

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

**«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ  
ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΟΣ ΔΕΙΚΤΗ  $Zn^{2+}$   
ΤΥΠΟΥ TREN»**

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΔΑΚΑΝΑΛΗ**

ΕΠΙΒΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΟΥΝΙΟΣ 2004

Στην οικογένεια μου

# ΔΑΚΑΝΑΛΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

---

## Προσωπικές Πληροφορίες

---

Όνοματεπώνυμο: Μαριάννα Δακανάλη  
Ημερομηνία Γέννησης: 11 Μαΐου 1977  
Τόπος Γέννησης: Αθήνα  
Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση κατοικίας: Χαλέπας 27  
Μασταμπάς, Ηράκλειο,  
71305, Κρήτης.  
Τηλ. 281031566

Διεύθυνση εργασίας: Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Τμήμα Χημείας  
71 409, Ηράκλειο, Κρήτης.  
Τηλ.: +302810 393 642  
fax: +302810 393 601

E-mail: dakanalim@chemistry.uoc.gr

## Σπουδές

---

1996 - 2001: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2001 - 2004: Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική  
Δραστικότητα (Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.)  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

18-30.08.2002: International Summer School for Postdoctoral Scientists and  
Advanced Students.  
Nato Advanced Study Institute.  
Spetses, Greece.

## Υποτροφίες - Βραβεία

---

02/2002-09/2002: Υποτροφία Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών  
Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα

07/2003: Βραβείο Sigma-Aldrich

## Εργαστηριακή Εμπειρία

---

1998: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Εργαστηριακή  
βοηθός, Εργαστήρια Γενικής Χημείας, στα πλαίσια της  
έμμισθης απασχόλησης φοιτητών.

- 1998 - 2001: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας,  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.  
Τίτλος: “Σύμπλοκα μετάλλων με οργανικούς υποκαταστάτες”.  
Υπεύθυνος καθηγητής: Αναπληρωτής Καθηγ. Α. Σαλίφογλου.
- 2002 - 2004: Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας στα πλαίσια του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης,  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.  
Τίτλος: “Σχεδιασμός, συνθετικές προσεγγίσεις και σύνθεση  
φθορίζοντος δείκτη ιόντων  $Zn^{2+}$  τύπου TREN”.  
Υπεύθυνος καθηγητής: Καθηγητής. Χ. Ε. Κατερινόπουλος.

### **Επαγγελματική & Διδακτική Εμπειρία**

---

- 1999: Πρακτική άσκηση προπτυχιακών φοιτητών: Οиноποιείο  
Αγροτικού Συνεταιρισμού Αρχανών, Αρχάνες, Ηράκλειο,  
Κρήτης.
- 09/2000 & 2001: Βοηθός χημικού, Οиноποιείο Αγροτικού Συνεταιρισμού  
Αρχανών, Αρχάνες, Ηράκλειο, Κρήτης.
- 2002: Εργαστηριακή βοηθός, εργαστήρια Ανόργανης χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 01/2003-03/2003: Τεχνικός εργαστηρίου, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική  
Δραστικότητα (Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.).
- 01/2004-03/2004: Τεχνικός εργαστηρίου, Πρόγραμμα “Ανάπτυξη μεθόδων  
παραγωγής προϊόντων με βάση τις φυτικές βαφές και  
ταυτοποίηση συστατικών αιθέριων φυτών της Κρήτης”  
Πρόγραμμα CRINNO, Περιφέρεια Κρήτης.
- 09/2002- 05/2003 & 10/2003- 05/2004: Διδασκαλία στα πλαίσια του προγράμματος Πρόσθετης  
Διδακτικής Στήριξης, Ενιαίο Λύκειο Αρχανών,  
Αρχάνες, Ηράκλειο, Κρήτης.
- 2003: Διδασκαλία φροντιστηριακών ασκήσεων Οργανικής Χημείας  
III Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

### **Τεχνικές Ικανότητες**

---

Χειρισμός: FT-IR, UV-Vis, 300MHz NMR, GC/MS

### **Ξένες Γλώσσες**

---

First Certificate in English, Cambridge University  
Grundstufe Zertifikat Goethe Institut

## Διοικητικές Ικανότητες

---

- 1998-2000: Γενική Γραμματέας, Σύλλογος Προπτυχιακών Φοιτητών Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 1998-2001: Εκπρόσωπος προπτυχιακών φοιτητών στη Γενική Συνέλευση Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 1998: Γραμματειακή υποστήριξη, Εθνικό πρόγραμμα αξιολόγησης: Αποτίμηση ερευνητικού και διδακτικού έργου Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 1999-2000: Εκπρόσωπος προπτυχιακών φοιτητών χημείας στη Σύγκλητο του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2000-2001: Αντιπρόεδρος, Σύλλογος Προπτυχιακών Φοιτητών Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2002-2003: Ταμίας, Σύλλογος Μεταπτυχιακών Φοιτητών Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2002: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής του 8<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Κρήτη.
- 2003: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής του 9<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Κρήτη.
- 2003 - 2004: Πρόεδρος Συλλόγου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2002-2004: Εκπρόσωπος μεταπτυχιακών φοιτητών στη Γενική Συνέλευση Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

## Δημοσιεύσεις

---

1. Synthesis, spectroscopic, and structural characterization of the first aqueous cobalt (II)-citrate complex: toward a potentially bioavailable form of cobalt in biologically relevant fluids.  
M. Matzapetakis, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, V. Tangoulis, A. Terzis, N. Moon, J. Giapintzakis, A. Salifoglou. *JBIC* **2000**, *5*, 469-474.
2. Manganese Citrate Chemistry: Synthesis, Spectroscopic Studies, and Structural Characterization of Novel Mononuclear, Water-Soluble Manganese Citrate Complexes.  
M. Matzapetakis, N. Karligiano, A. Bino, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, V. Tangoulis, A. Terzis, J. Giapintzakis, A. Salifoglou. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4044-4051.
3. Synthesis, pH-Dependent Structural Characterization, and Solution Behaviour of Aqueous Aluminum and Gallium Citrate Complexes.  
M. Matzapetakis, M. Kourgiantakis, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, T. Kiss, I. Banyai, L. Iordanidis, T. Mavromoustakos, A. Salifoglou. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 1734-1744.
4. A novel dinuclear species in the aqueous distribution of Aluminum in the presence of citrate.  
Dakanali M.; Raptopoulou C.P.; Terzis A.; Lakatos A.; Banyai I.; Kiss T.; Salifoglou A.. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 252-254.
5. Synthesis and spectroscopic and structural studies of a new cadmium(II)-citrate aqueous complex. Potential relevance to cadmium(II)-citrate speciation and links to cadmium toxicity.  
Dakanali M.; Kefalas E. T.; Raptopoulou C. P.; Terzis A.; Mavromoustakos T.; Salifoglou A.. *Inorganic Chemistry*, **2003**, *42*, 2531-2537.
6. A new dinuclear Ti(IV)-peroxo-citrate complex from aqueous solutions. Synthetic, structural, and spectroscopic studies in relevance to aqueous titanium(IV)-peroxo-citrate speciation.  
Dakanali M.; Kefalas E. T.; Raptopoulou C. P.; Terzis A.; Voyiatzis G.; Kyrikou I.; Mavromoustakos T.; Salifoglou A.. *Inorganic Chemistry*, **2003**, *42*, 4632-4639.

## **Παρουσιάσεις σε Διεθνή Συνέδρια**

---

Aluminum citrate chemistry in neurodegenerative diseases.

M. Kourgiantakis, M. Dakanali, M. Matzapetakis, K.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, T. Kiss, A. Salifoglou.

5<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry

13-17 April 1999, Corfu, Greece.

Synthesis of potential fluorescent Zinc indicators.

A. Akoumianaki, M. Dakanali, A. R. Kay, H. E. Katerinopoulos.

Chemical Probes in Biology

18-30 August 2002, Spetses, Greece.

## **Παρουσιάσεις σε Εθνικά Συνέδρια**

---

Σύνθεση Φθοριζόντων Δεικτών Ιόντων Ψευδαργύρου

M. Δακανάλη, A. Ακουμιανάκη, A. R. Kay, X. E. Κατερινόπουλος.

19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας

6-10 Νοεμβρίου 2002, Ηράκλειο, Κρήτη.

Απομόνωση και Χαρακτηρισμός των  $[\text{NH}_4]_5[\text{Ti}_4(\text{O}_2)_4(\text{citr})_2(\text{citrH})_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  και  $[\text{K}^+]_7[\text{Ti}_4(\text{O}_2)_4(\text{citr})_2(\text{citrH})_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  στα Πλαίσια Υδατικής Χημείας Τιτανίου με το Φυσιολογικό Κιτρικό Οξύ

E. Κεφάλας, M. Δακανάλη, A. Σαλίφογλου

19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας

6-10 Νοεμβρίου 2002, Ηράκλειο, Κρήτη.

## **Παρουσιάσεις σε Συνέδρια Μεταπτυχιακών Φοιτητών Τμήματος Χημείας**

---

Σύνθεση Φθοριζόντων Δεικτών Ιόντων Ψευδαργύρου

M. Δακανάλη, A. Ακουμιανάκη, A. R. Kay, X. E. Κατερινόπουλος.

8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας

28-30 Ιουνίου 2002, Ανώγεια, Κρήτη.

Σύνθεση Δεικτών Φθορισμού Ψευδαργύρου

M. Δακανάλη, X. E. Κατερινόπουλος.

9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας

27-29 Ιουνίου 2003, Ανώγεια, Κρήτη.

# DAKANALI MARIANNA

---

## Personal Information

---

Name: Dakanali Marianna  
Date of Birth: 11 May 1977  
Place of Birth: Athens, Greece  
Citizenship: Greek

Home address: 27 Halepas st.  
Mastabas, Heraklion,  
71305, Crete, Greece  
Tel. 281031566

Business Address: University Of Crete  
Department of Chemistry  
71 409, Heraklion, Crete, Greece  
tel: +30810 393 642  
fax: +30810 393 601

E-mail: dakanalim@chemistry.uoc.gr

## Education

---

1996 - 2001: B.Sc. Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

2002 - 2004: Graduate Program in Organic Chemistry (E.Π.E.A.E.K.)  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

18-30.08.2002: International Summer School for Postdoctoral Scientists and  
Post-Graduate Students.  
Nato Advanced Study Institute.  
Spetses, Greece.

## Fellowships - Awards

---

02/2002-09/2002: Graduate Fellowship: Graduate Program in Organic Chemistry  
(E.Π.E.A.E.K.).

07/2003: Sigma-Aldrich Award.

## Laboratory Experience

---

1998: Department of Chemistry, University of Crete, Greece.  
Undergraduate assistant: General Chemistry Laboratory



- 1998 - 2001: Research Assistant, Department of Chemistry  
University of Crete, Greece.  
Diploma Thesis: "Metal complexes with organic ligands".  
Supervisor: Associate Prof. A. Salifoglou.
- 2002 – 2004: Research Assistant,  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece.  
M.S. Thesis: "Design, Synthetic Approaches and Total  
Synthesis of a New TREN-type Fluorescent Zinc Probe".  
Supervisor: Prof. H. E. Katerinopoulos.

### **Professional & Teaching Experience**

---

- 1999: Industrial Training of Undergraduate Chemistry Students:  
Training at the Winery of the Agricultural Cooperative of  
Arhanes, Heraklion, Crete.
- 09/2000 & 2001: Assistant Chemist, Winery of the Agricultural Cooperative of  
Arhanes, Heraklion, Crete.
- 2002: Teaching assistant, Inorganic Chemistry laboratory.  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
- 01/2003-03/2003: Laboratory Assistant, Graduate Program: "Isolation and  
Synthesis of Natural Products with Biological Activity.  
EPEAEK), E.U. and Greek Ministry of Education.
- 01/2004-03/2004: Research Fellow, Crete Innovating Region (CRINNO)  
Program: "Production of Industrial Materials Based on Natural  
Colorings and Essential Oils from the Flora of Crete".
- 09/2002- 05/2003 & 10/2003- 05/2004: Teaching in the Secondary Education Program of Supporting  
Education in the High School of Arhanes, Heraklion, Crete.
- 2003: Teaching assistant, Organic Chemistry III  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

### **Technical Skills**

---

Operation of: FT-IR, UV-Vis, 300MHz NMR., GC/MS

### **Languages**

---

First Certificate in English, Cambridge University

Grundstufe Zertifikat Goethe Institut

---

## **Administrative Skills**

---

- 1998-2000: General Secretary, Undergraduate Student Association  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
- 1998-2001: Student Representative, General Assembly  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
- 1998: Assistant Secretary, National Evaluation Program: Evaluation  
of the Chemistry Department, University of Crete.
- 1999-2000: Student Representative, University Senate.
- 2000-2001: Vice President, Undergraduate Student Association  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
- 2002- 2003 : Treasurer, Graduate Student Association  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
- 2002: Organizing Committee 8<sup>th</sup> National Meeting of Graduate  
Chemistry Students, Crete, Greece
- 2003: Organizing Committee 9<sup>th</sup> National Meeting of Graduate  
Chemistry Students, Crete, Greece
- 2003 -2004: President, Graduate Student Association  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
- 2002-2004: Graduate student Representative, General Assembly  
Department of Chemistry, University of Crete, Greece

## Publications

---

1. Synthesis, spectroscopic, and structural characterization of the first aqueous cobalt (II)-citrate complex: toward a potentially bioavailable form of cobalt in biologically relevant fluids.  
M. Matzapetakis, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, V. Tangoulis, A. Terzis, N. Moon, J. Giapintzakis, A. Salifoglou. *JBIC* **2000**, *5*, 469-474.
2. Manganese Citrate Chemistry: Synthesis, Spectroscopic Studies, and Structural Characterization of Novel Mononuclear, Water-Soluble Manganese Citrate Complexes.  
M. Matzapetakis, N. Karligiano, A. Bino, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, V. Tangoulis, A. Terzis, J. Giapintzakis, A. Salifoglou. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4044-4051.
3. Synthesis, pH-Dependent Structural Characterization, and Solution Behaviour of Aqueous Aluminum and Gallium Citrate Complexes.  
M. Matzapetakis, M. Kourgiantakis, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, T. Kiss, I. Banyai, L. Iordanidis, T. Mavromoustakos, A. Salifoglou. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 1734-1744.
4. A novel dinuclear species in the aqueous distribution of Aluminum in the presence of citrate.  
Dakanali M.; Raptopoulou C.P.; Terzis A.; Lakatos A.; Banyai I.; Kiss T.; Salifoglou A.. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 252-254.
5. Synthesis and spectroscopic and structural studies of a new cadmium(II)-citrate aqueous complex. Potential relevance to cadmium(II)-citrate speciation and links to cadmium toxicity.  
Dakanali M.; Kefalas E. T.; Raptopoulou C. P.; Terzis A.; Mavromoustakos T.; Salifoglou A.. *Inorganic Chemistry*, **2003**, *42*, 2531-2537.
6. A new dinuclear Ti(IV)-peroxo-citrate complex from aqueous solutions. Synthetic, structural, and spectroscopic studies in relevance to aqueous titanium(IV)-peroxo-citrate speciation.  
Dakanali M.; Kefalas E. T.; Raptopoulou C. P.; Terzis A.; Voyiatzis G.; Kyrikou I.; Mavromoustakos T.; Salifoglou A.. *Inorganic Chemistry*, **2003**, *42*, 4632-4639.

## **International Meeting Presentations**

---

Aluminum citrate chemistry in neurodegenerative diseases.

M. Kourgiantakis, M. Dakanali, M. Matzapetakis, K.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, T. Kiss, A. Salifoglou.

5<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry  
13-17 April 1999, Corfu, Greece.

Synthesis of potential fluorescent Zinc indicators.

A. Akoumianaki, M. Dakanali, A. R. Kay, H. E. Katerinopoulos.

Chemical Probes In Biology  
18-30 August 2002, Spetses, Greece.

## **National Meeting Presentation**

---

Synthesis of potential fluorescent Zinc indicators.

M. Dakanali, A. Akoumianaki, A. R. Kay, H. E. Katerinopoulos.

19<sup>o</sup> National Meeting of the Greek Chemical Society.  
6-10 November 2002, Heraklion, Crete, Greece.

Isolation and Structure Determination of  $[\text{NH}_4]_5[\text{Ti}_4(\text{O}_2)_4(\text{citr})_2(\text{citrH})_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  and  $[\text{K}^+]_7[\text{Ti}_4(\text{O}_2)_4(\text{citr})_2(\text{citrH})_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  as a Part of a Study on the Aqueous Chemistry of Titanium Ions and Citric Acid in Biological Systems.

E. Kefalas, M. Dakanali, A. Salifoglou

19<sup>o</sup> National Meeting of the Greek Chemical Society.  
6-10 Νοεμβρίου 2002, Ηράκλειο, Κρήτη.

## **Regional Graduate Student Meeting Presentation**

---

Synthesis of potential fluorescent Zinc indicators.

M. Dakanali, A. Akoumianaki, A. R. Kay, H. E. Katerinopoulos.

8<sup>th</sup> Hellenic Meeting of Chemistry Graduate Students  
28-30 June 2002, Anogia, Crete, Greece.

Synthesis of potential fluorescent Zinc indicators-II.

M. Dakanali, H. E. Katerinopoulos.

9<sup>th</sup> Hellenic Meeting of Chemistry Graduate Students  
27-29 June 2003, Anogia, Crete, Greece.

## ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω πολλούς ανθρώπους ο καθένας από τους οποίους με τον τρόπο του συνέβαλε στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και το μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα» για την οικονομική υποστήριξη καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο όχι μόνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω το πειραματικό μέρος του μεταπτυχιακού μου διπλώματος στο εργαστήριό του αλλά πολύ περισσότερο για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια και για τις ατέλειωτες συζητήσεις επί παντός επιστητού!!

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ηλία Κουλαδούρο και τον Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Μανόλη Στρατάκη που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουλαδούρο για τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου σε ότι αφορά σε συνθετικά προβλήματα καθώς επίσης και για το γεγονός ότι ταξίδεψε από την Αθήνα για να παραστεί στην παρουσίασή μου. Σημαντική ήταν η βοήθεια και η καθοδήγηση του κ. Στρατάκη σε ένα μικρό κομμάτι της εργασίας μου που παρουσιάζεται στο παράρτημα. Αισθάνομαι πολύ τυχερή που η τριμελής επιτροπή μου δεν περιορίστηκε μόνο στον "τυπικό" ρόλο της εξέτασης μιας εργασίας αλλά στάθηκε δίπλα μου όποτε την είχα ανάγκη.

Θερμά ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Σπύρο Περγαντή για τη λήψη των φασμάτων MS του τελικού προϊόντος και την Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Μαρία Κανακίδου για τις ατέλειωτες συζητήσεις μας και τη συμπαράστασή της τα τελευταία χρόνια.

Ένα μεγάλο μεγάλο ευχαριστώ στο συνάδελφό μου τα τελευταία χρόνια Μανόλη Ρουσάκη που όχι μόνο υπήρξε ένας πολύ καλός συνεργάτης αλλά και σύμβουλος, βοηθός, φίλος και ήρωας!! Ήρωας που μπόρεσε να αντέξει σχεδόν τρία χρόνια τα νεύρα μου, τις παραξενιές μου, τις απογοητεύσεις μου. Του εύχομαι καλή συνέχεια και καλή επιτυχία σε ότι κι αν κάνει στη ζωή του. Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους μου μεταπτυχιακούς

Κώστα Χατζέλλη και Γεωργία Παγώνα καθώς και όλα τα παιδιά που πέρασαν για διπλωματική αυτά τα χρόνια από το εργαστήριο για την άψογη συνεργασία και το καλό κλίμα που επικρατούσε.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου Άρη Ζάρα, Μαρία Γραμματικοπούλου, Λέττα Τζανάκη, Γεωργία Βίγλη, Βασίλη Στεφανόπουλο, Άγγελο Φιλιππίδη, Ιωσήφ Ευφραιμίδη, Βασίλη Παπαδημητρίου που ξεκινήσαμε μαζί από το πρώτο έτος και όλα αυτά τα χρόνια με στήριζαν ψυχολογικά με την παρέα τους. Ελπίζω να συνεχίσουμε να στηρίζουμε ο ένας τον άλλο όπου κι αν βρισκόμαστε. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Άρη και τη Μαρία που αν δεν διάβαζα μαζί τους δεν θα είχα πάρει ακόμα πτυχίο!!

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά μεταπτυχιακούς φοιτητές της Χημείας και ειδικά τους "Πάνω Πίτες" για τη συντροφιά όλες αυτές τις ώρες στο Πανεπιστήμιο, τις συζητήσεις μας, τα πειράγματά μας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ το διδάκτορα Κώστα Τσιγαρίδη και τον υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Αϊβαλιώτη που μου πρόσφεραν απλόχερα τη φιλία τους.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια τόσο οικονομικά αλλά και ηθικά.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται ο σχεδιασμός, οι συνθετικές προσεγγίσεις και η ολική σύνθεση ενός φθορίζοντα δείκτη ψευδαργύρου.

Η συγκεκριμένη ένωση αποτελεί παράγωγο της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης και του συμπλοκοποιητή ψευδαργύρου TREN. Η επιλογή του χρωμοφόρου έγινε με βάση τα φθορισμομετρικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου παραγώγου της κουμαρίνης και τους αντίστοιχους περιορισμούς που επιβάλλουν η φύση των προς μελέτη υποστρωμάτων και η διαθέσιμη οργανολογία. Η επιλογή του χειλικού μέρους της ένωσης έγινε λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως η συγγένεια του προς το ιόν και η εκλεκτικότητά του σε σχέση με άλλα μέταλλα.

Εκτός από τη σύνθεση του φθορίζοντα δείκτη ψευδαργύρου, η παρούσα εργασία περιλαμβάνει προκαταρκτικές μελέτες του μηχανισμού της δημιουργίας N,N-διυποκατεστημένων φορμικών 2-αμινοαιθυλο εστέρων κατά την κατεργασία N,N-διυποκατεστημένων 2-βρωμοαιθυλο-αμινών με DMF, την διατύπωση μίας πρώτης υπόθεσης για τον μηχανισμό αυτό και προτάσεις για μελλοντικές μελέτες που πιθανόν να οδηγήσουν στην αποσαφήνιση του μηχανισμού.

## *ABSTRACT*

The major goal of this thesis was the design, the synthetic approaches, and the total synthesis of a coumarin-type fluorescent  $Zn^{2+}$  probe.

The structure of the probe is comprised of a fluorophore namely, 2-amino-4-methylcoumarin connected to TREN, a known selective  $Zn^{2+}$  chelator. The choice of the chromophore was based on the fluorescence spectral profile of the coumarin analog, as well as on the respective restrictions posed by the type of the desired zinc-probe applications and the necessary instrumentation. The chelator was selected on the basis of its affinity to zinc ions and its selectivity to  $Zn^{2+}$  versus other ions present in the systems of study.

This thesis also includes a set of preliminary experiments aiming at the study of the formation of N,N-disubstituted 2-aminoethyl formates during the reaction of N,N-disubstituted 2-bromoethylamines with DMF in the presence of DIPEA. A tentative reaction mechanism is proposed as well as a number of substrates to be studied in order to ascertain the detailed mechanism of the reaction.



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ</b>	<b>I</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΑΓΓΛΙΚΑ</b>	<b>VI</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>XI</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ</b>	<b>XIII</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ</b>	<b>XIV</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>XV</b>

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>20</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>23</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>49</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>62</b>

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>65</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>68</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>73</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>77</b>

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ**

## ***EΙΣΑΓΩΓΗ***

### **Γενικά για τον Ψευδάργυρο**

Ο ψευδάργυρος ανήκει στην IIB ομάδα του Περιοδικού Πίνακα των Στοιχείων και έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση  $[Ar]3d^{10}4s^2$ .<sup>1</sup> Όπως γίνεται αντιληπτό από τη διαμόρφωση αυτή ( $d^{10}$ ), απαντάται σε διαλύματα μόνο στην οξειδωτική βαθμίδα  $Zn^{2+}$ .<sup>1</sup> Επιπλέον είναι διαμαγνητικό στοιχείο, οπότε δεν λειτουργεί ως αποσβέστης φθορισμού. Στη φύση συναντώνται τα σταθερά ισότοπα:  $^{64}Zn$ ,  $^{66}Zn$ ,  $^{67}Zn$ ,  $^{68}Zn$  και  $^{70}Zn$ , από τα οποία μόνο ο  $^{67}Zn$  έχει πυρηνικό spin διαφορετικό του μηδενός ( $I=5/2$ ) επιτρέποντας τη μελέτη του ψευδαργύρου με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).<sup>1</sup>

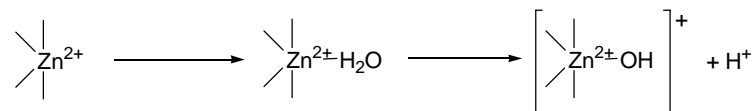
Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλες τις μορφές ζωής από τους μικροοργανισμούς μέχρι τον άνθρωπο.<sup>2</sup> Αν και η ιστορία του αρχίζει από τα προϊστορικά χρόνια, μόλις το 1869 ο *Raulin* διαπίστωσε ότι ο ψευδάργυρος ήταν απαραίτητος για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus niger*,<sup>2</sup> ενώ η αναγκαιότητά του για τα ζώα έγινε γνωστή μετά από πολλά χρόνια (το 1934 για τα ποντίκια και το 1955 για τους χοίρους). Ακόμα πιο αργά, το 1962, ο *Prasad* διαπίστωσε ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο και για τον άνθρωπο.<sup>2</sup>

Ο ψευδάργυρος αν και είναι μόλις το 27<sup>ο</sup> στοιχείο σε αφθονία στον στερεό φλοιό της γης, αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μέταλλο της πρώτης σειράς μεταπτώσεως και της ομάδας IIB που χρησιμοποιούνται από βιολογικά συστήματα για την εκτέλεση των λειτουργιών τους.<sup>3</sup>

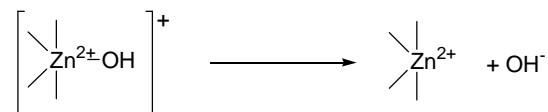
Για να γίνει αντιληπτός ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρά ο ψευδάργυρος με τα βιολογικά συστήματα, χρήσιμο είναι να αναφερθούν μερικές από τις βασικές χημικές ιδιότητές του. Στην οξειδωτική βαθμίδα 2+ στην οποία απαντάται στα διαλύματά του δρα σαν οξύ κατά Lewis. Το ιόν ψευδαργύρου ανήκει κατά *Pearson* στα σκληρά οξέα και επομένως σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με συμπλοκοποιητές (ligands) που φέρουν ως δότες ηλεκτρονίων άτομα οξυγόνου, αζώτου και θείου (σκληρές βάσεις).<sup>2</sup> Σε αντίθεση με το σίδηρο, το χαλκό και το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος λόγω της ηλεκτρονικής του διαμόρφωσης δεν λαμβάνει μέρος σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που συμβαίνουν σε βιολογικά συστήματα. Η απουσία τέτοιων οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων καθιστά τον ψευδάργυρο ικανό να δράσει καταλυτικά σε συστήματα ευαίσθητα σε οξειδώσεις από οξυγονούχες ρίζες, οι οποίες παράγονται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις in vivo. Όλα τα παραπάνω εξηγούν γιατί η φύση επιλέγει τον ψευδάργυρο έναντι του σιδήρου ή του χαλκού, σε ένζυμα του μεταβολισμού του RNA και του DNA.<sup>2</sup>

Η αλλαγή του αριθμού συναρμογής των συμπλόκων του ψευδαργύρου σε in vivo συστήματα είναι αρκετά εύκολη. Σύμπλοκα με αριθμούς συναρμογής 4, 5 και 6 και γεωμετρίες από κανονικό ή παραμορφωμένο τετράεδρο μέχρι τριγωνική διπυραμίδα, τετραγωνική πυραμίδα και κανονικό οκτάεδρο είναι τα ευρέως απαντώμενα στις βιολογικές λειτουργίες του ψευδαργύρου.<sup>2</sup> Γενικά, το γεωμετρικό σχήμα των συμπλόκων του ψευδαργύρου είναι αρκετά παραμορφωμένο, γεγονός που δημιουργεί διάφορες τάσεις στο υπόστρωμα, που τελικά οδηγούν στη διάσπασή του κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής αντίδρασης.<sup>2</sup> Τέλος, η ανταλλαγή των ligands στα σύμπλοκα του ψευδαργύρου είναι ταχεία, γεγονός που τα χαρακτηρίζει ως ευκίνητα (labile) σύμπλοκα.<sup>2</sup>

Μια εξίσου σημαντική ιδιότητα του ψευδαργύρου είναι ο επαμφοτερίζων χαρακτήρας του σε τιμές pH γύρω στο 7. Οπότε κατά τη συναρμογή του με μόρια νερού μπορεί να δώσει τόσο ιόντα υδροξυλίου όσο και υδρογονοκατιόντα.



Στη συνέχεια γίνεται η διάσπαση του συμπλόκου δίνοντας ιόντα υδροξυλίου.



Τέλος, σε αντίθεση με άλλα μέταλλα όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και ο υδράργυρος, καθώς και αυτών της ομάδας ΠΒ, ο ψευδάργυρος δεν εμφανίζει τοξικότητα.<sup>2</sup>

#### **Βιολογικός ρόλος του Ψευδαργύρου<sup>4,5,6</sup>**

Ο ψευδάργυρος αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό ιόν στο μεταβολισμό των κυττάρων. Αποτελεί απαραίτητο συμπράγοντα για την πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού κυτταρικών λειτουργιών, διαδραματίζοντας πρωτεύοντα ρόλο σε διαδικασίες όπως η ενζυμική δραστηριότητα, η έκφραση γονιδίων, η ανάπτυξη των κυττάρων και η νευροδιαβίβαση.

Όσον αφορά στην ενζυμική του δραστηριότητα, έχουν ταυτοποιηθεί γύρω στα 300 ένζυμα, τα οποία ανήκουν σε πάνω από 50 διαφορετικές κατηγορίες, από διάφορους οργανισμούς (μικροοργανισμούς ως και φυτά και ζώα), που χρησιμοποιούν ψευδάργυρο για τη λειτουργία τους. Ο ουσιαστικός ρόλος του ψευδαργύρου στα βιολογικά συστήματα γίνεται εντονότερα αντιληπτός εάν λάβουμε υπόψιν ότι ο αριθμός των ενζύμων που έχουν ταυτοποιηθεί και χρησιμοποιούν σίδηρο είναι πολύ μικρός, ακόμα δε μικρότερος ο αριθμός των μεταλλοενζύμων μολυβδαινίου, σεληνίου, νικελίου, μαγγανίου ή κοβαλτίου.

Ο ψευδάργυρος μπορεί να διαδραματίσει τρεις κυρίως ρόλους στα ένζυμά του: καταλυτικό, συνεργιστικό ή δομικό.

Δρώντας καταλυτικά, το μέταλλο συμμετέχει απ' ευθείας στην ενζυμική κατάλυση. Αν με τη χρήση ενός συμπλοκοποιητή το μέταλλο απομακρυνθεί από το ένζυμο, τότε το αποένζυμο γίνεται ανενεργό. Η έλλειψη δραστηριότητας του αποενζύμου μπορεί να αποδοθεί στην απ' ευθείας δράση του ψευδαργύρου στην καταλυτική διαδικασία. Παράλληλα, η εξαφάνιση της δραστηριότητας μπορεί να οφείλεται και σε μια επαγόμενη δομική αλλαγή μετά την απομάκρυνση του μετάλλου.

Η παρουσία ενός δεύτερου ατόμου ψευδαργύρου σε μια ενεργή περιοχή του ενζύμου όπου περιέχεται ήδη ένα άτομο ψευδαργύρου οδηγεί σε αύξηση ή μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί τις περιπτώσεις όπου ο ψευδάργυρος παρουσιάζει συνεργιστικό ρόλο στο ένζυμο. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να λειτουργήσουν και απουσία του δεύτερου ατόμου ψευδαργύρου.

Τέλος, ο δομικός ρόλος του ψευδαργύρου βασίζεται στη δομική σταθερότητα που προσδίδει το μέταλλο στην πρωτεΐνη μέσω της τεταρτοταγούς δομής. Το ιόν ψευδαργύρου συναρμόζεται με άτομα O, N και S δημιουργώντας δεσμούς-γέφυρες, σταθεροποιώντας τη δομή των πρωτεϊνών. Οι δεσμοί αυτοί είναι σταθεροί σε αναγωγικές συνθήκες αντίθετα από τους δισουλφιδικούς (-S-S-) δεσμούς-γέφυρας ομάδων κυστεΐνης. Κατά ανάλογο τρόπο ο ψευδάργυρος σταθεροποιεί δομικά και κυτταρικές μεμβράνες.

Ένζυμα όπου ο ψευδάργυρος έχει διττό ρόλο, καταλυτικό και δομικό, είναι μόνο οι αλκοολικές αφυδρογονάσες.

Από μελέτες σε μεγάλο αριθμό ενζύμων, σε κάποια από τα οποία και κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, προκύπτει ότι ο ψευδάργυρος προσδένεται κυρίως στα άτομα αζώτου ιμιδαζολικών δακτυλίων ιστιδίνης και σε άτομα θείου κυστεϊνών στα ένζυμα.

Στα κυριότερα ένζυμα ψευδαργύρου που έχουν μελετηθεί ανήκουν οι Καρβοξυπεπτιδάσες (υδρολυτικά ένζυμα), η Καρβονική ανυδράση (λυάση) και οι Αλκοολικές αφυδρογονάσες (οξειδοαναγωγάσες).

Οι μεταλλοθειονίνες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών του ψευδαργύρου οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, η τάξη I βρίσκεται σε θηλαστικά, η τάξη II σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η τάξη III σε φυτά.

Οι μεταλλοθειονίνες αποτελούνται από 62 (ή 61) αμινοξέα από τα οποία 20 είναι κυστεΐνες και περιέχουν 7 γραμμοάτομα Zn ή/και Cd ανά μόριο πρωτεΐνης. Ενδιαφέρουσα είναι η απουσία κυστίνης καθώς και ετεροκυκλικών και αρωματικών αμινοξέων.

Δομικές μελέτες σε μεταλλοθειονίνη προερχόμενη από θηλαστικά, έδειξε ότι τα 7 γραμμοάτομα μετάλλου (Zn ή/και Cd) και τα κυστεϊνικά κατάλοιπα διατάσσονται με τη μορφή cluster. Για παράδειγμα τα ιόντα  $Zn^{2+}$  στην  $Zn_7$ -μεταλλοθειονίνη οργανώνονται σε δύο διακριτά μεταλλικά cluster που δρουν σαν ligands γέφυρας ανάμεσα σε δύο άτομα μετάλλου σε κάθε cluster. Άτομα μετάλλου των cluster μπορούν να ανταλλάγουν με μέταλλα από το διάλυμα ή από άλλα μόρια μεταλλοθειονίνης ή και να μεταφερθούν σε ανενεργά αποένζυμα. Η μορφή της πρωτεΐνης χωρίς μέταλλα (θειονίνη) μπορεί να απομακρύνει ψευδάργυρο από τους παράγοντες μεταγραφής γονιδίων SP1 και TFIIIA ρυθμίζοντας τη γενετική διαδικασία.

Παρά το γεγονός, λοιπόν, ότι οι λειτουργίες των μεταλλοθειονινών παραμένουν άγνωστες, έχει προταθεί ότι απομακρύνουν βαρέα μέταλλα, σταθεροποιούν μεμβράνες και ρυθμίζουν το μεταβολισμό του ψευδαργύρου. Επιπλέον, πιστεύεται ότι δρουν ως σαρωτές ριζών, πηγές ψευδαργύρου για ανενεργά αποένζυμα και ως ρυθμιστικά μόρια στη διαδικασία έκφρασης γονιδίων.

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο στη σύνθεση του DNA και του RNA όπως και στη διαίρεση των κυττάρων. Η ανακάλυψη του παράγοντα μεταγραφής TFIIIA ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου 5S RNA και περιέχει 2 με 3 mole Zn ανά mole πρωτεΐνης, έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον στο ρόλο που διαδραματίζει ο ψευδάργυρος στη διαδικασία της μεταγραφής.

Πειράματα ακτίνων-Χ έδειξαν ότι ο παράγοντας TFIIIA περιέχει 9 ιόντα ψευδαργύρου το καθένα από τα οποία σχηματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο, συναρμοσμένο με δύο άτομα θείου δύο κυστεϊνών και δύο άτομα αζώτου δύο ιστιδινών. Η επαναλαμβανόμενη

μονάδα 30 καταλοίπων είναι αναδιπλωμένη σε μία επιμήκη μεταλλο-δεσμευτική δομική περιοχή η οποία έχει το σχήμα δάκτυλου (Zinc Fingers). Ο κάθε δάκτυλος προσδέεται σε περίπου 5 ζεύγη βάσεων DNA. Οι εννέα δάκτυλοι μπορούν να περιβάλλουν περίπου 45 ζεύγη βάσεων που είναι το συνολικό μήκος της περιοχής εσωτερικού ελέγχου του γονιδίου 5S RNA.

Το σύνολο σχεδόν της ποσότητας του  $Zn^{2+}$  που βρίσκεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ισχυρά συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. Εκτός όμως από τον συνδεδεμένο ψευδάργυρο, υπάρχει και μια μικρή ποσότητα χαλαρά συνδεδεμένου ψευδαργύρου σε ενδοκυττάριας περιοχές (Zinc pools). Ο ψευδάργυρος αυτός χαρακτηρίζεται ως ελεύθερος ή διαθέσιμος και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και ανάπτυξη των κυττάρων.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι μια τέτοια περιοχή ελεύθερου ψευδαργύρου είναι απαραίτητη στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων. Σε ιστούς ζώων με ανεπάρκεια ψευδαργύρου και σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν απουσία ψευδαργύρου *in vitro* παρατηρήθηκε αύξηση στο θάνατο κυττάρων από απόπτωση. Το γεγονός αυτό καθώς επίσης το ότι προσθήκη συμπληρώματος ψευδαργύρου οδήγησε στη μείωση του κυτταρικού θανάτου από αποπτωτικούς παράγοντες, υποδεικνύουν ότι η καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων είναι λειτουργία που βασίζεται στον ψευδάργυρο.

## Φθορισμός

Κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με την απορρόφηση ενός φωτονίου, το μόριο προσλαμβάνει ενέργεια την οποία δεν μπορεί να διατηρήσει στο διηγερμένο μόριο, οπότε και την αποβάλλει με διάφορους τρόπους. Ο συνηθέστερος τρόπος αποβολής της ενέργειας είναι υπό τη μορφή θερμότητας αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία είναι γνωστή ως φωταύγεια.

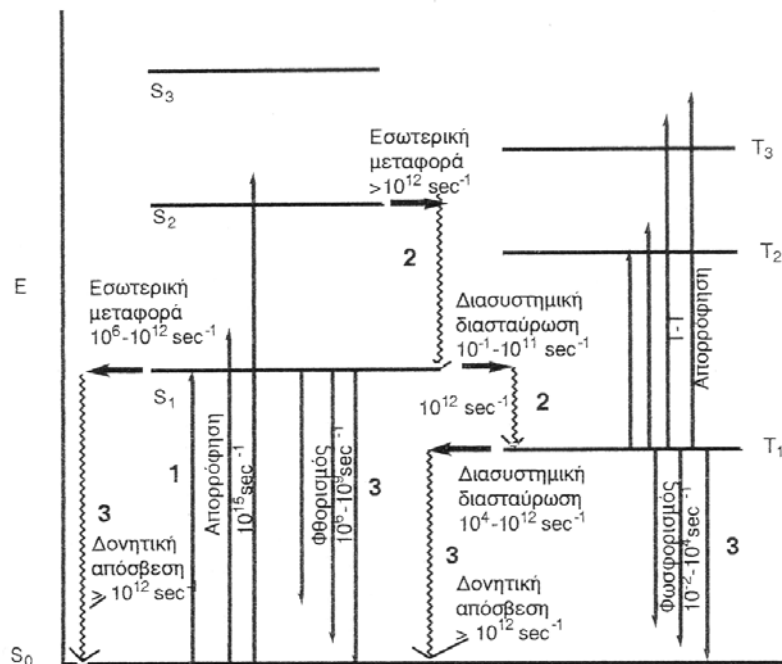
Φθορισμός χαρακτηρίζεται η φωταύγεια εάν η εκπομπή γίνει σε χρόνο  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  sec μετά τη διέγερση. Ο φθορισμός έχει μικρή διάρκεια και για το λόγο αυτό η μέτρηση της εντάσεώς του γίνεται κατά τη διάρκεια της διεγέρσεως.

**Μηχανισμός φθορισμού.** Απλή S (singlet) χαρακτηρίζεται η ηλεκτρονική στάθμη ενός μορίου, όταν το συνολικό spin είναι μηδέν αντιπαράλληλα spin σε όλα τα ζεύγη ηλεκτρονίων), σε κάθε άλλη περίπτωση όπου το spin δεν είναι μηδέν η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως τριπλή T (triplet) και η οποία είναι χαμηλότερης ενέργειας από την απλή κατάσταση. Με την απορρόφηση ακτινοβολίας στο μόριο, τα ηλεκτρόνια μεταπίπτουν από μη δεσμικά ( $\eta$ ) ή δεσμικά ( $\pi$ ) τροχιακά σε αντιδεσμικά ( $\pi^*$ ) τροχιακά, οπότε από την απλή κατάσταση  $S_0$  το μόριο μεταβαίνει σε διεγερμένες καταστάσεις  $S_1$ ,  $S_2$  κτλ. Η μετάπτωση  $S_0 \rightarrow S_1$  είναι επιτρεπόμενη ενώ η μετάπτωση  $S_0 \rightarrow T_1$  είναι απαγορευμένη λόγω της μικρής πιθανότητας να συμβεί αναστροφή του spin στο διηγερμένο μόριο.

Κατά την αποδιέγερση του μορίου, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται δονητική ή θερμική επαναφορά (vibrational or thermal relaxation) όλες οι δονητικές στάθμες των διηγερμένων απλών καταστάσεων καταλήγουν στη χαμηλότερη δονητική στάθμη της ηλεκτρονικής καταστάσεώς τους. Έτσι σταδιακά και ταχύτατα μεταφέρεται θερμότητα στα μόρια του διαλύτη με τα οποία συγκρούεται το διηγερμένο μόριο. Η μερική επικάλυψη των ανώτερων διηγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων, οδηγεί επίσης ταχύτατα στη διαδικασία της εσωτερικής μετατροπής (internal conversion), στην μετάπτωση δηλαδή από τη χαμηλότερη δονητική στάθμη ανώτερης ηλεκτρονικής καταστάσεως στην υψηλότερη δονητική στάθμη της χαμηλότερης ηλεκτρονικής καταστάσεως με την ίδια ενέργεια. Αποτέλεσμα είναι η κατάληξη όλων των απλών διηγερμένων καταστάσεων στη χαμηλότερη στάθμη δονήσεως της διηγερμένης καταστάσεως  $S_1$  με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας. Περαιτέρω αποδιέγερση από την  $S_1$  στην  $S_0$  γίνεται με μία από τις παρακάτω τέσσερις διαδικασίες:

1. Εσωτερική μετατροπή.  $S_1 \rightarrow S_0 + \text{Θερμότητα}$ . Παρατηρείται σε μόρια με υψηλό βαθμό δονητικής ελευθερίας π.χ. αλειφατικά μόρια, τα οποία και δεν φθορίζουν.

2. Εκπομπή φθορισμού.  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_\phi$ . Παρατηρείται σε μόρια με περιορισμένο βαθμό δονητικής ελευθερίας π.χ. αρωματικά μόρια ή μόρια με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς.
3. Ενδοσυστηματική διασταύρωση.  $S_1 \rightarrow T_1$  ακολουθούμενη με εκπομπή φωσφορισμού  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\phi\omega\phi}$ . Επειδή η  $T_1$  έχει μικρότερη ενέργεια από την  $S_1$  είναι  $\nu_\phi > \nu_{\phi\omega\phi}$ .
4. Απόσβεση. Μέσω συγκρούσεως με μόρια άλλων ουσιών, οπότε παρατηρείται εξασθένιση ή και πλήρης εξαφάνιση του φθορισμού.



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

**Φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής.** Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιας ουσίας μπορούν να ληφθούν δύο ειδών φάσματα, τα φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής. Το φάσμα διεγέρσεως (excitation spectrum) είναι η γραφική απεικόνιση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού (για σταθερό μήκος κύματος  $\lambda$  ακτινοβολίας φθορισμού) ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως. Η γραφική απεικόνιση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού (για  $\lambda$  διεγέρσεως σταθερό) ως συνάρτηση του μήκους κύματος ακτινοβολίας φθορισμού αποτελεί το φάσμα εκπομπής (emission spectrum) της ουσίας.

**Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό.** Απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση φθορισμού είναι ότι η δομή του μορίου είναι τέτοια ώστε να απορροφά ακτινοβολία στο υπεριώδες ή στο ορατό. Επίσης, η ακαμψία του μορίου πρέπει να είναι μεγάλη ώστε η διαφορά των καταστάσεων  $S_1$  και  $S_0$  να αποτρέπει τη διαδικασία εσωτερικής μετατροπής, οδηγώντας το σύστημα προς το φθορισμό. Οπότε, κατά κανόνα φθορίζουν ενώσεις με



αρωματικούς πυρήνες ή με εκτεταμένα συζυγιακά συστήματα διπλών δεσμών. Ο φθορισμός των αρωματικών ενώσεων αυξάνεται με την αύξηση της επιπεδότητας του μορίου. Επιπλέον, είναι δυνατό να επηρεάσουν το φθορισμό οι υποκαταστάτες του μορίου. Έτσι ομάδες δότες ηλεκτρονίων όπως  $-NH_2$ ,  $-OH$  αυξάνουν το φθορισμό διευκολύνοντας τη μετάπτωση  $S_1 \rightarrow S_0$ , ενώ ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων όπως  $-COOH$ ,  $-NO_2$ ,  $-N=N$  και αλογόνα μειώνουν το φθορισμό. Τέλος, ο σχηματισμός συμπλόκων με μεταλλοϊόντα αυξάνει το φθορισμό, λόγω της αύξησης της ακαμψίας του μορίου και ελαχιστοποίησης των εσωτερικών δονήσεων που οδηγούν σε εσωτερική μετατροπή.

Πέρα όμως από τη δομή των ίδιων των μορίων υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην ένταση του φθορισμού ενός δείγματος.

1. **Ξένα μόρια.** Η ύπαρξη τέτοιων μορίων αλλοιώνει την ένταση του φθορισμού όταν αυτά απορροφούν ακτινοβολία ή αλληλεπιδρούν με το φθορίζον μόριο ή φθορίζουν από μόνα τους.
2. **Διαλύτης.** Επιδρά τόσο στην ένταση φθορισμού όσο και στα χαρακτηριστικά του φάσματος εκπομπής. Αύξηση της πολικότητας ή του ιξώδους του διαλύτη οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού. Ο διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά ακτινοβολία.
3. **pH.** Το pH επηρεάζει κυρίως μόρια που φθορίζουν μόνο σε μία ιοντική τους μορφή.
4. **Θερμοκρασία.** Συνήθως η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του φθορισμού και αυτό λόγω του γεγονότος ότι η αυξανόμενη τυχαία κίνηση των μορίων αυξάνει τον αριθμό των συγκρούσεων μεταξύ των μορίων άρα οδηγεί σε αποδιέγερση με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας.
5. **Οξυγόνο.** Το οξυγόνο μπορεί να επηρεάσει την ένταση του φθορισμού με οξείδωση του μορίου σε μη φθορίζον προϊόν ή με απόσβεση του φθορισμού.
6. **Φωτοδιάσπαση.** Η χρήση ακτινοβολίας μεγάλης ισχύος για τη διέγερση του μορίου μπορεί να οδηγήσει στη φωτοδιάσπασή του. Έτσι οι μετρήσεις πρέπει να γίνονται ταχύτατα και πολλές φορές σε μήκος κύματος που δεν έχει τη μέγιστη απορρόφηση.
7. **Συγκέντρωση.** Η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας.

Είναι δυνατόν όλη η απορροφούμενη από το μόριο ενέργεια να αποδοθεί ως φθορισμός, στην πραγματικότητα όμως, ένα μέρος της χάνεται μέσω άλλων μηχανισμών. Για το λόγο αυτό έχει εισαχθεί ο όρος της κβαντικής απόδοσης φθορισμού. Συντελεστής κβαντικής απόδοσης φθορισμού  $\Phi$  (fluorescence quantum yield) ονομάζεται ο λόγος των φωτονίων που εκπέμπονται προς τα φωτόνια που απορροφούνται και είναι:  $0 \leq \Phi \leq 1$ .

## Μέθοδοι προσδιορισμού ψευδαργύρου

Η συγκέντρωση του ελεύθερου ψευδαργύρου στα κύτταρα κυμαίνεται από 1 nM στο κυτταρόπλασμα ως 1mM σε ορισμένα κυστίδια. Φαίνεται πιθανό να υπάρχει κάποιος μηχανισμός ο οποίος ρυθμίζει τη μετακίνηση των ιόντων  $Zn^{2+}$  σε θέσεις συμπλοκοποίησης και τη δημιουργία διαβαθμίσεων συγκέντρωσης που επιτρέπουν τη λειτουργία μηχανισμών επαγωγής ερεθισμάτων, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα κατιόντα  $Ca^{2+}$ .<sup>7</sup>

Για τη μέτρηση του συνολικού ψευδαργύρου στα κύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών, όπως για παράδειγμα η ατομική απορρόφηση ή η χρήση του ραδιενεργού ισότοπου  $^{65}Zn$ . Αντίθετα, η μέτρηση του ελεύθερου ψευδαργύρου είναι πιο δύσκολο να επιτευχθεί αν και είναι απαραίτητη για τη μελέτη βιολογικών λειτουργιών, αφού οι διαβαθμίσεις συγκέντρωσης του ψευδαργύρου είναι ικανές να καθορίσουν την ταχύτητα και την κατεύθυνση της κίνησής του στα κύτταρα.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του ελεύθερου ενδοκυττάριου ψευδαργύρου που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι:

1. Επιλεκτικά ηλεκτρόδια
2. Φασματοφωτομετρία με μεταλλοχρωμικούς δείκτες
3. Φθορίζοντες δείκτες

Από τα κυριότερα μειονεκτήματα στη χρήση των περισσότερων επιλεκτικών ηλεκτροδίων ψευδαργύρου είναι η αδυναμία που εμφανίζουν στη μέτρηση συγκεντρώσεων μικρότερων των 10  $\mu M$ . Επιπλέον, η χρήση τους περιορίζεται σε τιμές  $pH \geq 6$  εξαιτίας των παρεμβάσεων των υπαρχόντων πρωτονίων στις μετρήσεις.

Ο πιο γνωστός από τους μεταλλοχρωμικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του ψευδαργύρου είναι ο Zincon. Ο δείκτης αυτός εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα προς τον ψευδάργυρο έναντι άλλων ιόντων όπως  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  άλλα παράλληλα έχει χαμηλή τάση προς ένωση με τον  $Zn^{2+}$ . Η σταθερά διάστασής του είναι  $K_d=5.9 \mu M$  με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία του σε συγκεντρώσεις του ιόντος μικρότερες των 0.1  $\mu M$ .

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στην εύρεση μεθόδων επιλεκτικής ανίχνευσης ίχων ψευδαργύρου με αποτελεσματική μεταγωγή σήματος.<sup>8</sup> Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό συγκεντρώνουν οι φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου.

## Φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου

Όπως προαναφέρθηκε, η αδυναμία κυρίως των άλλων μεθόδων για τη μέτρηση του ενδοκυττάριου ψευδαργύρου σε βιολογικά συστήματα, οδήγησε στη σύνθεση φθορίζοντων δεικτών ψευδαργύρου.<sup>9</sup> Οι δείκτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την ανίχνευση όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του μετάλλου στα κύτταρα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, εμφανίζουν υψηλό φθορισμό, καθώς επίσης περιέχουν συμπλοκοποιητές οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα για το συγκεκριμένο μέταλλο ενώ παράλληλα οι σταθερές δέσμησης είναι τέτοιες ώστε να αποφεύγεται η απομάκρυνση του ισχυρά συνδεδεμένου ψευδαργύρου από ένζυμα και πρωτεΐνες.<sup>10</sup>

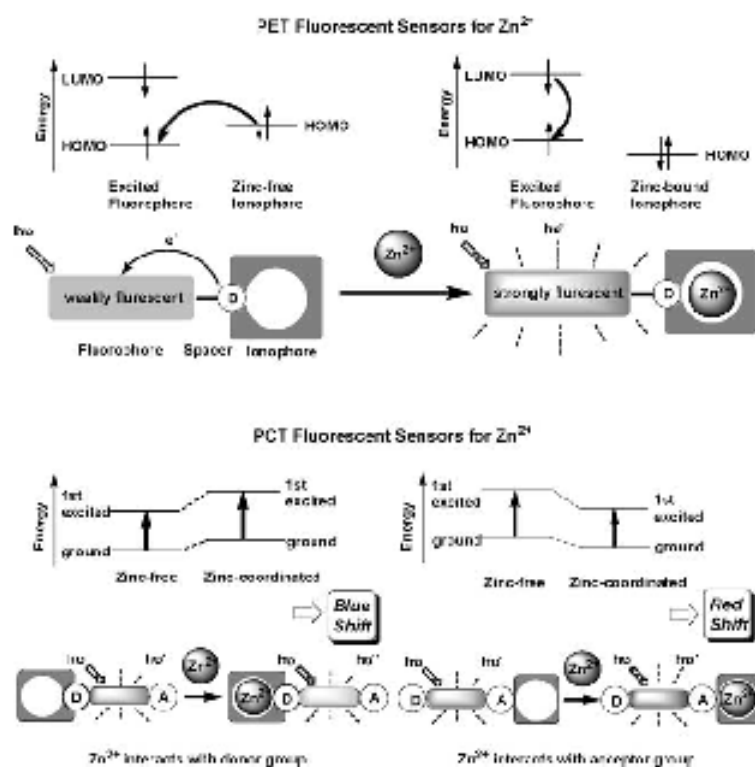
Η σύνθεση φθορίζοντων ενώσεων, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και τη μέτρηση ενδοκυττάριου ψευδαργύρου, απαιτεί την εμφάνιση ισχυρού σήματος φθορισμού και την παρουσία ligands τα οποία θα εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τον ψευδάργυρο.

Πιο συγκεκριμένα οι ιδιότητες που πρέπει να έχουν οι δείκτες είναι:

1. Μεγάλο συντελεστή μοριακής απορρόφησης και κατά συνέπεια υψηλή ένταση απορρόφησης.
2. Σημαντική μετατόπιση στο μήκος κύματος του μεγίστου ( $\lambda_{\max}$ ) στο φάσμα εκπομπής σε σχέση με το μέγιστο στο φάσμα διεγέρσεως (Stokes shift), ώστε να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών.
3. Εμφάνιση φθορισμού με σημαντική κβαντική απόδοση και αισθητή μεταβολή του  $\lambda_{\max}$  διέγερσης ή εκπομπής κατά τη δέσμηση ιόντων ψευδαργύρου. Μια τέτοια μετατόπιση είναι απαραίτητη σε τεχνικές όπως η ratio fluorescence, η οποία χρησιμοποιείται για υπολογισμούς συγκεντρώσεων ιόντων.
4. Απορροφήσεις σε μήκη κύματος κοντά στα 500 nm έτσι ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο ο φθορισμός που οφείλεται σε ενδοκυττάρια συστατικά, ιστούς και βιολογικά υγρά. Απορροφήσεις σε μικρότερα μήκη κύματος οδηγούν σε παραμόρφωση του σήματος και κατά συνέπεια σε μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου.
5. Ευαισθησία ανίχνευσης ιόντων ψευδαργύρου και υψηλή εκλεκτικότητα σε σχέση με άλλα μέταλλα. Δηλαδή να έχουν σταθερές διάστασης ( $K_d$ ) στην περιοχή των φυσιολογικών επιπέδων του ενδοκυττάριου ψευδαργύρου.
6. Δυνατότητα διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να μπορούν να γίνουν μετρήσεις ακόμα και στα πιο μικρά κύτταρα και να μη χρειαστεί να εισαχθούν με μικροπιπέτες ή με προσωρινή διάσπαση της μεμβράνης του κυττάρου.

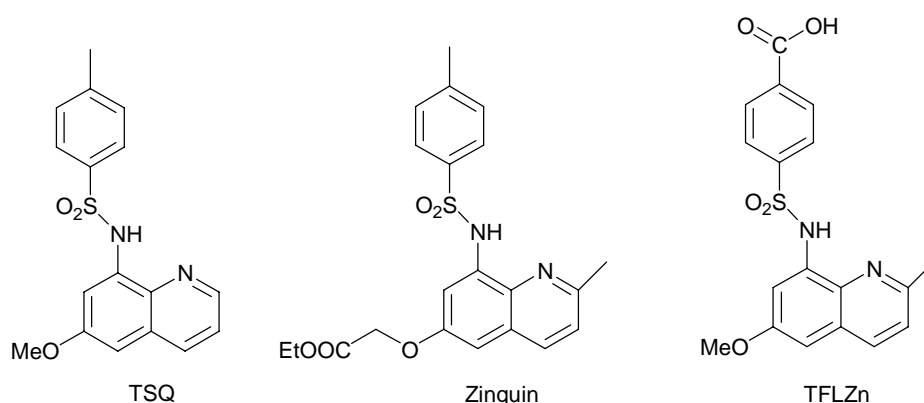
7. Δυνατότητα αλλαγών στο φάσμα απορρόφησης μεταξύ της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης με ψευδάργυρο μορφής.
8. Ορισμένη οξύτητα ( $pK_a < 7$ ), ώστε να μην πρωτονιώνονται στο κυτταρικό περιβάλλον, το οποίο θα σήμαινε μείωση της ταχύτητας συναρμογής του ψευδαργύρου.
9. Απουσία τοξικότητας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δείκτες φθορισμού που περιέχουν τόσο το φθοροφόρο όσο και το ιονοφόρο στο ίδιο μόριο, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό φωτοεπαγωγής, στους φωτοεπαγόμενους δείκτες με μεταφορά ηλεκτρονίου (PET) και στους φωτοεπαγόμενους δείκτες με μεταφορά φορτίου (PCT)<sup>11</sup>. Στους δείκτες PET, μετά τη διέγερση της ελεύθερης μορφής του δείκτη, μια εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ δότη και δέκτη προκαλεί απόσβεση φθορισμού. Όταν ο δείκτης βρίσκεται συμπλοκοποιημένος με το κατιόν-στόχο, η παραπάνω μεταφορά δεν είναι επιτρεπτή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ή την αύξηση της έντασης του φθορισμού. Στους δείκτες PCT, το φθοροφόρο αποτελείται από μια ομάδα-δότη ηλεκτρονίου σε συζυγία με μια ομάδα-δέκτη ηλεκτρονίου. Μετά τη διέγερση του μορίου, πραγματοποιείται εσωτερική μεταφορά φορτίου από το δότη στο δέκτη. Η συναρμογή του ιόντος στην ομάδα-δότη αποσταθεροποιεί το σύστημα, οδηγώντας σε μετατόπιση σε μικρότερο μήκος κύματος στο φάσμα διέγερσης (υποχρωμία). Στην περίπτωση όπου το ιόν συμπλοκοποιηθεί με την ομάδα-δέκτη, το φάσμα διέγερσης εμφανίζει μετατόπιση σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (βαθυχρωμία). Τέτοιες μετατοπίσεις είναι επιθυμητές στους δείκτες φθορισμού αφού επιτρέπουν τη μέτρηση λόγων εντάσεων φθορισμού (ratiometric studies).



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

Στην πρώτη γενιά φθορίζόντων δεικτών ασβεστίου ανήκουν οι δείκτες TSQ<sup>12,13</sup> N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide), Zinquin<sup>14</sup> [(2-methyl-8-p-toluenesulfonamido-quinolyloxy)ethylacetate], TFLZn<sup>15</sup> [N-(3-methyl-6-methoxy-8-quinolyl) -p-carboxybenzoyl-sulfonamide], η δομή των οποίων φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Και οι τρεις δείκτες φέρουν ως χρωμοφόρο κινολινικά παράγωγα και σχηματίζουν με τα ιόντα  $Zn^{2+}$  σύμπλοκα με αναλογία κυρίως 2:1 χωρίς να αποκλείεται και ο σχηματισμός συμπλόκων σε αναλογία 1:1 υπό κατάλληλες συνθήκες. Ο Zinquin περιέχει έναν αιθυλεστέρα στη θέση της μεθοξυ ομάδας του TSQ με αποτέλεσμα να μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να παραμένει για πολλές ώρες χωρίς να εμφανίζει φθορισμό μέχρι τη στιγμή που θα συμπλεχθεί με τον ψευδάργυρο. Ο TFLZn αποτελεί το υδατοδιαλυτό παράγωγο του TSQ. Και οι τρεις δείκτες εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τον ψευδάργυρο έναντι άλλων ιόντων όπως  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  ακόμα και σε συγκεντρώσεις που φτάνουν τις φυσιολογικές τους τιμές.

Το φάσμα εκπομπής του TSQ παρουσιάζει μέγιστο φθορισμού στα 495 nm. Η ένταση φθορισμού του δείκτη αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου από 0.01 ως 10  $\mu M$ , χωρίς ταυτόχρονη μετατόπιση στο μήκος κύματος. Ο TSQ δεν θεωρήθηκε ικανοποιητικός δείκτης για τη μέτρηση ψευδαργύρου κυρίως λόγω του γεγονότος ότι η ένταση φθορισμού των συμπλόκων που σχηματίζει αλλάζει ανάλογα με το μέσο.

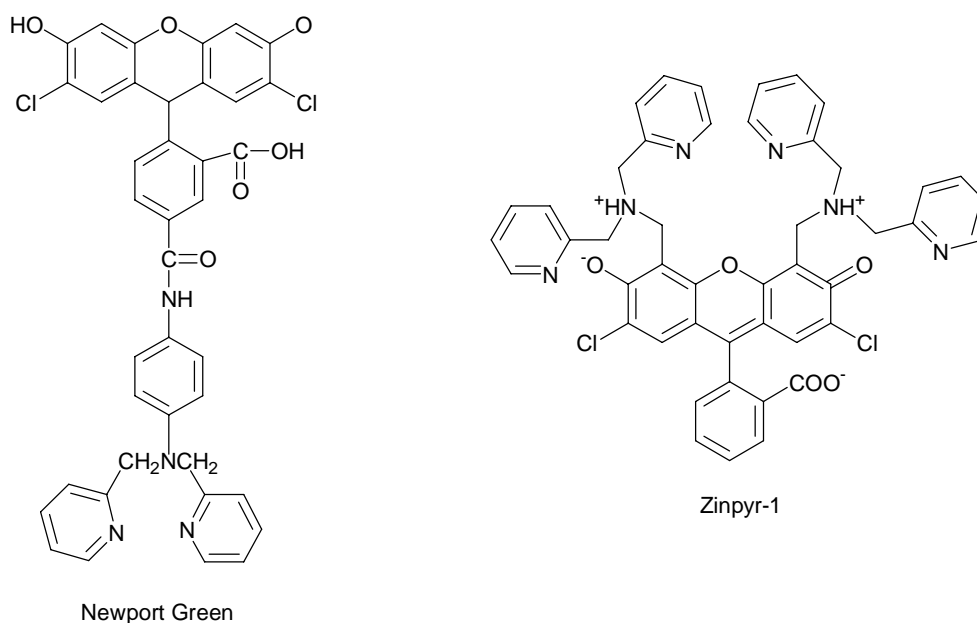
Η ένταση του φθορισμού στην περίπτωση του Zinquin αυξάνει σταδιακά σε συγκεντρώσεις ψευδαργύρου από nM σε 1  $\mu M$ . Το σύμπλοκο με στοιχειομετρία 1:1 εμφανίζει μέγιστα διέγερσης και φθορισμού  $\lambda_{exc}=370$  nm και  $\lambda_{em}=490$  nm αντίστοιχα. Οι

σταθερές δέσμευσης του δείκτη στα σύμπλοκά του με τον  $Zn^{2+}$  είναι  $7 \times 10^6 M^{-1}$  και  $11.7 \times 10^6 M^{-1}$  για τα σύμπλοκα με στοιχειομετρία 1:1 και 2:1 αντίστοιχα. Η σταθερά διάστασής του έχει υπολογιστεί ίση με 1  $\mu M$ . Στην περίπτωση του Zinquin κύρια αδυναμία του κρίθηκε το γεγονός ότι δεν μπορεί να συμπλοκοποιήσει προσδεμένο σε πρωτεΐνες ψευδάργυρο.

Τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης του συμπλόκου TFLZn-Zn εμφανίζουν μέγιστα φθορισμού στα 498 nm και 360 nm αντίστοιχα χωρίς αξιοσημείωτη μετατόπιση του μεγίστου κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του ιόντος. Ο TFLZn έχει ακόμα μικρότερη σταθερά διάστασης από τον Zinquin, μόλις 20  $\mu M$  οπότε δεν μπορεί να συμπλοκοποιεί ψευδάργυρο που βρίσκεται προσδεμένος σε πρωτεΐνες.

Μικρές μετατροπές στη δομή του Zinquin είχαν μέτριας έκτασης αποτελέσματα στο φασματοσκοπικό προφίλ της ένωσης.<sup>16, 17</sup> Επίσης, 5-διμεθυλαμινο-1-ναφθαλενοσουλφόνυλο- και τοζυλο- ανάλογα έχουν συντεθεί αλλά η εφαρμογή τους μέχρι σήμερα, είναι περιορισμένη.<sup>18, 12</sup>

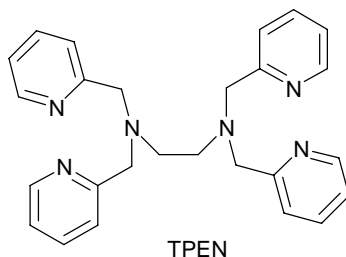
Στους φθορίζοντες δείκτες ψευδαργύρου ανήκουν και οι Newport Green<sup>19</sup> και Zinpyr-1<sup>20</sup> η δομή των οποίων παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα. Και οι δύο αυτοί δείκτες περιέχουν ως χρωμοφόρο τη 2,7-διχλωροφλουρεσκεΐνη και την δις(2-πυριδυλομεθυλαμίνη) (DPA) ως χηλικό κέντρο.



Ο Newport Green έχει σχετικά μικρή σταθερά δέσμευσης με τον ψευδάργυρο ( $K_d=1 \mu M$ ) αλλά παράλληλα αμελητέα ευαισθησία προς το ασβέστιο ( $K_d>100 mM$ ) καθιστώντας τον ικανό για μετρήσεις συγκεντρώσεων ψευδαργύρου παρουσία ασβεστίου. Εμφανίζει μέγιστο φθορισμού στο φάσμα διέγερσης στα 506 nm ενώ παράλληλα κατά τη δέσμευσή του με το ιόν  $Zn^{2+}$  παρέχει αύξηση στην ένταση φθορισμού χωρίς καμία μετατόπιση στα μήκη

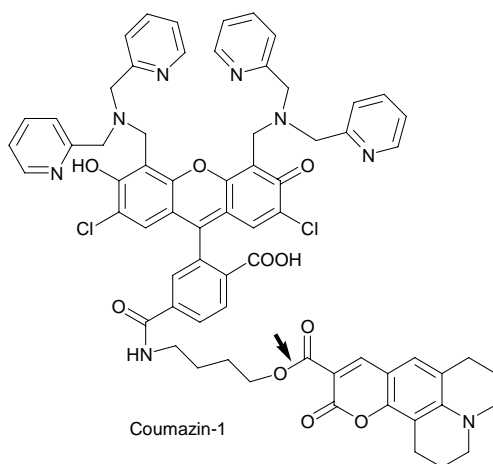
κύματος διέγερσης και εκπομπής. Αύξηση στην ένταση του φθορισμού παρατηρείται και με τη δέσμευση  $\text{Ni}^{2+}$  και  $\text{Co}^{2+}$ .

Ο Zinpyr-1 (ZP1) μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας τη μέτρηση ενδοκυττάριου ψευδαργύρου, ενώ η δομή του βασίζεται στη δομή του γνωστού συμπλοκοποιητή βαρέων μετάλλων TPEN.



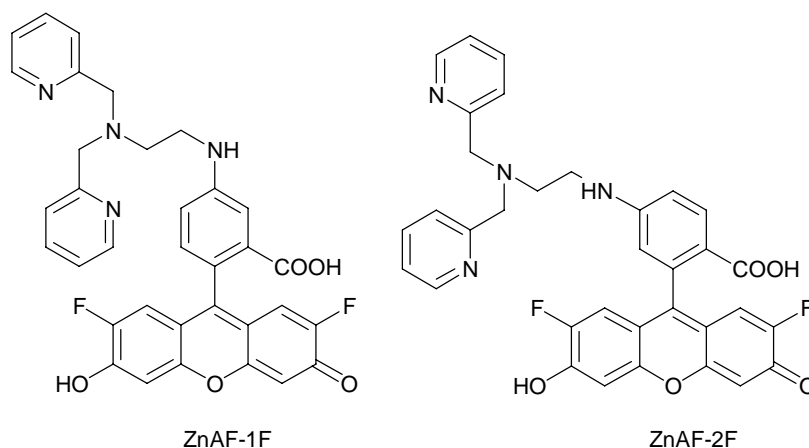
Ο ελεύθερος δείκτης εμφανίζει  $\lambda_{\text{exc}}=515$  nm με κβαντική απόδοση φθορισμού 0.39. Με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης ψευδαργύρου παρατηρείται μετατόπιση του μήκους κύματος οπότε όταν ο δείκτης κορεστεί με  $\text{Zn}^{2+}$  (25  $\mu\text{M}$ ), το σύμπλοκο που δημιουργείται εμφανίζει  $\lambda_{\text{exc}}=507$  nm και κβαντική απόδοση φθορισμού 0.89. Η σταθερά διάστασης προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά  $K_d=0.7\pm 0.1$  nM. Τα μέγιστα φθορισμού μετρήθηκαν στα 509 και 650 nm αντίστοιχα. Ο φθορισμός του Zinpyr-1 δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων ιόντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , ακόμα και αν η συγκέντρωσή τους φτάνουν τα 2 και 5 mM, αντίστοιχα.

Μια πιο πρόσφατη ερευνητική εργασία παρουσιάζει τη σύνθεση ενός δείκτη δύο χρωμοφώρων του Coumazin-1,<sup>21</sup> παράγωγο του Zinpyr-1, που χρησιμοποιείται για μετρήσεις λόγων έντασης φθορισμού (ratiometric). Αποτελείται, όπως προαναφέρθηκε, από τον γνωστό non-ratiometric δείκτη ψευδαργύρου Zinpyr-1 συζευγμένο μέσω ενός 4-υδροξυβουτυλοαμιδικού συνδέσμου με το κουμαρινικό χρωμοφόρο C343, το οποίο είναι συμπλοκοποιητής ψευδαργύρου.



Το μόριο μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και μετά την είσοδό του στο κύτταρο υδρολύεται από εστεράσες (στο παραπάνω Σχήμα φαίνεται η θέση υδρόλυσης) δίνοντας το δείκτη Zinpyr-1 ως το 4-υδροξυβουτυλοάμιδο παράγωγο του και το καρβοξυλικό ιόν του C343 το οποίο δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Το παράγωγο του Zinpyr-1, όταν διεγείρεται στα 505 nm, εκπέμπει φθορισμό με αυξανόμενη ένταση στα 535 nm παρέχοντας πληροφορίες για τον προσδεδεμένο ψευδάργυρο. Το ιόν του C343 όταν διεγείρεται στα 445 nm, εκπέμπει φθορισμό στα 488 nm δίνοντας πληροφορίες για το ποσοστό του μορίου που έχει υδρολυθεί.

Δύο ακόμα δείκτες που περιέχουν ως συμπλοκοποιητή την δις(2-πυριδυλομεθυλαμίνη) DPA είναι οι ZnAF-1F και ZnAF-2F<sup>22</sup> πρόδρομα των οποίων είναι οι δείκτες ZnAF-1 και ZnAF-2<sup>23</sup> στους οποίους δεν υπάρχουν τα άτομα φθορίου στο χρωμοφόρο. Οι δομικές τροποποιήσεις έχουν γίνει με σκοπό τη διεύριση της περιοχής pH όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τη χρήση τους σαν δείκτες ενδοκυττάρου ψευδαργύρου. Τα άτομα φθορίου σε όρθο θέση ως προς τα φαινολικά υδροξύλια χαμηλώνουν τις τιμές pK<sub>a</sub> των δεικτών και γι' αυτό το λόγο εμφανίζεται σταθερότερος φθορισμός σε τιμές pH κοντά στο 7.

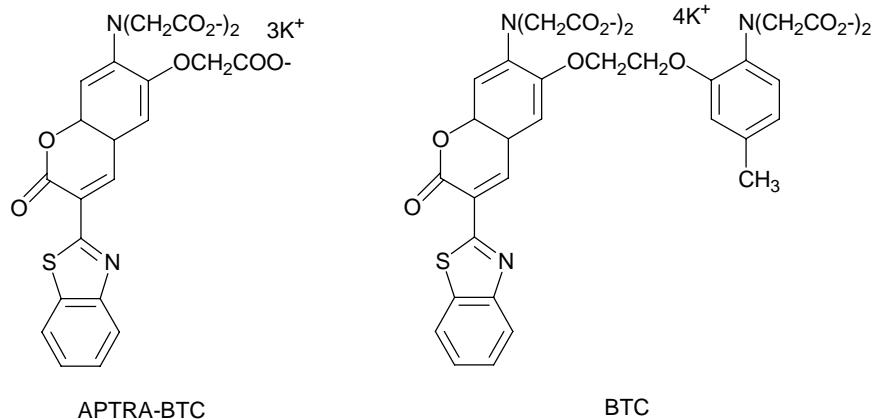


Οι δείκτες ZnAF-1F και ZnAF-2F δεν φθορίζουν στην ελεύθερή τους μορφή και έχουν κβαντική απόδοση φθορισμού μόλις 0.004 και 0.006 αντίστοιχα. Μετά τη δέσμευση του ψευδαργύρου στους δείκτες η ένταση του φθορισμού αυξάνεται 69 φορές για τον ZnAF-1F και 60 φορές για τον ZnAF-2F, με κβαντική απόδοση 0.17 και 0.24 αντίστοιχα. Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης εμφανίζει μια μικρή βαθοχρωμική μετατόπιση 2-3 nm μεταξύ ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής των δεικτών, ενώ το μέγιστο εκπομπής παραμένει σταθερό. Το μήκος κύματος διέγερσης για τον ZnAF-2F είναι στα 492 nm.

Μία άλλη κατηγορία φθορίζοντων δεικτών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ψευδαργύρου είναι οι πολυκαρβοξυλικοί



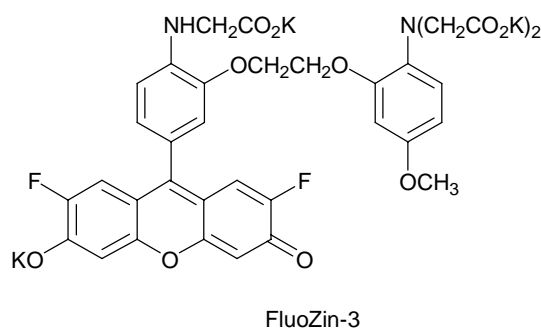
δείκτες όπως ο APTRA-BTC ένα τροποποιημένο παράγωγο του φθορίζοντα δείκτη ασβεστίου BTC.



Η δέσμευση ψευδαργύρου στον APTRA-BTC έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεγίστου φθορισμού στο φάσμα διεγέρσεως, με ισοσβεστικό σημείο στα 420 nm. Ο φθορισμός επηρεάζεται ελάχιστα από την παρουσία άλλων δισθενών όντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  σε συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{M}$  και 35 mM αντίστοιχα, αλλά και από την παρουσία μέχρι 25  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ή  $\text{Pb}^{2+}$ . Η σταθερά διάστασης του APTRA-BTC για τον ψευδάργυρο έχει υπολογιστεί  $K_d=1.4 \mu\text{M}$ . Η σχετικά ασθενής δέσμευση του δείκτη με τον ψευδάργυρο επιτρέπει τη χρήση του κυρίως σε περιβαλλοντολογικά δείγματα παρά σε βιολογικά συστήματα.

Εκτός από τον APTRA-BTC για τη μέτρηση ψευδαργύρου έχουν χρησιμοποιηθεί και οι πολυκαρβοξυλικοί δείκτες ασβεστίου BTC και Fura-2 καθώς και ο δείκτης μαγνησίου Mag-Fura-2.

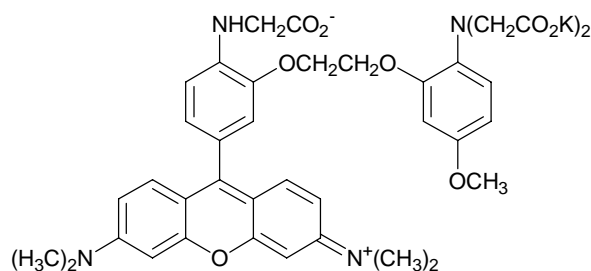
Ένας ακόμα πολυκαρβοξυλικός δείκτης που έχει συντεθεί για τη μέτρηση ψευδαργύρου είναι ο FluoZin-3<sup>24</sup> παράγωγο των δεικτών ασβεστίου Fluo-3 και Fluo-4, τροποποιημένους έτσι ώστε ο FluoZin-3 να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τον ψευδάργυρο έναντι του ασβεστίου. Η δομή του FluoZin-3 φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Αντίθετα με τον APTRA-BTC ο παραπάνω πολυκαρβοξυλικός δείκτης φέρει ως χρωμοφόρο την 4-φθορορεσορκινόλη. Με τιτλοδοτήσεις με αυξανόμενη συγκέντρωση

ψευδαργύρου υπολογίστηκε ότι η αναλογία με την οποία σχηματίζει σύμπλοκα ο δείκτης με τον ψευδάργυρο είναι 1:1 με  $K_d=15\pm 2$  nM και δεν επηρεάζεται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου επιδεικνύοντας μεγάλη εκλεκτικότητα προς τον ψευδάργυρο. Η ένταση του φθορισμού γίνεται μέγιστη σε συγκέντρωση ψευδαργύρου 100 nM, ενώ για συγκέντρωση ψευδαργύρου 5  $\mu$ M η κβαντική απόδοση φθορισμού υπολογίστηκε στα  $0.43\pm 0.04$ . Το μήκος κύματος διέγερσης για το σύμπλοκο του δείκτη με τον ψευδάργυρο είναι στα 488 nm.

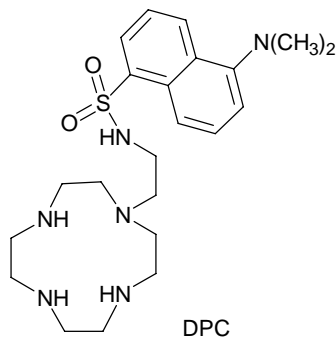
Ο πιο πρόσφατος πολυκαρβοξυλικός δείκτης ψευδαργύρου που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι ο RhodZin-3.<sup>25</sup>



RhodZin-3

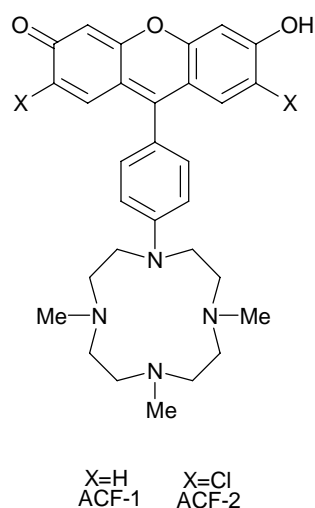
Μελέτες τιτλοδότησης έδειξαν ότι ο δείκτης στην ελεύθερη μορφή του δεν εμφανίζει φθορισμό, αλλά ο φθορισμός αυξάνεται καθώς η συγκέντρωση των ιόντων  $Zn^{2+}$  μεγαλώνει και η αύξηση γίνεται 75 φορές μεγαλύτερη όταν το διάλυμα φτάσει σε κορεσμό. Η διέγερση για τις μετρήσεις φθορισμού γίνεται σε μήκος κύματος 545 nm. Η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε  $K_d=65\pm 10$  nM. Οι μετρήσεις δεν επηρεάζονται παρουσία ασβεστίου σε συγκεντρώσεις μέχρι 40  $\mu$ M, ενώ σχετικά με άλλα μέταλλα, μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει για τον  $Fe^{3+}$  ( $K_d\sim 5$   $\mu$ M), λιγότερο για τα  $Hg^{2+}$  και  $Cd^{2+}$  (500  $\mu$ M) και καθόλου για τα  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ga^{3+}$  μέχρι 500  $\mu$ M και  $Na^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  μέχρι και 200 mM. Για την είσοδο του δείκτη σε μιτοχόνδρια και κορτικοειδής νευρώνες χρησιμοποιείται η εστεροποιημένη μορφή του δείκτη.

Επιπλέον κατηγορία αποτελούν οι δείκτες που φέρουν ως συμπλοκοποιητές τετραάζαιθères-στέμματα όπως το cyclen (1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκάνιο). Παράδειγμα τέτοιου δείκτη αποτελεί ο Dansylamidoethyl-Pendant Cyclen<sup>26, 27</sup> που στην παρούσα εργασία θα αναφέρεται ως DPC.



Κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν ότι ο ψευδάργυρος στο σύμπλοκο με τον DPC σχηματίζει τετραγωνική πυραμίδα μετά τη συναρμογή του με τα τέσσερα άτομα αζώτου του κυκλικού αιθέρα και του σουλφοναμιδικού αζώτου. Η κβαντική απόδοση φθορισμού του ελεύθερου δείκτη από 0.03 αυξάνεται στο 0.11 μετά τη δέσμευσή του με τον ψευδάργυρο. Ο ελεύθερος δείκτης εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 330 nm ενώ στη συμπλοκοποιημένη του με ψευδάργυρο μορφή στα 323 nm. Στο φάσμα φθορισμού (για διέγερση στα 330 nm) ο δείκτης έχει μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής στα 555 nm ενώ παρατηρείται μετατόπιση στα 528 nm (υποχρωμία) μετά την προσθήκη ψευδαργύρου σε υδατικό διάλυμα. Σε οργανικούς διαλύτες το φάσμα φθορισμού μετατοπίζεται σε χαμηλότερα μήκη κύματος 496 nm σε μεθανόλη, 489 nm σε αιθανόλη και 484 nm σε ακετονιτρίλιο. Αλλαγή παρατηρείται στους διαλύτες αυτούς και στους συντελεστές κβαντικής απόδοσης φθορισμού όπου αυξάνονται σε 0.53, 0.60 και 0.44 αντίστοιχα.

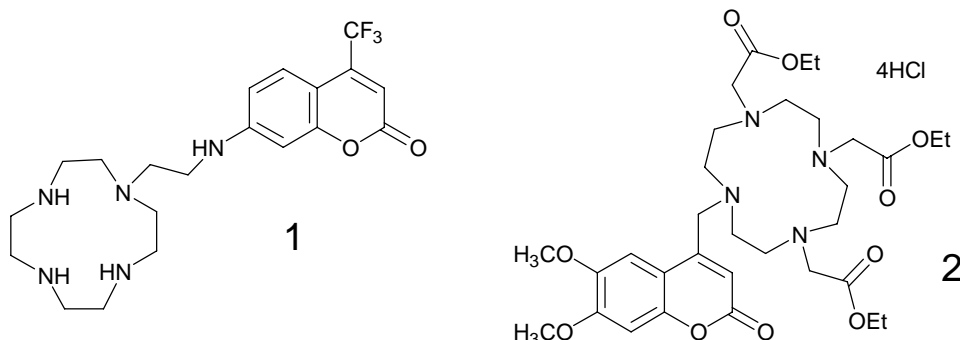
Οι ACF-1 και ACF-2<sup>28</sup> είναι δύο ακόμα δείκτες με τετραάζαχληκό μέρος και φλουρεσκεΐνη ως χρωμοφόρο.



Μετά τη δέσμευση ψευδαργύρου, η ένταση του φθορισμού εκπομπής αυξάνεται 14 φορές για τον ACF-1 και 26 φορές για τον ACF-2, με ταυτόχρονη μικρή μετατόπιση στα μέγιστα διέγερσης και εκπομπής. Ο ACF-1 εμφανίζει μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης στα

495 nm και εκπομπής στα 515 nm, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον ACF-2 είναι 505 nm και 525 nm αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης για τον  $Zn^{2+}$  είναι 500 nM.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται δύο δείκτες οι οποίοι ως χρωμοφόρο φέρουν υποκατεστημένες κουμαρίνες. Οι δομές των δεικτών παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα.



Στο δείκτη **1**<sup>29</sup> έγιναν μετρήσεις φθορισμού τόσο με  $Zn^{2+}$  όσο και με  $Cd^{2+}$  και  $Cu^{2+}$  καθώς επίσης και στην ελεύθερη μορφή του δείκτη. Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης για τον ελεύθερο δείκτη βρέθηκε στα 382 nm, ενώ για τα σύμπλοκα  $1-Zn^{2+}$ ,  $1-Cd^{2+}$  και  $1-Cu^{2+}$  βρέθηκε στα 388, 342 και 342 nm αντίστοιχα. Η μετατόπιση προς χαμηλότερα μήκη κύματος (υποχρωμία) για την περίπτωση των ιόντων καδμίου και χαλκού υποδηλώνει την συμμετοχή της 7-αμινομάδας στη σφαίρα συναρμογής του μετάλλου, ενώ αντίθετα η μετατόπιση προς ψηλότερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία) στην περίπτωση των ιόντων ψευδαργύρου ενισχύει την άποψη ότι η 7-αμινομάδα δεν συζεύγνεται με το μέταλλο. Τα φάσματα διέγερσης των παραπάνω συμπλόκων συμφωνούν με αυτά της απορρόφησης, αν και ο φθορισμός του συμπλόκου  $1-Zn^{2+}$  αυξάνεται λίγο. Αντίθετα στο σύμπλοκο  $1-Cu^{2+}$  παρατηρείται απόσβεση στο φθορισμό, ενώ η περίπτωση του  $Cd^{2+}$  κρίνεται η ιδανικότερη για τον συγκεκριμένο δείκτη.

Στο δείκτη **2**<sup>30</sup> η αλκυλίωση των αζώτων του μακροκυκλικού συμπλοκοποιητή έχει πολλαπλές συνέπειες. Οι εστέρες ή τα οξέα που προκύπτουν μετά από υδρόλυση σε βιολογικά συστήματα, μπορούν να συμμετάσχουν στη συμπλοκοποίηση του μετάλλου, αλλάζουν τη σταθερά  $pK_b$  του ligand, καθώς επίσης ρυθμίζει τη διαλυτότητα του δείκτη. Η προσθήκη ιόντων  $Zn^{2+}$  προκαλεί αύξηση του φθορισμού κατά 4.4 φορές χωρίς μετατόπιση του  $\lambda_{max}$  από τα 448 nm. Πρωτονίωση των αζώτων του μακροκυκλικού συστήματος προκαλεί επιπλέον αύξηση του φθορισμού. Φθορισμομετρική τιτλοδότηση έδειξε ότι η αύξηση αυτή γίνεται σημαντική μόνο σε τιμές pH κάτω του 4, οπότε ο δείκτης είναι κατάλληλος για χρήση σε φυσιολογικές τιμές pH. Η κβαντική απόδοση φθορισμού του δείκτη υπολογίστηκε  $>0.26$ .

## **ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο των ευκαρυωτικών κυττάρων και εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό σημαντικών ενδοκυττάρων διεργασιών. Η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων λαμβάνουν χώρα οι συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες, περιλαμβάνει την ανίχνευση και τη μέτρηση του διαθέσιμου ενδοκυττάρου ψευδαργύρου.<sup>31</sup>

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

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην ανίχνευση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και στον τρόπο με τον οποίο επαγόμενες αλλαγές στη συγκέντρωση ή στην κατανομή του, μπορούν να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Για το λόγο αυτό έχει συντεθεί μεγάλος αριθμός φθορίζοντων δεικτών ασβεστίου, οι χαρακτηριστικότεροι από τους οποίους είναι οι Fura-2, Indo-1, Quin-2 και BTC. Σε αντίθεση με το ασβέστιο, ο αριθμός φθορίζοντων δεικτών ενδοκυττάρου ψευδαργύρου είναι πολύ μικρός.

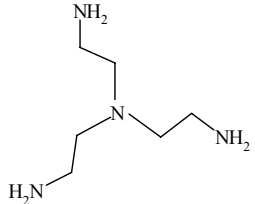
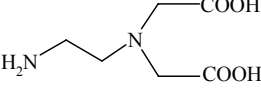
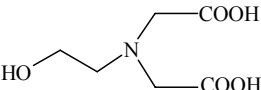
Κατά αναλογία με τους δείκτες, κυρίως ασβεστίου, που χρησιμοποιούν σαν χρωμοφόρο ομάδα κουμαρίνες, συντέθηκαν στο εργαστήριό μας παράγωγα της 4-μεθυλο-7-υδροξικουμαρίνης.<sup>32</sup> Σαν χειλικό μέρος στα μόρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν γνωστοί συμπλοκοποιητές ψευδαργύρου, όπως ο TREN (τρεις(2-αμινοαιθυλο)αμίνη, EDD (αιθυλενοδιαμινο-N,N-διοξικό οξύ) και HIDA N-(2-υδροξαιθυλο ιμινοδιοξικό οξύ). Οι συγκεκριμένες ενώσεις εμφανίζουν υψηλή τάση δέσμευσης και μεγάλη εκλεκτικότητα προς τον ψευδάργυρο, σε σχέση με άλλα μέταλλα, κυρίως ως προς το ασβέστιο και το μαγνήσιο.<sup>33,34</sup> Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι συμπλοκοποιητές ψευδαργύρου διακρίνονται ανάλογα με την ικανότητά τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Εξωκυτταριοί συμπλοκοποιητές (E): Οι διαλυτές μορφές του ελεύθερου συμπλοκοποιητή αλλά και του συμπλόκου του με τον ψευδάργυρο, δεν έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες.

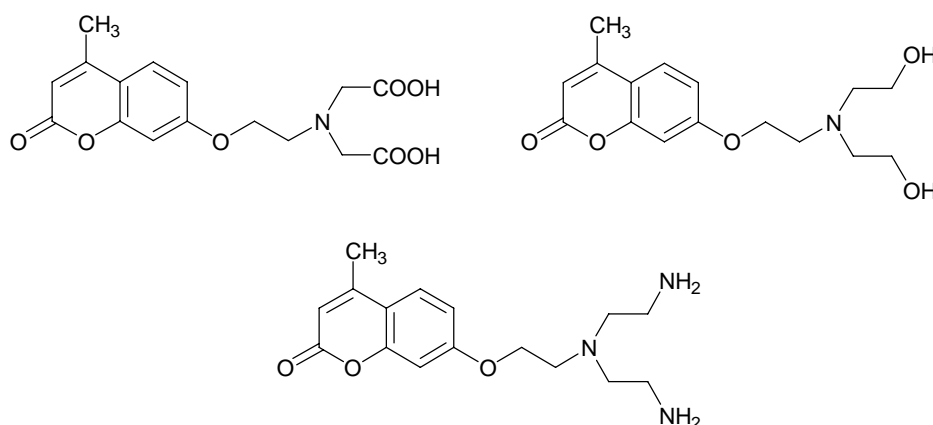
2. Διαπερατοί συμπλοκοποιητές (P): Κάποιες μορφές του ελεύθερου συμπλοκοποιητή μπορούν και διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Ένας συμπλοκοποιητής P τύπου, μπορεί να προσεγγίζει τον ψευδάργυρο μέσα και έξω από τα

κύτταρα, αλλά δεν επιφέρει ισορροπία στις συγκεντρώσεις του μετάλλου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

3. Συμπλοκοποιητές ιονοφόρα (I): Στην περίπτωση που κάποια μορφή του συμπλόκου του με τον ψευδάργυρο είναι χωρίς φορτίο, ο συμπλοκοποιητής μπορεί να δράσει σαν ιονοφόρο και θα επιφέρει ισορροπία στις συγκεντρώσεις του μετάλλου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες, καθώς και η δομή των συμπλοκοποιητών παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Συντομογραφία	$K_D$	ΔΟΜΗ	Διαπερατότητα
TREN	1.94867E-10		P
EDD	1.41585E-08		I
HIDA	8.81581E-08		I

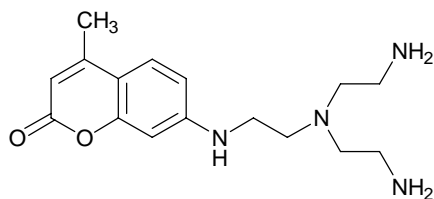
Έτσι συντέθηκαν στο εργαστήριό μας οι δείκτες, η δομή των οποίων φαίνεται στο επόμενο Σχήμα, όμως δεν είχαν τις επιθυμητές ιδιότητες.



Στη δική μας περίπτωση σχεδιάστηκε η σύνθεση ενός δείκτη που φέρει ως χρωμοφόρο την 4-μεθυλο-7-αμινοκουμαρίνη και συμπλοκοποιητή το μόριο του TREN, έτσι

ώστε να επιτευχθεί η ύπαρξη τετραάζα χηλικού μέρους για την καλύτερη δέσμευση και εκλεκτικότητα του δείκτη ως προς τον ψευδάργυρο.

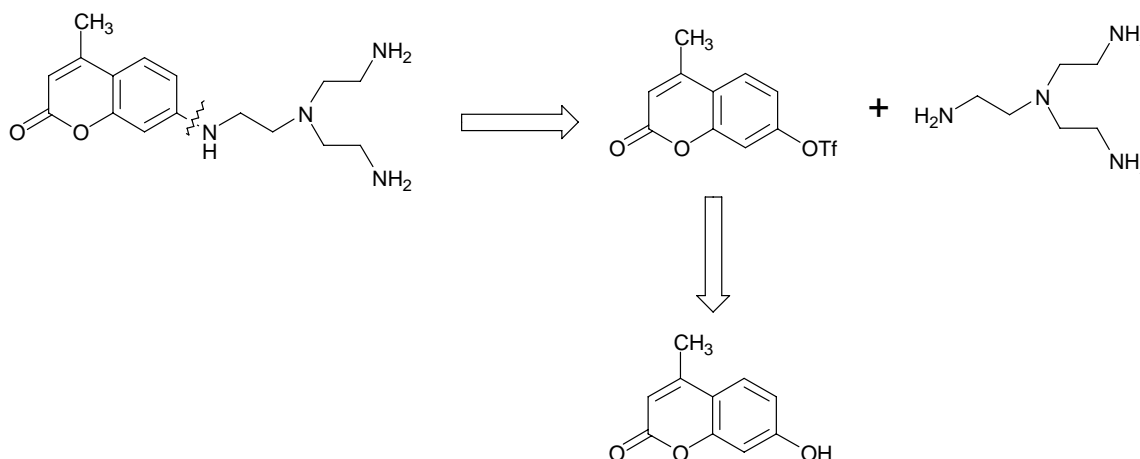
Η δομή του προτεινόμενου δείκτη παρουσιάζεται στο ακόλουθο Σχήμα.



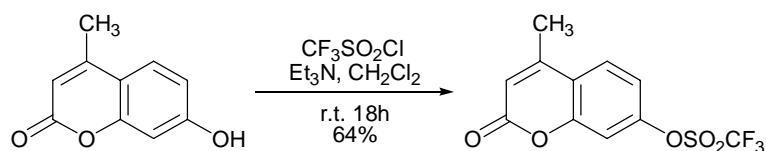
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Ρετροσυνθετική προσέγγιση Α

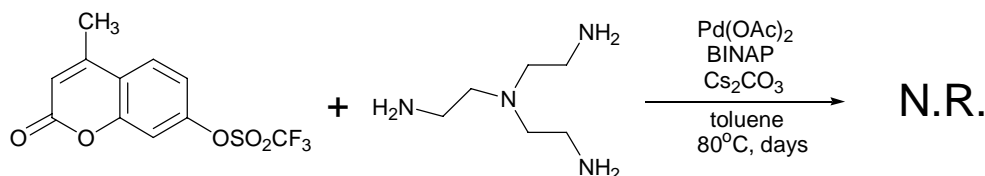
Η πρώτη προσέγγιση που έγινε στη σύνθεση του επιθυμητού δείκτη, βασίστηκε στην καταλυτική με παλλάδιο αντίδραση σύζευξης αρωματικών συστημάτων με αμίνες που εισήγαγαν οι Hartwig και Buchwald.<sup>36, 37, 38</sup> Στο παρακάτω Σχήμα παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική πορεία.



Η συνθετική πορεία περιλάμβανε στο πρώτο στάδιο τη μετατροπή της εμπορικά διαθέσιμης 7-υδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης, γνωστής ως ουμπελιφερόνη, στον αντίστοιχο τριφθορομεθυλοσουλφονικό εστέρα.<sup>35</sup>



Ακολούθησε η αντίδραση καταλυτικής σύζευξης<sup>36, 37, 38</sup> του παραπάνω εστέρα με τον συμπλοκοποιητή τρις-(2-αμινοαιθυλο)αμίνη (TREN).

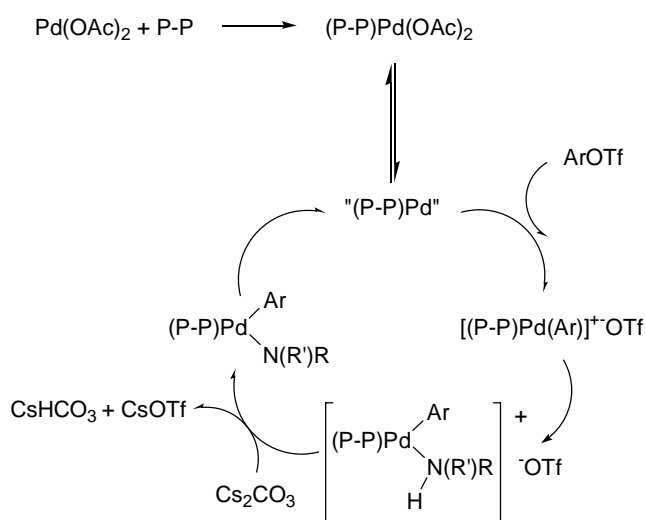




Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διάφορες αναλογίες υποκαταστάτη (BINAP) και προκαταλύτη (Pd(OAc)<sub>2</sub>). Επίσης επαναλήφθηκε υπό συνθήκες αυξημένης πίεσης αυτόκλειστο), και παρ' όλα αυτά δεν κατέληξε στο επιθυμητό προϊόν.

Ένα από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης που ταυτοποιήθηκε ήταν η αρχική ουμπελιφερόνη. Το πρόβλημα της υδρόλυσης του εστέρα ήταν γνωστό από τη βιβλιογραφία και εντείνεται ανάλογα με το είδος του χρησιμοποιούμενου καταλύτη και προκαταλύτη, τη βάση, το διαλύτη αλλά και τη διάρκεια της προσθήκης του εστέρα στο μείγμα της αντίδρασης. Βέλτιστες συνθήκες ως προς την αποφυγή του συγκεκριμένου παραπροϊόντος, εμφανίζονται να είναι η χρήση του καταλύτη BINAP (2,2'-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)-1,1'-διναφθύλιο) ή DPPF (1,1'-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)φεροκένιο), έναντι των P(o-tolyl)<sub>3</sub> (τρι-ο-τολουολυλοφωσφίνη), DPPE (1,1'-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)αιθυλένιο), DPPP (1,3-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)προπάνιο) κ.α. και του προκαταλύτη Pd(OAc)<sub>2</sub> (οξικό παλλάδιου(II)) σε σχέση με τους Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (τρις(διβενζυλιδενοακετονυλο)διπαλλάδιο), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)παλλάδιο). Επιπλέον, η χρήση του Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σαν βάση δίνει πολύ καλύτερες αποδόσεις αντί του t-BuONa και των K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DBU, proton sponge και άλλων ασθενέστερων βάσεων οι οποίες δεν οδηγούν σε προϊόντα.<sup>36, 37</sup> Αντίθετα με την περίπτωση των αρυλαλογονιδίων, η απόδοση της αντίδρασης αυξάνεται με τη χρησιμοποίηση τολουολίου αντί για THF. Τέλος, σημαντική για την αύξηση της απόδοσης είναι η προσθήκη του εστέρα στάγδην και για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στο μίγμα της αντίδρασης.

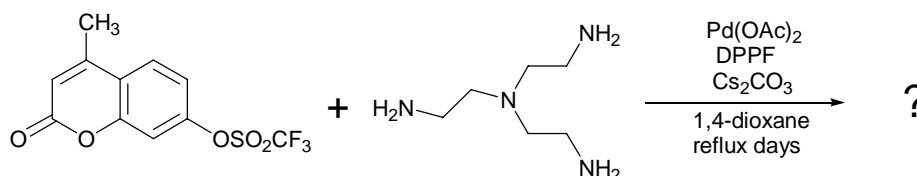
Ο καταλυτικός κύκλος που προτείνεται από την ερευνητική ομάδα του Stephen Buchwald φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες, όπως αυτές προτείνονται από τη βιβλιογραφία, δεν καταλήξαμε στο επιθυμητό προϊόν, γεγονός που

πιθανόν να οφείλεται στην σχεδόν μηδενική διαλυτότητα του TREN στο τολουόλιο. Για το λόγο αυτό η αντίδραση διεξήχθη και σε διαλύτη THF ο οποίος είναι αρκετά πιο πολικός. Και σε αυτή την περίπτωση δεν σχηματίστηκε προϊόν, καθώς οι καταλύτες καθίζαναν σαν άμορφη ελαιώδης μάζα.

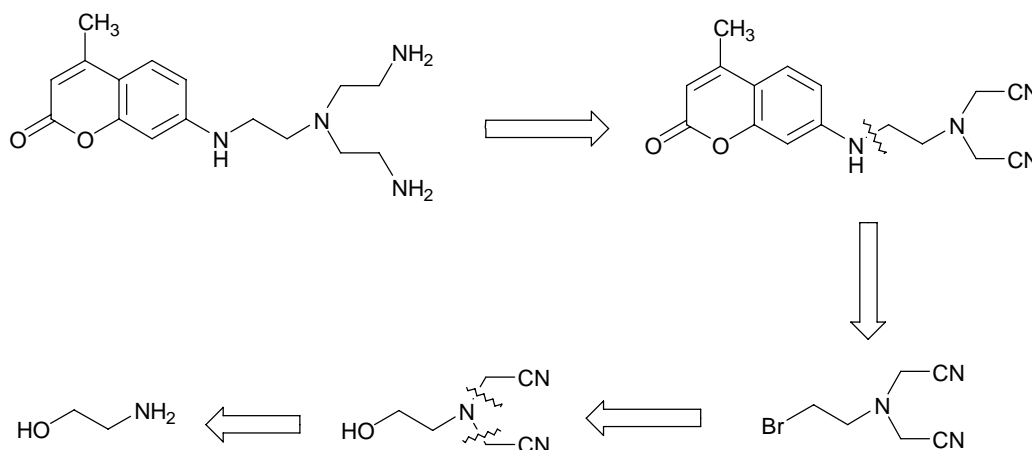
Στη συνέχεια δοκιμάστηκε μια τροποποιημένη αντίδραση καταλυτικής σύζευξης πολυαμινών με αρυλαλογονίδια που προτάθηκε από τους Beletskaya *et al.*<sup>39</sup>



Σε αυτή την περίπτωση η αντίδραση, εκτός από την αρχική κουμαρίνη, έδωσε και πλήθος άλλων προϊόντων που ανιχνεύτηκαν στο TLC. Ο διαχωρισμός αυτών με χρωματογραφία στήλης στάθηκε ανέφικτος λόγω της υψηλής πολικότητας και της δομής των προϊόντων. Προσπάθειες εκχύλισης των προϊόντων με διαβάθμιση του pH της υδατικής φάσης, δεν οδήγησαν στο διαχωρισμό τους, οπότε και η πορεία αυτή για τη σύνθεση του τελικού δείκτη εγκαταλείφθηκε.

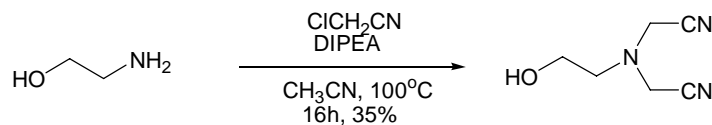
### **Ρετροσυνθετική προσέγγιση Β**

Η επόμενη προσέγγιση στην σύνθεση του επιθυμητού δείκτη βασίστηκε στην σταδιακή σύνθεση μιας πρόδρομης ένωσης του συμπλοκοποιητή, τη σύζευξη της με το χρωμοφόρο και τη δημιουργία του τελικού δείκτη.



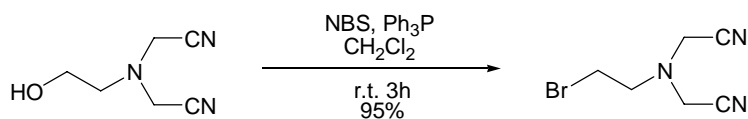
Ως αρχικές ενώσεις για τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος, χρησιμοποιήθηκαν η 2-αμινοαιθανόλη και το γλωροακετονιτρίλιο. Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλάμβανε την διαλκυλίωση της πρωτοταγούς αλειφατικής αμίνης, σε ένα στάδιο, μέσω μιας τυπικής

$S_N2$  αντίδρασης. Σαν βάση χρησιμοποιήθηκε η  $N,N$ -δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA), ενώ ως αλκυλιωτικό μέσο το χλωροακετονιτρίλιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλυτή ακετονιτρίλιο, υπό αυξημένη πίεση (αυτόκλειστο σύστημα) στους  $100^\circ\text{C}$ .



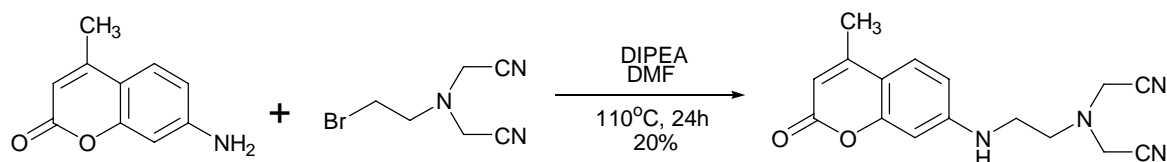
Το χαμηλό ποσοστό του προϊόντος της αντίδρασης οφείλεται στο γεγονός ότι στις συνθήκες της αντίδρασης σχηματίζεται και το προϊόν αλκυλίωσης της υδροξυλομάδας, ενώ υπάρχει και ένα ποσοστό μονοαλκυλιωμένου προϊόντος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,<sup>40,41,42</sup> παλαιότερες μελέτες σύνθεσης της διαλκυλιωμένης αμίνης στο εργαστήριό μας με ανθρακικό κάλιο ως βάση, δεν έδωσαν προϊόν αλκυλίωσης της υδροξυλομάδας, οδήγησαν ωστόσο αποκλειστικά στη δημιουργία του μονοαλκυλιωμένου προϊόντος. Επιπλέον, ένα πολύ μικρό ποσοστό του προϊόντος ενδέχεται να χάνεται κατά τη διάρκεια της κατεργασίας για την απομάκρυνση της βάσης, αφού το προϊόν είναι διαλυτό στο νερό.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μετατροπή της πρωτοταγούς αλκοόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο.<sup>43</sup>



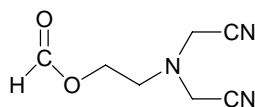
Η παραπάνω αντίδραση είναι ταχύτερη και οδηγεί στο επιθυμητό προϊόν σχεδόν ποσοτικά χωρίς τη δημιουργία παραπροϊόντων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μονοαλκυλίωσης της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης μέσω μιας  $S_N2$  αντίδρασης. Σαν βάση χρησιμοποιήθηκε η  $N,N$ -δισοπροπυλαιθυλαμίνη σε πολικό, μη πρωτικό διαλύτη,<sup>44</sup> σε συνθήκες αυξημένης πίεσης (αυτόκλειστο).



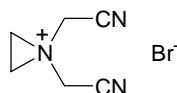
Η χαμηλή απόδοση της αντίδρασης οφείλεται κυρίως στη δημιουργία πλήθους παραπροϊόντων. Ένα από τα κύρια παραπροϊόντα της αντίδρασης που απομονώθηκε,

χαρακτηρίστηκε φασματοσκοπικά και προκαλεί ιδιαίτερη εντύπωση, είναι ο φορμυλεστέρας του αντίστοιχου βρωμιδίου.



Για την παραπέρα διερεύνηση της δημιουργίας του συγκεκριμένου προϊόντος πραγματοποιήθηκε αντίδραση του βρωμιδίου σε DMF παρουσία βάσης, οπότε και διαπιστώθηκε ο σχηματισμός του εστέρα σε ποσοστό 63%. Περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης αντίδρασης θα παρουσιαστεί σε επόμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

Άλλο πιθανό παραπροϊόν κατά την αντίδραση αλκυλίωσης της αμινοκουμαρίνης, είναι ο σχηματισμός της αζιριδίνης από το αντίστοιχο βρωμίδιο.

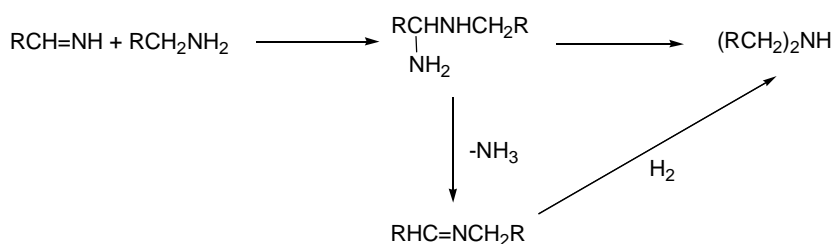


Το προϊόν αυτό δεν είναι δυνατό να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί, αφού είναι διαλυτό στο νερό ως αλάτι και απομακρύνεται κατά την επεξεργασία για τον καθαρισμό των προϊόντων.

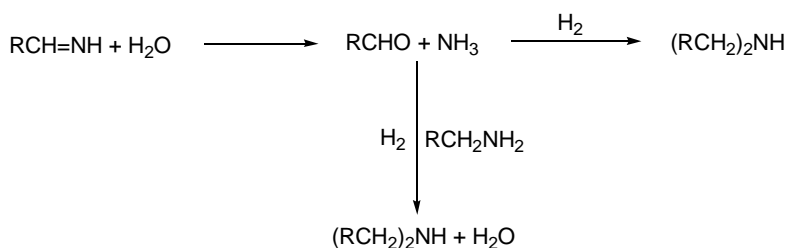
Το τελευταίο στάδιο για τη σύνθεση του δείκτη, περιελάμβανε την αναγωγή των νιτριλίων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την αναγωγή των νιτριλίων προς πρωτοταγείς αμίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναγωγικά αντιδραστήρια όπως  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ ,  $\text{NaOEt}$ ,  $\text{H}_2$  παρουσία καταλύτη και  $\text{NaBH}_4$  παρουσία καταλύτη όπως π.χ.  $\text{CoCl}_2$  ή  $\text{NiCl}_2$ .<sup>45</sup>

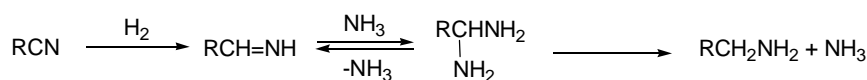
Οι αντιδράσεις αναγωγής νιτριλίων που περιλαμβάνουν καταλυτική υδρογόνωση, συχνά οδηγούν στη δημιουργία δευτεροταγών αμινών αντί πρωτοταγών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ενδιάμεσο της αναγωγής, το οποίο είναι μια ιμίνη, η οποία σε δεύτερο στάδιο ανάγεται περαιτέρω στην αμίνη. Η ιμίνη και η αμίνη μπορούν να δώσουν προϊόν προσθήκης που με απόσπαση  $\text{NH}_3$  ή υδρογονόλυση οδηγεί στη δευτεροταγή αμίνη.<sup>46</sup>



Σε δευτεροταγή αμίνη οδηγεί και μια ενδιάμεση αλδεύδη που μπορεί να σχηματιστεί αν σε υδατικό περιβάλλον, η ενδιάμεση μίνη υποστεί αναγωγική υδρόλυση.

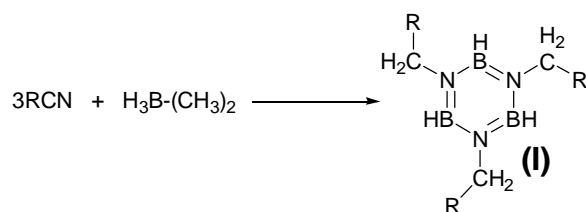


Για την αποφυγή του σχηματισμού των δευτεροταγών αμινών, οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ισχυρά όξινες συνθήκες για να μην αντιδράσει περαιτέρω η πρωτοταγής αμίνη σχηματίζοντας το αμμωνιακό άλας. Εναλλακτικά, χρήση περίσσειας αμμωνίας μετατοπίζει την ισορροπία προς την επιθυμητή πρωτοταγή αμίνη.

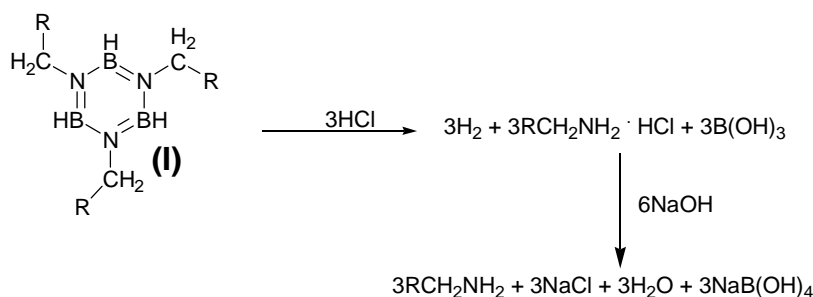


Εναλλακτικά, για την καταλυτική υδρογόνωση νιτριλίων, μπορεί να χρησιμοποιηθούν καταλύτες όπως Ni, Co και Raney Nickel σε υψηλές πιέσεις υδρογόνου (40-100 psi) σε θερμοκρασία ~100 °C.

Άλλη μέθοδος για την αναγωγή των νιτριλίων περιλαμβάνει τη χρήση του συμπλόκου αντιδραστήριου  $\text{H}_3\text{B}\cdot\text{S}(\text{CH}_3)_2$  (βορανίου-διμεθυλοσουλφιδίου). Η αναγωγή των νιτριλίων παρουσία του συγκεκριμένου αντιδραστήριου, πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού μίας ενδιάμεσου βοραζίνης **(I)**.<sup>47</sup>



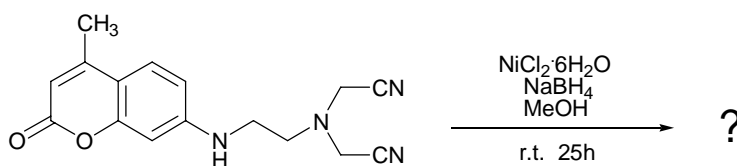
Το ενδιάμεσο **(I)** διασπάται στη συνέχεια με προσθήκη HCl 6N προς το αμμωνιακό αλάτι της πρωτοταγούς αμίνης, ενώ το τελικό προϊόν στην ουδέτερη του μορφή λαμβάνεται μετά από κατεργασία με NaOH.



Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η παραπάνω διαδικασία οδηγεί γρήγορα και με αρκετά μεγάλο ποσοστό στην αναγωγή των νιτριλίων.

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι που αναφέρθηκαν για την αναγωγή νιτριλίων προς πρωτοταγείς αμίνες, είχαν χρησιμοποιηθεί σε παλιότερες μελέτες στο εργαστήριό μας. Υποστρώματα παρόμοια με το δικό μας ήταν αδρανή στις παραπάνω συνθήκες, οπότε οι μέθοδοι αυτές δεν χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση μας.

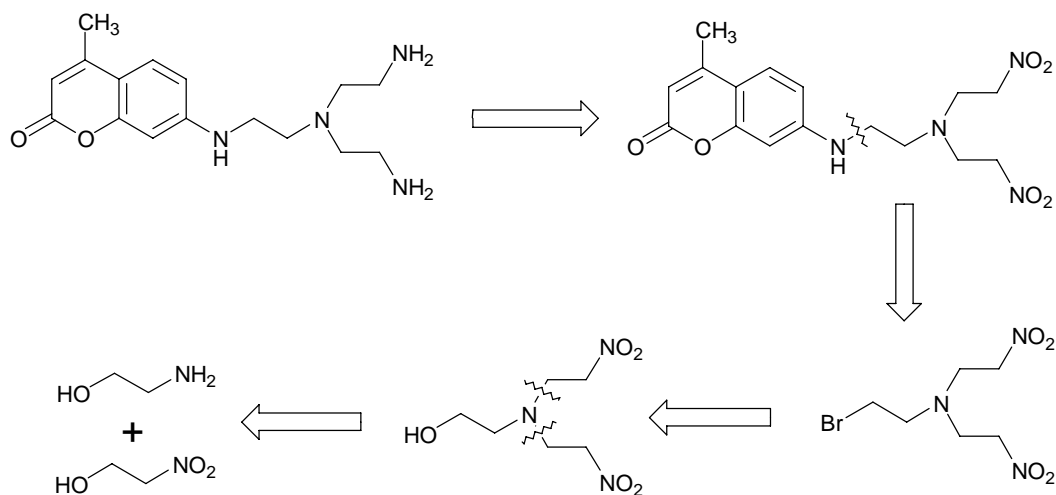
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε  $\text{NaBH}_4$  παρουσία καταλύτη  $\text{NiCl}_2$ .<sup>48</sup> Ο συνδυασμός του  $\text{NaBH}_4$  με αλογονίδια του  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$ ,  $\text{Cu(II)}$  και  $\text{Rh(II)}$ , έχει αναφερθεί ότι ανάγει ομάδες όπως νιτρίλια, αμίδια και ολεφίνες, τα οποία είναι αδρανή στη χρήση μόνο  $\text{NaBH}_4$ .<sup>49</sup>



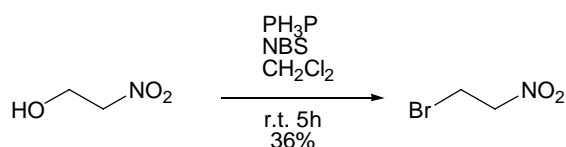
Η αντίδραση έδωσε τρία κύρια προϊόντα τα οποία δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν φασματοσκοπικά. Εξαιτίας της δυσκολίας αναγωγής των νιτριλίων και της αδυναμίας απομόνωσης των προϊόντων της αντίδρασης, η μέθοδος εγκαταλείφθηκε.

### **Ρετροσυνθετική προσέγγιση Γ**

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι νιτροομάδες στις περισσότερες των περιπτώσεων ανάγονται πολύ πιο εύκολα σε σχέση με τα νιτρίλια. Η τρίτη προσπάθεια σύνθεσης του επιθυμητού δείκτη, σχεδιάστηκε έτσι ώστε το τελευταίο στάδιο να περιλαμβάνει την αναγωγή νιτρομάδων προς τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες.

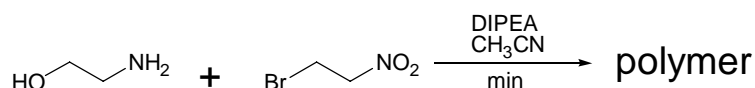


Στο πρώτο στάδιο η σύνθεση περιελάμβανε τη μετατροπή της υδροξυλομάδας της εμπορικά διαθέσιμης 2-νιτροαιθανόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο.



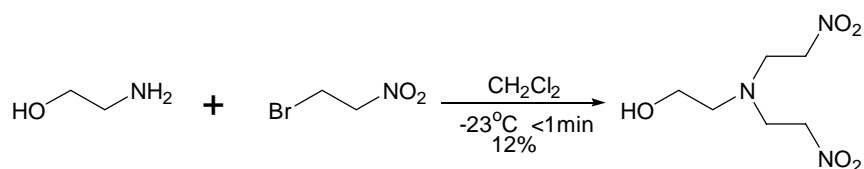
Παρότι η συγκεκριμένη μέθοδος μετατροπής υδροξυλομάδας στο αντίστοιχο βρωμίδιο δίνει, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και από εμπειρία εφαρμογών της αντίδρασης σε άλλα υποστρώματα στο εργαστήριό μας, μεγάλες αποδόσεις (πάνω από 90%), στην περίπτωση αυτή η απόδοση ήταν ιδιαίτερα χαμηλή.

Στη συνέχεια έγιναν προσπάθειες για τη σύζευξη του παραπάνω βρωμιδίου με την εμπορικά διαθέσιμη 2-αμινο-αιθανόλη αιθανολαμίνη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, παρουσία DIPEA σαν βάση.



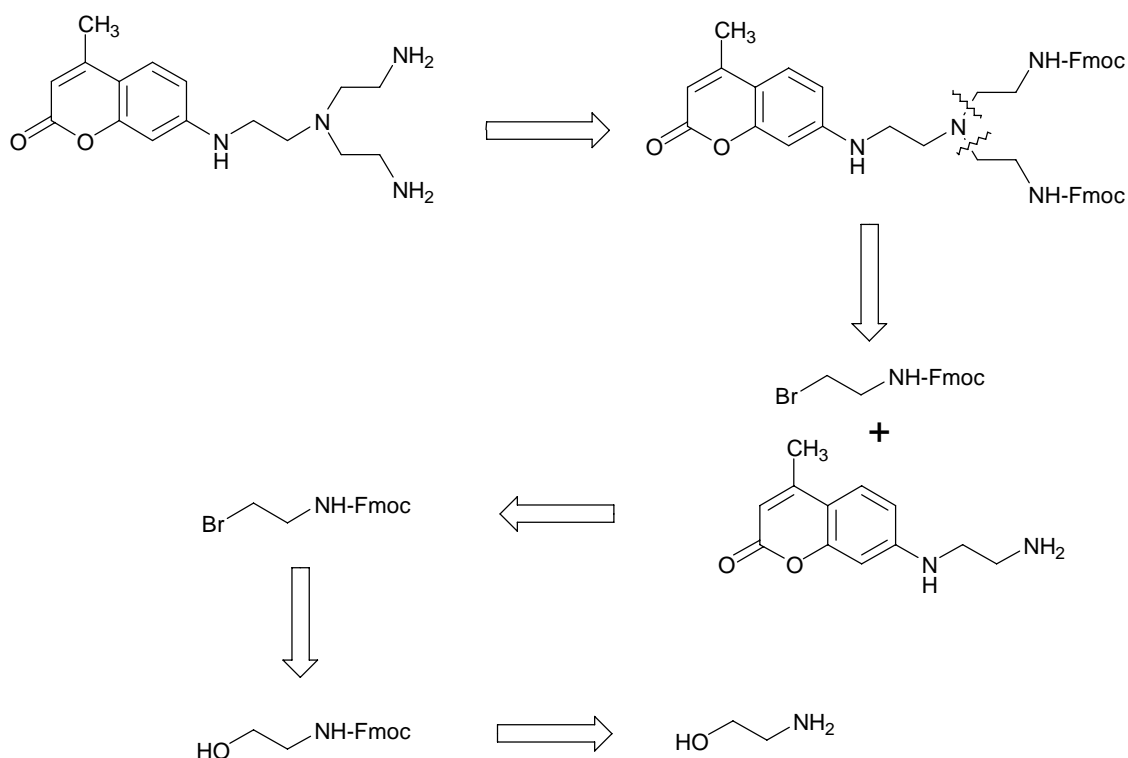
Αμέσως μετά την προσθήκη της αιθανολαμίνης στο διάλυμα του βρωμιδίου, άρχισε να δημιουργείται ένα κίτρινο στερεό. Η αντίδραση διεκόπη και το φάσμα NMR έδωσε κορυφές μεταξύ 0.5-1.5ppm που καταδεικνύει τη δημιουργία κάποιου πολυμερούς.

Η αντίδραση επαναλήφθηκε απουσία βάσης και σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος της αιθανολαμίνης στο διάλυμα του βρωμιδίου, η αντίδραση διεκόπη και απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν.



Το προϊόν, παρά το γεγονός ότι απομονώθηκε καθαρό, πολύ γρήγορα πολυμερίστηκε, οπότε δεν ήταν δυνατό να συνεχιστεί η συγκεκριμένη συνθετική πορεία.

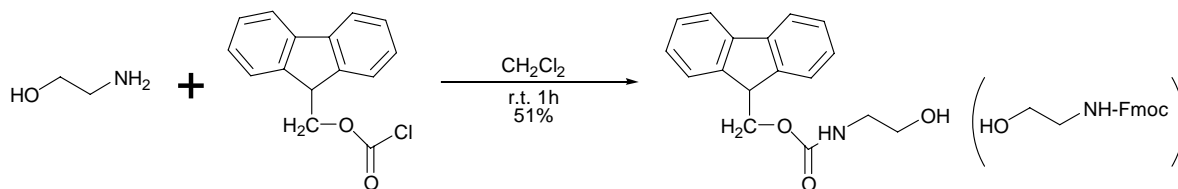
### Ρετροσυνθετική προσέγγιση Δ



Όπως φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα, η επόμενη προσπάθεια σύνθεσης του επιθυμητού δείκτη, βασίστηκε στη χρήση μιας γνωστής προστατευτικής ομάδας πρωτοταγών αμινών. Στην περίπτωση αυτή, το χειλικό μέρος του δείκτη δεν θα συντεθεί ξεχωριστά, θα συζευχθεί σταδιακά με το χρωμοφόρο.

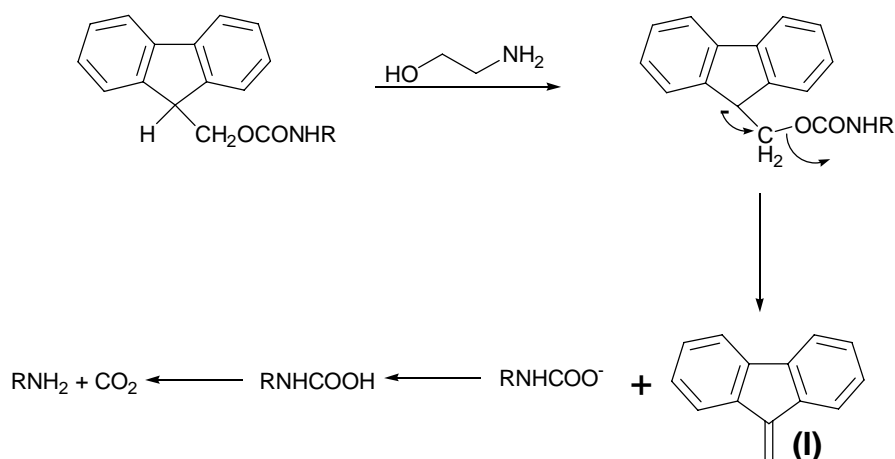
Χρησιμοποιώντας την εμπορικά διαθέσιμη 2-αμινοαιθανόλη, στο πρώτο στάδιο έγινε η αντίδραση προστασίας της πρωτοταγούς αμίνης με 9-φλουορενυλομεθυλοχλωροφορμίδιο (Fmoc-Cl).





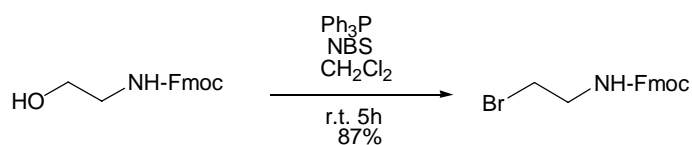
Η Fmoc χρησιμοποιείται ως προστατευτική ομάδα στη σύνθεση πεπτιδίων από το 1970<sup>50</sup> και ενδείκνυται για υποστρώματα τα οποία είναι ευαίσθητα σε συνθήκες όξινης ή ισχυρά βασικής αποπροστασίας. Το Fmoc-Cl αντιδρά με τις αμίνες δίνοντας υψηλά ποσοστά προϊόντος που φτάνουν το 88-97%. Παράλληλα, η αντίδραση αποπροστασίας είναι εξαιρετικά εύχρηστη, αφού μετά το πέρας της δεν απαιτείται επεξεργασία με οξύ και κατόπιν αλκαλοποίηση για την παραλαβή του τελικού προϊόντος.<sup>51</sup>

Στην παρούσα εργασία, το χαμηλό ποσοστό απόδοσης οφείλεται στο γεγονός ότι η 2-αμινοαιθανόλη την οποία και θέλαμε να προστατέψουμε, αποτελεί μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις για την αποπροστασία του Fmoc.

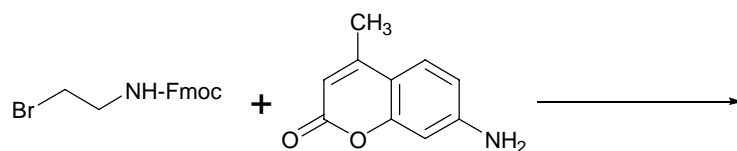


Το αλκένιο (**I**) σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζει αδιάλυτο πολυμερές, το οποίο πολύ εύκολα απομακρύνεται από το προϊόν.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μετατροπής του υδροξυλίου στο αντίστοιχο βρωμίδιο (απόδοση 87%).



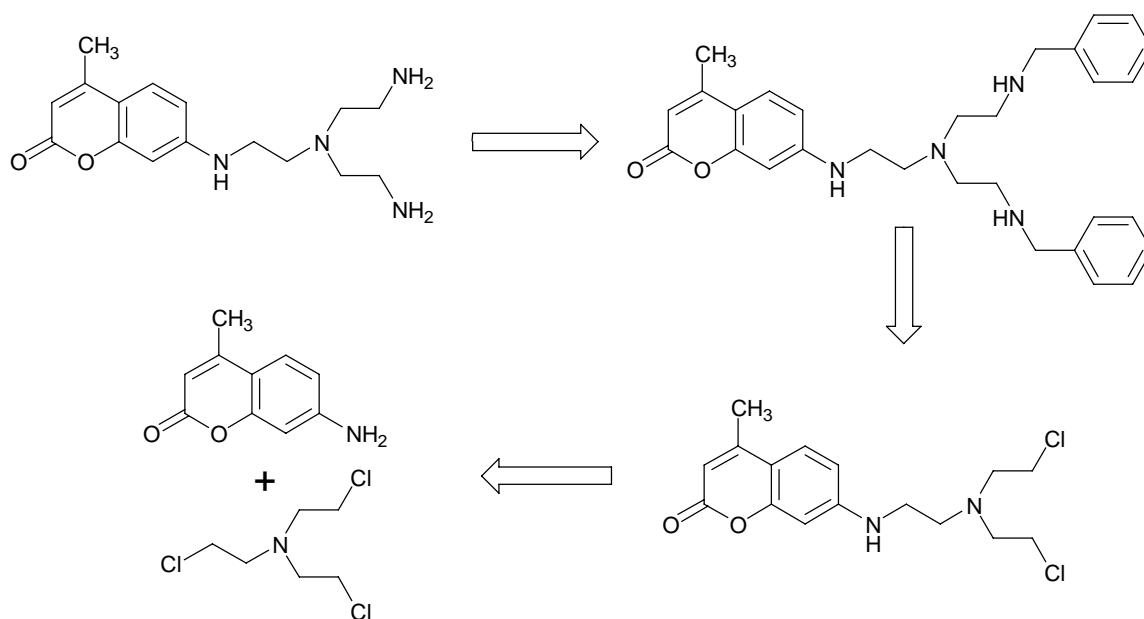
Ακολούθησε προσπάθεια σύζευξης του παραγόμενου βρωμιδίου με την 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη.



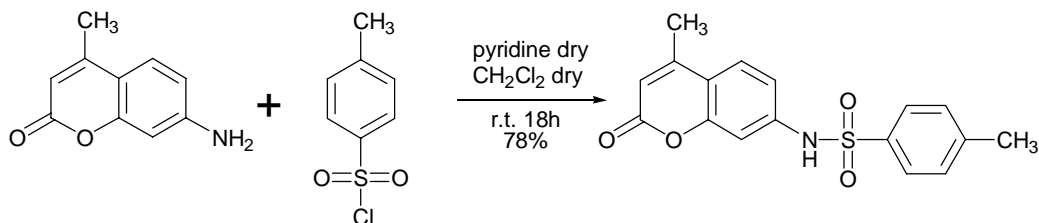
Κατά την παραπάνω αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε σαν βάση DIPEA ή ανθρακικό κάλιο. Αρχικά σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , όμως μετά από πολυήμερη θέρμανση υπό αναβρασμό δεν ανιχνεύτηκε κανένα προϊόν. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε άνυδρο τολουόλιο, αλλά η αντίδραση έδωσε πλήθος παραπροϊόντων παρ' όλο το μικρό ποσοστό κατανάλωσης της κουμαρίνης. Τέλος, όταν χρησιμοποιήθηκε άνυδρο DMF, σε 18 h παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση του βρωμιδίου με ταυτόχρονη παραγωγή δύο προϊόντων, ωστόσο κανένα από αυτά δεν ήταν το επιθυμητό.

### Ρετροσυνθετική προσέγγιση E

Η επόμενη συνθετική πορεία σχεδιάστηκε έτσι, ώστε το τελευταίο στάδιο, αποπροστασία αμινομάδων, να περιλαμβάνει υδρογονόλυση βενζυλομάδων. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η αντίστοιχη ρετροσύνθεση.

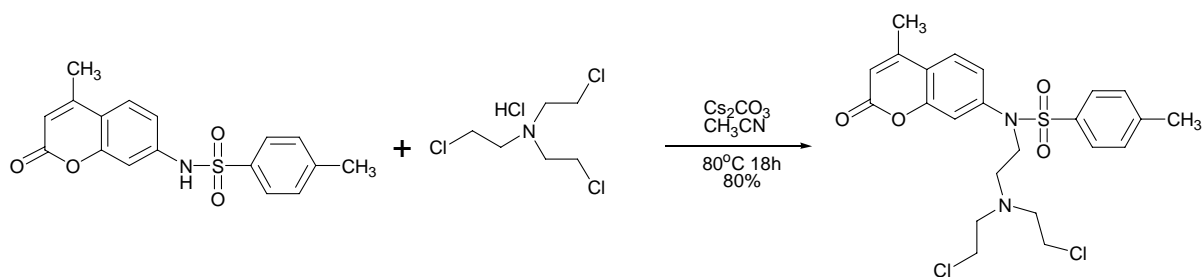


Στο πρώτο στάδιο της σύνθεσης, πραγματοποιήθηκε η προστασία της αμίνης της εμπορικά διαθέσιμης 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης, χρησιμοποιώντας p-τολουολοσουλφονυλο χλωρίδιο.



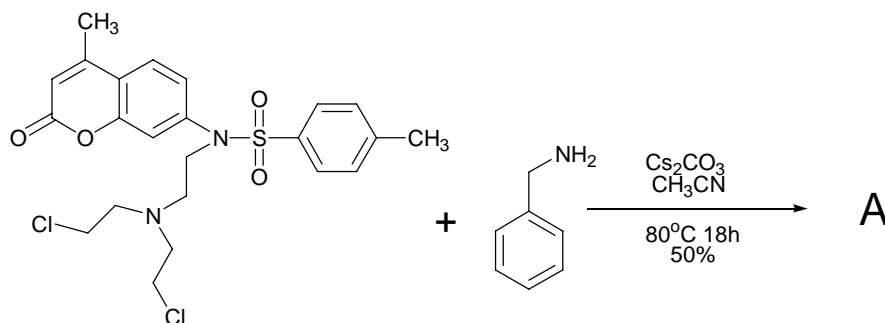
Η προστασία της αμίνης κρίθηκε επιβεβλημένη καθώς στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η σύζευξη της κουμαρίνης με την τρις(2-χλωροαιθυλο)αμίνη, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στο διαλκυλιωμένο παράγωγο. Αν και στη βιβλιογραφία αναφέρεται απόδοση για την αντίδραση γύρω στο 90%, η σχετικά χαμηλότερη απόδοση στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να οφείλεται σε τυχόν απώλεια του προϊόντος κατά την επεξεργασία με διάλυμα κιτρικού οξέος και θεικού χαλκού για την απομάκρυνση της πυριδίνης.

Όπως προαναφέρθηκε, στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύζευξη της προστατευμένης κουμαρίνης με το πρόδρομο του συμπλοκοποιητή TREN, που φέρει τρία άτομα χλωρίου.

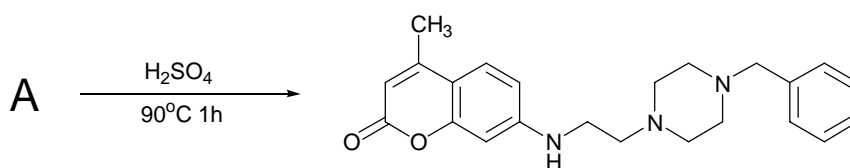


Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας περίσσεια τριχλωριδίου και ισχυρή ανόργανη βάση για την πλήρη κατανάλωση της κουμαρίνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι με τις συνθήκες αυτές επιτεύχθηκε η υψηλότερη απόδοση που είχε παρατηρηθεί μέχρι τώρα στην παρούσα μελέτη, κατά την αλκυλίωση κουμαρίνης.

Ακολούθησε η αντίδραση σύζευξης των χλωριδίων με τη βενζυλαμίνη.

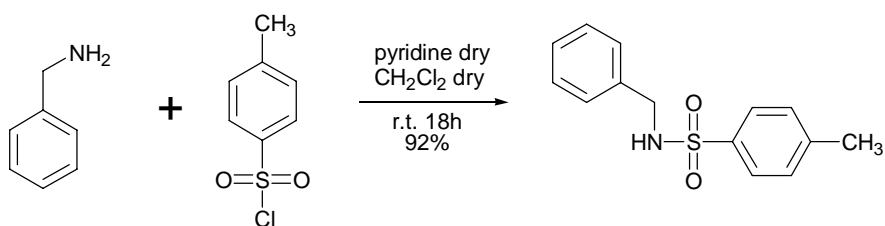


Μετά την επεξεργασία του μίγματος της αντίδρασης και το διαχωρισμό των προϊόντων, δεν καταφέραμε να εξάγουμε σαφή συμπεράσματα από τα φάσματα NMR για την ταυτότητα των προϊόντων. Έτσι, προχωρήσαμε στην αποπροστασία της αμίνης ώστε να απλουστευτεί το φάσμα.

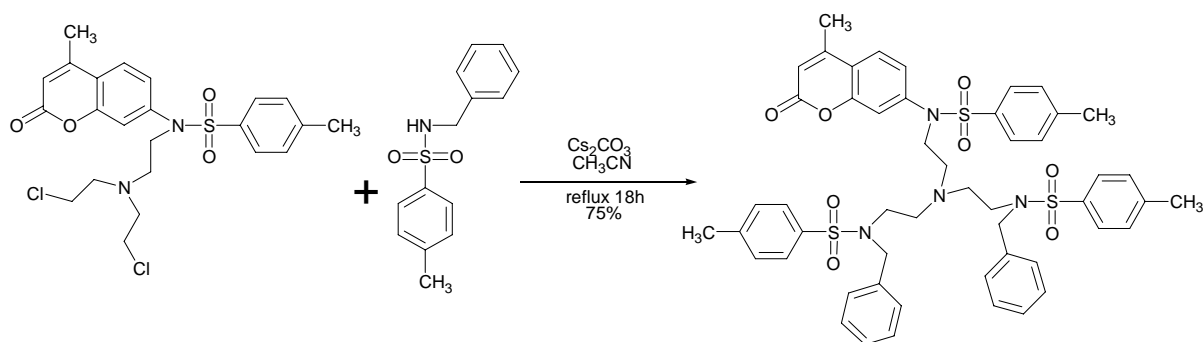


Όπως γίνεται αντιληπτό, κατά την αντίδραση σύζευξης, παρότι πραγματοποιήθηκε στάγδην προσθήκη του χλωριδίου στο διάλυμα της βενζυλαμίνης, δημιουργήθηκε το κυκλικό πιπεραζινικό προϊόν ως αποτέλεσμα της υποκατάστασης και των δύο ατόμων χλωρίου του συμπλοκοποιητή με το άζωτο της βενζυλαμίνης.

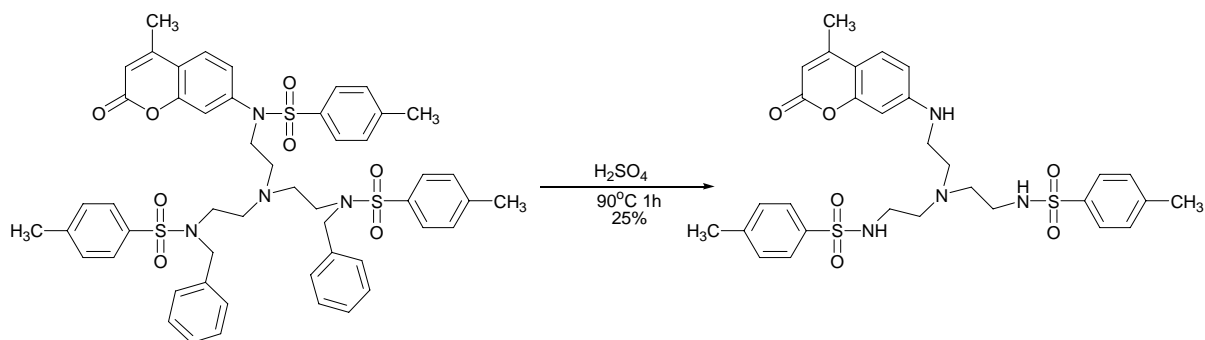
Για να αποφευχθεί η δημιουργία του κυκλικού προϊόντος, κατά την αντίδραση σύζευξης, συντέθηκε το προστατευμένο παράγωγο της βενζυλαμίνης.



Στη συνέχεια έγινε η αντίδραση μεταξύ της N-τοζυλοβενζυλαμίνης και του διγλωροπαραγώγου της κουμαρίνης.

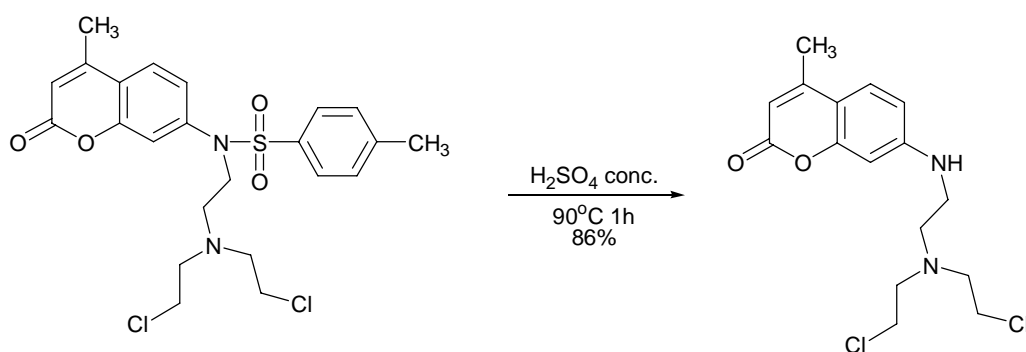


Το προτελευταίο στάδιο της σύνθεσης περιελάμβανε την αποπροστασία του μορίου από τις *p*-τολουολοσουλφονυλο ομάδες, ενώ θα ακολουθούσε στο τελευταίο στάδιο η υδρογόνωση των βενζυλομάδων προς σχηματισμό του τελικού δείκτη. Όμως, η κατεργασία με πυκνό θειικό οξύ είχε ως αποτέλεσμα την αποπροστασία των βενζυλαμινών χωρίς να απομακρυνθούν οι τοζυλομάδες.

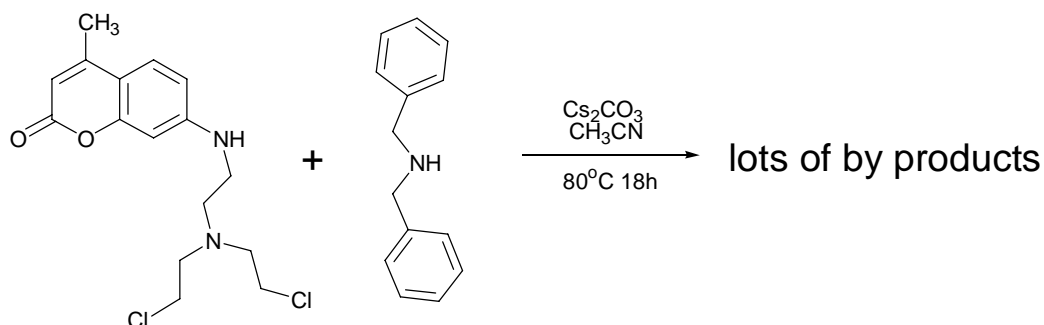


Περαιτέρω προσπάθεια αποπροστασίας με κατεργασία με HBr δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν.<sup>52</sup>

Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος αποφασίστηκε η χρήση διβενζυλαμίνης για τη σύζευξη με τα χλωρίδια. Επιπλέον, πριν από την αντίδραση με την διβενζυλαμίνη, πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία του μορίου της υποκατεστημένης αμινοκουμαρίνης, ώστε να μην χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια θειικό οξύ οπότε θα προέκυπτε πρόβλημα με τις ομάδες της βενζυλαμίνης.

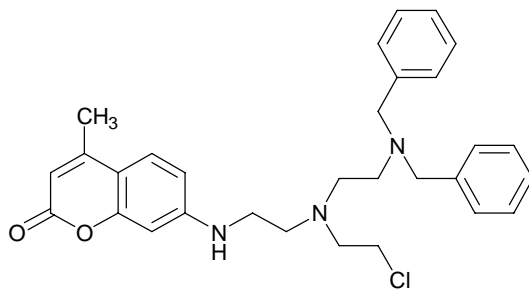


Η αντίδραση με τη διβενζυλαμίνη έγινε στις ίδιες συνθήκες που είχαν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση με την τοζυλο-προστατευμένη βενζυλαμίνη.

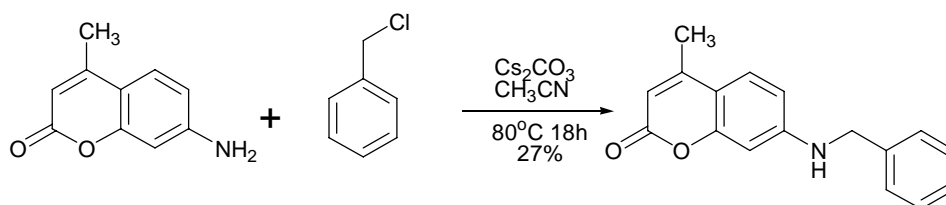


Η παραπάνω αντίδραση έδωσε πλήθος παραπροϊόντων, τα περισσότερα από τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά κυρίως εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν ήταν εφικτός ο

πλήρης ή ικανοποιητικός διαχωρισμός τους. Το μοναδικό από τα παραπροϊόντα που ταυτοποιήθηκαν ήταν το μονο-βενζυλιωμένο παράγωγο.

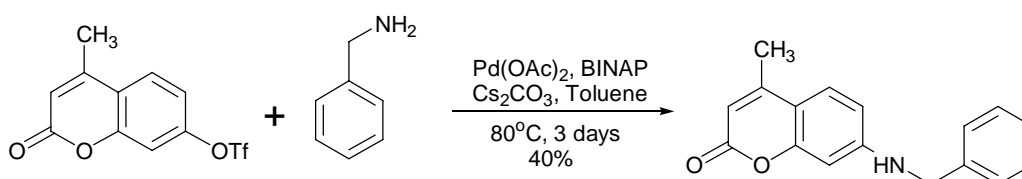


Λαμβάνοντας υπόψιν το ενδεχόμενο να έχει σχηματιστεί το κυκλικό παράγωγο σε μεγάλο ποσοστό, αφού η αμινοκουμαρίνη δεν είναι προστατευμένη, προχωρήσαμε στην αντίδραση μονοπροστασίας της κουμαρίνης χρησιμοποιώντας βενζυλοχλωρίδιο, ώστε στο τελευταίο βήμα της σύνθεσης ο επιθυμητός δείκτης να προκύψει από την υδρογονόλυση αποκλειστικά βενζυλομάδων.

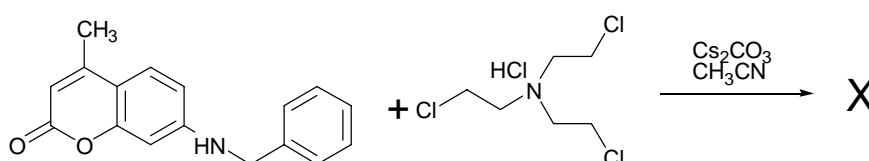


Η αρκετά χαμηλή απόδοση της αντίδρασης οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες, στην δημιουργία και του διβενζυλιωμένου παραγώγου της κουμαρίνης, αλλά και στο γεγονός ότι η αντίδραση διεκόπη πριν την πλήρη κατανάλωση της κουμαρίνης εξαιτίας της αύξησης του διβενζυλιωμένου προϊόντος.

Η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε και καταλυτικά κατά Hartwig και Buchwald,<sup>36, 37, 38</sup> με απόδοση σχεδόν διπλάσια σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση.



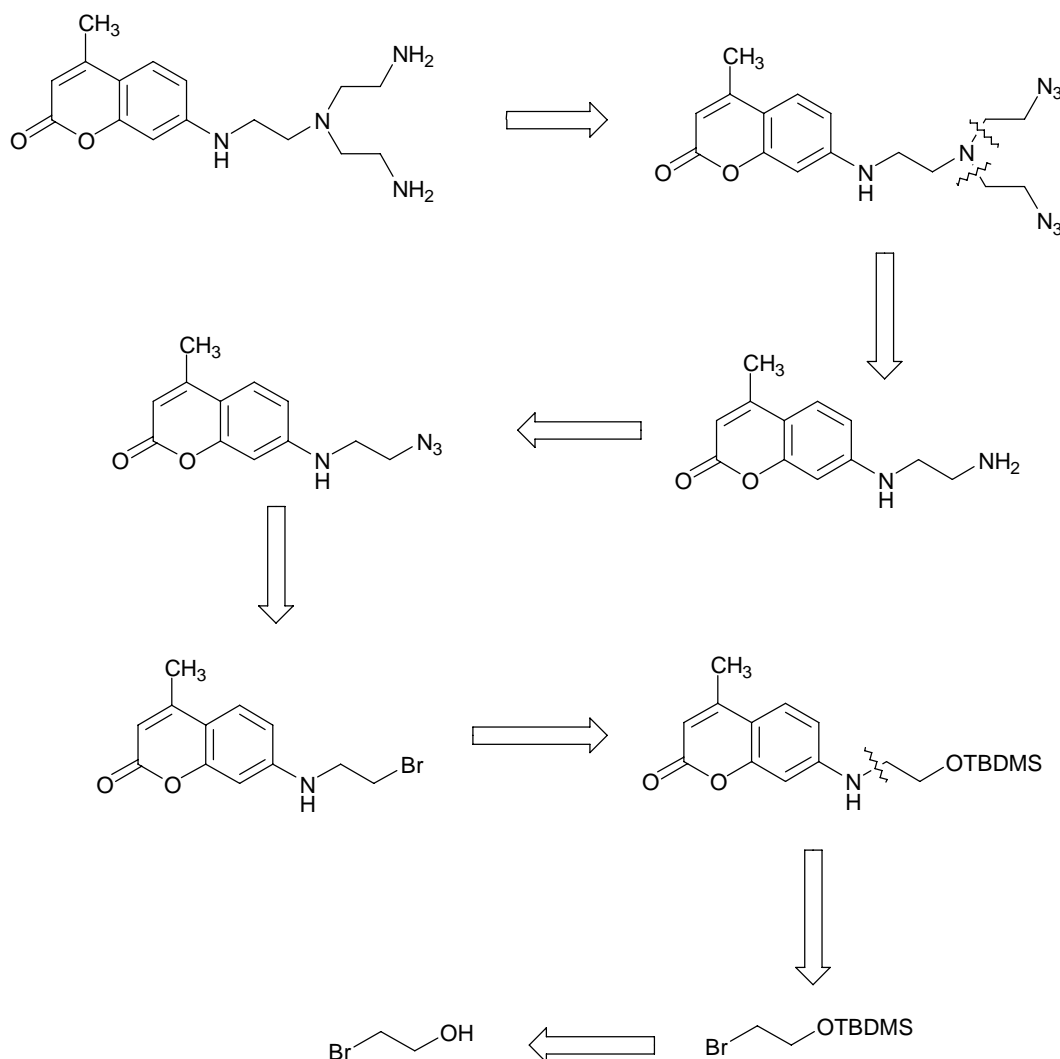
Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η σύζευξη της υποκατεστημένης κουμαρίνης με την τρις(2-χλωροαιθυλο)αμίνη.



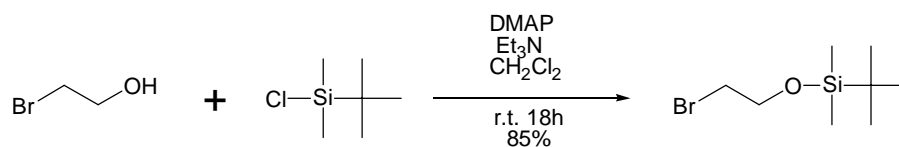
Η αντίδραση αρχικά πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν και σε παρόμοιες αντιδράσεις (80 °C, 18 h), όμως δεν ανιχνεύτηκε κανένα προϊόν, και για το λόγο αυτό η αντίδραση αφήθηκε υπό ανάδευση για άλλες 24 h, χωρίς αποτέλεσμα. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο σύστημα και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 100 °C. Ακόμα και μετά από 5 μέρες δεν εμφανίστηκε κανένα προϊόν, οπότε και η μέθοδος εγκαταλείφθηκε.

### Ρετροσυνθετική προσέγγιση ΣΤ

Η τελευταία προσπάθεια που έγινε για τη σύνθεση του επιθυμητού δείκτη, περιλαμβάνει στο τελευταίο στάδιο καταλυτική αναγωγή αζιδίων.

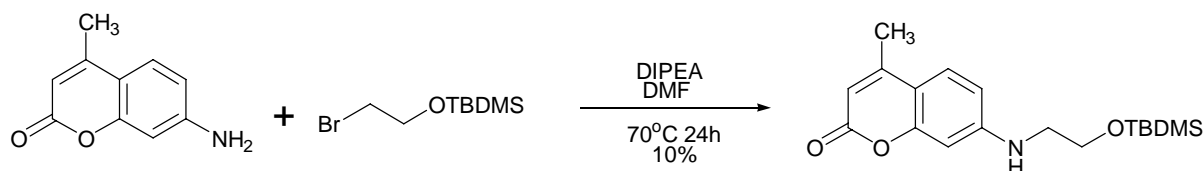


Η σύνθεση ξεκίνησε με την μετατροπή της εμπορικά διαθέσιμης 2-βρωμοαιθανόλης-1, στο προστατευμένο ως tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο παράγωγο.



Η παραπάνω είναι από τις πιο γνωστές και ευρέως χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες αλκοολών, αφού παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα έναντι των αντίστοιχων τριμεθυλοσίλυλο- και διμεθυλοϊσοπροπυλοσίλυλο- προστατευτικών ομάδων, ενώ παράλληλα η αντίδραση αποπροστασίας είναι το ίδιο γρήγορη και σχεδόν ποσοτική.<sup>53</sup>

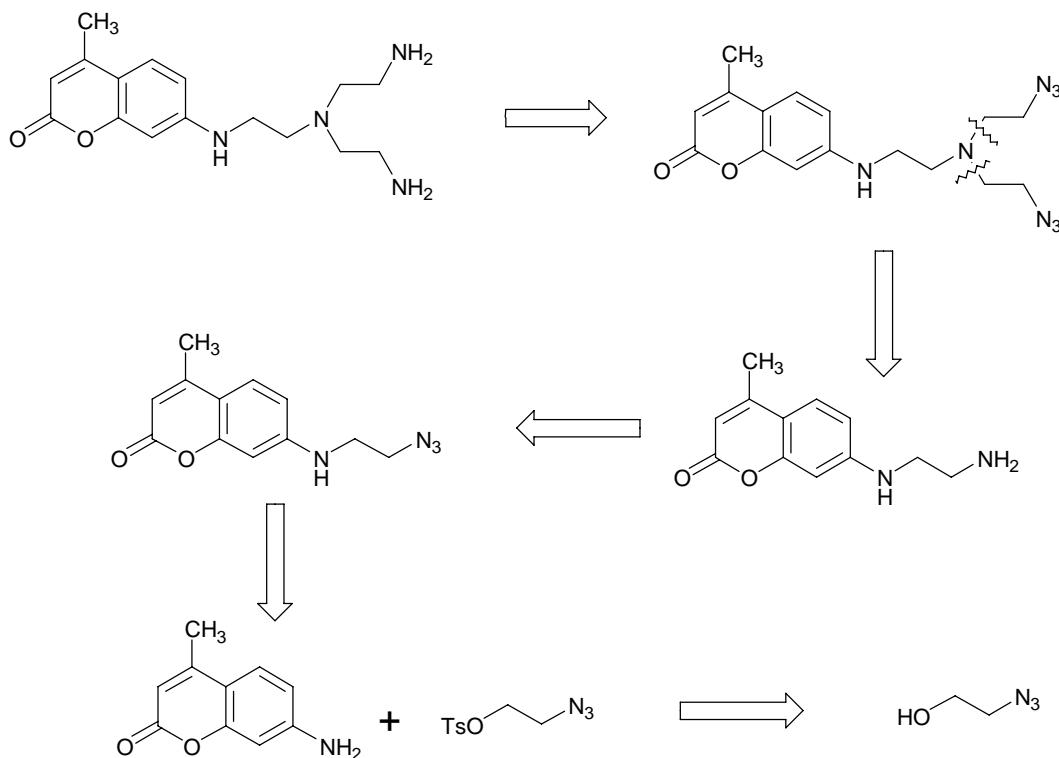
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύζευξης του παραπάνω βρωμιδίου με την 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη.



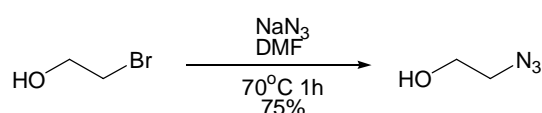
Παρά το γεγονός ότι δοκιμάστηκαν ποικίλες συνθήκες θερμοκρασίας, βάσεων και διαλυτών, η απόδοση της αντίδρασης δεν κατέστη δυνατό να αυξηθεί. Όχι μόνο δεν επιτευχθεί η πλήρης κατανάλωση της κουμαρίνης, αλλά ανιχνεύθηκε και πλήθος παραπροϊόντων με παρόμοια πολικότητα που δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστούν. Ακόμα και με προσθήκη καταλυτικής ποσότητας ιωδιούχου νατρίου ή HMPA ως συνδιαλύτη δεν καταφέραμε να οδηγήσουμε την αντίδραση σε πλήρη κατανάλωση της κουμαρίνης.

Εξαιτίας της πολύ χαμηλής απόδοσης της παραπάνω αντίδρασης αλλά και του πλήθους των συνθετικών βημάτων που απαιτούνταν, αποφασίσαμε να τροποποιήσουμε τη ρετροσυνθετική πορεία. Αντί να εισαχθεί η ομάδα του αζιδίου στην πλευρική αλυσίδα της κουμαρίνης, αντιπροτάθηκε η σύζευξη της κουμαρίνης με την αλυσίδα που θα φέρει αζίδιο. Η ρετροσυνθετική πορεία όπως προέκυψε μετά την τροποποίηση αυτή φαίνεται στο Σχήμα που ακολουθεί.

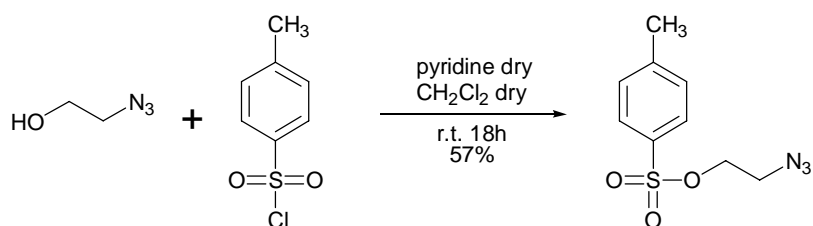




Αρχικά παρασκευάστηκε η 2-αζιδο-1-αιθανόλη από την εμπορικά διαθέσιμη 2-βρωμο-1-αιθανόλη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,<sup>54</sup> η αντίδραση δίνει, μετά από 11 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, το επιθυμητό προϊόν σε ποσοστό 96%. Στην παρούσα εργασία, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 70 °C, οπότε και ολοκληρώθηκε μετά από μία περίπου ώρα. Δυστυχώς, η απόδοση της αντίδρασης περιορίστηκε στο 75%, γεγονός που μάλλον οφείλεται στην απώλεια προϊόντος κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης του DMF μετά το πέρας της αντίδρασης.



Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του αντίστοιχου τοζυλεστέρα.

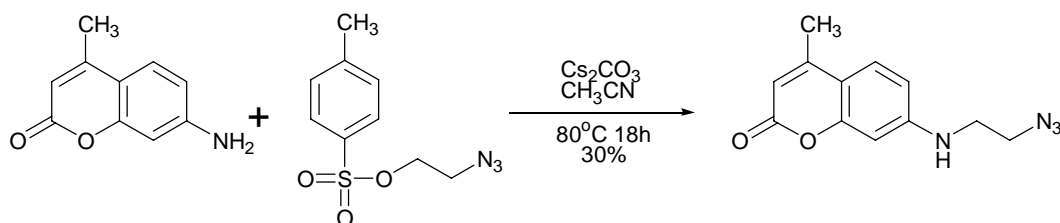


Η αντίδραση τοζυλίωσης που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε σε μίγμα πυριδίνης-διχλωρομεθανίου 1:1. Όμως ακόμα και σε αυτή την περίπτωση το

ποσοστό της αντίδρασης δεν ξεπέρασε το 57%, πιθανόν λόγω απομάκρυνσης του προϊόντος κατά τη διάρκεια της κατεργασίας με υδατικά διαλύματα Cu(II) και κιτρικού οξέος για την απομάκρυνση της πυριδίνης. Οι πρώτες προσπάθειες είχαν πραγματοποιηθεί με διαλύτη πυριδίνη,<sup>55</sup> αλλά έδωσαν ποσοστό 17%, ενώ με διαλύτη πυριδίνη/διχλωρομεθάνιο 1:20 το ποσοστό αυξήθηκε στο 45%.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η μετατροπή της 2-αζιδο-1-αιθανόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο ή χλωρίδιο δεν ήταν εφικτή, διότι για τη μετατροπή είναι απαραίτητη η χρήση τριφαινυλοφωσφίνης, η οποία όμως ανάγει το αζίδιο. Αντίδραση σχηματισμού του επιθυμητού αζιδίου από το 1,2-διβρωμοαιθάνιο, οδηγεί σε μίγμα προϊόντων και αρχικού αντιδραστήριου τα οποία δεν ήταν εφικτό να διαχωριστούν όπως αναφέρεται σε προηγούμενες εργασίες που είχαν εκπονηθεί στο εργαστήριό μας.

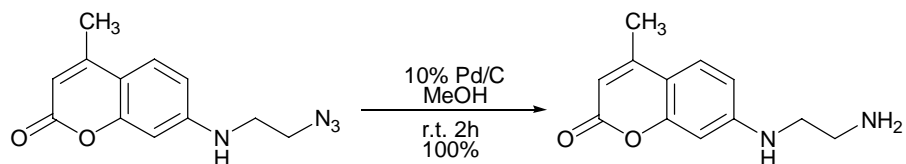
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύζευξης του παραπάνω αζιδίου με την 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη.



Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>56</sup> η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη DMF, χρησιμοποιώντας ανθρακικό κάλιο ως βάση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση αποφασίσαμε να αποφύγουμε τη χρήση του DMF, αφού από προηγούμενες αντιδράσεις που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο είχαμε διαπιστώσει ότι οι εκχυλίσες με νερό που πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση του DMF απομακρύνουν και μέρος των προϊόντων. Χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη ακετονιτρίλιο, το οποίο απομακρύνεται γρήγορα με απόσταξη και σαν βάση το πιο ισχυρό ανθρακικό καίσιο.

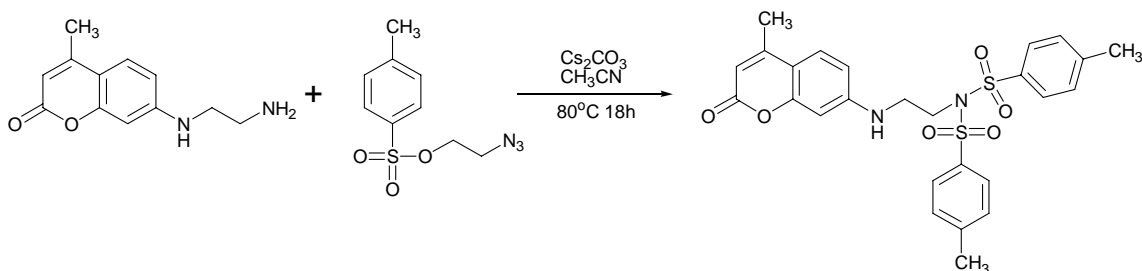
Παρά τις προσπάθειες που έγιναν δεν κατέστη δυνατή η αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης, γεγονός που οφείλεται κυρίως στη δημιουργία και του διακυλιωμένου παραγώγου που μας οδήγησε στη διακοπή της αντίδρασης όταν το προϊόν αυτό άρχισε να αυξάνει. Σχετικά καλύτερες αποδόσεις έδωσε η αντίδραση σε DMF και βάση proton sponge, όμως το προϊόν δεν ήταν δυνατό να διαχωριστεί πλήρως από το proton sponge.

Ακολούθησε η καταλυτική αναγωγή του αζιδίου προς την αντίστοιχη αμίνη.



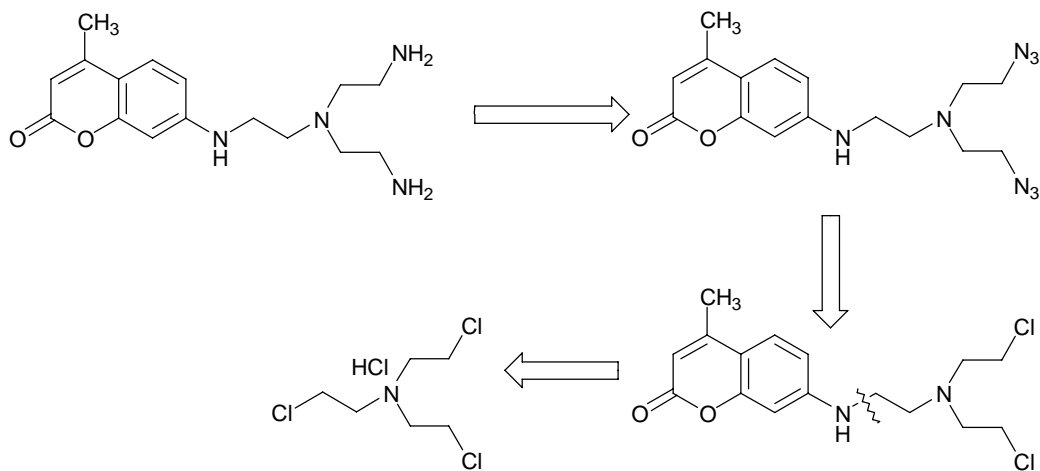
Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε αρκετά γρήγορα δίνοντας ποσοτικά το επιθυμητό προϊόν.

Ακολούθησε η αντίδραση σύζευξης της παραπάνω αμίνης με την τοξυλιωμένη 2-αζιδοαιθανόλη.



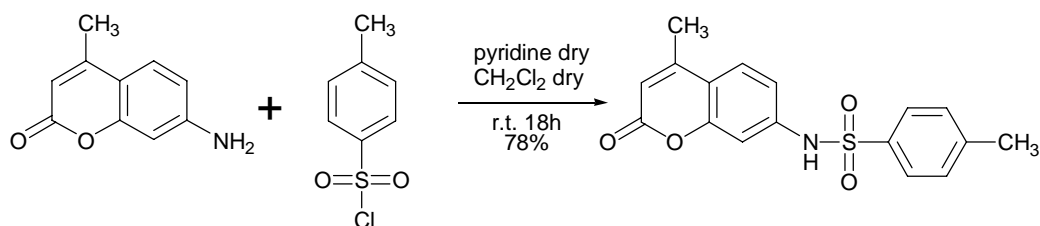
Όπως φαίνεται και από το παραπάνω Σχήμα το αποτέλεσμα της αντίδρασης ήταν το διτοξυλιωμένο αντί για το διαλκυλιωμένο προϊόν. Η *p*-τολουολοσουλφονυλομάδα είναι γνωστή για τη χρήση της ως προστατευτική ομάδα αμινών.<sup>57</sup>

Εξαιτίας του αδιεξόδου στο οποίο οδηγηθήκαμε, η ρετροσυνθετική πορεία τροποποιήθηκε για άλλη μία φορά, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.

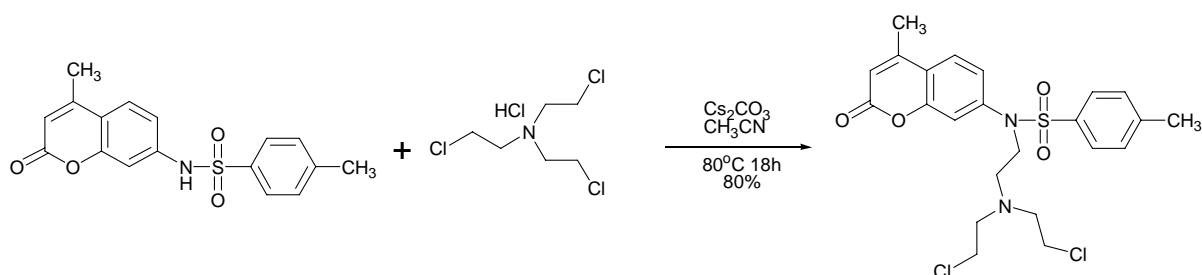


Αρχικά, το χειλικό μέρος του μορίου θα συζευχθεί με την αμινοκουμαρίνη φέροντας άτομα χλωρίου στην αλυσίδα. Θα ακολουθήσει η μετατροπή των χλωριδίων στα αντίστοιχα αζίδια, ενώ στο τελικό στάδιο ο δείκτης θα προκύψει από την καταλυτική υδρογονόλυση των αζιδίων προς τις αντίστοιχες αμίνες.

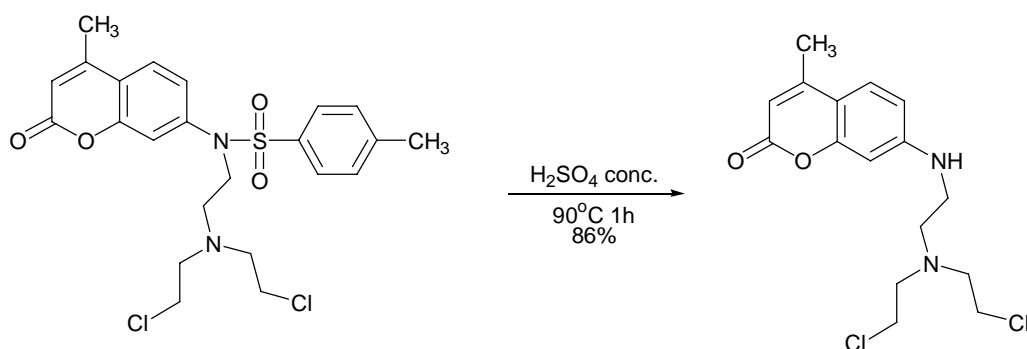
Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιέλαβε την προστασία της αμίνης της κουμαρίνης, χρησιμοποιώντας ως προστατευτική ομάδα το *p*-τολουολοσουλφονυλο χλωρίδιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με διαδικασία που έχει προαναφερθεί στην παρούσα εργασία.



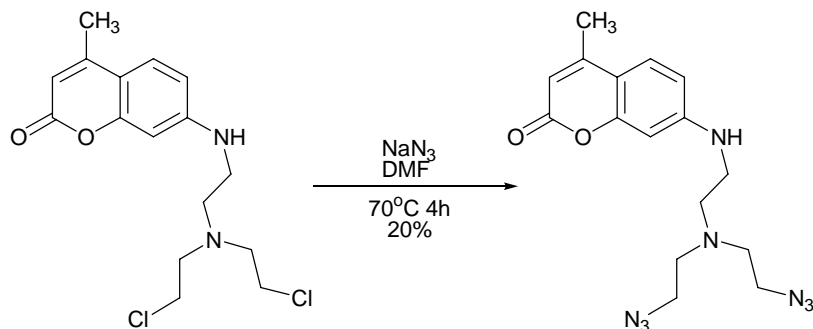
Ακολούθησε η σύζευξη με το χλωρίδιο, σύμφωνα με προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία.



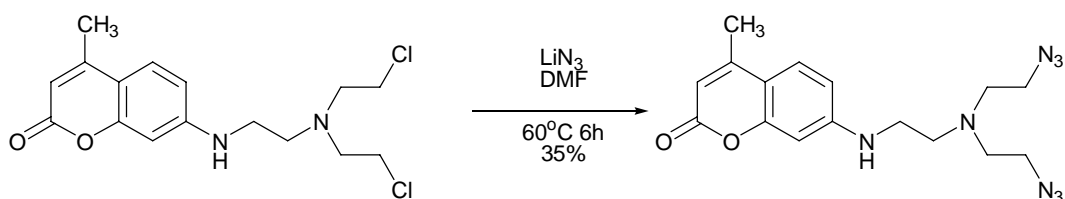
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της αμινομάδας της κουμαρίνης, πριν από την μετατροπή των χλωριδίων στα αντίστοιχα αζίδια. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε τυχόν καταστροφή των αζιδίων κατά τη διάρκεια της κατεργασίας της ένωσης με το πυκνό θειικό οξύ.



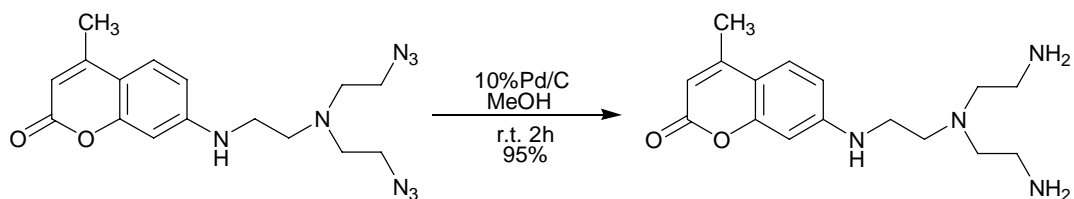
Ακολούθησε η μετατροπή των χλωριδίων στα αντίστοιχα αζίδια.



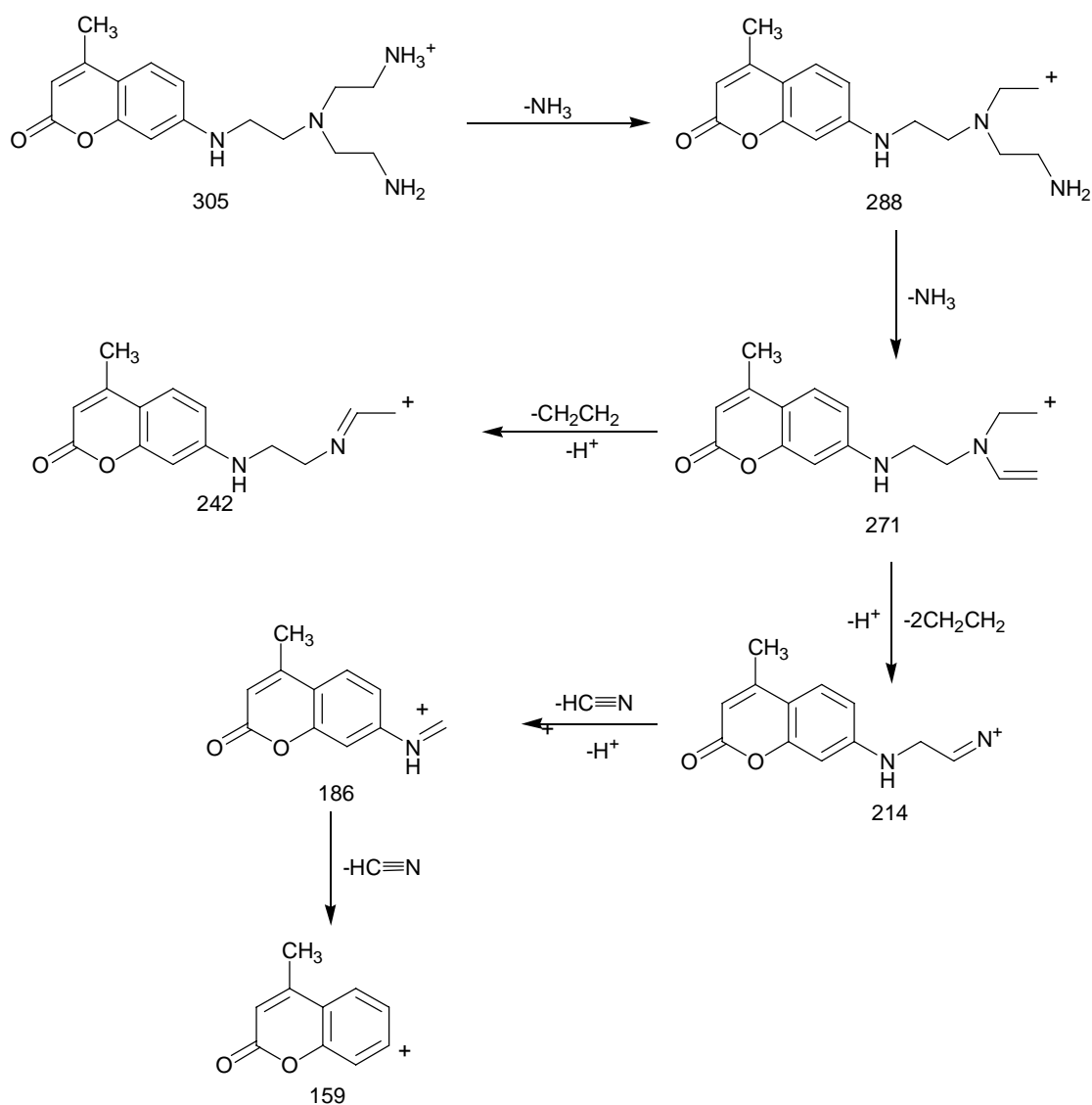
Παρά το γεγονός ότι σε όλες τις προηγούμενες αντιδράσεις μετατροπής αλογόνου σε αζίδιο που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας λαμβάνονταν ως μοναδικό προϊόν το επιθυμητό αζίδιο, στη συγκεκριμένη περίπτωση εκτός από το επιθυμητό προϊόν, σχηματίστηκε άλλο ένα σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα το οποίο δεν καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε. Πιθανόν, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης να δημιουργείται το κυκλικό παραπροϊόν, αφού η αμινομάδα της κουμαρίνης δεν είναι πλέον προστατευμένη. Η ποσότητα του αζιδίου που απομονώθηκε δεν ήταν ικανή ώστε να προχωρήσουμε στο επόμενο στάδιο της καταλυτικής υδρογονόλυσης. Αποφασίσαμε να επαναλάβουμε την αντίδραση χρησιμοποιώντας αντί του αζιδίου του νατρίου το αντίστοιχο του λιθίου το οποίο είναι πιο δραστικό. Επιπλέον, αποφασίστηκε η αποφυγή θέρμανσης της αντίδρασης.



Η αντίδραση αρχικά αφέθηκε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου όμως την επόμενη μέρα διαπιστώθηκε ότι δεν είχε σχηματιστεί το επιθυμητό αζίδιο. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 60°C οπότε, μετά από έξι ώρες διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αρχικού αντιδραστήριου. Η απόδοση της αντίδρασης δεν ήταν ούτε αυτή τη φορά ιδιαίτερος ικανοποιητική, παρά ταύτα η ποσότητα του παραγόμενου αζιδίου ήταν τέτοια ώστε να μπορούμε να προχωρήσουμε στην τελική αντίδραση της αναγωγής των αζιδίων.



Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες οπότε και διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αρχικού αζιδίου. Από το φάσμα NMR υπήρξαν σαφείς ενδείξεις για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Για την πληρέστερη διευκρίνιση της δομής του προϊόντος πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος MS όπου ανιχνεύθηκε το μοριακό ιόν  $[M+H]^+=305$  που αντιστοιχεί στο τελικό προϊόν στο οποίο μία από τις αμινομάδες έχει πρωτονιωθεί. Παραπέρα θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος (MS/MS) πιστοποίησε τη δομή της ένωσης όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



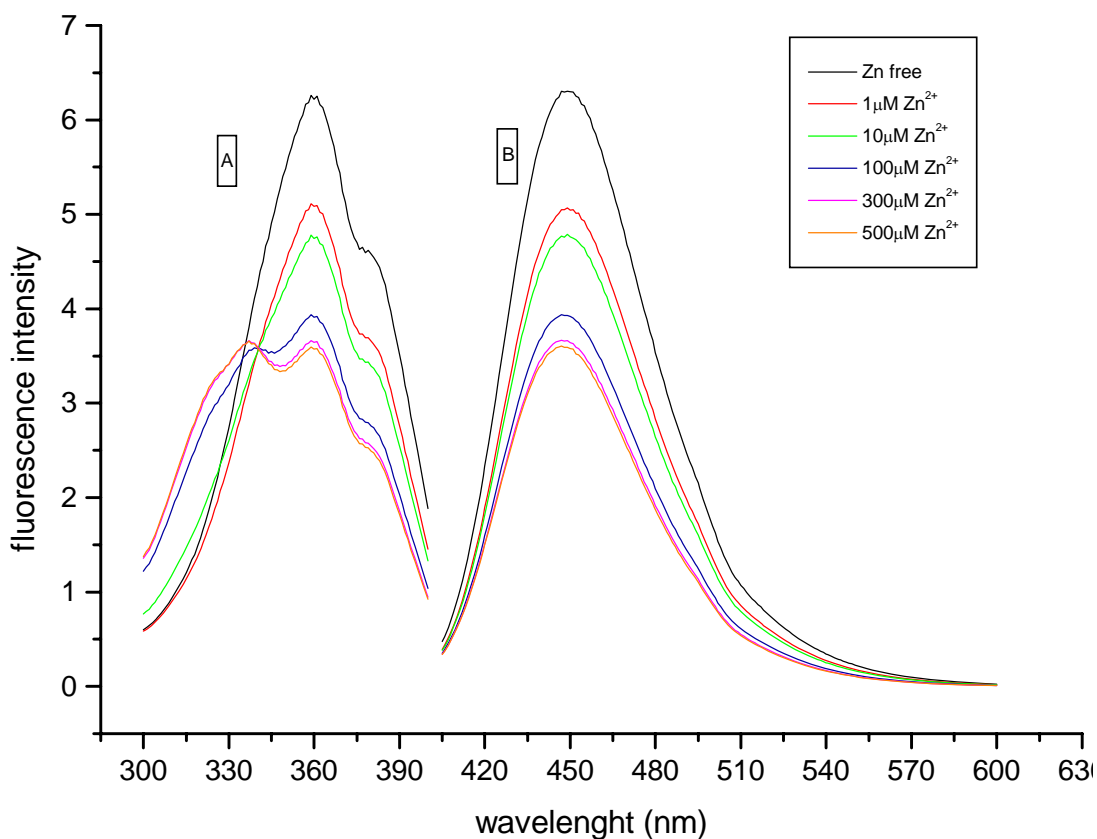
Η συνολική απόδοση της σύνθεσης του επιθυμητού δείκτη υπολογίστηκε σε 18% ξεκινώντας από την κουμαρίνη. Η απόδοση αυτή μπορεί να γίνει αρκετά υψηλότερη αν επιτευχθεί αύξηση της απόδοσης στην αντίδραση μετατροπής των χλωριδίων στα αντίστοιχα αζίδια.

## Μελέτες φθορισμού

Οι προκαταρκτικές μελέτες φθορισμού του τελικού δείκτη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του φθορισμόμετρου Aminco Bowman (Spectronics Co., USA).

### **Εξάρτηση της έντασης φθορισμού του δείκτη τύπου TREN από τη συγκέντρωση ιόντων $Zn^{2+}$**

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES και 10  $\mu$ M του δείκτη. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.8 στους 25 °C. Οι συγκεντρώσεις ιόντων ψευδαργύρου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M και 500  $\mu$ M. Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα η ελεύθερη μορφή του δείκτη εμφανίζει μέγιστο στο φάσμα διέγερσης στα 359 nm, το οποίο μετατοπίζεται στα 337 nm μετά τη δέσμευση με τον ψευδάργυρο. Τα φάσματα εμφανίζουν ισοβεστικό σημείο στα 340 nm. Όταν το μόριο διεγείρεται στα 359 nm, δίνει φάσμα εκπομπής με μέγιστο στα 450 nm το οποίο δεν αλλάζει ακόμα και μετά από κορεσμό με ιόντα ψευδαργύρου (300  $\mu$ M). Όπως αναμενόταν η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων  $Zn^{2+}$  έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης φθορισμού η οποία φθάνει σε ποσοστό 42% μετά από προσθήκη 300  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ .



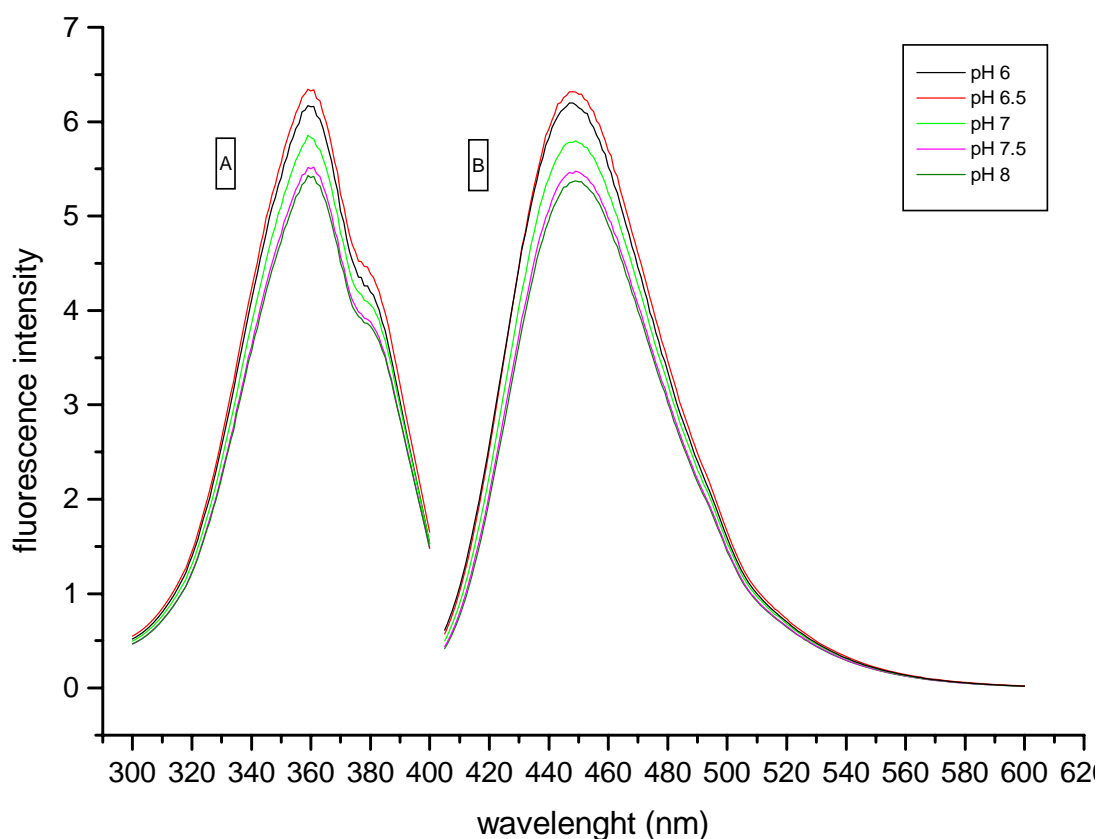
Η υποχρωμική μεταβολή του μήκους κύματος διέγερσης του δείκτη, καθώς και η μείωση της έντασης φθορισμού στο φάσμα εκπομπής οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο τελικός δείκτης τύπου TREN ανήκει στην κατηγορία δεικτών PCT (μεταφοράς φορτίου) και είναι κατάλληλος για μετρήσεις λόγου εντάσεων φθορισμού.

Η σταθερά διάστασης του δείκτη υπολογίστηκε σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Tsien στα 18  $\mu\text{M}$  και είναι ανάλογη με αυτές των δεικτών ZnACF-1 και ZnACF-2.

### Εξάρτηση της έντασης φθορισμού του δείκτη τύπου TREN από το pH του διαλύματος

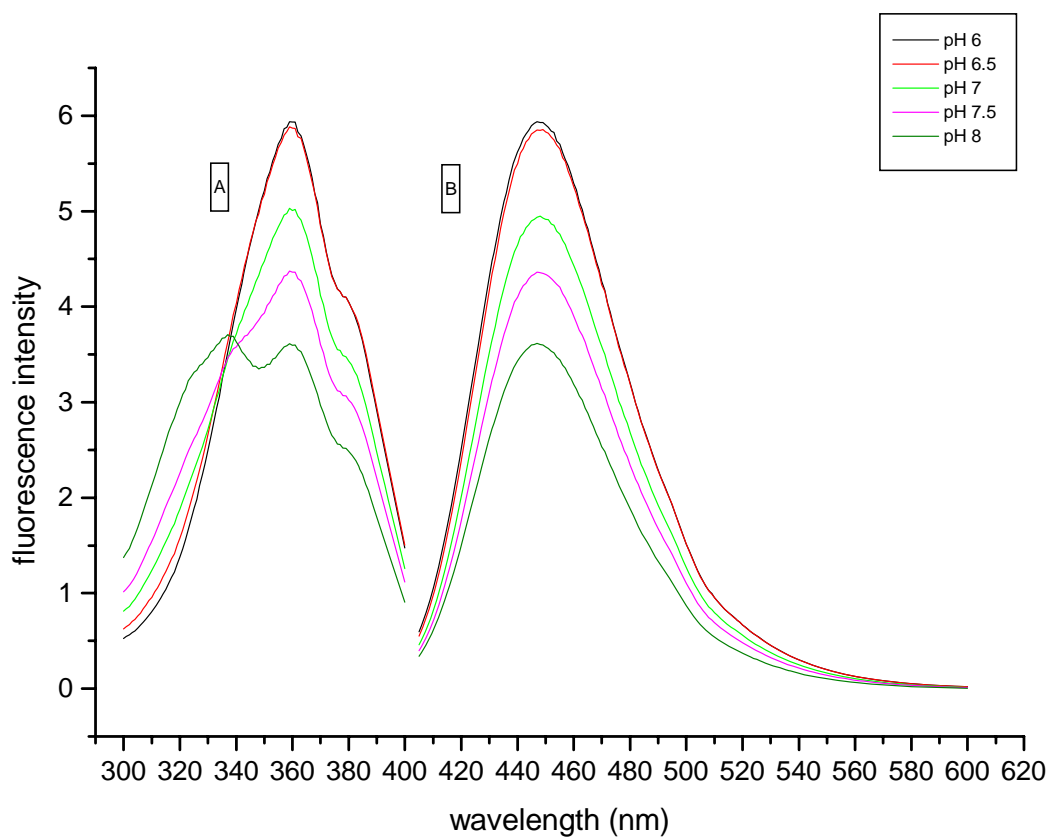
Εξαιτίας της δυνατότητας των πολυάμινο-δεικτών να πρωτονιώνονται, εξετάστηκε η συμπεριφορά τόσο του ελεύθερου όσο και του δεσμευμένου με ιόντα ψευδαργύρου δείκτη σε ένα εύρος pH από 6 ως 8.

Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES και 10  $\mu\text{M}$  του Δείκτη. Η συγκέντρωση ιόντων ψευδαργύρου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 300  $\mu\text{M}$ . Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στις τιμές 6, 6.5, 7, 7.5 και 8 στους 25 °C. Όπως φαίνεται από το Σχήμα που ακολουθεί, η ένταση του φθορισμού του ελεύθερου δείκτη μειώνεται κατά 8% όταν το pH αυξάνεται από 6 σε 7, ενώ η μείωση είναι μόλις 4% όταν το pH αυξάνεται από 7 σε 8. Επιπλέον, δεν παρατηρείται καμία μεταβολή τόσο στο μέγιστο του φάσματος διέγερσης όσο και αυτού του φάσματος εκπομπής.





Αντίθετα, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν με την αλλαγή του pH στη συμπλοκοποιημένη με το ιόν ψευδαργύρου μορφή του δείκτη ήταν πολύ πιο διακριτές. Κατά την αύξηση του pH από 6 σε 7 παρατηρείται μείωση στην ένταση φθορισμού κατά 41%, ενώ το φάσμα διέγερσης δεν παρουσιάζει καμία διαφορά από αυτό του ελεύθερου δείκτη. Καθώς το pH αυξάνεται από 7 σε 8, παρατηρούνται αλλαγές στο φάσμα διέγερσης που αντιστοιχούν σε αυτό της συμπλοκοποιημένης μορφής του δείκτη. Όπως διαφαίνεται, η δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου εξαρτάται από το pH εξαιτίας της δυνατότητας του δείκτη να βρίσκεται στην πρωτονιωμένη του μορφή σε όξινο και ουδέτερο pH. Η δέσμευση ιόντων ψευδαργύρου είναι δυνατή σε pH πάνω από 7.5. Η εξάρτηση της δεσμευμένης με ιόντα  $Zn^{2+}$  μορφής του δείκτη από το pH φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Γενικές Πληροφορίες

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου. Όπου απαιτήθηκαν άνυδρες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε πύρωση των γυάλινων συσκευών υπό υψηλό κενό.

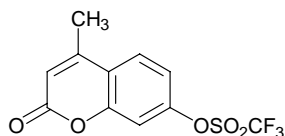
Οι διαλύτες τολουόλιο, 1,4-διοξάνιο και THF αποστάχθηκαν πάνω από μεταλλικό νάτριο, η πυριδίνη και το DMF αποστάχθηκαν πάνω από υδρίδιο του ασβεστίου, το διχλωρομεθάνιο πάνω από πεντοξείδιο του φωσφόρου, ενώ η μεθανόλη παρουσία μαγνησίου. Σε όλους τους διαλύτες προστέθηκαν μοριακά κόσκινα 3Å ή 4Å. Τέλος το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκε χωρίς να έχει προηγηθεί απόσταξη άλλα ξηράνθηκε με μοριακά κόσκινα 3Å.

Το Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Fluka) πριν τη χρήση του τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη σε σύνδεση με γραμμή υψηλού κενού όπου παρεμβαλλόταν P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Το σύστημα τοποθετήθηκε για 12 h σε ελαιόλουτρο στους 140 °C.

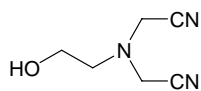
Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε γυάλινα πλακίδια επιστρωμένα με silica gel, τύπου 60F<sub>254</sub> (Merck). Για την εμφάνιση των πλακιδίων TLC χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολία UV (254 και 366 nm), ατμοί ιωδίου, 5% αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος και θέρμανση. Για τον διαχωρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel 60-200 mesh (Merck).

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματόμετρα MSL300 και AMX500 της Bruker 300 και 500 MHz αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm σε σχέση με το τετραμεθυλο σιλάνιο. Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer μοντέλο 735. Τα φάσματα GC/MS καταγράφηκαν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Shimadzu GC-MS-QP5050A. Η λήψη του φάσματος μάζας του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο μάζας ThermoFinnigan LCQ Advantage.

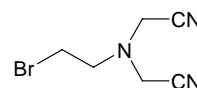
**Ενώσεις που συντέθηκαν**



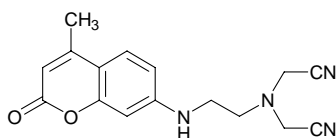
**Ένωση 1**



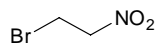
**Ένωση 2**



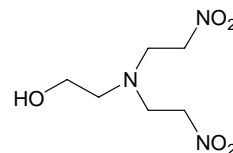
**Ένωση 3**



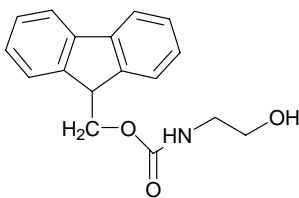
**Ένωση 4**



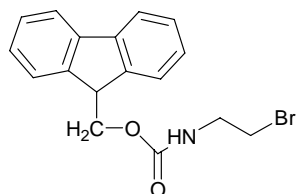
**Ένωση 5**



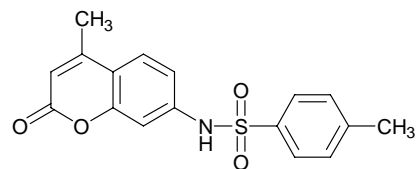
**Ένωση 6**



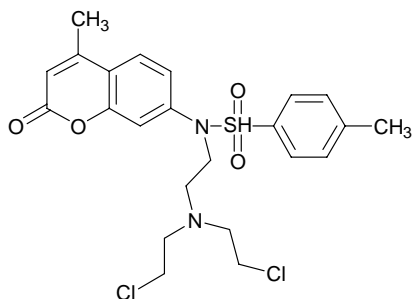
**Ένωση 7**



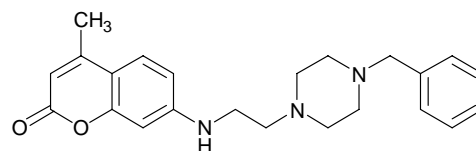
**Ένωση 8**



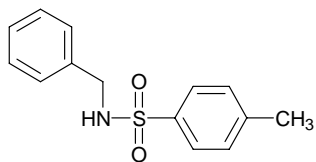
**Ένωση 9**



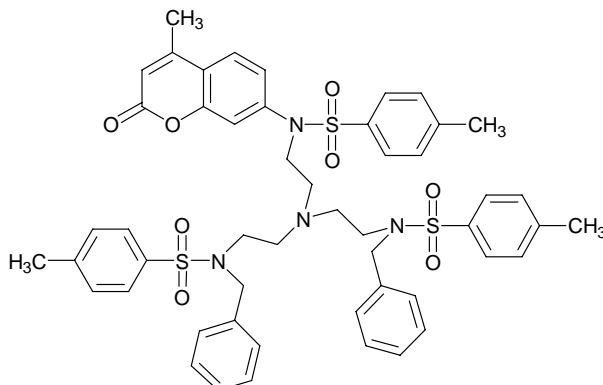
**Ένωση 10**



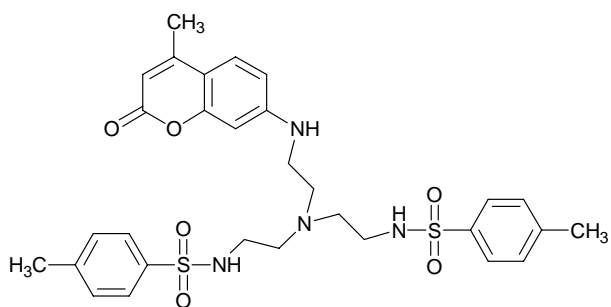
**Ένωση 11**



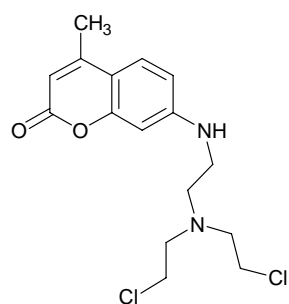
**Ένωση 12**



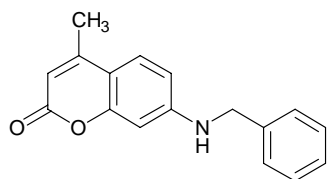
**Ένωση 13**



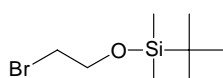
**Ένωση 14**



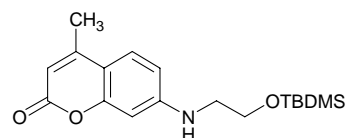
**Ένωση 15**



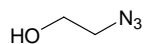
**Ένωση 16**



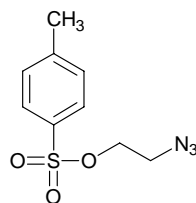
**Ένωση 17**



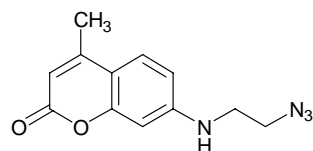
**Ένωση 18**



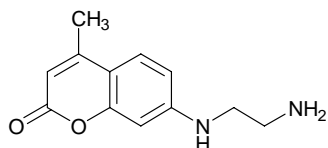
**Ένωση 19**



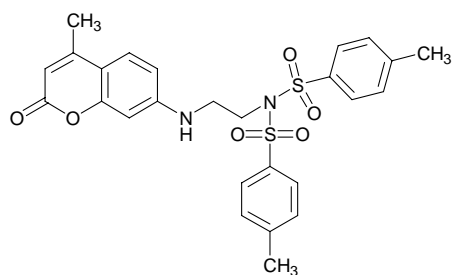
**Ένωση 20**



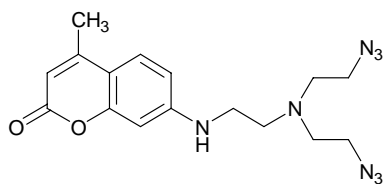
**Ένωση 21**



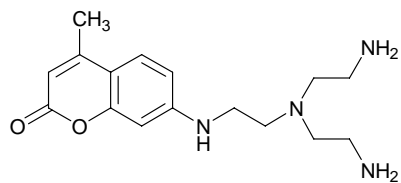
**Ένωση 22**



**Ένωση 23**



**Ένωση 24**



**Ένωση 25**

### **Παρασκευή ένωσης 1**

Σε σφαιρική φιάλη των 5 ml προστέθηκε άνυδρο διχλωρομεθάνιο 2 ml και κατόπιν 7-υδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.1 g (0.6 mmol) και τριαιθυλαμίνη 0.115 g (1.1 mmol). Στη συνέχεια το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ακετόνης-ξηρού πάγου. Όταν η θερμοκρασία κατέβηκε στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , προστέθηκε στάγδην τριφθορομεθυλοσουλφονυλοχλωρίδιο 0.105 g (0.6 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε για μια ώρα στους  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  και κατόπιν σε θερμοκρασία δωματίου όλο το βράδυ. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 50-80% οξικό αιθυλεστέρα/πετρελαϊκό αιθέρα. Απομονώθηκαν 0.112 g καθαρού προϊόντος (απόδοση 64%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.67 (d,  $J=8.4\text{ Hz}$ , 1H, αρωματικό), 7.19 (m, 2H, αρωματικά), 6.30 (bq,  $J=1.2\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 2.42 (d,  $J=1.2\text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 2**

Σε αυτόκλειστο τοποθετήθηκαν 10 ml άνυδρου ακετονιτριλίου και κατόπιν 2-αμινοαιθανόλη 1.012 g (16.6 mmol), DIPEA 6.436 g (49.8 mmol) και χλωροακετονιτριλίο 3.760 g (49.8 mmol). Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η αντίδραση αναδεύτηκε για 16 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Ακολούθησαν εκχυλίσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 40% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα. Απομονώθηκαν 0.807 g (35%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  3.74 (t,  $J=4.8\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.71 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.83 (t,  $J=4.8\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 3**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση 2 0.5 g (3.6 mmol) διαλυμένη σε 7.5 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου σε θερμοκρασία  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη 1.196 g (4.56 mmol) και μετά τη διάλυσή της, N-βρωμοσουκινιμίδιο 0.744 g (4.18 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία ώρα στους  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  και κατόπιν για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση του αρχικού αντιδραστήριου, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 20% ακετόνη σε τολουόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 2.735 g (95%).  $^1\text{H NMR}$

(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 3.62 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CN), 3.36 (t, *J*=6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 3.00 (t, *J*=6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N).

#### **Παρασκευή ένωσης 4**

Σε σφαιρική φιάλη που περιείχε 3 ml άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου, προστέθηκε 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.100 g (0.57 mmol), η ένωση **3** 0.115 g (0.57 mmol) και DIPEA 0.110 g (8.55 mmol). Η φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 110 °C και το διάλυμα αναδεύτηκε για 24 ώρες. Μετά την κατανάλωση του βρωμιδίου προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις πρώτα με νερό και κατόπιν με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 50-80% οξικό αιθυλεστέρα/πετρελαϊκό αιθέρα. Απομονώθηκαν 0.034 g (20%) προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.36 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, αρωματικό), 6.53 (dd, *J*=2.4, 8.7 Hz, 1H, αρωματικό), 6.47 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, αρωματικό), 5.99 (bq, *J*=1.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 4.57 (bs, 1H, NH), 3.69 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CN), 3.32 (t, *J*=5.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.99 (t, *J*=5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.33 (d, *J*=1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **Παρασκευή ένωσης 5**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε 2-νιτροαιθανόλη 1 g (11 mmol) σε 20 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου σε θερμοκρασία -23 °C. Ακολούθησε προσθήκη τριφαινυλοφωσφίνης 3.462 g (13.2 mmol) και μετά τη διάλυσή της, N-βρωμοσουλφιμόνιο 2.154 g (12.1 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία ώρα στους -23 °C και κατόπιν για πέντε ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση του αρχικού αντιδραστήριου, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 30% ακετόνη σε τολουόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 0.598 g (35.5%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 4.74 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>), 3.78 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, BrCH<sub>2</sub>). MS: 153 [M]<sup>+</sup>.

#### **Παρασκευή ένωσης 6**

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε το βρωμίδιο **5** 0.389 g (2.5 mmol) διαλυμένο σε 2 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου και αφού η θερμοκρασία μειώθηκε στους -23 °C προστέθηκε 2-αμινοαιθανόλη 0.051 g (0.8 mmol). Μέσα σε λίγα λεπτά παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κίτρινου στερεού με ταυτόχρονη πλήρη κατανάλωση της αιθανολαμίνης. Το διάλυμα διηθήθηκε και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Μετά από χρωματογραφία

στήλης με διαλύτη έκλουσης 30% ακετόνη σε τολουόλιο απομονώθηκαν 0.020 g προϊόντος (11.6%). Το προϊόν αποθηκεύτηκε στους 4 °C αλλά καταστράφηκε μέσω πολυμερισμού. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 4.42 (t, *J*=5.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>), 3.55 (t, *J*=4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.15 (t, *J*=5.7 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.68 (t, *J*=4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N).

### **Παρασκευή ένωσης 7**

Σε 3 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστέθηκε 9-φλουορενυλομεθυλοχλωροφορμίδιο 0.212 g (0.8 mmoles) και η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο. Ακολούθησε η προσθήκη στάγδην 2-αμινοαιθανόλης 0.05 g (0.8 mmoles). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση της αμίνης. Το διάλυμα διηθήθηκε και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 30% ακετόνη σε τολουόλιο. Απομονώθηκαν 0.115 g (51%) καθαρού προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.75 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, αρωματικά), 7.58 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, αρωματικά), 7.41-7.36 (m, 2H, αρωματικά), 7.32-7.27 (m, 2H, αρωματικά), 5.14 (bs, 1H, NH), 4.42 (d, *J*=6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.20 (t, *J*=6.6 Hz, 1H, CH), 3.70 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 2.05 (bs, 1H, OH).

### **Παρασκευή ένωσης 8**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση 7 0.2 g (0.7 mmoles) σε 4 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου σε θερμοκρασία -23 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη 0.220 g (0.84 mmoles) και μετά τη διάλυσή της, N-βρωμοσουκινιμίδιο 0.137 g (0.77 mmoles). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία ώρα στους -23 °C και κατόπιν για πέντε ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση της ένωσης 7, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και το προϊόν καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 30% ακετόνη σε τολουόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 0.210 g (87%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.76 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, αρωματικά), 7.58 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, αρωματικά), 7.42-7.37 (m, 2H, αρωματικά), 7.37-7.28 (m, 2H, αρωματικά), 5.17 (bs, 1H, NH), 4.41 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.21 (t, *J*=6.6 Hz, 1H, CH), 3.60 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.45 (t, *J*=5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br).

### **Παρασκευή ένωσης 9**

Σε 2 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου προστέθηκε 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.250 g (1.4 mmoles) και κατόπιν στάγδην άνυδρη πυριδίνη 2 ml. Μετά την προσθήκη της πυριδίνης προστέθηκε p-τολουλοσουλφονυλο χλωρίδιο 0.598 g (3.1 mmoles) και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 18 ώρες. Μετά την πλήρη κατανάλωση της κουμαρίνης προστέθηκε

οξικός αιθυλεστέρας και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με διάλυμα κιτρικού οξέος 10% και κορεσμένο διάλυμα θεικού χαλκού για την απομάκρυνση της πυριδίνης. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θεικό μαγνήσιο και ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 10-40% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα για τον καθαρισμό του προϊόντος. Το προϊόν που απομονώθηκε ήταν 0.359 g (78%).  $^1\text{H NMR}$  (acetone- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.81 (d,  $J=8.4$ , 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.65 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.37 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.22 (dd,  $J=2.1$ , 8.7 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.17 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.17 (bq,  $J=0.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 2.40 (d,  $J=0.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  κουμαρίνης), 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  τοξυλομάδας).

### **Παρασκευή ένωσης 10**

Σε τρίλαιμη φιάλη προστέθηκαν 30 ml άνυδρου ακετονιτριλίου και κατόπιν το υδροχλωρικό άλας της τρις(2-γλωροαιθυλο)αμίνης 0.949 g (3.9 mmol) και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0.635 g (1.9 mmol). Η θερμοκρασία του διαλύματος ρυθμίστηκε στους 80 °C και κατόπιν προστέθηκε η ένωση **9** 0.130 g (0.39 mmol) σε μικρές δόσεις. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 18 ώρες. Με την κατανάλωση της ένωσης **9** το διάλυμα διηθήθηκε και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες 10-30% ακετόνη σε τολουόλιο οπότε και απομονώθηκαν 0.154 g (79.8%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  (acetone- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.76 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.54 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.39 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.24 (dd,  $J=2.1$ , 8.4 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.12 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.32 (bq,  $J=0.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 3.82 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.51 (t,  $J=6.9$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 2.91 (t,  $J=6.9$  Hz, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 2.82 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.49 (d,  $J=0.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  κουμαρίνης), 2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  τοξυλομάδας).

### **Παρασκευή ένωσης 11**

Σε τρίλαιμη φιάλη προστέθηκαν 2 ml άνυδρου ακετονιτριλίου και κατόπιν βενζυλαμίνη 0.236 g (2.2 mmol) και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0.108 g (0.33 mmol). Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 80 °C και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην η ένωση **10** 0.110 g (0.22 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 20-40% ακετόνη σε τολουόλιο προέκυψε η ένωση **A**. Στη συνέχεια, η ένωση **A** (0.060 g) προστέθηκε σε 0.5 ml πυκνού θεικού οξέος. Το διάλυμα αφέθηκε για μία ώρα στους 90 °C υπό ανάδευση οπότε και διαπιστώθηκε η κατανάλωση της ένωσης **A**. Προστέθηκε διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$  για την εξουδετέρωση του θεικού οξέος και



ακολούθησαν εκχυλίσεις με διχλωρομεθάνιο. Μετά την ξήρανση της οργανικής φάσης, με χρωματογραφία στήλης απομονώθηκε ένα αναλυτικό δείγμα του προϊόντος της αντίδρασης.  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.44 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.35-7.21 (m, 5H, αρωματικά βενζυλομάδας), 6.66 (dd,  $J=2.1, 8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.44 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.88 (bq,  $J=0.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 5.77 (bs, 1H, NH), 3.48 (s, 2H Ph- $\text{CH}_2$ ), 3.32-3.26 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 2.63 (t,  $J=6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.51 (bm, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.35 (d,  $J=0.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 12**

Σε 6 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου προστέθηκε βενζυλαμίνη 0.490 g (4.6 mmol) και κατόπιν στάγδην 6 ml άνυδρης πυριδίνης. Μετά την προσθήκη της πυριδίνης προστέθηκε p-τολουλοσουλφόνυλο χλωρίδιο 1.971 g (10 mmol) και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 18 ώρες. Μετά την πλήρη κατανάλωση της βενζυλαμίνης προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με διάλυμα κιτρικού οξέος 10% και κορεσμένου διαλύματος θειικού χαλκού για την απομάκρυνση της πυριδίνης. Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό μαγνήσιο και ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 10-30% ακετόνη σε τολουόλιο. Το προϊόν που απομονώθηκε ήταν 1.100 g (92%).  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.77 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.39 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.29-7.21 (m, 5H, αρωματικά βενζυλομάδας), 6.84 (bs, 1H, NH), 4.10 (d,  $J=6.3$  Hz, 2H, Ph- $\text{CH}_2$ ), 2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 13**

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 10.5 ml ξηρού ακετονιτριλίου και κατόπιν η ένωση **10** 0.100 g (0.2 mmol), η ένωση **12** 0.522 g (2 mmol) και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0.652 g (2 mmol). Η αντίδραση αναδεύτηκε 24 h στους 80 °C και κατόπιν τα ανόργανα άλατα απομακρύνθηκαν με διήθηση. Ο οργανικός διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 30 και 40% ακετόνη σε τολουόλιο. Η μάζα του καθαρού προϊόντος ήταν 0.141 g (75%).  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.74 (d,  $J=8.1$  Hz, 4H, αρωματικά τοξυλομάδων), 7.64 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.49 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.42 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, αρωματικά τοξυλομάδας), 7.37 (d,  $J=8.1$  Hz, 4H, αρωματικά τοξυλομάδων), 7.30-7.24 (m, 10H, αρωματικά βενζυλομάδων), 7.02 (dd,  $J=2.1, 8.4$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.95 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.31 (bs, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 4.22 (s, 4H, Ph- $\text{CH}_2$ ), 3.44 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H, Tos- $\text{NCH}_2$ ), 2.88 (t,  $J=8.4$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{N-Tos}$ ), 2.44 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  τοξυλομάδων), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  κουμαρίνης), 2.30-2.17 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 14**

Στην ένωση **13** 0.065 g (0.07 mmol) προστέθηκαν 0.5 ml πυκνού θεικού οξέος. Το διάλυμα αφέθηκε για μία ώρα στους 90 °C υπό ανάδευση οπότε και διαπιστώθηκε η κατανάλωση της ένωσης **13**. Προστέθηκε διάλυμα ψυχρού NaHCO<sub>3</sub> για την εξουδετέρωση του θεικού οξέος και ακολούθησαν εκχυλίσεις με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 30-50% ακετόνη σε τολουόλιο απομονώθηκαν 0.010 g (25%) προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (methanol-d<sub>4</sub>, 500 MHz): δ 7.40 (d, *J*=8.5 Hz, 4H, αρωματικά τοξυλομάδων), 7.49 (d, *J*=8.5 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.31 (d, *J*=8.5 Hz, 4H, αρωματικά τοξυλομάδων), 6.70 (dd, *J*=2.0, 8.5 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.41 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.97 (bs, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 3.09 (t, *J*=6 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.88 (t, *J*=6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>N-Tos), 2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.54 (t, *J*=6 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub> κουμαρίνης), 2.37 (s, 6H, CH<sub>3</sub> τοξυλομάδων).

### **Παρασκευή ένωσης 15**

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **10** 0.177 g (0.35 mmol) και στη συνέχεια 1 ml πυκνού θεικού οξέος. Το διάλυμα αφέθηκε για μία ώρα στους 90 °C υπό ανάδευση οπότε και διαπιστώθηκε η κατανάλωση της ένωσης **10**. Προστέθηκε διάλυμα ψυχρού NaHCO<sub>3</sub> για την εξουδετέρωση του θεικού οξέος και ακολούθησαν εκχυλίσεις με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και μετά από απόσταξη του διαλύτη προέκυψαν 0.105 g (86%) προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.32 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.53 (dd, *J*=2.4, 8.7 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.42 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.95 (bq, *J*=1.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 5.17 (bs, 1H, NH), 3.53 (t, *J*=6.3 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.16 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.91 (t, *J*=6.3 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.85 (t, *J*=5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.32 (d, *J*=1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> κουμαρίνης).

### **Παρασκευή ένωσης 16**

Σε τρίλαιμη φιάλη προστέθηκαν 30 ml ξηρού ακετονιτριλίου και κατόπιν 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.100 g (0.57 mmol) και Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.857 g (5.7 mmol). Η θερμοκρασία του διαλύματος ρυθμίστηκε στους 80 °C και κατόπιν προστέθηκε βενζυλοχλωρίδιο 0.722 g (5.7 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 18 ώρες και κατόπιν διεκόπη. Τα ανόργανα άλατα απομακρύνθηκαν με διήθηση και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες 10-30% ακετόνη σε τολουόλιο οπότε και απομονώθηκαν 0.040 g (26.5%) προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.36-7.24 (m, 6H, αρωματικά), 6.52 (dd, *J*=2.4, 11.4 Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.44 (d, *J*=2.4 Hz,

<sup>1</sup>H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.94 (q, *J*=1.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 4.68 (bs, 1H, NH), 4.36 (d, *J*=5.4 Hz, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>), 2.30 (d, *J*=1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

### **Παρασκευή ένωσης 16 αντίδραση Hartwig-Buchwald**

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.059 g (0.18 mmoles), Pd(OAc)<sub>2</sub> 1.4 mg (0.007 mmoles) και καταλύτης BINAP 6 mg (0.01 mmoles) και η φιάλη τοποθετήθηκε σε αντλία υψηλού κενού για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας. Στη συνέχεια προστέθηκε βενζυλαμίνη 0.028 g (0.26 mmoles) διαλυμένη σε 1.5 ml άνυδρου τολουολίου. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 80 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν στάγδην, για περίπου μία ώρα, 0.040 g (0.13 mmoles) της ένωσης **1**. Μετά από τρεις μέρες η αντίδραση διεκόπη και στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας. Ακολούθησε διήθηση σε celite για την απομάκρυνση των καταλυτών και των ανόργανων αλάτων. Το προϊόν απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 3%, 5% και 10% ακετόνη σε ξυλόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 0.014 g (40%). Το φάσμα NMR συμφωνούσε με τα αντίστοιχα δεδομένα του προηγούμενου πειράματος.

### **Παρασκευή ένωσης 17**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 20 ml ξηρού διχλωρομεθανίου, 2-βρωμοαιθανόλη 3.526 g (28 mmoles), 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP) 0.137 g (1.12 mmoles) και τριαιθυλαμίνη 3.440 g (34 mmoles). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο και κατόπιν προστέθηκε t-βουτυλοδιμεθυλοσιλλυλο χλωρίδιο 4.220 g (28 mmoles). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες και κατόπιν προστέθηκε ένυδρο διχλωρομεθάνιο για τη διακοπή της αντίδρασης. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράνθηκε με θεικό μαγνήσιο, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό οπότε και προέκυψαν 5.693 g (85%) καθαρού προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 3.86 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.36 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, BrCH<sub>2</sub>), 0.87 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

### **Παρασκευή ένωσης 18**

Σε 3 ml άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF) προστέθηκε 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.200 g (1 mmoles) και DIPEA 0.194 g (1.5 mmoles). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 70 °C και κατόπιν προστέθηκε η ένωση **17** 0.273 g (1 mmoles). Μετά από 24 ώρες στην αντίδραση προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας και ακολούθησαν εκχυλίσσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα συλλέχθηκε και ξηράνθηκε με θεικό μαγνήσιο. Μετά την απόσταξη του διαλύτη

υπό κενό πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης 30-50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα. Η μάζα του προϊόντος ήταν 0.033 g (10%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.33 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.51 (dd,  $J=2.4, 8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.44 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.96 (bq,  $J=0.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 3.18 (t,  $J=5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.25 (t,  $J=5.4$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2.32 (d,  $J=0.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.88 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.06 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ).

### **Παρασκευή ένωσης 19**

Σε 20 ml άνυδρο DMF προστέθηκε 2-βρωμοαιθανόλη 2 g (16 mmoles) και  $\text{NaN}_3$  1.56 g (24 mmoles). Μετά από μία ώρα θέρμανση στους 70 °C διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του βρωμιδίου. Προστέθηκε αιθέρας και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με νερό για την απομάκρυνση του DMF. Μετά την ξήρανση της οργανικής στοιβάδας με θειικό μαγνήσιο και την απόσταξη υπό κενό του διαλύτη, απομονώθηκαν 1.037 g (75%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  3.73 (bm, 2H,  $(\text{OCH}_2)$ ), 3.36 (t,  $J=5.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ). IR ( $-\text{N}_3$ )  $2106\text{ cm}^{-1}$ .

### **Παρασκευή ένωσης 20**

Σε 50 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου προστέθηκε η ένωση **19** 3.569 g (40 mmoles) και άνυδρη πυριδίνη 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε p-τολουλοσουλφονυλο χλωρίδιο 20 g (105 mmoles) και η αντίδραση αφέθηκε για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση της αλκοόλης **19**, προστέθηκε διχλωρομεθάνιο και ακολούθησαν εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα θειικού χαλκού και νερό για την απομάκρυνση της πυριδίνης. Αφού η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό, χρωματογραφία στήλης με διαλύτη 10-60% οξικό αιθυλεστέρα-πετρελαϊκό αιθέρα, απέδωσε 5.468 g (57%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.78 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, αρωματικά), 7.34 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, αρωματικά), 4.13 (t,  $J=4.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.45 (t,  $J=4.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). MS: 213  $[\text{M}-\text{N}_2]^+$ .

### **Παρασκευή ένωσης 21**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 60 ml άνυδρου ακετονιτριλίου και κατόπιν προστέθηκε 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη 0.150 g (0.8 mmoles), η ένωση **20** 2.063 g (8 mmoles) και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  1.303 g (4 mmoles). Ακολούθησε απαέρωση με άζωτο για 20 λεπτά και στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C για 12 h. Η αντίδραση διεκόπη και στερεά απομακρύνθηκαν με διήθηση. Μετά την απόσταξη του ακετονιτριλίου υπό κενό πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με 10-30% ακετόνη σε

τολουόλιο. Απομονώθηκαν 0.058 g (30%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.36 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, αρωματικο), 6.53 (dd,  $J=2.1, 8.4$  Hz, 1H, αρωματικό), 6.46 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό), 5.99 (bs, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 3.56 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.38 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2.33 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### Παρασκευή ένωσης 22

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 2 ml άνυδρης μεθανόλης και στη συνέχεια η ένωση **21** 0.045 g (0.18 mmoles). Μετά την πλήρη διάλυση της ένωσης **21** προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 0.009 g. Η φιάλη συνδέθηκε σε αντλία υψηλού κενού και μετά την πλήρη απομάκρυνση του αζώτου, διαβιβάστηκε στο σύστημα αέριο υδρογόνο και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά την παρέλευση των δύο ωρών διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αζιδίου. Στο διάλυμα προστέθηκε διχλωρομεθάνιο και ακολούθησε διήθηση σε celite για την απομάκρυνση του καταλύτη. Μετά την απόσταξη των διαλυτών υπό κενό, προέκυψαν 0.040 g (100%) της επιθυμητής αμίνης.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.30 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, αρωματικό), 6.50 (dd,  $J=2.1, 8.7$  Hz, 1H, αρωματικό), 6.42 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H, αρωματικό), 5.92 (s, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 4.84 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 3.19 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2.97 (t,  $J=5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.82 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

### Παρασκευή ένωσης 23

Σε 9 ml άνυδρου ακετονιτριλίου διαλύθηκε η ένωση **22** 0.040 g (0.18 mmoles) και η ένωση **20** 0.442 g (1.8 mmoles), καθώς και  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0.299 g (0.9 mmoles). Μετά από 20 λεπτά απαέρωσης με άζωτο, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C και αφέθηκε για 18 h. Όταν διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αρχικού αντιδραστηρίου **22** πραγματοποιήθηκε διήθηση και απόσταξη του διαλύτη υπό κενό. Μετά από χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 40% ακετόνη σε τολουόλιο, απομονώθηκαν 0.040 g (42%) της ένωσης **23**.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.86 (d,  $J=8.4$  Hz, 4H, αρωματικά τοζυλομάδων), 7.33 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 7.28 (d,  $J=8.4$  Hz, 4H, αρωματικά τοζυλομάδων), 6.48 (dd,  $J=2.4, 8.7$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 6.31 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H, αρωματικό κουμαρίνης), 5.98 (bq,  $J=0.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-C=CH}$ ), 3.88 (t,  $J=6.3$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$  ή  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.43 (t,  $J=6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$  ή  $\text{NCH}_2$ ), 2.39 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  τοζυλομάδων), 2.33 (d,  $J=0.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  κουμαρίνης).

#### **Παρασκευή ένωσης 24**

Σε 0.5 ml άνυδρου DMF προστέθηκε η ένωση **23** 0.05 g (0.14 mmoles) και LiN<sub>3</sub> 0.011 g (0.2 mmoles) που είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριό μας. Μετά από έξι ώρες θέρμανση στους 60 °C διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του χλωριδίου. Προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με νερό για την απομάκρυνση του DMF. Μετά την ξήρανση της οργανικής στοιβάδας με θειικό μαγνήσιο και την απόσταξη υπό κενό του διαλύτη, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με 40-60% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα οπότε και απομονώθηκαν 0.017 g (35%) προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.31 (d, *J*=8.7 Hz, 1H, αρωματικό), 6.53 (dd, *J*=2.4, 8.7 Hz, 1H, αρωματικό), 6.41 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, αρωματικό), 5.94 (bq, *J*=1.2 Hz, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 5.03 (bs, 1H, NH), 3.33 (t, *J*=5.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.19 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.81 (t, *J*=5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.74 (t, *J*=5.7 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **Παρασκευή ένωσης 25**

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 2.5 ml άνυδρης μεθανόλης και στη συνέχεια η ένωση **24** 0.012 g (0.034 mmoles). Μετά την πλήρη διάλυση της ένωσης **24** προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 0.01 g. Η φιάλη συνδέθηκε σε αντλία υψηλού κενού και μετά την πλήρη απομάκρυνση του αζώτου, διαβιβάστηκε στο σύστημα αέριο υδρογόνο και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες, οπότε διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αζιδίου. Στο διάλυμα προστέθηκε διχλωρομεθάνιο και ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του καταλύτη. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό, προέκυψαν 0.009 g (95%) του τελικού προϊόντος. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 7.27 (d, *J*=9 Hz, 1H, αρωματικό), 6.53 (bd, *J*=9 Hz, 1H, αρωματικό), 6.43 (bs, 1H, αρωματικό), 5.91 (bs, 1H, CH<sub>3</sub>-C=CH), 3.18 (bt, *J*=5.5 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.79 (t, *J*=5.5 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.73 (t, *J*=5.5 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.58 (t, *J*=5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 
- <sup>1</sup> King R. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* Willey & Sons Ltd, New York, **1994**, pp, 4434-4451
- <sup>2</sup> Μανουσάκης Γ., Κεσίσογλου Δ. *Βιοανόργανη Χημεία*, Αδερφοί Κυριακίδη, **1990**, Θεσσαλονίκη, σελ. 137-160
- <sup>3</sup> Walkup, G. K.; Burdette, S. C.; Lippard, S. J.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*(23), 5644-5645
- <sup>4</sup> Vallee, B. L.; Falchuk, K. H. *Physiol Rev.*, **1993**, *73*, 79-118
- <sup>5</sup> Lippard, J. S.; Berg, M. S. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, **1994**, pp. 23, 257-274
- <sup>6</sup> Vallee B. L.; Auld D. S. *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 543-551
- <sup>7</sup> Kimura E.; Koike T. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 179-184
- <sup>8</sup> Czarnik A. W. *Chem. Biol.*, **1995**, *2*, 423-428
- <sup>9</sup> Jiang P.; Guo Z. *Coor. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 205-229
- <sup>10</sup> Mahadevan I. B.; Kimber M. C.; Lincoln S. F.; Tiekink E. R. T.; Ward A. D.; Betts W. H.; Forbes I. J.; Zalewski P. D. *Aust. J. Chem.*, **1996**, *49*, 561-568
- <sup>11</sup> Valeur B.; Leray I. *Coor. Chem. Rev.*, **2000**, *205*, 3-40
- <sup>12</sup> Nasir M. S.; Fahrni C. J.; Suhy D. A.; Kolodsick K. J.; Singer C. P.; O'Halloran T. V. *Jou. Bio. Ino. Chem.*, **1999**, *4*, 775-783
- <sup>13</sup> Frederickson C. J.; Kasarskis E. J.; Ringo D.; Frederickson R. E. *Jour. Neur. Met.*, **1987**, *20*, 91-103
- <sup>14</sup> Zalewski P. D.; Forbes I. J.; Betts, W. H. *Bio. Jour.*, **1993**, *296*, 403-408
- <sup>15</sup> Budde T.; Minta A.; White J. A.; Kay A. R. *Neuroscience*, **1997**, *79*, 347-358
- <sup>16</sup> Kimber M.C.; Mahadevan I.B.; Lincoln S.F.; Ward A.D.; Tiekink E.R.T. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 8204
- <sup>17</sup> Kimber M.C.; Mahadevan I.B.; Lincoln S.F.; Ward A.D.; Betts W.H. *Aust. J. Chem.*, **2001**, *54*, 43
- <sup>18</sup> Jiang P.; Chen L.; Lin J.; Liu Q.; Ding J.; Gao X.; Guo Z. *Chem. Commun.*, **2002**, 1424
- <sup>19</sup> Haughland R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9<sup>th</sup> ed., Molecular Probes, Eugene, **2002**
- <sup>20</sup> Walkup G. K.; Burdette S. C.; Lippard S. J.; Tsien R. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5644-5645
- <sup>21</sup> Woodroffe C. C.; Lippard S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11458-11459
- <sup>22</sup> Hirano T.; Kikuchi K.; Urano Y.; Nagano T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6555-6562

- <sup>23</sup> T. Hirano T.; K. Kikuchi K.; Y. Urano Y.; T. Higuchi T.; T. Nagano T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 12399
- <sup>24</sup> Gee K. R.; Zhou Z.-L.; Qian W.-J.; Kennedy R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 776-778
- <sup>25</sup> Sensi S. L.; Ton-That D.; Weiss J. H.; Rothe A.; Gee K. R. *Cell Calcium*, **2003**, *34*, 281-284
- <sup>26</sup> Koike T.; Watanabe T.; Aoki S.; Kimura E.; Shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 12696-12703
- <sup>27</sup> Kimura E.; Koike T. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 179-184
- <sup>28</sup> Kimura E.; Aoki S. *Biometals*, **2001**, *14*, 191-204
- <sup>29</sup> Mizukami S.; Nagano T.; Urano Y.; Odani A.; Kikuchi K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3920-3925
- <sup>30</sup> Lim N. C.; Yao L.; Freake H. C.; Brückner C. *Bio. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2251-2254
- <sup>31</sup> Katerinopoulos H. E.; Foukaraki E. *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, *9*, 275-306
- <sup>32</sup> Ακουμιανάκη Α. Διατριβή Διπλώματος Ειδίκευσης «Σχεδιασμός και Σύνθεση Παραγώγων της 7-Υδροξυ Υποκατεστημένης Κουμαρίνης και Μελέτη των Ιδιοτήτων τους σαν Φθορίζοντες Δείκτες Ψευδαργύρου», Πανεπιστήμιο Κρήτης, **2001**.
- <sup>33</sup> Martell A. M.; Smith R. M. *Critically Selected Stability Constants Of Metal Complexes* N.I.S.T., Gaithersburg, **1995**
- <sup>34</sup> Parker D. R.; Norvell W. A.; Chaney R. L. *Chemical equilibrium reaction models*, **1994**
- <sup>35</sup> Qing F.-L.; Fan J.; Sun H.-B.; Yue X.-J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, *20*, 3053-3057
- <sup>36</sup> Åhman J.; Buchwald S. L. *Tet. Lett.*, **1997**, *38*, 6363-6366
- <sup>37</sup> Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 1264-1267
- <sup>38</sup> Louie, J.; Driver, M. S.; Hamann, B. C.; Hartwig, J. F. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 1268-1273
- <sup>39</sup> Beletskaya I. P.; Bessmertnykh A. G.; Guillard R. *Tet. Lett.*, **1997**, *38*, 2287-2290
- <sup>40</sup> Krakowiak K. E.; Bradshaw J. S.; Izatt R. M. *Tet. Lett.*, **1988**, *29*, 3521-3524
- <sup>41</sup> Bradshaw J. S.; Krakowiak K. E.; Izatt R. M. *Tet. Lett.*, **1989**, *30*, 803-806
- <sup>42</sup> Krakowiak K. E.; Bradshaw J. S.; Izatt R. M.; Zamecka-Krakowiak D. J. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4061-4067
- <sup>43</sup> McGovern M. E.; Thompson M. *Can. J. Chem.*, **1999**, *77*, 1678-1689
- <sup>44</sup> Grynkiewicz G.; Poenie M.; Tsien R. Y. *Jou. Bio. Chem.*, **1985**, *260*, 3440-3450
- <sup>45</sup> March J. *Advanced Organic Chemistry*, 4<sup>th</sup> edition, Wiley & Sons, New York, **1992**, pp, 393-394, 397, 918-919, 1219-1220
- <sup>46</sup> Rylander N. P. *Hydrogenation Methods*, Academic Press, London, **1985**, pp. 94-98, 170-171



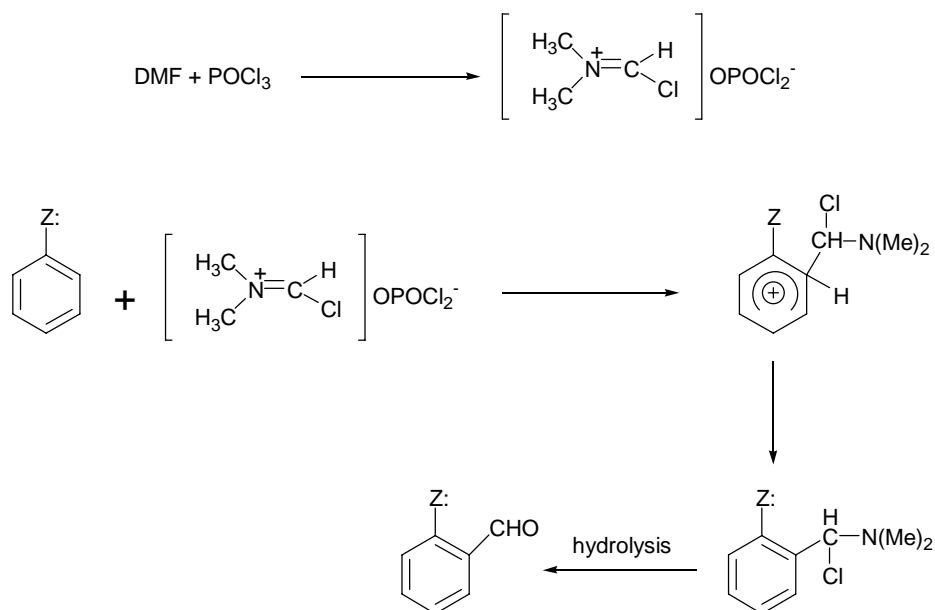
- 
- <sup>47</sup> Brown R. C.; Moon C. Y.; Narasimhan S. *Synthesis*, **1981**, 605-606
- <sup>48</sup> Constantinou-Kokotou V.; Kokotos G. *Org. Prep. Proc. Int.*, **1994**, 26, 599-602
- <sup>49</sup> Heinzman S. W.; Ganem B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 6801-6802
- <sup>50</sup> Atherton E.; Bury C.; Sheppard R. C.; Williams B. J. *Tet. Lett.*, **1979**, 20, 3041-3042
- <sup>51</sup> Carpino L. A.; Han G. Y. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 3404-3409
- <sup>52</sup> Compagnone R. S.; Rapoport H. *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 1713-1719
- <sup>53</sup> Green T. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley & Sons, New York, **1981**, pp. 39, 44-46
- <sup>54</sup> Badiang J. G.; Aube J. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2484-2487
- <sup>55</sup> Carboni B.; Vaultier M.; Carrié R. *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1799-1810
- <sup>56</sup> Iwata M.; Kuzuhara H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 918-919
- <sup>57</sup> Green T. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley & Sons, New York, **1981**, pp. 285-286

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πιο γνωστή μέθοδος φορμυλίωσης αρωματικών δακτυλίων είναι η αντίδραση με διυποκατεστημένα φορμαμίδια, γνωστή ως αντίδραση Vilsmeier ή αντίδραση Vilsmeier-Haack. Η αντίδραση όμως αυτή είναι κατάλληλη μόνο για ενεργοποιημένα υποστρώματα όπως αμίνες και φαινόλες. Αρωματικοί υδρογονάνθρακες και ετεροκυκλικές ενώσεις μπορούν επίσης να φορμυλιωθούν, αλλά μόνο αν είναι πολύ πιο ενεργοποιημένοι από το βενζόλιο (π.χ. φεροκένια, αζουλένια).

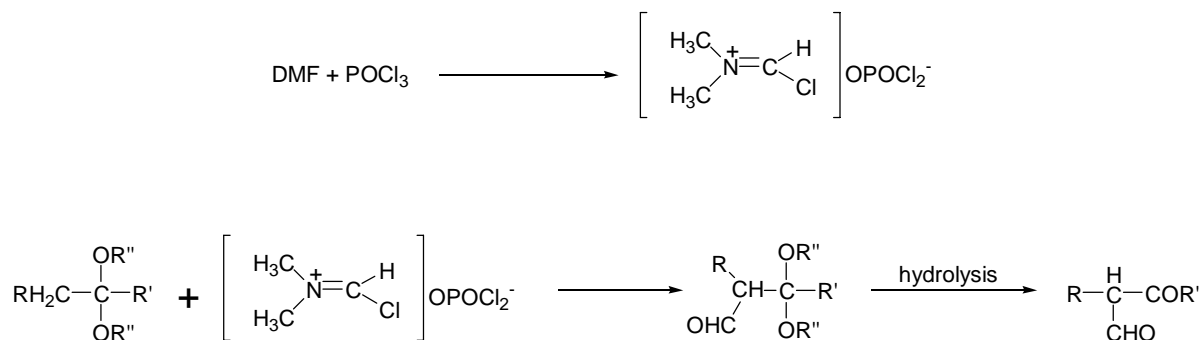
Παρά το ότι το N-φαινυλο-N-μεθυλοφορμαμίδιο είναι το πιο κοινό αντιδραστήριο για την αντίδραση αυτή, χρησιμοποιούνται επίσης και άλλα αλκυλοαρυλοαμίδια και διαλκυλαμίδια. Συνήθως η ενεργοποίηση του αντιδραστήριου γίνεται με χρήση του  $\text{POCl}_3$ , έχει χρησιμοποιηθεί όμως και το φωσγένιο  $\text{COCl}_2$ .<sup>1</sup>

Η φορμυλίωση Vilsmeier αποτελεί αντίδραση αρωματικής υποκατάστασης στην πλέον ενεργοποιημένη θέση του αρωματικού δακτυλίου. Περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό του ηλεκτρονιόφιλου συμπλόκου που προκύπτει από την αντίδραση του  $\text{POCl}_3$  με το αμίδιο, για παράδειγμα με το DMF. Η δομή του συμπλόκου αυτού έχει διερευνηθεί με φασματοσκοπία NMR σε πειράματα χαμηλής θερμοκρασίας.<sup>2</sup> Στη συνέχεια το παραπάνω σύμπλοκο προσβάλλεται από το αρωματικό σύστημα υποκαθιστώντας ένα άτομο υδρογόνου. Η ένωση που προκύπτει μετά την υποκατάσταση είναι ασταθής και υδρολύεται εύκολα προς το φορμυλιωμένο προϊόν. Ο μηχανισμός της φορμυλίωσης Vilsmeier παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα.



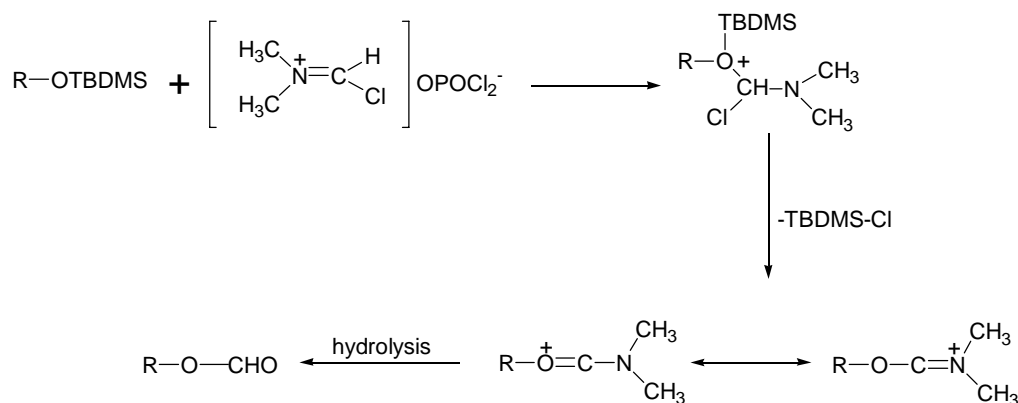
Το καθορίζον την ταχύτητα της αντίδρασης στάδιο μπορεί να είναι είτε ο σχηματισμός του συμπλόκου είτε η αντίδραση με το υποστρώμα, ανάλογα με τη δραστικότητα του υποστρώματος.

Με τις συνθήκες της αντίδρασης Vilsmeier μπορεί να γίνει φορμυλίωση και σε ολεφίνες.<sup>3</sup> Η φορμυλίωση μπορεί να γίνει επίσης σε α- θέση ακεταλών και κεταλών, έτσι ώστε η υδρόλυση των προϊόντων να δώσει κετο αλδεύδες ή διαλδεύδες.



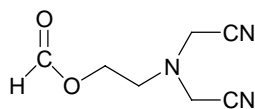
Επιπλέον, με συνθήκες Vilsmeier μπορεί να προστεθεί σε τριπλό δεσμό μια φορμυλομάδα και ένα αλογόνο.<sup>4</sup>

Τέλος, η αντίδραση Vilsmeier-Haack χρησιμοποιείται στη φορμυλίωση αλκοολών στη θέση του οξυγόνου, σε μία αντίδραση ενός σταδίου, χρησιμοποιώντας αλκοόλες προστατευμένες με t-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλομάδα ή τριαιθυλοσιλυλομάδα.<sup>5</sup> Ο μηχανισμός που προτάθηκε για τη μετατροπή αυτή φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Το σύμπλοκο της αντίδρασης μεταξύ POCl<sub>3</sub>/DMF προστίθεται στο σιλυλωμένο οξυγόνο του υποστρώματος δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο κατιόν. Στη συνέχεια απομακρύνεται το σίλυλο χλωρίδιο που παράγεται (ο δεσμός Si-Cl είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερός από το δεσμό Si-C) και το κατιόν που προκύπτει υδρολύεται γρήγορα προς την αντίστοιχη φορμυλιωμένη αλκοόλη.

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας κατά την αντίδραση σύζευξης της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης με ένα από τα βρωμίδια που συντέθηκαν στο εργαστήριό μας, παρατηρήσαμε ένα ασυνήθιστο παραπροϊόν στο οποίο αποδόθηκε η δομή:

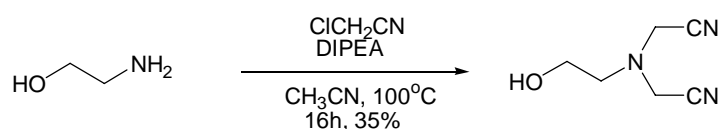


Πρόκειται δηλαδή για τον αντίστοιχο φορμυλεστέρα, παράγωγο ανάλογο αυτών που περιγράφηκαν παραπάνω. Η δημιουργία ενός τέτοιου παραπροϊόντος δεν έχει αναφερθεί πουθενά ως τώρα στη βιβλιογραφία και μας ώθησε προς τη διερεύνηση της συγκεκριμένης αντίδρασης. Για το λόγο αυτό, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή μιας μικρής σειράς βρωμιδίων με σκοπό την διαπίστωση του σχηματισμού αντιστοιχών προϊόντων κάτω από τις συνθήκες της αντίδρασης.

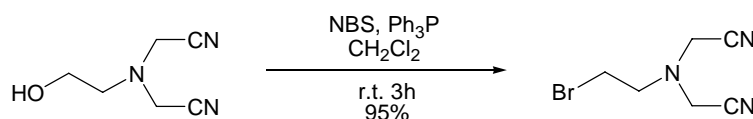
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην πρώτη αντίδραση που έγινε με το DMF χρησιμοποιήθηκε ένα βρωμίδιο που είχε συντεθεί κατά την προσπάθεια σύνθεσης του φθορίζοντα δείκτη ψευδαργύρου, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλάμβανε την διαλκυλίωση της πρωτοταγούς αλειφατικής αμίνης, σε ένα στάδιο, μέσω μιας τυπικής αντίδρασης S<sub>N</sub>2. Σαν βάση χρησιμοποιήθηκε η N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA), ενώ ως αλκυλιωτικό μέσο το χλωροακετονιτρίλιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, υπό αυξημένη πίεση (αυτόκλειστο σύστημα) στους 100 °C.

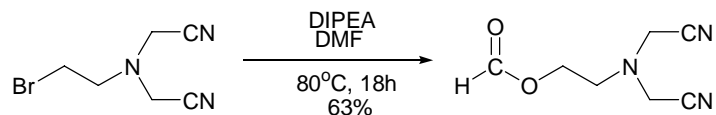


Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μετατροπή της πρωτοταγούς αλκοόλης στο αντίστοιχο βρωμίδιο.<sup>6</sup>



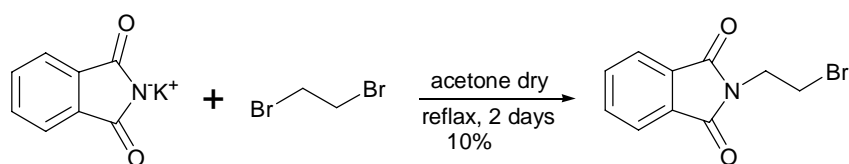
Η παραπάνω αντίδραση είναι ταχύτατη και οδηγεί στο επιθυμητό προϊόν σχεδόν ποσοτικά χωρίς τη δημιουργία παραπροϊόντων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του παραπάνω βρωμιδίου σε συνθήκες ανάλογες με αυτές που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη μονοαλκυλίωση της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης.



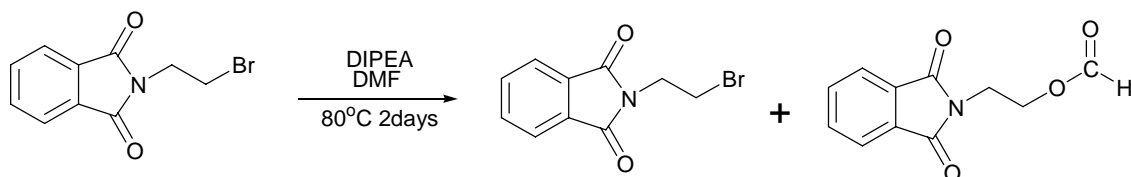
Η αντίδραση διεκόπη μετά την πλήρη κατανάλωση του αντίστοιχου βρωμιδίου και απομονώθηκαν δύο προϊόντα. Το ένα από τα προϊόντα αυτά απομονώθηκε σε συγκριτικά μεγάλη απόδοση. Η δομή του ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά και αποτελεί τον φορμικό εστέρα που παρουσιάζεται στο παραπάνω Σχήμα.

Στη συνέχεια συντέθηκε ένα δεύτερο βρωμίδιο από το φθαλιμιδικό κάλιο για να μελετηθεί και αυτό σε αντίστοιχη αντίδραση με το DMF.



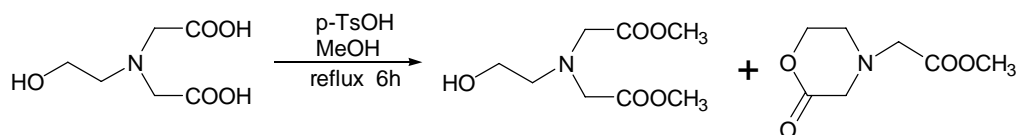
Η πολύ χαμηλή απόδοση της αντίδρασης πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η αντίδραση δεν ήταν δυνατόν να παρακολουθηθεί με TLC αφού τόσο το αντιδρών όσο και το προϊόν δεν εμφανιζόταν με κανένα τρόπο (UV, ορατό, χρώση σε ιώδιο ή διάλυμα φωσφομολυβδαινικού) οπότε μπορεί να διακόπηκε πριν το τέλος της. Επιπλέον, επειδή η απομόνωση του προϊόντος έγινε κατόπιν κρυστάλλωσης, ενδεχομένως να μην απομονώθηκε όλο το προϊόν που είχε παραχθεί. Τέλος αρκετά πιθανό είναι και το ενδεχόμενο να σχηματίστηκε το διμερές προϊόν.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του παραπάνω βρωμιδίου με το DMF ακολουθώντας τις ίδιες συνθήκες που είχαν χρησιμοποιηθεί και με το προηγούμενο υπόστρωμα.

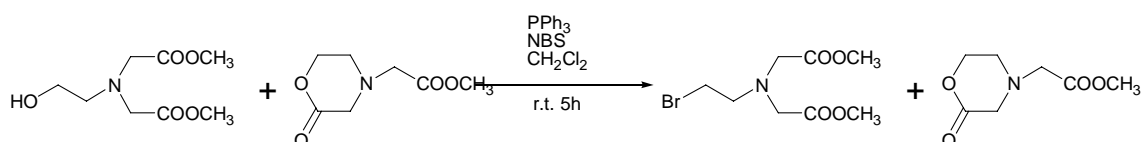


Δεδομένου ότι σε 20 ώρες, χρονικό διάστημα μετά το οποίο είχε διακοπεί η προηγούμενη αντίδραση, δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία κανενός προϊόντος, η αντίδραση αφέθηκε για συνολικά 2 μέρες οπότε και παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός κυρίου προϊόντος. Από το φάσμα NMR του μίγματος της αντίδρασης καθώς και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης GC/MS διαπιστώθηκε ότι ο αντίστοιχος φορμικός εστέρας σχηματίστηκε σε ποσοστό 44%.

Ακολούθησε η σύνθεση του βρωμιδίου του N-(2-υδροξυαιθυλο) ιμινοδιακετοξικού μεθυλεστέρα. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μετατροπή του οξέος στον αντίστοιχο εστέρα, ώστε το υπόστρωμα να είναι διαλυτό σε διχλωρομεθάνιο, διαλύτη όπου πραγματοποιείται η βρωμίωση.



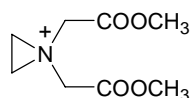
Η συνολική ποσότητα των δύο προϊόντων ήταν πολύ μικρή γεγονός που οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες. Πρώτον, στο ότι το αρχικό αντιδραστήριο δεν ανιχνεύεται με TLC οπότε η αντίδραση πιθανόν να διακόπηκε πριν την ολοκλήρωσή της, και δεύτερον ότι τα προϊόντα είναι αρκετά πολικά και πιθανόν η ανάκτησή τους κατά την διάρκεια των εκχυλίσεων να μην ήταν πλήρης. Οι πολικότητες των δύο παραπάνω προϊόντων δεν διέφεραν αρκετά ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους οπότε η αντίδραση βρωμίωσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μίγμα των προϊόντων.



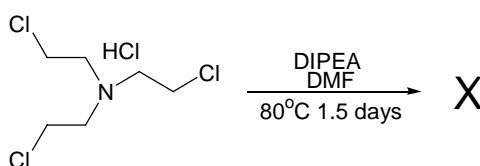
Στο σημείο αυτό ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων, οπότε και απομονώθηκε το βρωμίδιο σε συνολική απόδοση 29% από το αρχικό δικαρβοξυλικό οξύ. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του βρωμιδίου με το DMF. Μετά από 20 ώρες τα αποτελέσματα της ανάλυσης GC/MS επιβεβαίωσαν τον σχηματισμό του αντίστοιχου φορμυλοεστέρα σε ποσοστό 37% με ταυτόχρονη κατανάλωση όλης της ποσότητας του βρωμιδίου.



Αξίζει να σημειωθεί ότι στις συνθήκες του πειράματος δεν αποκλείεται η δημιουργία και της αντίστοιχης ενδιάμεσης αζιριδίνης, γεγονός το οποίο δεν μπορεί να αποκλεισθεί και για τις προηγούμενες περιπτώσεις και θα συζητηθεί στο τέλος του Κεφαλαίου.

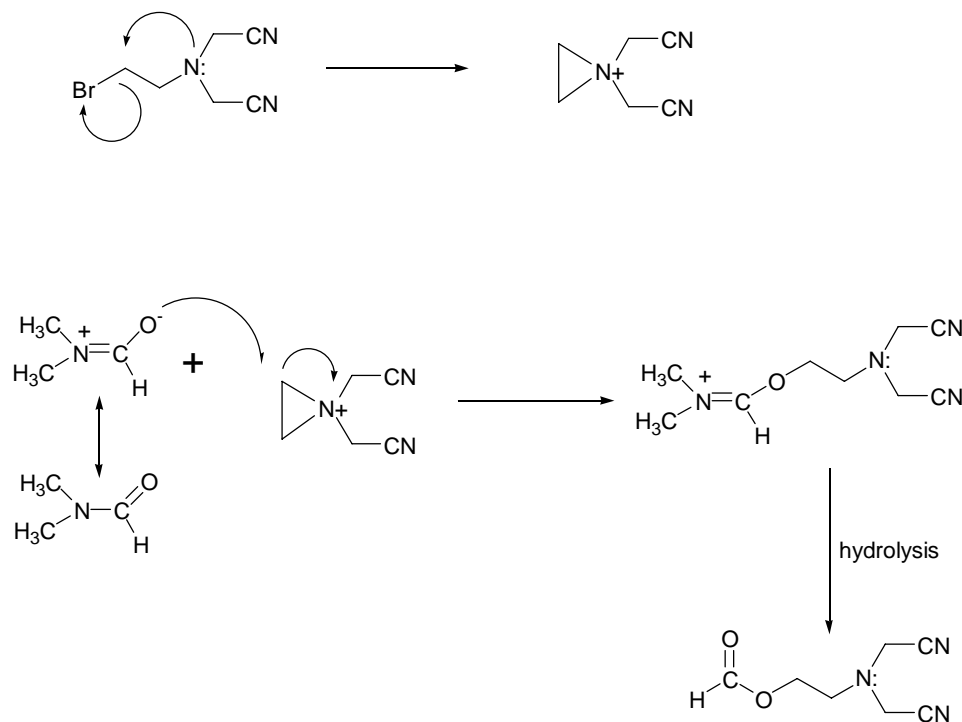


Τέλος, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση με το DMF της τρις-(2-χλωροαιθυλο)αμίνης. Το υπόστρωμα αυτό αντί για άτομο βρωμίου, φέρει άτομα χλωρίου, οπότε μπορεί να δώσει και μια πρώτη εκτίμηση για τη δραστηριότητα του βρωμίου έναντι του χλωρίου σαν αποχωρούσα ομάδα στην αντίδραση φορμυλίωσης.



Παρά το γεγονός ότι η αντίδραση αφέθηκε για περίπου μιάμιση μέρα, δεν ανιχνεύτηκε κανένα προϊόν, γεγονός που πιθανόν να σημαίνει ότι τα χλωρίδια δεν δίνουν την παραπάνω αντίδραση φορμυλίωσης με το DMF.

Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί να συμβαίνει στις παραπάνω αντιδράσεις φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα.



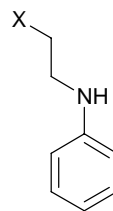
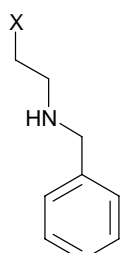
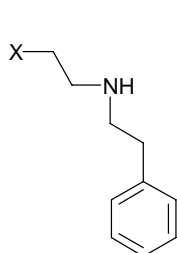
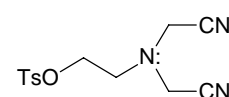
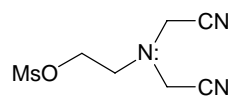
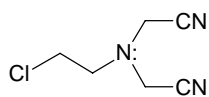
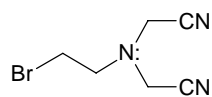
Αν και τα πειραματικά δεδομένα είναι προφανώς περιορισμένα σε αριθμό αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι πειραματικά και βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούν να οδηγήσουν σε μία αρχική υπόθεση μηχανισμού η οποία θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω σχεδιασμένα πειράματα.

Είναι γνωστό ότι β-αλογονωμένες αμίνες τύπου “nitrogen mustards” δίνουν, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, δραστικά ενδιάμεσα αζιριδινικού τύπου.<sup>7</sup>

Όπως φαίνεται στο Σχήμα, το DMF μπορεί να προσβάλει, μέσω του οξυγόνου, το πιθανό αζιριδινικό ενδιάμεσο σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής. Το ενδιάμεσο που σχηματίζεται μπορεί περαιτέρω να υδρολυθεί παρουσία της υγρασίας στην αντίδραση και να δώσει τον τελικό φορμικό εστέρα. Ο μηχανισμός αυτός συμφωνεί και με το γεγονός ότι δεν σχηματίστηκε προϊόν στην περίπτωση του χλωριδίου, αφού σε τέτοιου είδους αντιδράσεις το βρώμιο αποτελεί καλύτερη αποχωρούσα ομάδα. Επίσης συστήματα όπου η διαθεσιμότητα του ελεύθερου ζεύγους ηλεκτρονίων είναι περιορισμένη λόγω συντονισμού αναμένεται να δώσουν προϊόν σε μικρότερες αποδόσεις. Το γεγονός επιβεβαιώνεται στην περίπτωση του φθαλιμιδικού παραγώγου.



Στους μελλοντικούς στόχους του εργαστηρίου μας είναι η πραγματοποίηση της αντίδρασης και με άλλα υποστρώματα ώστε να εξαχθεί σαφές συμπέρασμα για τη φύση των υποστρωμάτων που δίνουν την αντίδραση αυτή, αλλά και να αποσαφηνισθεί ο μηχανισμός της. Σαν τέτοια υποστρώματα προτείνονται σειρές ενώσεων που θα επιτρέψουν την σύγκριση ταχυτήτων και αποδόσεων της αντίδρασης.



X=Br, Cl

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

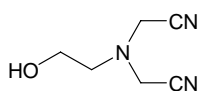
### Γενικές Πληροφορίες

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου.

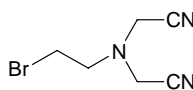
Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), σε γυάλινα πλακίδια επιστρωμένα με silica gel, τύπου 60F<sub>254</sub> (Merck). Για την εμφάνιση των πλακιδίων TLC χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολία UV (254 και 366 nm), ατμοί ιωδίου, 5% αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος και θέρμανση. Για τον διαχωρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel 60-200 mesh (Merck).

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματόμετρο MSL300 της Bruker 300 MHz. Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm σε σχέση με το τετραμεθυλο σιλάνιο. Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο της Perkin-Elmer μοντέλο 735. Τα φάσματα GC/MS καταγράφηκαν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Shimadzu GC-MS-QP5050A.

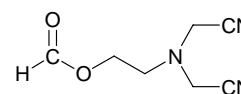
### Ενώσεις που συντέθηκαν



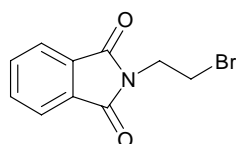
**Ένωση 2**



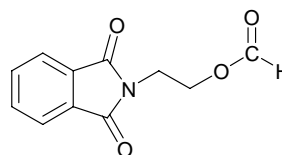
**Ένωση 3**



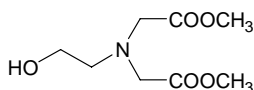
**Ένωση 26**



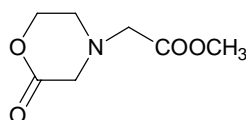
**Ένωση 27**



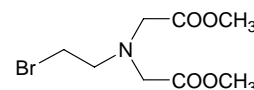
**Ένωση 28**



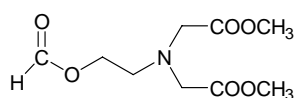
**Ένωση 29**



**Ένωση 30**



**Ένωση 31**



**Ένωση 32**

## Παρασκευή ένωσης 2

Σε αυτόκλειστο τοποθετήθηκαν 10 ml άνυδρου ακετονιτριλίου και κατόπιν 2-αμινοαιθανόλη 1.012 g (16.6 mmol), DIPEA 6.436 g (49.8 mmol) και χλωροακετονιτριλίο 3.760 g (49.8 mmol). Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 100 °C. Η αντίδραση αναδεύτηκε για 16 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 40% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα. Απομονώθηκαν 0.807 g (35%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  3.74 (t,  $J=4.8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.71 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.83 (t,  $J=4.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

## Παρασκευή ένωσης 3

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση 2 0.5 g (3.6 mmol) διαλυμένη σε 7.5 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου σε θερμοκρασία -23 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη 1.196 g (4.56 mmol) και μετά τη διάλυσή της, N-βρωμοσουλφιμόλιο 0.744 g (4.18 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία ώρα στους -23 °C και κατόπιν για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση του αρχικού αντιδραστήριου, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 20% ακετόνη σε τολουόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 2.735 g (95%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  3.62 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.36 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{BrCH}_2$ ), 3.00 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

## Παρασκευή ένωσης 26

Σε σφαιρική φιάλη, που περιείχε 2 ml DMF, τοποθετήθηκε η ένωση 3 0.01 g (0.05 mmol) και DIPEA 6 mg (0.05 mmol) και το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C. Μετά από 20 ώρες διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του βρωμιδίου οπότε προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας για τη διακοπή της αντίδρασης. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 50% οξικό αιθυλεστέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα. Απομονώθηκαν 5 mg (62.5%) προϊόντος.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  8.07 (s, 1H,  $\text{HC(O)O}$ ), 4.32 (t,  $J=5.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.69 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.97 (t,  $J=5.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ). MS: 167  $[\text{M}]^+$ . IR ( $-\text{C}=\text{O}$ ) 1639  $\text{cm}^{-1}$ , ( $-\text{CN}$ ) 2358  $\text{cm}^{-1}$ .

### Παρασκευή ένωσης 27

Σε 10 ml άνυδρης ακετόνης προστέθηκε φθαλιμιδικό κάλιο 0.1 g (0.5 mmoles) και διβρωμοαιθάνιο 0.094 g (0.5 mmoles) και το διάλυμα θερμαίνεται υπό βρασμό. Η αντίδραση αφέθηκε για 2 μέρες, αφού δεν μπορεί να ελεγχθεί με TLC. Στη συνέχεια αποστάχθηκε ο διαλύτης υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε αιθέρα. Προστέθηκαν σταγόνες πετρελαϊκού αιθέρα και το διάλυμα τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Μετά από 20 μέρες το κρυσταλλικό προϊόν απομονώθηκε κατόπιν διηθήσεως. Απομονώθηκαν 13 mg (10%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.87-7.83 (m, 2H, αρωματικά), 7.75-7.71 (m, 2H, αρωματικά), 4.10 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.60 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ).

### Παρασκευή ένωσης 28

Σε σφαιρική φιάλη, που περιείχε 2 ml DMF, τοποθετήθηκε η ένωση **27** 0.013 g (0.05 mmoles) και DIPEA 6 mg (0.05 mmoles) και το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C. Μετά από 2 μέρες και αφού διαπιστώθηκε ότι δεν καταναλώνεται πλήρως το βρωμιδίου προστέθηκε διχλωρομεθάνιο για τη διακοπή της αντίδρασης. Ακολούθησαν εκχυλίσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Στη συνέχεια λήφθηκε το φάσμα NMR του μίγματος όπου διαπιστώθηκε ότι υπάρχει το αρχικό βρωμίδιο τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται παραπάνω καθώς και η ένωση **28** (44%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.99 (s, 1H,  $\text{HC(O)O}$ ), 7.87-7.81 (m, 2H, αρωματικά), 7.75-7.70 (m, 2H, αρωματικά), 4.40 (t,  $J=5.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.99 (t,  $J=5.1$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ). MS: 219  $[\text{M}]^+$ .

### Παρασκευή ενώσεων 29 και 30

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 0.4 ml άνυδρης μεθανόλης, N-(υδροξυλαιθυλο)διακετοξικό οξύ 0.05 g (0.28 mmoles) και p-τολουλοσουλφονικό οξύ 0.073 g (0.42 mmoles) και το διάλυμα θερμάνθηκε υπό βρασμό για 6 ώρες. Προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας για τη διακοπή της αντίδρασης και ακολούθησαν εκχυλίσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Απομονώθηκαν 26 mg μίγματος δύο προϊόντων.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz): ένωση **29**:  $\delta$  3.65 (s, 6H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.50 (s, 4H,  $\text{NCH}_2\text{COO}$ ), 3.29 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H,  $\text{HOCH}_2$ ), 2.87-2.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ). Ένωση **30**:  $\delta$  4.37 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.67 (s, 2H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.48 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{COO}$ ), 3.29 (s, 2H,  $\text{COCH}_2\text{N}$ ), 2.87-2.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

### Παρασκευή ένωσης 31

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε το μίγμα των **29** και **30** 0.026 g διαλυμένο σε 0.7 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο τετραχλωράνθρακα-ξηρού πάγου σε θερμοκρασία -23 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη 0.04 g (0.15 mmoles) και μετά τη διάλυσή της, N-βρωμοσουκινιμίδιο 0.025 g (0.14 mmoles). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία ώρα στους -23 °C και κατόπιν για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πλήρη κατανάλωση του ενός αντιδρώντος, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης 20% ακετόνη σε τολουόλιο. Το καθαρό προϊόν ήταν 0.022 g (29% από το αρχικό οξύ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 3.62 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>), 3.33 (t, J=6.9 Hz, 2H, BrCH<sub>2</sub>), 3.08 (t, J=6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N).

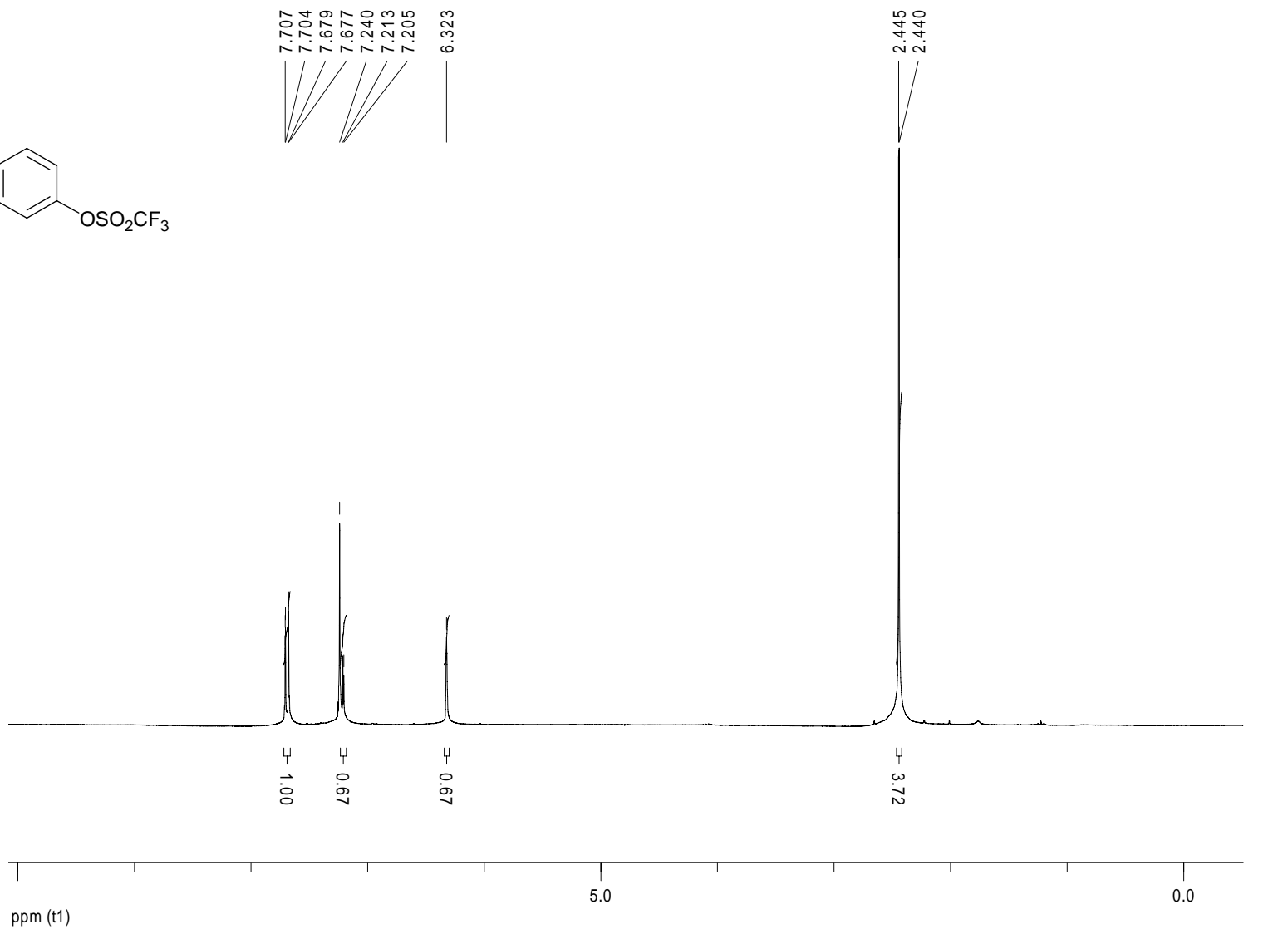
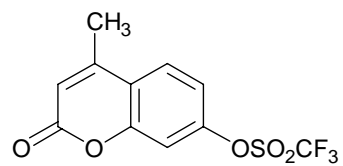
### Παρασκευή ένωσης 32

Σε σφαιρική φιάλη, που περιείχε 2 ml DMF, τοποθετήθηκε η ένωση **31** 0.022 g (0.08 mmoles) και DIPEA 10 mg (0.08 mmoles) και το σύστημα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 80 °C. Μετά από 20 ώρες προστέθηκε διχλωρομεθάνιο για τη διακοπή της αντίδρασης. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με νερό και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Στη συνέχεια λήφθηκε φάσμα GC/MS του μίγματος όπου διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει το αρχικό βρωμίδιο. Η ένωση **32** έχει σχηματιστεί σε ποσοστό 37%. MS: 233 [M]<sup>+</sup>.

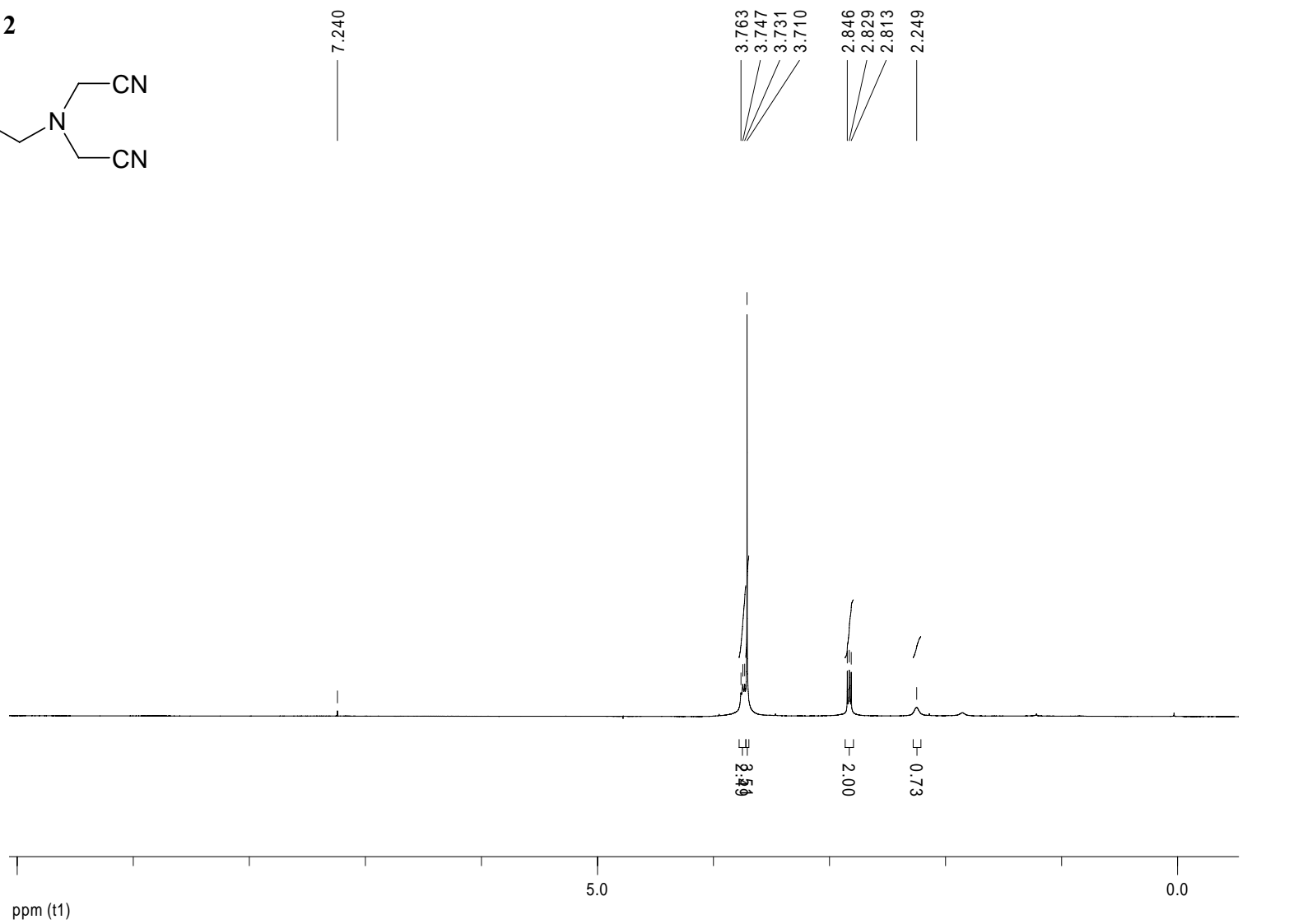
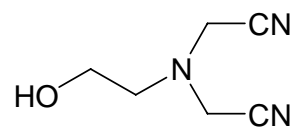
## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 
- <sup>1</sup> March J. *Advanced Organic Chemistry*, Fourth Edition, Wiley & Sons, New York, **1992**, pp. 542-543
- <sup>2</sup> Jugie G.; Smith J. A. S.; Martin G. J. *J. Chem. Soc. Perkin II*, **1975**, 925-927
- <sup>3</sup> March J. *Advanced Organic Chemistry*, Fourth Edition, Wiley & Sons, New York, **1992**, p. 599
- <sup>4</sup> March J. *Advanced Organic Chemistry*, Fourth Edition, Wiley & Sons, New York, **1992**, p. 822
- <sup>5</sup> Koeller S.; Lellouche J. P. *Tet. Lett.*, **1999**, 40, 7043-7046
- <sup>6</sup> McGovern M. E.; Thompson M. *Can. J. Chem.*, **1999**, 77, 1678-1689
- <sup>7</sup> Isaaks N. S. *Reactive Intermediates in Organic Chemistry* John Wiley and Sons, London 1974, pp. 200-212.

# Ένωση 1

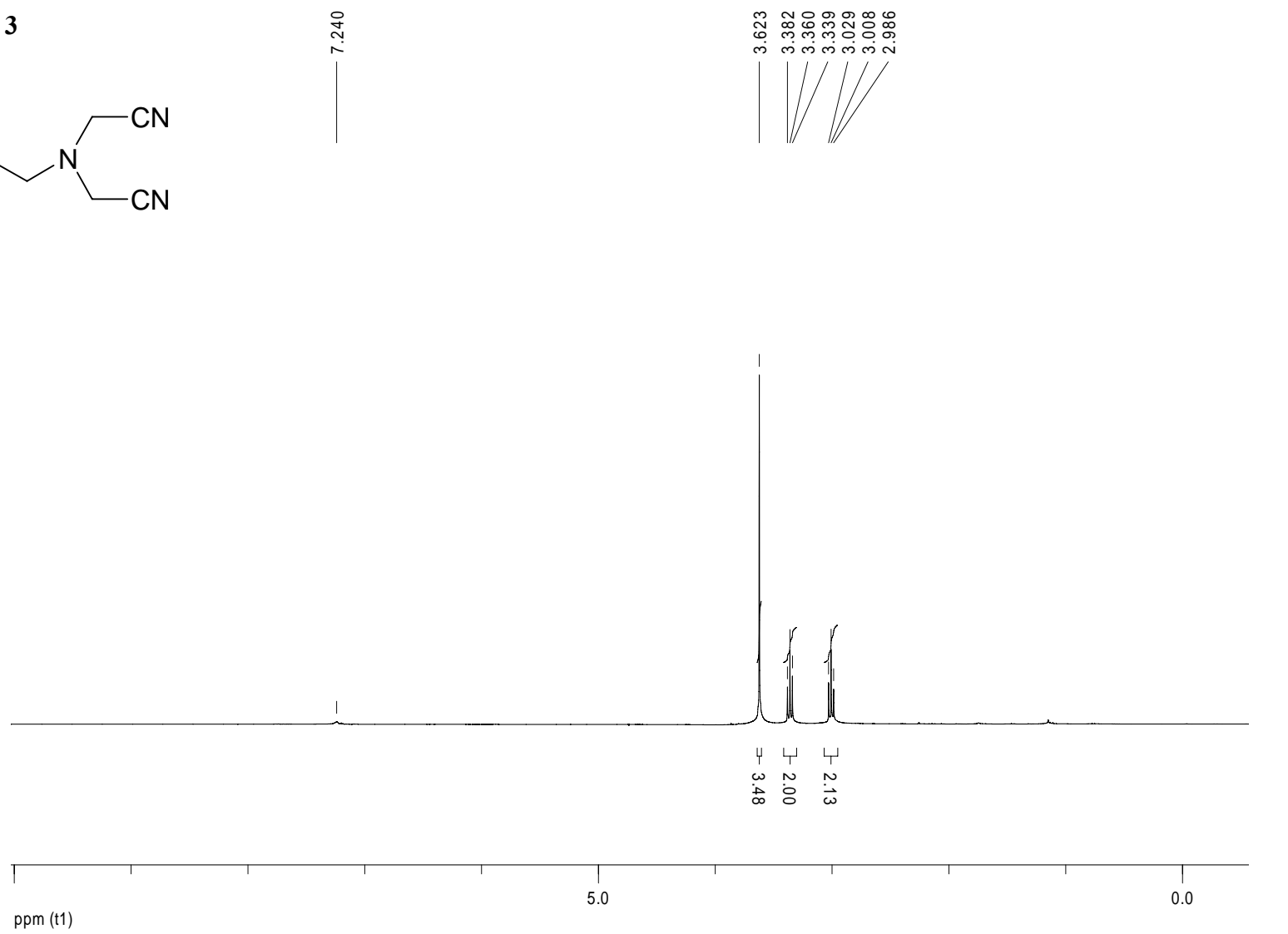
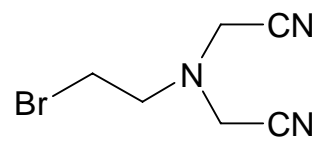


Ένωση 2

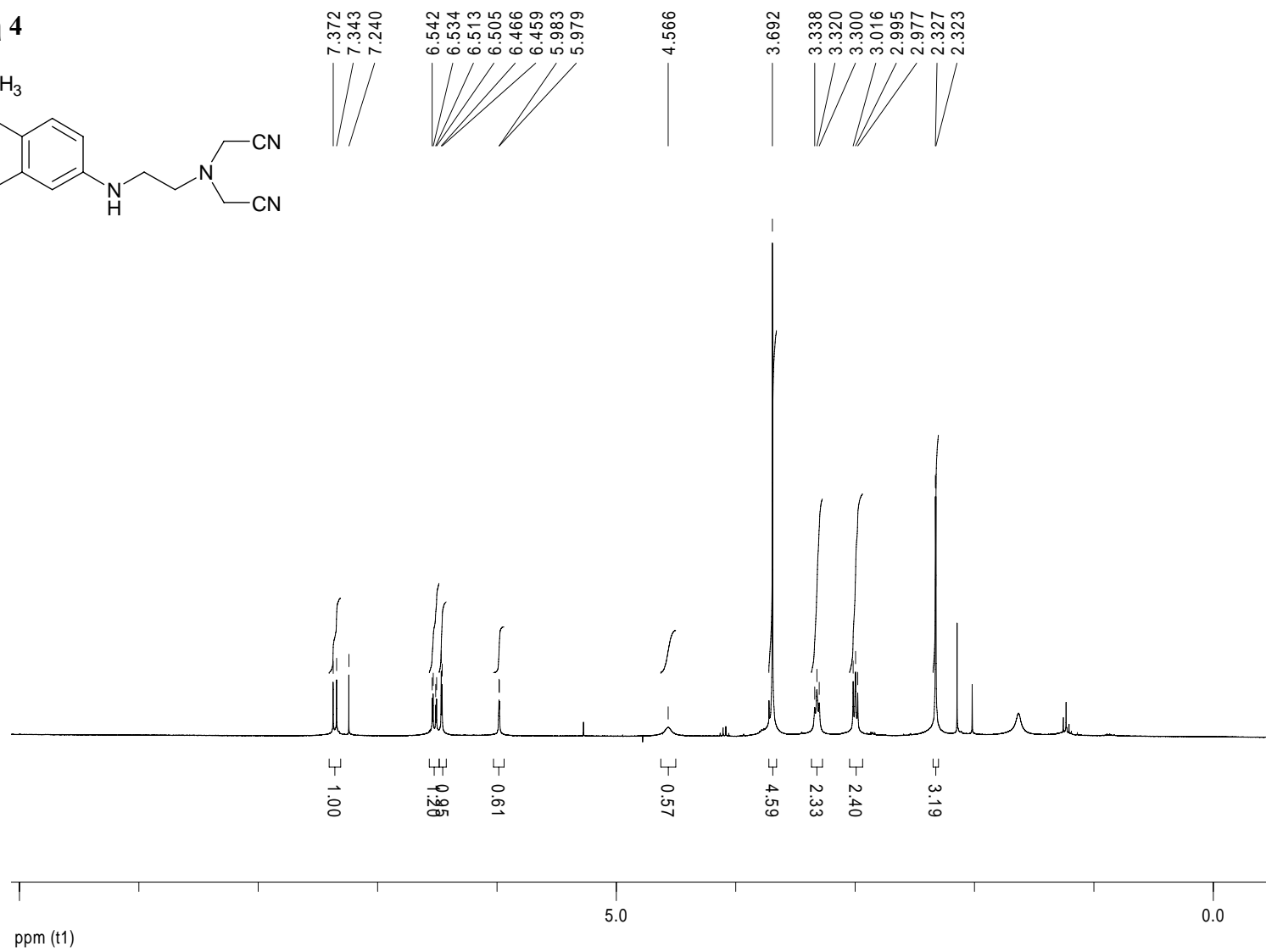
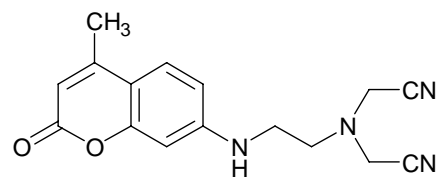




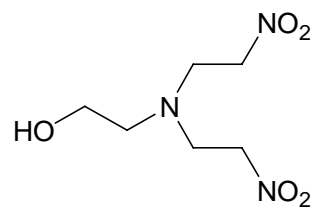
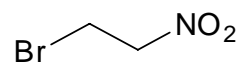
Ένωση 3



# Ένωση 4

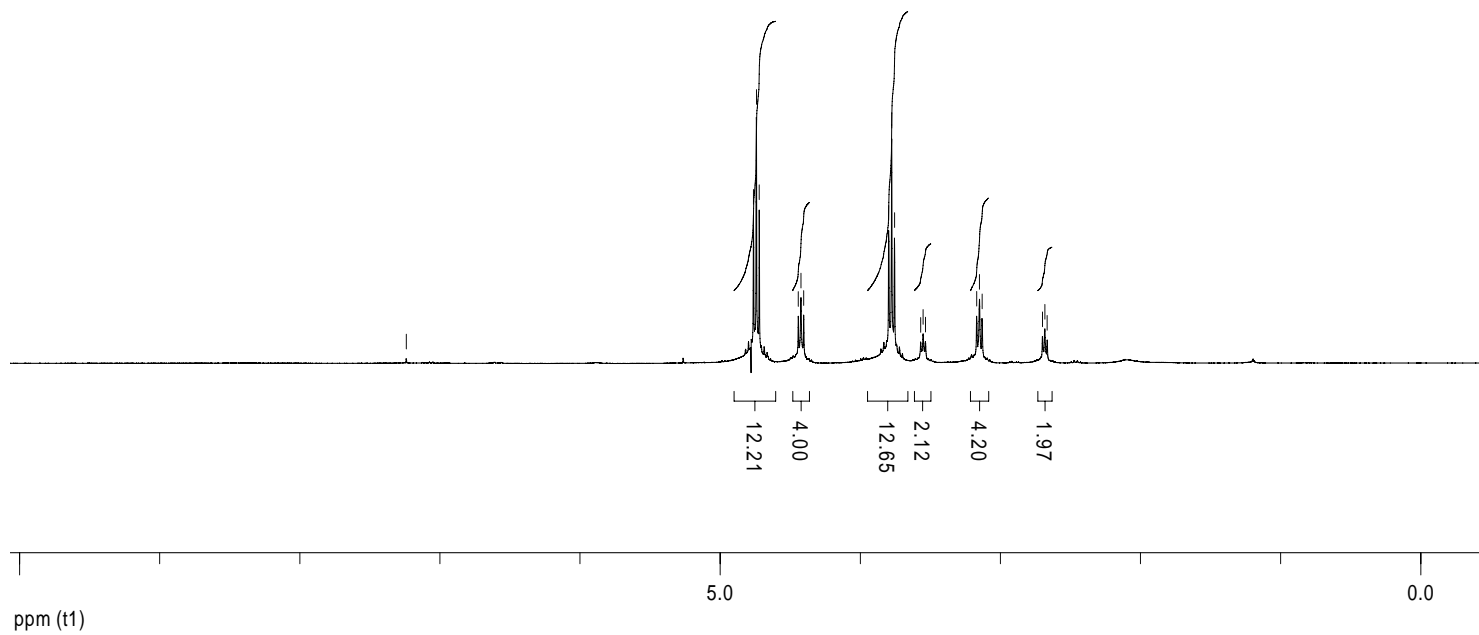


Ένωση 5 και 6

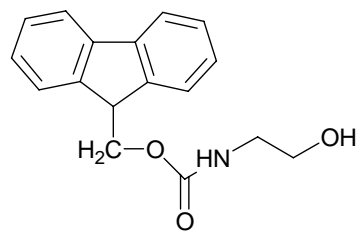


7.240

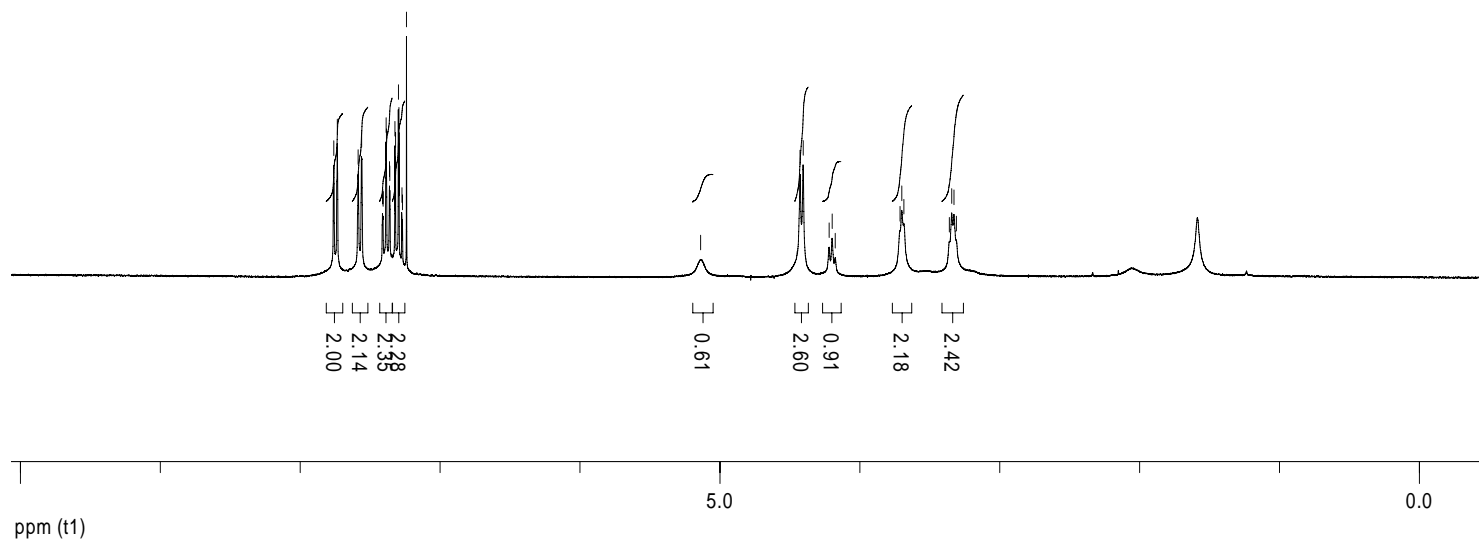
4.762  
4.741  
4.721  
4.442  
4.423  
4.403  
3.796  
3.776  
3.755  
3.568  
3.551  
3.534  
3.169  
3.149  
3.130  
2.700  
2.682  
2.666



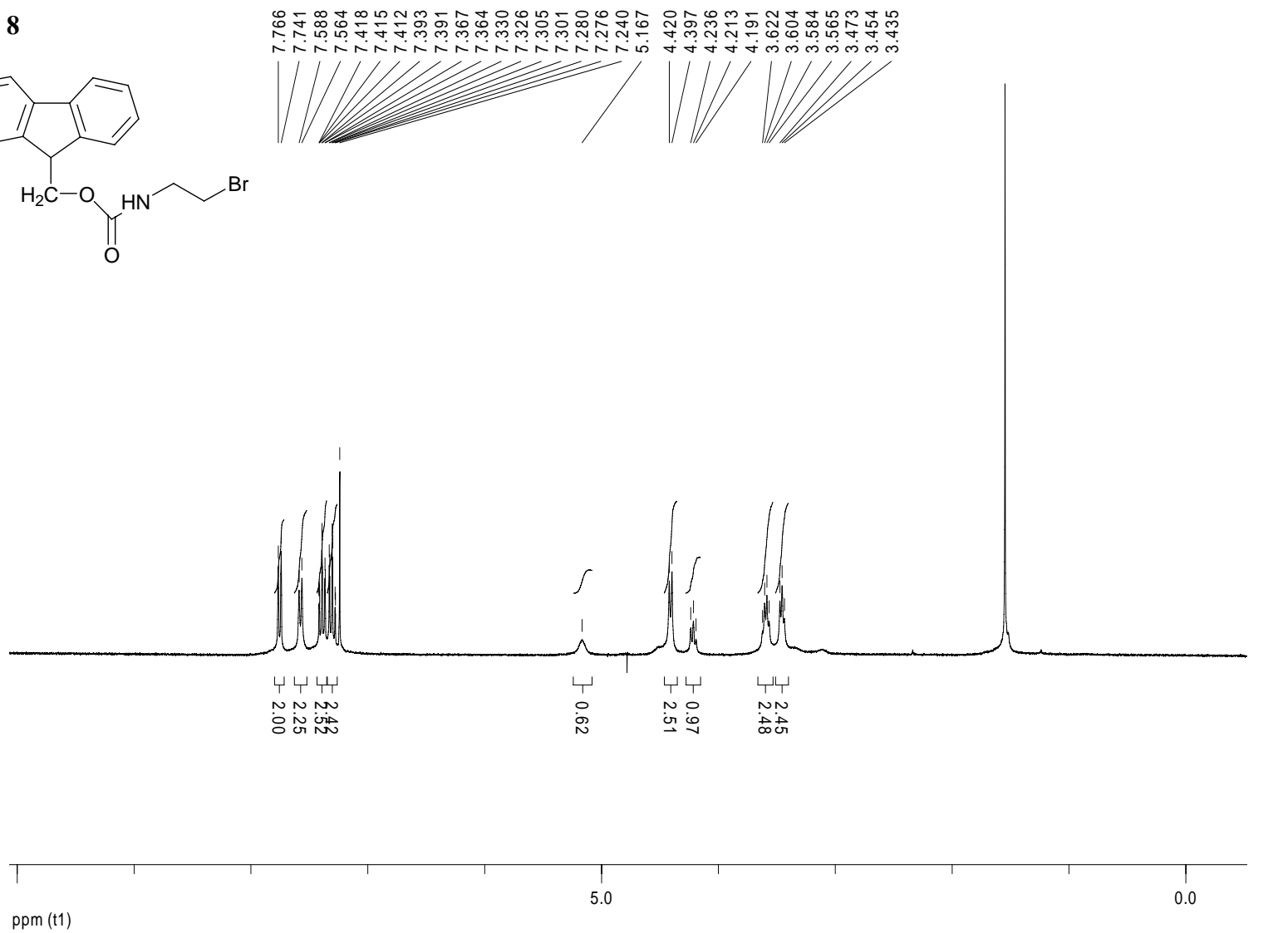
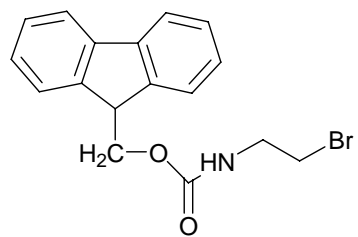
# Ένωση 7



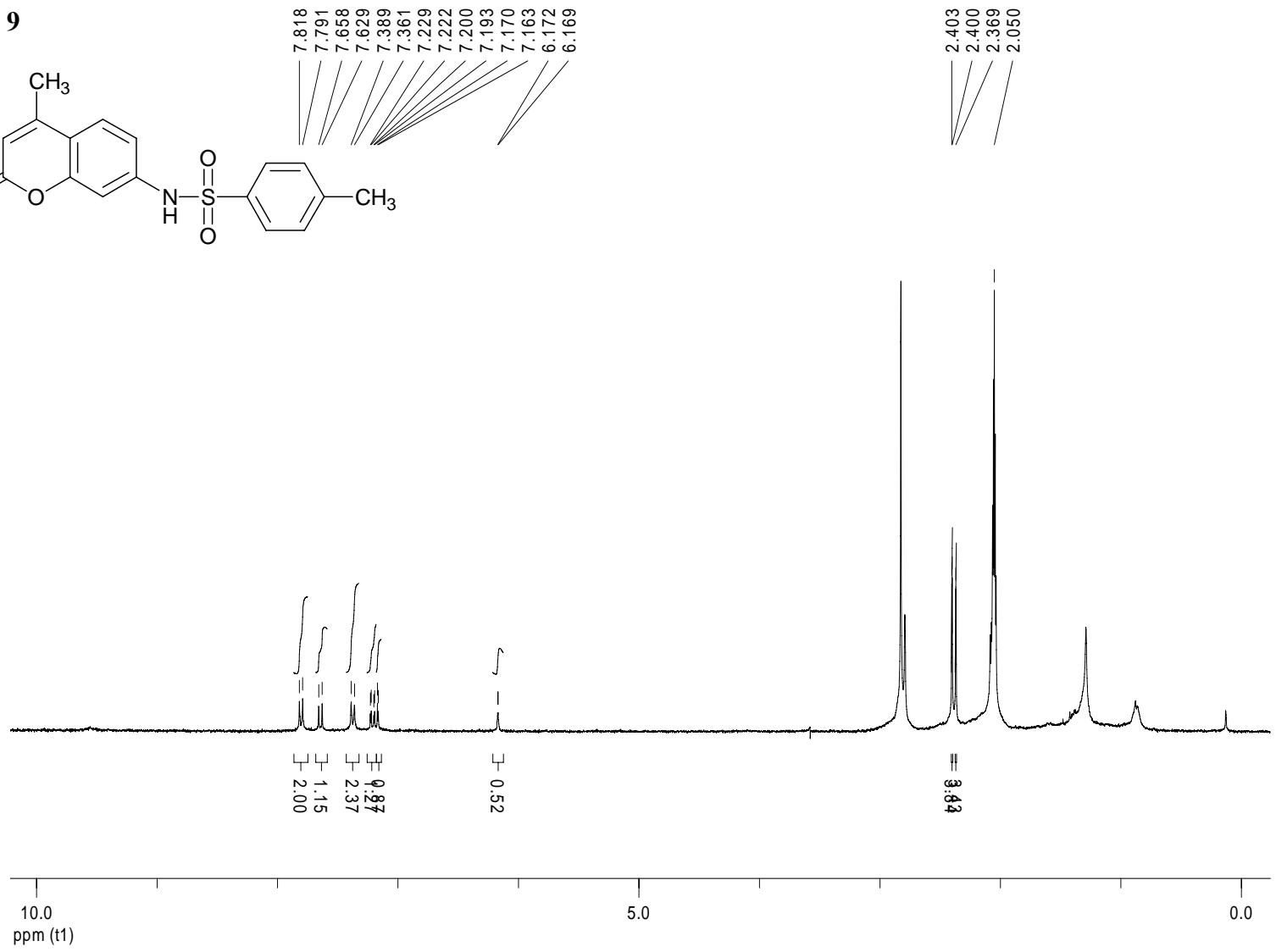
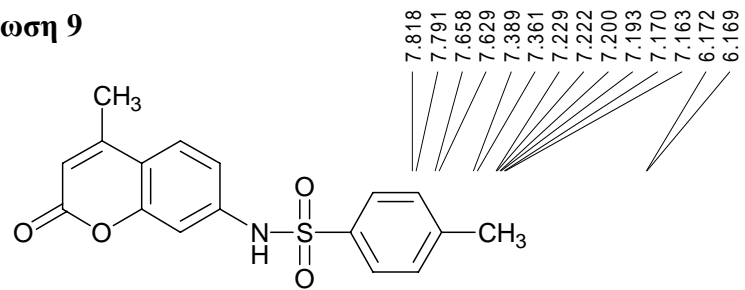
7.760  
7.735  
7.586  
7.561  
7.411  
7.408  
7.386  
7.384  
7.362  
7.359  
7.323  
7.319  
7.298  
7.294  
7.273  
7.269  
7.240  
5.138  
4.427  
4.405  
4.220  
4.197  
4.175  
3.713  
3.699  
3.685  
3.360  
3.343  
3.327  
3.309



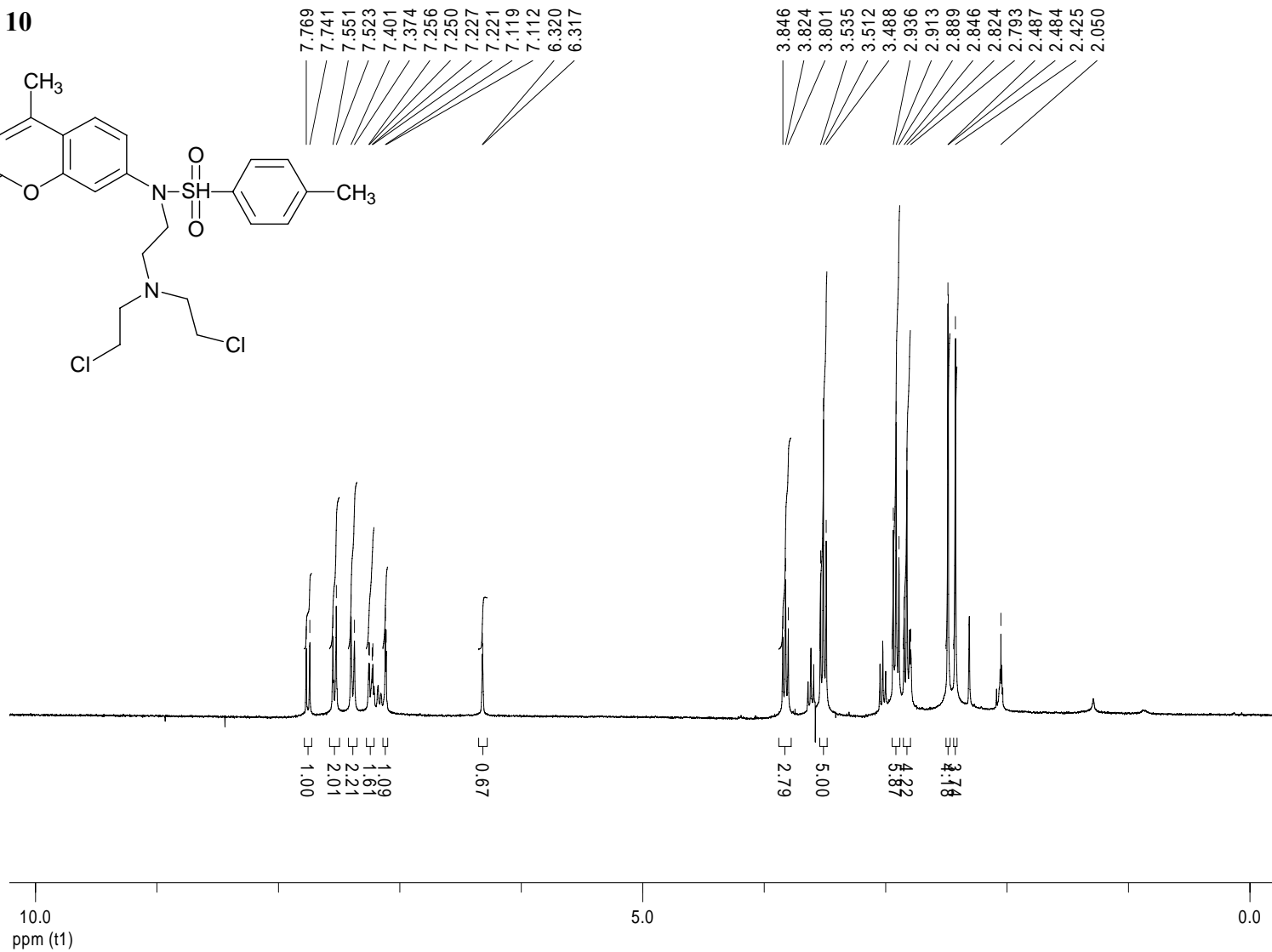
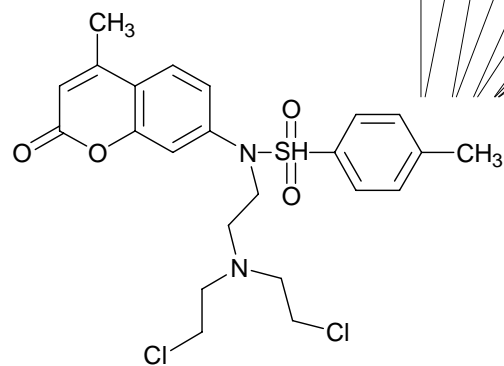
# Ένωση 8



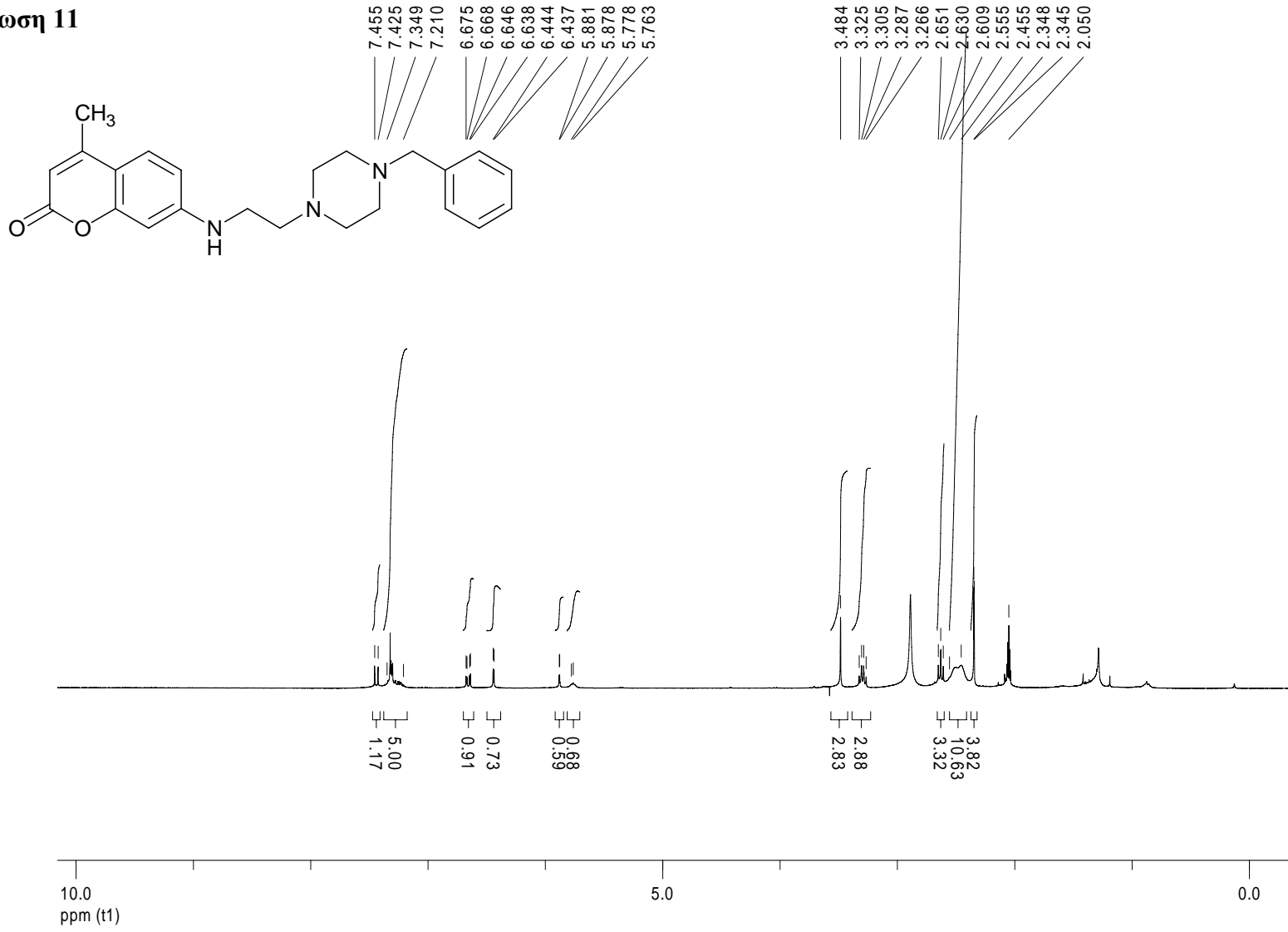
**Ένωση 9**



# Ένωση 10

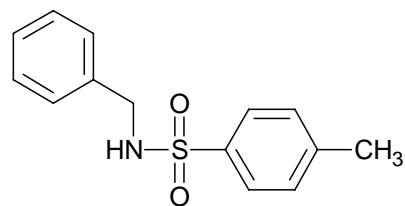


# Ένωση 11





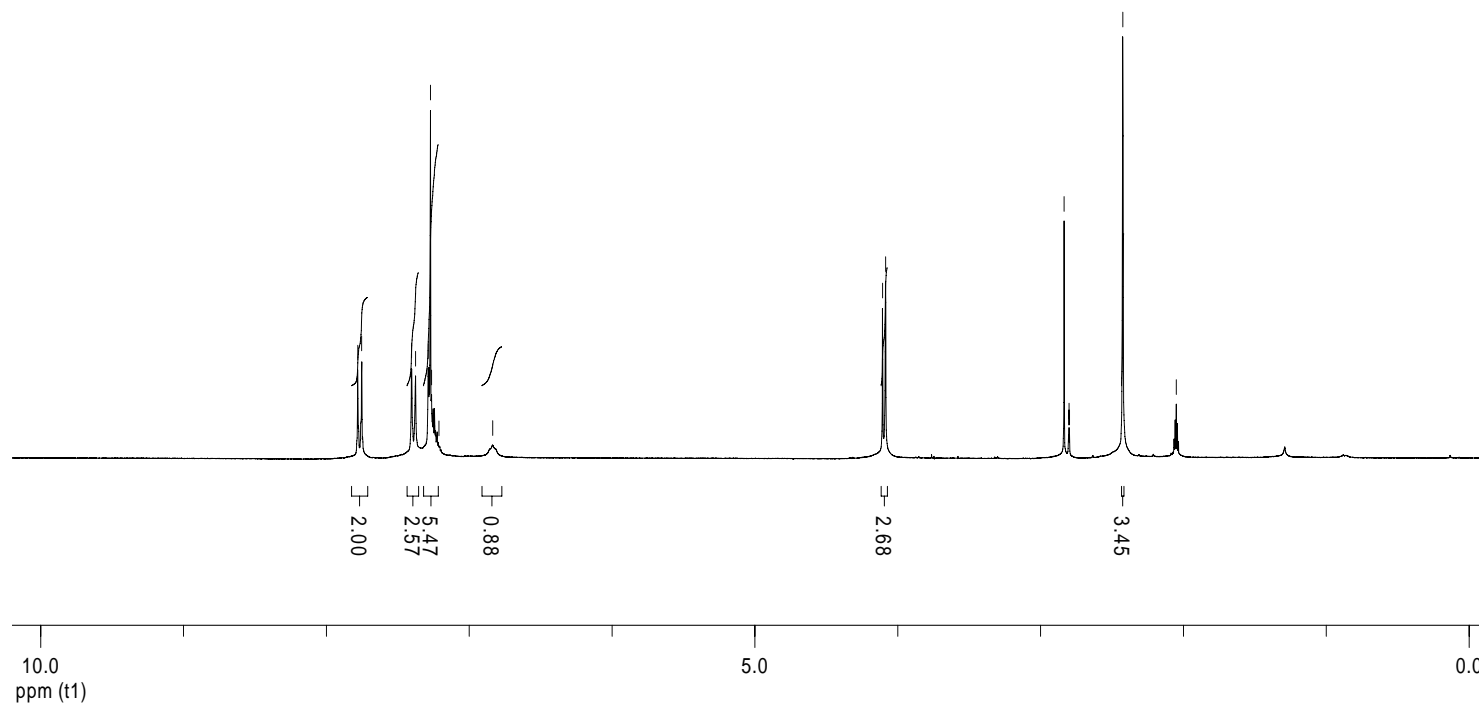
# Ένωση 12



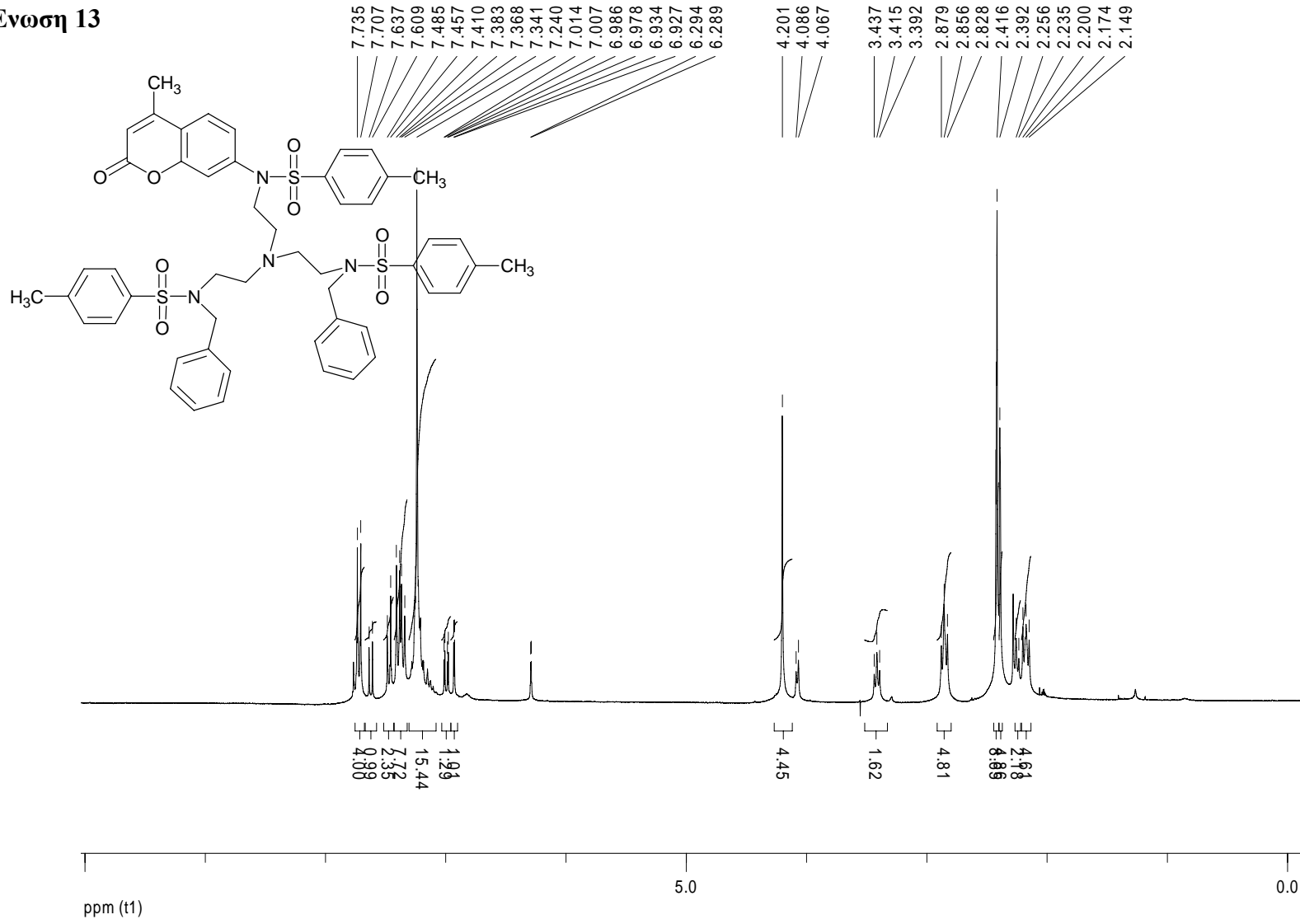
7.780  
7.752  
7.403  
7.376  
7.286  
7.271  
7.264  
7.212  
6.836

4.106  
4.085

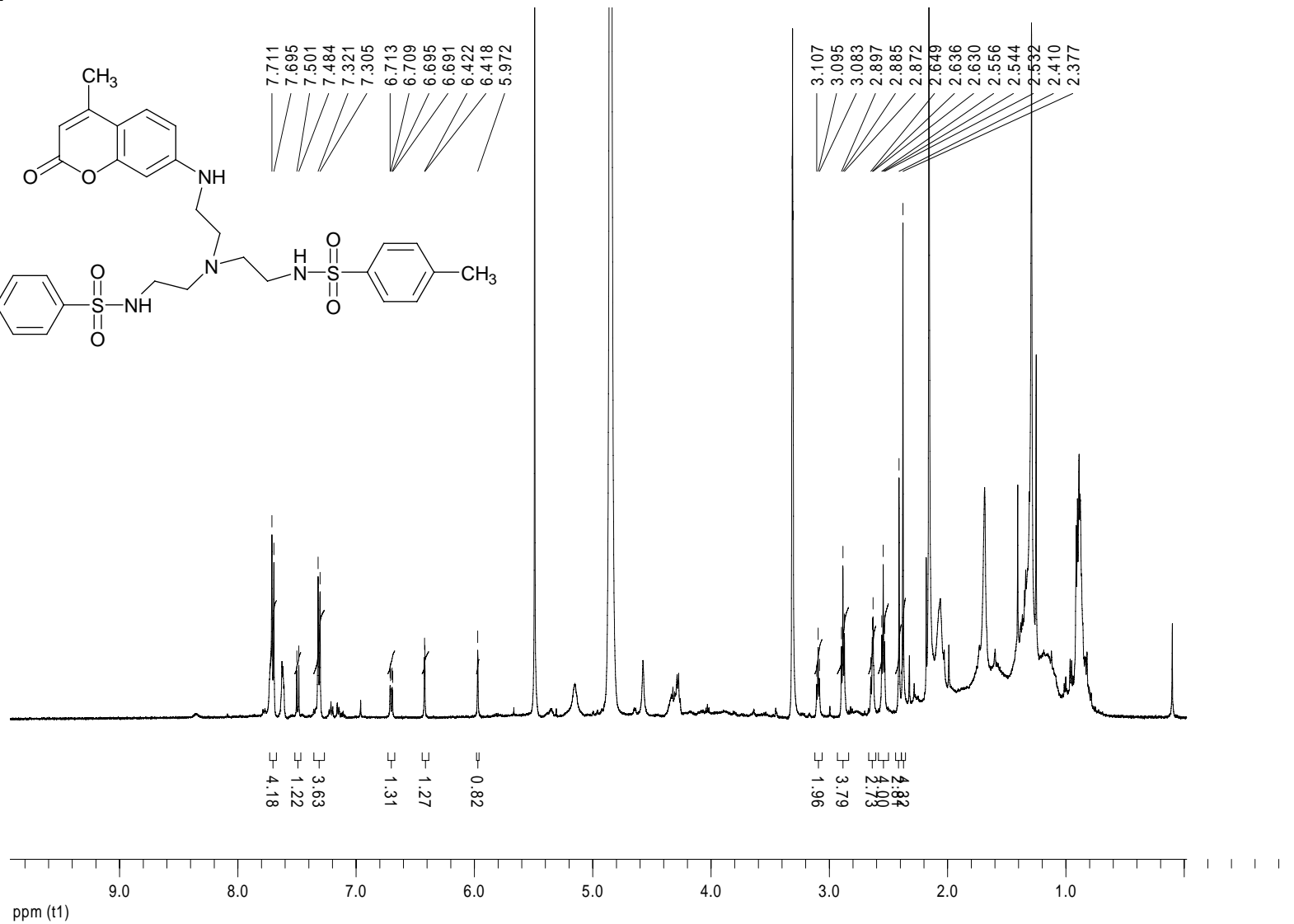
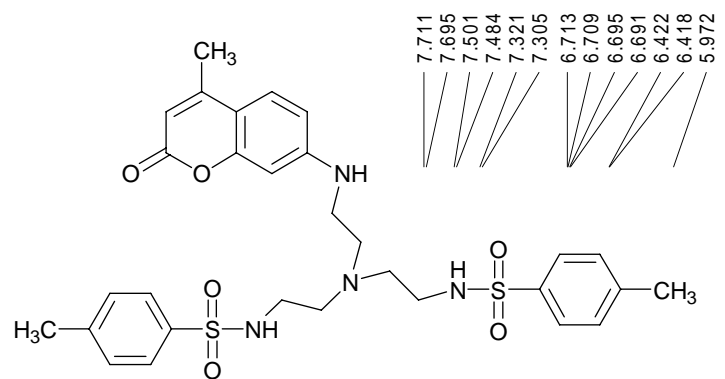
2.835  
2.804  
2.801  
2.797  
2.424  
2.050



**Ένωση 13**

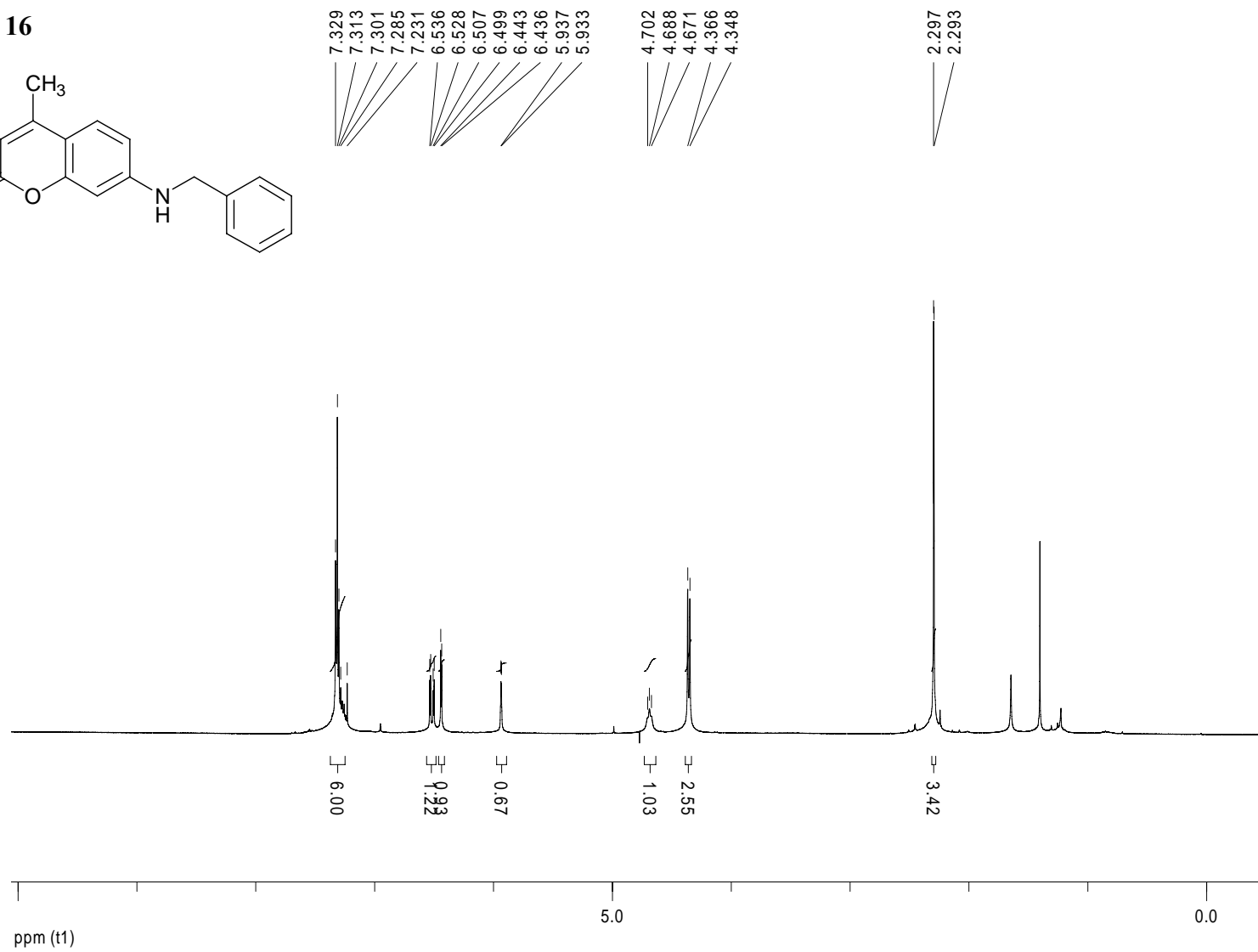
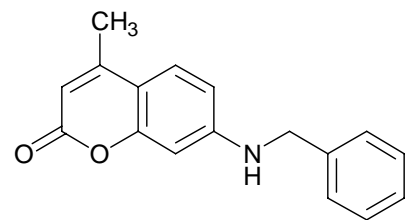


# Ένωση 14

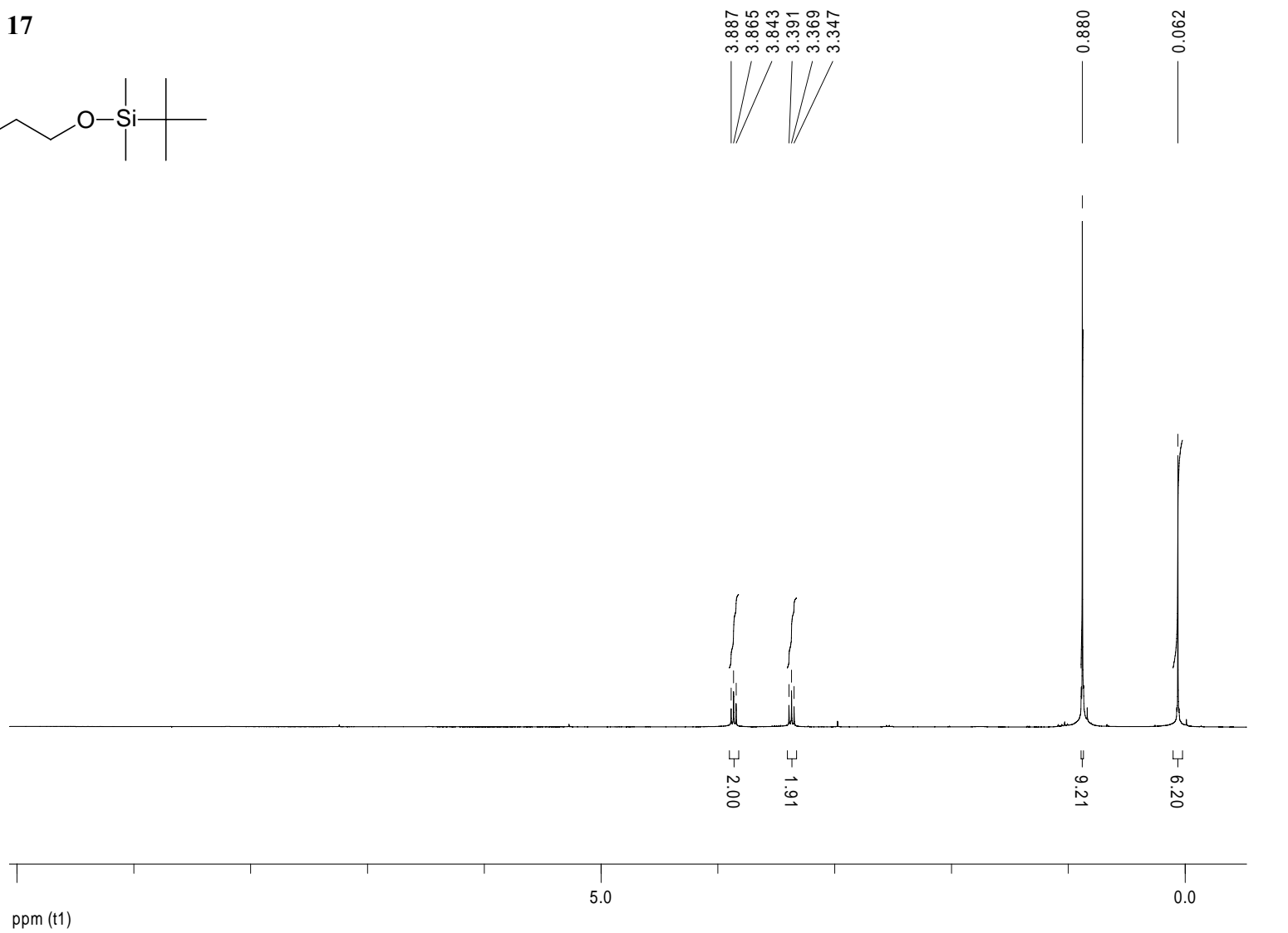
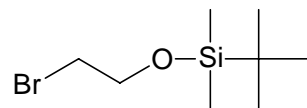




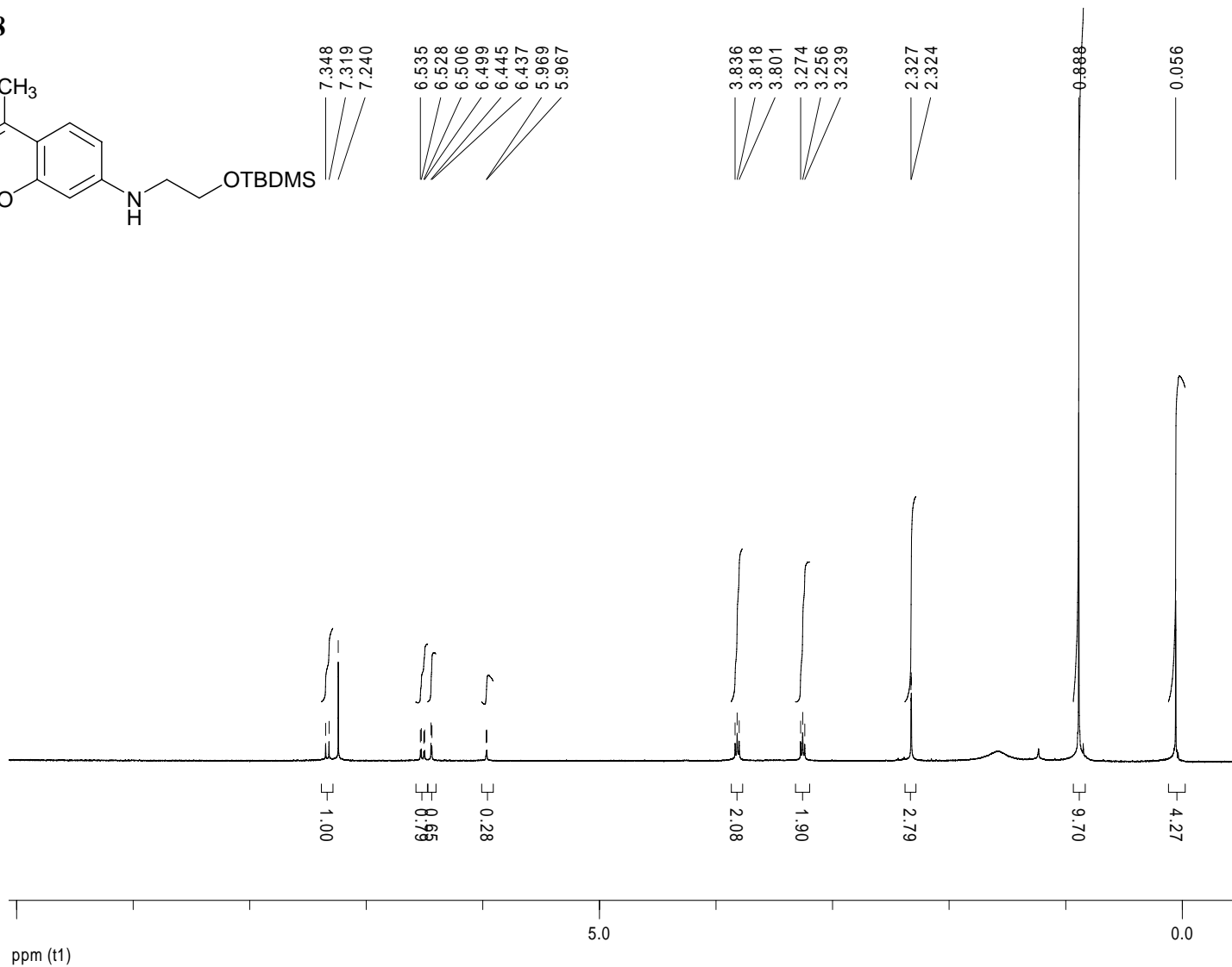
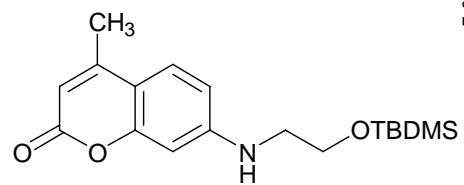
# Ένωση 16



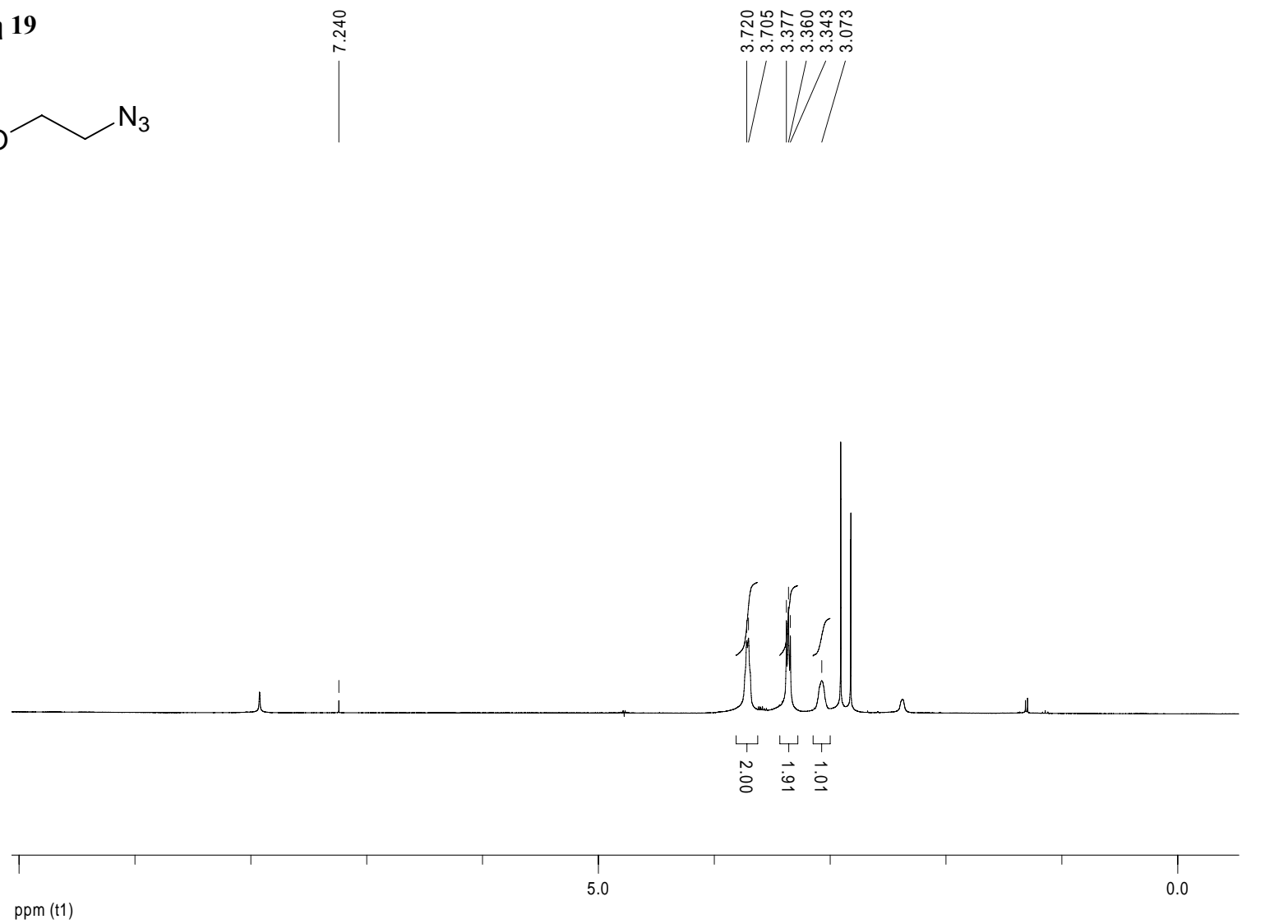
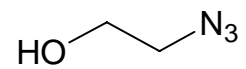
Ένωση 17



# Ένωση 18

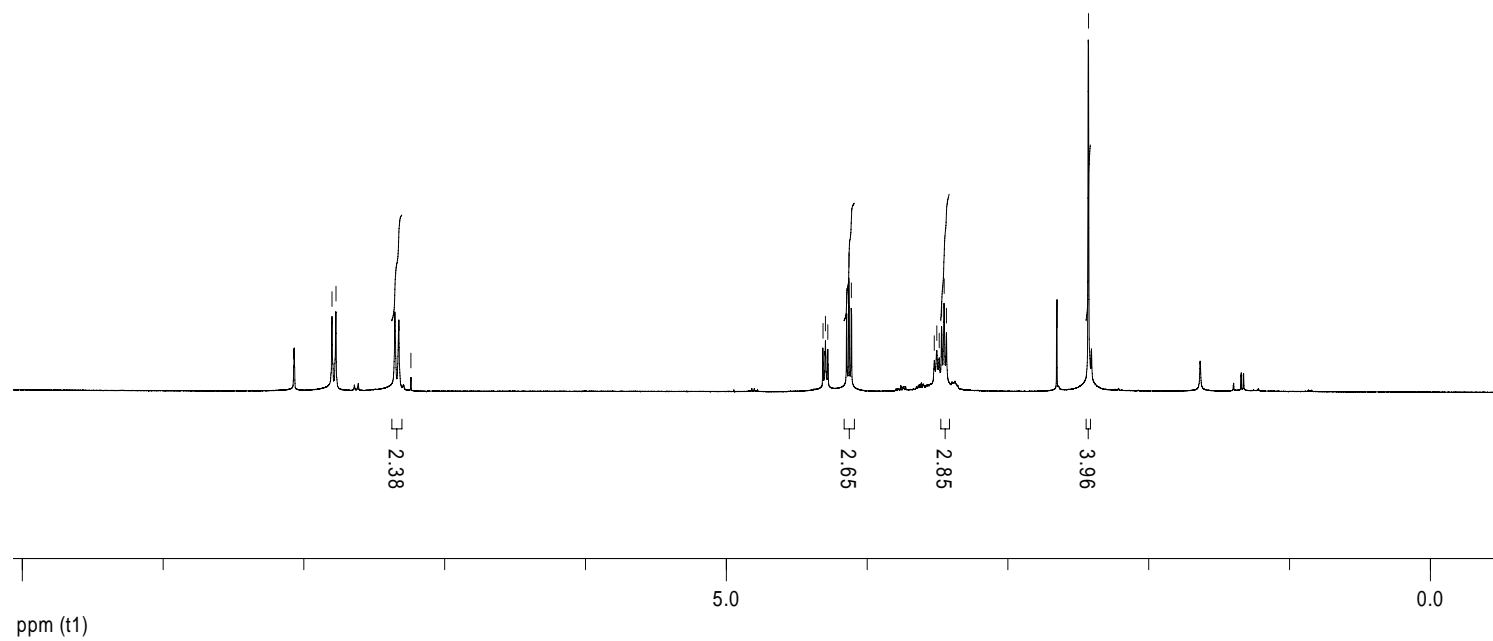
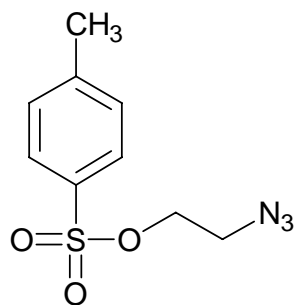


Ένωση 19

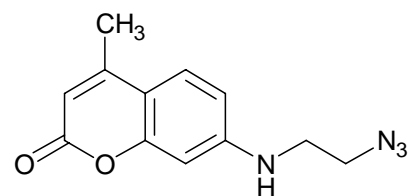




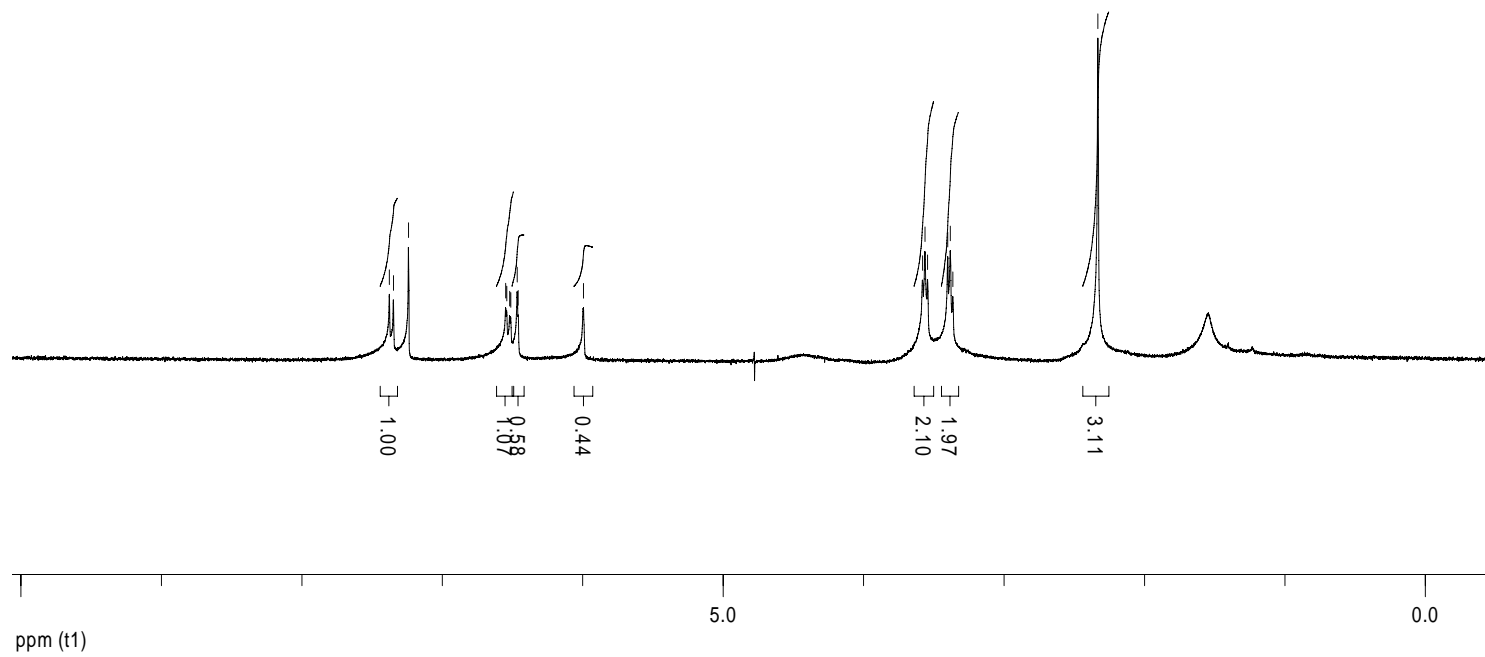
Ένωση 20



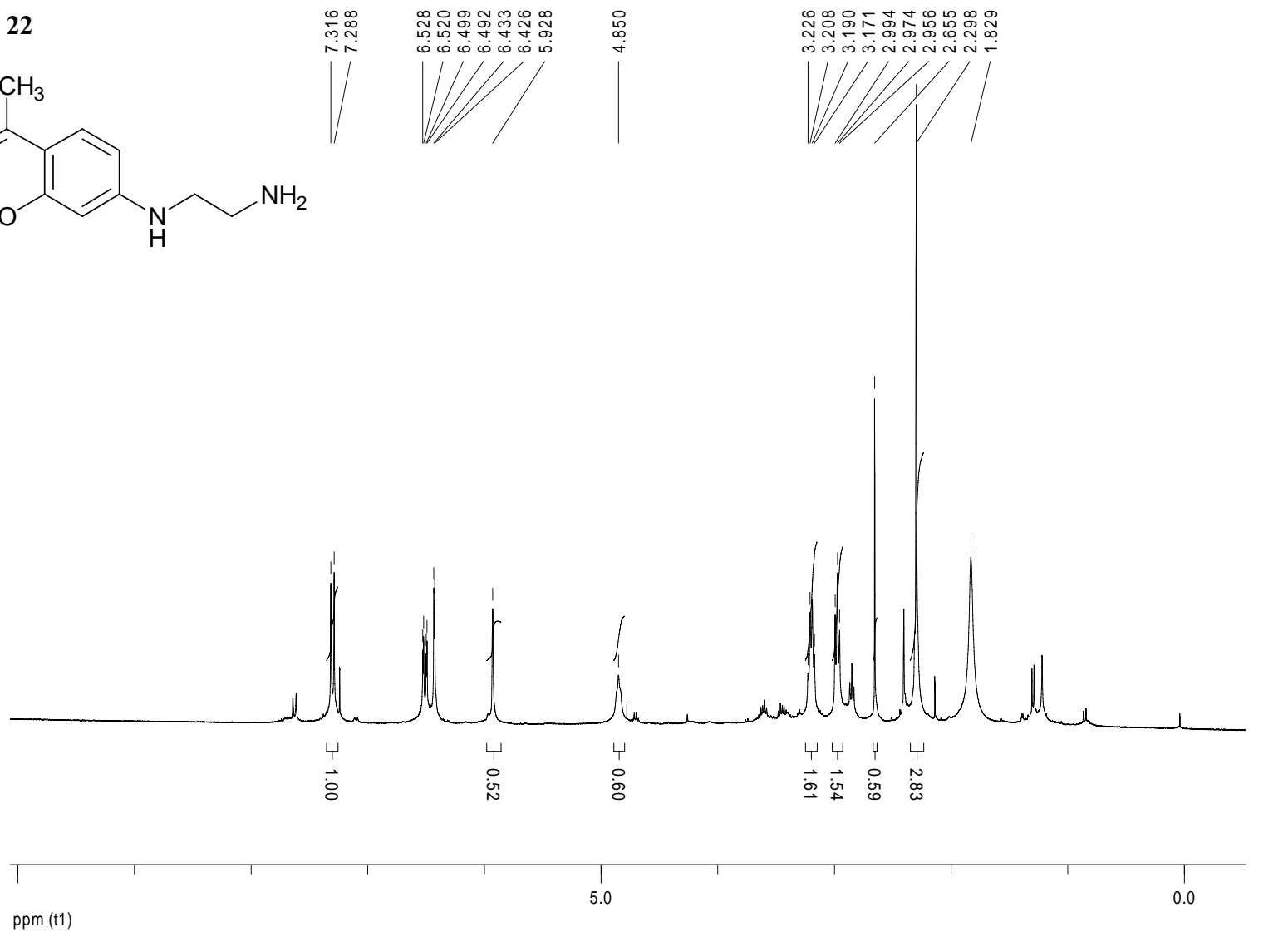
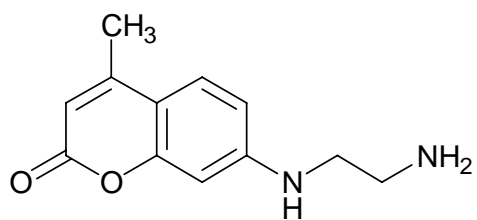
# Ένωση 21



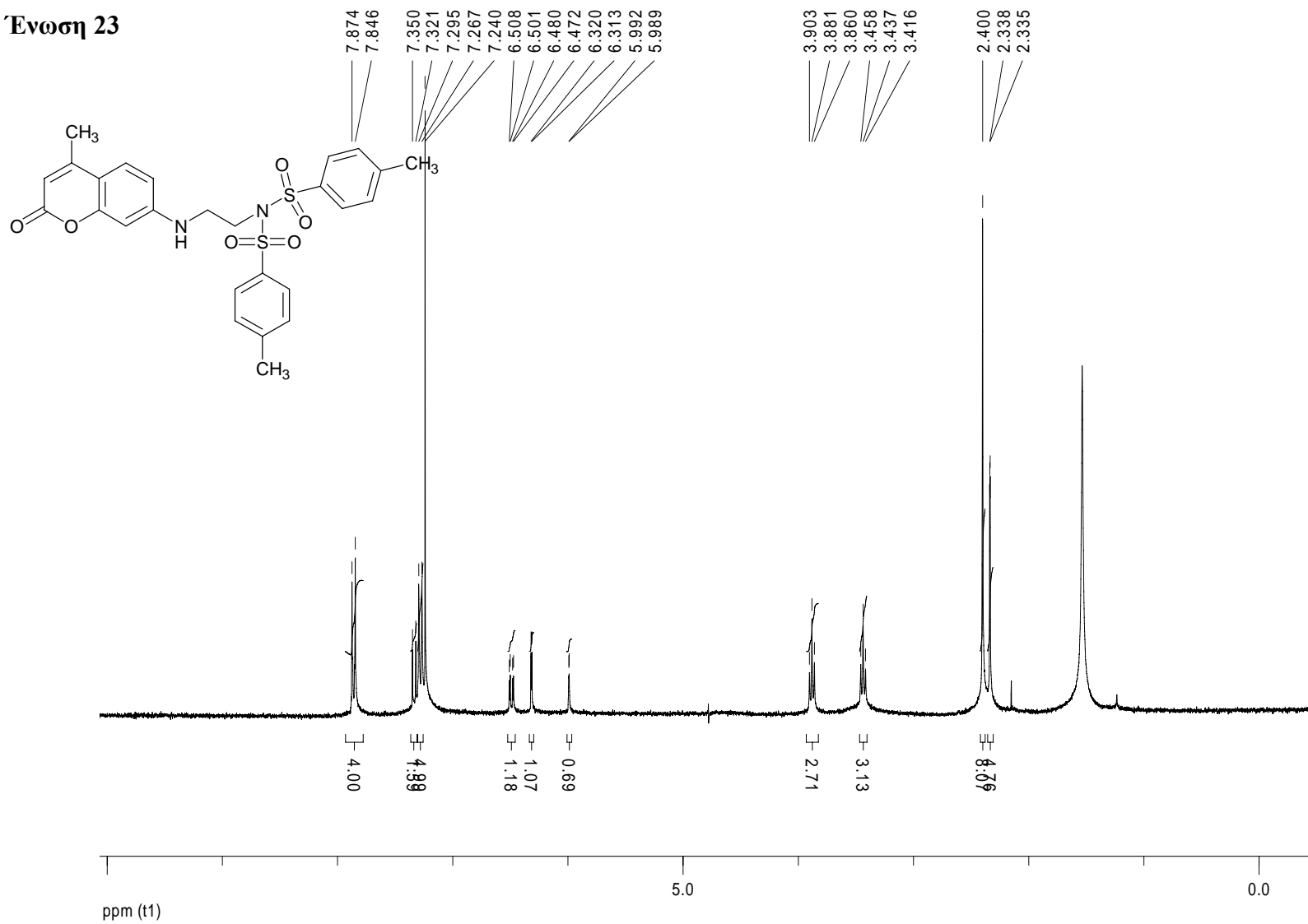
7.377  
7.348  
7.240  
6.548  
6.541  
6.520  
6.512  
6.466  
6.459  
5.994  
3.580  
3.563  
3.544  
3.401  
3.382  
3.364  
2.331



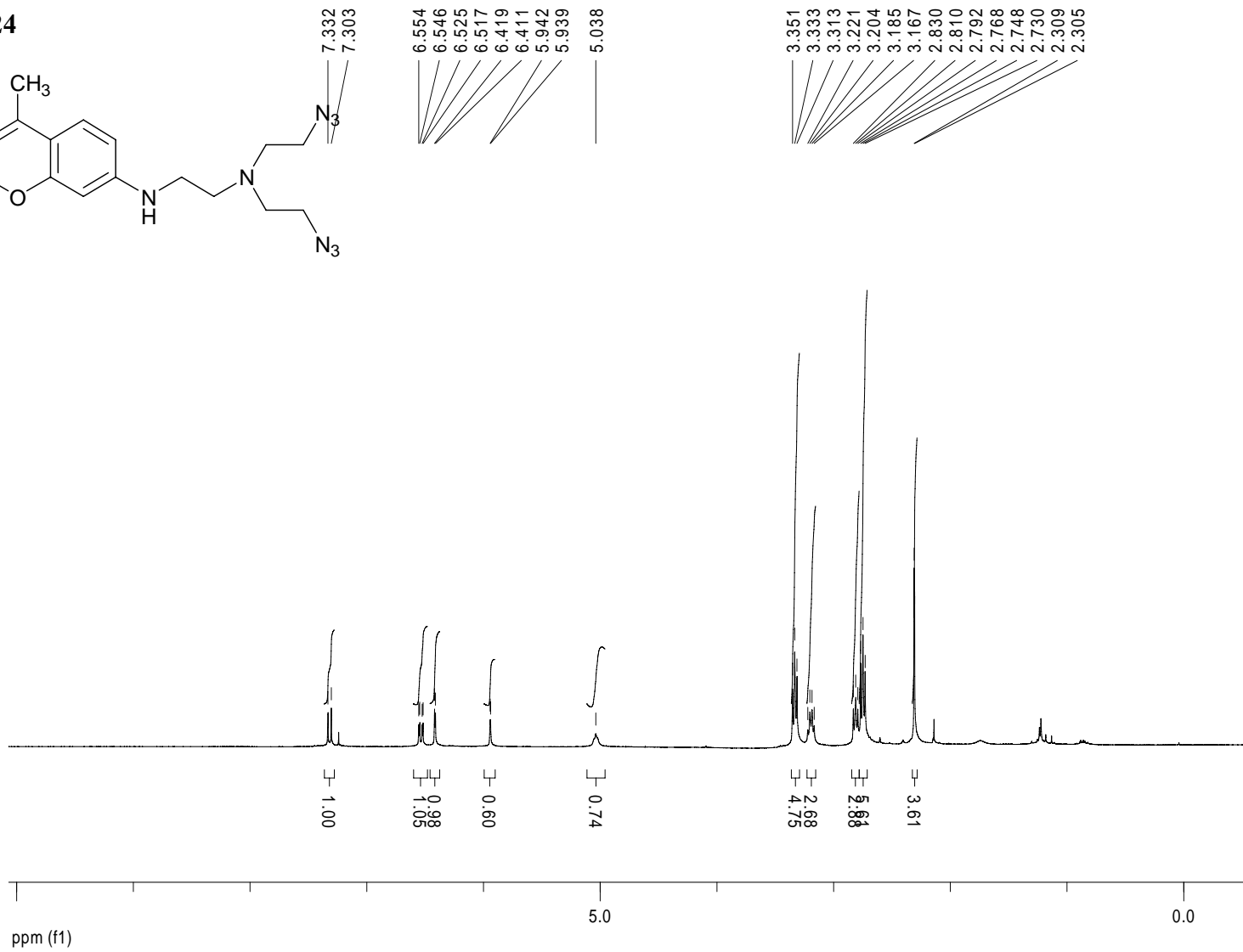
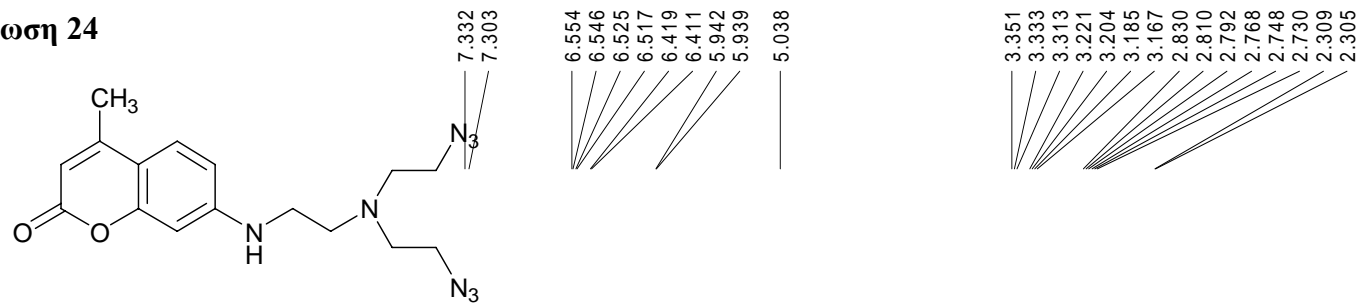
Ένωση 22



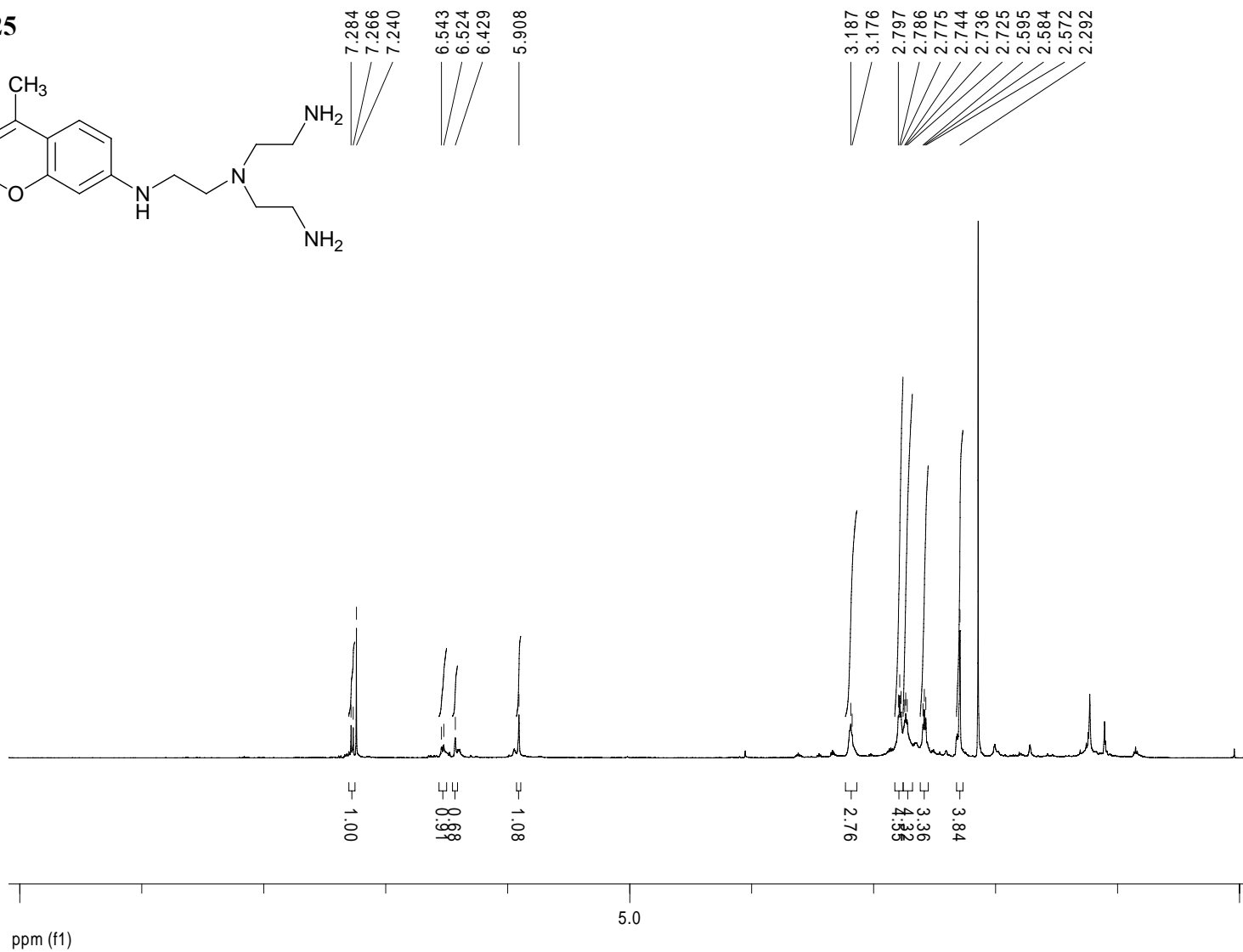
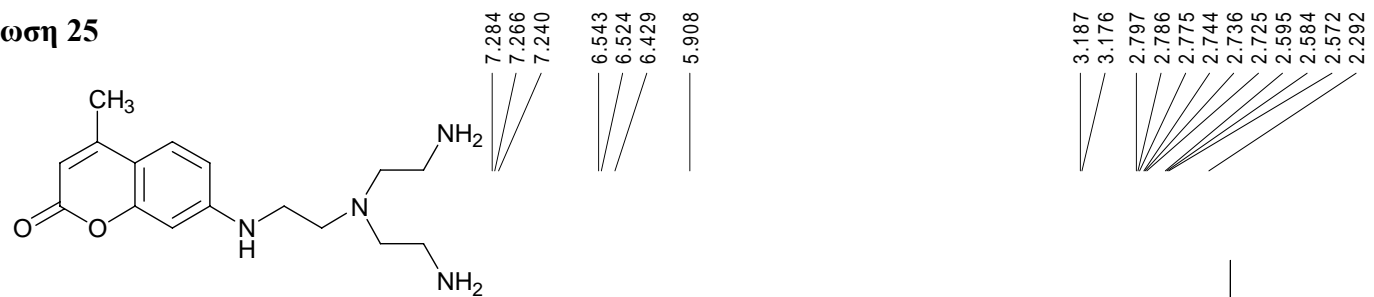
# Ένωση 23



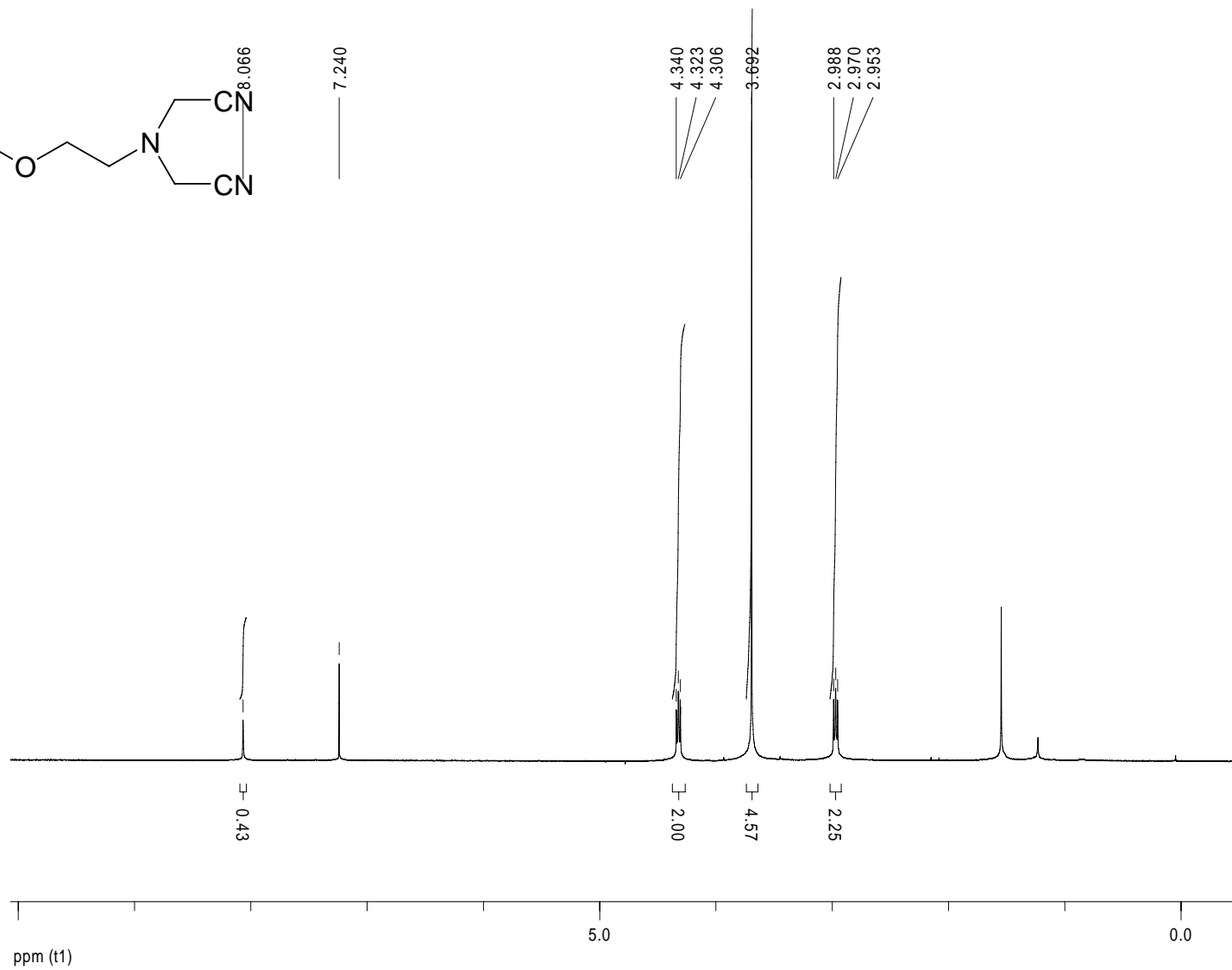
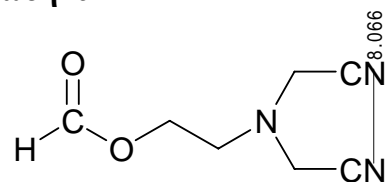
# Ένωση 24



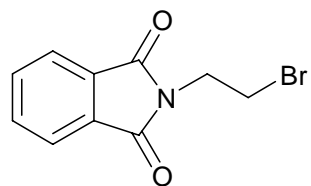
Ένωση 25



Ένωση 26

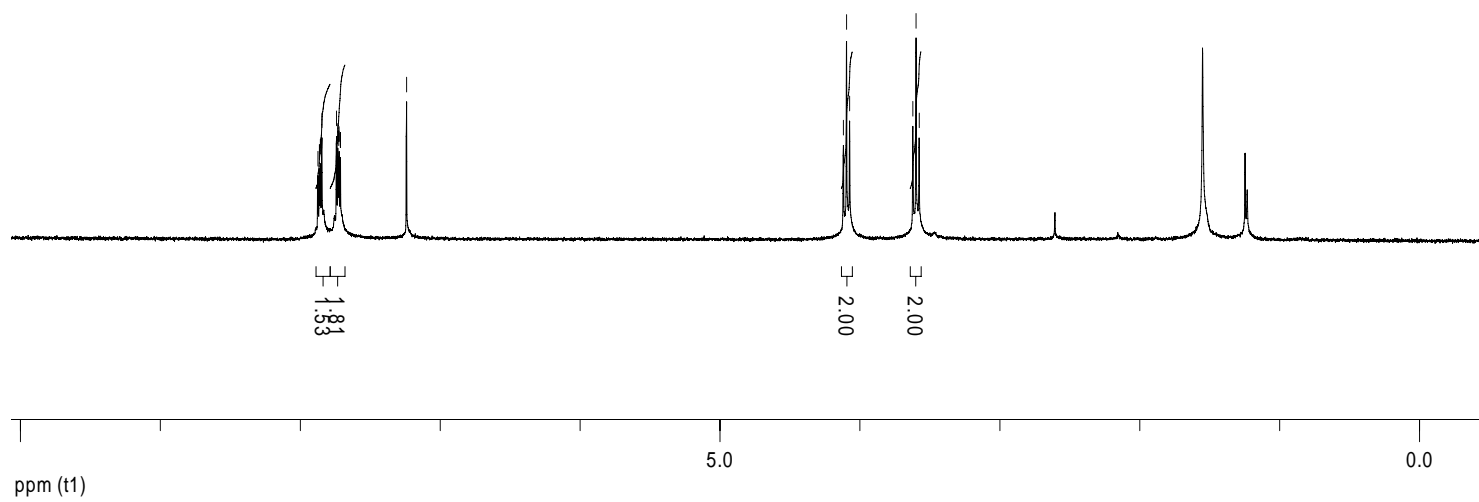


Ένωση 27



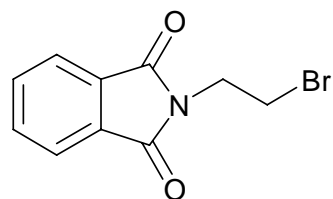
7.874  
7.863  
7.856  
7.845  
7.740  
7.731  
7.724  
7.722  
7.713  
7.712  
7.240

4.118  
4.095  
4.073  
3.621  
3.599  
3.576



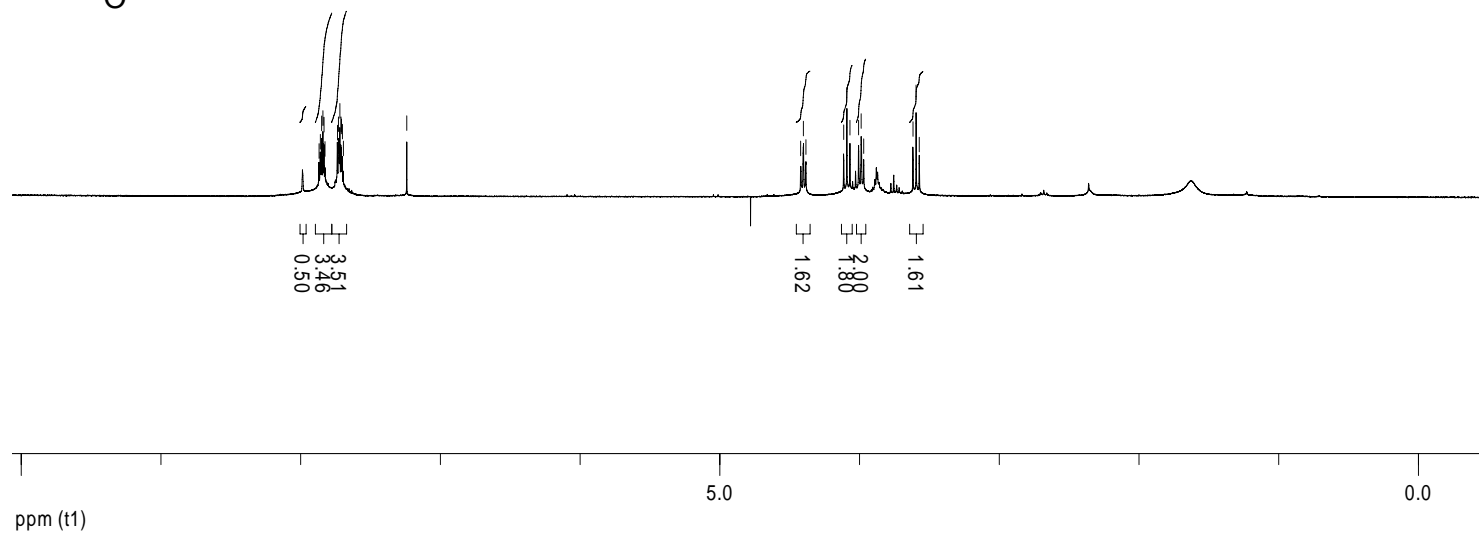
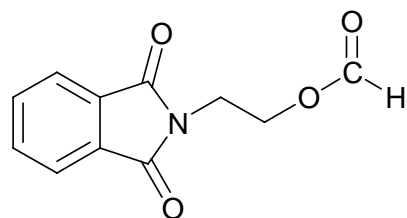


Ένωση 27 και 28



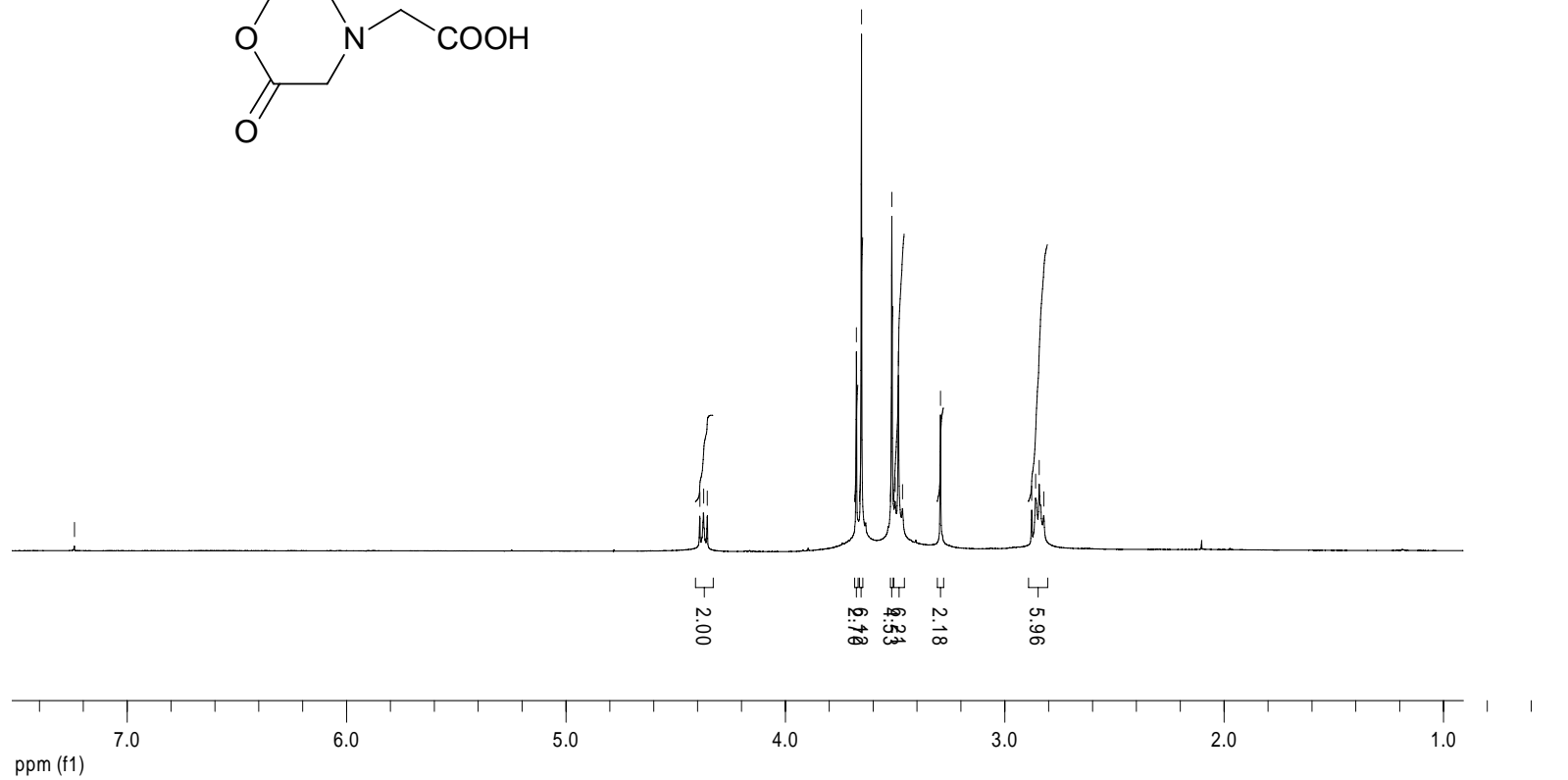
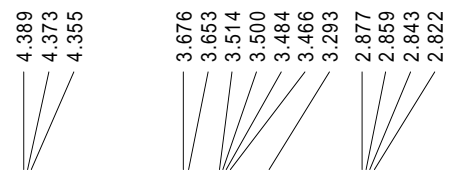
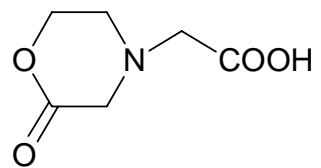
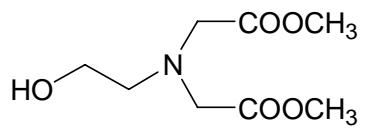
7.869  
7.859  
7.850  
7.841  
7.832  
7.825  
7.737  
7.729  
7.719  
7.712  
7.709  
7.701  
7.694  
7.240

4.421  
4.401  
4.383  
4.113  
4.090  
4.068  
4.006  
3.988  
3.970  
3.617  
3.595  
3.572



Ένωση 29 και 30

7.240



Ένωση 31

