



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

OTDK Dolgozat

*Egy bisz(akridino)-koronaéter a spermin bioszintézis oligoaminjainak
felismerésére*

Készítette:

Kisfaludi Péter

gyógyszervegyész-mérnök MSc-hallgató

Témavezetők:

Dr. habil. Tóth Tünde

egyetemi docens

Dr. Golcs Ádám

posztdoktor

Konzulens:

Prof. Dr. Huszthy Péter

professzor emeritusz, MTA r. tag



2024.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek **Dr. Tóth Tündének** és **Dr. Golcs Ádámnak** mind a kutatómunkában mind a szakmai élettől kapcsolatban nyújtott tanácsaikért és segítségükért. Hálával tartozom **Prof. Dr. Huszthy Péternek**, aki a kutatócsoportba való felvétellel lehetővé tette a munkám elvégzését és a sokévnnyi tapasztalata egy részének átadásával hozzájárult a szakmai fejlődésemhez. Köszönöm labortársaimnak **Agárdi Antalnak**, **Jávor Bálintnak** és **Ádám Bálintnak** a segítségüket és hogy a jelenlétükkel mindig jó hangulatúvá tették a labormunkát. Továbbá köszönöm **Spátay Sára** labortársamnak a fluorimetriás és UV-vis spektroszkópiai mérésekben nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni **Dr. Krekó Marcellnek** a modellezések elvégzését, ami nélkül nem jöhetett volna létre a jelen munka. Továbbá köszönettel tartozom **Vezse Pannának** az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségéért. Köszönöm **Dr. Simon Andrásnak** és **Kiss Erzsébetnek** az NMR, valamint **Dr. László Szabolcsnak** az IR-mérések elvégzését.

Végül szeretném megköszönni **Molnárné Bernáth Ritának** a labor működéséhez elengedhetetlen összes elvégzett munkáját, továbbá a Szürke labor minden aktív és tiszteletbeli munkatársának, hogy nem csak egy kutatócsoport, hanem egy közösség tagjává is válhattam.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1
2.	Célkitűzés.....	2
3.	Elméleti és irodalmi háttér	3
3.1	Az alifás oligoaminok és biológiai szerepük.....	3
3.2	Az oligoaminok analitikai vizsgálata	5
3.3	Korábbi oligoamin szenzormolekulák.....	8
4.	Eredmények és értékelésük.....	14
4.1	A tervezett molekula	14
4.2	Az új gazdamolekula szintézise	15
4.3	A koronaéter—oligoamin komplexek <i>in silico</i> szerkezetoptimalizálása	19
4.4	Spektroszkópiai vizsgálatok az oligoamin-felismerésről	23
5	A kísérletek részletes leírása	32
5.1	A felhasznált anyagok, preparatív eljárások és az új vegyületek karakterizálása	32
5.2	Molekulamodellzés és szerkezetoptimalizálás	33
5.3	A molekuláris felismerés spektroszkópiai vizsgálatai.....	33
5.4	A vegyületek szintézise	36
5.4.1	2-Nitro-3-metoxibenzoésav (19)	36
5.4.2	2-Amino-3-metoxibenzoésav (20)	36
5.4.3	3-Metoxi-2-((2-metoxifenil)amino)benzoésav (21).....	36
5.4.4	4,5-Dimetoxiakridon (22).....	37
5.4.5	9-Klór-4,5-dimetoxi-akridin (23).....	37
5.4.6	4,4',5,5'-Tetrametoxi-9,9'-biakridin (25).....	38
5.4.7	[9,9'-Biakridin]-4,4',5,5'-tetraol (26).....	39
5.4.8	27-Klór-6,9,12,15,18-pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa 1,3,5(26),19,21,23(27),24-heptaén (28)	39

5.4.9	27-{6,9,12,15,18-Pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa-1(27),2,4,19,21,23,25-heptaén-27-il}-6,9,12,15,18-pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa-1,3,5(26),19,21,23(27),24-heptaén (17) ...	40
6	Összefoglalás	42
7	Hozzájárulásom a dolgozat eredményeihez	43
8	Irodalomjegyzék	44
9	Függelék.....	
9.1	Az új vegyületek és a 9-klór-4,5-dimetoxiakridin ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektrumai	
9.2	Az új koronaéter (17) UV spektruma	

1. Bevezetés

Kutatómunkámat a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékén, a Szupramolekuláris Kémia Kutatócsoportban folytattam Dr. Tóth Tünde és Dr. Golcs Ádám témavezetésével, valamint Prof. Dr. Huszthy Péter konzulensi támogatásával. A csoport fő kutatási területe a koronaéterek molekuláris felismerésének vizsgálata és annak gyakorlati alkalmazása. Olyan molekulák közötti kölcsönhatásokat tanulmányozunk, amelyek többnyire intermolekuláris ionos vagy fémes kötésekkel, illetve másodrendű erőkkel – például *Van der Waals-erők*, hidrogénkötések, dipól-dipól, dipól-ionos- és π - π kölcsönhatások – összetartott komplexeket alkotnak. Amennyiben a gazdamolekula-vendégmolekula komplexek stabilitási állandóinak különbsége kellően nagy, a molekuláris felismerést fel tudjuk használni a vegyületek elválasztására. Abban az esetben, ha gazdamolekula valamely jellemzője megváltozik a komplexképzés során, lehetőség nyílik a makrociklus szenzormolekulaként való alkalmazására. Ezek a szenzormolekulák képesek szelektív komplexálás révén a célzott molekulák akár több száz zavaró molekula mellett történő kvalitatív és kvantitatív analízisére is. Az általam szintetizált új bisz(koronaéter) is ezen elvek alapján működik, így képes alifás biogén oligoaminok szelektív detektálására, amely a jövőben hozzájárulhat fontos biológiai folyamatok megértéséhez és vizsgálatához.

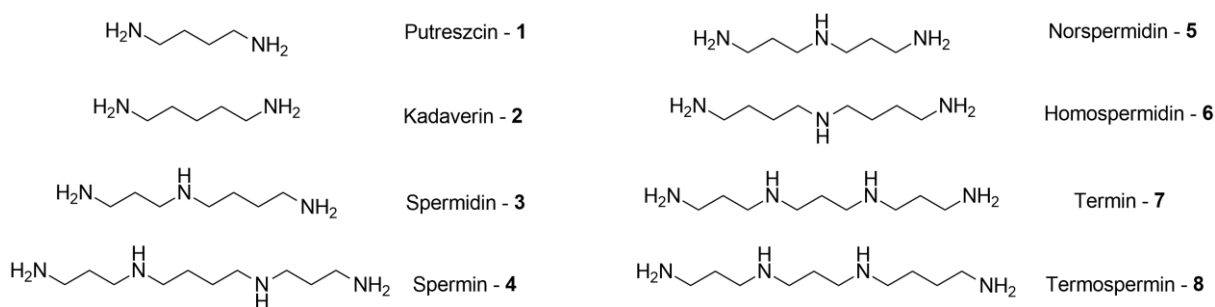
2. Célkitűzés

Olyan két makrogyűrűt tartalmazó bisz(koronaéter) előállítását tűztük ki célul, amely alkalmas lehet a spermin bioszintézisében előforduló oligoaminok szelektív detektálására. Ezek az aminok a biológiai folyamatokban való fontos szerepük miatt a napjainkban számos tanulmány fókuszpontját képezik. A szerkezetileg hasonló alifás biogén aminok főként a lánchosszukban és az aminocsoportok számában különböznek egymástól. A szelektív detektáláshoz olyan szenzormolekula szükséges, amely ezt a két különbséget használja ki. A két makrogyűrűnek köszönhetően az előállítani kívánt vegyület képes lehet mindkét gyűrű üregében egy-egy protonált aminocsoport reverzibilis komplexálására hárompontos hidrogénkötés kialakítása révén. A komplexképződés egyszerű nyomon követését a gazdamolekulában található két akridin alegység teszi lehetővé, amely fluoreszcens tulajdonságokkal ruházta fel a tervezett gazdamolekulát. A gazdamolekula fluoreszcenciája az aminokkal való komplexképzés során változik, ennek megfelelően "erősítő" vagy "kioltó" választ adhat, amelyek lehetővé teszik a komplex fluoreszcencia alapú vizsgálatát. A spermin lánchossza várhatóan megfelelő ahhoz, hogy a gazdamolekula az előbbi mindkét láncvégi protonált aminocsoportjával képes legyen kialakítani a hárompontos hidrogénkötést, így egy stabil 1:1 (gazda-vendég) sztöchiometriájú komplexet alkotva. A komplexképzés folyamatát számítógépes szimuláción alapuló molekuláris dokkolással, valamint titrálási kísérleteken alapuló regressziós módszerekkel terveztük vizsgálni. A modellezéssel és klasszikus analitikai vizsgálatokkal kapott eredmények összevetésével lehetőség nyílik a számítási módszer megbízhatóságának megállapítására, valamint olyan aminok komplexképzési tulajdonságainak előrejelzésére, amelyek fluoreszcens titrálását korábban nem végeztük el. Amennyiben az új fluoreszcens szenzormolekula képes szelektíven detektálni egyes biogén aminokat, ez lehetővé teszi az oligoaminok molekuláris szintű vizsgálatát (sejtes felszívódás, transzport, rákos folyamatok előrehaladása stb.), így számos alkalmazás kidolgozásához járulhat hozzá a későbbiekben.

3. Elméleti és irodalmi háttér

3.1 Az alifás oligoaminok és biológiai szerepük

Számos biológiailag aktív molekula tartalmaz legalább egy aminocsoportot. A biogén aminok megtalálhatók különféle élőlényekben, sejtekben, élelmiszerekben és italokban is. Az aminocsoportok száma szerint monoaminokra, oligoaminokra és poliaminokra csoportosíthatóak. Ezeket a vegyületeket jellemzően élő szervezetek szintetizálják, aminosavak enzimatis dekarboxilezésével [1–3]. A biogén alifás oligoaminok, mint például a spermin (4), spermidin (3), putreszcín (1) és kadaverin (2) (1. ábra) a legfontosabbak közé tartoznak, amelyek szinte minden élő szervezetben megtalálhatók. Az élő szervezetekben jellemzően protonált formában vannak jelen, és fontos szerepet játszanak különböző biológiai folyamatokban, mint például a sejtnövekedés, génszabályozás, nukleinsavak stabilizálása és sejtosztódás [4–6].



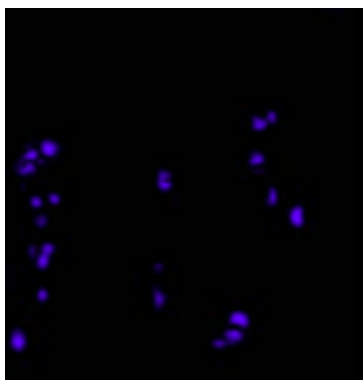
1. ábra

Példák biológiailag fontos alifás oligoaminokra (1–8)

A gerincesekben két oligoamin, a spermidin (3) és a spermin (4) található meg, valamint prekursoruk, a putreszcín (1). A normál oligoaminszint hiánya jelentős hatással lehet a sejtműködésre, beleértve a differenciálódást, az apoptózist, a motilitást, valamint az oxidatív és egyéb stresszekkel szembeni ellenálló képességet [7,8]. Ezen oligoaminok jelentőségét nemcsak a hiányuk okozta következmények, hanem számos diagnosztikai célú felhasználásuk is jól szemlélteti. Kimutatták, hogy a megemelkedett sperminszint rákos sejtek jelenlétére utalhat, így a spermin (4) biomarkerként is alkalmazható [9]. Emellett a magas spermin (4) és spermidin (3) koncentráció összefüggésbe hozható a pikkelysömörrel, ahol a betegekben körülbelül 5,5-ször annyi oligoamin található, mint az egészséges emberekben [10]. Ugyanakkor a normál szint alatti koncentrációk összekapcsolhatók az öregedés során előforduló betegségekkel, mint például a *Parkinson*-kór [11]. Tanulmányok azt is kimutatták,

hogy a spermidin (3) ígéretes lehet a szembetegségek diagnosztizálásában és kezelésében egyaránt [12].

Az oligoaminok és a rák, valamint az alapvető sejtfunkciók közötti kapcsolat ösztönözte az oligoaminok által közvetített biológiai folyamatok nyomon követésére szolgáló módszerek máig töretlen fejlesztését. Mivel a legtöbb daganat fokozott oligoamin-transzportot mutat [13], az erre a rendszerre tervezett kémiai szondák alkalmasak lehetnek a ráksejtek célzott kemoterápiás kezelésére, valamint diagnosztikai képalkotásra is [14] (2. ábra).



2. ábra

Konfokális pásztázó mikroszkóppal készített felvétel fluoreszcensen jelölt spermin (4) melanoma sejtekkel való inkubálása után [14]

Az oligoaminok sejtszintű transzportjának vizsgálatára jellemzően radioaktív (^3H vagy ^{14}C), illetve fluoreszcens jelölésű oligoaminokat alkalmaznak. A közelmúltban olyan fluoreszcens oligoamin konjugátumokat fejlesztettek ki, amelyek szimmetrikus BODIPY (4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén) fluorofort tartalmaznak, és sikeresen alkalmazták ezeket a ráksejtek oligoamin-felvételének követésére [15]. Ezeknek az oligoamin-élősejtszondáknak az egyszerű előállítása kereskedelmi szempontból is ígéretes, így megkönnyíthetik az oligoaminokkal kapcsolatos folyamatok nyomon követését. A spermin (4) és a spermidin (3) biológiai szerepe továbbra is számos kutatás középpontjában áll, ennek megfelelően az utóbbi években is számos fontos új felismerés látott napvilágot. Kimutatták, hogy a spermidin (3) nagy szerepet játszik az öregedés és az öregedéssel összefüggő betegségek folyamatában [16]. A spermidinszint az életkor előre haladtával csökken, így pótlása gyógyíthat vagy késleltethet számos öregedéssel kapcsolatos betegséget, beleértve az immunrendszert érintőket is, hiszen közvetlen hatással van a T-sejtek működésére és az ATP-termelésre. Ezen tulajdonságainak köszönhetően ígéretes antitumor hatásokat mutat [17]. A

spermin (4) esetében egy 2024-es kutatás kimutatta, hogy az *Alzheimer*-kóros betegek agyában megemelkedett sperminszint a betegség kialakulásában jelentős szerepet játszhat, és felveti terápiás célpontként való alkalmazhatóságát is [18]. Az emberi egészségben betöltött szerepük mellett ezek az oligoaminok számos egyéb területen is jelentősek, például a mezőgazdaságban felhasználhatók a csírázás és a palántanövekedés javítására [19].

3.2 Az oligoaminok analitikai vizsgálata

Manapság főként hagyományos analitikai módszereket alkalmaznak a spermin (4) és a spermidin (3) kvalitatív, valamint kvantitatív meghatározására [2]. A legelterjedtebb technikák közé tartozik a kapilláris elektroforézis (CE) és a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), amelyek előnye a kis mintaszükséglet és viszonylag alacsony kimutatási határ [20–22]. A kromatográfiás és elektroforetikus módszerek azonban komoly mintaelőkészítést igényelnek, mint például a szilárd fázisú extrakció vagy a biogén aminok szilárd fázisú mátrix diszperziója [23]. A műszeres analitikai módszerekhez emellett összetett és költséges berendezések szükségesek, ami csökkenti a hozzáférhetőségüket és megnehezíti a használatukat bizonyos rutin diagnosztikai eljárások során. A szenzormolekulák gyors és egyszerű alternatívát jelentenek a biogén aminok kimutatására, hiszen nem szükséges hozzájuk speciális műszeres háttér. Alkalmazhatók biológiai minták, például vér, nyál és vizelet vizsgálatára is, így csökkentve az invazív eljárások szükségességét. Bár a biológiai folyadékokban található anyagok kimutatása döntő jelentőségű lehet különféle betegségek és kórképek vizsgálatában (például a vizelet spermin (4) szintje alapján történő prosztatatarák előrejelzésnél [24]), ezt nehezíti a jelenlévő több száz, hasonló tulajdonságokkal rendelkező molekula, amelyek gyakran nyomnyi vagy mikromoláris mennyiségben fordulnak elő [25]. Az ilyen bonyolult összetételű biológiai minták vizsgálata hagyományos módszerekkel kihívást jelent, de a szenzormolekulák sokoldalúsága lehetővé teszi az egyes, figyelem középpontjában álló anyagok szelektív kimutatását mintaelőkészítés nélkül. Ezen felül a szenzormolekulák valós idejű elemzést biztosítanak, ami lehetővé teszi a biológiai folyamatok állandó nyomonkövetését. Emellett például képalkotásra is használhatók [26], így sejtszintű felvételek készíthetők biológiai indikátorok szöveti eloszlásáról.

Ezen szenzormolekulák működése molekuláris felismerésen alapul, amelynek során jelet generálnak az analit jelenlétében [25]. A szenzormolekulának rendelkeznie kell kromogén vagy fluorogén tulajdonságokkal, amelyek az analit komplexálása során megváltoznak. Ez a változás példaként a fotofizikai tulajdonságokban egyszerű detektálást tesz lehetővé [27,28]. A legtöbb szenzormolekula a „kötődési hely - jelzőhely” megközelítést

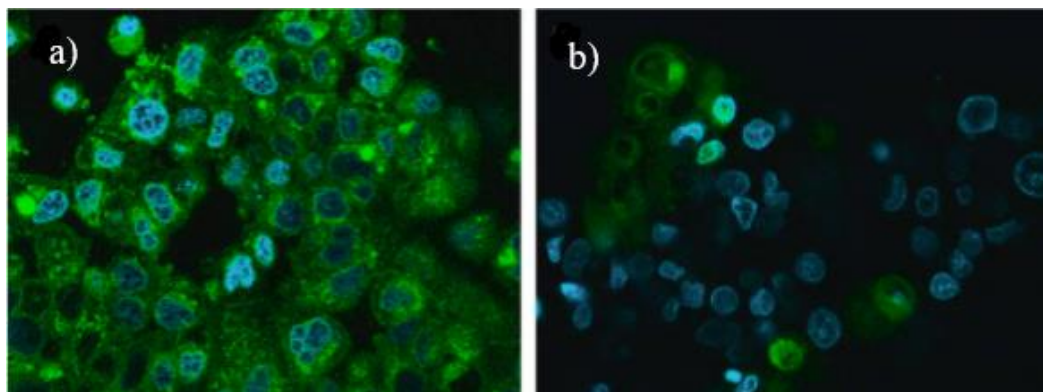
alkalmazza, ahol különálló egységek biztosítják ezeket a tulajdonságokat. A mi esetünkben a receptoregység rendelkezik ezen tulajdonságok mindegyikével, mivel a fluorofor egység a koordinációs szféra részét képezi. Az analit komplexálása során közvetlen belső töltésátviteli (*internal charge transfer* - *ICT*) folyamat révén a fluorofor emissziója megváltoztatására képes, számos előnyt kínálva más módszerekkel szemben, mint például a gyors válaszütem, nagy érzékenység és könnyű szabályozás [29].

A kromogén és fluorogén szenzormolekulák kutatása és fejlesztése a biológiailag aktív molekulák észlelésére az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséggel bír. Ez különösen igaz azokban az esetekben, amikor az érzékelt molekulák önmagukban nem rendelkeznek hasznos UV–vis spektrális jellegzetességekkel. Számos cikk számol be új szenzormolekulákról, amelyek biogén aminok detektálására alkalmazzák a kismolekulás kromofórok és fluoroforok [30–34], szerves polimerek [35], koordinációs vegyületek [36] és nanorészecskék [37] kölcsönhatásait. Az alifás biogén aminok szelektív észlelése bonyolult a nagyfokú szerkezeti hasonlóságuk miatt. A protonált oligoaminok több pozitív centrumot tartalmaznak, amelyek mind potenciális kötőhelyekként szolgálhatnak. Alifás jellegük miatt nagy konformációs rugalmassággal rendelkeznek, ami megnehezíti az entrópiás tag növekedését a koordináció során. Ezen nehézségek miatt sok szenzormolekula csak korlátozottan képes megkülönböztetni a spermint (4), spermidint (3), kadaverint (2) és putreszcint (1) [33,38]. A szakirodalom szerint csupán egyetlen kismolekulás fluoreszcens szenzormolekula létezik, amely szelektíven képes detektálni a spermint (4) más analogonokkal szemben minimális vagy semmilyen választ nem mutatva [34]. Ezen kis méretű szenzormolekulák használata előnyös, hiszen egyszerű szerkezeti módosításokkal a vizsgálni kívánt analitra szabható a szelektivitásuk [39]. Általában olcsón előállíthatók, toleránsak a különböző körülményekkel szemben, valamint a biológiai környezetekben fellépő kölcsönhatások minimálisak. Emellett kis molekuláris méretük megkönnyíti a mintákba való integrálást.

Az oligoaminok mint a spermin és spermidin, vizsgálata iránti érdeklődés a kutatói szférán kívül is folyamatosan nő, az egyes biológiai folyamatokban játszott fontos szerepüknek köszönhetően. E trend részeként a közelmúltban számos új termék jelent meg többek közt az Sigma Aldrich® (Merck) és más vegyszergyártók kínálatában, amelyek nemcsak a tudományos közösség figyelmét keltették fel, hanem széleskörű alkalmazási lehetőségeik révén új távlatokat nyitottak gyógyászatban.

Kiemelkedő példa erre az Aldrich által forgalmazott „*BioTracker™ Spermine Polyamine Green Fluorescent Live Cell Probe*” [40]. Ez a kemoszensor lehetővé teszi a spermin valós idejű nyomon követését élő sejtekben. A készülék fluoreszcens jelöléssel

működik, amely a spermin molekulák specifikus célzására és vizualizálására szolgál. A BioTracker™ alkalmazásával a kutatók betekintést nyerhetnek a spermin által közvetített folyamatokba, és tanulmányozhatják annak hatását különböző sejtfunkciókra. A 3. ábrán látható a BioTracker™ működése.



3. ábra

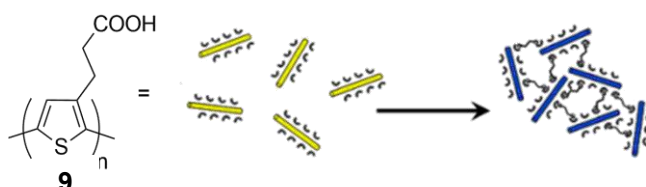
A kemoszenzorral detektált seprminfelvételt folytató sejtek (a) és az ugyanígy kezelt, de seprminfelvételükben akadályozott sejtek (b) [40]

Hasonló termékek közé tartozik például szintén a Sigma-Aldrich kínálatában található „*Polyamine Detection Kit*”, amely egy gyors és megbízható módszer a sejtekben található poliaminok és oligoaminok azonosítására. A Sigma-Aldrich mellett más cégek is kínálnak hasonló eszközöket, amelyek segítik a poli- és oligoaminok kvalitatív, illetve kvantitatív meghatározását. Egy másik figyelemre méltó termék a BioVision által forgalmazott „*Polyamine Assay Kit*,” amely ezen biogén aminok állati mintákban való kvantitatív mérésére specializálódott. Utóbbiak bár nem kompakt készülékek, de ugyanazon az elven működnek.

A bemutatott eszközök nagyban hozzájárulnak a biogén aminokkal kapcsolatos kutatások fejlődéséhez, azonban viszonylag drága termékek. Az általunk fejlesztendő szenzormolekula egyszerűen és költséghatékony módon közkereskedelemben elérhető forrásokból előállítható, amelynek igényét a fent említett termékek iránti folyamatos keresletnövekedés is mutatja. Kemoszenzorként való alkalmazása hozzájárulhat a jelenleg elérhetőknél olcsóbb módszerek kidolgozásához a spermin, továbbá más oligoaminok érzékeny és szelektív mérésére, lehetőséget teremtve a kutatók számára, hogy részletes betekintést nyerjenek a sejtek biokémiai folyamataiba.

3.3 Korábbi oligoamin szenzormolekulák

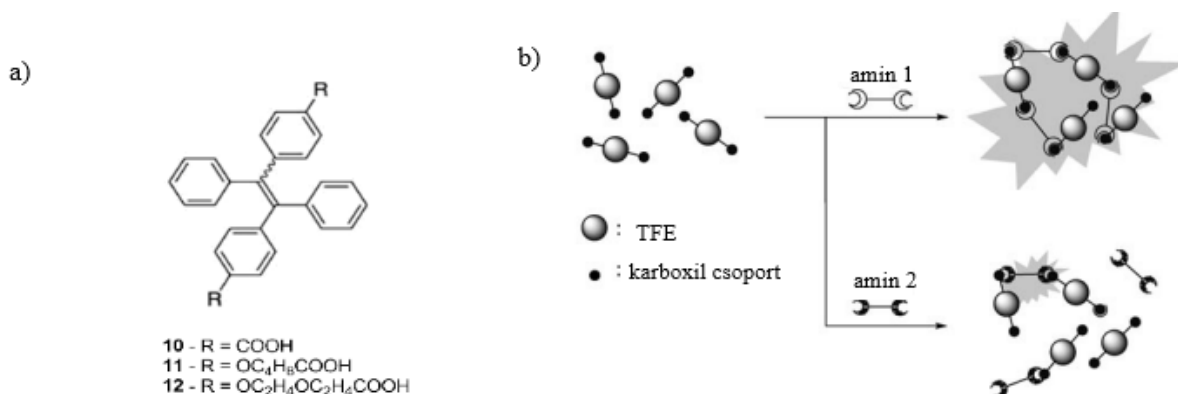
Az elmúlt években fejlesztett, oligoamin-elemzésre alkalmas szenzorvegyületek gyakran tartalmaznak karboxilcsoportokat, amelyek hidrogénkötésekkel vagy elektrosztatikus kölcsönhatásokkal lépnek interakcióba az aminosavakkal [41]. Korábban alkalmazott vegyületek közé tartoztak a karboxilcsoportokkal funkcionált poli(tiofének) (9), amelyek színváltozás mellett képesek az aminosavak kimutatására és azonosítására [42] (4. ábra).



4. ábra

A karboxilcsoportokkal funkcionált poli(tiofének) analit által kiváltott színváltozással járó aggregációja [42]

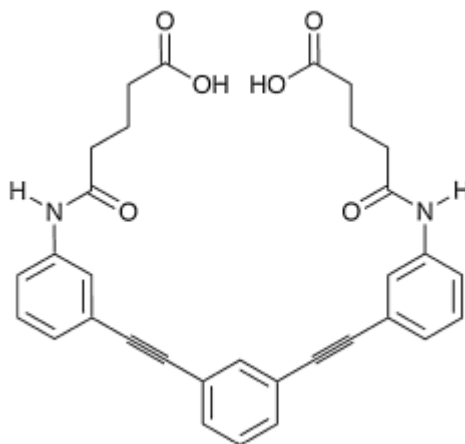
Ezenkívül karboxilcsoporttal rendelkező tetrafeniletiléneket (10,11,12, lásd 5a. ábra) is alkalmaztak korábban: ezek aggregáció hatására fényt kibocsátó molekulák, amelyek oldatban nem emisszívek, viszont aggregált vagy szilárd állapotban intenzív fluoreszcenciát mutatnak (5b. ábra). Ez az intramolekuláris rotációs átmenetek korlátozásának köszönhető, ami megakadályozza a sugárzás nélküli deaktiválást és a fluoreszcencia kioltását [32,33].



5. ábra

A tetrafeniletilén (10,11,12) szerkezete (a), illetve a karboxilcsoportok különböző aminosavakkal való hidrogénkötésének kialakulása utáni fluoreszcencia-intenzitásnövekedés sematikus rajza (b) [32]

Két karboxilcsoportot tartalmazó etinil-arént (**13**, lásd 6. ábra) szintén sikeresen alkalmaztak oligoaminok kimutatására karboxilegységei révén, amely fluoreszcencia-intenzitásnövekedéssel járó jelet adott [39].



13

6. ábra

A fluoreszcens két karboxilcsoportot tartalmazó etinil-arén szerkezete [39]

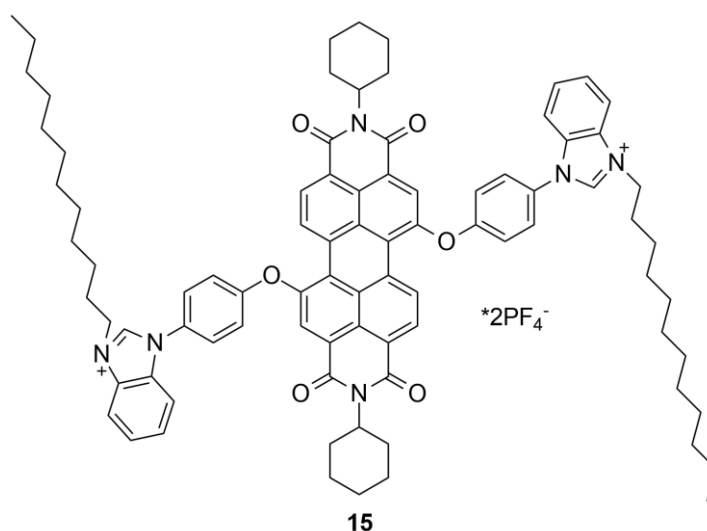
További módszerek közé tartozik az aggregáció révén működő kismolekulás amfifilek alkalmazása. Ilyen típusú vegyületek egyes fluoreszcens festékek, mint például a trinátrium-8-hidroxi-pirén-1,3,6-triszulfonát, amely alkilezés hatására „frusztrált” amfifillé alakul (**14**, lásd 7. ábra). *Köstereli* és munkatársai kimutatták, hogy ez az amfifil spermin (**4**) jelenlétében, akár nanomoláris koncentrációk mellett is, fluoreszcencia-kioltást mutat, így hatékony spermin-szelektív szenzormolekulaként működik [34].



7. ábra

A Köstereli és munkatársai által előállított molekula (14), valamint a „frusztrált” amfifil fluoreszcens kioltással járó micella képzése spermin jelenlétében [34]

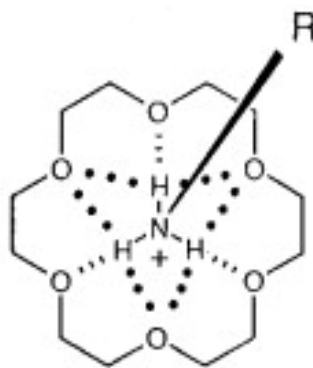
Hasonló módszert dolgoztak ki Singh és munkatársai, akik fluoreszcens festékként egy perilén-diimid-származékot (15, lásd 8. ábra) alkalmaztak, amely fluoreszcens intenzitásnövekedéssel járó választ eredményezett [43].



8. ábra

A Singh és munkatársai által előállított perilén-diimid-származék szerkezete [43]

A 18-korona-6-éter típusú makrociklusok képesek komplexet képezni protonált és semleges primer aminokkal egyaránt (a semleges aminok esetében jelentősen gyengébb stabilitással), hidrogénkötéseket alakítva ki a gazdamolekula nukleofil heteroatomjaival [44,45] (9. ábra).

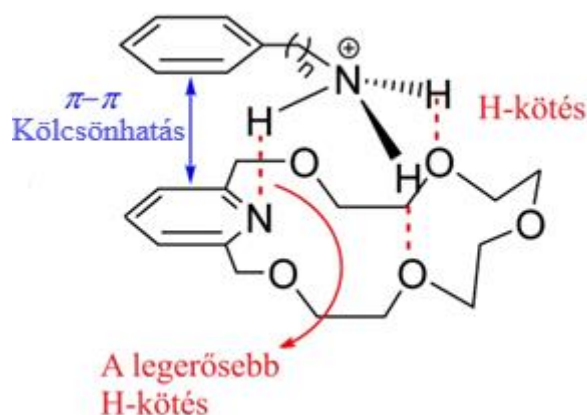


9. ábra

A 18-korona-6-éter protonált primer aminokkal alkotott komplexe

Ezen tulajdonságaiknak köszönhetően a koronaéterek kiválóan alkalmazhatók protonált amin-szelektív eljárásokban, például ammóniumsók melléktermékektől való elválasztására [46], biogén aminok extrakciójára [47], valamint királis és nem királis aminosavak elkülönítésére [48]. A koronaéterek sikerei az aminszármazékok molekuláris felismerés alapján történő szelektív szétválasztásában arra utalnak, hogy ezek a makrociklusok hatékony szenzormolekulák lehetnek biogén aminok kimutatására és szelektív elválasztására egyaránt [49]. Az oligoaminok lánchossza, valamint aminfunkcióinak száma közötti különbségek az elválasztás során jól kihasználhatók két makrociklus egységet tartalmazó koronaéterek alkalmazása esetén, amennyiben ezek többpontos kölcsönhatások kialakítására képesek. Ilyen esetekben a két makrogyűrűn belül létrejövő hidrogénkötéseken kívül egyéb kölcsönhatások (például kation- π kölcsönhatás) is kialakulhatnak a heterociklus alegységekkel, tovább növelve a komplex stabilitását.

Heteroaromás gyűrűvel rendelkező koronaéterek protonált primer aminokkal történő molekuláris felismerésében általában az nagy előnyt jelent, amikor az amin vendégmolekula is tartalmaz egy aromás egységet. Ilyenkor a gazdamolekula és a vendégmolekula aromás gyűrűi között π - π kölcsönhatás jöhet létre, amely effektív koordinációt biztosít a komplexálás során (10. ábra), ezzel hozzájárulva a komplex szerkezetének stabil térállásban történő rögzítéséhez [50]. Nitrogénatomot tartalmazó alegységek esetén, ez a heteroatom nagyobb affinitást mutat a hidrogénkötés kialakítására, mint a makrogyűrű éteres oxigénatomjai, ami tovább fokozza a protonált primer amin-származékokkal létrejövő komplex stabilitását.

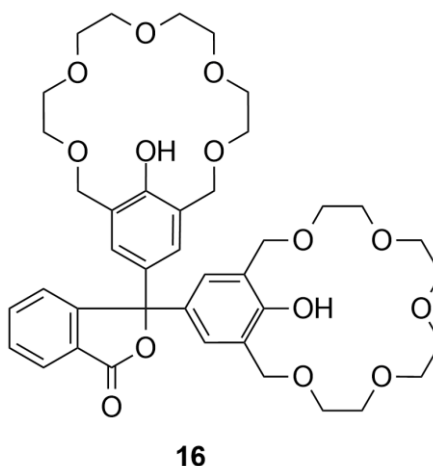


10. ábra

Egy heteroaromás egységet tartalmazó koronaéter lehetséges kölcsönhatásai aromás részt tartalmazó primer amin vendégmolekulával

Az akridinegységet tartalmazó koronaéterek esetén is fellép ez a π - π kölcsönhatás és a *N*-atommal kialakított erős hidrogénkötés. Ezek további előnye a heteroaromás váz merevsége, amelynek többek közt az enantiomer-megkülönböztetés mértékének növelésében is van szerepe királis molekulák szelektív detektálása esetén. Előnyük még a fluorofor és kromogén jellegük, amelyeknek köszönhetően komplexképzésük fotofizikai módszerekkel is vizsgálhatóak [51]. Ezen kívül az akridinegységet tartalmazó makrociklusok képesek gyors ioncserére és fázistranszportra, így ideálisak membrántranszport folyamatokhoz is. Az akridingyűrű továbbá jól szubsztituálható, és a szintetikus módosítások általában nem befolyásolják a komplexképzési tulajdonságokat, lehetővé téve a szelektív funkcionálizálást.

Korábban egyedül *Tanima* és munkatársai mutattak be olyan két üreget tartalmazó koronétert (11. ábra), amelyet sikeresen alkalmaztak szenzormolekulaként a spermin analogonok kimutatására [30].



11. ábra

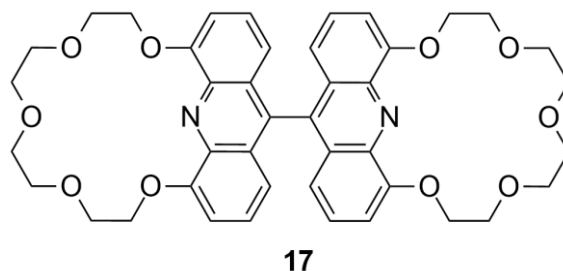
A *Tanima* és munkatársai által alkalmazott gazdamolekula

Tanima és munkatársai egy fenoltalein-származékot alkalmaztak, amely két koronaéter egységet tartalmazott (16) és képes volt hárompontos kölcsönhatások révén megkötni a spermidint (3) és a spermint (4). A gazdamolekula (16) szerkezeti módosításaival a színváltozásoson alapuló választ fluoreszcens válasszá tudták alakítani. A gazdamolekulák fluoreszcenciakioltást mutattak, ami kevésbé alkalmas a jelkioltás és a háttérzaj megkülönböztetésére. Nagy szelektivitást értek el a spermin (4) és a spermidin (3) színváltozással járó komplexképzése során a többi biogén aminnal szemben. A gazdamolekula inaktív maradt a triptaminnal (10 ekv.) és a kadaverinnel (2) (10 ekv.) szemben, ugyanakkor színreakciót mutatott, miután a spermint (4) adták (<1 ekv.) ezekhez a zavaró aminokhoz. Ennek ellenére a spermin (4) és a spermidin (3) közötti egyértelmű megkülönböztetés nem volt megvalósítható, mivel a komplexstabilitási állandók ($\log K$) értékei közeliak voltak. A spermidin (3) esetében a $\log K$ értékek 2,9 és 3,2 között, míg a spermin (4) esetében 3,4 és 3,6 között voltak, attól függően melyik származékát alkalmazták a gazdamolekulának.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A tervezett molekula

A tervezett bisz(akrino)-koronaéter (**17**, lásd 12. ábra) feltehetően nagy érzékenységgű szenzormolekulaként funkcionál protonált alifás biogén oligoaminok kimutatására és képes szelektíven megkülönböztetni a rövid és hosszú láncú oligoaminokat.



12. ábra

Az új bisz(akridino)-koronaéter szerkezete

A gazdamolekula (**17**) két 18-korona-6-éter-típusú makrogyűrűt tartalmaz, amelyek mérete pontosan illeszkedik a protonált primer aminocsoportokhoz (rendre $r(18K6) = 1,4 \text{ \AA}$ és $r(-NH_3^+) = 1,42 \text{ \AA}$) [44,45]. Ez lehetővé teszi a stabil koordinációt, hidrogénkötések révén az elektrofil ammóniumion és a gazdamolekula nukleofil heteroatomjainak magános elektronpárjai között [50]. A molekula kedvező fluoreszcens tulajdonságokkal (kvantumhatásfok [akridin, mint referenciavegyület ismert kvantumhatásfok értékéből $\phi = 0,87$, acetonitril], fluoreszcens élettido $[\tau = 8,67 \times 10^{-9} \text{ s, acetonitril, } 25 \text{ }^\circ\text{C, } 10^{-7} \text{ M}]$, Stokes eltolódás $[\Delta\lambda = 175,5 \text{ nm}]$) rendelkezik az akridinegységeinek köszönhetően, és az elektronkonjugáció révén már egy makrociklus üreg betöltése is fluoreszcens választ vált ki. A *Tanima* és munkatársai által használt gazdamolekulákkal ellentétben [30] ez a molekula a komplexképzést kísérő fluoreszcens intenzitásnövekedést mutat. Habár mindkét megközelítésnek megvannak a maga előnyei, általában az intenzitásnövekedéssel járó fluoreszcens válaszokat részesítik előnyben a fluoreszcens kioltással szemben, ugyanis ezek jelentősen felerősítik a fluoreszcencia jelet az analittal való kötődéskor, ezáltal növelve az érzékenységet. Ez az erősítés lehetővé teszi az analit alsó kimutatási határának csökkentését, valamint hatékonyan csökkenti a háttérzajt is, hiszen az interakció alatt minimális

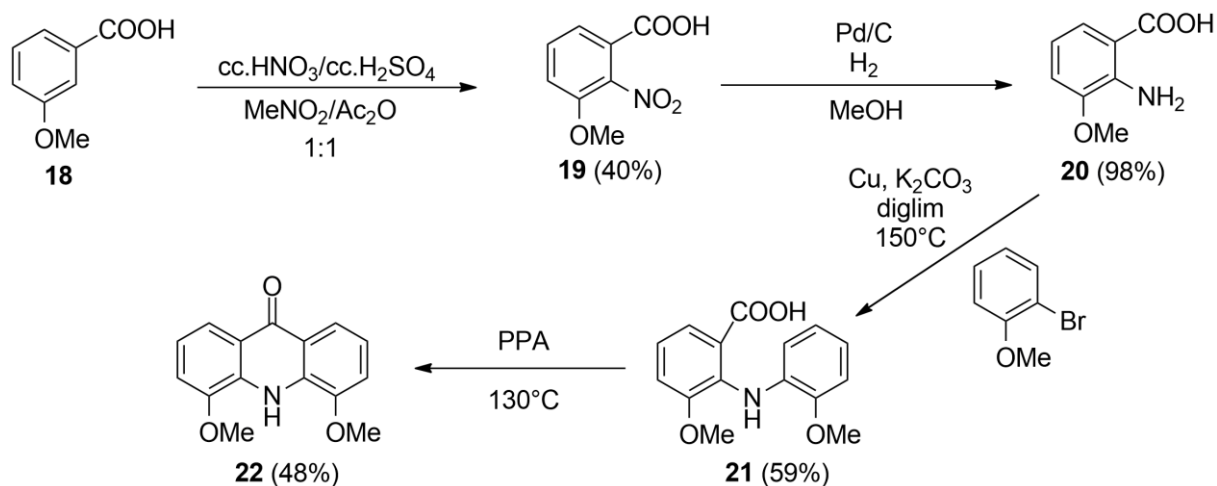
alapfluoreszcenciát biztosít, így mérsékeli a minta egyéb komponenseinek zavaró hatásait. Ezek alapján, míg az intenzitásnövekedés esetében a jelképzés során javul a jel-zaj viszony, addig fluoreszcens kioltásnál minél nagyobb a jel, annál rosszabb a jel-zaj arány [52].

Az akridinegység mellett, hogy kiváló fluorofor, merev konformációt is biztosít. Mivel a két gyűrűt akridinegységek kötik össze, a gyűrűk közti távolság optimálisan illeszkedik a spermin (4) lánchosszához anélkül, hogy jelentős szerkezeti torzulást okozna, továbbá ezek az alegységek síkalkatuk révén stabilizálják a makrociklust. Ebben az elrendezésben, ha a vendégmolekula protonált láncközi szekunder-amin funkcióval is rendelkezik, a gazdamolekula akridinegységei további aromás π -kation kölcsönhatás révén elősegíthetik a gazda-vendég komplex stabilizálását. Az akridinegység nitrogénatomja emellett nagyobb affinitást mutat a hidrogénkötés kialakítására, mint az éteres oxigénatomok, ezzel tovább növelve a protonált primer amin származékokkal kialakított komplex stabilitását [50].

4.2 Az új gazdamolekula szintézise

Jelen munkában két különböző eljárást mutatok be a 17 gazdamolekula szintézisére és demonstrálok annak szenzormolekulaként való alkalmazhatóságát analitikai vizsgálatokkal és számítógépes kémiai szimulációkkal különféle biogén és nem biogén mono- és oligoaminok, így például a spermin (4) és a spermidin (3) esetében.

Az új makrociklus (17) szintézisét a kereskedelmi forgalomban kapható, viszonylag olcsó 3-metoxibenzoésavból (18) kiindulva végeztem, amelyet több lépésben 4,5-dimetoxiakridonná (19) alakítottam (13. ábra) a szakirodalomban már korábban ismertetett módon [53], kisebb változtatásokkal. A szintézis első lépéseként a 3-metoxibenzoésavat (18) nitrálva, 2-es helyzetben egy nitrocsoportot alakítottam ki. A reakció során a nitrocsoport a 2-es és a kedvezményezettebb 4-es helyzetbe is kerülhet, valamint dinitro-melléktermék is képződhet. A melléktermékek képződését a nitrálás különböző oldószerekben történő elvégzésével próbáltam csökkenteni. Bár az egyszerűen nitrált termékek arányán nem sikerült változtatni, 50-50 térfogatszázalékos nitrometán-ecetsavanhidrid elegyben dinitro-melléktermék nem keletkezik, mert az egy nitrocsoportot tartalmazó származékok kiválnak az oldatból. A nitrocsoportot katalitikus hidrogénezéssel aminocsoportra cseréltem (20), majd ebből 2-brómanizollal reagáltatva, egy Ullmann-reakcióval kapcsoltam hozzá a második metoxicsoportot tartalmazó aromás gyűrűt. Végül a difenilamin-származékból (21) polifoszforsavval történő gyűrűzárással kaptam meg a 4,5-dimetoxiakridont (22).

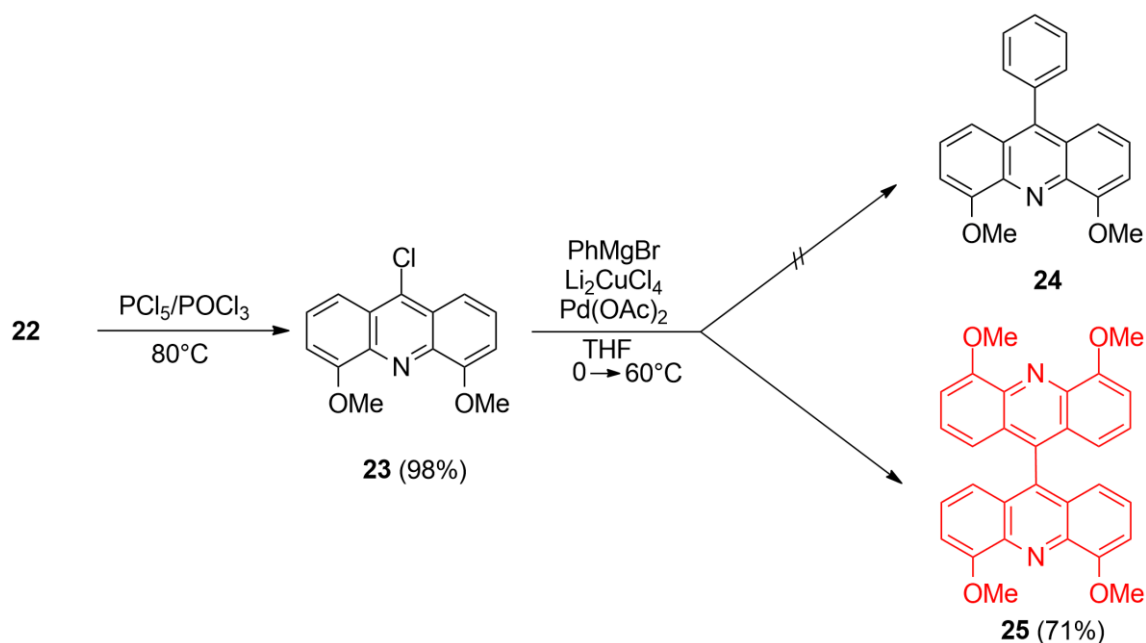


13. ábra

A 4,5-dimetoxiakridon (**22**) kulcsintermedier előállítása

A 4,5-dimetoxiakridont (**22**) foszfor-pentakloriddal és foszforil-kloriddal a megfelelő klórakridin-származékká (**23**) alakítottam egy korábban leírt módszer alapján [54], azonban javított feldolgozással (14. ábra). A reakcióelegyről lepároltam a foszforil-klorid nagy részét, mielőtt azt a trimetil-amin oldatába öntöttem volna. Ezzel a módosítással csökkentettem az eredeti módszerhez szükséges nagy feleslegben használt trimetil-amin és diklórmétán mennyiségét, valamint tisztább termékhez jutottam.

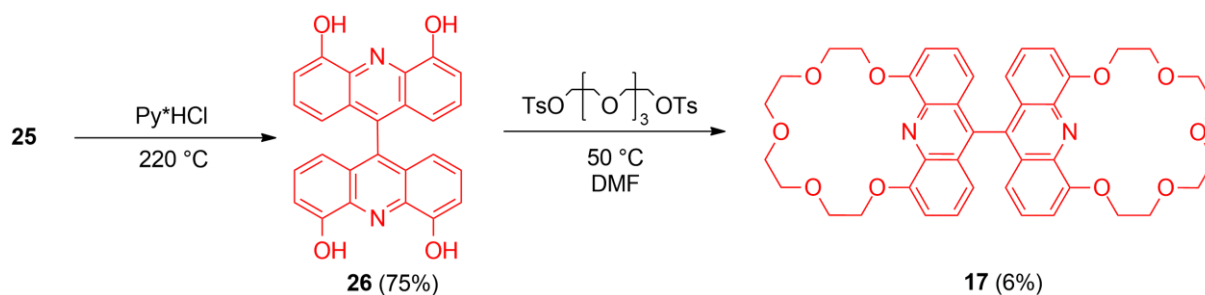
A klórakridin-származékot (**23**) ezt követően *Kharasch*-típusú keresztkapcsolási reakciónak vettem alá, dilítium-tetrakloro-kuprát és palládium-acetát katalizátorok jelenlétében, fenil-magnézium-bromiddal. A várt főtermék a 9-fenil-származék (**24**) volt (14. ábra).



14. ábra

A 9-klór-4,5-dimetoxiakridin (**23**) előállítás és a *Karasch*-típusú kapcsolási reakció, annak kívánt terméke (**24**), valamint a melléktermék (**25**) (új vegyületek pirossal jelölve)

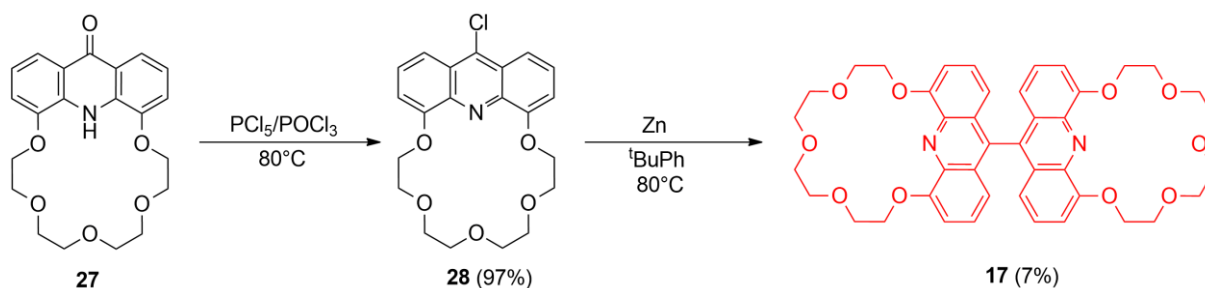
Bár a várt terméket nem sikerült előállítani, melléktermékként sikeresen izoláltam a 4,4',5,5'-tetrametoxi-9,9'-biakridint (**25**) igen jó, 71%-os termeléssel. A melléktermék azonosítása után megállapítottam, hogy az alkalmas prekursor lehet a biszmakrociklus (**17**) szintéziséhez (15. ábra). A tetrametoxi-biakridin (**25**) metilcsoportjait piridínium-kloriddal eltávolítva a tetrahidroxibiakridint (**26**) kaptam. A tetrahidroxiszármazékot (**26**) tetraetilén-glikol-ditoziláttal makrociklizáltam dimetilformamidban, kálium-karbonát bázis jelenlétében, aminek eredményeként a biszmakrociklus (**17**) képződött (15. ábra). Az izolálás utáni hozam alacsony volt (6%), ami gyakori az ilyen típusú reakciónál, különösen ebben az esetben, ugyanis a makrociklus gyűrűi többféleképpen záródhatnak. A főbb melléktermékek közé tartoztak olyan vegyületek, amelyekben a ditozilát két különböző akridin alegység hidroxilcsoportjaival lépett reakcióba, illetve olyan részlegesen reagált vegyületek, ahol csak egy gyűrű záródott be. További, kisebb mértékben képződött melléktermékek közé tartoznak az olyan vegyületek, ahol a ditozilát csak egy hidroxilcsoporttal reagált, illetve azok, amelyeknél két különböző biakridin molekula hidroxilcsoportjaival történt reakció és nem alakult ki gyűrű.



15. ábra

A bisz(koronaéter) (**17**) előállítás: a tetrametoxi-biakridin (**25**) demetilezése, majd a makrociklizáció (az új vegyületek pirossal vannak jelölve).

Egy másik módszert mutat be a biszmakrociklus (**17**) szintézisére a 16. ábra, ahol kiindulási anyagként egy korábban már előállított akridono-koronaétert (**27**) használtam [55]. Az akridino-koronaétert (**27**) foszfor-pentakloriddal foszforil-kloridban reagáltattam, melynek eredményeként a klórakridino-koronaéter (**28**) képződött (habár önmagában a foszforil-klorid is elegendő lenne, ebben az esetben foszforsav képződne a reakció során, ami a termelés csökkenéséhez vezet; ezzel szemben a foszfor-pentakloridból csak foszforil-klorid képződik a reakció során így ebben az esetben jobb termeléssel hajtható végre a reakció). A klórakridino-koronaétert (**28**) cinkporral, *tert*-butilbenzolban végzett kapcsolási reakcióval alakítottam át a biszmakrociklussá (**17**), 7%-os termeléssel.



16. ábra

Optimalizált szintézis a korábban ismertett klórakridino-koronaéter (**28**) előállításához és a **17** bisz(koronaéter) előállítása egy kapcsolási reakcióval (új vegyületek pirossal jelölve).

Az eljárás célja egy jobb reakcióút kidolgozása volt az új bisz(koronaéter) előállításához, hiszen a 15. ábrán bemutatott makrociklizáció sok mellékterméket és nehéz

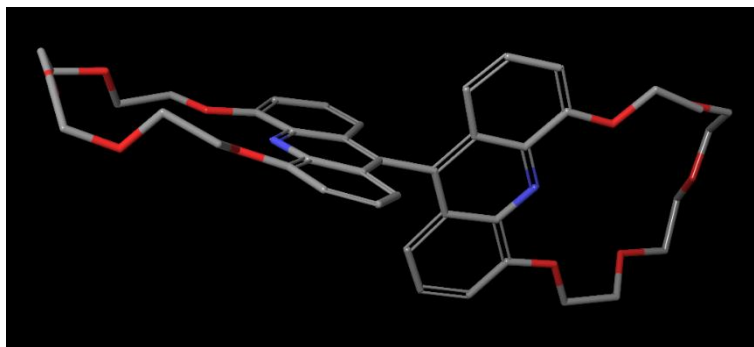
tisztítást, valamint alacsony termelést eredményez. Habár a legtöbb makrociklizációs reakció alacsony termeléssel jár, ez egy gyűrű előállítása esetén mégis jelentősen nagyobb hozamot jelent hiszen kevesebb melléktermék képződhet. Ennek megfelelően feltételeztük, hogy a gyűrű kialakítása, majd a két koronaéter összekapcsolása lenne az optimális út a gazdamolekula előállítására.

A reakció alacsony termelésének valószínű magyarázata, hogy a klórakridinokoronaéter (**28**) képes körülbelül 4 mól víz komplexálására (a nyerstermék $^1\text{H-NMR}$ [CDCl_3] spektruma alapján). A víz koordinálása az üregben gyakori jelenség a makrociklus analogonok körében [56]. Ebben az esetben a kapcsolási reakció során a víz dekomplexálódik, ami a klórvegyület (**28**) hidrolíziséhez vezet és a megfelelő akridonszármazék (**27**) keletkezik melléktermékként. Megkísértem a víz előzetes dekomplexálását a klórvegyület (**28**) alumínium-oxiddal töltött oszlopon történő átengedésével, azonban egy mól víz mindig komplex formában maradt még többszöri átengedés után is, ami csökkentette a **17** makrociklus termelését. Egyéb módszereket nem alkalmaztam a komplexált víz eltávolítására a klórvegyület (**28**) alacsony stabilitása, valamint kémiai vízelvonószerek esetén a nyerstermék tisztításának megnehezítése miatt.

4.3 A koronaéter—oligoamin komplexek *in silico* szerkezetoptimalizálása

A gazdamolekula és a vizsgált oligoaminok közötti kölcsönhatások megértése érdekében molekulamodellezést alkalmaztunk. A **17** molekula, sperminnel (**4**), spermidinnel (**3**), norspermidinnel (**5**) és a szintetikus analogon *N,N'*-bisz-(2-aminoetil)-propán-1,3-diaminnal (**30**) alkotott komplexeinek optimális konformációját sűrűségfukcionál-elméleti (DFT) számításokkal határoztuk meg.

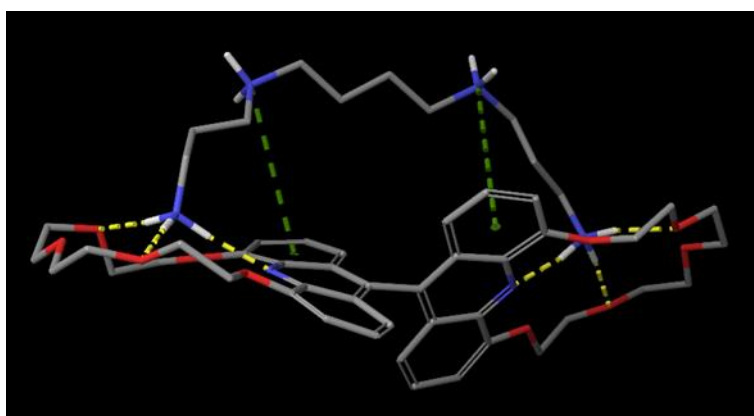
Minimális energiaszintjén a **17** gazdamolekula teljesen nyújtott konformációt vesz fel (17. ábra). Az akridinegységek síkalkata megmarad és a koronaéter gyűrűinek középpontjai az aromás síkok közelében helyezkednek el. Az akridinegységeket összekötő kötés mindkét aromás síkba illeszkedik, így a két gyűrű között nem tapasztalható elhajlás. A gazdamolekula (**17**) modellezése során meghatározott egyensúlyi konformáció jó összhangban van a biakridineknél megfigyelt konformációval [57], ahol az akridinegységek síkjai közötti szög nagyjából 80 fokos.



17. ábra

A **17** gazdamolekula optimális geometriai szerkezete DFT-számítások alapján. (A szürke, piros és kék atomok rendre a C-, O- és N-atomokat jelölik).

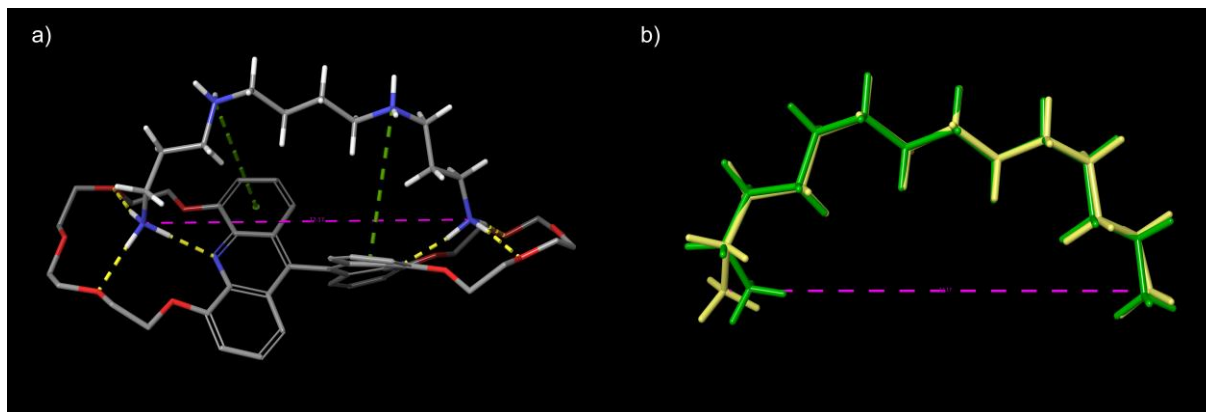
A bisz(koronaéter) (**17**) molekula sperminnel (**4**) alkotott komplexének optimalizált szerkezete (18. ábra) négy pontos kölcsönhatást feltételez. A koronaéter gyűrűi a spermin (**4**) protonált primer aminocsoportjaival lépnek kölcsönhatásba, hidrogénkötéseket kialakítva a 7. és 13. pozícióban lévő oxigénekkel, valamint az akridinegységek nitrogénjeivel. A protonált szekunder aminok az akridinegységek közelében helyezkednek el, és mindkét rész kation- π kölcsönhatásokat alakít ki az akridingyűrűkkel. A modell alapján a spermin (**4**) láncossza ideális a komplexképzéshez, mivel a **17** molekula megőrzi nyújtott konformációját, ahol mindkét koronaéter-gyűrű az akridinegységek aromás síkjában fekszik. Az akridinegységek síkjainak torziós szögében változás figyelhető meg a spermin (**4**) koordinációja során.



18. ábra

A DFT-módszerrel optimalizált geometria a **17** gazdamolekula sperminnel (**4**) alkotott komplexében. (A szürke, piros és kék atomok a C-, O- és N-atomokat, míg a sárga és zöld szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket és a kation- π kölcsönhatásokat jelölik.)

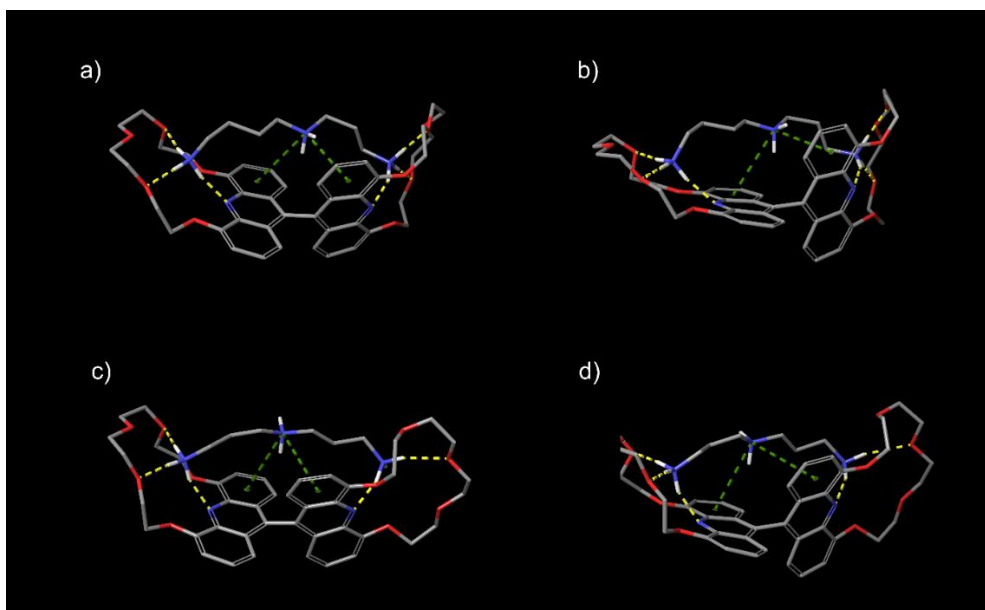
A **17** bisz(koronaéterrel) alkotott komplexben a spermin (**4**) terminális protonált primer aminocsoportjai között 12,2 Å távolság mérhető (19a. ábra). Nyilvánvaló, hogy a kötött spermin geometriája nagyon közel áll és jelentős átfedésben van a molekula minimális energiaszintű konformerével, azaz a spermin struktúrájában csak minimális feszültség lép fel a **17** gazdamolekulához való kötődés során (19b. ábra).



19. ábra

A spermin terminális protonált primer aminocsoportjai közötti távolság a **17** bisz(koronaéterrel) alkotott komplexben, amelyet lila szaggatott vonal jelöl: (a) a spermin **17** gazdamolekulához (sárga) kötött konformációja és a spermin lokális energiaminimumához tartozó konformere, amely a Schrödinger "MacroModel Minimization" funkciójával készült (zöld): (b).

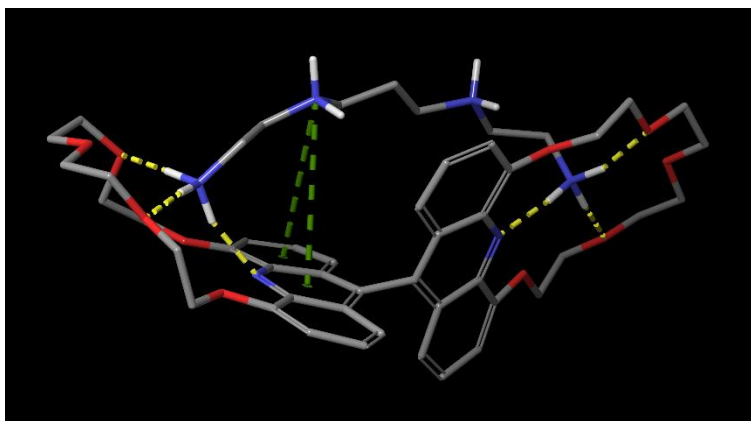
A spermidinre (**3**) és norspermidinre (**5**) meghatározott optimális koordinációjú komplexekben (20. ábra), a protonált szekunder amin rész mindkét akridinegységgel kation- π kölcsönhatásokat alakít ki, míg a protonált primer aminocsoportok a koronaéter gyűrűk heteroatomjaihoz kapcsolódnak. A rövidebb lánchosszak miatt legalább az egyik koronaéter gyűrűnek el kell fordulnia az akridinegység síkjából, hogy kötődhessen a protonált primer aminocsoportokhoz. A spermin (**4**) esetében mindkét protonált primer aminocsoport ideális pozícióban van a koronaéter gyűrűivel való koordinációhoz, azonban a norspermidin (**5**) rövidebb lánc miatt egy hidrogénkötés hiányzik a gyűrűk heteroatomjaival, mivel a lánchossz nem éri el az ideális távolságot a koordinációhoz. Az akridinegységek torzulást és hajlást mutatnak a komplexálatlan gazdamolekula optimalizált szerkezetéhez képest.



20. ábra

A **17** gazdamolekula spermidinnel (**3**): (a,b) és norspermidinnel (**5**): (c,d) alkotott komplexeinek DFT segítségével meghatározott különböző szögekben elforgatott optimális geometriái. (A szürke, piros és kék atomok rendre a C-, O- és N-atomokat, míg a sárga és zöld szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket és a kation- π kölcsönhatásokat jelölik.)

Az *N,N'*-bisz-(2-aminoetil)-propán-1,3-diamin (**30**) koordinációs komplexében a két protonált primer aminocsoport a koronaéter gyűrűk belsejében helyezkedik el, azonban csak egy kation- π kölcsönhatás figyelhető meg az egyik akridinegységgel, annak ellenére, hogy a **30** molekulának két protonált szekunder aminocsoportja van (21. ábra).



21. ábra

A **17** gazdamolekula protonált *N,N'*-bisz-(2-aminoetil)-propán-1,3-diaminnal (**30**) alkotott komplexének DFT segítségével meghatározott optimalizált geometriája (A szürke, piros és kék atomok rendre a C-, O- és N-atomokat, míg a sárga és zöld szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket és a kation– π kölcsönhatásokat jelölik.)

A protonált aminocsoportok távolsága nem ideális ahhoz, hogy egyszerre két kation– π kölcsönhatást alakítsanak ki. Az akridinegységek torziója figyelhető meg, valamint jelentős hajlás tapasztalható az aromás síkok között a szabad bisz(koronaéter) (**17**) szerkezetéhez képest.

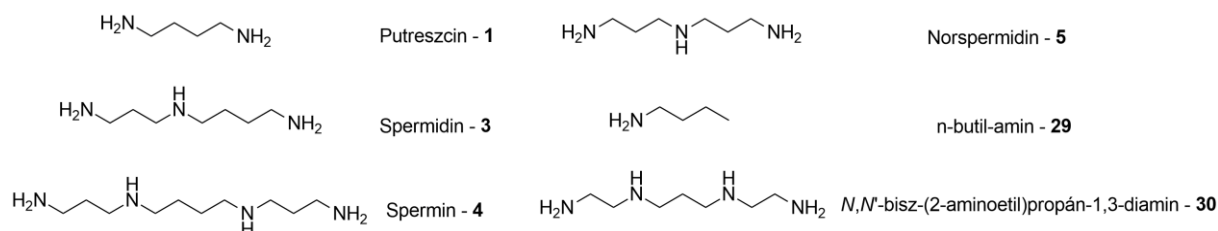
4.4 Spektroszkópiai vizsgálatok az oligoamin-felismerésről

A **17** gazdamolekula és a protonált oligoaminok közötti molekuláris felismerést fluoreszcens spektrofotometriás titrálásokkal is vizsgáltuk. A mérések céljai közé tartozott a számítógépes modellezéssel előre jelzett komplexképződési tulajdonságok megerősítése. Ugyanakkor a kísérleti eredmények feltárhatnak olyan fontos eltéréseket és hatásokat, amelyek a gyakorlatban meghatározó szerepet játszanak, de számítógépes kémiai módszerekkel nem jósolhatók meg. Továbbá az elméleti és kísérleti módszerek összehasonlítása lehetőséget nyújt arra, hogy a már feltárt összefüggések eddig még nem vizsgált potenciális vendégmolekulákra is kiterjeszthetők legyenek.

A titrálásokat szerves oldószerben, vagy 1:1 arányú acetonitril:desztillált víz elegyben végeztük. (Tisztán vizes közeg nem volt alkalmazható a gazdamolekula rossz oldhatósága miatt.) Az analitoldatokat Hamilton-fecskendővel adtuk hozzá a gazdamolekula 10^{-7} M acetonitriles oldataihoz. Az amin vendégmolekulák teljesen protonált formában voltak jelen a

vízben (hiszen pK_a értékeik $\sim 8-10$ körül mozognak). Félíg vizes közegben végzett titrálások esetén az aminok HCl-sói kerültek felhasználásra, míg a vízmentes szerves oldószerben végzett titrálások során a megfelelő semleges aminok acetonitriles oldatai lettek hozzáadva a gazdamolekula oldatához.

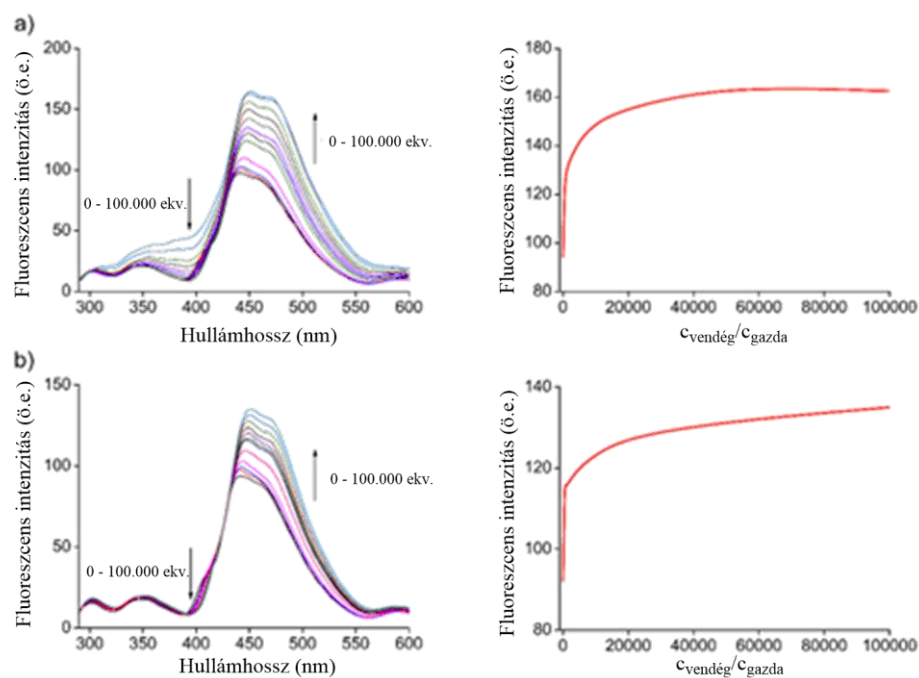
A molekuláris felismerési vizsgálatokat kiválasztott, kereskedelmi forgalomban kapható mono- és oligoamin származékokon (**1, 3, 4, 5, 29, 30**) végeztük, amelyek nagy része biológiailag is releváns vegyület. A vizsgált anyagok képletei a 22. ábrán láthatók.



22. ábra

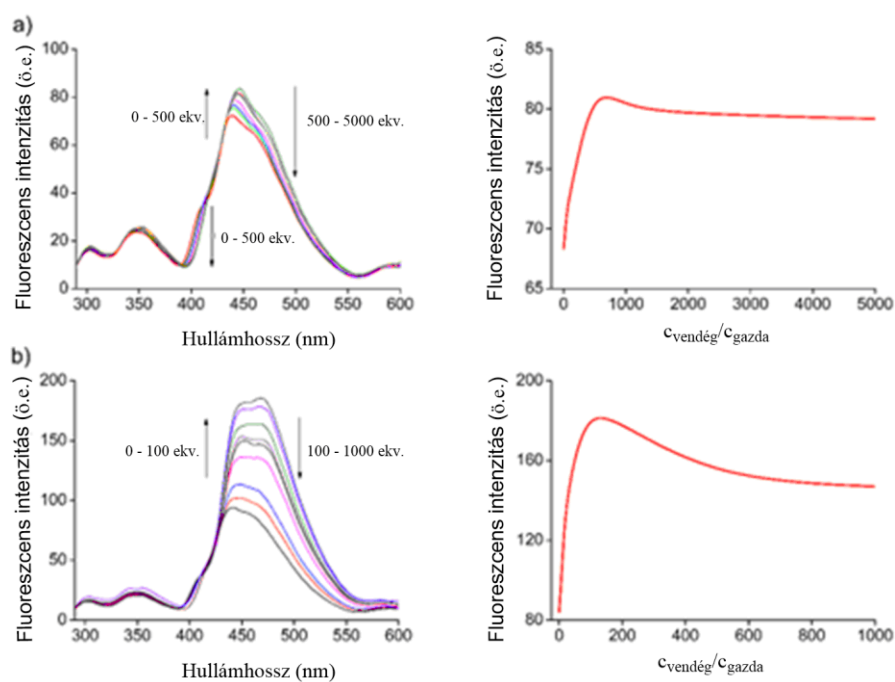
A spektrofluorimetriás molekuláris felismerési vizsgálatokhoz felhasznált mono- és oligoamin vendégmolekulák

A spektrofluorimetriás titrálásokat a vendégmolekulák széles koncentrációtartományában végeztük el. Az aminok felismerése során a gazdamolekula szerkezeti preferenciájának és komplex-sztöchiometriájának meghatározása és a stabilitási állandók kiszámítása érdekében globális nemlineáris regressziót alkalmaztunk a titrálási adatsorokon. A modellek illeszkedésének megfelelőségét statisztikai F -próbával ellenőriztük. A regressziós módszerekkel kapcsolatos részletes információk a Kísérleti részben (5. A kísérletek részletes leírása) találhatóak. Az eredmények a 23–25. ábrákon láthatóak.



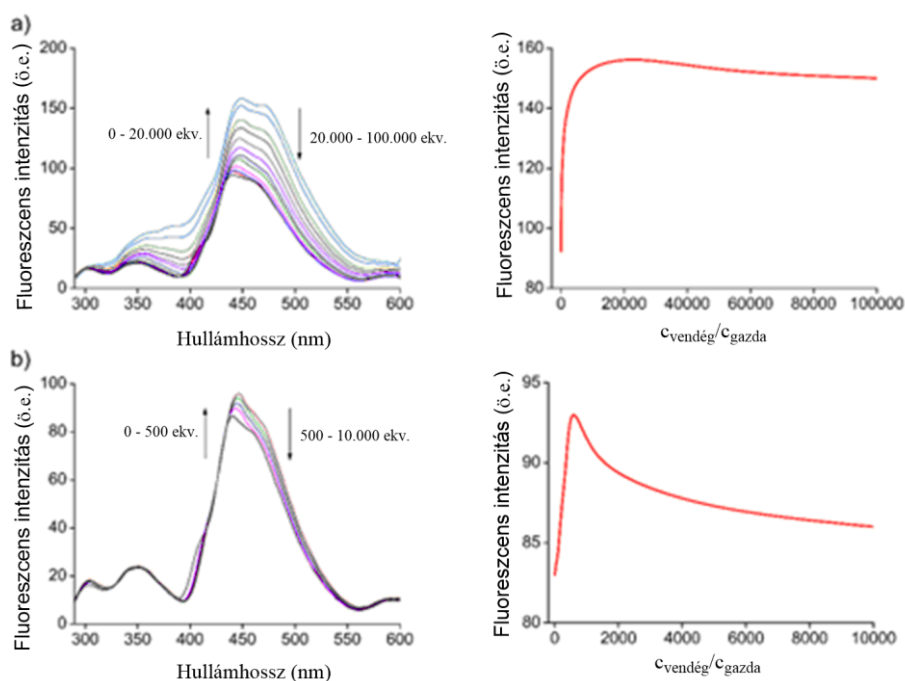
23. ábra

A **17** vegyület mono- és diaminokkal végzett titrálásának fluoreszcens emissziós spektrumsorozata (bal oldalon) és a hozzá tartozó globális nemlineáris regresszió a vendégmolekulák koncentrációjának függvényében (jobb oldalon) [(a) butil-amin (**29**); (b) putreszcin (**1**)].



24. ábra

A **17** bisz(koronaéter) triaminokkal végzett titrálásának fluoreszcens emissziós spektrumsorozata (bal oldalon) és a hozzá tartozó globális nemlineáris regressziós görbe a fluoreszcencia emissziós adatsor alapján a vendégmolekulák koncentrációjának függvényében (jobb oldalon) [(a) norspermidin (**5**); (b) spermidin (**3**)].



25. ábra

A **17** bisz(koronaéter) tetraaminokkal végzett titrálásának fluoreszcens emissziós spektrumsorozata (bal oldalon) és a hozzá tartozó globális nemlineáris regressziós görbe a fluoreszcencia emissziós adatsor alapján a vendégmolekulák koncentrációjának függvényében (jobb oldalon) [(a) *N,N'*-bisz(2-aminoetil)-1,3-propándiamin (**30**); (b) spermin (**4**)].

A titrálási adatokon végzett regressziós elemzések alapján kapott komplex-sztöchiometria és a stabilitási állandók számításának eredményeit az 1. táblázatban foglaltam össze. A komplex sztöchiometriák nincsenek külön feltüntetve a táblázatban, mivel minden esetben 1:1 arányú, majd egy következő lépésben 1:2 arányú (gazda-vendég) komplexek képződése volt megfigyelhető. Ez nem meglepő, hiszen a gazdamolekula két makrociklust tartalmaz fő kötőhelyekként, ezen kívül egyéb lehetőségeket is kínálva további intermolekuláris nem-kovalens kötőerők kialakítására. Ennek megfelelően nyilvánvaló, hogy az eltérő sztöchiometriájú koordinációk esetében fellépő kooperativitás jelentős hatással van a komplexképződési egyensúlyra.

1. Táblázat: A számított komplexstabilitási állandók és a kötődésbeli kooperativitás a konszekutív amin-koordinációhoz tartozó 1:1 és 1:2 (gazda-vendég)-komplexek kialakulása során

Amin vendégmolekula ¹	logK ₁ ²	logK ₂ ³	Kooperativitási effektus a komplexbépzés során ⁴
n-butyl-amin (29)	2,1 ± 0,2	<<2,0	nem-kooperatív
putreszcin (1)	2,6 ± 0,2	<<2,0	nem-kooperatív
N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propándiamin (30)	3,7 ± 0,2	3,0 ± 0,2	nem-kooperatív
norspermidin (5)	5,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	nem-kooperatív
spermin (4)	5,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	negatív kooperativitás (α = 0,6)
spermidin (3)	5,5 ± 0,1	4,8 ± 0,1	nem-kooperatív

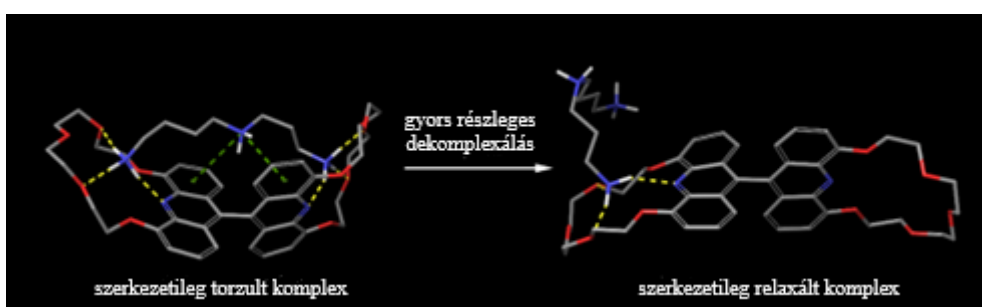
¹ HCl só formájában hozzáadva a vizes oldathoz (ahol minden aminocsoport teljesen protonált és Cl⁻ ellenionnal rendelkezik.) ² Az 1:1 arányú (gazda-vendég)-komplexek stabilitási állandója a koordináció első lépéseként. ³ Az 1:2 arányú (gazda-vendég)-komplexek stabilitási állandója a koordináció második lépéseként. ⁴ Szakirodalom [57] alapján számolva, ahol $K_1 = 4 \cdot K_2$ konszekutív, nem kooperatív kötődést jelent, míg az α a kooperativitás mértékét fejezi ki.

A számítások alapján a következő stabilitási sorrend állapítható meg: spermidin~spermin (3, 4) > norspermidin (5) > N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propándiamin (30) > putreszcin (1) > n-butyl-amin (29). A legtöbb esetben nem lépnek fel kooperatív hatások, mivel a gazdamolekula homotróp rendszert alkot két szerkezetileg ekvivalens kötőhellyel. Mivel a gazdamolekula két makrociklus gyűrűje egymástól elkülönül, az egyik gyűrű elfoglalása gyakorlatilag nem befolyásolja a másik koordinációs képességét, így legfeljebb két vendég aminmolekula képes egyidejűleg és függetlenül kötődni. Az első komplexált aminmolekula rögzíthető további, nem kovalens kölcsönhatásokkal a komplexen belül, így az ehhez tartozó logK₁ értékek magasabbak lesznek. A második aminmolekula koordinációja azután kezdődik, hogy a gazdamolekula kialakított egy 1:1 sztöchiometriájú komplexet, tehát konszekutív kötődési folyamatról van szó. Ezt a viselkedést a megfigyelt spektrális változások is alátámasztják, ugyanis az 1:2 komplexek a második koordinációs lépésnél ellentétes irányú

spektrális változást okoznak. Ez a jelenség valószínűleg az első koordinált ammóniumegységgel létrejött kation- π kölcsönhatás(ok) megszűnésének és a távolabbi akridingyűrű jelenlétének tulajdonítható a második makrociklusos üreg elfoglalásakor. Ugyanakkor a kation- π kölcsönhatás jelentősen gyengébb, mint a makrociklus üregben lévő hárompontos hidrogénkötés, így az első vendégmolekula komplexálása nem akadályozza lényegesen a második vendégmolekula befogadását.

Az egyetlen kivétel kooperativitás szempontjából a spermin (4) komplexálásának során lépett fel, ahol a regressziós elemzés negatív kooperativitást mutatott ki a második vendégmolekula koordinálása során [1:2 (gazda-vendég) komplex-sztöchiometria]. Ez a spermin (4) nagyobb lánchosszának tulajdonítható a többi oligoamin analogonokhoz képest, amely lehetővé teszi, hogy az ellenoldali terminális protonált primer aminocsoportja a második makrociklus gyűrűhöz kapcsolódjon anélkül, hogy jelentős szerkezeti torzulást okozna (lásd 18. ábra). Bár az első ammóniumcsoport komplexálása akadályozza a második csoportot abban, hogy a másik makrociklus gyűrű üregébe illeszkedjen, úgy tűnik, hogy ez csak enyhe hatás, mivel a versengő további vendégmolekulák képesek lehetnek kiszorítani a korábban komplexált csoportot a makrociklus-üregek egyikéből.

Ez utóbbi jelenség nem fordulhat elő rövidebb láncú aminok esetében, mert az 1:1 kezdeti sztöchiometria esetén a kettős kötődéssel járó komplexálás a gazdamolekula szerkezetének konformációs torzulását okozza, amely során a koronaéter gyűrűk kissé egymás felé mozdulnak el. Ennek eredményeként csökken a komplex kinetikai stabilitása, amit a modellezés is alátámaszt (26. ábra).



26. ábra

Az 1:2 (gazda-vendég) sztöchiometriájú komplexek csökkent kinetikus stabilitása a spermidin (3) koordinálásának példáján

Végül az egyik terminális primer ammóniumcsoportot elengedi a makrociklus gyűrűk egyike, amit a gazdamolekula konformációs relaxációja követ. A modellezésnek megfelelően

a másik terminális primer ammóniumcsoport a gyűrű üregében marad a komplex részleges disszociációját követően is. Ezek alapján a két láncvég rövidtávú komplexálása okozza a kooperációs effektus hiányát az 1:2 (gazda-vendég) arányú komplexek képződése során, a sperminnél rövidebb láncú aminok esetében.

Más sztöchiometriájú komplexek képződését nem figyeltük meg. Ez nem meglepő, mivel két protonált aminrésznél több csak kation- π kölcsönhatások révén koordinálható a szabadon hozzáférhető heteroaromás régiókkal. Mivel a 18-korona-6-éter-típusú gyűrű ürege pontosan illeszkedik a primer ammóniumion méretéhez [44,45], a vendégmolekula akridinegységekhez való közelítéskor csak a hárompontos hidrogénkötésnél gyengébb kölcsönhatások jöhetnek létre.

A második lépésben kialakuló komplexek stabilitási állandói kisebbnek bizonyultak, mint az 1:1 arányú komplexé, ami szintén megfelel a konszekutív kötődési modellnek. Azokban az esetekben, amikor a $\log K$ értékek nem érték el a 2,0-t, a titrálási adatsorokon alkalmazott illesztési módszerek bizonytalansága jelentősen növekedett, így pontos stabilitási értékeket nem lehetett meghatározni. Azonban ezeknek az instabil komplexeknek a kölcsönhatásai túl gyengék ahhoz, hogy bármilyen gyakorlati alkalmazásban használhatók legyenek.

Néhány stabilitási állandó igen stabil komplexálásra utal a reverzibilisen komplexálódó gazda és vendégmolekulák között ($\log K > 5$). Bár az alifás oligoaminok magas fokú konformációs szabadsága az entrópia szempontjából nem kedvez a komplexálásnak, a több protonált aminrész és az elektronban gazdag akridinegységek hatékonyan stabilizálják a komplexet azáltal, hogy növelik a koordinatív kölcsönhatások számát.

Az első vizsgált amin a butil-amin (**29**) volt, amely az oligoaminok legegyszerűbb szerkezeti alegysége. Ebben az esetben csak a vendég primer ammóniumcsoportjának komplexálása történhet meg a gazdamolekula gyűrűjével. Az irodalmi analógiák szerint [50] a komplexben hárompontos hidrogénkötés alakul ki a vendégmolekula ammóniumprotonjai, valamint a nukleofil akridin-*N* atom és a gazdamolekula két alternáló pozíciójú éteres oxigénatomja között. Nyilvánvaló, hogy a gazdamolekula merev szerkezete miatt csak egy makrociklus üreg vehet részt a komplexálásban. Ennek megfelelően jelentősen kisebb komplexstabilitási állandó várható, mint az oligoaminok esetében. Ahogy növeljük az oligoamin lánc hosszát, további kölcsönhatások lehetősége nyílik meg. A komplexált primer ammóniumcsoportokon kívül a protonált szekunder amin részek egy vagy két akridinegységgel alakíthatnak ki kation- π kölcsönhatásokat, az oligoamin lánc hosszától

függően. Ezzel párhuzamosan a megfelelő komplexek stabilitása folyamatosan növekszik (lásd 1. táblázat).

Továbbá, meghatároztuk a stabilitási állandókat protonátlan aminoszavakkal végzett titrálással is. Jól ismert, hogy a pozitív töltés hiánya kisebb komplexstabilitási állandót eredményez, ha a koordináció egyáltalán fellép [44,45]. Mivel az akridinegységek delokalizált π -elektronrendszerével létrejövő további koordinatív kölcsönhatások is hiányoznak, az eredmények nagyságrendekkel kisebb stabilitási állandókat mutattak (2. táblázat).

Fontos megjegyezni, hogy a víznyomok jelenlétét nem tudtuk teljesen kizárni, valamint, hogy a titrási kísérleteket nem inert légkörben végeztük. Habár a protonátlan vendégmolekulák részleges protonálódása bekövetkezhetett, ezek a kísérletek becslésként szolgálhatnak a víz más oldószerekkel való helyettesítésének hatásaira. Megállapítható, hogy a nem protonált aminoszavak stabilitási állandóinak értékei legalább egy nagyságrenddel csökkentek. Ugyanakkor ezeknek a bioaktív molekuláknak a vízmentes közegben történő vizsgálata a gyakorlatban ritkán releváns.

2. Táblázat: A számított komplexstabilitási állandók és a kötődésbeli kooperativitás a konszekutív amin-koordinációhoz tartozó 1:1 és 1:2 (gazda-vendég)-komplexek kialakulása során protonátlan aminoszavak esetében

Amin vendégmolekula ¹	$\log K_1$ ²	$\log K_2$ ³	Kooperativitási effektus a komplexképzés során ⁴
n-butyl-amin (29)	1,5±0,2	<<1,5	nem kooperatív
putreszcin (1)	1,7±0,2	<<1,7	nem kooperatív
N,N'-bisz(2-aminoetil)-1,3-propándiamin (30)	2,0±0,2	<<2,0	nem kooperatív
norspermidin (5)	2,8±0,2	<<2,0	nem kooperatív
spermin (4)	4,4±0,1	3,6±0,1	negatív kooperativitás ($\alpha=0,6$)
spermidin (3)	4,8±0,1	4,2±0,2	nem kooperatív

¹ Acetonitriles oldatban, protonátlan, aminoszavakban adtuk hozzá.² A komplex stabilitási állandója 1:1 (gazda:vendég) sztöchiometriájú komplexek esetében a koordináció első lépéseként.³ A komplex stabilitási állandó 1:2 (gazda:vendég) sztöchiometriájú komplexek esetén a koordináció második lépéseként.⁴ [58] szerint számítva, ahol $K_1 = 4K_2$ nem kooperatív konszekutív kötésre utal, míg α a kooperativitás mértékét fejezi ki.

5 A kísérletek részletes leírása

5.1 A felhasznált anyagok, preparatív eljárások és az új vegyületek karakterizálása

A kiindulási anyagokat és reagenseket a Sigma-Aldrich cégtől (USA, a Merck, Darmstadt, Németország tulajdona) vásároltuk és tisztítás nélkül használtuk fel, hacsak másképp nem jeleztük. A vékonyréteg-kromatográfiához (VRK) Silica Gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Németország) és alumínium-oxid 60 F254 semleges típusú E (Merck, Németország) lapokat használtunk. Minden reakciót VRK-val követtünk, és a vegyületek foltjait UV-lámpával tettük láthatóvá. Az oszlopkromatográfiához szilikagél 60 (70–230 mesh, Merck) és alumínium-oxid 60 F254 semleges típusú E (Merck, Németország) állófázisokat alkalmaztunk. A preparatív vékonyréteg-kromatográfiás (PVRK) tisztításokat 2 mm vastagságú szilikagél 60 F254 (Merck, Németország, cikkszám: 1.05744) vagy 0,25 mm vastagságú alumínium-oxid 60 F254 semleges típusú E (Merck, Németország, cikkszám: 1.05727) lemezekon végeztük. A bepárlást csökkentett nyomáson végeztük, hacsak másként nem jeleztük. Az eluensek oldószerarányait térfogatban (mL/mL) adtuk meg.

Az új vegyületeket fizikai állandóik alapján jellemeztük, mint például az olvadáspont, vékonyréteg-kromatográfiás retenciós faktor (R_f), IR, ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektroszkópia, valamint HRMS spektrometria. Az olvadáspontokat Boetius típusú mikro-olvadáspont mérő készüléken határoztuk meg. Az infravörös spektrumokat Bruker Alpha-T FT-IR spektrométerrel (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) rögzítettük. A ^1H - (300 MHz) és ^{13}C - (75 MHz) NMR spektrumokat Bruker 300 Avance spektrométeren (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) vettük fel. A ^1H - (500 MHz) és ^{13}C - (125 MHz) NMR spektrumokat Bruker DRX-500 Avance spektrométeren (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) készítettük. A HRMS elemzést lézeres gyors elpárologtatású ionizációs tömegspektrometriás (LA-REIMS) rendszeren végeztük. A LA-REIMS technológia közvetlenül elemzi az aeroszoloikat, amelyeket lézerrel generálnak (OPOTEK OPO lézer, $\lambda = 2940$ nm, 5 mJ/pulzus, 20 Hz, 6 ns pulzusszélesség). Az aeroszol ezután a REIMS ionforrásba jut. A tömegspektrométerbe való belépés előtt a generált gőz propán-2-ollal keveredik, amely leucin-enkefalint tartalmazott, mint rögzített tömegű referenciaanyagot. A leucin-enkefalin koncentrációja 0,5 ng/mL volt, a folyadékáramlási sebesség pedig 0,15 mL/perc. A nyers adatokat egy XevoTM G2-XS TOF-MS (Waters Corporation, Wilmslow, UK) készülékkel rögzítettük. A spektrumokat pozitív ion módban vettük fel. A rögzített tartomány 50–1200

m/z volt, 0,5 s/scan sebességgel. Az adatok feldolgozásához a MassLynx V4.2 szoftvert használtuk.

5.2 Molekulamodellezés és szerkezetoptimalizálás

Minden számítást a Schrödinger Suites 2019-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) moduljaival végeztünk a Maestro programban. A bisz(koronaéter) és az oligoaminok 3D szerkezeteit a LigPrep segítségével generáltuk pH = 7,4 értéken, az OPLS3e erőter alkalmazásával. Az oligoaminokat manuálisan dokkoltuk a gazdamolekulához teljesen protonált formában. A komplexeket minimális energiaszintű konformációba hoztuk, és a molekuladinamikai szimulációkhoz vízdobozokat hoztunk létre. A ligandumok nettó pozitív töltését kloridionokkal ellensúlyoztuk. Az SPC (*Simple Point Charge*) oldószermodellt alkalmaztuk. A határokat mindegyik tengely mentén 10 Å-re állítottuk be a komplexektől, így egy „ortorombikus doboz” jött létre. A rendszerek relaxációjához a szimuláció előtt a Desmond féle standard relaxációs folyamatot alkalmaztuk.

Az MD (molekuladinamikai) szimulációk első képkockájából nyert komplexeket választottuk ki a szerkezetoptimalizáláshoz. A vízmolekulákat és a kloridionokat eltávolítottuk. A komplexek szerkezetoptimalizálását sűrűségfukcionál-elmélettel (DFT) végeztük, a B3LYP-D3 funkcionál alkalmazásával. Az optimalizálásokat analitikai pontossággal hajtottuk végre. A számításokat PBF (*Poisson-Boltzmann Finite element*) oldószermodell és víz, mint oldószer alkalmazásával végeztük.

5.3 A molekuláris felismerés spektroszkópiai vizsgálatai

Az UV-Vis spektrumokat egy UNICAM UV4-100 spektrofotométeren vettük fel, amelyet a VIZION 3.4 szoftver (ATI UNICAM, Knutsford, Egyesült Királyság) vezérelt. A fluoreszcencia emissziós spektrumokat Perkin-Elmer LS 50B lumineszcens spektrométeren (PerkinElmer Inc., USA) vettük fel, és az FL Winlab 3.0 spektrométer szoftverrel (PerkinElmer Inc., Shelton, CT, USA) korrigáltuk. Minden esetben 1 cm-es úthosszúságú kvarcküvetákat használtunk. A spektroszkópiai méréseket szobahőmérsékleten (25 ± 1 °C) végeztük. Polárszűrőket nem alkalmaztunk. A titrálási kísérleteknél 290 nm-es sávszűrőt és 10 nm-es gerjesztési és emissziós réseket használtunk. Az oldatokat Hamilton-fecskendővel adtuk a ligandum 10^{-7} M-os acetonitriles oldataihoz. Az eredményeket korrigáltuk a háttérjel és a hozzáadott oldatok okozta hígítás figyelembevételével. Az analitot addig adagoltuk, amíg állandó optikai jelet nem észleltünk, ezt az állapotot tekintettük a titrálási kísérlet

végpontjának. A fluoreszcencia-mérések esetében 265 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmaztunk, amely megfelel a gazdamolekula abszorpciós csúcsmaximumához tartozó hullámhosszértékének.

A komplexek stabilitási állandóit (K) globális nemlineáris regressziós elemzéssel határoztuk meg. A komplex stabilitási állandójának meghatározásához a komplexképződéskor megfigyelt fluoreszcencia intenzitásnövekedés alapján a következő egyenletet alkalmaztuk [58]:

$$F = I_0 \Phi \epsilon b [X] = k_X [X], \quad (1)$$

ahol F a mért fluoreszcencia-intenzitás, I_0 az emisszió intenzitása, Φ a fluoreszcencia-kvantumhatásfok, ϵ a moláris abszorpciós együttható, b az optikai úthossz, $[X]$ az X vegyület moláris koncentrációja, és k_X az X vegyület optikai tulajdonságaitól függő konstans.

Az 1:1 sztöchiometriájú komplexek esetében az asszociációs állandó a következő egyenlet alapján számítható ki [58]:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{k_H/k_H^0 + (k_{HG}/k_H^0)K_a[G]}{1 + K_a[G]}, \quad (2)$$

ahol a k paraméterek és a K arányát az illesztési módszer során változó paraméterként hagytuk. Az F és F_0 paraméterek hullámhosszfüggő változók, és a $[G]$ is változóként lett megadva. F_0 a szabad gazdamolekula kezdeti fluoreszcencia-intenzitására utal, k_H a szabad gazdamolekula optikai tulajdonságaira utaló konstans, k_H^0 a szabad gazdamolekula optikai tulajdonságaira utaló konstans a preferált vendégmolekulák jelenlétében, a k_{HG} konstans a komplex fotofizikai tulajdonságait írja le, K az asszociációs állandó, $[G]$ pedig a kezdeti vendégmolekulák koncentrációja.

A globális nemlineáris illesztést hasonlóan végeztük el az 1:2 (gazda:vendég) sztöchiometriájú komplexek esetében is a következő egyenlet alapján [58]:

$$\Delta F = \frac{k_{\Delta HG}[H]_0 K_1 [G] + k_{\Delta HG_2}[H]_0 K_1 K_2 [G]^2}{1 + K_1 [G] + K_1 K_2 [G]^2} \quad (3)$$

ahol ΔF a fluoreszcencia változása a titrálási lépések során, $k_{AHG} = k_{HG} - k_H$, $[H]_0$ a gazdamolekula kezdeti koncentrációja, K_1 a komplexképződés első lépésére, míg K_2 a komplexképződés második lépésére vonatkozó stabilitási állandó.

A komplex-sztöchiometriák meghatározását is a korábban ismertetett globális nemlineáris illesztési módszerek alkalmazásával végeztük el. Ezeket az eredményeket a titrálási adatsorra történő illeszkedés jósága szempontjából hasonlítottuk össze a legkorszerűbb irodalmi ajánlások [59,60] szerint. A modell kiválasztását statisztikai F -próba segítségével végeztük, amelynek célja a négyzetösszegek vizsgálata volt minden modellillesztés esetében. Az 1:1 és 1:2 (gazda:vendég)-sztöchiometriákra vonatkozó képletek esetében a megfigyelt F -értékek 95%-os konfidenciaszinten alátámasztották a nullhipotézist, ahol az illesztett modell a kísérleti adatok sokaságának jellemzésére alkalmas összefüggést írt le. Ezzel szemben a többi sztöchiometriára vonatkozó modellek esetében a próba azt mutatta, hogy az alkalmazott modellek nem illeszkedtek a kísérleti adatokhoz.

Mivel minden esetben 1:1 és 1:2 (gazda:vendég) konszekutív koordinációt tartalmazó összetett kötődési modellt kaptunk, a titrálási görbék két ellentétes meredekségű fluoreszcencia-válaszgörbe-szakasza (intenzitásnövekedéssel járó fluoreszcencia-válasz és az azt követő részleges kioltás) jól illeszthető a következő két matematikai összefüggés lineáris kombinációival (a (2) és (3) egyenletek súlyozott összege, kisebb átrendezésekkel [58]):

$$F = c(F_0 \frac{k_H/k_H^0 + (k_{HG}/k_H^0)K_a[G]}{1+K_a[G]}) + (1-c)[F_0 - (F_0 - F_c) \frac{[H]_0 + [G] + \frac{1}{K_a} \sqrt{([H]_0 + [G] + \frac{1}{K_a})^2 - 4[H]_0[G]}}{2[H]_0}], \quad (4)$$

ahol c a lineáris együttható, amely a $[G]$ függvényében változik, míg F_c a teljesen komplexált gazdamolekula fluoreszcenciája.

A spektrofotometriai mérések kiértékelésére az OriginPro 8.6 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) szoftvert alkalmaztuk.

5.4 A vegyületek szintézise

5.4.1 2-Nitro-3-metoxibenzoésav (**19**)

Frissen desztillált ecetsavanhidrid (23 ml) és frissen desztillált nitrometán (23 ml) keverékében feloldjuk a 3-metoxibenzoésavat (**18**) (5,00 g; 32,9 mmol). Sós-jeges hűtéssel - 10 és 0 °C közé hűtjük a reakcióelegyet, majd becsepegtetjük a 100%-os salétromsav (2 ml) és cc. kénsav (2 ml) előre összekevert elegyét. A becsepegtetés megkezdésekor beoldódik a szilárd anyag, majd a vége fele fehér csapadék válik ki az oldatból. Amennyiben beadagoltuk a nitrálóelegyet (~1 óra) tovább kevertetjük a reakcióelegyet 2 órán át, majd felengedjük a hőfokot szobahőmérsékletig és a reakcióelegyet (200 ml) jeges vízre öntjük. A vizes szuszpenziót egy éjszakán át hűtőben tároljuk (~5 °C). A csapadékot szűrjük, majd vízzel mossuk. A nyersterméket butil-acetátból történő átkristályosítással tisztítjuk, így fehér kristályos anyagként kapva a terméket (2,59 g; 40%) $R_f = 0,25$ (szilícium-dioxid VRK, 1:30 ecetsav/toluol, 2x futtatva).

A 2-nitro-3-metoxibenzoésav (**19**) karakterizálására vonatkozó egyéb adatok megegyeztek az irodalomban korábban közöltekkel [55].

5.4.2 2-Amino-3-metoxibenzoésav (**20**)

A 2-nitro-3-metoxibenzoésavhoz (**19**) (5,00 g; 25,4 mmol) és 10%-os Pd/C katalizátorhoz (1,00 g) frissen desztillált metanolt adagolunk (300 ml) argon atmoszféra alatt. A reakcióelegyhez intenzív kevertetés mellett hidrogént vezetünk, amíg annak fogyása meg nem áll (3 óra). A reakció végeztével az elegyet szűrjük, majd bepárlással eltávolítjuk az oldószert. A nyerstermék további tisztítás nélkül felhasználható a következő reakcióban. A fehér kristályos terméket közel elméleti termeléssel kapjuk (4,16 g; 98%). $R_f = 0,48$ (szilícium-dioxid VRK, 1:30 ecetsav/toluol).

A 2-amino-3-metoxibenzoésav (**20**) karakterizálására vonatkozó egyéb adatok megegyeztek az irodalomban korábban közöltekkel [55].

5.4.3 3-Metoxi-2-((2-metoxifenil)amino)benzoésav (**21**)

2-Amino-3-metoxibenzoésavat (**20**) (7,65 g; 45,8 mmol) 2-brómanizolt (9,42 g; 56,4 mmol) és finomra porított izzított kálium-karbonátot (6,12 g; 44,3 mmol)

dietilénlglikol-dimetil-éterben (27 ml) oldunk, majd hozzámérünk rézport (125 mg; 2,0 mmol) és réz(I)-oxidot (125 mg; 0,9 mmol). A reakcióelegyet 160 °C-on kevertetjük 5 órán át, majd eltávolítjuk az oldószert és a visszamaradt anyagot etil-acetátban (200 ml) és desztillált vízben (200 ml) megosztjuk. A vizes oldat pH-ját hangyasavval 3-ra állítjuk, majd a vizes fázist etil-acetáttal (3 x 200 ml) extraháljuk. Az egyesített szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük majd bepárlással eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket xilolból átkristályosítva tisztítjuk. A terméket citromsárga kristályként kapjuk (9,06 g; 59%). $R_f = 0,30$ (szilícium-dioxid VRK, 1:20:40 ecetsav/etil-acetát/ciklohexán).

A 3-metoxi-2-((2-metoxifenil)amino)benzoesav (**21**) karakterizálására vonatkozó egyéb adatok megegyeztek az irodalomban korábban közöltekkel [55].

5.4.4 4,5-Dimetoxiakridon (**22**)

A 3-metoxi-2-((2-metoxifenil)amino)benzoesavat (**21**) (9,06 g; 33,2 mmol) polifoszforsavban (124,60 g) kevertetjük 130 °C-on 3 órán át, majd a reakcióelegyet forrón 80 °C-os desztillált vízbe (1500 ml) csurgatjuk intenzív keverés mellett. A csapadékot szűrjük és desztillált vízzel (3 x 150 ml) mossuk. A nyersterméket dimetilformamidból átkristályosítva tisztítjuk. A terméket citromsárga kristályként kapjuk (4,06 g; 48%). $R_f = 0,27$ (szilícium-dioxid VRK, 1:20:40 ecetsav/etil-acetát/ciklohexán).

A 4,5-dimetoxiakridon (**22**) karakterizálására vonatkozó egyéb adatok megegyeztek az irodalomban korábban közöltekkel [55].

5.4.5 9-Klór-4,5-dimetoxi-akridin (**23**)

4,5-Dimetoxiakridont (**22**) (1,50 g, 5,9 mmol) és foszfor-pentakloridot (3,68 g, 17,7 mmol) foszforil-kloridban (8 ml, 88,2 mmol) oldjuk, majd az elegy hőmérsékletét 90 °C-ra emeljük, és ezen a hőmérsékleten 4 órán keresztül kevertetjük argon atmoszféra alatt. Az illékony komponenseket eltávolítjuk, a visszamaradt anyagot pedig diklórmétánban (100 ml) oldjuk. Ezt az oldatot lassan, erőteljesen kevert 40 m/m%-os vizes trimetil-amin-oldatba (50 ml) öntjük, külső sós-jeges hűtéssel biztosítva, hogy a reakcióelegy belső hőmérséklete 5 °C alatt maradjon. A felesleges foszforil-klorid semlegesítése után a fázisokat elválasztjuk, majd a vizes fázist diklórmétánnal (5 × 50 ml) extraháljuk. A kombinált szerves fázist

magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük és bepárlással eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítjuk alumínium-oxidon, diklórmétán/hexán 1:1 elegyét alkalmazva eluensként. A sárga kristályos terméket közel elméleti termeléssel kapjuk (1,58 g; 98%). $R_f = 0,48$ (szilícium-dioxid TLC, etil-acetát).

A 9-klór-4,5-dimetoxiakridin (**23**) karakterizálására vonatkozó egyéb adatok megegyeztek az irodalomban korábban közöltekkel [54,55].

5.4.6 4,4',5,5'-Tetrametoxi-9,9'-biakridin (**25**)

A klórakridin (**23**) (1,98 g, 7,2 mmol) száraz és tiszta tetrahydrofuranban (40 ml) készült, intenzíven kevert szuszpenzióját $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtjük argon atmoszféra alatt, majd hozzáadunk 113,8 mg palládium-acetátot (0,5 mmol, 0,07 ekv.). Frissen készített fenil-magnézium-bromidot (2 M dietil-éterben, 6,00 ekv.) és dilítium-tetraklórkuprátot (0,1 M THF-ben, 0,01 ekv.) adunk a keverékhez cseppenként, miközben a hőmérsékletet 0 és $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ között tartjuk. Az elegy beadagolása után a reakcióelegyet hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, majd a hőmérsékletet $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra emeljük, és 20 órán át ezen a hőfokon tartjuk. Ezt követően a reakcióelegyet $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtjük. Az illékony komponenseket eltávolítjuk, majd a visszamaradt anyagot etil-acetátban (50 ml) és telített ammónium-klorid vizes oldatában (50 ml) oldjuk fel. A fázisokat alaposan összerázzuk, majd szétválasztjuk. A szilárd csapadékot a szerves fázisból leszűrjük, majd etil-acetáttal mossuk át. Az etil-acetátos fázist vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, majd bepárlással eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk szilikagélén, metanol/etil-acetát 1:100 arányú elegyét alkalmazva eluensként. A tiszta terméket sárgásbarna kristályok formájában kapjuk (1,22 g; 71%).

Op.: $336\text{ }^{\circ}\text{C}$ (bomlik), $R_f = 0,7$ (szilikagél VRK, diklórmétán/metanol 30:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 7,22 (t, $J = 10\text{ Hz}$, 4H), 7,02 (d, $J = 10\text{ Hz}$, 4H), 6,60 (d $J = 10\text{ Hz}$, 4H), 4,20 (s, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 155,8; 140,7; 127,1; 126,8; 117,6; 106,1; 100,0; 56,2. IR: ν_{max} [cm^{-1}]: 3388, 3117, 3016, 2805, 1749, 1636, 1565, 1438, 1398, 1319, 1272, 1204, 1137, 1083, 976, 744, 716, 634, 609 HR-MS: $m/z = [\text{M} + \text{H}]^+$: 477.1822 ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ -ra számolva: 477.1814).

5.4.7 [9,9'-Biakridin]-4,4',5,5'-tetraol (26)

A 4,4',5,5'-tetrametoxi-9,9'-biakridinhez (25) (500 mg, 1,1 mmol) piridinium-kloridot (7 g, 60,6 mmol) adunk, majd a keverék hőmérsékletét 220 °C-ra emeljük, ezen a hőmérsékleten 2 órán át keverjük, majd hideg desztillált vízbe (150 ml) öntjük, és további egy órán át keverjük. A csapadékot leszűrjük, hideg desztillált vízzel (3 × 15 ml) mossuk, majd etil-acetát (50 ml) és telített vizes nátrium-acetát oldat (50 ml) keverékébe veszünk fel. A fázisokat jól összerázzuk, majd szétválasztjuk. A vizes fázist etil-acetáttal (3 × 50 ml) extraháljuk. Az egyesített szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket propán-2-ol/dietil-éter keverékből történő átkristályosítással tisztítjuk. A tiszta terméket sötétsárga kristályok formájában kapjuk (331 mg; 75%).

Op.: > 365 °C, $R_f = 0,24$ (szilikagél VRK, diklórmétán/metanol 30:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]: 10,51 (s, 4H), 7,23 (t, $J = 10$ Hz, 4H), 7,12 (d, $J = 10$ Hz, 4H), 6,43 (d, $J = 10$ Hz, 4H) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]: 151,6; 141,9; 138,1; 128,1; 126,5; 116,9; 109,8. IR: ν_{max} [cm^{-1}]: 3351, 2923, 2853, 1703, 1664, 1574, 1463, 1376, 1334, 1260, 1211, 1175, 1096, 1041, 901, 884, 843, 800, 748, 719, 666, 535, 483. HR-MS: $m/z = [\text{M} + \text{H}]^+$: 421.1198 ($\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ -ra számítva: 421.1188)

5.4.8 27-Klór-6,9,12,15,18-pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa 1,3,5(26),19,21,23(27),24-heptaén (28)

Az akridono-koronaétert (27) (101 mg, 0,3 mmol) és foszfor-pentakloridot (163 mg, 0,8 mmol) foszforil-kloridban (1 ml, 13,2 mmol) oldjuk. Az elegy hőmérsékletét 90 °C-ra emeljük, és ezen a hőmérsékleten 4 órán át keverjük argon atmoszféra alatt. A reakció végeztével eltávolítjuk az illékony komponenseket, majd a visszamaradt anyagot diklórmétánban (100 ml) oldjuk. Ezt az oldatot lassan beleöntjük egy intenzíven kevert 40 m/m%-os vizes trimetil-amin oldatba (20 ml), külső sós-jeges hűtés segítségével az elegy belső hőmérsékletét 5 °C alatt tartva. A felesleges foszforil-klorid megsemmisítése után elválasztjuk a fázisokat, és a vizes fázist diklórmétánnal (5 × 20 ml) extraháljuk. Az egyesített szerves fázist vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk alumínium-oxidon, diklórmétánt használva eluensként. A sárga kristályos terméket közel elméleti termeléssel kapjuk (102 mg; 97%).

Op.: 139-141 °C. R_f = 0,21 (szilikagél VRK, diklórmetán/metanol 30:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 7,97 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,53 (t, J = 10 Hz, 2H), 7,01 (d, J = 10 Hz, 2H), 4,41 (t, J = 5 Hz, 4H), 4,19 (t, J = 5 Hz, 4H), 3,97–3,95 (m, 4H), 3,87–3,85 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 155,2; 141,0; 140,2; 127,4; 125,7; 116,2; 107,4; 72,1; 70,5; 69,4; 69,0. IR: ν_{max} [cm^{-1}]: 2922, 2853, 1620, 1557, 1447, 1417, 1393, 1362, 1326, 1276, 1260, 1211, 1192, 1113, 1082, 1043, 909, 862, 848, 814, 744, 773, 690, 646, 574, 509.

5.4.9 27-{6,9,12,15,18-Pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa-1(27),2,4,19,21,23,25-heptaén-27-il}-6,9,12,15,18-pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa-1,3,5(26),19,21,23(27),24-heptaén (17)

Előállítás [9,9'-biakridin]-4,4',5,5'-tetraolból (26)

A **26** biakridin-tetraolhoz (160 mg, 0,4 mmol) tetraetilénglikol-ditozilátot (924 mg, 1,8 mmol), kálium-karbonátot (535 mg, 3,8 mmol) és DMF-ot (16 ml) adunk argon atmoszféra alatt. Az intenzíven kevert szuszpenzió hőmérsékletét 80 °C-ra emeljük, majd a reakcióelegyet ezen a hőmérsékleten 7 napig keverjük. Ezt követően eltávolítjuk az oldószert, és a visszamaradt anyagot desztillált vízben (10 ml) és diklórmetánban (25 ml) megosztjuk. A fázisokat alaposan összerázzuk, majd szétválasztjuk. A vizes fázist diklórmetánnal (3×10 ml) extraháljuk. Az egyesített szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük és eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket először alumínium-oxidon oszlopkromatográfián tisztítjuk, eluensként toluol/etanol 5:2 arányú elegyét alkalmazva, majd alumínium-oxidon végzett preparatív vékonyréteg-kromatográfián, ugyanezt az eluent alkalmazva. A **17** bisz(koronaéter)-t élénksárga kristályként kapjuk (16,80 mg; 6%).

Op.: 103-106 °C. R_f = 0,7 (alumínium-oxid VRK, toluol/etanol 1:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 7,97 (d, J = 10 Hz, 4H), 7,53 (t, J = 10 Hz, 4H), 7,03 (d, J = 10 Hz, 4H), 4,44 (t, J = 5 Hz, 8H), 4,20 (t, J = 5 Hz, 8H), 3,92-3,90 (m, 8H), 3,90-3,80 (m, 8H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 154,4; 140,8; 140,7; 127,3; 125,7; 116,5; 107,6; 71,0; 70,2; 68,6; 68,5. IR: ν_{max} [cm^{-1}]: 3400, 2922, 2853, 1722, 1623, 1558, 1532, 1471, 1453, 1417, 1395, 1364, 1327, 1274, 1258, 1197, 1093, 1042, 917, 853, 813, 741, 568. HRMS: m/z = $[\text{M} + \text{H}]^+$: 737.3090 ($\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ -ra számítva: 737.3074).

Előállítás 27-klór-6,9,12,15,18-pentaoxa-25-azatetraciklo[21.3.1.05,26.019,24]heptakosa 1,3,5(26),19,21,23(27),24-heptaénből (**28**)

A frissen előállított **28** klórakridino-koronaétert (213 mg, 0,6 mmol) *tert*-butilbenzolban (4 ml) argon atmoszféra alatt intenzíven keverjük. Az elegyhez cinkport (44,85 mg, 0,7 mmol) adunk, majd a hőmérsékletet 90 °C-ra emeljük, és a keverést ezen a hőmérsékleten 15 órán keresztül folytatjuk. A reakció végeztével eltávolítjuk az oldószert, majd a visszamaradt anyagot desztillált vízben (20 ml) és diklórmétánban (20 ml) megosztjuk. A fázisokat alaposan összerázzuk és szétválasztjuk. A vizes fázist diklórmétánnal (3 × 20 ml) extraháljuk. Az egyesített szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és eltávolítjuk az oldószert. A nyersterméket először alumínium-oxidon oszlopkromatográfiásan tisztítjuk, eluensként toluol/etanol 5:2 arányú elegyét használva, majd alumínium-oxidon végzett PVRK-val, ugyanezt az eluent használva. A **17** bisz(koronaéter)-t élénksárga kristályként kapjuk (14,7 mg; 7%).

Az így előállított bisz(koronaéter) (**17**) jellemzői azonosak az előző eljárással kapottal. Az egyetlen melléktermék a **27** akridono-koronaéter volt, amely a kiindulási klórakridino-koronaéter (**28**) hidrolízisével keletkezett, és amelyet *tert*-butilbenzoltól történő átkristályosítással tisztítottunk.

6 Összefoglalás

A kutatási munka során sikeresen előállítottam egy új, két makrogyűrűt tartalmazó koronaétert. A bisz(koronaéter) gazdamolekula oligoaminokkal való komplexképzését titrálási kísérleteken alapuló regressziós módszerekkel és számítógépes szimuláción alapuló molekuláris dokkolással vizsgáltuk. A DFT-alapú modellezés jól megjósolta a kísérletileg meghatározott komplex stabilitásokat. A gazdamolekula preferenciasorrendje a molekuláris felismerés során a következő volt: spermin (4)~spermidin (3) > norspermidin (5) > *N,N'*-bisz(2-aminoetil)-1,3-propándiamin (30) > putreszcin (1) > n-butil-amin (29). A spermin (4) és a spermidin (3) komplexek közötti stabilitásbeli különbség nem bizonyult jelentősnek. Összességében a spermin (4) koordinációja tekinthető a legkedvezőbbnek, mivel ebben az esetben a legkisebb a gazdamolekula szerkezeti torzulása a kezdeti konformációhoz képest. Ráadásul itt alakul ki a legtöbb független vonzó kölcsönhatás, valamint az összetett kötési modellben negatív kooperativitás is fellép. A terminális primer ammóniumcsoportok és a láncközi protonált amin egységek között három C-C kötés, míg a két láncközi protonált amin egység között négy C-C kötés jelenti az optimális távolságot a molekulák közötti kölcsönhatások kialakulása szempontjából. A kisebb távolságokkal rendelkező aminocsoportok csökkentik a koordinációs lehetőségek számát, mivel a gazdamolekula szerkezete meglehetősen merev. A gyakorlatban a komplexstabilitási állandók közötti legalább egy nagyságrendbeli különbségre van szükség ahhoz, hogy az elválasztás vagy érzékelés során hatékony molekuláris megkülönböztetést lehessen elérni. Ennek megfelelően a tri- és tetraamin-típusú spermin analogonok szelektíven felismerhetők a di- és monoszármazékok jelenlétében. Az általunk bemutatott gazdamolekula ígéretes az oligoamin-központú folyamatok vizsgálatához, amelyek a modern biokémiai kutatások fókuszpontjai közé tartoznak.

7 Hozzájárulásom a dolgozat eredményeihez

Az OTDK dolgozatom alapját képező kutatásból egy nemzetközi, referált, Q1 besorolású folyóiratcikk is megjelent, melynek első szerzője vagyok.

Kisfaludi, P.; Spátay, S.; Krekó, M.; Vezse, P.; Tóth, T.; Huszthy, P.*; Golcs, Á.*: A Bis(Acridino)-Crown Ether for Recognizing Oligoamines in Spermine Biosynthesis. *Molecules* **2024**, 29, 4390. <https://doi.org/10.3390/molecules29184390> [Q1, IF=4.2]

A cikk és a dolgozat témáját adó kutatás során aktívan részt vettem a koncepció kialakításában, az analitikai vizsgálatok elvégzésében, az irodalmi háttér feltárásában, valamint a munka leírásában és vizualizációjában. Emellett én végeztem a projekt alapjaként szolgáló preparatív kémiai munkát. **Spátay Sára** az analitikai vizsgálatok kivitelezésében működött közre, míg **Dr. Krekó Marcell** a modellezési módszertan kidolgozásán, az *in-silico* vizsgálatokon, eredmények összegzésén és azok vizualizációján dolgozott. **Vezse Panna** a titrálási kísérletek regresszióanalízisen alapuló kiértékelését, a komplexstabilitási állandók meghatározását és a diagramok ábrázolását végezte, továbbá a kézirat javításában is közreműködött. **Dr. Tóth Tünde** témavezetőként a projekt felügyeletét látta el, valamint a munka ellenőrzésével is hozzájárult a kézirat véglegesítéséhez. **Prof. Dr. Huszthy Péter** a koncepció kialakításában, a szintetikus módszertan kidolgozásában és a kézirat ellenőrzésében vett részt, továbbá a projekt felügyeletéért is felelt. Végül, de nem utolsósorban **Dr. Golcs Ádám** a koncepció és a módszertan kidolgozásán, az analitikai vizsgálatok eredményeinek értékelésén és leírásán, valamint az erőforrások biztosításán dolgozott, továbbá témavezetői feladatokat látott el.

8 Irodalomjegyzék

1. Santos, M.H.S. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *29*, 213. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1).
2. Givanoudi, S.; Heyndrickx, M.; Depuydt, T.; Khorshid, M.; Robbens, J.; Wagner, P. A Review on Bio- and Chemosensors for the Detection of Biogenic Amines in Food Safety Applications: The Status in 2022. *Sensors* **2023**, *23*, 613. <https://doi.org/10.3390/s23020613>.
3. Davidek, J. *Natural Toxic Compounds of Foods*; Davidek, J., 1st Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2018**. ISBN 9781351074933.
4. Schuber, F. Influence of Polyamines on Membrane Functions. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 1. <https://doi.org/10.1042/bj2600001>.
5. Agostinelli, E.; Arancia, G.; Vedova, L.D.; Belli, F.; Marra, M.; Salvi, M.; Toninello, A. The Biological Functions of Polyamine Oxidation Products by Amine Oxidases: Perspectives of Clinical Applications. *Amino Acids* **2004**, *27*, 347. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0114-4>.
6. Ma, W.; Chen, K.; Li, Y.; Hao, N.; Wang, X.; Ouyang, P. Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications. *Engineering* **2017**, *3*, 308. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.012>.
7. Pegg, A.E. The Function of Spermine. *IUBMB Life* **2014**, *66*, 8. <https://doi.org/10.1002/iub.1237>.
8. Pegg, A.E. Functions of Polyamines in Mammals. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 14904. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>.
9. Peng, Q.; Wong, C.Y.-P.; Cheuk, I.W.; Teoh, J.Y.-C.; Chiu, P.K.-F.; Ng, C.-F. The Emerging Clinical Role of Spermine in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4382. <https://doi.org/10.3390/ijms22094382>.
10. Proctor, M.S.; Fletcher, H.V.; Shukla, J.B.; Rennert, O.M. Elevated Spermidine And Spermine Levels In The Blood Of Psoriasis Patients. *J. Investig. Dermatol.* **1975**, *65*, 409. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12607659>.
11. Saiki, S.; Sasazawa, Y.; Fujimaki, M.; Kamagata, K.; Kaga, N.; Taka, H.; Li, Y.; Souma, S.; Hatano, T.; Imamichi, Y.; et al. A Metabolic Profile of Polyamines in Parkinson Disease: A Promising Biomarker. *Ann. Neurol.* **2019**, *86*, 251. <https://doi.org/10.1002/ana.25516>.

12. Han, W.; Li, H.; Chen, B. Research Progress and Potential Applications of Spermidine in Ocular Diseases. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1500. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071500>.
13. Thomas, T.; Thomas, T.J. Polyamine Metabolism and Cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2003**, *7*, 113. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00210.x>.
14. Marku W.; Ulrike B.W.; Rüdiger P.; Helmut E.; Michael E.; Fluorophor-labeled Spermidine Derivatives as Fluorescent Markers in Optical Tumor Imaging *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3193. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.03.046>.
15. Vanhoutte, R.; Kahler, J.P.; Martin, S.; van Veen, S.; Verhelst, S.H.L. Clickable Polyamine Derivatives as Chemical Probes for the Polyamine Transport System. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 907. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800043>.
16. Ni, Y.-Q.; Liu, Y.-S. New Insights into the Roles and Mechanisms of Spermidine in Aging and Age-Related Diseases. *Aging Dis.* **2021**, *12*, 1948. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0603>.
17. Al-Habsi, M.; Chamoto, K.; Matsumoto, K.; Nomura, N.; Zhang, B.; Sugiura, Y.; Sonomura, K.; Maharani, A.; Nakajima, Y.; Wu, Y.; et al. Spermidine Activates Mitochondrial Trifunctional Protein and Improves Antitumor Immunity in Mice. *Science* **2022**, *378*, 3510. <https://doi.org/10.1126/science.abj3510>.
18. Tao, X.; Liu, J.; Diaz-Perez, Z.; Foley, J.R.; Nwafor, A.; Stewart, T.M.; Casero, R.A.; Zhai, R.G. Reduction of Spermine Synthase Enhances Autophagy to Suppress Tau Accumulation. *Cell Death Dis.* **2024**, *15*, 333. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06720-8>.
19. Tiburcio, A.F.; Alcázar, R. Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1694*, 489. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_40.
20. Issaq, H.J. Capillary Electrophoresis of Natural Products-II. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3190. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991001\)20:15/16<3190::AID-ELPS3190>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3190::AID-ELPS3190>3.0.CO;2-K).
21. Oguri, S. Electromigration Methods for Amino Acids, Biogenic Amines and Aromatic Amines. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *747*, 1. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00092-X).
22. Chiu, T.; Lin, Y.; Huang, Y.; Chang, H. Analysis of Biologically Active Amines by CE. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4792. <https://doi.org/10.1002/elps.200600126>.

23. Zhang, Y.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Li, G.; Yang, W.; Feng, X. A Review of Pretreatment and Analytical Methods of Biogenic Amines in Food and Biological Samples since 2010. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1605*, 360361. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.015>.
24. Chiu, P.K.-F.; Fung, Y.-H.; Teoh, J.Y.-C.; Chan, C.-H.; Lo, K.-L.; Li, K.-M.; Tse, R.T.-H.; Leung, C.-H.; Wong, Y.-P.; Roobol, M.J.; et al. Urine Spermine and Multivariable Spermine Risk Score Predict High-Grade Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2021**, *24*, 542. <https://doi.org/10.1038/s41391-020-00312-1>.
25. Krämer, J.; Kang, R.; Grimm, L.M.; De Cola, L.; Picchetti, P.; Biedermann, F. Molecular Probes, Chemosensors, and Nanosensors for Optical Detection of Biorelevant Molecules and Ions in Aqueous Media and Biofluids. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 3459. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00746>.
26. He, X.; Ding, F.; Sun, X.; Zheng, Y.; Xu, W.; Ye, L.; Chen, H.; Shen, J. Reversible Chemosensor for Bioimaging and Biosensing of Zn(II) and HpH in Cells, Larval Zebrafish, and Plants with Dual-Channel Fluorescence Signals. *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5563. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03456>.
27. Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419. <https://doi.org/10.1021/cr010421e>.
28. Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Chemodosimeters and 3D Inorganic Functionalised Hosts for the Fluoro-Chromogenic Sensing of Anions. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3081. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.016>.
29. 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*, 7105. <https://doi.org/10.1039/C7CS00240H>.
30. Tanimoto, D.; Imamura, Y.; Kawabata, T.; Tsubaki, K. Development of Highly Sensitive and Selective Molecules for Detection of Spermidine and Spermine. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4689. <https://doi.org/10.1039/b909682e>.
31. Lee, B.; Scopelliti, R.; Severin, K. A Molecular Probe for the Optical Detection of Biogenic Amines. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9639. <https://doi.org/10.1039/c1cc13604f>.
32. Nakamura, M.; Sanji, T.; Tanaka, M. Fluorometric Sensing of Biogenic Amines with Aggregation-Induced Emission-Active Tetraphenylethenes. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5344. <https://doi.org/10.1002/chem.201003285>.
33. Barros, M.; Ceballos, S.; Arroyo, P.; Sáez, J.A.; Parra, M.; Gil, S.; Costero, A.M.; Gaviña, P. Spermine and Spermidine Detection through Restricted Intramolecular

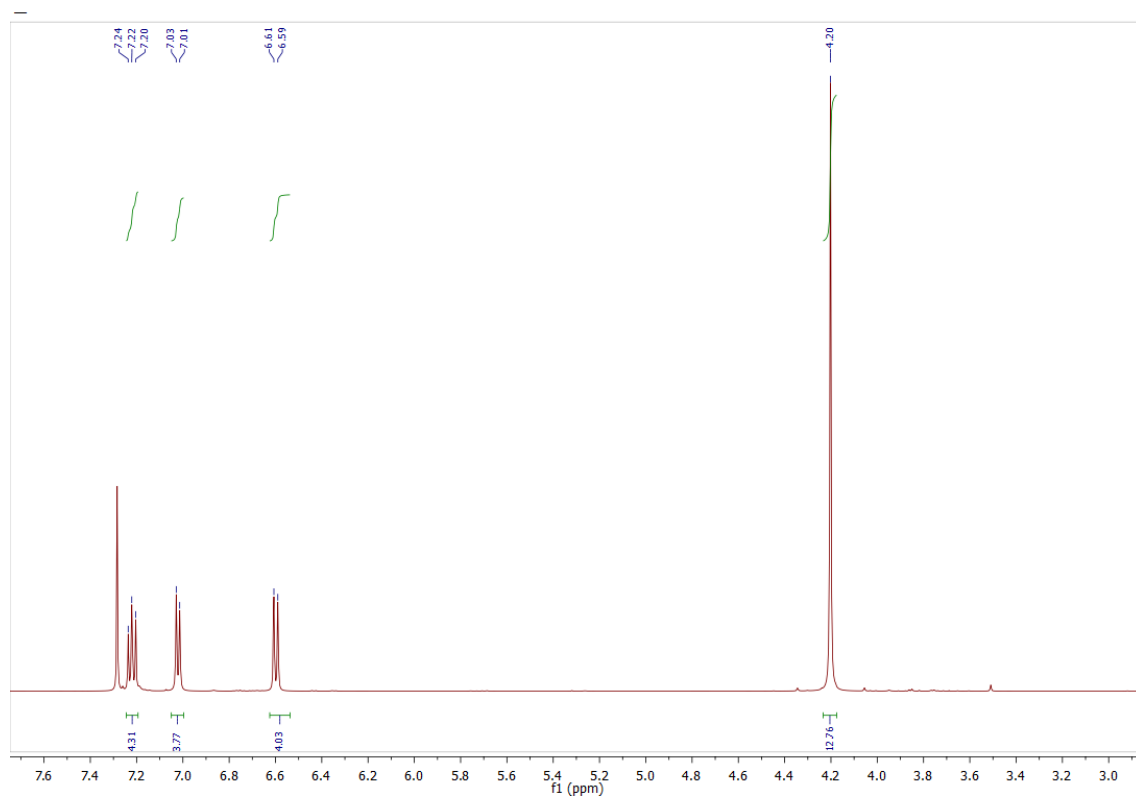
- Rotations in a Tetraphenylethylene Derivative. *Chemosensors* **2021**, *10*, 8. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010008>.
34. Köstereli, Z.; Severin, K. Fluorescence Sensing of Spermine with a Frustrated Amphiphile. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5841. <https://doi.org/10.1039/c2cc32228e>.
 35. Satrijo, A.; Swager, T.M. Anthryl-Doped Conjugated Polyelectrolytes as Aggregation-Based Sensors for Nonquenching Multicationic Analytes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16020. <https://doi.org/10.1021/ja075573r>.
 36. Chow, C.-F.; Lam, M.H.W.; Wong, W.-Y. Design and Synthesis of Heterobimetallic Ru(II)–Ln(III) Complexes as Chemodosimetric Ensembles for the Detection of Biogenic Amine Odorants. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8246. <https://doi.org/10.1021/ac401513j>.
 37. Khan, S.A.; Misra, T.K. Novel Gluconate Stabilized Gold Nanoparticles as a Colorimetric Sensor for Quantitative Evaluation of Spermine. *Eng. Asp.* **2022**, *648*, 129146. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129146>.
 38. Rawat, K.A.; Bhamore, J.R.; Singhal, R.K.; Kailasa, S.K. Microwave Assisted Synthesis of Tyrosine Protected Gold Nanoparticles for Dual (Colorimetric and Fluorimetric) Detection of Spermine and Spermidine in Biological Samples. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *88*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.069>.
 39. Fletcher, J.T.; Bruck, B.S. Spermine Detection via Metal-Mediated Ethynylarene ‘Turn-on’ Fluorescence Signaling. *Sens. Actuators. B Chem.* **2015**, *207*, 843. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.10.116>.
 40. A BioTracker™ Clickable Polyamine Spermidine Live Cell Probe egy termék, amely a Merck KGaA, (Darmstadt, Németország) védjegye alatt áll. <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/mm/sct249>
 41. Lu, B.; Wang, L.; Ran, X.; Tang, H.; Cao, D. Recent Advances in Fluorescent Methods for Polyamine Detection and the Polyamine Suppressing Strategy in Tumor Treatment. *Biosensors* **2022**, *12*, 633. <https://doi.org/10.3390/bios12080633>.
 42. Maynor, M.S.; Nelson, T.L.; O’Sullivan, C.; Lavigne, J.J. A Food Freshness Sensor Using the Multistate Response from Analyte-Induced Aggregation of a Cross-Reactive Poly (Thiophene). *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3217. <https://doi.org/10.1021/ol071065a>.
 43. Singh, P.; Mittal, L.S.; Bhargava, G.; Kumar, S. Ionic Self-Assembled Platform of Perylenediimide–Sodium Dodecylsulfate for Detection of Spermine in Clinical Samples. *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 890. <https://doi.org/10.1002/asia.201700120>.
 44. Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E.; Mutihac, L. The Complexation of the Ammonium Ion by 18-Crown-6 in Different Solvents and by Noncyclic Ligands, Crown Ethers and

- Cryptands in Methanol. *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 139. [https://doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0968-5677(98)80005-9).
45. Buschmann, H.-J.; Mutihac, L.; Mutihac, R. Physicochemical Parameters of the Transport of Amines and Amino Acids through Liquid Membranes by Macrocyclic Ligands. *Sep. Sci. Technol.* **1999**, *34*, 331. <https://doi.org/10.1081/SS-100100653>.
 46. Newcomb, M.; Timko, J.M.; Walba, D.M.; Cram, D.J. Host-Guest Complexation. 3. Organization of Pyridyl Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6392. <https://doi.org/10.1021/ja00461a035>.
 47. Saaid, M.; Saad, B.; Rahman, I.A.; Ali, A.S.M.; Saleh, M.I. Extraction of Biogenic Amines Using Sorbent Materials Containing Immobilized Crown Ethers. *Talanta* **2010**, *80*, 1183. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.006>.
 48. Udvarhelyi, P.M.; Sunter, D.C.; Watkins, J.C. Direct Separation of Amino Acid Enantiomers Using a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **1990**, *519*, 69. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(90\)85135-I](https://doi.org/10.1016/0021-9673(90)85135-I).
 49. Kovács, E.; Deme, J.; Turczel, G.; Nagy, T.; Farkas, V.; Trif, L.; Kéki, S.; Huszthy, P.; Tuba, R. Synthesis and Supramolecular Assembly of Fluorinated Biogenic Amine Recognition Host Polymers. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 5626. <https://doi.org/10.1039/C9PY00929A>.
 50. Vezse, P.; Benda, B.; Fekete, A.; Golcs, Á.; Tóth, T.; Huszthy, P. Covalently Immobilizable Tris(Pyridino)-Crown Ether for Separation of Amines Based on Their Degree of Substitution. *Molecules* **2022**, *27*, 2838. <https://doi.org/10.3390/molecules27092838>.
 51. Huszthy, P.; Vermes, B.; Báthori, N.; Czugler, M.: Synthesis and X-ray Crystallographic Studies of Novel Proton-Ionizable Nitro-and Halogen-Substituted Acridono-18-crown-6 Chromo-and Fluorogenic Ionophores. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 9371. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.09.086>
 52. Mao, L.; Liu, Y.; Yang, S.; Li, Y.; Zhang, X.; Wei, Y. Recent Advances and Progress of Fluorescent Bio-/Chemosensors Based on Aggregation-Induced Emission Molecules. *Dye. Pigment.* **2019**, *162*, 611. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.045>.
 53. Huszthy, P.; Köntös, Z.; Vermes, B.; Pintér, Á. Synthesis of Novel Fluorescent Acridono- and Thioacridono-18-Crown-6 Ligands. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4967. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00408-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00408-2).
 54. Golcs, Á.; Ádám, B.Á.; Vezse, P.; Huszthy, P.; Tóth, T. Synthesis and Spectrophotometric Studies of 9-Substituted-4,5-dimethoxyacridine Multifunctionalizable Fluorescent Dyes

- and Their Macrocyclic Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2021, 2485. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100291>.
55. Németh, T.; Tóth, T.; Balogh, G.T.; Huszthy, P. Synthesis and Fluorescence Spectroscopic Studies of Novel 9-phenylacridino-18-crown-6 Ether Type Sensor Molecules. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2017**, 61, 249. <https://doi.org/10.3311/PPch.11277>.
 56. Huszthy, P.; Vermes, B.; Báthori, N.; Czugler, M. Synthesis and X-Ray Crystallographic Studies of Novel Proton-Ionizable Nitro- and Halogen-Substituted Acridono-18-Crown-6 Chromo- and Fluorogenic Ionophores. *Tetrahedron* **2003**, 59, 9371. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.09.086>.
 57. Boyer, G.; Lormier, T.; Galy, J.-P.; Llamas-Saiz, A.L.; Foces- Foces, C.; Fierros, M.; Elguero, J.; Virgili, A. X-ray Crystallography at 170 K of Racemic 2,2'-Dimethoxy-9,9'-biacridine and 1H NMR Study of 2,2'-Diacetoxy-9,9'-biacridine. *Molecules* **1999**, 4, 104. <https://doi.org/10.3390/40400104>.
 58. Thordarson, P. Determining Association Constants from Titration Experiments in Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305. <https://doi.org/10.1039/C0CS00062K>.
 59. Van de Weert, M.; Stella, L. Fluorescence Quenching and Ligand Binding: A Critical Discussion of a Popular Methodology. *J. Mol. Struct.* **2011**, 998, 144. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>.
 60. Ulatowski, F.; Dabrowa, K.; Bałakier, T.; Jurczak, J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host–Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 1746. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02909>.

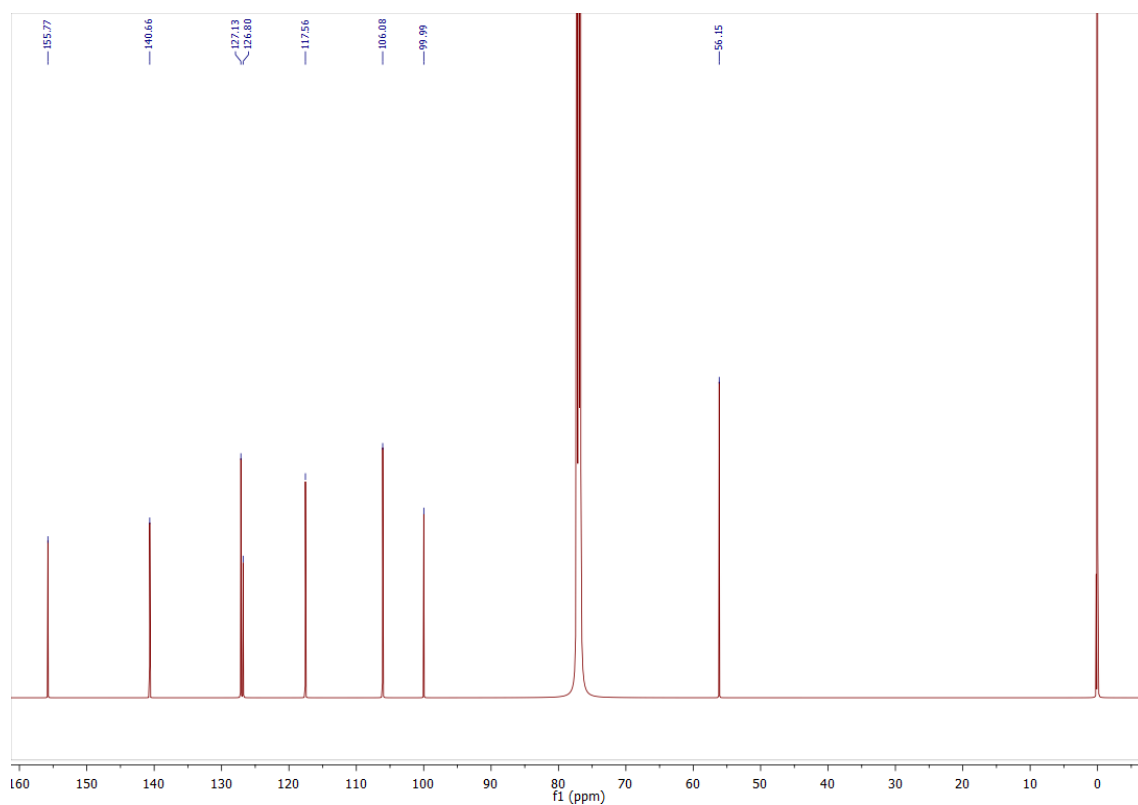
9 Függelék

9.1 Az új vegyületek és a 9-klór-4,5-dimetoxiakridin ^1H -NMR és ^{13}C -NMR spektrumai



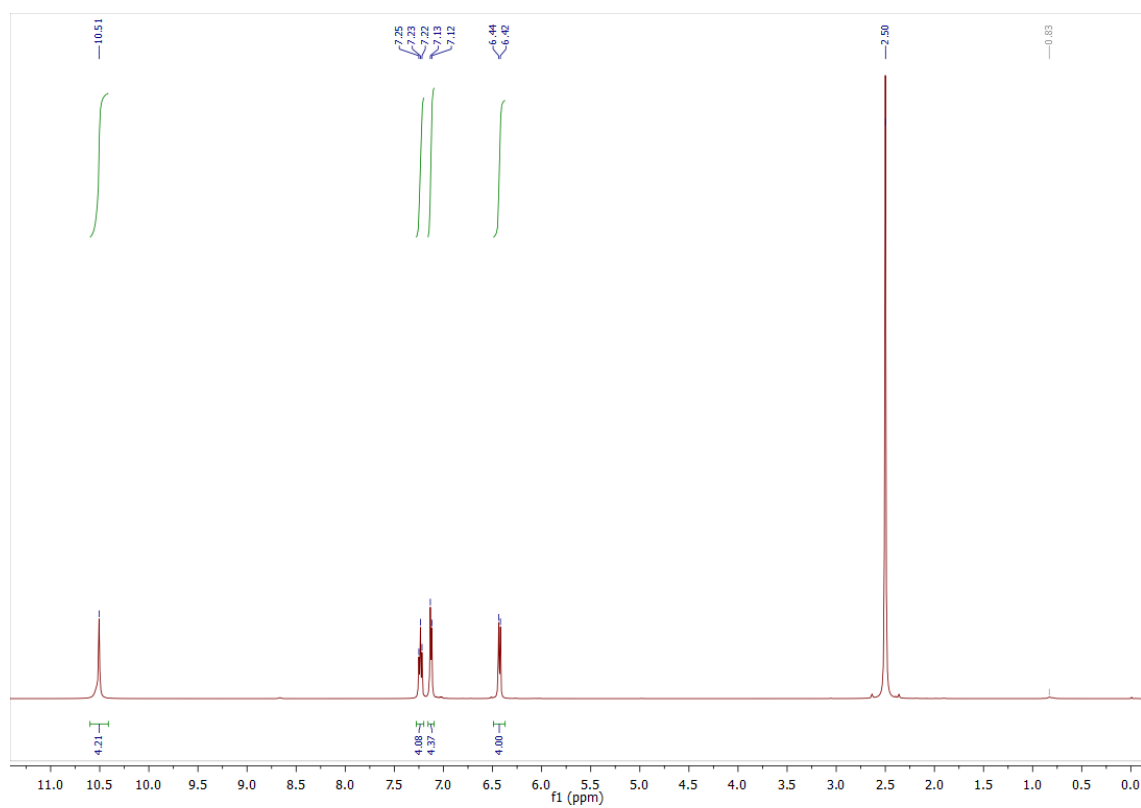
27. ábra

A 25 ^1H -NMR spektruma (CDCl_3)



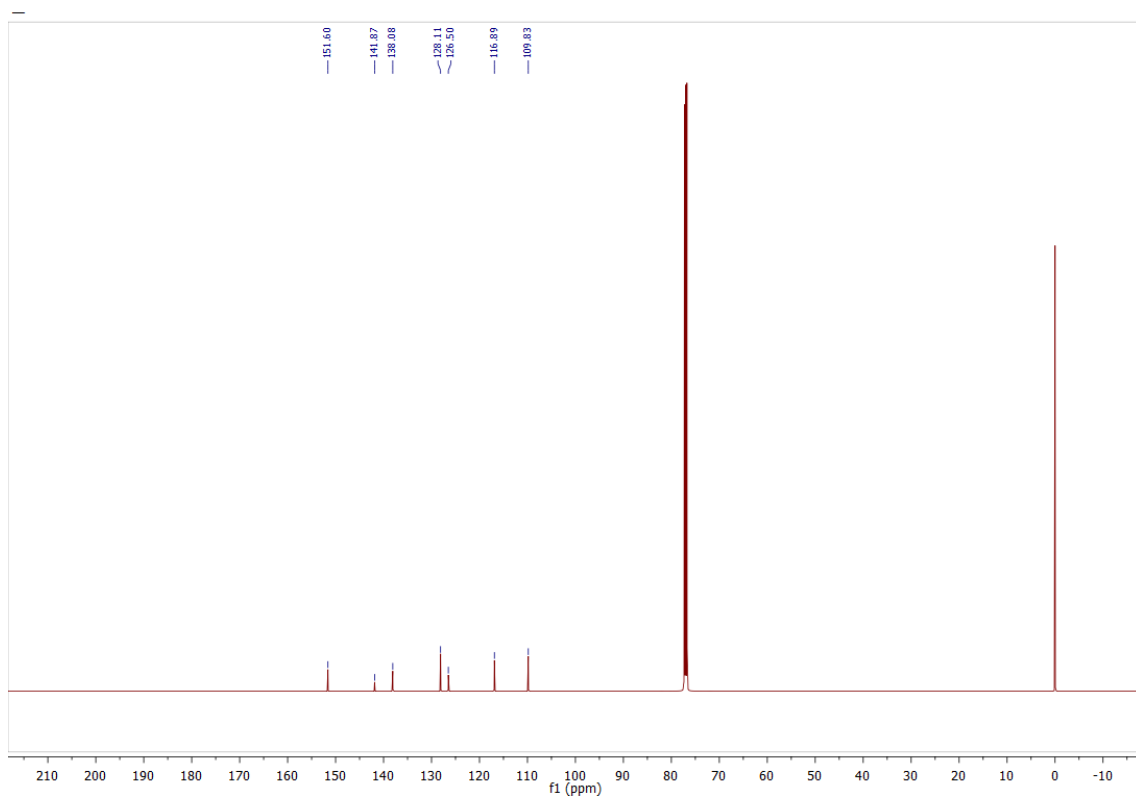
28. ábra

A 25 ^{13}C -NMR spektruma (CDCl_3)



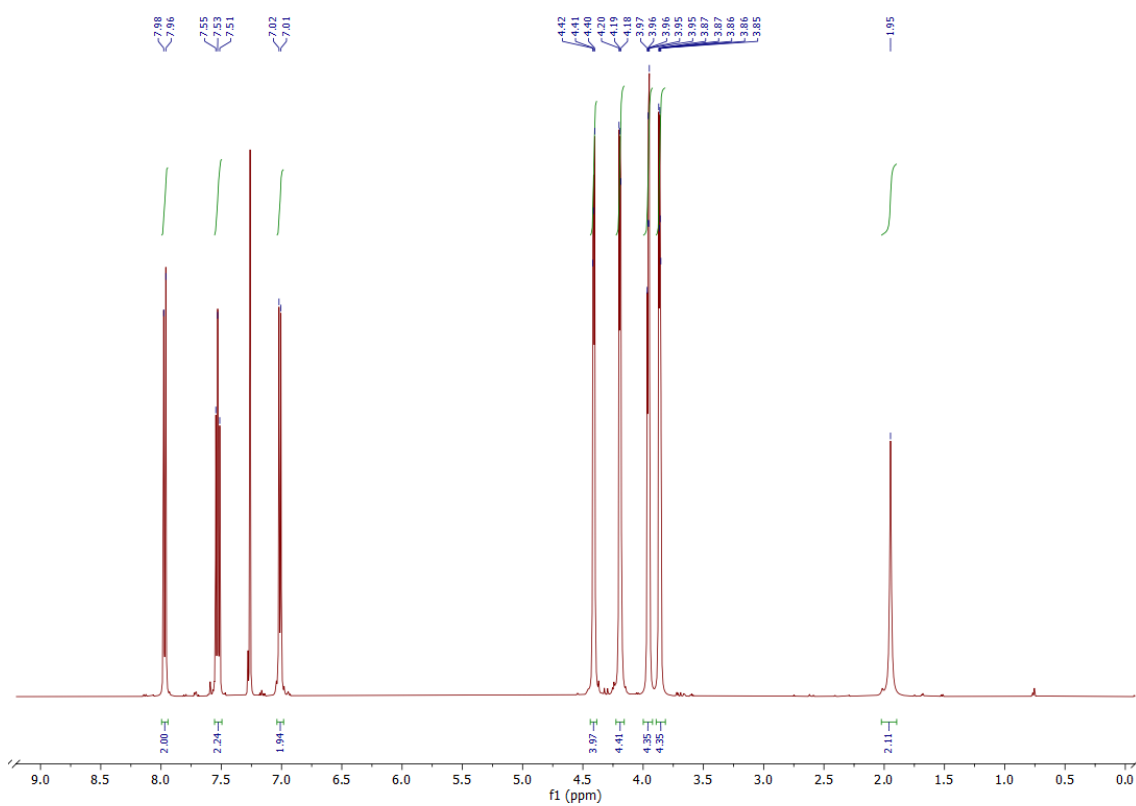
29. ábra

A 26 ^1H -NMR spektruma ($\text{DMSO}-d_6$)



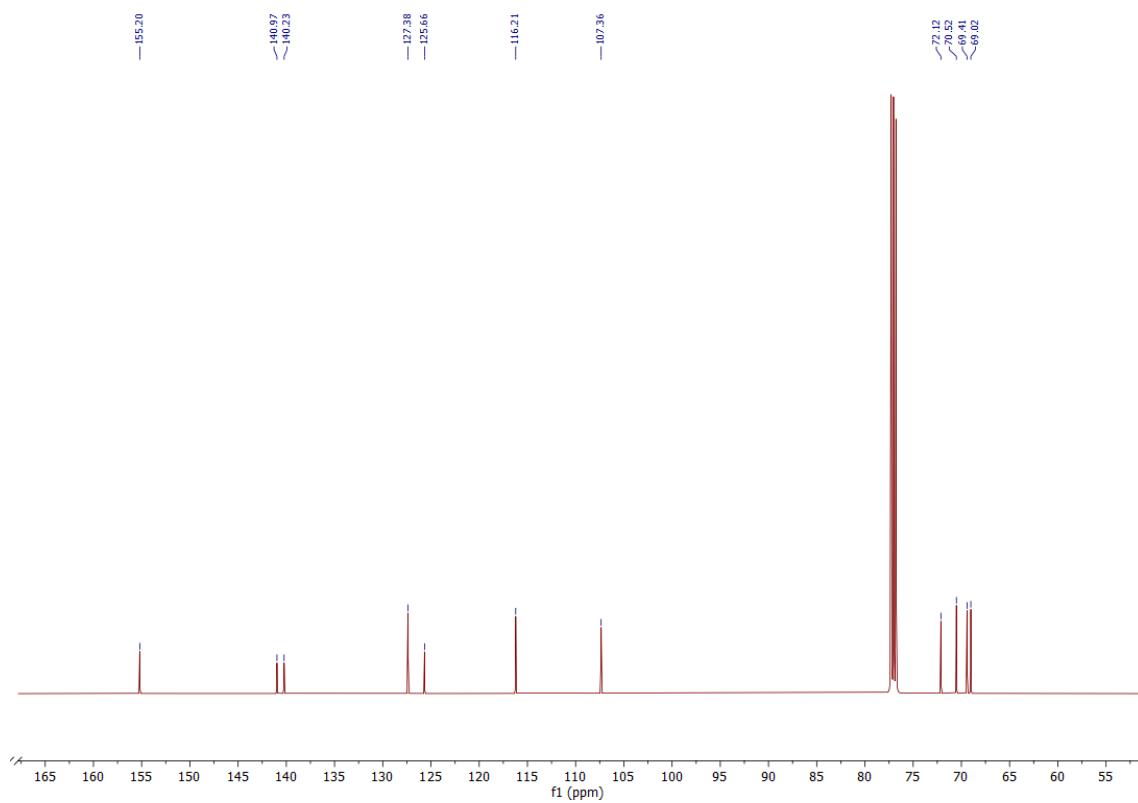
30. ábra

A 26 ^{13}C -NMR spektruma ($\text{DMSO-}d_6$)



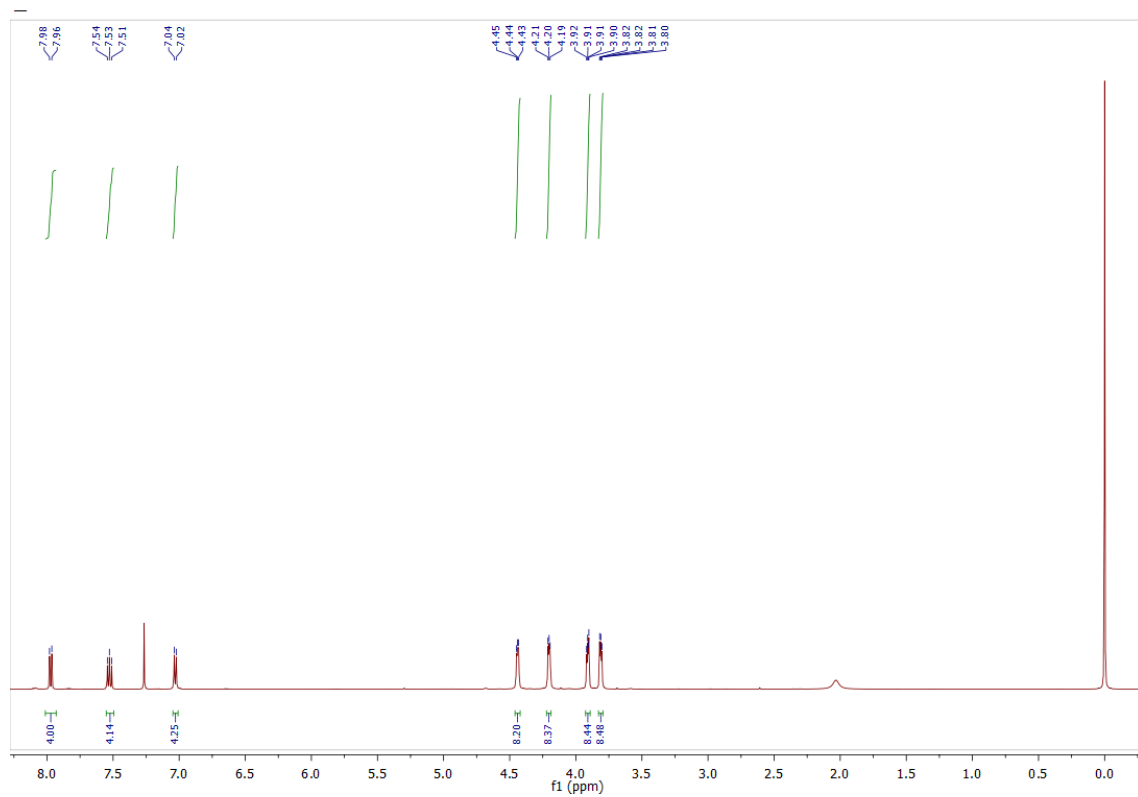
31. ábra

A 28 ^1H -NMR spektruma (CDCl_3)



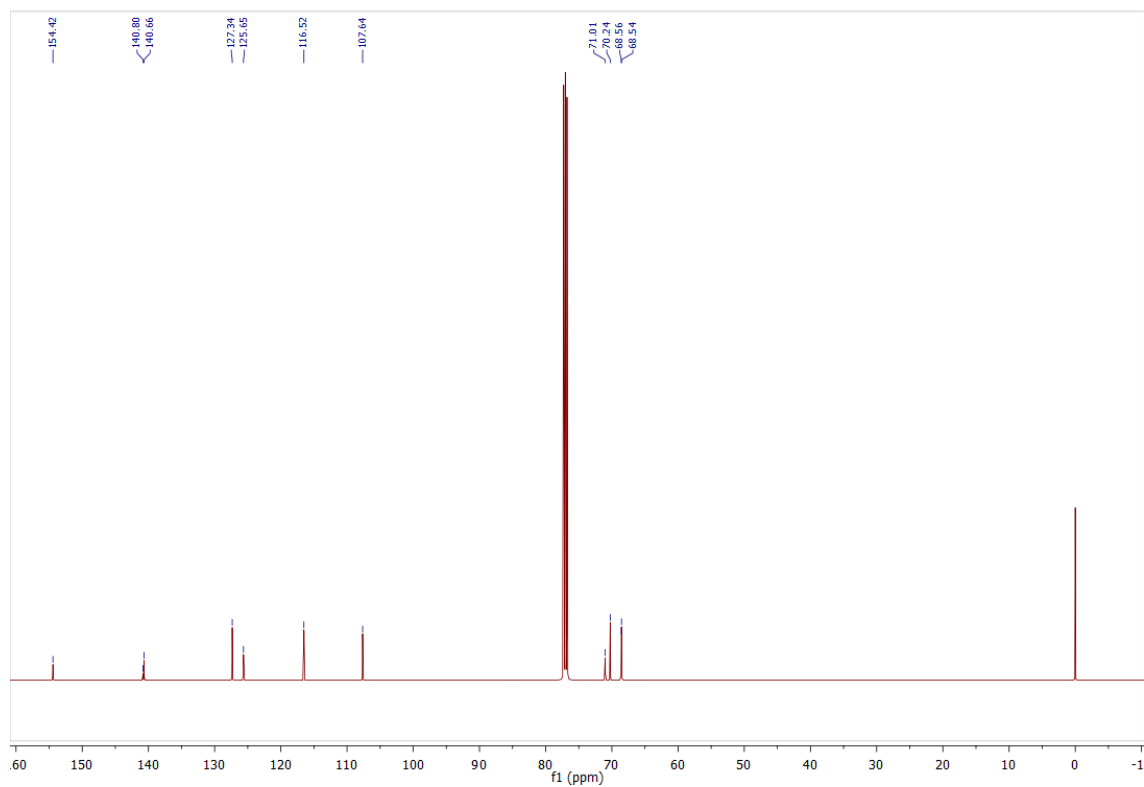
32. ábra

A 28 ¹³C-NMR spektruma (CDCl₃)



33. ábra

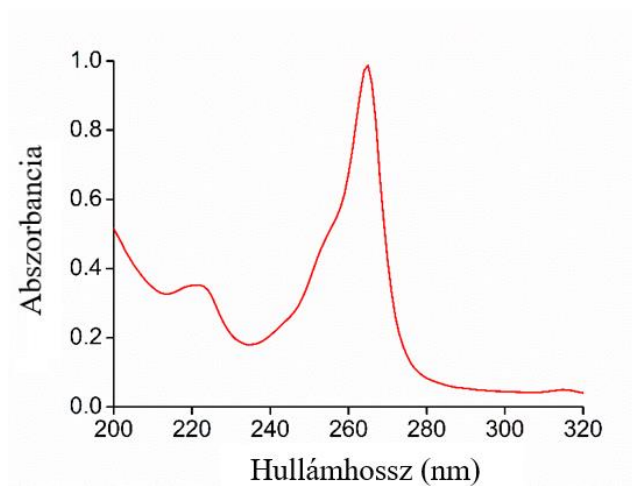
A 28 ¹H-NMR spektruma (CDCl₃)



34. ábra

A **17** ^{13}C -NMR spektruma (CDCl_3)

9.2 Az új koronaéter (**17**) UV spektruma



35. ábra

Az új koronaéter (**17**) UV spektruma acetonitrilben