

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ 7-
ΥΔΡΟΞΥ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΑΝ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΕΣ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ**

ΑΚΟΥΜΙΑΝΑΚΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2000/2001

Περίληψη

Στη διατριβή αυτή περιγράφεται ο σχεδιασμός και η συνθετική μεθοδολογία η οποία επιλέχθηκε για την παρασκευή φθοριζόντων δεικτών ψευδαργύρου.

Οι συγκεκριμένες ενώσεις αποτελούνται από χηλικά σύμπλοκα των οποίων η δομή έχει επεκταθεί με την προσθήκη χρωμοφόρων, συγκεκριμένα 7-υποκατεστημένων κουμαρινών. Η επιλογή του χηλικού μέρους των δεικτών έγινε λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως η συγγένειά τους για το ιόν και η εκλεκτικότητά τους σε σχέση με άλλα μέταλλα.

Εκτός από το σχεδιασμό και τη σύνθεση των φθοριζόντων δεικτών ψευδαργύρου, η παρούσα διατριβή περιλαμβάνει και μετρήσεις φθορισμού των ενώσεων που συντέθηκαν έτσι ώστε να μελετηθεί η συναρμογή τους με τον ψευδάργυρο και οι επαγόμενες αλλαγές στα φάσματα φθορισμού τους, καθώς και η εκλεκτικότητά τους ως προς τον ψευδάργυρο σε σχέση με άλλα ιόντα, όπως είναι το ασβέστιο.

Astract

This describes the design and the synthetic methodology followed, aiming at the preparation of a series of fluorescent zic ion concentration indicators.

The synthesized compounds consist of a chromophore part, which is a 7-substituted coumarin, and a zinc ion-binding group, selected from a pool of known zinc selective chelators.

The potential utility of these compounds as fluorescent zinc ion indicators is tested via a number of fluorescent spectral studies on their free and ion bound forms.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.Γενικά για τον ψευδάργυρο.....	1
Β.Βιολογικός ρόλος	4
Γ. Φθορισμός	13
Δ. Μέθοδοι προσδιορισμού ψευδαργύρου	17
Δ1. Φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου	18

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
--	----

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α. Σύνθεση του Δείκτη 1	30
Β. Σύνθεση του Δείκτη 2	36
Γ. Σύνθεση του Δείκτη 3	43
Δ. Μελέτες φθορισμού	56

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	63
--------------------------	----

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
-------------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81
--------------------	----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ	84
--------------------------	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Γενικά για τον Ψευδάργυρο

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για όλες τις μορφές ζωής, από τους μικροοργανισμούς μέχρι τον άνθρωπο.^[1] Αν και η ιστορία του αρχίζει από τα προϊστορικά χρόνια, στην Ευρώπη παράγεται εμπορικά για πρώτη φορά στα μέσα του 18^{ου} αιώνα.^[2] Μόλις το 1869 ο *Raulin* διαπίστωσε ότι ο Ψευδάργυρος ήταν απαραίτητος για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus niger*.^[1] Η αναγκαιότητα του για τα ζώα έγινε γνωστή ύστερα από πολλά χρόνια, το 1934 για τα ποντίκια και το 1955 για τους χοίρους ενώ το 1962 διαπιστώθηκε από τον *Prasad* ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο στοιχείο και για τον άνθρωπο.

Ο ψευδάργυρος ανήκει στην ομάδα IIB του Περιοδικού Πίνακα των Στοιχείων με ηλεκτρονική διαμόρφωση $[Ar] 3d^{10} 4s^2$.^[2] Λόγω της διαμόρφωσης αυτής (d^{10}) απαντάται σε διαλύματα μόνο σε μια βαθμίδα οξείδωσης Zn^{2+} .^[2] Είναι διαμαγνητικό στοιχείο γεγονός που σημαίνει ότι δεν λειτουργεί ως αποσβέστης φθορισμού. Τα σταθερά ισότοπα του ψευδαργύρου είναι τα: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn και ^{70}Zn . Από αυτά μόνο ο ^{67}Zn έχει πυρηνικό σπιν διαφορετικό του μηδενός ($I=5/2$) επιτρέποντας τη μελέτη του με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).^[2]

Πολλά βιολογικά συστήματα (ένζυμα, πρωτεΐνες) χρησιμοποιούν στοιχεία της πρώτης σειράς μεταπτώσεως και της ομάδας IIB του Περιοδικού Πίνακα προκειμένου να εκτελέσουν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Ο ψευδάργυρος αν και αποτελεί μόλις το 27^ο κατά σειρά στοιχείο σε αφθονία στο φλοιό της γης, είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο από τα παραπάνω μέταλλα στη Βιολογία.^[3]

Για να κατανοήσει κανείς καλύτερα τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με τα βιολογικά συστήματα είναι σημαντικό να αναφερθούν ορισμένες βασικές χημικές ιδιότητες του ψευδαργύρου.

Στην κύρια οξειδωτική βαθμίδα 2^+ με την οποία απαντάται στα διαλύματα ο ψευδάργυρος δρα σαν οξύ κατά Lewis. Το ιόν του ψευδαργύρου Zn^{2+} θεωρείται κατά *Pearson* ότι ανήκει μάλλον στα σκληρά οξέα και επομένως σχηματίζει κατά προτίμηση σταθερά σύμπλοκα με ligands που έχουν δότες ηλεκτρονίων άτομα οξυγόνου, αζώτου και θείου (σκληρές βάσεις).^[1]

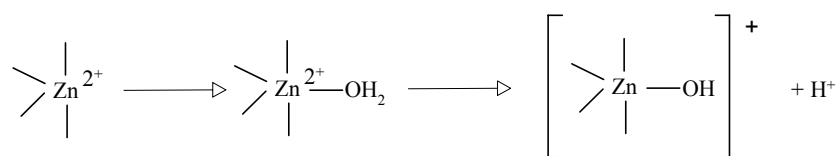
Ο ψευδάργυρος σε αντίθεση με το σίδηρο, το χαλκό και το μαγνήσιο λόγω της ηλεκτρονικής του διαμόρφωσης δεν παίρνει μέρος στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα. Ο *Williams* υποστήριξε ότι η απουσία οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων του ψευδαργύρου είναι ζωτικής σημασίας γιατί τον καθιστά ικανό να λειτουργήσει καταλυτικά σε συστήματα ευαίσθητα σε οξειδώσεις από δραστικές οξυγονούχες ρίζες. Οι ρίζες αυτές παράγονται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις *in vivo*. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί ο ψευδάργυρος έχει επιλεγεί από τη φύση να βρίσκεται σε ορισμένα ένζυμα του μεταβολισμού του RNA και του DNA και δεν έχει επιλεγεί ο σίδηρος, το μαγνήσιο ή άλλα μεταβατικά στοιχεία.^[1]

Η αλλαγή αριθμού συναρμογής στα σύμπλοκα του Zn^{2+} *in vivo* είναι εύκολη. Έτσι σύμπλοκα με αριθμό συναρμογής 4, 5 και 6 και με γεωμετρίες που ποικίλλουν από το κανονικό ή παραμορφωμένο τετράεδρο μέχρι την τριγωνική διπυραμίδα, την τετραγωνική πυραμίδα και το κανονικό οκτάεδρο, είναι αυτά που συναντώνται πιο συχνά στις βιολογικές λειτουργίες του ψευδαργύρου.^[1]

Η ανταλλαγή των ligands στα σύμπλοκα του ψευδαργύρου είναι συνήθως ταχεία, γεγονός που τα χαρακτηρίζει ως ευκίνητα (*labile*) σύμπλοκα.^[1]

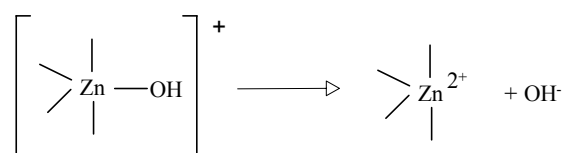
Το γεωμετρικό σχήμα των συμπλόκων του ψευδαργύρου *in vivo* είναι αρκετά παραμορφωμένο. Η παραμόρφωση αυτή δημιουργεί διάφορες τάσεις στο υπόστρωμα οι οποίες πιστεύεται ότι κινητοποιούν την αντίδραση διάσπασης του υποστρώματος κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής κατάλυσης.^[1]

Μια άλλη σημαντική ιδιότητα του ψευδαργύρου είναι ο επαμφοτερίζων χαρακτήρας του σε τιμές του pH κοντά στο 7.0. Έτσι κατά τη συναρμογή του με μόρια νερού μπορεί να δώσει τόσο ιόντα OH^- όσο και ιόντα H^+ σύμφωνα με το



σχήμα:

Στη συνέχεια το σύμπλοκο ιόν διασπάται και δίνει υδροξύλια.



Τέλος σε αντίθεση με άλλα μέταλλα (Fe, Cu, Hg) συμπεριλαμβανομένων και αυτών της ομάδας ΙΙΒ, ο ψευδάργυρος δεν εμφανίζει τοξικότητα.^[1]

B. Βιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο συμπράγοντα για την πραγματοποίηση ενός μεγάλου αριθμού κυτταρικών λειτουργιών. Ο συνδυασμός, του πρωταρχικού ρόλου που διαδραματίζει σε διαδικασίες όπως η ενζυμική δραστηριότητα, η έκφραση γονιδίων, η ανάπτυξη των κυττάρων και η νευροδιαβίβαση και των μοναδικών χημικών ιδιοτήτων του πιστοποιεί το γεγονός ότι ο ψευδάργυρος αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό ιόν στο μεταβολισμό των κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα σε μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από τριακόσια ένζυμα, τα οποία εκπροσωπούν περισσότερες από πενήντα διαφορετικές κατηγορίες, που χρησιμοποιούν ψευδάργυρο για τη λειτουργία τους. Αντίθετα έχει βρεθεί μικρός αριθμός ενζύμων σιδήρου και ακόμα μικρότερος αριθμός ενζύμων τα οποία περιέχουν χαλκό, μολυβδαίνιο, σελήνιο, νικέλιο, μαγγάνιο ή κοβάλτιο. Στα ένζυμα αυτά του ψευδαργύρου περιλαμβάνονται οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λιπάσες, ισομεράσες και λιγάσες.

Ο ψευδάργυρος διαδραματίζει τρεις κυρίως ρόλους στα ένζυμα του: καταλυτικό, συνεργιστικό(cocatalytic) ή δομικό. Ο καταλυτικός ρόλος υποδεικνύει ότι το μέταλλο συμμετέχει απ'ευθείας στην ενζυμική κατάλυση. Αν το μέταλλο απομακρυνθεί με τη χρήση κάποιου συμπλοκοποιητή τότε το αποένζυμο (ένζυμο χωρίς μέταλλο) γίνεται ανενεργό. Η εξαφάνιση της δραστηριότητας του ενζύμου μπορεί να αποδοθεί αρχικά στο γεγονός ότι ο ψευδάργυρος παίρνει μέρος απ'ευθείας στην καταλυτική διαδικασία. Αυτό βέβαια δεν αποκλείει την πιθανότητα μιας επαγόμενης δομικής αλλαγής (τοπική αλλαγή ή αλλαγή των ligands) μετά την απομάκρυνση του μετάλλου η οποία θα οδηγήσει στην απενεργοποίηση του ενζύμου.

Ο συνεργιστικός ρόλος υποδεικνύει ότι η παρουσία ενός δευτέρου ατόμου ψευδαργύρου σε μια ενεργή περιοχή του ενζύμου, η οποία περιέχει ήδη ένα άτομο ψευδαργύρου, συνεπάγεται κατά περίπτωση αύξηση ή μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου αυτού. Τα εν λόγω ένζυμα μπορούν όμως να λειτουργήσουν και απουσία του δευτέρου ατόμου ψευδαργύρου.

Τέλος ο δομικός ρόλος του ψευδαργύρου αφορά στην δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης μέσω σταθεροποίησης της τεταρτοταγούς της δομής. Ο ψευδάργυρος συναρμόζεται με άτομα O, N και S, δημιουργεί δεσμούς-γέφυρες και σταθεροποιεί με τον τρόπο αυτό τη δομή των πρωτεϊνών. Οι δεσμοί αυτοί, σε αντίθεση με τους δισουλφιδικούς δεσμούς (-S-S-) ομάδων της κυστεΐνης, που είναι και αυτοί δεσμοί

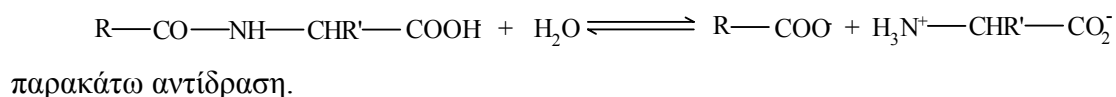
γέφυρες, είναι σταθεροί σε αναγωγικές συνθήκες. Κατά ανάλογο τρόπο ο ψευδάργυρος σταθεροποιεί και τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών.

Τα μόνα γνωστά έως τώρα ένζυμα τα οποία περιέχουν καταλυτικά αλλά και δομικά ιόντα ψευδαργύρου είναι οι αλκοολικές αφυδρογονάσεις.

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ενζύμων και περιλαμβάνουν ακόμα και κρυσταλλογραφία ακτίνων-X για κάποια από αυτά, προκύπτει ότι ο ψευδάργυρος προσδένεται κυρίως στα άτομα αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου ιστιδίνης καθώς και στα άτομα θείου κυστεΐνης στα ένζυμα όπου διαδραματίζει καταλυτικό ή δομικό ρόλο.

Στα κυριότερα ένζυμα ψευδαργύρου τα οποία έχουν μελετηθεί ανήκουν **οι Καρβοξυπεπτιδάσες** (υδρολυτικά ένζυμα), **η Καρβονική ανυδράση** (λύαση) και **οι Αλκοολικές αφυδρογονάσεις** (οξειδοαναγωγάσες).

Οι καρβοξυπεπτιδάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν ψευδάργυρο και έχουν ως αποστολή την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών σύμφωνα με την



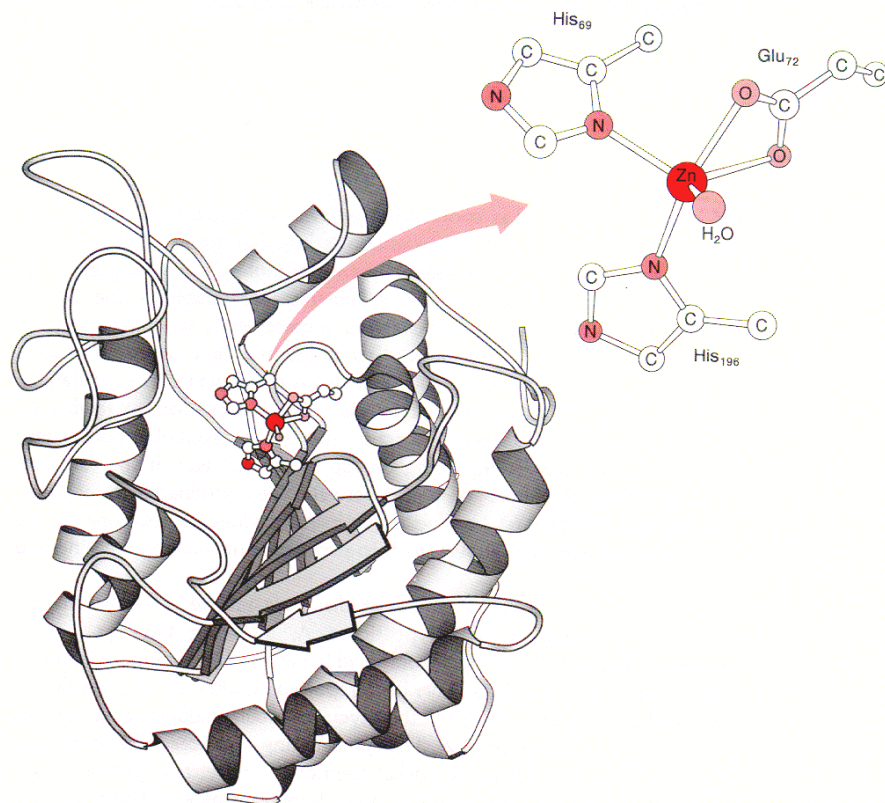
όπου R' = αρωματική ή αλειφατική διακλαδισμένη ομάδα

Οι καρβοξυπεπτιδάσες απαντώνται σε διάφορα είδη αλλά εμφανίζουν γενικά παρόμοιες ιδιότητες. Ο πιο συνηθισμένος τύπος καρβοξυπεπτιδάσης αποτελείται από 307 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 34.600Da και στο μόριο του υπάρχει ένα άτομο ψευδαργύρου. Ο τύπος αυτός ανήκει στην καρβοξυπεπτιδάση A.

Η δραστηριότητα του ενζύμου αναπτύσσεται στον ακραίο πεπτιδικό δεσμό των πεπτιδίων ή των πρωτεϊνών που αποτελούν το υπόστρωμα και κατά προτίμηση όταν στο άτομο άνθρακα του C-τελικού αμινοξέος υπάρχει αρωματική ομάδα.

Στις καρβοξυπεπτιδάσες τύπου B στο άτομο άνθρακα του C-τελικού αμινοξέος υπάρχει αλειφατική διακλαδισμένη ομάδα. Και τα δύο είδη καρβοξυπεπτιδασών A και B συντίθενται στο πάγκρεας και συχνά απομονώνονται από αυτή την πηγή.

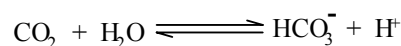
Η δομή της καρβοξυπεπτιδάσης A από πάγκρεας βοδινού καθώς και ο τρόπος συναρμογής του ψευδαργύρου στο ενεργό της κέντρο δίνονται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 1: Δομή της Καρβοξυπεπτιδάσης Α από πάγκρεας βοδινού

Όπως φαίνεται από το σχήμα το άτομο του ψευδαργύρου συναρμόζεται με δύο ομάδες ιστιδίνης και συγκεκριμένα την His-69 και την His-196, με την διδοντική καρβοξυλική ομάδα του Glu-72 και με ένα μόριο νερού ή υδροξυλίου ανάλογα με την τιμή του pH. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει δομή παραμορφωμένου τετραέδρου. Η συναρμογή του υποστρώματος με τον ψευδάργυρο γίνεται με αντικατάσταση του νερού ή του υδροξυλίου.

Η καρβονική ανυδράση ή ανθρακική ανυδράση είναι ένα ένζυμο του ψευδαργύρου το οποίο καταλύει την εφυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα, δηλαδή

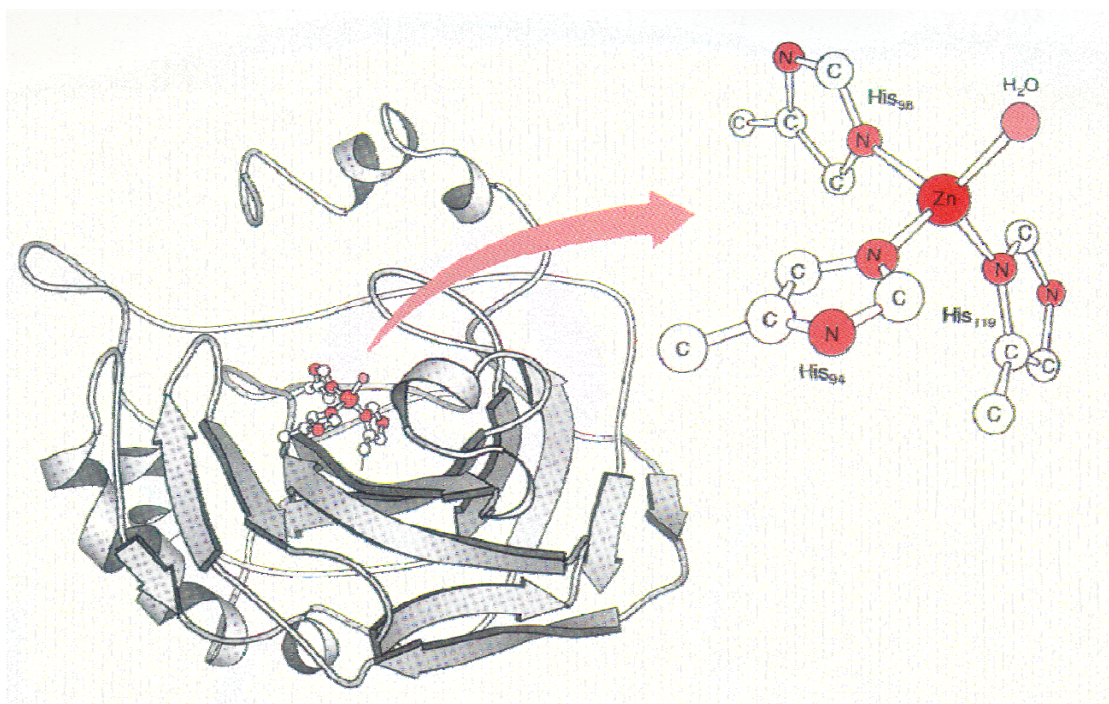


την αντίδραση

Η καρβονική ανυδράση βρίσκεται στον άνθρωπο, στα ζώα, στα φυτά και σε ορισμένους μικροοργανισμούς. Η πιο καλά μελετημένη μορφή της καρβονικής ανυδράσης είναι αυτή που βρίσκεται στον άνθρωπο και στα βοοειδή και είναι γνωστή ως καρβονική ανυδράση Β (CAB). Η καρβονική ανυδράση Β αποτελείται από 260

ομάδες αμινοξέων και έχει μοριακό βάρος 30.000Da. Σε ένα γραμμομόριο καρβονικής ανυδράσης αντιστοιχεί ένα γραμμοάτομο ψευδαργύρου.

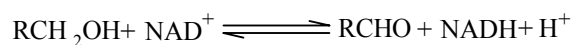
Η δομή της καρβονικής ανυδράσης καθώς και ο τρόπος συναρμογής του ψευδαργύρου δίνονται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 2: Δομή της Καρβονικής Ανυδράσης

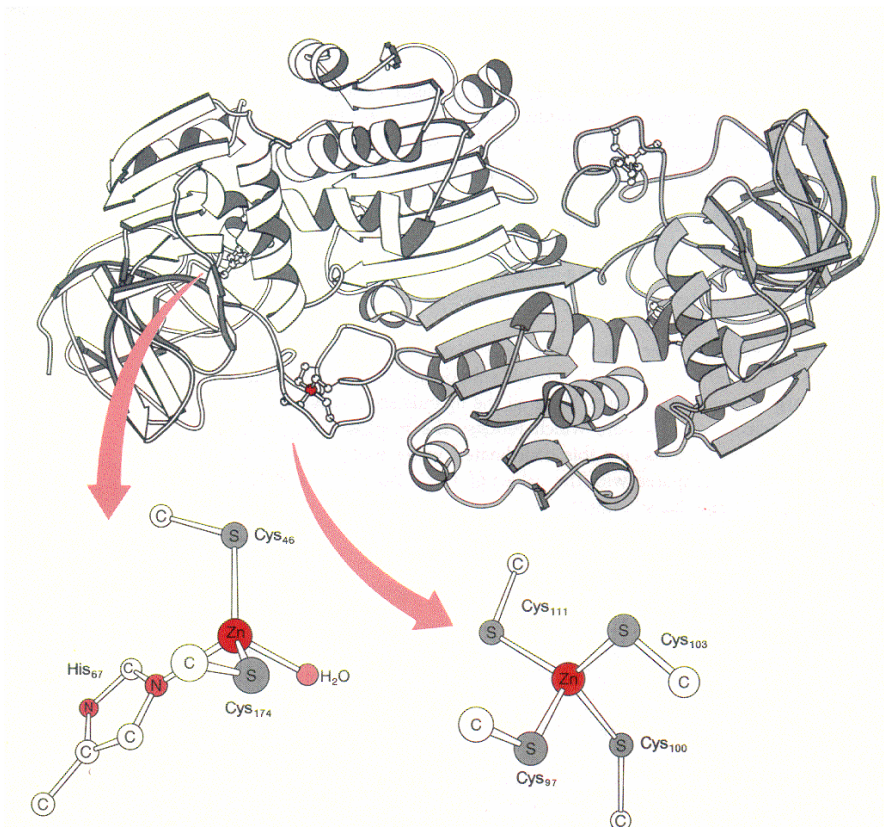
Από το σχήμα προκύπτει ότι ο ψευδάργυρος συναρμόζεται με τρεις ομάδες ιστιδίνης και συγκεκριμένα την His-119, την His-96 και την His-94 καθώς και με ένα μόριο νερού ή υδροξυλίου ανάλογα με την τιμή του pH. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει δομή παραμορφωμένου τετραέδρου.

Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν την εξαρτώμενη από το NAD^+ οξείδωση των πρωτοταγών αλκοολών προς αλδεύδες σύμφωνα με την αντίδραση.



Από τα ένζυμα αυτά πιο πολύ έχει μελετηθεί η αφυδρογονάση από συκώτι αλόγου η οποία αποτελείται από δύο πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές υπομονάδες (M.B=40kDa), κάθε μια από τις οποίες περιέχει δύο άτομα ψευδαργύρου σε διαφορετικές περιοχές.

Η δομή του διμερούς της αλκοολικής αφυδρογονάσης από συκώτι αλόγου καθώς και οι περιοχές όπου βρίσκονται τα άτομα ψευδαργύρου φαίνονται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 3: Δομή του διμερούς της Αλκοολικής Αφυδρογονάσης από συκώτι αλόγου

Το ένα από τα δύο ιόντα του ψευδαργύρου βρίσκεται στην υδρόφοβη καταλυτική περιοχή του ενζύμου, σε απόσταση 20Å από την επιφάνεια της πρωτεΐνης όπου δεσμεύεται επίσης το απαραίτητο συνένζυμο NAD^+ . Στο ιόν αυτό του ψευδαργύρου είναι συναρμοσμένες δύο κυστεϊνικές ομάδες η Cys-46 και η Cys-174 και μια ομάδα ιστιδίνης, η His-67. Η τέταρτη θέση συναρμογής καταλαμβάνεται από ένα μόριο νερού. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει δομή παραμορφωμένου τετραέδρου.

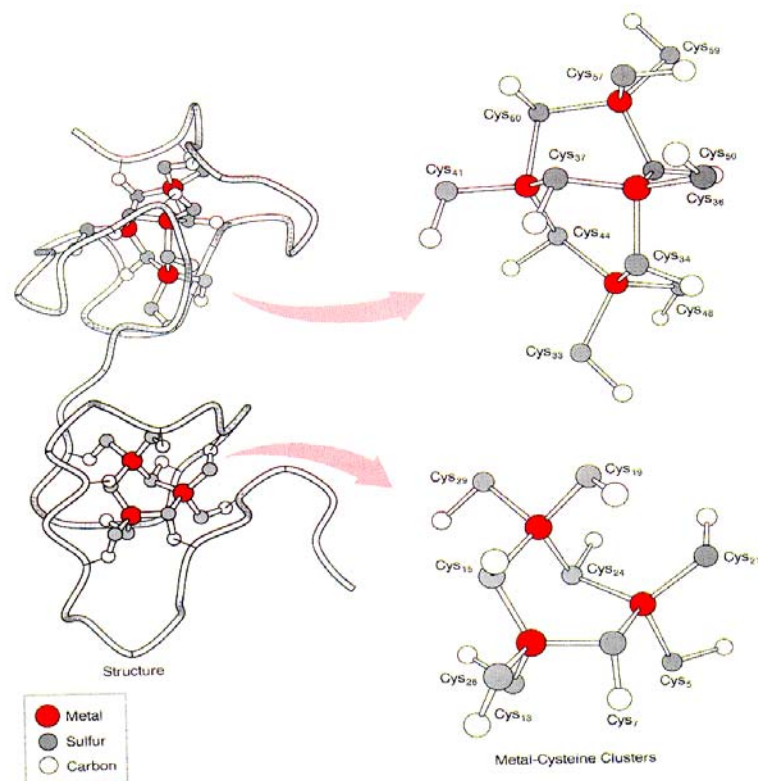
Το δεύτερο ιόν του ψευδαργύρου βρίσκεται πλησιέστερα προς την επιφάνεια του ενζύμου αλλά και αυτό δεν είναι εκτεθειμένο στον διαλύτη. Το δεύτερο ιόν συναρμόζεται με τέσσερις κυστεϊνικές ομάδες τις Cys-97, Cys-100, Cys-103 και Cys-111.

Ο ρόλος του ιόντος πιστεύεται ότι είναι δομικός, γεγονός όμως που παραμένει αδιευκρίνιστο.

Οι μεταλλοθειονίνες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών του ψευδαργύρου οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αν και δομή τους είναι γνωστή, η λειτουργία τους παραμένει αντικείμενο ερευνών. Πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο σε μεταβολικές όσο και σε τοξικολογικές διεργασίες.

Αν και το μοριακό τους βάρος είναι χαμηλό (~6700Da) το περιεχόμενο τους σε μέταλλα είναι πολύ υψηλό. Αποτελούνται από 62 (ή 61) αμινοξέα στα οποία περιλαμβάνονται 20 κυστεΐνες και περιέχουν 7 γραμμοάτομα Zn και/ή Cd ανά μόριο πρωτεΐνης. Χαρακτηριστική είναι η απουσία κυστίνης καθώς και ετεροκυκλικών και αρωματικών αμινοξέων.

Δομικές μελέτες σε φυσική μεταλλοθειονίνη προερχόμενη από θηλαστικά, έδειξε ότι τα 7 γραμμοάτομα Zn και/ή Cd και τα κυστεϊνικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης διατάσσονται με τη μορφή cluster. Συγκεκριμένα τα άτομα ψευδαργύρου στην Zn₇-μεταλλοθειονίνη έχουν οργανωθεί σε δύο διακριτά μεταλλικά clusters, το Zn₄Cys₁₁ (κατάλοιπα 33-60) και στο Zn₃Cys₉ (κατάλοιπα 5-29), με πέντε και τρία κυστεϊνικά κατάλοιπα αντίστοιχα να δρουν σαν ligands γέφυρας ανάμεσα σε δύο άτομα του μετάλλου σε κάθε cluster όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 4: Τρισδιάστατη δομή των μεταλλικών clusters της μεταλλοθειονίνης

Είναι γνωστό ότι λαμβάνει χώρα ανταλλαγή των μετάλλων ανάμεσα στα δύο clusters της πρωτεΐνης. Επίσης τα μέταλλα των clusters μπορούν να ανταλλάγουν με μέταλλα από το διάλυμα ή με μέταλλα από διαφορετικά μόρια μεταλλοθειονίνης ή και να μεταφερθούν σε ανενεργά αποένζυμα επαναφέροντας την ενζυμική τους δραστηριότητα. Η ελεύθερη μορφή της πρωτεΐνης η θειονίνη (πρωτεΐνη που δεν περιέχει μέταλλα) μπορεί να απομακρύνει ψευδάργυρο από τους παράγοντες μεταγραφής γονιδίων SP1 και TFIIIA ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό τη γενετική διαδικασία.

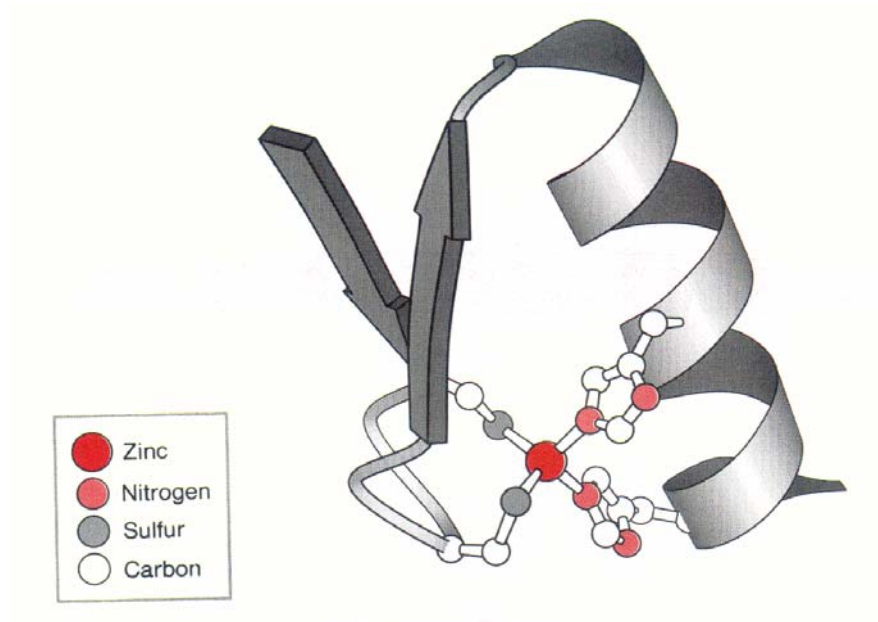
Έτσι, αν και οι λειτουργίες των μεταλλοθειονινών παραμένουν άγνωστες, έχει προταθεί ότι απομακρύνουν βαρέα μέταλλα, σταθεροποιούν μεμβράνες και ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του ψευδαργύρου και του χαλκού. Επίσης πιστεύεται ότι δρουν ως σαρωτές ριζών, ως πηγές ψευδαργύρου για ανενεργά αποένζυμα και ως ρυθμιστικά μόρια στην διαδικασία έκφρασης γονιδίων.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη δεκαετία του '70 οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο στη σύνθεση του DNA και του RNA καθώς και στη διαίρεση των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολούθησε το 1983 η ανακάλυψη του Wu, ότι ο παράγοντας μεταγραφής TFIIIA από τον *Xenopus laevis*, ο οποίος ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου 5S RNA περιέχει 2 με 3 mole ψευδαργύρου ανά mole πρωτεΐνης, η οποία συγκέντρωσε το ερευνητικό ενδιαφέρον στο ρόλο που διαδραματίζει ο ψευδάργυρος στην διαδικασία της μεταγραφής.

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια του ριβοσωματικού RNA 5S περιλαμβάνουν μια περιοχή 50 νουκλεοτιδίων στο κέντρο τους η οποία αποδείχθηκε ότι είναι κρίσιμη για την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής. Αυτή η ρυθμιστική θέση έχει ονομαστεί περιοχή εσωτερικού ελέγχου και είναι αυτή που αναγνωρίζεται από τον παράγοντα μεταγραφής TFIIIA. Ένα μόριο TFIIIA παραμένει δεσμευμένο στο γονίδιο κατά τη διάρκεια της μεταγραφής.

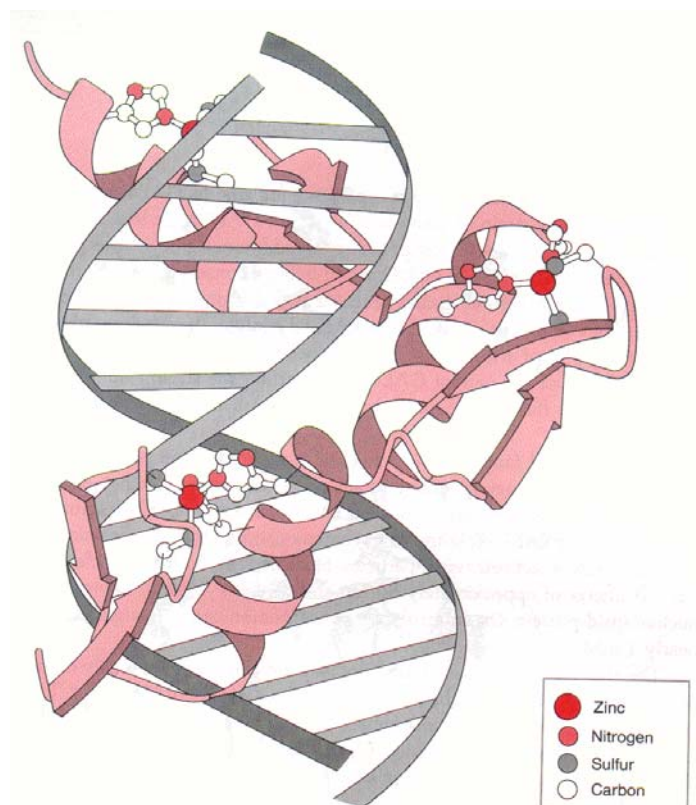
Ο παράγοντας μεταγραφής TFIIIA έχει μια αξιοσημείωτη δομή. Περιέχει εννέα όμοιες κύριες περιοχές, η κάθε μια μήκους 30 περίπου καταλοίπων. Η κάθε μια από αυτές τις περιοχές περιέχει δύο κυστεΐνες και δύο ιστιδίνες σε πανομοιότυπες θέσεις. Επιπλέον, η πρωτεΐνη περιέχει περίπου εννέα ιόντα ψευδαργύρου. Πειράματα με απορρόφηση ακτίνων-X έχουν δείξει ότι κάθε ψευδάργυρος σχηματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο, όντας συναρμοσμένος με τα δύο άτομα θείου των δύο

κυστεϊνών και τα δύο άτομα αζώτου των δύο ιστιδινών. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα των 30 καταλοίπων είναι μάλλον αναδιπλωμένη σε μια επιμήκη μεταλλο-δεσμευτική δομική περιοχή η οποία έχει το σχήμα ενός δακτύλου (**Zinc Fingers**). Η τρισδιάστατη δομή μιας τέτοιας περιοχής παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 5: Τρισδιάστατη δομή ενός Zinc Finger

Ο κάθε δάκτυλος προσδέεται σε περίπου πέντε ζεύγη βάσεων του DNA. Οι εννέα δάκτυλοι μπορούν να περιβάλλουν περίπου σαρανταπέντε ζεύγη βάσεων που είναι σχεδόν το μήκος της περιοχής εσωτερικού ελέγχου.



Σχήμα 6: Τρισδιάστατη δομή του τρόπου πρόσδεσης των Zinc Fingers στις βάσεις του DNA

Η ακολουθία αμινοξέων του παράγοντα μεταγραφής TFIIIA καθώς και η μορφή των συμπλόκων του ψευδαργύρου έχουν αποτελέσει πρότυπα μοντέλα για την εύρεση πρωτεϊνών ψευδαργύρου οι οποίες δεσμεύονται στο DNA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η μεγαλύτερη ποσότητα του Zn^{2+} είναι ισχυρά συνδεδεμένη με κυτταρικές πρωτεΐνες. Εκτός όμως από τον ισχυρά συνδεδεμένο, υπάρχουν και ενδοκυττάριας περιοχές που περιλαμβάνουν πιο χαλαρά συνδεδεμένο ψευδάργυρο (Zinc pools), ο οποίος αναφέρεται συχνά ως ελεύθερος ή διαφορετικά διαθέσιμος Zn^{2+} . Η παρουσία των περιοχών αυτών των οποίων οι συγκεντρώσεις σε ψευδάργυρο κυμαίνονται από sub-nM έως ~0.3mM, είναι σημαντική για μεγάλο αριθμό διαδικασιών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση και την ανάπτυξη των κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα μελέτες που πραγματοποιήθηκαν υποδεικνύουν ότι η παρουσία μιας περιοχής ελεύθερου ενδοκυττάρια ψευδαργύρου είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων. Η σημαντική αύξηση στον θάνατο από απόπτωση κυττάρων, από ιστούς ζώων τα οποία είχαν ανεπάρκεια ψευδαργύρου και κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία ψευδαργύρου *in vitro*, καθώς και η αναστολή του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από αποπτωτικούς παράγοντες (colchicine, dexamethasone) με προσθήκη συμπληρώματος ψευδαργύρου, *in vivo* και *in vitro*, υποδεικνύουν ότι η καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων είναι φυσιολογική λειτουργία του ψευδαργύρου.

Γ. Φθορισμός

Όπως είναι γνωστό η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με την απορρόφηση ενός φωτονίου δεν διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, συνήθως υπό μορφή θερμότητας, αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με τον γενικό όρο *φωταύγεια*.

Ειδικότερα η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως *φθορισμός*, εάν η εκπομπή γίνεται σε χρόνο $10^{-9} - 10^{-6}$ sec μετά την διέγερση. Εξαιτίας της μικρής διάρκειας του φθορισμού, η μέτρηση της εντάσεως του γίνεται κατά τη διάρκεια της διεγέρσεως και όχι μετά τον τερματισμό της.

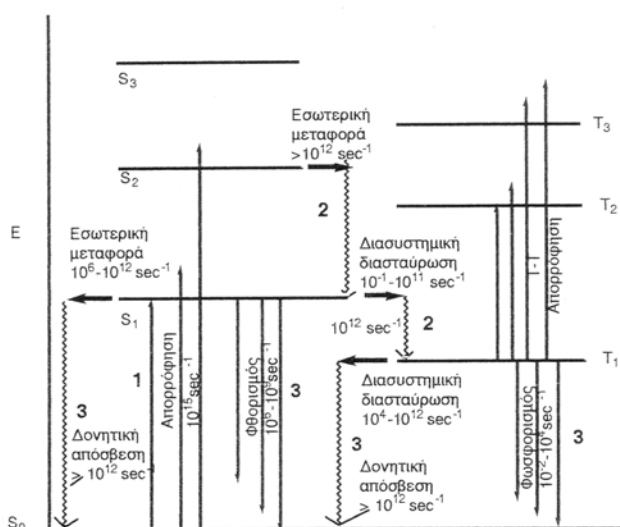
Μηχανισμός φθορισμού. Μια ηλεκτρονική στάθμη ενέργειας ενός μορίου χαρακτηρίζεται ως *απλή* (singlet) και συμβολίζεται με το S, όταν το συνολικό σπιν είναι μηδέν (αντιπαράλληλα σπιν σε όλα τα ζεύγη ηλεκτρονίων), ενώ όταν αυτό είναι διαφορετικό από το μηδέν, η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως *τριπλή* (triplet) και συμβολίζεται με το T. Μια κατάσταση T είναι φτωχότερη σε ενέργεια από την αντίστοιχη κατάσταση S. Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο συνεπάγεται μετάπτωση ηλεκτρονίων (ηλεκτρονική διέγερση) από μη δεσμικά (η) ή δεσμικά (π) τροχιακά σε αντιδεσμικά (π^*) τροχιακά, οπότε το μόριο μεταβαίνει από τη θεμελιώδη απλή κατάσταση S_0 σε διεγερμένες καταστάσεις S_1, S_2, \dots , που συνίστανται από αριθμό δονητικών σταθμών. Η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι επιτρεπόμενη, ενώ η μετάπτωση $S_0 \rightarrow T_1$ είναι απαγορευμένη, λόγω της μικρής πιθανότητας να συμβεί αναστροφή του σπιν στο διεγερμένο ηλεκτρόνιο (η μετάπτωση $S_0 \rightarrow T_1$ είναι περίπου 10^6 φορές λιγότερο πιθανή από τη μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$).

Κατά την αποδιέγερση του μορίου όλες οι δονητικές στάθμες των διεγερμένων απλών καταστάσεων καταλήγουν στη χαμηλότερη δονητική στάθμη της ηλεκτρονικής καταστάσεως τους, μέσω μιας διεργασίας που λέγεται δονητική ή θερμική επαναφορά (vibrational ή thermal relaxation), με την οποία επιτυγχάνεται σταδιακά και ταχύτατα μεταφορά θερμότητας στα μόρια του διαλύτη με τα οποία συγκρούεται το διεγερμένο μόριο. Εξαιτίας της μερικής επικάλυψης των ανώτερων διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων, επιτυγχάνεται επίσης ταχύτατα η διεργασία της *εσωτερικής μετατροπής* (internal conversion), δηλαδή της μεταπτώσεως από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη ανώτερης ηλεκτρονικής καταστάσεως στην υψηλότερη δονητική στάθμη της χαμηλότερης ηλεκτρονικής καταστάσεως, η οποία έχει την ίδια ενέργεια. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η κατάληξη όλων των απλών διεγερμένων καταστάσεων στη

χαμηλότερη στάθμη δονήσεως της διεγερμένης καταστάσεως S_1 , με έκλυση θερμότητας. Η πιο πέρα αποδιέγερση σε θερμοκρασία δωματίου από την S_1 στην S_0 πραγματοποιείται με μία από τις παρακάτω τέσσερις διεργασίες:

1. Εσωτερική μετατροπή $S_1 \rightarrow S_0 + \text{θερμότητα}$. Η διεργασία αυτή παρατηρείται σε μόρια με υψηλό βαθμό δονητικής ελευθερίας, όπως είναι τα αλειφατικά μόρια, τα οποία δεν φθορίζουν.
2. Εκπομπή φθορισμού (fluorescence) $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_\phi$ (η συχνότητα φθορισμού ν_ϕ είναι μικρότερη από τη συχνότητα της ακτινοβολίας διεγέρσεως ν_δ εξαιτίας της απώλειας, με τη μορφή θερμότητας, μέρους της ενέργειας, που απορροφήθηκε κατά τις διεργασίες της δονητικής επαναφοράς και της εσωτερικής μετατροπής). Η διεργασία αυτή παρατηρείται σε μόρια με περιορισμένο βαθμό δονητικής ελευθερίας, όπως είναι τα αρωματικά μόρια καθώς και μόρια με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, στα οποία η διεργασία της εσωτερικής μετατροπής είναι αμελητέα.
3. Ενδοσυστηματική διασταύρωση (intersystem crossing) $S_1 \rightarrow T_1$, που ακολουθείται από εκπομπή φωσφορισμού, $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\phi\text{ωσ}}$. Επειδή η T_1 έχει μικρότερη ενέργεια από την S_1 , είναι $\nu_\phi > \nu_{\phi\text{ωσ}}$.
4. Απόσβεση (quenching), μέσω συγκρούσεως με μόρια άλλων ουσιών, οπότε παρατηρείται εξασθένηση ή και πλήρης εξαφάνιση του φθορισμού.

Το σύνολο των παραπάνω διεργασιών περιγράφεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 7: Διάγραμμα Jablonski. Ενεργειακό διάγραμμα των διεγερμένων καταστάσεων πολυατομικού μορίου. Με έντονες οριζόντιες γραμμές παριστάνονται τα χαμηλότερα δονητικά επίπεδα των καταστάσεων

Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής. Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιας ουσίας λαμβάνονται δύο είδη φασμάτων, διεγέρσεως και εκπομπής. Η γραφική απεικόνιση της εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού (για σταθερό μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας φθορισμού, συνήθως το μήκος κύματος μέγιστου φθορισμού) ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως αποτελεί το *φάσμα διεγέρσεως* (excitation spectrum) της εξεταζόμενης ουσίας, ενώ η γραφική παράσταση της εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού (για σταθερό μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας διεγέρσεως) ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού αποτελεί το *φάσμα εκπομπής* (emission spectrum) της ουσίας.

Παράγοντες που επιδρούν στο φθορισμό. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση φθορισμού είναι η ύπαρξη τέτοιας δομής στο μόριο, ώστε να απορροφάται ακτινοβολία στο υπεριώδες ή το ορατό. Επιπλέον, η ακαμψία του μορίου πρέπει να είναι μεγάλη, ώστε η διαφορά μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων S_1 και S_0 να είναι τέτοια, που να αποτρέπει τη διεργασία της εσωτερικής μετατροπής σε όφελος της διεργασίας φθορισμού. Έτσι, κατά κανόνα φθορίζουν οι ενώσεις που περιέχουν αρωματικούς πυρήνες ή πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Έχει βρεθεί ότι διεγέρσεις του τύπου $\eta \rightarrow \pi^*$ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα ενδοσυστηματικής διασταύρωσης $S_1 \rightarrow T_1$ (που μειώνει το φθορισμό) από ότι διεγέρσεις του τύπου $\pi \rightarrow \pi^*$. Έτσι για παράδειγμα το βενζόλιο φθορίζει ενώ η πυριδίνη όχι. Ο φθορισμός των αρωματικών ενώσεων αυξάνεται με την επιπεδότητα του μορίου, η οποία συχνά καθορίζεται από τη μοριακή ακαμψία. Για παράδειγμα το φαινανθρένιο φθορίζει ενώ το α, β -διφαινυλ-αιθυλένιο όχι. Οι υποκαταστάτες είναι δυνατόν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό των μορίων. Για παράδειγμα ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες, όπως οι $-NH_2$, $-OH$, αυξάνουν το φθορισμό διότι διευκολύνουν τη μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_0$. Αντίθετα, ηλεκτρονιόφιλες ομάδες, όπως $-COOH$, $-NO_2$, $-N=N$ και ομάδες που περιέχουν αλογόνα μειώνουν ή και εξαλείφουν τελείως το φθορισμό. Κατά κανόνα, ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταλλοϊόντα ενισχύει το φθορισμό, με αύξηση της ακαμψίας του μορίου και ελαχιστοποίηση των εσωτερικών δονήσεων που ευνοούν την εσωτερική μετατροπή.

Εκτός από τη δομή των μορίων, στο φθορισμό επιδρούν και οι παρακάτω παράγοντες:

1. *Ξένα μόρια.* Η ύπαρξη ξένων μορίων συνεπάγεται αλλοίωση της εντάσεως φθορισμού, όταν αυτά απορροφούν την ακτινοβολία διεγέρσεως ή φθορισμού (φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου) ή αλληλεπιδρούν με το φθορίζον μόριο προκαλώντας απόσβεση ή φθορίζουν από μόνα τους.

2. *Διαλύτης*. Ο διαλύτης παίζει σημαντικό τόσο στα χαρακτηριστικά του φάσματος εκπομπής, όσο και στην ένταση φθορισμού. Ο φθορισμός αυξάνεται κατά κανόνα με την πολικότητα και το ιξώδες του διαλύτη. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά την ακτινοβολία διεγέρσεως ή φθορισμού.
3. *pH*. Πολλές ιονιζόμενες ουσίες φθορίζουν μόνο υπό τη μία ιονική μορφή τους και γι' αυτό το pH επηρεάζει έντονα το φθορισμό τους. Για παράδειγμα η ανιλίνη φθορίζει σε ουδέτερα ή αλκαλικά διαλύματα, όχι όμως σε pH=2, διότι φθορίζει το μόριο της και όχι το κατιόν του ανιλινίου.
4. *Θερμοκρασία*. Αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως συνεπάγεται μείωση της εντάσεως φθορισμού, διότι η αυξανόμενη τυχαία κίνηση των μορίων αυξάνει την πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ των μορίων και συνεπώς την αποδιέγερση τους με έκλυση θερμότητας. Πολλές ουσίες που δεν φθορίζουν σε θερμοκρασία δωματίου, είναι δυνατόν να φθορίζουν όταν διεγείρονται σε χαμηλή θερμοκρασία.
5. *Οξυγόνο*. Η παρουσία του οξυγόνου μπορεί να παρεμποδίζει είτε με άμεση οξειδωση της φθορίζουσας ουσίας προς μη φθορίζον προϊόν, είτε με απόσβεση του φθορισμού. Γι' αυτό απαιτείται απαέρωση του διαλύματος με διαβίβαση αζώτου, ιδιαίτερα κατά την εργασία σε οργανικούς διαλύτες.
6. *Φωτοδιάσπαση*. Επειδή χρησιμοποιείται ακτινοβολία διεγέρσεως μεγάλης ισχύος, υπάρχει κίνδυνος φωτοδιασπάσεως της φθορίζουσας ουσίας. Γι' αυτό οι μετρήσεις γίνονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα και σε ορισμένες περιπτώσεις επιλέγεται μήκος κύματος ακτινοβολίας διεγέρσεως που δεν απορροφάται ισχυρά.
7. *Συγκέντρωση*. Η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας.

Επομένως αν και είναι δυνατόν όλη η απορροφούμενη από το μόριο ενέργεια να αποδοθεί ως φθορισμός, συνήθως ένα μέρος της χάνεται με άλλους μηχανισμούς. Για το λόγο αυτό ως *συντελεστής κβαντικής απόδοσης φθορισμού* Φ (fluorescence quantum yield) έχει ορισθεί ο λόγος των φωτονίων που εκπέμπονται προς τα φωτόνια που απορροφούνται και μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1.

$$\Phi = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια/s}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια/s}} = \frac{\text{εκπεμπόμενα φωτόνια}}{\text{απορροφούμενα φωτόνια}}$$

Δ. Μέθοδοι προσδιορισμού του ψευδαργύρου

Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος που διαδραματίζει ο ψευδάργυρος ώθησε τους ερευνητές σε αναζήτηση τεχνικών που να επιτρέπουν τον υπολογισμό των επιπέδων των συγκεντρώσεων τόσο του συνολικού όσο και του ελεύθερου ψευδαργύρου στα ζώντα κύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η μεγαλύτερη ποσότητα του ενδοκυττάριου Zn^{2+} βρίσκεται ισχυρά συνδεδεμένη σε κυτταρικές πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα υπάρχουν ενδοκυττάρια περιχές πιο χαλαρά συνδεδεμένου ή διαφορετικά ελεύθερου ψευδαργύρου. Οι συγκεντρώσεις του διαθέσιμου ψευδαργύρου κυμαίνονται από $10^{-9}M$, στο κυτταρόπλασμα πολλών κυττάρων έως και $10^{-3}M$ σε ορισμένα κυστίδια.

Για την επιτυχή μέτρηση του συνολικού ψευδαργύρου υπάρχει ποικιλία τεχνικών, όπως για παράδειγμα η ατομική απορρόφηση ή η χρήση του ραδιενεργού ισότοπου ^{65}Zn . Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ψευδαργύρου είναι δύσκολο να επιτευχθεί αν και είναι απαραίτητη για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων, αφού οι διαβαθμίσεις των συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου είναι ικανές να καθορίσουν την ταχύτητα και την κατεύθυνση της κίνησης του μέσα στα κύτταρα.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού διαθέσιμου Zn^{2+} που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι:

1. Επιλεκτικά ηλεκτρόδια ψευδαργύρου
2. Φασματοφωτομετρία με μεταλλοχρωμικούς δείκτες, από τους οποίους ο Zincon είναι ο πιο γνωστός.
3. Φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου.

Τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια (παράγωγα ιμινοδιακεταμιδίου), αδυνατούν να μετρήσουν συγκεντρώσεις Zn^{2+} μικρότερες από $10\mu M$. Επίσης, αν και εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τον ψευδάργυρο, το γεγονός ότι στις μετρήσεις υπάρχει παρέμβαση από τα υπάρχοντα πρωτόνια, περιορίζει τη χρήση τους σε διαλύματα με $pH \geq 6$.

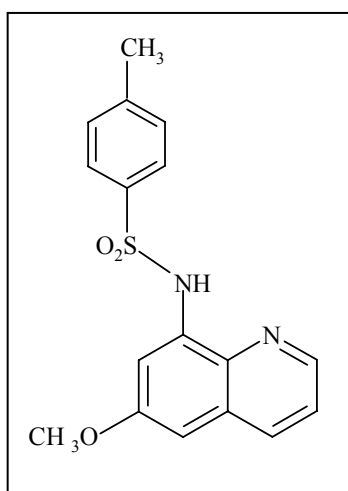
Ο μεταλλοχρωμικός δείκτης Zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazyl-benzenic acid), έχει το πλεονέκτημα έναντι άλλων δεικτών, της υψηλής εκλεκτικότητας ως προς τον Zn^{2+} σε σχέση με το Ca^{2+} και το Mg^{2+} . Έτσι η παρουσία Ca^{2+} και Mg^{2+} δεν επηρεάζει τα φασματικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου Zincon- Zn^{2+} . Το κυριότερο μειονέκτημα του δείκτη είναι η χαμηλή τάση προς ένωση με τον

Zn^{2+} . Η σταθερά διάστασης του είναι ίση με $K_d=5.9\mu M$. Το γεγονός αυτό μειώνει την ευαισθησία του σε συγκεντρώσεις μετάλλου μικρότερες των $0.1\mu M$.

Δ1. Φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου.

Η αδυναμία εφαρμογής των δύο προαναφερθέντων τεχνικών στον προσδιορισμό του ελεύθερου ενδοκυττάριου ψευδαργύρου σε πολλά βιολογικά συστήματα, οδήγησε στο σχεδιασμό και τη σύνθεση φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου, οι οποίοι θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τόσο στην ανίχνευση όσο και στη μέτρηση των συγκεντρώσεων του μετάλλου μέσα στα κύτταρα. Οι συγκεκριμένες ενώσεις μπορούν και διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, εμφανίζουν υψηλό φθορισμό, περιέχουν ligands τα οποία εμφανίζουν μεγάλη τάση για ένωση και υψηλή εκλεκτικότητα προς το μέταλλο και έχουν τέτοιες σταθερές δέσμευσης ώστε να αποφεύγεται η απομάκρυνση του ισχυρά συνδεδεμένου ψευδαργύρου από τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες των κυττάρων.^[8]

Ένας από τους πρώτους δείκτες ψευδαργύρου που συντέθηκαν, είναι ο **TSQ** (N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfonamide), η δομή του οποίου παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.^[15]



Σχήμα 8: Δομή του δείκτη TSQ

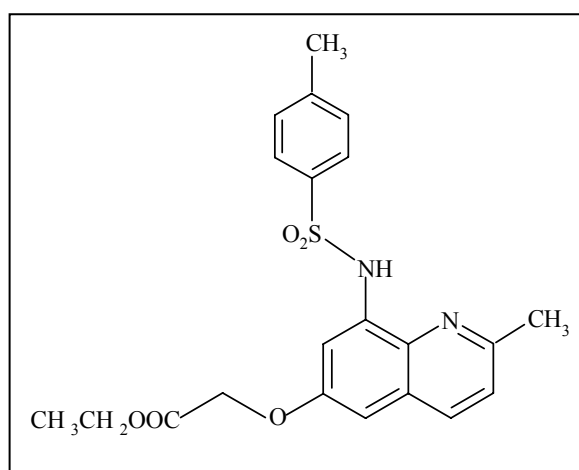
Το φάσμα εκπομπής του δείκτη TSQ παρουσιάζει μέγιστο φθορισμού στα 495nm . Η ένταση φθορισμού του δείκτη στο φάσμα εκπομπής, αυξάνεται με τη σταδιακή αύξηση της συγκεντρώσεως του ψευδαργύρου, από 0.01 έως $10\mu M$, χωρίς όμως να παρατηρείται μετατόπιση στο μήκος κύματος. Ο TSQ εμφανίζει μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τον Zn^{2+} , ακόμα και παρουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} και Mg^{2+} . Το σύμπλοκο του TSQ με τον Zn^{2+} εμφανίζει στοιχειομετρία 2:1 (δύο

μόρια δείκτη ανά άτομο ψευδαργύρου). Σύμπλοκα με στοιχειομετρία 1:1 μπορούν όμως να σχηματιστούν με τις κατάλληλες μεταλλοπρωτεΐνες.

Από μελέτες που περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων Zn^{2+} , τόσο σε θαλασσινό νερό όσο και σε βιολογικά συστήματα, έχει προσδιοριστεί για τον TSQ ένα όριο ανίχνευσης της τάξεως των 0.1nM.^[16]

Ο **Zinquin** ανήκει όπως και ο TSQ, στην πρώτη γενιά φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τη μέτρηση των συγκεντρώσεων του μετάλλου στα κύτταρα.^[9]

Ο Zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulfonamido-6-quinolyloxy)ethylacetate], περιέχει ένα αιθυλεστέρα στη θέση της μεθόξυ ομάδας του TSQ, γεγονός που διευκολύνει την παραμονή του μέσα στα κύτταρα. Η δομή του Zinquin φαίνεται στο



επόμενο σχήμα.

Σχήμα 9: Δομή του δείκτη Zinquin

Ο δείκτης Zinquin διαπερνά της μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων όπου παραμένει για πολλές ώρες και δεν εμφανίζει φθορισμό μέχρι τη στιγμή που θα συμπλεχθεί με τον ψευδάργυρο.

Ο φθορισμός ενός διαλύματος 2μM σε Zinquin, αυξάνεται σταδιακά παρουσία συγκεντρώσεων Zn^{2+} , της τάξεως των nM και φτάνει σε κορεσμό σε συγκέντρωση Zn^{2+} ίση με 1μM. Ο φθορισμός του Zinquin δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων δισθενών κατιόντων όπως το Ca^{2+} και το Mg^{2+} , ακόμα και αν αυτά βρίσκονται σε πολύ μεγάλη περίσσεια έναντι του Zn.

Ο Zinquin σχηματίζει σύμπλοκα Zinquin-Zn με στοιχειομετρία 1:1 και 2:1 και με σταθερές δέσμευσης $2.7 \pm 0.4 \times 10^6$ και $11.7 \pm 1.9 \times 10^6$ $l \cdot mole^{-1}$, οι οποίες είναι αρκετά χαμηλές ώστε να αποκλείσουν το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης του δείκτη με

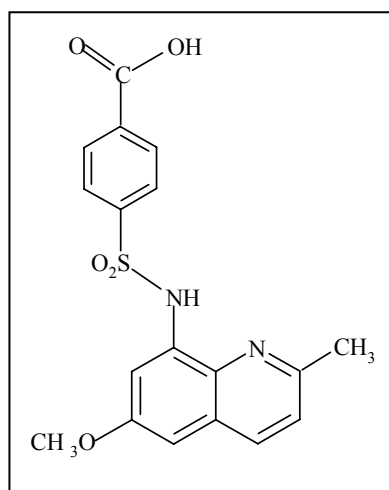
τον ισχυρά συνδεδεμένο ψευδάργυρο των μεταλλοενζύμων, όπου οι σταθερές δέσμευσης είναι της τάξεως των 10^{12} - 10^{13} lt·mole⁻¹.

Η σταθερά διάστασης για το δείκτη Zinquin έχει υπολογιστεί ίση με $K_d=1\mu\text{M}$.

Αυτό που παραμένει άγνωστο είναι αν ο Zinquin μπορεί να δεσμεύσει τον ψευδάργυρο των ενζύμων στα οποία ο ρόλος του είναι καταλυτικός και στα οποία είναι συναρμοσμένος με τρεις κυστεΐνες ή τρεις ιστιδίνες και ένα μόριο νερού.^[9]

Το γεγονός ότι ο Zinquin διεγείρεται σε σχετικά χαμηλά μήκη κύματος (370nm) περιορίζει σημαντικά τη χρήση του εξαιτίας της απουσίας κατάλληλων lasers στα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται σε μελέτες φθορισμού.

Η ένωση **TFLZn**, [N-(3-methyl-6-methoxy-8-quinoly)-p-carboxybenzoyl-sulfonamide] ανήκει επίσης στην κατηγορία των φθορίζοντων δεικτών του ψευδαργύρου. Η δομή του TFLZn παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.^[17]



Σχήμα 10: Δομή του δείκτη TFLZn

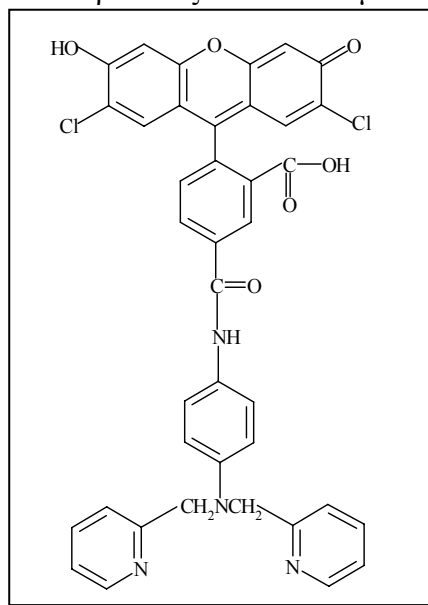
Ο δείκτης TFLZn αποτελεί το υδατοδιαλυτό ανάλογο του TSQ. Απουσία ψευδαργύρου ο TFLZn φθορίζει ελάχιστα, ενώ παρουσία $100\mu\text{M Zn}^{2+}$ η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά εκατό φορές.

Τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής του συμπλόκου TFLZn-Zn εμφανίζουν, μέγιστα φθορισμού στα 360nm και στα 498nm αντίστοιχα και μικρές μετατοπίσεις στα μήκη κύματος με την αύξηση της συγκεντρώσεως του ψευδαργύρου.

Ο TFLZn εμφανίζει πολύ υψηλή εκλεκτικότητα για τον ψευδάργυρο σε σχέση με άλλα μέταλλα. Έτσι η παρουσία Ca^{2+} και Mg^{2+} σε συγκεντρώσεις 1mM αλλά και Co^{2+} , Cd^{2+} και Cu^{2+} σε συγκεντρώσεις $100\mu\text{M}$, αφήνει ανεπηρέαστο το φθορισμό του TFLZn.

Η σταθερά διάστασης για τον TFLZn η οποία είναι ίση με $k_d=20\mu\text{M}$, είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του Zinquin ($k_d=1\mu\text{M}$), γεγονός που εξασφαλίζει ότι ο TFLZn δεν δεσμεύει ψευδάργυρο από τις πρωτεΐνες των κυττάρων.^[17]

Στην κατηγορία των φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου ανήκει και ο **Newport Green**, η δομή του οποίου παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.^[16]

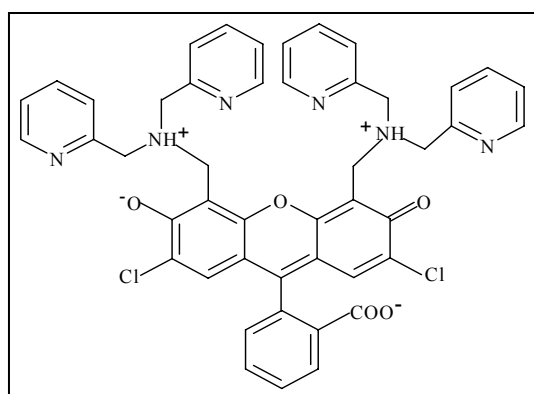


Σχήμα 11: Δομή του δείκτη Newport Green

Ο δείκτης Newport Green, ο οποίος περιέχει το χρωμοφόρο 2,7-dichlorofluorescein εμφανίζει μέγιστο φθορισμού στο φάσμα διεγέρσεως στα 506nm. Κατά τη δέσμευση του με τον ψευδάργυρο, παρέχει μια αύξηση στην ένταση φθορισμού ενώ δεν παρατηρείται καμία μετατόπιση στα μήκη κύματος διεγέρσεως και εκπομπής. Αύξηση στην ένταση του φθορισμού παρατηρείται επίσης με τη δέσμευση Ni^{2+} και Co^{2+} .

Η δέσμευση του Zn^{2+} από τον Newport Green ($k_d=1\mu\text{M}$) είναι ισχυρότερη από τη δέσμευση του Ni^{2+} ($k_d=1.5\mu\text{M}$) και δεν επηρεάζεται από την παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{2+} και Mg^{2+} .^[16]

Πρόσφατα συντέθηκε από τον Tsien και τους συνεργάτες του ο φθορίζον δείκτης ψευδαργύρου **Zinpyr-1**, του οποίου η δομή παρουσιάζεται στο επόμενο



σχήμα.^[3]

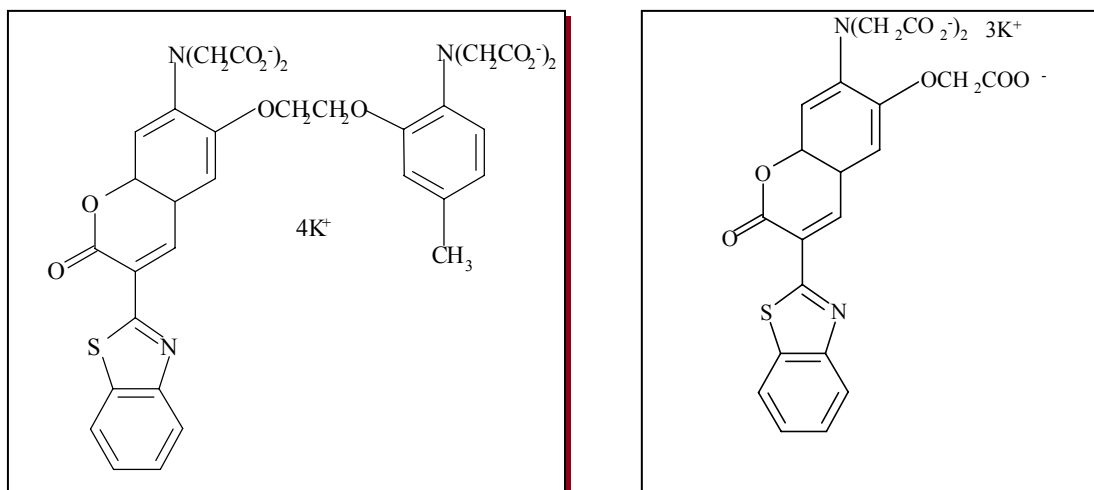
Σχήμα 12: Δομή του δείκτη Zinpyr-1

Ο δείκτης Zinpyr-1, ο οποίος επίσης περιέχει το χρωμοφόρο 2,7-dichlorofluorescein, εμφανίζει μέγιστο φθορισμού στο φάσμα διεγέρσεως στα 515nm, το οποίο παρουσιάζει μικρή μετατόπιση σε μικρότερα μήκη κύματος με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου. Ο κορεσμός επέρχεται σε συγκέντρωση Zn^{2+} ίση με 25 μ M, οπότε και το μέγιστο φθορισμού στο φάσμα διεγέρσεως έχει μετατοπιστεί στα 507nm. Κατά τη σταδιακή αύξηση της συγκεντρώσεως του ψευδαργύρου, παράλληλα με την μετατόπιση του μήκους κύματος στο φάσμα διεγέρσεως παρατηρείται αύξηση της εντάσεως στο φάσμα εκπομπής.

Η σταθερά διάστασης του δείκτη Zinpyr-1 έχει υπολογιστεί ίση με $k_d=1$ nM.

Ο φθορισμός του δείκτη Zinpyr-1 δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων δισθενών ιόντων, όπως Ca^{2+} και Mg^{2+} , ακόμα και σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 2 και 5mM αντίστοιχα, γεγονός που υποδεικνύει την μεγάλη εκλεκτικότητα του ως προς τον ψευδάργυρο.^[3]

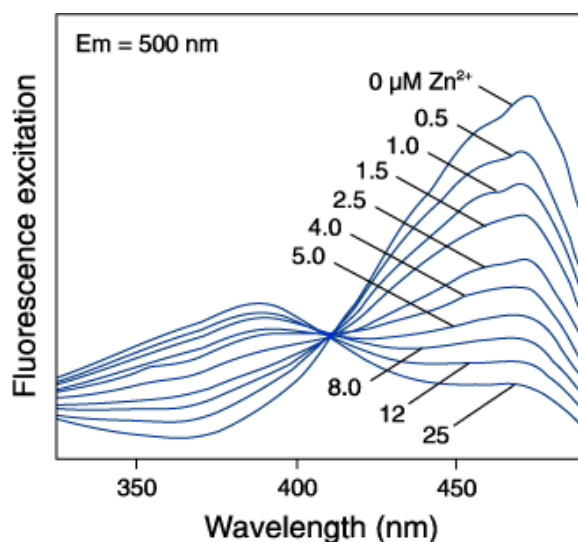
Ο δείκτης **APTRA-BTC**, ο οποίος προέρχεται από την τροποποίηση της



Σχήμα 13: Δομές των δεικτών BTC και APTRA-BTC δομές του γνωστού φθορίζοντα

δείκτη ασβεστίου BTC, ανήκει στην κατηγορία των πολυκαρβοξυλικών φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου. Οι δομές των δεικτών BTC και APTRA-BTC παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.^[16]

Η δέσμευση του ψευδαργύρου στον APTRA-BTC έχει σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση του μεγίστου φθορισμού στο φάσμα διεγέρσεως, με ισοβεστικό σημείο στα 420nm όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα.



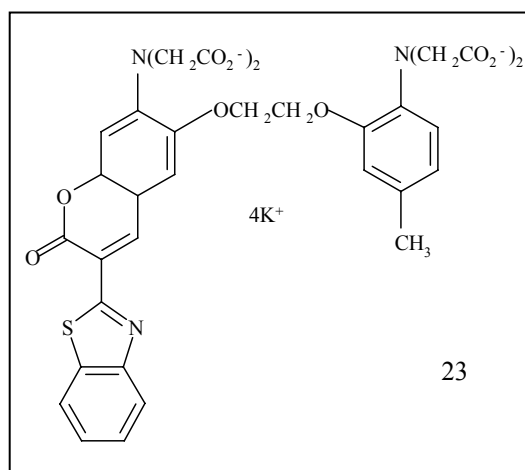
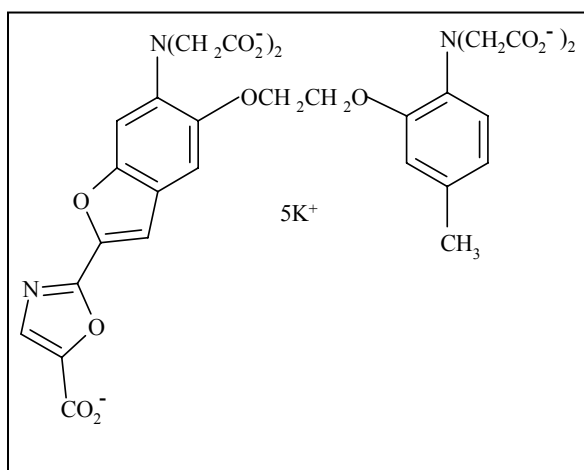
Σχήμα14: Φάσμα διεγέρσεως του δείκτη APTRA-BTC με σταδιακή αύξηση της συγκεντρώσεως ψευδαργύρου

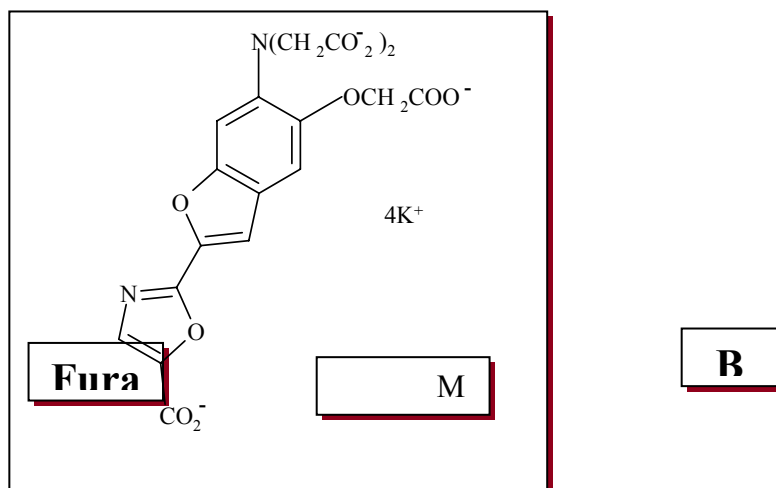
Η σταθερά διάστασης του APTRA-BTC για τον ψευδάργυρο έχει υπολογιστεί ίση με $k_d=1.4\mu\text{M}$.

Ο φθορισμός του δείκτη επηρεάζεται ελάχιστα από την παρουσία άλλων δισθενών ιόντων όπως Ca^{2+} και Mg^{2+} σε συγκεντρώσεις 100 μM και 35mM αντίστοιχα, αλλά και από την παρουσία 25 μM Al^{3+} , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} ή Pb^{2+} .

Εξαιτίας της σχετικά ασθενούς δέσμευσης με τον ψευδάργυρο, ο δείκτης APTRA-BTC είναι περισσότερο χρήσιμος για μετρήσεις σε περιβαλλοντολογικά δείγματα παρά για μετρήσεις σε κύτταρα.^[16]

Οι πολυκαρβοξυλικοί δείκτες ασβεστίου, **Fura-2** και **BTC** καθώς και ο δείκτης μαγνησίου **Mag-fura-2**, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες ψευδαργύρου. Οι δομές τους παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.^[18]





Σχήμα 15: Δομές των δεικτών Fura-2, BTC και Mag-fura-2.

Πιο συγκεκριμένα η σταθερά διάστασης του δείκτη Fura-2 για τον ψευδάργυρο, απουσία ασβεστίου έχει υπολογισθεί ίση με $k_d=3\text{nM}$. Ο Fura-2 παραμένει ευαίσθητος σε συγκεντρώσεις ψευδαργύρου της τάξεως των nM ακόμα και παρουσία συγκεντρώσεων ασβεστίου 25-100nM.^[18]

Πρόσφατα ο Hyrk και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν ότι ο γνωστός δείκτης ασβεστίου **BTC**, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης ψευδαργύρου. Συγκεκριμένα, η ένταση στα 400nm (μέγιστο στο φάσμα διεγέρσεως), αυξάνεται κατά 15 φορές σε συγκεντρώσεις ψευδαργύρου 0-20μM. Επίσης, η ένταση στο φάσμα διεγέρσεως αυξάνεται κατά 6 φορές στα 435nm (ισοσβεστικό σημείο για το ασβέστιο) για τις ίδιες συγκεντρώσεις ψευδαργύρου.

Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη σταθερά διάστασης του η οποία έχει υπολογιστεί ίση με $k_d=20\text{nM}$, τον κάνει κατάλληλο για τον προσδιορισμό, ανεξάρτητα από την παρουσία ασβεστίου, συγκεντρώσεων ενδοκυττάριου ψευδαργύρου της τάξεως των 50-100nM.^{[18], [19]}

Τέλος ο δείκτης **Mag-fura-2** ο οποίος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση συγκεντρώσεων του μαγνησίου, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου.

Το σύμπλοκο του Mag-fura-2 με τον Zn^{2+} δίνει μέγιστο στο φάσμα διεγέρσεως στα 323nm, ενώ τα σύμπλοκα του με Ca^{2+} και Mg^{2+} , δίδουν μέγιστα στα 335nm. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με μια σταθερά διάστασης ίση με $k_d=20\text{nM}$, επιτρέπει τη μέτρηση του ψευδαργύρου σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5nM έως 1μM.^{[12], [18]}

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ερμηνεία των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα σε κυτταρικό επίπεδο, είναι εξέχουσας σημασίας για την κατανόηση των αιτιών ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο των ευκαρυωτικών κυττάρων και εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό σημαντικών ενδοκυττάρων διεργασιών. Η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων λαμβάνουν χώρα οι συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες, αναπόφευκτα περιλαμβάνει την ανίχνευση και τη μέτρηση του διαθέσιμου ενδοκυττάρου ψευδαργύρου.^[18]

Η χρήση ενώσεων, που μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες χωρίς να προκαλούν βλάβες στα ίδια τα κύτταρα και παρέχουν διακριτές αλλαγές κατά την εκλεκτική δέσμευση τους με ιόντα, έκανε δυνατό τον υπολογισμό των αλλαγών στα επίπεδα συγκεντρώσεων των ενδοκυττάρων ιόντων.^{[8],[15]}

Η φθορισμομετρία έχει αναδειχθεί σε χρήσιμο εργαλείο για την επιλεκτική μελέτη επιμέρους συστατικών, πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων. Κατά συνέπεια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στο σχεδιασμό και τη σύνθεση φθορίζουσών ενώσεων, οι οποίες θα μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και θα εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα δέσμευσης για συγκεκριμένα ενδοκυττάρια μεταλλικά ιόντα.^[18]

Για παράδειγμα, μεγάλο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην ανίχνευση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και στον τρόπο με τον οποίο επαγόμενες αλλαγές στη συγκέντρωση ή στην κατανομή του, μπορούν να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Για το λόγο αυτό έχει συντεθεί μεγάλος αριθμός φθορίζοντων δεικτών ασβεστίου, με πλέον αντιπροσωπευτικούς τους Fura-2, Indo-1, Quin-2 και BTC, ο οποίος έχει οδηγήσει στη συλλογή σημαντικών πληροφοριών για το ρόλο που διαδραματίζει το ασβέστιο στα κύτταρα. Σε αντίθεση με το ασβέστιο, ο αριθμός φθορίζοντων δεικτών ενδοκυττάρου ψευδαργύρου είναι πολύ περιορισμένος.^[15]

Η σύνθεση φθορίζουσών ενώσεων, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και τη μέτρηση του ελεύθερου ενδοκυττάρου ψευδαργύρου, απαιτεί την εμφάνιση ισχυρού σήματος φθορισμού καθώς και την παρουσία ligands τα οποία θα εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς το μέταλλο.^[8]

Πιο συγκεκριμένα οι ιδιότητες που οι δείκτες αυτοί οφείλουν να έχουν είναι.^[20]

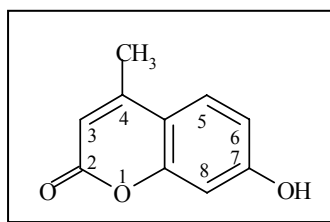
1. Μεγάλο συντελεστή μοριακής απορρόφησης και κατά συνέπεια υψηλή ένταση απορρόφησης.
2. Σημαντική μετατόπιση στο μήκος κύματος του μεγίστου (λ_{max}) στο φάσμα εκπομπής σε σχέση με το μέγιστο στο φάσμα διεγέρσεως (Stokes shift), ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπικαλύψει των κορυφών.
3. Εμφάνιση φθορισμού με σημαντική κβαντική απόδοση και αισθητή μεταβολή του λ_{max} διέγερσης ή εκπομπής κατά την δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου. Μια τέτοια μετατόπιση είναι απαραίτητη σε τεχνικές όπως η ratio fluorescence, η οποία χρησιμοποιείται για υπολογισμούς συγκεντρώσεων ιόντων.
4. Απορροφήσεις σε μήκη κύματος κοντά στα 500nm έτσι ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο ο φθορισμός που οφείλεται σε ενδοκυττάρια συστατικά, ιστούς και βιολογικά υγρά. Απορροφήσεις σε μικρότερα μήκη κύματος οδηγούν σε παραμόρφωση του σήματος και κατά συνέπεια σε μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου. Πολύ συχνά απαιτούνται απορροφήσεις στο μήκος κύματος των εμπορικά διαθέσιμων argon laser (488nm), οι οποίες είναι απαραίτητες σε τεχνικές όπως η flow cytometry η οποία προσφέρεται ιδιαίτερα για την επισήμανση ενδοκυττάρων διαδικασιών.
5. Ευαισθησία ανίχνευσης ιόντων ψευδαργύρου και υψηλή εκλεκτικότητα σε σχέση με άλλα μέταλλα. Δηλαδή είναι απαραίτητο να έχουν σταθερές διάστασης (K_d) στην περιοχή των φυσιολογικών επιπέδων του ενδοκυττάρου ψευδαργύρου και εκτός περιοχής των φυσιολογικών επιπέδων των άλλων ενδοκυττάρων ιόντων.
6. Δυνατότητα διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να μπορούν να γίνουν μετρήσεις ακόμα και στα πιο μικρά κύτταρα και να μη χρειασθεί να εισαχθούν με μικροπιπέτες ή με προσωρινή διάσπαση της μεμβράνης του πλάσματος.
7. Δυνατότητα αλλαγών στο φάσμα απορρόφησης μεταξύ της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης με ψευδάργυρο μορφής.

8. Ορισμένη οξύτητα ($pK_a < 7$), ώστε να μην πρωτονιώνονται στο κυτταρικό περιβάλλον, γεγονός το οποίο θα σήμαινε μείωση της ταχύτητας συναρμογής του ψευδαργύρου.
9. Απουσία τοξικότητας.

Στα μειονεκτήματα των δεικτών φθορισμού μπορεί να συμπεριληφθεί το γεγονός ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φωτοευαίσθητους ή με χρωμοφόρες ομάδες ιστούς. Επιπλέον, μέχρι σήμερα δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες μεταβολές στο μήκος κύματος του φθορισμού της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης μορφής, αλλά κυρίως στην ένταση.

Η ανάγκη παρασκευής φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου με βελτιωμένες ιδιότητες, μας οδήγησε στο σχεδιασμό και τη σύνθεση φθορίζουσών ενώσεων που θα μπορούσαν να πληρούν τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις.

Κατά αναλογία με τους δείκτες ασβεστίου, που χρησιμοποιούν σαν χρωμοφόρο ομάδα υποκατεστημένες κουμαρίνες (π.χ BTC), οι ενώσεις που συντέθηκαν, αποτελούν παράγωγα της υποκατεστημένης 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνης.



Σχήμα 16: Δομή της 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνης

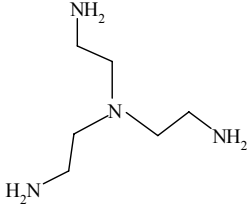
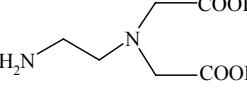
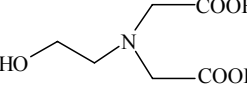
Η επιλογή του συγκεκριμένου χρωμοφόρου βασίστηκε στο γεγονός ότι οι υποκατεστημένες κουμαρίνες απορροφούν γενικότερα σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από τις αντίστοιχες μη-υποκατεστημένες. Επιπλέον πολλά παράγωγα κουμαρινών χρησιμοποιούνται ως χρωστικές laser (laser dyes), γεγονός που προϋποθέτει τη σταθερότητα του χρωμοφόρου στις πειραματικές συνθήκες και μεγάλη κβαντική απόδοση φθορισμού.^{[21], [22], [23]}

Από μελέτες φθορισμού που έχουν πραγματοποιηθεί σε μη-υποκατεστημένες κουμαρίνες και στα αντίστοιχα υποκατεστημένα παράγωγα τους, προκύπτει ότι ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες στη θέση 3 καθώς και ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες στις θέσεις 4, 6 ή 7 προκαλούν αύξηση στο μήκος κύματος αλλά και στην ένταση του φθορισμού.^[21]

Πιο συγκεκριμένα, σύγκριση της μη-υποκατεστημένης κουμαρίνης και της 7-υδροξυκουμαρίνης με τις αντίστοιχες, 4-μεθυλοκουμαρίνη και 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη, έδειξε ότι η παρουσία του μεθυλίου στην θέση 4 μετατοπίζει τα μέγιστα φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Ομοίως, σύγκριση της κουμαρίνης και της 4-μεθυλοκουμαρίνης με την 7-υδροξυκουμαρίνη, 7-μεθοξυκουμαρίνη, 4-μεθυλο-6-υδροξυκουμαρίνη, 4-μεθυλο-6-μεθοξυκουμαρίνη, 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη και 4-μεθυλο-7-μεθοξυκουμαρίνη, έδειξε ότι η παρουσία ηλεκτρονιοδοτικών ομάδων (-OH, -OCH₃) στις θέσεις 6 και 7 μετατοπίζει τα μέγιστα φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Όταν ο υποκαταστάτης καταλαμβάνει την 7 θέση της 4-μεθυλοκουμαρίνης, η μετατόπιση στο μήκος κύματος του φθορισμού είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της υποκατεστημένης με υδρόξυ ομάδες από αυτήν της υποκατάστασης με μεθόξυ ομάδες.^[21]

Η επιλογή του χηλικού τμήματος των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με βάση το γεγονός, ότι το ιόν του ψευδαργύρου Zn²⁺, θεωρείται ότι ανήκει κατά Pearson στα σκληρά οξέα και επομένως σχηματίζει κατά προτίμηση σταθερά σύμπλοκα με ligands που έχουν δότες ηλεκτρονίων, άτομα οξυγόνου, αζώτου και θείου (σκληρές βάσεις).^[1]

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζεται μια σειρά ενώσεων, οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως συμπλοκοποιητές (chelators) ψευδαργύρου. Οι συγκεκριμένες ενώσεις εμφανίζουν υψηλή τάση δέσμευσης και μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τον ψευδάργυρο, σε σχέση με άλλα μέταλλα, όπως είναι το ασβέστιο και το μαγνήσιο.^{[24],[25]}

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	K _D	ΔΟΜΗ	ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ
TREN	1.948 67E-10		P
EDD	1.415 85E-08		I
HIDA	8.815 81E-08		I

TREN (Tris(2-aminoethyl)amine)

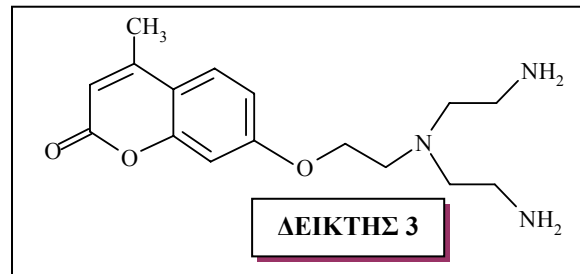
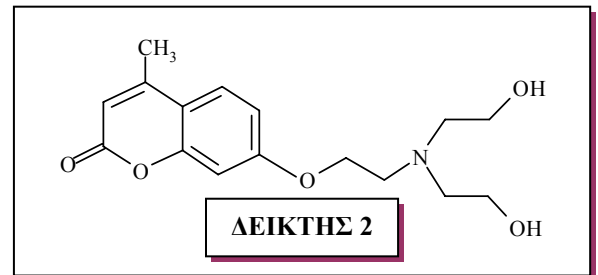
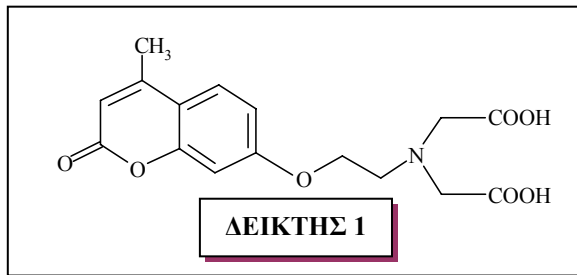
EDD (Ethylendiamine N,N diacetic acid)

HIDA (N-(2-hydroxyethyl iminodiacetic acid))

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι συμπλοκοποιητές ψευδαργύρου διακρίνονται ανάλογα με την ικανότητα τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες στις παρακάτω κατηγορίες.^{[24],[25]}

- Εξωκυττάριοι συμπλοκοποιητές (E):** Οι διαλυτές μορφές του ελεύθερου συμπλοκοποιητή αλλά και του συμπλόκου του με τον ψευδάργυρο, δεν έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες.
- Διαπερατοί συμπλοκοποιητές (P):** Κάποιες μορφές του ελεύθερου συμπλοκοποιητή μπορούν και διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Ένας συμπλοκοποιητής P τύπου, μπορεί να προσεγγίζει τον ψευδάργυρο μέσα και έξω από τα κύτταρα, αλλά δεν επιφέρει ισορροπία στις συγκεντρώσεις του μετάλλου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.
- Συμπλοκοποιητές ιονοφόρα (I):** Στην περίπτωση που κάποια μορφή του συμπλόκου του με τον ψευδάργυρο είναι χωρίς φορτίο, ο συμπλοκοποιητής μπορεί να δράσει σαν ιονοφόρο και θα επιφέρει ισορροπία στις συγκεντρώσεις του μετάλλου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

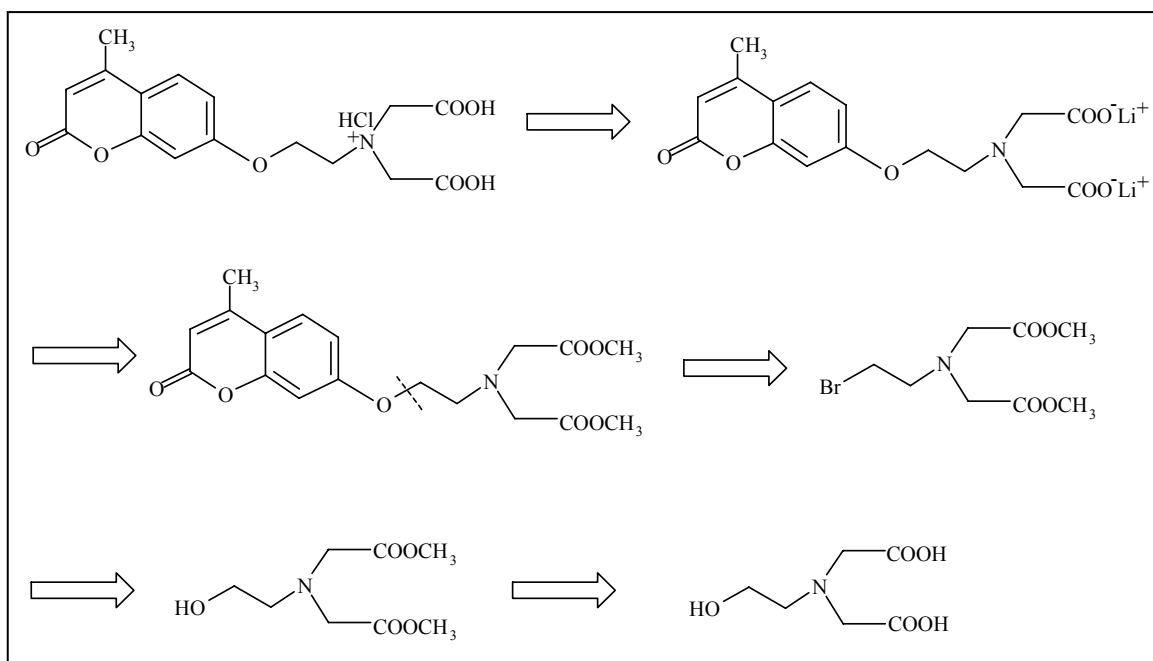
Επομένως με βάση τις παραπάνω ιδιότητες τόσο του χρωμοφόρου τμήματος όσο και των συμπλοκοποιητών ψευδαργύρου σχεδιάστηκαν και τέθηκαν ως συνθετικοί στόχοι οι παρακάτω φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

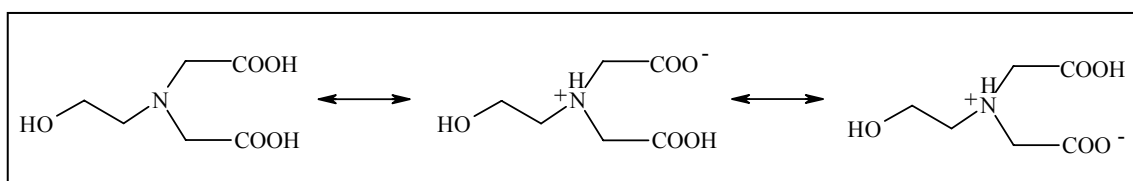
A. Σύνθεση του Δείκτη 1

Η ρετροσυνθετική πορεία που σχεδιάστηκε για το Δείκτη 1 παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.



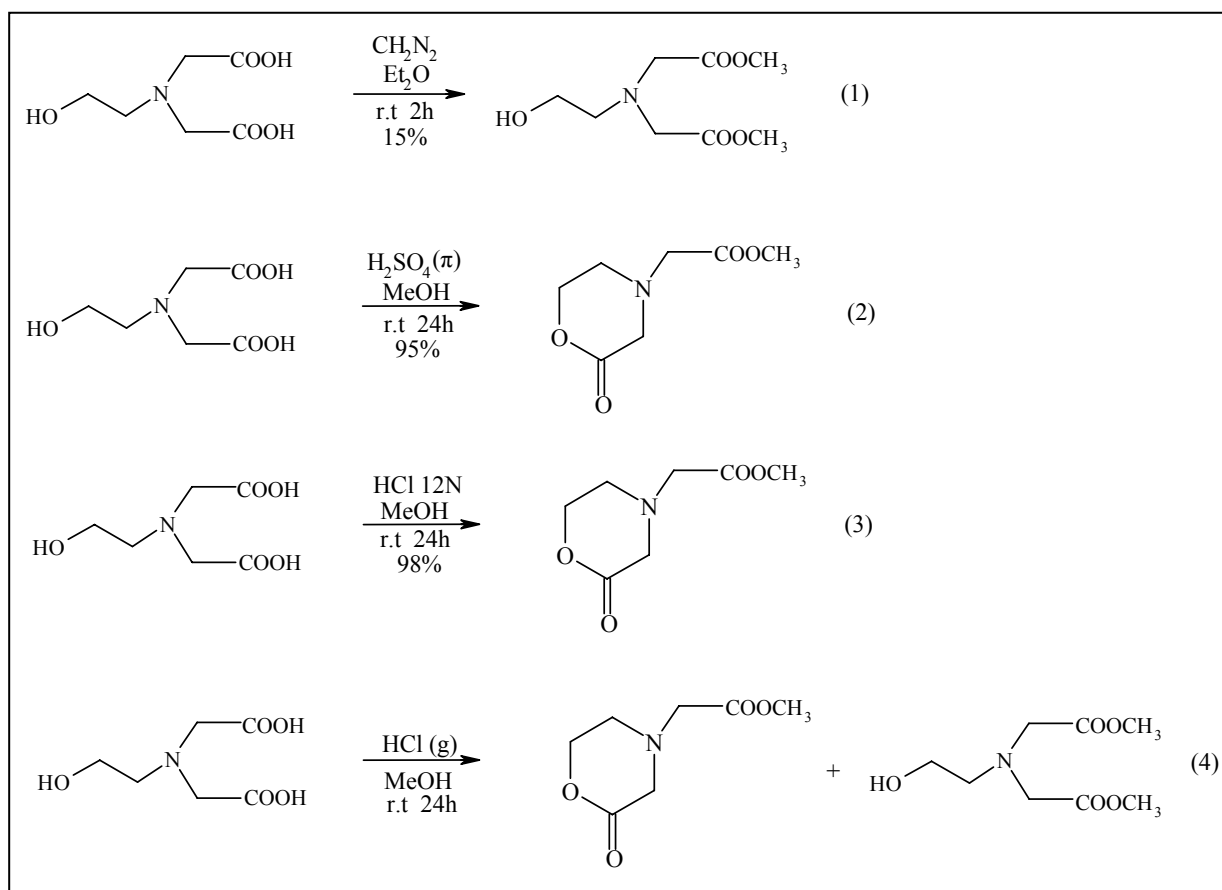
Σχήμα 17: Ρετροσυνθετική προσέγγιση του Δείκτη 1

Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα, ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη ένωση N-(2-υδροξυαιθυλο) μινοδιοξικό οξύ η οποία είναι αδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες.



Σχήμα 18: Δομή της υδατοδιαλυτής ένωσης N-(2-hydroxyethyl) iminodiacetic acid

Επομένως το πρώτο στάδιο της σύνθεσης αφορά στην μετατροπή των καρβοξυλικών ομάδων της ένωσης στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τη διαλυτότητα της στους οργανικούς διαλύτες. Ταυτόχρονα οι δύο καρβοξυλικές ομάδες προστατεύονται με τη μορφή των αντίστοιχων μεθυλεστέρων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.



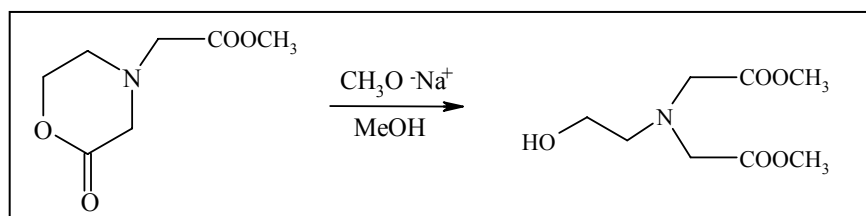
Η αντίδραση (1) επιλέχθηκε με βάση την γρήγορη και ποσοτική μετατροπή των καρβοξυλικών οξέων στους αντίστοιχους εστέρες με τη χρήση διαζωμεθανίου, αλλά και την απουσία όξινων ή βασικών συνθηκών.^[26] Εξαιτίας όμως της ελάχιστης διαλυτότητας της αρχικής ένωσης στον αέρα και άλλους προτεινόμενους στη βιβλιογραφία διαλύτες, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πολύ μικρό ποσοστό (15%) με ταυτόχρονη κατανάλωση πολύ μεγάλων ποσοτήτων διαζωμεθανίου. Επομένως η χρήση του διαζωμεθανίου ενδείκνυται σε περιπτώσεις διαλυτών σε οργανικούς διαλύτες, καρβοξυλικών οξέων. Στην πραγματικότητα η μετατροπή υδατοδιαλυτών καρβοξυλικών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες με τη χρήση

διαζωμεθανίου απαιτεί την οξίνιση διαλύματος του οξέος με HCl (pH 3-4), προσθήκη του αιθερικού διαλύματος του διαζωμεθανίου και στην συνέχεια διαχωρισμό των δύο στοιβάδων, της αιθερικής η οποία περιέχει τον σχηματιζόμενο εστέρα και της υδατικής.^[27]

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι γνωστές αντιδράσεις εστεροποίησης 2,3 και 4 οι οποίες όμως οδηγούν στην περίπτωση χρήσης πυκνού H₂SO₄ ή HCl 12N, αποκλειστικά στο σχηματισμό της λακτόνης, ενώ στην περίπτωση χρήσης HCl (g), στο σχηματισμό μίγματος λακτόνης-διεστέρα σε ποσοστά 74% και 26% αντίστοιχα.^{[28], [29]} Τα ποσοστά αυτά υπολογίστηκαν με χρωματογραφία GC-MS.

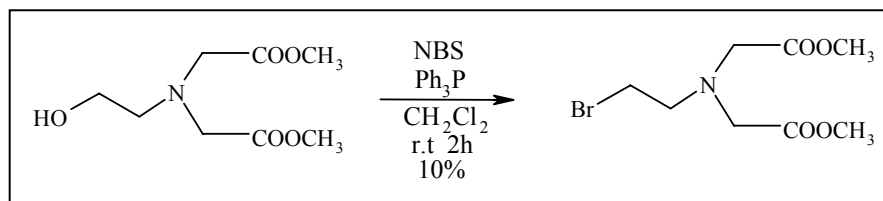
Το μικρό ποσοστό σχηματισμού του επιθυμητού διεστέρα οφείλεται στο γεγονός ότι, γ- και δ-υδρόξυ οξέα μετατρέπονται εύκολα στην αντίστοιχη λακτόνη παρουσία οξέων. Επομένως, ο σχηματισμός της λακτόνης στις παραπάνω συνθήκες εστεροποίησης είναι αναπόφευκτος.

Η δυσκολία διαχωρισμού των συστατικών του μίγματος με flash χρωματογραφία στήλης εξαιτίας της πολύ μικρής διαφοράς στην πολικότητα των δύο ενώσεων, μας οδήγησε στην πραγματοποίηση της επόμενης αντίδρασης, η οποία περιλαμβάνει την διάνοιξη της λακτόνης με τη χρήση CH₃O⁻Na⁺.



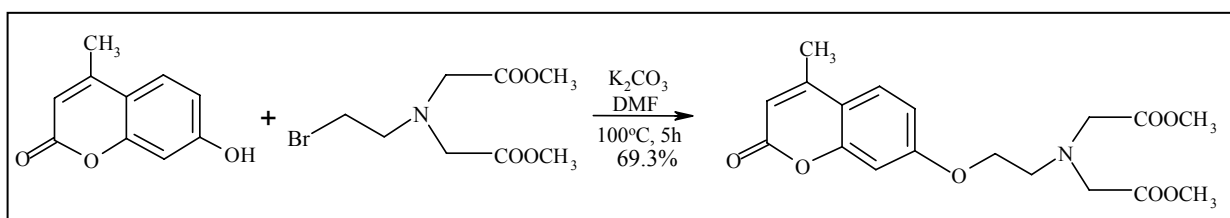
Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό ακόμα και με τη χρήση μεγάλης ποσότητας CH₃O⁻Na⁺, θέρμανσης αλλά και αυξημένης πίεσης (αυτόκλειστο σύστημα). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι λακτόνες διανοίγονται εύκολα κατά την κατεργασία τους με αλκοόλες και παρέχουν υδρόξυ εστέρες ανοικτής ανθρακικής αλυσίδας.^[30] Προφανώς, η αυξημένη σταθερότητα της συγκεκριμένης λακτόνης απαιτεί τη χρήση ισχυρά βασικών συνθηκών, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διάνοιξη της. Η παρουσία όμως των μεθυλεστέρων περιορίζει τη χρήση ισχυρών βάσεων στην παραπάνω αντίδραση.

Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση του μίγματος λακτόνης-διεστέρα στην επόμενη αντίδραση η οποία περιλαμβάνει την μετατροπή της πρωτοταγούς αλκοόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο.^[31]



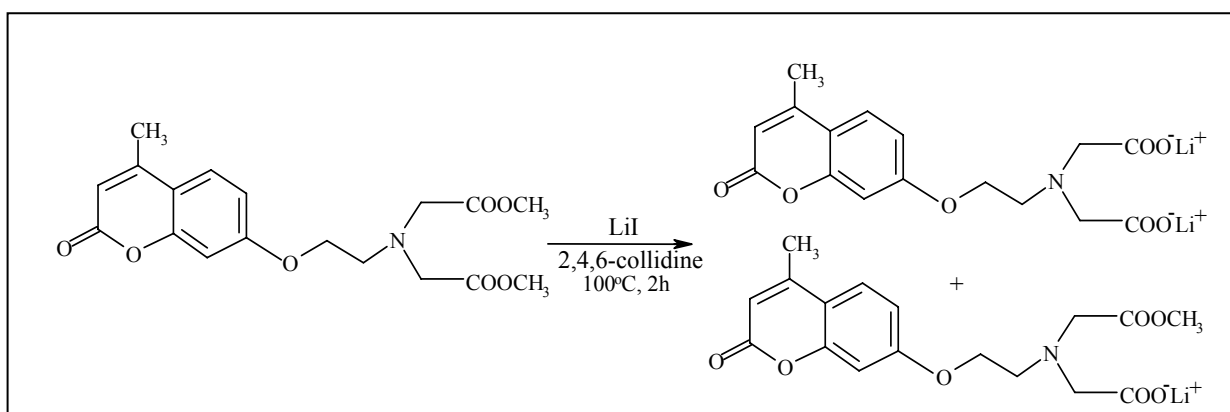
Στις συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, η λακτόνη παραμένει ανέπαφη και διαχωρίζεται από το σχηματιζόμενο βρωμίδιο με χρωματογραφία στήλης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση αλκυλίωσης του φαινολικού υδροξυλίου της εμπορικά διαθέσιμης 4-μεθυλο-7-υδροξικουμαρίνης (χρωμοφόρο τμήμα του Δείκτη 1). Πρόκειται για μια χαρακτηριστική S_N2 αντίδραση, στην οποία ως βάση χρησιμοποιείται K_2CO_3 . Η αντίδραση γίνεται σε πολικό, μη πρωτικό



διαλύτη.^[32]

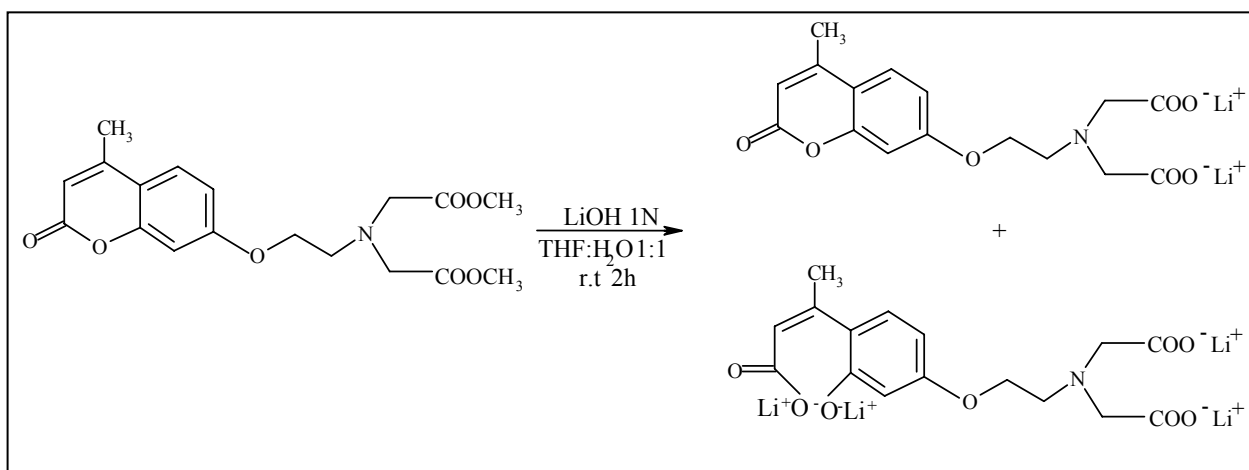
Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την υδρόλυση των εστέρων. Η ευαισθησία των κουμαρινών (λακτόνες) σε βασικές συνθήκες, επέβαλε την χρήση μιας ήπιας και ουδέτερης μεθόδου απομεθυλίωσης των εστέρων, όπως είναι η απομάκρυνση τους μέσω μιας S_N2 αντίδρασης. Ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε το LiI και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη 2,4,6-collidine.^[33] Πρόκειται για μια υποκατεστημένη πυριδίνη, που εκτός από το ρόλο της ως διαλύτη, χρησιμεύει στην παγίδευση του παραγώμενου μεθυλοιωδιδίου.



Από την συγκεκριμένη αντίδραση δεν επιτυγχάνεται απομόνωση καθαρού προϊόντος εξαιτίας της δύσκολης απομάκρυνσης της περίσσειας της κολλιδίνης, των

αλάτων της και του ιωδιούχου λιθίου, αλλά και τον δύσκολο διαχωρισμό του προϊόντος από τον αντίστοιχο μονοεστέρα.

Για το λόγο αυτό, στην επόμενη αντίδραση πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση των εστέρων σε βασικές συνθήκες, με τη χρήση υδατικού διαλύματος LiOH 1N.^[33] Στις συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, η υδρόλυση των εστέρων ολοκληρώθηκε πλήρως αλλά παράλληλα έλαβε χώρα σε μεγάλο ποσοστό διάνοιξη της

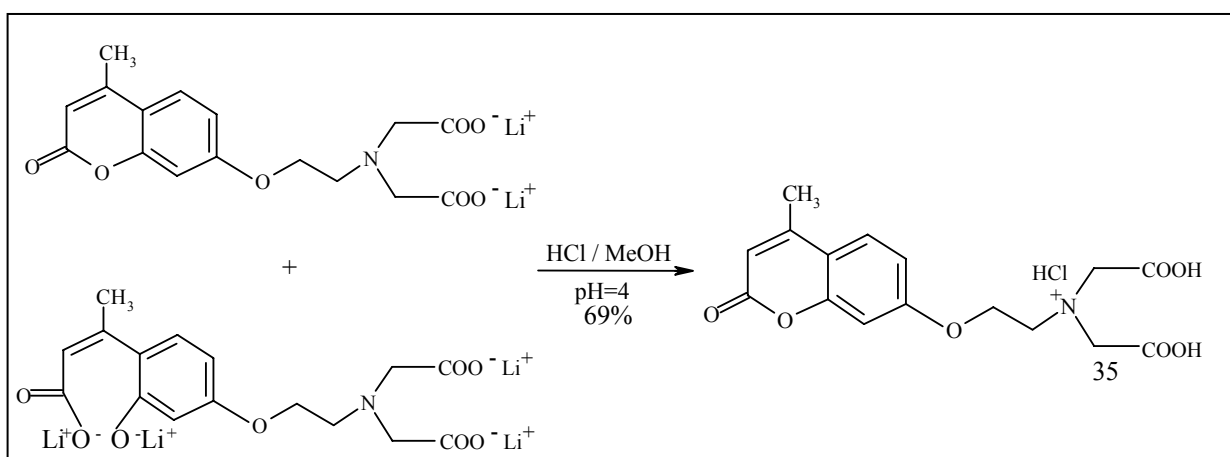


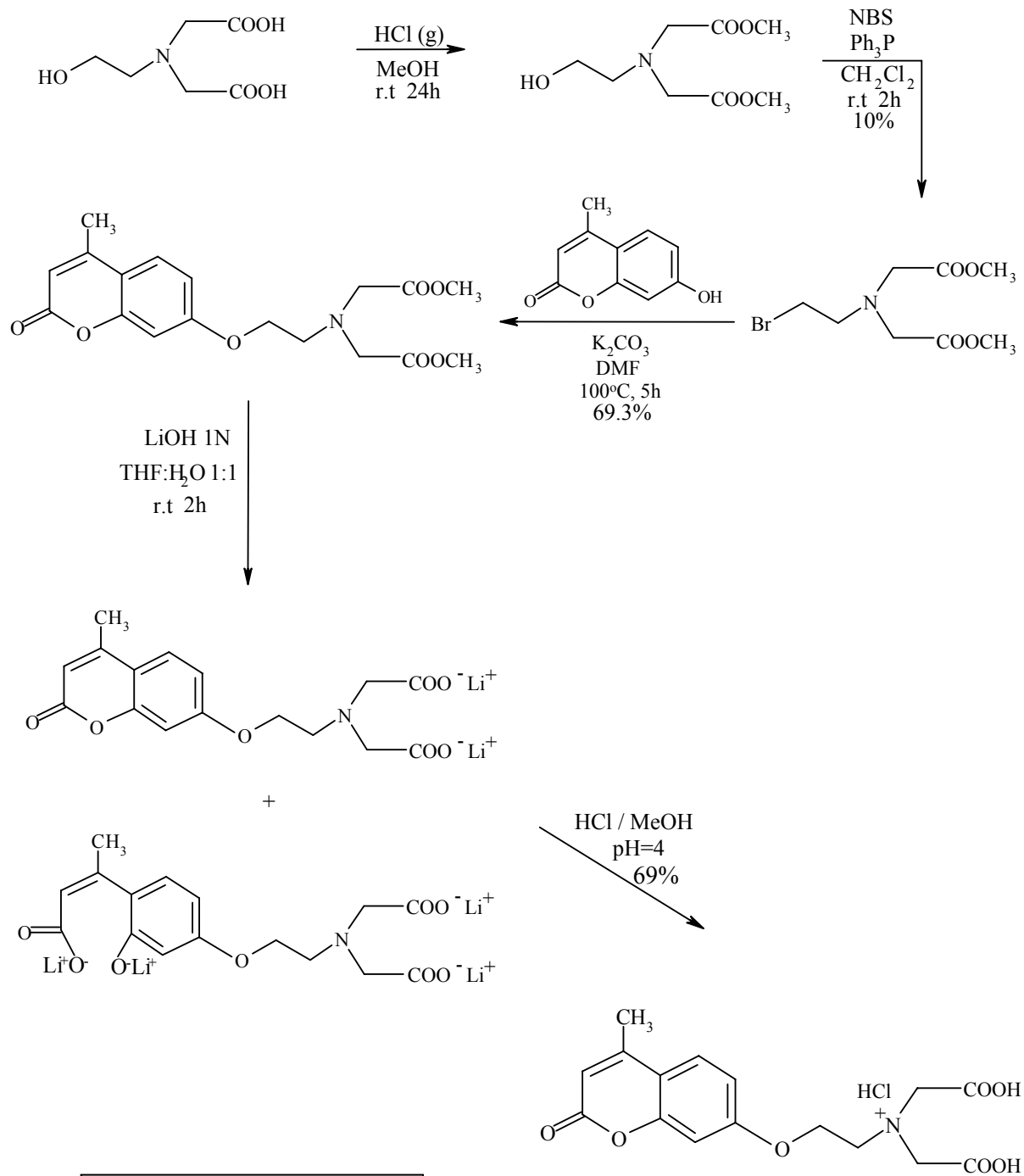
κουμαρίνης.^[21]

Έτσι στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκε οξίνιση του σχηματιζόμενου μίγματος με μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου, οπότε και λαμβάνεται ο **Δείκτης 1** (4-μεθυλο-7-[(N,N-δισ καρβοξυμεθυλο)-2-αμινοαιθοξύ]κουμαρίνη) στην πρωτονιομένη του μορφή.

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΔΕΙΚΤΗ 1

ΔΕΙΚΤΗΣ 1



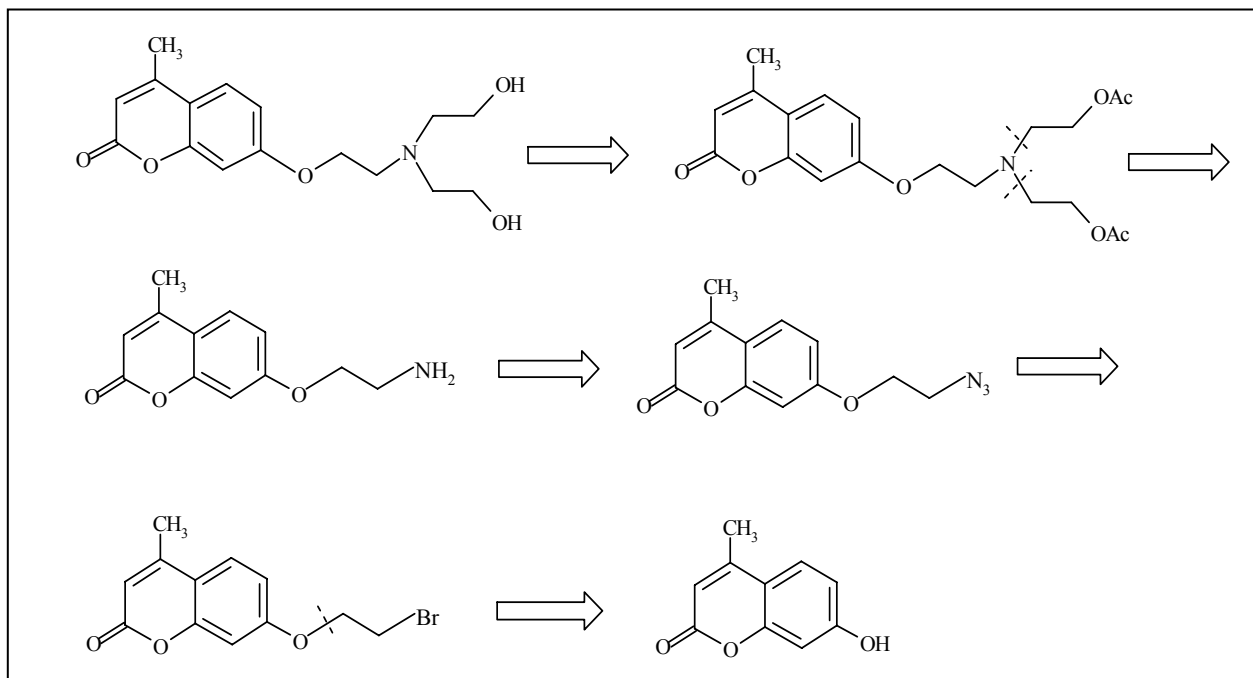


Συνολική Απόδοση 4.8%

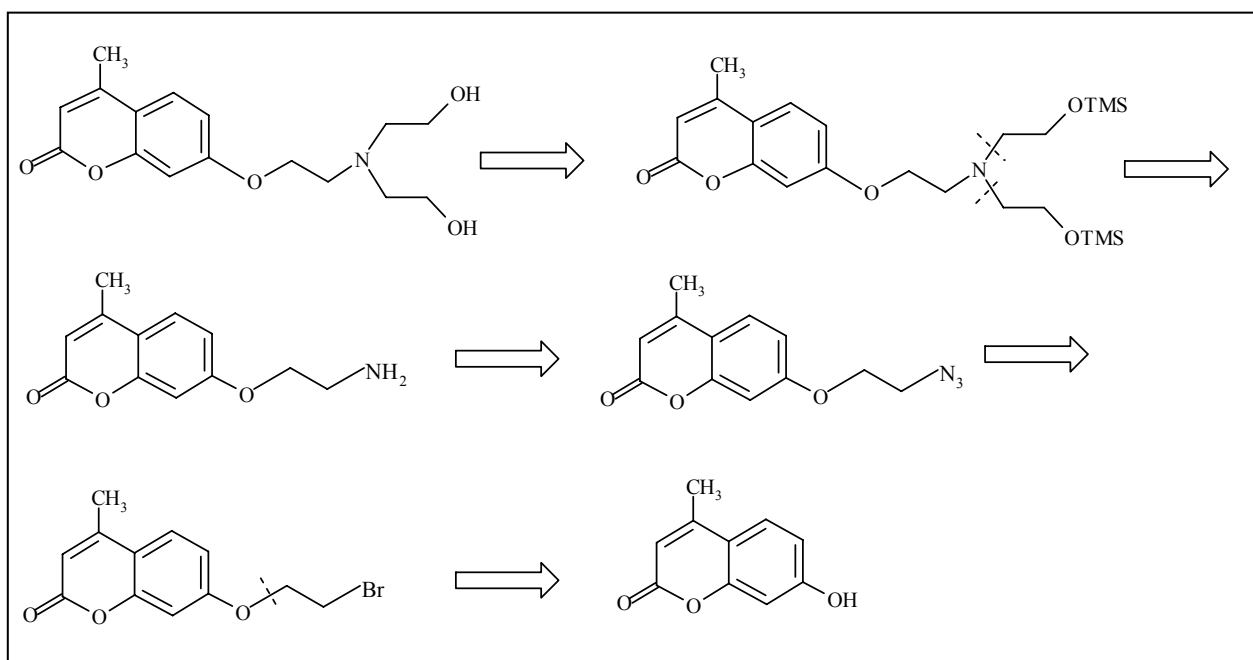
ΔΕΙΚΤΗΣ 1

B. Σύνθεση του Δείκτη 2

Οι ρετροσυνθετικές πορείες που σχεδιάστηκαν για το Δείκτη 2 παρουσιάζονται στα επόμενα σχήματα.



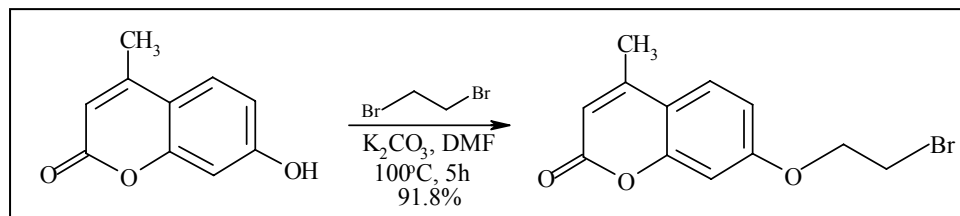
Σχήμα 19: Ρετροσυνθετική προσέγγιση A



Σχήμα 20: Ρετροσυνθετική προσέγγιση B

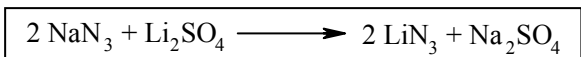
Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη και 1,2-διβρωμοαιθάνιο.

Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την αλκυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου της κουμαρίνης μέσω μιας χαρακτηριστικής SN_2 αντίδρασης προσβολής του 1,2-διβρωμοαιθάνιου όπου ως βάση χρησιμοποιείται το K_2CO_3 . Η αντίδραση γίνεται σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη.^[32]

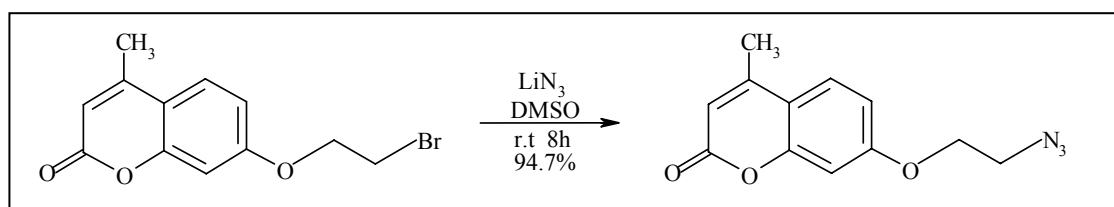


Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η υδρογονόλυση των αζιδίων παρέχει ένα εύκολο τρόπο εισαγωγής της αμινομάδας στις οργανικές ενώσεις.^{[30], [34]} Τα αζίδια είναι σταθερά έναντι μεγάλου αριθμού αντιδραστηρίων και υδρολυτικών συνθηκών και μπορούν εύκολα να αναχθούν προς τις αντίστοιχες αμίνες, ακόμα και παρουσία ομάδων οι οποίες ανάγονται εξίσου εύκολα. Οι άζιδο ενώσεις σχηματίζονται με πυρηνόφιλη υποκατάσταση από ένα ανόργανο αζίδιο και υδρογονώνονται με διατήρηση της στερεοχημείας. Η αντίδραση αναγωγής τους σε συνδυασμό με την αντίδραση $RX \rightarrow RN_3$, αποτελεί μια σημαντική μέθοδο μετατροπής των αλκυλαλογονιδίων στις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μετατροπής του βρωμιδίου στο αντίστοιχο αζίδιο μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής με χρήση LiN_3 , το οποίο παρασκευάζεται εργαστηριακά σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.^[35]



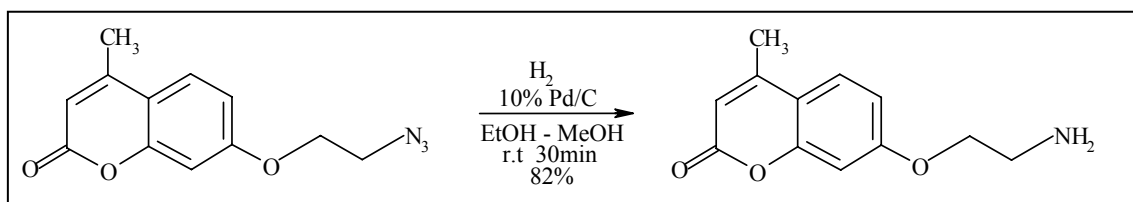
Σε σχέση με το εμπορικά διαθέσιμο NaN_3 , το LiN_3 πλεονεκτεί στο ότι είναι αφενός πολύ πιο δραστικό και αφετέρου πλήρως διαλυτό στο DMSO, με αποτέλεσμα τον εύκολο σχηματισμό οργανικών αζιδίων σε πολύ μεγάλες αποδόσεις.



Τα αζίδια ανάγονται εύκολα σε πρωτοταγείς αμίνες, με τη χρήση $LiAlH_4$, $NaBH_4$, Ph_3P (με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο η διαδικασία ονομάζεται *αντίδραση Staudinger*), αλλά και με καταλυτική υδρογόνωση. Καταλύτες όπως Pd , Pt και

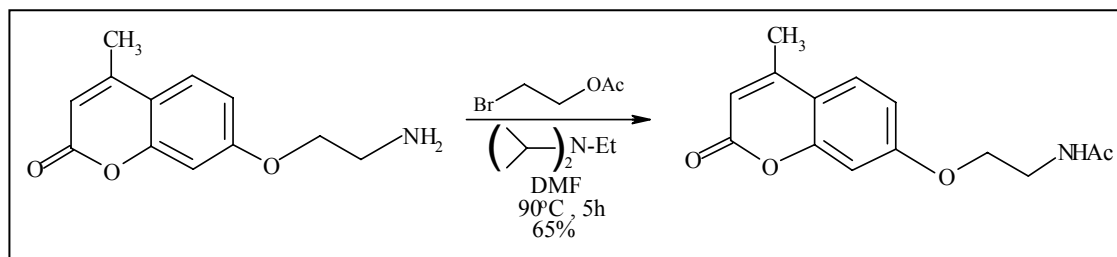
Raney Nickel, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς, κάτω από ήπιες συνθήκες αντίδρασης, στην αναγωγή των αζιδίων.^{[30], [34]}

Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την καταλυτική αναγωγή του αζιδίου προς την αντίστοιχη πρωτοταγή αμίνη παρουσία 10% Pd/C.^{[36], [37], [38]} Στις συγκεκριμένες συνθήκες της αντίδρασης ($P_{H_2}=1\text{Atm}$) η κουμαρίνη δεν υφίσταται καμία αναγωγή. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η κουμαρίνη παραμένει ανέπαφη ακόμα και παρουσία 10% Pd/C σε πίεση υδρογόνου $P_{H_2}=50\text{psi}$ (υδρογονωτής Parr). Είναι γνωστό πως στις καταλυτικές αναγωγές ως διαλύτες χρησιμοποιούνται αλκοόλες, επειδή το υδρογόνο έχει μεγάλη προσροφητικότητα σε αυτές. Για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη αναγωγή έλαβε χώρα σε μίγμα διαλυτών, EtOH-MeOH, με αναλογία 3:1 αντίστοιχα. Επίσης στη συγκεκριμένη αναλογία μίγματος διαλυτών επιτυγχάνεται πλήρης διάλυση του αζιδίου.



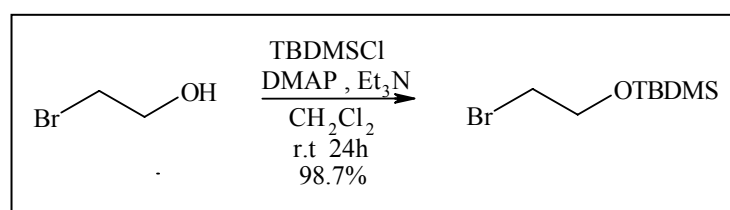
Στο επόμενο στάδιο έγινε προσπάθεια διαλκυλίωσης-σε ένα στάδιο-της πρωτοταγούς, αλειφατικής αμίνης, μέσω μιας χαρακτηριστικής SN_2 αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε η N-αιθυλο-δισοπροπυλαμίνη ενώ ως αλκυλιωτικό η εμπορικά διαθέσιμη ένωση ακετοξυβρωμοαιθάνιο. Η αντίδραση γίνεται στον πολικό, μη πρωτικό διαλύτη DMF. Στη συγκεκριμένη περίπτωση αποφεύγεται η χρήση ανόργανης βάσης (π.χ K_2CO_3), εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας της στο DMF αλλά και της δυσκολίας αλκυλίωσης των πρωτοταγών, αλειφατικών αμινών σε σχέση με τις φαινόλες. Η N-αιθυλο-δισοπροπυλαμίνη, είναι μια αρκετά παρεμποδισμένη ένωση, πλήρως διαλυτή στο DMF, η οποία δρα μόνο ως βάση και όχι ως πυρηνόφιλο. Η μεγαλύτερη ποσότητα της, απομακρύνεται μετά το τέλος της αντίδρασης με τη μορφή του αντίστοιχου υδροχλωρικού άλατος.^[39]

Η συγκεκριμένη αντίδραση δεν οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος αλλά στο σχηματισμό του αντίστοιχου αμιδίου, όπως διαπιστώθηκε από το φάσμα NMR της ένωσης.

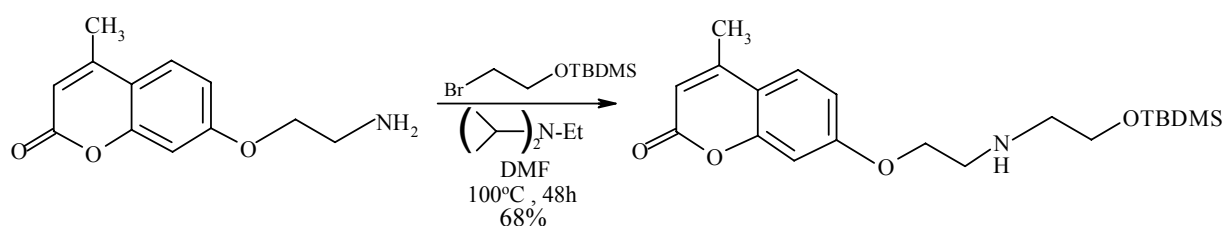


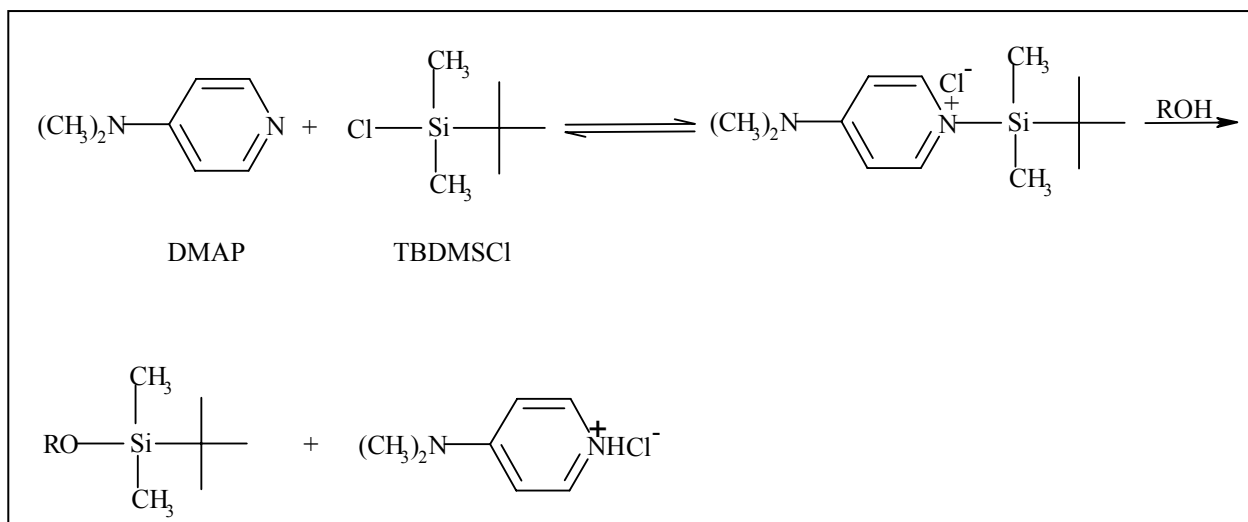
Για το λόγο αυτό αποφασίσθηκε η τροποποίηση της ρετροσυνθετικής προσέγγισης. Έτσι στην αντίδραση διακυλίωσης της αμινομάδας χρησιμοποιήθηκε ως βάση η Ν-αιθυλ-δισοπροπυλαμίνη ενώ ως αλκυλιωτικό, η εμπορικά διαθέσιμη ένωση 2-βρωμοαιθανόλη, της οποίας όμως το υδροξύλιο έχει προηγουμένως προστατευθεί σαν σίλλυλο αιθέρας, με τη χρήση της t-βουτυλοδιμεθυλοσίλλυλο ομάδας (TBDMS). Η TBDMS αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες προστατευτικές σιλυλομάδες στην οργανική σύνθεση. Αυτό οφείλεται στο ότι εισάγεται εύκολα με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων, έχει την ικανότητα να είναι αρκετά σταθερή στις συνθήκες πολλών οργανικών αντιδράσεων και απομακρύνεται κάτω από συνθήκες οι οποίες δεν επηρεάζουν άλλες δραστικές ομάδες. Επίσης είναι σχεδόν 10^4 φορές πιο σταθερή στην υδρόλυση από την ομάδα TMS. Εμφανίζει εξαιρετική σταθερότητα παρουσία βάσεων αλλά είναι σχετικά ευαίσθητη ως προς τα οξέα.^[33]

Η προστασία πραγματοποιήθηκε με t-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο, παρουσία τριαιθυλαμίνης και καταλυτικής ποσότητας 4-N,N-διμεθυλαμινο πυριδίνης (DMAP), σε CH_2Cl_2 και σε θερμοκρασία δωματίου.^[40]



Η DMAP σχηματίζει ένα φορτισμένο ενδιάμεσο με το χλωρίδιο, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από την αλκοόλη όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα.^[40]



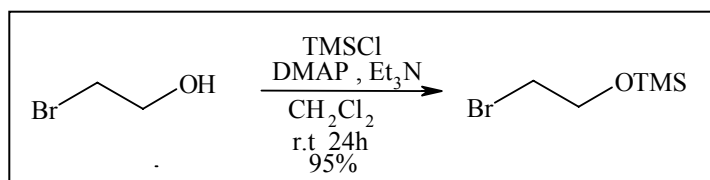


Σχήμα 21: Σχηματισμός ενεργοποιημένου ενδιαμέσου σιλυλίου

Η συγκεκριμένη αντίδραση δεν οδήγησε στο σχηματισμό της διακυλιωμένης αμίνης ακόμα και μετά την παρέλευση 48h θέρμανσης στους 100°C αλλά και τη χρήση μεγάλης ποσότητας αλκυλιωτικού και βάσης.

Ο μη σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος αποδόθηκε στις αυξημένες στερεοχημικές παρεμποδίσεις της αντίδρασης. Είναι γνωστό ότι η ταχύτητα μιας SN₂ αντίδρασης εξαρτάται άμεσα από στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η παρουσία ογκωδών υποκαταστατών μειώνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης, καθώς παρεμποδίζεται ο σχηματισμός της μεταβατικής κατάστασης, εξαιτίας των απωστικών δυνάμεων Van der Waals.^[41]

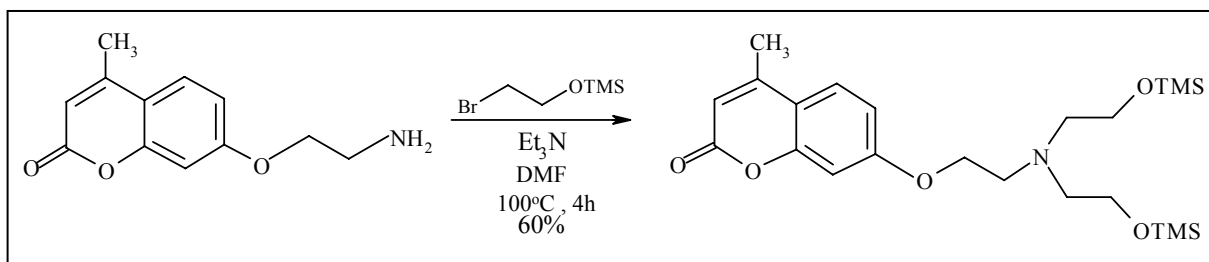
Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε για άλλη μία φορά η τροποποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης. Ως βάση επιλέχθηκε η λιγότερο παρεμποδισμένη Et₃N η



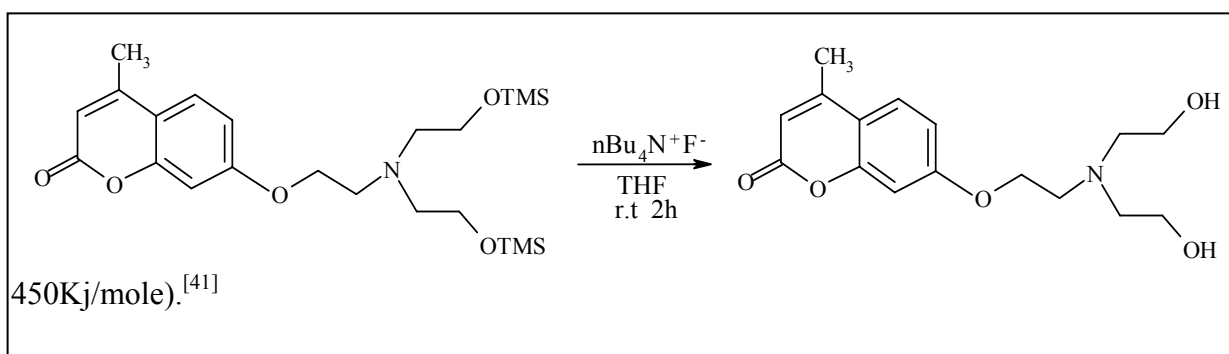
οποία είναι περίπου της ίδιας βασικότητας με την N-αιθυλο-δισοπροπυλαμίνη, ενώ ως αλκυλιωτικό επιλέχθηκε η 2-βρωμοαιθανόλη, της οποίας το υδροξύλιο έχει προηγουμένως προστατευθεί σαν σίλυλο αιθέρας, με τη χρήση της τριμεθυλοσίλυλο ομάδας (TMS).^[40]

Η προστατευτική ομάδα TMS είναι επίσης ανθεκτική στις συνθήκες της αντίδρασης αλλά και λιγότερο ογκώδης σε σχέση με την TBDMS.^[33]

Έτσι πραγματοποιήθηκε η τροποποιημένη αντίδραση διαλκυλίωσης της αμίνης, η οποία οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.

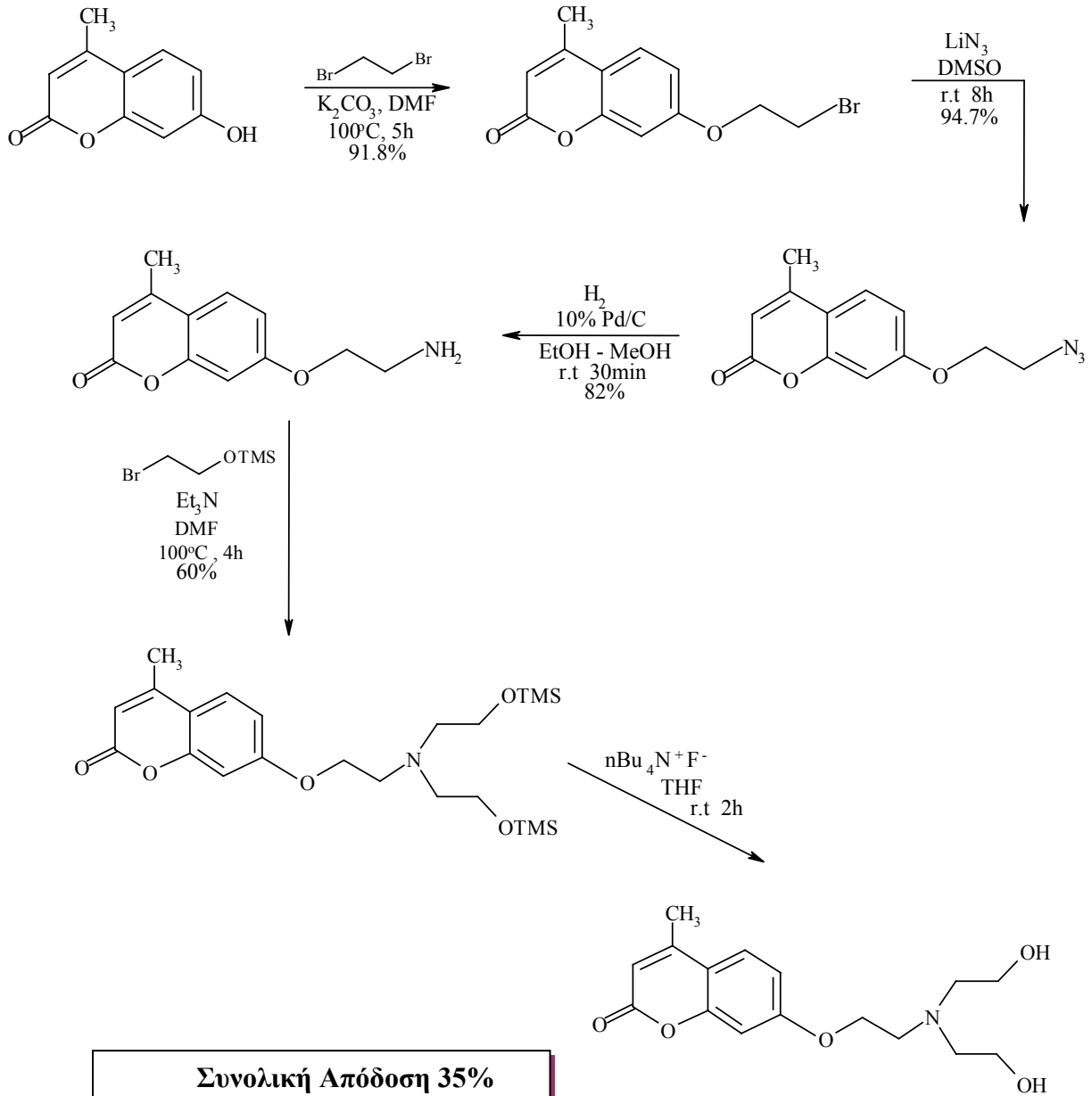


Το τελικό στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την αποπροστασία των υδροξυλομάδων με τη χρήση $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$. Οι προστατευτικές ομάδες TBDMS και TMS απομακρύνονται εύκολα με τη χρήση του $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ γεγονός που οφείλεται στο ότι ο δεσμός Si-F (540 – 570 KJ/mole) είναι σταθερότερος από το δεσμό Si-O (370 –



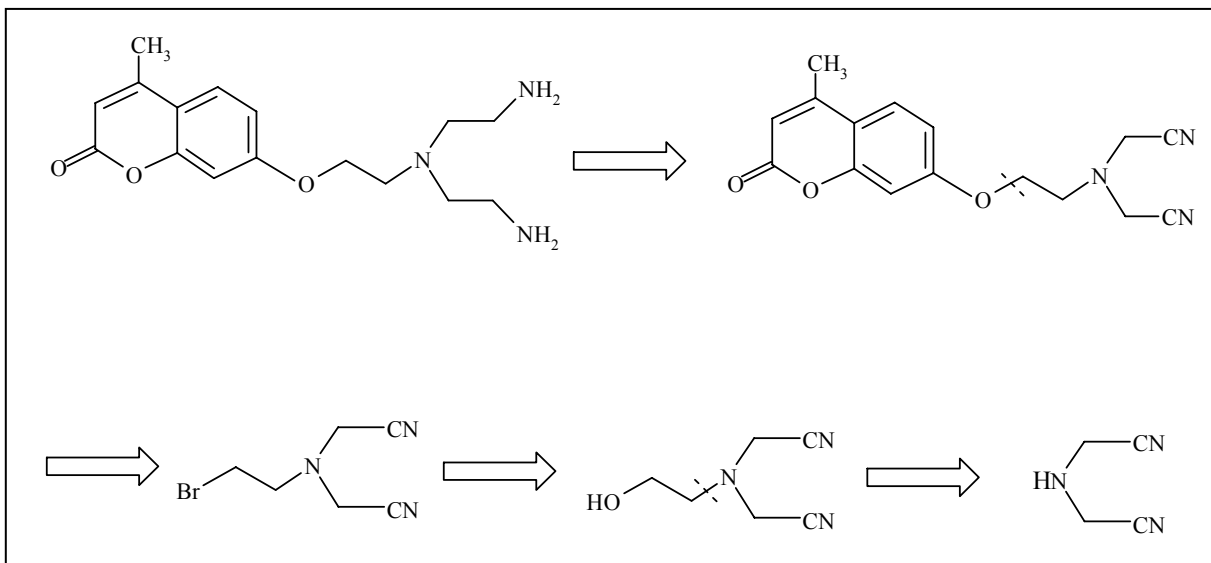
Επομένως με τη χρήση του παραπάνω συνθετικού σχήματος οδηγούμαστε στον επιτυχή σχηματισμό του επιθυμητού Δείκτη 2 (4-μεθυλο-7-[(N,N-δισ-(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθοξυ]κουμαρίνη).

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΔΕΙΚΤΗ 2

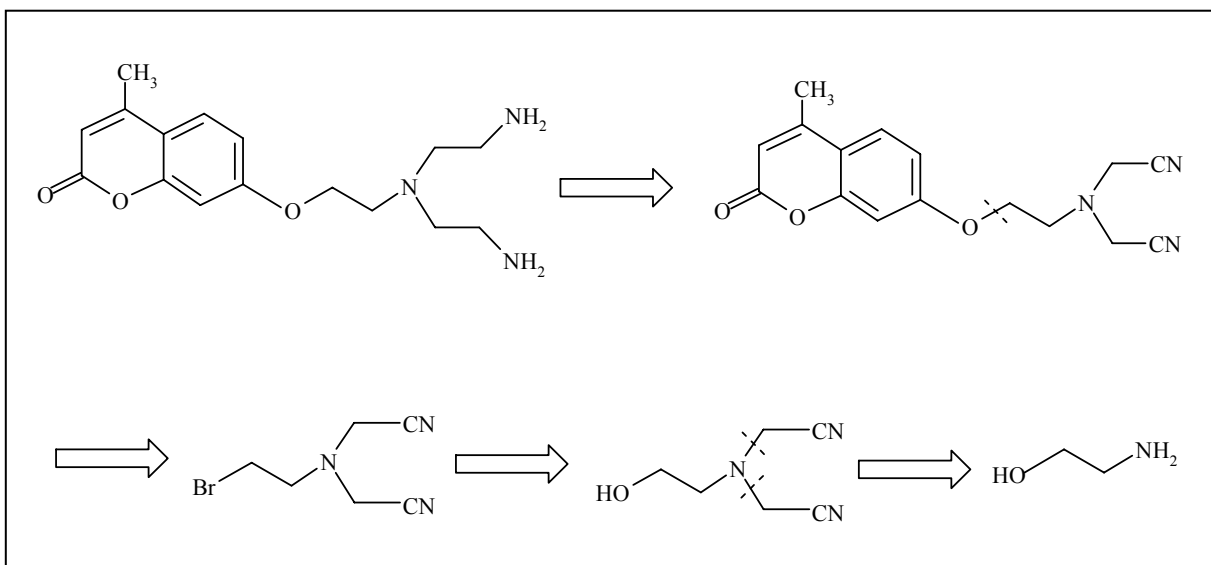


Γ. Σύνθεση του Δείκτη 3

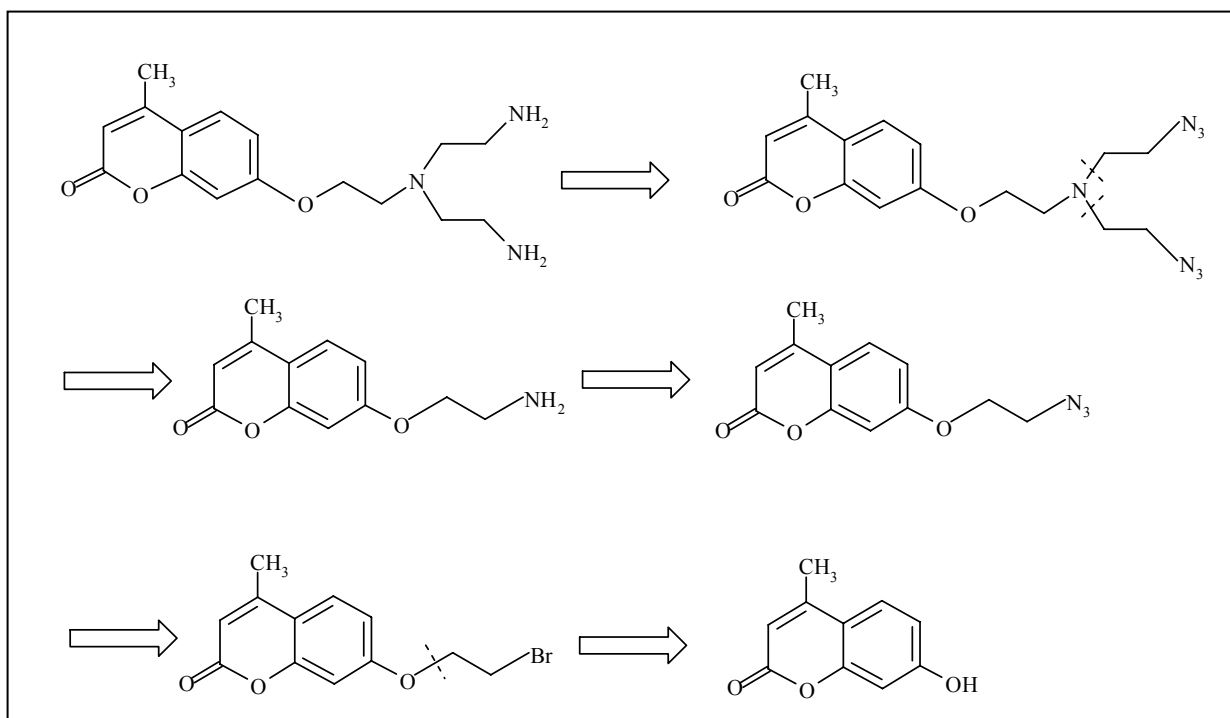
Οι ρετροσυνθετικές προσεγγίσεις που σχεδιάστηκαν για το Δείκτη 3 παρουσιάζονται στα επόμενα σχήματα.



Σχήμα 22: Ρετροσυνθετική προσέγγιση Α



Σχήμα 23: Ρετροσυνθετική προσέγγιση Β

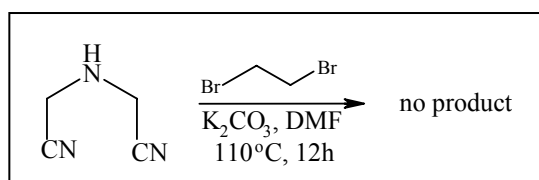


Σχήμα 24: Ρετροσυνθετική προσέγγιση Γ

Ρετροσυνθετική Προσέγγιση Α

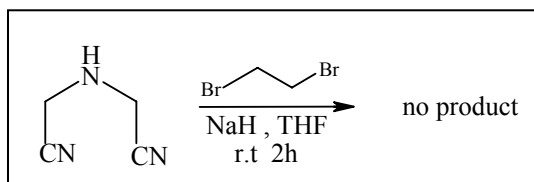
Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις μινοδιακετονιτρίλιο και 1,2-διβρωμοαιθάνιο.

Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την μονοαλκυλίωση της δευτεροταγούς, αλειφατικής αμίνης μέσω μιας S_N2 αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το K_2CO_3 ενώ ως αλκυλιωτικό, η ένωση 1,2-διβρωμοαιθάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη.^[32]



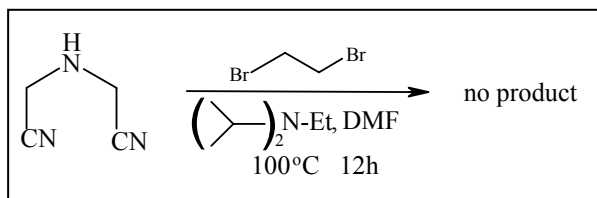
Στις συγκεκριμένες συνθήκες (παρατεταμένη θέρμανση, περίσσεια βάσης και αλκυλιωτικού), η αντίδραση δεν οδήγησε στον σχηματισμό του επιθυμητού

προϊόντος. Επομένως η δυσκολία αλκυλίωσης της δευτεροταγούς αμίνης, η οποία ενισχύεται και από την παρουσία των ηλεκτρονιοελκτικών νιτριλίων, απαιτεί τη

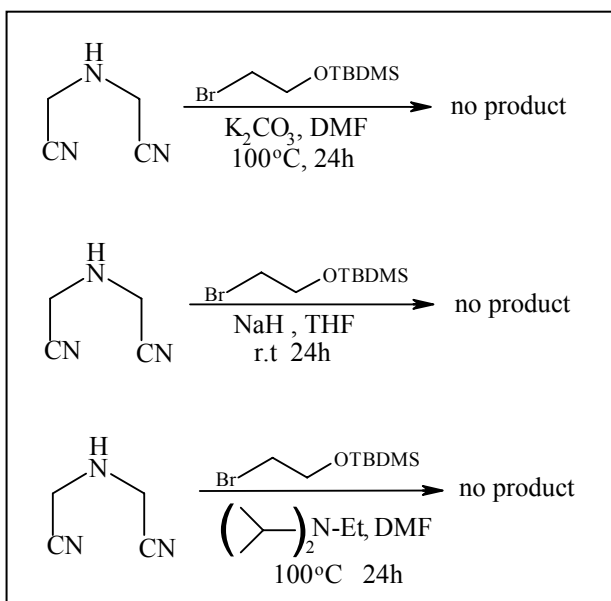


χρήση μιας πιο ισχυρής βάσης. Έτσι η αντίδραση επαναλαμβάνεται με τη χρήση NaH ως βάση.

Και σε αυτή την περίπτωση η αντίδραση δεν οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.^{[42], [43]} Η επόμενη προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε, περιλαμβάνει την χρήση της οργανικής βάσης N-αιθυλο-δισοπροπυλαμίνης, η οποία είναι διαλυτή στο DMF, έτσι ώστε να προκύψει ομογενές διάλυμα .



Η συγκεκριμένη αντίδραση δεν οδήγησε επίσης στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί, ότι οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και παρουσία της εμπορικά διαθέσιμης 2-βρωμοαιθανόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως αλκυλιωτικό μέσο με τη μορφή του αντίστοιχου σιλυλοαιθέρα (TBDMS).

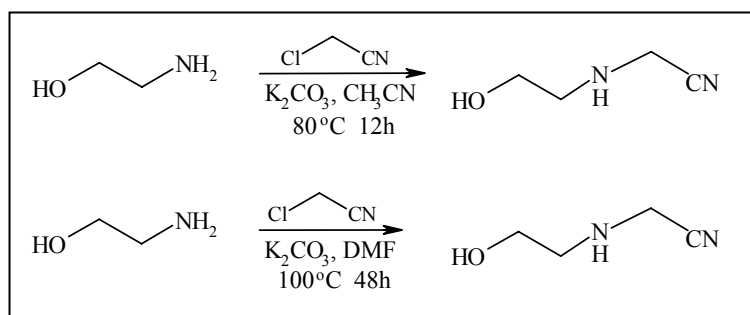


Όπως προκύπτει, τόσο η χρήση διαφορετικών βάσεων όσο και η αλλαγή του αλκυλιωτικού μέσου, δεν οδηγούν στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Για το λόγο αυτό αποφασίσθηκε η τροποποίηση της αντίστοιχης ρετροσυνθετικής πορείας.

Ρετροσυνθετική προσέγγιση Β

Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, 2-αμινοαιθανόλη και χλωροακετονιτρίλιο.

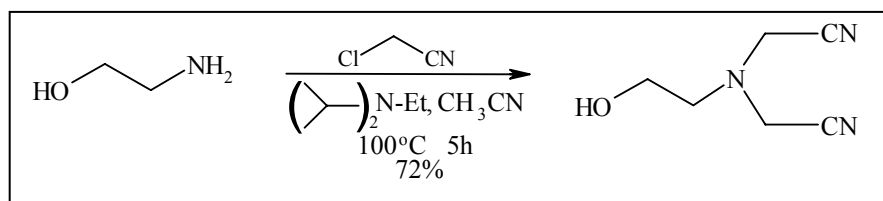
Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την προσπάθεια διαλκυλίωσης σε ένα στάδιο-της πρωτοταγούς αλειφατικής αμίνης, μέσω μιας χαρακτηριστικής S_N2 αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το K_2CO_3 ενώ ως αλκυλιωτικό μέσο το χλωροακετονιτρίλιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε CH_3CN και στη συνέχεια σε DMF. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ελεύθερη υδροξυλομάδα δεν αλκυλιώνεται στις παραπάνω συνθήκες αντίδρασης, επομένως δεν είναι απαραίτητη η χρήση κάποιας προστατευτικής ομάδας.^{[32], [44], [45], [46]}



Όπως φαίνεται στο σχήμα οι συγκεκριμένες αντιδράσεις, οδήγησαν αποκλειστικά στο σχηματισμό του μονοαλκυλιωμένου προϊόντος. Η χρήση μεγάλης περίσσειας αλκυλιωτικού και βάσης, αλλά και η παρατεταμένη θέρμανση δεν ευνόησαν το σχηματισμό του επιθυμητού διαλκυλιωμένου προϊόντος. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανότατα στην μικρή διαλυτότητα του ανθρακικού καλίου στους συγκεκριμένους διαλύτες (μη ομογενές διάλυμα) αλλά και στην δυσκολία διαλκυλίωσης των πρωτοταγών αλειφατικών αμινών χωρίς τη χρήση κάποιας ισχυρής βάσης.

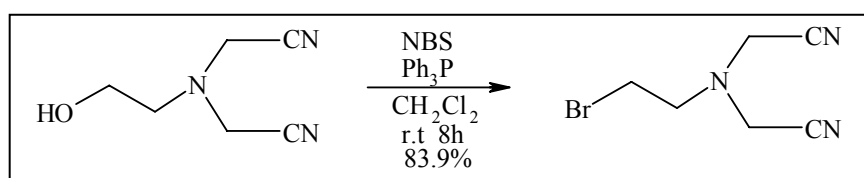
Η επόμενη προσπάθεια περιλαμβάνει τη χρήση της οργανικής βάσης Ν-αιθυλο-δισοπροπυλαμίνης, η οποία είναι διαλυτή τόσο στο CH_3CN όσο και στο DMF, έτσι ώστε να επιτευχθεί ομογενές διάλυμα. Επίσης αποφασίσθηκε η χρήση

αυτόκλειστου συστήματος έτσι ώστε η αντίδραση να πραγματοποιηθεί υπό αυξημένη πίεση.

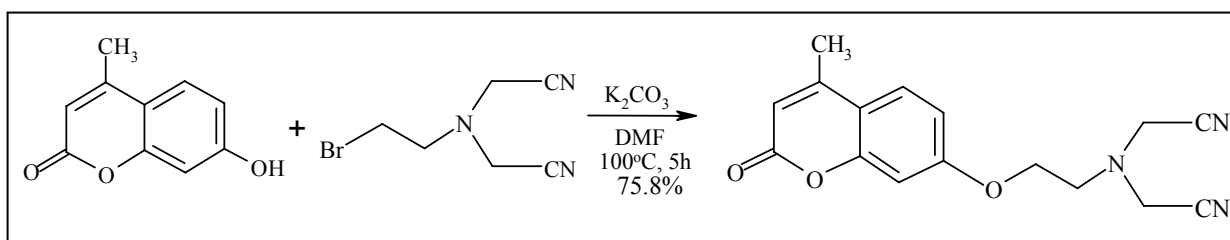


Με τις συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός της επιθυμητής διακυλιώμενης αμίνης σε αρκετά υψηλό ποσοστό (72%).

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μετατροπής της πρωτοταγούς αλκοόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο.^[31]



Ακολουθεί η αλκυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου της 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνης (χρωμοφόρο τμήμα) μέσω μιας χαρακτηριστικής S_N2 αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το K_2CO_3 . Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη.^[32]

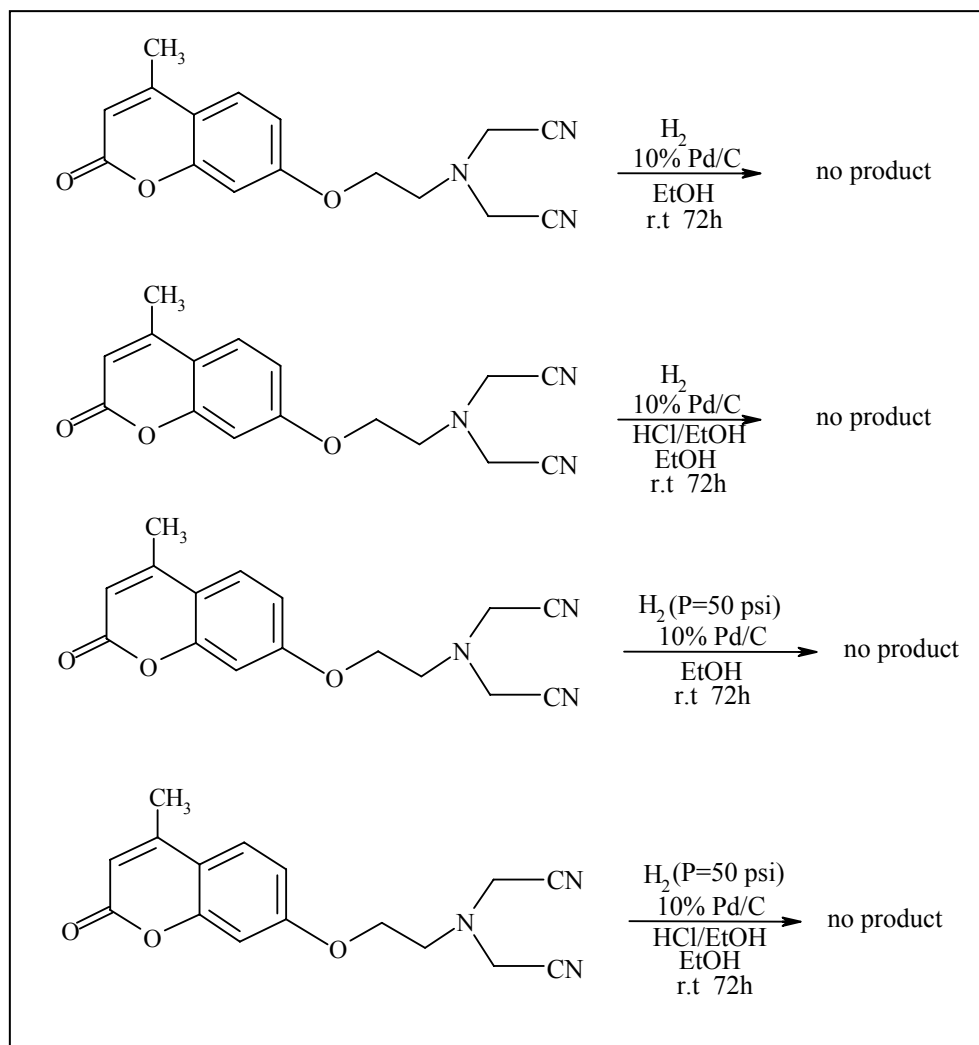


Το τελικό στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει τη αναγωγή των νιτριλίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες.

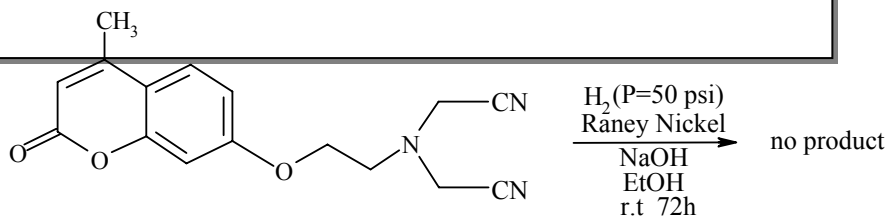
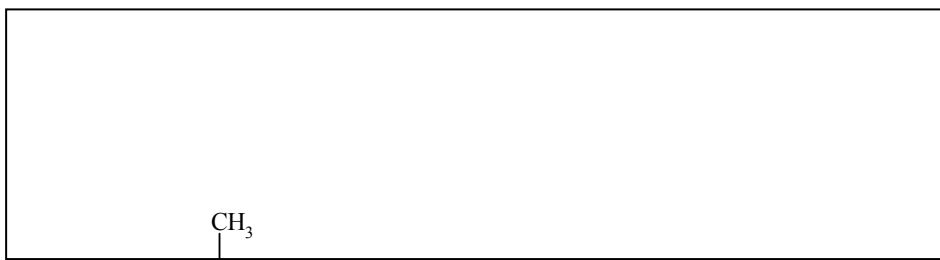
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα νιτρίλια μπορούν να αναχθούν σε πρωτοταγείς αμίνες με τη χρήση αναγωγικών αντιδραστηρίων όπως, $LiAlH_4$, $BH_3 \cdot Me_2S$, $NaOEt$, H_2 παρουσία καταλύτη και $NaBH_4$ παρουσία καταλύτη $CoCl_2$.^[30] Αντιδράσεις αναγωγής νιτριλίων οι οποίες περιλαμβάνουν καταλυτική υδρογόνωση συχνά οδηγούν στο σχηματισμό δευτεροταγών αμινών. Ο σχηματισμός των συγκεκριμένων παραπροϊόντων οφείλεται στο ενδιάμεσο της αναγωγής, το οποίο είναι μία ιμίνη. Η σχηματιζόμενη ιμίνη ανάγεται περαιτέρω σε πρωτοταγή αμίνη. Η

χρησιμοποιούνται επιτυχώς στις αναγωγές των νιτριλίων με τη χρήση ηπιότερων συνθηκών αντίδρασης.^[34]

Οι προσπάθειες καταλυτικής αναγωγής των νιτριλίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες που πραγματοποιήθηκαν, χωρίς όμως να οδηγήσουν στο σχηματισμό του τελικού επιθυμητού προϊόντος παρουσιάζονται παρακάτω.



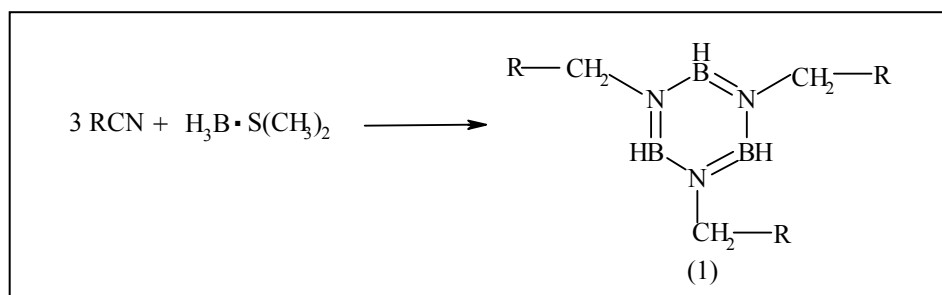
Όπως φαίνεται η χρήση ισχυρά όξινων συνθηκών (pH=3-4) και αυξημένης πίεσης υδρογόνου, αλλά και η παρατεταμένη διάρκεια των αντιδράσεων δεν οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος, αλλά στην παραλαβή μετά την επεξεργασία των αντιδράσεων της αρχικής ένωσης. Στα ίδια αποτελέσματα μας οδήγησε και η πραγματοποίηση της αναγωγής με καταλύτη Raney Nickel σε πίεση υδρογόνου P=50psi.



Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρόλο που η χρήση του καταλύτη Raney Nickel είναι επιτυχής στις αναγωγές νιτριλίων, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στην εφαρμογή της μεθόδου. Έτσι στην περίπτωση που η αντίδραση πραγματοποιείται σε μικρές ποσότητες (10mmol νιτριλίου ή λιγότερο), οι αποδόσεις είναι πολύ χαμηλές, πιθανότατα λόγω προσροφήσεως του αντιδρώντος ή του προϊόντος στην επιφάνεια του καταλύτη.^[47] Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιήθηκε με 0.067mmol (20mgr) νιτριλίου, επομένως η μη επιτυχής έκβαση της μπορεί να αποδοθεί στην πολύ μικρή ποσότητα αντιδρώντος.

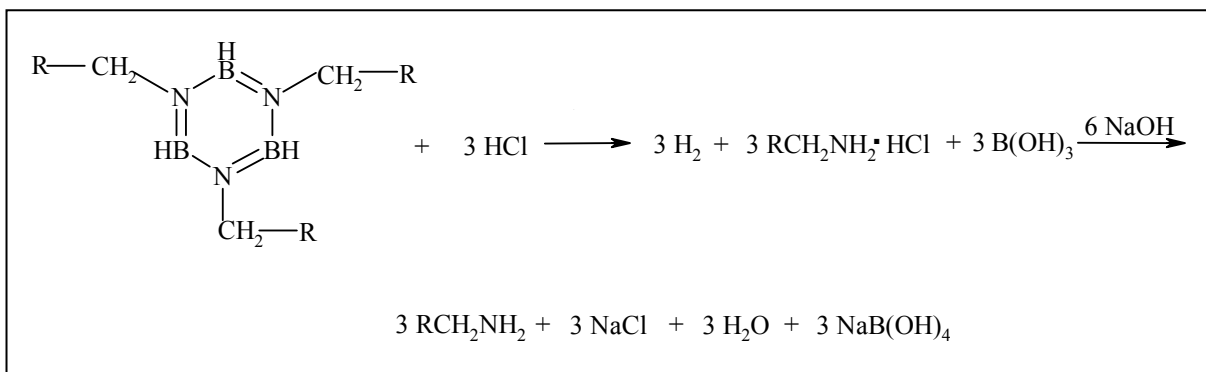
Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλες τις καταλυτικές προσπάθειες αναγωγής των νιτριλίων που προαναφέρθηκαν η κουμαρίνη (χρωμοφόρο τμήμα) δεν υφίσταται καμία αναγωγή.

Η επόμενη προσπάθεια αναγωγής των νιτριλίων περιλαμβάνει τη χρήση του αντιδραστήριου $H_3B \cdot S(CH_3)_2$ (Borane-Dimethyl Sulfide). Η αναγωγή των νιτριλίων παρουσία του συγκεκριμένου αντιδραστήριου, πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ενός ενδιάμεσου βοραζίνης (1).^[48]



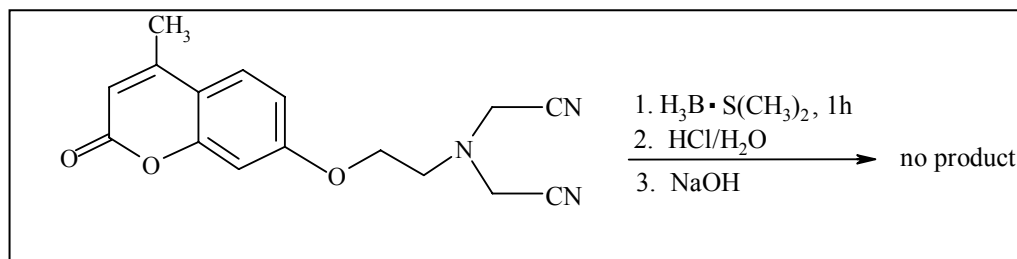
Σχήμα 25: Σχηματισμός του ενδιάμεσου της βοραζίνης (1)

Το ενδιάμεσο της βοραζίνης στη συνέχεια διασπάται με προσθήκη HCl 6N προς το αντίστοιχο αμμωνιακό αλάτι της πρωτοταγούς αμίνης. Η ουδέτερη μορφή της αμίνης λαμβάνεται μετά από εξουδετέρωση με NaOH.



Σχήμα 26: Διάσπαση του ενδιάμεσου της βοραζίνης

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και με αρκετά καλές αποδόσεις μέθοδο αναγωγής νιτριλίων. Επίσης στις συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης η ομάδα της λακτόνης δεν υφίσταται αναγωγή προς την αντίστοιχη γλυκόλη σε αντίθεση με τις αντιδράσεις υδροβορώσεως.^[49] Με βάση τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε η επόμενη αντίδραση.

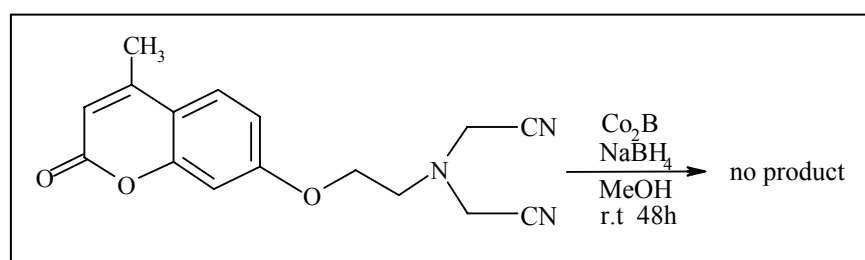


Όπως φαίνεται, μέσω της συγκεκριμένης αντίδρασης δεν επιτυγχάνεται ο σχηματισμός του επιθυμητού τελικού προϊόντος (ανάκτηση της μεγαλύτερης ποσότητας του αντιδρώντος). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανότατα στη δυσκολία σχηματισμού ή υδρόλυσης του ενδιάμεσου της βοραζίνης, καθώς δεν πρόκειται για ένα απλό αλειφατικό ή αρωματικό νιτρίλιο αλλά για ένα δινιτρίλιο το οποίο περιλαμβάνει μια σχετικά μεγάλη και ογκώδη αλυσίδα.

Σε μία τελευταία προσπάθεια αναγωγής των νιτριλίων αποφασίστηκε η χρήση του αντιδραστήριου NaBH₄ παρουσία καταλύτη CoCl₂. Ο συνδυασμός του NaBH₄ με αλογονίδια του Co(II), Ni(II), Cu(II) και Rh(III), έχει βρεθεί ότι ανάγει δραστικές ομάδες όπως νιτρίλια, αμίδια και ολεφίνες. Οι συγκεκριμένες ομάδες δεν ανάγονται από το NaBH₄. Η αντίδραση του NaBH₄ με το CoCl₂ σε αιθανόλη οδηγεί στο

σχηματισμό ενός μαύρου στερεού προϊόντος, του Co_2B . Η συγκεκριμένη ένωση προσδένεται σε ορισμένες χαρακτηριστικές ομάδες και καταλύει την ετερογενή αναγωγή τους από το NaBH_4 . Αυτό που δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα είναι αν το ελεύθερο NaBH_4 αποτελεί τον ενεργό δότη του υδριδίου. Υπάρχει η πιθανότητα τα υδρίδια να προέρχονται από πιο πολύπλοκες αναγωγικές ενώσεις, οι οποίες σχηματίζονται πάνω στην επιφάνεια του βοριδίου. Στις ενώσεις αυτές μπορούν να συμπεριληφθούν πολυπυρηνικά γεφυρώμενα βοροϋδρίδια καθώς και σύμπλοκα Co-H .^[50]

Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η αναγωγή των νιτριλίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες, παρουσιάζεται παρακάτω.



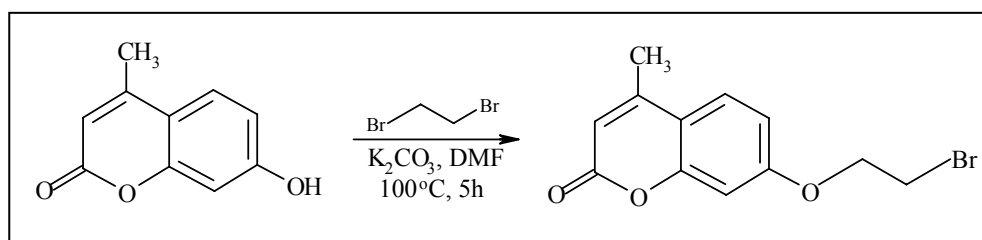
Η συγκεκριμένη αντίδραση δεν οδήγησε στο σχηματισμό του τελικού προϊόντος ακόμα και με τη χρήση περίσσειας Co_2B και NaBH_4 . Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να αποδοθεί σε συγκεκριμένους λόγους από τη στιγμή που ο μηχανισμός μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η συγκεκριμένη αναγωγή παραμένει άγνωστος.

Εξαιτίας της μεγάλης δυσκολίας αναγωγής των νιτριλίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες, αποφασίσθηκε η τροποποίηση της ρετροσυνθετικής πορείας.

Ρετροσυνθετική προσέγγιση Γ

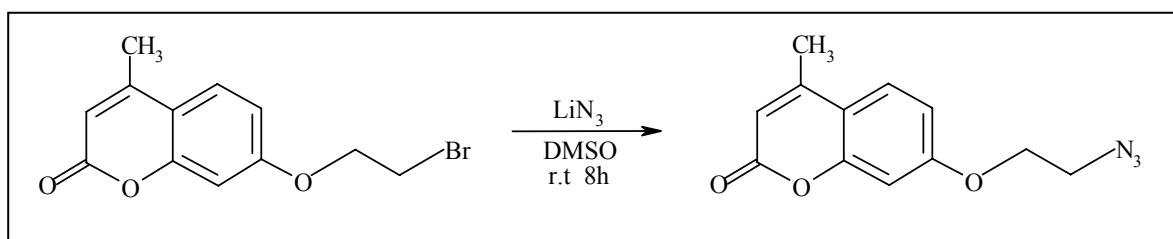
Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη (χρωμοφόρο τμήμα) και 1,2-διβρωμοαιθάνιο.

Στο πρώτο στάδιο της σύνθεσης πραγματοποιήθηκε η αλκυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου της κουμαρίνης, μέσω μιας χαρακτηριστικής $\text{S}_{\text{N}}2$ αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το K_2CO_3 ενώ ως αλκυλιωτικό μέσο η ένωση 1,2-διβρωμοαιθάνιο. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη.^[32]

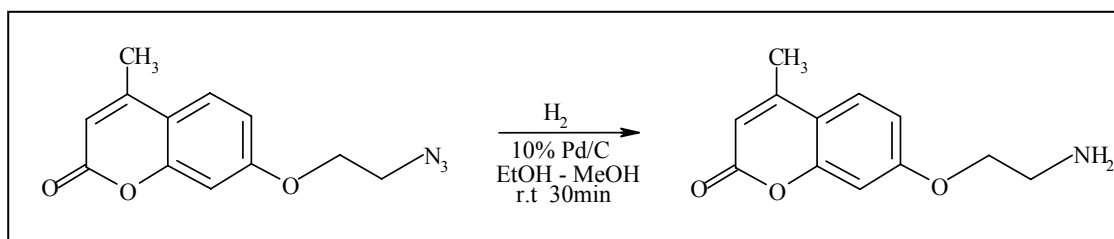


Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υδρογονόλυση των αζιδίων παρέχει ένα εύκολο τρόπο εισαγωγής της αμινομάδας στις οργανικές ενώσεις. Η αντίδραση αναγωγής τους σε συνδυασμό με την αντίδραση $RX \rightarrow RN_3$, αποτελεί μια σημαντική μέθοδο μετατροπής των αλκυλαλογονιδίων στις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες.

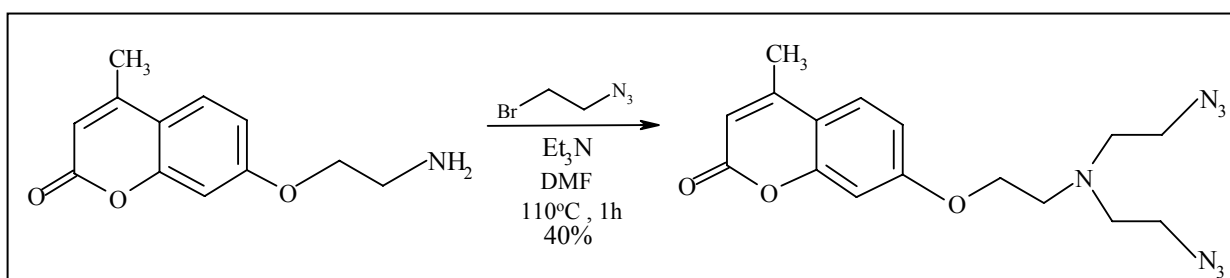
Έτσι το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη μετατροπή του βρωμιδίου στο αντίστοιχο αζίδιο, μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής με χρήση του LiN_3 .



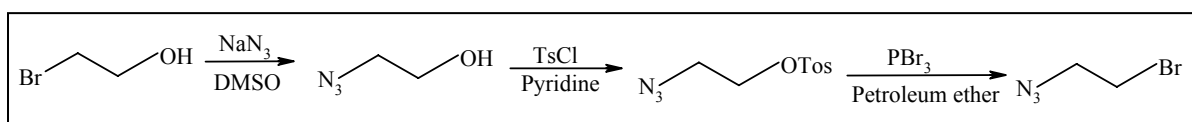
Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την καταλυτική αναγωγή του αζιδίου προς την αντίστοιχη πρωτοταγή αμίνη παρουσία 10% Pd/C.



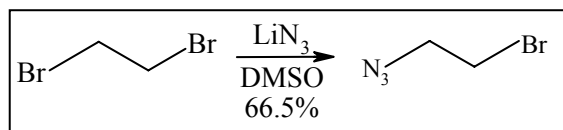
Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η ταυτόχρονη διαλκυλίωση-σε ένα στάδιο-της πρωτοταγούς αμίνης μέσω μιας SN_2 αντίδρασης. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε η Et_3N ενώ ως αλκυλιωτικό μέσο η ένωση 2-αζιδοβρωμοαιθάνιο. Η αντίδραση έγινε σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη.



Η ένωση 2-αζιδοβρωμοαιθάνιο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία παρασκευάζεται από την εμπορικά διαθέσιμη ένωση 2-βρωμοαιθανόλη μέσω μιας διαδικασίας τριών σταδίων.^[51]

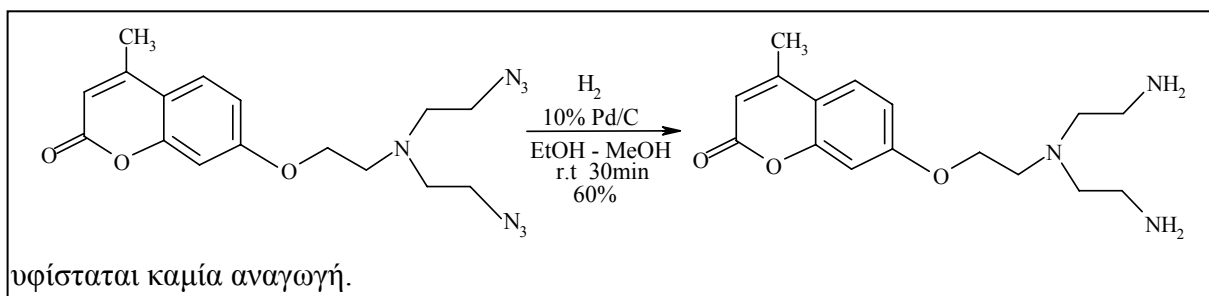


Για την αποφυγή των τριών σταδίων παρασκευής, η ένωση 2-αζιδοβρωμοαιθάνιο συντέθηκε εργαστηριακά από την ένωση 1,2-διβρωμοαιθάνιο με επίδραση διαλύματος LiN_3 σε DMSO.



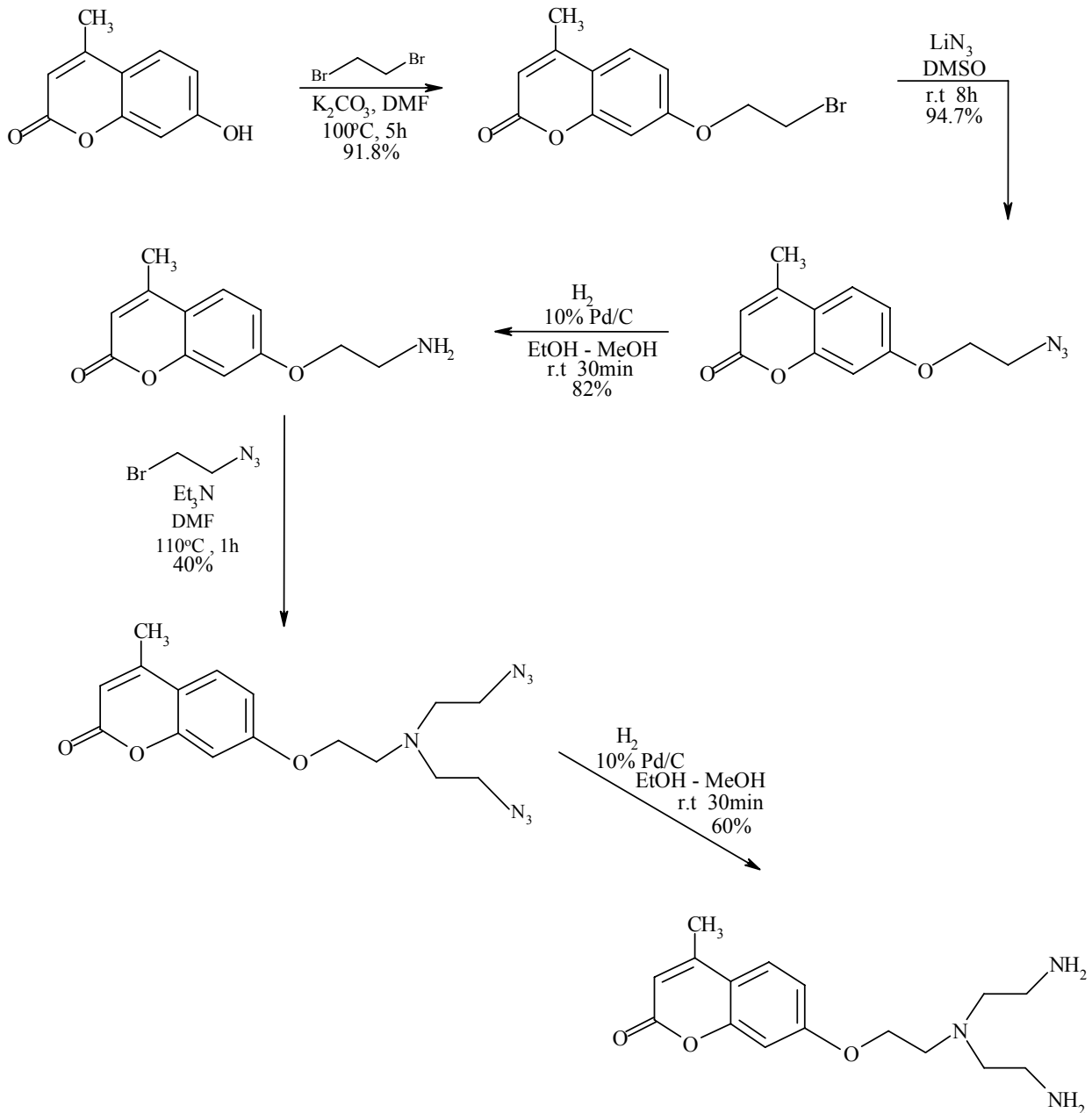
Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός του αντίστοιχου διαζιδίου, το 1,2-διβρωμοαιθάνιο χρησιμοποιείται σε μεγάλη περίσσεια και η προσθήκη του LiN_3 ολοκληρώνεται μετά από την παρέλευση 24h. Επομένως με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν σε ένα στάδιο και αποφεύγεται ο σχηματισμός του αντίστοιχου διαζιδίου.

Στο τελικό στάδιο της σύνθεσης του Δείκτη 3 πραγματοποιήθηκε η καταλυτική αναγωγή των αζιδίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ατμοσφαιρική πίεση και παρουσία 10% Pd/C. Στις συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, η κουμαρίνη παραμένει ανέπαφη και δεν



Επομένως με τη χρήση του παραπάνω συνθετικού σχήματος οδηγούμαστε στον επιτυχή σχηματισμό του επιθυμητού **Δείκτη 3 (4-μεθυλο-7-[N,N-δισ(2-αμινοαιθυλο)-2-αμινοαιθοξυ]κουμαρίνη)**.

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΔΕΙΚΤΗ 3



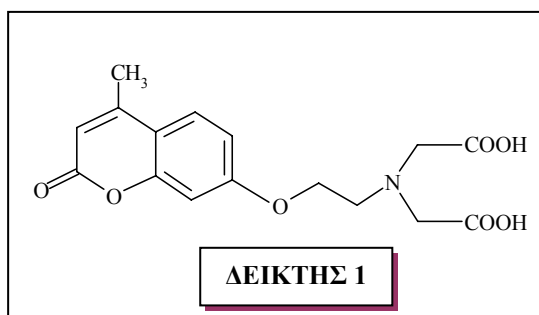
Συνολική Απόδοση 17%

ΔΕΙΚΤΗΣ 3

Δ. Μελέτες φθορισμού

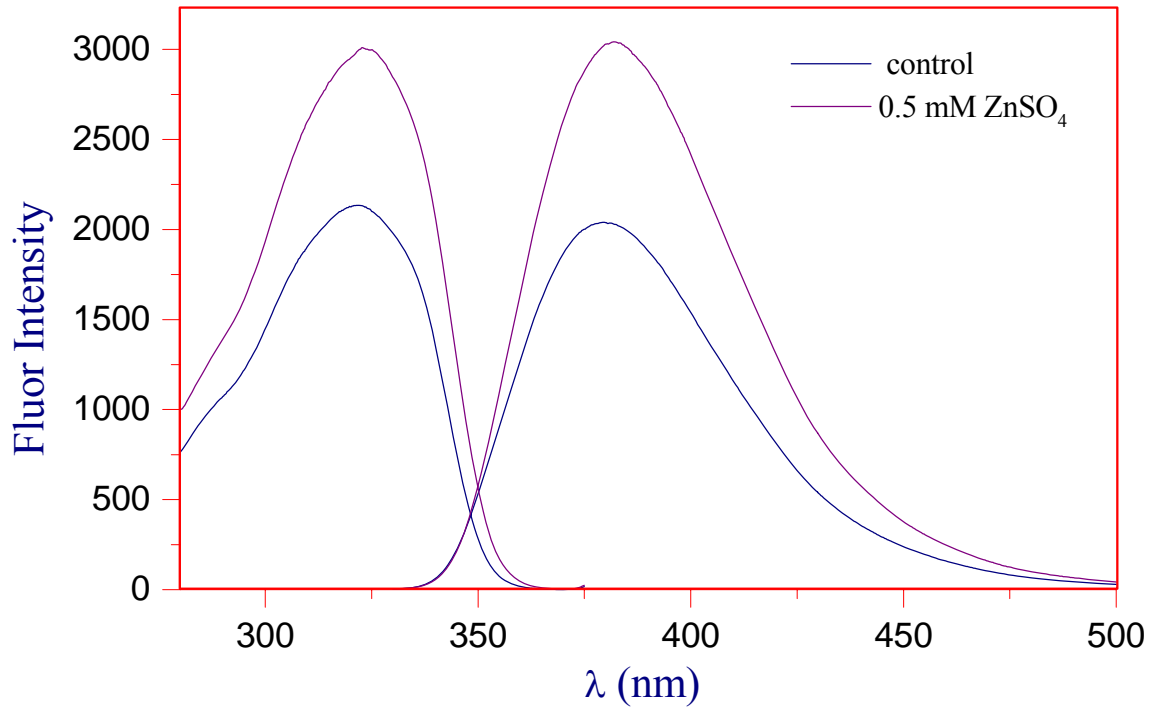
Οι προκαταρκτικές μελέτες φθορισμού δύο εκ των τελικών δεικτών ψευδαργύρου που συντέθηκαν, καθώς και δύο πρόδρομων ενώσεων πραγματοποιήθηκαν από τον καθηγητή Alan R. Kay στο Πανεπιστήμιο της Iowa των Ηνωμένων Πολιτειών. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις παραπάνω μελέτες παρουσιάζονται παρακάτω.

Δ1. Φθορισμομετρικές μελέτες του Δείκτη 1

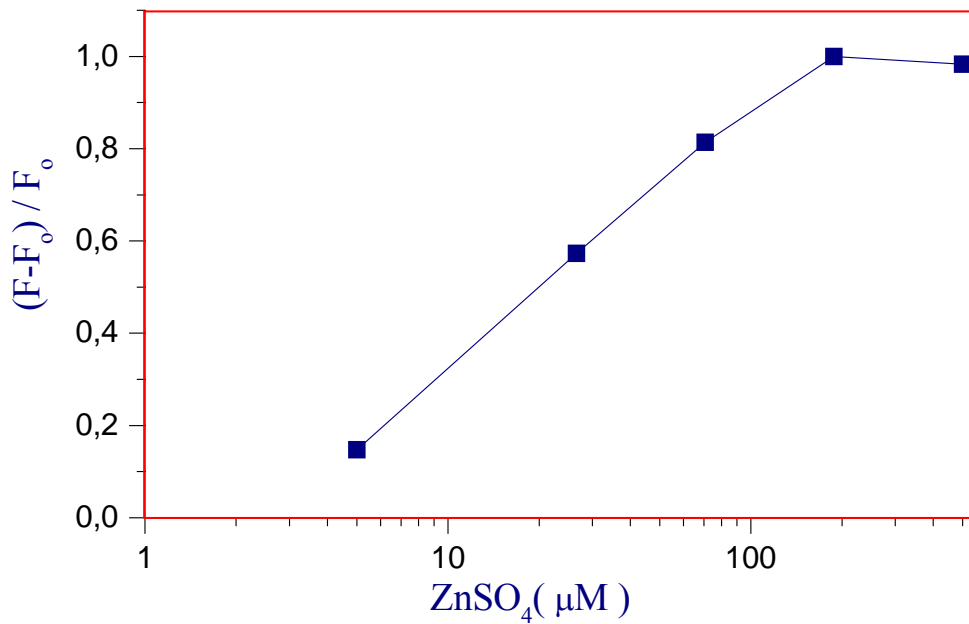


Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140mM NaCl, 10mM HEPES και 10μM του Δείκτη 1. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.4 στους 25°C. Από τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη προκύπτει ένα μέγιστο διεγέρσεως στα 321nm και ένα μέγιστο εκπομπής στα 383 nm. Προσθήκη 2mM EGTA οδήγησε σε μείωση της έντασης σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Προσθήκη 0.5mM CaCl₂ οδήγησε σε αύξηση της έντασης κατά 6.9% ενώ προσθήκη 0.5mM ZnSO₄ σε αύξηση της έντασης κατά 49%. Το μέγιστο στο φάσμα εκπομπής μετατοπίζεται κατά 2nm με την προσθήκη του ψευδαργύρου. Τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη και του δείκτη μετά την προσθήκη 0.5mM ZnSO₄ καθώς και το διάγραμμα της έντασης φθορισμού σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ZnSO₄ που προστίθεται στο διάλυμα του ελεύθερου δείκτη παρουσιάζονται στα επόμενα σχήματα.

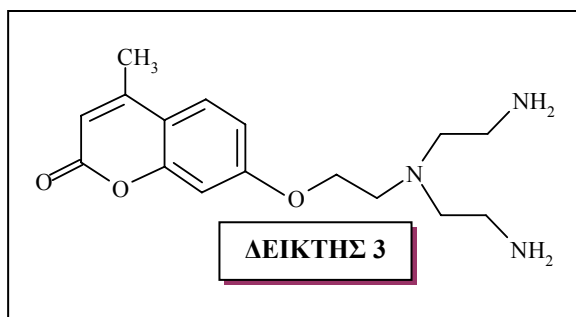


Σχήμα 27: Φάσμα διεγέρσεως ($\lambda_{em}=383\text{nm}$) του ελεύθερου δείκτη και φάσματα εκπομπής ($\lambda_{ex}=321$) του δείκτη σε συγκεντρώσεις $0.0\mu\text{M}$ και 0.5mM ZnSO_4



Σχήμα 28: Διάγραμμα της έντασης φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης ZnSO_4

Δ2. Φθορισμομετρικές μελέτες του Δείκτη 3

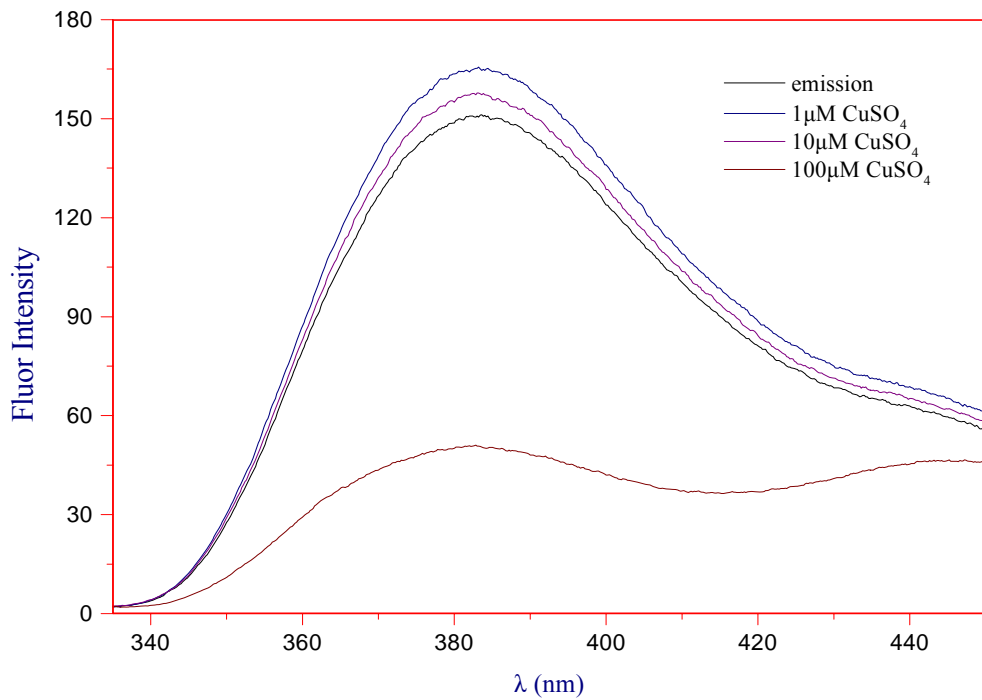
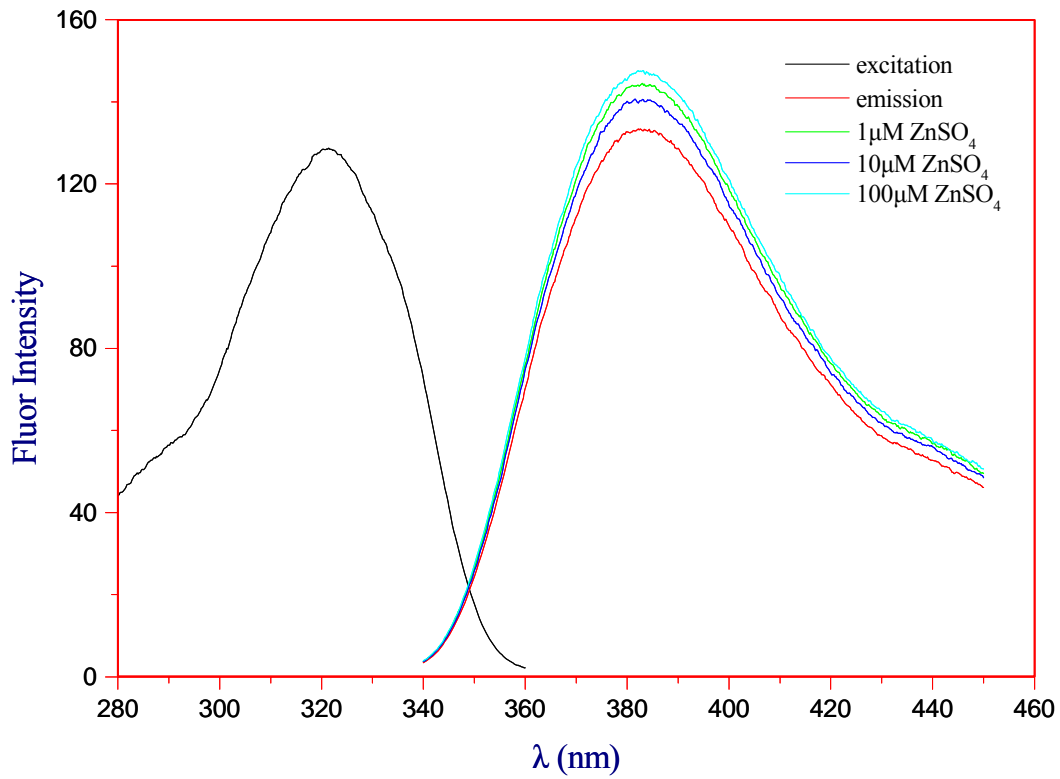


Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM HEPES και 10μM του Δείκτη 3. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.4 στους 25°C. Από τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη προκύπτει ένα μέγιστο διεγέρσεως στα 321nm και ένα μέγιστο εκπομπής στα 383 nm. Προσθήκη 1mM EGTA απουσία ψευδαργύρου οδήγησε σε μείωση της έντασης σε ποσοστό 2%. Προσθήκη 1μM ZnSO₄ οδήγησε σε αύξηση της έντασης κατά 6% ενώ η προσθήκη επιπλέον 110μM ZnSO₄ επέφερε πολύ μικρή αύξηση της έντασης. Προσθήκη 1μM CuSO₄ οδήγησε σε μικρή αύξηση της έντασης ενώ προσθήκη επιπλέον 110μM CuSO₄ είχε ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού.

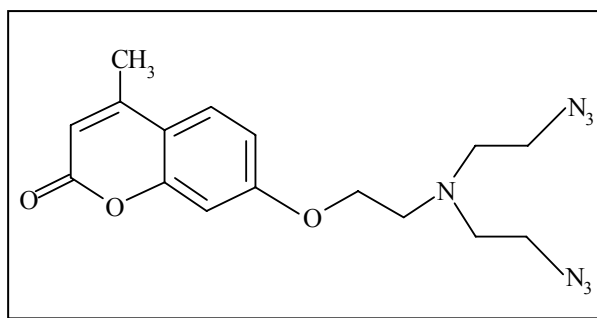
Η προσθήκη του CuSO₄ γίνεται για να διαπιστωθεί αν ο δείκτης έχει την δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ιόντων. Ο χαλκός συνήθως δεσμεύεται πιο ισχυρά από τον ψευδάργυρο και το ασβέστιο στα περισσότερα ligands και προκαλεί απόσβεση του φθορισμού. Έτσι προσθήκη χαλκού σε χαμηλές συγκεντρώσεις πρέπει να επιφέρει απόσβεση του φθορισμού στην περίπτωση που το ιόν προσδένεται ισχυρά στο δείκτη.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, προσθήκη μικρής συγκέντρωσης CuSO₄ δεν οδήγησε σε απόσβεση του φθορισμού αλλά αντίθετα σε μικρή αύξηση της έντασης γεγονός που υποδεικνύει ότι ο δείκτης εμφανίζει μικρή τάση προς ένωση για τα συγκεκριμένα ιόντα (logK~5). Τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη και του δείκτη μετά την προσθήκη ZnSO₄ και CuSO₄ παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.



□□□ **Σχήμα 29:** Φάσμα διεγέρσεως ($\lambda_{em}=383nm$) του ελεύθερου δείκτη και φάσματα εκπομπής ($\lambda_{ex}=321$) του δείκτη σε συγκεντρώσεις 0.0μM, 1.0μM, 10.0μM και 100.0μM ZnSO₄ και 0.0μM, 1.0μM, 10.0μM και 100.0μM CuSO₄

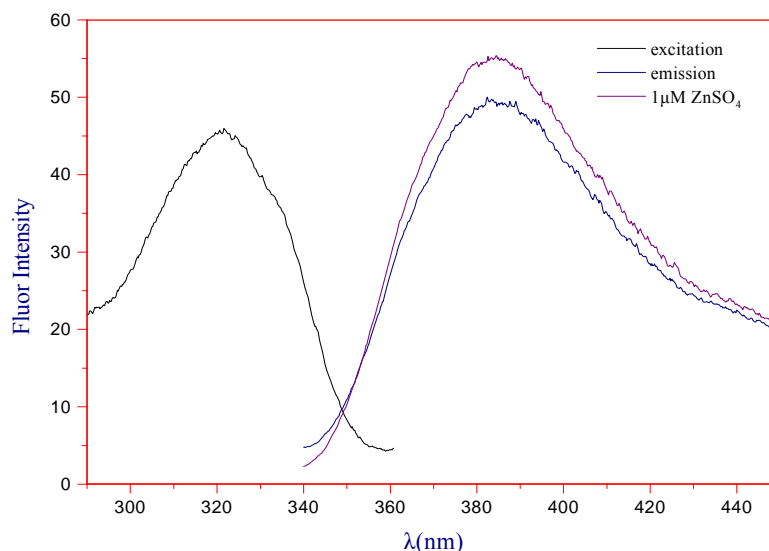
Δ3. Φθορισμομετρικές μελέτες της Ένωσης 16



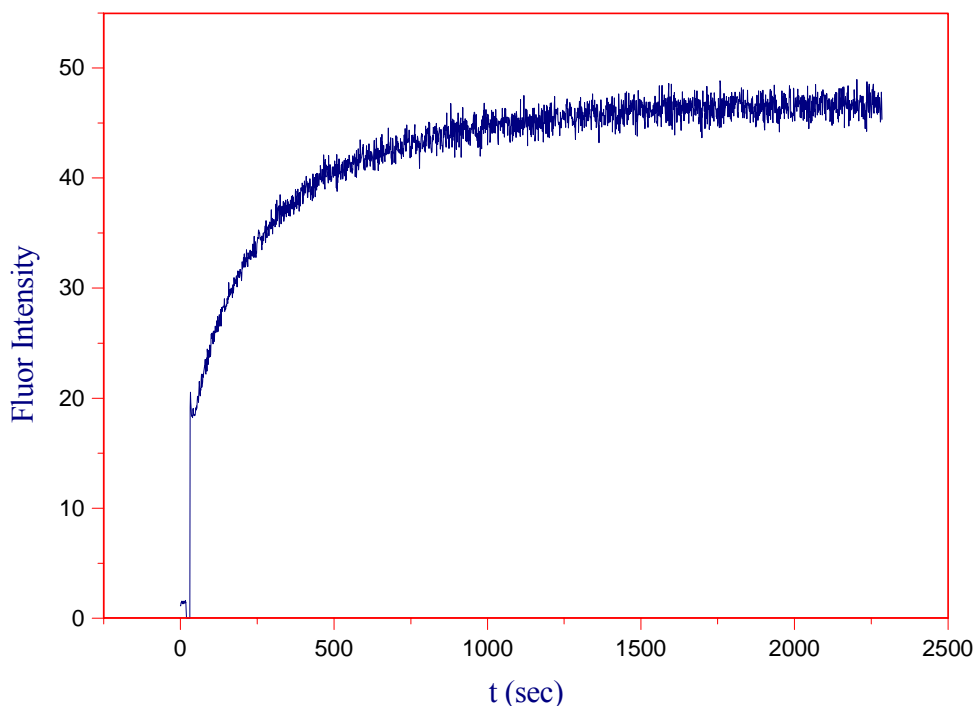
Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM HEPES και 10μM του Δείκτη 3. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.4 στους 25°C. Από τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη προκύπτει ένα μέγιστο διεγέρσεως στα 321nm και ένα μέγιστο εκπομπής στα 383 nm. Προσθήκη 1μM ZnSO₄ οδήγησε σε αύξηση της έντασης κατά 14% φθορισμού ενώ η προσθήκη επιπλέον 10μM ZnSO₄ δεν επέφερε αλλαγή στην ένταση. Η προσθήκη 20μM CuSO₄ δεν επέφερε καμία αλλαγή στο φθορισμό.

Τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη και του δείκτη μετά την προσθήκη ZnSO₄ παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 30: Φάσμα διεγέρσεως ($\lambda_{ex}=321\text{nm}$) του ελεύθερου δείκτη και φάσματα εκπομπής ($\lambda_{em}=383\text{nm}$) του δείκτη σε συγκεντρώσεις 0.0μM και 1.0μM ZnSO₄



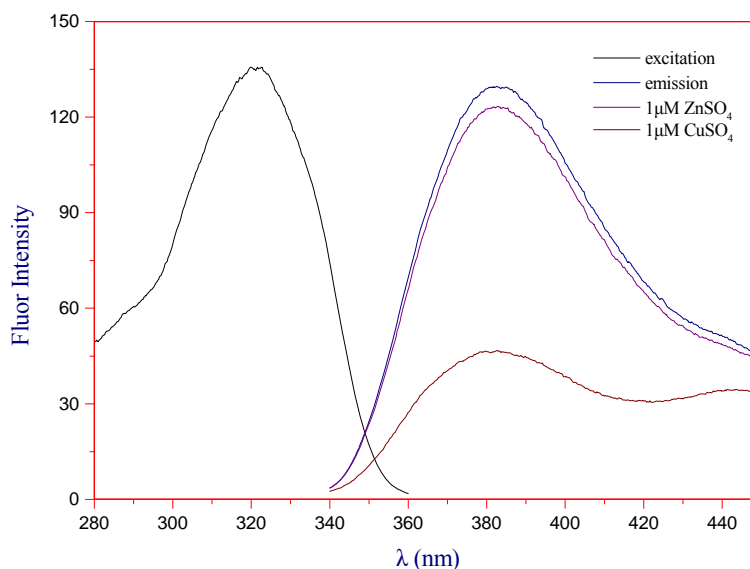
Σχήμα 31: Διάγραμμα έντασης φθορισμού της Ένωσης 16 απουσία ψευδαργύρου συναρτήσει του χρόνου.

Παρατηρήθηκε ότι ο φθορισμός της ένωσης 16 κατά την παραμονή της σε διάλυμα απουσία ψευδαργύρου αυξάνεται κατά 150% με $t_{1/2} = 4.2\text{min}$. Το διάγραμμα της έντασης του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα.

Το γεγονός ότι αυξάνεται η ένταση φθορισμού της ελεύθερης ένωσης με την πάροδο του χρόνου, μπορεί να συνεισφέρει στην αύξηση της έντασης κατά την προσθήκη του ZnSO_4 . Για το λόγο αυτό τα φάσματα φθορισμού θα πρέπει να ληφθούν μετά την σταθεροποίηση της έντασης φθορισμού της ελεύθερης ένωσης.

Δ4. Φθορισμομετρικές μελέτες της Ένωσης 18

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:



Σχήμα 32: Φάσμα διεγέρσεως ($\lambda_{ex}=321\text{nm}$) του ελεύθερου δείκτη και φάσμα εκπομπής ($\lambda_{em}=383\text{nm}$) του δείκτη σε συγκεντρώσεις $1.0\mu\text{M ZnSO}_4$ και $40.0\mu\text{M CuSO}_4$.

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140mM NaCl , 2.5mM KCl , 10mM HEPES και $10\mu\text{M}$ της ένωσης 18. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.4 στους 25°C . Από τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη προκύπτει ένα μέγιστο διεγέρσεως στα 321nm και ένα μέγιστο εκπομπής στα 383 nm . Προσθήκη $1\mu\text{M ZnSO}_4$ οδήγησε σε μικρή ελάττωση της έντασης ενώ η προσθήκη επιπλέον $40\mu\text{M CuSO}_4$ είχε ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού.

Τα φάσματα φθορισμού του ελεύθερου δείκτη και του δείκτη μετά την προσθήκη ZnSO_4 και CuSO_4 παρουσιάζονται στο επόμενο σχήμα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι προκαταρκτικές μελέτες φθορισμού των δεικτών ψευδαργύρου που συντέθηκαν, οδήγησαν στην συλλογή αρχικών πληροφοριών οι οποίες αφορούν την συναρμογή των ενώσεων με τον ψευδάργυρο, τις επαγόμενες διακριτές αλλαγές στα φάσματα φθορισμού τους τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων του ιόντος στις οποίες αποκρίνονται οι δείκτες, καθώς και την εκλεκτικότητα των ενώσεων ως προς τον ψευδάργυρο παρουσία ιόντων ασβεστίου. Μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη των δεικτών ψευδαργύρου περιλαμβάνει, τον υπολογισμό των σταθερών διάστασης και της κβαντικής απόδοσης των φασμάτων φθορισμού συμπλόκων ψευδαργύρου, την εξάρτηση των σταθερών διάστασης από την μεταβολή του pH, καθώς και την εκλεκτικότητα των ενώσεων ως προς τον ψευδάργυρο παρουσία άλλων ιόντων (π.χ Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}).

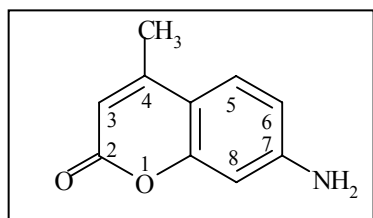
Ο υπολογισμός της σταθεράς διάστασης ενός δείκτη με ένα ιόν είναι απαραίτητος, καθώς μέσω της σταθεράς διάστασης είναι δυνατό να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων του ιόντος που ο δείκτης μπορεί να ανιχνεύσει και κατά συνέπεια καθορίζεται το πεδίο στο οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Ένας δείκτης είναι χρήσιμος όταν ισχύει ότι $0.1 K_d < [M^{n+}] < 10 K_d$.

Η εξάρτηση των σταθερών διάστασης από τη μεταβολή του pH σε κλίμακα από 6.0 έως 8.0 θα καθορίσει την καταλληλότητα χρήσης των δεικτών σε φυσιολογικά επίπεδα pH (~7.4). Το γεγονός ότι τα φάσματα φθορισμού ενός δείκτη δεν επηρεάζονται αισθητά από τις μεταβολές του pH στην περιοχή αυτή, υποδηλώνει ότι η ένωση δεν πρωτονιώνεται σε αυτό το εύρος pH και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φυσιολογικά επίπεδα χωρίς να επηρεάζονται οι μετρήσεις.

Η παρουσία άλλων ιόντων σε συγκεντρώσεις κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα, καθώς και η επίδραση των ιόντων αυτών στα φάσματα φθορισμού ενός ελεύθερου δείκτη και του συμπλόκου δείκτη-ψευδαργύρου καθορίζουν την εκλεκτικότητα του δείκτη για τον ψευδάργυρο. Το γεγονός ότι η παρουσία των ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν επηρεάζει τα φάσματα φθορισμού τόσο του δείκτη όσο και του συμπλόκου του με τον ψευδάργυρο, δηλώνει πως ο συγκεκριμένος δείκτης δεν συναρμόζεται με κανένα από αυτά τα ιόντα και εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τον ψευδάργυρο.

Για την βελτίωση των οπτικών ιδιοτήτων των δεικτών μπορούν να γίνουν επεμβάσεις στο χρωμοφόρο τμήμα των ενώσεων.

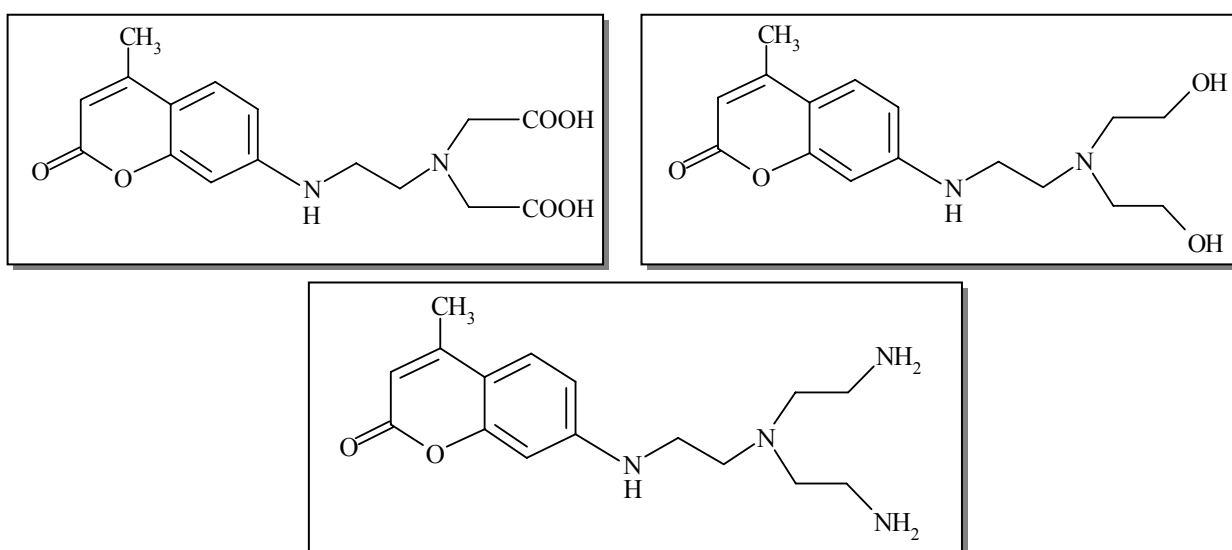
Από μελέτες φθορισμού που έχουν πραγματοποιηθεί σε μη-υποκατεστημένες κουμαρίνες και στα αντίστοιχα υποκατεστημένα παράγωγα τους, προκύπτει ότι ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες στη θέση 3 καθώς και ηλεκτρονιοδοτικές ομάδες στις θέσεις 4, 6 ή 7 προκαλούν αύξηση στο μήκος κύματος αλλά και στην ένταση του φθορισμού. Όταν ο υποκαταστάτης καταλαμβάνει την 7 θέση της 4-μεθυλοκουμαρίνης, η μετατόπιση στο μήκος κύματος του φθορισμού είναι



Σχήμα 39: Δομή της 4-μεθυλο-7-αμινοκουμαρίνης

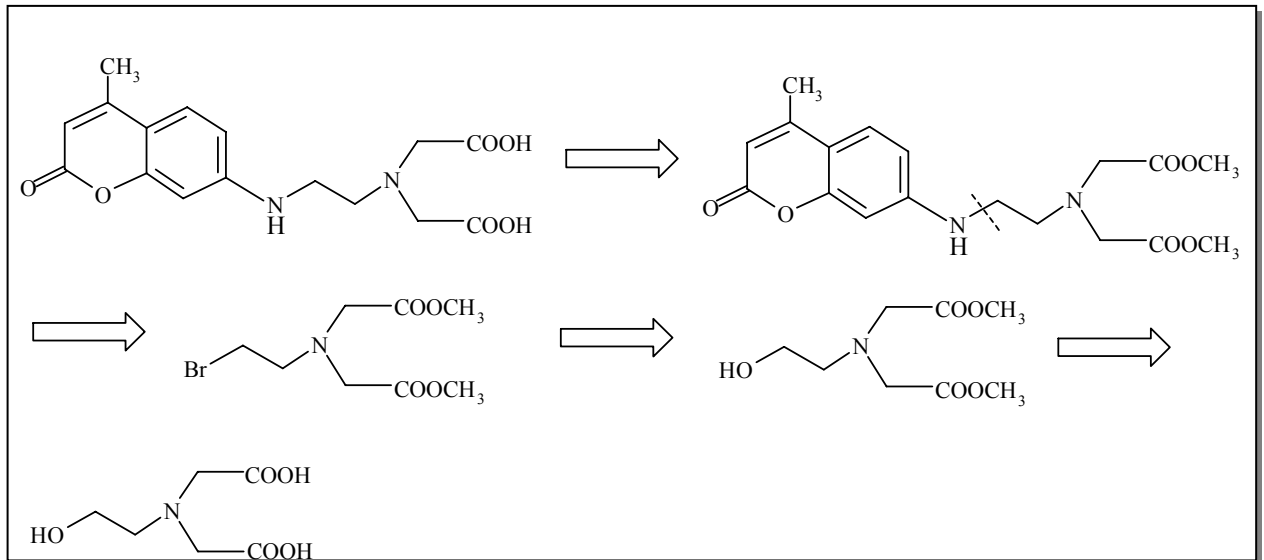
μεγαλύτερη στην περίπτωση της υποκατεστημένης με αμινο ομάδες από αυτήν της υποκατάστασης με υδρόξυ ομάδες. Επομένως, αντικατάσταση της 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνης από την 4-μεθυλο-7-αμινοκουμαρίνη μπορεί να επιφέρει αύξηση στην ένταση αλλά και μετατόπιση του μεγίστου φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Με βάση τα παραπάνω σχεδιάστηκαν και τέθηκαν ως συνθετικοί στόχοι οι παρακάτω ενώσεις.

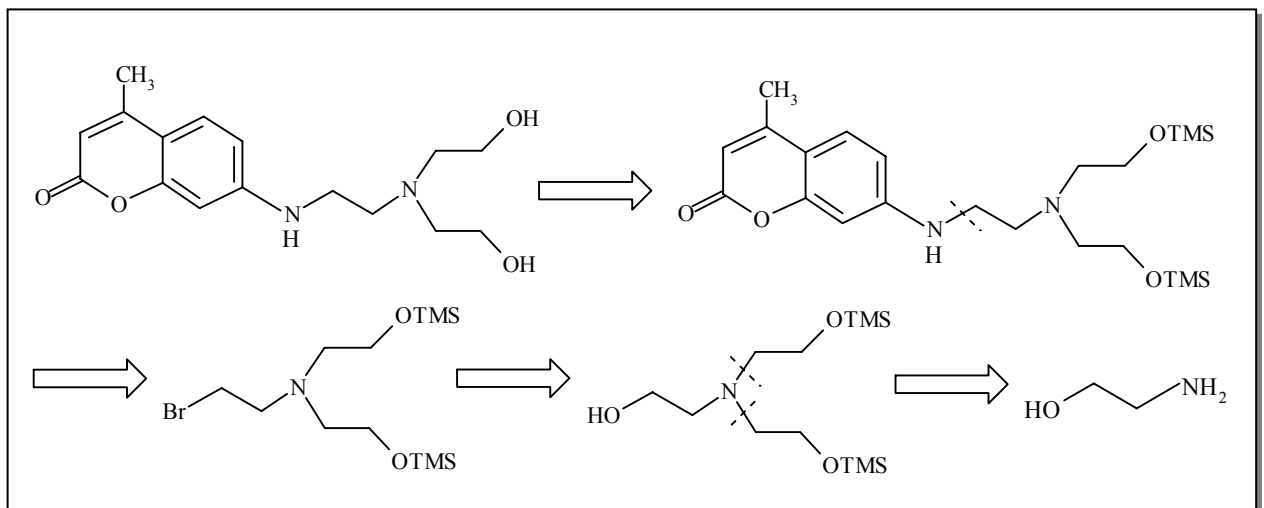


Τα αντίστοιχα ρετροσυνθετικά σχήματα που πρόκειται να ακολουθηθούν παρουσιάζονται παρακάτω.

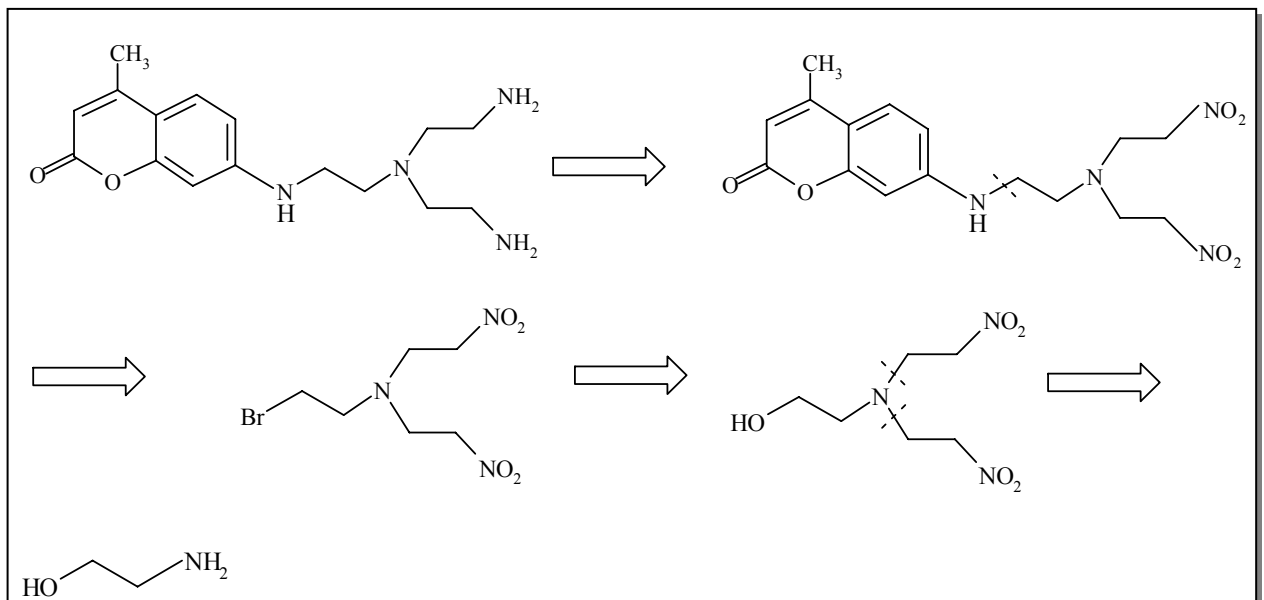
Ρετροσυνθετική Προσέγγιση Ένωσης 4



Ρετροσυνθετική Προσέγγιση Ένωσης 5



Ρετροσυνθετική Προσέγγιση Ένωσης 6



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου. Όπου απαιτήθηκαν ξηρές συνθήκες, οι σφαιρικές φιάλες πυράνθηκαν σε υψηλό κενό.

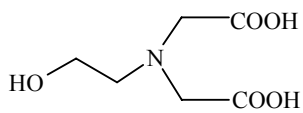
Οι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας (Ethyl acetate) και πετρελαϊκός αιθέρας αποστάχθηκαν παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5). Οι διαλύτες διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) και ακετονιτρίλιο αποστάχθηκαν παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και φυλάχθηκαν σε μοριακά κόσκινα μεγέθους 3A. Ο διαλύτης διμεθυλο-φορμαμίδιο (DMF) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) αποστάχθηκαν παρουσία υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) και φυλάχθηκαν σε μοριακά κόσκινα μεγέθους 3A. Τέλος οι διαλύτες μεθανόλη και αιθανόλη αποστάχθηκαν παρουσία μαγνησίου και φυλάχθηκαν σε μοριακά κόσκινα μεγέθους 3A.

Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε υάλινα πλακίδια επιστρωμένα με silica gel, τύπου 60F₂₅₄. Για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκαν, ακτινοβολία UV (254 και 366 nm), ατμοί ιωδίου ή 3% αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος και θέρμανση. Ο διαχωρισμός των μιγμάτων έγινε με χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 mesh).

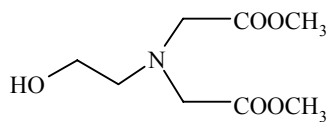
Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer μοντέλο 735. Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο AMX500 της Bruker ισχύος 500MHz. Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο. Τα φάσματα GS-MS καταγράφηκαν σε αέριο χρωματογράφο Shimadzu GS-MS-QP5050A. (Inj. Temp: 250°C, Interf. Temp: 230°C, Col. Temp: 100°C).

ΟΙ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ

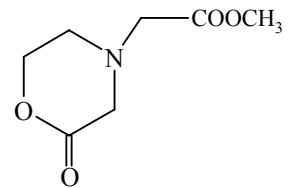
2β



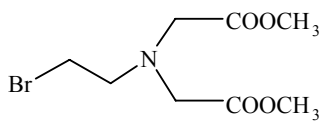
Ένωση 1



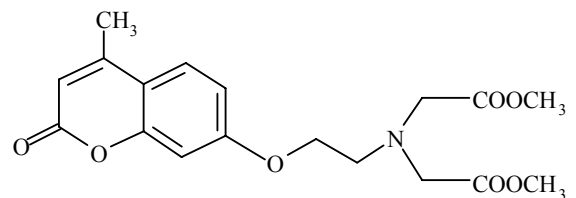
Ένωση 2α



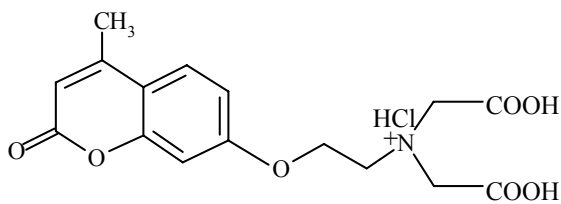
Ένωση



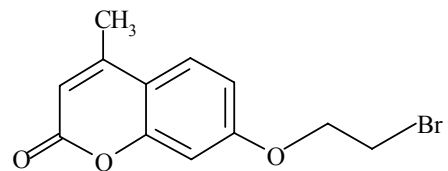
Ένωση 3



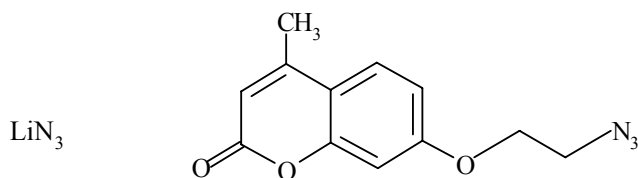
Ένωση 4



Ένωση 5

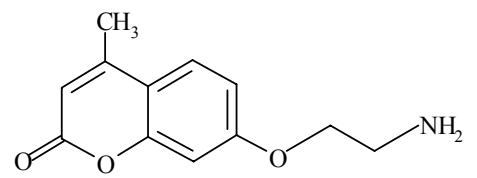


Ένωση 6

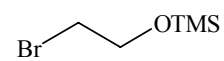
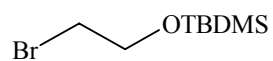


Ένωση 7

Ένωση 8

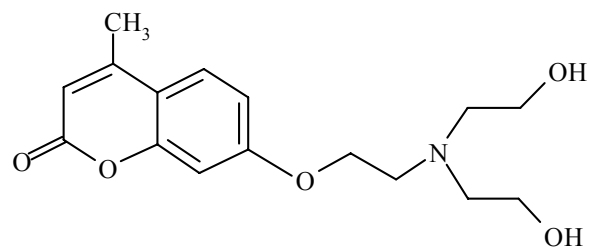
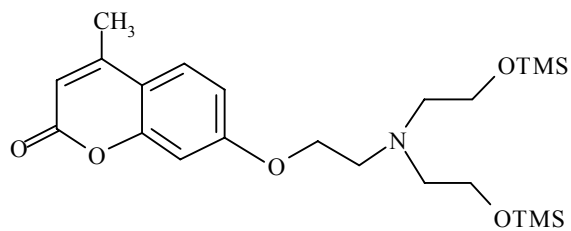


Ένωση 9



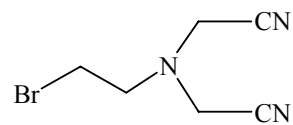
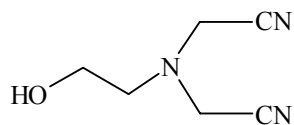
Ένωση 10

Ένωση 11



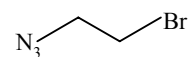
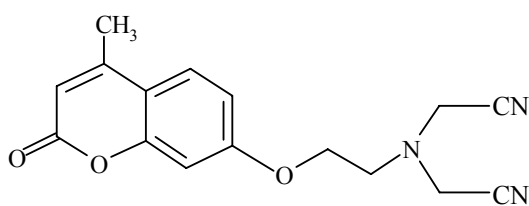
Ένωση 12

Ένωση 13



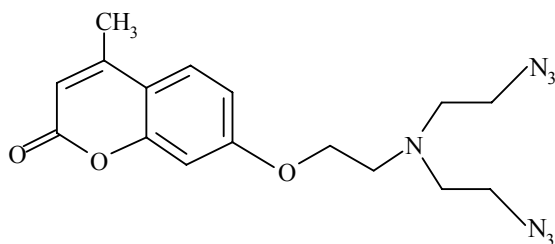
Ένωση 14

Ένωση 15

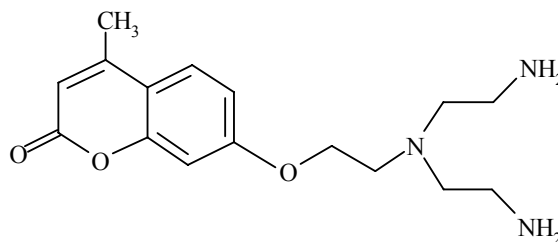


Ένωση 16

Ένωση 17



Ένωση 18



Ένωση 19

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 2α ΚΑΙ 2β

Σε σφαιρική δίκλιμη φιάλη των 500ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **1** (5.00gr, 28.22mmol) και 250ml MeOH. Στη φιάλη διαβιβάστηκε αέριο HCl(g) μέχρι πλήρους διαλύσεως της ένωσης **1**. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Μετά το τέλος της αντίδρασης απομακρύνθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Στη συνέχεια στο διάλυμα προστέθηκε NaHCO₃ για την εξουδετέρωση της περίσσειας του υδροχλωρικού οξέος. Το pH της αντίδρασης ρυθμίστηκε στην τιμή pH~8. Μετά την εξουδετέρωση, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20ml διχλωρομεθανίου όποτε και καταβυθίστηκαν τα διαλυτά στη μεθανόλη άλατα. Το διάλυμα διηθήθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε με διχλωρομεθάνιο. Το διήθημα ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό.

Μάζα μίγματος 4.30gr

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 3.69 s 6H (CH₃), 3.55 s 4H (NCH₂), 3.51 t (J=5Hz) 2H (OCH₂), 2.90 t (J=5Hz) 2H (CH₂N).

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 4.40 t (J=5Hz) 2H (CH₂CH₂) 3.71 s 3H (CH₃), 3.51 s 2H (NCH₂), 3.33 s 2H (OCH₂), 2.87 t (J=5Hz) 2H (CH₂N).

GS-MS ΕΝΩΣΗΣ 2α

Rt 21.691, [M⁺] 205, 26.02%

GS-MS ΕΝΩΣΗΣ 2β

Rt 22.381, [M⁺] 205, 73.98%

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 50ml, τοποθετήθηκαν το μίγμα των ενώσεων **2α** και **2β** (4.10gr) και 20ml ξηρού διχλωρομεθανίου. Η φιάλη καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε λουτρό CCl₄-ξηρού πάγου (T= -30°C). Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία προστέθηκε η ποσότητα της Ph₃P (7.54gr, 28.8mmol). Μετά την πλήρη διάλυση της, προστέθηκε και η ποσότητα του NBS (4.70gr, 0.0264mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε T= -30°C για 1h. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το λουτρό και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το τέλος της αντίδρασης απομακρύνθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Ακολούθησε προσθήκη 30ml διαιθυλαιθέρα οπότε και καταβυθίστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του σχηματιζόμενου Ph₃P=O. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση και το ίζημα εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης flash με σύστημα διαλυτών έκλουσης 30% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Συνολική απόδοση από την ένωση **1** 0.78gr κίτρινου υγρού (10.0%)

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 3.74 s 6H (CH₃), 3.64 s 4H (NCH₂), 3.45 t (J=7Hz) 2H (BrCH₂), 3.19 t (J=7Hz) 2H (CH₂N).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 50ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **3** (0.50gr, 1.9mmol), η 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη (0.23gr, 1.3mmol), άνυδρο ανθρακικό κάλιο (0.36gr, 2.6mmol) και 6ml ξηρού DMF. Το μίγμα της αντίδρασης, θερμάνθηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου, στους 100°C για 5h. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολούθησε διήθηση και το ίζημα (ανθρακικό κάλιο) εκπλύθηκε με αιθέρα. Στο διήθημα προστέθηκαν επιπλέον 30ml αιθέρα και η οργανική στοιβάδα εκχυλίστηκε διαδοχικά με νερό και με διάλυμα κορεσμένου χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη σε κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης flash με συστήματα διαλυτών έκλουσης βαθμωτής πολικότητας 30%, 35%, 40%, 45% και 50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 0.33gr υποκίτρινου στερεού (69.3%)

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 7.52 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 6.86 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.83 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.16 s 1H (βινυλικό), 4.20 t (J=5Hz) 2H (OCH₂), 3.72 s 6H (OCH₃), 3.71 s 4H (NCH₂), 3.25 t (J=5Hz) 2H (CH₂N), 2.43 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5

Σε σφαιρική φιάλη των 10ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **4** (0.17gr, 0.468mmol) και 2ml μίγματος τετραυδροφουρανίου-νερού σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη 2.81ml διαλύματος LiOH 1N. Η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 5ml MeOH (pH~10) και το διάλυμα οξινίστηκε με προσθήκη μεθανολικού διαλύματος

υδροχλωρικού οξέος (pH~4). Κατά τη διάρκεια της οξίνισης καταβυθίστηκε άσπρο στερεό ίζημα το οποίο απομακρύνθηκε με διήθηση. Ο διαλύτης του διηθήματος απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό δίνοντας υποκίτρινο κολλώδες στερεό προϊόν.

Απόδοση 0.12gr υποκίτρινου κολλώδους στερεού (69.0%)

¹H-N.M.R. (500MHz, MeOD) δ: 7.72 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 7.06 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.99 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.20 s 1H (βινυλικό), 4.49 t (J=5Hz) 2H (OCH₂), 3.86 s 4H (NCH₂), 3.73 t (J=5Hz) 2H (CH₂N), 2.47 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6

Σε προξηραμένη σφαιρική δίκαιμη φιάλη των 250ml, τοποθετήθηκαν η 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη (5.00gr, 28.4mmol), 24ml 1,2-διβρωμοαιθανίου (53.36gr, 284mmol), άνυδρο ανθρακικό κάλιο (20.00gr, 142mmol) και 30ml ξηρού DMF. Το μίγμα της αντίδρασης, θερμάνθηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου, στους 100°C για 5h. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολούθησε διήθηση και το ίζημα (ανθρακικό κάλιο) εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα. Στο διήθημα προστέθηκαν επιπλέον 50ml διαιθυλαιθέρα και η οργανική στοιβάδα εκχυλίστηκε διαδοχικά με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη σε κενό.

Απόδοση 7.38gr υποκίτρινου στερεού (91.8%)

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 7.55 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 6.91 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.84 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.18 s 1H (βινυλικό), 4.38 t (J=6Hz) 2H (OCH₂), 3.70 t (J=6Hz) 2H (CH₂Br), 2.43 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7

Σε ποτήρι ζέσεως των 500ml τοποθετήθηκαν NaN_3 (9.13gr, 140mmol) $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (14.10gr, 110mmol) και 70ml H_2O . Το σύστημα θερμάνθηκε στους 70°C για 20min και στη συνέχεια προστέθηκαν 350ml αιθανόλης, οπότε και καταβυθίστηκαν με τη μορφή λευκού στερεού Na_2SO_4 και LiSO_4 . Μετά από 10min το διάλυμα διηθήθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε με αιθανόλη. Ο διαλύτης του διηθήματος απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το λευκό στερεό που απέμεινε ξηράνθηκε στους 80°C και στη συνέχεια ανακρυσταλλώθηκε με προσθήκη 100ml αιθανόλης στους 35°C . Μετά από 2min το διάλυμα διηθήθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε με μικρή ποσότητα θερμής αιθανόλης. Ο διαλύτης του διηθήματος απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το λευκό στερεό που απέμεινε (LiN_3) ξηράνθηκε στους 80°C .

Απόδοση 5.22gr λευκού στερεού (81.3%)

I.R (KBr) 2049cm^{-1} , 1646cm^{-1}

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 8

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 50ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **6** (1.00gr, 3.53mmol), η ένωση **7** (0.19gr, 3.88mmol) και 10ml ξηρού DMSO. Η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 8h. Στη συνέχεια στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 30ml διαιθυλαιθέρα και η οργανική στοιβάδα εκχυλίστηκε διαδοχικά με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 0.82gr υποκίτρινου στερεού (94.7%)

$^1\text{H-N.M.R.}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 7.55 d ($J=8.8\text{Hz}$) 1H (Ar-H₅), 6.91 dd ($J_1=8.8\text{Hz}$, $J_2=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₆), 6.85 d ($J=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₈), 6.18 s 1H (βινυλικό), 4.23 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (OCH₂), 3.68 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (CH₂N₃), 2.43 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 50ml, που περιείχε 2ml ξηρής μεθανόλης και 6ml ξηρής αιθανόλης, προστέθηκε η ένωση **8** (0.20gr, 0.816mmol). Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.02gr 10% Pd/C. Το μίγμα υδρογονώθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκε διχλωρομεθάνιο για την εξουδετέρωση του καταλύτη και το μίγμα διηθήθηκε πάνω από celite υπό κενό. Οι διαλύτες του διηθήματος απομακρύνθηκαν με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 0.15gr υποκίτρινου κολλώδους στερεού (82.0%)

¹H-N.M.R. (500MHz, MeOD) δ: 7.73 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 7.03 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.97 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.19 s 1H (βινυλικό), 4.14 t (J=5Hz) 2H (OCH₂), 3.08 t (J=5Hz) 2H (CH₂NH₂), 2.48 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 10

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 250ml, τοποθετήθηκαν 5.7ml 2-βρωμοαιθανόλης (10.00gr, 80mmol) 13.4ml τριαιθυλαμίνης (9.71gr, 96mmol) και 4-N,N-διμεθυλοαμινοπυριδίνη (DMAP) (0.39gr, 3.2mmol) σε 160ml ξηρού διχλωρομεθανίου. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο (T= 0°C) και στη συνέχεια προστέθηκε t-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο-χλωρίδιο (13.26gr, 88mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίστηκε διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 19.00gr παχύρευστου πορτοκαλί υγρού (98.7%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 3.88 t (J=6.5Hz) 2H (CH₂O), 3.38 t (J=6.5Hz) 2H (BrCH₂), 0.91 s 9H (t-βουτυλο), 0.10 s 6H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 11

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 250ml, τοποθετήθηκαν 5.7ml 2-βρωμοαιθανόλης (10.00gr, 80mmol), 13.4ml τριαιθυλαμίνης (9.71gr, 96mmol) και DMAP (0.39gr, 3.2mmol) σε 160ml ξηρού διχλωρομεθανίου. Το σύστημα

τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ($T=0^{\circ}\text{C}$) και στη συνέχεια προστέθηκαν 12.2ml τριμεθυλο-σιλυλο-χλωριδίου (10.44gr, 88mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίστηκε διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 14.97gr παχύρεστου πορτοκαλί υγρού (95.0%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

$^1\text{H-N.M.R.}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 3.87 t ($J=6.5\text{Hz}$) 2H (CH_2O), 3.40 t ($J=6.5\text{Hz}$) 2H (BrCH_2), 0.15 s 9H (CH_3).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 10ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **9** (0.15gr, 0.666mmol), η ένωση **11** (1.31gr, 6.66mmol), 0.278ml τριαιθυλαμίνης (0.20gr, 1.99mmol) και 3.5ml ξηρού DMF. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και θερμάνθηκε υπό ανάδευση στους 100°C για 4h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα αραιώθηκε με προσθήκη 30ml διχλωρομεθανίου και εκχυλίστηκε με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης flash με σύστημα διαλυτών έκλουσης 40% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 0.18gr ελαιώδους κίτρινου υγρού (60.0%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

$^1\text{H-N.M.R.}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 7.51 d ($J=8.8\text{Hz}$) 1H (Ar-H₅), 6.86 dd ($J_1=8.8\text{Hz}$, $J_2=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₆), 6.82 d ($J=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₈), 6.14 s 1H (βινυλικό), 4.09 t ($J=6\text{Hz}$) 2H (OCH_2), 3.67 t ($J=6.5\text{Hz}$) 4H (CH_2OSi), 3.06 t ($J=6\text{Hz}$) 2H (CH_2N), 2.80 t ($J=6.5\text{Hz}$) 4H (NCH_2), 2.41 s 3H (CH_3), 0.13 s 18H (SiCH_3).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 13

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν η ένωση **12** (0.18gr, 0.39mmol) και 2ml THF. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ($T=0^{\circ}\text{C}$) και ακολούθησε η

προσθήκη 0.97ml (0.97 mmol) διαλύματος $t\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ 1M σε THF. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, με συστήματα διαλυτών έκλουσης 50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα, διχλωρομεθάνιο και 50% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά την παραλαβή του προϊόντος σε μη καθαρή μορφή (παρουσία $t\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$) πραγματοποιήθηκε διάλυση του μίγματος σε 15ml χλωροφορμίου. Η οργανική στοιβάδα εκχυλίστηκε διαδοχικά με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και στη συνέχεια ξηράθηκε με θειικό νάτριο. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 0.098gr 82.4%

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

$^1\text{H-N.M.R.}$ (500MHz, MeOD) δ : 6.80 d ($J=8.8\text{Hz}$) 1H (Ar-H₅), 6.04 dd ($J_1=8.8\text{Hz}$, $J_2=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₆), 6.20 d ($J=2.4\text{Hz}$) 1H (Ar-H₈), 5.88 s 1H (βινυλικό), 4.06 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (OCH₂), 3.67 t ($J=5.5\text{Hz}$) 4H (CH₂O), 2.92 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (CH₂N), 2.73 t ($J=5.5\text{Hz}$) 4H (NCH₂), 2.10 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 14

Σε αυτόκλειστο σύστημα, τοποθετήθηκαν 0.3ml 2-αμινοαιθανόλης (0.25gr, 4.09mmol), 0.8ml χλωροακετονιτριλίου (0.93gr, 12.28mmol), 2.1ml N-αιθυλοδισοπροπυλαμίνης (1.59gr, 12.28mmol) σε 2ml ξηρού ακετονιτριλίου. Το σύστημα θερμάνθηκε υπό ανάδευση σε $T=100^\circ\text{C}$ για 5h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα αραιώθηκε με προσθήκη 30ml οξικού αιθυλεστέρα και εκχυλίστηκε με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράθηκε με θειικό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης flash με σύστημα διαλυτών έκλουσης 50% ακετόνη σε τολουόλιο.

Απόδοση 0.41gr παχύρευστου κίτρινου υγρού (72.0%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

$^1\text{H-N.M.R.}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 3.83 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (OCH₂), 3.76 s 4H (NCH₂), 2.90 t ($J=5\text{Hz}$) 2H (CH₂N).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 15

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 50ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **14** (0.41gr, 2.95 mmol) και 6ml ξηρού διχλωρομεθανίου. Η φιάλη καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε λουτρό CCl₄-ξηρού πάγου (T= -30°C). Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία προστέθηκε Ph₃P (0.95gr, 3.54mmol). Μετά την πλήρη διάλυση της προστέθηκε NBS (0.58gr, 3.24mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε T= -30°C για 1h. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το λουτρό και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 8h. Μετά το τέλος της αντίδρασης απομακρύνθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Ακολούθησε προσθήκη 30ml διαιθυλαιθέρα οπότε και καταβυθίστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του σχηματιζόμενου Ph₃P=O. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση και το ίζημα εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης 50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 0.50gr κίτρινου υγρού (83.9%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 3.73 s 4H (NCH₂), 3.47 t (J=6.5Hz) 2H (BrCH₂), 3.14 t (J=6.5Hz) 2H (CH₂N).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 16

Σε προξηραμένη σφαιρική δίλιμη φιάλη των 10ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **15** (0.25gr, 1.24mmol), 4-μεθυλο-7-υδροξικουμαρίνη (0.22gr, 1.24mmol), άνυδρο ανθρακικό κάλιο (0.26gr, 1.86mmol) και 3ml ξηρού DMF. Το μίγμα της αντίδρασης, θερμάνθηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου, στους 100°C για 5h. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολούθησε διήθηση και το ίζημα (ανθρακικό κάλιο) εκπλύθηκε με αιθέρα. Στο διήθημα προστέθηκαν επιπλέον 20ml αιθέρα και η οργανική στοιβάδα εκχλίστηκε με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε μεθειϊκό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη σε κενό. Στη συνέχεια ακολούθησε ανακρυστάλλωση του προϊόντος από μίγμα ακετόνης και τολουολίου (10%). Το στερεό προϊόν λήφθηκε μετά από διήθηση.

Απόδοση 0.28gr λευκού στερεού (75.8%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 7.73 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 7.01 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.95 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.15 s 1H (βινυλικό), 4.40 t (J=5Hz) 2H (OCH₂), 4.02 s 4H (NCH₂), 3.25 t (J=5Hz) 2H (CH₂N), 2.46 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 17

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 250ml, στην οποία προσαρμόστηκε προσθετική φιάλη τοποθετήθηκαν 17.2ml 1,2-διβρωμοαιθανίου (37.57gr, 200mmol) και 20ml ξηρού DMSO. Στην προσθετική φιάλη τοποθετήθηκε διάλυμα LiN₃ (0.98gr, 20mmol) σε 10ml ξηρού DMSO. Η προσθήκη του διαλύματος του LiN₃ υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ολοκληρώθηκε μετά την παρέλευση 24h. Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε αραιώση του διαλύματος με προσθήκη 60ml διαιθυλαιθέρα και εκχύλιση αυτού με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μεγαλύτερο μέρος της περίσσειας του 1,2-διβρωμοαιθανίου απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό (rotary evaporator) σε 40°C.

Απόδοση 1.99gr κίτρινου υγρού (66.5%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 3.69 t (J=6.5Hz) 2H (BrCH₂), 3.67 s 4H (BrCH₂CH₂Br), 3.49 t (J=6.5Hz) 2H (CH₂N₃), 3.47 s 4H (N₃CH₂CH₂N₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 18

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 10ml, τοποθετήθηκαν η ένωση **9** (0.29gr, 1.33mmol), η ένωση **17** (1.99gr, 13.3mmol), 0.556ml τριαιθυλαμίνης (0.40gr, 3.99mmol) και 3.5ml ξηρού DMF. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και θερμάνθηκε υπό ανάδευση στους 110°C για 1h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα αραιώθηκε με προσθήκη 20ml διχλωρομεθανίου και εκχυλίστηκε με νερό και με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική

στοιβάδα ξηράνθηκε με θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης 5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο και 25% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Απόδοση 0.19gr υποκίτρινου στερεού (40.0%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 7.52 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 6.89 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.83 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.15 s 1H (βινυλικό), 4.13 t (J=5.5Hz) 2H (OCH₂), 3.37 t (J=6Hz) 4H (CH₂N₃), 3.08 t (J=5.5Hz) 2H (CH₂N), 2.90 t (J=6Hz) 4H (NCH₂), 2.41 s 3H (CH₃).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 19

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 10ml, που περιείχε 1ml ξηρής μεθανόλης και 3ml ξηρής αιθανόλης, προστέθηκε η ένωση **18** (0.02gr, 0.056mmol). Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.004gr 10% Pd/C. Το μίγμα υδρογονώθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκε διχλωρομεθάνιο για την εξουδετέρωση του καταλύτη και το μίγμα διηθήθηκε πάνω από celite υπό κενό. Οι διαλύτες του διηθήματος απομακρύνθηκαν με απόσταξη υπό κενό.

Απόδοση 0.01gr υποκίτρινου κολλώδους στερεού (60.0%)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

¹H-N.M.R. (500MHz, CDCl₃) δ: 7.51 d (J=8.8Hz) 1H (Ar-H₅), 6.89 dd (J₁=8.8Hz, J₂=2.4Hz) 1H (Ar-H₆), 6.85 d (J=2.4Hz) 1H (Ar-H₈), 6.15 s 1H (βινυλικό), 4.14 t (J=5.5Hz) 2H (OCH₂), 2.97 t (J=5.5Hz) 2H (CH₂N), 2.85 t (J=5.5Hz) 4H (NCH₂), 2.70 t (J=5.5Hz) 4H (CH₂NH₂), 2.41 s 3H (CH₃).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Μανουσάκης Γ., Κεσίσογλου Δ. *Βιοανόργανη Χημεία* Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 1990, σελ. 137-160
- King R. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* John Willey & sons Ltd, England, 1994, pp. 4434-4451
- Tsien R. Y., Lippard S. J., Walkup G. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, *122*, 5644-5645
- Vallee B. L., Falchuk K. H. *Physiological Reviews* 1993, *73*, 79-118
- Lippard J., S., Berg M., S. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Mill Valley, CA, University Science Books, 1994, pp. 23, 257-274
- Vallee B. L., Auld D. S. *Acc. Chem. Res.* 1993, *26*, 543-551
- Stryer L. *Βιοχημεία* Αλετράς Α., Βαλκανά Θ., Δραΐνας Δ., Δραΐνας Κ., Κούβελας Η., Παπαδόπουλος Γ. Κ., Παπαδόπουλος Μ. Γ., Φράγκου-Λαζαρίδη Μ., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1995, σελ.929-930
- Zalewski P. D., Forbes I. J., Betts W.H. *Aust. J. Chem.* 1996, *49*, 561-568
- Zalewski P. D., Forbes I. J., Betts W.H. *Biochem. J.* 1993, *296*, 403-408
- Χατζηϊωάννου Θ. Π., Κουπάρη Μ. Α. *Ενόργανη ανάλυση* Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτη, Αθήνα, 1993, σελ.246-254
- Φουκαράκη Ε. Διδακτορική Διατριβή "Φθοριζόντες και Φωτομεταβαλλόμενοι δείκτες ιόντων. Σχεδιασμός και Συνθετικές Προσεγγίσεις". Πανεπιστήμιο Κρήτης, 1998, σελ. 118
- Simons T. J. B. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1993, *27*, 25-37
- Lindner E., Horvath M., Toth K., Pungor E. *Anal. Letters* 1992, *25*, 453-470
- Hilario E., Romero I., Celis H. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1990, *21*, 197-207
- Nasir M. S., Fahrni C. J., O'Halloran T. V. *JBIC* 1999, *4*, 775-783
- Haugland R. P. *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 7th Edition* Molecular Probes, Eugene 1996
- Budde T., Minta A., White J. A., Kay A. R. *Neuroscience* 1997, *79*, 347-358
- Karerinopoulos E. H., Foukaraki E. 2000, 1-44, In press
- Hyrk K. L., Bownik J. M., Goldberg M. P. *Cell Calcium* 2000, *27*, 75-86
- Φουκαράκη Ε. Δίπλωμα Ειδίκευσης "Σύνθεση φθοριζόντων δεικτών με δυνατότητα συναρμογής ενδοκυττάρων ιόντων". Πανεπιστήμιο Κρήτης, 1995, σελ. 3-4
- Wheelock C. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, *81*, 1348-1352
- Ganguly B. K., Bagchi P. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, *21*, 1415-1419

Kalyanmay S., Bagchi P. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 24, 313-319

Martell A. M., Smith R. M. *Critically Selected Stability Constants Of Metal Complexes* (Gaithersburg, MD: N.I.S.T.), 1995

Parker D. R., Norvell W. A., Chaney R. L. *Chemical equilibrium reaction models*, 1994

Moore J. E., Reed D. E. *Organic Synthesis* 1961, 41, 16

Eiserbraun E. J., Morris R. N., Adolphsen G. *J. Chem. Edu.* 1985, 710

Harrison H. R., Haynes W. M., Arthur P., Eisenbraun E. J. *J. Chem. Ind* 1968, 1568

Danishefsky M. H., Gombatz T. H., Berman E., Schuda P. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, 6536

March J. *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Fourth Edition, Canada, 1992, pp.393-394, 397, 918-919, 1219-1220

Mc Govern and Thompson *Can. J. Chem* 1999, 77, 1680

Gryniewicz G., Poenie M., Tsien Y. R. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260, 3440-3450

Green W. T., Wuts G. M. P. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Second Edition, Canada, 1991, pp. 68, 77

Rylander N. P. *Hydrogenation Methods*, Academic Press Limited, London, 1985, pp. 94-98, 170-171

Hofmann-Bang N. *Act. Chem. Scand.* 1957, 11, 581

Scheurer A., Mosset P., Saalfrank R. W. *Tetrahedron Asymmetry* 1999, 10, 3559-3570

Stout M. G., Robins M. J., Olsen R. K. *J. Org. Chem.* 1969, 12, 658-662

McCarthy J. R., Schuster A. J. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 3095-3103

Fieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis Vol 7*, John Wiley & Sons, Canada, 1984, pp.175

Chaudhary S. K., Hernandez O. *Tetrahedron Lett.* 1979, 99-102

Corey E. J., Venkateswarlu A. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 6190-6191

Ahlbrecht H., Raab W., Vonderheid C. *Synthesis* 1979, 127-129

Harold T. M., Hauser C. R. *J. Chem. Soc.* 1960, 82, 1960-1965

Bradshaw J. S., Krakowiak K. E., Izatt R. M. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 4061-4067

Bradshaw J. S., Krakowiak K. E., Izatt R. M. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 3521-3524

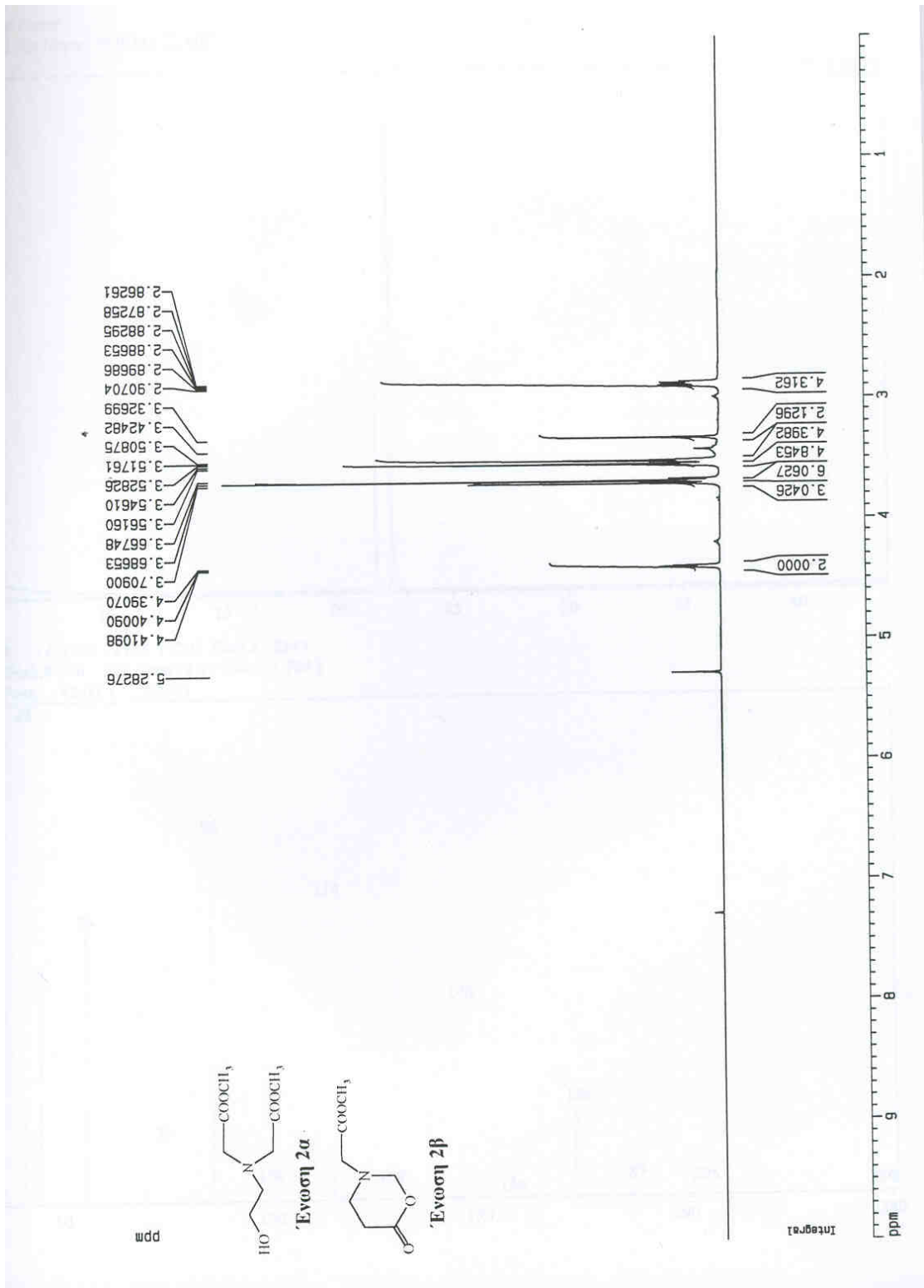
Bradshaw J. S., Krakowiak K. E., Izatt R. M. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 803-806

Bergeron R. J., Garlich J. R. *Synthesis* 1984, 782-784

Brown R. C., Choi Yong Moon, Narasimhan S. *Synthesis* 1981, 605-606

Braun L. M., Braun R. A., Crissman H. R. *J. Org. Chem.* 1971, 36, 2388-2389
Heinzman S. W., Ganem B. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 6801-6802
Carboni B., Vaultier M., Carrie R. *Tetrahedron* 1987, 43, 1799-1810
Magnus P., Gallagher T. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 389
Corey E. J., Szekely I., Shiner C. S. *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 5831
Michelin R. A. et al. *Coordination Chemistry Reviews* 1996, 147, 299-338
Braun L. M., Braun R. A., Crissman H. R. *J. Org. Chem.* 1971, 36, 2388-2389
Fagley T. F., Klein E., Albrecht J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, 3104-3106
Wiley R. H., Moffat J. *J. Org. Chem.* 1957, 22, 995-996
Reddy G. V., Rao G., Iyengar D. S. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 3937-3938
Benati L., Montevecchi P. C., *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 7313-7314
Kamal A., Rao N. V., Laxman E. *Tetrahedron Lett.* 1997, 39, 6945-6948

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ



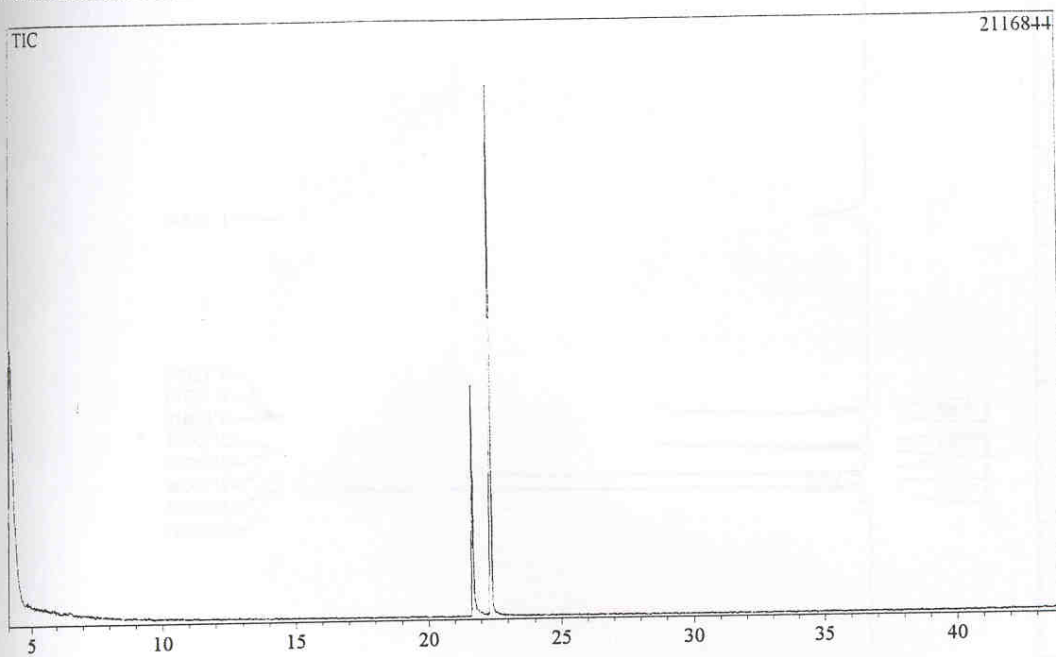
*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : TONIA.D03 00/04/20 11:13:04

Sample : TA 118125

ID :

Dilution Factor : 1

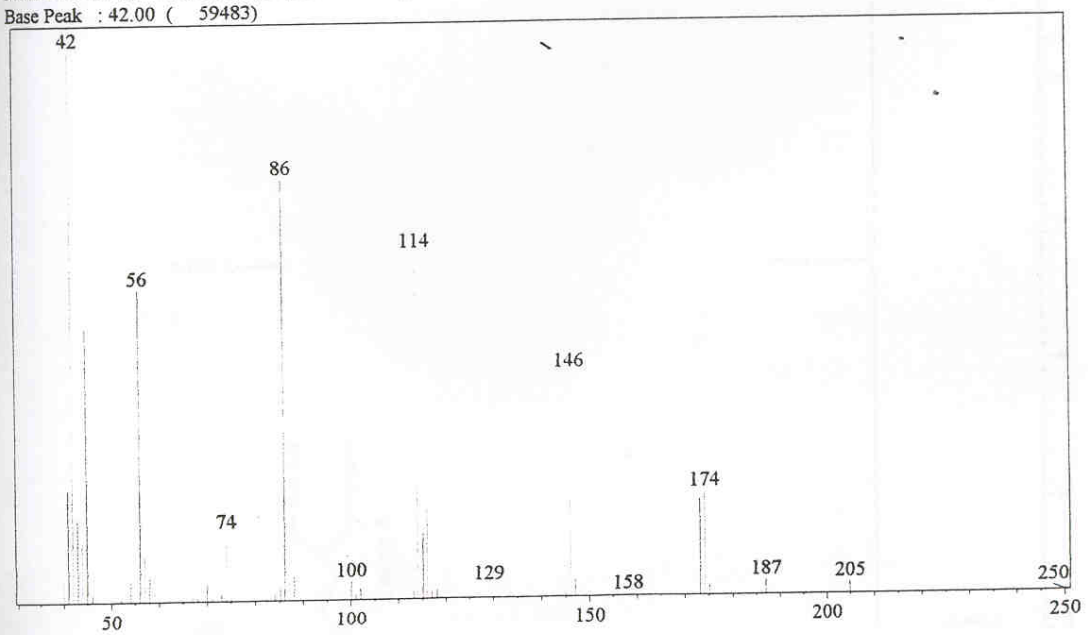
Method File Name : FORMAT2.MET

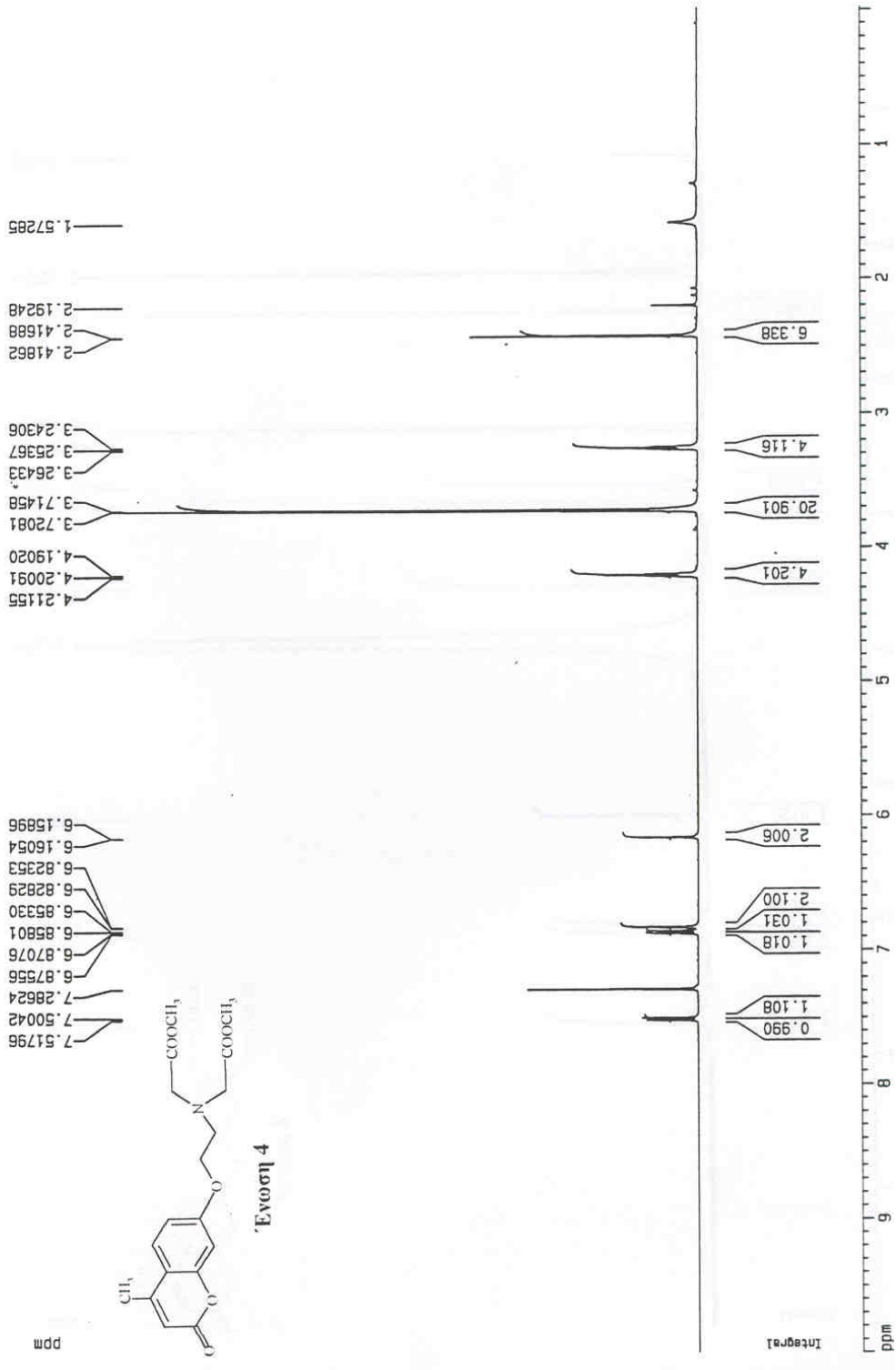


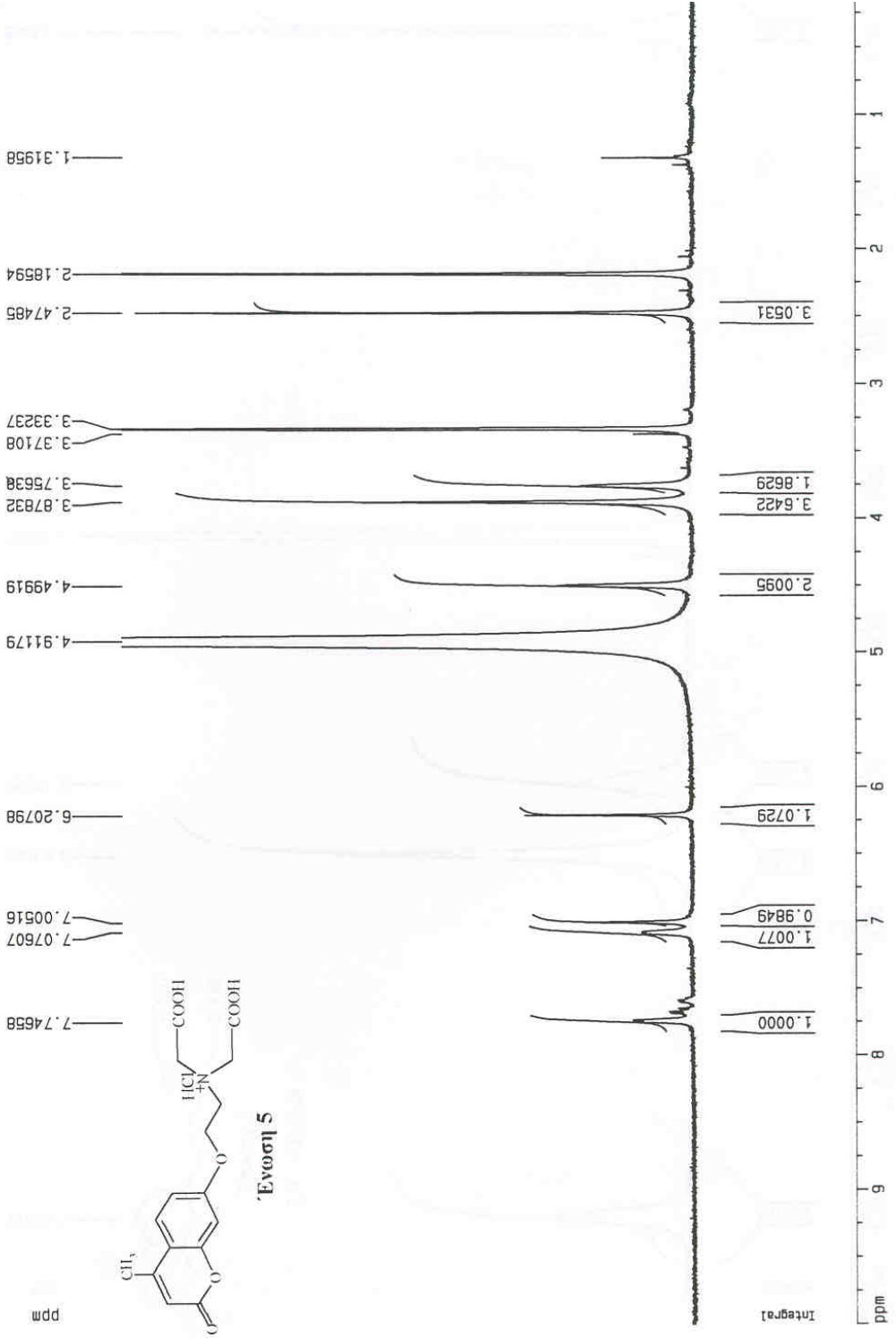
Scan # : (2119 - 2133) B.G. Scan # : 2145

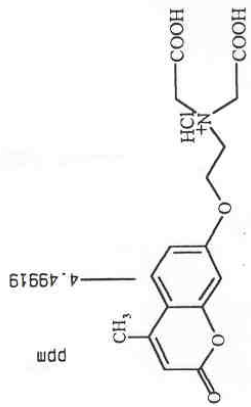
Mass Peak # : 76 Ret. Time : (21.650 - 21.767)

Base Peak : 42.00 (59483)

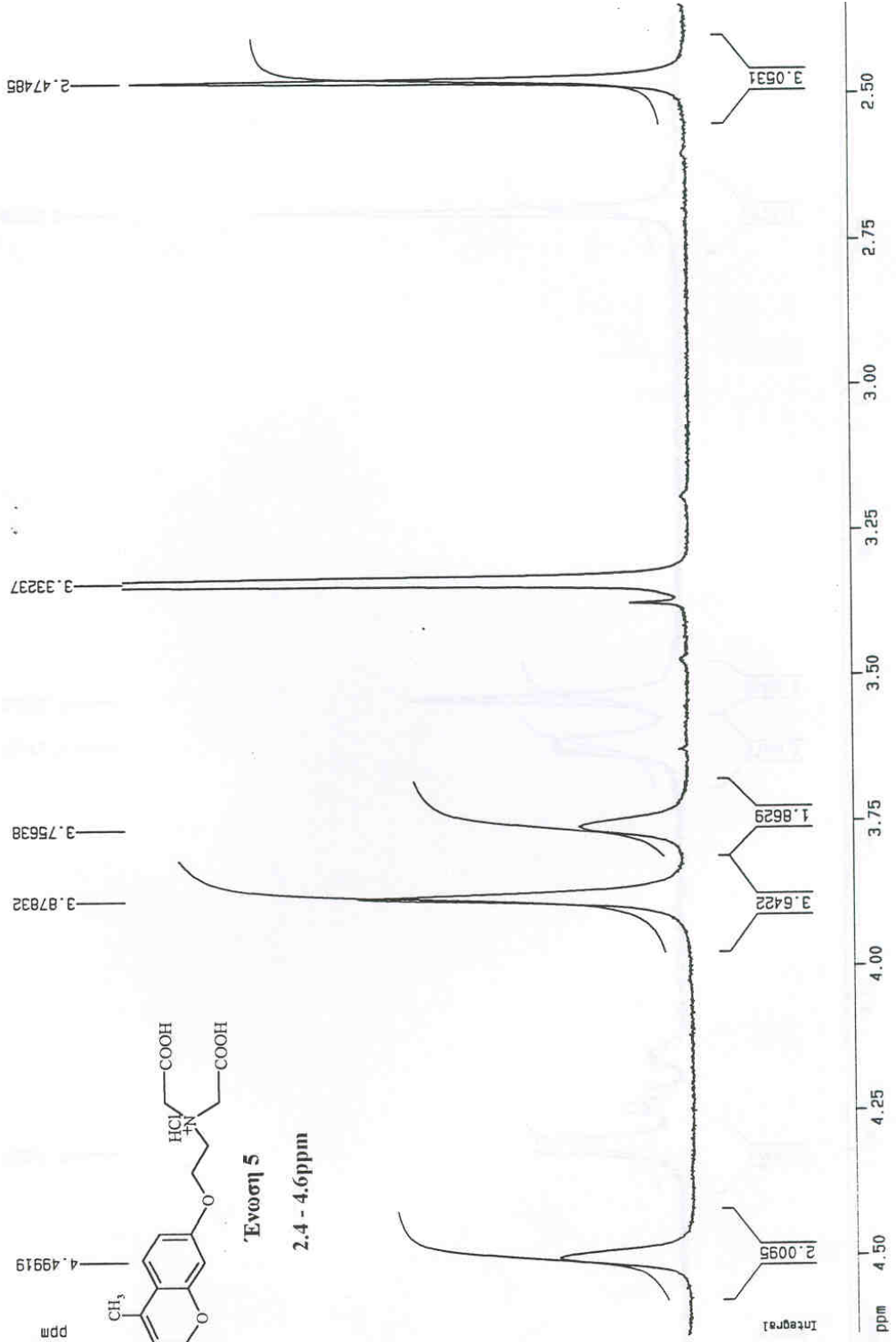


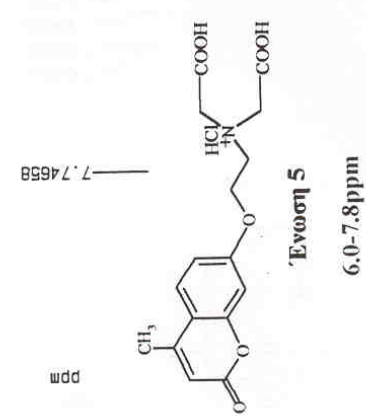
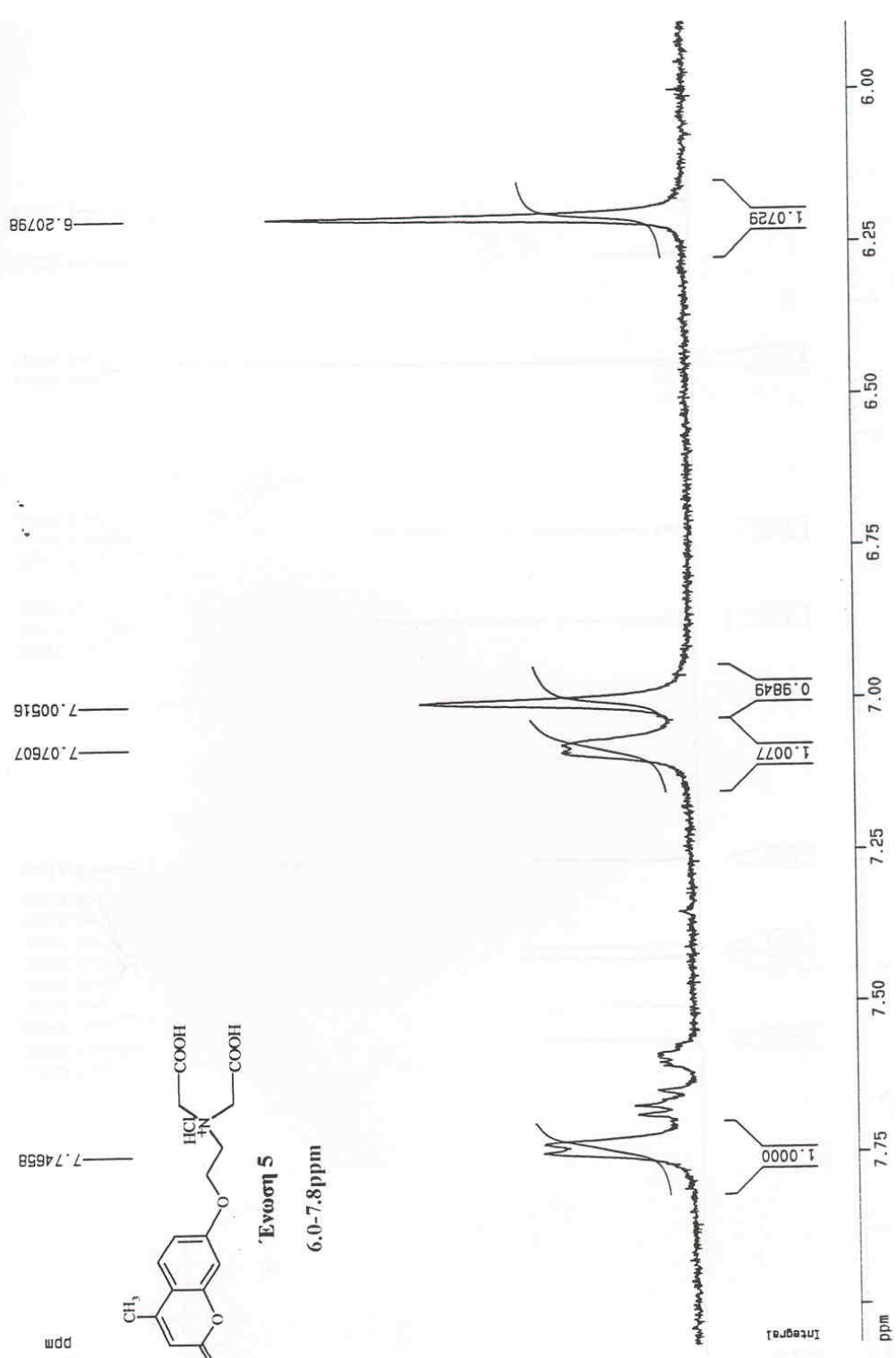






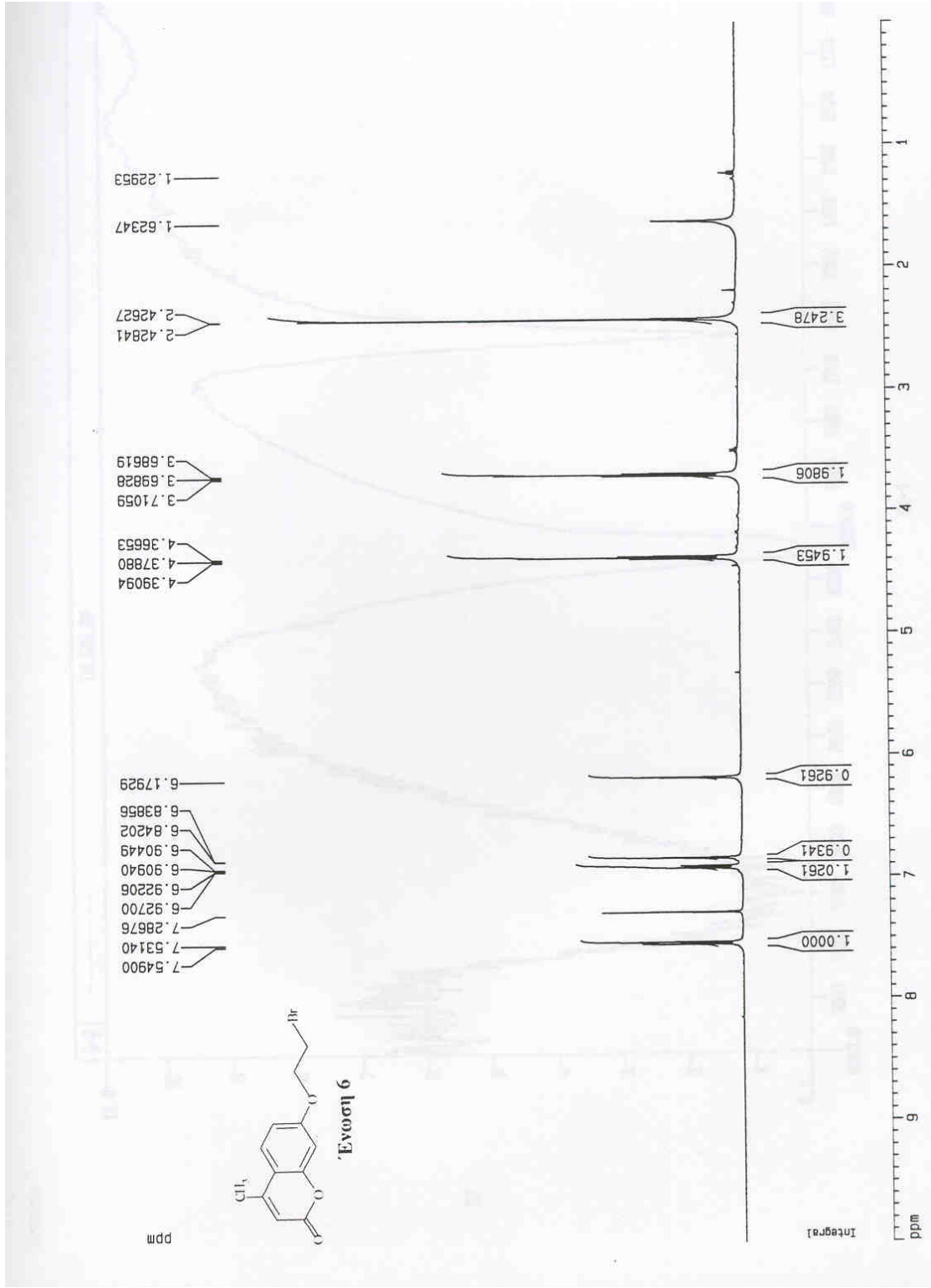
Evooel 5
2.4 - 4.6ppm



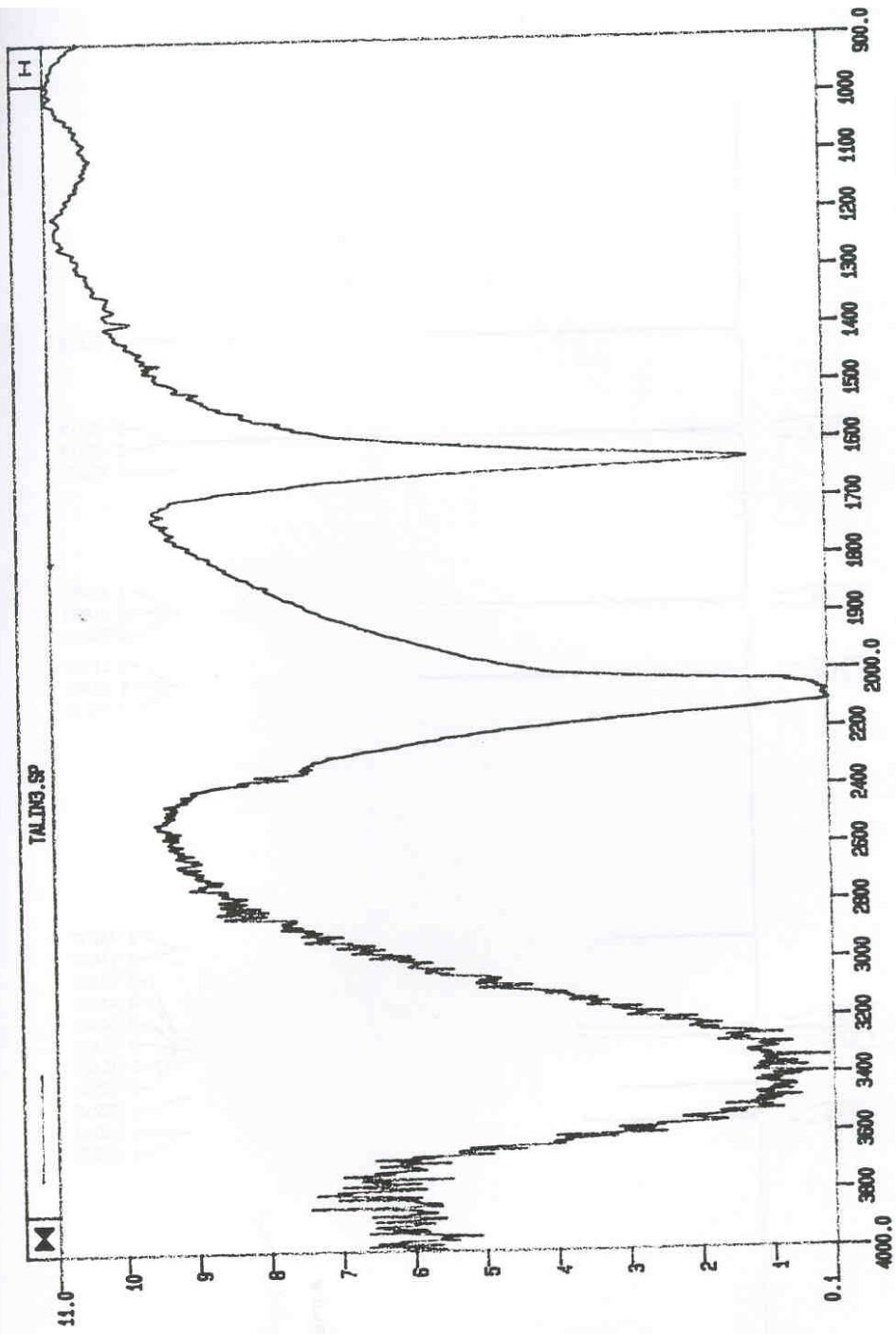


Ενωση 5
6.0-7.8ppm

ppm

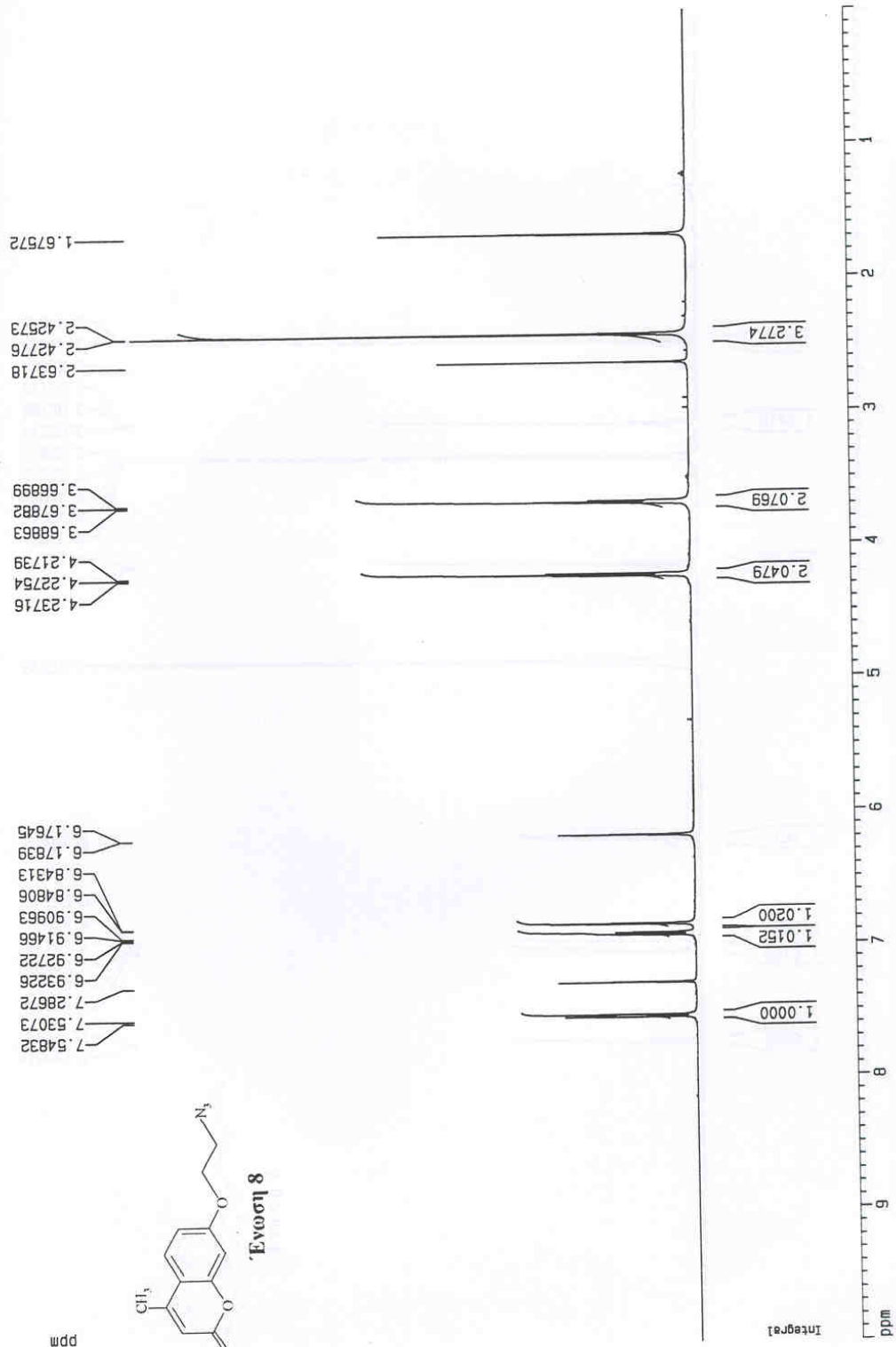


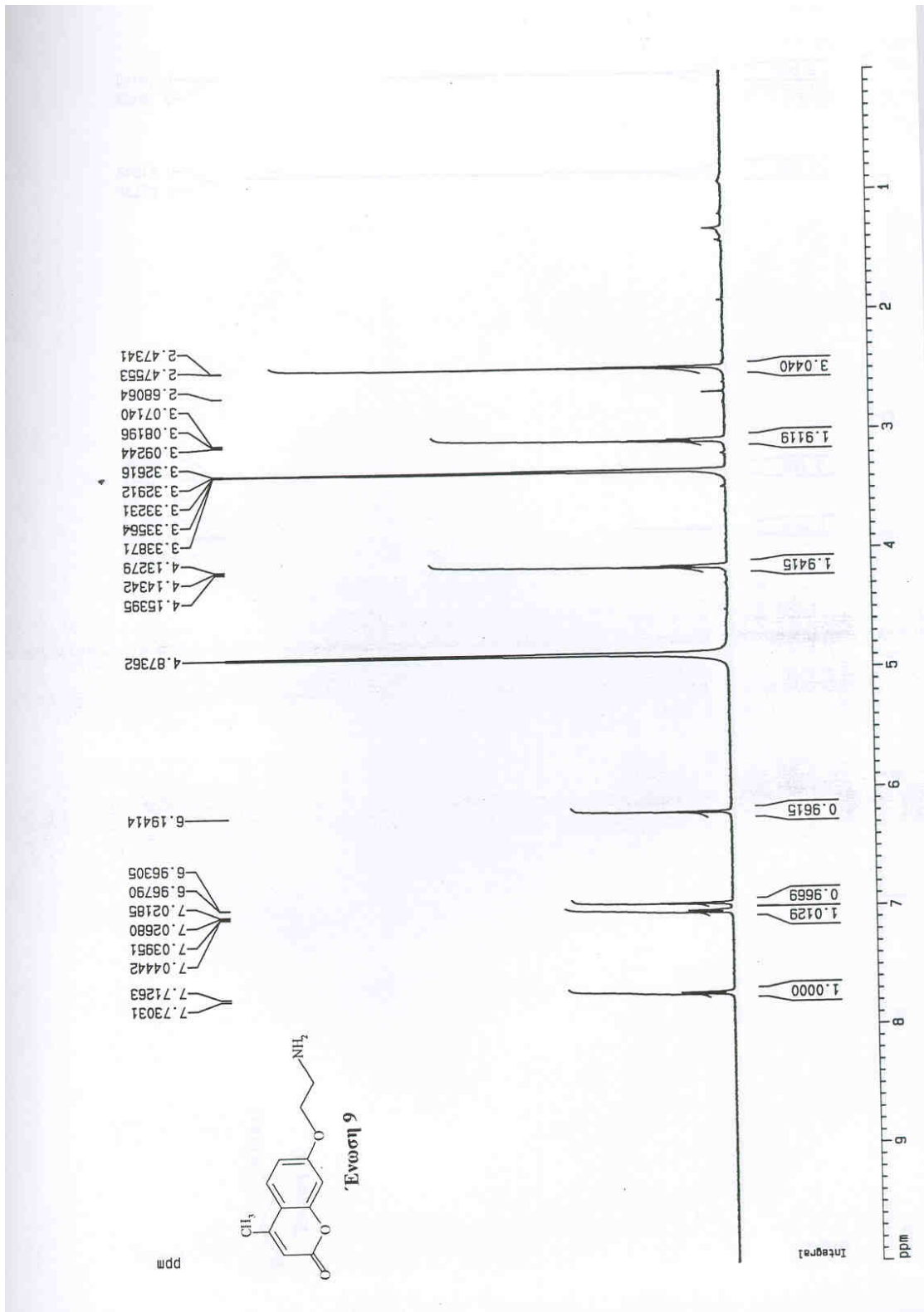
LIN 3
Evocool 7

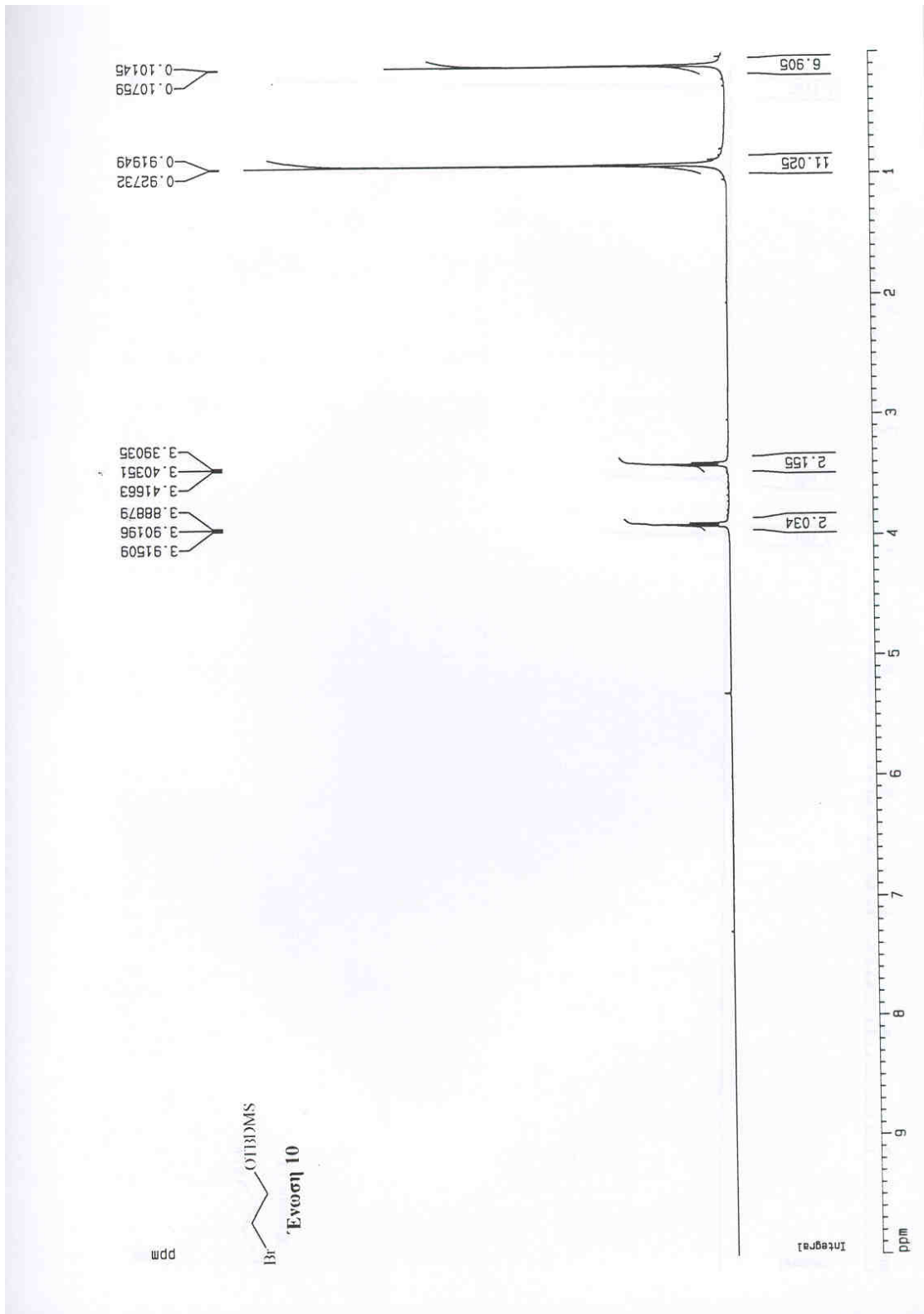


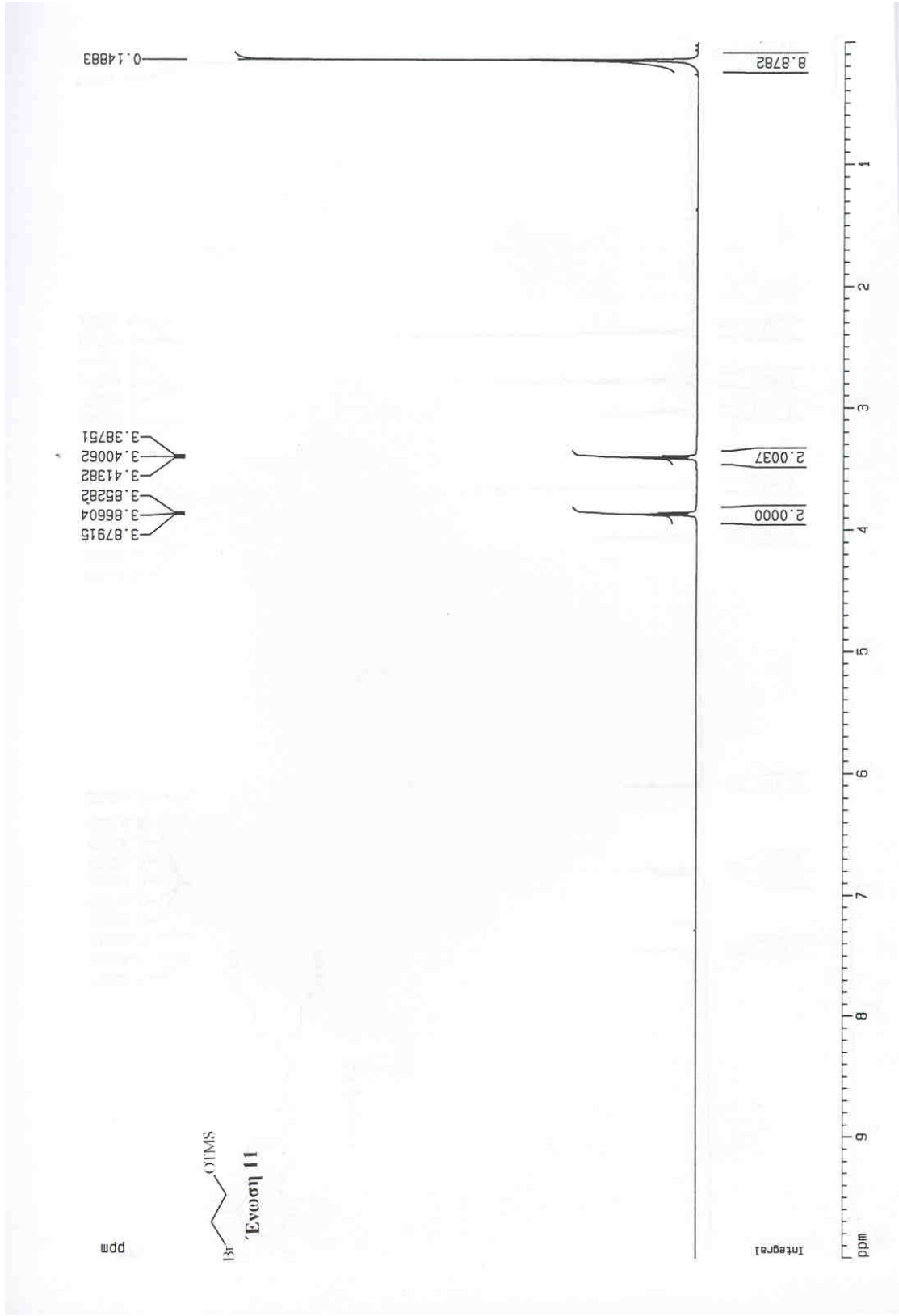
CH-1

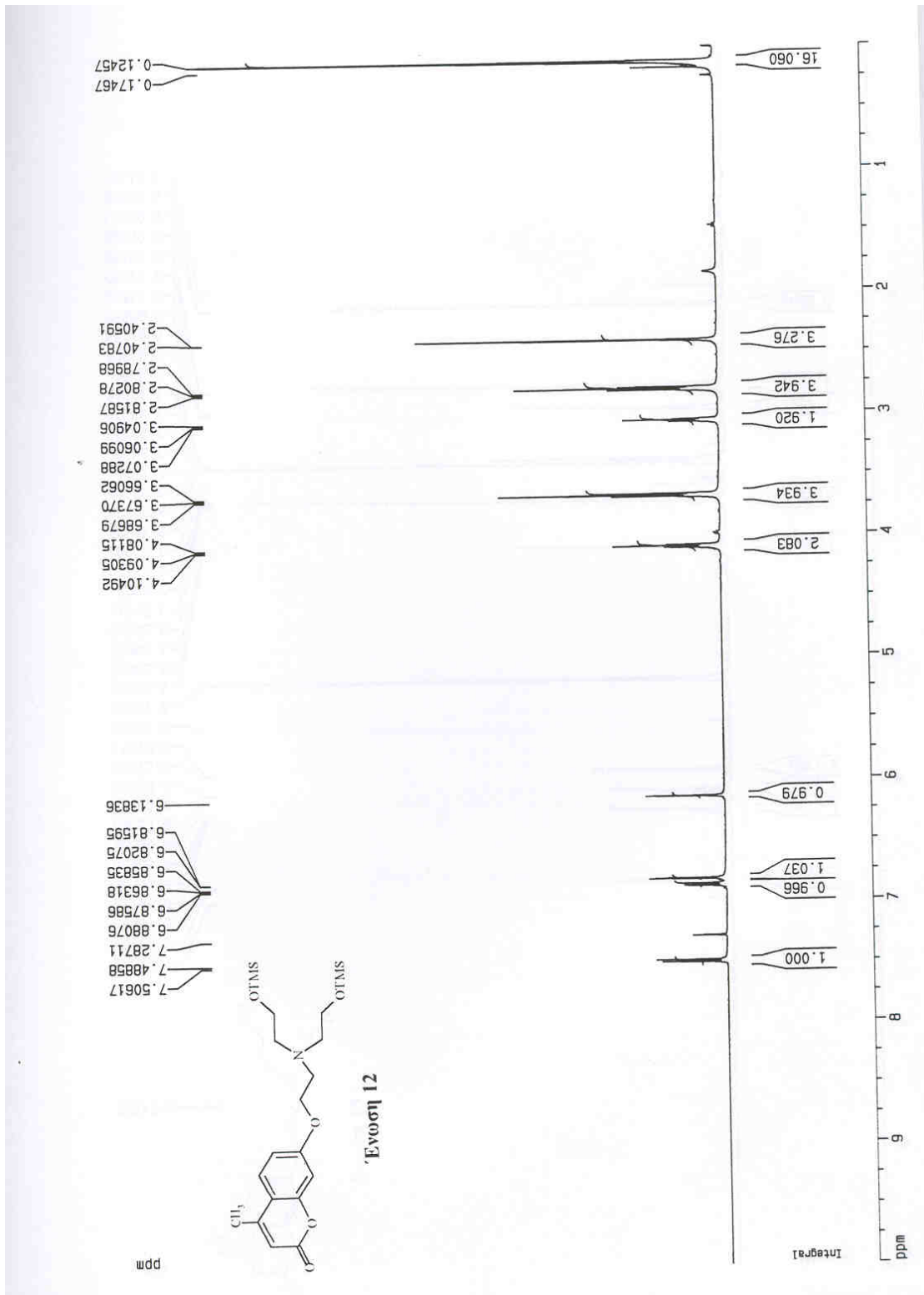
21

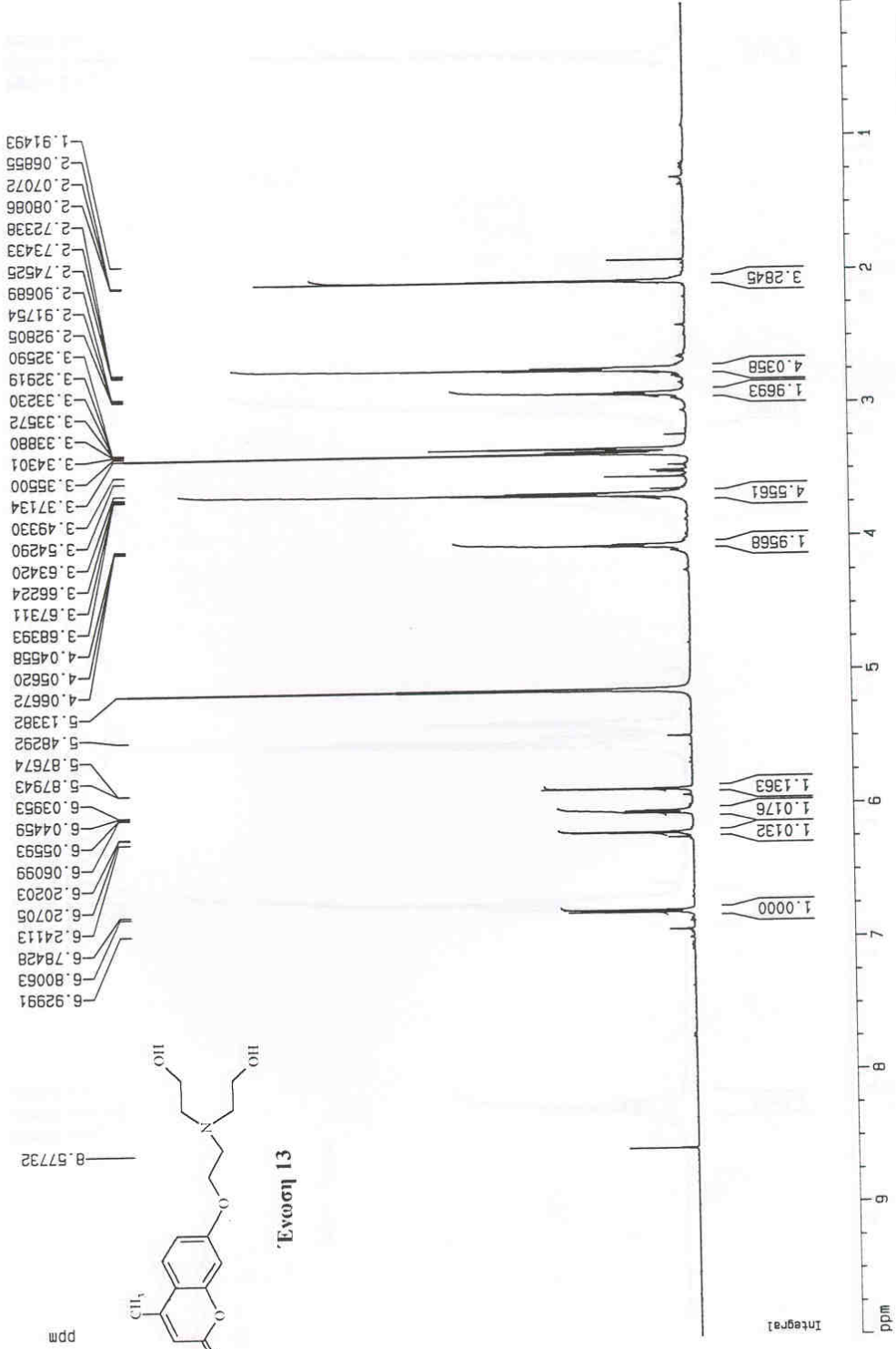


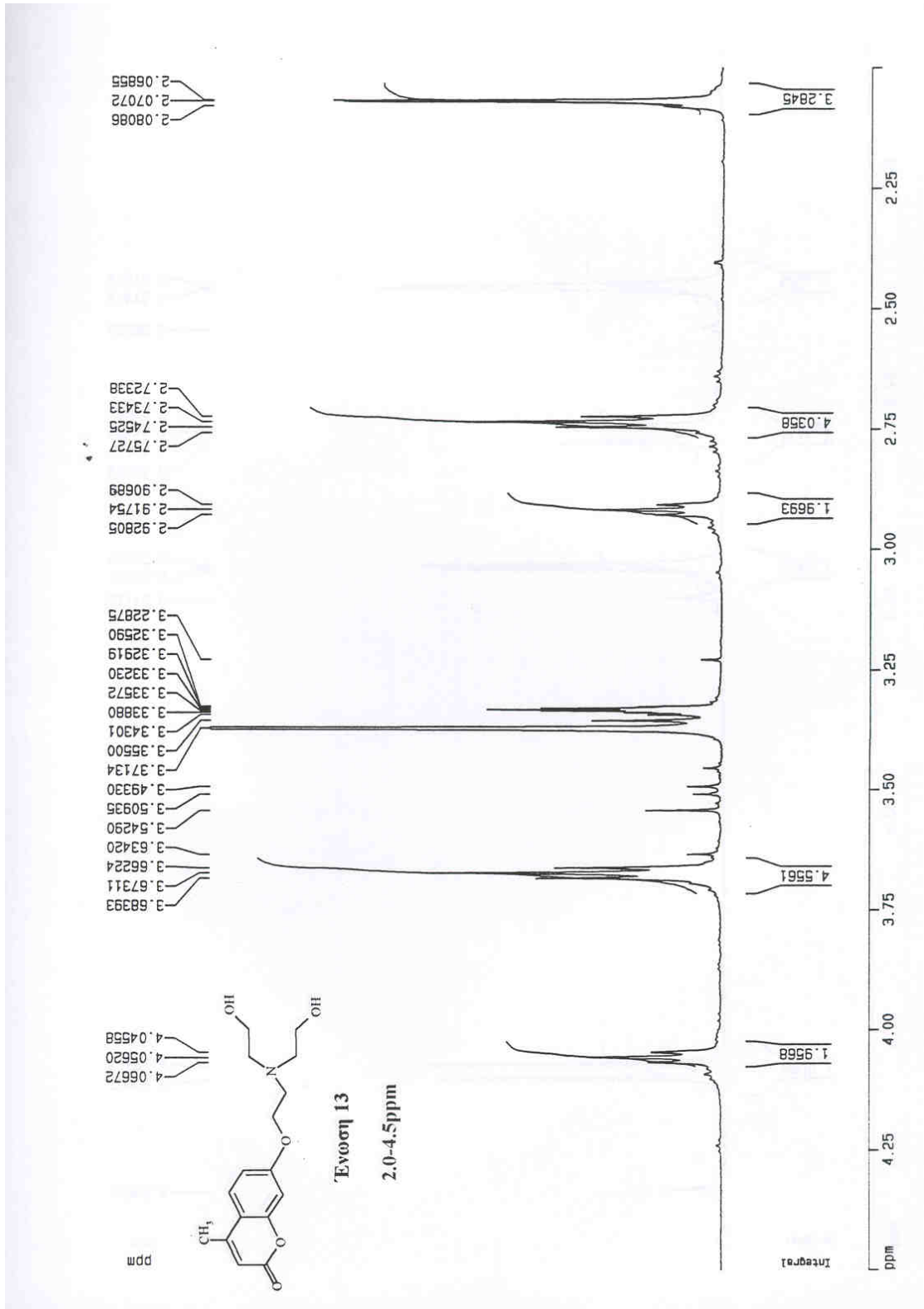


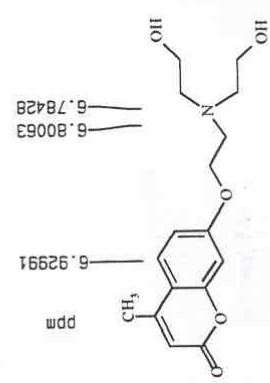








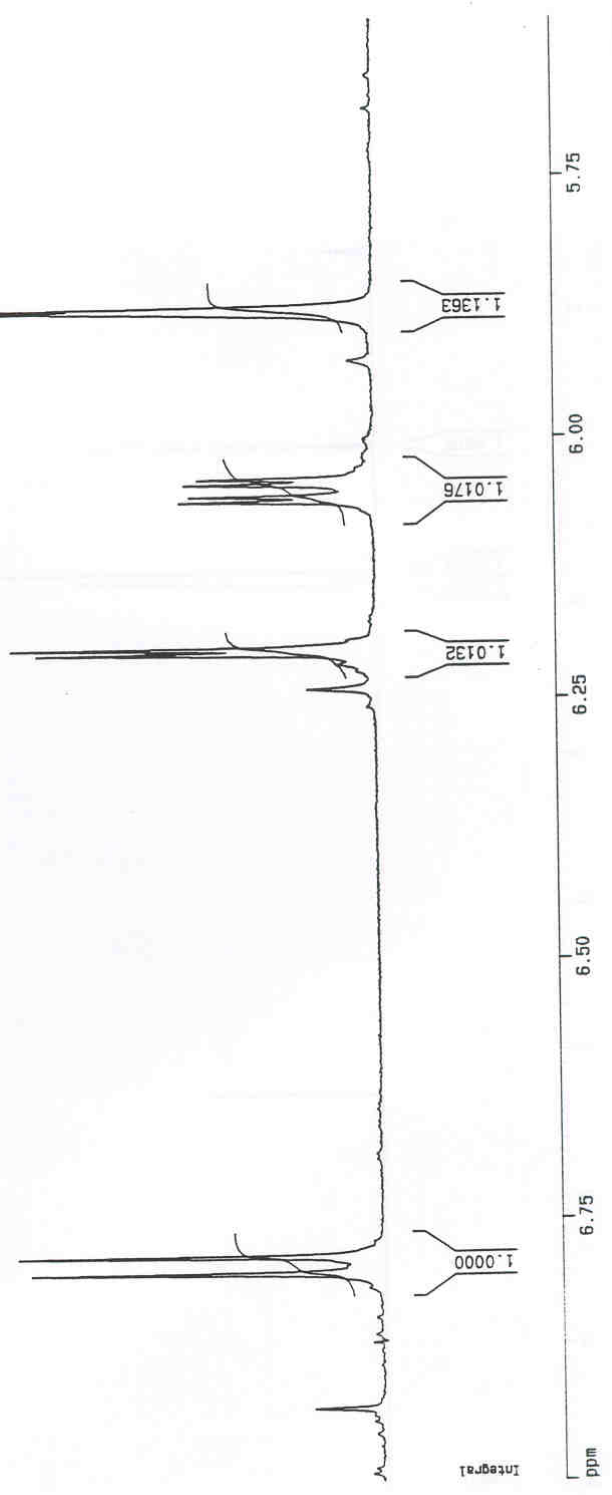


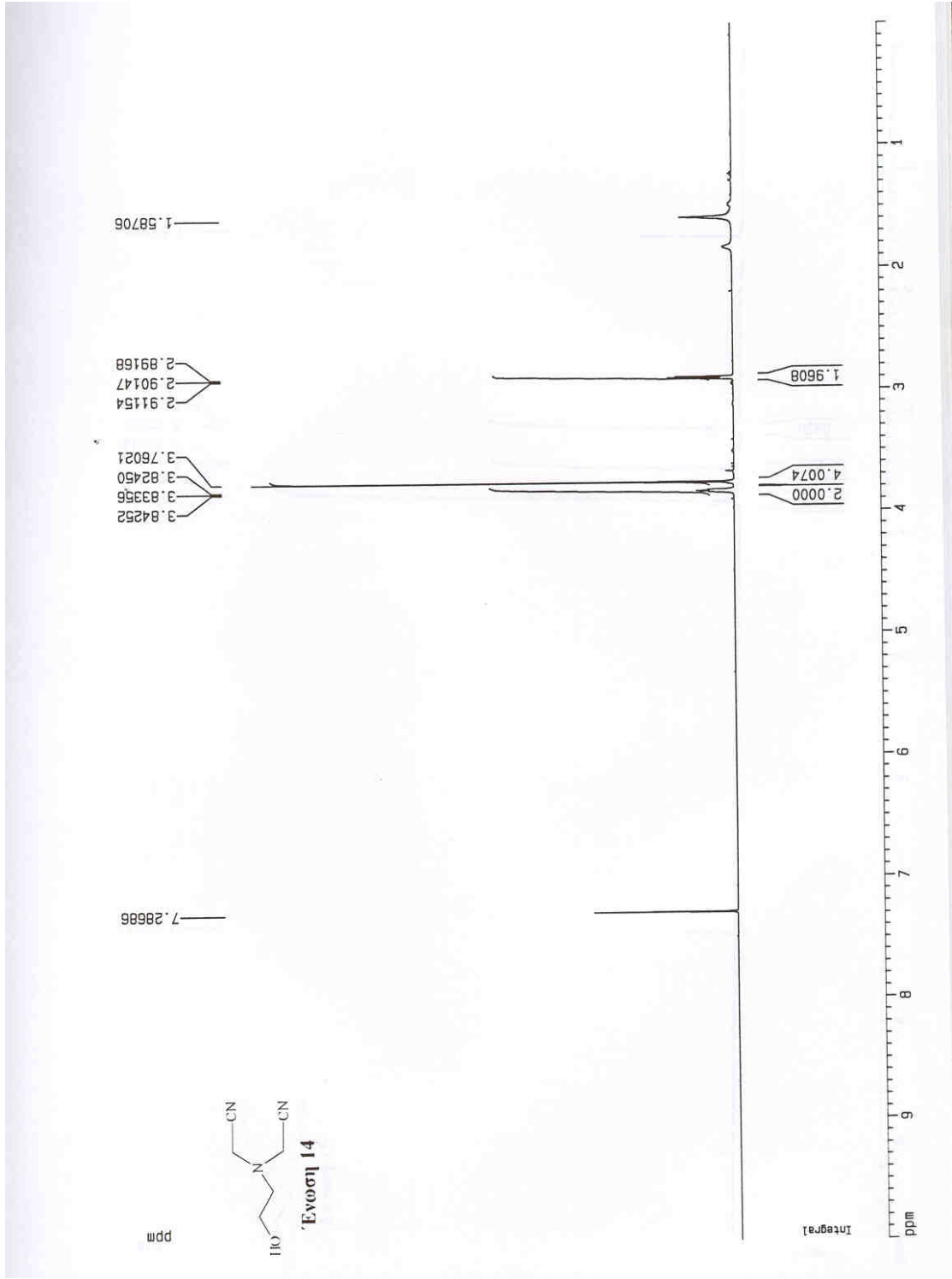


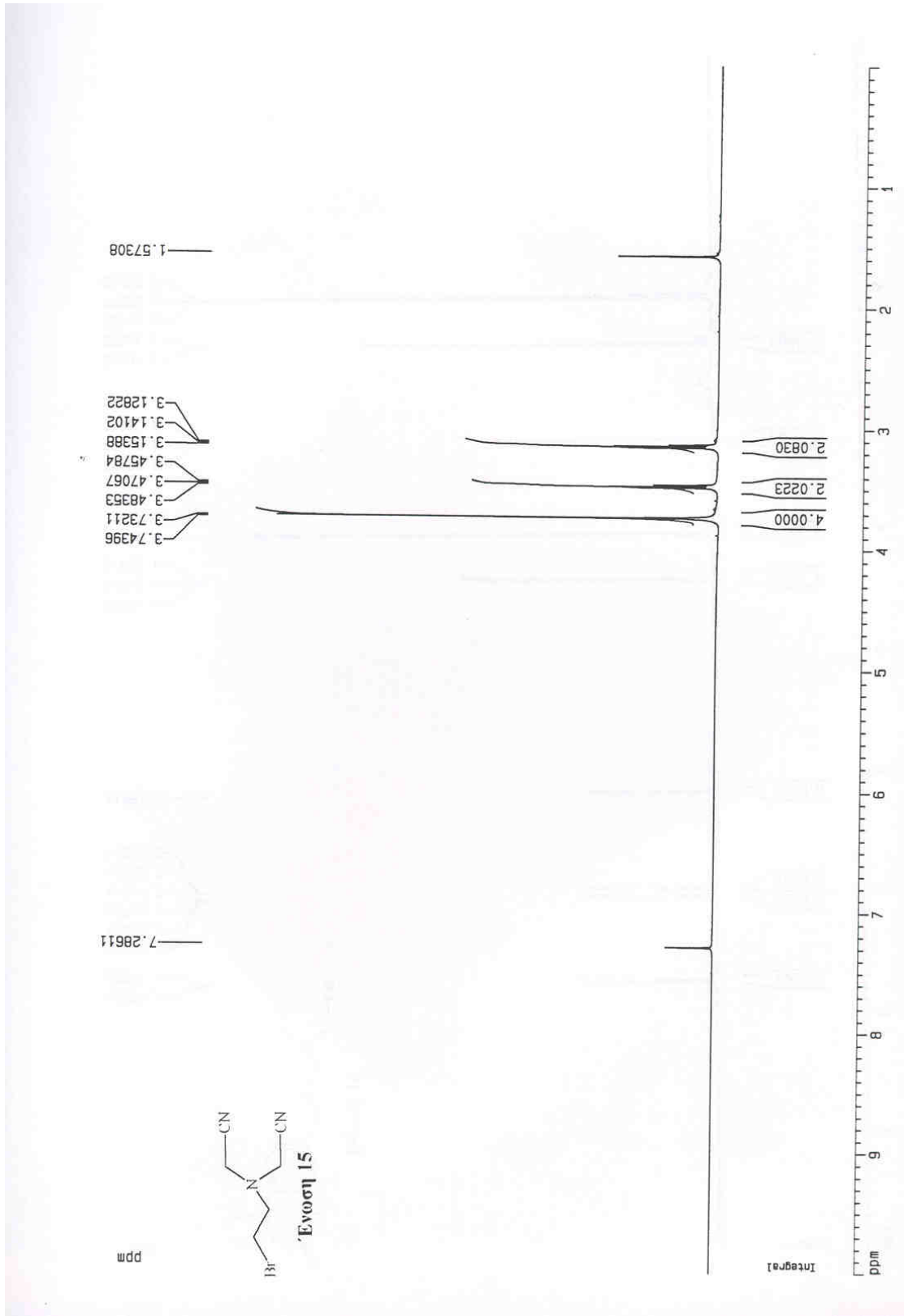
Ενωση 13

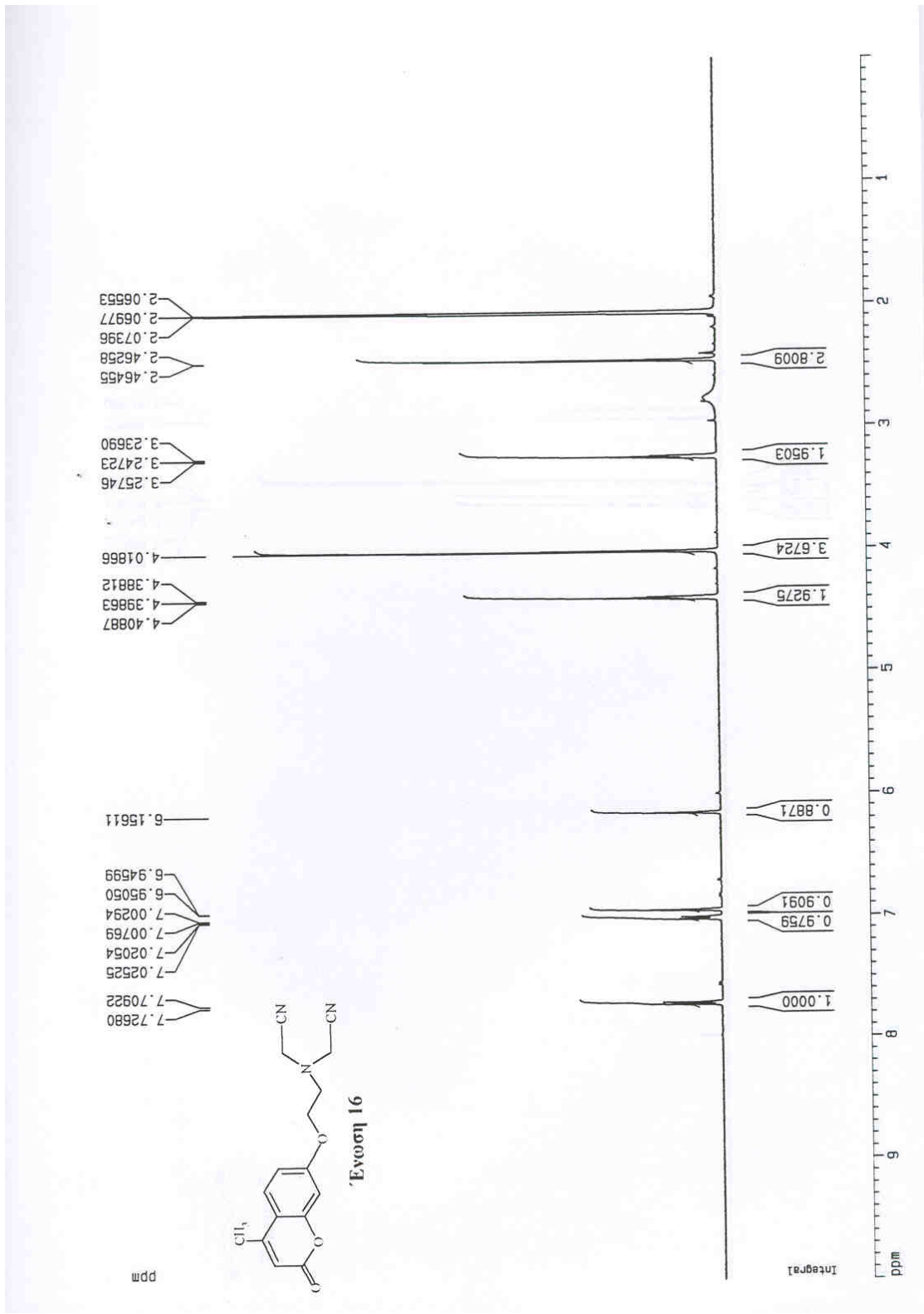
5.5-7.0ppm

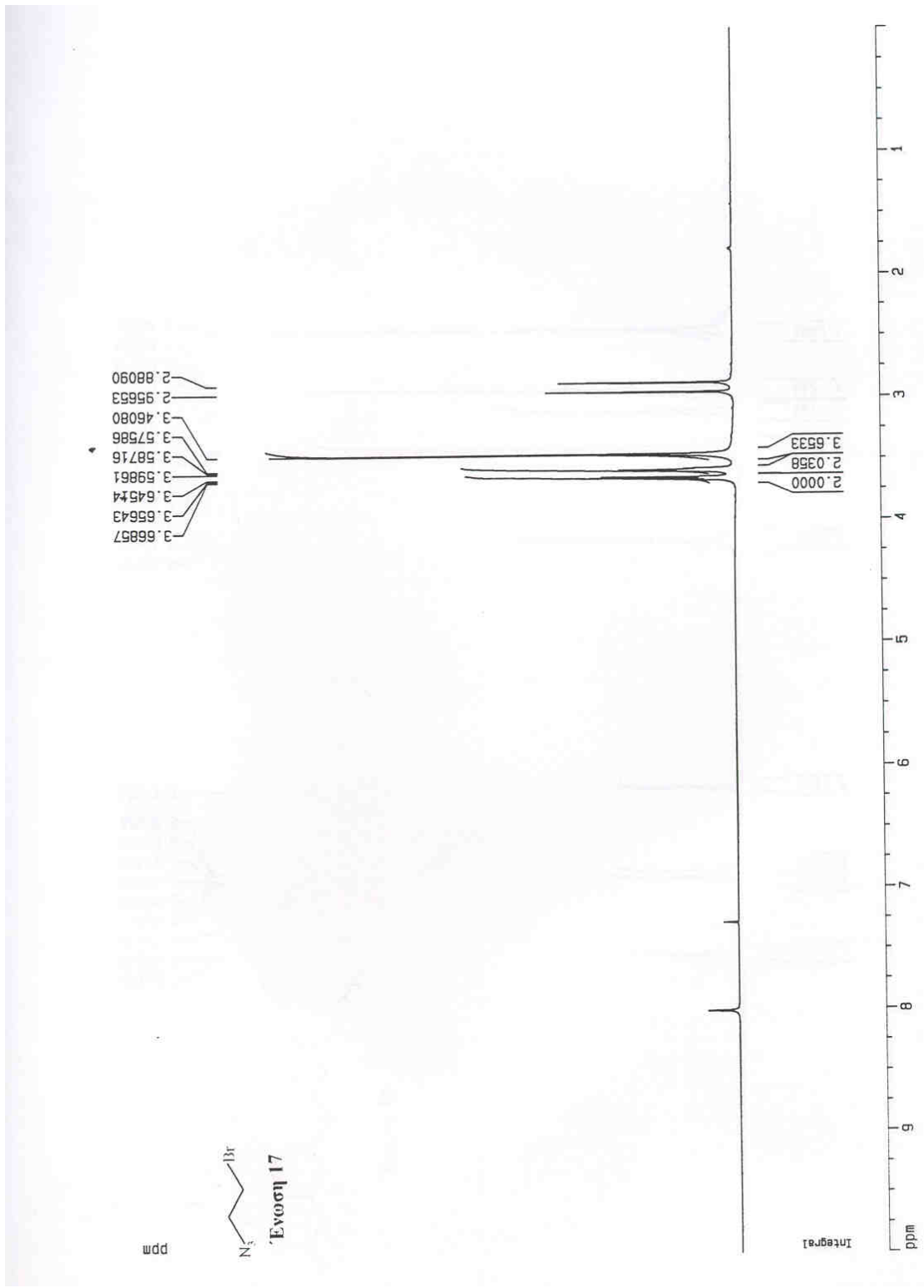
- 6.24113
- 6.20705
- 6.20203
- 6.06099
- 6.05993
- 6.04459
- 6.03953
- 5.92638
- 5.87943
- 5.87674











ppm

Integral

ppm

