



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ –  
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

**ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ Ε.Κ.Π.Α.**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ –  
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

**ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ Ε.Κ.Π.Α.**

**A.M.: 121307**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**A. Κ. Καλοκαιρινός, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**A. Κ. Καλοκαιρινός, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**M. A. Κουππάρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**Γ. Χ. Βουγιουκαλάκης, Λέκτορας ΕΚΠΑ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 21/10/2015**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας», με σκοπό τη σύνθεση νέων οργανικών ενώσεων και την εφαρμογή τους στην χημική ανάλυση. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Εργαστήριο Φωταύγειας του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (INN) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» καθώς και στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.

Θα ήθελα, από τη θέση αυτή να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της ερευνητικής εργασίας κ. Α. Καλοκαιρινό, καθώς και τον συν-επιβλέποντα κ. Γ. Βουγιουκαλάκη, για την ανάθεση του θέματος, για την καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή τους. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθώς και η ελευθερία για ανάπτυξη πρωτοβουλιών από μέρους μου βοήθησαν καταλυτικά στην εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Ξεχωριστή μνεία αξίζει στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Πευκιανάκη Ελευθέριο, που με βοήθησε και με στήριξε πολύπλευρα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας, ενώ μου προσέφερε αφειδώς σημαντικές συμβουλές και οδηγίες εφ' όλης της ύλης, καθώς και για την επιμελή ανάγνωση και κρίση του αρχικού χειρόγραφου. Επίσης οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στη μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Τουμπανάκη Δήμητρα του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για τις αμέτρητες συμβουλές της και την απίστευτη αρωγή της κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου σε μεμβράνη κυτταρίνης.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ. Παπαδόπουλο, Ερευνητή Α' βαθμίδας του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (INN) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για τις συμβουλές, το έντονο και έμπρακτο ενδιαφέρον του και την καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τους πρώτους μήνες εκτέλεσης της εργασίας αυτής.

Φυσικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη της ομάδας Οργανικής σύνθεσης του κ. Γ. Βουγιουκαλάκη, τα μέλη της ομάδας του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας του κ. Γ. Παπαευσταθίου καθώς και τα μέλη της ομάδας του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του κ. Α. Οικονόμου. Ειδικά ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στους υποψήφιους διδάκτορες Καμπανάκη Αντώνη και Frangi Natalie για τις ενώσεις που είχαν συνθέσει και μου επέτρεψαν να χρησιμοποιήσω.

Τέλος, δεν ξεχνώ να ευχαριστήσω τους οικείους μου, την οικογένεια μου, τους φίλους και τους υπόλοιπους συναδέλφους μου που μου συμπαράσταθηκαν έστω και ελάχιστα στη συγκεκριμένη χρονική περίοδο της ζωής μου.

Σας ευχαριστώ πολύ όλους.

Αλέξανδρος Σκλαβούνος

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκαν νέες οργανικές ενώσεις με στόχο την εφαρμογή τους στην ανάλυση επιθυμητών μορίων. Από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν, μία σκουαραΐνη με βάση το ινδόλιο παρουσίασε την ικανότητα να αποχρωματίζεται παρουσία μικρών υδατοδιαλυτών θειολών. Επιπλέον, παρουσία ιόντων υδραργύρου, η ίδια σκουαραΐνη, σχηματίζει έγχρωμα ιζήματα.

Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού θειολών σε υδατικά διαλύματα. Η μέθοδος βασίστηκε στη μείωση της απορρόφησης της σκουαραΐνης που προκαλούν οι θειόλες σε μήκος κύματος απορρόφησης  $\lambda = 538 \text{ nm}$ .

Από τα πειράματα βελτιστοποίησης, ως καταλληλότερος διαλύτης για τη μέθοδο προέκυψε το μίγμα ακετονιτρίλιο : νερό, 30 : 70 ο/ο. Η βέλτιστη συγκέντρωση της σκουαραΐνης ήταν  $7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών  $0,01 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 6,8$ . Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης, το όριο ανίχνευσης (πχ. L-κυστεΐνη  $\text{LoD} = 8,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ ), την εκλεκτικότητα, την πιστότητα, την ανθεκτικότητα και την αβεβαιότητα της.

Παράλληλα, η σκουαραΐνη επιστρώθηκε σε μεμβράνες κυτταρίνης και χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ιόντων  $\text{Hg}^{2+}$  σε υδατικά διαλύματα. Η μέθοδος επιτρέπει τη διά γυμνού οφθαλμού ανίχνευση των ιόντων αυτών σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από  $50 \text{ ng mL}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ .

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Αναλυτική Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** σκουαραΐνες, θειόλες, υδράργυρος, φωτομετρία, αναλύσεις σε χαρτί.

## ABSTRACT

In the present work, novel organic compounds were synthesized especially designed for analytical applications. Among those compounds synthesized was a squaraine dye based on indole, which showed remarkable bleaching in the presence of small, water soluble thiols. Additionally, in presence of mercury ions, this squaraine, tended to form colored precipitates.

A spectrophotometric method was developed and validated for the determination of thiols in aqueous solutions. This method was based on the decrease in the absorbance of the squaraine caused by the thiols, at a wavelength of  $\lambda = 538$  nm.

According to the optimization experiments, the optimum solvent for the method was the mixture acetonitrile : water 30 : 70 v/v. The optimal squaraine concentration was  $7.0 \times 10^{-6}$  M in 0.01 M phosphate buffer, pH = 6.8. The method validated the linearity of the calibration curves, limit of detection (eg. L-cysteine LoD =  $8.7 \times 10^{-7}$  M), selectivity, precision, ruggedness and uncertainty.

Meanwhile, a paper-based technique was developed, with the squaraine on cellulose membranes, to detect the presence of  $\text{Hg}^{2+}$  ions in aqueous solutions. This method allows for straightforward “naked-eye” monitoring of the  $\text{Hg}^{2+}$  at concentrations higher than  $50 \text{ ng mL}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ .

**SUBJECT AREA:** Analytical Chemistry

**KEYWORDS:** squaraines, thiols, mercury, photometry, paper based techniques

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

<b>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ</b>	<b>1</b>
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.2 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ	1
1.2.1 Μηχανισμός πρωτονίωσης – αποπρωτονίωσης	3
1.2.2 Μηχανισμός συμπλοκοποίησης	4
1.2.3 Μηχανισμός διάσπασης ή σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών	6
1.2.4 Μηχανισμός αντίδρασης οξειδοαναγωγής	7

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

<b>ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΩΝ</b>	<b>8</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2.2 ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΕΣ (Sq) ΩΣ ΠΕΧΑΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ	10
2.3 ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΕΣ (Sq) ΩΣ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΟΝΤΩΝ	11
2.4 ΆΛΛΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΩΝ (Sq)	12

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>14</b>
------------------------	-----------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>16</b>
4.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	16
4.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	18
4.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	24

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

<b>ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ</b>	<b>27</b>
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
5.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΗΜΙ-ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΩΝ (SSq)	27
5.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΙΝΔΟΛΟ-ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΗΣ	32
5.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	35

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟ**

<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΘΕΙΟΛΩΝ</b>	<b>36</b>
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	36
6.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	37
6.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	37
6.3.1 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη / μίγματος διαλυτών	37
6.3.2 Επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος	38
6.3.3 Επίδραση συγκέντρωσης της $S_0$	39
6.3.4 Επίδραση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος	40
6.3.5 Επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών	42
6.3.6 Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο προσδιορισμού	43
6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΘΕΙΟΛΩΝ	45
6.5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	47
6.5.1 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης	47
6.5.2 Εκλεκτικότητα μεθόδου	48
6.5.3 Ανιχνευσιμότητα μεθόδου	54
6.5.4 Πιστότητα μεθόδου	55
6.5.4.1 Επαναληψιμότητα μεθόδου	56
6.5.4.2 Αναπαραγωγιμότητα μεθόδου	58
6.5.5 Ορθότητα μεθόδου	68
6.5.5.1 Προσθετικότητα	68
6.5.5.2 Σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με αντίστοιχες της βιβλιογραφίας	71
6.5.6 Ανθεκτικότητα μεθόδου	72
6.5.7 Αβεβαιότητα μεθόδου	75
6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**

### **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ(II) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΙΙΝΔΟΛΟ – ΣΚΟΥΑΡΑΪΝΗΣ ΩΣ ΙΧΝΗΘΕΤΗ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΟΥ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ**

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	79
7.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΟΝΤΩΝ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ	80

7.2.1	Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της ζώνης δοκιμασίας της Sq	80
7.2.2	Επίδραση ρυθμιστικών διαλυμάτων στην ευαισθησία της ζώνης της Sq	83
7.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
	<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ</b>	<b>85</b>
	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ</b>	<b>86</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b>	<b>88</b>
	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΟΜΑΔΩΝ –SH ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ELLMAN	88
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ</b>	<b>91</b>
	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΗΣ Sq	91
	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>	<b>101</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ιχνηθέτη pH με πολλαπλές θέσης πρόσδεσης H <sup>+</sup> , με βάση τη ροδαμίνη. <sup>[1]</sup> .....	4
Σχήμα 1.2. Παράδειγμα ένωσης που βασίζεται στην άμεση συμπλοκοποίηση ιόντων Zn <sup>2+</sup> . (PET: Photoinduced Electron Transfer – Φωτοεπαγόμενη Μεταφορά Ηλεκτρονίων). <sup>[1]</sup> .....	5
Σχήμα 1.3. Παράδειγμα ένωσης που βασίζεται στην άμεση συμπλοκοποίηση ιόντων Zn <sup>2+</sup> και στην μετατόπιση των ιόντων αυτών από ιόντα Cd <sup>2+</sup> . <sup>[5]</sup> .....	6
Σχήμα 1.4. Παράδειγμα αντίδρασης διάσπασης ομοιοπολικού δεσμού (ενζυμική αντίδραση). <sup>[6]</sup> .....	7
Σχήμα 1.5. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίδρασης οξειδοαναγωγής, παρουσία οξυγόνου απλής κατάστασης ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , singlet oxygen). <sup>[1]</sup> .....	7
Σχήμα 2.1. Γενική δομή σκουαραϊνών. <sup>[10]</sup> .....	9
Σχήμα 2.2. Παράδειγμα σκουαραϊνης ως σύστημα Δότη – Δέκτη – Δότη. <sup>[10]</sup> .....	9
Σχήμα 2.3. Απόκριση της σκουαραϊνης του σχήματος στις αλλαγές pH του διαλύματος. <sup>[11]</sup> .....	10
Σχήμα 2.4. Δομή σκουαραϊνης που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση ιόντων Ca <sup>2+</sup> . <sup>[9]</sup> ..	11
Σχήμα 2.5. Αντίδραση σκουαραϊνης με θειόλη και στη συνέχεια απομάκρυνση της θειόλης με ιόντα Hg <sup>2+</sup> . <sup>[9]</sup> .....	12
Σχήμα 3.1. Συνθετική πορεία παρασκευής του επιθυμητού ανάλογου της λουμινόλης. <sup>[31-33]</sup> .....	14
Σχήμα 3.2. Μοριακή δομή της σκουαραϊνης που συντέθηκε. ....	15
Σχήμα 5.1. Μοριακές δομές, της ημι-σκουαραϊνης ((E)-3-βουτοξυ-4-((6-αιθοξυ-1-μεθυλκοινολιν-2(1H)-υλιδένιο) μεθυλ) κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης) (αριστερά) και της SSq 1 (δεξιά). ....	28
Σχήμα 5.2. Πετροσυνθετική πορεία σύνθεσης της ημι-σκουαραϊνης SSq – TGME.....	28

Σχήμα 5.3. Σύνθεση του βρωμιούχου άλατος του 1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθόξυ)αιθόξυ)αιθυλ)-2,3,3-τριμεθυλο-3H-ινδολ-1-ίου. ....	29
Σχήμα 5.4. Σύνθεση της (E)-3-αιθοξυ-4-((1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθόξυ)αιθόξυ)αιθυλο)-3,3-διμεθυλινδολιν-2-υλιδενιο)μεθυλ)κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης [ημι-σκουαραΐνη SSq – TGME]. ....	30
Σχήμα 5.5. Θεωρητική σύνθεση της (Z)-3-[(1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλινδολενο-2υλιδένιο)μέθυλο]-4-αιθοξυκυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης [ημι-σκουαραΐνη SSq 2]. ....	31
Σχήμα 5.6. Μοριακή δομή της σκουαραΐνης Sq 1. ....	31
Σχήμα 5.7. Σκουαραΐνες της βιβλιογραφίας και η αντίδρασή τους με τις θειόλες. Η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη και έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της σκουαραΐνης. <sup>[20,25]</sup> .....	32
Σχήμα 5.8. Σύνθεση του 2-(3H-ινδολ-1-ίουμ-2-υλ)-4-(1H-ινδολ-2-υλ)-3-οξοκυκλοβουτ- 1-εν-1-ολικού ιόντος [σκουαραΐνη Sq]. ....	32
Σχήμα 6.1. Επίδραση της συγκέντρωσης Sq σε μίγμα 30 : 70 ο/ο ACN : H <sub>2</sub> O στην απορρόφηση. ....	39
Σχήμα 6.2. Επίδραση pH στη % μείωση της σχετικής απορρόφησης 7,0×10 <sup>-6</sup> M Sq με 0,35×10 <sup>-5</sup> , 0,70×10 <sup>-5</sup> , 3,5×10 <sup>-5</sup> και 7,0×10 <sup>-5</sup> M Cys. ....	40
Σχήμα 6.3. Επίδραση του pH στην απορρόφηση λευκού (7,0×10 <sup>-6</sup> M Sq) και δείγματος (7,0×10 <sup>-6</sup> M Sq και 3,1 ×10 <sup>-5</sup> M Cys). ....	41
Σχήμα 6.4. Επίδραση του pH στη μείωση της απορρόφησης των διαλυμάτων του Σχήματος 6.3. ....	41
Σχήμα 6.5. Μεταβολή της % σχετικής απορρόφησης διαλυμάτων 7,0×10 <sup>-6</sup> M Sq σε 30 : 70% ο/ο ACN : H <sub>2</sub> O σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης κυστεΐνης 2,8, 7,7, 11,9 και 14,7×10 <sup>-6</sup> M ως συνάρτηση της συγκεντρώσεως του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,8. ....	42
Σχήμα 6.6. Μεταβολή της % μείωσης της απορρόφησης διαλύματος 7,0×10 <sup>-5</sup> M Sq ως συνάρτηση της συγκέντρωσης L-κυστεΐνης. ....	43

Σχήμα 6.7. Διάγραμμα Job της διαφοράς απορρόφησης της Sq ως συνάρτηση του γραμμομοριακού κλάσματος της κυστεΐνης .....	44
Σχήμα 6.8. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων μεταλλοϊόντων στη % μείωση της απορρόφησης $7,0 \times 10^{-6}$ M Sq.....	52
Σχήμα 6.9. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων μεταλλοϊόντων στη % μείωση της απορρόφησης $7,0 \times 10^{-6}$ M Sq με $1,0 \times 10^{-4}$ M κυστεΐνης. ....	53
Σχήμα 6.10. Διαφορά της ακραίας τιμής από την ονομαστική για το δείγμα της L-κυστεΐνης. ....	74
Σχήμα 6.11. Διαφορά την ακραίας τιμής από την ονομαστική για το δείγμα της 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.....	74
Σχήμα I.1. Τυπική αντίδραση του DTNB με ελεύθερες θειόλες. <sup>[56]</sup> .....	88
Σχήμα I.2. Φάσμα απορρόφησης του DTNB και του TNB. ....	90
Σχήμα II.1. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη DMF-d7 (200 MHz).....	91
Σχήμα II.2. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη DMF-d7 (500 MHz).....	91
Σχήμα II.3. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ σε διαλύτη DMF-d7 (126 MHz).....	92
Σχήμα II.4. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με πρωτόνιο (COSY – 500 MHz).....	92
Σχήμα II.5. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με πρωτόνιο σε μεγέθυνση. ....	93
Σχήμα II.6. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με άνθρακα (HSQC – 500 / 126 MHz). [Με κόκκινο συμβολίζονται οι πρωτοταγείς και τριτοταγείς άνθρακες ( $\text{CH}_3$ & $\text{CH}$ ), ενώ με μπλε οι δευτεροταγείς ( $\text{CH}_2$ )].....	93
Σχήμα II.7. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με άνθρακα σε μεγέθυνση. ....	94
Σχήμα II.8. Φάσμα μάζας (MS), ESI +, κύριο ιόν M+H. ....	94
Σχήμα II.9. Φάσμα μάζας (HRMS), ESI – , κύριο ιόν M–H. ....	95

Σχήμα II.10. Φάσμα μάζας (HRMS), ESI + , κύριο ιόν M+Na, λοιπά ιόντα M+H, 2M+H, 3M+H.....	96
Σχήμα II.11. Τυπικό φάσμα απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) της Sq.....	97
Σχήμα II.12. Τυπικό φάσμα απορρόφησης ορατού–υπεριώδους της Sq σε ακετονιτρίλιο και σε μίγμα ακετονιτριλίου νερού όπου είναι αισθητή η εμφάνιση συσσωματωμάτων της χρωστικής.....	98
Σχήμα II.13. Επίδραση της τιμής του pH στο φάσμα απορρόφησης της Sq.....	98
Σχήμα II.14. Φάσμα απορρόφησης της Sq σε σύγκριση με τα φάσματα απορρόφησης της Sq μετά την προσθήκη κυστεΐνης και χλωριούχου υδραργύρου αντίστοιχα. ....	99
Σχήμα II.15. Τυπικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής της Sq, σε ακετονιτρίλιο, σε συγκεντρώσεις από $3,0 \times 10^{-7}$ έως $1,0 \times 10^{-5}$ M.....	99
Σχήμα II.16. Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης. [W = μάζα, HF = ροή θερμότητας, T = θερμοκρασία].....	100

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 5.1. Μοριακή δομή της ημι-σκουαράϊνης (SSq)((E)-3-βουτοξυ-4-((6-αιθοξυ-1-μεθυλκοινολιν-2(1H)-υλιδένιο) μεθυλ) κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης) και τα αποτελέσματα της πρόσδεσης των ιόντων  $Hg^{2+}$  στο χρώμα (αριστερά) και στο φθορισμό (δεξιά) της.<sup>[47]</sup>.....27
- Εικόνα 5.2. Σχηματισμός συσσωματωμάτων κατά την προσθήκη νερού σε διάλυμα της Sq σε ACN.....34
- Εικόνα 5.3. Από αριστερά, διάλυμα της σκουαράϊνης Sq σε ACN : H<sub>2</sub>O 30 : 70 ο/ο, διάλυμα της Sq παρουσία θειόλης (L – κυστεΐνης), διάλυμα της Sq παρουσία ιόντων υδραργύρου ( $Hg^{2+}$ ), διάλυμα της Sq μετά από 3 μήνες παραμονής σε θερμοκρασίες από 20 έως 38°C και έκθεση στο φως.....35
- Εικόνα 6.1. Διαλύματα της Sq συγκέντρωσης  $7 \times 10^{-6}$  M σε μίγμα ACN : H<sub>2</sub>O 30 : 70 ο/ο, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης (από δεξιά προς τα αριστερά) ιόντων χρυσού (αριστερή φωτογραφία) και ιόντων υδραργύρου (δεξιά φωτογραφία). .....53
- Εικόνα 7.1. Εξοπλισμός απόθεσης αντιδραστηρίων σε πλάκες (TLC).<sup>[46]</sup> .....79
- Εικόνα 7.2. Μεμβράνες εμβαπτισμένες στα διάφορα διαλύματα υδραργύρου, αριστερά διάλυμα συγκέντρωσης 100  $\mu g mL^{-1}$  έως 250  $ng mL^{-1}$  και δεξιά το λευκό δείγμα. ....82
- Εικόνα 7.3. Απόκριση της Sq (έγχρωμη ταινία) στα ιόντα  $Hg^{2+}$ , από αριστερά το λευκό δείγμα ακολουθεί το δείγμα συγκέντρωσης 50  $ng mL^{-1}$  και διαδοχικά στα δεξιά είναι το δείγμα 10  $\mu g mL^{-1}$ .....82
- Εικόνα 7.4. Απόκριση της Sq στα ιόντα  $Hg^{2+}$ , αριστερά σε ηλιακό φως και δεξιά σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVC) από λευκό δείγμα (αριστερή ταινία), 100  $ng mL^{-1}$  , 500  $ng mL^{-1}$  , 1  $\mu g mL^{-1}$  και 10  $\mu g mL^{-1}$   $Hg^{2+}$  .....83

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 6.1. Ονομασίες και μοριακές δομές των προτύπων θειολών που μελετήθηκαν. .....	45
Πίνακας 6.2. Αναλυτικά χαρακτηριστικά πρότυπων θειολών.....	46
Πίνακας 6.3. Ονομασίες και μοριακές δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν.....	49
Πίνακας 6.4. Ονομασίες και μοριακές δομές των αμινοξέων που μελετήθηκαν.....	50
Πίνακας 6.5. Άλατα των ιόντων μετάλλων που μελετήθηκαν.....	51
Πίνακας 6.6. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρότυπων θειολών. ....	55
Πίνακας 6.7. Μείωση της απορρόφησης της S <sub>q</sub> παρουσία πρότυπων θειολών σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων.....	57
Πίνακας 6.8. Υπολογισμός της μέσης εκατοστιαίας τυπικής απόκλισης για το λευκό δείγμα και τα δείγματα των επιπέδων συγκεντρώσεων 1, 2, 3. ....	58
Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων L– κυστεΐνης.....	59
Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων 2– (διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.....	60
Πίνακας 6.11. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων N– ακετυλοκυστεΐνης.....	61
Πίνακας 6.12. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων L– κυστεΐνης.....	62
Πίνακας 6.13. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων 2– (διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.....	63
Πίνακας 6.14. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων N– ακετυλοκυστεΐνης.....	64

Πίνακας 6.15. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των εξισώσεων παλινδρόμησης της σχετικής μείωσης της απορρόφησης της Sq (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της L-κυστεΐνης. ....	65
Πίνακας 6.16. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών παλινδρόμησης σχετικής μείωσης της απορρόφησης της Sq (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.....	66
Πίνακας 6.17. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών παλινδρόμησης της σχετικής μείωσης της απορρόφησης της Sq (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της N-ακετυλοκυστεΐνης.....	67
Πίνακας 6.18. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος N-ακετυλοκυστεΐνη / L-κυστεΐνη.	69
Πίνακας 6.19. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος N-ακετυλοκυστεΐνη / μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης. ....	70
Πίνακας 6.20. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος N-ακετυλοκυστεΐνη / 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη. ....	70
Πίνακας 6.21. Παράγοντες που μελετήθηκαν στα 3 επίπεδα, -1 χαμηλό, 0 μέσο – ονομαστική τιμή , +1 υψηλό.....	73
Πίνακας 7.1. Χαρακτηριστικά των εκτυπώσεων στις μεμβράνες κυτταρίνης.....	81
Πίνακας II.1. Κορυφές απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) της Sq.....	97

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### Εφαρμογές Οργανικής Σύνθεσης Στην Αναλυτική Χημεία

#### 1.1 Εισαγωγή

Η Οργανική Χημεία για χρόνια παρέχει στην Αναλυτική Χημεία πληθώρα αντιδραστηρίων τα οποία παρουσία του αναλύτη μεταβάλλουν κάποια μετρήσιμη φυσικοχημική παράμετρο και γενικά ονομάζονται ιχνηθέτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα συμπλεκτικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του αναλύτη ή την απομάκρυνση παρεμποδιστικής ένωσης. Ένα ακόμα παράδειγμα είναι οι χρωμογόνες και φθορισμογόνες ενώσεις, των οποίων είτε το χρώμα είτε ο φθορισμός (ένταση / μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής) μεταβάλλονται παρουσία ή απουσία του αναλύτη ανάλογα με τη μέθοδο. Στη συνέχεια θα εξετασθεί κυρίως η εφαρμογή χρωμογόνων και φθορισμογόνων ενώσεων για αναλυτικούς σκοπούς.

#### 1.2 Στρατηγικές σύνθεσης ιχνηθετών

Χρωμογόνοι και φθορισμογόνοι ιχνηθέτες είναι αντιδραστήρια που η αλληλεπίδρασή τους με αναλύτες συνοδεύεται από αλλαγές των φασματοσκοπικών τους ιδιοτήτων, επιτρέποντας τον προσδιορισμό τους. Λόγω της ικανότητάς τους να βελτιώνουν την αναλυτική ευαισθησία, βρίσκουν χρήσεις τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μεθόδους. Τυπικά, οι χρωμογόνοι και φθορισμογόνοι ιχνηθέτες αποτελούνται από τρία διακριτά τμήματα:<sup>[1]</sup>

(1) χαρακτηριστική ομάδα σηματοδότησης, οι φασματοσκοπικές ιδιότητες της οποίας θα πρέπει να αλλάζουν κατά την αντίδραση με τον αναλύτη.

(2) ομάδα επισήμανσης ή αναγνώρισης, υπεύθυνη για την εκλεκτική αντίδραση με την προσδιοριζόμενη ουσία.

(3) κατάλληλη ομάδα διαχωρισμού ή σύνδεσης, που συνδέει τις δύο προαναφερθείσες ομάδες (μερικές φορές οι δύο ομάδες ενσωματώνονται χωρίς την παρουσία τέτοιας ομάδας).

Μια ακόμα ομάδα μπορεί προαιρετικά να προστεθεί στον ιχνηθέτη και να μεταβάλει τις φυσικοχημικές ιδιότητές του κατά βούληση, όπως τη διαλυτότητα (υδρόφιλο ή λιπόφιλο τμήμα), το σημείο τήξεως, την αγωγιμότητα κ.α., αναλόγως του πεδίου εφαρμογής.

Μέχρι σήμερα, πληθώρα μικρών μοριακών χρωμογόνων και φθορισμογόνων ιχνηθετών με τις παραπάνω ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί για διαφορετικούς αναλύτες.

Ο προσδιορισμός του αναλύτη – στόχου από τους ιχνηθέτες συνήθως επιτυγχάνεται μέσω ενός από τους ακόλουθους μηχανισμούς αντίδρασης:

- πρωτονίωση – αποπρωτονίωση
- συμπλοκοποίηση (άμεση σύμπλεξη ή ανταγωνιστική συμπλοκοποίηση – μετατόπιση υποκαταστάτη)
- διάσπαση ή σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών
- αντίδραση οξειδοαναγωγής

Ακόμα μπορεί να επιτευχθεί με:

- παραγωγοποίηση
- πυρηνόφιλη / ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη ή υποκατάσταση

Οι παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιούνται ως στρατηγικές σχεδιασμού για την ανάπτυξη μικρών μοριακών χρωμογόνων και φθορισμογόνων ιχνηθετών.

Ως εκ τούτου, η διαρκής ανάγκη σύνθεσης νέων αποτελεσματικών ιχνηθετών, που να μπορούν να ανιχνεύουν εκλεκτικά τα μόρια αναλύτες, είναι επιτακτική. Μέχρι σήμερα, έχει παρασκευαστεί ποικιλία μοριακών ιχνηθετών. Πολλοί από αυτούς τους ιχνηθέτες, ωστόσο, παρουσιάζουν διάφορα μειονεκτήματα:<sup>[2]</sup>

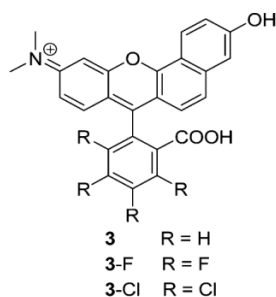
- Το μέσο όπου δρα ο ιχνηθέτης είναι διαφορετικό από αυτό του αναλύτη

- Παρουσιάζουν περιορισμένη εκλεκτικότητα
- Εμφανίζουν υψηλά όρια ανίχνευσης
- Η σύνθεσή τους είναι πολύπλοκη, υψηλού κόστους ή ακόμα και τόσο περιορισμένη που δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα
- Τα αντιδραστήρια και τα προϊόντα της σύνθεσης είναι επιβλαβή προς το περιβάλλον

Συνεπώς, ένας ιδανικός ιχνηθέτης, θα πρέπει να είναι εξαιρετικά ευαίσθητος και εκλεκτικός ως προς τον αναλύτη, να διαλυτοποιείται και να δρα στο μέσο που απαντάται ο αναλύτης και τέλος, η σύνθεση του να είναι απλή, οικονομική και όσο το δυνατό πιο φιλική προς το περιβάλλον. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση, λοιπόν, τέτοιων μοριακών ιχνηθετών αποτελεί σήμερα το επίκεντρο της συνθετικής στρατηγικής πολλών ερευνητικών ομάδων.

### 1.2.1 Μηχανισμός πρωτονίωσης – αποπρωτονίωσης

Οι αντιδράσεις πρωτονίωσης – αποπρωτονίωσης συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη χρωμογόνων και φθορισμογόνων πεχαμετρικών ιχνηθετών. Γενικά, οι ιχνηθέτες pH προσδιορίζουν με ακρίβεια την τιμή pH, σε εύρος περίπου δύο μονάδων pH, δηλαδή,  $pK_a \pm 1$ . Μεταξύ των υφιστάμενων ανιχνευτών pH, οι περισσότεροι έχουν σχεδιαστεί για μετρήσεις κοντά στο ουδέτερο pH, και μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτούς χρησιμοποιείται για προσδιορισμούς ακραίων τιμών pH (π.χ. πολύ όξινα ή βασικά διαλύματα). Κυρίως χρησιμοποιούνται ομάδες ευαίσθητες στο pH όπως αλκοόλες (-OH), καρβοξυλικά οξέα (COOH) ή αμινομάδες (-NH<sub>2</sub>). Επιπλέον, οι πεχαμετρικοί ιχνηθέτες με γραμμική απόκριση σε ευρεία περιοχή pH είναι σπάνιοι, αν και είναι αναγκαία η χρήση τους σε ορισμένες ειδικές εφαρμογές. Με σκοπό τη διεύρυνση του φάσματος απόκρισης των ιχνηθετών αυτών, μία αποτελεσματική στρατηγική είναι κατά τη σχεδίαση ενός ιχνηθέτη, το μόριο να διαθέτει πολλαπλά σημεία πρόσδεσης ιόντων H<sup>+</sup>, δηλαδή ηλεκτραρνητικά άτομα (πχ. N ή / και O) σε διαφορετικές θέσεις.<sup>[3]</sup> Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα οργανικής ένωσης, η οποία χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης pH.

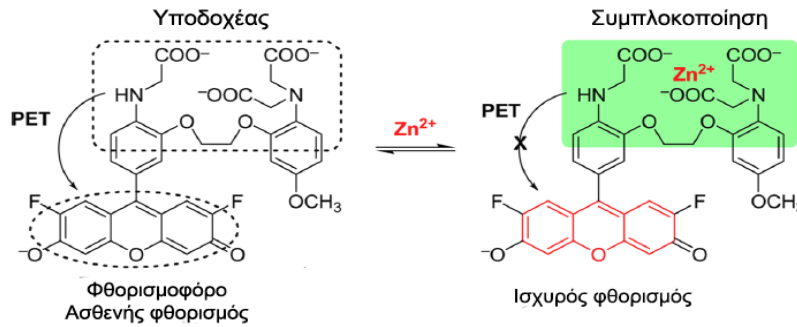


**Σχήμα 1.1.** Χαρακτηριστικό παράδειγμα ιχνηθέτη pH με πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης  $H^+$ , με βάση τη ροδαμίνη.<sup>[1]</sup>

### 1.2.2 Μηχανισμός συμπλοκοποίησης

Δύο είναι οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν οι ιχνηθέτες να συμπλεχθούν ώστε να παρέχουν αναλυτικό σήμα στο χρήστη. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση σύμπλεξη, ενώ ο δεύτερος βασίζεται στην ανταγωνιστική συμπλοκοποίηση και μετατόπιση / απόσπαση του υποκαταστάτη.<sup>[1]</sup>

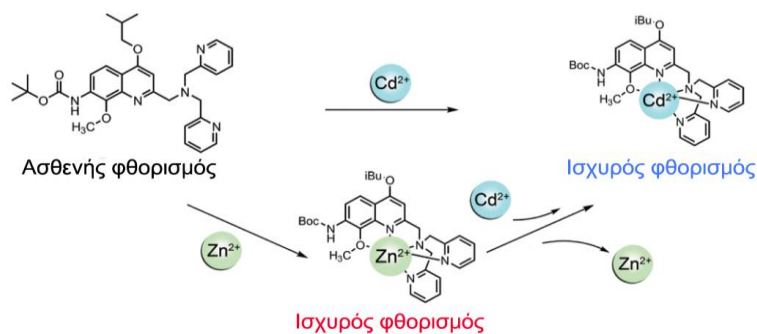
Ο μηχανισμός της άμεσης συμπλοκοποίησης αποτελεί την κύρια στρατηγική σχεδιασμού τέτοιων ιχνηθετών και οι ιχνηθέτες που βασίζονται σε αυτόν έχουν συνήθως ταχείες φασματοσκοπικές αποκρίσεις και καλή αντιστρεψιμότητα. Η μονάδα αναγνώρισης (υποδοχέας) και η μονάδα σηματοδότησης (φθορισμοφόρο) συνδέονται ομοιοπολικά. Οι ιχνηθέτες συμπλοκοποιούνται άμεσα με τον αναλύτη με τους εξής τρόπους: (α) συναρμογή, (β) ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή (γ) με σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται παράδειγμα οργανικής ένωσης η οποία χρησιμοποιείται για την άμεση συμπλοκοποίηση ιόντων  $Zn^{2+}$ . Ειδικά για την τελευταία περίπτωση θα πρέπει να σημειωθεί, ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε οργανικούς διαλύτες.



**Σχήμα 1.2. Παράδειγμα ένωσης που βασίζεται στην άμεση συμπλοκοποίηση ιόντων  $Zn^{2+}$ . (PET: Photoinduced Electron Transfer – Φωτοεπαγώμενη Μεταφορά Ηλεκτρονίων).<sup>[1]</sup>**

Κατά το μηχανισμό της ανταγωνιστικής συμπλοκοποίησης / μετατόπισης, ο υποδοχέας και η μονάδα σηματοδότησης δεν συνδέονται ομοιοπολικά. Αντ' αυτού, σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το οποίο χρησιμεύει ως ιχνηθέτης. Κατά την προσθήκη του αναλύτη στο διάλυμα του συμπλόκου – ιχνηθέτη, ο αναλύτης ως ισχυρότερος υποκαταστάτης του υποδοχέα, οδηγεί στην απελευθέρωση της μονάδας σηματοδότησης, προκαλώντας έτσι τη φασματοσκοπική αλλαγή του συστήματος. Τέτοιοι ιχνηθέτες, όμως, επηρεάζονται ιδιαίτερα από το pH του διαλύματος λόγω των διαφορετικών καταστάσεων πρωτονίωσης των ηλεκτραρνητικών τους ατόμων, που αποτελούν το μέσο σύνδεσης του αναλύτη με τον υποδοχέα. Στις περιπτώσεις αυτές πρέπει να εξετάζεται η επίδραση του pH και είναι συνήθως απαραίτητη η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος.<sup>[4]</sup>

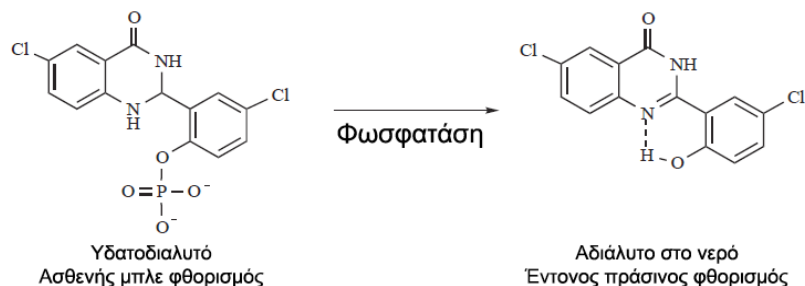
Επιπλέον, ο σχεδιασμός τέτοιου είδους ιχνηθετών, με υψηλή εκλεκτικότητα για ορισμένα μεταλλικά ιόντα παραμένει μια μεγάλη πρόκληση, καθώς πολλά μεταλλικά ιόντα έχουν παρόμοια αντίδραση και μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (π.χ.,  $Mg^{2+} - Ca^{2+}$ ,  $Ag^+ - Hg^{2+}$ , και  $Cd^{2+} - Zn^{2+}$ ). Συνεπώς, η πρόκληση για το σχεδιασμό των συμπλοκοποιητικών μορίων με βάση χρωμογόνους και φθορισμογόνους ιχνηθέτες, είναι το πώς θα συντεθεί ένας ειδικός υποδοχέας εκλεκτικός μόνο για τον επιθυμητό αναλύτη. Στο πλαίσιο αυτό, έχουν αναπτυχθεί ειδικοί ιχνηθέτες που χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό διαφόρων φωτοφυσικών διαδικασιών καθώς και αντιδράσεις συναρμογής.<sup>[1]</sup> Παράδειγμα τέτοιας ένωσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.3.



**Σχήμα 1.3.** Παράδειγμα ένωσης που βασίζεται στην άμεση συμπλοκοποίηση ιόντων Zn<sup>2+</sup> και στην μετατόπιση των ιόντων αυτών από ιόντα Cd<sup>2+</sup>.<sup>[5]</sup>

### 1.2.3 Μηχανισμός διάσπασης ή σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών

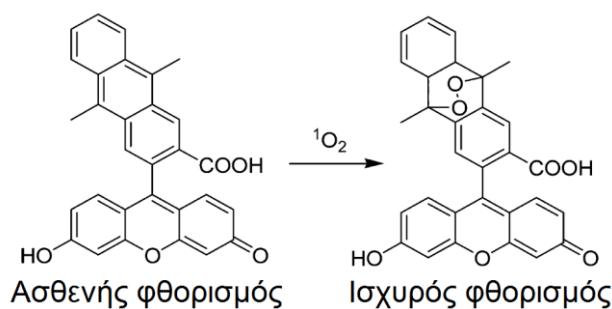
Μεγάλη προσοχή έχουν λάβει τις τελευταίες δεκαετίες χρωμογόνοι και φθορισμογόνοι ιχνηθέτες, που βασίζονται στη διάσπαση κάποιων από τους ομοιοπολικούς δεσμούς τους, από αναλύτες. Αυτός ο τύπος ιχνηθέτη συνήθως κατασκευάζεται με την ακόλουθη στρατηγική: το φθορισμοφόρο συνδέεται με μία ομάδα απόσβεσης μέσω ενός διασπάσιμου δεσμού, ο οποίος είναι ευαίσθητος σε διάφορες χημικές αντιδράσεις (παράδειγμα τέτοιου δεσμού είναι η προστασία – αποπροστασία χαρακτηριστικών ομάδων). Ο ιχνηθέτης αρχικά εμφανίζει ασθενή ή και καθόλου φθορισμό, ενώ κατά την προσθήκη ενός αναλύτη, ο δεσμός με την ομάδα απόσβεσης φθορισμού διασπάται και το φθορισμοφόρο απελευθερώνεται, με αποτέλεσμα την επαναφορά του φθορισμού. Αυτό το είδος των ιχνηθετών, συνήθως, εμφανίζει μη αναστρέψιμη φασματοσκοπική μεταβολή (on – off), συνεπώς ενδείκνυται για τον ακριβή προσδιορισμών των αναλυτών, αλλά είναι ακατάλληλοι για τη μελέτη της δυναμικής μεταβολής των συγκεντρώσεων του αναλύτη. Επιπλέον, οι περισσότεροι από τους ιχνηθέτες αυτούς, παρουσιάζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς τον αναλύτη, σε σχέση με τους αντίστοιχους ιχνηθέτες συμπλοκοποίησης, με αποτέλεσμα να παρέχουν έναν εναλλακτικό τρόπο για τον εκλεκτικό προσδιορισμό πληθώρας αναλυτών (π.χ. ενζυμική δραστηριότητα, μεταλλικά ιόντα, ενεργές μορφές οξυγόνου και θειόλες).<sup>[6]</sup> Παράδειγμα αντίδρασης διάσπασης ομοιοπολικού δεσμού παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.4.



**Σχήμα 1.4.** Παράδειγμα αντίδρασης διάσπασης ομοιοπολικού δεσμού (ενzymική αντίδραση).<sup>[6]</sup>

### 1.2.4 Μηχανισμός αντίδρασης οξειδοαναγωγής

Ιχνηθέτες που ανταποκρίνονται σε αναλύτες μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής χωρίς την απελευθέρωση της μονάδας σηματοδότη, περιλαμβάνουν ιχνηθέτες για μεταλλικά ιόντα, ενεργές μορφές οξυγόνου, μικρά μόρια καθώς και ένζυμα. Αυτοί οι ιχνηθέτες έχουν συνήθως τον ακόλουθο μηχανισμό αντίδρασης: η αντίδραση οξειδοαναγωγής οδηγεί στην αναστολή του φαινομένου PET (Photoinduced Electron Transfer – Φωτοεπαγόμενη Μεταφορά Ηλεκτρονίων) ή στη μετατροπή ενός μη φθορισμοφόρου σε φθορισμοφόρο. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάποιες αντιδράσεις οξειδοαναγωγής μεταξύ των ιχνηθετών και ενεργών μορφών οξυγόνου ή θειολών μπορούν να οδηγήσουν στην απελευθέρωση του φθορισμοφόρου, με μηχανισμό αντίστοιχο με αυτόν που περιγράφηκε προηγουμένως για τη διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού.<sup>[1]</sup> Στο Σχήμα 1.5 παρατίθεται χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίδρασης οξειδοαναγωγής οργανικής ένωσης παρουσία οξυγόνου απλής κατάστασης.



**Σχήμα 1.5.** Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίδρασης οξειδοαναγωγής, παρουσία οξυγόνου απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ , singlet oxygen).<sup>[1]</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Αναλυτικές Εφαρμογές Σκουαραϊνών

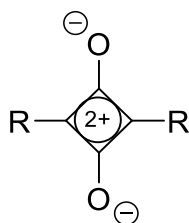
#### 2.1 Εισαγωγή

Σκουαραΐνες (Sq) είναι μια κατηγορία οργανικών χρωστικών ενώσεων με έντονη απορρόφηση (στενές ζώνες απορρόφησης με συντελεστές μοριακής απορρόφησης  $\epsilon > 10^5$ ) και φθορισμό (με κβαντική απόδοση φθορισμού  $\Phi_f > 0,1$  σε πολικούς και υδατικούς διαλύτες), συνήθως στην ερυθρά και εγγύς υπέρυθη περιοχή του ορατού φάσματος. Κύριο χαρακτηριστικό τους, από όπου και παίρνουν το όνομά τους, είναι ένα αρωματικό σύστημα που αποτελείται από τέσσερις άνθρακες. Προέρχονται από το σκουαρικό οξύ.<sup>[7]</sup>

Η σύνθεση της πρώτης σκουαραΐνης δημοσιεύθηκε από τους Sprenger και Ziegenbein το 1966.<sup>[8]</sup> Οι σκουαραΐνες προκύπτουν από την αντίδραση (πυρηνόφιλη προσβολή) του σκουαρικού οξέος (διϋδροξυ-κυκλοβουταδιόνη) με φαινόλες (ρεσορκινόλη, φλωρογλυκινόλη), ενεργοποιημένα πυρρόλια, αλλά και τριτοταγείς αρωματικές αμίνες.<sup>[9]</sup> Τα προϊόντα της συμπύκνωσης αυτής είναι έντονα χρωματισμένα (μπλε έως πράσινο), ενώ εμφανίζουν πολύ υψηλά σημεία τήξεως. Τα προϊόντα αυτά είναι συνήθως πολύ λίγο διαλυτά σε αλκοόλες ή στον αιθέρα, ενώ είναι περισσότερο διαλυτά σε διμεθυλοφορμαμίδιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο.

Ο σκουαρικός δακτύλιος έχει έλλειμα ηλεκτρονίων και συμβολίζεται με 2+ στο κέντρο του, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1. Αυτό το έλλειμα ηλεκτρονίων κάνει τις σκουαραΐνες ευάλωτες σε πυρηνόφιλα (πυρηνόφιλη προσβολή). Η δομή των σκουαραϊνών δεν είναι συγκεκριμένη τόσο λόγω του φορτίου του δακτυλίου όσο και της π-συζυγίας, έτσι συχνά παρομοιάζεται με τα ζβιπτερίοντα όπως το πάρα-κινόνοϊδές (p-quinonoid) και τη βεταΐνη.<sup>[8]</sup>



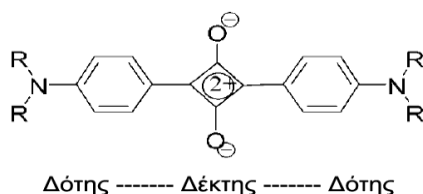


**Σχήμα 2.1. Γενική δομή σκουαραϊνών.<sup>[10]</sup>**

Τα τελευταία 30 χρόνια, οι χρωστικές αυτές έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, οι οποίες έχουν αναπτύξει πληθώρα φωτοχημικών εφαρμογών βασισμένες σε αυτές, όπως η οπτική εγγραφή, η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας, η ηλεκτροφωτογραφία, η μη γραμμική οπτική, η φωτοδυναμική θεραπεία, η βιοχημική επισήμανση, η δημιουργία χρωμογόνων ή / και φθορισμογόνων ιχνηθετών για στόχους όπως το pH, διάφορα ανιόντα, κατιόντα αλλά και ουδέτερα μόρια, καθώς και για τη μελέτη της αυτό-οργάνωσης συσσωματωμάτων των χρωστικών.<sup>[10]</sup>

Πέρα από τις παραπάνω χρήσεις των σκουαραϊνών, όπου χρησιμοποιούνται με την κλασική έννοια του μοριακού ιχνηθέτη – «θέση πρόσδεσης – μονάδα σηματοδότησης» με κατάλληλους υποδοχείς – έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικά συστήματα ανίχνευσης όπου αξιοποιείται η μοναδική τάση των σκουαραϊνών να αποχρωματίζονται (λεύκανση) μέσα από αντιστρέψιμες αντιδράσεις κατά την πυρηνόφιλη προσβολή του σκουαριικού δακτυλίου.

Εκτός από τη δραστηκότητα τους, όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες παραγράφους, οι σκουαραϊνες εμφανίζουν διάφορες άλλες ιδιαιτερότητες, που προκύπτουν από το γεγονός ότι μπορούν να θεωρηθούν ως ένα σύστημα δότη – δέκτη – δότη, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2, όπου ευνοείται η ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer–ICT).

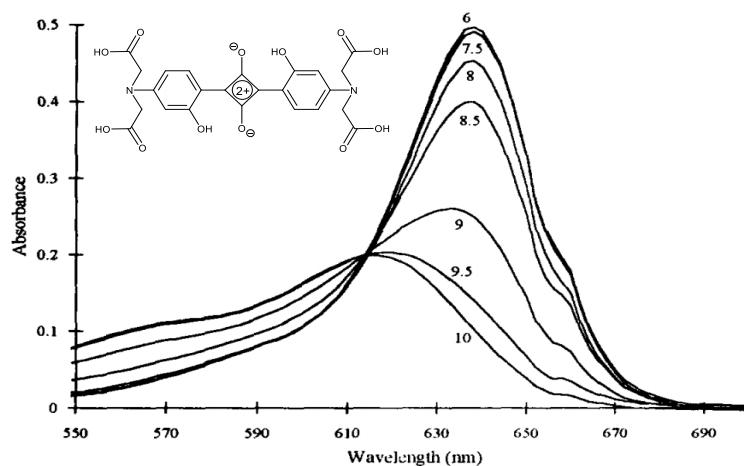


**Σχήμα 2.2. Παράδειγμα σκουαραϊνης ως σύστημα Δότη – Δέκτη – Δότη.<sup>[10]</sup>**

Πιο αναλυτικά, η βασική ( $S_0$ ) και η διεγερμένη ( $S_1$ ) ηλεκτρονιακή κατάσταση των σκουαράϊνών, επιτρέπουν την ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (charge transfer–CT). Η αρωματική / ετεροκυκλική χαρακτηριστική ομάδα και τα άτομα οξυγόνου λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, ενώ ο κεντρικός τετραμελής δακτύλιος είναι ο δέκτης των ηλεκτρονίων αυτών. Η ενδομοριακή μεταφορά φορτίου η οποία ευνοείται κατά τη διέγερση  $S_0 \rightarrow S_1$ , σε συνδυασμό με το εκτεταμένο δίκτυο π–ηλεκτρονίων, εξηγεί τις απότομες και έντονες κορυφές απορρόφησης και φθορισμού των σκουαράϊνών, στην υπέρυθρη περιοχή.

## 2.2 Σκουαράϊνες (Sq) ως πεχαμετρικοί ανιχνευτές

Η μοριακή δομή των σκουαράϊνών καλύπτει το βασικό κριτήριο που χρειάζεται ένας πεχαμετρικός ανιχνευτής, όπως αναπτύχθηκε στο εδάφιο 1.2.1. Ωστόσο, μέχρι σήμερα οι σκουαράϊνες που έχουν συντεθεί με σκοπό τη χρήση τους ως ανιχνευτές pH είναι περιορισμένες. Η πρώτη αναφορά στη σύνθεση τέτοιας σκουαράϊνης έγινε το 1997,<sup>[11]</sup> ενώ η επόμενη έγινε το 2006.<sup>[12]</sup> Στο Σχήμα 2.3 παρουσιάζεται σκουαράϊνη ευαίσθητη στις αλλαγές του pH καθώς και οι μεταβολές στο φάσμα απορρόφησης της σε pH από 6 έως 10.



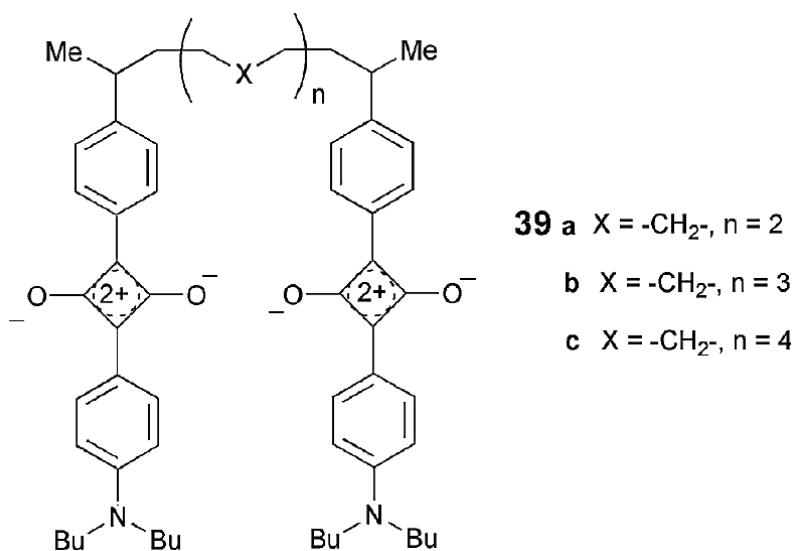
Σχήμα 2.3. Απόκριση της σκουαράϊνης του σχήματος στις αλλαγές pH του διαλύματος.<sup>[11]</sup>

### 2.3 Σκουραΐνες (Sq) ως ιχνηθέτες κατιόντων και ανιόντων

Πέρα από την ικανότητά τους να λειτουργούν ως πεχαμετρικοί ανιχνευτές, πληθώρα σκουραΐνων χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ιόντων.

Μέχρι σήμερα στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κατά κύριο λόγο σκουραΐνες οι οποίες είναι ευαίσθητες είτε σε αλκάλια είτε σε αλκαλικές γαίες. Πιο συγκεκριμένα, έχουν σχεδιαστεί σκουραΐνες οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν εκλεκτικά ιόντα  $\text{Na}^+$  <sup>[13]</sup> ενώ, έχει αναφερθεί η σύνθεση πολυμερούς της σκουραΐνης το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύει εκλεκτικά ιόντα  $\text{Li}^+$  παρουσία ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ .<sup>[14]</sup> Επίσης έχει συντεθεί σκουραΐνη η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  χωρίς παρεμποδίσεις από ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>[15]</sup> Ακόμα, πιο περίπλοκες δομές, όπως αυτή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον δια γυμνού οφθαλμού προσδιορισμό ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>[16,17]</sup>

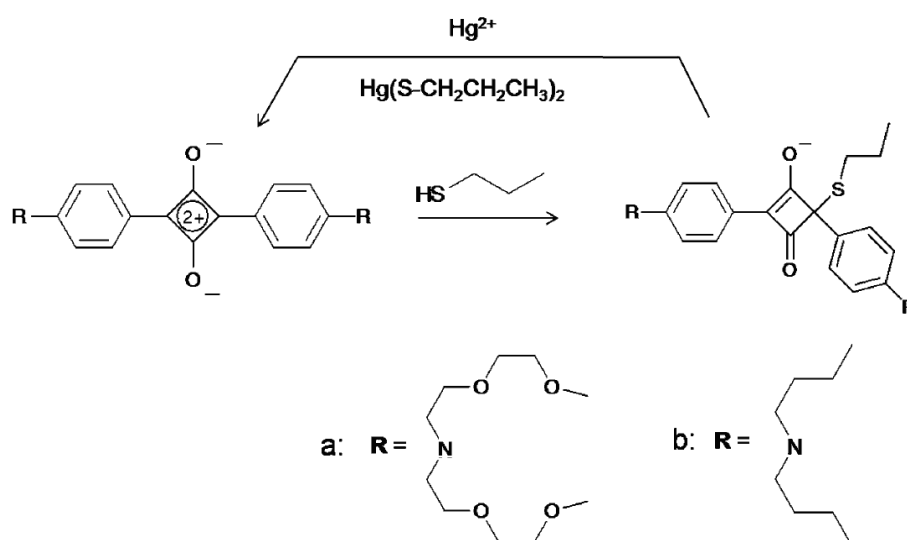
Εξαίρεση αποτελούν οι σκουραΐνες που συντέθηκαν από τον Ros-Lis και την ομάδα του οι οποίες μπορούσαν να ανιχνεύσουν εκλεκτικά ιόντα  $\text{CN}^-$ ,<sup>[18]</sup> καθώς και ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>[19]</sup>



Σχήμα 2.4. Δομή σκουραΐνης που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>[9]</sup>

## 2.4 Άλλες αναλυτικές εφαρμογές των σκουαραϊνών (Sq)

Σε μεγάλο βαθμό έχει αξιοποιηθεί η ευαισθησία του σκουαρκικού δακτυλίου στα πυρηνόφιλα μόρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πληθώρα εφαρμογών των σκουαραϊνών στον προσδιορισμό θειολών.<sup>[20-26]</sup> Στο Σχήμα 2.5 φαίνεται η αντίδραση στην οποία βασίζονται όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού θειολών με χρήση των σκουαραϊνών. Επίσης παρουσιάζεται και η αντίδραση που αναφέρθηκε προηγουμένως αναφορικά με τον προσδιορισμό ιόντων  $\text{Hg}^{2+}$  (Υποκεφάλαιο 2.3).



Σχήμα 2.5. Αντίδραση σκουαραϊνής με θειόλη και στη συνέχεια απομάκρυνση της θειόλης με ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>[9]</sup>

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

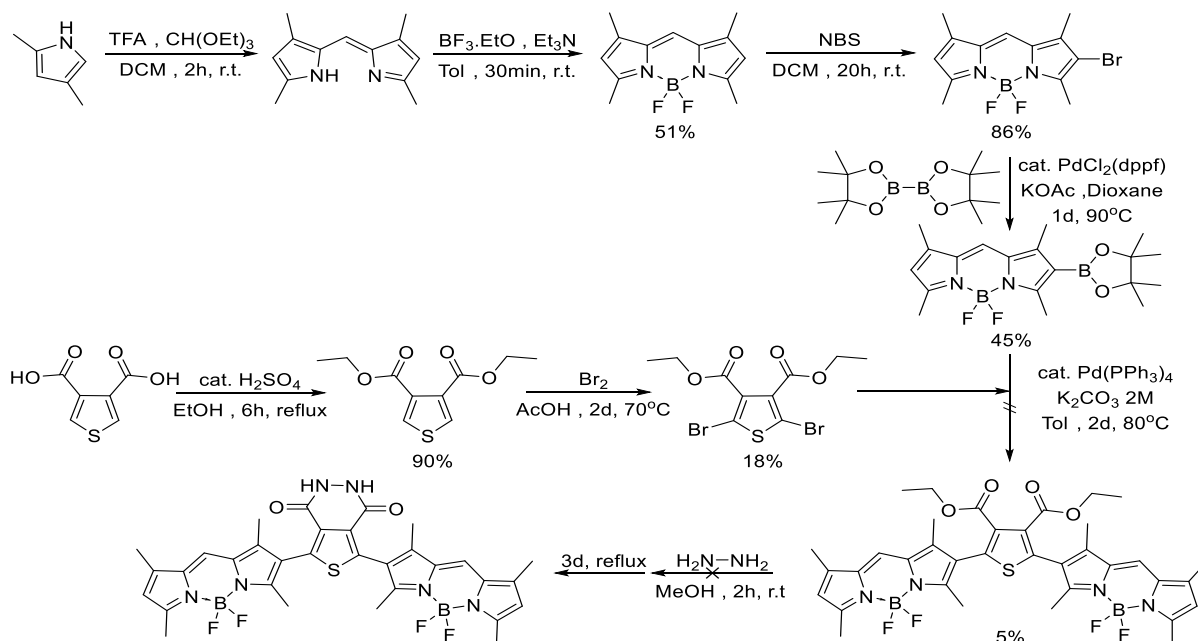
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση νέων οργανικών ενώσεων με ιδιότητες προσαρμοσμένες στις απαιτήσεις της αναλυτικής χημείας. Για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας τέθηκαν συνολικά έξι (6) διακριτοί στόχοι, εκ των οποίων οι τρεις πιο σημαντικοί αναλύονται στην συνέχεια.

Πρώτος στόχος ήταν η ανάπτυξη μεθόδου χημειοφωταυγειομετρικού προσδιορισμού αντιοξειδωτικών ουσιών, με χρήση νέων συμπλόκων του ρουθηνίου. Κύριος αντιπρόσωπος των χημειοφωταυγαζόντων συμπλόκων του ρουθηνίου είναι το  $Ru^{II}(bipy)_3$  ( $bipy = 2,2'$ -bipyridine), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε ένα τεράστιο αριθμό αναλυτικών εφαρμογών.<sup>[27]</sup> Τα σύμπλοκα αυτά είχαν συντεθεί σε παλαιότερες μελέτες<sup>[28]</sup> αλλά στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι οξειδωσή του ρουθηνίου <sup>[29]</sup> δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί στα πολύπλοκα αυτά μόρια.

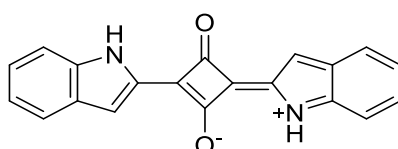
Ένας ακόμα στόχος της εργασίας αυτής ήταν η σύνθεση ενός καινοτόμου ανάλογου της λουμινόλης με την ισχυρά φθορισμοφόρο χρωστική BODIPY (Boron-DIPYromethene, Βορο-διπυρρομεθάνιο).<sup>[30]</sup> Η αρχική πορεία σύνθεσης συνίσταται από 8 διακριτά συνθετικά βήματα, εμπνευσμένα από τη βιβλιογραφία,<sup>[31-33]</sup> τα οποία παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1.



Σχήμα 3.1. Συνθετική πορεία παρασκευής του επιθυμητού ανάλογου της λουμινόλης.<sup>[31-33]</sup>

Τα βήματα της συνθετικής πορείας ήταν αρκετά. Επιπλέον, αρκετά από τα ενδιάμεσα ήταν πολύ δύσκολο να απομονωθούν / καθαρισθούν έτσι ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην επόμενη αντίδραση. Ειδικά, οι αντιδράσεις σύνθεσης των παραγώγων του θειοφαινίου, είχαν ιδιαίτερα μικρές αποδόσεις και παρουσίαζαν κακή επαναληψιμότητα, γεγονός που δυσκόλεψε περισσότερο την όλη συνθετική προσπάθεια. Αποτέλεσμα όλων αυτών ήταν το προτελευταίο βήμα της αντίδρασης (αντίδραση σύζευξης Suzuki – Miyaura<sup>[34-36]</sup>) να αποδώσει ποσότητα προϊόντος που δεν ήταν ικανή για το επόμενο βήμα, ενώ ακόμα και η ταυτοποίησή του δεν ήταν απόλυτα ακριβής. Η συγκεκριμένη ερευνητική προσπάθεια, όπως και άλλες που δεν αναφέρονται στην εργασία αυτή, σταμάτησαν προσωρινά, προκειμένου να συνεχισθούν αργότερα.

Τέλος, σχεδιάστηκε μια νέα σκουαραΐνη (Σχήμα 3.2), για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό θειολών. Σκοπός τελικά της εργασίας αυτής αναδείχθηκε η χρήση της νέας σκουαραΐνης ως ιχνηθέτη θειολών, σε υδατικά διαλύματα. Τελικός στόχος ήταν, η βελτίωση της απόκρισης του συστήματος όσο και η ταυτόχρονη μείωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε η ιδιαίτερη απόκριση της σκουαραΐνης προς τα ιόντα υδραργύρου  $Hg^{2+}$ . Η συντεθείσα σκουαραΐνη επιστρώθηκε σε μεμβράνες κυτταρίνης, παρασκευάζοντας έτσι επιτυχώς αισθητήρες για τον προσδιορισμό ιόντων  $Hg^{2+}$ . Οι αισθητήρες είναι ιδανικοί τόσο για εργαστηριακές αναλύσεις όσο και για αναλύσεις πεδίου.



Σχήμα 3.2. Μοριακή δομή της σκουαραΐνης που συντέθηκε.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Αντιδραστήρια – Οργανολογία

#### 4.1 Όργανα και εξοπλισμός

Οι μετρήσεις απορρόφησης, ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας, διεξήχθησαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης της εταιρίας Shimadzu, Model UV-1800 το οποίο ελέγχεται από το λογισμικό UV Probe (v2.42). Για την καταγραφή των μετρήσεων αυτών χρησιμοποιήθηκε ζεύγος κυψελίδων χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Το όργανο διαθέτει δυνατότητα σάρωσης σε μήκη κύματος από 190 έως 1100 nm (εύρος δέσμης 1 nm).<sup>[37]</sup>

Ο φθορισμός των δειγμάτων μελετήθηκε σε φασματοφθορισμόμετρο της εταιρίας Shimadzu, Model RF-5301PC με λυχνία ξένου (ισχύς 150 W) και εύρος από 220 έως 900 nm ( $\pm 1,5$  nm). Για την καταγραφή των μετρήσεων φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες από χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm και το λογισμικό RFPC.<sup>[38]</sup>

Τα φάσματα απορρόφησης στο υπέρυθρο ελήφθησαν σε τρία διαφορετικά όργανα:

- Εταιρία Shimadzu, Model IRAffinity-1, λογισμικό LabSolutions IR.<sup>[39]</sup>
- Εταιρία PerkinElmer, Model Spectrum One FT-IR.<sup>[40]</sup>
- Εταιρία Thermo, Model FT-IR Nicolet 6700, Εξάρτημα Ολικής Εξασθενημένης Ανάκλασης (ATR) SmartOrbit, λογισμικό OMNIC.<sup>[41]</sup>

Για τις μετρήσεις στα δύο πρώτα όργανα ήταν απαραίτητη η παρασκευή παστίλιας του δείγματος με προ-ξηραμένο βρωμιούχο κάλιο (2 mg δείγμα / 200 mg KBr).

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε δύο όργανα:

- Εταιρία Varian, Model Mercury 200 MHz, λογισμικό VNMR.
- Εταιρία Bruker, Model Avance III 500 MHz, λογισμικό TopSpin.<sup>[42]</sup>

Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOD-D}_2\text{O}$ ,  $\text{DMF-d}_7$ ,  $\text{Methanol-d}_4$ ,  $\text{Acetone-d}_6$ ,  $\text{Acetonitrile-d}_3$ ) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Euriso-top.

Το μοριακό βάρος των ενώσεων που συντέθηκαν προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας (τριπλό τετράπολο) της εταιρίας Thermo, Model MSQ Plus Single Quadrupole (ESI) που ελέγχεται με το λογισμικό Xcalibur.<sup>[43]</sup> Η ακριβής μάζα του τελικού προϊόντος



προσδιορίστηκε με φασματογράφο μάζας υψηλής ανάλυσης (HR–MS TOF) της Εταιρίας Bruker, Maxis Impact (ESI).<sup>[44]</sup>

Οι μελέτες θερμικής σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν σε όργανο Θερμοσταθμικής Ανάλυσης (Thermogravimetric Analysis–TGA) της εταιρίας Mettler Toledo, σε ατμόσφαιρα αζώτου. Ο έλεγχος του οργάνου πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό STARe.<sup>[45]</sup>

Η επίστρωση των μεμβρανών κυτταρίνης πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Για την επίστρωση χρησιμοποιήθηκε ειδικός εξοπλισμός απόθεσης αντιδραστηρίων σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), της εταιρίας Camag, Model Linomat 5 που ελέγχεται από το λογισμικό Wincats.<sup>[46]</sup> Το διάλυμα επιστρώθηκε στις μεμβράνες με σύριγγα τύπου gas tight μέγιστου όγκου 100  $\mu\text{L}$ .

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Αναδευτήρας Δίνης – Vortex (Velp Scientifica srl, ZX<sup>3</sup>)
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Mettler Toledo, College B154).
- Αντλία μεμβράνης (Vacuubrand, M7 2C NT)
- Αντλία υψηλού κενού (Edwards, RV5 oil–sealed rotary vane pump)
- Απαγωγός
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 10–100  $\mu\text{L}$  και 100–1000  $\mu\text{L}$  (Accumax, Smart)
- Θάλαμος εμφάνισης πλακών χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) με ακτινοβολία UV μηκών κύματος 254 και 366 nm (Spectroline)
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας (Velp Scientifica srl, ARE)
- Περιστροφικός Συμπυκνωτής (IKA, RV 8)
- Πεχάμετρο (Thermo, Orion Model 4520).
- Συσκευή υπερήχων (Witeg – Wisd Lab instruments, WiseClean)
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού (Merck Millipore, Milli–Q 18 & 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter) – ειδική αντίσταση 18.2  $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  @ 25°C
- Φυγόκεντρος (International Equipment Co., International Clinical Centrifuge)

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό περιλαμβάνονται επίσης, ογκομετρικές φιάλες Duran κλάσης A (5, 10, 25, 50, 100, 250 mL), σιφώνια σταθερού όγκου Duran κλάσης A (2, 3, 5, 10, 20 mL), βαθμονομημένα σιφώνια Duran κλάσης A (5, 10 mL), εσφυρισμένες σφαιρικές φιάλες (50, 100, 250, 500 mL), κωνικές φιάλες (50, 100, 250, 500 mL), φιάλες Schlenk, ψυκτήρας διπλότοιχος, γραμμή Αργού – Κενού, Dean–Stark παγίδα απόσταξης, εσφυρισμένοι σύνδεσμοι, γυάλινα χωνιά, δοκιμαστικοί σωλήνες, διηθητικά χωνιά τύπου Büchner με βαθμό πορώδους G3 και G4, στήλες για υγρή χρωματογραφία, κρυσταλλωτήριο, γυάλινα φιαλίδια των 7 και 30 mL με πλαστικό πώμα και πιπέττες τύπου Pasteur.

## 4.2 Διαλύτες και Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας είναι αναλυτικής καθαρότητας > 95% και περιλαμβάνουν:

- Αιθανόλη – 99,8% (Acros Organics, CAS: 64–17–5)
- Ακετόνη ≥99,5% (Chem–Lab, CAS: 67–64–1)
- Ακετονιτρίλιο ≥99,9% (Sigma Aldrich, CAS: 75–05–8)
- 1–Βουτανόλη (Carlo Erba, CAS: 71–36–3)
- Διαιθυλαιθέρας ≥99,8% (Sigma Aldrich, CAS: 60–29–7)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Ferak, CAS: 67–68–5)
- N,N–Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) (Carlo Erba, CAS: 68–12–2)
- Διχλωρομεθάνιο 99,8% (Chem–Lab, CAS: 79–09–2)
- Μεθανόλη (Chem–Lab, CAS: 67–56–1)
- Οξικός αιθυλεστέρας (Panreac, CAS: 141–78–6)
- Πετρελαϊκός αιθέρας 40–60°C (Chem–Lab, CAS: 64742–49–0)
- 1–Προπανόλη (Carlo Erba, CAS: 71–23–8)
- Τετραϋδροφουράνιο (Carlo Erba, CAS: 109–99–9)
- Τολουόλιο (Fisher Chemical, CAS: 108–88–3)
- Χλωροφόρμιο (Fisher Chemical, CAS: 67–66–3)

Για τη σύνθεση των σκουαραϊνικών παραγώγων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 4-(Διμεθυλάμινο)πυριδίνη (DMAP) [C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub> – MB: 122,17 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 1122-58-3)
- 1-Βρώμο-2-[2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ]αιθάνιο [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>3</sub> – MB: 227,10 g mol<sup>-1</sup>]
- Βρωμιούχο άλας του 1-Δωδέκυλο-2,3,3-τριμεθυλινδολενίνιου [C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>BrN – MB: 408,47 g mol<sup>-1</sup>]
- 3,4-διυδροξυ-3-κυκλοβουτεν-1,2-διόνη [C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – MB: 114,06 g mol<sup>-1</sup>] (Alfa Aesar, CAS: 2892-51-5)
- 3,4-δαιοξυ-3-κυκλοβουτεν-1,2-διόνη [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – MB: 170,16 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 5231-87-8)
- Ινδόλιο [C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N – MB: 117,15 g mol<sup>-1</sup>] (Riedel-de Haën, CAS: 120-72-9)
- Τριαιθυλαμίνη [C<sub>2</sub>H<sub>15</sub>N – MB: 101,19 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 0.73 g cm<sup>-3</sup>] (Merck, CAS: 121-44-8)
- 2,3,3-Τριμέθυλοινδολενίνιο [C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N – MB: 159,23 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 1640-39-7)
- Πλάκες γέλης σίλικας 60 F<sub>254</sub>, χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) (Merck)
- Πλάκες κυτταρίνης, χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) (Sigma Aldrich)
- Γέλη Σίλικας, 70-230 mesh, 63-200 μm, τεχνικής καθαρότητας, υγρής χρωματογραφίας (Sigma Aldrich, CAS: 112926-00-8)
- Μοριακά κόσκινα, 4 Å (Alfa Aesar, CAS: 70955-01-0)

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων (πρότυπα και ρυθμιστικά διαλύματα) για τις αναλύσεις είναι τα παρακάτω:

- (E)-3-[(1-Δωδεκυλ-3,3-διμεθυλινδολενο-2υλιδενιο)μέθυλο]-4-αιθοξυκυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνη (SSq 1) [C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>3</sub> – MB: 451,65 g mol<sup>-1</sup>]
- CTAB [C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN – MB: 364,45 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 57-09-0)
- SDS [NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub> – MB: 288,38 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 151-21-3)

- Triton-X114 [(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O, (n= 7–8) – MB: 647 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 1.058 g cm<sup>-3</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 9036–19–5)
- Ανθρακικό νάτριο [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – MB: 105,99 g mol<sup>-1</sup>] (Fluka, CAS: 497–19–8)
- Βορικό οξύ [H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – MB: 61,83 g mol<sup>-1</sup>] (Lach-ner, CAS: 10043–35–3)
- Δισόξινο-φωσφορικό νάτριο (Ενυδρο) [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – MB: 137,99 g mol<sup>-1</sup>] (Carlo Erba, CAS: 10049–21–5)
- Μονόξινο-φωσφορικό κάλιο [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – MB: 174,18 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 7778–77–0)
- Οξικό οξύ [CH<sub>3</sub> COOH – MB: 60,05 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 1.05 g cm<sup>-3</sup>] (Carlo Erba, CAS: 64–19–7)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο [NaHCO<sub>3</sub> – MB: 88,01 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 144–55–8)
- Ροδαμίνη 6G [C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl – MB: 479,02 g mol<sup>-1</sup>] (Alfa Aesar, CAS: 989–38–8)
- Υδροξείδιο του αμμωνίου [NH<sub>4</sub>OH (25% NH<sub>3</sub>) – MB: 35,04 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 0.91 g cm<sup>-3</sup>] (Lach-ner, CAS: 1336–21–6)
- Υδροξείδιο του νατρίου [NaOH – MB: 40,00 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 1310–73–2)
- Υδροχλωρικό οξύ 37% [HCl – MB: 36,46 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 1.19 g cm<sup>-3</sup>] (Panreac, CAS: 7647–01–0)
- Φωσφορικό οξύ 85% [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – MB: 97,99 g mol<sup>-1</sup>, ρ: 1.71 g cm<sup>-3</sup>] (Merck, CAS: 7664–38–2)
- Ρυθμιστικό διάλυμα βαθμονόμησης pH-μέτρου, pH 4,00 ± 0,02 (20°C) (Carlo Erba)
- Ρυθμιστικό διάλυμα βαθμονόμησης pH-μέτρου, pH 7,00 ± 0,02 (20°C) (Carlo Erba)
- Ρυθμιστικό διάλυμα βαθμονόμησης pH-μέτρου, pH 10,00 ± 0,05 (20°C) (Carlo Erba)
- Ανθρακικό λίθιο [Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – MB: 73,89 g mol<sup>-1</sup>] (Carlo Erba, CAS: 554–13–2)
- Θειικό κάδμιο [3CdSO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O – MB: 769,51 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 7790–84–3)
- Θειικό νικέλιο [NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O – MB: 262,86 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 10101–97–0)

- Νιτρικό αργίλιο [ $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – MB: 375,15 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 7784–27–2)
- Νιτρικό ασβέστιο [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – MB: 236,15 g mol<sup>-1</sup>]  
(Merck, CAS: 13477–34–4)
- Νιτρικό κοβάλτιο [ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – MB: 291,04 g mol<sup>-1</sup>]  
(The British Drug Houses Ltd., CAS: 10026–22–9)
- Νιτρικό χρώμιο (III) [ $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – MB: 400,15 g mol<sup>-1</sup>]  
(Merck, CAS: 7789–02–8)
- Νιτρικός άργυρος [ $\text{AgNO}_3$  – MB: 169,87 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 7761–88–8)
- Νιτρικός μόλυβδος [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – MB: 331,20 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 10099–74–8)
- Νιτρικός σίδηρος (III) [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – MB: 404,00 g mol<sup>-1</sup>]  
(Merck, CAS: 7782–61–8)
- Νιτρικός χαλκός [ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – MB: 241,60 g mol<sup>-1</sup>]  
(Merck, CAS: 10031–43–3)
- Νιτρικός ψευδάργυρος [ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – MB: 297,48 g mol<sup>-1</sup>]  
(Fluka, CAS: 10196–18–6)
- Τετραχλωροχρυσικό οξύ [ $\text{HAuCl}_4$  (51% Au) – MB: 339,79 g mol<sup>-1</sup>]  
(Riedel–de Haën, CAS: 16903–35–8)
- Τριχλωριούχο ρουθίνιο [ $\text{RuCl}_3$  – MB: 207,43 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 10049–08–8)
- Χλωριούχο μαγγάνιο [ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – MB: 197,91 g mol<sup>-1</sup>]  
(Merck, CAS: 13446–34–9)
- Χλωριούχος υδράργυρος [ $\text{HgCl}_2$  – MB: 271,52 g mol<sup>-1</sup>]  
(Johnson Matthey Co., CAS: 7487–94–7)
- D–Βαλίνη [ $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$  – MB: 117,15 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 640–68–6)
- L–Θρεονίνη [ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$  – MB: 119,12 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 72–19–5)

- L-Ιστιδίνη [ $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$  – MB: 209,63 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 5934–29–2)
- L-Κυστεΐνη [ $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$  – MB: 175,63 g mol<sup>-1</sup>]  
(Biohellas s.a., CAS: 7048–04–6)
- L-Προλίνη [ $C_5H_9NO_2$  – MB: 115,13 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 147–85–3)
- L-Σερίνη [ $HOCH_2CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 105,09 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 56–45–1)
- Αργινίνη [ $H_2NC(=NH)NH(CH_2)_3CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 174,20 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 74–79–3)
- β-Αλανίνη [ $NH_2CH_2CH_2COOH$  – MB: 89,09 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 107–95–9)
- Γλουταμικό οξύ [ $HO_2CCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 147,13 g mol<sup>-1</sup>]  
(Panreac, CAS: 56–86–0)
- Γλουταμίνη [ $H_2NCOCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 146,14 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 56–85–9)
- Κυστίνη [ $(-SCH_2CH(NH_2)CO_2H)_2$  – MB: 240,30 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 56–89–3)
- Μεθειονίνη [ $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 149,21 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 63–68–3)
- Μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης [ $HSCH_2CH(NH_2)COOCH_3 \cdot HCl$  –  
MB: 171,65 g mol<sup>-1</sup>] (Fluka, CAS: 18598–63–5)
- Βεταΐνη [ $(CH_3)_3N^+CH_2COO^- \cdot HCl$  – MB: 153,61 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 590–46–5)
- N – ακετυλοκυστεΐνη [ $HSCH_2CH(NHCOCH_3)CO_2H$  – MB: 163,19 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 616–91–1)
- Φαινυλαλανίνη [ $C_6H_5CH_2CH(NH_2)CO_2H$  – MB: 165,19 g mol<sup>-1</sup>]  
(Sigma Aldrich, CAS: 63–91–2)

- 1,2-δισ(4-μεθυλ-4H-1,2,4-τριαζολ-3-υλ)δισουλφίδιο [ $C_6H_8N_6S_2$  – MB: 228,29 g mol<sup>-1</sup>]
- 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH.HCl – MB: 141,66 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 13242-44-9)
- 2-μερκαπτοξικό οξύ [HSC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COOH – MB: 92,11 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 68-11-1)
- 4-Ακεταμιδοθειοφαινόλη [CH<sub>3</sub>CONHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SH – MB: 167,23 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 1126-81-4)
- Αντιδραστήριο Ellman – 5,5'-διθειοδισ(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) [(-SC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(NO<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> – MB: 396,35 g mol<sup>-1</sup>] (Sigma Aldrich, CAS: 69-78-3)
- Πυρρολιδινό-1-καρβοδιθειοϊκό αμμώνιο [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NS<sub>2</sub>.NH<sub>4</sub> – MB: 164,30 g mol<sup>-1</sup>] (Merck, CAS: 5108-96-3)

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια τα τελικά προϊόντα των συνθέσεων που θα περιγραφούν στο επόμενο κεφάλαιο (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5):

- (E)-3-μεθόξυ-4-([1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλ)-3,3-διμεθυλινδολιν-2-υλιδένιο] μεθυλο)κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνη (SSq – TGME) [C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> – MB: 415,49 g mol<sup>-1</sup>].
- 4-((1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλ-3H-ινδολ-1-ιουμ-2-υλ)μεθυλεν)-2-((1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλινδολιν-2-υλιδένιο)μεθυλ)-3-οξοκυκλοβουτ-1-εν-1-ολικό ιόν (Sq 1) [C<sub>50</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – MB: 733,14 g mol<sup>-1</sup>].
- 2-(3H-ινδολ-1-ιουμ-2-υλ)-4-(1H-ινδολ-2-υλ)-3-οξοκυκλοβουτ-1-εν-1-ολικό ιόν (Sq) [C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – MB: 312,33 g mol<sup>-1</sup>].

Για την εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού υδραργύρου επιστρώθηκαν μεμβράνες από ίνες κυτταρίνης (πάχος: 0,1 cm, πλάτος: 1,7 cm) της εταιρίας Merck-Millipore (CFSP002000 | C083).

### 4.3 Διαλύματα

Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν από αντιδραστήρια καθαρότητας αναλυτικού βαθμού και όσα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια ήταν φασματοσκοπικώς καθαρά (NMR, UV-Vis).

Απαεριωμένο υπερκάθαρο νερό. Παρασκευάζεται από υπερκάθαρο νερό το οποίο μέσα σε μία αεροστεγή φιάλη, υπό ελαττωμένη πίεση ( $\approx 50$  torr), τοποθετείται στη συσκευή υπερήχων για μισή ώρα. Στη συνέχεια στη φιάλη διοχετεύεται αργό, έτσι ώστε να εξισορροπιστεί η πίεση εντός της φιάλης με την ατμοσφαιρική.

Διάλυμα παρακαταθήκης αμινοξέων,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ζυγίζονται περίπου 10 mg αμινοξέος και αραιώνονται με απαεριωμένο υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 10 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$  για 1 εβδομάδα.

Διάλυμα παρακαταθήκης θειολών,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ζυγίζονται περίπου 10 mg θειόλης και αραιώνονται με απαεριωμένο υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 10 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$  για 1 ημέρα μακριά από φως.

Διάλυμα παρακαταθήκης ιόντων μετάλλων,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα άλατος του μετάλλου και ακολουθεί αραιώση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 10 mL. Τα διαλύματα ιόντων αργύρου και υδραργύρου φυλάσσονται μακριά από το φως και το διάλυμα του τετραχλωροχρυσικού οξέος φυλάσσεται στο ψυγείο.

Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, 2,00 M. Ζυγίζονται 8,00 g υδροξειδίου του νατρίου σε ποτήρι ζέσεως, διαλυτοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη και ακολουθεί αραιώση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστικό φιάλη.

Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, 1,00 M. Μεταφέρονται 8,30 mL υδροχλωρικού οξέος 37% σε 50 mL υπερκάθαρου νερού και ακολουθεί αραιώση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα Britton – Robinson, 0,40 M ( $0,40 \text{ M CH}_3\text{COOH} - 0,40 \text{ M H}_3\text{PO}_4 - 0,40 \text{ M H}_3\text{BO}_3$ ). Ζυγίζονται 6,20 g βορικού οξέος σε ποτήρι, διαλυτοποιούνται σε περίπου 100 mL υπερκάθαρο νερό, αναμειγνύονται με 5,75 mL παγόμορφου οξικού οξέος και 6,75 mL πυκνού φωσφορικού οξέος και το μίγμα αραιώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 250 mL. Το



τελικό pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην επιθυμητή τιμή (5-9) με προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, 1,00 M, pH = 7,0. Μεταφέρονται 5,75 mL παγόμορφου οξικού οξέος σε 50 mL υπερκάθαρο νερό. Προστίθενται 6,90 mL αμμωνίας 25% και το μίγμα αραιώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL. Το τελικό pH ρυθμίζεται στην τιμή 7,0, με προσθήκη αραιού διαλύματος με CH<sub>3</sub>COOH ή NH<sub>3</sub>.

Ρυθμιστικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, 1,00 M, pH = 8,3. Ζυγίζονται 8,80 g όξινου ανθρακικού νατρίου σε ποτήρι ζέσεως, διαλυτοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό και αραιώνονται μέχρι όγκου 100 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου, 1,00 M, pH = 11,4. Ζυγίζονται 10,60 g ανθρακικού νατρίου σε ποτήρι ζέσεως, διαλυτοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό και αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,20 M, pH = 6,8. Ζυγίζονται 1,74 g μονόξινου-φωσφορικού καλίου και 1,38 g δισόξινου-φωσφορικού νατρίου σε ποτήρι ζέσεως, διαλυτοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη και αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,10 M, pH = 8,0. Ζυγίζονται 1,74 g μονόξινου-φωσφορικού καλίου σε ποτήρι ζέσεως, διαλυτοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό και το pH ρυθμίζεται με φωσφορικό οξύ μέχρι την επιθυμητή τιμή (9,2 – 8,0). Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και ακολουθεί αραιώση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 100 mL.

Διάλυμα Ροδαμίνης 6G,  $3,00 \times 10^{-3}$  M. Ζυγίζονται 14,4 mg ροδαμίνης 6G, διαλύονται και αραιώνονται με αιθανόλη ή ακετονιτρίλιο μέχρι όγκου 10 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται για 1 ημέρα στους  $-18^{\circ}\text{C}$  μακριά από φως.

Διάλυμα αντιδραστηρίου Ellman's (DTNB), 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ζυγίζονται 20,0 mg DTNB, διαλύονται και αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,10 M (pH = 8,0) μέχρι όγκου 5 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται για 1 εβδομάδα στους  $4^{\circ}\text{C}$  μακριά από φως

Διάλυμα ημι-σκουαρινών SSq 1, SSq – TGME και Sq 1,  $2,00 \times 10^{-3}$  M. Ζυγίζονται περίπου 10,0 mg ημι-σκουαρινής και ακολουθεί αραιώση με μεθανόλη ή ακετόνη ή ακετονιτρίλιο μέχρι όγκου 10 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται για 1 εβδομάδα στους  $-18^{\circ}\text{C}$  μακριά από φως.

Διάλυμα σκουραΐνης Sq,  $3,50 \times 10^{-3}$  M. Ζυγίζονται περίπου 11,0 mg σκουραΐνης και ακολουθεί αραιώση με DMF μέχρι όγκου 10 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται για ένα μήνα στους  $-18^{\circ}\text{C}$  μακριά από φως.

Διάλυμα επιφανειοδραστικών SDS και CTAB,  $1,00 \times 10^{-2}$  M. Ζυγίζονται 37,0 mg CTAB ή 30 mg SDS, αντίστοιχα και ακολουθεί αραιώση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 10 mL. Διάλυμα επιφανειοδραστικού Triton-X114, 10%. 1 mL Triton-X114 αραιώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκου 10 mL.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

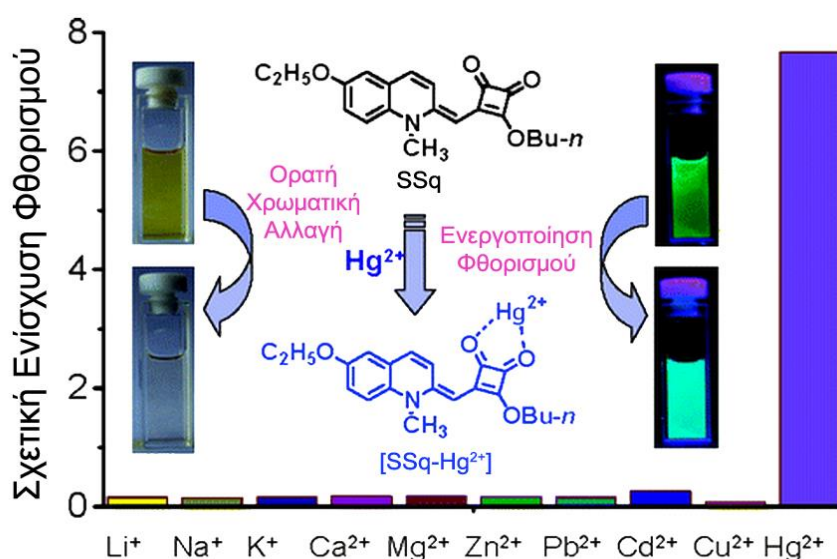
### Σύνθεση Σκουαραϊνικών Παραγώγων

#### 5.1 Εισαγωγή

Από τη βιβλιογραφία των παραγώγων του σκουαρικού οξέος, προκύπτει ότι οι ημι-σκουαραΐνες δρουν ως ιχνηθέτες υδραργύρου.<sup>[47]</sup> Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η σύνθεση σκουαραΐνων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό θειολών σε ποικιλία φυσικών δειγμάτων. Στα επόμενα υποκεφάλαια περιγράφονται οι πορείες σύνθεσης των ημι-σκουαραΐνών και σκουαραΐνών που μελετήθηκαν.

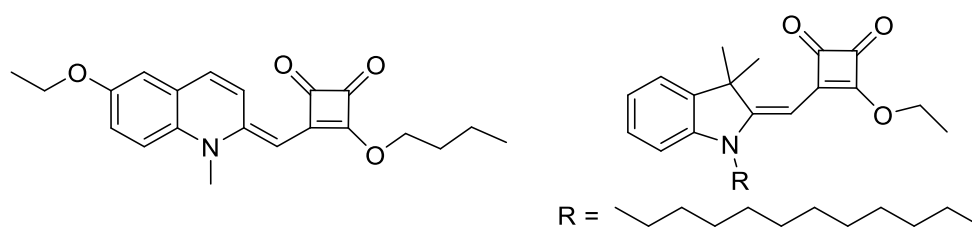
#### 5.2 Σύνθεση ημι-σκουαραΐνών (SSq)

Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση ημι-σκουαραΐνης στη βιβλιογραφία, ήταν αυτή της (E)-3-βουτοξυ-4-((6-αιθοξυ-1-μεθυλκινόλιν-2(1H)-υλιδένιο) μεθυλ) κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε από την Rekha R. Anirah, για τον εκλεκτικό προσδιορισμό ιόντων  $Hg^{2+}$  σε μικυλλιακά συστήματα. Το χρώμα της ημι-σκουαραΐνης αυτής, μειωνόταν αυξανόμενης της συγκέντρωσης των ιόντων  $Hg^{2+}$ , ενώ παράλληλα αυξανόταν η ένταση του φθορισμού της (βλ. Εικόνα 5.1).<sup>[47]</sup>



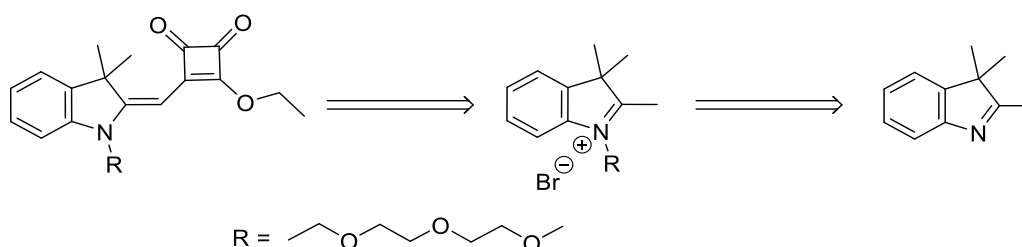
Εικόνα 5.1. Μοριακή δομή της ημι-σκουαραΐνης (SSq)((E)-3-βουτοξυ-4-((6-αιθοξυ-1-μεθυλκινόλιν-2(1H)-υλιδένιο) μεθυλ) κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης) και τα αποτελέσματα της πρόσδεσης των ιόντων  $Hg^{2+}$  στο χρώμα (αριστερά) και στο φθορισμό (δεξιά) της.<sup>[47]</sup>

Η πρώτη ημι-σκουαράϊνη που δοκιμάστηκε ως ιχνηθέτης υδραργύρου ήταν η ημι-σκουαράϊνη που είχε συνθέσει ο υποψήφιος διδάκτορας Καμπανάκης Αντώνης (SSq 1) με μοριακή δομή που φαίνεται στο Σχήμα 5.1. Η SSq 1 διαλύθηκε σε ακετόνη και αραιώθηκε σε μίγμα νερού : ακετόνης 9 : 1 ο/ο παρουσία ενός επιφανειοδραστικού (SDS, CTAB, Triton-X114) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης (CMC = 12 mM). Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η απορρόφηση και ο φθορισμός δεν παρουσίαζε σημαντικές μεταβολές αυξανόμενης της συγκέντρωσης των ιόντων υδραργύρου.



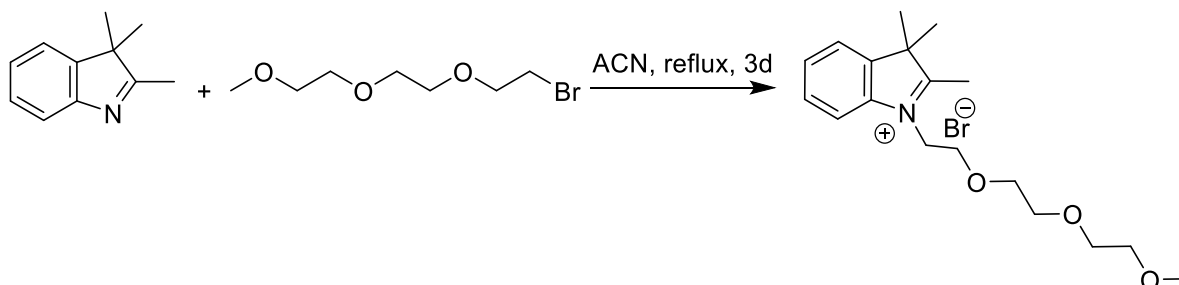
**Σχήμα 5.1. Μοριακές δομές, της ημι-σκουαράϊνης ((E)-3-βουτοξυ-4-((6-αιθοξυ-1-μεθυλοινολιν-2(1H)-υλιδένιο) μεθυλ) κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης) (αριστερά) και της SSq 1 (δεξιά).**

Η δυσχέρεια χρήσης της SSq 1 αποδίδεται στην περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό καθώς και στο μήκος της αλειφατικής αλυσίδας το οποίο παρεμποδίζει την πρόσδεση των ιόντων  $Hg^{2+}$  στο σκουαρικό δακτύλιο. Για τον περιορισμό των δυσχερειών, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκε και συντέθηκε η ημι-σκουαράϊνη SSq – TGME, η οποία φέρει μία αλυσίδα τριαιθυλενογλυκόλης αντί της αλειφατικής αλυσίδας της SSq 1 (Σχήμα 5.2). Τέτοιες ομάδες συνήθως χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν την υδροφιλικότητα των οργανικών μορίων, βελτιώνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους στο νερό.<sup>[48]</sup>



**Σχήμα 5.2. Ρετροσυνθετική πορεία σύνθεσης της ημι-σκουαράϊνης SSq – TGME.**

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το πρώτο βήμα της σύνθεσης έχει ως πρώτη ύλη τα 2,3,3-τριμεθυλοινδολενίνιο και το 1-βρώμο-2-[2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ]αιθάνιο (Σχήμα 5.3).<sup>[49]</sup>



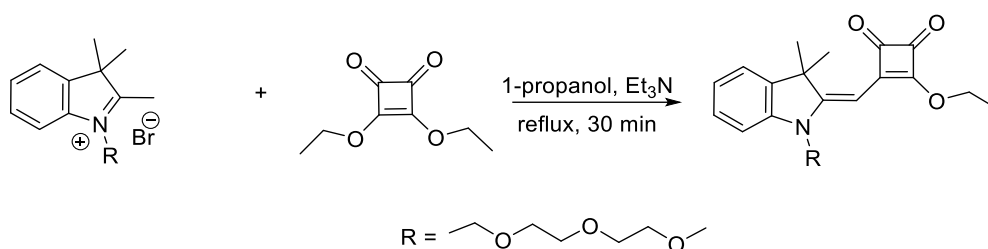
**Σχήμα 5.3. Σύνθεση του βρωμιούχου άλατος του 1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλ)-2,3,3-τριμεθυλο-3H-ινδολ-1-ίου.**

Σε προξηραμένη δίλιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL, με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 0,10 g 2,3,3-τριμεθυλοινδολενινίου (0,63 mmol). Το αντιδραστήριο διαλύεται σε 10 mL ξηρό και απαεριωμένο διαλύτη ACN. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 0,30 g 1-βρώμο-2-[2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ]αιθάνιο (1,32 mmol) και το μίγμα αφήνεται να ζέει με επαναρροή (reflux) για 3 μέρες, υπό ροή αργού. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι μικρού όγκου περίπου 1 mL. Το προϊόν απομονώνεται με καταβύθιση από το μίγμα της αντίδρασης, μετά την προσθήκη 50 mL Et<sub>2</sub>O.

#### Βρωμιούχο άλας του 1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλ)-2,3,3-τριμεθυλο-3H-ινδολ-1-ίου

Μωβ στερεό με ελαιώδη υφή: 0,22 g, απόδοση 90%,  $R_f = 0,0$  (σε EtOAc), <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.93 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.53 (s, 3H), 5.11 (t, 2H), 4.03 (t, 2H), 3.77 – 3.34 (m, 8H), 3.30 (s, 3H), 3.06 (s, 2H), 1.61 (s, 6H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 129.92, 129.64, 123.06, 116.10, 71.82, 70.40, 67.29, 59.04, 50.05, 23.10, 16.30.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αντιδράσεις των σκουαρικών εστέρων με βάσεις του μεθυλενίου οδηγούν σε μονο-υποκατεστημένους εστέρες.<sup>[50]</sup> Έτσι, το επόμενο βήμα ήταν η αντίδραση του ινδολικού άλατος με το σκουαρικό διαιθυλεστέρα (Σχήμα 5.4).



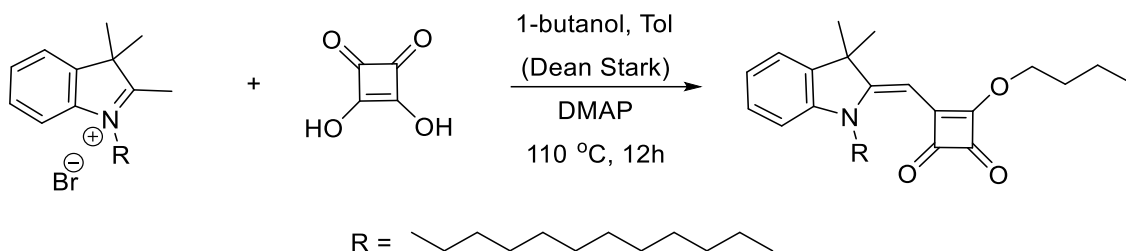
**Σχήμα 5.4. Σύνθεση της (E)-3-αιθοξυ-4-((1-(2-(2-(2-μεθοξυαιθοξυ)αιθοξυ)αιθυλο)-3,3-διμεθυλινδολιν-2-υλιδενιο)μεθυλ)κυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης [ημι-σκουαραΐνη SSq – TGME].**

Σε προξηραμένη δίλιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL, με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 0,20 g του ινδολικού άλατος (0,52 mmol). Το αντιδραστήριο διαλύεται σε 15 mL 1-προπανόλης. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 92  $\mu$ L 3,4-δihydroxy-3-κυκλοβουτεν-1,2διόνης (0,52 mmol) και μικρή ποσότητα ( $\approx$  50  $\mu$ L) τριαιθυλαμίνης που δρα καταλυτικά. Το μίγμα αφήνεται να ζέει με επαναρροή (reflux) για 30 περίπου λεπτά, υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης ( $\text{Et}_2\text{O}$  / P.Ether 20 : 80 έως 50 : 50 ο/ο, βαθμιδωτή έκλουση).

#### Ημι-σκουαραΐνη SSq – TGME

Κίτρινο-πορτοκαλί στερεό με ελαιώδη υφή: 0,16 g, απόδοση 75%,  $R_f = 0,6$  (σε  $\text{Et}_2\text{O}$  / P.Ether 50 : 50 ο/ο),  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.21 (dd, 2H), 7.04 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.86 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 4.02 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.76 (t,  $J = 5.9$  Hz, 3H), 3.62 – 3.38 (m, 8H), 3.31 (s, 3H), 1.58 (s, 6H), 1.50 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 192.13, 187.61, 173.65, 168.44, 142.70, 140.33, 127.51, 122.53, 121.56, 108.86, 81.53, 71.63, 70.91, 70.38, 69.76, 67.03, 58.79, 47.70, 43.06, 26.82, 24.24, 23.31, 15.77, 9.82, MS (ESI +25, MeOH):  $[M+H]^+$  430.29 Da

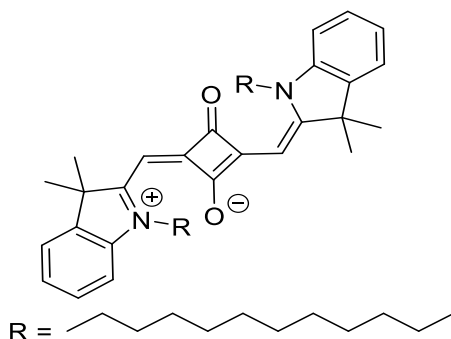
Κατά τη μελέτη της ημι-σκουαραΐνης SSq – TGME, παρατηρήθηκε ότι η διαλυτότητα στο νερό είναι αυξημένη, ωστόσο χρήση της ως ιχνηθέτη ιόντων υδραργύρου δεν απέδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για τη βελτίωση της ευαισθησίας αποφασίσθηκε η σύνθεση της SSq 2, που είναι το Z ισομερές της SSq 1, η οποία περιγράφεται παρακάτω. (Σχήμα 5.5).



**Σχήμα 5.5.** Θεωρητική σύνθεση της (Z)-3-[(1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλινδολενο-2υλιδένιο)μέθυλο]-4-αιθοξυκυκλοβουτ-3-εν-1,2-διόνης [ημι-σκουαραΐνη SSq 2].

Σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL, με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 0,20 g του ινδολικού βρωμιούχου άλατος (0,49 mmol). Το αντιδραστήριο διαλύεται σε 100 mL μίγματος 1-βουτανόλης : τολουολίου 50 : 50 ο/ο. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται 0,056 g σκουαρικού οξέος (0,49 mmol – ανακρυσταλλώθηκε από νερό) και 0,12 g 4-(διμεθυλάμινο)πυριδίνης (0,98 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 110°C για 12 ώρες, υπό ατμόσφαιρα αργού και ανά τακτά χρονικά διαστήματα συλλέγεται ποσότητα του διαλύτη με τη χρήση παγίδας Dean–Stark. Ο όγκος του διαλύτη που συλλέγεται ανανεώνεται στο μίγμα της αντίδρασης από νέο μίγμα 1-βουτανόλης : τολουολίου 50 : 50 ο/ο. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (EtOAc / P.Ether 20 : 80 ο/ο).

Από την πορεία σύνθεσης δεν προέκυψε η SSq 2 αλλά η Sq 1 δηλαδή το 4-((1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλ-3H-ινδολ-1-ιουμ-2-υλ)μεθυλεν)-2-((1-δωδεκυλ-3,3-διμεθυλινδολιν-2-υλιδενιο)μεθυλ)-3-οξοκυκλοβουτ-1-εν-1-ολικό ιόν, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.6.



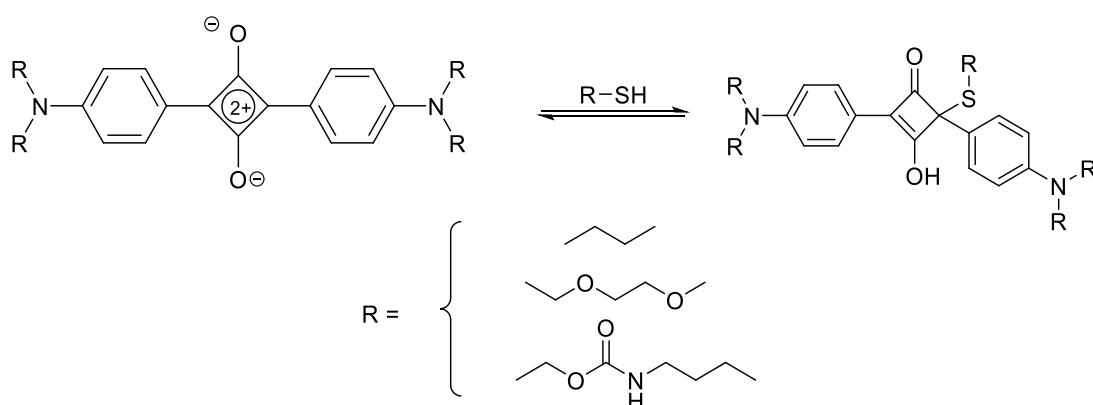
**Σχήμα 5.6.** Μοριακή δομή της σκουαραΐνης Sq 1.

## Σκουαράϊνη Sq 1

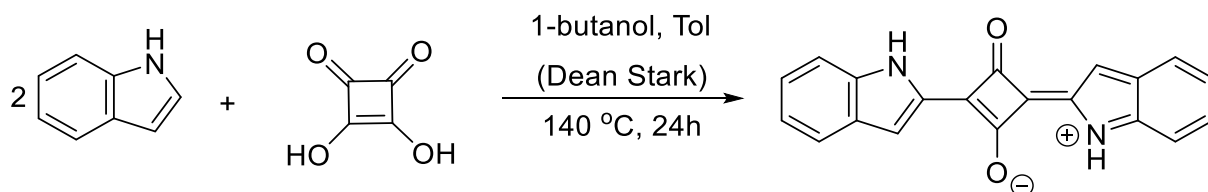
Μπλε στερεό: 0,18 g, απόδοση 50%,  $R_f = 0,2$  (σε Et<sub>2</sub>O / P.Ether 20 : 80 o/o), <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33 (dd, 4H), 7.14 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 5.95 (s, 2H), 1.78 (s, 12H), 1.24 (s, 40H), 0.86 (s, 6H).

### 5.3 Σύνθεση της διινδολο-σκουαράϊνης

Επειδή οι προσπάθειες που περιγράφηκαν κατέληξαν στη σύνθεση σκουαράϊνης (Σχήμα 5.6) αντί της αντίστοιχης ημι-σκουαράϊνης (Σχήμα 5.5), σχεδιάστηκε και συντέθηκε μια νέα σκουαράϊνη, με δομή παρόμοια με αυτή της βιβλιογραφίας<sup>[20,25]</sup> (Σχήμα 5.7) αλλά με υποκαταστάτες το ινδόλιο, που δεν είχε συντεθεί μέχρι σήμερα. Η πορεία σύνθεσης της σκουαράϊνης αυτής παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.8. Το ινδόλιο χρησιμοποιήθηκε ως ανάλογο του πυρρολίου που έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές σκουαράϊνες.<sup>[7,9]</sup>



Σχήμα 5.7. Σκουαράϊνες της βιβλιογραφίας και η αντίδρασή τους με τις θειόλες. Η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη και έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της σκουαράϊνης.<sup>[20,25]</sup>



Σχήμα 5.8. Σύνθεση του 2-(3H-ινδολ-1-ιουμ-2-υλ)-4-(1H-ινδολ-2-υλ)-3-οξοκυκλοβουτ-1-εν-1-ολικού ιόντος [σκουαράϊνη Sq].



Σε προξηραμένη δίλαιομη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL, με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 0,74 g του ινδολίου (6,32 mmol). Το αντιδραστήριο διαλύεται σε 150 mL μίγματος 1-βουτανόλης : τολουολίου 50 : 50 ο/ο. Στο διάλυμα προστίθενται 0,36 g σκουαρικού οξέος (3,16 mmol) που έχει ανακρυσταλλωθεί από νερό. Το μίγμα θερμαίνεται στους 140°C για συνολικά 24 ώρες, υπό ατμόσφαιρα αργού και ανά τακτά χρονικά διαστήματα συλλέγεται ποσότητα του διαλύτη με τη χρήση παγίδας Dean–Stark. Ο όγκος του διαλύτη που συλλέγεται, ανανεώνεται στο μίγμα της αντίδρασης με μίγμα 1-βουτανόλης : τολουολίου 50 : 50 ο/ο. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι περίπου 5 mL. Το προϊόν απομονώνεται με καταβύθιση μετά την προσθήκη 100 mL τολουολίου.

#### Σκουαράϊνη Sq

Μωβ κρύσταλλοι: 0,89 g, απόδοση 90%,  $R_f = 0,15$  (σε EtOAc), Σ.Τ. > 250°C,  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz, DMF-d7) δ: 13.20 (s, 2H), 8.93 – 8.80 (m, 4H), 7.73 – 7.62 (m, 2H), 7.39 (dt,  $J = 6.8, 3.6$  Hz, 4H),  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMF-d7) δ: 13.17 (s, 2H), 8.87 (d,  $J = 13.9$  Hz, 4H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 4H),  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, DMF) δ 189.94, 180.45, 139.30, 137.34, 127.04, 125.80, 125.16, 124.35, 114.35, 113.27, 30.69, MS (ESI +25, MeOH):  $[\text{M}+\text{H}]$  313.11 Da, HRMS (ESI, ACN):  $[\text{M}-\text{H}]$  311.0794,  $[\text{M}+\text{H}]$  313.0946.

Η προτεινόμενη μοριακή δομή της σκουαράϊνης Sq, που συντέθηκε, προκύπτει από τα φάσματα NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC), την απορρόφηση των χαρακτηριστικών ομάδων στο IR και την ακριβή μάζα του μορίου (βλ. Παράρτημα II).

Η Sq εμφανίζει μειωμένη διαλυτότητα στους περισσότερους κοινούς οργανικούς διαλύτες. Είναι αδιάλυτη σε εξάνιο και όξινα υδατικά διαλύματα ( $\text{pH} < 8$ ), μερικώς διαλυτή σε τολουόλιο, χλωροφόρμιο, DCM και ACN, αρκετά διαλυτή σε ακετόνη και THF και πλήρως διαλυτή σε DMF.

Η Sq εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης περί τα 540 nm η οποία εξαρτάται από το διαλύτη και το pH του διαλύματος. Συγκεκριμένα σε κυψελίδα ενός εκατοστού και σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, η Sq εμφανίζει συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας:

$$\epsilon = 1,8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm})$$

Πέραν της ικανότητάς της να απορροφά ισχυρά, φθορίζει με συντελεστή κβαντικής απόδοσης φθορισμού  $\Phi_f = 4,95\%$  σε ACN ( $\lambda_{ex} = 541 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$ ) και  $\Phi_f = 4.35\%$  σε EtOH ( $\lambda_{ex} = 544 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$ ) [Πρότυπη ένωση: R6G].

Επίσης, σύμφωνα με τη θερμοσταθμική ανάλυση, η S<sub>q</sub> δεν υπόκειται σε καμία χημική μεταβολή μέχρι τους 300°C, γεγονός που την καθιστά αρκετά σταθερή ακόμα και σε αυξημένες θερμοκρασίες. Παρόλο που η στερεά S<sub>q</sub> είναι σταθερή, τα διαλύματά της είναι ασταθή ανάλογα με τις συνθήκες. Διάλυμα S<sub>q</sub> σε μεθανόλη ή σε υδατικά διαλύματα με pH >6 αποχρωματίζεται σταδιακά, ενώ διαλύματα S<sub>q</sub> που εκτίθενται στο φως εμφανίζουν χαμηλότερη απορρόφηση από αυτά που φυλάσσονται στο σκοτάδι. Σταθερά είναι τα διαλύματα της S<sub>q</sub> σε DMF που φυλάσσονται μακριά από το φως και στους -18°C για περίπου 1 μήνα. Στις ίδιες συνθήκες διαλύματα S<sub>q</sub> σε ακετονιτρίλιο είναι σταθερά για μια εβδομάδα.

Χαρακτηριστικό της S<sub>q</sub> είναι η ικανότητά της να σχηματίζει συσσωματώματα τα οποία εμφανίζονται κυρίως σε μίγματα οργανικού διαλύτη (Ακετόνη, ACN, MeOH) με νερό πάνω από 75% ο/ο. Τα συσσωματώματα έχουν πορτοκαλί – χρυσαφί χρώμα και είναι συνήθως ορατά με γυμνό μάτι (βλ. Εικόνα 5.2).



**Εικόνα 5.2. Σχηματισμός συσσωματωμάτων κατά την προσθήκη νερού σε διάλυμα της S<sub>q</sub> σε ACN.**

Όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα παρατίθενται στο Παράρτημα II.

Σε προκαταρκτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν (βλ. Εικόνα 5.3), βρέθηκε ότι διάλυμα S<sub>q</sub> αποχρωματίζεται όταν αντιδρά με θειόλες σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (pH > 6,0). Επομένως, η S<sub>q</sub> θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης θειολών. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι σε βασικό περιβάλλον παρουσία NaHCO<sub>3</sub> ή NaCO<sub>3</sub>, η S<sub>q</sub> σχηματίζει κολλοειδή ιζήματα με τα ιόντα του υδραργύρου (Hg<sup>2+</sup>). Το ίζημα έχει μπλε χρώμα, γεγονός που υποδεικνύει πως η S<sub>q</sub> θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως ιχνηθέτης υδραργύρου. Οι πιθανές εφαρμογές της S<sub>q</sub> παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια.



**Εικόνα 5.3.** Από αριστερά, διάλυμα της σκουαράϊνης S<sub>q</sub> σε ACN : H<sub>2</sub>O 30 : 70 ο/ο, διάλυμα της S<sub>q</sub> παρουσία θειόλης (L – κυστείνης), διάλυμα της S<sub>q</sub> παρουσία ιόντων υδραργύρου (Hg<sup>2+</sup>), διάλυμα της S<sub>q</sub> μετά από 3 μήνες παραμονής σε θερμοκρασίες από 20 έως 38°C και έκθεση στο φως.

#### 5.4 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν μία ημι-σκουαράϊνη και δύο σκουαράϊνες. Οι δύο ημι-σκουαράϊνες (SS<sub>q</sub> 1 και SS<sub>q</sub> – TGME) χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες υδραργύρου, χωρίς ιδιαίτερα αποτελέσματα και οι δύο σκουαράϊνες ως ιχνηθέτες θειολών. Η σκουαράϊνη S<sub>q</sub> 1 δεν αντέδρασε με θειόλες σε αντίθεση με τη σκουαράϊνη S<sub>q</sub> που αντιδρά με θειόλες, ενώ παρουσία ιόντων υδραργύρου σχηματίζει κολλοειδή μπλε ιζήματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου για το Φασματοφωτομετρικό Προσδιορισμό Θειολών

#### 6.1 Εισαγωγή

Οι θειόλες (ή μερκαππάνες) είναι οργανικές ενώσεις, ανάλογα των αλκοολών, οι οποίες φέρουν μία (τουλάχιστον) υδροθειομάδα ( $-SH$ ) αντί αυτής του υδροξυλίου ( $-OH$ ), συνδεδεμένη με άτομο άνθρακα. Μια σημαντική ιδιότητα των θειολών είναι η έντονη και ενίοτε δυσάρεστη οσμή τους. Ειδικά τα μικρότερα μέλη της ομόλογης σειράς έχουν αξιοσημείωτα ανυπόφορη οσμή, η οποία όμως μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα.<sup>[51]</sup>

Χαρακτηριστικό παράδειγμα θειόλης αποτελεί η αιθανοθειόλη, η οποία προστίθεται στο φυσικό αέριο (συνήθως άοσμο) έτσι ώστε να γίνεται άμεσα αντιληπτή μια πιθανή διαρροή του αερίου. Ακόμα, θειόλες όπως η *trans*-2-βουτεν-1-θειόλη εκλύονται από τα κουνάβια όταν βρίσκονται σε κίνδυνο. Ενώ, στη μεθανοθειόλη οφείλεται η χαρακτηριστική οσμή που έχουν τα στρείδια, το τυρί τσένταρ, τα κρεμμύδια και το σκόρδο. Το σκόρδο περιέχει επίσης 2-προπεν-1-θειόλη. Η οσμή των κρεμμυδιών οφείλεται στην 1-προπανοθειόλη, η οποία είναι και δακρυγόνος ουσία.<sup>[52]</sup>

Βιολογικής σημασίας θειόλες όπως η κυστεΐνη, η ομοκυστεΐνη και η γλουταθειόνη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα καθώς δρουν ως αντιοξειδωτικά. Συγκεντρώσεις εκτός των φυσιολογικών τους επιπέδων, έχουν συνδεθεί άμεσα με ορισμένες ασθένειες και τον καρκίνο. Ανεπάρκεια κυστεΐνης, μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες, όπως μείωση της αιμοποίησης, απώλεια λευκοκυττάρων και ψωρίαση, ενώ η ομοκυστεΐνη αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και εμφάνιση της νόσου Alzheimer. Ακόμα η γλουταθειονίνη, συμβάλλει στην κυτταρική προστασία καθότι δρα ως αντιοξειδωτικό με αποτέλεσμα να συνεισφέρει σημαντικά στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ενώσεων και στην απενεργοποίηση των ενεργών μορφών του οξυγόνου και των ελεύθερων ριζών. Ο προσδιορισμός των βιοθειολών σε σωματικά υγρά είναι πολύ σημαντικός, τόσο από βιολογικής όσο και από φαρμακολογικής σκοπιάς. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι προσδιορισμού κυστεΐνης και ομοκυστεΐνης, γεγονός που υποδεικνύει τη σημαντικότητα του προσδιορισμού τους και την ανάγκη για ανάπτυξη ευαίσθητων, αξιόπιστων και γρήγορων μεθόδων.<sup>[25]</sup>

## 6.2 Επιλογή Μεθόδου

Μετά την επιτυχή σύνθεση της σκουραΐνης Sq (βλ. Υποκεφάλαιο 5.3) , προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι παρουσία κυστεΐνης η απορρόφηση και η ένταση φθορισμού του διαλύματος μεταβάλλεται. Με σκοπό λοιπόν την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου ικανής να προσδιορίζει θειόλες μικρού μοριακού βάρους και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>[20,25]</sup> επιλέχθηκε ως τεχνική η φασματοφωτομετρία απορρόφησης ακτινοβολίας στην περιοχή του ορατού και υπεριώδους φάσματος.

Η μέθοδος βασίζεται στη μείωση της απορρόφησης της σκουραΐνης στα 540 nm ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της θειόλης. Η αναλυτική μέτρηση ( $\Delta A$ ) βασίζεται στη μείωση της απορρόφησης του «λευκού δείγματος»  $A_0$  σε  $A$  μετά την προσθήκη θειόλης:

$$\Delta A = A_0 - A$$

Καθώς επίσης και στην % μείωση της απορρόφησης (RA %):

$$RA(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

## 6.3 Βελτιστοποίηση Μεθόδου

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, ακολουθήθηκε η μέθοδος σταδιακής μεταβολής ενός παράγοντα. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, κάθε φορά μεταβάλλεται μια μόνο παράμετρος, διατηρώντας όλους τους υπόλοιπους παράγοντες σταθερούς. Ως πρότυπη θειόλη χρησιμοποιήθηκε η L-κυστεΐνη (L-Cys). Επιπλέον, όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

### 6.3.1 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη / μίγματος διαλυτών

Βασικό κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι να μην απορροφά στην περιοχή όπου απορροφά το χρωμοφόρο. Ο ιδανικός διαλύτης στην περίπτωση αυτή είναι το νερό. Ωστόσο, η Sq είναι αδιάλυτη στο νερό, οπότε ήταν απαραίτητη η χρήση οργανικού διαλύτη για τη βελτίωση της διαλυτότητας της Sq στο νερό. Επιπλέον, από τα προκαταρκτικά πειράματα που διενεργήθηκαν, διαπιστώθηκε πως η Sq απορροφά κυρίως στην ορατή περιοχή. Στην περιοχή αυτή η απορρόφηση των περισσότερων διαλυτών που αναμιγνύονται

με το νερό είναι αμελητέα. Συνεπώς, όποιος διαλύτης και να είχε επιλεγεί δεν θα παρεμπόδιζε τη μέτρηση.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι σκουαραΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό θειολών είτε διαλύονταν σε μίγμα ακετονιτρίλιο : νερό (20 : 80 ο/ο),<sup>[20]</sup> είτε σε μίγμα DMSO : νερό (9:1 ο/ο).<sup>[25]</sup> Δοκιμάστηκαν 3 διαλύτες: η μεθανόλη, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο, με τελικό σκοπό να χρησιμοποιηθούν μίγματα αυτών με το νερό. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι διαλύματα Sq σε μεθανόλη είναι ασταθή οπότε η μεθανόλη απορρίφθηκε.

Μελετήθηκαν επίσης η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο ως πιθανοί διαλύτες, αλλά δεν ήταν δυνατή η πλήρης διαλυτοποίηση ποσότητας πέραν των 10 mg Sq σε 10 mL διαλύτη. Έτσι επιλέχθηκε το DMF ως ο καταλληλότερος διαλύτης για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης το οποίο στη συνέχεια αραιωνόταν με ακετονιτρίλιο.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι η Sq συσσωματώνεται όταν το ποσοστό του οργανικού διαλύτη σε μίγμα με νερό είναι μικρότερο από περίπου 15% ο/ο (βλ. Παράρτημα II). Από την άλλη πλευρά, όταν ο διαλύτης υπερβαίνει το 30% ο/ο, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης. Συνεπώς, το μίγμα ακετονιτρίλιο : νερό, 30 : 70 ο/ο επιλέχθηκε ως το βέλτιστο μίγμα διαλυτών της μεθόδου.

### 6.3.2 Επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος

Σε κάθε φασματφωτομετρική μέθοδο η μέτρηση της απορρόφησης συνήθως γίνεται σε ένα δεδομένο μήκος κύματος. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η ταχύτητα της μεθόδου, καθώς η μέτρηση ενός μήκους κύματος είναι πιο ταχεία από τη λήψη του πλήρους φάσματος απορρόφησης, ενώ παράλληλα καθίσταται πιο εύκολη η επεξεργασία των δεδομένων. Το μήκος κύματος επιλέγεται με τα εξής κριτήρια:

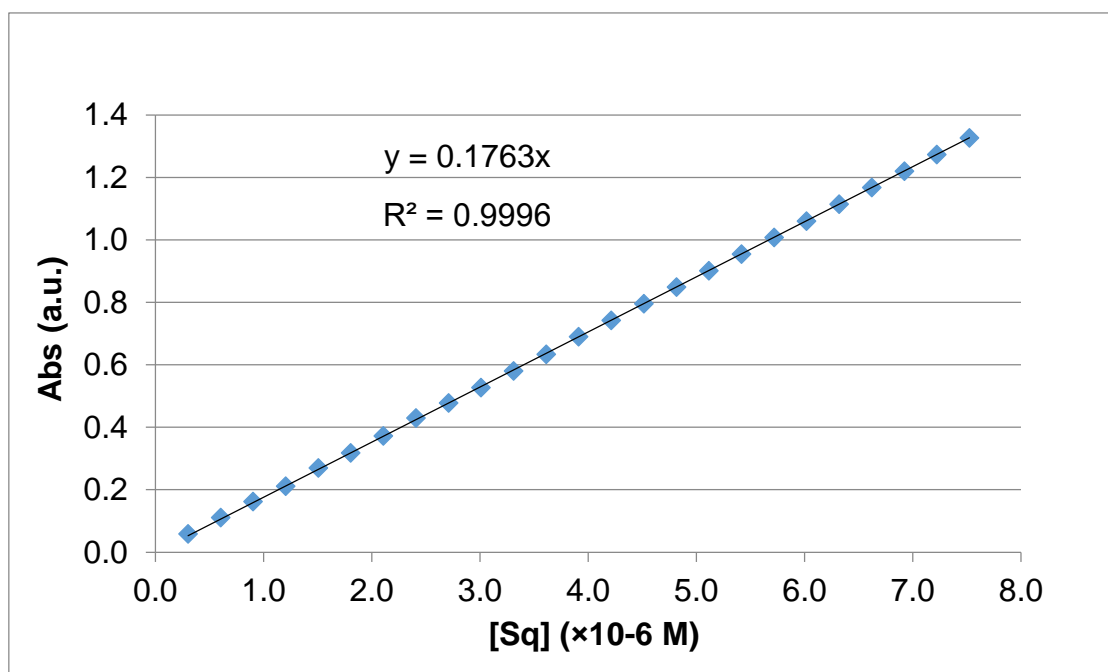
- Η απορρόφηση του χρωμοφόρου να λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της (τοπικό ή ολικό μέγιστο), με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ευαισθησία της μεθόδου και μειώνονται οι αποκλίσεις από το νόμο του Beer.
- Το δείγμα και η μήτρα του δείγματος να μην απορροφούν στην ίδια περιοχή με το χρωμοφόρο, οπότε ενισχύεται η εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Μελετώντας, λοιπόν, το φάσμα απορρόφησης της Sq στο μίγμα ακετονιτρίλιο : νερό, 30 : 70 ο/ο, σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια, βρέθηκε ότι στο μήκος κύματος  $\lambda = 538 \text{ nm}$  παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση της Sq-Cys.

Όλες οι μετρήσεις που ακολουθούν, πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το μήκος κύματος.

### 6.3.3 Επίδραση συγκέντρωσης της Sq

Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης Sq στην περιοχή  $3,0 \times 10^{-7}$  έως  $7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  σε ακετονιτρίλιο : νερό, 30 : 70 ο/ο σε  $\lambda = 538 \text{ nm}$  στην απορρόφηση (Σχήμα 6.1).

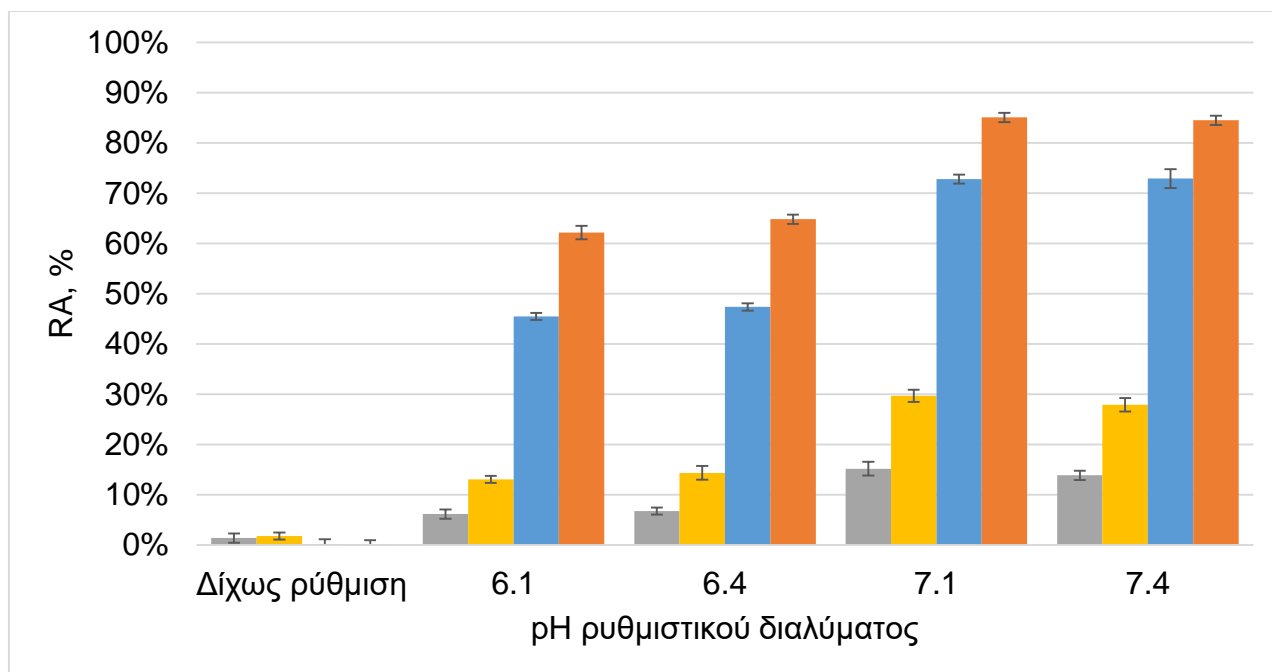


Σχήμα 6.1. Επίδραση της συγκέντρωσης Sq σε μίγμα 30 : 70 ο/ο ACN : H<sub>2</sub>O στην απορρόφηση.

Σύμφωνα με το Σχήμα 6.1, η βέλτιστη συγκέντρωση της Sq θα μπορούσε να επιλεγεί η  $6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$  που αντιστοιχεί σε απορρόφηση ίση με 1,0 a.u.. Επειδή όμως σε προκαταρκτικά πειράματα που διεξήχθησαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline, pH = 7,4) παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση του διαλύματος της Sq ήταν περίπου 10% χαμηλότερη από την απορρόφηση του ίδιου διαλύματος απουσία του ρυθμιστικού, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση Sq  $7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$  σε όλες τις μετρήσεις.

### 6.3.4 Επίδραση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος

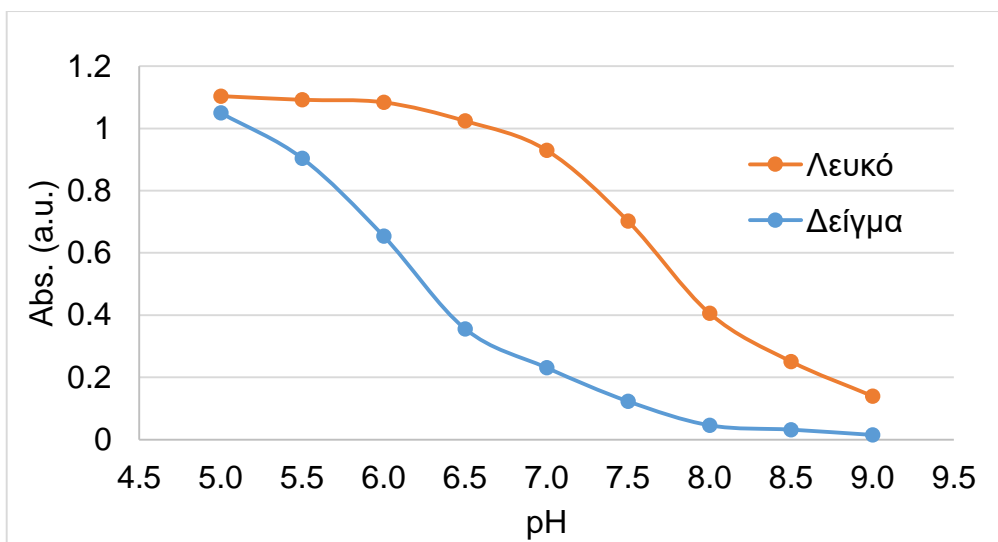
Από τα προκαταρκτικά πειράματα, προέκυψε ότι η αντίδραση Sq με L-κυστεΐνη απαιτεί περιοχή pH 6 – 8, μελετήθηκε η επίδραση των ρυθμιστικών οξικού αμμωνίου και PBS, pH = 6,1 – 7,1 και 7,4 αντίστοιχα (Σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.2. Επίδραση pH στη % μείωση της σχετικής απορρόφησης  $7,0 \times 10^{-6}$  M Sq με  $0,35 \times 10^{-5}$ ,  $0,70 \times 10^{-5}$ ,  $3,5 \times 10^{-5}$  και  $7,0 \times 10^{-5}$  M Cys.

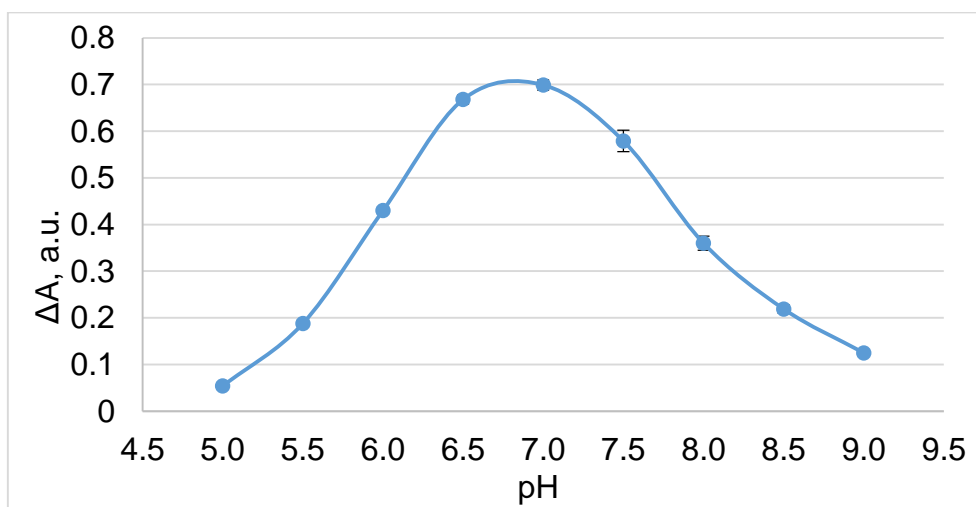
Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του pH στην απορρόφηση της Sq–Cys με ρυθμιστικό διάλυμα Britton–Robinson (BR). Το ρυθμιστικό Britton–Robinson, αποτελείται από 3 ασθενή οξέα (βορικό, φωσφορικό και οξικό οξύ), είναι ρυθμιστικό διάλυμα γενικής χρήσης με εύρος pH από 2,0 έως 12,0 και η ρύθμιση στο επιθυμητό pH γίνεται με προσθήκη διαλύματος NaOH. Παρασκευάστηκαν διαλύματα  $7,0 \times 10^{-6}$  M Sq με τριπλάσια συγκέντρωση Cys, τα οποία αραιώθηκαν με μίγμα 30 : 70 ο/ο ACN : H<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα BR 0,04 M με pH στην περιοχή 5,0 – 9,0 (Σχήμα 6.3).





Σχήμα 6.3. Επίδραση του pH στην απορρόφηση λευκού ( $7,0 \times 10^{-6} \text{ M Sq}$ ) και δείγματος ( $7,0 \times 10^{-6} \text{ M Sq}$  και  $3,1 \times 10^{-5} \text{ M Cys}$ ).

Για την καλύτερη απεικόνιση της επίδρασης του pH, στο Σχήμα 6.4. φαίνεται η μεταβολή της απορρόφησης ως συνάρτηση του pH.



Σχήμα 6.4. Επίδραση του pH στη μείωση της απορρόφησης των διαλυμάτων του Σχήματος 6.3.

Από τα Σχήματα 6.3 και 6.4 προκύπτει ότι η βέλτιστη απόκριση είναι στην περιοχή 6,5 έως 7,0.

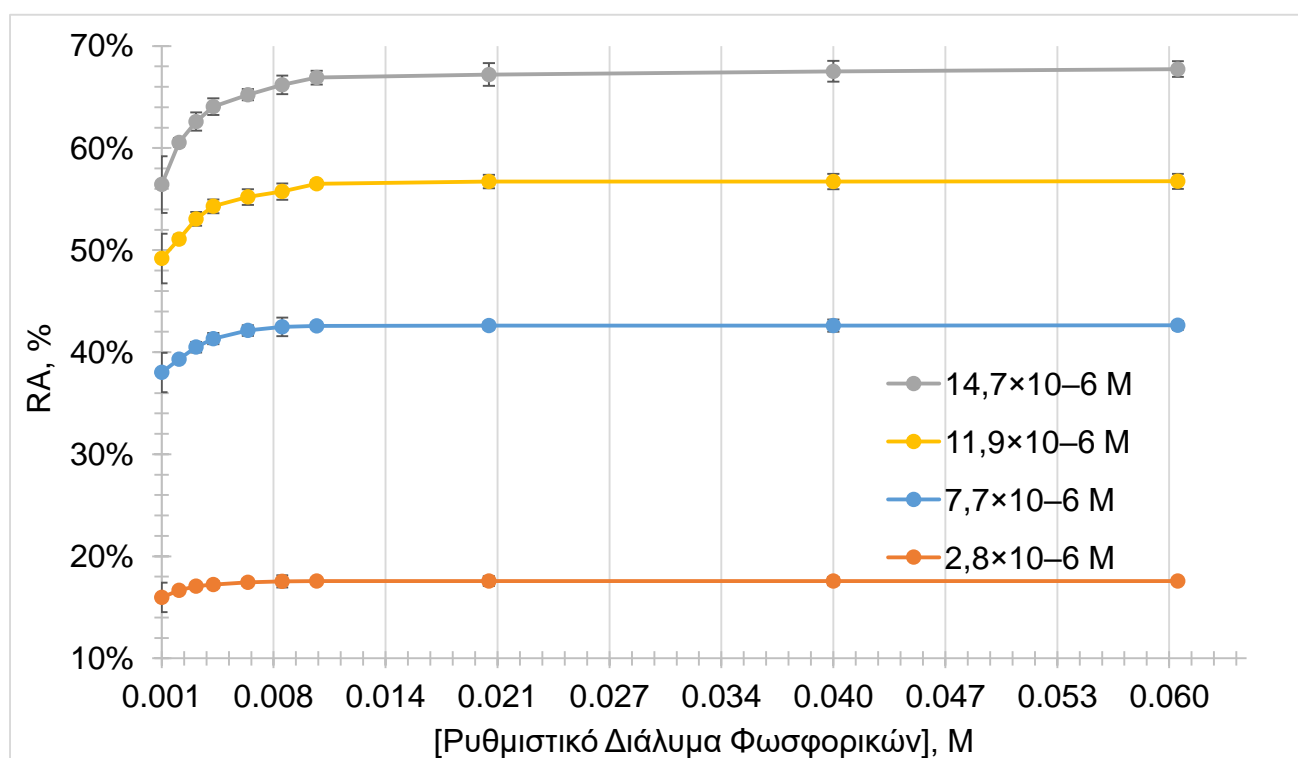
Επομένως, ως βέλτιστη τιμή pH επιλέχθηκε η τιμή 6,8. Το ρυθμιστικό διάλυμα BR είναι ιδανικό για την εύρεση της βέλτιστης τιμής pH αλλά εξαιτίας της μειωμένης ρυθμιστικής ικανότητας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω. Ως αντικαταστάτες του BR με

ικανότητα ρύθμισης στην επιθυμητή περιοχή pH μελετήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα οξικού αμμωνίου, κιτρικών και φωσφορικών αλάτων.

Τελικά επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών εξαιτίας της ευκολίας παρασκευής του στο επιθυμητό pH.

### 6.3.5 Επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

Για τη μελέτη της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος παρασκευάστηκαν διαλύματα  $7,0 \times 10^{-6}$  M Sq σε 30 : 70 ο/ο ACN : H<sub>2</sub>O και σε ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών 0,001 – 0,060 M. Στο Σχήμα 6.5 φαίνεται η % μείωση της απορρόφησης διαλυμάτων Sq σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης κυστεΐνης 2,8, 7,7, 11,9 και  $14,7 \times 10^{-6}$  M ως συνάρτηση της συγκεντρώσεως του ρυθμιστικού διαλύματος.



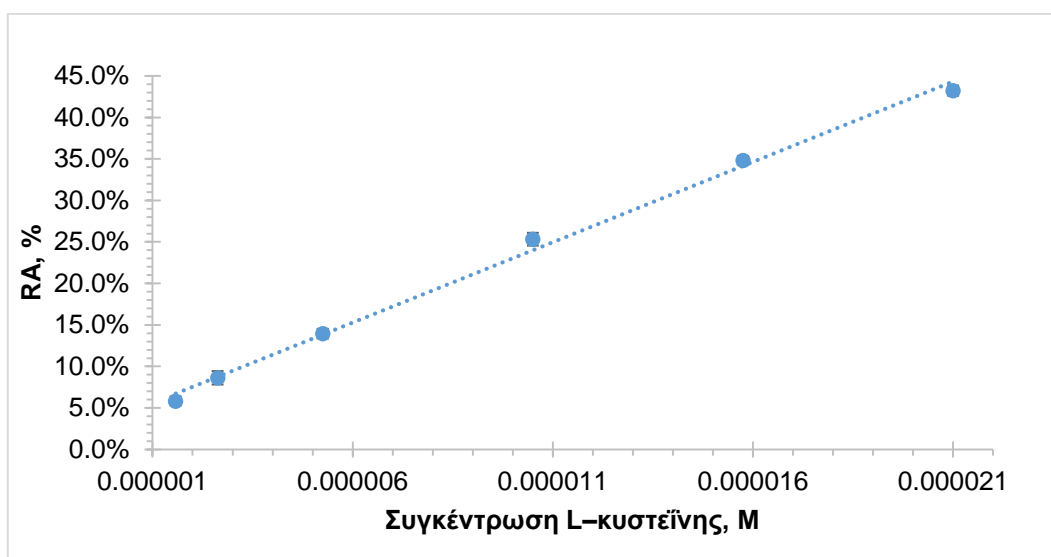
Σχήμα 6.5. Μεταβολή της % σχετικής απορρόφησης διαλυμάτων  $7,0 \times 10^{-6}$  M Sq σε 30 : 70% ο/ο ACN : H<sub>2</sub>O σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης κυστεΐνης 2,8, 7,7, 11,9 και  $14,7 \times 10^{-6}$  M ως συνάρτηση της συγκεντρώσεως του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,8.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 6.5, η βέλτιστη συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών είναι ίση με 0,01 M.

### 6.3.6 Βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο προσδιορισμού

Παρασκευάζεται διάλυμα σκουραΐνης  $2,1 \times 10^{-5}$  M Sq σε ακετονιτρίλιο, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH = 6,8 και συγκέντρωσης 0,03 M και διάλυμα του αναλύτη (θειόλη) σε νερό.

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθεται αρχικά, με αυτόματη πιπέττα, 1 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL από το διάλυμα της Sq και τέλος προστίθεται 1 mL από το διάλυμα του αναλύτη. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 3 mL. Το διάλυμα ανακινείται και μεταφέρεται στην κυψελίδα χαλαζία και μετράται η απορρόφηση του δείγματος στο μήκος κύματος  $\lambda = 538$  nm. Ως διάλυμα αναφοράς χρησιμοποιείται το διάλυμα που παρασκευάζεται με ανάμειξη 1 mL ακετονιτρίλιο, 1 mL νερό και 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η μεταβολή της % μείωσης της απορρόφησης διαλύματος Sq ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της L-κυστεΐνης παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.6.



Σχήμα 6.6. Μεταβολή της % μείωσης της απορρόφησης διαλύματος  $7,0 \times 10^{-5}$  M Sq ως συνάρτηση της συγκέντρωσης L-κυστεΐνης.

Επιπλέον μελετήθηκε η αναλογία Sq με την κυστεΐνη, με τη βοήθεια του διαγράμματος Job. Αυτός ο τύπος διαγράμματος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας μιας αντίδρασης δέσμευσης. Στη μέθοδο αυτή, η συνολική γραμμομοριακή συγκέντρωση των δύο αντιδρώντων διατηρείται σταθερή, ενώ τα επιμέρους γραμμομοριακά κλάσματα του κάθε αντιδρώντος μεταβάλλονται.

Γενικά, για δύο αντιδρώντα A και B ισχύει η παρακάτω εξίσωση:

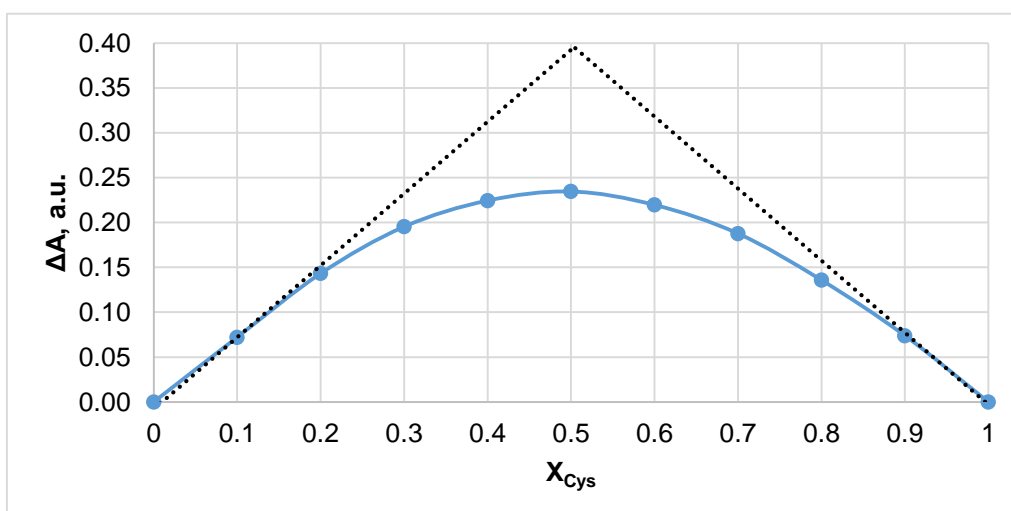
$$\text{mole}_A + \text{mole}_B = k \text{ και αντίστοιχα } C_A + C_B = K$$

Ενώ το γραμμομοριακό κλάσμα, για παράδειγμα του αντιδρώντος A, υπολογίζεται ως εξής:

$$X_A = \frac{\text{mole}_A}{k} = \frac{C_A}{K}$$

Το γραμμομοριακό κλάσμα ενός από τα δύο αντιδρώντα παριστάνεται γραφικά συναρτήσει κάποιας μετρήσιμης παραμέτρου (πχ. απορρόφηση). Τα ακρότατα που εμφανίζονται στο διάγραμμα (μέγιστο ή ελάχιστο) αντιστοιχούν στην στοιχειομετρία των δύο αντιδραστηρίων.<sup>[53]</sup>

Στην περίπτωση της ενώσεως Sq–Cys, παρασκευάσθηκαν διαλύματα Sq και κυστεΐνης συγκέντρωσης  $1,0 \times 10^{-5}$  M. Το διάλυμα Sq αναμίχθηκε με λευκό διάλυμα και διάλυμα κυστεΐνης, αντίστοιχα, σε αναλογίες από 3,0 mL Sq / 0 mL δείγμα έως 0 mL Sq / 3,0 mL δείγμα ανά 0,3 mL. Όλα τα διαλύματα περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 0,01 M. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 6.7.



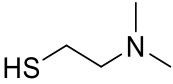
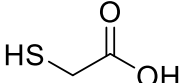
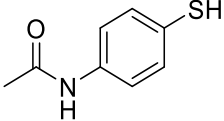
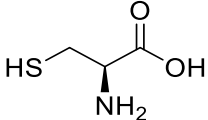
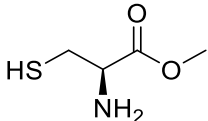
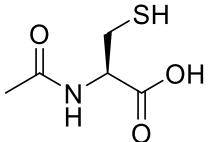
Σχήμα 6.7. Διάγραμμα Job της διαφοράς απορρόφησης της Sq ως συνάρτηση του γραμμομοριακού κλάσματος της κυστεΐνης

Από το Σχήμα 6.7, προκύπτει ότι η Sq δεσμεύει τη θειόλη κυστεΐνη σε στοιχειομετρία 1 : 1.

#### 6.4 Εφαρμογή Μεθόδου για τον Ποσοτικό Προσδιορισμό Πρότυπων Θειολών

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της εργασίας αυτής εφαρμόστηκε αρχικά σε πρότυπες θειόλες (Πίνακας 6.1). και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.1. Ονομασίες και μοριακές δομές των προτύπων θειολών που μελετήθηκαν.

Ονομασία		Συντακτικός τύπος
Ελληνικά	Αγγλικά	
2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη	2-(dimethylamino)ethanethiol <b>[MEDA]</b>	
2-μερκαπτοξικό οξύ	2-mercaptoacetic acid	
4-ακεταμιδοθειοφαινόλη	4-acetamidothiophenol	
L-κυστεΐνη	L-cysteine <b>[Cys]</b>	
μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης	L-cysteine methyl ether	
N-ακετυλοκυστεΐνη	N-acetyl-L-cysteine <b>[NAC]</b>	

Πίνακας 6.2. Αναλυτικά χαρακτηριστικά πρότυπων θειολών.

Ένωση	Γραμμική περιοχή (M)	A ( $\pm S_A$ )	B ( $\pm S_B$ )	$S_{y/x}$	$R^2$ (N)
2– (διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη	$9,0 \times 10^{-7}$ – $3,0 \times 10^{-5}$	0,016 ( $\pm 0,004$ )	24624 ( $\pm 315$ )	0,006	0,999 (10)
2–μερκαπτοξικό οξύ	$3,0 \times 10^{-6}$ – $3,0 \times 10^{-5}$	0,016 ( $\pm 0,004$ )	8698 ( $\pm 213$ )	0,006	0,995 (10)
4–ακεταμιδοθειοφαινόλη	$5,0 \times 10^{-6}$ – $2,0 \times 10^{-4}$	0,018 ( $\pm 0,006$ )	4351 ( $\pm 97$ )	0,009	0,998 (7)
L–κυστεΐνη	$1,0 \times 10^{-6}$ – $1,5 \times 10^{-5}$	0,017 ( $\pm 0,004$ )	19621 ( $\pm 453$ )	0,005	0,997 (8)
μεθυλαιθέρας της L–κυστεΐνης	$1,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	0,015 ( $\pm 0,005$ )	19453 ( $\pm 540$ )	0,008	0,997 (6)
N–ακετυλοκυστεΐνη	$1,0 \times 10^{-6}$ – $2,0 \times 10^{-5}$	0,012 ( $\pm 0,004$ )	12908 ( $\pm 390$ )	0,005	0,996 (6)

## 6.5 Επικύρωση Μεθόδου

Ως επικύρωση, ορίζεται η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου, μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Η έκταση της επικύρωσης δεν είναι δεδομένη, αλλά εξαρτάται από τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής, όπως και από τον τύπο της μεθόδου (Έλεγχος Ταυτοποίησης, Έλεγχος Προσμίξεων – Όρια ή Ποσοτικοποίηση, Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας).<sup>[54]</sup>

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας της αναλυτικής μεθόδου που προσδιορίζονται κατά την επικύρωση είναι τα εξής:

- Γραμμικότητα
- Εκλεκτικότητα
- Ορθότητα
- Πιστότητα ( Επαναληψιμότητα – Αναπαραγωγιμότητα)
- Ανιχνευσιμότητα (όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης)
- Ανθεκτικότητα
- Αβεβαιότητα

### 6.5.1 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης

Οι αναλυτικές τεχνικές, εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις (κουλομετρία, σταθμική ανάλυση) παρέχουν σχετικές μετρήσεις της αναλυτικής παραμέτρου και απαιτείται βαθμονόμηση για να υπολογισθεί η συγκέντρωση του αναλύτη. Η πλέον εύχρηστη συνάρτηση βαθμονόμησης είναι η γραμμική, με την προϋπόθεση να υπάρχει αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης και της μετρούμενης παραμέτρου.

Η γραμμικότητα (linearity) της καμπύλης βαθμονόμησης αποδεικνύεται αρχικά με οπτική εξέταση του διαγράμματος – αναλυτικό σήμα ως προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη. Έπειτα, αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων) και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης. Αποδεκτά γραμμική θεωρείται η καμπύλη της οποίας ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) είναι

μεγαλύτερος από 0,98 (προτιμάται 0,99 αλλά και 0,98 είναι αποδεκτό, εξαρτάται από τις ανάγκες της μεθόδου).<sup>[54]</sup>

Από την εφαρμογή της μεθόδου σε πρότυπες ουσίες (Υποκεφάλαιο 6.4), προκύπτει ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η γραμμικότητα των ευθειών παλινδρόμησης μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική εφόσον  $R^2 > 0,99$  (Πίνακας 6.2).

### 6.5.2 Εκλεκτικότητα μεθόδου

Μια μέθοδος είναι πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους.<sup>[54]</sup>

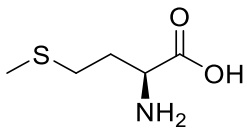
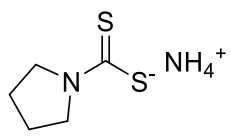
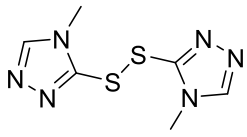
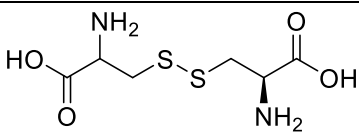
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι θειόλες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες φέρουν μία (τουλάχιστον) υδροθειομάδα ( $-SH$ ) (Υποκεφάλαιο 6.1). Στα πλαίσια της μελέτης των πιθανών παρεμποδίσεων στην ανίχνευση θειολών με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε, μελετήθηκε μια σειρά από οργανικές ενώσεις που φέρουν ομάδες θείου, όχι όμως υδροθειομάδες. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι ενώσεις που μελετήθηκαν.

Τα διαλύματα της Sq και της Sq-Cys με συγκέντρωση κυστεΐνης  $1,0 \times 10^{-4}$  M με τους παρεμποδιστές, συνολικού όγκου 3 mL, παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στο εδάφιο 6.3.6.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στις ενώσεις αυτές όπως ακριβώς εφαρμόστηκε και στις θειόλες που μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις των ενώσεων από  $1,0 \times 10^{-5}$  έως  $2,1 \times 10^{-4}$  M. Όπως ήταν αναμενόμενο η απόκριση της Sq ήταν μηδενική παρουσία αυτών των ενώσεων. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι η μέθοδος δεν αποκρίνεται καθόλου στα διθειοφίδια (ενώσεις 3 και 4, Πίνακας 6.3) τα οποία είναι τα διμερή των αντίστοιχων θειολών. Συνεπώς, η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι ικανή να διακρίνει, σε ένα δείγμα, τις θειόλες εκλεκτικά από ενώσεις που φέρουν άλλες ομάδες θείου.



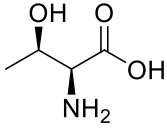
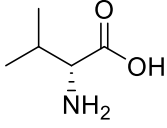
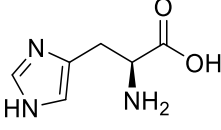
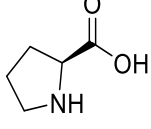
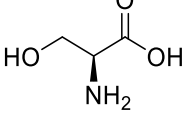
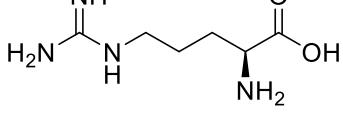
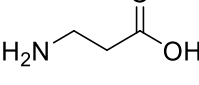
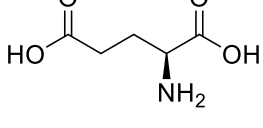
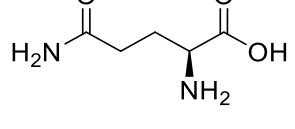
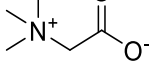
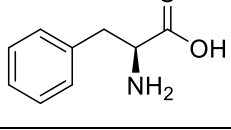
Πίνακας 6.3. Ονομασίες και μοριακές δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Ονομασία		Συντακτικός τύπος
Ελληνικά	Αγγλικά	
μεθειονίνη	methionine	
πυρρολιδινο-1-καρβοδιθειϊκό αμμώνιο*	ammonium pyrrolidine-1-carbodithioate	
1,2-δισ(4-μεθυλ-4h-1,2,4-τριαζολ-3-υλ)δισουλφίδιο	1,2-bis(4-methyl-4h-1,2,4-triazol-3-yl)disulfane	
κυστίνη*	cystine	

\*Περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό.

Η κυστεΐνη εκτός από το γεγονός ότι ανήκει στην οικογένεια των θειολών, είναι και αμινοξύ. Κατά συνέπεια, εξετάσθηκε η απόκριση της μεθόδου με μια σειρά αμινοξέων, τα οποία όμως δεν έφεραν υδροθειομάδες. Τα έντεκα αμινοξέα που μελετήθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, η μέθοδος εφαρμόσθηκε σε συγκεντρώσεις του εκάστοτε αμινοξέος από  $1,0 \times 10^{-5}$  έως  $2,1 \times 10^{-4}$  M. Η μέθοδος αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ευαίσθητη στα αμινοξέα αυτά, ισχυροποιώντας έτσι τον ισχυρισμό της εκλεκτικότητας της μεθόδου ως προς της θειόλες.

Πίνακας 6.4. Ονομασίες και μοριακές δομές των αμινοξέων που μελετήθηκαν.

Ονομασία		Συντακτικός τύπος
Ελληνικά	Αγγλικά	
L-θρεονίνη	L-threonine	
D-βαλίνη	D-valine	
L-ιστιδίνη	L-histidine	
L-προλίνη	L-proline	
L-σερίνη	L-serine	
αργινίνη	arginine	
β-αλανίνη	β-alanine	
γλουταμικό οξύ	glutamic acid	
γλουταμίνη	glutamine	
βεταΐνη	betaine	
φαιτυλαλανίνη	phenylalanine	

Επιπλέον παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης  $2,1 \times 10^{-4}$  Μ των αμινοξέων που μελετήθηκαν, παρουσία κυστεΐνης σε συγκεντρώσεις από  $2,1 \times 10^{-5}$  έως  $2,1 \times 10^{-4}$  Μ – το διάλυμα αναφοράς περιείχε μόνο την κυστεΐνη χωρίς το εκάστοτε αμινοξύ, ώστε να μελετηθεί και η επίδραση των αμινοξέων στη μεταβολή απορρόφησης της Sq-Cys. Στα παραπάνω διαλύματα εφαρμόστηκε η μέθοδος, ωστόσο δεν υπήρχαν αποκλίσεις στην απόκριση της μεθόδου απουσία και παρουσία των αμινοξέων. Συνεπώς, με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε μπορεί να προσδιορισθεί εκλεκτικά η κυστεΐνη σε φυσικό δείγμα, παρουσία άλλων αμινοξέων χωρίς τα τελευταία να παρεμποδίζουν τη μέτρησή της.

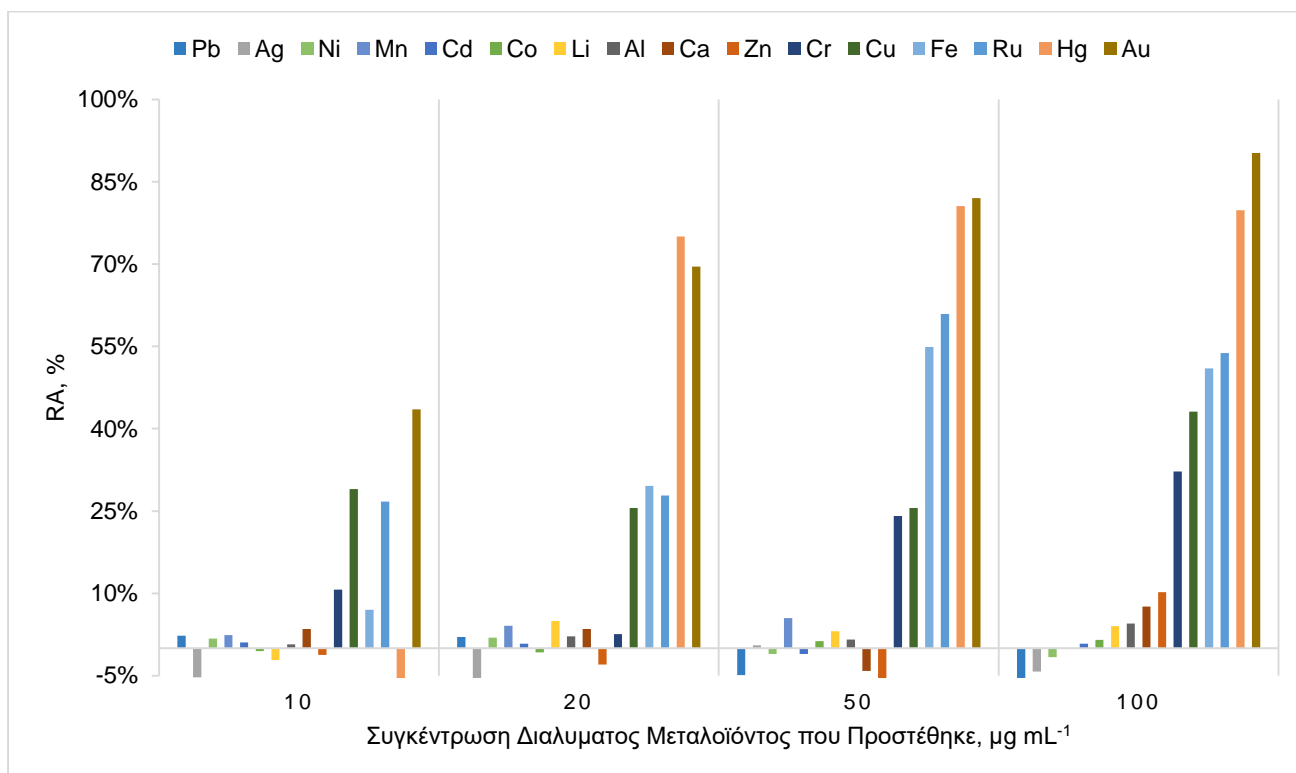
Τέλος, σύμφωνα με τη δομή της σκουαραΐνης που συντέθηκε, η Sq θα μπορούσε να συμπλεχθεί με μια ποικιλία από ιόντα μετάλλων. Κατά συνέπεια, μελετήθηκαν οι αποκρίσεις της Sq και της Sq-Cys με συγκέντρωση κυστεΐνης  $1,0 \times 10^{-4}$  Μ παρουσία δεκαέξι διακριτών ιόντων μετάλλων. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5. Άλατα των ιόντων μετάλλων που μελετήθηκαν.

Νιτρικά	Χλωριούχα	Θειικά	Ανθρακικά
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Li}_2\text{CO}_3$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{RuCl}_3$	$3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	/
$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{HgCl}_2$		
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{HAuCl}_4$		
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	/		
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$			
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			
$\text{AgNO}_3$			
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$			

Στα παραπάνω διαλύματα, προστέθηκαν 10, 20, 50 και 100  $\mu\text{L}$  από κάθε διάλυμα μεταλλοκατιόντος, συγκέντρωσης  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (βλ. Υποκεφάλαιο 4.3). Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα αναφοράς όπου αντί για διάλυμα ιόντων του μετάλλου προστέθηκαν ίδιοι όγκοι υπερκάρου νερού.

Στα Σχήματα 6.8 και 6.9 παρουσιάζεται η επίδραση κάθε ιόντος στη % μείωση της απορρόφησης της  $\text{S}_q$  και της  $\text{S}_q\text{-Cys}$  αντίστοιχα.

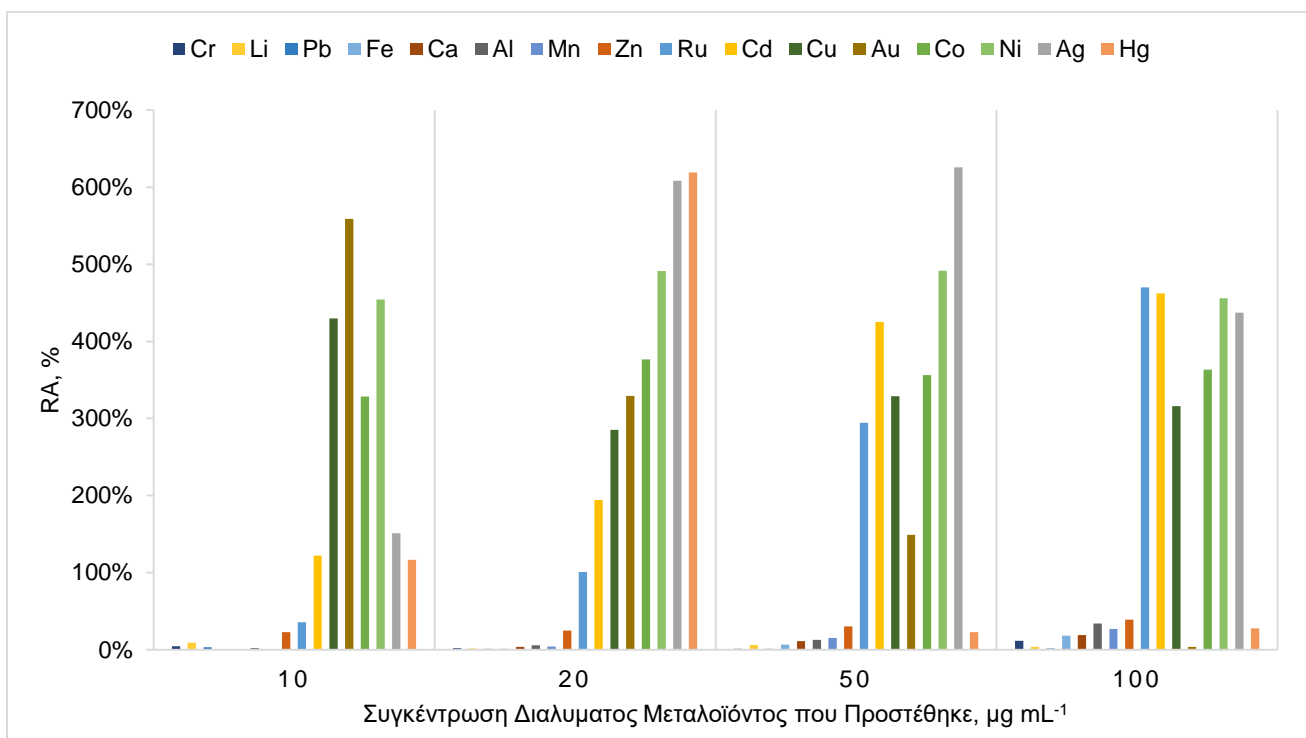


**Σχήμα 6.8. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων μεταλλοϊόντων στη % μείωση της απορρόφησης  $7,0 \times 10^{-6} \text{ M S}_q$ .**

Από τα αποτελέσματα του Σχήματος 6.8 προκύπτει ότι τα ιόντα  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  και  $\text{Au}^{3+}$  έχουν θετική παρεμπόδιση. Επίσης στην Εικόνα 6.1 παρουσιάζονται φωτογραφίες από τα διαλύματα της  $\text{S}_q$  παρουσία ιόντων χρυσού και υδραργύρου, όπου φαίνεται η έντονη επίδραση των μεταλλοϊόντων αυτών στο χρώμα της  $\text{S}_q$ .



**Εικόνα 6.1. Διαλύματα της Sq συγκέντρωσης  $7 \times 10^{-6}$  M σε μίγμα ACN : H<sub>2</sub>O 30 : 70 ο/ο, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης (από δεξιά προς τα αριστερά) ιόντων χρυσού (αριστερή φωτογραφία) και ιόντων υδραργύρου (δεξιά φωτογραφία).**



**Σχήμα 6.9. Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων μεταλλοϊόντων στη % μείωση της απορρόφησης  $7,0 \times 10^{-6}$  M Sq με  $1,0 \times 10^{-4}$  M κυστεΐνης.**

Πρέπει να τονισθεί ότι τα κατιόντα τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με τις θειόλες, δύνανται να απομακρύνουν τη θειόλη που είχε προσβάλει τον σκουαρικό δακτύλιο της Sq, με αποτέλεσμα η Sq να ανακτεί την αρχική της απορρόφηση. Η παρατήρηση αυτή έχει αξιοποιηθεί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για τον έμμεσο προσδιορισμό αυτών των μεταλλοϊόντων και κυρίως του υδραργύρου.<sup>[19,21]</sup>

### 6.5.3 Ανιχνευσιμότητα μεθόδου

Η ανιχνευσιμότητα (detectability), εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

1. Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit, DL ή LoD)
2. Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LoQ)

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους. Τα όρια αυτά εκφράζονται σε μονάδες συγκέντρωσης του αναλύτη και υπολογίζονται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$C = \frac{\bar{x}_0 + k \times SD_0}{S}$$

Όπου:

C : Η συγκέντρωση αντιστοιχεί στο εκάστοτε όριο

$\bar{x}_0$  : μέσος όρος σημάτων του λευκού δείγματος

k : παράγοντας για επιθυμητή τιμή 1- $\alpha$  (πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους)

SD<sub>0</sub> : τυπική απόκλιση σημάτων λευκού δείγματος

S : η κλίση της καμπύλης απόκρισης

Για k = 3,3 προκύπτει ότι  $\alpha = 0,0005$  δηλαδή υπάρχει μόνο 0,05% πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους. Οπότε ως όριο ανιχνεύσεως, ορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού. Ενώ, ως όριο ποσοτικοποίησης, ορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού

Για τον προσδιορισμό των ορίων αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες προσεγγίσεις οι οποίες δεν είναι πάντα ισοδύναμες μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό, κατά την επικύρωση μιας μεθόδου θα πρέπει να δηλώνεται ο τρόπος υπολογισμού τους.<sup>[54]</sup>

Στον Πίνακα 6.6 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε θειόλη υπολογισμένα σύμφωνα με την τυπική απόκλιση του λευκού (LoD<sub>1</sub> – SD<sub>0</sub>), την τυπική

απόκλιση της τομής A της καμπύλης αναφοράς ( $LoD_2 - S_A$ ) και την τυπική απόκλιση των υπολοίπων της καμπύλης αναφοράς ( $LoD_3 - S_{y/x}$ ).

Πίνακας 6.6. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρότυπων θειολών.

Ένωση	Όριο Ανίχνευσης (M)			Όριο Ποσοτικοποίησης (M)		
	LOD <sub>1</sub>	LOD <sub>2</sub>	LOD <sub>3</sub>	LOQ <sub>1</sub>	LOQ <sub>2</sub>	LOQ <sub>3</sub>
2- (διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη	$3,55 \times 10^{-7}$	$4,90 \times 10^{-7}$	$8,11 \times 10^{-7}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-6}$	$2,46 \times 10^{-6}$
2-μερκαπτοξικό οξύ	$3,05 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$9,25 \times 10^{-6}$	$4,08 \times 10^{-6}$	$6,35 \times 10^{-6}$
4-ακεταμιδοθειοφαινόλη	$1,16 \times 10^{-6}$	$4,89 \times 10^{-6}$	$6,79 \times 10^{-6}$	$3,51 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-5}$	$2,06 \times 10^{-5}$
L-κυστεΐνη	$8,74 \times 10^{-7}$	$6,78 \times 10^{-7}$	$8,70 \times 10^{-7}$	$2,65 \times 10^{-6}$	$2,06 \times 10^{-6}$	$2,64 \times 10^{-6}$
μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης	$5,18 \times 10^{-7}$	$9,00 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$
N-ακετυλοκυστεΐνη	$7,38 \times 10^{-7}$	$9,47 \times 10^{-7}$	$1,39 \times 10^{-6}$	$2,24 \times 10^{-6}$	$2,87 \times 10^{-6}$	$4,21 \times 10^{-6}$

#### 6.5.4 Πιστότητα μεθόδου

Η πιστότητα (precision) μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανομένων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Ποιοτικά μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Υποσύνολα του όρου πιστότητα είναι οι όροι επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility).

Η επαναληψιμότητα είναι μέτρο διασποράς αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Δηλαδή, χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος, την εφαρμόζει ο ίδιος αναλυτής, στο ίδιο εργαστήριο, με τις ίδιες συσκευές, τα ίδια αντιδραστήρια και σε βραχύ χρονικό διάστημα. Ως όριο επαναληψιμότητας ( $r$ ), ορίζεται ως η

μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες επαναληψιμότητας.

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times \sigma_r$$

Όπου  $t_{\infty}$  η τιμή κριτηρίου Students δύο άκρων για  $n = \infty$  για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, είναι ίση με 1,96 και  $\sigma_r$  η τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας. Επομένως:

$$r = 2,77 \times \sigma_r$$

Η αναπαραγωγιμότητα είναι μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ελέγχων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Δηλαδή, η μέθοδος εφαρμόζεται από διαφορετικούς αναλυτές, με διαφορετικές συσκευές, σε διαφορετικά εργαστήρια και σε διαφορετικούς χρόνους. Αντίστοιχα με το όριο επαναληψιμότητας, το όριο αναπαραγωγιμότητας ( $R$ ) ορίζεται ως η μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.<sup>[54]</sup>

$$R = 2,77 \times \sigma_R, \text{ στάθμη εμπιστοσύνης 95\%}$$

$\sigma_R$  η τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας

#### 6.5.4.1 Επαναληψιμότητα μεθόδου

Κατά την εξαγωγή των καμπυλών βαθμονόμησης των πρότυπων θειολών (Υποκεφάλαιο 6.4), πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις σε συγκεντρώσεις εντός της γραμμικής περιοχής. Χωρίζοντας τη γραμμική περιοχή σε τρία τμήματα, προκύπτουν τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλό, μέσο, υψηλό). Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης προσδιορίσθηκε η μέση τιμή της διαφοράς της απορρόφησης της  $S_q$  ( $\overline{\Delta A}$ ), η τυπική απόκλιση των μετρήσεων ( $\pm SD$ ) καθώς και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλισή τους (% RSD). Στον Πίνακα 6.7 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα από τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της μεθόδου.



Πίνακας 6.7. Μείωση της απορρόφησης της S<sub>q</sub> παρουσία πρότυπων θειολών σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων.

Ένωση	Λευκό Δείγμα	Επίπεδο		
		Χαμηλό	Μέσο	Υψηλό
	A <sub>0</sub> ± SD <sub>0</sub> (%RSD)	Συγκέντρωση (M) $\overline{\Delta A} \pm SD^* (\%RSD)$		
2– (διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη	0,953 ± 0,003 (0,28)	1,09×10 <sup>-6</sup> 0,025 ± 0,003 (11,40)	8,69×10 <sup>-6</sup> 0,222 ± 0,003 (1,51)	1,96×10 <sup>-5</sup> 0,464 ± 0,003 (0,62)
2–μερκαπτοξικό οξύ	0,931 ± 0,008 (0,86)	5,29×10 <sup>-6</sup> 0,065 ± 0,008 (12,75)	1,58×10 <sup>-5</sup> 0,145 ± 0,008 (5,56)	2,84×10 <sup>-5</sup> 0,239 ± 0,008 (3,42)
4–ακεταμιδοθειοφαινόλη	0,966 ± 0,002 (0,16)	1,84×10 <sup>-5</sup> 0,090 ± 0,007 (8,02)	5,53×10 <sup>-5</sup> 0,257 ± 0,007 (2,64)	1,11×10 <sup>-4</sup> 0,473 ± 0,005 (1,09)
L–κυστεΐνη	0,962 ± 0,005 (0,54)	1,76×10 <sup>-6</sup> 0,044 ± 0,006 (13,02)	7,05×10 <sup>-6</sup> 0,155 ± 0,005 (3,50)	1,41×10 <sup>-5</sup> 0,277 ± 0,005 (1,98)
μεθυλαιθέρας της L–κυστεΐνης	1,013 ± 0,003 (0,30)	1,31×10 <sup>-6</sup> 0,031 ± 0,004 (12,63)	8,74×10 <sup>-6</sup> 0,198 ± 0,003 (1,63)	1,75×10 <sup>-5</sup> 0,353 ± 0,003 (0,88)
N–ακετυλοκυστεΐνη	1,010 ± 0,003 (0,29)	1,27×10 <sup>-6</sup> 0,023 ± 0,005 (21,59)	8,44×10 <sup>-6</sup> 0,129 ± 0,005 (3,52)	1,69×10 <sup>-5</sup> 0,228 ± 0,005 (2,03)

$$*SD = \sqrt{SD_0^2 + SD_{\text{δείγματος}}^2}$$

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαναληψιμότητας συνοψίζονται στον Πίνακα 6.8. Παρατηρείται ότι η μέση επαναληψιμότητα του λευκού δείγματος (% RSD = 0,40) είναι άκρως ικανοποιητική για φασματοφωτομετρικές μετρήσεις. Επίσης η επαναληψιμότητα του προσδιορισμού της συγκέντρωσης της θειόλης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση. Η τάση αυτή ερμηνεύεται από το γεγονός ότι στα πυκνότερα διαλύματα η απορρόφηση της S<sub>q</sub> είναι μικρότερη, συνεπώς η μείωση της απορρόφησης (ΔA) είναι μεγαλύτερη και κατ' επέκταση η επίδραση της διασποράς των μετρήσεων είναι μικρότερη.

Συνεπώς, στο σύνολο των επιπέδων συγκέντρωσης η μέση εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (RSD) είναι 5.99%.

**Πίνακας 6.8. Υπολογισμός της μέσης εκατοστιαίας τυπικής απόκλισης για το λευκό δείγμα και τα δείγματα των επιπέδων συγκεντρώσεων 1, 2, 3.**

<b>Δείγμα</b>	<b>Μέση εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) (όριο επαναληψιμότητας) [N=6]</b>
Λευκό	0,40 (1,12)
Επίπεδο συγκέντρωσης 1 (Χαμηλό)	13,24 (36,66)
Επίπεδο συγκέντρωσης 2 (Μέσο)	3,06 (8,48)
Επίπεδο συγκέντρωσης 3 (Υψηλό)	1,67 (4,63)
Σύνολο	5,99

#### 6.5.4.2 Αναπαραγωγιμότητα μεθόδου

Τα πειράματα αναπαραγωγιμότητας διεξήχθησαν σε δύο στάδια.

Το πρώτο στάδιο αφορά τον υπολογισμό της μεταξύ ημερών αναπαραγωγιμότητας (between days precision), η οποία προσδιορίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τον ίδιο αναλυτή, στο ίδιο δείγμα, στο ίδιο εργαστήριο, σε διαφορετικές ημέρες.

Το δεύτερο στάδιο αφορά τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (within laboratory reproducibility) και συχνά χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision), η οποία προσδιορίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο εργαστήριο, σε διαφορετικά δείγματα, από δύο.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης L-κυστεΐνης, 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης και N-ακετυλοκυστεΐνης, σε τέσσερις διαφορετικές μέρες, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.9 – 6.11.

Επιπλέον, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης L-κυστεΐνης, 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης και N-ακετυλοκυστεΐνης, από δύο αναλυτές, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.12 – 6.14).

Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων L-κυστεΐνης.

Ημέρα	Συγκέντρωση διαλυμάτων L-κυστεΐνης (M)					
	Λευκό	$1,67 \times 10^{-6}$	$3,09 \times 10^{-6}$	$5,28 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-5}$
	$\overline{\Delta A} \pm SD (n=3)$					
1	$1,012 \pm 0,005$	$0,056 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,005$	$0,128 \pm 0,005$	$0,236 \pm 0,005$	$0,308 \pm 0,005$
2	$1,021 \pm 0,002$	$0,058 \pm 0,002$	$0,101 \pm 0,003$	$0,135 \pm 0,003$	$0,231 \pm 0,002$	$0,339 \pm 0,003$
3	$1,031 \pm 0,004$	$0,059 \pm 0,004$	$0,098 \pm 0,007$	$0,126 \pm 0,004$	$0,233 \pm 0,007$	$0,327 \pm 0,004$
4	$1,046 \pm 0,001$	$0,061 \pm 0,001$	$0,101 \pm 0,002$	$0,132 \pm 0,001$	$0,245 \pm 0,001$	$0,347 \pm 0,002$
Τυπική απόκλιση εντός ομάδων	0,003	0,004	0,005	0,004	0,004	0,004
Μέσος Όρος	1,027	0,058	0,098	0,130	0,236	0,330
Τυπική απόκλιση μεταξύ ομάδων	0,015	0,004	0,006	0,005	0,008	0,017
%RSD	1,46	7,23	6,58	4,05	3,21	5,23

Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.

Ημέρα	Συγκέντρωση διαλυμάτων 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης (M)					
	Λευκό	$1,52 \times 10^{-6}$	$2,54 \times 10^{-6}$	$5,08 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-5}$
	$\bar{\Delta A} \pm SD$ (n=3)					
1	$1,003 \pm 0,003$	$0,053 \pm 0,003$	$0,074 \pm 0,004$	$0,130 \pm 0,007$	$0,254 \pm 0,005$	$0,394 \pm 0,004$
2	$0,987 \pm 0,005$	$0,054 \pm 0,005$	$0,072 \pm 0,005$	$0,132 \pm 0,005$	$0,265 \pm 0,007$	$0,387 \pm 0,009$
3	$0,990 \pm 0,005$	$0,052 \pm 0,005$	$0,071 \pm 0,011$	$0,130 \pm 0,009$	$0,258 \pm 0,005$	$0,389 \pm 0,005$
4	$1,014 \pm 0,005$	$0,063 \pm 0,005$	$0,077 \pm 0,007$	$0,136 \pm 0,007$	$0,271 \pm 0,006$	$0,398 \pm 0,007$
Τυπική απόκλιση εντός ομάδων	0,004	0,005	0,007	0,007	0,006	0,006
Μέσος Όρος	0,998	0,055	0,073	0,132	0,262	0,392
Τυπική απόκλιση μεταξύ ομάδων	0,013	0,007	0,008	0,008	0,010	0,008
%RSD	1,31	12,22	10,47	5,76	3,65	2,07

Πίνακας 6.11. Αποτελέσματα πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας διαλυμάτων Ν-ακετυλοκουστεΐνης.

Ημέρα	Συγκέντρωση διαλυμάτων Ν-ακετυλοκουστεΐνης (M)					
	Λευκό	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,63 \times 10^{-6}$	$5,25 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$
	$\bar{\Delta A} \pm SD (n=3)$					
1	$1,010 \pm 0,004$	$0,035 \pm 0,004$	$0,043 \pm 0,007$	$0,081 \pm 0,007$	$0,142 \pm 0,008$	$0,214 \pm 0,006$
2	$1,010 \pm 0,003$	$0,031 \pm 0,005$	$0,039 \pm 0,003$	$0,071 \pm 0,005$	$0,149 \pm 0,005$	$0,218 \pm 0,005$
3	$0,992 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,001$	$0,041 \pm 0,002$	$0,072 \pm 0,002$	$0,134 \pm 0,003$	$0,183 \pm 0,001$
4	$0,983 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,004$	$0,039 \pm 0,003$	$0,072 \pm 0,002$	$0,133 \pm 0,002$	$0,204 \pm 0,004$
Τυπική απόκλιση εντός ομάδων	0,002	0,004	0,004	0,004	0,005	0,004
Μέσος Όρος	0,999	0,030	0,041	0,074	0,139	0,205
Τυπική απόκλιση μεταξύ ομάδων	0,014	0,005	0,005	0,006	0,009	0,016
%RSD	1,36	17,07	11,53	8,74	6,41	7,89

Πίνακας 6.12. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων L-κυστεΐνης.

Αναλυτής	Συγκέντρωση διαλυμάτων L-κυστεΐνης (M)						
	Λευκό	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,63 \times 10^{-6}$	$5,25 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-5}$
	$\overline{\Delta A} \pm SD (n=3)$						
1	1,026 ± 0,001	0,034 ± 0,001	0,071 ± 0,002	0,128 ± 0,001	0,251 ± 0,001	0,351 ± 0,002	0,462 ± 0,001
2	0,884 ± 0,018	0,020 ± 0,020	0,042 ± 0,020	0,093 ± 0,020	0,181 ± 0,019	0,274 ± 0,020	0,356 ± 0,018
Ολική Επαναληψιμότητα (S <sub>r</sub> )	0,013	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014	0,013
Μέσος Όρος	0,955	0,027	0,056	0,110	0,216	0,312	0,409
Ενδιάμεση Πιστότητα (S <sub>R</sub> )	0,100	0,006	0,019	0,024	0,049	0,054	0,075
%RSD	10,46	20,81	33,97	21,44	22,64	17,32	18,24

Πίνακας 6.13. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.

Αναλυτής	Συγκέντρωση διαλυμάτων 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης (M)						
	Λευκό	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,63 \times 10^{-6}$	$5,25 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-5}$
	$\overline{\Delta A} \pm SD (n=3)$						
1	1,014 ± 0,005	0,063 ± 0,005	0,077 ± 0,007	0,136 ± 0,007	0,271 ± 0,006	0,398 ± 0,007	0,511 ± 0,006
2	0,880 ± 0,005	0,043 ± 0,005	0,071 ± 0,011	0,107 ± 0,009	0,224 ± 0,005	0,317 ± 0,005	0,412 ± 0,005
Ολική Επαναληψιμότητα (S <sub>r</sub> )	0,005	0,005	0,009	0,008	0,006	0,006	0,005
Μέσος Όρος	0,947	0,053	0,074	0,121	0,248	0,357	0,461
Ενδιάμεση Πιστότητα (S <sub>R</sub> )	0,094	0,013	0,004	0,020	0,033	0,057	0,070
%RSD	9,94	25,35	4,96	16,48	13,35	15,94	15,13

Πίνακας 6.14. Αποτελέσματα πειραμάτων ενδιάμεσης πιστότητας διαλυμάτων Ν-ακετυλοκουστεΐνης.

Αναλυτής	Συγκέντρωση διαλυμάτων Ν-ακετυλοκουστεΐνης (M)						
	Λευκό	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,63 \times 10^{-6}$	$5,25 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-5}$
	$\overline{\Delta A} \pm SD (n=3)$						
1	0.992 ± 0.001	0.029 ± 0.001	0.041 ± 0.002	0.072 ± 0.002	0.134 ± 0.003	0.183 ± 0.001	0.239 ± 0.001
2	0.883 ± 0.001	0.017 ± 0.004	0.029 ± 0.003	0.052 ± 0.002	0.093 ± 0.002	0.134 ± 0.004	0.180 ± 0.003
Ολική Επαναληψιμότητα (S <sub>r</sub> )	0.001	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002
Μέσος Όρος	0.938	0.023	0.035	0.062	0.114	0.159	0.210
Ενδιάμεση Πιστότητα (S <sub>R</sub> )	0.077	0.009	0.008	0.014	0.029	0.034	0.041
%RSD	8.19	37.49	23.39	22.62	25.51	21.66	19.77

Από τα παραπάνω πειράματα αναπαραγωγιμότητας κατασκευάσθηκαν και οι αντίστοιχες καμπύλες παλινδρόμησης της σχετικής μείωσης της απορρόφησης της S<sub>q</sub> (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της εκάστοτε θειόλης. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών αυτών παρουσιάζονται στους Πίνακες 6.15 και 6.17. Από τα αποτελέσματα των πινάκων συμπεραίνεται ότι η κλίση των ευθειών (B) και η τομή με τον άξονα της σχετικής απορρόφησης (A) δεν έχουν μεγάλες αποκλίσεις, εκτός από την περίπτωση του 2<sup>ου</sup> αναλυτή. Οι καμπύλες που κατασκευάσθηκαν από τα δεδομένα του 2<sup>ου</sup> αναλυτή, παρατηρήθηκε ότι είχαν αισθητά μικρότερες κλίσεις.



Πίνακας 6.15. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των εξισώσεων παλινδρόμησης της σχετικής μείωσης της απορρόφησης της S<sub>q</sub> (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της L-κυστεΐνης.

Ημέρα	A ( $\pm$ SD <sub>A</sub> )	B ( $\pm$ SD <sub>B</sub> )	S <sub>y/x</sub>	R <sup>2</sup> (N)
1	0,019 ( $\pm$ 0,004)	20046 ( $\pm$ 526)	0,005	0.997 (5)
2	0,037 ( $\pm$ 0,008)	18559 ( $\pm$ 866)	0,010	0.994 (5)
3	0,036 ( $\pm$ 0,007)	18969 ( $\pm$ 832)	0,009	0.994 (5)
4	0,035 ( $\pm$ 0,007)	18843 ( $\pm$ 771)	0,009	0.995 (5)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,032 ( $\pm$ 0,011) (26,89)	19104 ( $\pm$ 1001) (3,41)	/	
<b>Αναλυτής 1</b>	0,018 ( $\pm$ 0,005)	20698 ( $\pm$ 402)	0,006	0.999 (6)
<b>Αναλυτής 2</b>	- 0,003 ( $\pm$ 0,004)	19553 ( $\pm$ 297)	0,005	0.9991 (6)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,008 ( $\pm$ 0,015) (195,86)	20125 ( $\pm$ 883) (4,02)	/	

Πίνακας 6.16. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών παλινδρόμησης σχετικής μείωσης της απορρόφησης της S<sub>q</sub> (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.

Ημέρα	A ( $\pm$ SD <sub>A</sub> )	B ( $\pm$ SD <sub>B</sub> )	S <sub>y/x</sub>	R <sup>2</sup> (N)
1	0,010 ( $\pm$ 0,005)	24729 ( $\pm$ 620)	0,007	0.998 (5)
2	0,012 ( $\pm$ 0,003)	24970 ( $\pm$ 396)	0,005	0.9992 (5)
3	0,009 ( $\pm$ 0,004)	24961 ( $\pm$ 414)	0,005	0.9992 (5)
4	0,016 ( $\pm$ 0,005)	24582 ( $\pm$ 589)	0,007	0.998 (5)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,012 ( $\pm$ 0,006) (28,32)	24810 ( $\pm$ 548) (0,76)	/	
<b>Αναλυτής 1</b>	0,019 ( $\pm$ 0,005)	23334 ( $\pm$ 401)	0,007	0.999 (6)
<b>Αναλυτής 2</b>	0,018 ( $\pm$ 0,006)	21618 ( $\pm$ 469)	0,01	0.998 (6)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,018 ( $\pm$ 0,005) (2,60)	22476 ( $\pm$ 1290) (5,40)	/	

Πίνακας 6.17. Αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών παλινδρόμησης της σχετικής μείωσης της απορρόφησης της S<sub>q</sub> (RA%) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της N-ακετυλοκουστεΐνης.

Ημέρα	A ( $\pm$ SD <sub>A</sub> )	B ( $\pm$ SD <sub>B</sub> )	S <sub>y/x</sub>	R <sup>2</sup> (N)
1	0,013 ( $\pm$ 0,003)	12489 ( $\pm$ 293)	0,003	0.998 (5)
2	0,009 ( $\pm$ 0,004)	12453 ( $\pm$ 460)	0,006	0.996 (5)
3	0,013 ( $\pm$ 0,003)	11091 ( $\pm$ 334)	0,004	0.997 (5)
4	0,007 ( $\pm$ 0,002)	12603 ( $\pm$ 211)	0,002	0.9992 (5)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,010 ( $\pm$ 0,004) (31,27)	12159 ( $\pm$ 790) (5,88)	/	
<b>Αναλυτής 1</b>	0,014 ( $\pm$ 0,003)	10886 ( $\pm$ 220)	219,74	0.004 (6)
<b>Αναλυτής 2</b>	0,007 ( $\pm$ 0,002)	9337 ( $\pm$ 469)	144,71	0.003 (6)
<b>Μέση τιμή (<math>\pm</math> SD) (%RSD)</b>	0,011 ( $\pm$ 0,006) (47,35)	10111 ( $\pm$ 1 111) (10,83)	/	

### 6.5.5 Ορθότητα μεθόδου

Η ορθότητα της μεθόδου, αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου  $\bar{x}$  (mean), μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής  $\mu$ , η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθής (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Η ορθότητα δηλαδή αποτελεί μέτρο εκτίμησης του συστηματικού σφάλματος της μεθόδου. Η εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου μπορεί να γίνει: α) με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς, β) με σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που λαμβάνονται εφαρμόζοντας μία μέθοδο αναφοράς ή πρότυπη μέθοδο με χαμηλό συστηματικό σφάλμα και γ) με τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων (πειράματα ανάκτησης).<sup>[54]</sup>

Στα πλαίσια του ελέγχου ορθότητας της μεθόδου μελετήθηκε η τυχόν συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση μιγμάτων των πρότυπων θειολών ώστε να μελετηθεί τυχόν επίδραση μήτρας. Ακόμα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύγκρισης των αποτελεσμάτων της μεθόδου με τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής μεθόδου προσδιορισμού θειολών με τη μέθοδο Ellman. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε, είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους πιο ευαίσθητη από τη μέθοδο Ellman. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των θειολών που προσδιορίζονται με τη μέθοδο της Sq είναι μικρότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου Ellman και κατ' επέκταση δεν ήταν δυνατή η σύγκριση των δύο μεθόδων. Επιπλέον τα αποτελέσματα της μεθόδου συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα, που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, όπου γίνεται χρήση αντίστοιχων σκουαραϊνών.

#### 6.5.5.1 Προσθετικότητα

Στα πλαίσια ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου, απαραίτητος είναι ο έλεγχος της προσθετικότητας της δράσης του κάθε αναλύτη ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την ύπαρξη συστηματικών σφαλμάτων.

Οι θειόλες έχουν την τάση να σχηματίζουν τα αντίστοιχα δισουλφίδια καθώς η σταθερότητα των μορίων αυτών επηρεάζεται από μια σειρά παράγοντες (φως, θερμοκρασία, pH, οξυγόνο, άλλη θειόλη). Για τη μελέτη αυτή παρασκευάστηκε σειρά δειγμάτων πρότυπων θειολών. Εξετάστηκαν 3 ζεύγη τα οποία περιείχαν τη δραστική ουσία του φαρμάκου, N-ακετυλοκουστεΐνη. Τα ζεύγη αυτά ήταν: (α) N-ακετυλοκουστεΐνη / L-κουστεΐνη, (β) N-ακετυλοκουστεΐνη / μεθυλαιθέρας της L-κουστεΐνης και (γ) N-ακετυλοκουστεΐνη / 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη.

Με τη βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης της Ν-ακετυλοκυστεΐνης επιλέχθηκε η κατάλληλη συγκέντρωσή της στην οποία η S<sub>q</sub> παρουσιάζει σχετική απορρόφηση περίπου 20–25% και οι υπόλοιπες θειόλες ήταν στην ίδια συγκέντρωση με την Ν-ακετυλοκυστεΐνη. Στη συνέχεια προσδιορίσθηκε η σχετική απορρόφηση της S<sub>q</sub> των δειγμάτων τα οποία είχαν ποσότητες και των δύο θειολών σε αναλογία 7 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 και 1 : 7. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους Πίνακες 6.18 – 6.20.

**Πίνακας 6.18. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος Ν-ακετυλοκυστεΐνη / L-κυστεΐνη.**

<b>Αναλογία Ν-ακετυλοκυστεΐνη / L-κυστεΐνη</b>	<b>%RA</b>	<b>Θεωρητικό %RA</b>	<b>Πειρ, – Θεωρ,</b>
1 / 0	24,45	24,45	–
7 / 1	24,64	25,46	– 0,82
3 / 1	25,84	26,48	– 0,64
1 / 1	28,20	28,51	– 0,31
1 / 3	30,85	30,54	0,32
1 / 7	31,76	31,55	0,21
0 / 1	32,57	32,57	–

Πίνακας 6.19. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος N-ακετυλοκυστεΐνη / μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης.

Αναλογία N-ακετυλοκυστεΐνη / μεθυλαιθέρας της L-κυστεΐνης	%RA	Θεωρητικό %RA	Πειρ, – Θεωρ,
1 / 0	22,35	22,35	–
7 / 1	21,72	23,71	– 1,99
3 / 1	23,44	25,07	– 1,64
1 / 1	26,70	27,80	– 1,10
1 / 3	30,12	30,52	– 0,40
1 / 7	32,23	31,88	0,34
0 / 1	33,25	33,25	–

Πίνακας 6.20. Μετρήσεις προσθετικότητας μίγματος N-ακετυλοκυστεΐνη / 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη.

Αναλογία N-ακετυλοκυστεΐνη / 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλη	%RA	Θεωρητικό %RA	Πειρ, – Θεωρ,
1 / 0	19,66	19,66	–
7 / 1	21,39	22,39	– 1,01
3 / 1	25,14	25,13	0,01
1 / 1	30,47	30,59	– 0,12
1 / 3	35,57	36,06	– 0,48
1 / 7	37,80	38,79	– 0,98
0 / 1	41,52	41,52	–

Στους Πίνακες 6.18 – 6.20, παρατηρείται ότι η αναμενόμενη (θεωρητική) τιμή της σχετικής απορρόφησης της S<sub>q</sub> διαφέρει σημαντικά από την πειραματική, γεγονός που εξηγείται από την τάση των θειολών να σχηματίζουν δισουλφίδια με άλλες θειόλες. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι δεν είναι δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλών θειολών σε ένα δείγμα, εκτός εάν το δείγμα κατεργασθεί κατάλληλα ώστε να μην καθίσταται δυνατή η όποια αντίδραση σχηματισμού δισουλφιδίων.

#### 6.5.5.2 Σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με αντίστοιχες της βιβλιογραφίας

Οι πρώτες αναφορές σε σκουαραΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό θειολών δεν παρείχαν αναλυτικά αποτελέσματα.<sup>[20,21]</sup> Αργότερα, αρκετές σκουαραΐνες, οι οποίες θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό διάφορων θειολών.

Η πιο ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού θειολών με χρήση σκουαραΐνης δημοσιεύθηκε το 2011 από τους Z. Yan, S. Guang, H. Xu και X. Liu. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η σκουαραΐνη μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κυστεΐνης σε περιοχή συγκεντρώσεων από  $1,0 \times 10^{-8}$  M έως  $7,0 \times 10^{-7}$  M και όριο ανίχνευσης τα  $3,9 \times 10^{-9}$  M.<sup>[22]</sup> Ακόμα, αναφέρθηκε σκουαραΐνη που μπορούσε να προσδιορίσει κυστεΐνη και άλλες βιοθειόλες σε τάξη συγκεντρώσεων  $4,0 \times 10^{-6}$  M, απαιτούσε όμως τουλάχιστον 5 λεπτά για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.<sup>[25]</sup> Σε μία ακόμα δημοσίευση, αναφέρεται ότι σκουαραΐνη που συντέθηκε είχε γραμμική απόκριση απέναντι στην κυστεΐνη σε εύρος συγκεντρώσεων από  $1,0 \times 10^{-6}$  M έως  $4,0 \times 10^{-4}$  M, ενώ τα δείγματα απαιτούσαν 10 λεπτά επώαση.<sup>[24]</sup> Επίσης, σκουαραΐνη η οποία χρησιμοποιήθηκε κυρίως σε μικυλλιακά συστήματα (CTAB) αναφέρεται ότι προσδιόριζε γλουταθειόνη, εντός πέντε λεπτών, με όριο συγκέντρωσης τα  $1,0 \times 10^{-8}$  M και με γραμμική απόκριση στην περιοχή  $1,5 \times 10^{-7}$  M ως  $8,5 \times 10^{-6}$  M.<sup>[23]</sup> Τέλος η πιο πρόσφατη αναφορά σε σκουαραΐνη στη βιβλιογραφία ήταν το 2015, η οποία μπορούσε να προσδιορίσει κυστεΐνη και ομοκυστεΐνη σε επίπεδα συγκεντρώσεων των θειολών μέχρι  $2,0 \times 10^{-5}$  και  $1,0 \times 10^{-5}$  M, αντίστοιχα.<sup>[26]</sup>

Η μέθοδος λοιπόν που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας θεωρείται συγκρίσιμη με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους και έχει επιπλέον είναι άμεση και παρουσιάζει πολύ καλή ευαισθησία, γραμμικότητα και όρια ανίχνευσης αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.

Επιπλέον οι πιο ευαίσθητες από τις μεθόδους που αναφέρονται παραπάνω, είναι φθορισμομετρικές μέθοδοι. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε θα μπορούσε μελλοντικά, με κατάλληλες τροποποιήσεις να εφαρμοσθεί και για τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό θειολών, μειώνοντας πιθανότατα και τα όρια ανίχνευσής της.

### 6.5.6 Ανθεκτικότητα μεθόδου

Η ανθεκτικότητα (ruggedness) της μεθόδου περιγράφει την ανθεκτικότητά της σε προσχεδιασμένες μικρές μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Σχετίζεται με την αντοχή (robustness) της μεθόδου σε τυχαίες μη σκόπιμες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.<sup>[54]</sup>

Κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, παρατηρήθηκε ότι οι παράμετροι που επηρεάζουν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι τα παρακάτω:

1. Η συγκέντρωση της σκουαράϊνης  $S_q$
2. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών
3. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος
4. Η ποσότητα του δείγματος που προστίθεται (1,00 mL)
5. Το μήκος κύματος απορρόφησης,  $\lambda$
6. Η έκθεση της  $S_q$  στο φως

Ένας ακόμα παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τη μέθοδο είναι η ποσότητα των φωσφορικών αλάτων τα οποία ζυγίζονται για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος. Οπότε, δύο ακόμα παράγοντες συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη αυτή, οι μάζες των  $NaH_2PO_4$  και  $K_2HPO_4$ .

Εξετάστηκε λοιπόν, κατά πόσο αλλαγές της τάξης του  $\pm 5\%$  στις ποσότητες αυτές επηρεάζουν την απόκριση της μεθόδου ως προς ένα δείγμα κυστεΐνης και 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης συγκέντρωσης  $2,0 \times 10^{-5}$  M. Σε κάθε πείραμα ανθεκτικότητας μεταβαλλόταν μόνο ένας παράγοντας και κάθε διάλυμα αναλύθηκε τουλάχιστον τρεις φορές. Στον Πίνακα 6.21 παρουσιάζονται οι τιμές των παραγόντων, ως ονομαστική τιμή (0) χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη τιμή της μεθόδου και ως  $\pm 1$  χαρακτηρίζονται οι ακραίες τιμές.

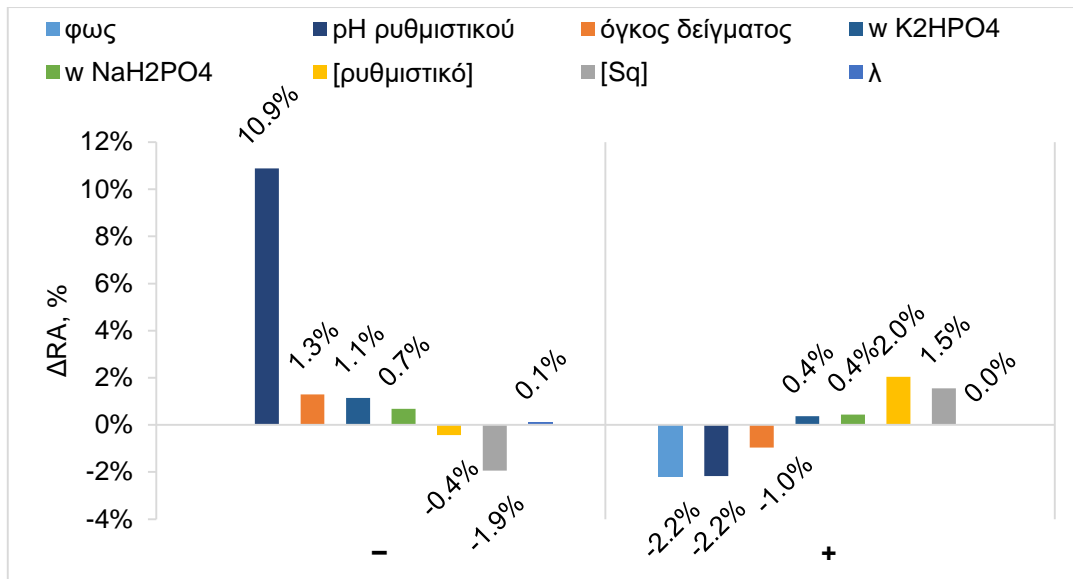


Πίνακας 6.21. Παράγοντες που μελετήθηκαν στα 3 επίπεδα, -1 χαμηλό, 0 μέσο – ονομαστική τιμή , +1 υψηλό.

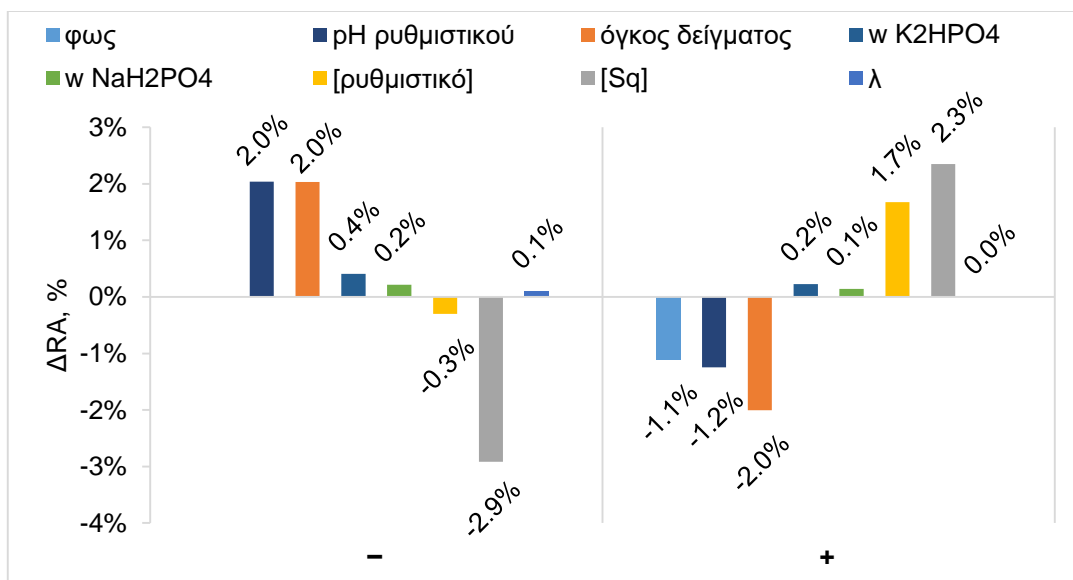
Παράγοντας	-1	0	+1
Συγκέντρωση $S_q$ , M	$2.00 \times 10^{-5}$	$2.10 \times 10^{-5}$	$2.21 \times 10^{-5}$
Συγκέντρωση ρυθμιστικού, M	0.0285	0.0300	0.0315
$\lambda$ , nm	537	538	539
pH ρυθμιστικού	6,7	6,8	6,9
Όγκος δείγματος, mL	0,95	1,00	1,05
Μάζα $NaH_2PO_4$ , g	1.3806	1.3806	1.3806
Μάζα $K_2HPO_4$ , g	1.3681	1.3681	1.3681
Φώς	0*		1*

\*0 = σκοτάδι, 1 = έκθεση στο φως για 15 λεπτά)

Στα Σχήματα 6.10 και 6.11 παρουσιάζεται η διαφορά της σχετικής απορρόφησης της ακραίας τιμής  $RA_{\pm}$  από την σχετική απορρόφηση της ονομαστικής τιμής  $RA_0$  [ $RA_0 - RA_{\pm}$ ] για τις δύο θειόλες που μελετήθηκαν.



Σχήμα 6.10. Διαφορά της ακραίας τιμής από την ονομαστική για το δείγμα της L-κυστεΐνης.



Σχήμα 6.11. Διαφορά την ακραίας τιμής από την ονομαστική για το δείγμα της 2-(διμεθυλαμινο)αιθανοθειόλης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί, η παρατήρηση πως στην περίπτωση της L-κυστεΐνης το pH του διαλύματος είναι πολύ σημαντικό, ειδικά όταν είναι περισσότερο όξινο από τη βέλτιστη τιμή του (6,8). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα βελτιστοποίησης της μεθόδου (Υποκεφάλαιο 6.3.4).

### 6.5.7 Αβεβαιότητα μεθόδου

Η αβεβαιότητα (uncertainty) μίας αναλυτικής μεθόδου, κατά τον ορισμό της EURACHEM, είναι μία παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα μίας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό. Η αβεβαιότητα εκφράζει δηλαδή μία περιοχή στην οποία βρίσκεται με αξιοπιστία, σε ένα επίπεδο εμπιστοσύνης, το αποτέλεσμα ενός αναλυτικού προσδιορισμού. Υπάρχουν διάφορες εκφράσεις της αβεβαιότητας. Όταν η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση, τότε αναφέρεται ως τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty,  $u$ ). Ως συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty,  $u_c$ ), ορίζεται η αβεβαιότητα που προκύπτει από το συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας. Η διευρυμένη αβεβαιότητα (expanded uncertainty,  $U$ ), χρησιμοποιείται συνήθως για να καλύψει τις απαιτήσεις των τελικών χρηστών της μέτρησης και εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από την συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, στο οποίο η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Συνήθως η τιμή της  $U$  προκύπτει αν πολλαπλασιάσουμε τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα παράγοντα κάλυψης (coverage factor,  $k$ ). Η επιλογή του παράγοντα κάλυψης βασίζεται στην επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης. Στις χημικές αναλύσεις συνήθως χρησιμοποιείται στάθμη εμπιστοσύνης 95%, οπότε ο παράγοντας κάλυψης είναι  $k=1,96$  (συνηθέστερα  $k=2$ ).<sup>[55]</sup>

Για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας του ποσοτικού προσδιορισμού θειολών σε υδατικά διαλύματα, πρέπει να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι πηγές αβεβαιότητας της μεθόδου. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πηγών αβεβαιότητας αναφέρεται παρακάτω.

#### *Αβεβαιότητα από τη ζύγιση των αντιδραστηρίων, $u(m)$*

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή του αναλυτικού ζυγού τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, όπου πραγματοποιήθηκαν οι ζυγίσεις των αντιδραστηρίων (της  $Sq$ , των φωσφορικών αλάτων και των θειολών), η αβεβαιότητα του ζυγού είναι  $\pm 0,1$  mg. Θεωρώντας ότι το εύρος που δηλώνεται στο πιστοποιητικό ακολουθεί τετραγωνική κατανομή, ενώ η ζύγιση πραγματοποιήθηκε εκ διαφοράς,

$$\text{Συνεπώς: } u(m) = \sqrt{2 \times \left(\frac{\alpha}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,082 \text{ mg}$$

### *Αβεβαιότητα από τον όγκο των αντιδραστηρίων, $u(V)$*

Τα αντιδραστήρια διαλυτοποιήθηκαν και αραιώθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες τύπου A, οι οποίες έχουν αβεβαιότητα που εξαρτάται από τον όγκο που περιέχουν. Χαρακτηριστικά, 5 και 10 mL  $\pm 0,025$  mL, 25 mL  $\pm 0,04$  mL, 50 mL  $\pm 0,06$  mL, 100 mL  $\pm 0,1$  mL, 250 mL  $\pm 0,15$  mL.

Η προσθήκη μικρών όγκων μέχρι 1,0 mL έγινε με χρήση αυτόματων πιπετών. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή τους η αβεβαιότητα της πιπέτας εύρους όγκων 10 – 100  $\mu$ L για τα 10  $\mu$ L είναι  $\pm 3\%$  και για τα 100  $\mu$ L είναι  $\pm 0,8\%$ . Αντίστοιχα η πιπέτα εύρους όγκων 100 – 1000  $\mu$ L έχει αβεβαιότητα στα 100  $\mu$ L  $\pm 3\%$  και στα 1000  $\mu$ L  $\pm 0,6\%$ .

Τέλος για τη μεταφορά όγκων μεγαλύτερων από 1,0 mL χρησιμοποιήθηκαν σιφώνια τύπου A, τα οποία έχουν αβεβαιότητα που εξαρτάται από τον τύπο τους και από τον όγκο που μεταφέρουν. Για τα βαθμονομημένα σιφώνια ισχύουν οι παρακάτω αβεβαιότητες, για 2 mL  $\pm 0,01$  mL, για 5 mL  $\pm 0,03$  mL και για 10 mL  $\pm 0,05$  mL. Ενώ για τα σιφώνια σταθερού όγκου ισχύουν οι αβεβαιότητες, για 2 mL  $\pm 0,01$  mL, για 5 mL  $\pm 0,015$  mL, για 10 mL  $\pm 0,02$  mL και για 25 mL  $\pm 0,03$  mL.

Θεωρώντας ότι το εύρος που δηλώνεται ακολουθεί τετραγωνική κατανομή η σχετική τυπική αβεβαιότητα του κάθε περιέκτη υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση όπου  $a$  είναι η αβεβαιότητα που δηλώνεται στο πιστοποιητικό διακρίβωσης.

$$u(V) = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

### *Αβεβαιότητα από τη χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης, $u(C)$*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε θειόλης είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με πρότυπο διάλυμα της θειόλης. Η τυπική αβεβαιότητα  $u(C)$  που προκύπτει σε αυτή την περίπτωση υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση που ακολουθεί.

$$u(C) = \frac{S_{y/x}}{B} \left\{ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{B^2 \times \sum_i (x_i - \bar{x})} \right\}^{1/2}$$

όπου,

$S_{y/x}$  : η τυπική απόκλιση των υπολοίπων των τιμών  $y$  που προκύπτουν από τη γραμμική συσχέτιση (τυχαίο σφάλμα των  $y$ )

$B$  : η κλίση της καμπύλης αναφοράς

$n$  : ο αριθμός των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

$m$  : ο αριθμός των επαναλήψεων κατά τη μέτρηση του άγνωστου δείγματος

$y_0$  : ο μέσος όρος των αποκρίσεων αυτών των επαναλήψεων

$\bar{y}$  : ο μέσος όρος των αποκρίσεων των προτύπων διαλυμάτων

$x_i$  : η συγκέντρωση κάθε πρότυπου διαλύματος

$\bar{x}$  : ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων

#### *Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα*

Από τις συνιστώσες αβεβαιότητας που έχουν υπολογιστεί στα προηγούμενα στάδια υπολογίζεται η συνδυασμένη αβεβαιότητα με βάση την εξίσωση που ακολουθεί. Επειδή οι πηγές της αβεβαιότητας έχουν διαφορετικές μονάδες, η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται συνήθως ως σχετική τυπική αβεβαιότητα στις χημικές μετρήσεις.

$$\frac{u_c}{C} = \sqrt{RSD_F^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(C)}{C}\right)^2}$$

Τέλος η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα  $U$ . Για στάθμη εμπιστοσύνης 95% δίνεται από τη σχέση:

$$U = 2 \times u_c$$

## 6.6 Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, αναπτύχθηκε μια νέα φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού θειολών με χρήση της σκουαραΐνης S<sub>q</sub> που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Η μέθοδος βασίζεται στη μείωση της απορρόφησης της S<sub>q</sub> παρουσία υδατοδιαλυτής θειόλης σε μήκος κύματος 538 nm.

Η μέθοδος αρχικά βελτιστοποιήθηκε και οι βέλτιστες συνθήκες συνοψίζονται ως εξής: Σε 1 mL υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH = 6,8) συγκέντρωσης 0,03 M, προστίθεται 1 mL διαλύματος της S<sub>q</sub> σε ακετονιτρίλιο, συγκέντρωσης  $2,1 \times 10^{-5}$  M. Στο παραπάνω μίγμα, προστίθεται 1 mL υδατικού διαλύματος θειόλης και καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 538 nm. Τα διαλύματα προτείνεται να φυλάσσονται σε δροσερό και σκοτεινό μέρος. Επίσης, είναι σημαντικό τα διαλύματα και τα δείγματα να μην περιέχουν ιόντα μετάλλων καθώς αυτά μπορεί να παρεμποδίζουν την μέθοδο.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου παρατηρήθηκε ότι η S<sub>q</sub> δεν είναι το ίδιο ευαίσθητη σε όλες τις θειόλες. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα διαλύματα της S<sub>q</sub> καθώς και η απόκρισή της στις θειόλες εξαρτώνται σημαντικά από την τιμή pH του διαλύματος. Γενικά, η S<sub>q</sub> αναμένεται να έχει μικρότερη ευαισθησία σε θειόλες που φέρουν όξινες ομάδες.

Επιπλέον, η μέθοδος επικυρώθηκε επιτυχώς με μοναδικό πρόβλημα τον ακριβή προσδιορισμό της ορθότητας της μεθόδου, πιθανότατα λόγω της φύσης των θειολών οι οποίες έχουν την τάση στα διαλύματά τους να σχηματίζουν δισουλφίδια. Η S<sub>q</sub> όπως αποδείχθηκε και από τα πειράματα εκλεκτικότητας προσβάλλεται μόνο από ελεύθερες υδροθειομάδες (-SH). Ακόμα, η S<sub>q</sub> εμφανίζει μια ιδιαίτερη ευαισθησία σε μια σειρά από ιόντα μετάλλων με τα πιο σημαντικά να είναι τα ιόντα υδραργύρου και χρυσού.

Τέλος, συγκρίνοντας τη μέθοδο που αναπτύχθηκε με αντίστοιχες μεθόδους είναι φανερό πως η μέθοδος που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να ανταγωνισθεί αντάξια άλλες πρότυπες μεθόδους της βιβλιογραφίας αλλά και άλλα παρόμοια μόρια της οικογένειας των σκουαραΐνών τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### Ανάπτυξη Μεθόδου Ανίχνευσης Ιόντων Υδραργύρου(II) με χρήση δινδολο – σκουαραΐνης ως ιχνηθέτη επιστρωμένου σε μεμβράνες κυτταρίνης

#### 7.1 Εισαγωγή

Όπως παρατηρήθηκε από τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με την σκουαραΐνη  $S_q$  και τα ιόντα υδραργύρου, η  $S_q$  φαίνεται να έχει εκλεκτική απόκριση προς τα ιόντα υδραργύρου. Χαρακτηριστικά, το χρώμα των υδατικών διαλυμάτων της  $S_q$  παρουσία υδραργύρου μεταβάλλεται από ροζ σε μπλε ενώ το σύμπλοκο που σχηματίζεται εμφανίζει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Η μικρή διαλυτότητα του συμπλόκου  $S_q$ - $Hg$ , έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κolloειδών ιζημάτων σε υδατικά διαλύματα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο άμεσος φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ιόντων αυτών.

Για την αξιοποίηση, λοιπόν, αυτής της ικανότητας της  $S_q$  ήταν απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια διαφορετική πορεία ανάλυσης. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός ιόντων υδραργύρου, η  $S_q$  πρέπει να βρίσκεται σε στερεή φάση. Συνεπώς αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος προσδιορισμού υδραργύρου βασισμένη στην αλλαγή του χρώματος της  $S_q$  που επιστρώθηκε, με χρήση του εξοπλισμού που φαίνεται στην Εικόνα 7.1, σε στερεό υπόστρωμα και συγκεκριμένα σε μεμβράνη κυτταρίνης.



Εικόνα 7.1. Εξοπλισμός απόθεσης αντιδραστηρίων σε πλάκες (TLC).<sup>[46]</sup>

## 7.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ιόντων υδραργύρου

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμάστηκαν αρχικά διάφορες μεμβράνες συγκράτησης, στις οποίες το πληρωτικό υλικό ήταν είτε κυτταρίνη είτε νιτρο-κυτταρίνη.

Οι δύο μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: (α) πλάκες κυτταρίνης (για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC) και (β) μεμβράνες από ίνες κυτταρίνης (πάχος: 0,1 cm, πλάτος: 1,7 cm) (ευγενική χορηγία του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ). Η επίστρωση των μεμβρανών διεξήχθη με τη χρήση κατάλληλης οργανολογίας, ώστε να διασφαλισθεί η επαναληψιμότητα και η ομοιογένεια της επίστρωσης στις μεμβράνες, αφού επιστρώθηκαν ζώνες  $S_q$  στις στατικές φάσεις πάχους μερικών μόνο χιλιοστών.

Παρατηρήθηκε ότι οι πλάκες κυτταρίνης ήταν πιο ευαίσθητες από τις μεμβράνες από ίνες κυτταρίνης στα ιόντα υδραργύρου. Ωστόσο, λόγω της λεπτής τους επίστρωσης καταστρέφονταν πολύ εύκολα κατά την επαφή τους με τα υδατικά διαλύματα όπου έγιναν οι δοκιμές. Συνεπώς, οι μεμβράνες κυτταρίνης επιλέχθηκαν τελικά ως η κατάλληλη στατική φάση για την ανάπτυξη της μεθόδου.

### 7.2.1 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της ζώνης δοκιμασίας της $S_q$

Η ποσότητα που περιέχεται σε κάθε ζώνη που επιστρώνεται στη μεμβράνη καθορίζεται από τον όγκο του διαλύματος και τον αριθμό των ψεκασμών που γίνονται σε κάθε ζώνη. Παρασκευάστηκε, λοιπόν, διάλυμα της  $S_q$  σε ακετονιτρίλιο, συγκέντρωσης  $4,0 \times 10^{-5}$  M και επιστρώθηκε στις μεμβράνες κυτταρίνης. Σε κάθε επίστρωση εναποτίθετο 2  $\mu\text{L}$  του διαλύματος στη μεμβράνη σε μήκος 8 cm. Η ποσότητα της  $S_q$  που επιστρωνόταν κάθε φορά στη μεμβράνη ήταν  $10,0 \text{ pmol cm}^{-1}$ .

Σειρά μεμβρανών παρασκευάστηκαν με διαφορετικό αριθμό ψεκασμών οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 7.1. Οι μεμβράνες στη συνέχεια κόπηκαν σε μικρότερες ταινίες πλάτους 0,5 cm. Επιπλέον, στον Πίνακα 7.1 παρουσιάζεται το συνολικό φορτίο της κάθε ταινίας σε  $S_q$ .



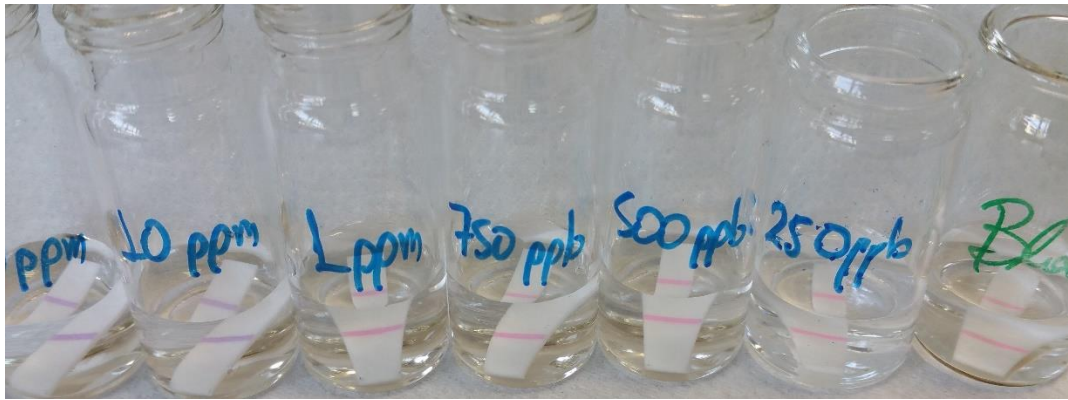
Πίνακας 7.1. Χαρακτηριστικά των επιστρώσεων στις μεμβράνες κυτταρίνης.

Αριθμός Ψεκασμών	Συνολικός όγκος επίστρωσης, $\mu\text{L}$	Συνολική ποσότητα επίστρωσης (μήκος 8cm), $\mu\text{mol cm}^{-1}$	Ποσότητα επίστρωσης σε κάθε ταινία (0,5 cm), $\mu\text{mol}$
1	2	10	5
2	4	20	10
4	8	40	20
8	16	80	40
10	20	100	50
20	40	200	100
30	60	300	150
40	80	400	200
60	120	600	300
80	160	800	400

Για να είναι εύκολα διακριτή η ζώνη της  $S_q$  ήταν απαραίτητοι τουλάχιστον 8 ψεκασμοί.

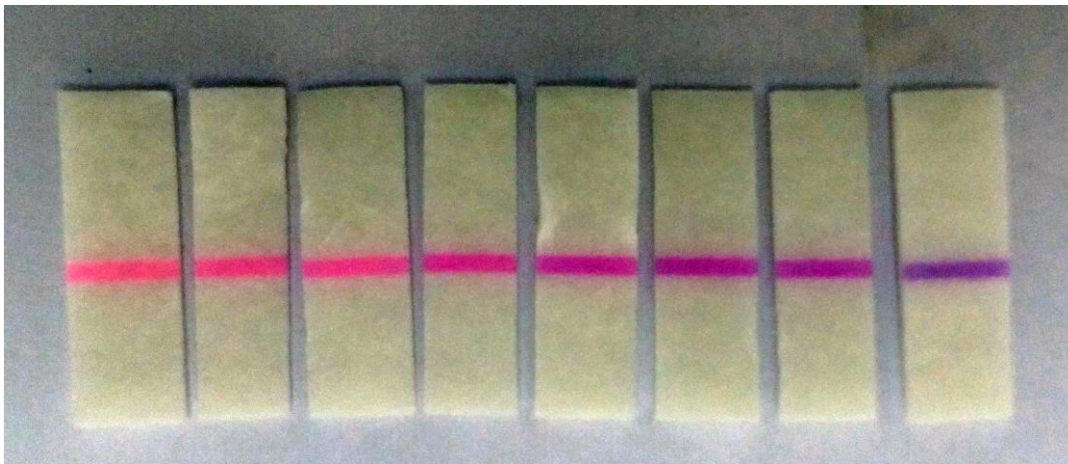
Στη συνέχεια παρασκευάσθηκαν υδατικά διαλύματα ιόντων υδραργύρου συγκέντρωσης από  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  έως  $250 \text{ng mL}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ .

Οι ταινίες (0,5 cm) εμβαπτίζονταν στα διαλύματα του υδραργύρου (3 mL) και επωάζονταν για 15 λεπτά (Εικόνα 7.2). Έπειτα απομακρύνονταν από τα διάλυμα, αφήνονταν να στεγνώσουν ελαφρά και με φωτογραφική μηχανική καταγραφόταν η χρωματική αλλαγή της ζώνης της  $S_q$ .



**Εικόνα 7.2.** Μεμβράνες εμβαπτισμένες στα διάφορα διαλύματα υδραργύρου, αριστερά διάλυμα συγκέντρωσης  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  έως  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  και δεξιά το λευκό δείγμα.

Η μεμβράνες που είχαν επιστρωθεί με 20 ψεκασμούς εμφάνιζαν την καλύτερη απόκριση στα ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$  και στη συνέχεια μελετήθηκαν με συγκεντρώσεις υδραργύρου από  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  έως  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Εικόνα 7.3).

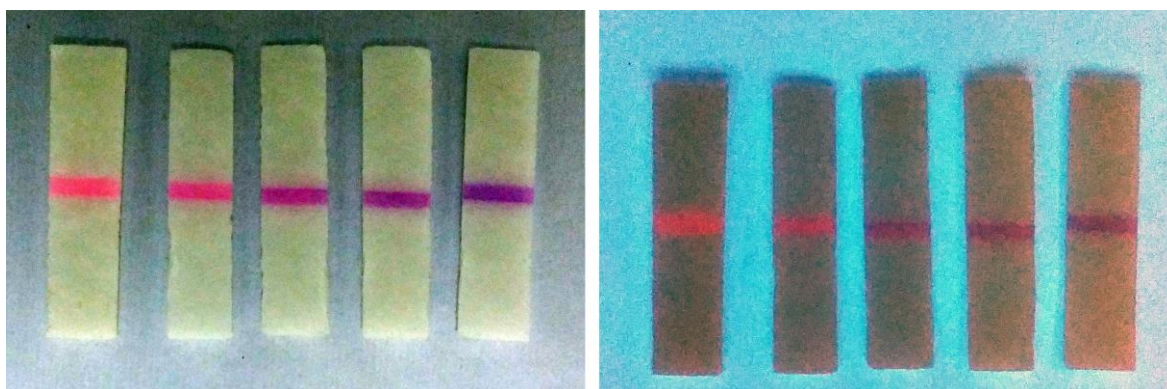


**Εικόνα 7.3.** Απόκριση της Sq (έγχρωμη ταινία) στα ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$ , από αριστερά το λευκό δείγμα ακολουθεί το δείγμα συγκέντρωσης  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  και διαδοχικά στα δεξιά είναι το δείγμα  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Παρατηρήθηκε ότι η Sq δέσμευε τα ιόντα υδραργύρου απομακρύνοντας τα εν μέρει από το διάλυμα. Με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, μειώθηκε το πλάτος των ταινιών από  $0,5 \text{ cm}$  σε  $0,4 \text{ cm}$  (για 20 ψεκασμούς  $80 \text{ pmol Sq}$ ) ώστε να είναι μικρότερη η επιφάνεια επαφής της Sq αλλά και η συνολική της ποσότητα στην ταινία. Ακόμα, ο όγκος του

διαλύματος αυξήθηκε από 3 mL σε 10 mL και οι συγκεντρώσεις υδραργύρου περιορίστηκαν μεταξύ  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  και  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι δεν άλλαζε μόνο το χρώμα της Sg, αλλά τα ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$  είχαν επίδραση και στο φθορισμό της ζώνης, περιορίζοντας τον αρκετά, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους (Εικόνα 7.4).



Εικόνα 7.4. Απόκριση της Sg στα ιόντα  $\text{Hg}^{2+}$ , αριστερά σε ηλιακό φως και δεξιά σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVC) από λευκό δείγμα (αριστερή ταινία),  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Hg}^{2+}$

### 7.2.2 Επίδραση ρυθμιστικών διαλυμάτων στην ευαισθησία της ζώνης της Sg

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση του υδραργύρου με την Sg είναι απαραίτητο το διάλυμα να είναι ελαφρώς όξινο ( $\text{pH} \geq 6,5$ ) ή αλκαλικό. Μελετήθηκε, λοιπόν, η επεξεργασία των μεμβρανών πριν από την ανάλυση με εμφύσηση σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για μικρό χρονικό διάστημα (2 λεπτά). Στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση.

Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών σε διάφορα pH (2, 4, 7, 8, 10) συγκέντρωσης 0,01 M καθώς και διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_2$  στην ίδια συγκέντρωση. Οι μεμβράνες επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω. Επίσης μεμβράνες εμφύσηθηκαν σε υπερκάθαρο νερό ως δείγματα αναφοράς. Παρατηρήθηκε ότι οι μεμβράνες που εμφύσηθηκαν στα όξινα ρυθμιστικά διαλύματα είχαν μειωμένη ευαισθησία σε σύγκριση με αυτά που εμφύσηθηκαν σε ουδέτερα και αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα. Δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη ενίσχυση του σήματος με τη χρήση των ρυθμιστικών, οπότε και δεν κρίνεται απαραίτητη η χρήση τους.

### 7.3 Συμπεράσματα

Αναπτύχθηκε μέθοδος ανίχνευσης ιόντων υδραργύρου με επίστρωση της σκουαραΐνης Sq σε μεμβράνη κυτταρίνης. Η μέθοδος επιτρέπει, την διά γυμνού οφθαλμού, ανίχνευση ιόντων υδραργύρου, σε διαλύματα συγκέντρωσης από  $50 \text{ ng mL}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$  και όγκου 10 mL, με την εμβάπτιση της μεμβράνης στο δείγμα και παραμονή σε αυτό για 15 λεπτά. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι ακόμα πιο χαμηλό με κατάλληλη ψηφιακή αποτύπωση των δειγμάτων (σαρωτής ή έξυπνο κινητό) και επεξεργασία της εικόνας με κατάλληλο πρόγραμμα (imageJ ή photoshop). Τα όρια που έχει θέσει ο EPA (United States Environmental Protection Agency – Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών) για τον υδράργυρο είναι  $2 \text{ ng mL}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$  στο νερό. Συνεπώς, θα μπορούσε, μελλοντικά, να εφαρμοσθεί σε αναλύσεις πεδίου, για τον άμεσο έλεγχο υδραργύρου σε ύδατα (σε μεγαλύτερο όγκο δείγματος), κατευθείαν στην πηγή των υδάτων χωρίς τη χρήση ενόργανης μεθόδου. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το κόστος, με τα σημερινά δεδομένα, σύνθεσης της Sq είναι κάτω από 80 € ανά g τελικού προϊόντος, συνεπώς το κόστος του κάθε αισθητήρα ανά ανάλυση (απαιτούνται 2 αισθητήρες, αναφοράς και δείγματος) ανέρχεται στα 0,012 € ( $\approx$  0,05 €, συμπεριλαμβανομένης της συσκευασίας). Κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αποδείχθηκε επίσης, ότι δεν είναι απαραίτητη η προκατεργασία των μεμβρανών πριν την ανάλυση, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατευθείαν μετά την επίστρωσή τους με την Sq.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Reflux	Αναρροή
Wavelength	Μήκος Κύματος
Buffer Solution	Ρυθμιστικό Διάλυμα

## Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

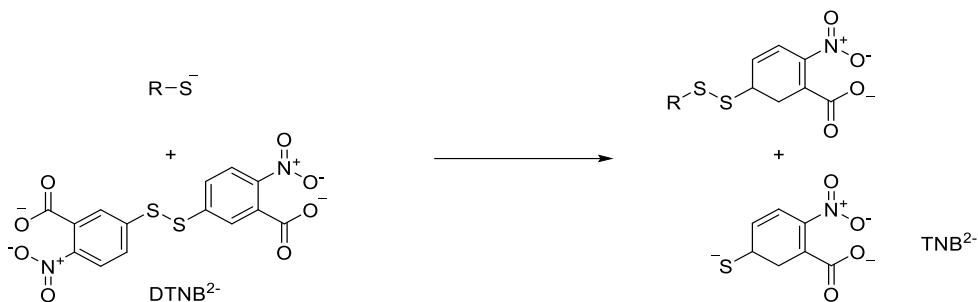
Ακρωνύμιο	Ανάπτυξη	Απόδοση στα Ελληνικά
Abs.	Absorbance	Απορρόφηση
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
a.u.	Arbitrary Units	Αυθαίρετες Μονάδες
BODIPY	4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene	4,4-διφθορο-4-βορα-3α,4α-διάζα-s-ινδακένιο
BR	Britton-Robinson (universal buffer)	(Ρυθμιστικό διάλυμα γενικής χρήσης)
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform Deuterated	Χλωροφόρμιο Δευτεριωμένο
CPE	Cloud Point Extraction	Εκχύλισης Σημείου Νέφωσης
CPT	Cloud Point Temperature	Θερμοκρασία Σημείου Νέφωσης
CMC	Critical Micelle Concentration	Κρίσιμη Μικυλλιακή Συγκέντρωση
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridine	4-(Διμεθυλάμινο)πυριδίνη
Et <sub>2</sub> O	Diethyl Ether	Διαιθυλαιθέρας
DMF	N,N-Dimethylformamide	N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	5,5'-διθειοδισ(2-νιτροβενζοϊκό Οξύ)
$\lambda_{em}$	Emission Wavelength	Μήκος κύματος Εκπομπής
$\lambda_{ex}$	Excitation Wavelength	Μήκος κύματος Διέγερσης
$\lambda_{max}$	Maximum Wavelength (Absorbance)	Μέγιστο Μήκος κύματος (Απορρόφηση)
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
EtOAc	Ethyl Acetate	Οξικός Αιθυλεστέρας
FL	Fluorescence	Φθορισμός
Ir	Infrared	Υπέρυθρο
MS	Mass Spectrometry	Φασματοσκοπία Μαζών
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MeOD	Methanol Deuterated	Μεθανόλη Δευτεριωμένη

D	Days	Μέρες
H	Hours	Ώρες
Min	Minutes	Λεπτά
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
PBS	Phosphate Buffered Saline	Ισότονο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά ιόντα
P.Ether	Petroleum Ether 40–60°C	Πετρελαϊκός Αιθέρας 40–60°C
pH	Hydrogen Potential ( $-\log[H^+]$ )	πεχά
ppb	Parts Per Billion ( $\mu\text{g}/\text{Kg} - \mu\text{g}/\text{L}$ )	Μέρη Στο Δισεκατομμύριο
ppm	Parts Per Million ( $\text{mg}/\text{Kg} - \text{mg}/\text{L}$ )	Μέρη Στο Εκατομμύριο
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
r.t.	Room Temperature	Θερμοκρασία Δωματίου
SSq	Semi-Squaraine	Ημι-σκουαράϊνη
Sq	Squaraine	Σκουαράϊνη
SD	Standard Deviation	Τυπική Απόκλιση
S <sub>a</sub>	Standard Deviation of a	Τυπική Απόκλιση του a
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Δωδέκυλο Θειικό Νάτριο
THF	Tetrahydrofuran	Τετραϋδροφουράνιο
TGA	Thermal Gravimetric Analysis	Θερμοσταθμική Ανάλυση
TNB	2-nitro-5-thiobenzoic acid	2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ
UV	Ultra Violet	Υπεριώδες
Vis	Visible	Ορατό
Σ.Τ.	–	Σημείο Τήξης

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερων ομάδων –SH με το αντιδραστήριο Ellman

Το 5,5'-διθειοδις(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) γνωστό και ως αντιδραστήριο Ellman, αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα αντιδραστήρια για την ποσοτικοποίηση μικρών οργανικών μορίων που διαθέτουν ελεύθερες –SH ομάδες (θειόλες) καθώς και για την ομοιοπολική τροποποίηση των ομάδων θειόλης επί πρωτεϊνών. Σε αλκαλικό περιβάλλον (pH = 8,0), παρουσία κάποιας θειόλης το δισουλφίδιο σπάει και το διάλυμα χρωματίζεται κίτρινο (Σχήμα Ι.1) – λαμβάνει το χρώμα του μονομερούς 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (TNB) το οποίο ποσοτικοποιείται φωτομετρικά ( $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$ ).



Σχήμα Ι.1. Τυπική αντίδραση του DTNB με ελεύθερες θειόλες.<sup>[56]</sup>

Πρόδρομος του DTNB ήταν το δις(π-νιτροφαινόλη)δισουλφίδιο (PNPD). Ωστόσο, το δισουλφίδιο αυτό είναι πολύ αδιάλυτο στο νερό και κατά συνέπεια, υδατικά διαλύματα ακετόνης έπρεπε να χρησιμοποιηθούν για να διαλυθούν τα αντιδρώντα. Αν και αυτό δεν αποτελούσε σοβαρό μειονέκτημα για ορισμένες ενώσεις, έκανε την αντίδραση με κάποιες θειόλες πιο πολύπλοκη. Για παράδειγμα, η αντίδραση με την κυστεΐνη είναι σημαντικά βραδύτερη από ότι είναι η αντίδραση με την 3-μερκαπτοαιθανόλη. Ένα ακόμα πρόβλημα με τη χρήση της ακετόνης είναι η ικανότητά της να καταβυθίζει και / ή να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φωτομετρικής μέτρησης. Για τους λόγους αυτούς, συντέθηκε από τον George L. Ellman το 1959, από όπου και πήρε το όνομά του, ένα υδατοδιαλυτό παράγωγο του δις(ρ-νιτροφαινόλη)δισουλφιδίου, το DTNB. Δεδομένου ότι η αντίδραση έπρεπε να πραγματοποιηθεί σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον, κρίθηκε



απαραίτητη η εισαγωγή ομάδων καρβοξυλίου, οι οποίες βελτίωσαν δραματικά τη διαλυτότητα του μορίου καθώς και την ταχύτητα της αντίδρασης σε υδατικά διαλύματα.<sup>[57,58]</sup>

Ο Ellman αρχικά, θεώρησε πως ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του TNB που παραγόταν, ότι ήταν  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ ). Αρκετά χρόνια αργότερα όμως, το 1979 αυτό επαναπροσδιορίστηκε από τον Peter W. Riddles και την ομάδα του οι οποίοι κατέληξαν στο ότι ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του διανιόντος του TNB είναι  $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , στα 412 nm, σε αραιά υδατικά διαλύματα αλάτων. Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για την ποσοτικοποίηση ελεύθερων θειολών σε υδατικά διαλύματα.<sup>[56]</sup>

Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται ο παρακάτω εξοπλισμός:

- Γυάλινα φιαλίδια (τουλάχιστον 10 mL)
- Σιφώνια (2, 3 και 5 mL)
- Αυτόματη πιπέττα
- Φασματοφωτόμετρο (απαιτούνται και κατάλληλες κυψελίδες χαλαζία)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού ελεύθερων θειολών με το αντιδραστήριο Ellman έχει ως εξής <sup>[59]</sup>:

**Βήμα 1:** 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, συγκέντρωσης 0,1 M και pH 8,0, αραιώνονται με 5 mL υπερκάθαρο νερό, σε γυάλινο φιαλίδιο.

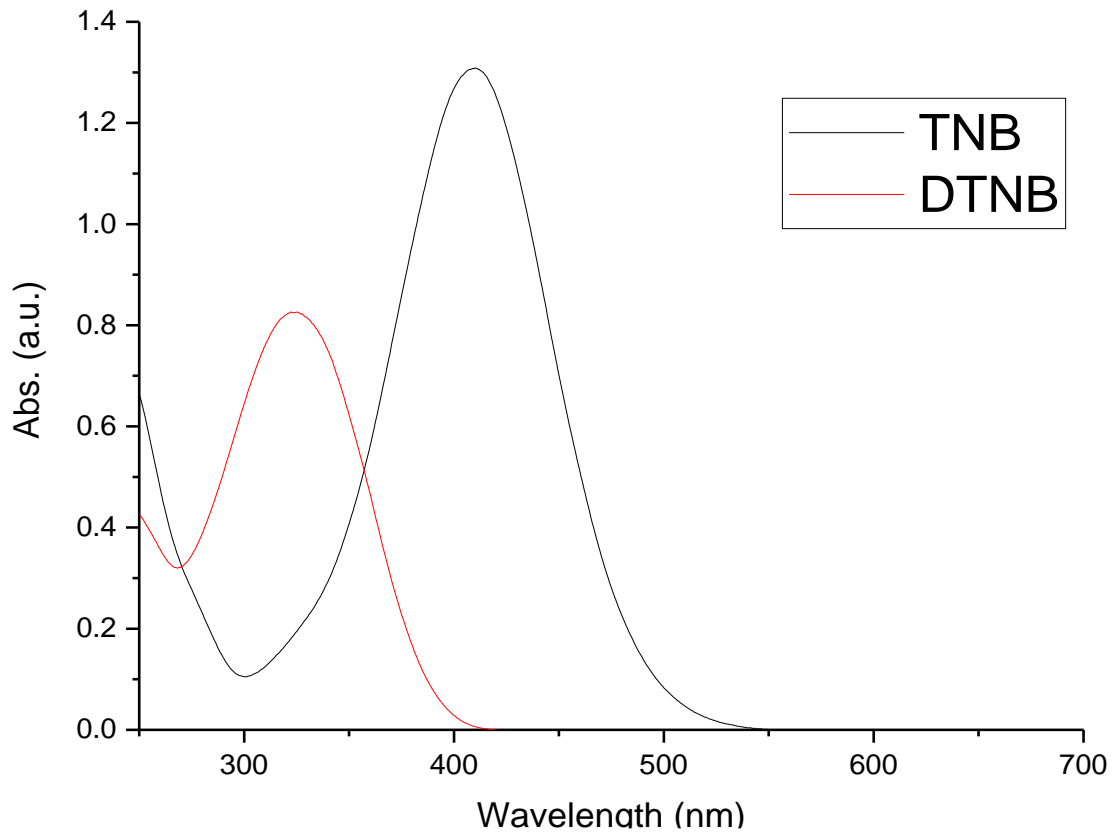
**Βήμα 2:** Στο διάλυμα προστίθενται 3 mL θειόλης (τελικός όγκος 10 mL) και ανακινείται για την ομογενοποίηση του μίγματος.

**Βήμα 3:** Από το παραπάνω διάλυμα λαμβάνονται 3 mL, και μεταφέρονται σε νέο φιαλίδιο, στα οποία προστίθενται 20  $\mu\text{L}$  φρέσκου αλκαλικού διαλύματος DTNB ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$  – pH 8,0), το μίγμα ανακινείται και αφήνεται να επωαστεί για τουλάχιστον 2 λεπτά.

**Βήμα 4:** Μετά και την επώαση η απορρόφηση του δείγματος μετράται στο μήκος κύματος  $\lambda = 412 \text{ nm}$  (βλ. Σχήμα 1.2).

Για τη χρήση της μεθόδου είναι απαραίτητη η χρήση λευκού δείγματος.

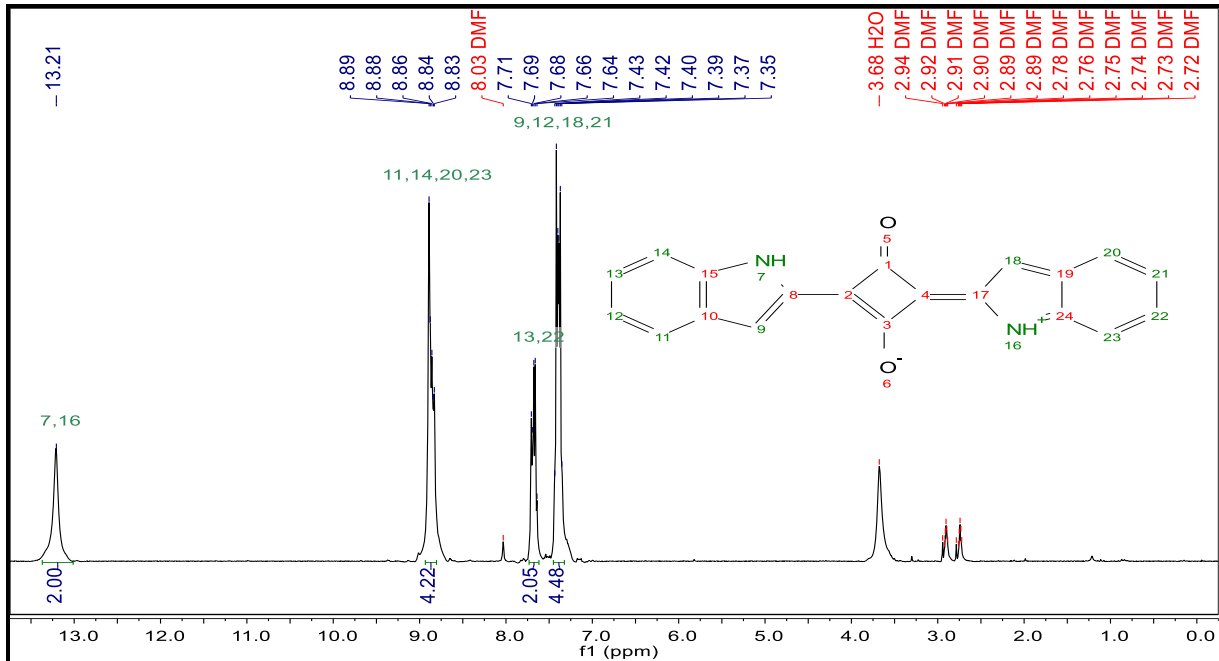
Η μέθοδος είναι αξιόπιστη, επαναλήψιμη, και πολύ σταθερή.



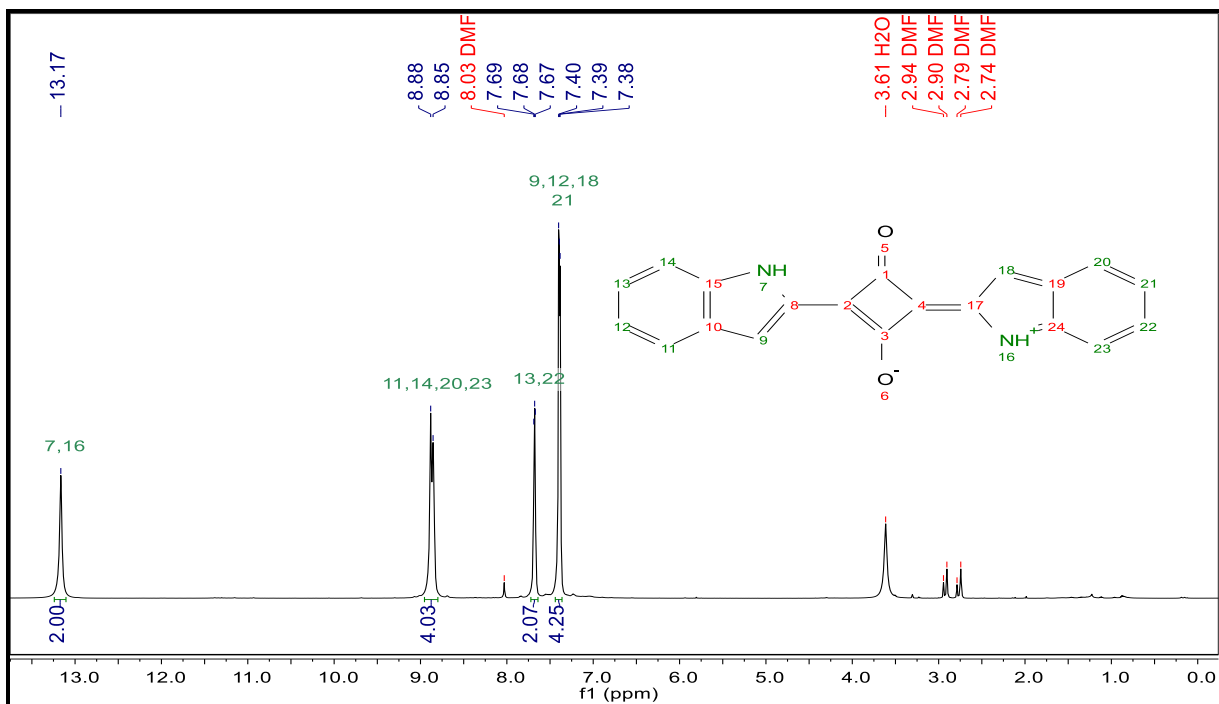
Σχήμα Ι.2. Φάσμα απορρόφησης του DTNB και του TNB.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

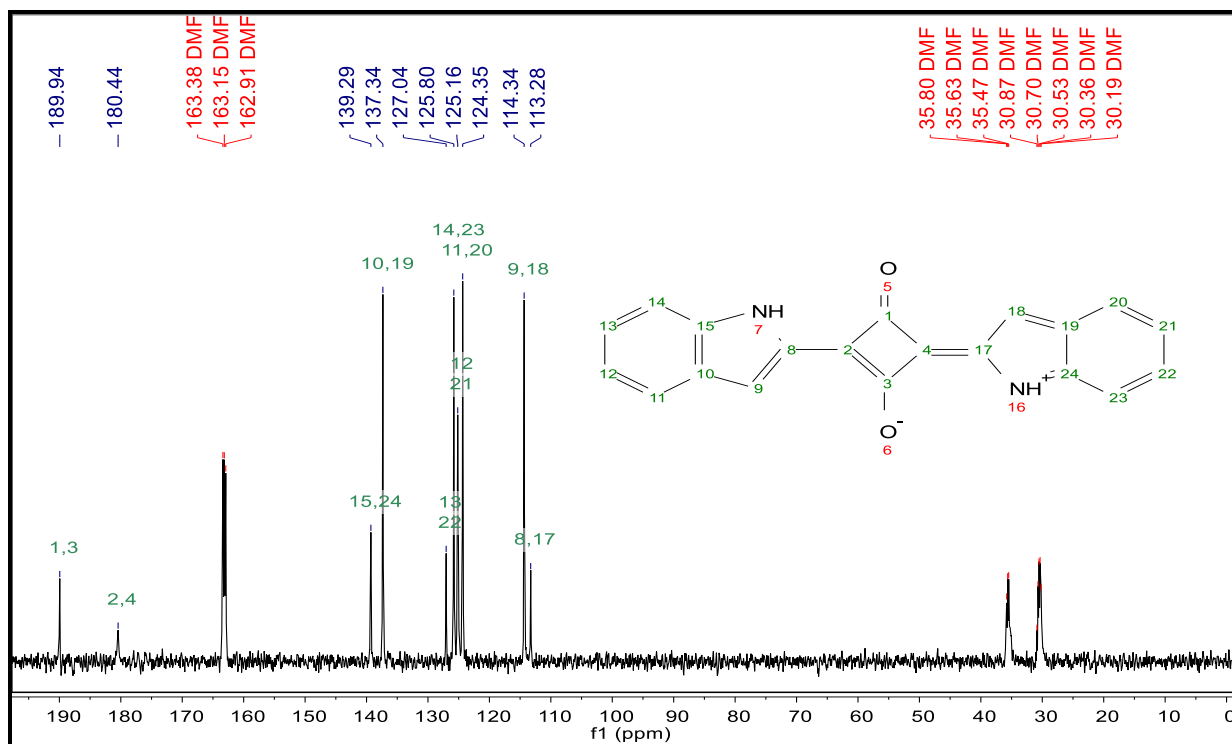
### Φασματοσκοπικά δεδομένα από το χαρακτηρισμό της Sg



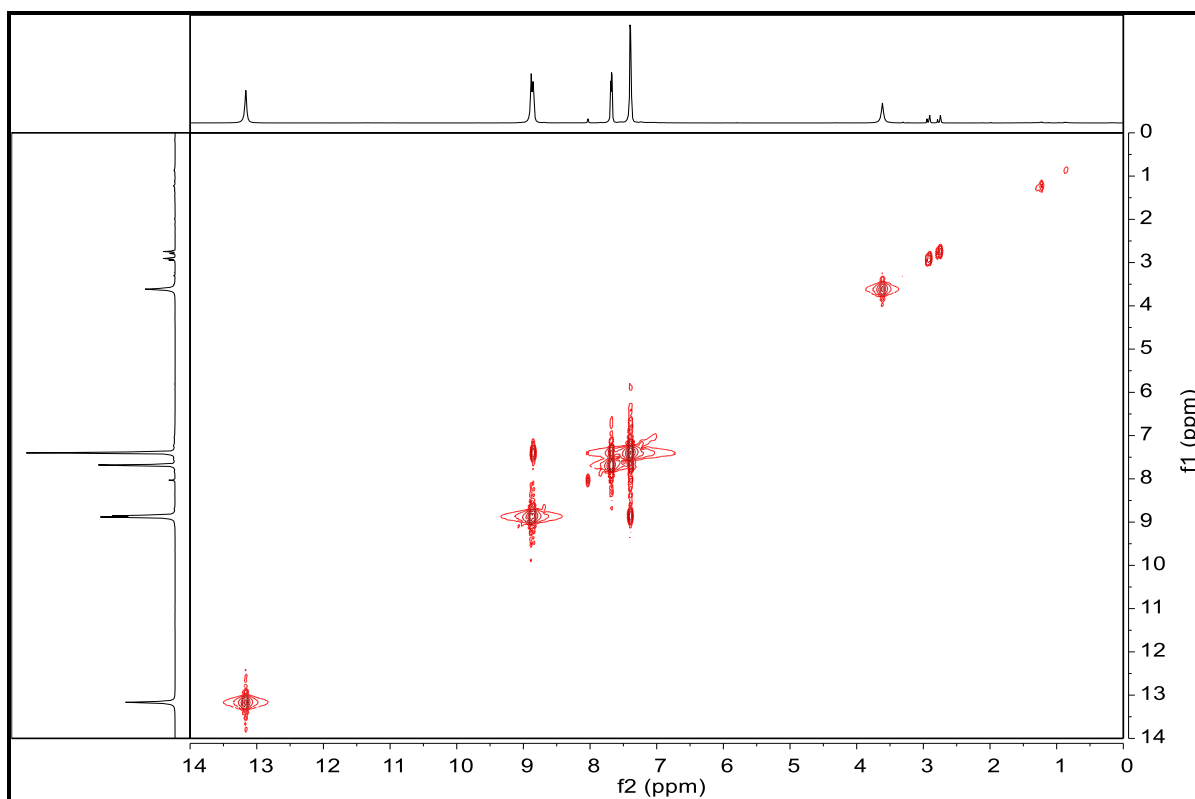
Σχήμα ΙΙ.1. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR σε διαλύτη DMF-d<sub>7</sub> (200 MHz).



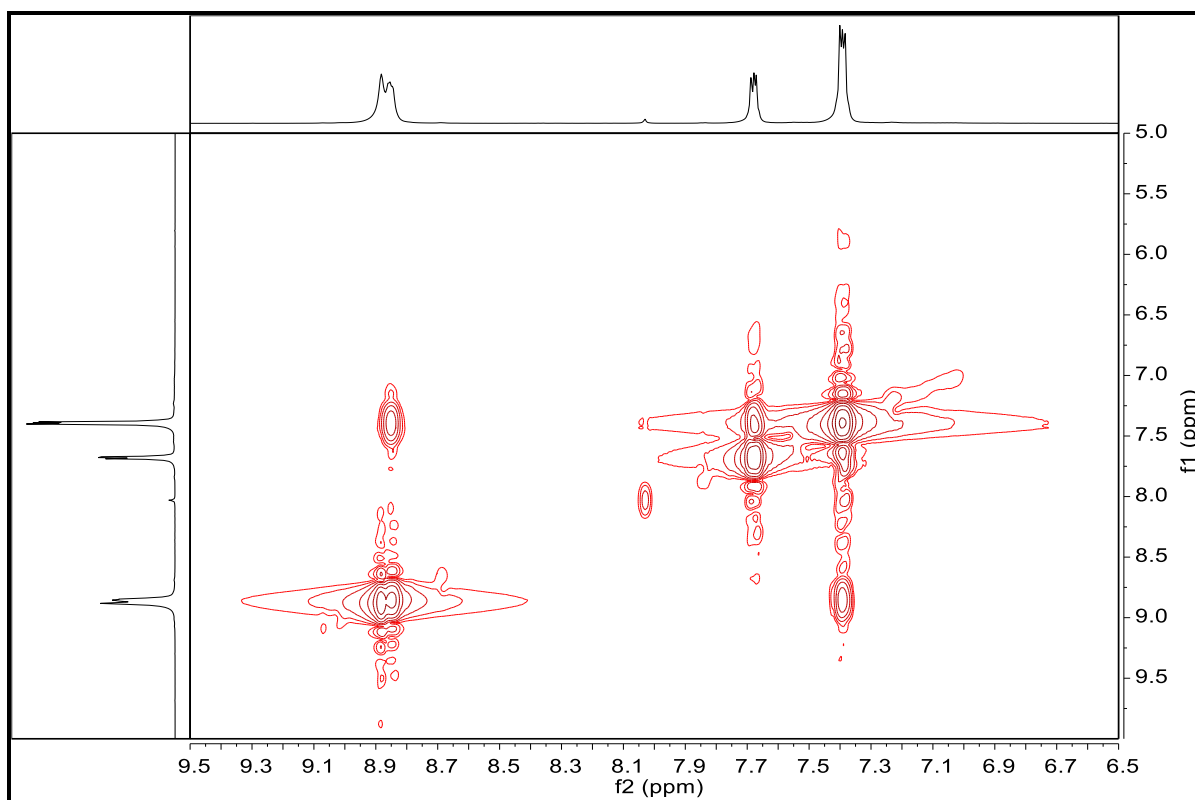
Σχήμα ΙΙ.2. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR σε διαλύτη DMF-d<sub>7</sub> (500 MHz).



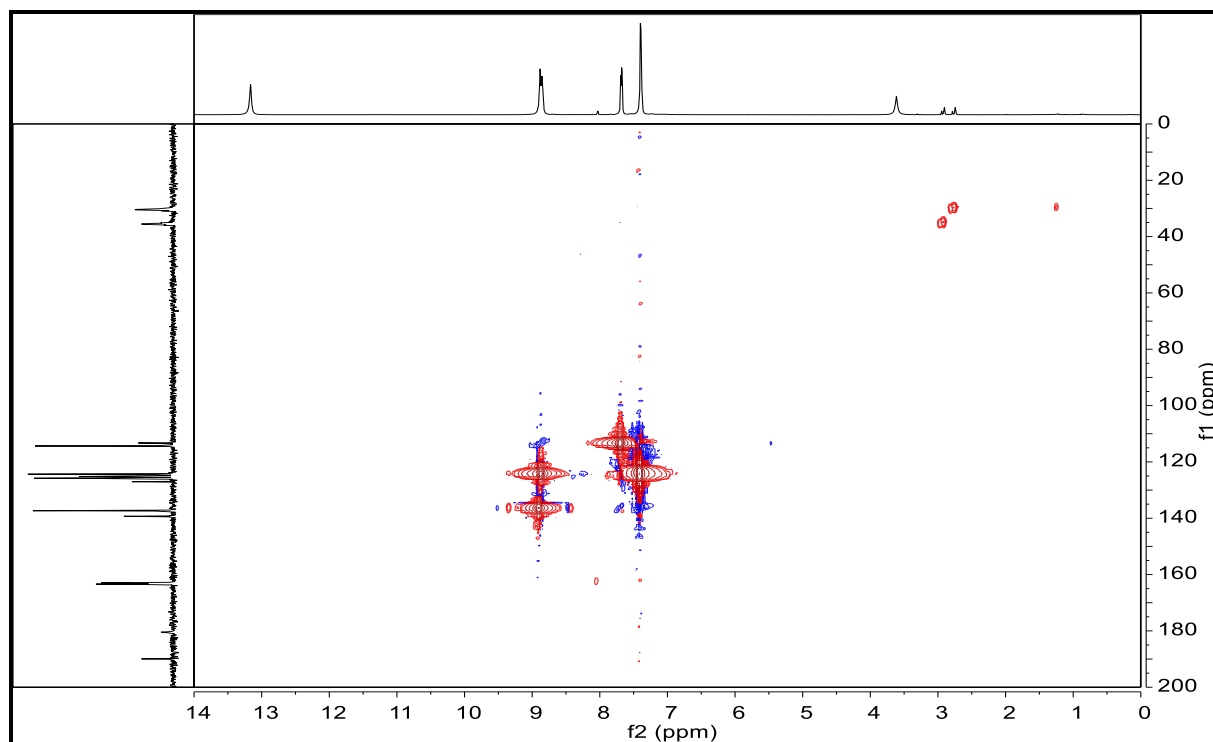
Σχήμα II.3. Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR σε διαλύτη DMF-d7 (126 MHz).



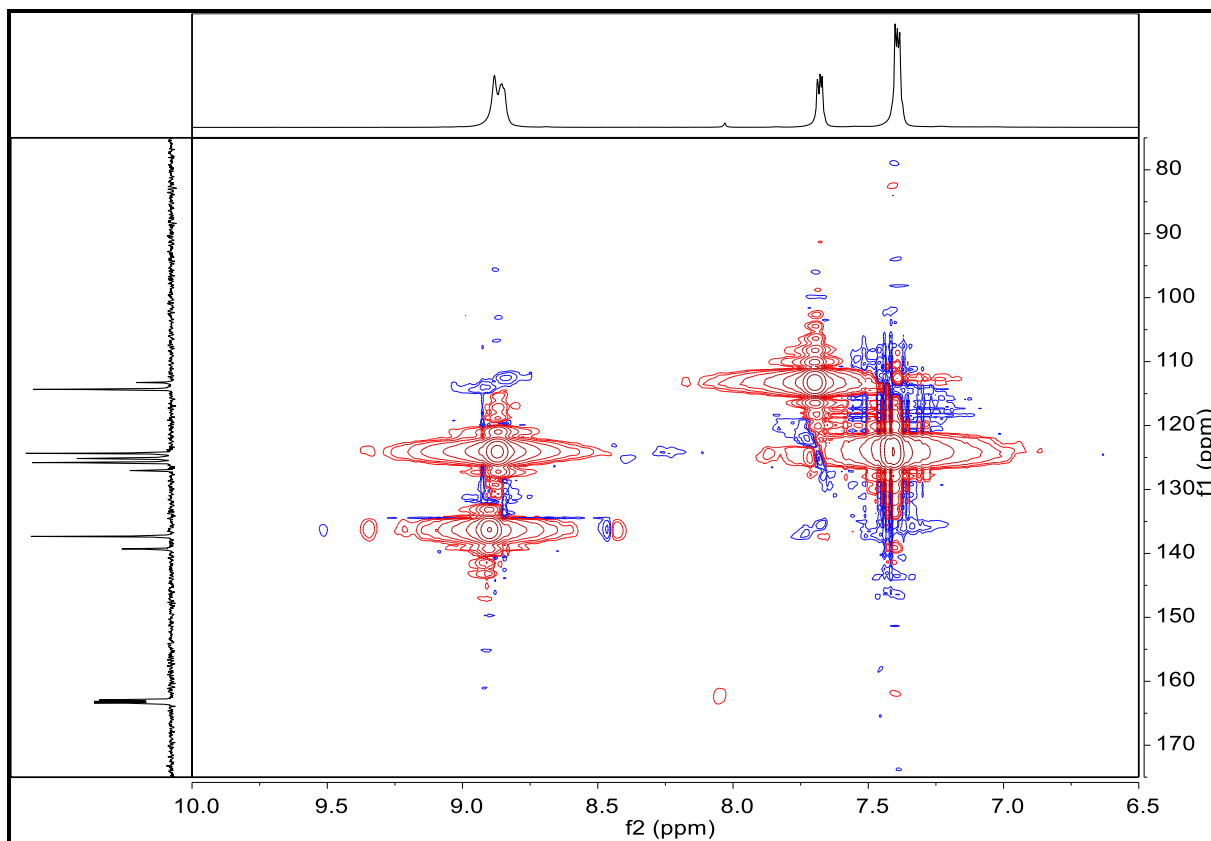
Σχήμα II.4. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με πρωτόνιο (COSY – 500 MHz).



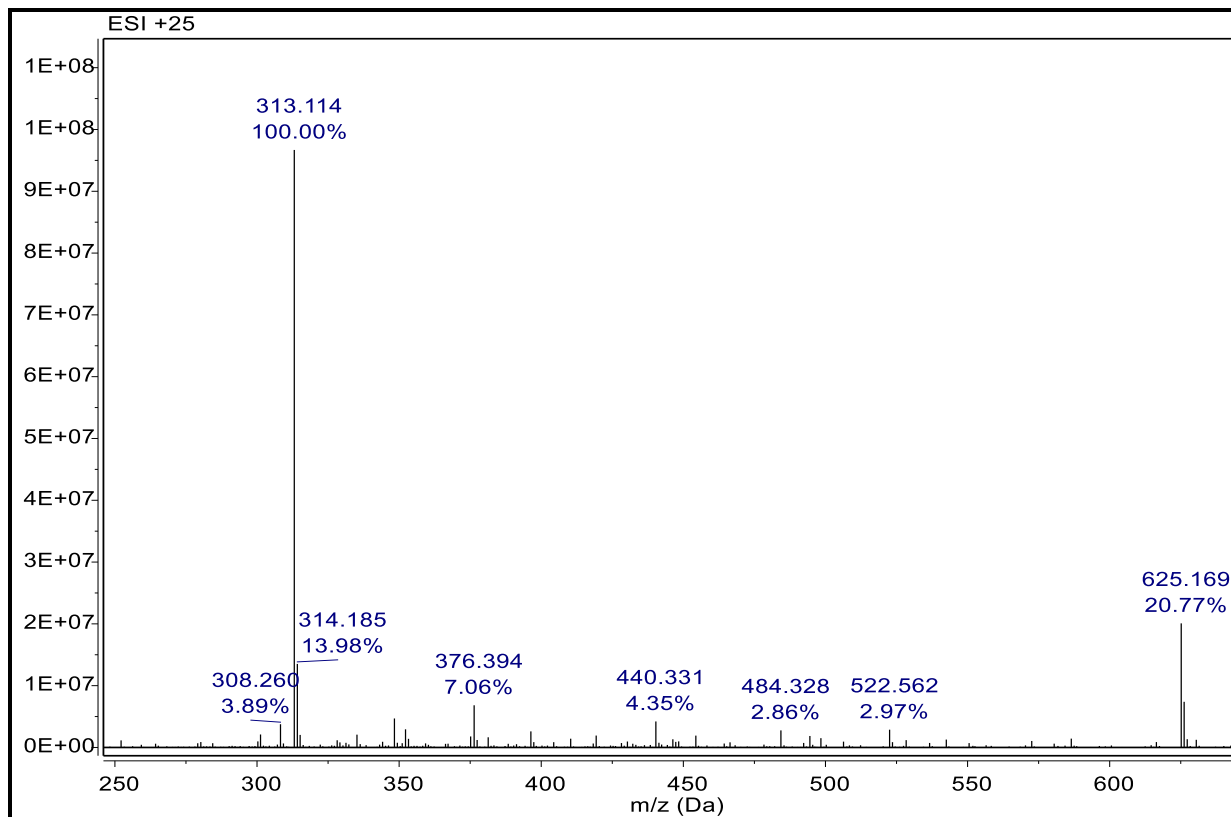
Σχήμα II.5. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με πρωτόνιο σε μεγέθυνση.



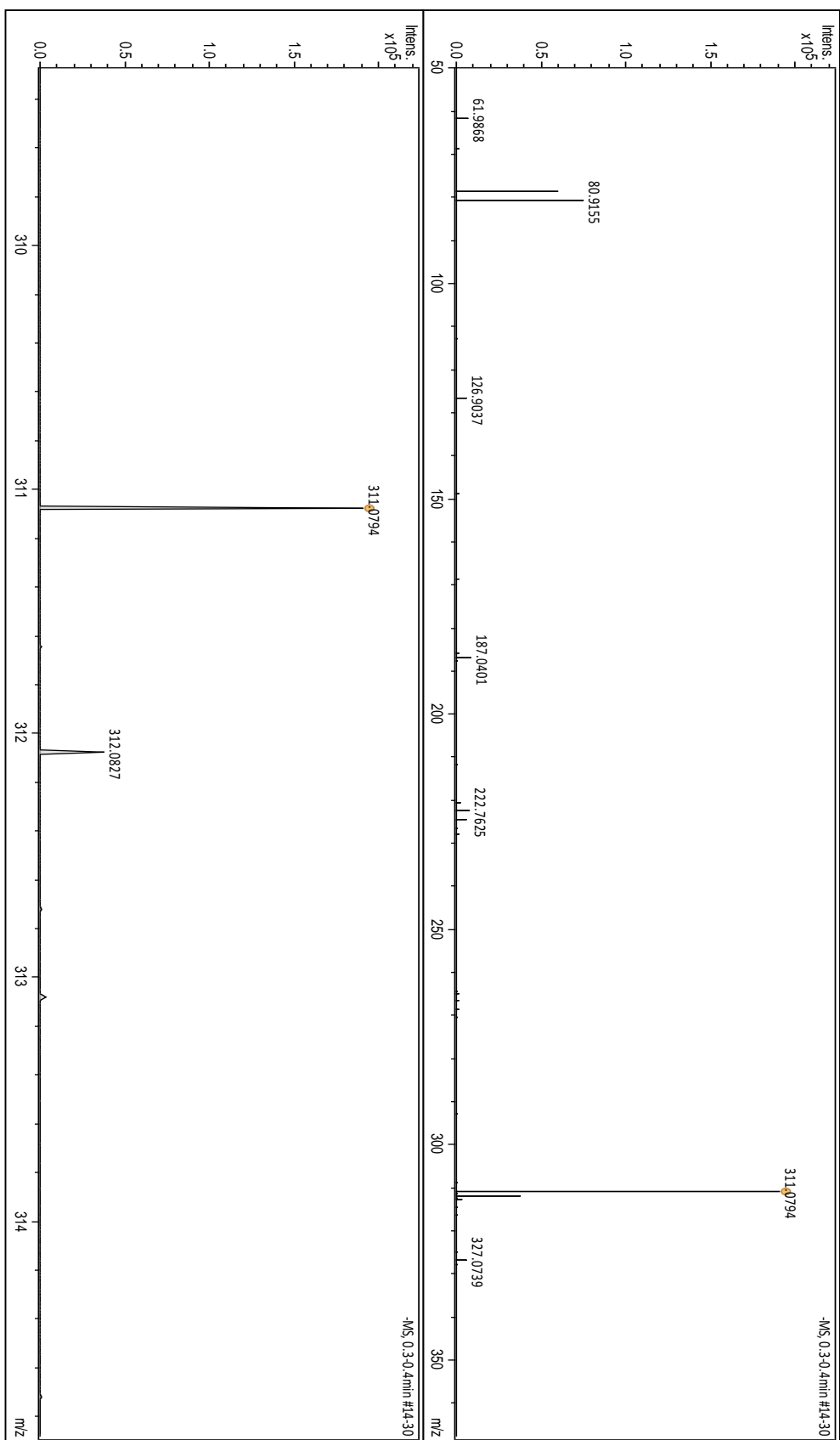
Σχήμα II.6. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με άνθρακα (HSQC – 500 / 126 MHz).  
 [Με κόκκινο συμβολίζονται οι πρωτοταγείς και τριτοταγείς άνθρακες ( $\text{CH}_3$  &  $\text{CH}$ ), ενώ με μπλε οι δευτεροταγείς ( $\text{CH}_2$ ).



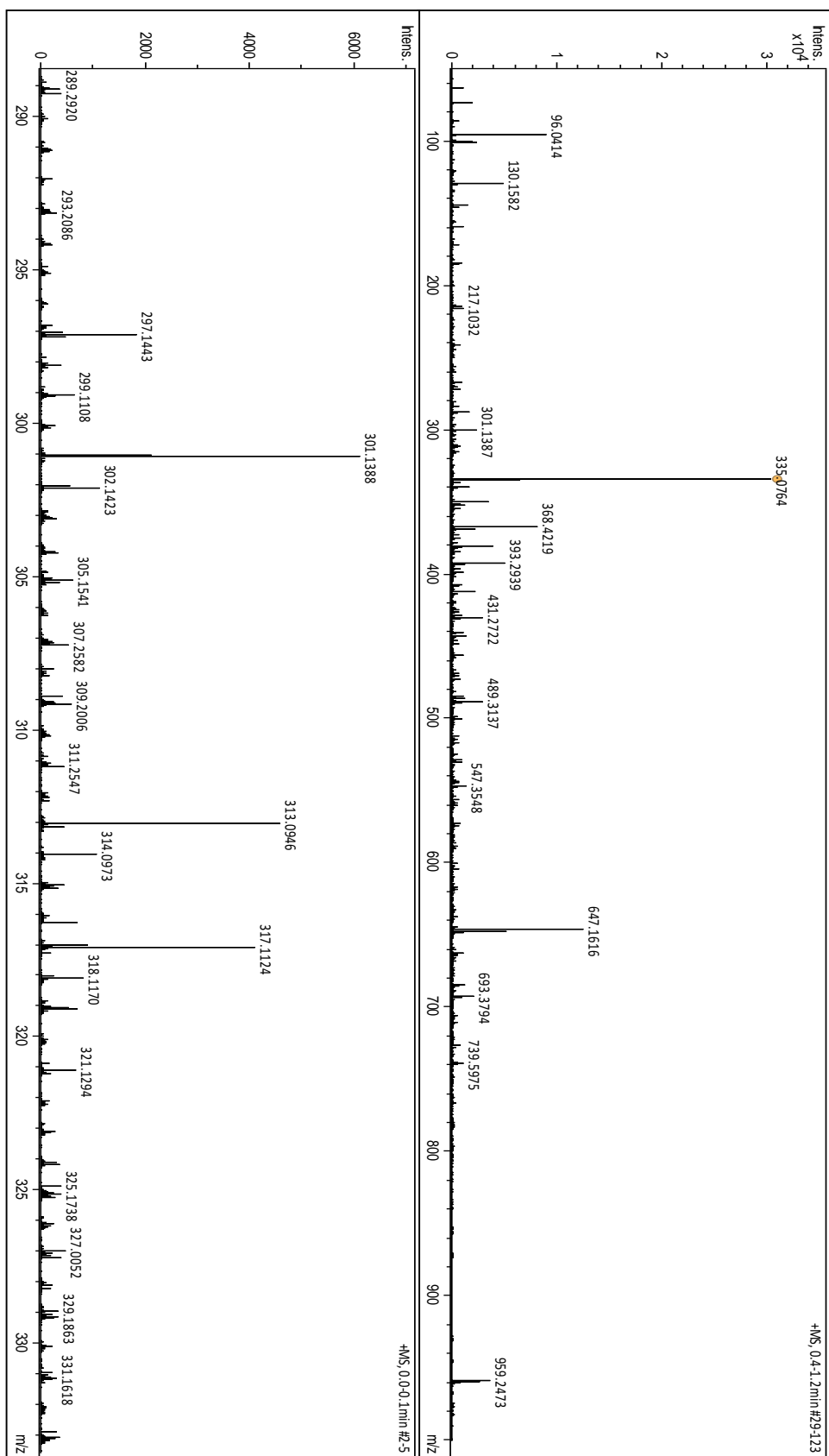
Σχήμα II.7. Φάσμα NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πρωτονίου με άνθρακα σε μεγέθυνση.



Σχήμα II.8. Φάσμα μάζας (MS), ESI +, κύριο ιόν  $M+H$ .

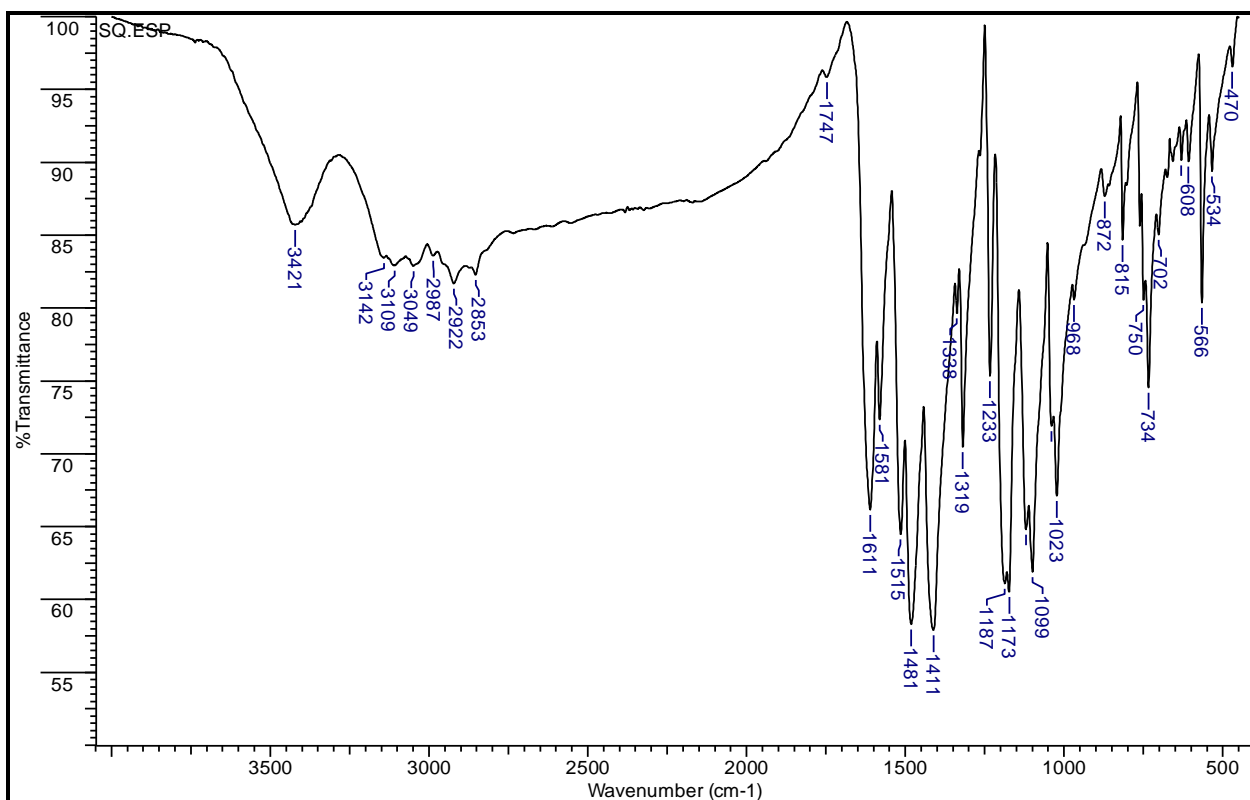


Σχήμα II.9. Φάσμα μάζας (HRMS), ESI – , κύριο ιόν M–H.



Σχήμα II.10. Φάσμα μάζας (HRMS), ESI + , κύριο ιόν M+Na, λοιπά ιόντα M+H, 2M+H, 3M+H.

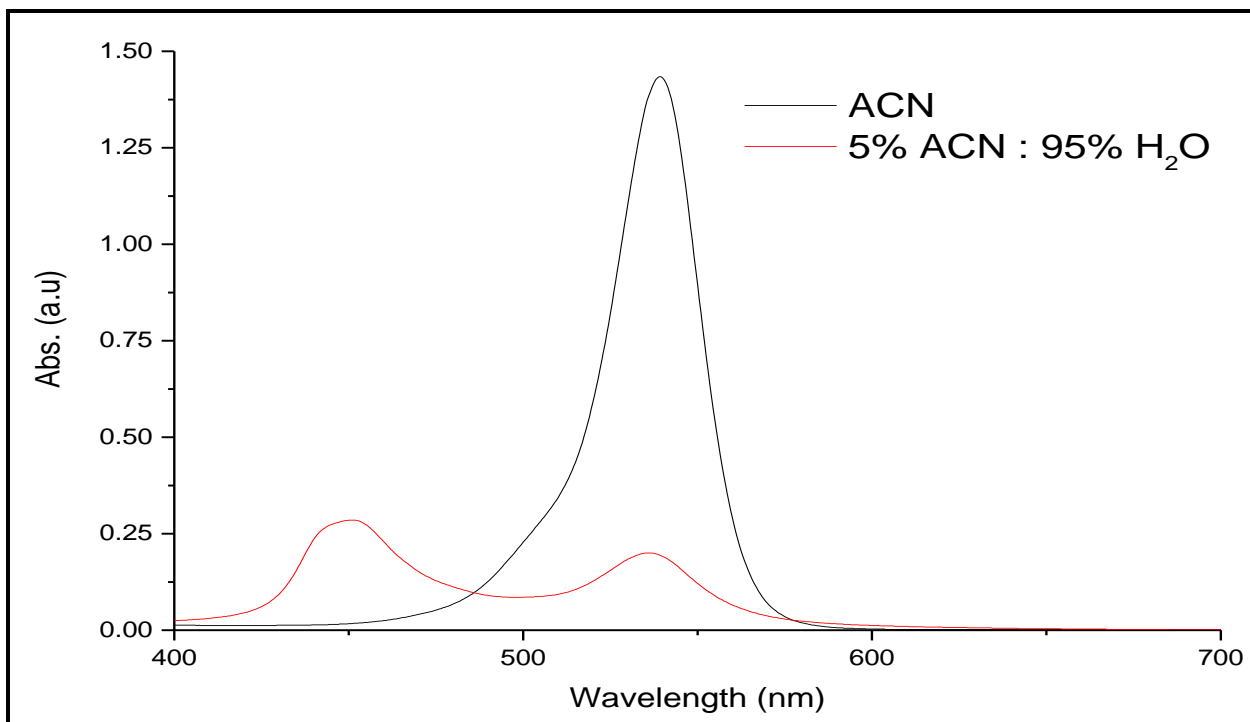




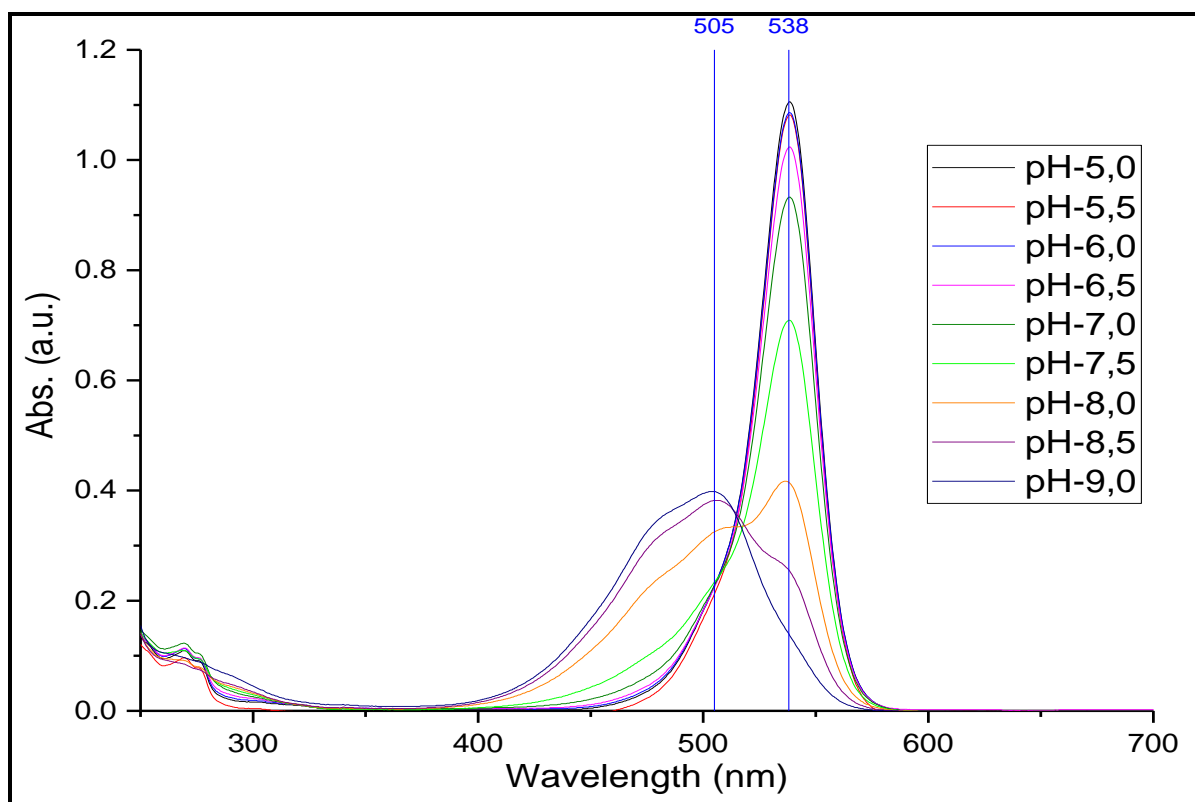
Σχήμα II.11. Τυπικό φάσμα απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) της Sq.

Πίνακας II.1. Κορυφές απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) της Sq.

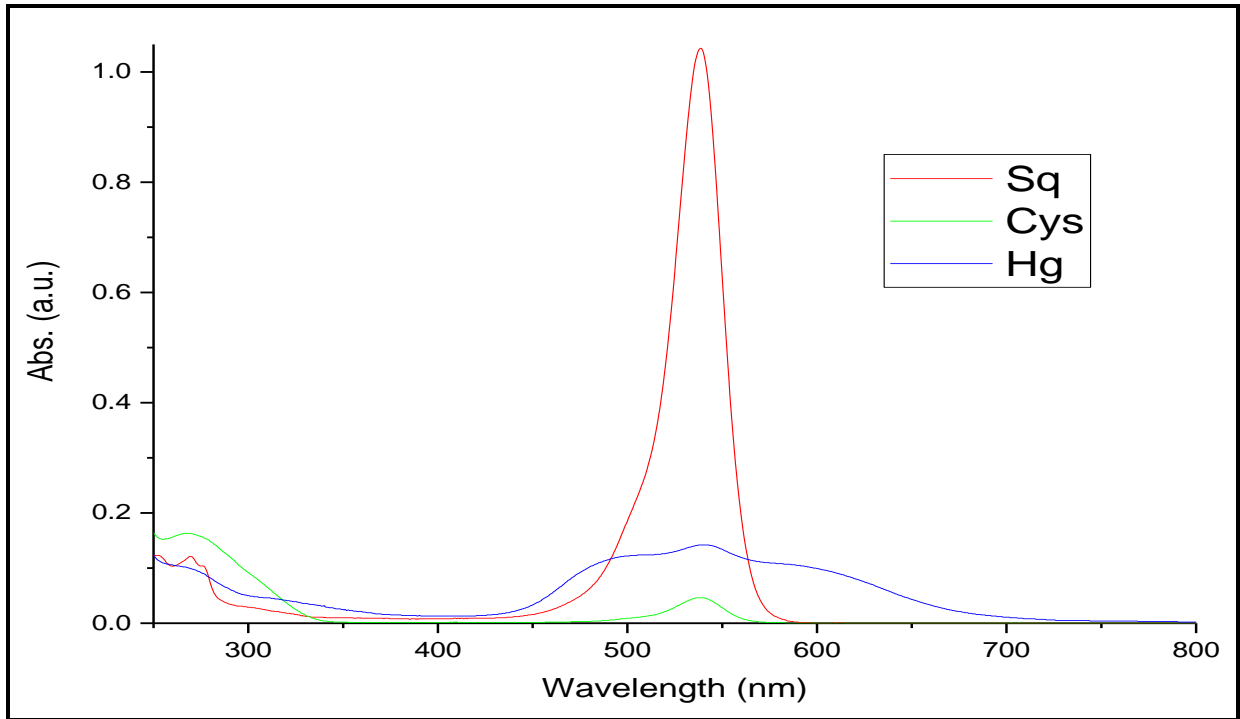
cm <sup>-1</sup>	Ένταση	cm <sup>-1</sup>	Ένταση	cm <sup>-1</sup>	Ένταση
470	VW	1023	S	1515	S
534	W	1039	S	1581	S
566	M	1099	VS	1611	S
608	W	1120	S	1747	VW
631	W	1173	VS	2853	M
702	M	1187	VS	2922	M
734	S	1233	M	2987	M
750	M	1319	S	3049	M
815	M	1338	M	3109	M
872	W	1411	VS	3142	M
968	M	1481	VS	3421	M



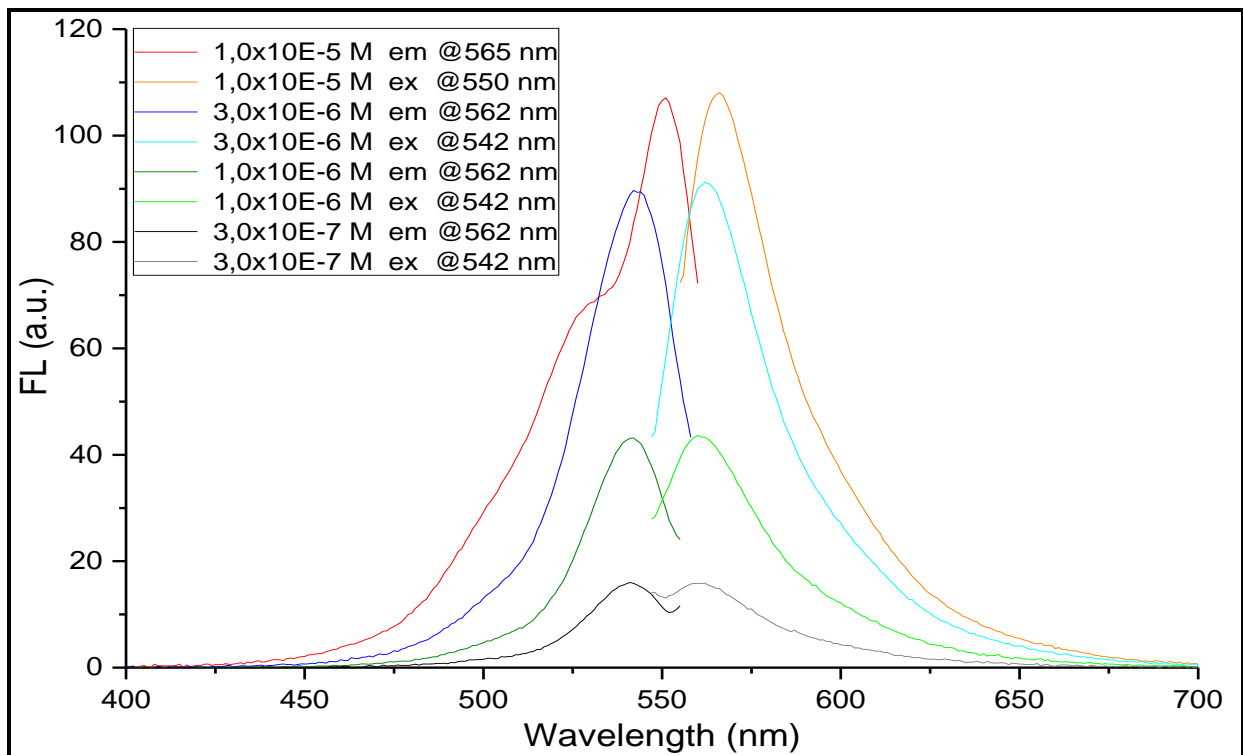
Σχήμα II.12. Τυπικό φάσμα απορρόφησης ορατού–υπεριώδους της Sg σε ακετονιτρίλιο και σε μίγμα ακετονιτρίλιου νερού όπου είναι αισθητή η εμφάνιση συσσωματωμάτων της χρωστικής.



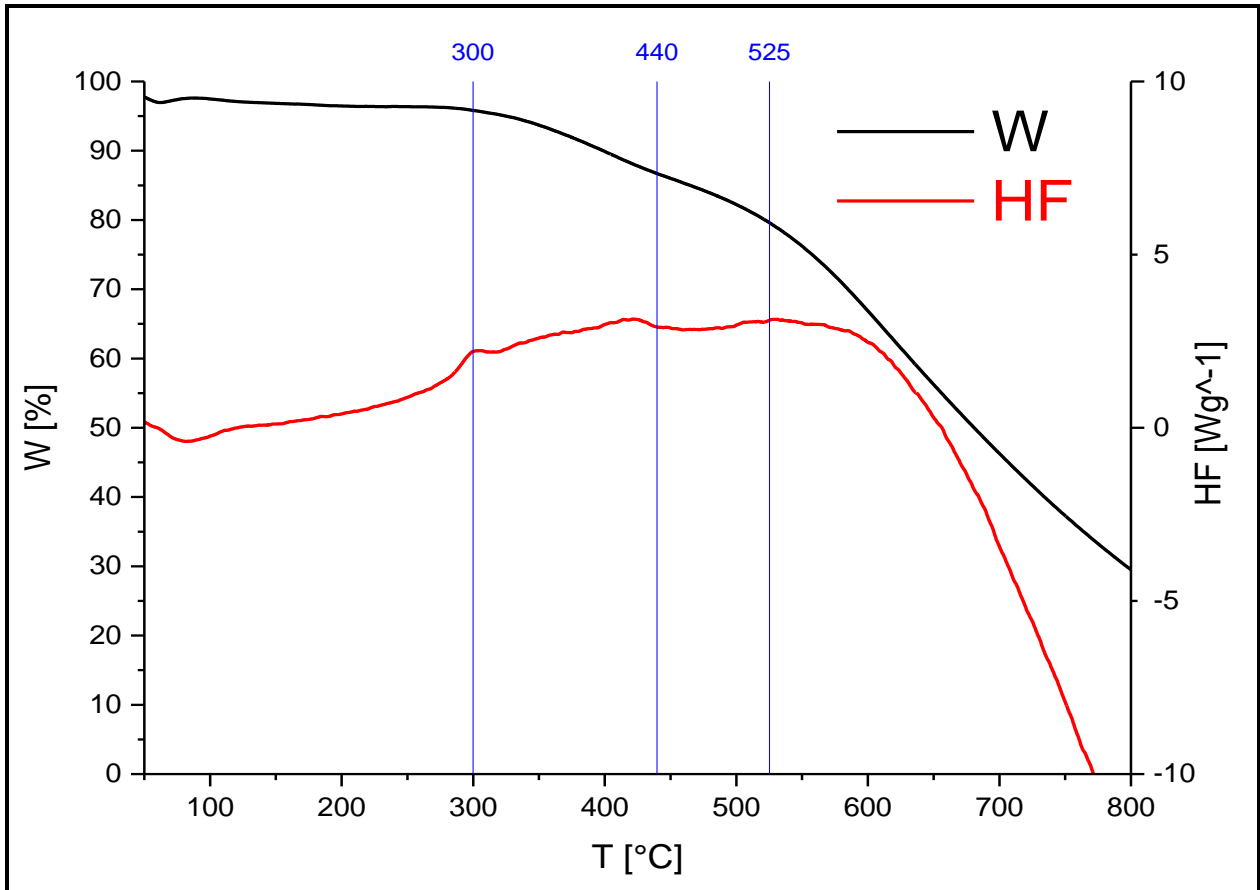
Σχήμα II.13. Επίδραση της τιμής του pH στο φάσμα απορρόφησης της Sg.



Σχήμα II.14. Φάσμα απορρόφησης της Sq σε σύγκριση με τα φάσματα απορρόφησης της Sq μετά την προσθήκη κυστεΐνης και χλωριούχου υδραργύρου αντίστοιχα.



Σχήμα II.15. Τυπικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής της Sq, σε ακετονιτρίλιο, σε συγκεντρώσεις από  $3,0 \times 10^{-7}$  έως  $1,0 \times 10^{-5}$  M.



Σχήμα II.16. Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης. [W = μάζα, HF = ροή θερμότητας, T = θερμοκρασία].

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Li, X., Gao, X., Shi, W. and Ma, H., *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 590-659.
2. Zhu, X., Lin, Q., Lou, J.-C., Lu, T.-T., Zhang, Y.-M. and Wei, T.-B., *New J. Chem.*, 2015, **39**, 7206-7210.
3. Su, M., Liu, Y., Ma, H., Ma, Q., Wang, Z., Yang, J. and Wang, M., *Chem. Commun.*, 2001, 960-961.
4. Wiskur, S. L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J. J. and Anslyn, E. V., *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 963-972.
5. Xue, L., Liu, Q. and Jiang, H., *Org. Lett.*, 2009, **11**, 3454-3457.
6. Chen, X., Sun, M. and Ma, H., *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 477-489.
7. Ajayaghosh, A., *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 449-459.
8. Sprenger, H. E. and Ziegenbein, W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1966, **5**, 894-894.
9. Sreejith, S., Carol, P., Chithra, P. and Ajayaghosh, A., *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 264-274.
10. Ros-Lis, J. V., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Spieles, M. and Rurack, K., *Chemistry – A European Journal*, 2008, **14**, 10101-10114.
11. Isgor, Y. G. and Akkaya, E. U., *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 7417-7420.
12. Snee, P. T., Somers, R. C., Nair, G., Zimmer, J. P., Bawendi, M. G. and Nocera, D. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13320-13321.
13. Oguz, U. and Akkaya, E. U., *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 5857-5860.
14. Chenthamarakshan, C. R. and Ajayaghosh, A., *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1795-1798.
15. Akkaya, E. U. and Turkyilmaz, S., *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 4513-4516.
16. Ajayaghosh, A., Arunkumar, E. and Daub, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 1766-1769.

17. Arunkumar, E., Chithra, P. and Ajayaghosh, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6590-6598.
18. Ros-Lis, J. V., Martinez-Manez, R. and Soto, J., *Chem. Commun.*, 2002, 2248-2249.
19. Ros-Lis, J. V., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Rurack, K. and Soto, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 4405-4407.
20. Ros-Lis, J. V., García, B., Jiménez, D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., Gonzalvo, F. and Valdecabres, M. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4064-4065.
21. Hewage, H. S. and Anslyn, E. V., *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 13099-13106.
22. Yan, Z., Guang, S., Xu, H. and Liu, X., *Analyst*, 2011, **136**, 1916-1921.
23. Fan, J., Wang, Z., Zhu, H. and Fu, N., *Sensors Actuators B: Chem.*, 2013, **188**, 886-893.
24. Liu, X.-D., Sun, R., Ge, J.-F., Xu, Y.-J., Xu, Y. and Lu, J.-M., *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, **11**, 4258-4264.
25. Shin, I.-S., Gwon, S.-Y. and Kim, S.-H., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, **120**, 642-645.
26. Liu, T., Huo, F., Yin, C., Li, J. and Niu, L., *RSC Advances*, 2015, **5**, 28713-28716.
27. Gerardi, R. D., Barnett, N. W. and Lewis, S. W., *Anal. Chim. Acta*, 1999, **378**, 1-41.
28. Pefkianakis, E. K., Christodouleas, D., Giokas, D. L., Papadopoulos, K. and Vougioukalakis, G. C., *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2013, **2013**, 4628-4635.
29. McDermott, G. P., Jones, P., Barnett, N. W., Donaldson, D. N. and Francis, P. S., *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 5453-5457.
30. Treibs, A. and Kreuzer, F.-H., *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1968, **718**, 208-223.
31. Atilgan, N., Algi, F., Önal, A. M. and Cihaner, A., *Tetrahedron*, 2009, **65**, 5776-5781.
32. Sekiya, M., Umezawa, K., Sato, A., Citterio, D. and Suzuki, K., *Chem. Commun.*, 2009, 3047-3049.
33. Tserng, K.-Y. and Bauer, L., *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 172-175.
34. Miyaura, N., Yamada, K. and Suzuki, A., *Tetrahedron Lett.*, 1979, **20**, 3437-3440.

35. Miyaura, N. and Suzuki, A., Chem. Rev., 1995, **95**, 2457-2483.
36. Miyaura, N. and Suzuki, A., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1979, 866-867.
37. Shimadzu UV-1800, <http://www.shimadzu.com/an/spectro/uv/uv1800/uv.html>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
38. RF-5301PC Spectrofluorophotometer, <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=rf5301>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
39. Shimadzu IRAffinity-1, [http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/spectroscopy/iraffinity\\_brochure\\_b.pdf](http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/spectroscopy/iraffinity_brochure_b.pdf), (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
40. PerkinElmer Spectrum One FT-IR, [http://shop.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/SpecificationSheets/spc\\_spectrumone\\_eftir.pdf](http://shop.perkinelmer.com/Content/RelatedMaterials/SpecificationSheets/spc_spectrumone_eftir.pdf), (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
41. Nicolet FT-IR Spectrometer, <http://public.hofstragroup.com/3971.pdf>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
42. Bruker Avance III, <https://www.bruker.com/products/mr/nmr/technical-details.html>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
43. Thermo MSQ Plus, <http://www.thermoscientific.com/en/product/msq-plus-single-quadrupole-mass-spectrometer.html>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
44. Bruker Maxis Impact, <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/lc-ms/o-tof/maxis-ii/overview.html>, (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
45. Mettler Toledo – TGA, [http://us.mt.com/us/en/home/products/Laboratory\\_Analytics\\_Browse/TA\\_Family\\_Browse/TGA.html](http://us.mt.com/us/en/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/TA_Family_Browse/TGA.html), (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
46. Camag Linomat 5, [http://www.camag.com/en/tlc\\_hptlc/products/sample\\_application/linomat\\_5.cfm](http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/sample_application/linomat_5.cfm), (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος, 2015).
47. Avirah, R. R., Jyothish, K. and Ramaiah, D., Org. Lett., 2007, **9**, 121-124.
48. Dontula, P., Macosko, C. W. and Scriven, L. E., AIChE J., 1998, **44**, 1247-1255.

49. Gu, J., Anumala, U. R., Heyny-von Haußen, R., Hölzer, J., Goetschy-Meyer, V., Mall, G., Hilger, I., Czech, C. and Schmidt, B., *ChemMedChem*, 2013, **8**, 891-897.
50. Terpetschnig, E. and Lakowicz, J. R., *Dyes and Pigments*, 1993, **21**, 227-234.
51. Vogel, A. I. and Furniss, B. S., *Vogel's textbook of practical organic chemistry*; Longman, 1989.
52. Timberlake, K. C., *Chemistry: An Introduction to General, Organic, and Biological Chemistry*; Pearson Education, 2014.
53. Hill, Z. D. and MacCarthy, P., *J. Chem. Educ.*, 1986, **63**, 162.
54. Κουππάρης, Μ. Α., Σημειώσεις "Επικύρωση / Επαλήθευση Αναλυτικών Μεθόδων", Διαπανεπιστημιακό Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας, 2012.
55. Κωστάκης, Μ., Θωμαΐδης, Ν. and Κουππάρης, Μ. Α., Σημειώσεις "Εκτίμηση Αβεβαιότητας στις Χημικές Μετρήσεις", Διαπανεπιστημιακό Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας, 2013.
56. Riddles, P. W., Blakeley, R. L. and Zerner, B., *Anal. Biochem.*, 1979, **94**, 75-81.
57. Ellman, G. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **82**, 70-77.
58. Ellman, G. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **74**, 443-450.
59. Özyürek, M., Baki, S., Güngör, N., Çelik, S. E., Güçlü, K. and Apak, R., *Anal. Chim. Acta*, 2012, **750**, 173-181.



