

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppiseaduste valdkond

Keemia Instituut

Orgaanilise keemia õppetool

**Keskkonnatundlike fluorestseeruvate aminohapete sünteesi
optimeerimine**

Kerli Tali

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja Anton Mastitski, PhD

Tartu 2022

Infoleht

Keskkonnatundlike fluorestseeruvate aminohapete sünteesi optimeerimine

Töö eesmärk oli optimeerida kahe keskkonnatundliku fluorestseeruva aminohappe sünteesiradu, mis sisaldavad 6-N,N-dimetüülamino-2,3-naftalimiidi ja 4-dimetüülaminofthalimiidi fluorestseeruvaid fragmente. Nende fluorestseeruvate aminohapete fluorestsentsi intensiivsus polaarses ja mittepolaarses solvendis erineb >1000 korda. See väärtus on palju suurem kui praegu kommertsiaalselt saadaolevatel keskkonnatundlikel fluorestseeruvatel aminohapetel, seega on mainitud ainetel väga suur potentsiaal peptiidide interaktsioonide uurimises kasutamiseks. Nende aminohapete kirjanduslikud sünteesirajad koosnevad mitmest erinevast etapist ja neid optimeeriti selle töö käigus.

Märksõnad: fluorestseeruvad aminohapped, keskkonnatundlikud fluorofoorid, orgaaniline süntees

P390 – orgaaniline keemia

Abstract

Optimization of the synthesis routes of organic environment-sensitive fluorescent amino acids

The aim of this study was to optimize the synthesis routes of two environment-sensitive fluorescent amino acids bearing 6-N,N-dimethylamino-2,3-naphthalimide and 4-dimethylaminophthalimide moieties. These fluororescent amino acids exhibit more than a 1000-fold increase in fluorescence intensity when moving from polar to non-polar media, which is lot larger difference than the one the older environment-sensitive fluororescent amino acids exhibit. This means that these fluororescent amino acids have a great potential to be used when studying peptide-protein interactions, however they are not commercially available. The literature synthesis routes for these compounds consist of multiple steps and were optimized during this work.

Keywords: fluorescent amino acids, environment-sensitive fluorophores, organic synthesis

P390 – organic chemistry

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1. Fluorestsentsi põhimõte	8
1.2. Fluorestsentsi keskkonnast sõltuvus.....	9
1.3. Fluorestsents-sensorite omadused ja rakendused.....	10
1.4. Fluorestseeruvad aminohapped	10
1.4.1. Omadused	10
1.4.2. Sünteesirajad	13
1.4.2.1. 4-DAPA süntees.....	13
1.4.2.2. 6-DMN süntees	14
1.4.2.3. 4-DMNA süntees	16
2. Reagentide, aparatuuri ja meetodite kirjeldus.....	18
2.1. Aparatuur ja töövahendid	18
2.2. Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused.....	18
3. Eksperimentaalne osa.....	20
3.1. 4-DAPA sünteesi optimeerimine	20
3.1.1. 4-N,N-dimetüülaminoftaalhappe süntees	20
3.1.2. 4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdriidi süntees.....	20
3.1.3. Fmoc-Dap(Boc)-OH süntees	21
3.1.4. Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl-i süntees.....	21
3.1.5. Fmoc-Dap-OAllyl-i süntees.....	22
3.1.6. Fmoc-DAPA-OAllyl-i süntees.....	23
3.1.7. 4-DAPA süntees.....	23
3.2. 6-DMNA sünteesi optimeerimine	24
4. Tulemused ja arutelu.....	26
4.1. 4-DAPA süntees.....	26
4.2. 6-DMN sünteesi optimeerimine	32
Kokkuvõte.....	36
Summary	37
Kasutatud kirjandus	38
Lisad.....	42

Kasutatud lühendid

4-DMAP	4-dimetüülaminoftalimiid
4-DAPA	4-dimetüülaminoftalimidoalaniin
4-DMN	4-N,N-dimetüülamino-1,8-naftalimiid
4-DMNA	4-N,N-dimetüülamino-1,8-naftalimidoalaniin
6-DMN	6-N,N-dimetüülamino-2,3-naftalimiid
6-DMNA	6-N,N-dimetüülamino-2,3-naftalimidoalaniin
Ac	atsüül
ACN	atsetonitriil
Allyl	allüül
Ar	arüül
Arg	arginiin
BADAN	6-bromoatsetüül-2-dimetüülaminonaftaleen
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül
BPO	bensoüülperoksiid
Dap-OH	2,3-diaminopropioonhape
Fmoc-DAPA-OAllyl	allüül-N- α -Fmoc-N- β -(4-N,N-dimetüülaminoftalimidoüül)-L-diaminopropionaat
DCM	diklormetaan
DIPEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-dimetüülformamiid

DMSO	dimetüülsulfoksiid
DnsA	dansüülalaniin
EtOAc	etüülatsetaat
Fmoc	fluorenüülmetüüloksükarbonüül
Gly	glütsiin
Hex	heksaan
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
<i>J</i>	lõhenemiskonstant
Kt	keemistemperatuur
Lys	lüsiin
Me	metüül
MS	massispektromeetria
NBS	N-bromosuktsiinimiid
n_D^{20}	murdumisnäitaja temperatuuril 20 °C
<i>o</i>	orto-
Ph	fenüül
St	sulamistemperatuur
Su	suktsiinimiid
TBS	tris(hüdrometüül)aminometaaniga puhverdatud NaCl lahus
TFA	2,2,2-trifluoroetaanhape

TMR	tuumamagnetresonantsspektroskoopia
TLC	planaarkromatograafia (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
tt	toatemperatuur

Sissejuhatus

Solvatokroomsed fluorestsentsmarkerid on laialt levinud erinevate biokeemiliste protsesside, sealhulgas ka valguliste retseptorite ja peptiidide interaktsioonide uurimises. Ühed klassikalisemad selleks kasutatud värvid on tiolreaktiivsed 6-akrüloüül-2-(dimetüülamino)naftaleen (akrüloodaan) ja 6-bromoatsetüül-2-dimetüülaminonaftaleen (BADAN), mis omavad nõrka fluorestsentsi intensiivsuse muutust ja nende kasutamine väga madalate kontsentratsioonide juures on raskendatud.

Viimasel ajal on arendatud rida fluorestsentsmarkeriga märgistatud aminohappeid, mille hulka kuuluvad 4-DAPA, 6-DMNA ja 4-DMNA. Antud aminohapete fluorestsentsi intensiivsuse kasv polaarset solvendist mittepolaarsesse solventi liikudes on rohkem kui 1000-kordne, mis on palju suurem võrreldes varasemast ajast tuntud fluorestseeruvate aminohapetega, millel vastav parameeter on kuni 100. Seetõttu on nende ainete potentsiaal peptiidide seondumise uurimiseks väga suur.

Vaatamata väga headele fluorestsentsi näitajatele pole eelmainitud aminohapped kommertsiaalselt kättesaadavad ja nende kirjanduslikke sünteesiradu on kirjeldatud vaid üksikutes artiklites. Kirjeldatud sünteesietapid on kohati keerulised, nende kirjeldus on puudulik, kasutatud reagentide kogused on sageli ebaratsionaalselt suured või väga olulised detailid on jäetud kirjeldamata. See kõik muudab sünteesid väga raskesti korratavateks. Lisaks on kirjeldatud radades sünteesietapid, mida on potentsiaalselt võimalik vahele jätta.

Mainitud probleemide tõttu vajavad 4-DAPA ja 6-DMNA sünteesirajad põhjalikku optimeerimist, pidades silmas reagentide liia (eriti Pd katalüsaatorite) vähendamist, korrektsete tingimuste otsimist ja ka sünteesiradade mõningat lühendamist.

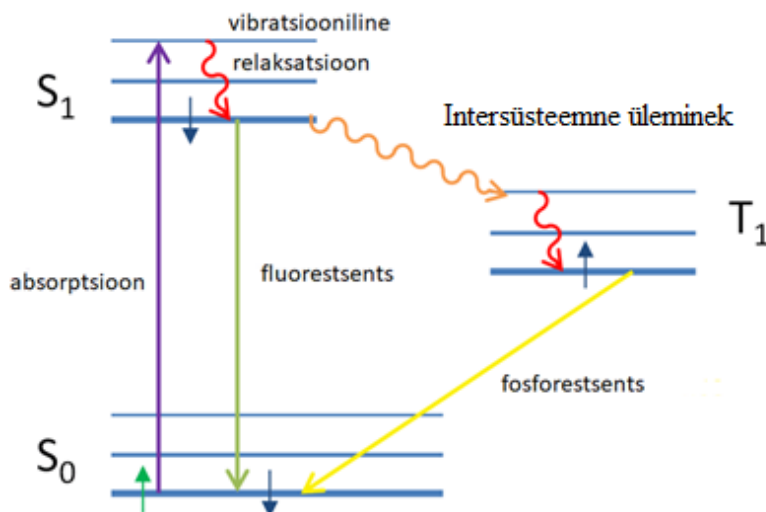
4-DAPA ja 6-DMNA sünteesiga seotud probleemide osaline lahendamine on antud töö eesmärgiks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Fluorestsentsi põhimõte

Fluorestsentskiirgus tekib, kui molekul absorbeerib footoni ja läheb ergastatud olekusse. Tagasi põhiolekusse minnes vabastab molekul footoni, mille lainepikkus on suurem kui absorbeeritud footonil. Lisaks fluorestsentskiirgusele võib molekul absorbeeritud kiirguse vabastada ka fosforestsentskiirgusena või soojusena. [1] Jablonski diagramm, mis kirjeldab erinevaid protsesse, mis võivad valguse toimel ergastatud molekuliga juhtuda, on toodud **skeemil 1**. [2] Kiirgust absorbeerides läheb molekul esmalt singletsesse ergastatud olekusse (S_1). Singletsest ergastatud olekust tagasi põhiolekusse (S_0) relakseerumist kiirguse näol nimetatakse fluorestsentsiks. Singletses ergastunud olekus elektron võib ka oma spinni muuta ja minna üle triplettesse olekusse (T_1) ning tripletsest olekust emiteeritud kiirgust nimetatakse fosforestsentsiks. Molekul võib nii tripletsest kui ka singletsest olekust põhiolekusse tagasi minna, vabastades absorbeeritud energia soojusena. [1]

Emiteeritud fluorestsentskiirguse ja absorbeeritud kiirguse suhet nimetatakse fluorestsentsi kvantsaagiseks (Φ_F). [1]

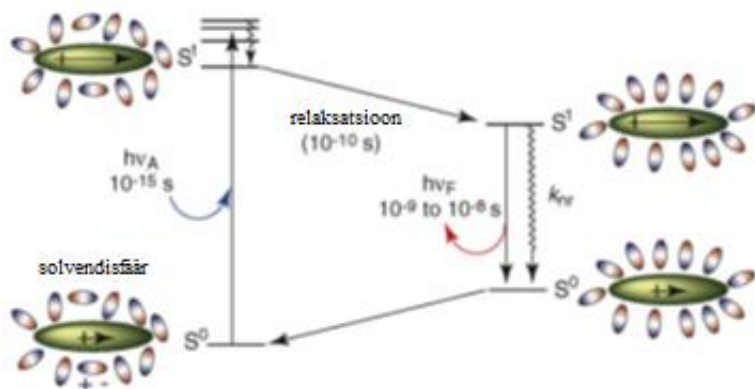


Skeem 1. Jablonski diagramm. [2]

Fluorestsentsi nähtus sõltub ka märgatavat keskkonnast (polaarne/mittepolaarne keskkond, solvatatsioon jne). Selle nähtuse teket ja solvatokroomsuse jaoks vajalikke molekuli struktuuri-elemente vaatleme peatükis 1.2.

1.2. Fluorestsentsi keskkonnast sõltuvus

Skeemil 2 on toodud fluorestsentsi emissiooni lainepikkuse muutust iseloomustav skeem.



Skeem 2. Solvatokroomset nihet iseloomustav skeem. [3]

Algselt on fluorestseeruv molekul solvendis olles põhiolekus (S^0 vasakul) ning selle dipoolmomendi suurus ja suund on näidatud musta noolega. Seejärel absorbeerib molekul footoni energiaga $h\nu_A$ ja jõuab singletsesse ergastatud olekusse (S^1 vasakul). Ergastatud olekus on molekuli dipoolmoment võrreldes põhiolekuga märgatavalt erinev. Selle tõttu toimub solvendi relaksatsioon, st solvendi molekulid reorganiseeruvad, et vähendada ergastatud oleku energiat (S^1 paremal). Kuna solvendimolekulid on nüüd organiseeritud teisiti võrreldes algse põhiolekuga, siis kui molekul jõuab põhiolekusse tagasi, on põhioleku energia kõrgem võrreldes algse põhioleku energiaga (S^0 paremal). Seega on emiteeritud footoni energia väiksem võrreldes absorbeeritud footoni energiaga ja emiteeritud lainepikkus seega absorbeeritud lainepikkusest pikem. Mida polaarsem on solvent, seda suurem on absorbeeritud ja emiteeritud lainepikkuste vahe. Keskkonnatundlikele fluorofooridele on veel iseloomulik, et polaarsetes solventides, kus põhioleku ja singletse ergastatud oleku vahe on väike, suureneb sisekonversiooni osakaal ja selle tulemusena fluorestsentsi kvantsaagis väheneb. [3]

Selleks, et molekuli fluorestsentsomadused oleksid keskkonnatundlikud, peab molekulis põhioleku ja ergastatud oleku dipoolmoment oluliselt erinev. Selleks peab molekul

sisaldama nii elektrondonoorset kui ka elektronaktseptoorset rühma ning ergastatud olekusse minnes vastavalt elektrondonoorne rühm annab elektroni ära ja elektronaktseptoorne rühm võtab selle vastu, mis muudab molekuli dipoolmomenti. Elektronaktseptoorseks rühmaks on fluorestsentsvärvides tavaliselt kas C=O või S=O ja elektrondonoorseks rühmaks amino- või N,N-dimetüülaminorühm. Mida suurem on distants doonori ja aktseptori vahel, seda suurem peaks olema fluorofoori keskkonnatundlikkus, kui molekulid on peale selle identsed. [4] Fluorestsentsmarkerid sisaldavad tihti aromaatsset süsteemi, kuigi võimalik on ka alifaatne konjugeeritud süsteem. [5]

1.3. Fluorestsents-sensorite omadused ja rakendused

Optilisi tuvastusmeetodeid on kasutatud paljudes erinevates valdkondades tänu nende heale tundlikkusele ja selektiivsusele. Optiliste tuvastusmeetodite hulka kuuluvad absorptsioon, difraktsioon, reflektatsioon, hajumine ja kemoluminestsents. Fluorestsents on kemoluminestsentsi üks alaliike. Fluorestsentsil põhinevaid sensoreid peetakse võrreldes teiste sensoritega spetsiifilisemaks ja täpsemaks. [6]

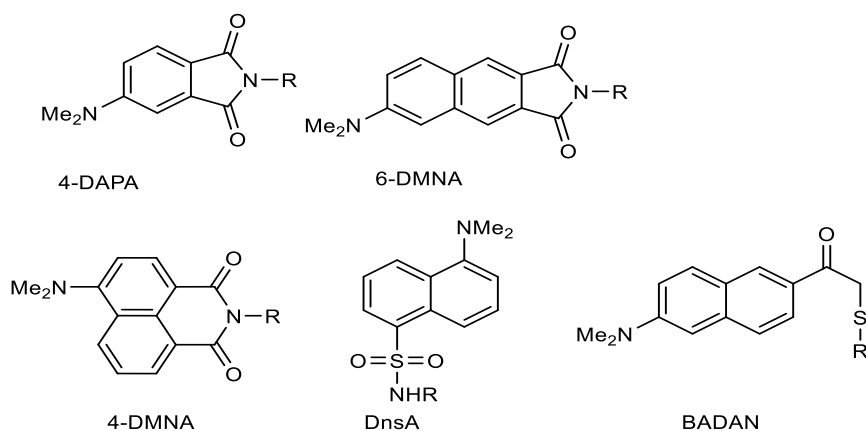
Esimesi fluorestsentsil põhinevaid kemosensoreid kasutati metallikatioonide detekteerimiseks, aga alates 1980. aastatest on lisandunud hulgaliselt rakendusi biokeemias. [7–10] Viimase rakenduse alla kuulub ka valkude ja peptiidide retseptoriga seostumise uurimine. Selleks on kasutatud fluorestseeruvaid valke, kuid kuna oluline on säilitada peptiidi esialgne struktuur, on väga mõistlik märgistada mõnda teatud aminohapet fluorestsentsmarkeriga, mille suurus on looduslike aminohapete omaga väga sarnane ja mis mõjutab peptiidi struktuuri palju vähem. [11,12] Klassikaliselt on selleks kasutatud tsüsteiini tioolsete rühmade suhtes reaktiivset akrüülodaani või BADAN-i. [13] Lisaks on solvatokroomsed omadused ka üksikutel looduslikel aminohapetel ning arendatud on ka tehislikke fluorestseeruvaid aminohappeid.

1.4. Fluorestseeruvad aminohapped

1.4.1. Omadused

Aminohappel trüptofaan on keskkonna polaarsustundlikud fluorestseeruvad omadused, kuid trüptofaani kasutamise negatiivseks pooleks on, et selle ergastamiseks läheb vaja väga madalat lainepikkust ja trüptofaan on looduslikes struktuurides laialt levinud. [3,14] Kirjanduses on kirjeldatud väga mitmeid erinevaid tehislikke keskkonnatundlikke

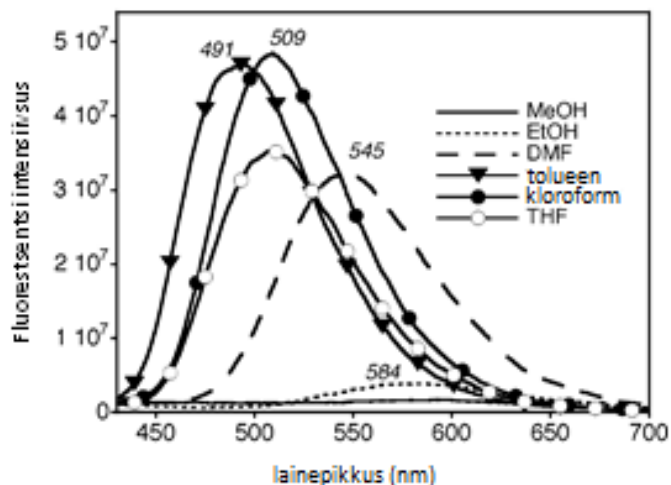
fluorestseeruvaid aminohappeid, millest osade solvatokroomsed fragmendid on toodud **skeemil 3**.



Skeem 3. Erinevate orgaaniliste keskkonnatundlike fluorofooride struktuurid.

Nagu struktuuridest näha, sisaldavad need kõik kas N,N-dimetüül- või aminorühma ja ühte või kahte karbonüül- või sulfoonamiidset rühma, mis viib dipoolmomendi muutuseni footoni absorbeerimisel.

Vees ja orgaanilistes polaarsetes solventides on toodud keskkonnatundlike fluorestseeruvate aminohapete fluorestsentsi kvantsaagis väga madal, aga mittepolaarsetes solventides oluliselt kõrgem. Fluorestsentsi kvantsaagis on nende molekulide puhul kõrge ka siis, kui need polaarsetes solvendis olles seonduvad mittepolaarsete kohtadega valkudes. **Skeemil 4** on toodud ühe keskkonnatundlikku fluorofoorset fragmenti sisaldava aine, 6-DMN-GlyOMe, fluorestsentsi emissiooni intensiivsus erinevates solventides, kust on näha, et metanoolis ei fluorestseeru molekul peaaegu üldse ja kõige kõrgem fluorestsentsi intensiivsus testitud solventidest on molekulil kloroformis, kuid palju ei erine ka mõõdetud intensiivsus toluenis. [15]

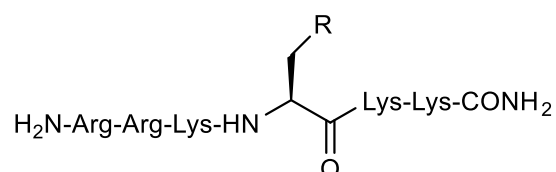


Skeem 4. 6-DMN-GlyOMe fluorestsentsi intensiivsus erineva polaarsusega solventides. [15]

Tabelis 1 on toodud erinevaid fluorestseeruvaid fragmente sisaldavate peptiidide fluorestsentsomadused erineva polaarsusega solventides. Peptiidid saadi, kui kõik **skeemil 3** toodud fluorofoorid seoti **skeemil 5** toodud peptiidiga, kus R märgib seondunud fluorofoori.

Tabel 1. Erinevaid fluorestseeruvaid aminohappeid sisaldavate peptiidide omadused [12]

Seondunud fluorofoor	Fluorestsentsi intensiivsuste vahe (kordades)	Solvatokroomne nihe (TBS vs 1,4-dioksaan)
4-DMAP	4500	83 nm
6-DMN	1400	105 nm
4-DMN	1200	42 nm
dansüül	66	65 nm
BADAN	70	93 nm



Skeem 5. Peptiid, millega seoti uuritavad keskkonnatundlikud fluorofoorid.

Tabelist 1 on näha, et kuigi solvatokroomse nihke suurus on kõikide aminohapete korral vähemalt 42 nm, siis varem sünteesitud fluorestseeruvaid aminohappeid BADAN või DnsA sisaldavatel peptiididel on oluliselt väiksemad erinevused fluorestsentsi intensiivsuste suurenemises polaarsest keskkonnast mittepolaarsesse keskkonda liikumisel (66-70 korda) kui uuemaid fluorestseeruvaid aminohappeid 4-DAPA, 6-DMNA või 4-DMNA sisaldavatel peptiididel (>1200 korda). Fluorestsentsi intensiivsuse erinevus on kõige suurem 4-DAPA-t

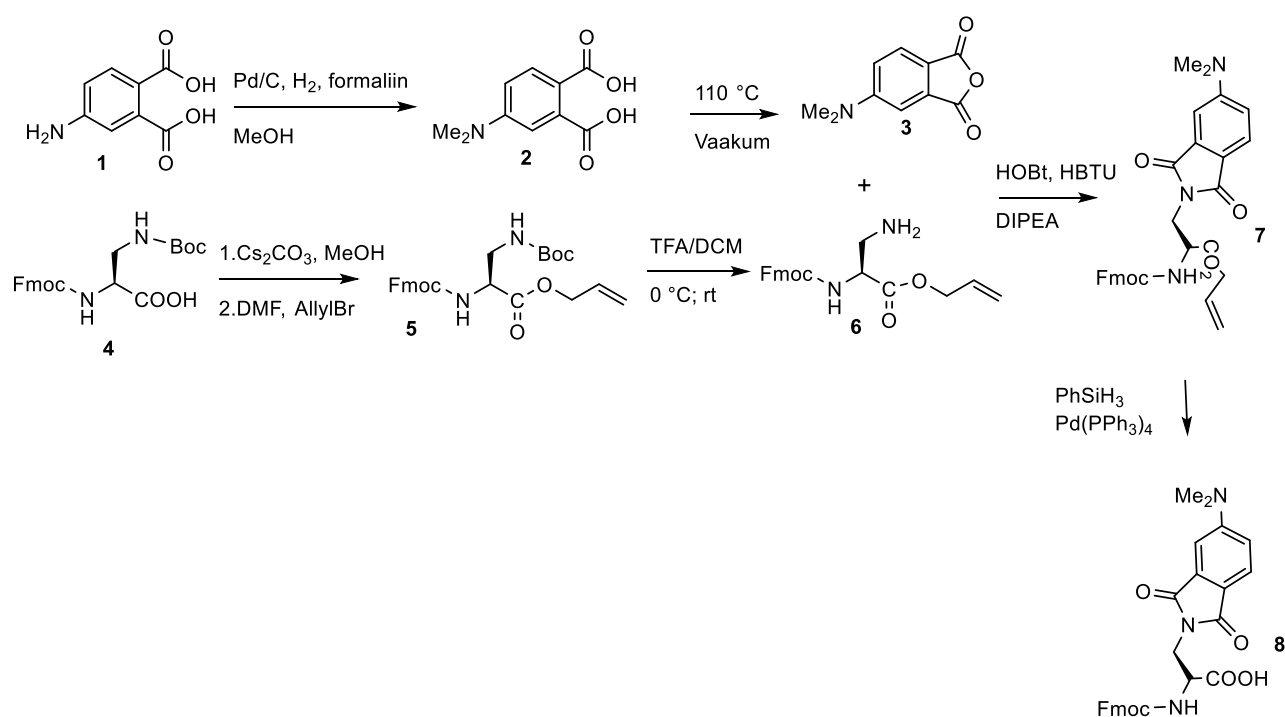
sisaldava peptiidi jaoks, mille fluorestsentsi intensiivsus kasvab polaarsest solvendist mittepolaaressse solvendi minnes 4500 korda.

Saadud informatsiooni põhjal saab öelda, et 4-DAPA, 6-DMNA ja 4-DMNA omavad praktiliste rakenduste jaoks kõige väärtuslikumaid parameetreid. Järgnevalt on toodud ülevaade 4-DAPA, 6-DMNA ja 4-DMNA sünteesist, sest kuigi nendel aminohapetel on suur potentsiaal fluorestsentsil põhinevates sensorites kasutamiseks, ei ole need veel komertsiaalselt kättesaadavad.

1.4.2. Sünteesirajad

1.4.2.1. 4-DAPA süntees

4-DAPA sünteesi jaoks on kirjeldatud ühte sünteesirada, mis on toodud **skeemil 6**.



Skeem 6. 4-DAPA sünteesirada.

Lähteaineks on 4-aminoftaalhape (**aine 1 skeemil 6**), mille redutseerival alküülimisel kasutatakse formaldehüüdi vesilahust 10%-se Pd/C katalüsaatori juuresolekul (40 massi% 4-aminoftaalhape massist) vesiniku atmosfääris 2 bar rõhu all ja reaktsioonis saavutatakse täielik konversioon kolme tunniga. [16] Kuna Pd/C katalüsaatori puhul on tegemist suhteliselt kalliga ainega, siis kui tahta sünteesi läbi viia suuremal skaalal, on vajalik katalüsaatori koguse vähendamine. Aminorühma redutseerivat alküülimist saab läbi viia veel näiteks Na(CN)BH₃ ja formaldehüüdi abil pH 6 juures. [17]

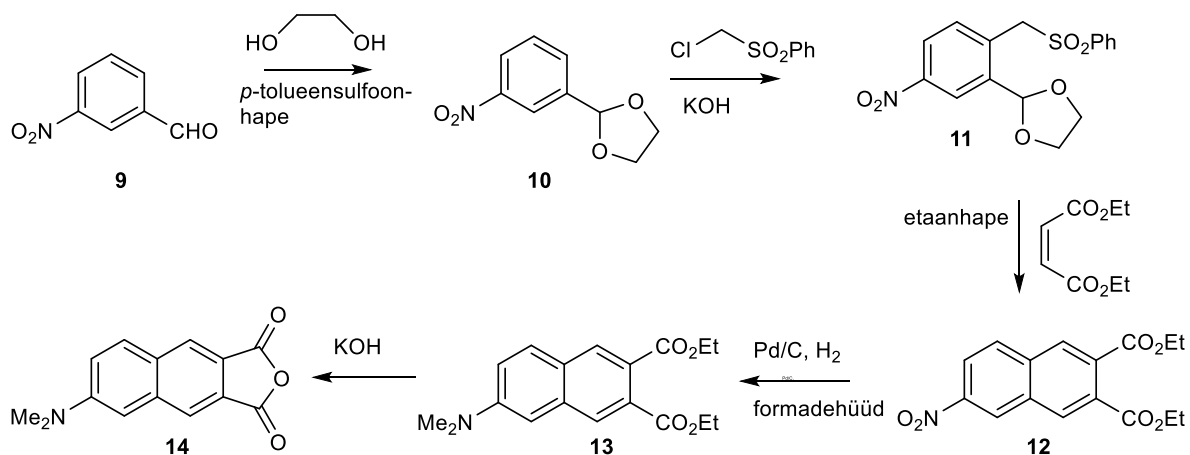
4-DMAP anhüidriid (**aine 3**) saadakse 4-N,N-dimetüülaminoftaalhappes vaakumis 110 °C juures kuumutades, kuid protseduur ei täpsustanud, millist rõhku transformatsiooniks vaja on. [16] Alternatiivne viis aine saamiseks on segamine atseetanhüidriidi liias 50 °C juures. [18]

Sünteesiraja teise haru eesmärgiks on saada Fmoc-Dap-OAllyl (**aine 6**), mida saaks siduda fluorofooriga (**ainega 3**). Alloc-kaitstud N- α -Fmoc-diaminohappe saamiseks võetakse komertsiaalselt saadaolev Fmoc-Dap(Boc)-OH, mis Cs_2CO_3 juuresolekul reageerib allüülbromiidiga, andes **aine 5**, mis vajab kolonn-kromatograafilist puhastamist. Järgmises etapis eemaldatakse TFA abil Boc-kaitserühm ning seejärel toimub **ainete 6 ja 3** omavaheline seondumine aktivaatorite HOBt ja HBTU juuresolekul aluselises keskkonnas, andes vajaliku aine 63% saagisega. [16] Teoreetiliselt peaks olema võimalik saada **aine 7** ilma anhüidriidi tekketa otse **aine 2 ja 6** vahelises reaktsioonis kahekordse aktivaatorite hulga kasutamisel. See muudatus võimaldaks sünteesi ühe etapi võrra lühendada.

Viimaseks etapiks on allüülrühma eemaldamine, et kaitsmata karboksüülhappe rühma saaks siduda aminohapete järjestusse. Selleks kasutatakse 25 ekvivalenti fenüülsilaani katalüütilise koguse $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ juuresolekul kuivades tingimustes. Kuna fenüülsilaani näol on tegemist üsna kalli reagentiga, siis võiks saada sünteesi muuta odavamaks väiksema koguse fenüülsilaani kasutamisega. Sünteesiraja summaarne saagis on 42%. [16]

1.4.2.2. 6-DMN süntees

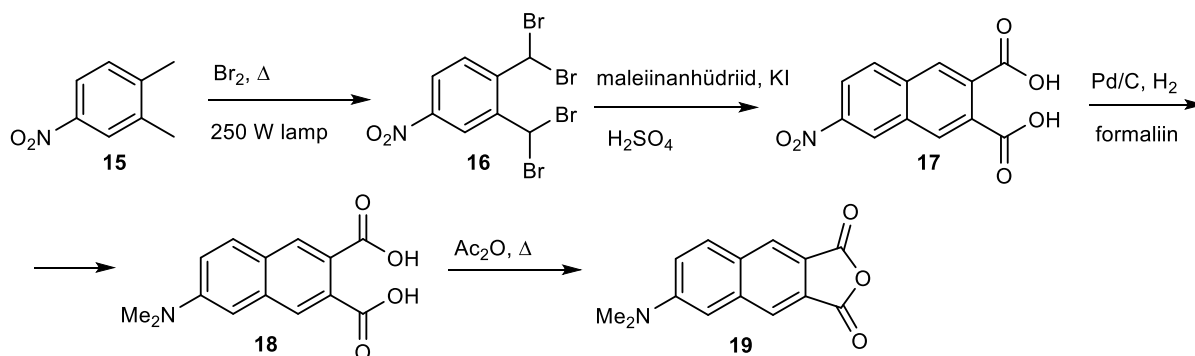
6-DMN anhüidriidi jaoks on kirjeldatud kahte erinevat sünteesirada, millest esimesel on 5 etappi ja teisel 3 etappi. [18,19] Esimesena kirjeldatud 6-DMN sünteesiraja skeem on näidatud **skeemil 7**.



Skeem 7. 6-DMN sünteesirada.

Lähteaineks on 3-nitrobensaldehüüd (**aine 9 skeemil 7**) ja esimeseks etapiks on aldehüüdrühma kaitsmine. Teises etapis toimub nukleofiilne asendus, mis annab 2- ja 4-kaitstud produktid 1:1 vahekorras, nii et soovitud produkti (**aine 11**) saagis on 35%. Kolmandas etapis toimub Michaeli liitumine, neljandas etapis redutseeriv amineerimine vesiniku atmosfääris formaldehüüdiga katalüsaatori juuresolekul ja viimases etapis happe tsükliiseerumine anhüüridiks. Sünteesiraja summaarne saagis on vaid 16,5%. [18]

Alternatiivses sünteesirajas (**skeem 8**) algab süntees 4-nitro-*o*-ksüleenist.



Skeem 8. 6-DMN anhüüriidi süntees, alustades bromeerimisest.

Esimeses etapis toimub fotokeemiline bromeerimine 250 W hõõgpirmi valguses, andes **aine 16** 84% saagisega. [19] Süntees on näiliselt lihtne, kuid selle korrektne reprodutseerimine keeruline kasutatava lambi täpsete omaduste puudumise tõttu.

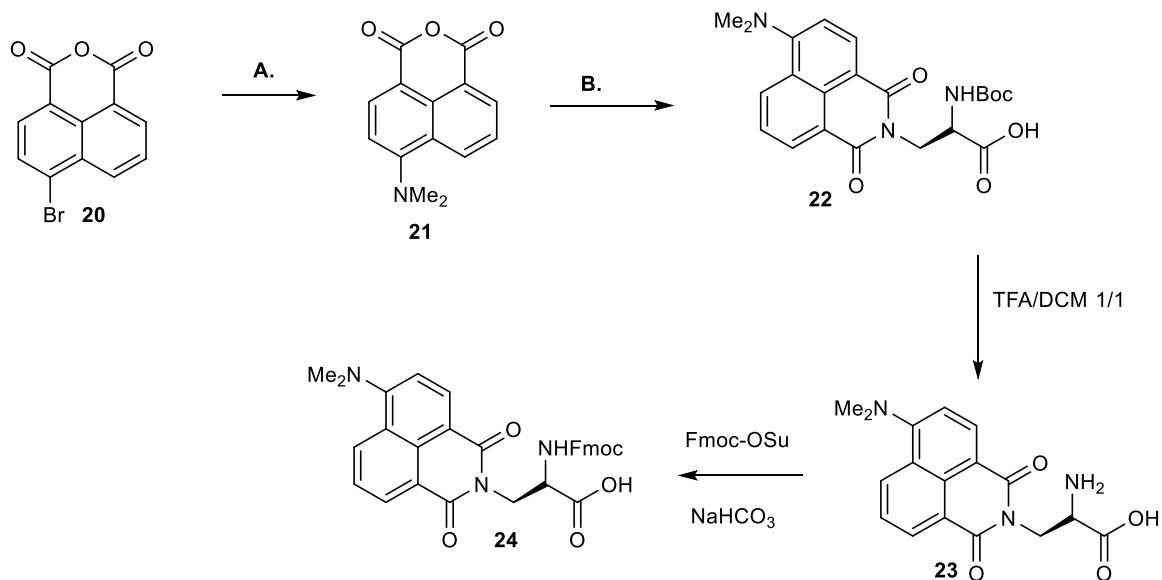
Teises etapis toimub tetrabromeeritud ühendi transformatsioon dihappeks (**aine 17**) ja kolmandas etapis nitrorühma redutseeriv alküülimine **aineks 18**. Viimases etapis toimub

dihappe transformatsioon anhüdriidiks (**aine 19**) atseetanhüdridi liias keetes. Sünteesiraja summaarne saagis on 56%. Kõikides etappides kasutatakse produkti puhastusmeetodina ümberkristallimist ja kolonn-kromatograafilist lahutamist ei ole vaja kasutada. [19] Saadud anhüdridi on võimalik siduda erinevate aminohapetega, nagu näidatud 4-DMAP ja Fmoc-Dap-OAllyl näitel **skeemil 6**.

Kuigi 4-nitro-*o*-ksüleenii bromeerimist ei ole teistes tingimustes kirjeldatud, siis dimetüülenseeni ja selle derivaatide tetrabromeerimise kohta on välja töötatud mitmeid erinevaid tingimusi. Näiteks on reaktsioon läbi viidud NBS-i abil, kasutades katalüsaatorina bensoüülperoksiidi, aga ka NBS-ga fotokeemiliselt hõõglambi abil, kasutades radikaalse initsiaatorina AIBN-i. [20,21] Kasutatud solventidest on kõige tavalisem CCl₄, sest see ei saa reageerida radikaalse broomiga, kuid kasutatakse ka näiteks kloroformi. [22]

1.4.2.3. 4-DMNA süntees

Võrreldes 4-DAPA ja 6-DMNA-ga on 4-DMNA sünteesirada lühem, koosnedes ainult neljast etapist. 4-DMNA jaoks on kirjeldatud ühte sünteesirada (**skeemil 9**), mille lähteaineks on 4-bromo-1,8-naftaleenanhüdriid (**aine 20** **skeemil 9**), mis konverteeritakse 4-N,N-dimetüül-1,8-naftaleenanhüdriidiks (**aine 21**) 3-dimetüülaminopropionitriili juuresolekul.



A. 3-dimetüülaminopropionitriil, 3-metüül-1-butanol, N₂, Δ

B. 3-amino-2-(Boc-amino)-propioonhappe, NaHCO₃, 1,4-dioksaan/vesi 5/1, N₂, Δ

Skeem 9. 4-DMNA sünteesirada.

Seejärel toimub sidumisreaktsioon 3-amino-2-(Boc-amino)-propioonhappega NaHCO₃ juuresolekul. Järgneb Boc-kaitserühma eemaldamine ja Fmoc-kaitserühma sisestamine molekuli. Kogu sünteesiraja summaarne saagis on 46%. [23]

4-DMN anhüdrüidi (**aine 21**) saamiseks on mitmeid erinevaid võimalusi. Sünteesi alternatiivsed lähteained on näiteks 1,8-naftaleenanhüdrüid, 4-nitro-1,8-naftalimiid ja atsenafteen. [24-26]

Tulenevalt kirjeldatud sünteesiradade probleemidest on töö eesmärk 4-DAPA ja 6-DMN sünteesi optimeerimine. 4-DAPA sünteesi puhul on eesmärgiks optimeerida **skeemil 6** toodud sünteesirada, vähendades Pd/C katalüsaatori ja fenüülsilaani kogust ning lühendades sünteesirada. 6-DMN puhul on eesmärgiks **skeemil 8** toodud sünteesi esimeseks etapiks oleva tetrabromeerimise reaktsiooni uurimine erinevatel tingimustel.

2. Reagentide, aparatuuri ja meetodite kirjeldus

2.1. Aparatuur ja töövahendid

- TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merck KGaA.
- TMR spektrid mõõdeti Bruker AC 200P (Spectroscopin AG, Switzerland).
- Ainete kromatograafiliseks lahutamiseks kasutati Sigma-Aldrichi Silica gel high purity grade 70-230.
- Produktide puhtust analüüsiti LCMS-2020 kromatograafil 220 nm, 254 nm ja 440 nm juures. HPLC seade oli varustatud Kinetex C18 kolonniga ning UV-Vis ja massdetektoritega. Proovide elueerimiseks kasutati järgmisi gradiendi programme:

gradient A - komponent B 5% (5 min), 5-99% (5-37 min), toatemperatuuril,

gradient B - komponent B 10% (5 min), 10-99% (5-37 min), toatemperatuuril,

gradient C - komponent B 5% (5 min), 5-99% (5-37 min), 40 °C,

kus komponent A oli 0,1% TFA/Milli-Q H₂O ja komponent B oli 0,1% TFA/ACN.

- Töös kasutati Sigma-Aldrichi, Mercki, Lach-Neri ja Iris Biotechi solvente ja reaktiive ning mõned reaktiivid olid sünteesitud ka meie töögrupi poolt.

2.2. Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused

Tabel 2. Kasutatud reagentide ja solventide füüsikalised omadused [27]

Aine nimetus	Molaarmass (g/mol)	St (°C)	Kt (°C)	Tihedus (g/cm ³)	n _D ²⁰
4-aminoftaalhape	181,15	-	-	-	-
4-nitro- <i>o</i> -ksüleen	151,16	27-30	-	1,139	-
Allüülbromiid	120,98	-119	70-71	1,398	1,469
Atseetanhydriid	102,09	-73	138-140	1,08	1,390
Atsetonitriil	41,05	-45	81-82	0,786	1,344
BPO	242,23	100-105 (laguneb)	-	1,33	-

Aine nimetus	Molaarmass (g/mol)	St (°C)	Kt (°C)	Tihedus (g/cm ³)	n _D ²⁰
Broom	159,81	-7,2	58,8	3,119	-
CDCl ₃	120,38	-64	60,9	1,500	1,444
Cs ₂ CO ₃	325,82	610	-	-	-
DCM	84,93	-97	39,8-40	1,325	1,424
DIPEA	129,24	-50	127	0,742	1,414
DMSO-d ₆	84,17	20,2	-	1,19	-
EtOAc	88,11	-84	76,5-77,5	0,902	1,3720
Fenüülsilaan	108,21	-	120	0,877	-
Fmoc-Dap-OH	326,35	-	-	-	-
Formaldehüüdi vesilahus (36%)	30,03	-	-	1,09	-
Heksaan	86,18	-95	69	0,659	1,375
Klorobenseen	112,56	-45	132	1,106	1,524
MeOH	32,04	-98	64,7	0,791	1,329
Na ₂ SO ₄	142,04	-	884	2,68	-
Pd(PPh ₃) ₄	1155,56	-	-	-	-
TFA	114,02	-15,4	72,4	1,489	1,3
tolueen	92,14	-93	110-111	0,865	1,496

3. Eksperimentaalne osa

3.1. 4-DAPA sünteesi optimeerimine

3.1.1. 4-N,N-dimetüülaminoftaalhappe süntees

Autoklaavi teflonklaasi kaaluti 0,5-3,0 g (1 ekv) 4-aminoftaalhapet, 3,3-6,7% massiprotsenti 11,5% Pd/C katalüsaatorit (4-aminoftaalhappe massi suhtes), formaldehüüdi 36% vesilahust (6,67 ml/1 g 4-aminoftaalhappe kohta, 10,6 ekv), metanooli (33 ml/g 4-aminoftaalhappe kohta). Autoklaav suleti, puhuti vesinikuga läbi ning täideti vesinikuga 2-4 bar rõhuni. Reaktsioonisegu segati kiirusega 700 pöört minutis 23-70 °C juures vesiniku atmosfääris 1-33 tundi. Reaktsioonisegu analüüsiti TLC (proov võeti otse reaktsioonisegust ja lahjendati metanooliga), HPLC ja HPLC-MS abil. Pärast reaktsiooni lõppemist filtriti reaktsioonisegu läbi Celiidi Pd katalüsaatori eemaldamiseks (**NB!** Ei tohi lasta kuivaks!) ja filtrikooki pesti 25-50 ml metanooliga. Saadud filtraat kontsentreeriti rotaatoraurustil ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt saadi kollase tahkisenä (saagised 125-196%, HPLC puhtus 2-98%).

R_f (eluent EtOAc) 0,23; HPLC retentsiooniaeg 19,9 min (gradient A); MS: C₁₀H₁₁NO₄ protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 210, määratud: 210.

Reaktsiooni tulemused erinevatel tingimustel on toodud peatükis **4.1. tabelis 3**.

Optimeeritud tingimused: 3 h, 70 °C, 4 bar H₂ rõhk, 3,3% 11,5%-st Pd/C katalüsaatorit (lähteaine massi suhtes).

3.1.2. 4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdriidi süntees

Ümarkolbi kaaluti 0,5-2,5 g 4-N,N-dimetüülaminoftaalhapet (1 ekv), sellele lisati atseetanhydriidi (50 ekv) ja reaktsioonisegu keedeti püstjahutiga 4 h. Seejärel jahutati reaktsioonisegu toatemperatuurini ja lisati 30-100 ml dietüületrit. Reaktsioonisegu hoiti 0 °C juures (1 h) ja üleöö -20 °C juures. Produkt eraldati vaakumfiltreerimise abil ja pesti 10-20 ml külma dietüületriga. Produkt saadi erkkollase pulbrina, mis fluorestseerus 365 nm lambi valguses (saagis 67-71%).

St 201 °C (kirjanduses 202 °C [28]); ¹H TMR (700 MHz, DMSO-d₆, δ): 3,129 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 7,115 (s, 2H, Ar), 7,775 (s, 1H, Ar); ¹³C TMR (176 MHz, DMSO-d₆, δ): 40,00,

106,68, 114,83, 117,94, 127,25, 134,15, 155,74, 163,45, 164,71; MS: C₁₀H₉NO₃
protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 192, määratud: 192.

¹H ja ¹³C TMR spektrid on vastavalt **lisa 1** ja **lisa 2**.

Reaktsiooni tulemused on toodud peatükis **4.1. tabelis 4**.

3.1.3. Fmoc-Dap(Boc)-OH süntees

Ümarkolbi kaaluti 0,425-0,8 g (1 ekv) Fmoc-Dap-OH, mis lahustati diklorometaanis (20 ml/g Fmoc-Dap-OH kohta) ja kolb puhuti lämmastikuga läbi. Reaktsioonisegusse lisati 2 ekv DIPEA-d ja segati toatemperatuuril, 10 minutit hiljem lisati 1,05 ekv Boc₂O. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril, kuni kogu lähteaine oli solvendis lahustunud (1 h), reaktsiooni kulgemist kontrolliti TLC abil (proovi valmistamine: Eppendorfi tuubi lisati 0,5 ml 0,1 M KHSO₄ vesilahust, 0,3 ml EtOAc ja tilk reaktsioonisegust ning tuubi loksutati). Kui reaktsioonisegus oli TLC järgi toimunud täielik Boc-Dap-OH konversioon, lisati reaktsioonisegule 100 ml 0,1 M KHSO₄ vesilahust ja KHSO₄ kihti pesti diklorometaaniga 4 korda. Ühendatud orgaanilisi faase pesti 30 ml veega, 30 ml NaCl küllastunud vesilahusega ja kuivatati Na₂SO₄-ga. Produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 40 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt saadi valge pulbrina (kvantitatiivne saagis).

R_f (EtOAc/MeOH 5/1) = 0,22; St = 126 °C (kirjanduses 129 °C [29]); ¹H TMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,414 (s, 9H, (C-CH₃)), 3,575 (d, J = 4,6 Hz, 2H, CH₂), 4,211 (t, J = 7 Hz, 1H, CH (Fmoc)), 4,349-4,349 (m, 3H, CH₂ (Fmoc) + CH), 5,187 ja 5,878 (s, 1H, NH), 6,321 (m, 1H, NH), 7,234-7,360 (m, 4H, Ar), 7,566 (d, J = 7 Hz, 2H, Ar), 7,720 (d, J = 7 Hz, 2H, Ar), 9,247 (s, 1 H, COOH); ¹³C TMR (176 MHz, CDCl₃, δ): 27,30, 46,94, 55,28, 67,10, 67,35, 85,08, 119,85, 125,07, 126,97, 127,61, 141,36, 143,52, 146,65, 155,65, 156,61, 157,13, 158,24, 173,16.

¹H ja ¹³C TMR spektrid on vastavalt **lisa 3** ja **lisa 4**.

3.1.4. Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl-i süntees

Ümarkolbi kaaluti 0,425-0,8 g (1 ekv) Fmoc-Dap(Boc)-OH ja see lahustati metanoolis (20 ml/1 g Fmoc-Dap(Boc)-OH). Reaktsioonisegule lisati 1,05 ekv Cs₂CO₃. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril 10 minutit ja seejärel metanool kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 24 °C). Reaktsioonisegu lahustati DMF-s (5 ml/1 g Fmoc-Dap(Boc)-

OH). 3,15 ekv allüülbromiidi lahustati 2 ml-s DMF-s ja lahus lisati reaktsioonisegusse. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril ja jälgiti TLC abil (proovi valmistamine: Eppendorfi tuubi lisati 0,5 ml 0,1 M KHSO₄ vesilahust, 0,3 ml EtOAc ja tilk reaktsioonisegust ning tuubi loksutati), kuni oli toimunud täielik Fmoc-Dap(Boc)-OH konversioon (1 h). Reaktsioonisegule lisati 100 ml NaHCO₃ küllastunud vesilahust. NaHCO₃ kihti pesti diklorometaaniga 4 korda. Ühendatud orgaanilisi faase pesti 30 ml veega, 30 ml NaCl küllastunud vesilahusega ja kuivatati Na₂SO₄-ga. Produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 45 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt puhastati kolonnkromatograafiliselt (eluent EtOAc/Hex 1/4). Produkt saadi kollakasvalge pulbrina (81% saagis).

R_f (EtOAc/Hex 1/3) = 0,31 (Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl), 0,84 (Dap(Boc)-OAllyl); ¹H TMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,432 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,567 (s, 2H, CH₂), 4,213 (1H, t, *J* = 13,8 Hz, CH (Fmoc)), 4,376-4,414 (m, 3H, CH (Fmoc) + CH₂), 4,649 (d, *J* = 4,6, 2H, CH₂), 4,811 (s, 1H, NH), 5,248 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H, CH), 5,277 (s, 1H, CH), 5,813-6,009 (m, 2H, CH₂ (Allyl)), 7,294-7,395 (m, 4H, Ar), 7,594 (d, *J* = 7 Hz, 2H, Ar), 7,752 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar); ¹³C TMR (176 MHz, CDCl₃, δ): 28,16, 42,10, 47,04, 55,02, 66,48, 67,04, 79,96, 118,95, 119,86, 125,03, 127,06, 127,83, 131,33, 141,20, 143,61, 155,90, 156,28, 170,04.

¹H ja ¹³C TMR spektrid on vastavalt **lisa 5** ja **lisa 6**.

3.1.5. Fmoc-Dap-OAllyl-i süntees

Ümarkolbi kaaluti 0,1-0,5 g (1 ekv) Fmoc-Dap-(Boc)-OAllyl, see lahustati diklorometaanis (10 ml/g Fmoc-Dap-(Boc)-OAllyl kohta) ja reaktsioonisegu paigutati jäävanni. Reaktsioonisegule lisati 0 °C juures tilkhaaval 52 ekv TFA-d. Reaktsioonisegu segati 20 minutit 0 °C juures, kuni TLC järgi oli toimunud täielik lähteaine konversioon. TLC proov valmistati, lisades Eppendorfi tuubi küllastatud NaHCO₃ vesilahust ja etüülatsetaati ning tilk reaktsioonisegu. Pärast reaktsiooni lõppu produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 24 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis (30 minutit). Produkt lahustati toluenis, kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 45 °C) ja kuivatati taas lüofilisaatori vaakumis. Produkt saadi Fmoc-Dap-OAllyl-i TFA soolana ja seda kasutati järgmises etapis ilma edasise puhastamiseta. Produkt saadi pruuni õlina (105% saagis, R_f (EtOAc) = 0,08).

3.1.6. Fmoc-DAPA-OAllyl-i süntees

Ümarkolbi kaaluti 0,1-0,33 g (1 ekv) Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl, mis lahustati DMF-s (1 ml/g lähteaine kohta) ja reaktsioonisegusse lisati 5-10 ekv DIPEA-d ja 1,2 ekv 4-DMAP-i või 4-N,N-dimetüülaminoftaalhapet. 30 minutit hiljem lisati 1,2-2,4 ekv HOBt-i ja 1,2-2,4 ekv HBTU-d. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril ja jälgiti TLC abil ja HPLC-MS abil (proovi valmistamine: Eppendorfi tuubi lisati 0,5 ml 0,1 M NaHCO₃ küllastunud vesilahust, 0,3 ml EtOAc, tilk reaktsioonisegust ning tuubi loksutati). Reaktsioon lõpetati 24 h möödudes. Reaktsioonisegule lisati 100 ml NaHCO₃ küllastunud vesilahust. NaHCO₃ kihti pesti diklorometaaniga 3 korda. Ühendatud orgaanilisi faase pesti 30 ml veega, 30 ml NaCl küllastunud vesilahusega, kuivatati Na₂SO₄-ga ja kontsentreeriti rotaatoraurustil. Produkt puhastati kolonn-kromatograafiliselt (eluent EtOAc/Hex 1/1). Produkt saadi kollase pulbrina (max 65% saagis).

R_f (EtOAc) = 0,85; ¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 3,058 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 4,106-4,128 (2H, m), 4,152-4,190 (2H, m), 4,361-4,381 (1H, m, CH (Fmoc)), 4,652-4,678 (2H, m, CH₂ (Fmoc)), 4,701-4,740 (2H, m, CH₂), 5,366 (1H, d, J = 17,55 Hz, CH), 5,865 (1H, d, J = 8,05 Hz, CH), 5,9184-5,9662 (1H, m, NH), 6,831 (1H, d, J = 6,65 Hz, CH), 7,074 (1H, d, J = 1,82 Hz, Ar), 7,278-7,311 (3H, m, Ar), 7,369-7,395 (2H, m, Ar), 7,750-7,592 (2H, m, Ar), 7,742 (2H, d, J = 7,49 Hz, Ar); ¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃, δ): 38,95, 40,74, 47,14, 53,66, 66,86, 67,53, 106,31, 115,51, 118,01, 119,18, 120,02, 125,20, 126,87, 127,54, 131,39, 134,39, 141,25, 143,59, 144,26, 153,95, 155,96, 168,45, 168,97, 169,71; MS: C₃₁H₂₉N₃O₆ protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 540, määratud: 540.

¹H ja ¹³C TMR spektrid on vastavalt **lisa 7** ja **lisa 8**.

Sünteesi tulemused on toodud peatükis **4.1. tabelis 5**.

3.1.7. 4-DAPA süntees

Ümarkolbi kaaluti 20-110 mg (1 ekv) Fmoc-DAPA-OAllyl-i, mis lahustati kuivas diklorometaanis (100 ml/g lähteaine kohta) ja reaktsioonisegule lisati 0,5-25 ekv fenüülsilaani ja 0,1 ekv Pd(PPh₃)₄. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril lämmastiku atmosfääris 1 h, kuni TLC järgi oli toimunud täielik lähteaine konversioon (proov võeti otse reaktsioonisegust ja lahjendati etüülatsetaadis). Reaktsioonisegu kontsentreeriti rotaatoraurustil.

Puhastamisviisid:

A) 25 ekv fenüülsilaani sisaldav reaktsioonisegu: reaktsioonisegule lisati 1 ml vett ja 1 ml 1,4-dioksaani ning produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil. Produkt puhastati kolonn-kromatograafiliselt (eluendid etüülatsetaat/isopropanool 3/1 ja MeOH/DCM 1/16).

B) Kombineeritud segu, mis sisaldas 0,5, 1 ja 10 ekv fenüülsilaani sisaldanud reaktsioonisegusid: segule lisati 1 ml isopropanooli ning produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil. Produkt puhastati kolonn-kromatograafiliselt (eluendid etüülatsetaat/isopropanool 3/1, 0,2% etaanhapet etüülatsetaadis ja MeOH/DCM 1/16).

C) Kombineeritud segu, mis sisaldas 1,5, 3 ja 5 ekv fenüülsilaani sisaldanud reaktsioonisegusid: segule lisati 1 ml MeOH. Produkt puhastati preparatiivse HPLC abil (gradient A).

R_f (EtOAc/isopropanool 3/1) = 0,11; HPLC retentsiooniaeg 30,8 min (gradient A); ^1H TMR (700 MHz, CDCl_3 , δ): 2,982 (6H, s, N-(CH_3)₂), 4,092-4,121 (2H, m, CH_2), 4,222-4,247 (2H, m, CH_2 (Fmoc)), 4,362 (1H, t, $J = 10,43$ Hz, CH Fmoc), 4,737 (1H, d, $J = 5,04$ Hz, CH), 5,778 (1H, d, $J = 7,07$ Hz, CH), 7,285-7,319 (2H, m, Ar), 7,380-7,408 (3H, m, Ar), 7,554 (3H, t, $J = 6,51$ Hz, Ar), 7,749 (2H, d, $J = 7,35$ Hz, Ar), 7,768 (1H, s, Ar); ^{13}C TMR (176 MHz, CDCl_3 , δ): 38,82, 41,20, 47,01, 53,35, 67,70, 107,44, 116,60, 119,92, 125,25, 125,46, 127,13, 127,71, 134,27, 141,18, 143,59, 143,97, 153,66, 156,33, 168,68, 168,99, 172,69; MS: $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$ protoneeritud molekuli $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z arvutatud: 500, määratud: 500.

^1H ja ^{13}C TMR spektrid on vastavalt **lisa 9** ja **lisa 10**.

Optimeeritud tingimused: 1,5 ekv fenüülsilaani, 1h.

Katse tulemused erinevatel tingimustel on toodud peatükis **4.1. tabelis 6**.

3.2. 6-DMNA sünteesi optimeerimine

Protseduur A (bromeeriv reagent on NBS): 0,5 g (1 ekv, 3,31 mmol) 4-nitro-*o*-ksüleeni lahustati 10 ml-s solvendis. Reaktsioonisegusse lisati 5 ekv N-bromosuktsiinimiidi ja 0,75-1,5 ekv bensoöülperoksiidi. Reaktsioonisegu segati püstjahutiga keetes 24 h. Reaktsioonisegu jahutati toatemperatuurini ja sade eraldati vaakumfiltreerimise teel. Filtraat kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 45 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt

lahustati 50 ml-s kloroformis ja pesti 20 ml H₂O ja 20 ml 10% NaOH vesilahusega, ühendatud vesifaas ekstraheeriti 30 ml kloroformiga. Ühendatud orgaanilisi faase pesti 30 ml NaCl küllastunud lahusega ja kuivatati MgSO₄-ga. Produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 45 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt ümberkristalliti heksaanis ja saadi heleroosa pulbrina (44% saagis).

Protseduur B (bromeeriv reagent on Br₂): 0,5 g 4-nitro-*o*-ksüleeni lahustati 3 ml-s klorobenseenis ja reaktsioonisegu kuumutati keemiseni. 7 ekv Br₂ lahustati 2 ml-s klorobenseenis ja Br₂ lahus lisati tilkhaaval reaktsioonisegusse, samal ajal reaktsioonisegu 400 W halogeenprožektoris või 150 W hõõgpirniga valgustades (kui reaktsioonis kasutati lampi). Reaktsioonisegusse lisati 0-0,1 ekv bensoüülperoksiidi. Reaktsioonisegu segati püstjahutiga keetes 2 h ja reaktsioonisegusse lisati 0-0,1 ekv bensoüülperoksiidi. Reaktsioonisegu segati püstjahutiga keetes, kuni reaktsiooni algusest oli möödunud 24 h, produkti puhtust kontrolliti HPLC abil. Reaktsioonisegu pesti 3 x 30 ml veega, ühendatud vesifaase ekstraheeriti 2 x 30 ml EtOAc-ga, ühendatud orgaanilisi faase pesti 20 ml NaCl küllastatud lahusega ja kuivatati MgSO₄-ga. Produkt kontsentreeriti rotaatoraurustil (vesivanni temperatuur 45 °C) ja kuivatati lüofilisaatori vaakumis. Produkt ümberkristalliti heksaanis ja saadi kollaste kristallidena (77% saagis).

R_f = 0,30 (EtOAc/heksaan 10/1); St = 122-123 °C (kirjanduses 125-127 °C [19]); HPLC retentsiooniaeg 28,0 min (gradient B); ¹H TMR (200 MHz, CDCl₃, δ): 7,068 (s, 1 H, CHBr₂), 7,121 (s, 1 H, CHBr₂), 7,927 (d, 1 H, J = 8,6 Hz, Ar), 8,201 (dd, 1 H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,4 Hz, Ar), 8,541 (d, ¹H, J = 1,4 Hz, Ar); ¹³C TMR (176 MHz, CDCl₃, δ): 33,92, 33,95, 124,48, 131,29, 139,81, 143,15, 147,99.

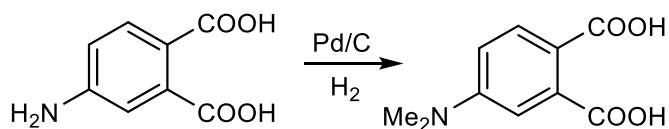
¹H ja ¹³C TMR spektrid on vastavalt **lisa 11** ja **lisa 12**.

Optimeeritud tingimused: 7 ekv broomi, 400 W halogeenprožektor, 0 ekv bensoüülperoksiidi, 16 h.

Reaktsiooni tulemused erinevatel tingimustel on toodud peatükis **4.2. tabelis 7**.

4. Tulemused ja arutelu

4.1. 4-DAPA süntees



Skeem 10. 4-aminoftaalhappe redutseeriv alküülimine.

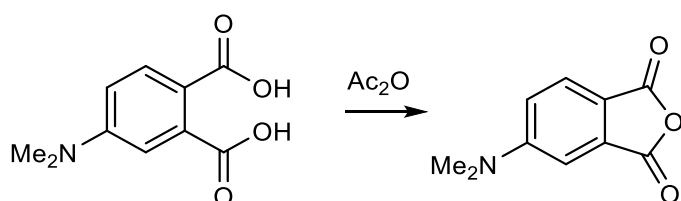
4-DAPA sünteesi esimeses etapis (**skeemil 10**) toimub kommertsiaalselt kättesaadava 4-aminoftaalhappe redutseeriv amineerimine vesiniku atmosfääris pallaadiumi katalüsaatori juuresolekul. Kirjeldatud protseduuris kasutati lähteaine suhtes 40 massi% Pd/C katalüsaatorit. [18] Seega vajab antud etapp optimeerimist eesmärgiga saada kiirelt, puhtalt ja minimaalse Pd/C katalüsaatori hulgaga toimuv protsess. Optimeerimise tulemused erinevatel tingimustel on toodud **tabelis 3**. Katalüsaatori kontsentratsiooni vähendati 6 korda 6,7% massiprotsendini ja ülejäänud protseduuri tingimusi ei muudetud (2 bar H₂ rõhk, toatemperatuur). Reaktsiooni jälgiti TLC abil ning pärast kolmetunnilist segamist toatemperatuuril tundus TLC järgi, et reaktsioon on lõpuni kulgenud, kuid HPLC-ga kontrollides selgus, et tekkinud on ainult 2% lõpp-produkti, ülejäänud lähteaine oli jäänud kas reageerimata või tekkinud oli vaheühend, mis oli ilmselt monometüülitud produkt (reaktsioon **1 tabelis 3**). Samasugune tulemus saadi ka reaktsiooni läbiviimisel 2 bar rõhu ja 70 °C juures (reaktsioon **2**). Reaktsioonis **2** tõsteti vesiniku rõhk autoklaavis 6 tunni möödudes 4 bar-ni. Reaktsiooniseigus oli 24 h möödudes toimunud täielik 4-aminoftaalhappe konversioon.

Reaktsioon, mis algusest peale toimus 4 bar rõhu all toatemperatuuril segades, jõudis täieliku lähteaine konversioonini 33 h jooksul (reaktsioon **3**). Reaktsioonis, mis toimus 4 bar rõhu all, kuid 70 °C juures segades, saavutati täielik lähteaine konversioon 1 tunni jooksul (reaktsioon **4**). Kui katalüsaatori kogust vähendati 3,3%-ni võrreldes 4-aminoftaalhappega, saavutati täielik lähteaine konversioon 3 tunni jooksul (reaktsioon **5**). Kõikides reaktsioonides saadi >100% saagis, mis tulenes paraformaldehüüdi moodustumisest reaktsiooniseigus. Paraformaldehüüdi on võimalik depolümeriseerida kuumutades või happelises või aluselises keskkonnas. [30]

Tabel 3. 4-aminoftaalhappe redutseeriva alküülimise tulemused erinevatel tingimustel.

Nr	4-aminoftaalhappe mass	Rõhk	Aeg	Temperatuur	Katalüsaatori kontsentratsioon	Saagis	HPLC puhtus
1	3,0 g	2 bar	3 h	tt	6,7%	196%	2%
2	3,0 g	2 bar	6 h	70 °C	6,7%	154%	2%
3	1,0 g	4 bar	33 h	tt	6,7%	145%	98%
4	1,0 g	4 bar	1 h	70 °C	6,7%	143%	98%
5	0,5 g	4 bar	3 h	70 °C	3,3%	125%	94%

4-N,N-dimetüülftaalanhüdrüidi moodustumise reaktsioon (**skeemil 11**) viidi läbi atseetanühüriidis keetes.



Skeem 11. 4-N,N-dimetüülaminoftaalhappe konversioon 4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdrüidiks.

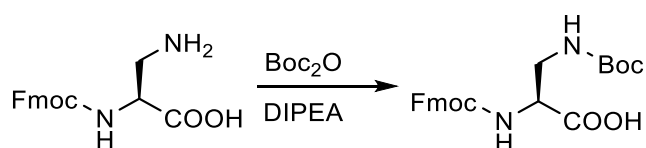
Pärast reaktsiooni lõppu jahutati reaktsioonisegu toatemperatuurini ja lisati dietüüleetri, kuna atseetanühüridi ei ole võimalik rotaatoraurustiga kontsentreerida. Dietüüleetri lisamise tulemusena sadenes produkt reaktsioonisegust välja. Reaktsioonide tulemused on toodud **tabelis 4**. Kui lähteainena kasutati 94-98% HPLC puhtusega 4-N,N-dimetüülaminoftaalhapet, mis sisaldas paraformaldehüüdi, saadi produkt 67-71% saagisega erkkollase fluorestseeruva tahkisena (**tabel 4**, reaktsioonid **2-4**). Kuna 4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdrüidi TMR spektrites ei olnud jälgi paraformaldehüüdist, siis järeldati, et paraformaldehüüd lagunes kuumutamise käigus. Produkt saadi puhta ainena.

Süntees viidi läbi ka juhul, kui produkti HPLC puhtus oli vaid 2%, kuna TLC põhjal tehti vale järeldus lähteaine täieliku konversiooni kohta (**tabel 4**, reaktsioon 1). Sellisel juhul filtriti külmast dietüüleest välja ainult 20% teoreetilisest ainekogusest. Et saagist tõsta, lisati lahusele ka heksaani ning lahust hoiti üleöö -20 °C juures. Lahusest filtriti välja pruun pulber, mille mass oli 65% saagisest. Saadud tahkisel ei olnud fluorestseeruvaid omadusi ning ka TMR spektri järgi ei olnud tegemist puhta ainega.

Tabel 4. 4-aminoftaalanhüdriidi sünteesi tulemused.

Nr	Lähteaine HPLC puhtus	Lähteaine mass (kui paraformaldehüüdi mitte arvestada)	Dietüüleest väljakristallunud produkti saagis	Fluorestseeruvad omadused?
1	2%	1,1 g	20%	Ei
2	98%	0,5 g	71%	Jah
3	98%	2,0 g	67%	Jah
4	94-98%	2,5 g	68%	Jah

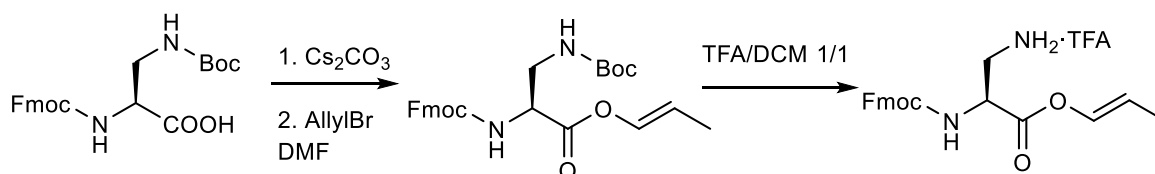
4-DAPA saamiseks oli vaja sünteesida ka kaitstud aminohape, mille sünteesi alustati Fmoc-Dap-OH molekuli aminorühma Boc-rühmaga kaitsmise reaktsioonist (**skeemil 12**). Reaktsioon viidi läbi Boc₂O ja DIPEA-ga DCM-s toatemperatuuril segades. DIPEA on vajalik Boc₂O aktiveerimiseks, mis saab seejärel kergelt kaitsmata aminorühmaga reageerida. Kuna lähteaine DCM-s märkimisväärselt ei lahustu, aga moodustuv produkt lahustub, saab reaktsiooni lõppu määrata ka sellega, et tekkinud on selge lahus.



Skeem 12. Fmoc-Dap-OH Boc-rühmaga kaitsmine.

Reaktsioon kulges lõpuni 1 tunni jooksul ja toimus kvantitatiivse saagisega. Reaktsiooni viidi läbi korduvalt ning saadud tulemused olid nii saagise kui ka reaktsiooniaja poolest väga sarnased. Kuigi produkti ei puhastatud, oli HPLC põhjal siiski tegemist puhta ainega.

Järgnevalt toimub Fmoc-Dap(Boc)-OH allüülimine (**skeemil 13**), mille esimeses etapis eemaldatakse karboksüülrühmalt prooton ja saadud aminohappe tseesiumsool allüülitakse allüülbromiidiga. Produkti peab pärast reaktsiooni lõppu ka kolonn-kromatograafiliselt puhastama, sest Fmoc-rühm osaliselt eemaldub Cs₂CO₃ toimel, andes kõrvalproduktiks Dap(Boc)-OAllyl.

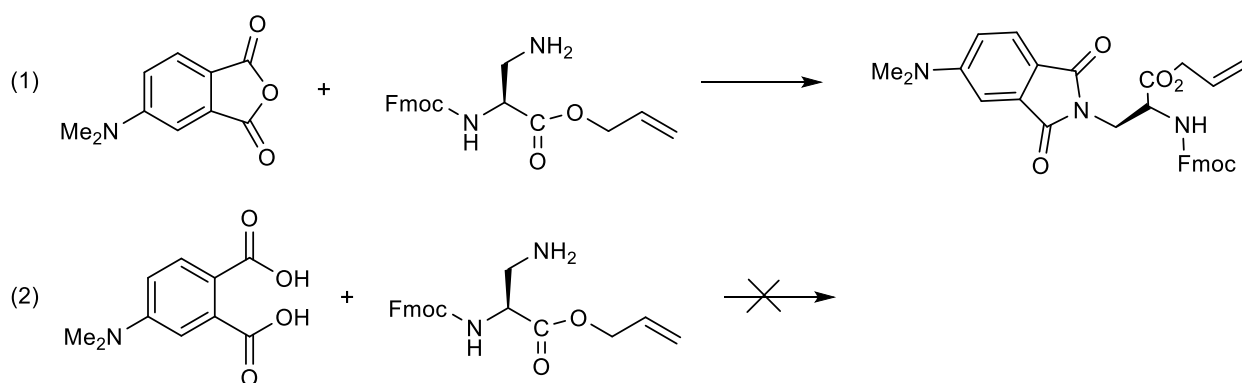


Skeem 13. Fmoc-Dap(Boc)-OH molekulile OAllyl-kaitserühma lisamine ja Boc-kaitserühma eemaldamine.

Soovitud produkt saadi 71-81% saagisega ja kõrvalprodukt 15-18% saagisega. Pärast kolonn-kromatograafilist puhastamist saadud Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl on TMR spektrite järgi puhas aine.

Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl-i molekulist Boc-i eemaldamine toimus DCM/TFA 1/1 lahuses. TFA-d lisati tilkhaaval ja reaktsioon toimus jäävannis kõrvalreaktsioonide ärahoidmiseks. Reaktsioon kulges jäävannis lõpuni 20 minutiga ja solvent kontsentreeriti rotaatoraurustil toatemperatuuril olevas vesivannis, et Fmoc-i molekulist eemaldumist takistada. Seejärel lahustati produkt toluenis ja toluen kontsentreeriti rotaatoraurustil, et eemaldada veel lahusesse jäänud TFA aseotroopse seguna. Reaktsioonil oli veidi kvantitatiivsest saagisest suurem saagis, sest väike osa tolueni jäi alles. Produkt saadi TFA-soolana ja seda kasutati järgmises etapis ilma edasise puhastamiseta.

Reaktsioon Fmoc-Dap-OAllyl ja 4-DMAP anhütriidi (reaktsioon **1 skeemil 14**) vahel toimis nii, nagu kirjeldatud protseduuris kirjas, sest 24 h toimunud reaktsioonil saadi esimesel korral 41% ja teisel korral 65% saagis (reaktsioonid **1** ja **2 tabelis 5**) ning saadud aine oli HPLC-MS-i ja TMR spektrite järgi puhas.



Skeem 14. Fmoc-DAPA-OAllyl-i süntees.

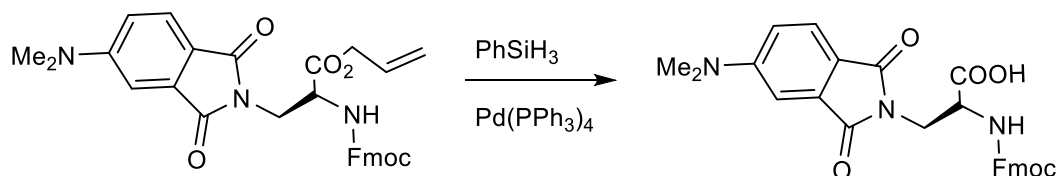
Fmoc-Dap-OAllyl-i üritati reageerima panna ka 4-N,N-dimetüülaminoftaalhappega, kasutades 2 korda rohkem aktivaatoreid (HOBt ja HBTU) ja kaks korda rohkem DIPEA-d, kuid jättes muud protseduuri parameetrid samaks (reaktsioon **3 tabelis 5**). Reaktsiooni jälgiti HPLC-MS abil ning 4 tunni möödudes oli reaktsioonisegus tekkinud 24% soovitud produkti, kuid 24 tunni möödudes oli enamus sellest lagunenu ja reaktsioonisegus oli alles ainult 3% produkti, seejärel reaktsioon lõpetati. Tekkinud produkti lagunemine oli tingitud ilmselt sellest, et reaktsioonisegusse alles jäänud 4-N,N-dimetüülaminoftaalhape reageeris tekkinud produktiga.

Tabel 5. Fmoc-Dap-OAllyl-le fluorestseeruva fragmendi sidumise tulemused.

Nr	Kasutatud reagent	DIPEA kogus	Aktivaatorite kogus	Puhastatud produkti saagis	HPLC puhtus
1	4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdriid	5 ekv	1,2 ekv	41%	-
2	4-N,N-dimetüülaminoftaalanhüdriid	5 ekv	1,2 ekv	65%	-
3	4-N,N-dimetüülaminoftaalhape	10 ekv	2,4 ekv	a	3%

a – Reaktsioonisegu ei puhastatud, vaid analüüsiti ainult HPLC abil.

Sünteesiraja viimaseks etapiks oli Fmoc-DAPA-OAllyl-st allüülrühma eemaldamine, milleks kasutati fenüülsilaani kuivas DCM-s lämmastiku atmosfääris, kasutades katalüsaatorina Pd(PPh₃)₄ (**skeem 15**).



Skeem 15. 4-DAPA sünteesi viimane etapp, OAllyl-kaitserühma eemaldamine.

Protseduuri järgi oli vaja 25 ekvivalenti fenüülsilaani ja 0,1 ekv Pd(PPh₃)₄ ning kirjeldatud reaktsioonis saavutati täielik lähteaine konversioon ühe tunni jooksul. [16] Järgides kirjeldatud protseduuri, kulges reaktsioon lõpuni ühe tunni jooksul, kuid produkti ei saadud TMR spektri järgi siiski puhta aineka parast kolonn-kromatograafilist puhastamist. Reaktsioonisegus saavutati täielik lähteaine konversioon ühe tunni jooksul ka siis, kui 25 ekv asemel kasutati 0,5-10 ekvivalenti fenüülsilaani. Reaktsiooni tulemused erinevate fenüülsilaani kogustega on toodud **tabelis 6**. Kõige puhtam produkt HPLC järgi saadi juhul, kui kasutati 1,5 ekvivalenti fenüülsilaani (79% 220 nm, reaktsioon **3 tabelis 6**). 1 ekvivalenti korral oli puhtus 71% (reaktsioon **2**) ja 0,5 ekvivalenti korral 64% (reaktsioon **1**).

Kuna reaktsioonid viidi lähteaine väikese koguse tõttu läbi väikeses skaalas (20 mg), siis puhastamiseks kombineeriti mitu reaktsioonisegu omavahel. Reaktsioonide **1**, **2** ja **6** segule lisati isopropanooli ja produkti puhastati kolonn-kromatograafiliselt mitu korda erinevates eluentsüsteemides, parim saadud HPLC puhtus oli seejuures 79% (220 nm, **tabeli 6** sissekanne **7**). Reaktsioonide **3**, **4** ja **5** segule lisati metanooli ja produkt puhastati preparatiivse HPLC abil. Nii saadud produkti puhtus oli 90% (220 nm, **tabeli 6** sissekanne **8**) ning ka TMR spektrite põhjal oli tegu üsna puhta ainega.

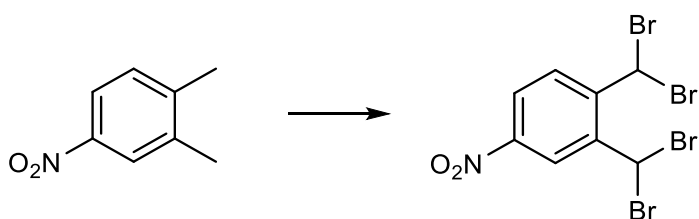
Tabel 6. Allüülrühma eemaldamine erinevate fenüülsilaani koguste juuresolekul.

Nr	Fenüülsilaan (ekv)	HPLC puhtus (220 nm)	HPLC puhtus (254 nm)	HPLC puhtus (440 nm)
1	0,5	64%	93%	99%

Nr	Fenüülsilaan (ekv)	HPLC puhtus (220 nm)	HPLC puhtus (254 nm)	HPLC puhtus (440 nm)
2	1	71%	93%	96%
3	1,5	79%	94%	96%
4	3	57%	87%	84%
5	5	34%	83%	69%
6	10	31%	64%	64%
7	Reaktsioonisegude 1, 2 ja 6 kolonnkromatograafilisest puhastamisest saadud produkt	79%	75%	92%
8	Reaktsioonisegude 3, 4 ja 5 kolonnkromatograafilisest puhastamisest saadud produkt	90%	95%	100%

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et viimases etapis võimalikult puhta aine saamiseks tuleks reaktsioon läbi viia 1,5 ekv fenüülsilaaniga. Kolonn-kromatograafiliselt on saadud ainet võimalik puhtamaks saada teatud piirini. Kuna preparatiivse HPLC-ga saab puhastada ainult väga väikest kogust ainet, oleks suurema koguse puhta aine saamiseks vajalik näiteks ümberkristallimise meetodi leidmine.

4.2. 6-DMN sünteesi optimeerimine



Skeem 16. 4-nitro-*o*-ksüleeni bromeerimine.

4-nitro-*o*-ksüleeni bromeerimine (**skeem 16**) on esimene etapp 6-DMN sünteesirajas. Reaktsiooni üritati läbi viia nii fotokeemilise reaktsiooni tulemusena kui ka radikaalsete initsiaatorite toimetel. Süsiniktetrakloriid on bromeerimise jaoks väga levinud solvent, kuid see on toksiline ja keskkonnaohtlik, seega on parem seda sünteesi läbiviimisel siiski vältida. Teine solvent, milles reaktsiooni läbi viidi, oli klorobenseen, mis on vähem ohtlik. Bromeerivatest reagentidest kasutati antud töös molekulaarset broomi ja NBS-i ning reaktsioonide edukust hinnati HPLC abil (254 nm). Kõikidel reaktsioonidel lasti toimuda 24 h ja mõlema bromeeriva reagenti korral puhastati ära ainult HPLC järgi kõige puhtam produkt. Reaktsioonide tulemused erinevatel tingimustel on toodud **tabelis 7**.

Tabel 7. Bromeerimise tulemused erinevates tingimustes.

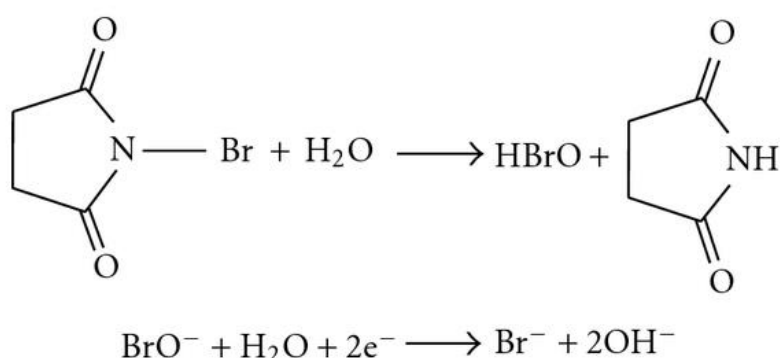
Nr	Bromeeriv reagent	Solvent	Reaktsiooni alguses lisatud BPO kogus	Hiljem lisatud BPO kogus	Lamp	HPLC puhtus (254 nm)	Saagis	Märkmed
1	NBS	CCl ₄	0,075 ekv	-	-	50%	44%	b, c
2	NBS	PhCl	0,075 ekv	-	-	25%	d	c
3	NBS	PhCl	0,15 ekv	-	-	45%	d	c
4	NBS	PhCl	0,075 ekv	-	-	31%	d	b, c
5	Broom	PhCl	0,1 ekv	-	-	10%	d	
6	Broom	PhCl	-	-	400 W	85%	77%	
7	Broom	PhCl	-	-	150 W	71%	d	
8	Broom	PhCl	0,1 ekv	-	400 W	70%	d	
9	Broom	PhCl	-	0,1 ekv	400 W	81%	d	

b – Kuiv solvent.

c – Kuivad tingimused, sh lämmastiku atmosfäär.

d – Reaktsioonisegu ei puhastatud, vaid analüüsiti ainult HPLC abil

Kõik reaktsioonid, kus kasutati bromeeriva reagentina NBS-i, viidi läbi kuivades tingimustes ja lämmastiku atmosfääris, kuna NBS hüdrolyüsib veega reageerides, andes NHS-i, mis reaktsioonis vajalikku rolli ei täida (**skeem 17**). Reaktsioon viidi läbi nii süsiniktetrakloriidis kui ka klorobenseenis ja kõige parema tulemuse andis reaktsioon süsiniktetrakloriidis 0,075 ekv BPO juuresolekul – 73% HPLC puhtus (reaktsioon **1**). Sama reaktsiooni kordamisel klorobenseenis saadi 25% puhtus (reaktsioon **2**) ja molekulaarsõelte peal kuivatatud klorobenseenis 31% (reaktsioon **4**). Kui bensoöülperoksiidi kogust klorobenseeniga reaktsioonis suurendati 2 korda (0,15 ekvivalendini), saavutati reaktsioonisegus aine 45% HPLC puhtus (reaktsioon **3**).



Skeem 17. NBS-i hüdrolyüs. [31]

Kõige parema tulemuse läbiviidud reaktsioonidest andis reaktsioon, kus bromeeriva reagentina kasutati molekulaarset broomi ja reaktsioon viidi läbi 400 W lambi valguses, mis andis soovitud ühendi 85% HPLC puhtusega (reaktsioon **6**). Reaktsioonisegu 150 W hõõgpirniga valgustades saadi HPLC puhtuseks 71% (reaktsioon **7**). Kuna bromeerimisreaktsioonides kasutatakse tihti radikaalse initsiaatorina bensoöülperoksiidi, lisati ka selles töös kõige parema tulemuse andnud reaktsioonisegusse 0,1 ekv BPO-d, et uurida selle mõju reaktsiooni kulgemisele. [32-33] Kui reaktsioonisegusse lisati bensoöülperoksiidi reaktsiooni alguses, siis saadi 24 h jooksul HPLC puhtuseks 70% (reaktsioon **8**). Kui bensoöülperoksiidi lisati 400 W lambi valguses toimuvale reaktsioonile 2 h pärast reaktsiooni algust, oli 24 h möödudes reaktsioonisegu puhtus 81% (reaktsioon **9**), mis on väga sarnane ilma bensoöülperoksiidita reaktsioonile (reaktsioon **6**). Reaktsioonis **9** oli 7 h möödudes reaktsioonisegu puhtus 51%, aga reaktsioonis **6** 63%, mis tähendab, et bensoöülperoksiid aeglustab reaktsiooni kulgu. Kui reaktsioon viidi läbi molekulaarse

broomiga, aga ilma valguseta, kasutades radikaalse initsiaatorina 0,1 ekv BPO-d, saavutati 24 h möödudes reaktsioonisegus ainult 10% HPLC puhtus (reaktsioon 5).

Mõlema bromeeriva reagentiga kõige parema HPLC puhtuse andnud produktid (reaktsioonid 1 ja 6) ekstraheeriti ja ümberkristalliti heksaanist, saades vastavalt 44% ja 77% saagisega produkti. Reaktsioonist 6 saadud aine oli puhas ka TMR spektrite põhjal. Kuna ümberkristallimiseks kulunud heksaani kogus oli väga suur (40 ml/g reaktsioonis 1 ja 70 ml/g reaktsioonis 6), siis tuleks suurema koguse aine puhastamiseks leida mõni teine solvent või solvendisüsteem, mida antud aine ümberkristallimise jaoks kuluks vähem. Kuna klorobenseenis NBS-ga reaktsioonides saavutati <45% HPLC puhtus, siis süsiniktetrakloriidi toksilisuse ja keskkonnaohtlikkuse tõttu NBS-i selle reaktsiooni jaoks rutiinselt kasutada ei saa.

Kokkuvõte

Töö eesmärk oli optimiseerida kahe keskkonnatundliku fluorestseeruva aminohappe, 4-DAPA ja 6-DMNA, sünteesiradu. 4-DAPA sünteesi esimeseks etapiks on aminorühma redutseeriv alküülimine. Vajaminevat Pd katalüsaatori kogust vähendati rohkem kui 10 korda, pikendamata seejuures reaktsiooniaega.

Fluorofoori aminohappele sidumise etapis kasutati originaalprotseduuris 4-DMAP anhütriidi, selles töös üritati reaktsiooni läbi viia ka vastava dihappega, kuid need katsed ebaõnnestusid ja reaktsioonisegus saadi vajalik aine väga väikeses hulgas.

Allüülrühma eemaldamisel vajaliku fenüülsilaani kogust vähendati 25 ekvivalendilt 0,5 ekvivalendini ning kõige puhtam reaktsioonisegu HPLC järgi saadi juhul, kui kasutati 1,5 ekvivalenti fenüülsilaani. Kõige puhtam produkt saadi preparatiivse HPLC-ga puhastamise käigus, produkti prooviti puhastada ka kolonn-kromatograafiliselt.

4-nitro-*o*-ksüleeni tetrabromeerimist, mis on 6-DMNA sünteesi esimeseks etapiks, viidi läbi erinevate bromeerivate reagentide ja solventidega ning fotokeemilist bromeerimist ka erinevate lampide juuresolekul. Kuigi kõikidel tingimustel veidi soovitud produkti tekkis, siis kõige parema tulemuse andis broomiga klorobenseenis 400 W halogeenprožektori valguses toimunud reaktsioon, kus saavutati 85% HPLC puhtus.

Töö käigus arendatud sünteesimeetodid on korratavad ja nende abil saab uuritud aineid sünteesida vähemate koguste reagentidega.

Summary

Optimization of the synthesis of organic environment-sensitive fluorescent amino acids

The aim of this study was to investigate and optimize the synthesis routes of two environment-sensitive fluorescent amino acids, 4-dimethylaminothalimide and 6-N,N-dimethylamino-2,3-naphthalimide.

The first step in the synthesis of 4-dimethylaminothalimidoalanine is reductive alkylation of an amino group. In the optimization carried out in this work, the amount of Pd catalyst was reduced more than 10 times with regards to the published procedure.

In the fluorophore binding step to the amino acid, the reaction which was originally supposed to work with DMAP-anhydride, was tested with the corresponding acid, to see if the route can be shortened by one step, however, the attempts were unsuccessful.

In the allyl group removal step the amount of phenyl silane was successfully reduced from 25 eq to 0.5 eq, however the reaction where 1.5 eq phenyl silane was used, gave the highest HPLC purity. Purification by preparative HPLC gave the product with the highest purity, purification by column chromatography was also used.

The first step in the 6-N,N-dimethylamino-2,3-naphthalimide synthesis, tetrabromination, was investigated and different brominating reagents, solvents and lamps were tested. The optimal conditions were found to be bromine in the presence of 400 W halogen lamp, which gave a crude product with HPLC purity of 85%.

In conclusion, the developed synthesis routes are reproducible and can be used to synthesize the compounds more economically with regards to the necessary reagents.

Kasutatud kirjandus

1. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
2. Technischen, der; Eck, M. *Dissertation Zur Erlangung Des Doktorgrades Performance Enhancement of Hybrid Nanocrystal/Polymer Bulk Heterojunction Solar Cells: Aspects of Device Efficiency, Reproducibility, and Stability*; 2014.
3. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring Protein Interactions and Dynamics with Solvatochromic Fluorophores. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28 (2), 73–83.
4. Weber, G.; Farris, F. J. Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino)Naphthalene. *Phys. Chem. Macromol.* **1976**, 80 (1), 31.
5. Singh, R. K.; Agarwal, S. Fluorescent Labeling and Its Effect on Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides. In *Reviews in Fluorescence 2008*; Geddes, C., Ed.; Springer: New York, 2008; p 163.
6. Shin, Y.-H.; Teresa Gutierrez-Wing, M.; Choi, J.-W. Review—Recent Progress in Portable Fluorescence Sensors. *J. Electrochem. Soc.* **2021**, 168 (1), 017502.
7. Maddali, H.; Miles, C. E.; Kohn, J.; O’Carroll, D. M. Optical Biosensors for Virus Detection: Prospects for SARS-CoV-2/COVID-19. *ChemBioChem* **2021**, 22 (7), 1176–1189.
8. Aliberti, A.; Vaiano, P.; Caporale, A.; Consales, M.; Ruvo, M.; Cusano, A. Fluorescent Chemosensors for Hg²⁺ Detection in Aqueous Environment. *Sensors Actuators B* **2017**, 247 (727).
9. Khalid, N.; Kobayashi, I.; Nakajima, M. Recent Lab-on-Chip Developments for Novel Drug Discovery. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2017**, 9 (1381).
10. Lu, Y.; Shi, Z.; Liu, Q. Smartphone-Based Biosensors for Portable Food Evaluation. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, 28 (74).

11. Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent Chemosensors: The Past, Present and Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (23), 7105–7123.
12. Krueger, A. T.; Imperiali, B. Fluorescent Amino Acids: Modular Building Blocks for the Assembly of New Tools for Chemical Biology. *ChemBioChem*. May 10, 2013, pp 788–799.
13. Prendergast, F. G.; Meyer, M.; Carlson, G. L.; Iida, S.; Potter, J. D. Synthesis, Spectral Properties, and Use of 6-Acryloyl-2-Dimethylaminonaphthalene (Acrylodan). *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (12), 7541–7544.
14. Vivian, J. T.; Callis, P. R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophys. J.* **2001**, *80* (5), 2093–2109.
15. Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Imperiali, B. Photophysics and Biological Applications of the Environment-Sensitive Fluorophore 6-N,N-Dimethylamino-2,3-Naphthalimide. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (4), 1300–1306.
16. Vázquez, M. E.; Rothman, D. M.; Imperiali, B. A New Environment-Sensitive Fluorescent Amino Acid for Fmoc-Based Solid Phase Peptide Synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (14), 1965–1966.
17. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2nd Editio.; Oxford University Press: New York, 2012, pp 234-235.
18. Sainlos, M.; Imperiali, B. Synthesis of Anhydride Precursors of the Environment-Sensitive Fluorophores 4-DMAP and 6-DMN. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (12), 3219–3225.
19. Baathulaa, K.; Xu, Y.; Qian, X. Short and Scalable Synthesis of an Anhydride Precursor of the Environment-Sensitive Fluorophore 6-Dimethylaminonaphthalimide. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (12), 1990–1997.
20. Mataka, S.; Liu, G.-B.; Sawada, T.; Kurisu, M.; Tashiro, M. Photothermal Side-Chain Bromination of Methyl-, Dimethyl-, and Trimethylbenzenes with *N* - Bromosuccinimide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67* (4), 1113–1119.

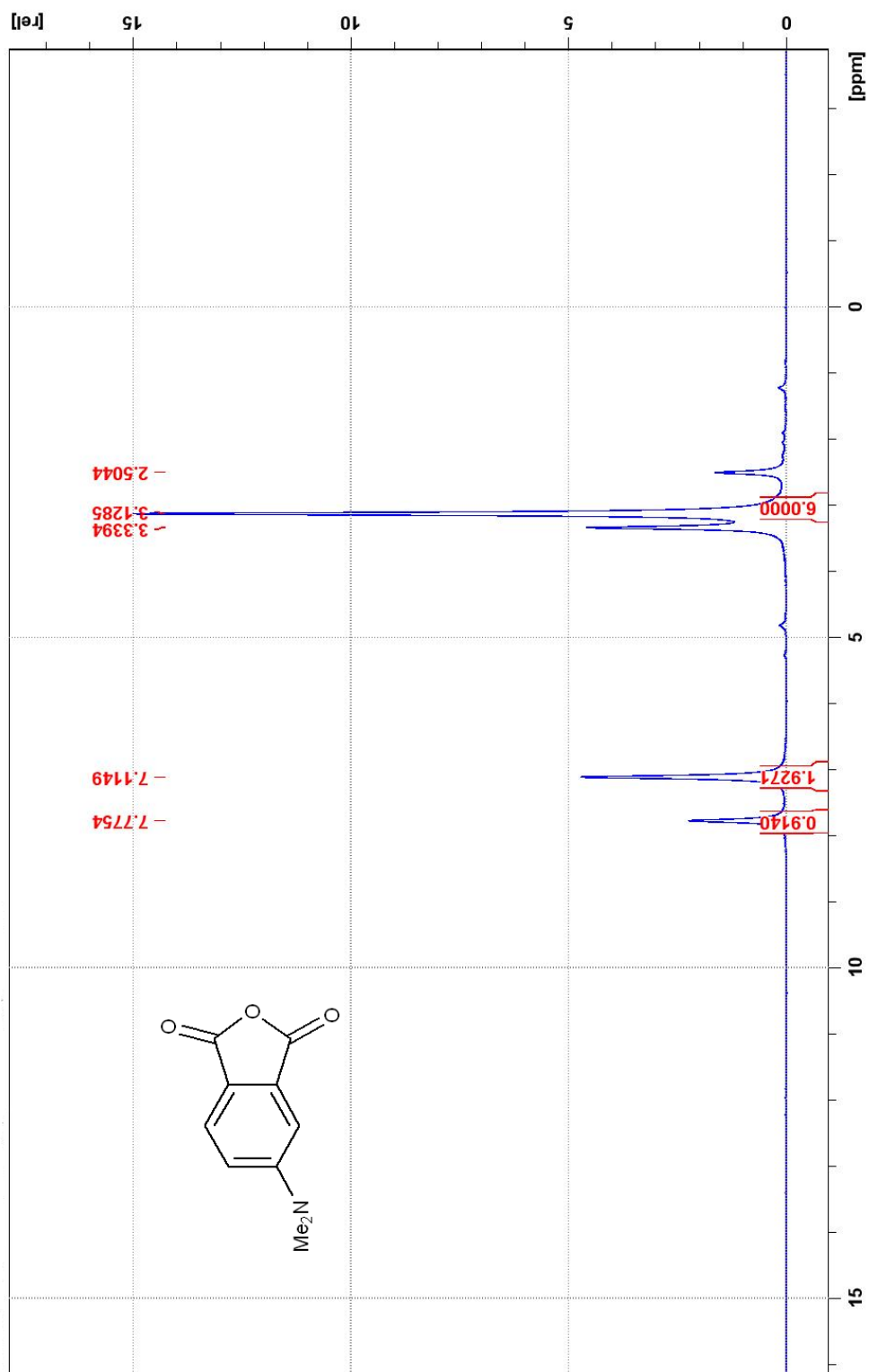
21. Okamoto, T.; Reese, C.; Senatore, M. L.; Tang, M. L.; Jiang, Y.; Parkin, S. R.; Bao, Z. 2,9-Dibromopentacene: Synthesis and the Role of Substituent and Symmetry on Solid-State Order. *Synth. Met.* **2010**, *160* (23–24), 2447–2451.
22. Aster, A.; Zinna, F.; Rumble, C.; Lacour, J.; Vauthey, E. Singlet Fission in a Flexible Bichromophore with Structural and Dynamic Control. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (5), 2361–2371.
23. Loving, G.; Imperiali, B. A Versatile Amino Acid Analogue of the Solvatochromic Fluorophore 4-N,N-Dimethylamino-1,8-Naphthalimide: A Powerful Tool for the Study of Dynamic Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13630–13638.
24. Wang, L.; Shi, Y.; Zhao, Y.; Liu, H.; Li, X.; Bai, M. Push-Pull 1,8-Naphthalic Anhydride with Multiple Triphenylamine Groups as Electron Donor. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1056–1057* (1), 339–346.
25. Tomczyk, M. D.; Byczek-Wyrostek, A.; Strama, K.; Wawszków, M.; Kasprzycki, P.; Walczak, K. Z. Anticancer Activity and Topoisomerase II Inhibition of Naphthalimides with ω -Hydroxylalkylamine Side-Chains of Different Lengths. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2018**, *15* (5), 550–560.
26. Singh, R. K.; Agarwal, S. Fluorescent Labeling and Its Effect on Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides. In *Reviews in Fluorescence 2008*; Gedders, C. D., Ed.; Springer: New York, 2008; pp 165–167.
27. *Sigma Aldrich*. www.sigmaaldrich.com (viimati vaadatud 02.05.2022).
28. Inagaki, K. 4-Dialkylaminophthalic Acid Derivatives. JP40012783, 1965.
29. Zhang, Z.; Aerschot, A. Van; Hendrix, C.; Busson, R.; David, F.; Sandra, P.; Herdewijn, P. Synthesis of Alanine and Proline Amino Acids with Amino or Guanidinium Substitution on the Side Chain. *Tetrahedron* **2000**, *56* (16), 2513–2522.
30. Ellis, E. A. A Fast, Simple, and Safe Way to Prepare Paraformaldehyde Solutions. *Micros. Today* **2009**, *17* (6), 48–49.

31. Rajendraprasad, N.; Basavaiah, K.; Vinay, K. B. Titrimetric and Spectrophotometric Assay of Oxcarbazepine in Pharmaceuticals Using N-Bromosuccinimide and Bromopyrogallol Red. *Int. J. Anal. Chem.* **2011**, *2011*, 1–8.
32. Boehm, J. C.; Callahan, J. F.; Wan, Z.; Yan, H. Substituted 3,4'-Biphenyldicarboxamides as P38 Kinase Inhibitors, and Their Preparation, Pharmaceutical Compositions, and Use. WO2006110173, 2006.
33. Young, D. H. Use of Certain Amides as Probes for Detection of Antitubulin Activity and Resistance Monitoring. EP843018, 1998.

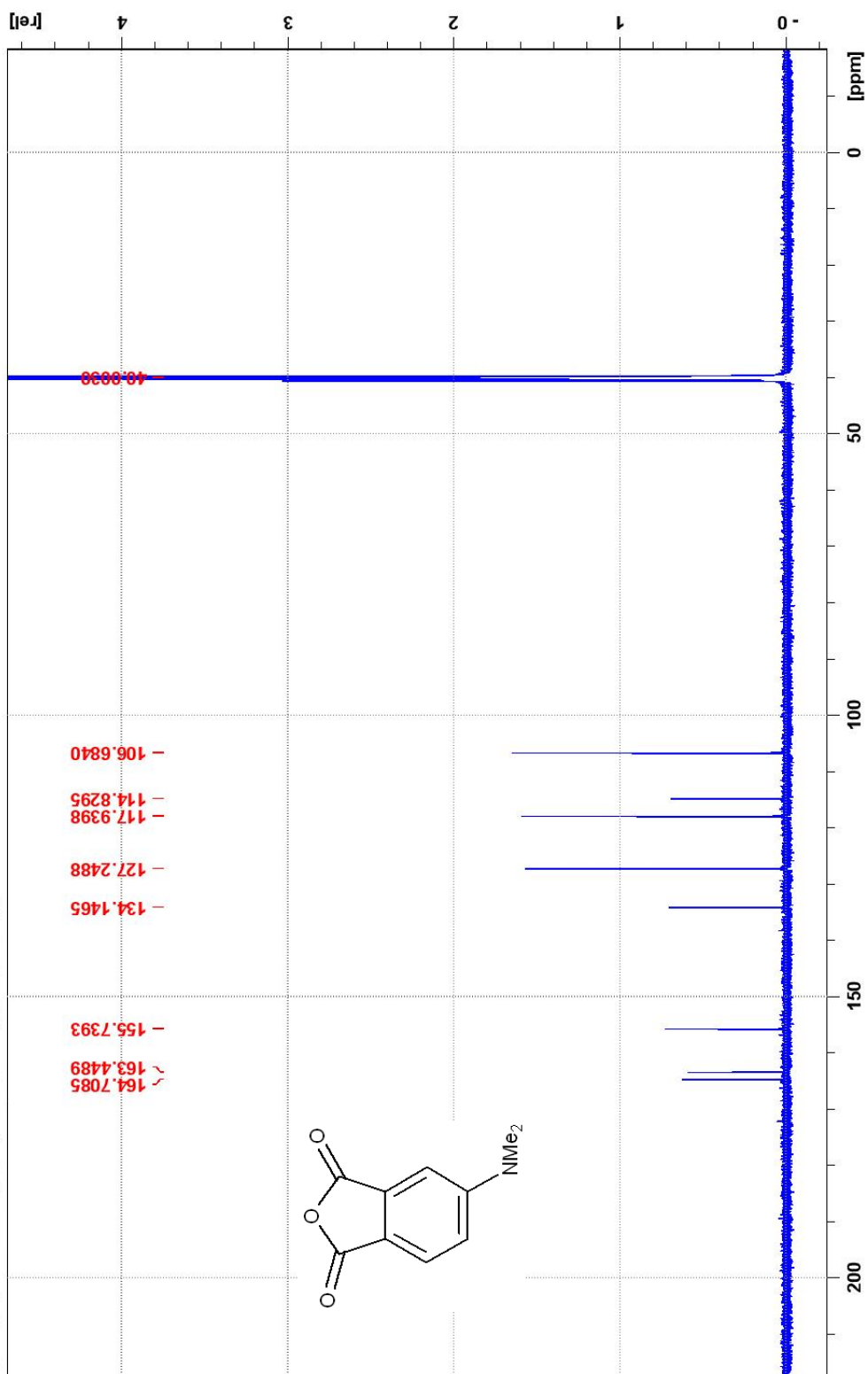
Lisad

	Aine	Spekter
Lisa 1.	4-DMAP	¹ H TMR
Lisa 2.	4-DMAP	¹³ C TMR
Lisa 3.	Fmoc-Dap(Boc)-OH	¹ H TMR
Lisa 4.	Fmoc-Dap(Boc)-OH	¹³ C TMR
Lisa 5.	Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl	¹ H TMR
Lisa 6.	Fmoc-Dap(Boc)-OAllyl	¹³ C TMR
Lisa 7.	Fmoc-DAPA-OAllyl	¹ H TMR
Lisa 8.	Fmoc-DAPA-OAllyl	¹³ C TMR
Lisa 9.	4-DAPA	¹ H TMR
Lisa 10.	4-DAPA	¹³ C TMR
Lisa 11.	1,2-bis(dibromometüül)-4-nitrobenseen	¹ H TMR
Lisa 12.	1,2-bis(dibromometüül)-4-nitrobenseen	¹³ C TMR

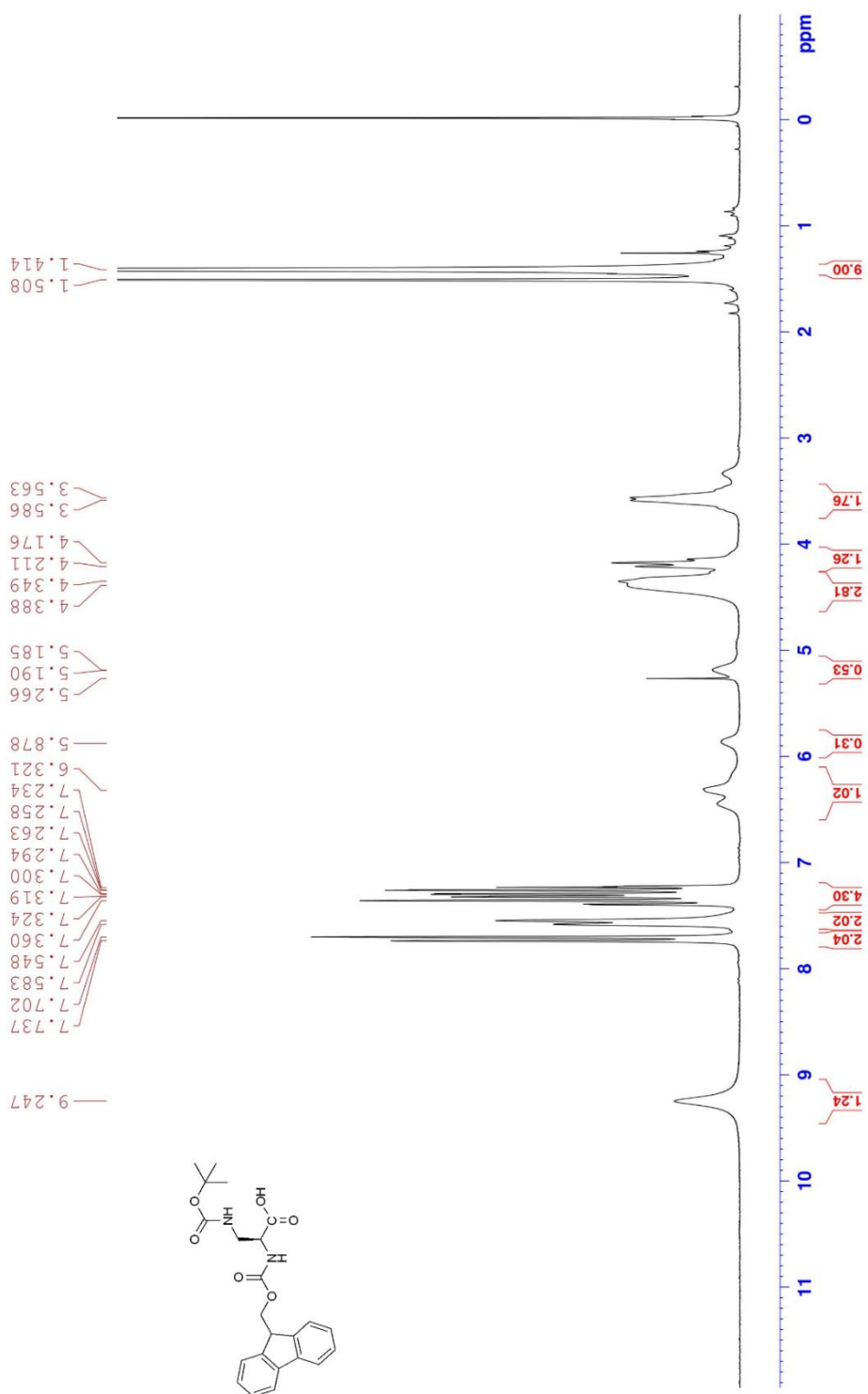
Lisa 1.



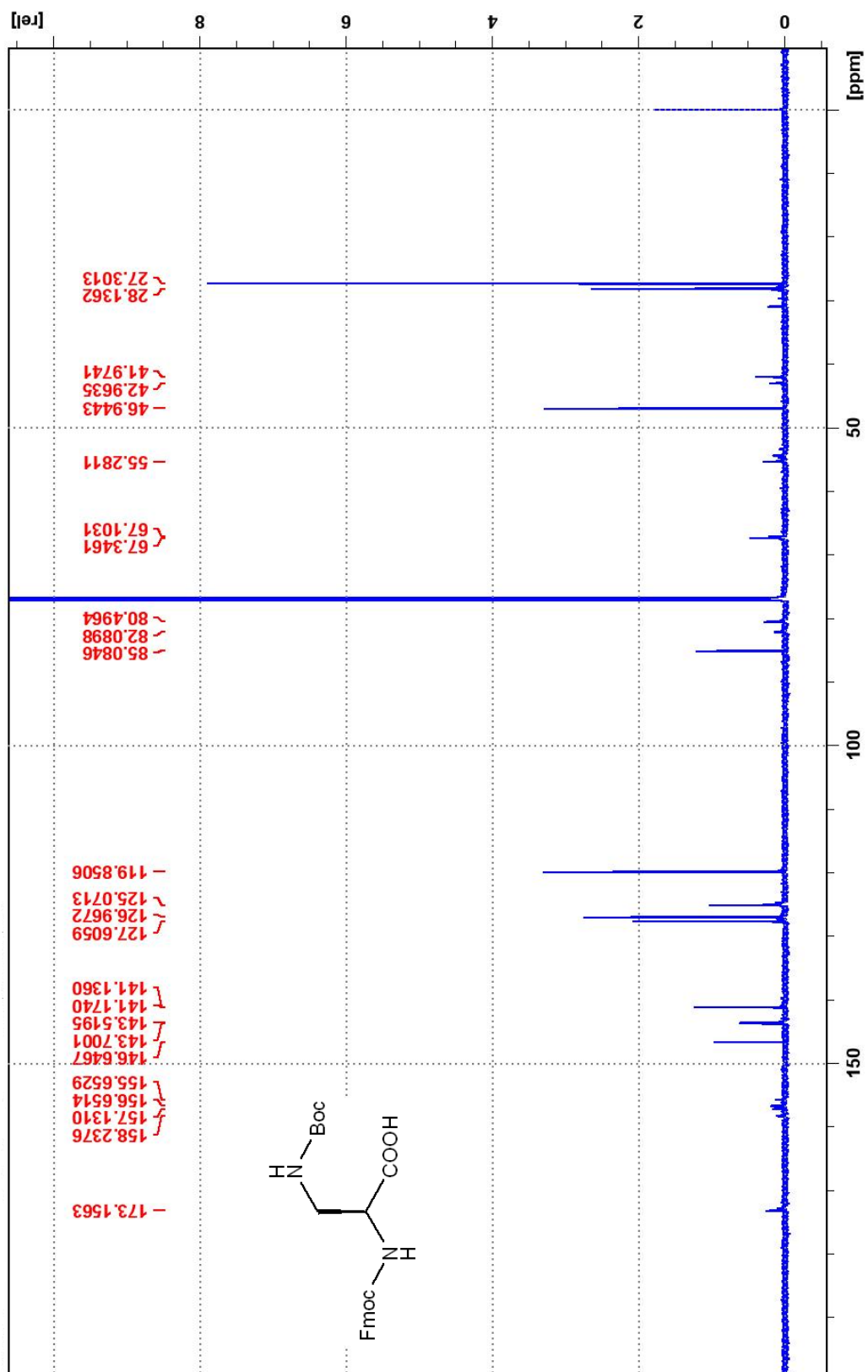
Lisa 2.



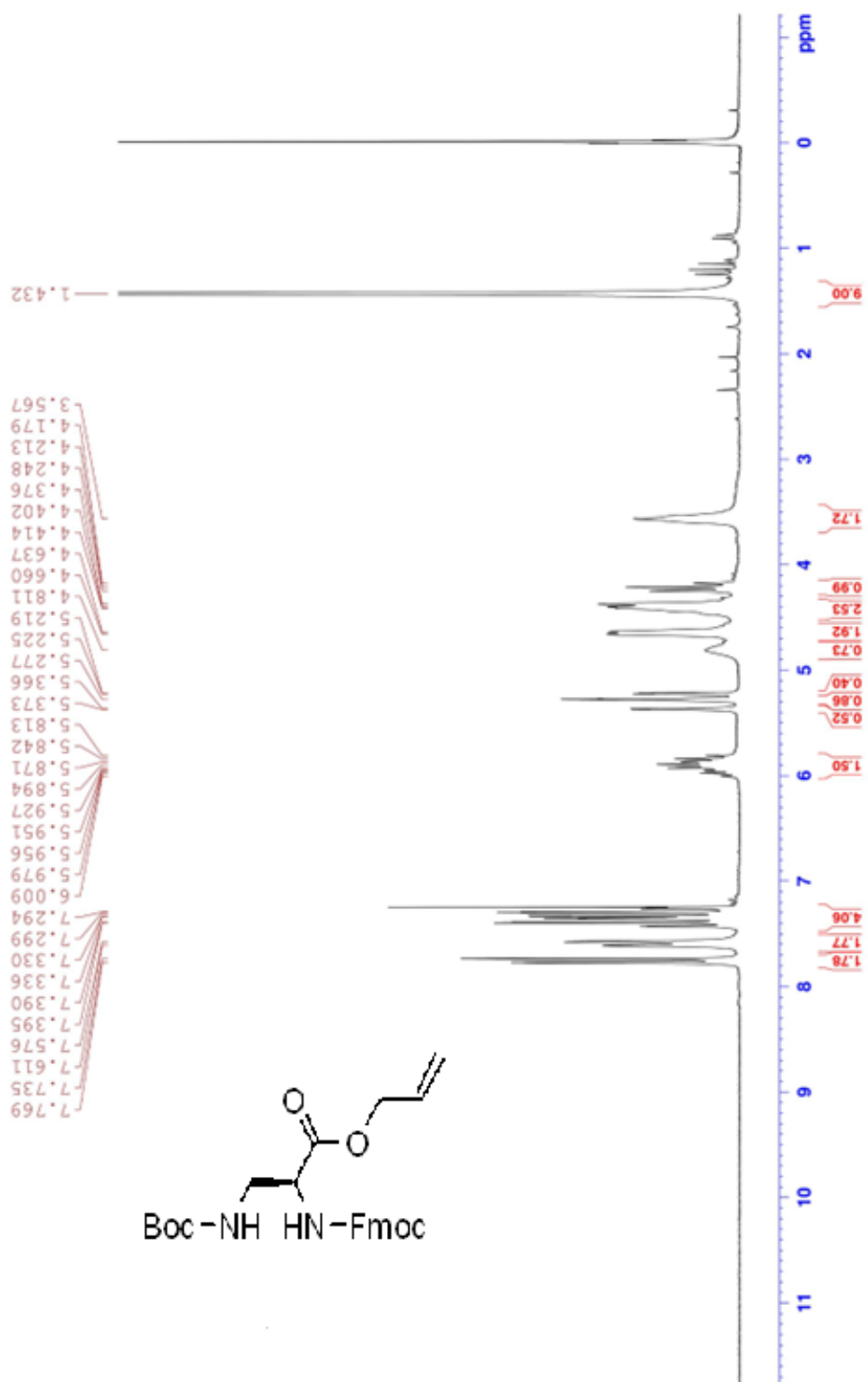
Lisa 3.



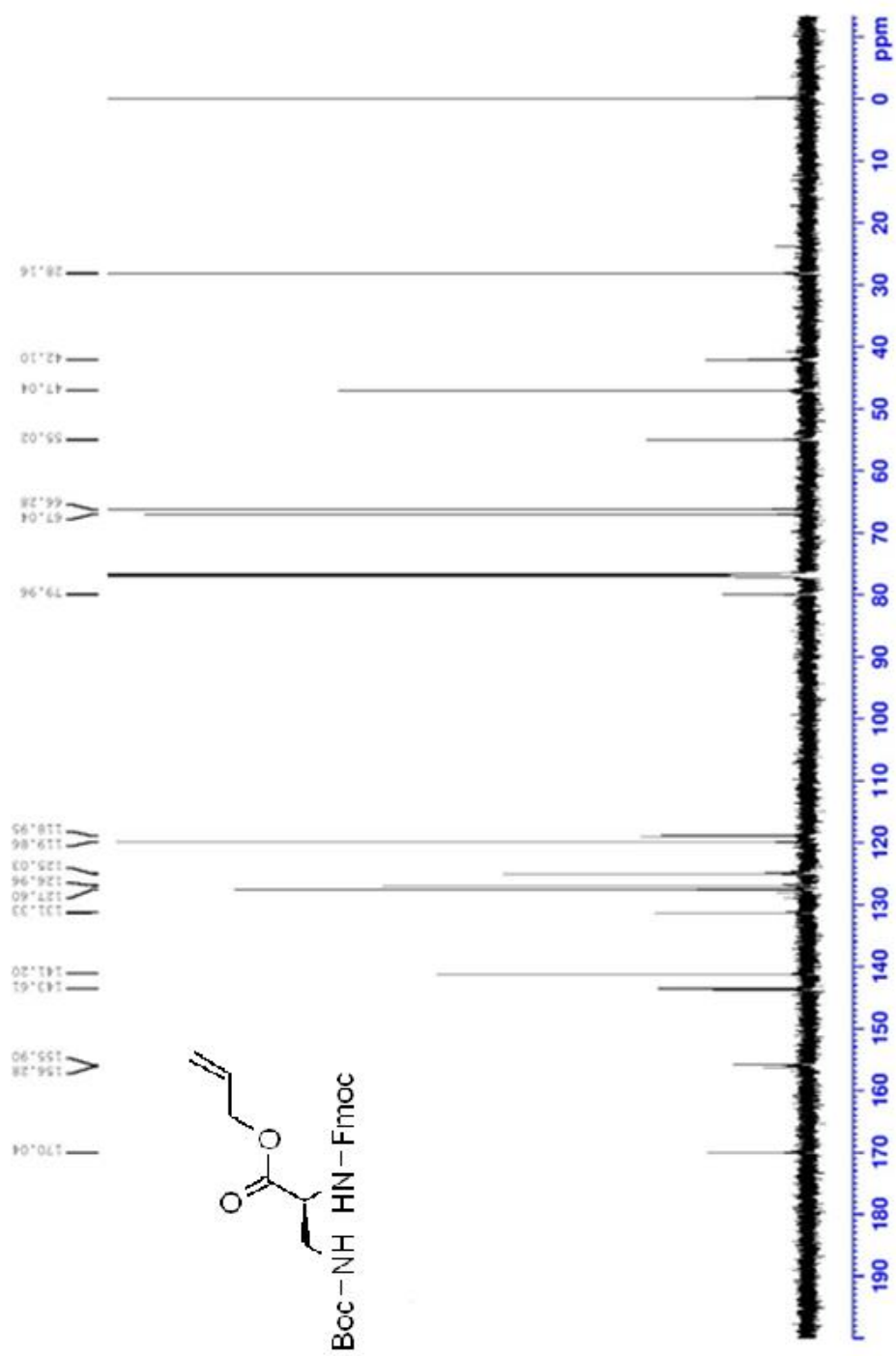
Lisa 4.



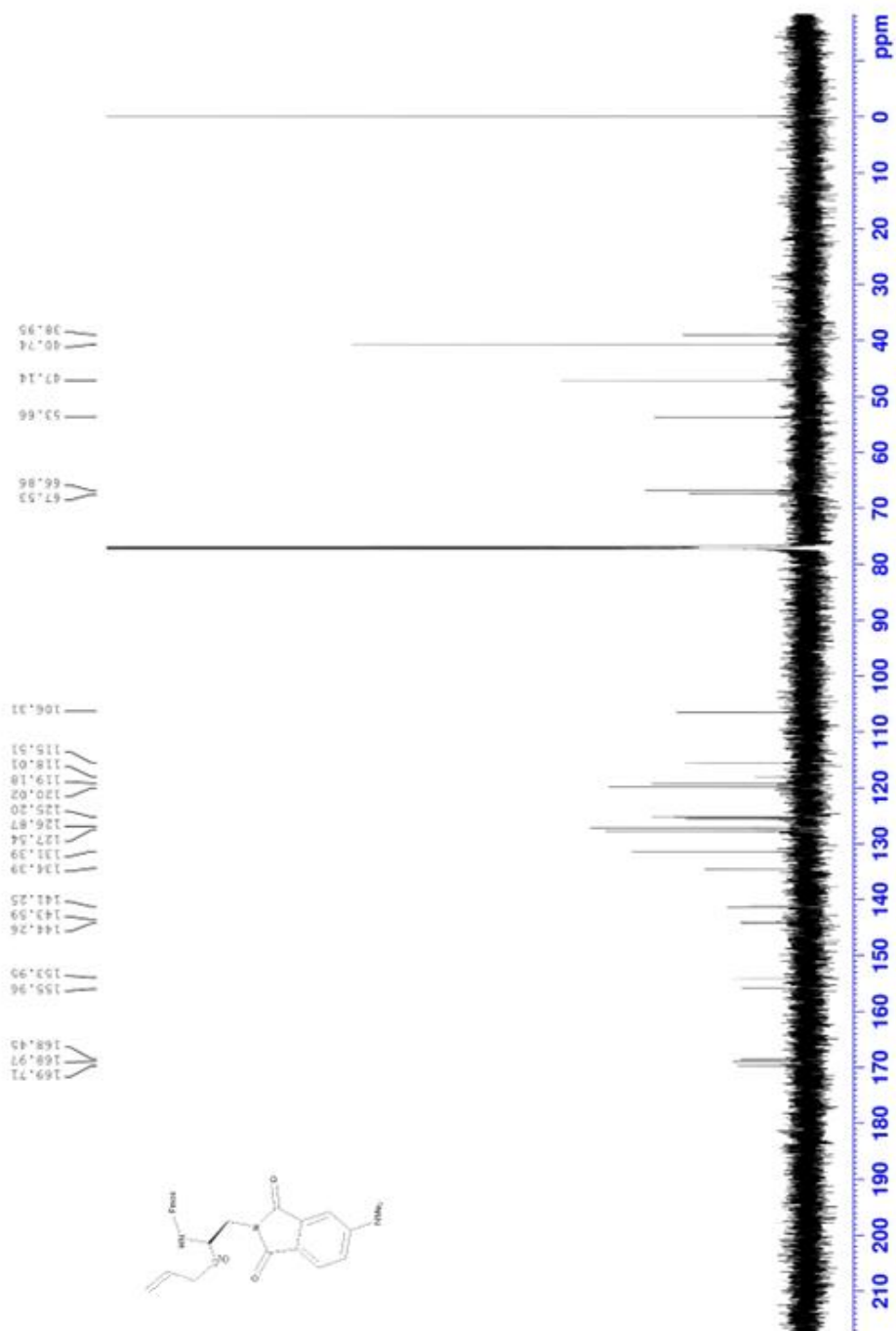
Lisa 5.



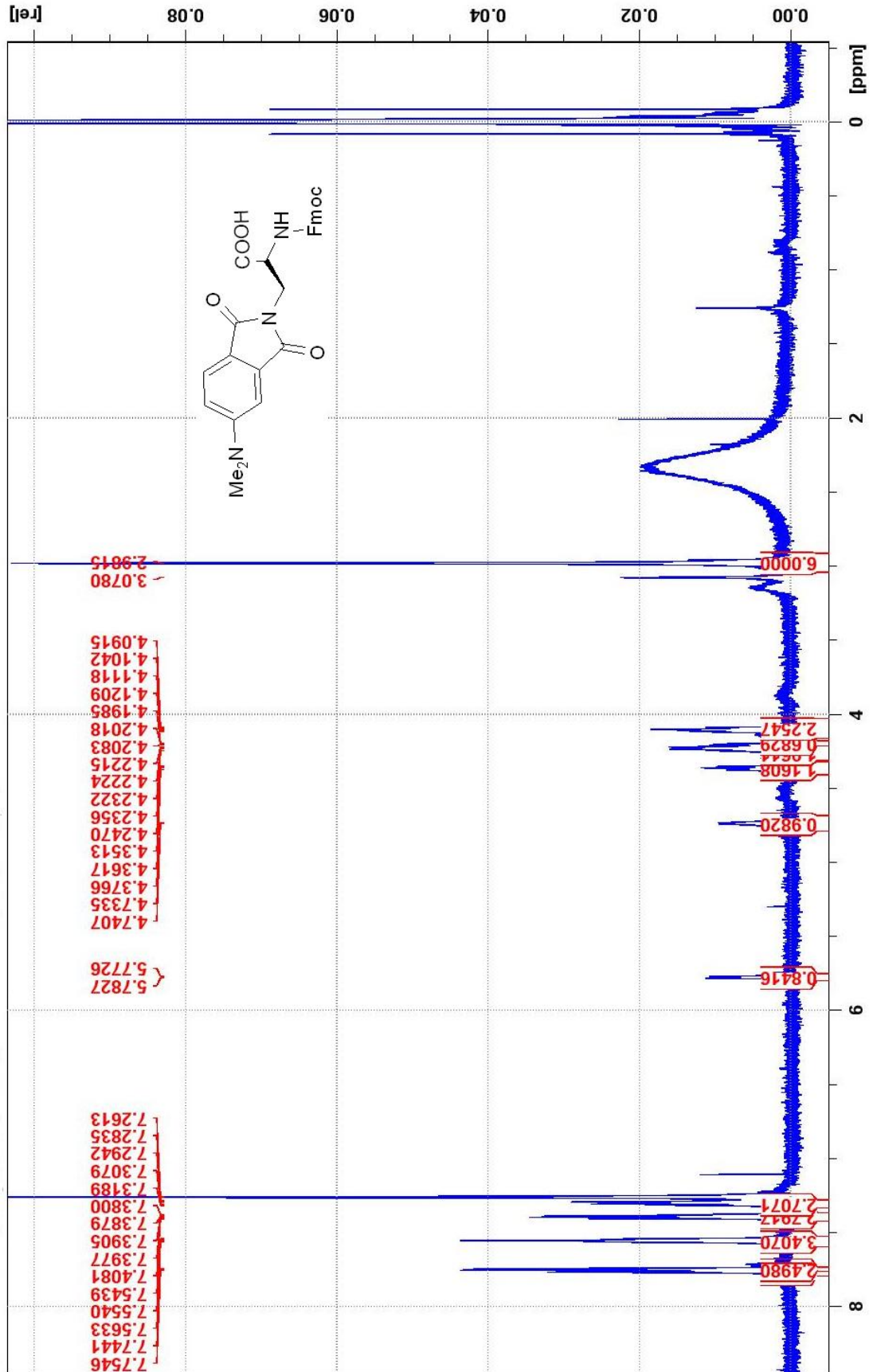
Lisa 6.



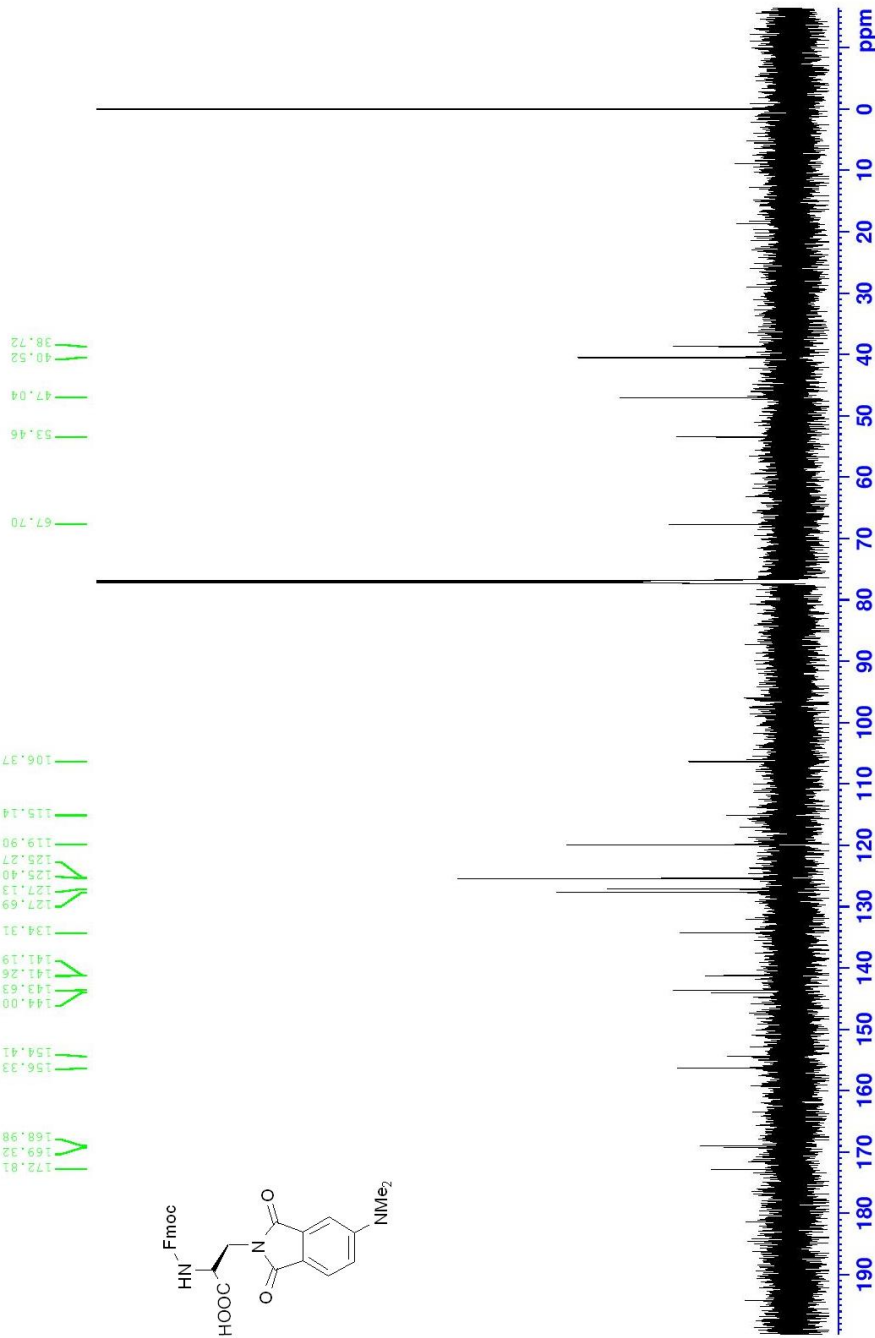
Lisa 8.



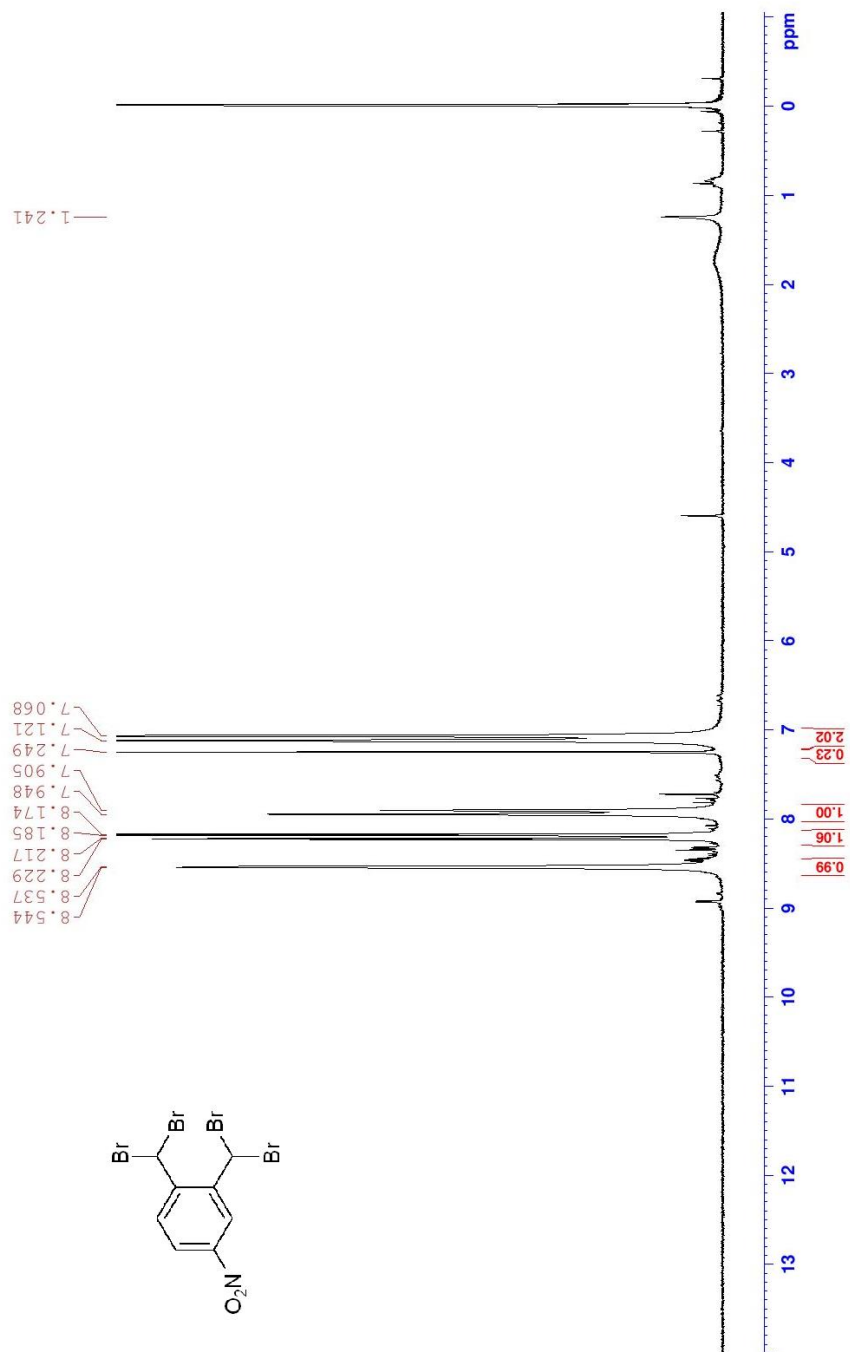
Lisa 9.



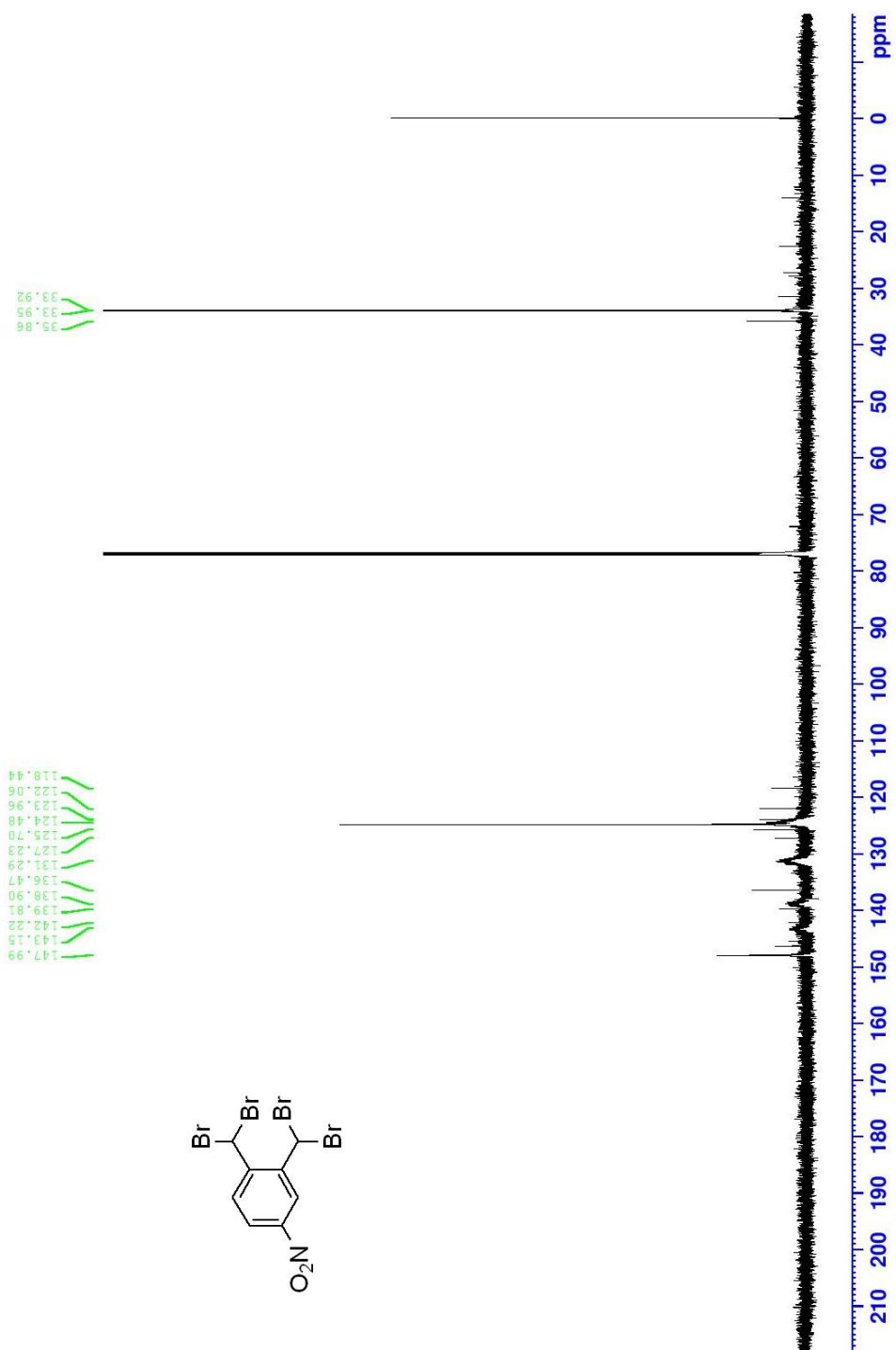
Lisa 10.



Lisa 11.



Lisa 12.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kerli Tali,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Keskkonnatundlike fluorestseeruvate aminohapete sünteesi optimeerimine“, mille juhendaja on Anton Mastitski, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **31.05.2037** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kerli Tali

24.05.2022