCN se je intenziteta signalov za reagente in produkte reakcije močno znižala, za MeCN pa zvišala. Ko smo nadaljevali z odparevanjem, se je pojavil isti trend. Intenziteta signala za DHP je močno narasla zaradi koncentriranja reakcijske zmesi in sprotne nastajanja produkta. Signal za izhodno spojino je naraščal počasneje, saj je bila njegova rast le posledica koncentriranja (Slika 14 in Slika 15). Po treh urah je bila reakcija končana.



Slika 15: Tridimenzionalni prikaz naraščanja intenzitet signalov med prvim in drugim odparevanjem v območju valovnih dolžin, ki so karakteristične za vse komponente reakcije

5.3 VPLIV TOPILA NA PRETVORBO KETONA V DIHIDROPEROKSID

Ko smo ugotovili, da je odparevanje MeCN ključnega pomena za začetek reakcije, smo raziskali, kako vpliva dodano topilo na reakcijo. Naredili smo serijo reakcij v različnih topilih: nepolarna (heksan, toluen, Et₂O), polarna aprotična (DKM, EtOAc, MeCN, DME) in polarna protična (EtOH, MeOH, TFE). Predvidevali smo, da je poleg polarnosti in protičnosti topila pomembna tudi tvorba azeotropne zmesi z vodo. Primerjalne reakcije smo izvedli tako, da smo 1 ekv izhodne spojine raztopili v 10 ml topila (heksan, toluen, Et₂O, DKM, EtOAc, MeCN, DME, EtOH, MeOH ali TFE) in dodali 4 ekv 30 % H₂O₂. Odparevali smo 20 minut, dodali novih 10 ml istega topila in odparevali še nadaljnjih 20 minut. Vzorec smo vzeli po 2. odparevanju in po 24 urah ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra. Kot modelna substrata smo uporabili dobro reaktiven 4-metilcikloheksanon **1a** (Tabela IV) in manj reaktiven nonan-2-on **3a** (Tabela V).

Tabela IV: vpliv topila na pretvorbo 4-metilcikloheksanona **1a** v DHP **2a**

topilo (delež vode v azeotropu) ^b		% pretvorbe (% DHP) ^a	
		t=45 min	t=24h
polarna protična	EtOH (4)	80 (25)	100 (100)
	MeOH (0)	85 (24)	93 (88)
	TFE (/)	84 (5)	90 (74)
polarna aprotična	EtOAc (8,5)	88 (65)	95 (95)
	MeCN (15,2)	93 (82)	94 (94)
	DME (/)	89 (0)	93 (93)
	DKM (1)	84 (35)	95 (90)
nepolarna	Et ₂ O (1,3)	89 (53)	90 (90)
	heksan (5,6)	88 (59)	93 (87)
	toluen (19)	85 (30)	93 (87)

^a Pretvorbo smo določili iz NMR spektra reakcijske zmesi glede na izhodno spojino. % DHP je delež DHP v NMR spektru surove reakcijske zmesi.

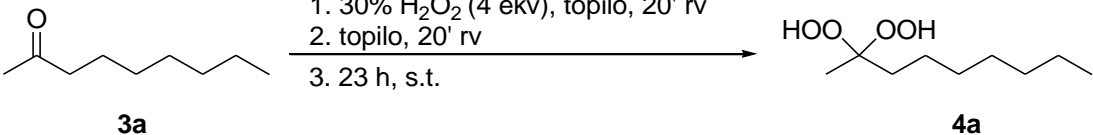
^b Podani so masni deleži vode v plinski fazi pri temperaturi vrelišča (36, 37), za DME in TFE ni podatka.

Pretvorbo smo določili na osnovi razlike signalov za metilno skupino v NMR spektru, medtem ko so signali za OOH skupino pokazali na nastanek DHP. Večje razlike smo opazili po 45 minutah reakcije, kjer smo v NMR spektru opazili nastanek vmesnega produkta. Iz signalov za metilno skupino je razvidno, da se je keton v določeni meri že pretvoril, vendar je bilo več signalov za OOH skupino, iz česar smo sklepali na neselektivno reakcijo ali nastanek vmesnega produkta. Iz rezultatov lahko razberemo, da se **1a** pretvori v 80–93 % deležu že po 45 minutah ne glede na protičnost in polarnost topil (Tabela IV), vendar pa je razlika v selektivnosti reakcije. V nepolarnih topilih nastane 30–59 % DHP **2a**, v polarnih protičnih manj (5–25 %), pri polarnih aprotičnih topilih pa je interval širši. Po 45 minutah največ DHP (82 %) nastane v MeCN, najmanj pa v DME, kjer v NMR spektru sploh ni bilo signala za **2a**. Iz tega lahko sklepamo, da je topilo pri dobro reaktivnih ketonih odločilno predvsem za selektivnost reakcije za DHP (Tabela IV). Po

daljšem reakcijskem času pa topilo nima več odločilne vloge, saj nastane več kot 87 % DHP v vseh topilih razen TFE (74 % **2a**).

Pretvorbo slabše reaktivnega ketona **3a** v DHP **4a** smo določili na podlagi zmanjševanja ketonskega signala za CH₂ skupino na mestu 3, pri čemer se je signal za OOH sorazmerno povečeval. Razmerje med ketonom in DHP smo preračunali iz razmerja med signalom za metilne skupine in CH₂ skupino, ki je karakteristična za keton. Pri ketonu **3a** je reakcija občutno počasnejša, saj je po 45 minutah prišlo do manjše pretvorbe izhodne spojine v le treh topilih (27 % v MeCN in EtOAc, 12 % v EtOH). V nasprotju z dobro reaktivnim ketonom **1a** ima topilo odločilen vpliv na končno pretvorbo **3a** v DHP **4a**. Po 24 urah pride pri štirih topilih (MeOH, EtOH, EtOAc, MeCN) do več kot 60 % pretvorbe, ostala topila pa so dala 10 % ali manj. Ugotovili smo, da tvorba azeotropne zmesi topila z vodo ni zadostni pogoj za potek reakcije, saj v nepolarnih topilih reakcija ne poteka ali pa poteka zelo počasi, kljub temu da topilo (heksan, toluen) tvori azeotrop z vodo (Tabela V).

Tabela V: vpliv topila na pretvorbo nonan-2-ona **3a** v DHP **4a**

			
topilo (delež vode v azeotropu) ^b		% pretvorbe (% DHP) ^a	
		t=45 min	t=24h
polarna protična	EtOH (4)	12 (0)	83 (83)
	MeOH (0)	0 (0)	62 (62)
	TFE (/)	0 (0)	21 (10)
polarna aprotična	EtOAc (8,5)	27 (14)	88 (88)
	MeCN (15,2)	27 (18)	26 (74)
	DME (/)	0 (0)	31 (10)
	DKM (1)	0 (0)	8 (2)
nepolarna	Et ₂ O (1,3)	0 (0)	7 (3)
	heksan (5,6)	0 (0)	0 (0)
	toluen (19)	0 (0)	0 (0)

^a Pretvorbo smo določili iz NMR spektra reakcijske zmesi glede na izhodno spojino. % DHP je delež DHP v NMR spektru surove reakcijske zmesi.

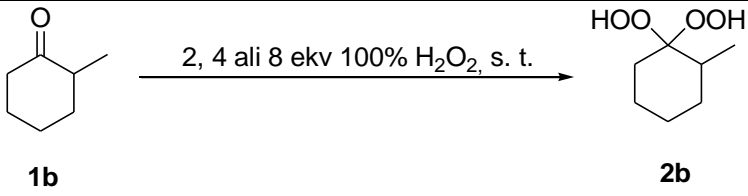
^b Podani so masni deleži vode v plinski fazi pri temperaturi vrelišča (36, 37), za DME in TFE ni podatka.

5.4 VPLIV PRESEŽKA VODIKOVEGA PEROKSIDA NA PRETVORBO

Vpliv na pretvorbo ketona v DHP ima tudi količina reagenta (H_2O_2), ki vstopa v reakcijo. Izvedli smo tri vzporedne reakcije po enakem postopku, le z različno količino 30 % H_2O_2 (2, 4 ali 8 ekv glede na izhodno spojino). Vzorec smo vzeli po 45 minutah in po 24 urah od začetka reakcije ter pretvorbo določili na podlagi NMR spektra. Modelni spojini sta bili dobro reaktiven keton **1b** in slabo reaktiven keton **3a**.

Pri dobro reaktivnem ketonu **1b** opazimo razliko v hitrosti reakcije med ekvimolarno količino (2 ekv) in presežkom H_2O_2 (4 ali 8 ekv). Na reakcijo nima bistvenega vpliva kolikšen presežek H_2O_2 dodamo v reakcijo, saj dajeta 2- in 4-kratni presežek približno enako stopnjo pretvorbe tako po 45 minutah kot po 24 urah. V reakciji s presežnim H_2O_2 je pretvorba v DHP hitra, saj že po 45 minutah doseže približno 94 % oz. 96 % nastanek DHP. Pri ekvimolarnem dodatku H_2O_2 reakcija ne poteče do konca. Zanimivo je, da po 24 urah v reakcijski zmesi opazimo manj DHP kot po 45 minutah, kar je posledica velike reaktivnosti nastalih različnih peroksidnih spojin in posledično nizke stabilnosti (Tabela VI).

Tabela VI: vpliv presežka H_2O_2 na pretvorbo 2-metilcikloheksanona **1b** v DHP **2b**

		
1b		2b
ekvivalenca H_2O_2	% pretvorbe (% DHP) ^a	
	t=45 min	t=24h
2	44 (3)	45 (30)
4	97 (94)	93 (85)
8	99 (96)	91 (87)

^a Pretvorbo smo določili iz NMR spektra reakcijske zmesi glede na izhodno spojino. % DHP je delež DHP v NMR spektru surove reakcijske zmesi.

Nonan-2-on **3a** je slabše reaktiven, zato gre pretvorba v DHP počasneje in ima posledično nanjo presežek dodanega H_2O_2 večji vpliv kot na **1b**. Z višanjem količine dodanega H_2O_2 se večja hitrost reakcije in stopnja pretvorbe ketona v DHP, kar je še posebej dobro opazno po daljšem času reakcije (24 ur). Pri reakciji z 2 ekv H_2O_2 je nastalo 29 %, s 4 ekv 65 %, z

8 ekv pa kar 83 % DHP **4a** (Tabela VII). Pri manj reaktivnih ketonih kljub dodatku nekajkratnih presežkov ne opazimo tvorbe stranskih produktov.

Tabela VII: vpliv presežka H₂O₂ na pretvorbo nonan-2-ona **3a** v DHP **4a**

ekvivalenca H ₂ O ₂	% pretvorbe (% DHP) ^a	
	t=45 min	t=24h
2	4 (1)	29 (29)
4	4 (6)	65 (65)
8	11 (11)	83 (83)

^a Pretvorbo smo določili iz NMR spektra reakcijske zmesi glede na izhodno spojino. % DHP je delež DHP v NMR spektru surove reakcijske zmesi.

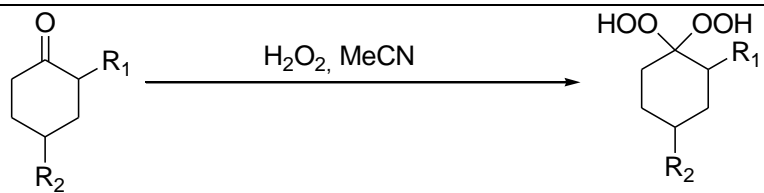
5.5 SINTEZA DIHIDROPEROKSIDOV IZ RAZLIČNIH KETONOV

Ko smo proučili pogoje za reakcijo, smo se lotili še preparativnih metod za različne DHP. Pripravili smo dva splošna postopka glede na hlapnost izhodnega ketona. Nehlapne ketone smo raztopili v acetonitrilu, dodali H₂O₂ in potem topilo dvakrat odparili na rotavaporju (Shema 6, Pogoji 1). Hlapne ketone pa smo zmešali s 100 % H₂O₂, ki smo ga pripravili tik pred reakcijo, da bi preprečili izhlapevanje izhodne spojine med rotavapiranjem (Shema 6, Pogoji 2). Pri slabše reaktivnih ketonih smo za pospešitev reakcije dodali več ekvivalentov H₂O₂ (8 do 16 ekv) ali/in jih tekom reakcije segrevali na 40 °C. Nastale DHP smo čistili s kolonsko kromatografijo razen pri tistih produktih, ki so na silikagelu razpadli ali pa so skoraj netopni v organskih topilih in zmesih topil.

Tekoča cikloheksanonska substrata **1a** in **1b** smo pretvorili pod pogoji 2. S kratkim časom reakcije smo zagotovili boljšo selektivnost reakcije in po kolonski kromatografiji izolirali DHP **2a** in **2b** s 75 % oz. 80 % izkoristkom (Tabela VIII). Pri trdnem 4-*terc*-butilcikloheksanonu **1c** smo reakcijo pospešili s segrevanjem na 40 °C in podaljšali čas reakcije na 5 ur. Občutno slabše reaktiven je bil 4-fenilcikloheksanon **1d**, kjer smo pri reakciji s 4 ekv H₂O₂ pri sobni temperaturi tudi po 13 dneh v reakcijski zmesi imeli le 49 % DHP **2d** (določeno iz NMR spektra). Še slabši izkoristek je imela 20-urna reakcija pri 60 °C (16 % DHP). Pri še višji reakcijski temperaturi (100 °C) je bila pretvorba sicer 100 %, vendar pa je prišlo pri tem do razpada DHP. Kot boljša rešitev za pospešitev tvorbe

DHP se je izkazalo povečanje količine H₂O₂ na 8 ekv, kar je pri reakciji pri sobni temperaturi po 4 dneh dalo 100 % pretvorbo. S še dodatnim segrevanjem na 40 °C smo popolno pretvorbo **1d** v DHP **2d** dosegli v 24 urah ter po izolaciji s kolonsko kromatografijo dobili kvantitativni izkoristek.

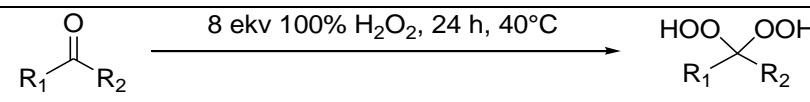
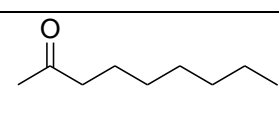
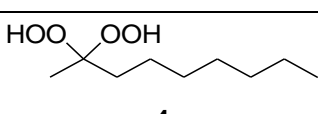
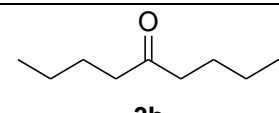
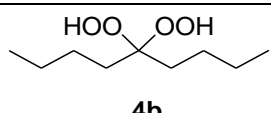
Tabela VIII: pretvorba različno substituiranih cikloheksanonov v ustrezni DHP

								
izhodna spojina	R ₁	R ₂	Ekv. H ₂ O ₂	pogoji	čas reakcije	T	produkt	izkoristek ^a
1a	H	Me	4	2	2 h	s. t.	2a	75 %
1b	Me	H	4	2	1,5 h	s. t.	2b	80 %
1c	H	t-Bu	4	1	5 h	40 °C	2c	89 %
1d	H	Ph	8	1	24 h	40 °C	2d	99 %

^a izkoristek čistega izoliranega DHP.

Alifatski ketoni so slabše reaktivni in ugotovili smo, da se je nonan-2-on **3a** pri reakciji z 8 ekv H₂O₂ po enem dnevu 87 % pretvoril v DHP **4a** (Tabela IX). S segrevanjem reakcijske zmesi na 40 °C smo še izboljšali pretvorbo in izolirali **4a** z 82 % izkoristkom. Izkoristek reakcije s **3b** pod podobnimi pogoji je bil še malo višji. Podoben izkoristek izoliranih DHP **4a** in **4b** je pokazal, da položaj karbnilne skupine ne vpliva pomembno na reaktivnost.


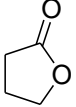
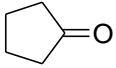
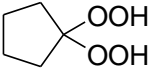
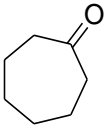
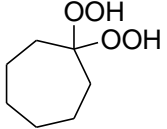
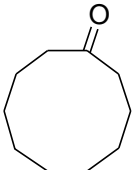
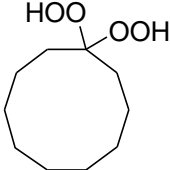
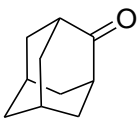
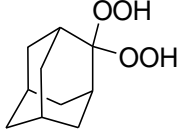
Tabela IX: pretvorba položajnih izomerov nonanona v ustrezni DHP

		
izhodna spojina	produkt	izkoristek ^a
 <p>3a</p>	 <p>4a</p>	82 %
 <p>3b</p>	 <p>4b</p>	86 %

^a izkoristek čistega izoliranega DHP.

Pri reakciji nasičenih cikličnih ketonov z H_2O_2 sta konkurenčni reakciji Bayer-Villigerjeva oksidacija in adicija na karbonilno skupino. Nasičeni ciklični ketoni z večjo napetostjo med vezmi (štiri- in petčlenski obroč) so bolj reaktivni za Bayer-Villigerjevo oksidacijo in posledično povečanje obroča, ki zmanjša napetost med vezmi. Med proučevanimi substrati je Bayer-Villigerjeva oksidacija potekala le na ciklobutanonu **5a** (Tabela X). Ciklični ketoni s pet ali več ogljikovimi atomi so po aktivaciji s 100 % H_2O_2 reagirali do ustreznih DHP. Ciklopentanon **5b** se je popolnoma pretvoril v **7b** s 4 ekv H_2O_2 pri sobni temperaturi. Pri reakciji adicije H_2O_2 na karbonilno skupino se reaktivnost cikličnih ketonov z večjim številom ogljikovih atomov približuje reaktivnosti acikličnih ketonov. Pretvorbo cikloheptanona **5c** smo hoteli izboljšati z višjo temperaturo reakcije (40 °C), vendar smo kljub temu dobili le 68 % izkoristek. Pri ciklodekanonu **5d** smo povečali ekvivalent H_2O_2 (8 ekv) ter dobili višji izkoristek (78 %) kot pri cikloheptanonu **7c**. Pri teh pogojih se je adamantanon **5e** 95 % pretvoril v DHP **7e**.

Tabela X: peroksidacija cikličnih ketonov v ustrezni DHP oz. lakton

izhodna spojina	ekv. H_2O_2	pogoji	čas reakcije	T(reakcije)	produkt	izkoristek ^a
 5a	4	2	2 h	s. t.	 6	48 %
 5b	4	2	24 h	s. t.	 7b	94 %
 5c	4	2	24 h	40 °C	 7c	68 %
 5d	8	1	24 h	40 °C	 7d	78 %
 5e	8	1	24 h	40 °C	 7e	95 %

^a izkoristek čistega izoliranega DHP.

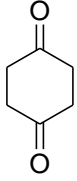
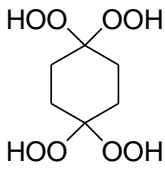
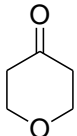
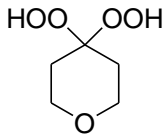
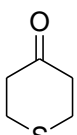
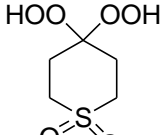
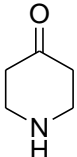
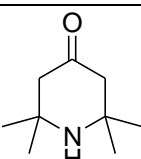
Izmed cikličnih ketonov z dodatno funkcionalno skupino je bil najbolj reaktiven cikloheksa-1,4-dion **8a**. Reakcijo med ketonom **8a** in H_2O_2 smo izvajali pri sobni temperaturi, saj je pri povišani nastalo veliko stranskih produktov. Potrebni je bilo 8 ekv H_2O_2 (po 4 ekv na vsako karbnilno skupino), da je po 24 urah selektivno nastal DHP z dvema paroma peroksidnih skupin **9a**, medtem ko signala za **8a** ni bilo več v NMR spektru surove reakcijske zmesi. Pri uporabi 6 ekv je bilo za popolno pretvorbo ketona **8a** v DHP **9a** potrebno počakati 4 dni (glede na NMR analizo). Strukturo trdnega produkta **9a** smo določili s pomočjo primerjave NMR, IR spektrov sorodnih derivatov in HR-MS analize, saj ga zaradi nestabilnosti ni bilo mogoče izolirati.

Manj reaktiven je bil piran-4-on **8b**, saj je pri reakciji s 4 ekv H_2O_2 pri sobni temperaturi še po 13 dneh dosegel le 85 % pretvorbo v DHP **9b**. Pri zaostitvi pogojev (8 ekv H_2O_2 , 40 °C) je bila po 24 urah pretvorba v DHP **9b** zelo dobra (95 % na podlagi NMR spektroskopske analize), nastal pa je le en produkt. Njegovo strukturo (DHP **9b**) smo določili iz surove reakcijske zmesi tako kot za **9a**, saj je med izolacijskim postopkom (ekstrakcijo v vodi ali pri poskusu čiščenja s kolonsko kromatografijo na silikagelu) razpadel v izhodni keton **8b**.

Pri reakciji tiopiran-4-ona **8c** z H_2O_2 je ne glede na pogoje nastala zmes hidroperoksidnih produktov. Pretvorba v en sam produkt ni potekla niti pri reakciji ketona **8c** s 16 ekv H_2O_2 na 40 °C po 72 urah. Iz NMR spektra surove reakcijske zmesi je razvidno, da se je **8c** pretvoril kvantitativno, nastal pa je DHP produkt, oksidacija pa je potekla tudi na žveplovem atomu. V reakcijski zmesi je bil prisoten še vmesni produkt z eno hidroksi in eno hidroperoksidno skupino ter sulfonsko skupino **9c'**. Strukturo **9c'** smo potrdili s HR-MS analizo produkta, ki je nastal pri reakciji tiopirana **8c** z manjšim ekvivalentom H_2O_2 (4 ekv) v milejših pogojih (20 h, s. t.). Produktov **9c** in **9c'** zaradi nestabilnosti nismo uspeli izolirati v čisti obliki.

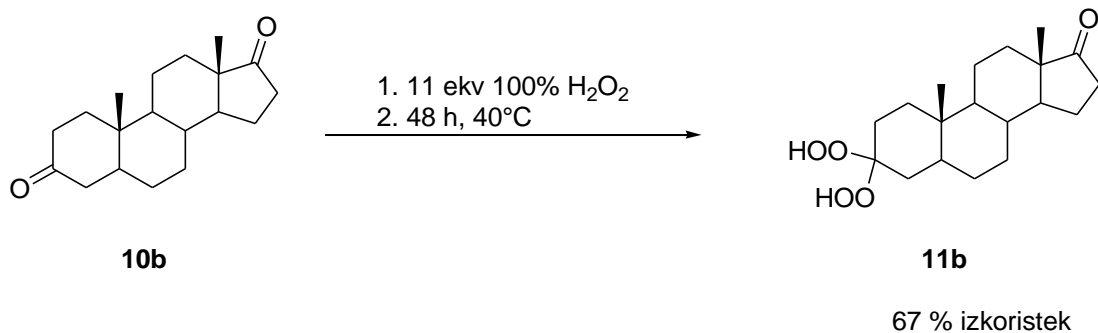
Piperidin-4-on **8d**, ki smo ga pripravili z nevtralizacijo iz njegove kloridne soli, in njegov derivat **8e** sta bila nereaktivna pri reakciji s H_2O_2 . Ne glede na uporabljene pogoje (4, 8 ali 16 ekv H_2O_2 pri s. t. ali 40 °C) je tudi po enem tednu v reakcijski zmesi ostala le nezreagirana izhodna spojina.

Tabela XI: peroksidacija cikloheksadiona **8a** in nasičenih heterocikličnih ketonov **8b-e**

izhodna spojina	ekv. H ₂ O ₂	metoda	čas reakcije	T	produkt	pretvorba ^a
 <p>8a</p>	8	1	24 h	s. t.	 <p>9a</p>	100 %
 <p>8b</p>	8	1	24 h	40 °C	 <p>9b</p>	95 %
 <p>8c</p>	16	1	72 h	40 °C	 <p>9c</p>	38 % ^b
 <p>8d</p>	16	1	7 dni	40 °C	/	0 %
 <p>8e</p>	16	1	7 dni	40 °C	/	0 %

^a Pretvorbo smo izračunali na podlagi NMR analize surovega reakcijskega produkta, strukturo produkta pa s primerjavo spektrov (NMR, IR) s sorodnimi produkti ter s HR-MS. ^b Poleg DHP **9c** je bil v reakcijski zmesi prisoten tudi vmesni produkt **9c'** (62 %).

Nazadnje smo v DHP pretvorili še dva ketona s steroidnim skeletom, ki sta zaradi svoje velikosti slabše reaktivna in smo zato reakcijo izvajali pri 40 °C in večjim prebitkom H₂O₂. Pri uporabi 9 ekv H₂O₂ smo po 24 urah na 40 °C in potem še 6 dneh pri sobni temperaturi dosegli 100 % pretvorbo holestanona **10a** v DHP **11a**, ki smo ga identificirali na podlagi primerjave z literaturnimi NMR spektroskopskimi podatki. Pri androstan-3,17-dionu **10b** je peroksidacija selektivno potekla le na karbonilni skupini na mestu 3. Pri reakciji z 11 ekv H₂O₂ smo po dveh dneh izolirali DHP **11b** s 67 % izkoristkom (Shema 7).



Shema 7: sinteza steroidnega DHP **11b**

6 SKLEP

Z uporabo ATR-IR sonde za sledenje reakcije smo pokazali, da keton reagira z vodikovim peroksidom tudi brez dodanega katalizatorja in nastane selektivno dihidroperoksid. Reakcija ne poteče med mešanjem v topilu, temveč med koncentriranjem reakcijske zmesi na rotavaporju, kjer se reakcija sproži, ko je koncentracija H_2O_2 dovolj velika. Najboljši izkoristek dosežemo pri uporabi 100 % H_2O_2 pridobljenega tekom reakcije iz 30 % H_2O_2 z azeotropnim odparevanjem vode s pomočjo drugega topila. Ugotovili smo, da je MeCN najbolj primerno topilo. V primeru hlapnih ketonov je zaradi zmanjšanja izgub optimalen predhodno pripravljen 100 % H_2O_2 . Pri slabo reaktivnih ketonih je potrebno uporabiti polarno topilo, pri dobro reaktivnih pa po daljšem času v vseh preskušanih topilih pride do pretvorbe ketona v DHP. Povečevanje presežka H_2O_2 iz 4 na 8 ekv močno izboljša pretvorbo pri slabo reaktivnih ketonih. Iz različnih izhodnih ketonov in 100 % H_2O_2 smo sintetizirali DHP ter jih izolirali s kolonsko kromatografijo. Izkoristki izoliranih produktov so bili nad 75 % (razen pri cikloheptanonu **5c**, kjer je izkoristek 68 %). Reaktivnost substituiranih cikloheksanonov **1a-1d** je odvisna od substituenta. Položaj karbnilne skupine v nonanonu (**3a** in **3b**) ne vpliva bistveno na izkoristek reakcije. Ciklični ketoni **5b-5e** so se pretvorili v ustrezen DHP, pri ciklobutanonu **5a** pa je prišlo do Bayer-Villigerjeve reakcije do laktona **6**. Izmed sintetiziranih DHP sta nova produkta **2d** in **7d**, ki smo ju identificirali z ^1H in ^{13}C NMR, IR, HR-MS in elementno analizo. Iz šestčlenskih cikličnih ketonov z dodatno funkcionalno skupino smo po novi sintezni poti pridobili manj stabilne DHP **9a-9c**, ki smo jih identificirali na osnovi ^1H in ^{13}C NMR, IR in HR-MS spektroskopskih podatkov ter njihove primerjave s sorodnimi produkti. Cikloheksa-1,4-dion **8a** in piran-4-on **8b** sta se pretvorila v ustrezen DHP, ki ju zaradi nestabilnosti nismo uspeli izolirati. DHP **9a** je nov produkt. Tiopiran-4-on **8c** je reagiral tako na ketonski skupini kot tudi na obročnem žveplovi atomu, nastala pa je zmes hidroperoksidnih produktov **9c** in **9c'**. Piperidin-4-on **8d** in njegov derivat **8e** sta nereaktivna pri reakciji s 100 % H_2O_2 . V dihidroperoksidi smo pretvorili tudi slabše reaktivne ketone s steroidnim skeletom **10a** in **10b**. Na osnovi naših rezultatov lahko povzamemo, da smo razvili enostavno in poceni metodo za sintezo dihidroperoksidov, ki daje visoke izkoristke, ne zahteva uporabe dragih kovinskih katalizatorjev, ampak za sintezo potrebujemo le poceni in komercialno dostopne ketone, 30 % vodno raztopino vodikovega peroksida ter klasična topila.

7 LITERATURA

1. World malaria report 2011. WHO, 2011, ISBN 9789241564403, http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf. Dostop: 18. 6. 2012.
2. Rosenthal J P. Antimalarial chemotherapy: mechanism of action, resistance, and new directions in drug discovery, Humana Press, New Jersey, 2001: 3-41, 191-201, 255-263.
3. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. WHO, 2010, ISBN 9789241500470, http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf. Dostop: 6. 6. 2012.
4. Krishna S, Bustamante L, Haynes R K, Staines H M. Artemisinins: their growing importance in medicine. Trends Pharm Sci 2008; 29 (10): 520-527.
5. Golenser J, Waknine J H, Krugliak M, Hunt N H, Grau G E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. Int J Parasitol 2006; 36: 1427-1441.
6. Iskra J: Antimalarial peroxides: from artemisin to synthetic peroxides. V: New Developments in Medicinal Chemistry: Ortega M P in Gil I C (ured.), Nova Publishers, New York, 2009: 131-170.
7. Ospenica D M, Šolaja B A. Antimalarial peroxides. J Serb Chem Soc 2009; 74 (11): 1155-1193.
8. Slack R D, Jacobine A M, Posner G H. Antimalarial peroxides: advances in drug discovery and design. Med Chem Commun 2012; 3: 281-297.
9. Keiser J, Utzinger J, Tanner M, Dong Y, Vennerstrom J L. The synthetic peroxide OZ78 is effective against *Echinostoma caproni* and *fasciola hepatica*. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 1193-1197.
10. O'Neill P M et al. Identification of 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins. Angew Chem Int Ed 2010; 49: 5693-5697.
11. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, Flower R J. Rang and Dale's pharmacology, Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia, 2010: 702 – 709.
12. O'Neill P M, Barton V E, Ward S A. The molecular mechanism of action of artemisinin - the debate continues. Molecules 2010; 15: 1705-1721.

13. Bousejra-El Garah F, He-Long Wong M, Amewu R K, Muangnoicharoen S, Maggs J L, Stigliani J L, Park B K, Chadwick J, Ward S A, O'Neill P M. 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. *J Med Chem* 2011; 54: 6443-6455.
14. Tang Y, Dong Y, Wang X, Sriraghavan K, Wood J K, Vennestrom J L. Dispiro-1,2,4-trioxane analogues of a prototype dispiro-1,2,4-trioxolane: mechanistic comparators for artemisinin in the context of reaction pathways with iron(II). *J Org Chem* 2005; 70: 5103-5110.
15. Li J, Zhou B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules* 2010; 15: 1378-1397.
16. Meshnick S R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1655-1660.
17. Kumura N, Furukawa H, Onyango A N, Izumi M, Nakajima S, Ito H, Hatano T, Kim H S, Wataya Y, Baba N. Different behaviour of artemisinin and tetraoxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chem Phys Lipids* 2009; 160: 114-120.
18. Kumar N, Singh R, Rawat D S. Tetraoxanes: synthetic and medicinal chemistry perspective. *Med Res Rev* 2010; 31(3): 1-30.
19. Žmitek 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: 1479–1484.
20. Iskra J, Bonnet-Delpon D, Begue J P. One-pot synthesis of non-symmetric tetraoxanes with H₂O₂/MTO/fluorous alcohol system. *Tetrahedron Lett* 2003; 44: 6309-6312.
21. Žmitek K, Zupan M, Iskra J. α -Substituted organic peroxides: synthetic strategies for a biologically important class of *gem*-dihydroperoxide and perketal derivatives. *Org Biomol Chem* 2007; 5: 3895-3908.
22. Bunge A, Hamann H J, Liebscher J. A simple, efficient and versatile synthesis of primary *gem*-dihydroperoxides from aldehydes and hydrogen peroxide. *Tetrahedron Lett* 2009; 50: 524-526.
23. 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 Lett* 2011; 52: 107-111.

24. Tada N, Cui L, Okubo H, Miura T, Itoh A. An Efficient Synthesis of *gem*-Dihydroperoxides with Molecular Oxygen and Anthracene under Light Irradiation. *Adv Synth Catal* 2010; 352: 2383-2386.
25. 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 Chem* 2011; 13: 2347-2350.
26. Kharasch M S, Sosnovsky G. Structure of peroxides derived from cyclohexanone and hydrogen peroxide. *J Org Chem* 1958; 23: 1322-1326.
27. Ghorai P, Dussault P H. Mild and efficient Re(VII)-catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides. *Org Lett* 2008; 10: 4577-4579.
28. Žmitek K, Stavber S, Zupan M, Iskra J. The effect of iodine on the peroxidation of carbonyl compounds, *J Org Chem* 2007, 72, 6534-6540.
29. Das B, Krishnaiah M, Veeranjanyulu B, Ravikanth B. A simple and efficient synthesis of *gem*-dihydroperoxides from ketones using aqueous hydrogen peroxide and catalytic ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Lett* 2007; 48; 6286-6289.
30. Azarifar D, Khosravi K, Soleimanei F. Mild and efficient strontium chloride hexahydrate-catalyzed conversion of ketones and aldehydes into corresponding *gem*-dihydroperoxides by aqueous H₂O₂. *Molecules* 2010; 15: 1433-1441.
31. 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. *Org Lett* 2009; 11: 1615-1618.
32. Tada N, Cui L, Okubo H, Miura T, Itoh A. A facile catalyst-free synthesis of *gem*-dihydroperoxides with aqueous hydrogen peroxide. *Chem Commun* 2010; 46: 1772-1774.
33. Žmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. Iodine as a catalyst for efficient conversion of ketones to *gem*-dihydroperoxide by aqueous hydrogen peroxide. *Org Lett* 2006; 8: 2491-2494.
34. Mitsudome T, Noujima A, Mizugaki T, Jitsukawa K, Kaneda K. Supported gold nanoparticles as a reusable catalyst for synthesis of lactones from diols using molecular oxygen as an oxidant under mild conditions. *Green Chem* 2009; 11: 793-797.

35. Terent'ev A O, Platonov M M, Ogibin Y N, Nikishin G I. Convenient synthesis of geminal bishydroperoxides by the reaction of ketones with hydrogen peroxide. *Synth Commun* 2007; 37: 1281-1287.
36. Smallwood I M. *Handbook of organic solvent properties*, Butterworth-Heinemann, London, 1996: 302-303.
37. Weast R C. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 55. izdaja, CRC Press, Cleaveland, 1974 – 1975.