## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

# Παράγωγα του EGTA ως φθορίζοντες δείκτες κατιόντων: Σύνθεση και φθορισμομετρικά χαρακτηριστικά

### ΙΩΑΝΝΑ Κ. ΦΙΛΙΠΠΑ

## ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ «ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

MAPTIOS 2018

## **MASTER'S THESIS**

# **EGTA Derivatives as Fluorescent Cation Sensors:**

# **Synthesis and Fluorescence Spectral Properties**

IOANNA K. PHILIPPA

## SUPERVISOR: Prof. H. E. KATERINOPOULOS

E.P.E.A.E.K. PROGRAM "ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH BIOLOGICAL ACTIVITY"

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CRETE, GREECE

MARCH 2018

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

#### Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

#### Σμόνου Ιουλία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σε όλους όσους πίστεψαν ότι μπορώ

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ



Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ), 2007-2013.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό του πρόγραμμα καθώς και για την παροχή της απαραίτητης υλικοτεχνικής υποδομής, για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Η λέξη «ευχαριστώ» είναι πραγματικά πολύ λίγη για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χ. Ε. Κατερινόπουλο. Υπήρξε πραγματικός Δάσκαλος για μένα και ελπίζω να φάνηκα αντάξια των προσδοκιών του. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια τόσο των προπτυχιακών όσο και των μεταπτυχιακών μου σπουδών και κυρίως για την ψυχραιμία και το αστείρευτο χιούμορ του, που μου έδωσαν κουράγιο να ξεπεράσω κάθε σκόπελο.

Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τα οποία δέχθηκαν να κρίνουν την ερευνητική μου εργασία, τους καθηγητές, κ. Ε. Στρατάκη καθώς και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Ι. Σμόνου από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, στον κ. Α. Κουβαράκη για τη λήψη φασμάτων μάζας, στον Δρ. Μ. Κλώντζα για τις υπολογιστικές μελέτες, τον καθηγητή κ. Σ. Περγαντή για τη λήψη και τη βοήθεια ερμηνείας στα φάσματα μάζας καθώς και τον επίκουρο καθηγητή κ. Α. Σπύρο για τη βοήθειά του επί της ερμηνείας των φασμάτων NMR.

Ένα πάρα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις αγαπημένες μου φίλες και συνεργάτιδες Σοφία Γεωργιλαδάκη, Αθανασία Τσικριτζή, Γεωργία Μενούνου, Γεωργία Χριστοφόρου και τους πολύτιμους συνεργάτες Γεώργιο Τσικαλά και Μιχάλη Στεφανάκη για τη θερμή υποδοχή τους, την απλόχερη

βοήθειά τους, την ηθική στήριξη, τις παραγωγικές συζητήσεις και για όλες τις πραγματικά αξέχαστες στιγμές που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήταν άδικο όμως, να μην ευχαριστήσω και τα νέα μέλη του εργαστηρίου Χρύσα Σαμιωτάκη και Μαρίνα Ραπούση, οι οποίες μου προσέφεραν πολύτιμη βοήθεια κατά τις τελευταίες ημέρες της ολοκλήρωσης και παρουσίασης της διατριβής μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει μέχρι σήμερα και για τη στήριξή τους σε κάθε νέο μου βήμα αλλά και την «κατ' επιλογήν» οικογένειά μου, τους φίλους μου, που με ώθησαν ν'ανέβω ένα ακόμη σκαλί και ήταν δίπλα μου σε κάθε απογοήτευση και επιτυχία, είτε ακούγοντας στωϊκά την γκρίνια μου είτε υπομένοντας τους ξέφρενους πανηγυρισμούς μου.

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ	Ιωάννα Φίλιππα			
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	Πάροδος Καπετανίσσης Μαριγώς 25, Ηράκλειο Κρήτης, 71201, Ελλάδα			
	Sector 2811-101081 Sector 6937-216332			
	philippa70@hotmail.com			
	Γένος: Θήλυ   Ημερομηνία γέννησης: 04/06/1980   Εθνικότητα: Ελληνική			
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ				
ΕΜΠΕΙΡΙΑ				
09/2014 -11/2014	Χημικος Ιναπαρίας Ονοαγιαγοριαίας Ελλανικό Κάταρο Οαλασσίν η Ερομικίης Ερίουρο			
	Πεδιάδος,71500			
	Συλλογή και Χημικές αναλύσεις δειγμάτων νερού και ιζήματος Διεξαγωγή πειραμάτων στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «HAME: investigation of Hypoxia and Acidification effects on Marine Ecosystems by means of benthic mesocosm experiments»			
	Κλάδος: Δράσεις Έρευνας και Τεχνολογίας			
02/2013 -03/2014	Γραμματειακή υποστήριξη			
	Sigma Plus ΕΠΕ, Αρχ. Μακαρίου 42, 71202			
	Διαχειριση καθημερινης αλληλογραφιας (εγγραφης/ηλεκτρονικης) Υπεμθυνη αρχείου			
	Κλάδος: Ασφαλιστικές Υπηρεσίες			
07/2006-07/2010	Ασφαλιστικός Υπάλληλος			
	ΙΝΤΕΡΣΑΛΟΝΙΚΑΑ.Ε.Γ.Α, Περιφερειακή Διεύθυνση Ηρακλείου, Λ. 62 Μαρτύρων 196-198,71303			
	Γραμματειακή υποστήριξη Σύνταξη και αποστολή μπροεσιακών εννοάκων			
	Οργάνωση και διαχείριση αρχείου συνεργατών-πελατών			
	Διαχείριση καθημερινής αλληλογραφίας (έγγραφης/ηλεκτρονικής)			
	Έκδοση συμβολαίων Αυτοκινήτου, Πυρός, Σκαφών, Πράσινων Καρτών			
	Διαχειριση ζημιών (καταχωρηση σηλωσεών ατοχηματών, πμολογιών, εκοσση αποσειζεών αποζημιώσεως)			
	Διαχείριση συμβάσεων συνεργατών			
	Μηχανογραφημένο Λογιστήριο			
	Κλάοος: Ασφαλισείς Γενικών κλάσων			
10/2005-04/2006	Υπειίθυνη λειτομονίας κυλικείου Διεθνούς Εκθεσιακού Κέντοου Κοήτης (Δ Ε Κ Κ)			
10/2000 0-1/2000	«Άρτιον Catering», Μονής Οδηγητρίας 11, 71202			
	Παραγγελίες προμηθειών, Έκδοση τιμολογίων, Εξυπηρέτηση πελατών			
	Κλάδος: Οργάνωση εκδηλώσεων, υπηρεσίες catering			
07/0005 00/0000				
07/2005-02/2006	Ι Ιωλητρία αρτοζαχαροπλαστείου			
	Αρτοξαχαροπλαστείο «Αρτιον», ινιονής Οσηγητρίας ΤΤ, 7 τ202			
	Κλάδος: Πώληση ποοϊόντων άοτου και ζαναροπλαστικός			
04/2004-12/2004	Τηλεφωνήτρια εξυπηρέτηση πελατών Ο.Τ.Ε (134)			
	Ο.Τ.Ε.Α.Ε, Μινωταύρου 10, 71202			
	Ενημέρωση πελατών αναφορικά με τα προϊόντα της εταιρείας			
	μιαχειριση αιτησεων (νεων τηλεφωνικων συνδεσεων, συνδρομων internet κ.ά υπηρεσιών)			
	server 2 Ibroug Ikiening			

06/2002-08/2002	Πρακτική άσκηση Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η ), Βούτες Ηρακλείου 71003 Ανάλυση δειγμάτων αίματος Κλάδος: Υπηρεσίες Υγείας				
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ					
10/2013 έως σήμερα	Μεταπτυχιακό Δ Τμήμα Χημείας, Σχα Πρόγραμμα Σύνθεα	<mark>ιίπλωμα Ειδίκευ</mark> λή Θετικών Επιστη σης και Απομόνωση	<mark>σης</mark> μών, Πανεπιστήμι ς Φυσικών Προϊόν	ο Κρήτης, Βούτες Ηρ πων με Βιολογική Δρ	ακλείου 71003 ραστικότητα
1999-2012	Πτυχίο Χημείας Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βούτες Ηρακλείου 71003 Μέσος όρος 7.45 / 10 Διπλωματική εργασία: «Σύνθεση του ενδοκυττάριου δείκτη C <sub>12</sub> -BIIC για το φθορισμομετρικό προσδιορισμό ιόντων ασβεστίου»				
1995-1998	Αττολυτήριο Λυκείου 1° Γενικό Λύκειο Θήβας, Βοιωτία Μέσος όρος 17.2 / 20				
ΑΤΟΜΙΚΕΣΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ					
Μητρική γλώσσα	Ελληνικά				
Λοιπές γλώσσες	ΚΑΤΑΝ Προφορική	ΟΗΣΗ Γραπτή (ανάγνωση)	ΟΝ Επικοινωνία	ιι∧ιΑ Προφορική έκφραση	ГРАФН
English	C1	C1	C1	B2	B2
	Certificat	e of Proficiency in Er	nglish ( Cambridge	University ) C2 level	
Επικοινωνιακές δεξιότητες	Ευχέρεια λόγου, κα πολύχρονη εμπειρία επικοινωνία με τον	λές επικοινωνιακές α μου σε θέσεις εργ πελάτη με σκοπό τη	δεξιότητες που απ ασίας που είχαν ω ν εξυπηρέτησή το	οκτήθηκαν μέσα απο ς κύριο στοιχείο την υ	ό την άμεση
Οργανωτικές/διαχειριστικές δεξιότητες	Επίβλεψη φοιτητών	ν στο Τμήμα Χημείαα	ς, Πανεπιστήμιο Κι	ͻήτης	
Τεχνικές δεξιότητες	Χειρισμός οργάνων αντίστοιχων προγρι Origin, εμπειρία η ο διπλώματος ειδίκευ	φασματοσκοπίας Ν αμμάτων ανάλυσης ποία αποκτήθηκε κι σης	IMR, GC-MS, fluo Bruker TopSpin, G ατά τη διάρκεια εκτ	meter καθώς και των 3C-MS Postrun Anal τόνησης του μεταπτι	ν ysis και υχιακού
Ψηφιακές δεξιότητες	Γνώση χρήσης ηλεκτρονικού υπολογιστή (επεξεργασία κειμένου, υπολογιστικών φύλλων, βάσεων δεδομένων, δημιουργία και επεξεργασία παρουσιάσεων) και υπηρεσιών διαδικτύου - Cambridge International Diploma in IT Skills Χειρισμός εφαρμογών διαδικτύου - Internet Applications Certificate Level 1 (Vellum Global Educational Services) Καλός χειρισμός βάσης δεδομένων "Bluebyte", εμπειρία η οποία αποκτήθηκε τον τελευταίο χρόνο με την εργασία μου στο ασφαλιστικό πρακτορείο Sigma Plus ΕΠΕ Καλός χειρισμός προγραμμάτων Chemdraw και Chemdraw 3D, εμπειρία η οποία αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας				

Άλλες δεξιότητες	Μέλος θεατρικής ομάδας Πανεπιστημίου Κρήτης (ΘΟΠΚ), 1999-2006 Εθελοντική ομάδα «Διαβάζω για τους άλλους», Οκτώβριος 2015 έως σήμερα
ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	
Δημοσιεύσεις	Tsikalas, G.K., Karavassili, A., Lazarou, P., Philippa, I., Katerinopoulos, H. E., Synthesis and ion selectivity studies of potential fluorescent heavy metal ion indicators Arkivoc, <b>2015</b> , (iii) 252-262
Συνέδρια	22ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 2016
	Αναρτημένη ανακοίνωση «Σύνθεση παραγώγων του EGDA και EGTRA και μελέτη των ιδιοτήτων τους ως φθορίζοντες δείκτες βιολογικών ιόντων»
	16th International Conference on Balymore and Organia Chemistry, BOC 2016
	Tourn international Conference on Polymers and Organic Chemistry, POC-2016 Xsogóvpgoc Hogrλsíou, Ιούνιος 2016
	Αναρτημένη ανακοίνωση «Design and Synthesis of Coumarin Analogs as Potential Fluorescent Probes in the Detection of Biological Cations»
	Chemistry at the Interface of Biology and Medicine, Heraklion Crete, Greece, 23-26 September 2016
	18ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
	Ι Ιανεπιστημιο Κρητης, Μαρτιος 2016 Αναστριμένη σταγγρέψει για την ΕΟΤΑ είνα αροίζου τος δρίντος κατιό του γ
	Αναριημένη ανακοινώση «παραγώγα του EGTA ως φθοριζόντες σείκτες κατιοντών. Σύνθεση και φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός»
	12ο Παναλλάνηο Συνκάδοιο Κλυμικάς Χουρίας
	Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Οκτώβριος 2015
	Note de la contra de
	IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry
	Aγαστημένη ανακοίνωση «Synthesis and ion selectivity studies of potential fluorescent
	heavy metal ion indicators»
	2015 Aquatic Sciences Meeting
	Σοτο Αφααίο Ociences Meeting Γραγάδα, Ισπανία, Φεβρομάριος 2015
	Aquatic Sciences: Global And Regional Perspectives — North Meets South
	Aναρτημένη ανακοίνωση « Effects of ocean acidification and hypoxia to the functioning of different sediment types: a benthic microcosm approach»
	9ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
	Ανώγεια Ρεθύμνου, Ιούνιος 2003
	Αναρτημένη ανακοίνωση «Εναλλακτική μέθοδος σύνθεσης του ενδοκυττάριου λιπόφιλου
	טנוגדון וטעזשע מטקנטזוטט כ <sub>12</sub> -שווכ»
Σεμινάρια	Ion Chromatography, Thermo Scientific, Ηράκλειο 8/10/2013
-	Erasmus Summer School "SYNAPS", Πανεπιστήμιο Κρήτης, 18-30/07/2011
Turner ( 5 to 1/1 to 1	
ι ιμητικες οιακρίσεις και βραβεία	ι ιρογραμμα χορηγησης υποτροφιων ΙΚΥ με οιαδικασια εξατομικευμένης αξιολόγησης» ΙΚΥ, Ακαδ. Έτος 2013-2014
Συνδρομές	Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών, Οκτώβριος 2012 έως σήμερα
1	

Εργαστηριακή εμπειρία	Μεταπτυχιακός Βοηθός προπτυχιακών εργαστηρίων Οργανικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Χειμερινό Εξάμηνο 2014
	Μεταπτυχιακός Βοηθός προπτυχιακών εργαστηρίων Οργανικής Χημείας ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Εαρινό Εξάμηνο 2015
	Επίβλεψη και συμβουλευτική για τη διεξαγωγή των πειραμάτων από τους φοιτητές. Διόρθωση εργαστηριακών αναφορών
	Προπτυχιακός Βοηθός προπτυχιακών εργαστηρίων Οργανικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Εαρινό Εξάμηνο 2001
	Προετοιμασία αναλωσίμων για τη διεξαγωγή εκπαιδευτικών πειραμάτων.
Πιστοποιήσεις	Πιστοποίηση ISO 22716:2007 ( TUV HELLAS )
	ΕΕΧ, Περιφερειακή Διεύθυνση Κρήτης, Οκτώβριος 2015

# **CURRICULUM VITAE**

PERSONAL INFORMATION	Ioanna Philippa		
	25, Parodos Kapetannisis Marigos, Heraklion, Crete, 71201, Greece		
	+30-2811-101081		
	philippa70@hotmail.com		
	Gender: Female   Date of birth: 04/06/1980   Nationality: Greek		
WORK EXPERIENCE			
00/004 4 44/004 4	Chamiet		
09/2014 -11/2014	Unemist		
	Collection and chemical analyses of water and sediment samples under the research program «HAME: investigation of Hypoxia and Acidification effects on Marine Ecosystems by means of benthic mesocosm experiments".		
	Sector: Research and Technology		
02/2013 -03/2014	Secretarial support		
	Sigma Plus Ltd., Arch. Makariou 42, 71202		
	Daily mail handling (written/electronic) File Manager		
	Sector: Insurance Services		
07/2006-07/2010	Insurance Company Personnel		
	INTERSALONIKA AEGA, Regional Heraklion Address, Av. 62 Witness 196 to 198, 71303		
	Secretarial support		
	Drafting and circulating official documents		
	File Manager of associates and customers		
	Issuing insurance policies (general sectors)		
	Damage management (registration of accidents, invoices, receipt of proof of		
	compensation)		
	Associate's contract management		
	Sector: General Insurance Services		
10/2005-04/2006	Catering manager, Crete International Exhibition Centre		
	«ARTION Catering», Monis Odigitrias 11, 71202		
	Orders, Supplies, Invoicing, Customer Service		
	Sector: Events organization, catering services		
07/2005-02/2006	Bakery's saleswoman		
	«ARTION» bakery, Monis Odigitrias 11, 71202		
-	Sector: Sales of bakery and confectionery products		
04/0004 40/0004			
04/2004-12/2004	Operator, customer service OTE (134)		
	UTE SA, MINOTAULTU, / 1202		

	Informing custome Management of a	ers regarding compositions (new tell	oany's products ephone connections,	internet services, sul	oscriptions etc.)
	Sector: Telecommunications Services				
06/2002-08/2002	Industrial Train Laboratory of Clini Voutes 71003	Industrial Training Laboratory of Clinical Pharmacology University General Hospital of Heraklion (PA.G.N.I) Voutes 71003			
	Blood sample ana Sector: Health Ser	lyses vices			
TRAINING					
10/2013 to date	M.Sc. studies Department of Cherr Synthesis and Isol	M.Sc. studies Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Crete, Heraklion Voutes 71003,Greece Synthesis and Isolation of Natural Products with Biological Activity Program			
1999-2012	Bachelor's deg Department of Chem Average Grade: 7. Diploma Thesis: "S	ree in Chemis histry, Faculty of Scie 45 / 10.0 Synthesis of intrac	try nce, University of Cre ellular marker C <sub>12</sub> -	ete, Heraklion Voutes BIIC for the fluorim	71003,Greece etric
1995-1998	determination of ca	alcium ions"			
	Average Grade: 17.2 / 20.0				
PERSONAL SKILLS AND COMPETENCES					
Mother tongue	Greek				
Other languages	UNDERSTANDING SPEAKING		WRITING		
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	C1	C1	C1	B2	B2
	Certificat	e of Proficiency in	English ( Cambridg	e University ) C2 lev	rel
Communication skills	Fluency, good con had as main eleme	nmunication skills ent the direct com	gained through my munication with the	/ years of experien e customer for serv	ce in jobs that ricing purposes.
Organisational/ managerial skills	Supervision of sop	homore students	in Chemistry Labo	ratory, University o	f Crete.
Technical skills	Handling NMR spectroscopy instruments, GC-MS, fluorimeter and the corresponding analysis programs Bruker TopSpin, GC-MS Postrun Analysis and Origin, experience gained during my research under the master's degree program.				

Digital skills	Computer programs knowledge (word processing, spreadsheets, databases, creating and editing presentations) and internet services - Cambridge International Diploma in IT Skills
	Handling web applications - Internet Applications Certificate Level 1 (Vellum Global Educational Services)
	Database handling "Bluebyte", experience gained during my work at the Sigma Plus Ltd insurance agency
	Handling Chemdraw programs and Chemdraw 3D, experience gained during the preparation of my M.Sc. thesis
Other skills	Member of the theatrical group of the University of Crete, 1999-2006 Volunteer in the group «Reading for others», October 2015 to date
ADDITIONAL INFORMATION	
Publications	Tsikalas, G.K., Karavassili, A., Lazarou, P., Philippa, I., Katerinopoulos, H. E., Synthesis and ion selectivity studies of potential fluorescent heavy metal ion indicators Arkivoc, <b>2015</b> , (iii) 252-262
Conferences	22o Panhellenic Chemistry Conference Thessaloniki, December 2016 Poster " Synthesis of EGDA and EGTRA derivatives and study of their properties as fluorescent probes for biological ions"
	16th International Conference on Polymers and Organic Chemistry, POC-2016 Hersonissos Heraklion, June 2016 Poster " Design and Synthesis of Coumarin Analogs as Potential Fluorescent Probes in the Detection of Biological Cations"
	Chemistry at the Interface of Biology and Medicine, Heraklion Crete, Greece, 23-26 September 2016
	18th Congress of Graduate Students in Chemistry University of Crete, March 2016 Poster "Derivatives of EGTA as fluorescent cation indicators. Synthesis and spectroscopic characterization"
	13th National Congress of Clinical Chemistry Medical School, University of Crete, October 2015
	IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry Egli, Zappeion, Athens, June 2015 Poster " Synthesis and ion selectivity studies of potential fluorescent heavy metal ion indicators"
	2015 Aquatic Sciences Meeting Granada, Spain, February 2015 Aquatic Sciences: Global And Regional Perspectives — North Meets South Poster " Effects of ocean acidification and hypoxia to the functioning of different sediment types; a benthic microcosm approach"

	9th Congress of Graduate Students in Chemistry, University of Crete
	Anogia Rethymnon, June 2003
	Poster "Alternative method of synthesis of the intracellular lipophilic $C_{12}$ -BIIC calcium ion indicator"
Seminars	Ion Chromatography, Thermo Scientific, Heraklion October 2013
	Erasmus Summer School "SYNAPS", University of Crete, July 2011
Honours and awards	" SSF Program, "IKY scholarships" individualized assessment process" Acad. year 2013-2014
Memberships	Member of Association of Greek Chemists
Laboratory experience	MSc Assistant, undergraduate laboratories of Organic Chemistry I, Chemistry Department, University of Crete, Fall Semester 2014
	MSc Assistant, undergraduate laboratories of Organic Chemistry II, Chemistry Department, University of Crete Spring Semester 2015
	Supervision and advisory of students. Reviewing of laboratory reports
	Bachelor Assistant, undergraduate Organic Chemistry I laboratories, Chemistry Department, University of Crete, Spring Semester 2001
	Preparing reagents and solutions for the Organic Chemistry experiments.
Certifications	Certificate: ISO 22716: 2007 (TUV HELLAS),
	Association of Greek Chemists, Regional Directorate of Crete, October 2015

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η σύνθεση και ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός μιας σειράς δυνητικών φθορισμομετρικών δεικτών ιόντων. Τα ιονοφόρα τμήματα των δεικτών αυτών είναι ανάλογα του γνωστού συμπλοκοποιητή ιόντων Ca<sup>2+</sup> EGTA (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) και συγκεκριμένα το «διυποκατεστημένο» παράγωγο EGDA, (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N',-diacetic acid) και το «τρι-υποκατεστημένο» παράγωγο EGTRA, (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',-triacetic acid).

Τα ενσωματωμένα χρωμοφόρα είναι υποκατεστημένες κουμαρίνες, μια γνωστή κατηγορία χρωμοφόρων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή φθοριζόντων δεικτών. Όταν το ιονοφόρο είναι συνδεδεμένο με το κουμαρινικό χρωμοφόρο μέσω συζυγιακού συστήματος – στη συγκεκριμένη περίπτωση ένας αμιδικός δεσμός - τότε η απόκριση είναι συνήθως του τύπου δεικτών-λόγου φθορισμού (*ratiometric* sensors) ενώ, αν η συζυγία αυτή αναιρεθεί, ή αν το συμπλοκοποιημένο ιόν δεν συναρμόζεται με το χρωμοφόρο, η απόκριση του δείκτη αναμένεται να είναι αυτή της αύξησης της έντασης φθορισμού (*turn-on* sensors).

Οι μεταβολές στο χηλικό τμήμα του μορίου οδήγησαν σε αλλαγές στην εκλεκτικότητα των αισθητήρων προς τα υπό μελέτη ιόντα ενώ ο τρόπος συναρμογής των ιόντων με τους δείκτες επηρέασε τη φθορισμομετρική τους συμπεριφορά.

1

#### ABSTRACT

In this thesis the synthesis and spectroscopic profile studies of a series of potential fluorescent ion indicators is described. The ionophores embedded in these indicators are analogues of the known Ca<sup>2+</sup> chelator EGTA (ethylene glycol bis (b-aminoethyl ether) - N,N,N',N'-tetraacetic acid) and in particular the "di-substituted" derivative EGDA, (ethylene glycol bis (b-aminoethyl ether) -N,N',-diacetic acid) and "tri-substituted" derivative EGTRA, (ethylene glycol bis (b-aminoethyl ether) -N,N,N',-triacetic acid).

The embedded chromophores are substituted coumarins, a known class of chromophores used in the preparation of fluorescent probes. When the ionophore is linked to the coumarin chromophore via a conjugated system - in this case an amide bond - then the response is usually that of a *ratiometric* sensor, based on fluorescence ratio measurements. When this conjugation is interrupted, or when the chelated ion is not coordinated with the chromophore, the probe response is expected to be that of a *"turn-on"* sensor and measurements are based on the increase of fluorescence intensity.

Changes in the chelating moiety of the molecule led to changes in the selectivity of the sensors to the ions under study while mode of coordination of the ions to the indicators influenced their fluorometric response.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
-------------

ПЕРІЛНΨН
ABSTRACT
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
1.1. EGTA4
1.2. BAPTA
1.3. Η χρησιμότητα των φθορισμομετρικών αλλαγών στον έλεγχο των μεταβολών συγκέντρωσης βιολογικών ιόντων6
1.4. Σύντομη αναδρομή στην ανάπτυξη πολυκαρβοξυλικών φθορισμομετρικών δεικτών7
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ
3.1. Δομή των μονοκουμαρινικών (4a-d) και δικουμαρινικών (6a-d) αναλόγων: Μελέτες NMR24
4. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ
4.1 Συμπεράσματα41
4.2 Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων44
4.3 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων51
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
6.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
7.ВІВЛІОГРАФІА
8.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ112
ΦΑΣΜΑΤΑ NMR
ΦΑΣΜΑΤΑ GC-MS
ΦΑΣΜΑΤΑ LC-MS/LCQ
ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ162

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### **1.1. EGTA**

Στην ιστορική για το πεδίο δημοσίευσή του με τίτλο «New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures» o R. Y. Tsien ανέφερε χαρακτηριστικά:<sup>1</sup>

«It is scarcely necessary any longer to stress the importance of intracellular free  $Ca^{2+}$  as a second messenger for external stimuli and as a regulatory ion... A major technical challenge has been to devise satisfactory means for non-destructively measuring intracellular free  $Ca^{2+}$  with good time resolution... The most popular technique has been to use dyes or proteins which change their absorption or luminescence upon binding  $Ca^{2+}$  ions.»

Η προσέγγιση που ακολούθησε ο Tsien ήταν η ενσωμάτωση της δομικής μονάδας του EGTA (ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) στους δείκτες ασβεστίου που συνέθεσε (Σχήμα 1). Η συγκεκριμένη επιλογή βασίστηκε στα ειδικά χαρακτηριστικά της ένωσης αυτής που σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα σε ρυθμιστικά διαλύματα. Αυτή η ένωση δίνει πρακτικά το μόνο ρυθμιστικό διάλυμα με υψηλή εκλεκτικότητα για  $Ca^{2+}$  σε σχέση με το  $Mg^{2+}$  βρίσκοντας έτσι σημαντική χρήση στη βιολογική έρευνα. Η διαφορά αυτή της εκλεκτικότητας  $Ca^{2+}$  /  $Mg^{2+}$  απορρέει πιθανώς από μια συναρμόζουσα κοιλότητα η οποία έχει το σωστό μέγεθος για τα ιόντα  $Ca^{2+}$ , αλλά η οποία δεν μπορεί να «συσταλεί» περαιτέρω για να δεσμεύσει ισχυρά τα ιόντα  $Mg^{2+}$  επειδή τα καρβοξύλια σε κάθε άκρο της αλυσίδας παρεμποδίζουν το ένα το άλλο. Πράγματι, η στερική διάταξη των τεσσάρων καρβοξυλικών, των δυο αιθερικών και των δυο αμινομάδων στο γηλικό τμήμα του μορίου, προσδίδει επιλεκτικότητα κατά την πρόσδεση του  $Ca^{2+}$  περίπου  $10^5$ :1 ως προς το σημαντικότερο παρεμποδιστικό ιόν, το Mg<sup>2+</sup>. Η επιλεκτικότητα αυτή είναι απαραίτητη, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου μαγνήσιου στο κυτταρόπλασμα  $([Mg^{2+}]i)$  είναι περίπου 10<sup>4</sup> φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του ασβεστίου (10<sup>-3</sup> M έναντι 10<sup>-7</sup> M).

Δυστυχώς, τα άζωτα του EGTA δεσμεύουν πρωτόνια με τιμές pKa 8.96 και 9.58 καθιστώντας τη ρυθμιστική δυνατότητά του για το  $Ca^{2+}$  άμεσα εξαρτώμενη από μεταβολές του pH στην περιοχή του 7.0.<sup>2</sup> Επίσης, επιβραδύνεται σε μεγάλο βαθμό η δέσμευση και η απελευθέρωση  $Ca^{2+}$ . Οι Hellam και Podolsky<sup>3</sup> ανέφεραν τιμές για τις παρατηρούμενες σταθερές για την αντίδραση του  $Ca^{2+}$  με το EGTA ως  $10^{6.3}$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> και 0.4 s<sup>-1</sup> σε pH 7.0, όπου το EGTA υφίσταται κυρίως ως διανιόν (H<sub>2</sub>EGTA<sup>2-</sup>). Σε φυσιολογικό pH, το EGTA δεσμεύει τα ιόντα του  $Ca^{2+}$  δύο με τρεις τάξεις μεγέθους πιο αργά από αντίστοιχους συμπλοκοποιητές

4

που δεν παρεμποδίζονται από την ύπαρξη πρωτονίων. Κατά συνέπεια το EGTA χρειάζεται χρόνους της τάξης των δευτερολέπτων για να ανταποκριθεί ρυθμιστικά σε μία αιφνίδια μεταβολή συγκέντρωσης ιόντων Ca<sup>2+</sup>.



Σχήμα 1: Οι δομές των EGTA και BAPTA.

#### **1.2. BAPTA**

Η λύση στα παραπάνω προβλήματα προτάθηκε από τον Tsien, ο οποίος ενσωμάτωσε συμμετρικά δύο αρωματικούς δακτυλίους στην αλυσίδα του μορίου αλλάζοντας τις ιδιότητές του. Οι τιμές pKa των δύο αζώτων μειώθηκαν κάτω από το 7.0 με αποτέλεσμα την αποφυγή πρωτονίωσης σε φυσιολογικές τιμές pH και την ταγύτερη συναρμογή με τα ιόντα ασβεστίου. Θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό, ότι η κοιλότητα του BAPTA [bis(oaminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid],  $\delta\pi\omega\zeta$   $\pi\rho\sigma\tau\delta\theta\eta\kappa\varepsilon$  το  $\alpha\kappa\rho\omega\nu\delta\mu$ ιο της ένωσης, δεν διαφέρει από αυτή του EGTA διατηρώντας την εκλεκτικότητα  $Ca^{2+}$  /  $Mg^{2+}$ . O Tsien διέβλεψε την αλλαγή στο φθορισμομετρικό προφίλ της ένωσης συνειδητοποιώντας ότι στην ελεύθερή της μορφή, τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων των αζώτων θα συμμετείχαν στο συζυγιακό σύστημα προσανατολίζοντας τα τρογιακά τους παράλληλα με τα p τρογιακά των βενζολικών δακτυλίων. Στη δεσμευμένη με Ca<sup>2+</sup> όμως μορφή, τα άζωτα, οι συνδεδεμένες ομάδες του οξικού οξέος και τα αιθερικά οξυγόνα, συναρμόζονται με το ιόν  $Ca^{2+}$  και οι δεσμοί αζώτου-δακτυλίου θα πρέπει να στραφούν κατά σχεδόν 90°, με αποτέλεσμα τα ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων του αζώτου να εκτρέπονται εκτός της συζυγίας των αρωματικών συστημάτων δίνοντας ένα φάσμα φθορισμού παρόμοιο με αυτό του απλού βενζολίου. Το συζυγιακό δηλαδή, σύστημα του χρωμοφόρου περιορίζεται, με συνέπεια τη μετατόπιση του μήκους κύματος του μεγίστου της απορρόφησης σε μικρότερο μήκος κύματος.

# 1.3. Η χρησιμότητα των φθορισμομετρικών αλλαγών στον έλεγχο των μεταβολών συγκέντρωσης βιολογικών ιόντων

Οι μετατοπίσεις αυτές στα μήκη κύματος των τετρακαρβοξυλικών δεικτών, χρησιμοποιήθηκαν από τον R.Y. Tsien για τον υπολογισμό συγκεντρώσεων  $[Ca^{2+}]$  μέσω ενός αλγορίθμου τον οποίο ο ίδιος εισήγαγε.<sup>4</sup> Στην περίπτωση κατά την οποία παρατηρείται μετατόπιση στα μήκη κύματος των μεγίστων της διέγερσης και του φθορισμού ως αποτέλεσμα της δέσμευσης  $Ca^{2+}$  από τον δείκτη, ο λόγος R των εντάσεων φθορισμού F<sub>1</sub> και F<sub>2</sub> στα δυο μήκη κύματος διέγερσης λ<sub>1</sub> και λ<sub>2</sub> στα οποία πραγματοποιούνται οι μετρήσεις, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης  $[Ca^{2+}]$  ανεξαρτήτως της συνολικής συγκέντρωσης του δείκτη, της ευαισθησίας του οργάνου και του οπτικού μήκους διαδρομής (μετρήσεις λόγου εντάσεων φθορισμού, ratiometric measurements). Η συγκέντρωση  $[Ca^{2+}]$ ενός δείγματος με λόγο εντάσεων φθορισμού R, υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\left[\operatorname{Ca}^{2+}\right] = \operatorname{K}_{d} \cdot \left(\frac{\operatorname{R} - \operatorname{R}_{\min}}{\operatorname{R}_{\max} - \operatorname{R}}\right) \cdot \left(\frac{\operatorname{S}_{f2}}{\operatorname{S}_{b2}}\right)$$

όπου  $K_d$  είναι η σταθερά διάστασης του συμπλοκοποιημένου με  $Ca^{2+}$  δείκτη και  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  είναι αντίστοιχα οι λόγοι των εντάσεων φθορισμού του ελεύθερου και του κορεσμένου με  $Ca^{2+}$  δείκτη, στα μήκη κύματος διέγερσης  $\lambda_1$  και  $\lambda_2$ . Οι συντελεστές  $S_{f1}$  και  $S_{b1}$  είναι συντελεστές αναλογικότητας για τις εντάσεις φθορισμού του ελεύθερου και του κορεσμένου με  $Ca^{2+}$  δείκτη αντίστοιχα, για το μήκος κύματος διέγερσης  $\lambda_1$ , ενώ οι αντίστοιχοι συντελεστές για το μήκος κύματος  $\lambda_2$  είναι οι  $S_{f2}$  και  $S_{b2}$ . Στο όριο μηδενικής  $[Ca^{2+}]$  ο λόγος  $R_{min}$  για τον ελεύθερο δείκτη αντιστοιχεί στο λόγο  $S_{f1}$  /  $S_{f2}$ , ενώ ο  $R_{max}$  είναι ο λόγος  $S_{b1}$  /  $S_{b2}$  για  $[Ca^{2+}]$  η οποία αντιστοιχεί σε κορεσμό. Οι τέσσερις συντελεστές αναλογικότητας που αναφέρθηκαν, μπορούν να υπολογιστούν από διαλύματα βαθμονόμησης (*calibration*) τα οποία περιέχουν γνωστές, χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερου και κορεσμένου με  $Ca^{2+}$  δείκτη.

Στην περίπτωση που δεν παρατηρείται μετατόπιση στα μήκη κύματος των μεγίστων διέγερσης και απορρόφησης, η συγκέντρωση κατιόντων ασβεστίου ενός δείγματος με ένταση φθορισμού F υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\left[\operatorname{Ca}^{2+}\right] = \operatorname{K}_{d} \cdot \left(\frac{\operatorname{F} - \operatorname{F}_{\min}}{\operatorname{F}_{\max} - \operatorname{F}}\right)$$

όπου  $F_{min}$  και  $F_{max}$  είναι οι εντάσεις φθορισμού του ελεύθερου και του κορεσμένου με Ca<sup>2+</sup> δείκτη αντίστοιχα, μετρούμενες στο ίδιο μήκος κύματος διέγερσης (μετρήσεις απολύτων τιμών φθορισμού, non-ratiometric measurements). Η εφαρμογή των παραπάνω αλγορίθμων

βασίζεται στις παραδοχές ότι ο δείκτης σχηματίζει ένα απλό 1:1 σύμπλοκο με το Ca<sup>2+</sup>, ότι συμπεριφέρεται στα κύτταρα όπως και στα διαλύματα βαθμονόμησης και ότι έχει ικανή διαλυτότητα έτσι ώστε η ένταση φθορισμού να είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των φθοριζόντων ειδών.

#### 1.4. Σύντομη αναδρομή στην ανάπτυξη πολυκαρβοξυλικών φθορισμομετρικών δεικτών

## 1.4.α Πολυκαρβοξυλικοί φθορίζοντες δείκτες $Ca^{2+}$

Όπως προαναφέρθηκε, ο δομικός σκελετός με βάση τον οποίο σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέοι δείκτες, ήταν αυτός του BAPTA με εξαίρεση τους δείκτες quin 1 και quin  $2^{5.6}$  που φέρουν ως χρωμοφόρο τμήμα παραγοντοποιημένη κινολίνη. Αυτό όμως που τους διαφοροποιεί από τους άλλους φθορίζοντες δείκτες Ca<sup>2+</sup> είναι το γεγονός ότι το χηλικό τμήμα τους έχει υποστεί τροποποίηση, καθώς ένα αιθερικό άτομο οξυγόνου έχει αντικατασταθεί από το κινολινικό άζωτο (Σχήμα 2). Αυτή η αντικατάσταση είχε ως αποτέλεσμα αφενός αύξηση της συγγένειας για τα Ca<sup>2+</sup> και αφετέρου μείωση της επιλεκτικότητας ως προς τα Mg<sup>2+</sup>. Συγκρίνοντας την επιλεκτικότητα Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup> βλέπουμε ότι για το BAPTA είναι 10<sup>5.2</sup> ενώ για τα κατιόντα Ca<sup>2+</sup> αντικατοπτρίζεται στις τιμές της σταθεράς διάστασης των συμπλόκων, οι οποίες είναι 10<sup>-7.6</sup> M και 10<sup>-7.1</sup> M αντίστοιχα για τους δείκτες quin 1 και quin 2, τιμές μειωμένες σε σχέση με το BAPTA όπου K<sub>d</sub>= 10<sup>-6.97</sup> M. Οι δομές των quin 1 και quin 2 απεικονίζονται στο Σχήμα 2.



X = H => quin 1 $X = OCH_3 => quin 2$ 

Σχήμα 2: Οι δείκτες quin 1 και quin 2.

Το γεγονός ότι τα  $\lambda_{exc}$  αυτών των δεικτών βρίσκονται στην περιοχή του υπεριώδους, σε συνδυασμό με τις χαμηλές τιμές των  $K_d$  και την πολύ μικρή μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος με τη δέσμευση  $Ca^{2+}$ , οδήγησε σε περιορισμένες εφαρμογές αυτή την  $1^{\eta}$  γενιά των τετρακαρβοξυλικών δεικτών.

Το 1985 δημοσιεύτηκαν από τον R.Y. Tsien και τους συνεργάτες του, η σύνθεση και οι φασματοσκοπικές ιδιότητες έξι νέων δεικτών,<sup>4</sup> οι οποίοι αποτελούν τη  $2^{\eta}$  γενιά και εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τον quin 2. Αποτελούν παράγωγα του BAPTA, το χρωμοφόρο τμήμα των οποίων εμφανίζει αυξημένη συζυγία και σε αυτό ενσωματώθηκαν είτε υποκατεστημένα παράγωγα trans-στιλβενίου (οικογένεια των δεικτών still), είτε υποκατεστημένα παράγωγα στιλβενίου στα οποία ο διπλός δεσμός είναι ενταγμένος σε φουρανικό δακτύλιο (οικογένεια των fura dyes) ή τέλος μια καρβοξυ-υποκατεστημένη ινδολική ομάδα (indo 1). Οι δομές των νέων δεικτών απεικονίζονται στο Σχήμα 3.



<u>Σχήμα 3</u>: Οι φθορίζοντες δείκτες still 1,2, fura 1,2,3 και indo 1.

Τα πλεονεκτήματα της 2<sup>ης</sup> αυτής γενιάς δεικτών σε σχέση με τον quin 2, ήταν ότι εμφάνιζε 30 φορές ισχυρότερο φθορισμό καθώς και σημαντική μετατόπιση στο μήκος κύματος διέγερσης (και εκπομπής για την περίπτωση του indo 1) αλλά και αύξηση στην ένταση του φθορισμού μετά τη συμπλοκοποίηση των Ca<sup>2+</sup>. Παρουσίαζε επίσης βελτιωμένη επιλεκτικότητα για τα Ca<sup>2+</sup> σε σχέση με άλλα δισθενή ιόντα (Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>), καθώς και ελαφρώς μειωμένη συγγένεια για τα κατιόντα Ca<sup>2+</sup> και τέλος μικρή αύξηση στο μήκος κύματος διέγερσης του ελεύθερου δείκτη.

Από τη 2<sup>η</sup> γενιά, ο indo 1 και ο fura 2 είναι οι δείκτες που ξεχώρισαν. Ο indo 1 είναι ο μοναδικός δείκτης υπεριώδους στη βιβλιογραφία ο οποίος εμφανίζει μεταβολή και των δύο μηκών κύματος (διέγερσης και εκπομπής), ιδιότητα που τον καθιστά αναντικατάστατο σε κυτταρικά πειράματα ροής στα οποία η διέγερση γίνεται σε ένα μήκος κύματος και παρακολουθείται η μεταβολή του λόγου του εκπεμπόμενου φθορισμού σε δύο μήκη κύματος.<sup>7,8,9</sup> Σοβαρό μειονέκτημα που περιορίζει το φάσμα εφαρμογών του indo 1 αποτελεί η μικρή του φωτοσταθερότητα.

Ο fura 2 είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης σε βιολογικά πειράματα, καθώς συγκεντρώνει αρκετά από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ο ισχυρός φθορισμός σε συνδυασμό με την αυξημένη φωτοσταθερότητά του, η μεταβολή του λ<sub>exc</sub> με τη δέσμευση και η μετατόπισή του σε μικρότερα μήκη κύματος καθώς και η ελαφρώς αυξημένη σταθερά διάστασής του, τον καθιστούν κατάλληλο για πολλές εφαρμογές.<sup>10,11</sup> Μάλιστα, ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, δεν μπορεί να θεωρηθεί τυχαίο το γεγονός ότι η χρήση του fura 2 έχει αναφερθεί σε περισσότερες από 13.000 δημοσιεύσεις. Ορισμένα από τα μειονεκτήματά του αφορούν τη μερική αγκυροβόλησή του σε κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, τη δέσμευσή του σε πρωτεΐνες, τη μειωμένη διαλυτότητά του με τη μορφή του ΑΜ εστέρα και τέλος τη μερική διαφυγή του από το κύτταρο μέσω μηχανισμών ανιοντικής μεταφοράς.<sup>6,8</sup>

Όσον αφορά στην οικογένεια των δεικτών still, οι εφαρμογές τους περιορίζονται λόγω του cis  $\leftrightarrow$  trans φωτοϊσομερισμού, ο οποίος είναι μη επιθυμητός καθώς από τα δύο ισομερή μόνο το trans φθορίζει.<sup>4</sup>

Το επόμενο βήμα στο πεδίο ήταν η σύνθεση <u>δεικτών διέγερσης ορατού</u>, ώστε να αποφευχθούν οι περιορισμοί που σχετίζονται με τη χρήση υπεριώδους φωτός σε βιολογικά πειράματα. Ένας από τους πρώτους δείκτες που εμφανίστηκαν στη βιβλιογραφία ήταν ο fura red,<sup>12</sup> ο οποίος διαφέρει στο ότι διαθέτει ένα χρωμοφόρο τμήμα με εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα ώστε να είναι εφικτή η επίτευξη μεγαλύτερου μήκους κύματος διέγερσης.

Συγκεκριμένα, το χρωμοφόρο τμήμα του αποτελείται από έναν βενζοφουρανικό δακτύλιο σε συζυγία με μία ομάδα θειοϋδαντοΐνης. Η δομή του fura red φαίνεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4: Η δομή του δείκτη fura red.

Το αποτέλεσμα της τροποποίησης του χρωμοφόρου τμήματος που οδήγησε στη σύνθεση του fura red, ήταν η μεγάλη μετατόπιση Stokes που παρατηρείται. Συγκεκριμένα, το  $\lambda_{exc}$  διαφέρει από το  $\lambda_{em}$  κατά 185-221 nm, δηλαδή ο δείκτης εμφάνισε τη μεγαλύτερη μετατόπιση Stokes που είχε αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Επίσης, ο δείκτης εμφανίζει μεταβολή του  $\lambda_{exc}$  με τη δέσμευση Ca<sup>2+</sup> (από 472 nm στα 436 nm) οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο λόγος εντάσεων φθορισμού για τον προσδιορισμό της [Ca<sup>2+</sup>]. Η συγγένειά του για τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> είναι υψηλή (K<sub>d</sub>=140 nM). Στα μειονεκτήματά του συγκαταλέγεται η χαμηλή κβαντική απόδοση φθορισμού του (0.013). Το 1989 δημοσιεύτηκε<sup>13</sup> η σύνθεση πέντε νέων δεικτών διέγερσης ορατού. Η μετατόπιση των μηκών κύματος διέγερσης προς υψηλότερες τιμές επετεύχθη ενσωματώνοντας στο μοριακό σκελετό του BAPTA χρωμοφόρα όπως αυτά της Φλουορεσκεΐνης και της Ροδαμίνης. Οι δομές της 3<sup>ης</sup> αυτής γενιάς δεικτών απεικονίζονται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5: Οι δομές των φθοριζόντων δεικτών Rhod 1, 2 και fluo 1, 2, 3.

Η επιλογή της Φλουορεσκεΐνης και Ροδαμίνης έγινε με βάση το γεγονός ότι τα δύο αυτά χρωμοφόρα χρησιμοποιούνται ως χρωστικές σε βιολογικά πειράματα. Ως εκ τούτου, υπήρχε ήδη έτοιμη η απαιτούμενη οργανολογία για αναλύσεις στα μήκη κύματος των συγκεκριμένων χρωμοφόρων. Επίσης, η ύπαρξη συνθετικών οδών και για τα δύο χρωμοφόρα καθώς και η σημαντική φωτοχημική τους σταθερότητα αποτέλεσαν ισχυρά κίνητρα για την ενσωμάτωσή τους σε δείκτες  $Ca^{2+}$ . Εκτός από τη μετατόπιση του  $\lambda_{exc}$  στο ορατό, οι δείκτες αυτοί παρουσιάζουν 2 έως 10 φορές μικρότερη συγγένεια για τα ιόντα  $Ca^{2+}$  σε σχέση με τους προηγούμενους, χαρακτηριστικό που τους καθιστά κατάλληλους για τη μέτρηση υψηλότερων συγκεντρώσεων  $Ca^{2+}$ . Η δέσμευση  $Ca^{2+}$  προκαλεί αύξηση στην ένταση του φθορισμού αλλά όχι μεταβολή του  $\lambda_{exc}$ , γεγονός που περιορίζει τις εφαρμογές των δεικτών αφού δεν μπορούν να γίνουν υπολογισμοί λόγων εντάσεων φθορισμού για τη  $[Ca^{2+}]$ . Ένα ακόμη μειονέκτημα των δεικτών της Φλουορεσκεΐνης είναι η ευαισθησία τους ως προς το pH. Από αυτήν την κατηγορία ξεχώρισε ο fluo 3, ο οποίος παρουσιάζει την μικρότερη εξάρτηση από την τιμή του pH ενώ ο φθορισμός του αυξάνει κατά 40 φορές με τη δέσμευση  $Ca^{2+}$ .

Όπως προαναφέρθηκε, το γεγονός ότι τα  $\lambda_{exc}$  και  $\lambda_{em}$  των δεικτών των οικογενειών fluo και rhod παραμένουν αμετάβλητα κατά τη δέσμευση Ca<sup>2+</sup>, αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα στη χρήση αυτών των μορίων σε βιολογικές εφαρμογές. Αυτό το πρόβλημα ξεπεράστηκε το 1993 οπότε και δημοσιεύτηκε<sup>14</sup> η σύνθεση δεικτών με ενσωματωμένο χρωμοφόρο ένα υβρίδιο Φλουορεσκεΐνης-Ροδαμίνης. Στο Σχήμα 6 φαίνεται ο βασικός μοριακός σκελετός αυτών των δεικτών ενώ ο συνδυασμός των υποκαταστατών R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, και R<sub>4</sub> έδωσε έναν αριθμό παραγώγων από τα οποία ξεχώρισε ο fluorhod 2.



Σχήμα 6: Μοριακός σκελετός των δεικτών της οικογένειας Fluorhod και δομή δείκτη fluorhod 2.

Η χρήση υποκατεστημένων κουμαρινών ως χρωμοφόρων, έδωσε μία ακόμα γενιά δεικτών που διεγείρονται στην ορατή περιοχή. Το 1994 δημοσιεύτηκε η σύνθεση τεσσάρων νέων παραγώγων από τα οποία ξεχώρισε ο δείκτης BTC,<sup>1,15</sup> ο οποίος είχε ενσωματωμένη στο χρωμοφόρο τμήμα του μια βενζοθειαζολυλο-υποκατεστημένη κουμαρίνη (Σχήμα 7).



Σχήμα7: Η δομή του κουμαρινικού δείκτη BTC.

Η ενσωμάτωση του κουμαρινικού χρωμοφόρου επιλέχθηκε αφενός λόγω της σταθερότητάς του και αφετέρου λόγω της διέγερσής του σε υψηλότερα μήκη κύματος. Το αποτέλεσμα, εκτός από την αναμενόμενη αύξηση του  $\lambda_{exc}$ , ήταν η παρασκευή δεικτών με μειωμένη συγγένεια για τα κατιόντα  $Ca^{2+}$  ( $K_{d(BTC)}=7\mu M$ ) οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μέτρηση [ $Ca^{2+}$ ] σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση διέγερσης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μεταβολή του  $\lambda_{exc}$  κατά τη συμπλοκοποίηση, καθιστά τον BTC ικανό για χρήση σε μελέτες στις οποίες άλλοι δείκτες φτάνουν σε κορεσμό και δεν μπορούν να αποκριθούν σε υψηλές [ $Ca^{2+}$ ]. Επίσης, χαρακτηριστικό του BTC ήταν η άμεση υδρόλυση των ακετοξυμεθυλεστέρων του μέσα στο κύτταρο. Ιδιαίτερο πλεονέκτημα του δείκτη ήταν η ιδιότητά του να διεγείρεται στα 488 nm (argon laser beam). Μοναδικό μειονέκτημα ήταν η μέτρια κβαντική του απόδοση.

Η σύνθεση μίας σειράς φθοριζόντων δεικτών ιμινοκουμαρινικού τύπου που πραγματοποιήθηκε παλαιότερα στο εργαστήριό μας (Σχήμα 8), οδήγησε στην παρασκευή μορίων από τα οποία ήταν δυνατή, δεδομένης της δυνατότητας τροποποίησης της ιμινοκουμαρινικής ομάδας, η σύνθεση ενώσεων είτε με εκτεταμένα χρωμοφόρα συστήματα είτε με λιπόφιλες ομάδες ενσωματωμένες στη δομή τους. Οι ιμινοκουμαρινικοί δείκτες που προαναφέρθηκαν, παρουσίασαν ένα φασματοσκοπικό προφίλ παρόμοιο αυτού των αντίστοιχων κουμαρινικών αναλόγων.<sup>16</sup>

12



Σχήμα 8: Δομή των ιμινοκουμαρινικού τύπου δεικτών BIIC, BXIC και BTIC.

Η ανάπτυξη των πολυκαρβοξυλικών δεικτών ιόντων ασβεστίου καθώς και δεικτών με χρωμοφόρο την ομάδα της κουμαρίνης περιγράφονται αναλυτικά σε άρθρα ανασκόπησης από την ερευνητική μας ομάδα.<sup>8,17</sup>

## 1.4.<br/>β Πολυκαρβοζυλικοί φθορίζοντες δείκτες $\mathrm{Mg}^{2+}$

Καθώς τα ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα ιόντα  $Ca^{2+}$  σχεδιάστηκαν δείκτες με μικρότερο αριθμό συναρμογής, που αποτελούσαν παράγωγα του o-aminophenol-N,N,O-triacetic acid (APTRA, Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Η δομή του APTRA.

Δύο δείκτες, αντιπροσωπευτικοί του τύπου fura 2 είναι οι mag fura 2 (furaptra)<sup>18</sup> και mag fura 5.<sup>19</sup> Αντίστοιχα, σχεδιάστηκε ένας δείκτης με παρόμοια δομή αυτής του indo 1, o mag indo 1. Η σταθερά διάστασης για  $Mg^{2+}$  του mag indo 1 είναι 2.7 mM, ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη του mag fura 2, η οποία είναι 1.9 mM. Παρόμοια με τους αντίστοιχους δείκτες  $Ca^{2+}$ , ο mag fura 2 υφίσταται μια σημαντική μετατόπιση στο μήκος κύματος

διέγερσης κατά τη δέσμευση ιόντων  $Mg^{2+}$ . Ο mag indo 1 παρουσιάζει μετατόπιση στο μέγιστο τόσο της διέγερσης όσο και της εκπομπής.<sup>9</sup>



<u>Σχήμα 10:</u> Δομές των δεικτών mag fura 2 (furaptra), mag fura 5 και mag indo 1.

Μία σειρά δεικτών με μεγαλύτερη συγγένεια για τα ιόντα  $Mg^{2+}$ , περιλαμβάνει τους δείκτες magnesium green και mag fluo 4.



magnesium green

Σχήμα 11: Οι δομές των magnesium green και mag-fluo-4.

Η ανάπτυξη των δεικτών περιγράφεται αναλυτικά σε σχετικά άρθρα ανασκόπησης.<sup>8,9</sup>

# 1.4.<br/>γ Πολυκαρβοξυλικοί φθορίζοντες δείκτες $\mathbf{Zn}^{2+}$

Ο σημαντικός ρόλος των ιόντων ψευδαργύρου σε βιολογικές δομές και λειτουργίες,<sup>20</sup> οδήγησε στη σύνθεση και μελέτη των αντίστοιχων φθοριζόντων δεικτών. Στην υποκατηγορία

των πολυκαρβοξυλικών δεικτών συμπεριλαμβάνεται και ο APTRA-BTC<sup>21</sup> (Σχήμα 12), ένα τροποποιημένο παράγωγο του φθορίζοντα δείκτη ασβεστίου BTC.



Σχήμα 12: Δομή του πολυκαρβοξυλικού δείκτη APTRA-BTC, αναλόγου του δείκτη ασβεστίου BTC.

Ο Fluo Zin-3<sup>22</sup> είναι ένας ακόμα πολυκαρβοξυλικός δείκτης, ο οποίος αποτελεί παράγωγο των δεικτών ασβεστίου Fluo-3 και Fluo-4 κατάλληλα τροποποιημένων ώστε να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τον ψευδάργυρο έναντι του ασβεστίου (K<sub>d</sub>=15±2 nM). Το μήκος κύματος διέγερσης για το σύμπλοκο του δείκτη με τον ψευδάργυρο είναι στα 488 nm. Η δομή του φαίνεται στο Σχήμα 13:



Σχήμα 13: Δομή του τρικαρβοξυλικού δείκτη ψευδαργύρου FluoZin-3.

## 1.4.δ Πολυκαρβο<br/>ξυλικοί φθορίζοντες δείκτες ${\rm Mn}^{2+}$

Η σύνθεση εκλεκτικών για τα ιόντα  $Mn^{2+}$  δεικτών αποτέλεσε πρόκληση για μεγάλο χρονικό διάστημα, δεδομένης της δυσκολίας σύνθεσης συστημάτων συναρμογής τα οποία θα ήταν εκλεκτικά για το συγκεκριμένο ιόν-στόχο. Το 2010 οι Liang και Canary παρουσίασαν μία νέα ένωση η επιλογή και σύνθεση της οποίας βασίστηκε στην ακόλουθη λογική:<sup>23</sup>

Η βελτιστοποίηση της δομής ενός συνθετικού υποδοχέα για ένα υπόστρωμα οδηγεί μεν σε ισχυρή δέσμευση, μπορεί όμως να μην οδηγήσει σε καλή επιλεκτικότητα για συναγωνιστικά υποστρώματα. Στην περίπτωση των συμπλοκοποιητών μεταλλικών ιόντων, η επιλογή του ατόμου δότη στον υποκαταστάτη μπορεί μερικές φορές να αποτελέσει πλεονέκτημα. Για παράδειγμα, επιλέγοντας μαλακό άτομο δότη μπορεί να βελτιωθεί η επιλεκτικότητα για σχετικά μαλακά μεταλλικά ιόντα σε ανταγωνισμό με τα σκληρά. Τόσο το  $Mn^{2+}$  όσο και το  $Ca^{2+}$ , ωστόσο, θεωρούνται γενικά σκληρά ιόντα και δείχνουν μέγιστη σταθερότητα σε σύμπλοκα με σκληρούς δότες οξυγόνου. Έτσι, επιφανειακές εκτιμήσεις θα οδηγούσαν αρχικά μακριά από τη μέθοδο επιλογής σκληρού / μαλακού ατόμου-δότη σαν μια στρατηγική για την επίτευξη επιλεκτικότητας των ιόντων  $Mn^{2+}$ .

Ωστόσο, παρόλο που και τα δύο ιόντα  $Mn^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  ταξινομούνται ως "σκληρά" μέταλλα και ως εκ τούτου σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με δότες οξυγόνου, το  $Mn^{2+}$ φαίνεται να είναι πιο ανεκτικό σε μαλακούς δότες από ότι ο "μαλακότερος" δότης  $Ca^{2+,24}$  Η υπόθεση που έκαναν οι ερευνητές ήταν να αντικαταστήσουν δύο ή περισσότερες καρβοξυλικές ομάδες στο σκελετό του BAPTA με "μαλακούς" υποκαταστάτες. Επειδή το  $Mn^{2+}$  είναι ένα σκληρό κατιόν μετάλλου, θα περίμενε κανείς από μια τέτοια αλλαγή μία ασθενέστερη δέσμευση με το συμπλοκοποιητή. Δεδομένου όμως ότι το  $Ca^{2+}$  είναι ένα ακόμη σκληρότερο κατιόν, η επίδραση της αλλαγής υποκαταστάτη θα πρέπει να είναι περισσότερο έντονη στο  $Ca^{2+}$ , με αποτέλεσμα ακόμη πιο ασθενή δέσμευση με το  $Ca^{2+}$  με συνέπεια μία καθαρή αύξηση της επιλεκτικότητας. Τελικά επιλέχθηκαν δότες άτομα αζώτου από πυριδίνη, η οποία είναι μια κοινή ομάδα υποκαταστατών ιόντων σε σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης και η οποία θεωρείται ότι είναι οριακά μεν, αλλά "μαλακότερη" από υποκαταστάτες με οξυγόνο (Σχήμα 14).



Bis(pyridin-2-ylmethyl)-Probe-2

Bis(pyridin-2-ylmethyl)-Probe-3



Η στρατηγική αυτή η οποία ονομάστηκε από τους ερευνητές ως "selective poisoning" strategy, οδήγησε στις ανωτέρω ενώσεις. Προσθήκη ιόντων στο παράγωγο της <u>φλουορεσκεΐνης</u> τετραπλασιάζει σχεδόν την κβαντική απόδοση φθορισμού του μορίου. Συγκριτικές μελέτες δέσμευσης με ιόντα  $Ca^{2+}$  έδειξαν ότι η ένωση δεσμεύει ιόντα μαγγανίου με πέντε τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη συγγένεια από ότι τα ιόντα ασβεστίου (logK=7.01 και logK=2.96, αντίστοιχα). Το μειονέκτημα το οποίο εντοπίστηκε είναι ότι τα ιόντα  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  και  $Hg^{2+}$  συναγωνίζονται το  $Mn^{2+}$ . Το δίχλωρο-παράγωγο της φλουορεσκεΐνης έδειξε αντίστοιχη εκλεκτικότητα για το  $Mn^{2+}$ . ως προς το  $Ca^{2+}$  (logK=8.00 και logK=3.33, αντίστοιχα) και τετραπλασιασμό της κβαντικής απόδοσης με τη δέσμευση των ιόντων  $Mn^{2+}$ . Και πάλι η ένωση, παρά τη μεγάλη συγγένειά της στα ιόντα μαγγανίου, δεσμεύεται με αρκετά μεγάλη συγγένεια με τη προαναφερθείσα σειρά κατιόντων.

Υπάρχει μόνο μία ακόμη δημοσίευση φθορίζοντα δείκτη με εκλεκτικότητα για τα ιόντα  $Mn^{2+}$  και για το λόγο αυτό θα αναφερθεί παρά το γεγονός ότι η ένωση δεν είναι πολυκαρβοξυλική (Σχήμα 15). Η ένωση «L» μελετήθηκε για την εκλεκτικότητά της αλλά, παρά το γεγονός ότι είναι εκλεκτική για τα ιόντα  $Mn^{2+}$  τα δεδομένα δεν είναι ενθαρρυντικά. Η ένωση μελετήθηκε σε pH 4.2 δεδομένου ότι η ένταση φθορισμού μειώνεται δραστικά σε φυσιολογικές τιμές pH. Οι μελέτες έγιναν σε ακετονιτρίλιο:νερό 1:1 και όχι σε υδατικό περιβάλλον. Η L εμφανίζει φθορισμό με μέγιστο εκπομπής  $\lambda_{max}$ =360 nm με το μέγιστο διέγερσης στα 310 nm. Η ένταση φθορισμού της L αυξάνει εκλεκτικά 3.5 φορές κατά την αλληλεπίδραση με ιόντα  $Mn^{2+}$  σε σύγκριση με σειρά μεταλλικών ιόντων, αλλά τα πειράματα έχουν διεξαχθεί σε συγκεντρώσεις ~0.1 mM.



Σχήμα 15: Δομή της διπυριδίνυλο-ένωσης L, εκλεκτικής για τα ιόντα Mn<sup>2+</sup>.

#### 1.4.ε Τρόποι απόκρισης φθορισμομετρικών δεικτών στην προσθήκη ιόντων

Οι κύριες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διέγερση φθορισμομετρικών δεικτών αποτελούν τη βάση της ακόλουθης κατηγοριοποίησης των δεικτών αυτών.

# 1.4.ε.i Δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίου (photoinduced electron transfer (PET) indicators)

Στους δείκτες αυτής της κατηγορίας (fluorescent PET indicators), τα ετεροάτομα του χηλικού τμήματος του δείκτη δεν συνδέονται συζυγιακά με το σύστημα του χρωμοφόρου. Παρεμβάλλεται δηλαδή μεταξύ ιονοφόρου και χρωμοφόρου τουλάχιστον ένα άτομο, τα τροχιακά του οποίου δεν συμμετέχουν σε συζυγιακό σύστημα.<sup>25,26,27</sup>

Συνέπεια της επιλογής αυτής είναι ότι, στην ελεύθερη μορφή του δείκτη, η φωτοδιέγερση του χρωμοφόρου επάγει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το υψηλότερο κατειλημμένο δεσμικό μοριακό τροχιακό (HOMO), στο χαμηλότερο μη κατειλημμένο αντιδεσμικό μοριακό τροχιακό (LUMO). Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίου από το HOMO του χηλικού μέρους (δότης), στο HOMO του χρωμοφόρου (δέκτης) το οποίο βρίσκεται ενεργειακά χαμηλότερα, με αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού (Σχήμα 16). Μετά τη δέσμευση του κατιόντος, αλλάζει το δυναμικό οξειδοαναγωγής του δότη και το HOMO του γίνεται χαμηλότερο σε ενέργεια από αυτό του δέκτη, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η μεταπήδηση ηλεκτρονίου, οπότε παρατηρείται αύξηση στην ένταση φθορισμού.



Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων στους δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίου.

# 1.4.ε.ii Δείκτες μεταφοράς φορτίου (photoinduced charge transfer (PCT) indicators)

Όταν ένα χρωμοφόρο είναι συζυγιακά συνδεδεμένο με μία ομάδα δότη ηλεκτρονίων, τότε λόγω συντονισμού το HOMO του χρωμοφόρου είναι εξαρχής υψηλότερα ενεργειακά από αυτό του δότη οπότε προκύπτει μια διαφορετική κατηγορία δεικτών, αυτή της μεταφοράς φορτίου (fluorescent PCT indicators).<sup>27,28</sup>

Συγκεκριμένα όταν ένα χρωμοφόρο π.χ. μια κουμαρίνη, εμπεριέχει μια ηλεκτρονιοδοτική ομάδα (στη συγκεκριμένη περίπτωση μία αμινομάδα) η οποία βρίσκεται σε συζυγία με μία ηλεκτρονιοελκτική ομάδα (στη συγκεκριμένη περίπτωση μία καρβονυλομάδα) τότε η φωτοδιέγερση του μορίου προκαλεί ενδομοριακή μεταφορά φορτίου από τον δότη στο δέκτη (Σχήμα 17). Αυτή η μεταφορά φορτίου οδηγεί σε μία μετατόπιση του μεγίστου διέγερσης (μετατόπιση Stokes) η οποία εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του χρωμοφόρου.



Σχήμα 17: Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου.

Όταν ο δότης (αμινομάδα) <u>ανήκει στην ομάδα που αλληλεπιδρά με το κατιόν</u> τότε η ηλεκτρονιοδοτική του ικανότητα ελαττώνεται. Η "μείωση" αυτή του συζυγιακού συστήματος συνεπάγεται μία υψοχρωμική μετατόπιση (blue shift) του φάσματος απορρόφησης και ταυτόχρονα ελάττωση του συντελεστή απορρόφησης. Αντίθετα, <u>όταν το κατιόν αλληλεπιδρά</u> με τον ηλεκτρονιοδέκτη (καρβονυλομάδα) ο ηλεκτρονιοελκτικός χαρακτήρας του αυξάνεται με συνέπεια η μεταφορά φορτίου να γίνεται ισχυρότερη, το φάσμα απορρόφησης να υφίσταται βαθοχρωμική μετατόπιση (red-shift) και ο συντελεστής απορρόφησης να αυξάνεται.

Τα φάσματα εκπομπής ακολουθούν την ίδια κατεύθυνση μετατόπισης με αυτή των φασμάτων απορρόφησης. Όλες οι μεταβολές στο φθορισμομετρικό προφίλ των δεικτών εξαρτώνται από το κατιόν που συναρμόζεται με το δείκτη. Οι φωτοφυσικές αλλαγές που προκαλούνται από την εκάστοτε συναρμογή του κατιόντος είναι δυνατόν να ερμηνευτούν και με τη θεώρηση της αλληλεπίδρασης διπόλουφορτίου (charge dipole interaction). Στην περίπτωση όπου η διπολική ροπή της διεγερμένης κατάστασης του συστήματος είναι μεγαλύτερη από αυτήν της βασικής κατάστασης και το κατιόν αλληλεπιδρά με το δότη, τότε η διεγερμένη κατάσταση αποσταθεροποιείται περισσότερο από τη βασική και συνεπώς εμφανίζει μια μικρή υψοχρωμική μετατόπιση (blue-shift) στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής.

Αντίθετα, εάν το κατιόν αλληλεπιδρά με τον ηλεκτρονιοδέκτη, η διεγερμένη κατάσταση σταθεροποιείται περισσότερο από τη βασική και συνεπώς εμφανίζεται μια βαθοχρωμική (red-shift) μετατόπιση στα αντίστοιχα φάσματα (Σχήμα 18).

Interaction with the donor group



interaction with the acceptor group



Σχήμα 18:. Καταστάσεις αλληλεπίδρασης κατιόντων με δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων.

#### 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των αλλαγών στη δομή του ιονοφόρου φθοριζόντων δεικτών στην εκλεκτικότητά τους ως προς τα συναρμοζόμενα ιόντα. Ως ιονοφόρα τμήματα των δεικτών αυτών επιλέχθηκαν ανάλογα του γνωστού συμπλοκοποιητή ιόντων Ca<sup>2+</sup> EGTA (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) και συγκεκριμένα το "δι-υποκατεστημένο" παράγωγο EGDA, (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N',-diacetic acid) και το "τρι-υποκατεστημένο" παράγωγο EGTRA, (ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N',-triacetic acid).<sup>29</sup> Ως χρωμοφόρα προτείνονται η κουμαρίνη και τα 6-μεθυλο-, 8-μεθοξυ- και 7-διαιθυλαμινο-ανάλογά της.<sup>30</sup>

Η επιλογή των ιονοφόρων βασίζεται στη θεωρία ότι, όταν οι "σκληροί" υποκαταστάτες των ιονοφόρων αντικαθίσταται από "μαλακούς", θα επηρεαστεί αντίστοιχα και η επιλεκτικότητα του δείκτη ως προς τα συναρμοζόμενα ιόντα. Η προσέγγιση αυτή είναι γνωστή ως "selective poisoning" strategy. Αναμένεται ότι οι μεταβολές στο χηλικό τμήμα του μορίου θα οδηγήσουν σε αλλαγές στην εκλεκτικότητα των αισθητήρων προς τα υπό μελέτη ιόντα ενώ ο τρόπος συναρμογής των ιόντων με τους δείκτες θα επηρεάσει τη φθορισμομετρική τους συμπεριφορά.

#### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύνθεση των δεικτών **5** και **7** παρουσιάζεται στο Σχήμα 19. Αντίδραση της 2-[2-(2αμινοαιθοξυ)αιθοξυ]-1-αιθαναμίνης με βρωμοοξικό μεθυλεστέρα<sup>31</sup> έδωσε τον διμεθυλεστέρα EGDA και τον τριμεθυλεστέρα EGTRA σε ίσες ποσότητες μαζί με 5% του παραπροϊόντος του τετραμεθυλεστέρα EGTA. Οι δύο πρώτοι εστέρες αντέδρασαν με τα ακυλο χλωρίδια **3**(**ad**) δίνοντας τα αντίστοιχα μόνο- και δι- κουμαρινικά ανάλογα **4**(**a**-**d**) και **6**(**a**-**d**).

Αποπροστασία των μεθυλεστέρων με 5M KOH σε MeOH,<sup>23</sup> έδωσε τα επιθυμητά προϊόντα 5(a-d) και 7(a-d).



Σχήμα 19: Σύνθεση των τρι- και δι- καρβοξυλικών δεικτών 5(a-d) και 7(a-d).
Η σύνθεση των κουμαρινικών οξέων **9(a-c)** πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης των κατάλληλα υποκατεστημένων σαλικυλαλδεϋδών **8(a-c)** με μηλονικό οξύ παρουσία του όξινου καταλύτη Montmorillonite KSF (Σχήμα 20).<sup>32</sup> Το 7-διαιθυλαμινο παράγωγο **9d** παρασκευάστηκε μέσω της αντίδρασης της 4-διαιθυλαμινο σαλικυλαλδεύδης (**8d**) με μηλονικό διμεθυλεστέρα παρουσία πιπεριδίνης σε μεθανόλη.<sup>33</sup> Ο μεθυλεστέρας **9d-Me** υδρολύθηκε υπό βασικές συνθήκες (NaOH) σε διάλυμα 50% MeOH / H<sub>2</sub>O δίνοντας το ελεύθερο οξύ **9d** μετά από οξίνιση με HCl 3N. Κατεργασία των οξέων **9(a-d)** με θειονυλο χλωρίδιο<sup>34</sup> έδωσε τα επιθυμητά παράγωγα **3(a-d)**.



Σχήμα 20: Σύνθεση των ακυλο χλωριδίων 3(a-d).

#### 3.1. Δομή των μονοκουμαρινικών 4(a-d) και δικουμαρινικών 6(a-d) αναλόγων: Μελέτες NMR

Ένα από τα απρόβλεπτα προβλήματα τα οποία εμφανίστηκαν κατά τη σύνθεση των μονοκαι δι- κουμαρινικών αναλόγων είναι αυτό το οποίο εμφανίστηκε κατά την ερμηνεία των φασμάτων NMR των ενδιάμεσων ενώσεων 4(a-d) και 6(a-d). Το φάσμα άνθρακα των μονοκουμαρινικών αναλόγων 4(a-d), λόγω της ασυμμετρίας της ένωσης αναμένεται να εμφανίσει τέσσερις διαφορετικούς συντονισμούς για τους άνθρακες των μεθυλενίων τα οποία γειτνιάζουν με τα άτομα του οξυγόνου. Αντ΄ αυτού, εμφανίστηκαν οκτώ σήματα με παραπλήσιες χημικές μετατοπίσεις ανά δύο και με προφανή διαφορά έντασης. Τα δεδομένα αυτά εμφανίστηκαν και για τα τέσσερα μονοκουμαρινικά ανάλογα. Τα δεδομένα οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι υπήρχαν δύο διαφορετικά ισομερή τα οποία εμφάνιζαν διαφορετικούς συντονισμούς. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα των δικουμαρινικών παραγώγων 6(a-d). Στην περίπτωση αυτή η συμμετρία των μορίων υπαγόρευε την εμφάνιση δύο διαφορετικών σημάτων για τους τέσσερις αντίστοιχους άνθρακες. Σε αναλογία με τα προηγούμενα δεδομένα, αντί των δύο σημάτων εμφανίστηκαν τέσσερα, με παραπλήσιες χημικές μετατοπίσεις ανά δύο και με προφανή διαφορά έντασης. Σε μία προσπάθεια ερμηνείας του φαινομένου, έγινε τιτλοδότηση διαλύματος της ένωσης 4a με ιόντα μαγνησίου. Στην Εικόνα 1 εμφανίζεται η βαθμιαία αλλαγή έντασης των κορυφών των ανθράκων των μεθυλενίων οι οποίες, παρουσία περίσσειας ιόντων μαγνησίου μειώνονται σε τέσσερις. Αν αυτό ισχύει, τότε υπάρχουν τουλάχιστον δύο στερεοϊσομερείς δομές του αμιδικού δεσμού οι οποίες θα οδηγούν και στο σχηματισμό δύο ισομερών της 4a. Είναι προφανές ότι οι δομικές αυτές διαφορές θα μεταφράζονται και σε διαφορές στις τιμές συντονισμών των ανθράκων και υδρογόνων των ισομερών. Το πείραμα της τιτλοδότησης της 4a με ιόντα μαγνησίου δείχνει ότι η ηλεκτρονιακή αλληλεπίδραση του οξόφιλου μαγνησίου με τα άτομα οξυγόνου του δείκτη είναι τόσο ισχυρή ώστε τέτοιες μικρές διαφορές γημικών μετατοπίσεων εκλείπουν παρουσία περίσσειας ιόντων.



<u>Εικόνα 1</u>: Εμφανίζεται το φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης **4a** ενώ στο ένθετο η διαφοροποίηση στην πολλαπλότητα των ατόμων C της περιοχής 70.0-70.4 ppm στην ελεύθερη και στην με  $Mg^{2+}$  δεσμευμένη μορφή της ένωσης **4a**, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης  $Mg^{2+}$ .

Μία πιθανή ερμηνεία του φαινομένου μπορεί να προέλθει από τη μελέτη του θεωρητικού μοντέλου π.χ. της **7a**. Η δομή ενεργειακού ελάχιστου υποδεικνύει απόσταση C-N του αμιδικού δεσμού ίση προς 1.36 Å, υποδεικνύοντας δομή διπλού μάλλον παρά απλού δεσμού μεταξύ των δύο ατόμων (Εικόνα 2).<sup>35</sup>



Εικόνα 2: Mol files της ένωσης 7a σε παρουσίαση wireframe (αριστερά) και Ball and Stick (δεξιά) όπου διακρίνεται ο αμιδικός δεσμός μήκους 1.36 Å.

Τα αποτελέσματα του ίδιου πειράματος αλλά με καταγραφή των φασμάτων πρωτονίου έδωσαν ένα ακόμα ενδιαφέρον αποτέλεσμα. Χρησιμοποιώντας ως μέτρο μετατόπισης τα σήματα του βινυλικού πρωτονίου της κουμαρίνης, παρατηρήσαμε ότι υπήρξε μεν αλλαγή της χημικής μετατόπισης των δύο σημάτων αλλά τελικά δεν υπήρξε ταύτιση των σημάτων αυτών παρουσία περίσσειας ιόντων μαγνησίου.



Εικόνα 3: Εμφανίζεται το φάσμα <sup>1</sup>Η NMR της ένωσης 4a ενώ στο ένθετο παρουσιάζεται η διαφοροποίηση της έντασης του βινυλικού Η στην ελεύθερη και στην με Mg<sup>2+</sup> δεσμευμένη μορφή της ένωσης 4a, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης Mg<sup>2+</sup>.

Μία πιθανή ερμηνεία του φαινομένου θα ήταν η εξής: εάν υποτεθεί ότι το μαγνήσιο σχηματίζει εξαδοντικό σύμπλοκο με την ένωση **4a** (παρόμοιο με αυτό που σχηματίζει με το EDTA) τότε τα οξυγόνα της ευθείας αλυσίδας θα συναρμόζονται με το ιόν αλλά τα βυνιλικά πρωτόνια θα βρίσκονται σε απόσταση τριών δεσμών από το πλησιέστερο πιθανό σημείο συναρμογής (Σχήμα 21). Συνεπώς η επίδραση της συναρμογής του οξόφιλου μαγνησίου με τα οξυγόνα της **4a** θα είναι ισχυρότερη για τους γειτονικούς άνθρακες παρά για το απομακρυσμένο βινυλικό πρωτόνιο.



Σχήμα 21: Αναπαράσταση της πιθανής συναρμογής των ιόντων μαγνησίου με το ιονοφόρο της 4a.

## 4. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

'Ολοι οι δείκτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές και έχει μελετηθεί πλήρως το φθορισμομετρικό τους προφίλ.

Για τις μετρήσεις φθορισμού τα διαλύματα όλων των δεικτών παρασκευάστηκαν προσθέτοντας 3μl διαλύματος δείκτη σε υπερκαθαρό νερό συγκέντρωσης  $10^{-2}$  M σε 3ml υπερκαθαρό νερό, δίνοντας διαλύματα τελικής συγκέντρωσης  $10^{-5}$  M (10 μM). Για κάθε δείκτη πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού χρησιμοποιώντας 15 διαφορετικά ιόντα μετάλλων (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> και Pb<sup>2+</sup>).

Πιο συγκεκριμένα, ο δείκτης **5a** εμφανίζει για την πλειοψηφία των ιόντων "turn-on" απόκριση, δηλαδή η αυξανόμενη συγκέντρωση των ιόντων συνεπάγεται αύξηση της σχετικής έντασης φθορισμού. Η απόκριση είναι διακριτή για τα ιόντα Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> και Pb<sup>2+</sup>, μέτρια για τα Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> και αμελητέα για τα Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> και Ni<sup>2+</sup>. Εξαίρεση αποτελούν τα ιόντα K<sup>+</sup> και Fe<sup>2+</sup> για τα οποία εμφανίζει αμελητέα "turn-off" απόκριση. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι λ<sub>em</sub>: 420 nm και λ<sub>exc</sub>: 330 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές K<sub>d</sub>: K<sub>d(Al)</sub>= 842 μM, K<sub>d(Pb)</sub>= 123 μM και K<sub>d(Hg)</sub>= 5.93 μM.



*Εικόνα 4:* Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **5a** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> Μ παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Al<sup>3+</sup>.

Ο δείκτης **5b** εμφανίζει επίσης για την πλειοψηφία των ιόντων "turn-on" απόκριση. Η απόκριση είναι διακριτή για τα ιόντα  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  και  $Pb^{2+}$ , μέτρια για το  $Cu^{2+}$  και αμελητέα για τα  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  και  $Ni^{2+}$ . Επίσης, εμφανίζει "turn-off" απόκριση μέτριας έντασης για τα ιόντα  $Co^{2+}$  και αμελητέας για τα  $K^+$  και  $Fe^{2+}$ . Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 428 nm και  $\lambda_{exc}$ : 340 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές  $K_d$ :  $K_{d(Al)}$ = 150 μM,  $K_{d(Cd)}$ = 60.30 μM,  $K_{d(Pb)}$ = 20.80 μM και  $K_{d(Hg)}$ = 6.78 μM.



*Εικόνα 5:* Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **5b** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> M παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Hg<sup>2+</sup>.

Ο δείκτης **5c** συμπεριφέρεται διαφορετικά ανά ομάδες ιόντων: εμφανίζει "turn-on" απόκριση διακριτή για το  $Pb^{2+}$  και αμελητέα για τα  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  και  $Zn^{2+}$ . Επίσης, εμφανίζει "turn-off" απόκριση μέτριας έντασης για τα ιόντα  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  και αμελητέας για τα  $Co^{2+}$ ,  $K^+$  και  $Na^+$ . Τέλος, ο δείκτης συμπεριφέρεται ως ratiometric μέτριας έντασης για τα ιόντα  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  και αμελητέας για το  $Ni^{2+}$ . Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 480 nm και  $\lambda_{exc}$ : 310 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές  $K_d$ :  $K_{d(Pb)}$ = 70.80 μM και  $K_{d(Hg)}$ = 1.29 μM.



<u>Εικόνα 6:</u> Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **5c** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> Μ παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Pb<sup>2+</sup>.

Ο τελευταίος μονοκουμαρινικός δείκτης **5d** εμφανίζει "*turn-off*" απόκριση για το σύνολο των υπό εξέταση ιόντων. Η ένταση της απόκρισης είναι διακριτή για την πλειοψηφία των ιόντων, εκτός από τα ιόντα  $Mn^{2+}$  και  $Cd^{2+}$  που είναι μέτριας έντασης, και των  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  που εμφανίζουν αμελητέα ένταση. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 475 nm και  $\lambda_{exc}$ : 413 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές  $K_d$ :  $K_{d(Cu)}$ = 217 μM,  $K_{d(Al)}$ = 75.20 μM,  $K_{d(Hg)}$ = 9.95 μM,  $K_{d(Co)}$ = 7.16 μM και  $K_{d(Fe}^{3+}$ )= 2.32 μM.



<u>Εικόνα 7:</u> Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **5d** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> Μ παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Cu<sup>2+</sup>.

Όσο αφορά τα δικουμαρινικά παράγωγα, ο δείκτης **7a** εμφανίζει "turn-on" απόκριση διακριτής έντασης για τα ιόντα  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  και  $Pb^{2+}$ , μέτριας για το  $Cd^{2+}$  και αμελητέας για τα ιόντα  $Co^{2+}$ . Η απόκριση του δείκτη είναι "turn-off" διακριτής έντασης για τα ιόντα  $Fe^{3+}$ , μέτριας για τα ιόντα  $K^+$  και  $Ni^{2+}$  και αμελητέας για τα  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  και  $Mn^{2+}$ . Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 410 nm και  $\lambda_{exc}$ : 335 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές  $K_d$ :  $K_{d(Al)}$ =0.94 mM,  $K_{d(Pb)}$ = 0.28 mM,  $K_{d(Cu)}$ = 0.20 mM και  $K_{d(Hg)}$ = 0.11 mM.



<u>Εικόνα 8:</u> Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **7a** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> M παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Al<sup>3+</sup>.

Ομοίως, ο δείκτης **7b** εμφανίζει "turn-on" απόκριση για την πλειοψηφία των ιόντων, διακριτής έντασης για τα ιόντα  $Al^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  και  $Pb^{2+}$ , μέτριας για τα  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  και αμελητέας για τα ιόντα  $Mg^{2+}$  και  $Co^{2+}$ . Επίσης, ο δείκτης εμφανίζει αμελητέα απόκριση για τα ιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  και  $Fe^{2+}$ . Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 428 nm και  $\lambda_{exc}$ : 339 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές  $K_d$ :  $K_{d(Al)}$ = 2.45 mM,  $K_{d(Fe}^{3+})$ = 21.30 μM,  $K_{d(Hg)}$ = 6.90 μM και  $K_{d(Pb)}$ = 5.57 μM.



*Εικόνα 9:* Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **7b** συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> M παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Fe<sup>3+</sup>.

Ο δείκτης **7c** εμφανίζει "turn-on" απόκριση διακριτής έντασης για τα ιόντα  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  και Pb<sup>2+</sup>, μέτριας για τα Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> και αμελητέας για όλα τα υπόλοιπα εκτός του Fe<sup>3+</sup> στο οποίο εμφανίζει ratiometric συμπεριφορά μέτριας έντασης. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι  $\lambda_{em}$ : 487 nm και  $\lambda_{exc}$ : 311 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές K<sub>d</sub>: K<sub>d(Pb)</sub>= 0.30 mM, K<sub>d(Cu)</sub>= 0.13 mM και K<sub>d(Hg)</sub>= 0.12 mM.



<u>Εικόνα 10:</u> Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **7c** συγκέντρωσης  $10^{-5}$  M παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Hg<sup>2+</sup>.

Ο τελευταίος δικουμαρινικός δείκτης **7d** εμφανίζει "*turn-off*" απόκριση για την πλειοψηφία των υπό εξέταση ιόντων. Η ένταση της απόκρισης είναι διακριτή για τα ιόντα Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> και Zn<sup>2+</sup>, μέτριας για τα Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> και Cd<sup>2+</sup> και αμελητέας για τα K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> και Mg<sup>2+</sup>. Εξαίρεση αποτελεί η διακριτής έντασης *ratiometric* συμπεριφορά για το Al<sup>3+</sup> και η μέτριας έντασης "*turn-on*" συμπεριφορά για τα ιόντα Hg<sup>2+</sup> και Pb<sup>2+</sup>. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι λ<sub>em</sub>: 475 nm και λ<sub>exc</sub>: 413 nm, αντίστοιχα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθες τιμές K<sub>d</sub>: K<sub>d(Co)</sub>= 73.80 μM, K<sub>d(Ni)</sub>= 27.30 μM, K<sub>d(Fe</sub><sup>3+</sup>)= 22.80 μM και K<sub>d(Cu)</sub>= 6.61 μM.



<u>Εικόνα 11:</u> Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7d συγκέντρωσης  $10^{-5}$  M παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιόντων Fe<sup>3+</sup>.

Συγκεντρωτικά, όπως αναφέρονται στη συζήτηση των αποτελεσμάτων, τα φασματοσκοπικά δεδομένα και των 8 δεικτών παρατίθενται στους ακόλουθους πίνακες:

Δείκτης 5a											
Ιόν	Τύπος απόκρισης Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 330 nm)			Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης			
				Екло	μπή (λ <sub>em:</sub> 42	20 nm)	Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		$\checkmark$									
Na <sup>+</sup>											
Mg <sup>2+</sup>											
Al <sup>3+</sup>											
Ca <sup>2+</sup>											
Mn <sup>2+</sup>											
Fe <sup>3+</sup>											
Co <sup>2+</sup>	$\checkmark$					420/470					
Fe <sup>2+</sup>		$\checkmark$									
Ni <sup>2+</sup>						420/485					
Cu <sup>2+</sup>						420/470					
Zn <sup>2+</sup>				$\checkmark$							
Cd <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Hg <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Pb <sup>2+</sup>	V			V							

Δείκτης 5b											
Ιόν	Τύπος απόκρισης Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 340 nm)			Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης			
				Εκπο	μπή (λ <sub>em:</sub> 42	8 nm)	Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		$\checkmark$									
Na <sup>+</sup>	V			V							
Mg <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Al <sup>3+</sup>	$\checkmark$						$\checkmark$				
Ca <sup>2+</sup>	V			V					√		
Mn <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Fe <sup>3+</sup>	*			*			1				
Co <sup>2+</sup>		$\checkmark$									
Fe <sup>2+</sup>		V									
Ni <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Cu <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$				$\checkmark$			
Zn <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$			$\checkmark$				
Cd <sup>2+</sup>	V			$\checkmark$			1		<u> </u>		
Hg <sup>2+</sup>	V			$\checkmark$			1		<u> </u>		
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$						$\checkmark$				

\*Μη χαρακτηριζόμενη συμπεριφορά: πτώση φθορισμού για [Fe  $^{3+}$ ]  $> 11.5 x 10^{-4}$  M, με μετατόπιση  $\lambda_{max}$  340—360 nm - Μηδενική μεταβολή

Δείκτης 5c											
Ιόν	Τύπ	ιος απόκρια	σης	Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης			
	Διέγερση (λ <sub>exc:</sub> 310 nm)			Εκπομπή (λ <sub>em:</sub> 480 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		$\checkmark$							$\checkmark$		
Na <sup>+</sup>		V							V		
Mg <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$					$\checkmark$		
Al <sup>3+</sup>	$\checkmark$										
Ca <sup>2+</sup>											
Mn <sup>2+</sup>			*			*					
Fe <sup>3+</sup>			310/400			400/490		V			
Co <sup>2+</sup>						400/490					
Fe <sup>2+</sup>		V									
Ni <sup>2+</sup>			310/345			410/480					
Cu <sup>2+</sup>		$\checkmark$									
Zn <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Cd <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Hg <sup>2+</sup>			310/350			410/490					
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$							

\*Εμφάνιση ισοσβεστικών σημείων στα 305 κ 478 nm αντίστοιχα, χωρίς διακριτή διαφοροποίηση απόκρισης

Δείκτης 5d												
Ιόν	Τύπος απόκρισης			Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης				
	Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 413 nm)			Εκπομπή (λ <sub>em</sub> : 475 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα			
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric						
K <sup>+</sup>		V			$\checkmark$							
Na <sup>+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$							
Mg <sup>2+</sup>		V			$\checkmark$							
Al <sup>3+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$		$\checkmark$					
Ca <sup>2+</sup>		$\checkmark$										
Mn <sup>2+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$							
Fe <sup>3+</sup>		$\checkmark$					$\checkmark$					
Co <sup>2+</sup>		$\checkmark$					$\checkmark$					
Fe <sup>2+</sup>		V					$\checkmark$					
Ni <sup>2+</sup>		V					$\checkmark$					
Cu <sup>2+</sup>		V										
Zn <sup>2+</sup>							$\checkmark$					
Cd <sup>2+</sup>		V										
Hg <sup>2+</sup>							$\checkmark$		<u> </u>			
Pb <sup>2+</sup>		$\checkmark$					$\checkmark$					

Δείκτης 7a											
Ιόν	Τύπ	ος απόκρια	σης	Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης			
	Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 335nm)			Εκπομπή (λ <sub>em</sub> : 410 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		V			$\checkmark$			$\checkmark$			
Na <sup>+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$						
Mg <sup>2+</sup>		$\checkmark$									
Al <sup>3+</sup>							$\checkmark$				
Ca <sup>2+</sup>											
Mn <sup>2+</sup>											
Fe <sup>3+</sup>		V					$\checkmark$				
Co <sup>2+</sup>				V					ν		
Fe <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ni <sup>2+</sup>		V			$\checkmark$						
Cu <sup>2+</sup>							$\checkmark$				
Zn <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Cd <sup>2+</sup>											
Hg <sup>2+</sup>											
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$										

Μηδενική μεταβολή

Δείκτης 7b											
Ιόν	Τύπος απόκρισης			Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης			
	Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 339 nm)			Εκπομπή (λ <sub>em</sub> : 428 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		V			$\checkmark$						
Na <sup>+</sup>											
Mg <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$							
Al <sup>3+</sup>	$\checkmark$						$\checkmark$				
Ca <sup>2+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$						
Mn <sup>2+</sup>					$\checkmark$						
Fe <sup>3+</sup>			340/375			*	$\checkmark$				
Co <sup>2+</sup>	V								1		
Fe <sup>2+</sup>		V			$\checkmark$				1		
Ni <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$							
Cu <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$							
Zn <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$							
Cd <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Hg <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$										

\*Μετατόπιση  $\lambda_{max}$ χωρίς διακριτό ισοσβεστικό σημείο

Δείκτης 7c												
Ιόν	Τύπος απόκρισης			Τύ	Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης				
	Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 311 nm)			Εκπομπή (λ <sub>em</sub> : 487 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα			
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric						
K <sup>+</sup>												
Na <sup>+</sup>	V											
Mg <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Al <sup>3+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Ca <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Mn <sup>2+</sup>	$\checkmark$											
Fe <sup>3+</sup>		*				400/487						
Co <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Fe <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Ni <sup>2+</sup>	$\checkmark$			$\checkmark$								
Cu <sup>2+</sup>	$\checkmark$											
Zn <sup>2+</sup>	$\checkmark$											
Cd <sup>2+</sup>	$\checkmark$											
Hg <sup>2+</sup>	$\checkmark$											
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$						$\checkmark$					

\*Μετατόπιση  $\lambda_{max}$ χωρίς διακριτό ισοσβεστικό σημείο

Δείκτης 7d											
Ιόν	Τύπος απόκρισης			Τύπος απόκρισης			Ένταση Απόκρισης				
	Διέγερση (λ <sub>exc</sub> : 413 nm)			Εκπομπή (λ <sub>em</sub> : 475 nm)			Διακριτή	Μέτρια	Αμελητέα		
	Turn on	Turn-off	Ratio metric	Turn on	Turn-off	Ratio metric					
K <sup>+</sup>		V									
Na <sup>+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$						
Mg <sup>2+</sup>		$\checkmark$									
Al <sup>3+</sup>			413/432				$\checkmark$				
Ca <sup>2+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$						
Mn <sup>2+</sup>		$\checkmark$			$\checkmark$						
Fe <sup>3+</sup>		V					$\checkmark$				
Co <sup>2+</sup>		V					$\checkmark$				
Fe <sup>2+</sup>		V									
Ni <sup>2+</sup>		V									
Cu <sup>2+</sup>											
Zn <sup>2+</sup>											
Cd <sup>2+</sup>					$\checkmark$						
Hg <sup>2+</sup>	$\checkmark$										
Pb <sup>2+</sup>	$\checkmark$										

## 4.1 Συμπεράσματα

Παρά το γεγονός ότι οι αποκρίσεις των δεικτών στην παρουσία κατιόντων εμφανίζουν ένα διαφοροποιημένο προφίλ κατά περίπτωση, είναι δυνατόν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα και να δοθούν ερμηνείες στα εκάστοτε φαινόμενα.

Ο δείκτης **5a** εμφανίζει, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης κατιόντων, απόκριση τύπου *turn on*. Προσεκτική μελέτη των φασμάτων δείχνει ότι η *turn off* απόκριση του δείκτη για τα ιόντα  $K^+$  και  $Fe^{2+}$  είναι αμελητέα σε σημείο που η απόκριση αυτή να βρίσκεται στα όρια ενός στατιστικού σφάλματος. Ο τύπος της απόκρισης *turn on* δείχνει ότι υπερισχύει ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίου (photoinduced electron transfer) από το χρωμοφόρο στο ιονοφόρο.

Ο δικουμαρινικός δείκτης **7a** εμφανίζει, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης κατιόντων, παρόμοιο προφίλ. Τα ιόντα που προκαλούν απόκριση τύπου *turn on* έχουν διακριτές αποκρίσεις (Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> και Pb<sup>2+</sup>) ενώ τα ιόντα που προκαλούν απόκριση *turn off* έχουν αμελητέα ή μηδενική απόκριση φθορισμού. Προσεκτική μελέτη των φασμάτων δείχνει ότι η *turn off* απόκριση του δείκτη **7a** για τα ιόντα Fe<sup>3+</sup> μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής: για το εύρος συγκεντρώσεων  $0.5 \times 10^{-5}$  έως  $6.5 \times 10^{-5}$  η συμπεριφορά του δείκτη είναι *turn on* αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλείται σταδιακή απόσβεση (quenching) ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται συχνά στα ιόντα Fe<sup>3+</sup>.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η 6-μεθυλο-υποκατάσταση στον κουμαρινικό βενζολικό δακτύλιο έχει μικρή επίδραση στο συζυγιακό σύστημα των κουμαρινών και συνεπώς αμελητέα διαφοροποίηση στην απόκριση των δεικτών **5b** και **7b** παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων κατιόντων.

Ο δείκτης **5b** συνεπώς εμφανίζει, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης κατιόντων, απόκριση τύπου *turn on*. Και στην περίπτωση αυτή, η *turn off* απόκριση του δείκτη για τα ιόντα K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> και Fe<sup>2+</sup> είναι αμελητέα σε σημείο που η απόκριση αυτή να βρίσκεται στα όρια ενός στατιστικού σφάλματος. Ο τύπος της απόκρισης (*turn on*) δείχνει ότι υπερισχύει ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίου (photoinduced electron transfer) από το χρωμοφόρο στο ιονοφόρο. Και πάλι εξαίρεση στον κανόνα αποτελεί η *turn off* απόκριση του δείκτη **5b** για τα ιόντα Fe<sup>3+</sup> όπου για το εύρος συγκεντρώσεων 0.0 (*Free*) έως 11.5x10<sup>-5</sup> η συμπεριφορά του δείκτη είναι *turn on* αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλείται σταδιακή απόσβεση (quenching) με ταυτόχρονη μετατόπιση του λmax exc. προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shifting).

Ο δικουμαρινικός δείκτης **7b** εμφανίζει, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης κατιόντων, αντίστοιχο προφίλ με τον **7a**. Τα ιόντα που προκαλούν απόκριση τύπου *turn on* έχουν διακριτές αποκρίσεις (Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> και Pb<sup>2+</sup>) ενώ τα ιόντα που προκαλούν απόκριση *turn off* έχουν αμελητέα ή μηδενική απόκριση φθορισμού. Η συμπεριφορά του φάσματος διέγερσης του δείκτη για τα ιόντα Fe<sup>3+</sup> είναι *ratiometric* (339 / 375 nm), χωρίς όμως να εμφανίζει διακριτό ισοσβεστικό σημείο. Όπως αναμένεται με διέγερση στα 339 nm, το φάσμα εκπομπής θα εμφανίζει *πτώση* της έντασης φθορισμού αυξανόμενης της συγκέντρωσης των κατιόντων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι 8-μεθόξυ-υποκατεστημένοι κουμαρινικοί δείκτες 5c και 7c: Ο μονοκουμαρινικός δείκτης 5c ακολουθεί σε γενικές γραμμές τη συμπεριφορά των αναλόγων του, δηλαδή των 5a και 5b οι οποίοι εμφανίζουν διακριτή turn on απόκριση και αμελητέας έντασης turn off απόκριση. Το ιδιαίτερο στην περίπτωση του 5c είναι ότι ένας αριθμός κατιόντων ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  και  $Hg^{2+}$ ) εμφανίζει απόκριση τύπου ratiometric με διακριτά ισοσβεστικά σημεία στα φάσματα διέγερσης ή/και εκπομπής. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να ερμηνευτεί με την υπόθεση ότι η μεθόξυ-ομάδα εμπλουτίζει τον κουμαρινικό δακτύλιο ηλεκτρονιακά τόσο, ώστε στη διεγερμένη κατάσταση να σχηματίζεται ισχυρό αρνητικό φορτίο. Η συναρμογή του ανιόντος με το κατιόν σταθεροποιεί το σύμπλοκο και κατά συνέπεια επικρατεί ο μηγανισμός PCT (photoinduced charge transfer) και η απόκριση μετατρέπεται από turn on σε ratiometric. Προς έκπληξή μας η συμπεριφορά του δικουμαρινικού 7c δεν ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά: η απόκρισή του στα περισσότερα ιόντα είναι turn on με αμελητέα αλλαγή έντασης με εξαίρεση τα οξόφιλα  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  και  $Pb^{2+}$  που εμφανίζουν μέτρια ή διακριτή απόκριση. Μια πιθανή ερμηνεία του φαινομένου είναι ότι η παρουσία και του δεύτερου δακτυλίου δημιουργεί στερεογημική παρεμπόδιση στην ισχυρή συναρμογή των ιόντων με τις κουμαρινικές ομάδες.

Ένα άξιο προσοχής γεγονός είναι η πανομοιότυπη συμπεριφορά των δεικτών τύπου (d) δηλαδή των 7-διαιθυλάμινο παραγώγων: η απόκριση των 5d και 7d σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιόντων είναι η μείωση της έντασης φθορισμού. Το μάλλον παράδοξο αυτό φαινόμενο ίσως μπορεί να εξηγηθεί με τον ακόλουθο τρόπο:

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (βλέπε Σχήμα 17, εδάφιο 1.4.ε.ii) ότι οι 7-αμινο κουμαρίνες κατά τη διέγερση υφίστανται μεταφορά φορτίου, με το αρνητικό φορτίο να

τοποθετείται στο οξυγόνο του καρβονυλίου. Ως γνωστό, η συγκεκριμένη συμπεριφορά του χρωμοφόρου οδηγεί σε μετατόπιση του μεγίστου διέγερσης ή/και εκπομπής ακτινοβολίας. Δεδομένου δε ότι το συγκεκριμένο άτομο οξυγόνου αποτελεί και σημείο συναρμογής με το υπό μελέτη κατιόν, οδηγεί σε **σταθεροποίηση** του συστήματος και με απλούστερους όρους ερμηνείας, το μέγιστο υφίσταται μετατόπιση προς το ερυθρό. Το φάσμα αναμένεται να εμφανίζει ισοσβεστικό σημείο και ο δείκτης θεωρείται ratiometric.



Στην περίπτωση του δείκτη 5d, η συναρμογή ιόντων αργιλίου έχει ως αποτέλεσμα το ακόλουθο φασματικό προφίλ:



Θα μπορούσε κανείς να ερμηνεύσει το φάσμα ως εξής: το ισοσβεστικό σημείο στα 450 nm αποτελεί το σημείο που χαρακτηρίζει τη μετάβαση από την ελεύθερη στη δεσμευμένη με ιόντα Al<sup>3+</sup> μορφή του δείκτη και συνεπώς το φάσμα της δεσμευμένης του μορφής θα επεκτείνεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Συνεπώς οι φασματικές γραμμές μεταξύ 320 και 450 nm αποτελούν το φάσμα της ελεύθερης μορφής του δείκτη, η οποία με την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al<sup>3+</sup> μειώνεται, άρα θα μειώνεται και η έντασή της.

Μετά την εκτίμηση της απόκρισης των δεικτών 5(a-d) και 7(a-d) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατιόντων και τον υπολογισμό των σταθερών διάστασής τους  $(K_d)$ , μελετήθηκε η πιθανή εκλεκτικότητα των δεικτών σε συγκεκριμένα ιόντα.

Πραγματοποιήθηκε μία σειρά μελετών ανταγωνισμού (Competition Studies) με τα εξής κριτήρια:

- Ως υπό μελέτη ιόν επιλέχθηκε, για κάθε δείκτη, αυτό το οποίο είχε την πιο διακριτή απόκριση στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση.
- Όλα τα ανταγωνιζόμενα ιόντα μελετήθηκαν στη συγκέντρωση στην οποία το ιόν αναφοράς έδωσε τη μεγαλύτερη δυνατή απόκριση.
- Ως μεγαλύτερη δυνατή συγκέντρωση ορίζεται η συγκέντρωση πάνω από την οποία ο δείκτης είτε δίνει την ίδια απόκριση (Plateau) είτε εμφανίζεται απότομη μείωση λόγω απόσβεσης φθορισμού (Quenching).
- 4. Οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δεικτών ήταν 10 μΜ.

Για τον δείκτη **5a** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν Pb<sup>2+</sup> στο οποίο ο δείκτης είχε την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 1**.



Γράφημα 1. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 5a.

Στον άξονα των τεταγμένων εμφανίζεται ο λόγος ( $F_{ion} - F_{free}$ ) /  $F_{free}$  όπου ως  $F_{ion}$ ορίζεται η ένταση του φθορισμού που προκαλείται από την προσθήκη στο σύστημα ενός ιόντος και σαν  $F_{free}$  ορίζεται η ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη πριν την προσθήκη οποιουδήποτε ιόντος. Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{free} =$  $F_{ion}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: εφ' όσον ο δείκτης είναι *turn on* θα σημειωθεί *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-At<sup>3+</sup>* προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνίζόμενων ιόντων Pb<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων καδμίου κ.ο.κ.

Για το δείκτη **5b** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε πάλι το ιόν  $Pb^{2+}$  στο οποίο ο δείκτης είχε την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 2**.



Γράφημα 2. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 5b.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο (F<sub>free =</sub> F<sub>ion).</sub> Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: ο δείκτης είναι *turn on* οπότε σημειώθηκε (μικρή) *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή

αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα δείκτη-Al<sup>3+</sup> προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Pb<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων χαλκού κ.ο.κ.

Για το δείκτη **5c** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν  $Pb^{2+}$  στο οποίο ο δείκτης είχε πάλι την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 3**.



Γράφημα 3. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 5c.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{free} = F_{ion}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: ο δείκτης είναι *turn on* οπότε σημειώθηκε *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-Al*<sup>3+</sup> προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Pb<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων καδμίου κ.ο.κ.

Για το δείκτη **5d** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν Cu<sup>2+</sup> στο οποίο ο δείκτης είχε την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 240 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 4**.



Γράφημα 4. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 5d.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{free} = F_{ion}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων χαλκού στο διάλυμα του δείκτη: στην περίπτωση αυτή, ο δείκτης είναι <u>turn off</u> οπότε σημειώθηκε μείωση της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-Al*<sup>3+</sup> προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Cu<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων κοβαλτίου κ.ο.κ.

Για το δείκτη **7a** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν  $Pb^{2+}$  στο οποίο ο δείκτης είχε την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 5**.



Γράφημα 5. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 7a.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{\text{free}} = F_{\text{ion}}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: ο δείκτης είναι *turn on* οπότε σημειώθηκε (μικρή) *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-Al*<sup>3+</sup> προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Pb<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων καδμίου κ.ο.κ.

Για το δείκτη **7b** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν  $Pb^{2+}$  στο οποίο ο δείκτης είχε πάλι την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 6**.



Γράφημα 6. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 7b.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{\text{free}} = F_{\text{ion}}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: ο δείκτης είναι *turn on* οπότε σημειώθηκε *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-Al*<sup>3+</sup> προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Pb<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων χαλκού κ.ο.κ.

Για το δείκτη **7c** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν Pb<sup>2+</sup> στο οποίο ο δείκτης είχε πάλι την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 140 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 7**.



Γράφημα 7. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 7c.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{\text{free}} = F_{\text{ion}}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων μολύβδου στο διάλυμα του δείκτη: ο δείκτης είναι *turn on* οπότε εμφανίστηκε (μικρή) *αύξηση* της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα χαλκού. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα *δείκτη-Cu<sup>2+</sup>* προστεθεί ίση συγκέντρωση

ανταγωνιζόμενων ιόντων  $Pb^{2+}$ . Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων τρισθενούς σιδήρου κ.ο.κ.

Για το δείκτη **7d** ως ιόν αναφοράς επιλέχθηκε το ιόν Cu<sup>2+</sup> στο οποίο ο δείκτης είχε την πλέον διακριτή απόκριση. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων ήταν 240 μM. Οι αποκρίσεις του δείκτη εμφανίζονται στο **Γράφημα 8**.



Γράφημα 8. Μελέτες Ανταγωνισμού Ιόντων για το δείκτη 7d.

Η πρώτη τιμή στο γράφημα με την ένδειξη *Free* είναι προφανώς μηδενική και αναφέρεται στη διαφορά εντάσεων φθορισμού για το δείκτη και μόνο ( $F_{free} = F_{ion}$ ). Η δεύτερη τιμή προκύπτει από την προσθήκη ιόντων χαλκού στο διάλυμα του δείκτη: στην περίπτωση αυτή ο δείκτης είναι <u>turn off</u> οπότε εμφανίστηκε μείωση της έντασης φθορισμού. Η επόμενη τιμή αναφέρεται στην ένταση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη όταν προστεθούν ιόντα αργιλίου. Η τέταρτη τιμή προκύπτει όταν στο διάλυμα δείκτη- $Al^{3+}$  προστεθεί ίση συγκέντρωση ανταγωνιζόμενων ιόντων Cu<sup>2+</sup>. Οι επόμενες δύο τιμές αναφέρονται στο σύστημα ιόντων κοβαλτίου κ.ο.κ.

#### 4.3 Σχολιασμός των αποτελεσμάτων

Ο δείκτης **5a** δεν εμφανίζει κάποιο σταθερό μοτίβο απόκρισης ανταγωνιστικής δράσης των ιόντων μολύβδου. Αν τα ιόντα ήταν ανταγωνιστικά, η προσθήκη ιόντων Pb<sup>2+</sup> σε οποιοδήποτε διάλυμα δείκτη-ιόντος θα έδινε ένταση φθορισμού παρόμοια με αυτή που φαίνεται στο Γράφημα 1 και στην τιμή «Pb<sup>2+</sup>». Η συμπεριφορά αυτή εμφανίζεται οριακά στον ανταγωνισμό των ιόντων αργιλίου και μόνο. Άρα ο δείκτης δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα.

Η ίδια εικόνα εμφανίζεται και στο Γράφημα 2. Ο δείκτης **5b** εμφανίζει μοτίβο μηδενικής ανταγωνιστικής δράσης των ιόντων μολύβδου στο φθορισμό των διαφορετικών συστημάτων δείκτη-ιόντος: η προσθήκη ανταγωνιστικών ιόντων Pb<sup>2+</sup> δεν επιφέρει καμία μεταβολή είτε στις θετικές είτε στις αρνητικές τιμές έντασης φθορισμού των διαφορετικών συστημάτων.

Ο μεθόξυ-υποκατεστημένος δείκτης **5c** είναι ο πρώτος που εμφανίζει συνεπή συμπεριφορά: παρά το γεγονός ότι δεν εμφανίζει ισχυρό ανταγωνισμό, η προσθήκη ιόντων Pb<sup>2+</sup> αυξάνει τις θετικές εντάσεις και μειώνει τις αρνητικές τιμές.

Το προφίλ εκλεκτικότητας του δείκτη **5d** είναι αισθητά διαφορετικό: ο δείκτης λειτουργεί με βάση το φαινόμενο PCT ως *ratiometric*, με *turn off* συμπεριφορά όταν διεγείρεται στα 413 nm. Η προσθήκη ιόντων χαλκού σε οποιοδήποτε σύστημα δείκτη-ιόντος αυξάνει την απόλυτη τιμή του λόγου εντάσεων φθορισμού, ενισχύοντας το μέγεθος της απόκρισης turn off.

Σε αναλογία με το προφίλ του **5a**, ο δείκτης **7a** δεν εμφανίζει κάποιο σταθερό μοτίβο απόκρισης ανταγωνιστικής δράσης των ιόντων μολύβδου. Η *turn on* συμπεριφορά εμφανίζεται στην περίπτωση των ιόντων αργιλίου και υδραργύρου μόνο χωρίς ανταγωνιστική δράση. Άρα ο δείκτης δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα.

Η ίδια εικόνα με τον **5b** εμφανίζεται και στην περίπτωση του δείκτη **7b**, ο οποίος εμφανίζει μοτίβο μηδενικής ανταγωνιστικής δράσης των ιόντων μολύβδου. Η προσθήκη ανταγωνιστικών ιόντων Pb<sup>2+</sup> σε διαφορετικά συστήματα δείκτη-ιόντος δεν επιφέρει καμία μεταβολή είτε στις θετικές είτε στις αρνητικές τιμές έντασης φθορισμού των συστημάτων αυτών.

Μηδενική ανταγωνιστική δράση εμφανίζουν επίσης τα ιόντα  $Pb^{2+}$  και στην περίπτωση του δείκτη **7c**. Η προσθήκη ιόντων  $Pb^{2+}$  σε διαφορετικά συστήματα δείκτη-ιόντος επίσης δεν επιφέρει καμία μεταβολή είτε στις θετικές είτε στις αρνητικές τιμές έντασης φθορισμού των συστημάτων αυτών.

Σε άμεση αντιστοιχία με τον 5d, ο δείκτης 7d εμφανίζει προφίλ εκλεκτικότητας για τα ιόντα  $Cu^{2+}$  και ισχυρής ανταγωνιστικότητας σε όλα τα ιόντα που μελετήθηκαν: ο δείκτης λειτουργεί με βάση το φαινόμενο PCT ως ratiometric, με turn off συμπεριφορά όταν διεγείρεται στα 413 nm. Η προσθήκη ιόντων χαλκού σε οποιοδήποτε σύστημα δείκτη-ιόντος αυξάνει την απόλυτη τιμή του λόγου εντάσεων φθορισμού, ενισχύοντας το μέγεθος της απόκρισης turn off.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην εργασία αυτή επιτεύχθηκε η σύνθεση και ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός μιας σειράς δυνητικών φθορισμομετρικών δεικτών ιόντων.
- Τα ιονοφόρα τμήματα των δεικτών αυτών είναι ανάλογα του γνωστού συμπλοκοποιητή ιόντων Ca<sup>2+</sup> EGTA και συγκεκριμένα το "δι-υποκατεστημένο" παράγωγο EGDA, και το "τρι-υποκατεστημένο" παράγωγο EGTRA.
- Τα ενσωματωμένα χρωμοφόρα είναι η κουμαρίνη και τα 6-μεθυλο-, 8-μεθοξυ- και
  7-διαιθυλαμινο- ανάλογά της.
- Οι μεταβολές στο χηλικό τμήμα του μορίου δεν οδήγησαν στις επιθυμητές αλλαγές στην εκλεκτικότητα των αισθητήρων προς τα υπό μελέτη ιόντα. Παρ' ότι η αρχική ιδέα ήταν η τροποποίηση του  $Ca^{2+}$  - εκλεκτικού EGTA σε  $Mn^{2+}$  εκλεκτικούς δείκτες τύπου EGDA και EGTRA, τα προϊόντα των τροποποιήσεων αυτών έδειξαν διακριτές αποκρίσεις φθορισμού σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων αλλά όχι για τα ιόντα  $Mn^{2+}$ .
- Ο τρόπος συναρμογής των ιόντων με τους δείκτες επηρέασε τη φθορισμομετρική τους συμπεριφορά. Οι τρεις μονοκουμαρινικοί δείκτες 5a-c και οι τρεις δικουμαρινικοί δείκτες 7a-c εμφανίζουν μία *turn-on* συμπεριφορά σε σχέση με την απόκρισή τους σε βαρέα μέταλλα. Οι διαιθυλαμινο-δείκτες 5d και 7d εμφανίζουν κυρίως *ratiometric* απόκριση με μείωση της έντασης φθορισμού στα φάσματα εκπομπής.
- Συμπερασματικά, από τους οκτώ δείκτες που σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και μελετήθηκαν, οι δείκτες 5d και 7d εμφανίζουν το επιθυμητό φασματοσκοπικό προφίλ και μπορούν να χρησιμεύσουν για τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων σε αναλυτικά δείγματα.

## 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό αδρανείς συνθήκες (ατμόσφαιρα αργού-αζώτου).

Όπου απαιτήθηκαν άνυδρες συνθήκες, οι φιάλες αντίδρασης πυρώθηκαν σε υψηλό κενό.

Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας T.L.C. σε γυάλινα πλακίδια επιστρωμένα με ζηροπηκτή διοζειδίου του πυριτίου Silica Gel τύπου  $60F_{254}$ . Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία UV 254 nm και 366 nm, εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα 7% φωσφομολυβδαινικού οζέος και θέρμανση ή έκθεση των πλακιδίων σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου. Ως διαλύτες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα EtOAc:MeOH:NH<sub>3</sub> (8:1:1), AcOH/Toluene (15%) και MeOH/DCM (3-10%). Για την χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε silica gel 60, 230-400 mesh.

Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρα MSL300 (300MHz) και FT-NMR AMX500 (500MHz) της εταιρίας Bruker. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων αναγράφονται σε ppm, σε σχέση με την μετατόπιση του τετραμεθυλοσιλανίου.

Τα μονοδιάστατα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR ελήφθησαν με 64K πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν από 16 έως 64 FIDs οι οποίες αποθηκεύτηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Το φασματικό εύρος ήταν από 1 έως 14 ppm. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν από την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών. Ο χρόνος ανάκτησης (acquisition time) ήταν 2.7 s, ενώ ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) μεταξύ δυο συνεχόμενων ακολουθιών παλμών ήταν 1 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης.

Τα μονοδιάστατα φάσματα <sup>13</sup>CNMR ελήφθησαν με 64K πραγματικά δεδομένα και φασματικό εύρος από 10 έως 220 ppm. Για κάθε φάσμα ελήφθησαν από 2.000 έως 10.000 FIDs, οι οποίες αποθηκεύτηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ψευδοσαρώσεις ώστε η θερμοκρασία του δείγματος και το σύστημα των spin να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 3 s. Η τιμή του παλμού 90 είχε διάρκεια 10.3 μs. Πριν το μετασχηματισμό Fourier η ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) πολλαπλασιάστηκε με μια εκθετική συνάρτηση, με εκθέτη lb= 3 Hz, για την αύζηση της ευαισθησίας του πειράματος και τα δεδομένα αυζήθηκαν με την προσθήκη 64K μηδενικών στη μνήμη του υπολογιστή. Μετά το μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάζης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάζης.

Τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε φασματογράφους Shimatzu GC-MS QP5050A με ανιχνευτή μάζας CI, ThermoScientific TSQ Quantum, με ανιχνευτή μάζας ESI-MS/MS με σύστημα τριπλού τετράπολου και ThermoScientific LCQ με ανιχνευτή μάζας ESI-MS/MS με παγίδα ιόντων.

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν σε φθορισμόμετρο Aminco Bowman (Spectronics Co., USA.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ













0\_ 0 9c `ОН







9a



9b

ОН















55



























7d

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 2a-c</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> ( <i>g</i> )	mmoles <sup>(eq)</sup>	V(ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$
2-[2-(2-αμινοαιθοξυ)αιθοξυ]-1-	148.20	0.508	$3.40^{(1)}$	0.5	1.015
αιθαναμίνη					
Βρωμοοξικός μεθυλεστέρας	152.97	1.040	6.80 <sup>(2)</sup>	0.6	1.616
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.884	6.80 <sup>(2)</sup>	1.2	0.742
Ακετονιτρίλιο <sub>(ξηρό)</sub>	41.05			5.0	0.786

### <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</u>

Σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα, ψυκτήρα και 3-way βαλβίδα με μπαλόνι N<sub>2</sub>, προστέθηκαν αρχικά 5 ml διαλύτη ξηρό CH<sub>3</sub>CN και στη συνέχεια 0.6 ml βρωμοοξικού μεθυλεστέρα και 1.2 ml διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνης. Το σύστημα αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 30'. Ακολουθεί η προσθήκη 0.5 ml 2-[2-(2- αμινοαιθόξυ)αιθόξυ]-1-αιθαναμίνης και το μίγμα θερμαίνεται με ελαιόλουτρο στους 50°C. Το χρώμα της αντίδρασης είναι ανοιχτό κίτρινο, το οποίο σκουραίνει με την πάροδο του χρόνου. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης EA:MeOH:NH<sub>3</sub> (8:1:1) και διακόπτεται μετά την πάροδο 5 ωρών εφόσον δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή.

Αφού το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρείται καταβύθιση μικρής ποσότητας αλάτων. Προστίθεται αρκετή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα με ταυτόχρονη ανάδευση ώστε να καταβυθιστούν τα άλατα στο σύνολό τους. Ακολουθεί διήθηση σε χωνί με χάρτινο ηθμό, εκπλύσεις των αλάτων με οξικό αιθυλεστέρα και τέλος απομάκρυνση των διαλυτών με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και ακολουθούν εκχυλίσεις με απιονισμένο H<sub>2</sub>O, για την απομάκρυνση των υπολοίπων των αμινών, και τέλος εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ποσότητα των προϊόντων που περνούν στην υδατική φάση, ανακτώνται με εκχυλίσεις της υδατικής φάσης με  $CH_2Cl_2$ . Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και αφού ξηρανθούν με  $MgSO_4$  ακολουθεί συμπύκνωση σε rotary evaporator. Προκύπτει κίτρινο ελαιώδες μίγμα βάρους 710 mg εκ των οποίων τα 660 mg διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα έκλουσης 7% MeOH/DCM. Το μίγμα αποτελείται από 4.5% **2a** (30 mg), 42.4% **2b** (280 mg) και 39.4% **2c** (260 mg).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR **2a** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 3.67 (s, 12H), 3.60 (s, 8H), 3.58 (t, *J*= 5.3 Hz, 4H), 3.52 (s, 4H), 2.93 (t, *J*= 5.5 Hz, 4H)

<sup>13</sup>C-NMR **2a** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 171.91, 70.38, 70.31, 55.77, 53.73, 51.64

<sup>1</sup>H-NMR **2b** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 3.69 (s, 3H), 3.66 (s, 6H), 3.60 (s, 4H), 3.57 (t, *J*= 5.46 Hz, 2H), 3.55 (s, 4H), 3.55 (t, *J*= 5.1 Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 2.93 (t, *J*= 5.5 Hz, 2H), 2.77 (t, *J*= 5.5 Hz, 2H), 2.10 (br.s, 1Hz)

<sup>13</sup>C-NMR **2b** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 172.75, 171.90, 70.68, 70.39, 70.33, 70.30, 55.78, 53.71, 51.84, 51.62, 50.81, 48.82

<sup>1</sup>H-NMR **2c** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 3.65 (s, 6H), 3.55 (s, 4H), 3,53 (t, *J*= 5.1 Hz, 4H), 3.39 (s, 4H), 2.74 (t, *J*= 5.0 Hz, 4H), 2.08 (br.s, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR **2c** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 172.82, 70.69, 70.30, 51.82, 50.81, 48.81

LC-MS (m/z) positive ionization **2b**: 365.4 [M+H]<sup>+</sup>, 387.4 [M+Na]<sup>+</sup>

LC-MS (m/z) positive ionization  $2c: 293.2 [M+H]^+$
## <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9a</u>



(MB = 190.15)

Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> ( <i>g</i> )	mmoles <sup>(eq)</sup>	V(ml)	$d (^{g}/_{ml})$
2-υδροξυ βενζαλδεϋδη	122.12	1.22	10 <sup>(1)</sup>	1.07	1.146
Μαλονικό οξύ	104.06	1.56	$15^{(1.5)}$		
Montmorillonite KSF		1.00			
H-O				3 50	
1120				5.50	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε αυτόκλειστο εφοδιασμένο με μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub>, 3.5 ml H<sub>2</sub>O και 1.07 ml της 2-υδροξυ βενζαλδεϋδης. Μετά από σύντομη ανάδευση, προστίθενται 1.56 g μαλονικού οξέος μετά τη διάλυση των οποίων, ακολουθεί προσθήκη 1 g του όξινου καταλύτη Montmorillonite KSF. Το σύστημα βρίσκεται σε συνεχή ισχυρή ανάδευση και βυθίζεται σε προθερμασμένο στους 110 °C ελαιόλουτρο. Παρατηρείται προοδευτική αλλαγή του χρώματος του καταλύτη καθώς και σχηματισμός λευκού ιζήματος. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 24 ώρες.

Αφού το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, διηθείται υπό κενό σε πορσελάνινο χωνί Buchner με χάρτινο ηθμό, για την απομάκρυνση του διαλύτη. Ακολούθως, το στερεό υπόλειμμα μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως με 60 ml MeOH και ακολουθεί θέρμανση υπό ανάδευση για περίπου 5' ώστε το επιθυμητό προϊόν να διαλυθεί στη MeOH. Αμέσως μετά το μίγμα διηθείται σε ηθμό Buchner πάνω από celite για την κατακράτηση του καταλύτη, πραγματοποιούνται εκπλύσεις του στερεού υπολείμματος με MeOH, η οποία τελικά απομακρύνεται με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator. Το προκύπτον στερεό επαναδιαλύεται σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και συμπύκνωση σε rotary evaporator. Μετά από έλεγχο με χρωματογραφία TLC σε σύστημα ανάπτυξης 30% EA / PE, διαπιστώνεται η ύπαρξη πρώτης ύλης και παραπροϊόντων τα οποία απομακρύνονται με εκπλύσεις του με ethyl acetate. Παραλαμβάνονται 1.1 g ελαφρώς υποκίτρινου στερεού, τα οποία αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν (απόδοση 57.80%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 12.26 (br.s, 1H), 8,96 (s, 1H), 7,82-7.76 (m, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 164.22, 162.55, 154.69, 151.66, 135.93, 130.64, 126.40, 118.57, 117.34, 114.97

GC-MS (m/z): 191 (M<sup>+</sup>)

## <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9b</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	<i>d</i> ( <sup>g</sup> / <sub>ml</sub> )
2-υδροξυ-5-μεθυλο- βενζαλδεϋδη	136.15	1.00	7.34 <sup>(1)</sup>		
Μαλονικό οξύ	104.06	1.15	11.02 <sup>(1.5)</sup>		
Montmorillonite KSF		0.80			
$H_2O$				6	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **9a**.

Έλεγχος του τελικού ιζήματος με χρωματογραφία TLC σε σύστημα ανάπτυξης 15% AcOH/Toluene, υποδεικνύει την ύπαρξη πρώτης ύλης και παραπροϊόντων, τα οποία απομακρύνονται με εκπλύσεις ψυχρού πετρελαϊκού αιθέρα. Παραλαμβάνονται 750 mg ελαφρώς κίτρινου στερεού, τα οποία αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν (απόδοση 50%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 12.30 (br.s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.58 (dd,  $J_1$ = 1.9 Hz,  $J_2$ = 8.6 Hz, 1H), 7.52 (d, J= 1.9 Hz, 1H), 7.36 (d, J= 8.6 Hz, 1H), 2.4 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 164.37, 162.73, 152.85, 151.58, 137.16, 136.50, 130.11, 118.30, 116.97, 114.62, 20.88

GC-MS (m/z): 204 (M<sup>+</sup>)

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9c



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d(^{g}/_{ml})$
2-υδροξυ-3-μεθοξυ- βενζαλδεϋδη	152.15	1.50	9.86 <sup>(1)</sup>		
Μαλονικό οξύ	104.06	1.54	14.79 <sup>(1.5)</sup>		
Montmorillonite KSF		1.00			
H <sub>2</sub> O				11	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **9a**, με τη διαφορά ότι η μάζα του KSF μετά την αρχική διήθηση για την απομάκρυνση του διαλύτη της αντίδρασης, τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως με  $CH_2Cl_2$  καθώς διαπιστώθηκε ότι το προϊόν παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα στη MeOH.

Παραλαμβάνονται 900 mg έντονα κίτρινου στερεού, τα οποία αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν (απόδοση 41.45%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 12.29 (br.s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.40 (dd,  $J_1$ = 8.6 Hz,  $J_2$ = 7.6 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J_1$ = 8.2 Hz,  $J_2$ = 1.6 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J_1$ = 7.6 Hz,  $J_2$ = 1.6 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 163.87, 162.62, 151.90, 147.52, 144.27, 126.32, 121.47, 119.23, 117.17, 115.15, 56.62

GC-MS (m/z): 220 (M<sup>+</sup>)

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9d</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles (eq)	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$
2-υδροξυ-4-διαιθυλαμινο- βενζαλδεϋδη	193.24	0.97	5 <sup>(1)</sup>		
Μαλονικός διμεθυλεστέρας <sub>(ξηρός)</sub>	132.11	1.32	10 <sup>(2)</sup>	1.14	1.156
Πιπεριδίνη	85.15	0.43	5 <sup>(1)</sup>	0.50	0.862
ΜεΟΗ <sub>(ξηρή)</sub>	32.04			15.00	0.791

### <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</u>

Σε αυτόκλειστο εφοδιασμένο με μαγνητικό αναδευτήρα, το οποίο έχει προηγουμένως πυρωθεί στο φούρνο για την απομάκρυνση της υγρασίας, προστίθενται υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub>, 15 ml ξηρής MeOH και 0.97 g της 2-υδροξυ-4-διαιθυλαμινο- βενζαλδεϋδης, μετά τη διάλυση των οποίων ακολουθεί η προσθήκη 1,14 ml ξηρού μαλονικού διμεθυλεστέρα. Τέλος, μετά από σύντομη ανάδευση, προστίθενται 0.5 ml πιπεριδίνης και το σύστημα βυθίζεται σε προθερμασμένο στους 70 °C ελαιόλουτρο ενώ βρίσκεται σε συνεχή ισχυρή ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης 15% AcOH/Toluene και διακόπτεται μετά την πάροδο 22 ωρών εφόσον δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή.

Αφού το σύστημα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα έκλουσης 20% AcOH/Toluene. Παραλαμβάνονται 1.2 g του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 87.18%). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι απομονώθηκαν επίσης 140 mg ένωσης η οποία, όπως υποδεικνύουν τα φασματοσκοπικά της δεδομένα, φαίνεται να είναι προϊόν υποκατάστασης του μαλονικού διμεθυλεστέρα με την πιπεριδίνη, πιθανότατα λόγω των ισχυρών συνθηκών υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση.

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 8.42 (s, 1H), 7.32 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J*<sub>1</sub>= 2.5 Hz, *J*<sub>2</sub>= 9.0 Hz, 1H), 6.41 (d, *J*= 2.5 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.41 (q, *J*= 7.2 Hz, 4H), 1.19 (t, *J*= 7.2 Hz, 6H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 165.03, 158.54, 158.45, 153.00, 149.75, 131.20, 109.67, 108.33, 107.71, 96.64, 52.39, 45.18, 12.45

GC-MS (m/z): 276 (M<sup>+</sup>)

PPMA: GC-MS (m/z): 185 (M<sup>+</sup>)

#### <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9d</u>



( MB = 261.27 )

Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles (eq)	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$
Ένωση <b>9d-Me</b>	275.30	1.05	3.83 <sup>(1)</sup>		
NaOH	40.00	0.15	3.83 <sup>(1)</sup>		
50% MeOH / H <sub>2</sub> O				18	
HCl 3N					

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σφαιρική φιάλη εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα, μεταφέρονται 1.05 g της ένωσης **9d-Me**, τα οποία διαλύονται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα MeOH (9 ml). Στη συνέχεια προστίθεται ίση ποσότητα νερού ώστε η αναλογία του διαλύτη να είναι 50% MeOH / H<sub>2</sub>O και 0.15 g NaOH μετά τη διάλυση των οποίων προσαρτείται στη φιάλη ψυκτήρας, το σύστημα βυθίζεται σε προθερμασμένο υδατόλουτρο και ακολουθεί θέρμανση υπό αναρροή (reflux) για 15 min. Ήδη, μετά την προσθήκη του NaOH, σχηματίζεται κίτρινο ίζημα η ποσότητα του οποίου αυξάνεται προοδευτικά.

Μετά την πάροδο των 15 λεπτών reflux και αφού το σύστημα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται στάγδην ποσότητα υδατικού διαλύματος HCl 3N έως pH= 2 και πλήρους διαλυτοποίησης του ιζήματος. Ακολουθούν εκχυλίσεις με  $CH_2Cl_2$ , ξήρανση της οργανικής φάσης με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator. Παραλαμβάνονται 937 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 93.64%, μετατροπή 81.08%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 12.35 (br.s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.46 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J*<sub>1</sub>= 2.5 Hz, *J*<sub>2</sub>= 9.0 Hz, 1H), 6.53 (d, *J*= 2.5 Hz, 1H), 3.49 (q, *J*= 7.2 Hz, 4H), 1.26 (t, *J*= 7.2 Hz, 6H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 165.69, 164.66, 158.20, 153.87, 150.48, 132.12, 111.02, 108.70, 105.71, 96.96, 45.48, 12.53

GC-MS (m/z): 262 (M<sup>+</sup>)

## <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3a</u>



(MB = 208.60)

Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles (eq)	V (ml)	$d (^{g}/_{ml})$	C(mol/lt)
Ένωση <b>9a</b>	190.15	0.13	0.7 <sup>(1)</sup>			0.38
SOCl <sub>2(πρόσφατα απεσταγμένο)</sub>	118.97	0.50	4.2 <sup>(6)</sup>	0.30	1.631	
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			1.50	1.492	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα, ψυκτήρα και βαλβίδα τριπλής εξόδου με μπαλόνι N<sub>2</sub>, μεταφέρονται 0.13 g της ένωσης **9a** μαζί με 1.5 ml ξηρού CHCl<sub>3</sub> σταθεροποιημένου με amylene, <u>αντί αιθανόλης ως είθισται, καθώς η μικροποσότητα αυτής, είναι ικανή να υδρολύσει το παραγόμενο ακυλοχλωρίδιο προς τον αντίστοιχο αιθυλεστέρα</u>. Το σύστημα τίθεται υπό ανάδευση και σε παγόλουτρο. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη 0.3 ml πρόσφατα απεσταγμένου SOCl<sub>2</sub> και μετά από σύντομη ανάδευση το παργόμου στους 65 °C ελαιόλουτρο και ακολουθεί reflux. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης 15% AcOH / Toluene και διακόπτεται μετά την πάροδο 3 ωρών εφόσον δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή.

Αφού το σύστημα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης και τα υπολείμματα του  $SOCl_2$ απομακρύνονται με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator με χρήση παγίδας. Το στερεό που προκύπτει, επαναδιαλύεται στο διαλύτη της αντίδρασης και συμπυκνώνεται εκ νέου για την πλήρη απομάκρυνση του  $SOCl_2$  (x4). Παραλαμβάνονται 140 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 95.88%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 8.87 (s, 1H), 7.80-7.72 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 161.31, 155.51, 154.97, 153.95, 136.71, 130.83, 125.66, 120.27, 117.52, 117.15

GC-MS (m/z): 208 (M<sup>+</sup>)

## <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3b</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles (eq)	V (ml)	<i>d</i> ( <sup>g</sup> / <sub>ml</sub> )	C(mol/lt)
Ένωση <b>9b</b>	204.18	0.48	2.4 <sup>(1)</sup>			0.38
SOCl <sub>2(πρόσφατα απεσταγμένο)</sub>	118.97	1.68	14.1 <sup>(6)</sup>	1	1.631	
$CHCl_{3(\xi\eta\rho\delta,\sigma\tau\alpha\theta.amylene)}$	119.38			5	1.492	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **3a**.

Παραλαμβάνονται 510 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 95.45%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 8.82 (s, 1H), 7.58 (dd,  $J_I$ = 2.0 Hz,  $J_2$ = 8.5 Hz, 1H), 7.51 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 7.30 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 161.35, 155.22, 153.96, 153.76, 137.95, 135.63, 130.32, 120.10, 117.33, 116.88, 20.82

GC-MS (m/z): 222 (M<sup>+</sup>)

# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3c



Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles (eq)	V (ml)	<i>d</i> ( <sup>g</sup> / <sub>ml</sub> )	C(mol/lt)
Ένωση <b>9c</b>	220.18	0.4	1.8 <sup>(1)</sup>			0.38
SOCl <sub>2(πρόσφατα απεσταγμένο)</sub>	118.97	1.3	10.9 <sup>(6)</sup>	0.8	1.631	
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			4.0	1.492	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **3a**.

Παραλαμβάνονται 310 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 71.38%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 8.80 (s, 1H), 7.34-7.23 (m, overlap, 3H), 3.95 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 161.33, 154.48, 154.17, 147.32, 145.20, 125.53, 121.66, 120.48, 118.09, 117.80, 56.56

GC-MS (m/z): 238 ( $M^+$ )

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 3d</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles (eq)	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$	C(mol/lt)
Ένωση <b>9d</b>	261.27	0.42	1.6 <sup>(1)</sup>			0.38
SOCl <sub>2(πρόσφατα απεσταγμένο)</sub>	118.97	1.15	9.7 <sup>(6)</sup>	0.7	1.631	
CHCl <sub>3(ξηρό,σταθ.amylene)</sub>	119.38			3.5	1.492	

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **3d**.

Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε στην επόμενη αντίδραση χωρίς ν' απομονωθεί λόγω αστάθειας

#### <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4a</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	<i>d</i> ( <sup>g</sup> / <sub>ml</sub> )
Ένωση <b>3a</b>	208.60	0.14	$0.67^{(1.0)}$		
Ένωση <b>2b</b>	364.39	0.12	$0.34^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.09	$0.67^{(1.0)}$	0.12	0.742
CHCl <sub>3(ξηρό, σταθ.amylene)</sub>	119.38			4.00	1.492

#### <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</u>

Στη σφαιρική φιάλη που περιέχει το ακυλοχλωρίδιο **3a** προστίθενται 2 ml ξηρού CHCl<sub>3</sub> σταθεροποιημένου με amylene και ακολουθεί ανάδευση έως διάλυσής του. Ακολουθεί προσθήκη 120 μl DIPEA προκειμένου να δεσμευθούν τυχόν υπολείμματα οξέων ώστε να αποφευχθεί η πρωτονίωση της ένωσης **2b**. Μετά από σύντομη ανάδευση, μεταφέρονται στη φιάλη της αντίδρασης, 120 mg της ένωσης **2b** διαλυμένα σε 2 ml CHCl<sub>3</sub>. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης 8% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και διακόπτεται μετά την πάροδο 3 ωρών εφόσον δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή.

Ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις του μίγματος της αντίδρασης με απιονισμένο H<sub>2</sub>O, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> και τέλος με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Αφού η οργανική φάση ξηρανθεί με MgSO<sub>4</sub>, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα έκλουσης 3% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 95 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 52.08%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 537.7[M+H]<sup>+</sup>, **559.7** [M+Na]<sup>+</sup>, 575.8[M+K]<sup>+</sup>



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	COSY	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-	-
2	-	-	-	158.05	-
3	-	-	-	124.69	-
4	H-4	7.96 (s, 1H)	H-7,H-8, H-9,H-10	143.48	H-4
5	-	-	-	118.28	-
6	-	-	-	154.07	-
7	H-7	7.35-7.33 (m, 1H)	H-4, H-8, H-9,H-10	116.81	H-7
8	H-8	7.56 (dd, $J_1 = J_2 = 7.1$ Hz, 2H)	H-4, H-7, H-9,H-10	128.73	H-8
9	H-9	7.31 (dt, $J_1$ = 7.9 Hz, $J_2$ = 3.16 Hz, 1H)	H-4, H-7, H-8,H-10	125.01	Н-9
10	H-10	7.58 (dd, $J_1 = J_2 = 7.1$ Hz, 2H)	H-4, H-7, H-8,H-9	132.93	H-10
11	-	-	-	165.93	-
12	Ν	-	-	-	-
13	H-13	4.38 (s, 2H)	H-15, H-16	48.06	H-13
14	-	-	-	169.48	-
15	H-15	3.77 (s, 3H)	H-13	52.25	H-15
16	H-16	3.55 (m, 2H)	H-13	50.07	H-16
17,19,	H-17,19, 20,22	3.51-3.76 (m, 8H)	undefined	70.36	
20,22				70.11	
				70.04	
				69.97	
18,21	0	-	-	-	-
23	H-23	2.93 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	undefined	53.58	Н-23
24	N	-	-	-	-
25,28	H-25,28	3.60 (br.s, 4H)		55.43	H-25,28
26,29	-	-	-	171.39	-
27,30	H-27,30	3.67 (s, 6H)	-	51.69	H-27,30

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	COSY	$\delta^{13}C$	HSQC
1	О	-	-	-	-
2	-	-	-	158.02	-
3	-	-	-	124.66	-
4	H-4	<b>7.93</b> (s, 1H)	H-7,H-8, H-9,H-10	143.67	H-4
5	-	-	-	118.25	-
6	-	-	-	154.07	-
7	H-7	7.35-7.33 (m, 1H)	H-4, H-8, H-9,H-10	116.81	H-7
8	H-8	7.56 (dd, $J_1 = J_2 = 7.1$ Hz, 2H)	H-4, H-7, H-9,H-10	128.68	H-8
9	Н-9	7.31 (dd, $J_1$ = 7.9 Hz, $J_2$ = 3.16 Hz, 1H)	H-4, H-7, H-8,H-10	124.99	H-9
10	H-10	7.58 (dd, $J_1 = J_2 = 7.1$ Hz, 2H)	H-4, H-7, H-8,H-9	132.95	H-10
11	-	-	-	165.93	-
12	Ν	-	-	-	-
13	H-13	<b>4.20</b> (s, 2H)	H-15, H-16	51.54	H-13
14	-	-	-	170.02	-
15	H-15	3.77 (s, 3H)	H-13	52.34	H-15
16	H-16	3.76 (m, 2H)	H-13	47.29	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.51-3.76 (m, 8H)	undefined	70.38	
20,22	20,22			70.14	
				70.04	
				69.95	
18,21	О	-	-	-	-
23	Н-23	<b>2.95</b> (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	undefined	53.58	H-23
24	N	-	-	-	-
25,28	H-25,28	3.60 (br.s, 4H)	H-25,28	55.37	H-25,28
26,29	-	-	-	171.37	-
27,30	H-27,30	3.67 (s, 6H)	-	51.69	H-27,30

#### <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4b</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d (^{g}/_{ml})$
	Dupog				
Ένωση <b>3b</b>	222.62	0.18	$0.82^{(1.0)}$		
Ένωση <b>2b</b>	364.39	0.15	$0.41^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.11	0.82 <sup>(1.0)</sup>	0.15	0.742
CHCl <sub>3(ξηρό,σταθ.amylene)</sub>	119.38			4.00	1.492

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 2 ώρες ενώ ο διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel γίνεται με σύστημα έκλουσης 4% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 90 mg του επιθυμητού προϊόντος ( απόδοση 39.87%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 551.7 [M+H]<sup>+</sup>, **573.6** [M+Na]<sup>+</sup>, 574.8 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

 $589.6 \left[M+K
ight]^+$ 



73

Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}$ C	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	158.29	-
3	-	-	124.65	-
4	H-4	7.87 (s, 1H)	143.50	H-4
5	-	-	118.06	-
6	-	-	152.29	-
7	H-7	7.21 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H)	116.56	H-7
8	H-8	7.34 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.89 Hz, 1H)	134.03	H-8
9	-	-	134.82	-
10	H-10	7.29 (br.d, <i>J</i> = 1.89 Hz, 1H)	128.35	H-10
11	-	-	166.06	-
12	N	-	_	-
13	H-13	4.35 (s, 2H)	48.11	H-13
14	-	-	169.55	-
15	H-15	3.74 (s, 3H)	52.25	H-15
16	H-16	3.52 (m, 2H)	50.08	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.49-3.72 (m, 8H)	70.44	
20,22	_~,		70.33	
			70.18	
			70.08	
18,21	0	-	-	-
23	Н-23	2.93 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H )	53.64	Н-23
24	N	-	-	-
25,28	H-25,28	3.60 (br.s, 4H)	55.71	H-25,28
26,29	-	-	171.80	-
27,30	H-27,30	3.65 (s, 6H)	51.63	H-27,30
31	H-31	2.38 (s, 3H)	20.83	H-31

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	158.26	-
3	-	-	124.59	-
4	H-4	<b>7.84</b> (s, 1H)	143.71	H-4
5	-	-	118.04	-
6	-	-	152.29	-
7	H-7	7.21 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H)	116.56	H-7
8	H-8	<b>7.35</b> (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.5 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.89 Hz, 1H)	134.03	H-8
9	-	-	134.81	-
10	H-10	<b>7.27</b> (br.d, <i>J</i> = 1.89 Hz, 1H)	128.41	H-10
11	-	-	166.08	-
12	N	-	-	-
13	H-13	<b>4.17</b> (s, 2H)	51.57	H-13
14	-	-	170.08	-
15	H-15	3.74 (s, 3H)	52.34	H-15
16	H-16	3.73 (m, 2H)	47.33	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.49-3.72 (m, 8H)	70.44	
20,22	,		70.37	
			70.15	
			70.08	
18,21	0	-	-	-
23	Н-23	<b>2.95</b> (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H)	53.64	Н-23
24	N	-	-	-
25,28	H-25,28	3.60 (br.s, 4H)	55.71	H-25,28
26,29	-	-	171.79	-
27,30	H-27,30	3.65 (s, 6H)	51.63	H-27,30
31	H-31	<b>2.37</b> (s, 3H)	20.82	H-31

#### <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4c</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	<i>d</i> ( <sup>g</sup> / <sub>ml</sub> )
Ένωση <b>3c</b>	238.62	0.28	$1.20^{(1.0)}$		
Ένωση <b>2b</b>	364.39	0.22	$0.60^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.16	1.20 <sup>(1.0)</sup>	0.21	0.742
CHCl <sub>3(ξηρό,σταθ.amylene)</sub>	119.38			5.00	1.492

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 2.5 ώρες ενώ ο διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel γίνεται με σύστημα έκλουσης 2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 250 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 73.54%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 567.7 [M+H]<sup>+</sup>, **589.6** [M+Na]<sup>+</sup>, 590.8 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

 $605.60 \left[M+K\right]^+$ 



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	157.49	-
3	-	-	124.86	-
4	H-4	7.84 (s, 1H)	143.72	H-4
5	-	-	118.85	-
6	-	-	147.08	-
7	-	-	143.67	-
8	H-8	7.05 (dd, $J_1$ = 8.0 Hz, $J_2$ = 1.4 Hz, 1H)	114.54	H-8
9	Н-9	7.03 (dd, $J_1$ = 8.0 Hz, $J_2$ = 1.4 Hz, 1H)	124.96	H-9
10	H-10	7.15 (d, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8 Hz, 1H)	119.83	H-10
11	-	-	165.87	-
12	Ν	-	-	-
13	H-13	4.28 (s, 2H)	48.09	H-13
14	-	-	169.47	-
15	H-15	3.67 (s, 3H)	52.18	H-15
16	H-16	3.43 (m, 2H)	50.03	H-16
17,19,	H-17,19, 20,22	3.42-3.65 (m, 8H)	70.35	
20,22			70.16	
			70.09	
			69.99	
18,21	0	-	-	-
23	H-23	2.84 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H)	53.60	H-23
24	N	-	-	-
25	H-25	3.51 (br.s, 2H)	55.57	H-25
28	H-28	3.52 (br.s, 2H)	55.58	H-28
26,29	-	-	171.60	-
27,30	H-27,30	3.58 (s, 6H)	51.60	H-27,30
31	H-31	3.86 (s, 3H)	56.28	H-31

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	157.44	-
3	-	-	124.83	-
4	H-4	<b>7.81</b> (s, 1H)	144.02	H-4
5	-	-	118.83	-
6	-	-	147.06	-
7	-	-	143.67	-
8	H-8	<b>7.00</b> (dd, $J_1$ = 8.0 Hz, $J_2$ = 1.4 Hz, 1H)	114.54	H-8
9	Н-9	<b>6.98</b> (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8.0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1.4 Hz, 1H)	124.92	H-9
10	H-10	<b>7.14</b> (d, <i>J</i> <sub><i>I</i></sub> = 8.0 Hz, 1H)	119.87	H-10
11	-	-	165.91	-
12	N	-	-	-
13	H-13	<b>4.11</b> (s, 2H)	51.46	H-13
14	-	-	170.00	-
15	H-15	3.67 (s, 3H)	52.26	H-15
16	H-16	<b>3.67</b> (m, 2H)	47.31	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.42-3.65 (m, 8H)	70.35	
20,22	20,22		70.22	
			70.11	
			69.99	
18,21	0	-	-	-
23	Н-23	<b>2.85</b> ( t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H)	53.60	H-23
24	Ν	-	-	-
25	H-25	3.51 (br.s, 2H)	55.57	H-25
28	H-28	3.52 (br.s, 2H)	55.58	H-28
26,29	-	-	171.60	-
27,30	H-27,30	<b>3.58</b> (s, 6H)	51.60	H-27,30
31	H-31	<b>3.86</b> (s, 3H)	56.28	H-31

#### <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4d</u>



Ένωση	Μοριακό	<i>m</i> ( <i>g</i> )	mmoles <sup>(eq)</sup>	V(ml)	$d (^{g}/_{ml})$
	Βάρος				
Ένωση <b>3d</b>	279.72	0.31	$1.10^{(1.0)}$		
Ένωση <b>2b</b>	364.39	0.20	$0.55^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.14	$1.10^{(1.0)}$	0.19	0.742
CHCl <sub>3(ξηρό,σταθ.amylene)</sub>	119.38			6.00	1.492

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 5 ώρες ενώ ακολουθούν δύο διαχωρισμοί με χρωματογραφία στήλης σε silica gel με συστήματα έκλουσης 4 και 2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, αντίστοιχα. Παραλαμβάνονται 50 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 14.96%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 608.7 [M+H]<sup>+</sup>, 630.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 631.7 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

646.6 [M+K]<sup>+</sup>



79

Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	_
2	-	-	159.19	-
3	-	-	116.18	-
4	H-4	7.81 (s, 1H)	144.91	H-4
5	-	-	107.70	-
6	-	-	157.21	-
7	H-7	6.43 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	96.95	H-7
8	H-8	-	151.64	-
9	Н-9	6.55 (dd, J <sub>1</sub> = 8.9 Hz, J <sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H)	109.36	Н-9
10	H-10	7.26 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H)	129.86	H-10
11	-	-	167.28	-
12	N	-	-	-
13	H-13	4.33 (s, 2H)	48.30	H-13
14	-	-	169.83	-
15	H-15	3.73 (s, 3H)	52.09	H-15
16	H-16	3.51 (m, 2H)	50.14	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.48-3.71 (m, 8H)	70.57	
20,22	_ ~ ,		70.37	
			70.32	
			70.12	
18,21	0	-	-	-
23	Н-23	2.92 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	53.61	Н-23
24	N	-	-	-
25	H-25	3.59 (br.s, 2H)	55.69	H-25
28	H-28	3.60 (br.s, 2H)		H-28
26,29	-	-	171.79	-
27,30	H-27,30	3.65 (s, 6H)	51.60	H-27,30
31,33	Н-31,33	3.39 (q, <i>J</i> = 6.86 Hz, 2H)	44.97	H-31,33
32,34	H-32,34	1.17 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H)	12.43	H-32,34

Position ( <b>minor</b> )	Atom	δ <sup>1</sup> H	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	159.13	-
3	-	-	116.14	-
4	H-4	<b>7.80</b> (s, 1H)	145.33	H-4
5	-	-	107.70	-
6	-	-	157.24	-
7	H-7	6.43 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	96.91	H-7
8	H-8	-	151.66	-
9	Н-9	<b>6.56</b> (dd, J <sub>1</sub> = 8.9 Hz, J <sub>2</sub> = 2.5 Hz, 1H)	109.36	Н-9
10	H-10	<b>7.25</b> (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H)	129.94	H-10
11	-	-	167.33	-
12	N	-	-	-
13	H-13	<b>4.20</b> (s, 2H)	51.68	H-13
14	-	-	170.34	-
15	H-15	3.73 (s, 3H)	52.15	H-15
16	H-16	<b>3.72</b> (m, 2H)	47.43	H-16
17,19,	H-17,19, 20.22	3.48-3.71 (m, 8H)	70.57	
20,22	20,22		70.37	
			70.32	_
			70.17	
18,21	0	-	-	-
23	Н-23	<b>2.93</b> (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	53.61	H-23
24	N	-	-	-
25	H-25	3.59 (br.s, 2H)	55.69	H-25
28	H-28	3.60 (br.s, 2H)		H-28
26,29	-	-	171.79	-
27,30	H-27,30	3.65 (s, 6H)	51.60	Н-27,30
31,33	H-31,33	3.39 (q, <i>J</i> = 6.86 Hz, 2H)	44.97	H-31,33
32,34	H-32,34	1.17 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H)	12.43	H-32,34

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6α



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d ({}^{g}/_{ml})$
Ένωση <b>3a</b>	208.60	0.32	$1.54^{(1.5)}$		
Ένωση <b>2c</b>	292.33	0.15	$0.51^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.20	1.54 <sup>(1.5)</sup>	0.27	0.742
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			6.00	1.492

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 3 ώρες και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel με σύστημα έκλουσης 2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 130 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 40.05%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 637.4  $[M+H]^+$ , 659.5  $[M+Na]^+$ , 660.6  $[M+H+Na]^+$ ,

 $675.4 \left[M+K
ight]^+$ 



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	_
2	-	-	158.13	-
3	-	-	124.79	-
4	H-4	7.96 (s, 2H)	143.57	H-4
5	-	-	118.33	-
6	-	-	154.16	-
7	H-7	7.36-7.34 (m, 2H)	116.93	H-7
8	H-8	7.62-7.57 (m, 2H)	133.05	H-8
9	H-9	7.32-7.29 (m, 2H)	125.09	H-9
10	H-10	7.56-7.50 (m, 2H)	128.81	H-10
11	-	-	165.98	-
12	Ν	-	_	-
13	H-13	4.38 (s, 4H)	48.15	H-13
14	-	-	169.55	-
15	H-15	3.77 (s, 6H)	52.36	H-15
16	H-16	3.53 (m, 4H)	50.13	H-16
17,19	H-17,19	3.75-3.51 (m, 8H)	70.45	H-17,19
			70.14	]

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	158.11	-
3	-	-	124.85/124.78/124.74	-
4	H-4	<b>7.97/7.93/7.93</b> (s, 2H)	143.75/143.59	H-4
5	-	-	118.37	-
6	-	-	154.16	-
7	H-7	7.36-7.34 (m, 2H)	116.91	H-7
8	H-8	7.62-7.57 (m, 2H)	133.00	H-8
9	Н-9	7.32-7.29 (m, 2H)	125.11/125.06	H-9
10	H-10	7.56-7.50 (m, 2H)	128.73/128.72	H-10
11	-	-	165.96	-
12	Ν	-	-	-
13	H-13	<b>4.20</b> (s, 4H)	51.61	H-13
14	-	-	170.12/170.06/169.58	-
15	H-15	3.77 (s, 6H)	52.47	H-15
16	H-16	<b>3.75</b> (m, 4H)	47.38	H-16
17,19	H-17,19	3.75-3.51 (m, 8H)	70.50/70.45/70.38	H-17,19
			70.20/70.08/69.96	

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6b



Ένωση	Μοριακό Βάρος	m (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d (^{g}/_{ml})$
Ένωση <b>3b</b>	222.62	0.46	$2.05^{(1.5)}$		
Ένωση <b>2</b> c	292.33	0.20	$0.68^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.27	2.05 <sup>(1.5)</sup>	0.36	0.742
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			8.00	1.492

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 4 ώρες και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel με σύστημα έκλουσης 3% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 140 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 30.97%).

#### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 665.9 [M+H]<sup>+</sup>, 687.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 688.6 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

703.4  $[M+K]^+$ 



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	158.27	-
3	-	-	124.56	-
4	H-4	7.83 (s, 2H)	143.48	H-4
5	-	-	118.01	-
6	-	-	152.26	-
7	H-7	7.16 (d, <i>J</i> = 8.66 Hz, 2H)	7.16 (d, <i>J</i> = 8.66 Hz, 2H) 116.55	
8	H-8	7.32 (dd, $J_1$ = 8.66 Hz, $J_2$ = 1.95 Hz, 2H) 134.07		H-8
9	H-9	-	134.84	-
10	H-10	7.26-7.24 (m, 2H)	128.33	H-10
11	-	-	166.08	-
12	Ν	-	-	-
13	H-13	4.31 (s, 4H)	48.10	H-13
14	-	-	169.50	-
15	H-15	3.70 (s, 6H)	52.27	H-15
16	H-16	3.47 (m, 4H)	50.05	H-16
17,19	H-17,19	3.45-3.68 (m, 8H)	70.39	H-17,19
			70.12	
20	H-20	2.34 (s, 3H)	20.83	H-20

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	158.27	-
3	-	-	124.61/124.52/124.49	-
4	H-4	<b>7.85/7.81/7.80</b> (s, 2H)	143.69	H-4
5	-	-	118.04	-
6	-	-	152.26	-
7	H-7	<b>7.14</b> (d, <i>J</i> = 8.66 Hz, 2H)	116.55	H-7
8	H-8	7.32 (dd, $J_1$ = 8.66 Hz, $J_2$ = 1.95 Hz, 2H)	134.04	H-8
9	H-9	-	134.82	-
10	H-10	7.26-7.24 (m, 2H)	128.43	H-10
11	-	-	166.05	-
12	Ν	-	-	-
13	H-13	<b>4.14</b> (s, 4H)	51.54	H-13
14	-	-	170.00/170.05/169.53	-
15	H-15	<b>3.69</b> (s, 6H)	52.39	H-15
16	H-16	<b>3.68</b> (m, 4H)	47.30	H-16
17,19	H-17,19	3.45-3.68 (m, 8H)	70.43/70.39/70.31	H-17,19
			70.19/70.02/69.91	
20	H-20	<b>2.33</b> (s,3H)	20.81	H-20

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6c



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$
Ένωση <b>3c</b>	238.62	0.39	1.64 <sup>(1.5)</sup>		
Ένωση <b>2c</b>	292.33	0.16	$0.55^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.21	1.64 <sup>(1.5)</sup>	0.29	0.742
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			6.00	1.492

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 4 ώρες και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel με σύστημα έκλουσης 5% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 280 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 73.08%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 697.4 [M+H]<sup>+</sup>, **719.4** [M+Na]<sup>+</sup>, 720.5 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

735.4  $[M+K]^+$ 



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	О	-	-	-
2	-	-	157.51	-
3	-	-	124.90	-
4	H-4	7.89 (s, 2H)	143.67	H-4
5	-	-	118.81	-
6	-	-	147.07	-
7	-	-	143.74	-
8	H-8	7.08 (dd, $J_1$ = 7.7 Hz, $J_2$ = 1.3 Hz, 2H)	114.57	H-8
9	H-9	7.20 (dd, $J_1 = J_2 = 7.7$ Hz, 2H)	124.88	H-9
10	H-10	7.05 (dd, $J_1$ = 7.7 Hz, $J_2$ = 1.3 Hz, 2H)	119.92	H-10
11	-	-	165.94	-
12	N	-	-	-
13	H-13	4.33 (s, 4H)	48.07	H-13
14	-	-	169.45	-
15	H-15	3.72 (s, 6H)	52.24	H-15
16	H-16	3.71 (m, 4H)	50.04	H-16
17,19	H-17,19	3.47-3.70 (m, 8H)	70.33	H-17,19
			69.98	
20	H-20	3.92 (s, 6H)	56.29	H-20

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	157.53/157.50/157.48	-
3	-	-	124.90	-
4	H-4	<b>7.91/7.88/7.87</b> (s, 2H)	144.05	H-4
5	-	-	118.86/118.83	-
6	-	-	147.07	-
7	-	-	143.64	-
8	H-8	<b>7.09</b> (dd, J <sub>1</sub> = 7.7 Hz, J <sub>2</sub> = 1.3 Hz, 2H)	114.57	H-8
9	H-9	<b>7.21</b> (dd, $J_1 = J_2 = 7.7$ Hz, 2H)	124.86	H-9
10	H-10	7.05 (dd, $J_1$ = 7.7 Hz, $J_2$ = 1.3 Hz, 2H)	119.92/119.86/119.81	H-10
11	-	-	165.94/165.92/165.89	-
12	N	-	-	-
13	H-13	<b>4.15</b> (s, 4H)	51.46	H-13
14	-	-	169.99/169.96/169.48	-
15	H-15	<b>3.73</b> (s, 6H)	52.35	H-15
16	H-16	<b>3.49</b> (m, 4H)	47.32	H-16
17,19	H-17,19	3.47-3.70 (m, 8H)	70.37/70.33/70.26	H-17,19
			70.08/69.96/69.86	
20	H-20	<b>3.92/3.92/3.91</b> (s, 6H)	56.29	H-20

## <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 6d</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V(ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$
	σαμος				
Ένωση <b>3d</b>	279.72	0.40	$1.44^{(1.5)}$		
Ένωση <b>2c</b>	292.33	0.14	$0.48^{(0.5)}$		
Διϊσοπροπυλο-αιθυλαμίνη	129.24	0.19	1.44 (1.5)	0.25	0.742
CHCl <sub>3</sub> (ξηρό,σταθ.amylene)	119.38			6.00	1.492

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **4a**.

Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 3.5 ώρες και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel με σύστημα έκλουσης 2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Παραλαμβάνονται 120 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 32.09%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) positive ionization: 779.4 [M+H]<sup>+</sup>, 801.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 802.5 [M+H+Na]<sup>+</sup>,

817.3 [M+K]<sup>+</sup>



Position ( <b>major</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	159.20	-
3	-	-	116.15	-
4	H-4	7.83 (s, 2H)	144.89	H-4
5		-	107.72	
6	-	-	157.22	-
7	H-7	6.47 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 2H)	96.97	H-7
8	-		151.66	_
9	H-9	6.62 (dd, $J_1$ = 9.0 Hz, $J_2$ = 2.3 Hz, 2H)	109.41	Н-9
10	H-10	7.29 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H)	129.86	H-10
11	_		167.29	_
12	N	-	-	-
13	H-13	4.34 (s, 4H)	48.31	H-13
14	-	-	169.79	_
15	H-15	3.74 (s, 6H)	52.12	H-15
16	H-16	3.73 (m, 4H)	50.15	H-16
17,19	H-17,19	3.49-3.72 (m, 4H)	70.57	H-17,19
			70.34	
20,22	H-20,22	3.41 (q, <i>J</i> =7.1 Hz, 8H)	44.99	H-20,22
21,23	H-21,23	1.20 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 12H)	12.45	H-21,23

Position ( <b>minor</b> )	Atom	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$	HSQC
1	0	-	-	-
2	-	-	159.14	-
3	-	-	116.15	-
4	H-4	<b>7.82</b> (s, 2H)	145.31	H-4
5	-	-	107.72	-
6	-	-	157.24	-
7	H-7	6.47 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 2H)	96.94	H-7
8	-	-	151.66	-
9	Н-9	6.62 (dd, $J_1$ = 9.0 Hz, $J_2$ = 2.3 Hz, 2H)	109.41	H-9
10	H-10	<b>7.28</b> (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H)	129.97	H-10
11	-	-	167.34	-
12	N	-	-	-
13	H-13	4.21 (s, 4H)	51.68	H-13
14	-	-	170.31	-
15	H-15	3.74 (s, 6H)	52.19	H-15
16	H-16	<b>3.54</b> (m, 4H)	47.43	H-16
17,19	H-17,19	3.49-3.72 (m, 4H)	70.31	H-17,19
			70.06	
20,22	H-20,22	3.41 (q, <i>J</i> =7.1 Hz, 8H)	44.99	H-20,22
21,23	H-21,23	<b>1.24/1.22/1.18</b> (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 12H)	12.45	Н-21,23

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5α



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d (^{g}/_{ml})$	C(mol/lt)
	_					
Ένωση <b>4a</b>	536.53	0.037	$0.069^{(1.0)}$			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.013	$0.228^{(3.3)}$	0.046		0.25
MeOH	32.04			0.91	0.791	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το starting material προστίθενται 0.9 ml MeOH, ακολουθεί ανάδευση έως διάλυσής του και στη συνέχεια προστίθενται 46 μlt υδατικού διαλύματος KOH 5M. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρα.

Στη φιάλη της αντίδρασης προστίθεται αρκετή ποσότητα διαιθυλαιθέρα προκειμένου να καταβυθιστεί το προϊόν. Το μίγμα μεταφέρεται σε προζυγισμένα vials και ακολουθούν φυγοκεντρήσεις για την απομάκρυνση του διαιθυλαιθέρα. Ακολούθως, πραγματοποιούνται φυγοκεντρήσεις του ιζήματος με 50% CH<sub>3</sub>CN / Et<sub>2</sub>O για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων (x3) και ξανά με Et<sub>2</sub>O για την απομάκρυνση όλων των υπόλοιπων διαλυτών και της υγρασίας (x5). Παραλαμβάνονται 20 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 47.62%).

#### *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:



94


Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	О	-	nd ( not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	nd
4	H-4	7.73-7.65 (m, 1H)	145.36
5	-	-	nd
6	-	-	nd
7	H-7	7.23 (br.d, <i>J</i> = 7.84 Hz, 1H)	nd
8	H-8	7.31 (br.d, <i>J</i> = 7.49 Hz, 1H)	130.21
9	H-9	7.20 (br.d, <i>J</i> = 7.63 Hz, 1H)	125.79
10	H-10	7.35 (br.d, <i>J</i> = 7.46 Hz, 1H)	133.78
11	-	-	nd
12	Ν	-	-
13	H-13	4.17 (s, 2H)	52.71
14	-	-	174.22
15	H-15	3.63 (br.t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	52.73
16,18,19,21	H-16,18,19,21	3.75-3.61 (overlap, 8H)	70.32/70.12/70.02/69.95
17,20	О	-	-
22	H-22	2.87 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H)	56.21
23	Ν	-	-
24,26	H-24,26	3.68 (overlap, 4H)	58.97
25,27	-	-	179.33

# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5b



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d(^{g}/_{ml})$	C(mol/lt)
	Dupoş					
Ένωση <b>4b</b>	550.56	0.053	$0.096^{(1.0)}$			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.018	0.318 <sup>(3.3)</sup>	0.064		0.25
MeOH	32.04			1.30	0.791	

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

Παραλαμβάνονται 46 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 71.93%).

### *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:





Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	122.83
4	H-4	7.19 (s, 1H)	144.63
5	-	-	118.49
6	-	-	nd
7	H-7	6.79 (br.d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H)	116.06
8	H-8	7.06 (br.d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H)	135.37
9	H-9	-	136.55
10	H-10	6.95 (br.d, <i>J</i> = 4.65 Hz, 1H)	129.50
11	-	-	168.25
12	Ν	-	-
13	H-13	4.19 (s, 2H)	50.72
14	-	-	174.78
15	H-15	3.78-3.50 (unresolved multiplet, 2H)	50.74
16,18,19,21	H-16,18,19,21	3.78-3.50 (unresolved multiplet, 8H)	70.46/70.35/70.21/70.11
			overlapping
17,20	0	-	-
22	H-22	2.88 (t, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H)	53.74
23	Ν	-	-
24,26	H-24,26	3.60 (overlap, 4H)	58.70
25,27	-	-	179.30
28	H-28	2.20 (s, 3H)	20.46

# ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5c



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d (^{g}/_{ml})$	C(mol/lt)
Ένωση <b>4c</b>	566.55	0.050	$0.088^{(1.0)}$			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.016	0.291 (3.3)	0.058		0.25
MeOH	32.04			1.18	0.791	

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

Παραλαμβάνονται 50 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 88.95%).

## *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:





Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	160.30
3	-	-	nd
4	H-4	nd	144.73
5	-	-	119.19
6	-	-	nd
7	H-7	-	144.70
8	H-8	6.90-6.85 (m, 1H)	113.30
9	H-9	6.53 (dd, $J_1 = J_2 = 7.2$ Hz, 1H)	nd
10	H-10	6.98-6.90 (m, 1H)	119.99
11	-	-	nd
12	Ν	-	-
13	H-13	4.18 (s, 2H)	46.59
14	-	-	176.83
15	H-15	3.75 (overlap, 2H)	50.90
16,18,19,21	H-16,18,19,21	3.75-3.53 (overlap, 8H)	70.40/70.32/70.27/70.13
17,20	0	-	-
22	H-22	2.84 (overlap, 2H)	54.9
23	Ν	-	-
24,26	H-24,26	3.55/3.53 (overlap, 4H)	56.87/56.79
25,27	-	-	176.60
28	H-28	3.75 (overlap, 3H)	58.60

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5d</u>



Ένωση	Μοριακό	<i>m</i> ( <i>g</i> )	mmoles (eq)	V(ml)	$d(^{g}/_{ml})$	C(mol/lt)
	Βάρος					
Ένωση <b>4d</b>	607.65	0.040	0.066 <sup>(1.0)</sup>			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.012	0.217 <sup>(3.3)</sup>	0.044		0.25
MeOH	32.04			0.89	0.791	

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

Παραλαμβάνονται 38 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 84.69%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:



[ 608.10 ]



100



Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	nd
4	H-4	8.15 (s, 1H)	148.12
5	-	-	108.44
6	-	-	nd
7	H-7	6.40 (br.s, 1H)	97.16
8	H-8	-	153.10
9	H-9	6.65 (br.d, J= 8.7 Hz, 1H)	110.88
10	H-10	7.34 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H)	131.38
11	-	-	nd
12	Ν	-	-
13	H-13	4.00 (s, 2H)	47.73
14	-	-	174.78
15	H-15	3.51 (overlap, 2H)	50.73
16,18,19,21	H-16,18,19,21	3.68-3.59 (m, 8H)	70.36/70.10/70.06/69.45
17,20	0	-	-
22	H-22	2.95 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 2H)	56.17
23	N	-	-
24,26	H-24,26	3.61/3.62 (overlap, 4H)	58.97
25,27	-	-	nd
28,30	H-28,30	3.41 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz, 4H)	45.36
29,31	H-29,31	1.03 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H)	12.30

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7a</u>



Ένωση	Μοριακό	<i>m</i> ( <i>g</i> )	mmoles (eq)	V(ml)	$d \left( \frac{g}{ml} \right)$	C(mol/lt)
	Βάρος					
Ένωση <b>6a</b>	636.60	0.038	0.060 <sup>(1.0)</sup>			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.007	0.131 (2.2)	0.026		0.25
МеОН	32.04			0.52	0.791	

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

Παραλαμβάνονται 29 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 70.59%).

### *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:









[ 667.20 ]

[ 652.10 ]

[ 609.20 ]



Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	126.36
4	H-4	7.68 (br.s, 2H)	nd
5	-	-	120.40
6	-	-	155.66
7	H-7	7.32-7.19 (m, 2H)	117.04
8	H-8	7.43-7.28 (m, 2H)	131.32
9	H-9	7.32-7.19 (m, 2H)	123.13
10	H-10	7.43-7.28 (m, 2H)	130.24
11	-	-	172.22
12	N	-	-
13	H-13	4.38 (s, 4H)	50.69
14	-	-	173.36
15,16,18	H-15,16,18	3.77 (s, 6H)	49.54/70.36/69.71
17	0	-	-

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7b</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$	C(mol/lt)
Ένωση <b>6b</b>	664.66	0.045	0.068 <sup>(1.0)</sup>			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.008	0.149 <sup>(2.2)</sup>	0.030		0.25
МеОН	32.04			0.6	0.791	

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

[ 635.60 ]

Παραλαμβάνονται 24 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 49.52%).

## *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:



[ 712.10 ]

[ 317.30 ]



[ 449.50 ]



Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	123.52
4	H-4	7.48 (br.s, 2H)	144.67
5	-	-	nd
6	-	-	153.80
7	H-7	7.00-6.91 (m, 2H)	116.90
8	H-8	7.15 (br.d, 2H)	130.19
9	H-9	-	131.84
10	H-10	7.00-6.91 (m, 2H)	129.51
11	-	-	172.95
12	Ν	-	-
13	H-13	3.90 (br.s, 4H)	49.52
14	-	-	176.21
15,16,18	H-15,16, 18	3.75-3.62 (overlap, 12H)	50.17/70.34/70.17
17	0	-	-
19	H-19	2.17 (s, 6H)	20.46-20.06 multiple signals

## ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7c



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$	C(mol/lt)
Ένωση <b>6c</b>	696.65	0.060	0.086 <sup>(1.0)</sup>			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.011	0.189 <sup>(2.2)</sup>	0.038		0.25
МеОН	32.04			0.76	0.791	

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης **5a**.

Παραλαμβάνονται 45 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 70.26%).

#### *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ* ΔΕΔΟΜΕΝΑ

LC-MS (m/z) negative ionization:







[ 681.40 ]





106

[ 637.10 ]

[ 569.30 ]



Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$
1	0	-	nd (not detected)
2	-	-	nd
3	-	-	123.30
4	H-4	8.09 (br.s, overlap, 2H)	nd
5	-	-	119.73
6	-	-	148.90
7	H-7	-	nd
8	H-8	6.98-6.91 (m, 2H)	113.42
9	H-9	6.98-6.91 (m, 2H)	123.38
10	H-10	6.83-6.77 (m, 2H)	122.15
11	-	-	172.21
12	Ν	-	-
13	H-13	4.26 (s, 4H)	49.53
14	-	-	173.36
15,16,18	H-15,16,18	3.77-3.61 (overlap, 12H)	50.77/70.35/69.77
17	0	_	-
19	H-19	3.80 (br.s, 6H)	56.80

# <u>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7d</u>



Ένωση	Μοριακό Βάρος	<i>m</i> (g)	mmoles <sup>(eq)</sup>	V (ml)	$d \left( {}^{g} / {}_{ml} \right)$	C(mol/lt)
Ένωση <b>6d</b>	778.84	0.040	0.051 <sup>(1.0)</sup>			
υδ. διάλυμα ΚΟΗ 5Μ	56.11	0.006	0.113 <sup>(2.2)</sup>	0.023		0.25
MeOH	32.04			0.46	0.791	

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, αντιστοιχεί σε αυτήν της ένωσης 5a.

Παραλαμβάνονται 22 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 52.16%).

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

[ 749.30 ]

LC-MS (m/z) negative ionization:



108



Position	Atom	$\delta^{1}$ H (Tentative Identification)	$\delta^{13}C$	
1	0	-	nd (not detected)	
2	-	-	nd	
3	-	-	116.98	
4	H-4	8.14 (s, 2H)	148.12	
5	-	-	108.44	
6	-	-	nd	
7	H-7	6.38 (br.s, 2H)	96.77	
8	H-8	-	152.93	
9	H-9	6.61 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H)	110.84	
10	H-10	7.32 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 2H)	131.36	
11	-	-	nd	
12	Ν	-	-	
13	H-13	4.02 (br.s, 4H)	49.54	
14	-	-	nd	
15,16,18	H-15,16,18	3.70-3.56 (m, overlap, 12H)	50.82/70.69/70.40	
17	0	-	-	
19,21	H-19,21	3.34 (q, <i>J</i> =7.2 Hz, 8H)	45.34	
20,22	H-20,22	1.09 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 12H) 12.31		

#### 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- <sup>1</sup> Tsien, R. Y. *Biochemistry* **1980**, *19*, 2396.
- <sup>2</sup> Martell, A. E.; Smith, R. M. Critical Stability Constants, Vol. 1, Plenum Press, New York, **1974**.
- <sup>3</sup> Hellam, D. C.; Podolsky, R. J. J. Physiol. (London) **1969**, 200, 807.
- <sup>4</sup> Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. J. Biol. Chem. 1985, 260, 3440.
- <sup>5</sup> Tsien, R. Y. *Trends Neurosc.* **1988**, *11*, 419.
- <sup>6</sup> Takahashi, A.; Camacho, P.; Lechleiter, J. D.; Herman, B. Physiol. Rev. 1999, 79, 1089.
- <sup>7</sup> Tsien, R. Y. Nature **1981**, *290*, 527.
- <sup>8</sup> Katerinopoulos, H. E.; Foukaraki, E. Current Medicinal Chemistry 2002, 9, 275.

<sup>9</sup> Haugland, R.P. *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* 9<sup>th</sup> ed., Molecular Probes, Eugene **2002**.

- <sup>10</sup> Grienberger, C.; Konnerth, A. Neuron **2012**, 73, 862-885.
- <sup>11</sup> Mbatia H. W.; Burdette, S. C.*Biochemistry*, **2012**, *51*, 7212–7224.
- <sup>12</sup> DeMarinis, R. M.; Katerinopoulos, H. E.; Muirhead, K. **1989**, U.S. Patent 196654.
- <sup>13</sup>. Minta, A.; Kao, J. P.; Tsien, R. Y. J. Biol. Chem. 1989, 264, 8171.

<sup>14</sup>. Smith, G. A.; Metcalfe, J. C.; Clarke, S. D. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1993, 2, 1195.

<sup>15</sup>. Katerinopoulos, H. E.; Iatridou, E.; Foukaraki, E.; Kuhn, M. A.; Malekzeder, N.; Lugade, A. **1996**, U.S. Patent 5,501,980.

<sup>16</sup>. Liepouri, F.; Foukaraki, E.; Deligeorgiev, T. G.; Katerinopoulos, H. E. Cell Calcium 2001, 30, 331.

<sup>17</sup> Katerinopoulos H E.Curr. Pharm. Design 2004, 30, 3835-3852.

<sup>19</sup> Illner, H.; McGuigan, J. A.; Luthi, D. Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol. 1992, 422, 179.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Raju, B.; Murphy, E.; Levy, L. A.; Hall, R. D.; London, R. E. Am. J. Physiol.-Cell Ph. 1989, 256, C540.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Vallee, B. L.; Falchuk, K. H. Physiol. Rev. **1993**, 73, 79.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Katerinopoulos, H.E.; Foukaraki, E.; Kapetanaki, S.; Hoyland, M.; Kuhn, M.A. 208th Amer. Chem. Soc. Meeting, Washington, DC, August **1994**, Abstr. MEDI 243

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup>. Gee, K. R.; Zhou, Z.-L.; Qian, W.-J.; Kennedy, R. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 776.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Liang, J.; Canary, J.W. Angew. Chem., Int. Ed. Engl, 2010, 49, 7710.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> R. G. Pearson, J. Chem Educ. **1968**, 45, 581.

<sup>25</sup> Leray I.; Valeur B. Eur. J. Inorg. Chem. 2009, 24, 3525.

<sup>26</sup> Valeur, B.; Leray, I. Coord. Chem. Rev. 2000, 205, 3.

<sup>27</sup> P. Jiang P.; Guo, Z. Coord. Chem. Rev. **2004**, 248, 205–229.

<sup>28</sup> B. Valeur, I. Leray, Coord. Chem. Rev. 2000, 205, 3–40.

<sup>29</sup> To date the EGTA analogs, namely EGDA and EGTRA have not been reported in the literature. In contrast, the corresponding EDTA analogs have been studied as ion chelators: Blackmer, G. L.; Hamm, R. E.;and Legg, J. I.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*,6632-6637; Brunos, A. J.; Chaberek, S.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *78*, 2723-2728.

<sup>30</sup> Corrie, J. E. T.; Munasinghe, V. R. N. J. Heterocyclic Chem. 2000, 37, 1447-1455.

<sup>31</sup> Iatridou, H.; Foukaraki, E.; Kuhn, M. A.; Marcus, E. M.; Haugland, R. P.; Katerinopoulos, H. E. *Cell Calcium* **1994**, *15*, 190-198.

<sup>32</sup> Bigi, F.; Chesini, L.; Maggi, R.; Sartori, G. J.Org. Chem. 1999, 64, 1033-1035.

<sup>33</sup> Long, L.; Wu, Y.; Wang, L.; Gong, A.; Hu, F.; Zhang, C. Chem. I Commun. **2015**, *51*, 10435-10438.

<sup>34</sup> For a similar method on coumarin acid chloride preparation see: Phillips, L. R.; Supko, J. G.; Wolfe, T. L.; Malspeis, L. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1805-1814.

<sup>35</sup> For tables of bond lengths determined by X-Ray and Neutron Diffraction, see: Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen. A. G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, S1-S19.

<sup>36</sup> For a case of clear preference on heavy metal in a competition study see: Roussakis, E.; Pergantis, S.A.; Katerinopoulos, H. E. *Chem. Commun.* **2008**, *46*, 6221-6223.