

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ  
ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ  
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ**

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΦΟΥΚΑΡΑΚΗ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 1995

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή διπλώματος ειδίκευσης.**

1) Χ. Ε. Κατερινόπουλος (Επιβλέπων καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης).

2) Γ. Καραμπάτσος (Πανεπιστήμιο Κρήτης).

3) Μ. Ορφανόπουλος (Πανεπιστήμιο Κρήτης).

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου για την υπομονή και τη συμπαράστασή της και όλους όσους άμεσα ή έμμεσα με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της εργασίας μου, προσφέροντας τη γνώση τους (μέσω συζητήσεων ή μεταπτυχιακών μαθημάτων), τα μέσα (υπολογιστή, φάσματα M.S.), την εμπειρία τους και την ηθική τους συμπαράσταση.

Κυρίως όμως και περισσότερο από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. **Χαράλαμπο Κατερινόπουλο** για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, προσφέροντάς μου θέση στο εργαστήριο του, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την ευαισθησία που επέδειξε προσφέροντάς μου χρηματική βοήθεια.

Δύο άνθρωποι, που επίσης έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην εργαστηριακή μου πορεία, ήταν η Δρ. Ελένη Ιατρίδου που με καθοδήγησε επιβλέποντας τα πρώτα εργαστηριακά μου βήματα και ο υποψήφιος Δρ. Αντώνης Κουβαράκης για την συνεχή του συμπαράσταση.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η συνθετική πορεία που επιλέχθηκε για τη σύνθεση ενός φθορίζοντα δείκτη ενδοκυττάριου μαγνησίου, καθώς και οι ιδιότητές του τόσο σε σχέση με το μαγνήσιο, όσο και με μια σειρά άλλων ιόντων.

Η σύνθεση του δείκτη MBTC επιτεύχθηκε σε 13 στάδια

Φασματοσκοπικές μελέτες έδειξαν πως δε συναρμόζεται με το μαγνήσιο, αλλά είναι εκλεκτικός ως προς τον ψευδάργυρο και το κάδμιο.

## SUMMARY

In this thesis, the synthesis of a fluorescent indicator and its properties are described.

MBTC has been synthesized in 13 steps.

According to spectroscopic data, it does not coordinate with magnesium, but it is sensitive to cadmium and zinc, with  $k_d^{Cd^{+2}} = 1.0\mu M$  and  $k_d^{Zn^{+2}} = 1.9\mu M$ .

As a result, it would be used as a zinc fluorescent indicator, like TSQ.

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

## ΣΕΛΙΔΑ

Εισαγωγή	
A) Βιολογική δράση του μαγνησίου.	1
B) Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης $Mg^{+2}$ σε βιολογικά συστήματα.	2
Γ) Αιτιολόγηση ερευνητικής πρότασης	5
Αποτελέσματα και συμπεράσματα	
A) Συνθετικές πορείες	9
B) Χαρακτηριστικές ιδιότητες του δείκτη MBTC	18
Γ) Μελλοντικοί στόχοι	28
Πειραματικό μέρος	31
Φασματοσκοπικά δεδομένα	40
Βιβλιογραφία	69

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας I. Οπτικές ιδιότητες των δεικτών FURA-2, FURAPTRA, BTC, MBTC.	7
Πίνακας II. Χαρακτηριστικές ιδιότητες του MBTC.	20

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. EGTA, BAPTA, FURA-2, FURA-RED.	5
Σχήμα 2. EDTA, APTRA, FURAPTRA.	6
Σχήμα 3. BTC, MBTC.	8
Σχήμα 4. Βασική ρετροσυνθετική πορεία.	9
Σχήμα 5. Προστασία υδροκινόνης.	10
Σχήμα 6. Νίτρωση προστατευμένης υδροκινόνης.	10
Σχήμα 7. Εκλεκτική αποπροστασία της ο-φαινολικής ομάδας του νίτρο παραγώγου.	11
Σχήμα 8. Καταλυτική αναγωγή νιτρομάδας.	11
Σχήμα 9. Καταλυτική αναγωγή νιτρομάδας. Απομόνωση αμμωνιακού άλατος.	11

Σχήμα 10. Πιθανός μηχανισμός για τη δημιουργία της λακτόνης.	12
Σχήμα 11. Ταυτόχρονη αλκυλίωση της αμινο και φαινολικής ομάδας.	12
Σχήμα 12. Δεύτερη ρετροσυνθετική προσέγγιση.	13
Σχήμα 13. Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού λακτάμης.	13
Σχήμα 14. Σύνθεση οξαζολίνης.	14
Σχήμα 15. Σύνθεση βρώμο-οξαζολίνης.	14
Σχήμα 16. Σύνθεση της ένωσης 12.	14
Σχήμα 17. Σύνθεση της ένωσης 14.	15
Σχήμα 18. Σύνθεση της ένωσης 7.	15
Σχήμα 19. Σύνθεση της ένωσης 15.	16
Σχήμα 20. Σύνθεση της ένωσης 16.	16
Σχήμα 21. Σύνθεση της ένωσης 12.	17
Σχήμα 22. Σύνθεση του δείκτη MBTC.	18
Σχήμα 23. Απόκριση του MBTC στις αλλαγές του pH.	21
Σχήμα 24. Απόκριση του MBTC σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και μαγνησίου.	22
Σχήμα 25. Απόκριση του MBTC σε σειρά μετάλλων.	23
Σχήμα 26. Μετατόπιση του μεγίστου του φάσματος διέγερσης με την προσθήκη ψευδαργύρου.	24
Σχήμα 27. Μετατόπιση του μεγίστου του φάσματος διέγερσης με την προσθήκη καδμίου.	25
Σχήμα 28. Καμπύλη της σταθεράς διάστασης του καδμίου.	26
Σχήμα 29. Καμπύλη της σταθεράς διάστασης του ψευδαργύρου.	27

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>4</b>	40
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>4</b>	41
I.R. της ένωσης <b>4</b>	42
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>6</b>	43
M.S. της ένωσης <b>6</b>	44
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>7</b>	45
I.R. της ένωσης <b>7</b>	46
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>8</b>	47
I.R. της ένωσης <b>8</b>	48
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>9</b>	49
I.R. της ένωσης <b>9</b>	50
M.S. της ένωσης <b>9</b>	51
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>10</b>	52
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>11</b>	53
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>12</b>	54
I.R. της ένωσης <b>12</b>	55
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>13</b>	56
I.R. της ένωσης <b>13</b>	57
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>14</b>	58
I.R. της ένωσης <b>14</b>	59
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>7</b>	60
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>15</b>	61
I.R. της ένωσης <b>15</b>	62
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>16</b>	63
I.R. της ένωσης <b>16</b>	64
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>17</b>	65
M.S. της ένωσης <b>17</b>	66
I.R. της ένωσης <b>17</b>	67
<sup>1</sup> H - N.M.R. της ένωσης <b>18</b>	68



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## A) ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ

Το μαγνήσιο είναι ένα στοιχείο γνωστό από αρχαιοτάτων χρόνων, αλλά η χημεία του δεν ήταν γνωστή μέχρι τον 17 αιώνα. Πήρε δε, την ονομασία του από τον H. Davy ο οποίος το απομόνωσε το 1808.<sup>1</sup> Όπως και το ασβέστιο, το κάλιο, ο φωσφόρος, το νάτριο, το χλώριο και το θείο, το μαγνήσιο βρίσκεται στον οργανισμό, υπό μορφή ιόντων ( $Mg^{+2}$ ), και σε ποσοστό μεγαλύτερο του  $5 \times 10^{-3}$ .<sup>2</sup>

Είναι γνωστό πως τα ιόντα του μαγνησίου χρησιμοποιούνται ως συμπαραγοντες κυτταρικών ενζύμων και μεταφορέων. Επιπλέον το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώνεται στην ικανότητα του  $Mg^{+2}$  να δρα ως ρυθμιστής της δράσης των ιόντων του ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ ) και αυτό γίνεται ως εξής: 1) Παρεμποδίζει την ελευθέρωση του  $Ca^{+2}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, ως απόκριση σε μια ξαφνική εισροή εξωκυττάριου  $Ca^{+2}$ , η οποία φυσιολογικά ενεργοποιεί αυτή την ελευθέρωση. 2) Οδηγεί το  $Ca^{+2}$  στο σαρκοπλασματικό δίκτυο ενεργοποιώντας την ΑΤΡάση του ασβεστίου (Ca-ΑΤΡάση). 3) Δρα ανταγωνιστικά με το  $Ca^{+2}$  σε κάποιες περιοχές συναρμογής των τροπονίνης-C και μυοσίνης. 4) Παρεμποδίζει την ικανότητα του να διεγείρει την τάση του μυοκαρδίου. 5) Κατανέμεται στα μιτοχόνδρια και ρυθμίζει την ποσότητα του κυτταρικού  $Mg^{+2}$  που αλληλεπιδρά με το κυτταρικό  $Ca^{+2}$  επιβάλλοντάς του επιπλέον να παραμένει σε σφαιροειδή (διαλυτή) μορφή.<sup>3</sup>

Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι τα ιόντα μαγνησίου βρίσκονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, προσφέροντας σταθερότητα σε πολλά κυτταρικά ένζυμα και μεταφορείς εξαρτώμενους από το μαγνήσιο. Κατά συνέπεια ακόμα και μικρές αργές αλλαγές συγκεντρώσεων  $Mg^{+2}$  είναι δυνατό να προκαλέσουν σπουδαία διαφοροποίηση στη ρύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας.

Έχει αναφερθεί, μέσω κλινικών μελετών, ότι ασθένειες, όπως υπέρταση, μυοκαρδιοπάθειες, αλκοολισμός, διαβήτης, που οφείλονται σε αύξηση πίεσης του αίματος, συχνά συνδέονται με μείωση του  $Mg^{+2}$  του ορού.<sup>4</sup> Έλλειψη δε  $Mg^{+2}$  έχει ως αποτέλεσμα τη μη επιτυχή παρεμπόδιση εισροής  $Ca^{+2}$  στα κύτταρα, την παρεμπόδιση εκροής του από το κύτταρο, μέσω της Ca-ΑΤΡάσης και την ελλιπή αποθήκευσή του στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Κατά συνέπεια μειώνει τη διαβάθμιση  $Ca^{+2}$  κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον η μείωση  $[Mg^{+2}]$  στον ορό οδηγεί, αφ ενός, στην ανεξέλεγκτη εισαγωγή  $Ca^{+2}$  στα μιτοχόνδρια και κατά συνέπεια τη λειτουργική και δομική διάρρηξή τους και αφ ετέρου στην κρυστάλλωση του  $Ca^{+2}$  προκαλώντας αποτιάνωση ( calcification ) διαφόρων ιστών.<sup>3</sup>

Αντίθετα υπερμαγνησαιμία που σημειώνεται σε νεφρικές αγγειακές δυσλειτουργίες (renal vascular disorders) και κυκλοφορικό shock (circulatory shock), συχνά συνδέεται με υποτασικά επεισόδια.<sup>4</sup>

## **B) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ**

Η αποτίμηση του ρόλου του  $Mg^{+2}$  ως μόνιμου ρυθμιστή της κυτταρικής λειτουργίας δυσχεραίνεται εξαιτίας του μειωμένου αριθμού άμεσων μεθόδων μέτρησης του επιπέδου του κυτταροπλασματικού μαγνησίου  $[Mg^{+2}]_i$ . Οι υπάρχουσες τεχνικές, είναι οι εξής:

**1. Τα εκλεκτικά μικροηλεκτρόδια μαγνησίου.** Μέχρι αρκετά πρόσφατα δεν ήταν αρκετά εκλεκτικά, με αποτέλεσμα να παρεμβάλλονται στις μετρήσεις ιόντα καλίου και νατρίου, καθιστώντας απαραίτητη τη βαθμονόμηση του μικροηλεκτροδίου με προσεκτικό υπολογισμό των αλκαλίων.<sup>5</sup> Αξιοσημείωτη βελτίωση ως προς αυτόν τον τομέα επέφερε ο Simon.<sup>6</sup> Επιπλέον πρόσφατα παρασκευάστηκαν δείκτες ηλεκτροδίων με μεγάλη εκλεκτικότητα του  $Mg^{+2}$  ως προς το  $Ca^{+2}$ .<sup>7</sup> Η βελτίωση αυτή είναι αξιοσημείωτη καθώς το μαγνήσιο και το ασβέστιο έχουν παρόμοιες ιδιότητες όσον αφορά τα άτομα με τα οποία συναρμόζονται και επιπλέον το  $Ca^{+2}$  (λόγω μεγέθους) είναι πιο ευέλικτο στο σχηματισμό συμπλόκων από το  $Mg^{+2}$ .<sup>8</sup>

**2. Null point for plasma membrane permeabilisation.** Με αυτή τη μέθοδο τα προς μελέτη κύτταρα αιωρούνται σε μέσα με διαφορετική εξωτερική συγκέντρωση  $Mg^{+2}$  και μετά με την προσθήκη συνήθως μεγάλων συγκεντρώσεων ενός ιονοφόρου αυξάνεται η διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης σε  $Mg^{+2}$ . Η προς μέτρηση ποσότητα σε αυτήν τη μέθοδο είναι η συγκέντρωση του εξωτερικού μαγνησίου  $[Mg^{+2}]_o$  όταν έχει αποκατασταθεί η ισορροπία. Καθώς μέσω του ιονοφόρου ανταλλάσσονται 2 ισοδύναμα  $H^{+1}$  με 1  $Mg^{+2}$  στην ισορροπία ισχύει η σχέση (1), μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση ιόντων μέσα στο κύτταρο  $[Mg^{+2}]_i$ .<sup>5,9</sup>

$$[Mg^{+2}]_i / [Mg^{+2}]_o = [H^{+1}]_i^2 / [H^{+1}]_o^2 \quad (1)$$

Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η έκθεση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αιωρήματα με μεγάλη πυκνότητα και η πιθανότητα εσφαλμένης μέτρησης στην περίπτωση που το κύτταρο περιέχει και οργανίδια με διαφορετική  $[Mg^{+2}]_i$  από το κυτταροπλασματικό, καθώς το ιονοφόρο διαπερνά παράλληλα και τη μεμβράνη των οργανιδίων.

**3. <sup>31</sup>P Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός.** Μετρήσεις μέσω N.M.R. του συμπλόκου  $ATP-Mg^{+2}$  στηρίζονται στο διαφορετικό μέγεθος διαφοροποίησης των χημικών μετατοπίσεων των  $\alpha$  και  $\beta$  ή των  $\beta$  και  $\gamma$  φωσφορικών ομάδων του  $ATP$  ανάλογα με το λόγο του δεσμευμένου με μαγνήσιο  $ATP$  προς το ελεύθερο  $ATP$ .

Έτσι η διαφορά των  $\alpha$ ,  $\beta$  χημικών μετατοπίσεων κυμαίνεται μεταξύ 10.81 ppm για το ελεύθερο ATP και 8.44 ppm για το κορεσμένο σε  $Mg^{+2}$  ATP.<sup>5</sup> Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η σχετικά μικρή σταθερά διάστασης  $k_D^{Mg}$  (0.1mM)<sup>10</sup> που οδηγεί στη μείωση της ακρίβειας της μέτρησης καθώς στα περισσότερα κύτταρα το ATP είναι σχεδόν κορεσμένο με μαγνήσιο.

**4. Χρωστικές ευαίσθητες στο μαγνήσιο.** Το 1974 ο Scarpa πρότεινε το Eriochrome Blue SE, 3-[(5-χλώρο-2-υδροξυφαίνυλ)αζο]-4,5-διυδροξυ-2,7-ναφθαλενδισουλφονικό οξύ, ως ένα βιολογικό δείκτη ελεύθερου  $Mg^{+2}$ . Το Eriochrome Blue δε δεσμεύει μόνο  $Mg^{+2}$ , αλλά και  $Ca^{+2}$  και πρωτόνια.<sup>11</sup> Εξαιτίας της δυσκολίας στην απόλυτη βαθμονόμηση στην πολυ-χρωματική ακτινοβολία, χρησιμοποιείται μόνο ποιοτικά και ενδεικτικά της αύξησης ή μείωσης του  $Mg^{+2}$  μέσω διάλυσης.<sup>5,9</sup>

#### **5. Τρικαρβοξυλικοί δείκτες.**

**5α. Τρικαρβοξυλικοί δείκτες με ομάδες σήμανσης μέσω N.M.R. όπως το  $^{19}F$ .** Αυτό το είδος δεικτών στηρίζεται στην ιδέα της ομάδας του Tsien<sup>12</sup> που επεκτάθηκε από την ομάδα του Smith<sup>13</sup> η οποία χρησιμοποίησε κάποιο πολυφθοριομένο αρωματικό παράγωγο βασισμένο στη δομή της γνωστής χηλικής ένωσης EGTA με σκοπό τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων του ενδοκυττάρου ασβεστίου [ $Ca^{+2}$ ], με  $^{19}F$  πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται κάποιο φθοριομένο παράγωγο του EDTA που είναι μια άλλη πολύ διαδεδομένη χηλική ένωση.<sup>14</sup> Η χρήση των δεικτών αυτού του είδους παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Το κυριώτερο από αυτά είναι πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κύτταρα με έντονα φθορίζοντα ενδοκυττάρια συστατικά. Το βασικό μειονέκτημα αυτών των δεικτών είναι η αξιοσημείωτα μικρή ευαισθησία τους σε σχέση με τους δείκτες φθορισμού.

**5β. Τρικαρβοξυλικές ενώσεις με δείκτες φθορισμού.** Όπως και η προηγούμενη κατηγορία τρικαρβοξυλικών δεικτών, έτσι και αυτοί οι δείκτες στηρίζονται στη στρατηγική που αναπτύχθηκε από τον Tsien, ο οποίος εισήγαγε φθορίζοντες δείκτες στα κύτταρα με σκοπό τη μέτρηση [ $Ca^{+2}$ ].<sup>12,15,16</sup> Η ελεύθερη και η σύμπλοκος με  $Mg^{+2}$  μορφή παρουσιάζουν διαφορές στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού. Με βάση τις αλλαγές αυτές είναι δυνατός ο υπολογισμός της [ $Mg^{+2}$ ]. Το σημαντικό πλεονέκτημα των τρικαρβοξυλικών δεικτών σε σχέση με τις άλλες μεθόδους προσδιορισμού της [ $Mg^{+2}$ ], είναι πως εισάγονται στο κύτταρο υπό τη μορφή ακετοξυμεθυλεστέρων διαπερνώντας την κυτταροπλασματική μεμβράνη χωρίς να οδηγήσουν στην προσωρινή έστω διάσπασή της.

Οι ιδιότητες που οφείλουν να έχουν είναι:

**1.** Ευαισθησία ανίχνευσης ιόντων μαγνησίου και εκλεκτικότητα σε σχέση με άλλα ιόντα. Δηλαδή είναι απαραίτητο να έχουν σταθερές διάστασης ( $k_D^{Mg}$ ) κοντά στα

φυσιολογικά επίπεδα του κυτταροπλασματικού μαγνησίου, της τάξης του 1mM και αρκετά μακριά από τα φυσιολογικά επίπεδα των άλλων ενδοκυττάρων ιόντων.

**2.** Ορισμένη οξύτητα ( $pK_a < 7$ ), ώστε να μην πρωτονιώνονται στο κυτταρικό περιβάλλον, γιατί κάτι τέτοιο θα σήμαινε μείωση της ταχύτητας συναρμογής του μαγνησίου με το δείκτη.

**3.** Δυνατότητα διαπερατότητας κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να μπορούν να γίνουν μετρήσεις ακόμα και στα πιο μικρά κύτταρα. Αυτό είναι και το μεγαλύτερο πλεονέκτημά τους έναντι άλλων μεθόδων, όπως είναι τα εκλεκτικά μικροηλεκτρόδια. Έχουν τη δυνατότητα με τη μορφή των τρι-ακετοξυ-μεθυλεστέρων να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες χωρίς να χρειαστεί να εισαχθούν στα κύτταρα με μικροενέσεις ή με προσωρινή διάσπαση της μεμβράνης του πλάσματος. Οι εστέρες δε, όταν περάσουν την κυτταρική μεμβράνη, υδρολύονται στο κυτταρόπλασμα από εστεράσες. Τα τρικαρβοξυλικά ιόντα που σχηματίζονται είναι πλέον πολύ πολικά για να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη προς την αντίθετη κατεύθυνση και παγιδεύονται στο κύτταρο.

**4.** Δυνατότητα αλλαγών στο φάσμα απορρόφησης μεταξύ της ελεύθερης και της σύμπλοκου με μαγνήσιο μορφής. Αυτό συμβαίνει γιατί στην ελεύθερή τους μορφή το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου βρίσκεται σε συζυγία με τον αρωματικό δακτύλιο. Όταν όμως δεσμευτεί το ιόν, ο δεσμός αζώτου - δακτυλίου στρέφεται, προσανατολίζοντας το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου εκτός συζυγίας.

**5.** Απορρόφηση στο μήκος κύματος της argon laser. Απορροφήσεις σε μικρότερα μήκη κύματος συμπίπτουν με απορροφήσεις ενδοκυττάρων συστατικών, μειώνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Απορροφήσεις στο μήκος κύματος της argon laser είναι απαραίτητες για τεχνικές όπως η flow cytometry, που προσφέρεται ιδιαίτερα για την επισήμανση ενδοκυττάρων διαδικασιών.

**6.** Παρουσίαση φθορισμού με σημαντική κβαντική απόδοση και αισθητή μεταβολή του μήκους κύματος με τη δέσμευση των  $[Mg^{+2}]_i$ .

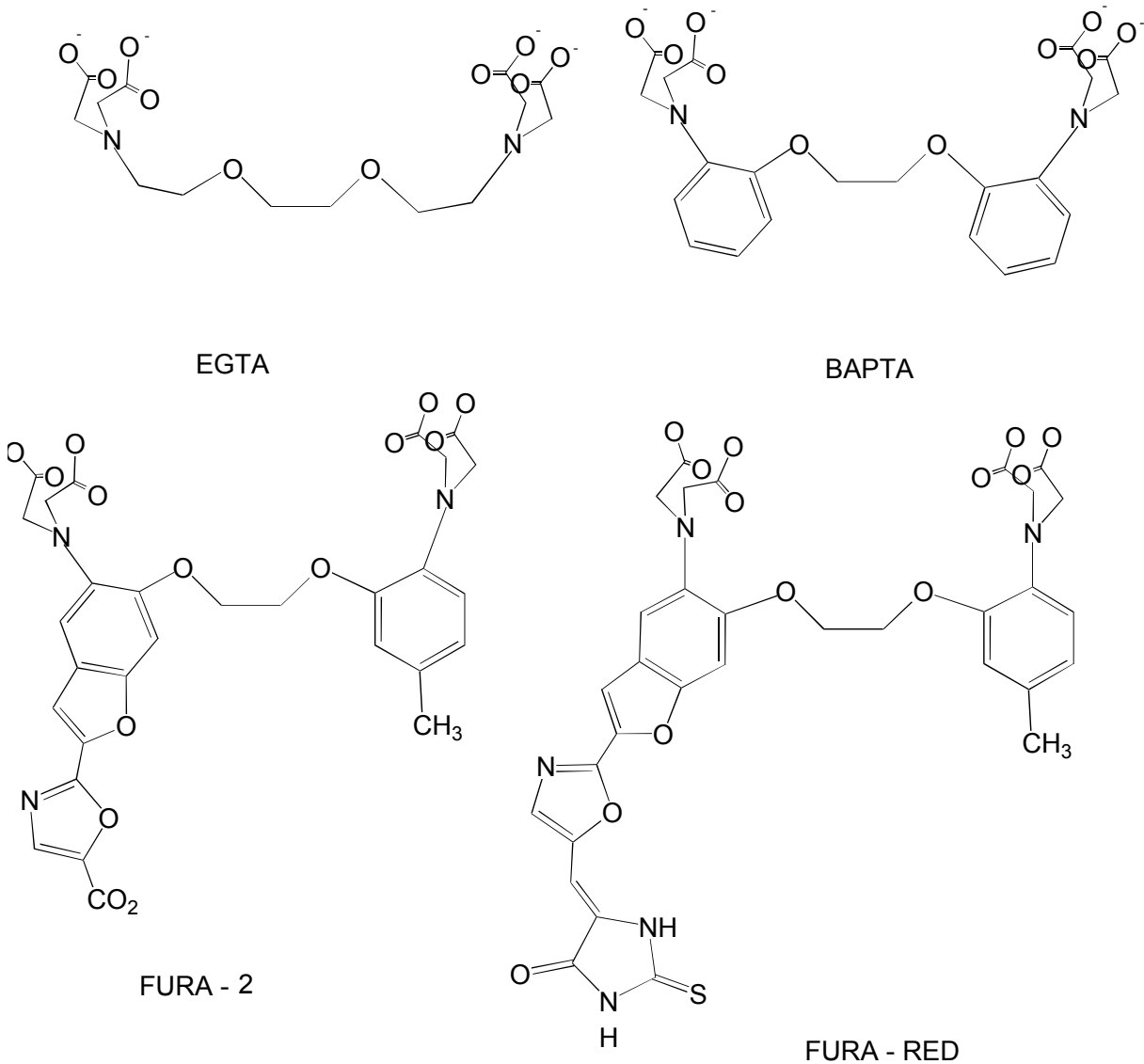
**7.** Απουσία τοξικότητας.

Στα μειονεκτήματα των δεικτών φθορισμού μπορούν να συμπεριληφθούν 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 σύμπλοκου μορφής, αλλά κυρίως στην ένταση. Σημαντικό είναι επίσης να σημειωθεί η έλλειψη εκλεκτικότητας των δεικτών ως προς το  $Mg^{+2}$  σε σχέση με το  $Ca^{+2}$  αν και κάτι τέτοιο δε δημιουργεί προβλήματα στις μετρήσεις, εξαιτίας της μικρής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης  $[Ca^{+2}]_i$  ( $10^{-4}mM$ ) σε σχέση με τη σταθερά συγγένειας του δείκτη  $K_d = 50\mu M$  προς το αντίστοιχο ιόν. Τέλος σε μερικούς ιστούς δεν

υδρολύονται απόλυτα οι εστερομάδες και παρατηρείται διαμερισματοποίηση του φθορισμού στα διάφορα οργανίδια.

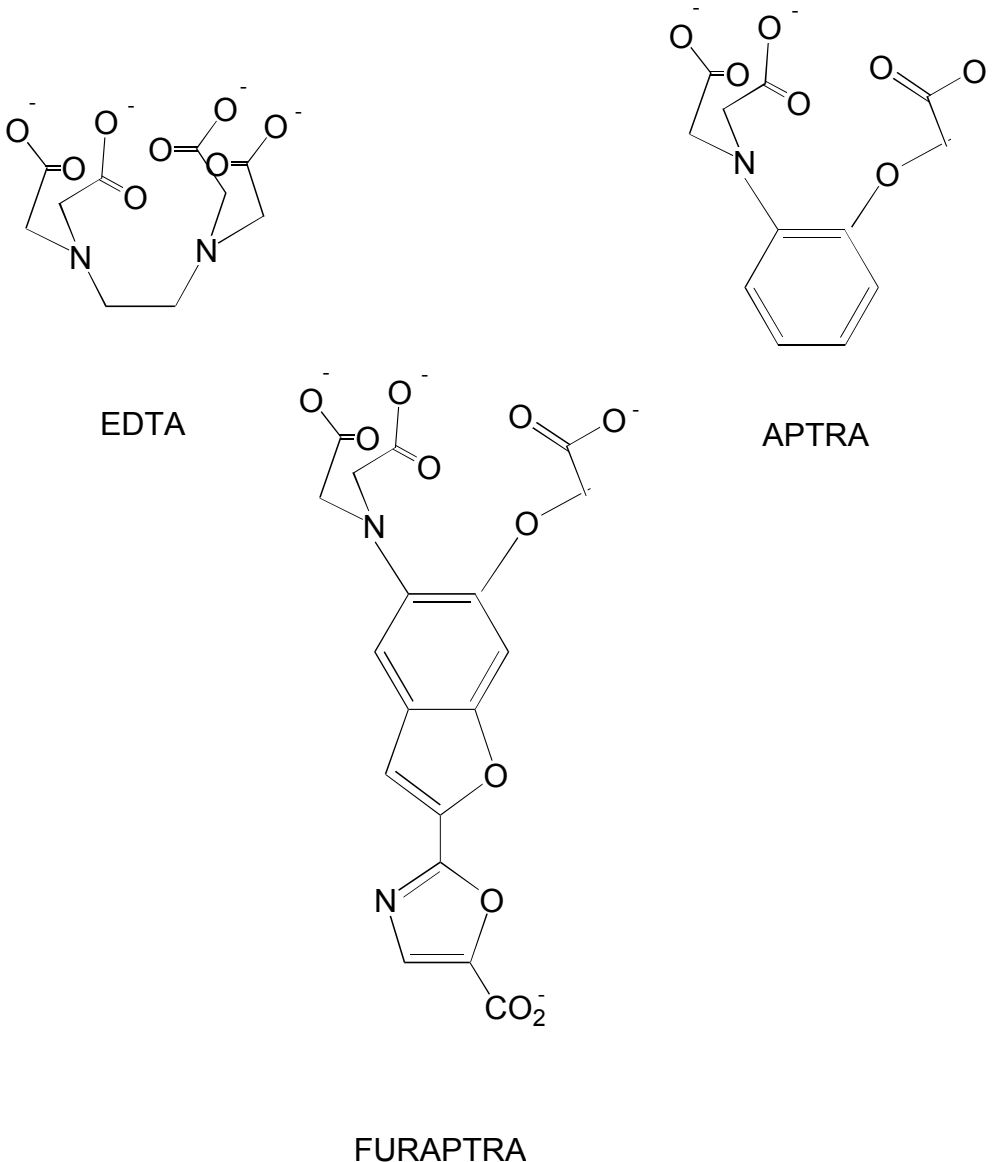
### Γ) ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΤΑΣΗΣ

Οι πρώτοι καρβοξυλικοί δείκτες που στηρίζονται στη στρατηγική που αναφέρεται στην εισαγωγή αφορούν τη μέτρηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου  $[Ca^{+2}]_i$  και σχεδιάστηκαν από την ερευνητική ομάδα του Tsien το 1980.<sup>12</sup> Ήταν δε αναγκαία η εξασφάλιση μεγάλης εκλεκτικότητας ως προς το  $[Ca^{+2}]_i$  σε σχέση με το  $[Mg^{+2}]_i$ , καθώς η αναλογία των  $[Ca^{+2}]_i : [Mg^{+2}]_i$  είναι 1 :  $10^4$  αντίστοιχα. Οι προτεινόμενοι λοιπόν δείκτες είναι παράγωγα της γνωστής χηλικής ένωσης EGTA, (BAPTA, Σχημ. 1), που εξασφαλίζει την ανάλογη εκλεκτικότητα. Πιστεύεται πως αυτό οφείλεται στο μέγεθος της κοιλότητας που σχηματίζεται από το δείκτη όταν δέχεται το ιόν εξαιτίας της μεγαλύτερης ιονικής ακτίνας του  $Ca^{+2}$  σε σχέση με το  $Mg^{+2}$ . ( $Ca^{+2} : 1.06 \text{ \AA}$ ,  $Mg^{+2} : 0.78 \text{ \AA}$ ).<sup>17</sup>



Σχημ. 1

Αντίστοιχα λοιπόν με τους δείκτες  $[Ca^{+2}]_i$  για το σχεδιασμό δεικτών  $[Mg^{+2}]_i$  χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα του EDTA (Σχημ. 2) τα οποία έχουν χαρακτηριστικά μικρότερη κοιλότητα και ελαττωμένη εκλεκτικότητα μεταξύ του  $Ca^{+2}$  και του  $Mg^{+2}$ .<sup>14</sup> Το EDTA γίνεται λιγότερο ευαίσθητο στις αλλαγές του pH αν οι μεθυλενικές ομάδες μεταξύ των αζώτων αντικατασταθούν από έναν βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος δεν προκαλεί αξιοσημείωτες αλλαγές στο μέγεθος της χηλικής κοιλότητας. Εξαιτίας της δυσκολίας της σύνθεσης της ένωσης ο-φαινυλενοδιάμινο N,N,N',N' τετραοξικό οξύ, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, οι πιο πάνω ερευνητές αποφάσισαν να αντικαταστήσουν τη μία από τις δύο αμινομάδες με μία υδροξυλομάδα (APTRA Σχημ.2).<sup>14</sup> Μια τέτοια καινοτομία ώφειλε να επηρεάσει αρνητικά τη συγγένεια του δείκτη με το μαγνήσιο, (συνήθης αριθμός συναρμογής του μαγνησίου είναι 6), επιπλέον όμως να βελτιώσει κατά μεγάλο ποσοστό την εκλεκτικότητά του ως προς το  $Mg^{+2}$  σε σχέση με το  $Ca^{+2}$ .<sup>8</sup>



Σχημ. 2

Καθώς ένας από τους πρώτους και πιο διαδεδομένους δείκτες ενδοκυττάρου  $Ca^{+2}$ , που έχουν παρασκευασθεί από τον Tsien<sup>15</sup> είναι η Fura-2 (Σχημ. 1), στην οποία ως χρωμοφόρο χρησιμοποιείται ένας υποκατεστημένος φουρανικός δακτύλιος, αποφασίστηκε από την ερευνητική ομάδα του London η σύνθεση της αντίστοιχης Furaptra<sup>14</sup> (Σχημ. 2).

Οι ιδιότητες του χηλικού τμήματος του δείκτη κρίθηκαν ικανοποιητικές παρά το γεγονός πως παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το  $Ca^{+2}$  ( $k_d^{Ca^{+2}} = 53\mu M$ ,  $k_d^{Mg^{+2}} = 1.5mM$ ), εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσης ενδοκυττάρου ασβεστίου 1-2mM έναντι της αντίστοιχης του μαγνησίου 30mM. Κατά συνέπεια το  $Ca^{+2}$  δεν παρεμβάλεται στις μετρήσεις του ενδοκυττάρου μαγνησίου.

Όσον αφορά τις οπτικές ιδιότητες του δείκτη, αυτός συμπεριφέρεται όπως και ο αντίστοιχος δείκτης ασβεστίου Fura-2. (Πίνακας I)

ΠΙΝΑΚΑΣ I

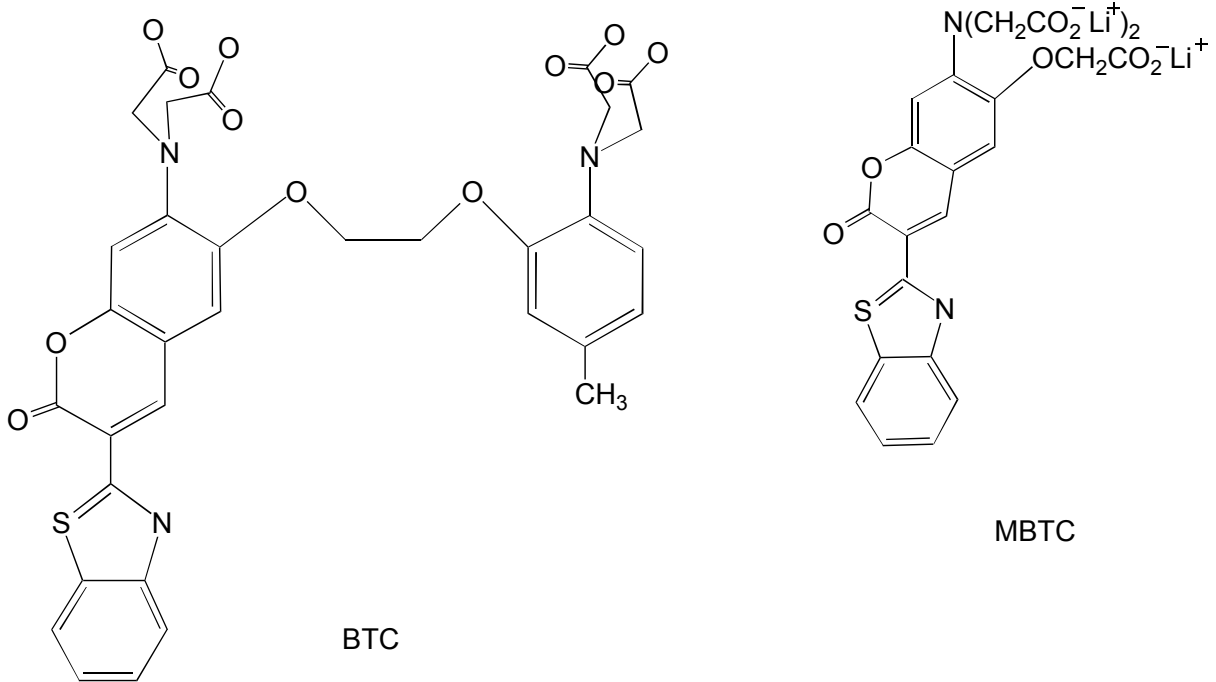
Δείκτης	Μέγιστα Διέγερσης		Μέγιστα Εκπομπής		Κβαντική απόδοση	
	(nm)		(nm)			
	Ελεύθερη μορφή	Συμπλοκοποιημένη μορφή	Ελεύθερη μορφή	Συμπλοκοποιημένη μορφή	Ελεύθερη μορφή	Συμπλοκοποιημένη μορφή
Fura-2	362	335 ( $Ca^{+2}$ )	512	505 ( $Ca^{+2}$ )	0.23	0.49 ( $Ca^{+2}$ )
FURARTRA	370	335 ( $Mg^{+2}$ )	510	510 ( $Mg^{+2}$ )	0.24	0.3 ( $Mg^{+2}$ )
BTC	462	401 ( $Ca^{+2}$ )	525	525 ( $Ca^{+2}$ )	0.07	0.12 ( $Ca^{+2}$ )
MBTC	452	380 ( $Zn^{+2}$ ) 400 ( $Cd^{+2}$ )	525	505 ( $Zn^{+2}$ ) 500 ( $Cd^{+2}$ )		

Βασικό μειονέκτημα των δύο αυτών δεικτών είναι το μικρό μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν, (πίνακας I), απαγορευτικό για τη χρησιμοποίησή τους σε τεχνικές όπως η flow cytometry.

Η ανάγκη παρασκευής ενός δείκτη με βελτιωμένες οπτικές ιδιότητες σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι δείκτες  $Mg^{+2}$  παρουσιάζουν τις ίδιες οπτικές ιδιότητες με τους ανάλογους δείκτες  $Ca^{+2}$  μας οδήγησαν στη δημιουργία ενός δείκτη με χρωμοφόρο ομάδα κάποια υποκατεστημένη κουμαρίνη (Σχημ. 3) κατά αναλογία με τους αντίστοιχους δείκτες  $Ca^{+2}$ .<sup>18,19</sup> Η χρησιμοποίηση δε, ενός τέτοιου χρωμοφόρου βασίστηκε στην παρατήρηση πως οι υποκατεστημένες κουμαρίνες απορροφούν



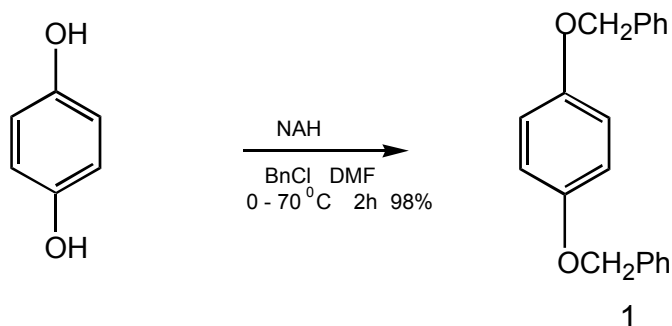
γενικότερα σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από τα αντίστοιχα βενζοφουράνια ( βασικά χρωμοφόρα των Fura-2<sup>15</sup> και Fura-Red<sup>20</sup> ) (σχημ.1). Επιπλέον πολλά παράγωγα κουμαρινών χρησιμοποιούνται ως χρωστικές laser (laser dyes) γεγονός που εξασφαλίζει τη σταθερότητα του χρωμοφόρου στις πειραματικές συνθήκες και μεγάλη κβαντική απόδοση φθορισμού.



Σχήμα 3

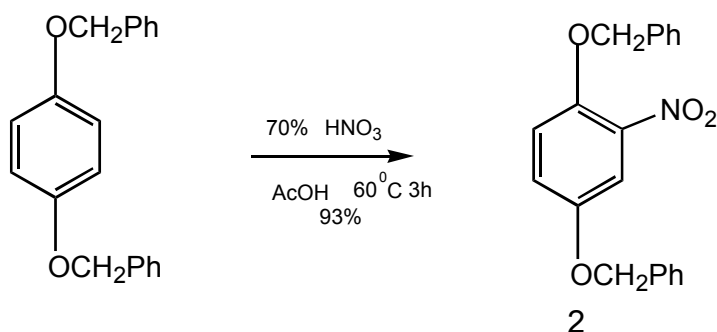


Στο αντίστοιχο συνθετικό σχήμα ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη ένωση υδροκινόννη οι υδροξυλομάδες της οποίας προστατεύονται με μια χαρακτηριστική  $S_N2$  αντίδραση, στην οποία χρησιμοποιείται  $NaH$  ως βάση για το σχηματισμό του πυρηνόφιλου που προσβάλλει το βενζυλοχλωρίδιο. Η αντίδραση γίνεται σε απρωτικό διαλύτη.<sup>15</sup>



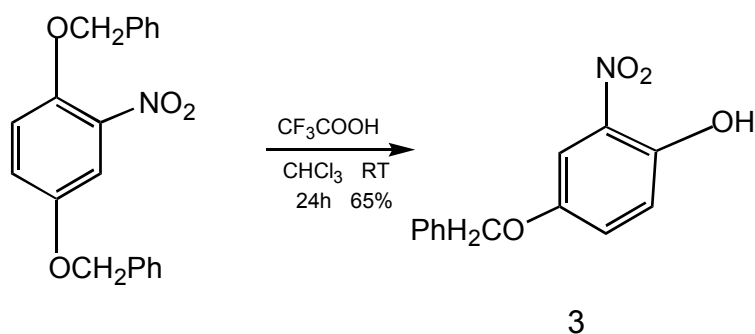
Σχημ. 5

Η επόμενη αντίδραση, είναι μια ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Δεδομένου ότι οι βενζυλαιθέρες υδρολύονται σε ισχυρά όξινες συνθήκες, για την εισαγωγή της νιτρομάδας στον αρωματικό δακτύλιο το νιτρωνιόν ( $NO_2^+$ ) δε σχηματίζεται υπό την επίδραση θειικού οξέος σε νιτρικό, αλλά υπό την επίδραση οξικού σε νιτρικό οπότε σχηματίζεται ο μικτός ανυδρίτης οξικού-νιτρικού οξέος  $CH_3COONO_2$ .<sup>15</sup>



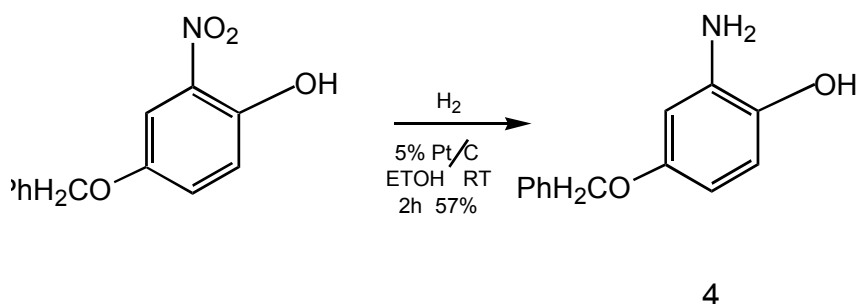
Σχημ. 6

Ακολουθεί η εκλεκτική αποπροστασία της φαινολικής ομάδας που βρίσκεται σε όρθο θέση ως προς τη νιτρομάδα παρουσία όμοιου υποκαταστάτη σε θέση πάρα.<sup>15,21</sup> Η εκλεκτική αυτή αποπροστασία επιτυγχάνεται λόγω της αρχικής συναρμογής του οξέος με τα οξυγόνα της γειτονικής νιτρομάδας.



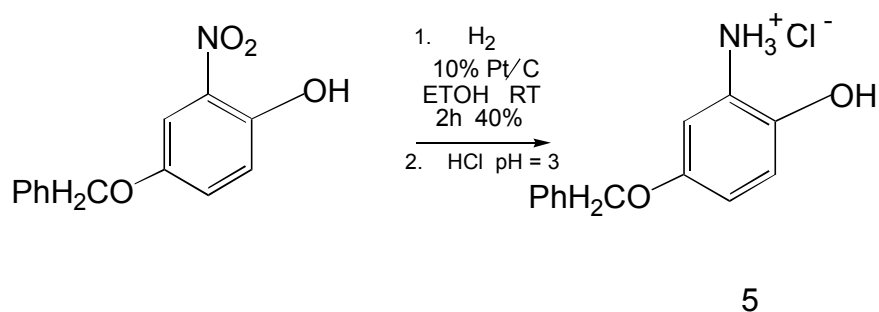
Σχημ. 7

Το επόμενο στάδιο αφορά την καταλυτική αναγωγή της νιτρομάδας σε αμινομάδα παρουσία Pt/C 10%. Η χρήση της πλατίνης αντί του παλλαδίου έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί με τη μέθοδο αυτή αποφεύγεται η υδρογονόλυση του βενζυλαιθέρα, ο οποίος λειτουργεί και ως προστατευτική ομάδα. Το προϊόν της αναγωγής, η 2-άμινο-4-βενζυλόξυ-φαινόλη, είναι πολύ ευαίσθητο και παρουσία οξυγόνου καταστρέφεται. Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχει η παρασκευή του σε καθαρή μορφή<sup>22</sup> δεν παρασκευάστηκε χωρίς προσμίξεις ακόμα και όταν η κατεργασία του έγινε υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub> και με καλά απαερωμένους διαλύτες.



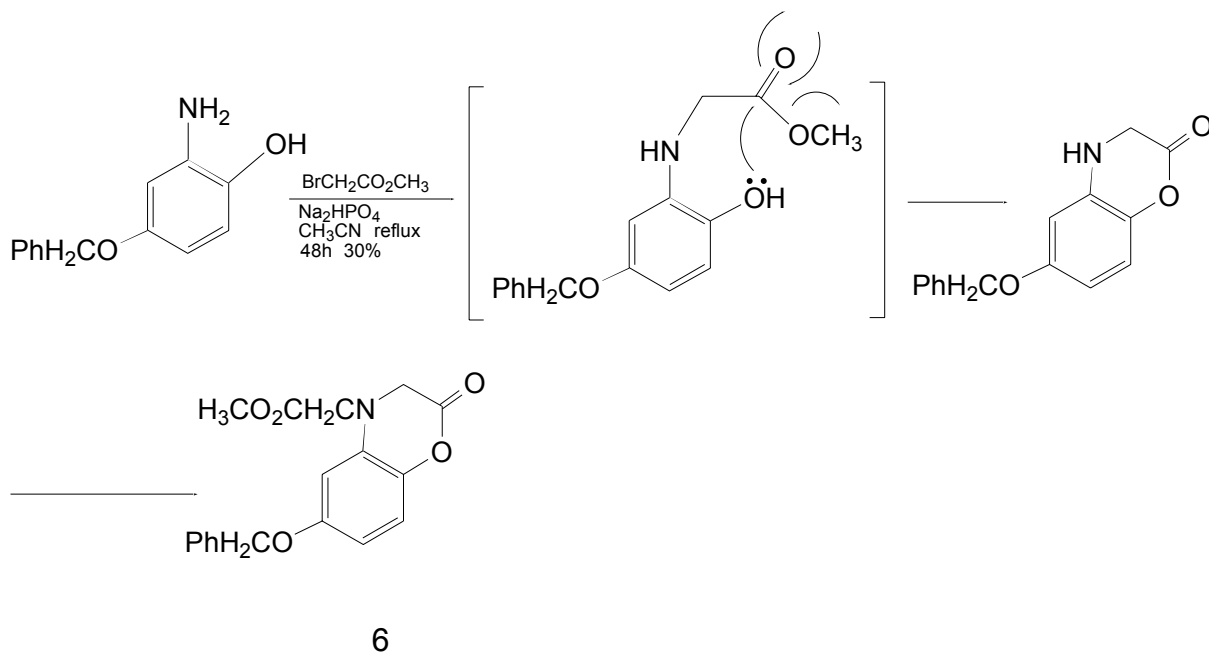
Σχημ. 8

Όταν η αναγωγή έγινε σε EtOH και στο τέλος της αντίδρασης προστέθηκε HCl 3N, απομονώθηκε το αντίστοιχο αμμωνιακό αλάτι, το οποίο ήταν σταθερό στην ατμόσφαιρα.



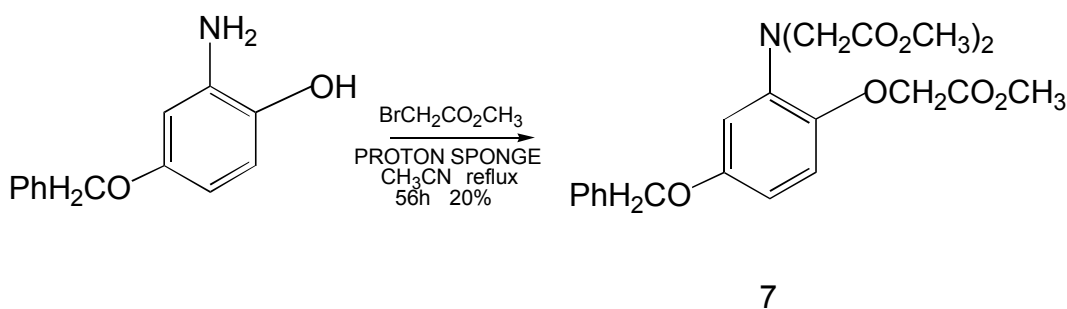
Σχημ. 9

Η επόμενη αντίδραση αφορά την ταυτόχρονη αλκυλίωση σε ένα στάδιο και της φαινολικής και της αμινο ομάδας. Αρχικά, όταν ως βάση χρησιμοποιήθηκε το όξινο φωσφορικό νάτριο, απομονώθηκε λακτόνη η οποία προήρθε από την πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλίου του εστέρα της αλκυλιωμένης αμινομάδας από το οξυγόνο της φαινολικής ομάδας.



Σχημ. 10

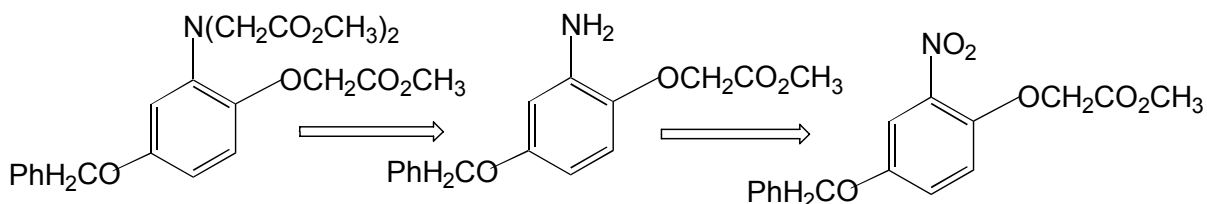
Η επόμενη βάση, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν το Proton Sponge.<sup>22</sup> Σε αυτή την αντίδραση απομονώθηκε κυρίως το επιθυμητό προϊόν με μικρό ποσοστό από το κυκλικό παραπροϊόν 6.



Σχημ. 11

Ακόμα και σε αυτή την περίπτωση το ποσοστό της αντίδρασης ήταν πολύ μικρό, αν και πραγματοποιήθηκε υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub> και σε απαερωμένο διαλύτη. Αυτό μπορεί να οφείλεται, αφ ενός στη μη χρησιμοποίηση καθαρού αντιδραστήριου ως αντιδρώντος, και αφ ετέρου στην καταστροφή του αντιδρώντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

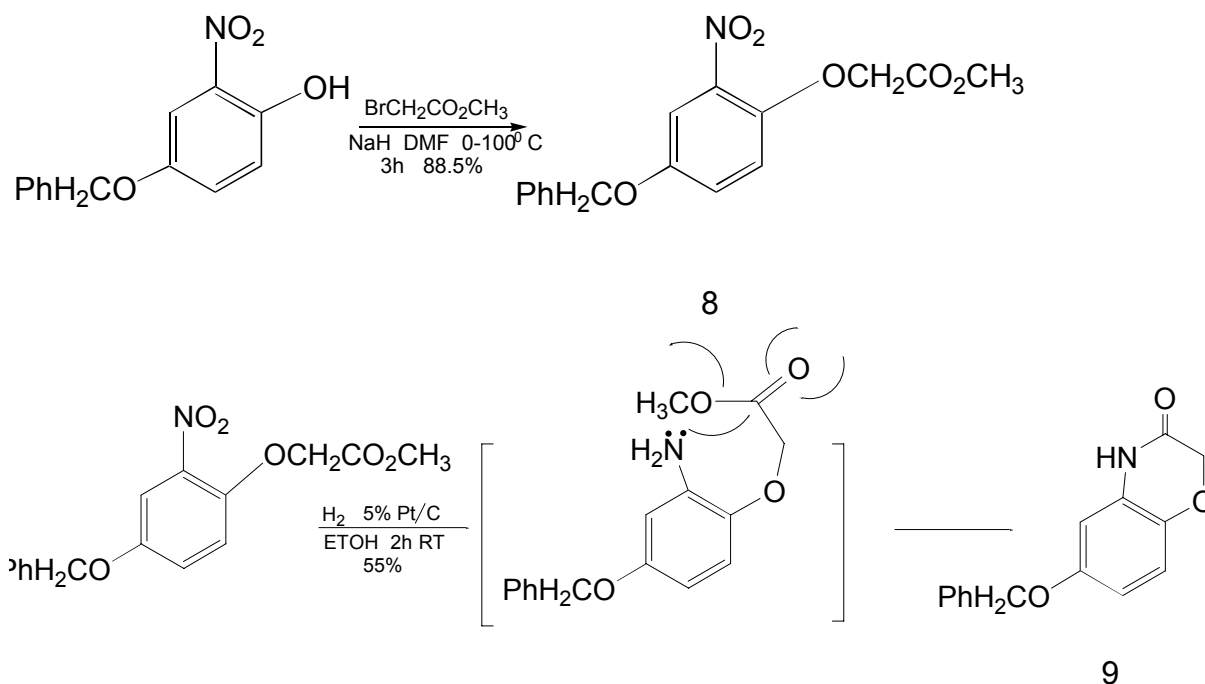
Καθώς η συνολική απόδοση των δύο τελευταίων αντιδράσεων ήταν αρκετά μικρή και κυρίως επειδή τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα, αποφασίσθηκε η τροποποίηση της προηγούμενης ρετροσυνθετικής προσέγγισης. Καθώς παλιότερα είχε παρασκευασθεί η αντίστοιχη Ο-αλκυλιωμένη ένωση που είναι σταθερή στην ατμόσφαιρα, αποφασίστηκε η αλκυλίωση της ένωσης σε δύο στάδια.



Σχημ. 12

Το πρώτο στάδιο θα περιελάμβανε την αλκυλίωση της φαινολικής ομάδας του νίτρο παραγώγου και το δεύτερο, διαδοχικά την αναγωγή της νιτρομάδας και την αλκυλίωση της σχηματιζόμενης αμίνης.

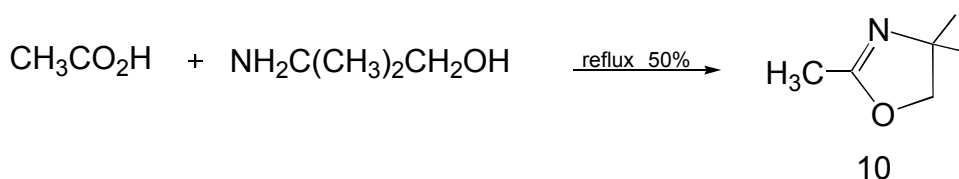
Το στάδιο της καταλυτικής αναγωγής όμως δεν έδωσε το αναμενόμενο προϊόν καθώς το σχηματισμό της αμινομάδας ακολούθησε μια πυρηνόφιλη προσβολή στο καρβονύλιο του μεθυλεστέρα και ο σχηματισμός της αντίστοιχης λακτάμης.<sup>23</sup>



Σχημ. 13

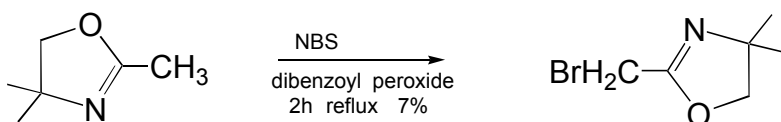
Εγινε λοιπόν φανερή η αναγκαιότητα της χρήσης μιας προστατευτικής ομάδας, η οποία να προστατεύει όχι μόνο την υδροξυλομάδα, αλλά και την καρβονυλομάδα του οξέος. Έτσι αποφασίσθηκε να προστατευτεί το οξύ υπό μορφή οξαζολίνης.

Η αρχική ιδέα ήταν να παρασκευασθεί η 2-βρωμομέθυλ-4,4-διμέθυλ-οξαζολίνη και να χρησιμοποιηθεί ως αλκυλιωτικό μέσο στην αντίδραση με τη νιτροφαινόλη. Οι προσπάθειες που έγιναν για τη σύνθεσή της, αφορούν τη δημιουργία της 4,4,2-τριμέθυλο-οξαζολίνης με ανάμειξη οξικού οξέος και 2-άμινο-2-μέθυλο-1-προπανόλης, κατά την οποία η οξαζολίνη αποσπάζεται, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, σε εξάνιο για να διαχωρίζεται από το επίσης αποσταζόμενο νερό.<sup>24</sup>



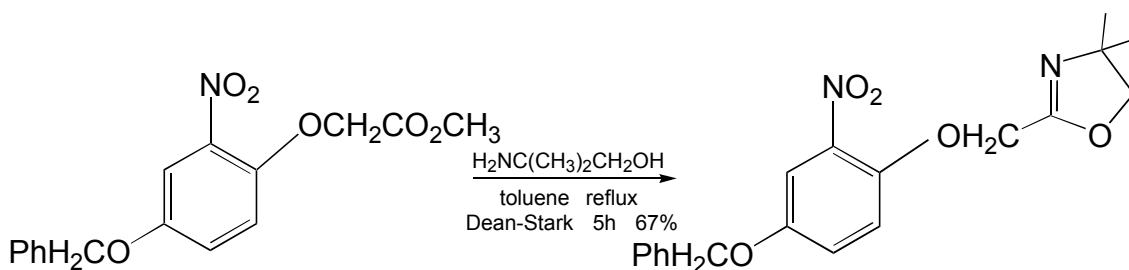
Σχημ. 14

Οι προσπάθειες που έγιναν για τη βρωμίωση της οξαζολίνης αφορούν μια βρωμίωση σε αλλυλική θέση με N-βρωμοσουκινιμίδιο (NBS), αλλά η απόδοση ήταν πολύ μικρή καθώς σχηματίστηκαν πολλά παραπροϊόντα.



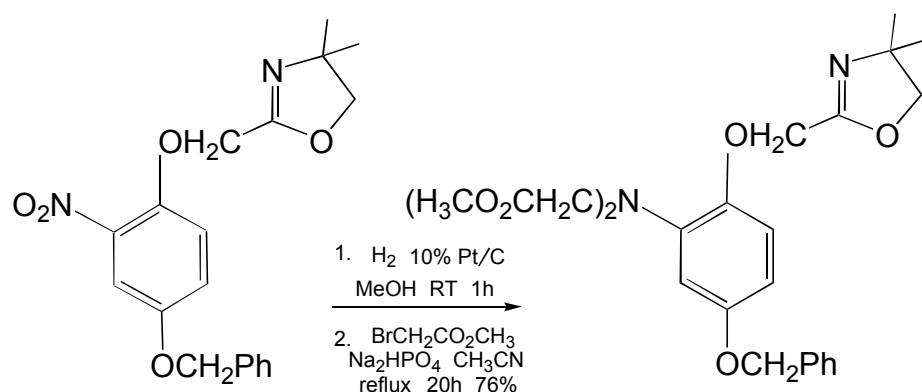
Σχημ. 15

Τελικά φάνηκε πιο εύκολη η απ ευθείας προστασία του α-[(2-νίτρο-4-βενζυλόξυ)φαινυλόξυ]-οξικού μεθυλεστέρα με τη 2-άμινο-2-μέθυλο-1-προπανόλη.<sup>26</sup>



Σχημ. 16

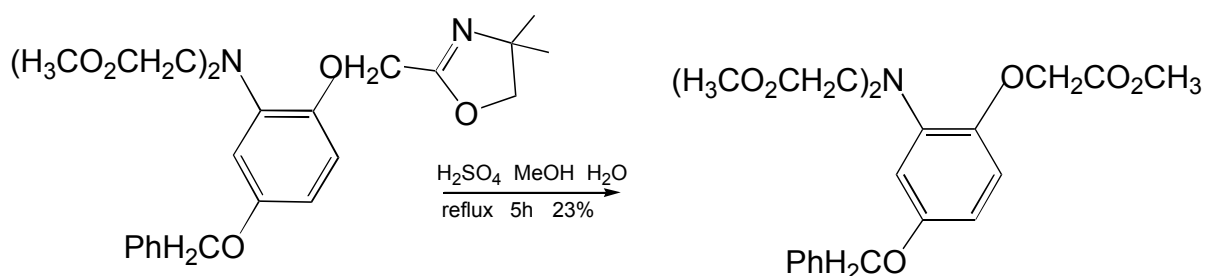
Το επόμενο στάδιο αφορά την καταλυτική αναγωγή της νιτρομάδας με Pt/C 10% (χωρίς την αναγωγή του ιμινικού δεσμού) και την αλκυλίωση της σχηματιζόμενης αμίνης. Αυτή τη φορά ως βάση για την αλκυλίωση χρησιμοποιήθηκε όξινο φωσφορικό νάτριο.



14

Σχημ. 17

Ακολούθησε η αποπροστασία του οξέος με τη μέθοδο που προτάθηκε από το Meyers<sup>24</sup> με ταυτόχρονη μεθυλίωση του σχηματιζόμενου οξέος ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH και  $\text{H}_2\text{O}$ ). Το επιθυμητό προϊόν σχηματίστηκε σε διάλυμα MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  και αναλογία αντιδρώντος :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 : 2.

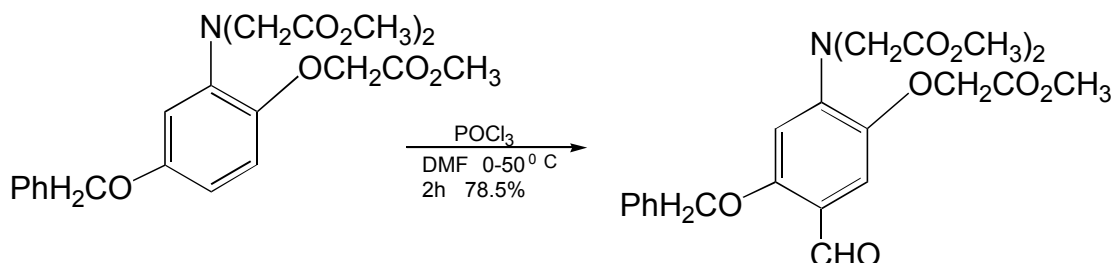
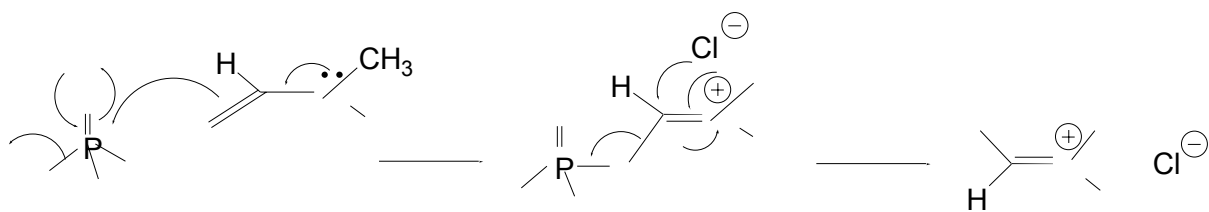


7

Σχημ. 18

Το στάδιο που ακολουθεί αφορά μια φορμυλίωση Vilsmeier, άλλη μια ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση.<sup>27</sup> Σε αυτήν την αντίδραση ο διαλύτης, DMF, παίζει το ρόλο αντιδραστήριου καθώς δημιουργείται in situ κατιονικό σύμπλοκο του οξυχλωριούχου φωσφόρου με το DMF, το οποίο προσβάλλει τον αρωματικό δακτύλιο.<sup>27,28</sup>

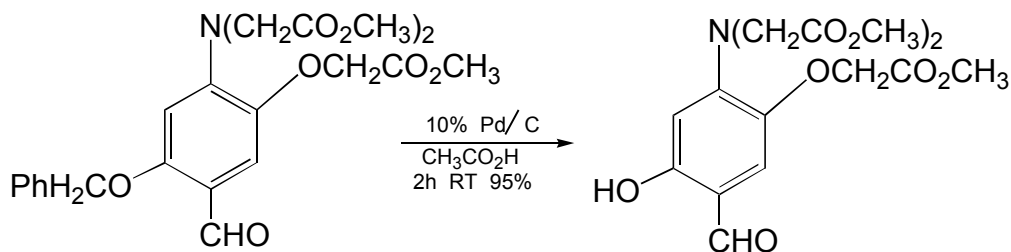




15

Σχημ. 19

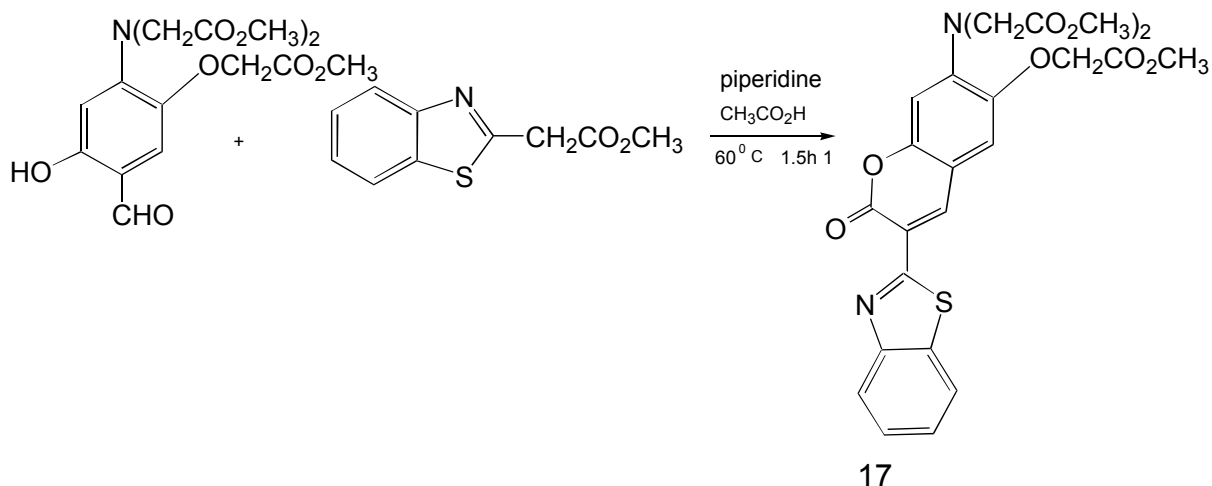
Η επόμενη αντίδραση αφορά την καταλυτική υδρογονόλυση της βενζυλομάδας για την παρασκευή του βασικού ενδιαμέσου στη σύνθεση του δείκτη, τη σαλικυλαλδεΐδη **16**. Ως καταλύτης σε αυτήν την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε  $\text{Pd/C}$  10%. Η ύπαρξη και δεύτερης ομάδας, της φορμυλομάδας, που μπορεί να αναχθεί υπο αυτές τις συνθήκες, καθιστά την αντίδραση ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Η βέλτιστη απόδοση επιτεύχθηκε όταν ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .<sup>22</sup>



16

Σχημ. 20

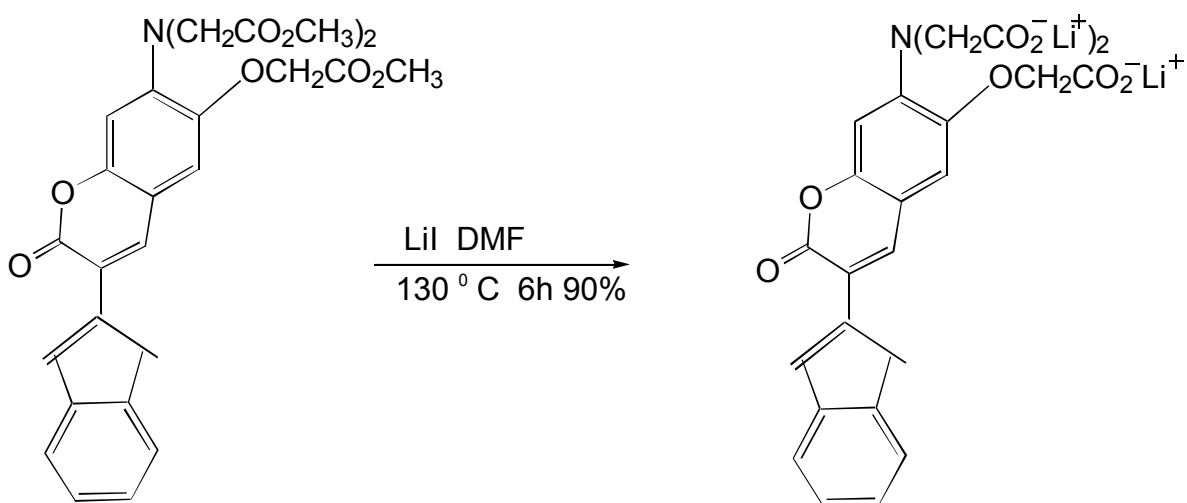
Τέλος ο δείκτης στη μορφή του τριεστέρα παρασκευάζεται μέσω της σαλικυλαλδεΐδης και του  $\alpha$ -βενζοθειαζολυλ-οξικού μεθυλεστέρα<sup>18,29</sup> με μια αντίδραση Knoevenagel.



Σχημ. 21

Η επόμενη αντίδραση είναι η υδρόλυση εστέρων. Η ευαισθησία των λακτονών (όπως οι κουμαρίνες) σε βασικές συνθήκες επέβαλε τη χρησιμοποίηση μιας ήπιας και ουδέτερης μεθόδου απομεθυλίωσης των εστέρων, όπως είναι η απομάκρυνση τους μέσω μιας  $SN_2$  αντίδρασης. Ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε το ιωδιούχο λίθιο και η αντίδραση έγινε αρχικά με reflux σε  $CH_3CN$ . Σε αυτές τις συνθήκες η αντίδραση δεν ολοκληρώθηκε και τελικά απομονώθηκε μίγμα αλάτων. Εγινε προσπάθεια διαχωρισμού τους με gel χρωματογραφία (LH-20 και διαλύτη έκλουσης διάλυμα  $LiOH$  με  $pH = 7.5$ ), η οποία δεν επέφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Το μίγμα διαχωρίστηκε με χρωματογραφία H.P.L.C. σε κολώνα αντίστροφης φάσης, στις Η.Π.Α. από την εταιρεία Molecular Probes (Eugene OR, U.S.A.), όπου έγιναν, η μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων του MBTC και οι μετρήσεις των σταθερών διάστασης του με διάφορα ιόντα.

Η επόμενη προσπάθεια πραγματοποιήθηκε με διαλύτη DMF ώστε να αυξηθεί η θερμοκρασία ( $130^\circ C$ ) στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση.



Σε αυτήν την περίπτωση η αντίδραση ολοκληρώθηκε, αλλά μαζί με το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε και το αλάτι που σχηματίστηκε από την αλληλεπίδραση του σχηματιζόμενου ιωδομεθανίου με το διαλύτη. Η ταυτοποίησή του έγινε επαναλαμβάνοντας τις συνθήκες του προηγούμενου πειράματος με μοναδικό αντιδραστήριο ιωδομεθάνιο σε DMF, και την απομόνωση ενός λευκού άλατος, που εμφανίζει τις ίδιες φασματοσκοπικές ιδιότητες.

## Γ) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ MBTC

Ο MBTC παρουσιάζει τις ίδιες οπτικές ιδιότητες με τον αντίστοιχο δείκτη για το  $\text{Ca}^{2+}$ , BTC, Πίνακας Ι. Εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 464.4 nm με συντελεστή απορρόφησης  $\epsilon = 32550 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  στην ελεύθερή του μορφή και μέγιστο φθορισμού στα 525 nm.<sup>31</sup>

### Υπολογισμός σταθεράς διάστασης

Μελετήθηκε η συγγένεια που παρουσιάζει ο δείκτης MBTC με μια σειρά ιόντων ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός εκλεκτικότητάς του.

Η συγγένεια ενός φθορίζοντα δείκτη με κάποιο ιόν υπολογίζεται μέσω των φασμάτων φθορισμού του.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι η εξής:

1mgr MBTC στη μορφή του τετρανιόντος διαλύθηκε σε 1 ml απιονισμένου νερού εξασφαλίζοντας τη συγκέντρωση του δείκτη περίπου 1mM. Το διάλυμα αραιώθηκε διαδοχικά μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1μM σε ρυθμιστικά διαλύματα του εκάστοτε ιόντος που περιείχαν 10mM EGTA και καταγράφηκαν τα φάσματα φθορισμού τους που συλλέχθηκαν το ένα στο μήκος κύματος της μέγιστης διέγερσης της ελεύθερης μορφής και το δεύτερο στο μέγιστο της διέγερσης της δεσμευμένης μορφής του δείκτη.

Η συνήθης εξίσωση που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του  $k_d$  όταν η στοιχειομετρία δείκτη : ιόντος είναι 1 : 1 δίνεται από την εξίσωση 2.<sup>12</sup>

$$[M^{+n}] = k_d \frac{F - F_{\text{Min}}}{F_{\text{Max}} - F} \quad 2$$

$F$  : η ένταση φθορισμού στη συγκεκριμένη συγκέντρωση  $M^{+n}$

$F_{\text{Min}}$  : η ένταση φθορισμού της ελεύθερης μορφής του δείκτη

$F_{\text{Max}}$  : η ένταση φθορισμού του κορεσμένου συμπλόκου

Η σταθερά διάστασης υπολογίζεται από τη γραφική παράσταση του

$$\log \left( \frac{F - F_{\text{Min}}}{F_{\text{Max}} - F} \right)$$

προς το  $\log[M^{+n}]$  και αντιστοιχεί στην τιμή του

$$\left( \frac{F - F_{\text{Min}}}{F_{\text{Max}} - F} \right)$$

όταν ο  $\log[M^{+n}] = 0$ .

Σ' αυτή την περίπτωση ο φθορισμός συλλέγεται με μήκος κύματος διέγερσης το ισοσβεστικό σημείο κατά το οποίο όλες οι μορφές του δείκτη παρουσιάζουν τον ίδιο συντελεστή απορρόφησης.

Επειδή η ένταση του φθορισμού εξαρτάται επιπλέον και από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του φασματοφωτόμετρου που αφορούν την ευαισθησία του οργάνου, όπως η ικανότητα του να συλλέγει τα φωτόνια που εκπέμπονται, η σταθερά διάστασης δεν έχει μια απολύτως ανεξάρτητη τιμή.

Καθώς ο υπολογισμός του  $k_d$  μέσω του λόγου των εντάσεων φθορισμού που έχουν σαρωθεί με διαφορετικό μήκος διέγερσης αποτελεί τη λύση αυτού του προβλήματος, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μετατόπιση που παρατηρείται στο φάσμα απορρόφησης κατά την συναρμογή του δείκτη με το ιόν.

Σ' αυτήν την περίπτωση για κάθε διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης ιόντος καταγράφονται δύο φάσματα φθορισμού. Το ένα σαρώνεται στο μήκος κύματος της μέγιστης διέγερσης της ελεύθερης μορφής του δείκτη  $\lambda_1$ , και το άλλο στην αντίστοιχη τιμή της συμπλόκου μορφής  $\lambda_2$ .<sup>15</sup>

$$[M^{+n}] = k_d \left( \frac{R - R_{Min}}{R_{Max} - R} \right) \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad 3$$

R : ο λόγος των εντάσεων του φθορισμού με διέγερση στο  $\lambda_1$  προς τον αντίστοιχο στο  $\lambda_2$

$R_{Min} : S_{f1} / S_{f2}$        $R_{Max} : S_{b1} / S_{b2}$

S : είναι ο αναλογικός παράγοντας που συνδέει την ένταση φθορισμού με τη συγκέντρωση μιας συγκεκριμένης μορφής του δείκτη και υπολογίζεται εύκολα από τις εντάσεις φθορισμού διαλυμάτων που περιέχουν γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις μόνο ελεύθερου ( $S_f$ ) ή μόνο συμπλοκοποιημένου δείκτη ( $S_b$ ). Εξαρτάται δε από την ένταση διέγερσης, το συντελεστή απορρόφησης και τη κβαντική απόδοση του δείκτη καθώς και από την ευαισθησία του οργάνου.

Καθώς ο δείκτης MBTC παρουσιάζει μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης του κατά τη συναρμογή του με κάποιο ιόν, για το καθορισμό της συγγενείας που παρουσιάζει με μια σειρά ιόντων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 3.<sup>31</sup>

Όπως φαίνεται στο (Σχήμ. 23) το φάσμα απορρόφησης δε μεταβάλλεται αισθητά σε κλίμακα pH από 5.25 ως 10.0 σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού οξέος, γεγονός που δηλώνει πως η αμινομάδα της ένωσης δεν πρωτονιώνεται σ' αυτό το εύρος pH (pH<5) και σε φυσιολογικά επίπεδα δε θα επιρεάζονται οι μετρήσεις.

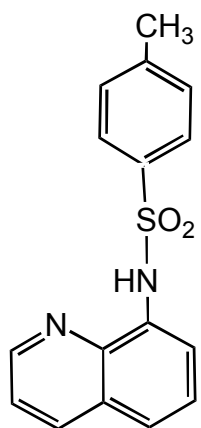
Επιπλέον, προσθήκη τόσο  $\text{Ca}^{+2}$  σε συγκέντρωση πάνω των  $100\mu\text{M}$  και  $\text{Mg}^{+2}$  σε συγκέντρωση πάνω από των  $35\text{ mM}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα EGTA που περιείχαν  $1\mu\text{M}$  MBTC δεν επηρέασαν το φάσμα απορρόφησης (Σχημ. 24), γεγονός που δηλώνει πως ο συγκεκριμένος δείκτης δε συναρμόζεται με κανένα από αυτά τα ιόντα. Η ίδια έλλειψη απόκρισης στο φάσμα παρατηρήθηκε και με προσθήκη διαφόρων μετάλλων συμπεριλαμβανομένων και των  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Eu}^{+3}$ ,  $\text{Rb}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  και  $\text{Bi}^{+3}$  (Σχημ. 25).

Το ενδιαφέρον που προέκυψε από τις μετρήσεις είναι η μετατόπιση του μήκους κύματος διέγερσης από τα  $452$  στα  $400\text{ nm}$  με προσθήκη  $\text{Cd}^{+2}$  (Σχημ. 26) και από τα  $452$  στα  $380\text{ nm}$  με προσθήκη  $\text{Zn}^{+2}$  (Σχημ. 27) με ισοσβεστικά σημεία  $424$  και  $415\text{nm}$  αντίστοιχα. Οι σταθερές διάστασης είναι  $k_d=1.0\mu\text{M}$  για το  $\text{Cd}^{+2}$  (Σχημ. 28) και  $k_d=1.9\mu\text{M}$  για το  $\text{Zn}^{+2}$  (Σχημ. 29, Πίνακας II).<sup>31</sup>

ΠΙΝΑΚΑΣ II

Δείκτης MBTC					
Ιόν	Μέγιστα Διέγερσης (nm)		Μέγιστα Φθορισμού (nm)		Σταθερά διάστασης $k_d$ ( $\mu\text{M}$ )
	Ελεύθερη μορφή	Συμπλοκοποιημένη μορφή	Ελεύθερη μορφή	Συμπλοκοποιημένη μορφή	
$\text{Zn}^{+2}$	452	380	525	525	1.9
$\text{Cd}^{+2}$	452	400	525	525	1.0

Θα μπορούσε λοιπόν το MBTC να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης  $\text{Zn}^{+2}$  κατά τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιήθηκε και η υποκατεστημένη κινολίνη TSQ<sup>32</sup> για την ταυτοποίηση των αλλαγών της συγκέντρωσης  $\text{Zn}^{+2}$  στον εγκέφαλο των ποντικιών.



## Γ) ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Συνοψίζοντας θα μπορούσε να καταλήξει κανείς στα εξής συμπεράσματα:

Όσον αφορά τις οπτικές ιδιότητες του δείκτη MBTC

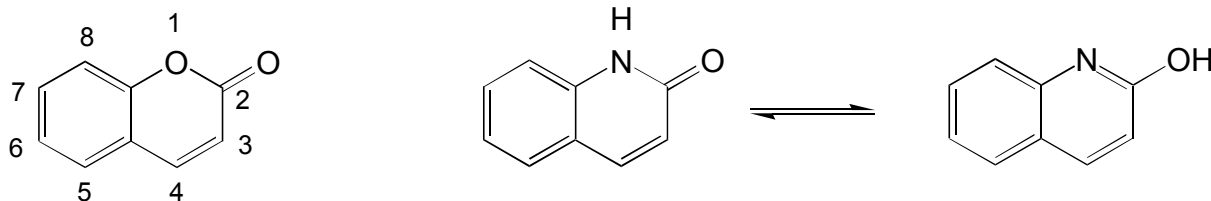
1. Παρατηρήθηκε αύξηση του μήκους κύματος απορρόφησης και φθορισμού του σε σχέση με τον ήδη υπάρχοντα δείκτη FURAPTRA και
2. Μείωση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού (Πίνακας II).

Όσον αφορά τις χηλικές ιδιότητές του

1. Δε συναρμόζεται με μαγνήσιο.
2. Συναρμόζεται με κάδμιο και ψευδάργυρο.

Επεμβάσεις που πιθανόν να βελτιώσουν τις οπτικές ιδιότητες του δείκτη είναι:

1α. Αντικατάσταση του ετεροκυκλικού οξυγόνου από το λιγότερο ηλεκτραρνητικό άζωτο (Σχημ. 30). Μια τέτοια αλλαγή πιθανόν να προκαλέσει αύξηση τόσο της κβαντικής απόδοσης, όσο και του μήκους κύματος απορρόφησης κατ' αναλογία με τη 4-methyl-7-hydroxystyryl σε σχέση με την 4-μεθυλο-7-υδροξικουμαρίνη.<sup>33</sup>



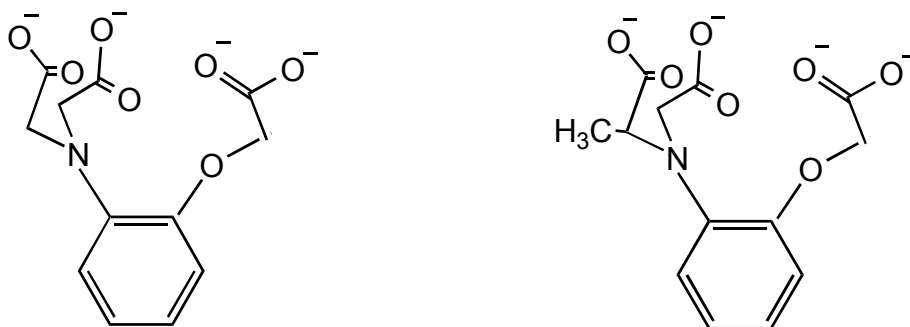
Σχημ. 30

2α. Καθώς η υποκατάσταση στην 3 θέση των κουμαρινών παίζει σημαντικό ρόλο στο μήκος κύματος απορρόφησης και φθορισμού ανάλογα με το συζυγιακό ή επαγωγικό φαινόμενο του υποκαταστάτη, αλλαγή του μπορεί να επιφέρει αξιοσημείωτες βελτιώσεις.<sup>33</sup>

Όσον αφορά τις χηλικές ιδιότητες του δείκτη, βελτιώσεις είναι δυνατό να προέλθουν μέσω ενίσχυσης του ηλεκτρονικού φορτίου του αζώτου. Κάτι τέτοιο μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους:

1β. Με αντικατάσταση του ενός μεθυλοκαρβόξυ υποκαταστάτη της αμινομάδας από τον αντίστοιχο 2-αιθυλοκαρβόξυ υποκαταστάτη (Σχημ. 31). Αυτή η διαδικασία εγκυμονεί κινδύνους, καθώς στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν είναι γνωστό αν οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις εξαιτίας της επιπλέον μεθυλονάδας είναι σημαντικότερος παράγοντας από το επαγωγικό της φαινόμενο.

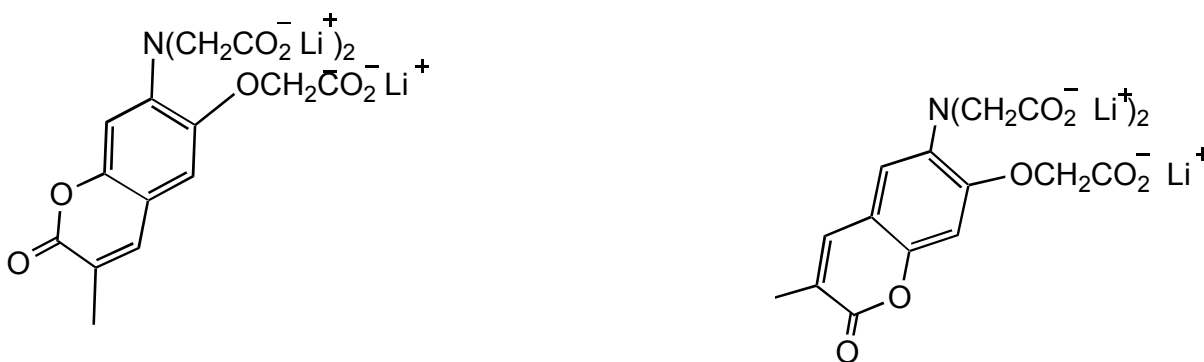




Σχημ. 31

2β. Το γεγονός ότι η μόνη διαφορά του MBTC με τη FURAPTRA είναι η προσθήκη ενός ακόμα ηλεκτρονιόφιλου κέντρου μας οδηγεί στο συμπέρασμα της πιθανής αποπροστασίας του αζώτου μέσω του αρνητικού επαγωγικού φαινομένου του.

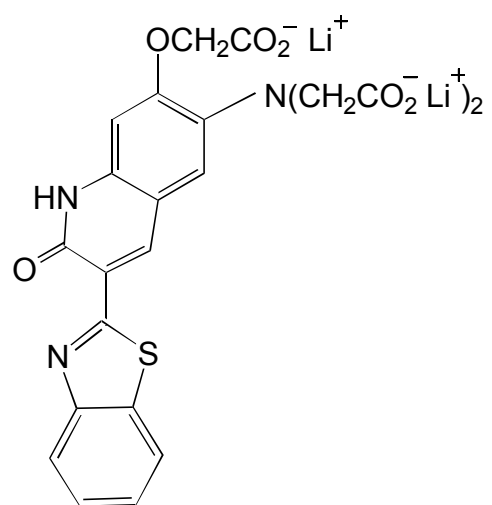
Η σύνθεση λοιπόν της 7-O-μεθυλοκαρβόξυ-6,6-N,N-διμεθυλοκαρβόξυ-3-φαινυλθειαζολυλο-κουμαρίνης, στην οποία το ετεροκυκλικό οξυγόνο της κουμαρίνης βρίσκεται σε π-θέση ως προς την αμινομάδα και κατά συνέπεια δεν επιδρά μαζί της μέσω επαγωγικού φαινομένου, πιθανόν θα επιφέρει αύξηση της συγγένειας με το μαγνήσιο (Σχημ. 32).



Σχημ. 32

Μια αλλαγή αυτού του είδους πιθανόν βέβαια να προκαλέσει μείωση του μήκους κύματος απορρόφησης, καθώς μεθοξυ υποκατάσταση στην 7-θέση της κουμαρίνης προκαλεί μικρότερη αύξηση του μήκους κύματος απορρόφησης σε σχέση με το διεθυλάμινο υποκαταστάτη.

Ίσως συνδιαστική εφαρμογή των προτάσεων 1α, και 2β για τη δημιουργία ενός δείκτη της μορφής που φαίνεται στο σχήμ. 33 να επιφέρει βελτιώσεις τόσο στις οπτικές, όσο και στις χηλικές ιδιότητες του δείκτη.



Σχημ. 33

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΓΕΝΙΚΑ

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

Οι διαλύτες DMF, CH<sub>3</sub>CN και CCl<sub>4</sub> αποστάχθηκαν από P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> και φυλλάχθηκαν σε μοριακά κόσκινα μεγέθους 4 Α. MeOH και EtOH αποστάχθηκαν από Mg και φυλλάχθηκαν σε μοριακά κόσκινα 3 Α.

Η πορεία των αντιδράσεων καταγράφηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε γυάλινα πλακίδια επιστρωμένα με silica gel τύπου 60F<sub>254</sub>. Για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολία UV (254 & 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, pH: 6.5-7.5).

Τα σημεία τήξης προσδιορίστηκαν σε συσκευή Thomas-Hoover και δεν είναι διορθωμένα. Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer μοντέλο 735. Τα φάσματα N.M.R. καταγράφηκαν σε όργανο ισχύος 80 MHz της Varian. Το N.M.R. της ένωσης **17** καταγράφηκε σε φασματοφωτόμετρο ισχύος 250 MHz στο Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών. Οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε ppm σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο. Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε φθοριόμετρο Hitachi 4500 από τη Molecular Probes (Eugene OR, U.S.A.).

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 1

Σε 500ml ξηρού DMF προστίθεται υδροκινόννη (22.02 gr, 0.2 mol) και το σύστημα ψύχεται στους 0<sup>0</sup> C. Στο διάλυμα προστίθενται σταδιακά, σε διάστημα 1 h περίπου, NaH (80% σε λάδι) (15, 0.5 mol). Το σύστημα θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται σ' αυτό βενζυλοχλωρίδιο (52.2 ml, 57.4 gr, 0.44 mol) και θερμαίνεται στους 60-70<sup>0</sup> C για 2 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη. Το μίγμα ψύχεται στους 0<sup>0</sup> C και προστίθενται 300 ml νερό, οπότε το προϊόν καθιζάνει. Ακολουθεί κατεργασία του ιζήματος με νερό, μεθανόλη και αιθέρα. Απόδοση 56.82 gr ή 98%.  
m.p. = 126 - 128<sup>0</sup> C. (Βιβλ.<sup>15</sup> 128 - 130<sup>0</sup> C ).

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 2

Σε αιώρημα της ένωσης **1** (56.82 gr, 0.19 mol ) σε 200ml πυκνού οξικού οξέος προστίθεται σταδιακά διάλυμα νιτρικού οξέος (70%) (13.2ml, 18.45 gr, 0.2 mol) σε 50ml πυκνού οξικού οξέος. Το μίγμα θερμαίνεται για 3h στους 60 - 70<sup>0</sup> C. Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και το ίζημα απομακρύνεται με διήθηση σε κενό. Το διήθημα αραιώνεται με νερό και πάγο και δεύτερη ποσότητα ιζήματος

απομονώνεται. Τα δύο ιζήματα διαλύονται σε 250ml διχλωρομεθανίου και εκχυλίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται ξανά με 5ml διχλωρομεθάνιο. Μετά από ξήρανση της οργανικής στοιβάδας με θειϊκό νάτριο ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό. Το ίζημα εκπλένεται με αιθέρα και ξηραίνεται σε κενό. Απόδοση 60.97 gr ή 92.76%.  
m.p. = 79.5 - 82<sup>0</sup> C (Βιβλ.<sup>15</sup> 81 - 82.5<sup>0</sup> C).

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3

Σε διάλυμα της ένωσης **2** (60.97 gr, 0.18 mol) σε 150ml χλωροφορμίου προστίθεται τρίφθοροοξικό οξύ (18.3ml, 27.14 gr, 0.24 mol). Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h, οπότε προστίθεται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 3N, ώσπου να εξουδετερωθεί το τριφθοροοξικό οξύ. Ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό. Το προϊόν διαλύεται σε αιθέρα (1.5lt). Στο διάλυμα προστίθεται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 5N, οπότε καθιζάνει το άλας της ένωσης **3**, το οποίο απομονώνεται με διήθηση. Το ερυθρού χρώματος μίγμα πλένεται με αιθέρα για να απομακρυνθούν οι προσμίξεις. Το ίζημα οξινίζεται με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 3N, οπότε απομονώνεται η αλκοόλη **3**. Η υδατική στοιβάδα εκχυλίζεται με αιθέρα και η αιθερική στοιβάδα ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο. Ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη σε κενό. Απόδοση 29.02 gr ή 65%.  
m.p. = 65 - 69<sup>0</sup> C. (Βιβλ.<sup>15</sup> 67 - 70<sup>0</sup> C).

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4

Σε απαερωμένο με άζωτο αιώρημα της ένωσης **3** (3 gr, 12.23mmol) σε μεθανόλη 90ml προστίθεται 5% Pt/C 0.3 gr. Το σύστημα υδρογονώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται σε celite σε κενό υπό ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται απαερωμένο τολουόλιο. Το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτη εξατμίζεται στο κενό και το ίζημα διηθείται σε κενό υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Απόδοση 1.5 gr ή 57%.  
m.p. = 144 - 146<sup>0</sup> C. (Βιβλ.<sup>22</sup> 150 - 154<sup>0</sup> C).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ: 7.30 bs 5H, 6.55 d J=8Hz 1H, 6.33 d J=2.5Hz 1H, 6.05 dd J=8Hz J=2.5Hz 1H, 4.9 s 2H, 4 bs 2H, 2.75 bs 1H.

**N.M.R.** (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O) δ: 7.30 bs 5H, 6.55 d J=8Hz 1H, 6.33 d J=2.5Hz 1H, 6.05 dd J=8Hz J=2.5Hz 1H, 4.9 s 2H.

**IR.** 3384, 3294, 1334 (cm<sup>-1</sup>)

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5

Σε εξαερωμένο με άζωτο αιώρημα της ένωσης **3** (200mgr, 0.181mmol) σε μεθανόλη 7.5ml προστίθεται 10% Pt/C (20mgr). Το σύστημα υδρογονώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται διάλυμα 25% HCl έως pH=3 και το μίγμα διηθείται σε celite υπό κενό. Προσθήκη πετρελαϊκού αιθέρα οδηγεί στην κρυστάλλωση του προϊόντος. Απόδοση 82 mgr ή 40%.

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6

Σε CH<sub>3</sub>CN 45ml αιωρούνται η ένωση **4**, (1gr, 4.65mmol), όξινο φωσφορικό νάτριο (4gr, 28mmol), βρωμοοξικό μεθυλεστέρα (97%) (2.6ml, 4.28gr, 28mmol) και ιωδιούχο νάτριο (7mgr, 0.046mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 110°C επί 48h. Μετά το τέλος της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, διηθείται υπό κενό και πλένεται με διαλύτη. Το διήθημα εκχυλίζεται με διάλυμα 3N NaOH, με H<sub>2</sub>O και με κορ. NaCl. Το διάλυμα ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης αποστάζεται υπό κενό. Απόδοση 420mgr ή 30%.

## ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) δ: 7.40-7.38 m 5H, 6.94 d J=10Hz 1H, 6.50 dd J=10Hz, J=2.4Hz 1H, 6.43 s 1H, 5.05 s 2H, 4.18 s 2H, 4.11 s 2H, 3.68 s 3H.

**M.S.:** 327 [M<sup>+</sup>].

**IR.** 1765, 1743, 1216, 1260 (cm<sup>-1</sup>).

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7

Αιώρημα της ένωσης **4** (1gr, 4.65mmol), Proton Sponge (2.66gr, 12.42mmol), βρωμοοξικού μεθυλεστέρα (1.55ml, 2.56gr, 16.28mmol) και ιωδιούχου νατρίου (830mgr, 5.58mmol) σε CH<sub>3</sub>CN (45ml) θερμαίνεται στους 110° C επί 72h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, διηθείται υπό κενό και το ίζημα πλένεται με διαλύτη. Ο διαλύτης αποστάζεται υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται με flash χρωματογραφία στήλης, με διαλύτες έκλουσης από 15% - 50% οξικό αιθυλεστέρα - πετρελαϊκό αιθέρα. Απόδοση 470mgr ή 23% προϊόντος και 10mgr ή 6.35% αντιδρώντος.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ:**

**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.38, 5H, 6.85-6.42 m 3H, 4.96, 2H, 4.59 s 2H 4.17 s 4H, 3.77 s 3H, 3.70 s 6H  
**I.R.:** 1747 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 8**

Σε διάλυμα της ένωσης **3** (6 gr, 24.47 mmol) σε 30ml ξηρό DMF προστίθεται σταδιακά, σε διάστημα 20 λεπτών περίπου, στους 0<sup>o</sup> C, NaH (70% σε λάδι) (1.26 gr, 36.71 mmol). Το αιώρημα θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται ιωδιούχο νάτριο (2.7 gr, 18mmol) και βρωμοοξικός μεθυλεστέρας (5.62 gr, 36.71 mmol) και θερμαίνεται στους 100<sup>o</sup> C για 3 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη. Το μίγμα ψύχεται στους 0<sup>o</sup> C και αραιώνεται με νερό. Το στερεό που καθιζάνει διηθείται σε κενό και ξεπλένεται με παγωμένη μεθανόλη. Στη συνέχεια διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα, όπου εκχυλίζεται με διάλυμα 20% NaCl και με κορ. NaCl. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με θειικό νάτριο και ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό. Απόδοση 6.87 gr ή 88.5%.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ:**

**N.M.R.** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta$ : 7.52 - 7.42 m 5H, 7.27 bs 3H, 5.18 s 2H, 4.85 s 2H, 3.72 s 3H.  
**IR.** 1751, 1151, 1526, 1357 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9**

Σε απαερωμένο με άζωτο αιώρημα της ένωσης **8**, 700mgr (2.21mmol) σε μεθανόλη 17ml προστίθεται 5% Pt/C 56mgr. Το σύστημα υδρογονώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται σε celite υπό κενό. Αποστάζεται ο διαλύτης του διηθήματος και το ίζημα εκπλένεται με διχλωρομεθάνιο. Εξατμίζοντας το διαλύτη του διηθήματος απομονώνεται επιπλέον στερεή ουσία. Απόδοση 330mgr ή 55%.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ:**

**N.M.R.** ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta$ : 7.40 bs 5H, 6.85 s 1H, 6.65 bs 2H, 5.05 s 2H, 4.47 s 2H, 2.80 bs 1H.

**I.R.**(KBR): 1687.5 C=O  $\text{cm}^{-1}$

**MS**: 255 [  $\text{M}^+$  ].

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 10

Σε 2-αμινο-2-μέθυλ-1-προπανόλη (10ml, 9.34gr, 0.10mol) προστίθεται glacial οξικό οξύ (5ml, 5.25gr, 0.10mol). Πολύ γρήγορα καθιζάνει ένα λευκό στερεό. Η οξαζολίνη αποσπάζεται αζεοτροπικά με το  $\text{H}_2\text{O}$  και διαλύεται στον πετρελαϊκό αιθέρα που υπάρχει στη σφαιρική συλλογή. Μετά το τέλος της αντίδρασης η υδατική στοιβάδα εκχυλίζεται και οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται. Ο διαλύτης αποσπάζεται στο κενό. Απόδοση 5.67gr ή 50%.

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.90 s 2H, 1.94 s 3H, 1.26 s 6H.

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 11

Σε διάλυμα της ένωσης **10** (0.36 gr, 3.18mmol) σε  $\text{CCl}_4$  (5ml) προστίθεται N-βρωμοσουλφοναμίδια (0.35 gr, 3.00mmol) και καταλυτική ποσότητα διβενζόλιο υπεροξειδίου, το οποίο καθιζάνει. Το αιώρημα αναδεύεται 3h υπό αναβρασμό. Στο τέλος της αντίδρασης αιωρείται ένα άσπρο ίζημα. Το μίγμα διηθείται και το ίζημα εκπλένεται με  $\text{CCl}_4$ . Ο διαλύτης του διηθήματος αποσπάζεται σε κενό και το προϊόν απομονώνεται με flash χρωματογραφία με διαλύτη έκλουσης 10% οξικό αιθυλεστέρα-πετρελαϊκό αιθέρα. Απόδοση 40mgr ή 7%.

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.03 s 2H, 3.90 s 2H, 1.29 s 6H.

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12

Διάλυμα των ενώσεων **8** (6 gr, 18,9 mmol) και 2-αμινο-2-μέθυλ-1-προπανόλης (17 gr, 190 mmol) σε τολουόλιο (100ml) θερμαίνεται στους 110<sup>0</sup> C για 1h. Στη συνέχεια γίνεται αζεοτροπική αποστάξη νερού με συσκευή Dean-Stark για επιπλέον 4h. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποσπάζονται τα 3/4 του διαλύτη σε κενό και προστίθεται αιθέρας. Το διάλυμα ψύχεται στους -4<sup>0</sup> C για 24h οπότε καθιζάνει το προϊόν. Το

ίζημα διηθείται σε κενό και εκπλένεται με αιθέρα. Το διήθημα φυλάσσεται στους  $-4^{\circ}\text{C}$  όπου κρυσταλλώνεται επιπλέον προϊόν. Ακολουθεί διαχωρισμός της ουσίας με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα. Απόδοση 4.5gr ή 67%.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :**

**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.57 - 7.00 m 8H, 5.08 s 2H, 4.51 s 2H, 3.69 s 2H, 1.37 s 6H.

**I.R.:** 1454, 1511, 1239, 1024 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 13**

Σε απαερωμένο με άζωτο αιώρημα της ένωσης **5** (2 gr, 5.6mmol) σε μεθανόλη (70ml) προστίθεται 10% Pt/C (0.18 gr). Το σύστημα υδρογονώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 1h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται σε celite σε κενό, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό μέχρι ξηρού.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :**

**N.M.R.** ( $\text{MeOD}$ )  $\delta$ : 7.35 s 5H, 6.77 - 6.52 m 3H, 4.96 s 2H, 4.37 s 2H, 3.57 s 2H, 1.31 s 6H.

**IR.:** 3340, 1670, 1630 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 14**

Σε αιώρημα όξινου φωσφορικού νατρίου (2.27 gr, 16 mmol), ιωδιούχου νατρίου 8 mgr (0.0533 mmol) και βρώμοοξικού μεθυλεστέρα (1.6 ml, 2.5 gr, 16 mmol) σε απαερωμένο ακετονιτρίλιο (30ml) προστίθεται η ένωση **13**. Το σύστημα θερμαίνεται στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 30 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης διηθείται σε κενό και το ίζημα εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα. Ο διαλύτης του διηθήματος αποστάζεται σε κενό και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης αρχικά αιθέρα και τέλος οξικό αιθυλεστέρα. Συνολική απόδοση 2 gr ή 76%.

#### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :**



**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.36 s 5H, 7 - 6.60 m 3H, 4.97 s 2H, 4.42 s 2H, 4.07 s 4H, 3.77 s 3H, 3.70 s 6H, 3.56 s 2H, 1.29 s 6H.  
**I.R.:** 1742, 1733, 1655 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7

Η ένωση **7** (1.5 gr, 3.19 mmol) διαλύεται σε 17.15 ml μεθανολικό διάλυμα θειϊκού οξέος (16ml MeOH, 0.80ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.35ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) και θερμαίνεται στους  $78^\circ\text{C}$  για 5h. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται σε κενό η μισή ποσότητα διαλύτη και προστίθεται αιθέρας. Το σύστημα εκχυλίζεται με κορ. διάλυμα NaCl εως ότου η υδατική στοιβάδα εμφανίζεται άχρωμη. Η υδατική στοιβάδα εκχυλίζεται με αιθέρα και οι 2 οργανικές φάσεις αναμιγνύονται και ξηραίνονται με θειϊκό νάτριο. Το ίζημα που μένει μετά την απόσταξη του διαλύτη καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτες έκλουσης συστήματα από 30% ως 40% οξικό αιθυλεστέρα - πετρελαϊκό αιθέρα. Απόδοση 320 mgr ή 23%.  
m.p. =  $83-84^\circ\text{C}$  (Βιβλ.<sup>22</sup>  $83-84^\circ\text{C}$  ).

## ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.36 bs 5H, 6.8 d  $J=8.8$  1H, 6.53 s 1H, 6.48 d  $J=8.8$  1H, 4.96 s 2H, 4.58 s 2H, 4.16 s 4H, 3.76 s 3H, 3.69 s 6H.  
**I.R.:** 1747 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 15

Σε 0.8ml DMF στους  $0^\circ\text{C}$  προστίθεται στάγδην οξιχλωριούχος φωσφόρος (168 mgr, 1.08mmol). Το διάλυμα αναδεύεται στους  $0^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά. Στην ίδια θερμοκρασία προστίθεται και η ένωση **8** (480 mgr, 1.11mmol) σε 1ml DMF. Το κίτρινο-πορτοκαλί διάλυμα θερμαίνεται στους  $50^\circ\text{C}$  για 2 h. Ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται σε αυτό κορεσμένο διάλυμα οξικού νατρίου 1ml. Αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθεται διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται με  $\text{H}_2\text{O}$  και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο και ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό. Απόδοση 400 mgr 78.5%.  
m.p. =  $118-120^\circ\text{C}$  (Βιβλ.<sup>22</sup>  $121-123^\circ\text{C}$ ).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.29 s 1H, 7.37 s 5H, 7.22 s 1H, 6.34 s 1H, 5.10 s 2H, 4.57 s 2H, 4.22 s 4H, 3.77 s 3H, 3.73 s 6H.

**I.R.:** 1747, 1666 (cm<sup>-1</sup>).

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 16

Σε απαερωμένο με άζωτο αιώρημα της ένωσης **9** (293 mgr, 0.64 mmol) σε glacial οξικό οξύ προστίθεται Pd/C 10% 12 mgr. Το σύστημα υδρογονώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 2h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται σε celite σε κενό. Με προσθήκη τετραχλωράνθρακα το προϊόν καθιζάνει και ο διαλύτης αποστάζεται σε κενό. Προστίθενται επιπλέον ποσότητες τετραχλωράνθρακα ( σχηματίζει αζεοτροπικό μίγμα με το οξικό οξύ σε αναλογία 98:2 με b.p.=76). Απόδοση 224 mgr ή 95%.

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.58 s 1H, 6.88 s 1H, 6.19 s 1H, 4.54 s 2H, 4.26 s 4H, 3.79 s 3H, 3.76 s 6H.

**I.R.:** 3417, 1747, 1634 (cm<sup>-1</sup>).

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 17

Σε αιώρημα της ένωσης **10** (60 mgr, 0.16 mmol) σε 0.5 ml μεθανόλης, προστίθεται διάλυμα του α-βενζοθειαζολυλοξικού μεθυλεστέρα (42 mgr, 0.2 mmol) σε 0.5 ml μεθανόλης και μια σταγόνα πιπεριδίνη. Το πορτοκαλί διάλυμα θερμαίνεται στους 60<sup>0</sup> C για 1.5 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το σύστημα ψύχεται στους 0<sup>0</sup> C διηθείται σε κενό και το ίζημα εκπλένεται με παγωμένη μεθανόλη. Απομονώνονται 71 mgr της ένωσης **18**. Με εξάτμιση της μεθανόλης από το διήθημα απομονώνονται επιπλέον 8.7 mgr ουσίας. Απόδοση 79.7mgr ή 94.6%.

TLC:50% οξικός αιθυλεστέρας - πετρελαιοκός αιθέρας.

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :

**N.M.R.** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.88 s 1H, 8 d J=6.75 1H, 7.9 d J=6.55 1H, 7.51-7.46 m 1H, 7.40-7.35 m 1H 6.93 s 1H, 6.68 s 1H, 4.62 s 2H, 4.30 s 4H, 3.81 s 3H, 3.79 s 6H.

**I.R.:** 1746, 1712, 1616 (cm<sup>-1</sup>).

**M.S.:** 527 [M + 1<sup>+</sup>].

### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 18 : ΜΕΘΟΔΟΣ Α**

Σε διάλυμα της ένωσης 18 (30 mgr, 0.057mmol) σε ακετονιτρίλιο 5ml προστίθεται άνυδρο ιωδιούχο λίθιο (366 mgr, 2.73 mmol). Το αιώρημα θερμαίνεται στους 110<sup>o</sup> C 72h. Κατά την πορεία της αντίδρασης καθιζάνει πορτοκαλί στερεό. Μετά το τέλος της, το σύστημα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με διχλωρομεθάνιο και ακετόνη. Το στερεό καθαρίζεται με gel χρωματογραφία με υλικό πλήρωσης LH-20 και διαλύτη έκλουσης απιονισμένο νερό με LiOH σε pH = 5. Ακολουθεί οξύνιση των κλασμάτων και ψύξη τους στους -4<sup>o</sup> C. Το σύστημα διηθείται και το στερεό διαλύεται σε μεθανόλη, όπου ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ο διαλύτης αποστάζεται υπό κενό και απομονώνεται 20 mgr μίγματος. Το προϊόν τελικά διαχωρίζεται με H.P.L.C. (Molecular Probes Eugene OR).

### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 18 : ΜΕΘΟΔΟΣ Β**

Σε διάλυμα της ένωσης 18 (30 mgr, 0.057mmol) σε D.M.F. 5ml προστίθεται άνυδρο ιωδιούχο λίθιο (366 mgr, 2.73 mmol). Το σύστημα θερμαίνεται στους 130<sup>o</sup> C 6h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το σύστημα ψύχεται και ακολούθως διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με ξηρό διχλωρομεθάνιο. Απόδοση 27 mgr ή 90% .

### **ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ :**

**N.M.R.** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.99 s 1H, 8.0-7.78 m 2H, 7.55-7.33 m 2H, 7.28 s 1H, 7.0 s 1H, 4.6 s 2H, 3.83 s 4H.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N. Greenwood & A. Earnhaw CHEMISTRY OF THE ELEMENTS. N., Pergamon pp 117-154, 1986.
2. H. Kretsinger & D. J. Nelson. Coord. Chem. Rew. 18: 29 - 124, 1976.
3. T. Iseri & J. H. French. Am. Heart J. 108: 188-193, 1984.
4. M. Altura & B. T. Altura. Fed. Proc. 40: 2672-2679, 1981.
5. Y. Tsien. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 12: 91-116, 1983.
6. Behm, D. Ammann, W. Simon. Helv. Chim. Acta. 68: 110-118, 1985.
7. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta & H. Hisanoto. Anal Chem 67: 324-334, 1995.
8. Caruzo, K. Djinicovic & M. Rizzi. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2: 127-135, 1993.
9. Scarpa & F. J. Brinley. Fed. Proc. 40: 2646-2652, 1981.
10. T. Wu, G. M. Pieper, J. M. Salhany & R. S. Eliot. Biochemistry 20: 7399-7403, 1981.
11. Scarpa. Biochemistry 13: 2789-2794, 1974.
12. Y. Tsien. Biochemistry 19: 2396-2404, 1980.
13. A. Smith, R. T. Hesketh, J. C. Metcalf, J. Feeney & P. G. Morris. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 7178-7182, 1983.
14. A. Levy, E. Murphy, B. Raju, & R. E. London. Biochemistry 27: 4041-4048, 1988.
15. Gr. Gryniewicz, M. Ponie, R. Y. Tsien. J. Biol. Chem. 260: 3440-3450, 1985.
16. Minta, J. P. Y. Kao & R. Y. Tsien. J. Biol. Chem. 264: 8171-8178, 1989.
17. F. Dietrich. J. Chem. Ed. 62: 954-964, 1985.
18. H. Iatridou, E. Foukaraki, M. A. Kuhn, E. M. Marcus, R. P. Haugland & H. E. Katerinopoulos. Cell Calcium 15: 190-198, 1994.
19. E. Katerinopoulos, H. Iatridou, E. Foukaraki, M. A. Kuhn, N. Malekzeder & A. Lugade. U.S. Patent Submitted.
20. M. Demarinis, H. E. Katerinopoulos & K. A. Muirhead. Fluorescent intracellular calcium indicators U.S., 4, 849, 362, 1989.
21. P. Marsh & L Goodman. J. Org. Chem. 30: 2491-2492, 1965.
22. Raju, E. Murphy, L. A. Levy, R. D. Hall & R. E. London. Am. J. Physiol 256 C540-548 1989.
23. W. Muth, J. R. Elkins, M. L. DeMatte & S. T. Chiang. J.O.C. 32: 1106-1110, 1967.
24. A. I. Meyers, D. L. Temple, R. L. Nolen, E. D. Michelich. J. Org. Chem. 39: 2778-2783 1974.

25. L. Greenwood, M. D. Kellert & J. Sedlak. *Org. Synth. Coll. Vol. IV.* 108-110.
26. S. R. Schow, J. D. Bloom, A. S. Tomson, K. N. Winzenberg, A. B. Smith III, J. A. C. S 108, 2662, 1986.
27. Campaigne & W. L. Archer. *Org. Synth. Coll. Vol. IV,* 331-332
28. G. Jugie, J. A. S. Smith & G. J. Martin. *J. Chem. Soc. Perkin trans 2,* 925, 1975
29. M. Hammer. *J. Chem. Soc.* 1480-1498, 1956.
30. Mc Marry J. *Org. Reac.* 187-224.
31. E. Katerinopoulos, E. Foukaraki, S. Kapetanaki, B. Hoyland, M. A. Kuhn. 208th Amer. Chem. Soc. Meeting, Med. Chem. Section Abs #243, 1994.
32. J. Frederickson, E. J. Kasarskis, D. Ringo, R. E. Frederickson. *J. Neurosci. Meth* 20: 91-103, 1987.
33. C. E. Wheelock *J.A.C.S.* 81: 1348-1352, 1959.



