
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και Μελέτη Φθορισμομετρικού Προφίλ Θειούχων
Άκυκλων Δεικτών Ιόντων Υδραργύρου**

ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΤΣΙΚΡΙΤΖΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

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

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

MASTER'S THESIS

**Synthesis and Fluorimetric Profile Study of Acyclic Sulphide
Indicators for Mercury Ions**

ATHANASIA TSIKRITZI

SUPERVISOR: Prof. H. E. KATERINOPOULOS

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

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CRETE, GREECE

JUNE 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ορφανόπουλος Μιχαήλ

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε τόσο σε προπτυχιακό όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

Βαθύτατες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο, ο οποίος με την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου, μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία, δίνοντας μου μια θέση στην ερευνητική του ομάδα και καθοδηγώντας με από την αρχή ως το τέλος της συνεργασίας μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Μ. Ορφανόπουλο και κ. Ε. Στρατάκη για τον συμβουλευτικό τους ρόλο ως μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

Ένα πάρα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην αγαπημένη φίλη και υποψήφια διδάκτορα Σοφία Γεωργιλαδάκη για την αμέριστη βοήθεια της, συμπαράσταση και το τόσο μεγάλο ενδιαφέρον που μου έδειξε, με το να είναι συνέχεια δίπλα μου, καθώς επίσης και στη Γεωργία Μενούνου για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί από την αρχή ως το τέλος. Δεν μπορώ να ξεχάσω επίσης τον Κυριακό Τόκα και την Ιωάννα Φίλιππα για την άψογη συνεργασία μας, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου παλιά και νέα. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους πολυαγαπημένους μου φίλους Μαρία Τσεμπερούλη και Γιάννη Τίτιλα για τις τόσο ωραίες στιγμές που περάσαμε μαζί από την πρώτη κιόλας μέρα που βρεθήκαμε στο τμήμα Χημείας. Ένα τεράστιο και αμέριστο ευχαριστώ οφείλω στον συμπαραστάτη της ζωής μου Γεώργιο Δημητρακάκη που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζει. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μανώλη Κλώντζα από το εργαστήριο υπολογιστικής χημείας του καθηγητή κ. Γ. Φρουδάκη που πραγματοποίησε ορισμένες υπολογιστικές μελέτες.

Τέλος ευχαριστώ από καρδιάς την πολυαγαπημένη μου οικογένεια, τους γονείς μου, Γεώργιο και Ελένη Τσικριτζή, που είναι πάντα δίπλα μου, με αγάπη, υπομονή και κατανόηση για να με στηρίζουν σε όλα μου τα βήματα, από τα πιο μικρά έως τα πιο μεγάλα. Τα αδέρφια μου Μαρία και Δημήτρη Τσικριτζή που χωρίς την αγάπη τους και την συμπαράστασή τους όλα θα ήταν τόσο διαφορετικά... Και φυσικά ευχαριστώ το γαμπρό μου Δημήτρη Ντιγκάκη και τα ανιψάκια μου Μανώλη και Ελευθερία που με τα χαμόγελά τους ο κόσμος φαίνεται καλύτερος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	II
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	III
CURRICULUM VITAE	V
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VII
ABSTRACT	VIII
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΧΟΛΙΟ	1
A.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	1
A.3 ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ	3
B. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ	5
B.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	5
B.2 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	6
B.3 ΤΡΟΠΟΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.....	9
<i>B.3.1 Δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίου (photoinduced electron transfer (PET) indicators)</i>	9
<i>B.3.2 Δείκτες μεταφοράς φορτίου (photoinduced charge transfer (PCT) indicators)</i>	10
Γ. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ	12
Γ.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΩΜΟΦΟΡΟΥ	12
Γ.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΗΛΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ (ΙΟΝΟΦΟΡΟ)	13
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	15
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	39
ΣΤ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR	49
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΑΣ	55
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Αθανασία Τσικριτζή

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΟΙΚΙΑΣ Ιφιγενείας 4, Ηράκλειο Κρήτης, 71304, Ελλάδα

ΤΗΛΕΦΩΝΟ 2815000239 6976393678

E-MAIL athatsik@yahoo.gr

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ 14/04/1990

ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Ιούλιος 2012- Σεπτέμβριος 2012
Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης
“Μέτρηση των επιπέδων Φαρμάκων στο πλάσμα ασθενών”
- Φεβρουάριος 2013- Ιούνιος 2013
Εργαστηριακή βοήθος στα προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας II
- Σεπτέμβριος 2013- Δεκέμβριος 2013
Εργαστηριακή βοήθος στα προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας I

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- Σεπτέμβριος 2012- Σήμερα
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην “Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων”, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης
- Σεπτέμβριος 2008- Σεπτέμβριος 2012
Πτυχίο Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης
- Οκτώβριος 2011- Ιούνιος 2012
Διπλωματική Εργασία “Φασματοσκοπία FT-IR για το χαρακτηρισμό λίθων νεφρών και φαρμάκων σε μορφή δισκίων”, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης
- Σεπτέμβριος 2005- Ιούνιος 2008
Ολοκλήρωση Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα Ελληνικά

Λοιπές γλώσσες

Αγγλικά

ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
B2	B2	B2	B2	B2

Certificate of Competency in English (Michigan) and London Tests of English (Edexcel).

- Επικοινωνιακές δεξιότητες
Άριστες επικοινωνιακές δεξιότητες που αποκτήθηκαν ως μέλος ερευνητικής ομάδας

- Επαγγελματικές δεξιότητες
- Άριστος χειρισμός οργάνων φασματοσκοπίας: Υπερύθρου (FT-IR), Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)
 - Άριστος χειρισμός οργάνων ανάλυσης: Αέρια Χρωματογραφία/Μάζας (GC/MS)

- Δεξιότητες πληροφορικής
- Καλός χειρισμός των εργαλείων Microsoft Office® (Word, Excel, Power Point, Outlook)
 - Πολύ καλή γνώση εξειδικευμένων προγραμμάτων Φασματοσκοπίας (Topspin, Mestrec, Omnic, GC/MS Postrun Analysis)
 - Πολύ καλή γνώση προγραμμάτων ανάλυσης (Origin Lab, Chem Draw, Lab view)

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Προγράμματα
- Χρηματοδότηση Ερευνητικής Πρότασης με τίτλο: “Σύνθεση Τετραθεία-Μακροκυκλικών Φθοριζόντων Δεικτών εκλεκτικών για τα ιόντα Υδραργύρου” (Ηράκλειο, 2013)
- Συνέδρια
- Συμμετοχή στο 1^ο Συνέδριο Chain Reaction με θέμα “Φυσικές επιστήμες και Διερευνητική Μάθηση στη Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση”
- Σεμινάρια
- Συμμετοχή στην ημερίδα “Ημέρες γνωριμίας με το Πανεπιστήμιο Κρήτης” (Ηράκλειο, 2014)

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION **Athanasia Tsikritzi**

HOME ADDRESS 4 Iphigenia's str., Heraklion Crete, 71304, Greece

PHONE 2815000239 6976393678

E-MAIL athatsik@yahoo.gr

DATE OF BIRTH 14/04/1990

CITIZENSHIP Greek

WORK EXPERIENCE

July 2012-
September 2012

- Clinical Pharmacology Laboratory, General University Hospital of Heraklion "Measuring drug levels in patients' blood plasma"

February 2013-
June 2013

- Teaching Assistant, Undergraduate Laboratory of Organic Chemistry II

September 2013-
December 2013

- Teaching Assistant, Undergraduate Laboratory of Organic Chemistry I

EDUCATION AND TRAINING

September 2012-
Today

- M.Sc., Department of Chemistry, University of Crete, Greece

September 2008-
September 2012

- B.Sc., Department of Chemistry, University of Crete, Greece

October 2011-
June 2012

- B. Sc. Thesis "Kidney stones and pill drugs characterization using FT-IR spectroscopy techniques", Department of Chemistry, Analytical Chemistry Laboratory, University of Crete

September 2005-
June 2008

- Secondary Education

PERSONAL SKILLS

Mother tongue Greek

Other language

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	B2	B2	B2	B2	B2

Certificate of Competency in English (Michigan) and London Tests of English (Edexcel).

Communication skills

- Excellent communication skills acquired through working and interacting as a research group member

Technical skills

- Extended experience in operating spectroscopy instruments: Infrared (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
- Experienced user of analysis instruments: Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS)

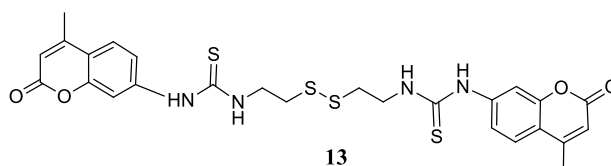
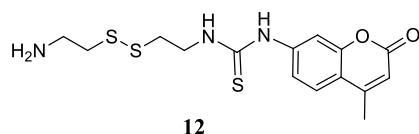
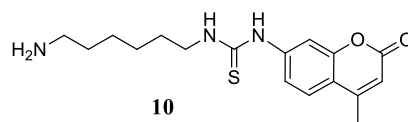
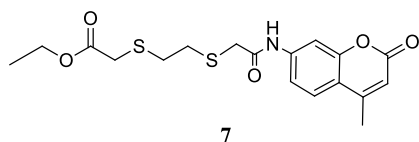
- Computer skills**
- Advanced user of Microsoft Office® tools package (Word, Excel, Power Point, Outlook)
 - Experienced user of specialized spectroscopy programs (Topspin, Mestrec, Omnic, GC/MS Postrun Analysis)
 - Advanced user of analysis software (Origin Lab, Chem Draw, Lab view)

ADDITIONAL INFORMATION

- Research Projects**
- Special Research Account Committee funding for the Research Proposal titled: “Synthesis of Tetrasulfur-Macrocycles Fluorescent Probes with high Selectivity to Mercury Ions” (Heraklion, 2013)
- Conferences**
- Participation in the 1st Chain Reaction Workshop entitled: “Physical Sciences and Secondary Education Learning”
- Seminars**
- Participation in the “Meeting with the University of Crete” seminar (Heraklion, 2014)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία περιλαμβάνει την σύνθεση και τη φθορισμομετρική μελέτη τεσσάρων φθορισμομετρικών δεικτών επιλεκτικών ως προς τα βαρέα μέταλλα. Οι δείκτες οι οποίοι συντέθηκαν είναι οι δείκτες **7**, **10**, **12** και **13**, με τις ακόλουθες δομές:



Στη συνέχεια εξετάστηκε η επιλεκτικότητα των δεικτών αυτών ως προς διάφορα μεταλλικά ιόντα τα οποία απαντώνται σε βιολογικά συστήματα (K^+ , Na^+ , Pd^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} κ.α). Ο δείκτης **10** εμφανίζει, έναντι των υπολοίπων, τη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για το δισθενές ιόν του υδραργύρου (Hg^{2+}) το οποίο ήταν και ο βασικός αναλυτικός στόχος του έργου.

Ο δείκτης **7** δεν εμφανίζει επιλεκτικότητα ως προς το ιόν Hg^{2+} και συμπεριφέρεται σαν “turn-off”, με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 335 nm και λ_{em} : 395 nm, αντίστοιχα, και τιμή $K_d= 37.58\mu M$ για το Hg^{2+} .

Ο δείκτης **10**, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Hg^{2+} παρουσιάζει αύξηση της σχετικής έντασης φθορισμού, δηλαδή “turn-on” συμπεριφορά με μέγιστο μήκος διέγερσης και εκπομπής λ_{exc} : 337 nm και λ_{em} : 409 nm αντίστοιχα και τιμή $K_d= 10.17\mu M$ για το Hg^{2+} . Ο δείκτης συμπεριφέρεται ως “turn-off” παρουσία όλων των άλλων ιόντων.

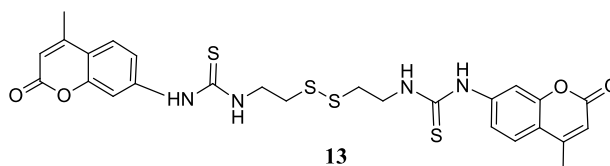
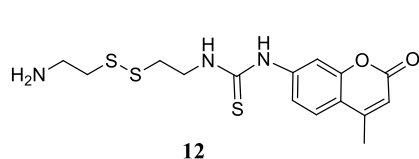
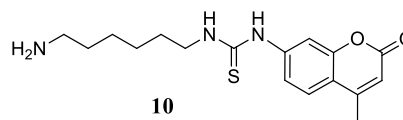
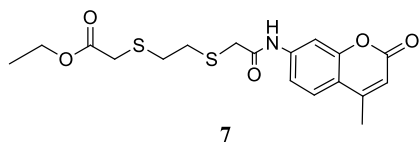
Ο δείκτης **12** αποκρίνεται θετικά στο ιόν του Hg^{2+} (“turn-on”) με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 337 nm και λ_{em} : 407 nm αντίστοιχα και τιμή $K_d= 22.33\mu M$.

Τέλος, ο δείκτης **13** παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Hg^{2+} παρουσιάζει αύξηση της σχετικής έντασης φθορισμού (“turn-on”), με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 342 nm και λ_{em} : 412 nm αντίστοιχα και τιμή $K_d= 179.70\mu M$.

Συμπερασματικά, από την ομάδα των δεικτών που μελετήθηκαν, ο καταλληλότερος δείκτης για την μέτρηση ιόντων Hg^{2+} σε βιολογικά συστήματα είναι ο δείκτης **10**.

ABSTRACT

This research project involves the synthesis and spectral profile study of four fluorometric indicators with specificity for heavy metals. The synthesized sensors are compounds **7**, **10**, **12** and **13**, with the following structures:



Ion-selectivity studies of these sensors in the presence of various biological metal ions such as K^+ , Na^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{2+} indicated that sensor **10** displays greater selectivity for divalent mercury (Hg^{2+}) which was the main target ion in this work.

Sensor **7** shows no selectivity for Hg^{2+} ions and behaves as “turn-off”, with excitation and emission wavelength maxima at λ_{exc} : 335 nm and λ_{em} : 395 nm, respectively, and a dissociation constant value $K_d = 37.58 \mu M$ for Hg^{2+} .

Sensor **10**, in the presence of increasing Hg^{2+} ion concentrations, exhibits an increase in relative fluorescence intensity, i.e. a “turn-on” behavior, with excitation and emission maxima at λ_{exc} : 337 nm and λ_{em} : 409 nm, respectively, and a dissociation constant value of $K_d = 10.17 \mu M$ for Hg^{2+} . In the presence of the rest biological ions compound **10** functions as a “turn-off” sensor.

Sensor **12** exhibits a positive response to the presence of Hg^{2+} ions (“turn-on”) with excitation and emission maxima at λ_{exc} : 337 nm and λ_{em} : 407 nm, respectively, and a dissociation constant value of $K_d = 22.33 \mu M$.

Finally, sensor **13**, in the presence of increasing Hg^{2+} ion concentrations, exhibits an increase in relative fluorescence intensity (“turn-on”), with excitation and emission maxima at λ_{exc} : 342 nm and λ_{em} : 412 nm, respectively, and a dissociation constant value of $K_d = 179.70 mM$.

In conclusion, among the four sensors studied, the most promising indicator for measuring Hg^{2+} ions in biological systems is sensor **10**.

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΧΟΛΙΟ

Η διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων τόσο στο περιβάλλον, όσο και στους ζώντες οργανισμούς, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη διάφορων εργαστηριακών τεχνικών για την ανίχνευση τους.¹

Ως πλέον κατάλληλη τεχνική θεωρείται σήμερα αυτή του φθορισμού και αυτό γιατί έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, τουλάχιστον όσο αφορά στην ανίχνευση των βαρέων μετάλλων, όπως θα αναφερθεί στο δεύτερο κεφάλαιο. Η δε χρήση του φθορισμού για την ανίχνευση του υδραργύρου λαμβάνει όλο και μεγαλύτερη προσοχή, λόγω της ιδιαίτερα υψηλής τοξικότητας του για τον άνθρωπο.

Α.2 ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Ο όρος «βαρύ μέταλλο» αναφέρεται σε οποιοδήποτε μεταλλικό χημικό στοιχείο που έχει μια σχετικά υψηλή πυκνότητα, περίπου 5 φορές μεγαλύτερη του νερού και είναι τοξικό ή δηλητηριώδες σε χαμηλές συγκεντρώσεις.² Παραδείγματα βαρέων μετάλλων είναι ο υδράργυρος (Hg), το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), το νικέλιο (Ni), το κοβάλτιο (Co), το θάλλιο (Tl) και το αρσενικό (As).

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά συστατικά του φλοιού της γης. Δεν μπορούν να αλλοιωθούν ή να καταστραφούν. Σε μικρό ποσοστό εισχωρούν στον οργανισμό μας μέσω των τροφίμων, του πόσιμου νερού και του αέρα. Ως ιχνοστοιχεία, μερικά από αυτά (π.χ. χαλκός, ψευδάργυρος) είναι απαραίτητα για την διατήρηση του μεταβολισμού του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις αυτών μπορούν να οδηγήσουν σε δηλητηρίαση. Η δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα θα μπορούσε να προκύψει, παραδείγματος χάριν, από τη μόλυνση πόσιμου νερού λόγω υψηλών περιβαλλοντικών συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στον αέρα κοντά στις πηγές εκπομπής αυτών, ή την εισαγωγή στον οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας.³

Επιπροσθέτως, η δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα είναι αποτέλεσμα της περιβαλλοντικής ρύπανσης, η οποία μπορεί να συμβεί άμεσα από τις εκροές λυμάτων

των βιομηχανιών, διυλιστηρίων και εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων ή έμμεσα εξαιτίας των προσμίξεων που εισέρχονται στην παροχή νερού από το έδαφος ή από τα υπόγεια συστήματα και την ατμόσφαιρα μέσω των όμβριων υδάτων.⁴

Τα βαρέα μέταλλα είναι επικίνδυνα επειδή τείνουν να βιοσυσσωρεύονται. Ως βιοσυσσώρευση ορίζεται η αύξηση της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας σε ένα βιολογικό οργανισμό κατά τη διάρκεια του χρόνου, έναντι της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας στο περιβάλλον.⁵ Ουσιαστικά οι ενώσεις που έχουν αυτή την ιδιότητα συσσωρεύονται στους ζωντανούς οργανισμούς οποτεδήποτε λαμβάνονται και αποθηκεύονται γρηγορότερα από ότι μεταβολίζονται ή εκκρίνονται.

Η βιοσυσσώρευση των βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο έχει ποικίλες επιπτώσεις, οι οποίες μπορούν να αναφερθούν περιληπτικά ως εξής:⁶⁻⁹

- Διατάραξη του νευρικού συστήματος
- Βλάβη των λειτουργιών του εγκεφάλου
- Βλάβη του DNA και χρωμοσωμική αλλοίωση
- Αλλεργικές αντιδράσεις, με συνέπεια τις αναφυλαξίες δερμάτων, την κούραση και τους πονοκεφάλους
- Αρνητικά αναπαραγωγικά αποτελέσματα, όπως υποβάθμιση σπέρματος, ατέλειες γέννησης και αποβολές
- Αύξηση αρτηριακής πίεσης
- Βλάβη νεφρών
- Μειωμένες δυνατότητες εκμάθησης των παιδιών
- Προβλήματα συμπεριφοράς των παιδιών, όπως επιθετικότητα, παρορμητική συμπεριφορά και υπερδραστηριότητα.

A.3 ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ

Ο υδράργυρος είναι ένα από τα πιο τοξικά βαρέα μέταλλα, τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς μία από τις μεγαλύτερες επιπτώσεις της έκθεσης του ανθρώπου στον υδράργυρο, είναι η καταστροφή των κυττάρων.¹⁰

Πριν ακόμα ο υδράργυρος καταλάβει την έκτη θέση στη λίστα με τις πιο επικίνδυνες ενώσεις,⁴ υπάρχουν αναφορές ότι ο υδράργυρος χρησιμοποιούνταν στη γραφή, στην ιατρική, στην οδοντιατρική, στην υψηλή ραπτική ακόμα και στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων.¹¹

Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η χρήση του υδραργύρου υπό τη μορφή κόκκινου μεταλλεύματος, καναβαρρίτης, από τους Κινέζους 3000 χρόνια πριν, το οποίο χρησιμοποίησαν ως κόκκινο μελάνι στις γραφές.

Ακόμη βρέθηκε σε αιγυπτιακούς τάφους, πιθανά ως συντηρητικό, αλλά και ίσως ως προστασία από τα κακά πνεύματα.

Στην ιατρική, οι ενώσεις του υδραργύρου χρησιμοποιήθηκαν σε κρέμες δέρματος προκειμένου να θεραπευτούν διάφορες δερματικές μολύνσεις, ενώ υπήρχε και η υπόνοια ότι ο υδράργυρος πιθανά να είχε σημαντικά αποτελέσματα στη θεραπεία της σύφιλης.

Η χρήση του νιτρικού υδραργύρου στις γούνες των καπέλων, ως συντηρητικό, συντέλεσε στην παραγωγή της υψηλής ποιότητας καπέλων κατά τον 17^ο αιώνα.

Επιπροσθέτως, στην οδοντιατρική προστέθηκε η καλομέλα (Hg_2Cl_2) σε οδοντιατρικές σκόνες, καθώς επίσης και μέχρι τον 20^ο αιώνα γινόταν χρήση οδοντιατρικών αμαλγαμάτων υδραργύρου-αργύρου.

Τέλος κατά την βιομηχανική εποχή έγινε χρήση του υδραργύρου σε θερμόμετρα και βαρόμετρα, ενώ στη καθημερινή ζωή εισήχθη σε λάμπες φωτισμού.

Ο υδράργυρος υπάρχει σε τρεις οξειδωτικές καταστάσεις και γι αυτό κατατάσσεται και σε τρεις κατηγορίες:^{11,12} α) τον στοιχειακό υδράργυρο, β) τον ανόργανο υδράργυρο και γ) τον οργανικό υδράργυρο.

Όσο αφορά τον στοιχειακό υδράργυρο (Hg^0), βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση μηδέν, έχει ατομικό αριθμό 80, ατομικό βάρος 200.59 amu και πυκνότητα 13.546

g/ml στους 20°C. Είναι ένα ασημί υγρό και μάλιστα είναι το μόνο μέταλλο το οποίο βρίσκεται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Είναι πτητικό υγρό και απελευθερώνει μονοατομικό αέριο, το οποίο είναι γνωστό και ως ατμός υδραργύρου. Ακόμη είναι σταθερός στον περιβαλλοντικό αέρα και για αυτό το λόγο μπορεί να μείνει στην ατμόσφαιρα για μήνες ή ακόμα και χρόνια. Ο στοιχειακός υδράργυρος παίζει σημαντικό ρόλο στον παγκόσμιο κύκλο του υδραργύρου.

Ο παγκόσμιος κύκλος του υδραργύρου περιλαμβάνει τη μετατροπή του στοιχειακού υδραργύρου στις άλλες μορφές του, οι οποίες μπορούν να μεταφερθούν μέσω του νερού και των εδαφών κατά τη διάρκεια της βροχής ή του χιονιού.⁴ Στη συνέχεια ο στοιχειακός υδράργυρος που βρίσκεται στον αέρα, μέσω φωτοχημικών διαδικασιών μετατρέπεται στον ανόργανο υδράργυρο (Hg^{2+}), ο οποίος και καταλήγει στη γη αφού έχει συνδυαστεί με τους ατμούς του αέρα. Ο ανόργανος υδράργυρος που καταλήγει στις θάλασσες και τις λίμνες, μέσω των «θεικών-αναγωγικών» βακτηρίων μεθυλιώνεται, σχηματίζοντας έτσι τον μέθυλο-υδράργυρο (methyl-mercury), οποίος μέσω της τροφικής αλυσίδας καταλήγει στον άνθρωπο.¹¹

Ο ανόργανος υδράργυρος περιλαμβάνει άλατα υδραργυρούχου (Hg^{1+}) και υδραργυρικού (Hg^{2+}) υδράργυρου και σχηματίζει ενώσεις όπως η καλομέλα και το υδραργυρικό σουλφίδιο αντίστοιχα.

Ο οργανικός υδράργυρος προέρχεται από τη μεθυλίωση (methyl-mercury) ή αιθυλίωση (ethyl-mercury) του ανόργανου υδραργύρου από τους μικροοργανισμούς σε θάλασσες και λίμνες με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στα ψάρια. Κατά συνέπεια οι οργανικές ενώσεις του υδραργύρου περνούν στην τροφική αλυσίδα.

Εξαιτίας λοιπόν του κύκλου του υδραργύρου, όπου ο όχι και τόσο τοξικός στοιχειακός υδράργυρος μετατρέπεται σε ποιο τοξικές μορφές, κατατάσσεται το δισθενές ιόν του υδραργύρου σε ένα από τα πιο τοξικά κατιόντα για το περιβάλλον επειδή κατανέμεται σε αέρα, νερό και έδαφος.^{13,14}

Επίσης ο υδράργυρος μπορεί να συσσωρευτεί στο ανθρώπινο σώμα και να προκαλέσει μια ποικιλία από νόσους ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως νεφρικές, πεπτικές και νευρολογικές ασθένειες.^{1,4,11,12,15-20}

B. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ

B.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η έντονη ερευνητική δραστηριότητα γύρω από την αναλυτική χημεία προσδιορισμού των τοξικών μεταλλοϊόντων, ανέδειξε πληθώρα μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού τους.

Οι αναλυτικές τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση τοξικών μεταλλοϊόντων είναι:

α) τεχνικές φασματοσκοπίας μάζας²¹ όπως η δευτεροταγής ιοντική φασματοσκοπία μάζας (SIMS) και η φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος μάζας με λέιζερ (LA-ICP-MS),

β) φασματοσκοπία ηλεκτρονικής απεικόνισης (ESI) συνδυασμένη με φασματοσκοπία απώλειας ενέργειας ηλεκτρονίων (EELS),^{22,23}

γ) μικροσκοπία φθορισμού X-ray^{24,25} καθώς και

ε) ηλεκτροχημικές τεχνικές (ποτενσιομετρία, αμπερομετρία ή αγωγιμομετρικές μέθοδοι).²⁶

Πιο συγκεκριμένα οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του υδραργύρου είναι:

α) φασματοσκοπία ατομικής μάζας,²⁷

β) φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος-μάζας (ICP-MS),²⁸

γ) φασματοσκοπία φθορισμού συνεχόμενης ροής κρύου ατμού,²⁹

δ) φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος-ατομικής εκπομπής,³⁰

ε) φασματοσκοπία X-ray φθορισμού³¹ και τέλος

στ) φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού φωτός (UV-Vis).³²

Η χρωματογραφία HPLC είναι άλλη μια αναλυτική μέθοδος στην οποία έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση. Η συγκεκριμένη τεχνική προσφέρει την δυνατότητα του ταυτόχρονου διαχωρισμού πολλών μετάλλων σε μια ανάλυση (single run) και τη

δυνατότητα προσδιορισμού των μετάλλων, διαφορετικής οξειδωτικής κατάστασης. Όσον αφορά στον Hg(II) η HPLC έχει συνδυαστεί με τη χρήση οργανικών χρωμοφόρων για την ανίχνευσή του.²⁰ Ωστόσο, αν και η HPLC αποτελεί αναπόσπαστη αναλυτική οργανολογία για κάθε εργαστήριο δεν έχει καταφέρει να αντικαταστήσει πολυδάπανες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως, παραδείγματος χάριν, τη φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος-μάζας.

B.2 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Πέραν των αναλυτικών τεχνικών, που αναφέρθηκαν στην ενότητα B.1, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ανίχνευση και προσδιορισμό του υδραργύρου με τεχνικές φθορισμού και αυτό γιατί, το δισθενές ιόν του υδραργύρου εξαιτίας της κατανομής των ηλεκτρονίων του στις ενεργειακές στοιβάδες ($5d^{10} 6s^0$ - συμπληρωμένες), δεν έχει οπτικές φασματοσκοπικές ιδιότητες (silent ion).²⁰

Η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται επί το πλείστον είναι η σύνθεση χημειοδεικτών, που περιλαμβάνει, δείκτες χρώματος, δείκτες φθορισμού και ηλεκτροχημικούς δείκτες ή ακόμα και συνδυασμό δεικτών χρώματος-φθορισμού.³³

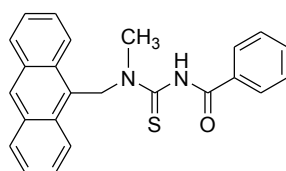
Η γενική μέθοδος λειτουργίας ενός αισθητήρα είναι ότι μετρά ή ανιχνεύει μια φυσική παράμετρο και τη μετατρέπει σε σήμα, το οποίο ακολούθως γίνεται αντιληπτό από κάποιο παρατηρητή (δείκτες χρώματος) ή «διαβάζεται» από κάποιο όργανο, όπως το φθορισμόμετρο (δείκτες φθορισμού).⁴

Συγκεκριμένα οι φθορισμομετρικοί χημειοαισθητήρες ιόντων μπορούν ανιχνεύσουν ποσοτικά τα μεταλλικά ιόντα, εξαιτίας των αλλαγών στο φάσμα φθορισμού τους.³⁴ Μάλιστα έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε αυτού του τύπου αισθητήρες, εξαιτίας του ότι παρουσιάζουν ευαισθησία, επιλεκτικότητα, ταχύτητα, και ευκολία μετρήσεων, μέσω του φθορισμομέτρου, το οποίο είναι διαθέσιμο σε αρκετά επιστημονικά εργαστήρια.³⁵ Ιδιαίτερα για τους φθορισμομετρικούς αισθητήρες του δισθενούς ιόντος υδραργύρου προτιμάται να παρουσιάζουν σαν ιδιότητα την ενίσχυση του φθορισμού (“turn on”) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Hg^{2+} έναντι της απόσβεσης αυτού (“turn off”).²⁰

Ένας φθορισμομετρικός δείκτης συνήθως αποτελείται από το ιονοφόρο (χηλικό) και από το χρωμοφόρο τμήμα. Το ιονοφόρο τμήμα είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του αναλύτη ενώ το χρωμοφόρο μετατρέπει αυτή την αναγνώριση σε οπτικό σήμα.⁴ Ως εκ τούτου, το ιονοφόρο περιλαμβάνει ένα ανθρακικό σκελετό που περιέχει ετεροάτομα, όπως οξυγόνο, θείο και άζωτο, μέσω των οποίων γίνεται η συναρμογή του δείκτη με το μεταλλικό ιόν και το χρωμοφόρο τμήμα καθορίζει τις ιδιότητες του φθορισμού, όπως ο συντελεστής απορρόφησης, το μήκος κύματος διέγερσης/εκπομπής και η κβαντική απόδοση. Η συναρμογή του δείκτη με το ιόν-στόχο προκαλεί αλλαγές στο μήκος κύματος διέγερσης ή/και εκπομπής και η αλλαγή αυτή επιτρέπει τη μέτρηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στο βιολογικό δείγμα βάσει του αλγόριθμου του Tsien.³⁶ Η επιλογή του εκάστοτε χρωμοφόρου γίνεται ανάλογα με τις απαιτήσεις που τίθενται από τις πρακτικές των μελετών φθορισμού στα βιολογικά συστήματα,³⁷ όπως θα αναφερθεί στο τρίτο κεφάλαιο.

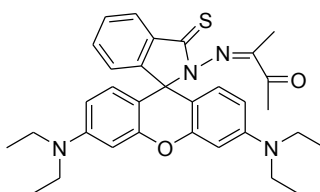
Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα φθορισμομετρικών δεικτών επιλεκτικών ως προς το δισθενές ιόν του υδραργύρου.^{4,20,33,38-45}

Ένα πρώτο παράδειγμα είναι οι ακυλοθειουρίες με φθορίζοντα πυρένια με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τη Ν-μέθυλο-Ν-9-(μέθυλοανθρακίνο)-Ν'-βένζοϋλοθειουρία, MABT.^{46,47}



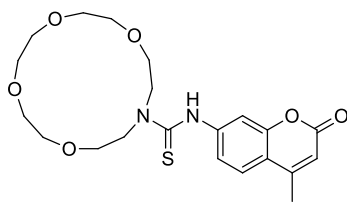
MATB

Επίσης άλλο ένα παράδειγμα είναι οι δείκτες βασισμένοι στη ροδαμίνη, όπως ο ThioRh-1.³⁸



ThioRh-1

Επίσης έχει επιτευχθεί και η σύνθεση μακροκυκλικού δείκτη βασισμένου σε χρωμοφόρο κουμαρινικού τύπου, όπως το N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecane-13-carbothioamide (MOCAC) .⁴¹



MOCAC

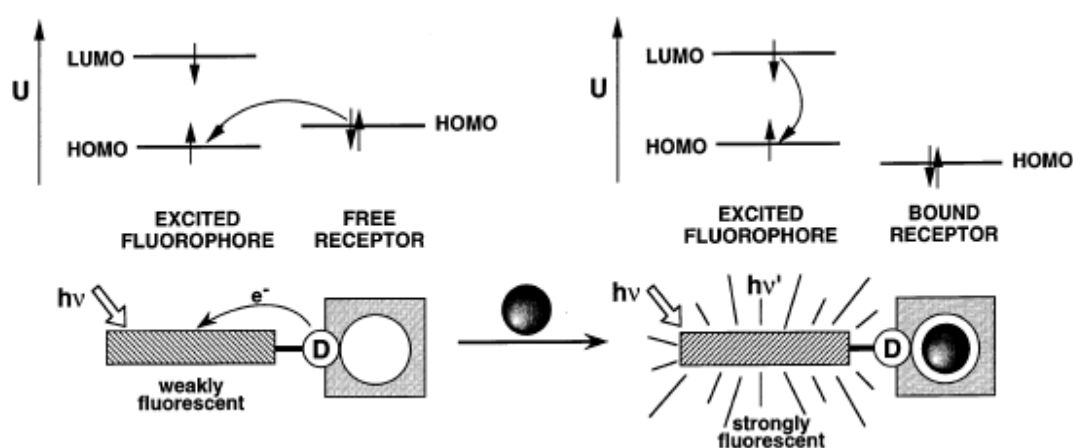
B.3 ΤΡΟΠΟΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Οι κύριες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την διέγερση φθορισμομετρικών δεικτών αντιστοιχούν στην ακόλουθη κατηγοριοποίηση των δεικτών αυτών.

B.3.1 Δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίου (*photoinduced electron transfer (PET) indicators*)

Στους δείκτες αυτή της κατηγορίας (fluorescent PET indicators), τα ετεροάτομα του χηλικού τμήματος του δείκτη δεν συνδέονται συζυγιακά με το σύστημα του χρωμοφόρου.^{26,48,49}

Συνέπεια της επιλογής αυτής είναι ότι, στην ελεύθερη μορφή του δείκτη, η φωτοδιέγερση του χρωμοφόρου επάγει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το υψηλότερο κατειλημμένο δεσμικό μοριακό τροχιακό (HOMO), στο χαμηλότερο μη κατειλημμένο αντιδεσμικό μοριακό τροχιακό (LUMO). Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίου από το HOMO του χηλικού μέρους (δότης) στο HOMO του χρωμοφόρου (δέκτης), με αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού (Σχήμα 1). Μετά την δέσμευση του κατιόντος, αλλάζει το δυναμικό οξειδοαναγωγής του δότη και το HOMO του γίνεται χαμηλότερο σε ενέργεια από αυτό του δέκτη, οπότε δεν είναι δυνατή η μεταπήδηση ηλεκτρονίου, οπότε παρατηρείται αύξηση στην ένταση φθορισμού.

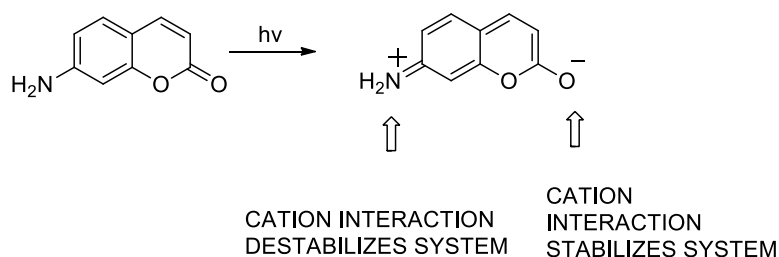


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων στους δείκτες μεταφοράς ηλεκτρονίου.

B.3.2 Δείκτες μεταφοράς φορτίου (*photoinduced charge transfer (PCT) indicators*)

Όταν ένα χρωμοφόρο είναι συζυγιακά συνδεδεμένο με μία ομάδα δότη ηλεκτρονίων, τότε λόγω συντονισμού το HOMO του χρωμοφόρου είναι εξ αρχής ψηλότερα ενεργειακά από αυτό του δότη οπότε προκύπτει μια διαφορετική κατηγορία δεικτών μεταφοράς φορτίου (*fluorescent PCT indicators*).^{26,48,49}

Συγκεκριμένα όταν ένα χρωμοφόρο π.χ. μια κουμαρίνη, εμπεριέχει μια ηλεκτρονιοδοτική ομάδα (στη συγκεκριμένη περίπτωση μία αμινομάδα) η οποία βρίσκεται σε συζυγία με μία ηλεκτρονιοελκτική ομάδα (στη συγκεκριμένη περίπτωση μία καρβονυλομάδα) τότε η φωτοδιέγερση του μορίου προκαλεί ενδομοριακή μεταφορά φορτίου από τον δότη στο δέκτη (Σχήμα 2). Αυτή η μεταφορά φορτίου οδηγεί σε μία μετατόπιση Stokes η οποία εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του χρωμοφόρου.



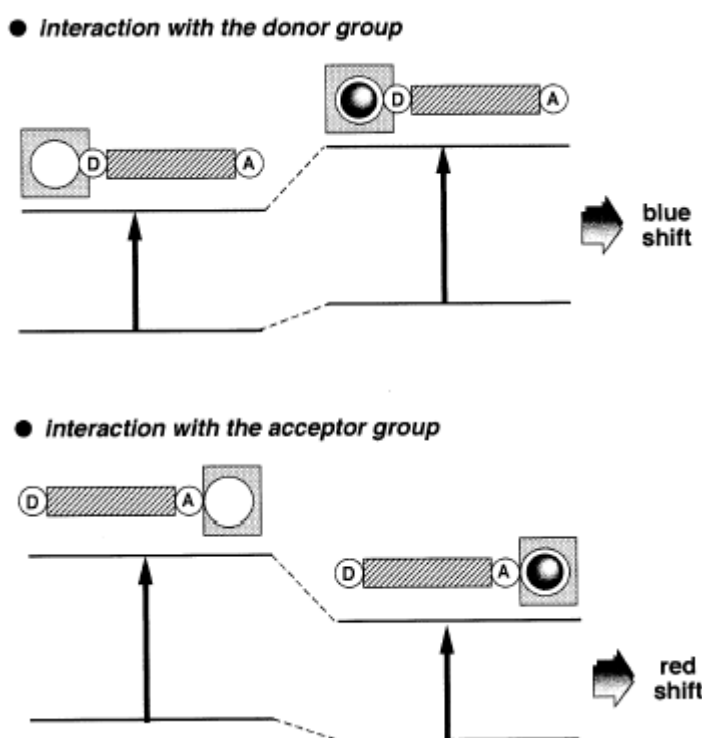
Σχήμα 2. Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου.

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

Τα φάσματα εκπομπής ακολουθούν την ίδια κατεύθυνση μετατόπισης με αυτή των φασμάτων απορρόφησης. Όλες οι μεταβολές στο φθορισμομετρικό προφίλ των δεικτών εξαρτώνται από το κατιόν που συναρμόζεται με το δείκτη.

Οι φωτοφυσικές αλλαγές που προκαλούνται από την εκάστοτε συναρμογή του κατιόντος είναι δυνατόν να ερμηνευτούν και με την θεώρηση της αλληλεπίδρασης διπόλου-φορτίου (charge dipole interaction). Στην περίπτωση όπου η διπολική ροπή της διεγερμένης κατάστασης του συστήματος είναι μεγαλύτερη αυτής της βασικής κατάστασης και το κατιόν αλληλεπιδρά με τον δότη, τότε η διεγερμένη κατάσταση αποσταθεροποιείται περισσότερο από τη βασική και συνεπώς εμφανίζει μια μικρή υψοχρωμική μετατόπιση (blue-shift) στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής.

Αντίθετα, εάν το κατιόν αλληλεπιδρά με τον ηλεκτρονιοδέκτη η διεγερμένη κατάσταση σταθεροποιείται περισσότερο από την βασική και συνεπώς εμφανίζεται μια βαθοχρωμική (red-shift) μετατόπιση στα αντίστοιχα φάσματα (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Καταστάσεις αλληλεπίδρασης κατιόντων με δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων.

Γ. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση και η φθορισμομετρική μελέτη των ιδιοτήτων σειράς ενώσεων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φθορισμομετρικοί δείκτες ιόντων Hg^{2+} .

Εισαγωγικό σχόλιο:

Η αποτελεσματικότητα της φθορισμομετρικής μεθόδου, έγκειται στη σύνθεση και χρήση του κατάλληλου δείκτη/αισθητήρα, αλλά και στην σωστή ερμηνεία των φθορισμομετρικών δεδομένων. Ο τρόπος απόκρισης των αισθητήρων και η λειτουργία τους που αφορά τη θεωρία του φθορισμού αναφέρθηκε στο κεφάλαιο Β.

Σημαντικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα ενός φθορισμομετρικού δείκτη ιόντων αποτελεί η κατάλληλη επιλογή του χρωμοφόρου και του χηλικού τμήματος του αντίστοιχα, προκειμένου ο εκάστοτε συντιθέμενος δείκτης να αποκρίνεται στην παρουσία του υπό μελέτη ιόντος και συγκεκριμένα στο δισθενές ιόν του υδραργύρου, κάτι το οποίο θα αναλυθεί στο παρόν κεφάλαιο.

Γ.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΩΜΟΦΟΡΟΥ

Ως χρωμοφόρο στην σύνθεση των δεικτών επιλέχθηκαν ανάλογα της κουμαρίνης διότι.^{50,51}

- α) έχουν φωτοσταθερότητα
- β) τα μέγιστα μήκη κύματος διέγερσής τους βρίσκονται στην περιοχή του ορατού ώστε ν' αποφεύγεται ο "θόρυβος" στα σήματα φθορισμού (background fluorescence) από κυτταρικά, ή βιολογικά συστατικά γενικότερα.
- γ) εμφανίζουν αρκετά μεγάλη μετατόπιση Stokes προς αποφυγή σημαντικής επικάλυψης των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής.
- δ) οι κβαντικές αποδόσεις του φθορισμού τους επιτρέπουν την ανίχνευση ιόντων με χαμηλές συγκεντρώσεις δείκτη, και
- ε) έχουν τη δυνατότητα να εισαχθούν στα κύτταρα είτε με μικροένεση είτε ως παράγωγα με δυνατότητα διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, χωρίς να καταστρέφουν το κύτταρο.

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους έχουν σημαντικές αντιαλλεργικές, αντιμυκητιακές, αντιβακτηριδιακές και αντιακές ιδιότητες,⁵²⁻⁵⁴ ενώ παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.⁵⁵

Το εργαστήριο μας έχει 20-ετή πείρα στην παρασκευή και μελέτη φθοριζόντων δεικτών ασβεστίου και άλλων ενδοκυττάρων ιόντων με χρωμοφόρα υποκατεστημένες κουμαρίνες και έχει συμβάλλει σημαντικά στο πεδίο της σύνθεσης και μελέτης φθοριζόντων δεικτών.^{41,56-62}

Γ.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΗΛΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ (ΙΟΝΟΦΟΡΟ)

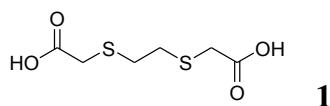
Η επιλογή του κατάλληλου χηλικού μέρους είναι μείζονος σημασίας για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του δισθενούς ιόντος υδραργύρου (Hg^{2+}).

Το δισθενές ιόν του υδραργύρου είναι ένα «μαλακό» ιόν και απαιτεί, όσον αφορά στο χηλικό μέρος, την παρουσία «μαλακών» ατόμων-δοτών, όπως είναι οι θειόλες και οι θειολοιθιρές, ή γενικά η παρουσία ατόμων θείου, προκειμένου να αυξηθεί η συγγένεια και η επιλεκτικότητα του δείκτη ως προς τον υδράργυρο. Επίσης είναι γνωστό, πως άτομα-δότες τα οποία μπορούν να συναρμοστούν με το ιόν του υδραργύρου είναι και τα άτομα αζώτου και φωσφόρου.²⁰

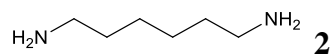
Βιβλιογραφικά έχουν γίνει αναφορές για σύνθεση δεικτών επιλεκτικών ως προς τον υδράργυρο, όπου το χηλικό μέρος αποτελείται από μακροκυκλικά συστήματα τα οποία εμπεριέχουν στον ανθρακικό τους σκελετό ετεροάτομα θείου, αζώτου, οξυγόνου ή συνδυασμούς αυτών.²⁰

Στην παρούσα εργασία τα χηλικά μέρη τα οποία επιλέχθηκαν δεν είναι μακροκυκλικά συστήματα, αλλά άκυκλες (θειούχες ή μη) ενώσεις. Η επιλογή αυτή έγινε προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι αποτελεσματικά και τα άκυκλα συστήματα ως δείκτες επιλεκτικοί προς τον υδράργυρο.

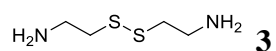
Το πρώτο χηλικό μέρος το οποίο επιλέχθηκε είναι το 2,2'-(αιθυλενοδιθειο)οξικό οξύ (**1**), το οποίο περιλαμβάνει στο βασικό του σκελετό δύο άτομα θείου, με απόσταση μιας αιθυλενομάδας ανάμεσά τους.



Το επόμενο χηλικό μέρος που επιλέχθηκε είναι η 1,6-εξανοδιαμίνη (**2**). Η ένωση αυτή δεν περιέχει κάποιο άτομο θείου στο βασικό ανθρακικό σκελετό της αλλά περιέχει δύο άτομα αζώτου (αμινομάδες) που όπως προαναφέρθηκε μπορούν να συναρμολογηθούν με το δισθενές ιόν του υδραργύρου.



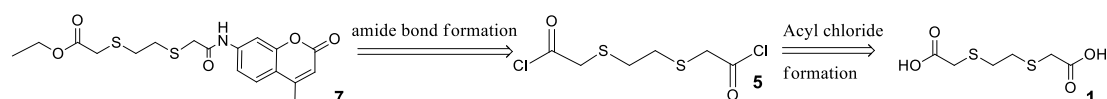
Το τελευταίο ιονοφόρο που επιλέχθηκε είναι η κυσταμίνη (**3**). Το συγκεκριμένο χρωμοφόρο εμπεριέχει στον βασικό ανθρακικό του σκελετό δύο άτομα θείου που είναι απευθείας συνδεδεμένα μεταξύ τους και δύο άτομα αζώτου.



Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνολικά επιτεύχθηκε η σύνθεση τεσσάρων φθορισμομετρικών δεικτών, όπου για τον καθένα παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική του προσέγγιση, η συνθετική του πορεία, καθώς και οι φθορισμομετρικές μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν.

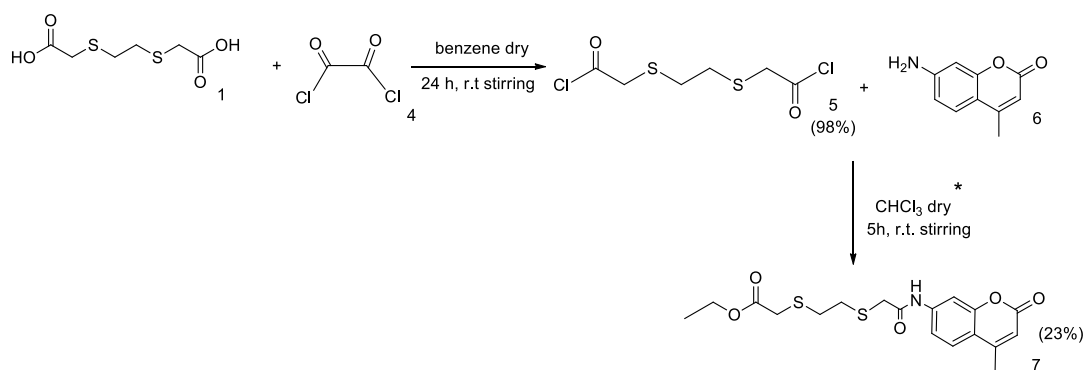
Σύνθεση του Δείκτη 7



Σχήμα 4. Ρετροσυνθετική προσέγγιση του δείκτη 7

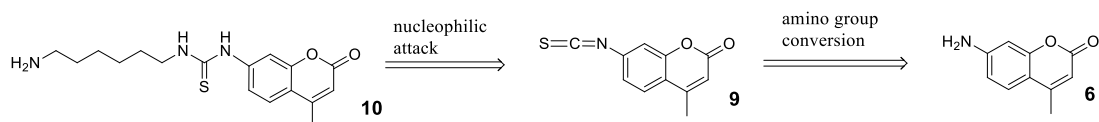
Σύμφωνα με το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα, η ένωση 2,2'-(αιθυλενοδιθειο)οξικό οξύ (1) υπόκειται σε αντίδραση χλωρίωσης προς σχηματισμό του διακυλοχλωριδίου 5. Στη συνέχεια με σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του διακυλοχλωριδίου 4, και της 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης (6), σχηματίζεται η ένωση 7. Η ένωση 7 περιλαμβάνει στο ιονοφόρο τμήμα του δείκτη δύο άτομα θείου που είναι πιθανές θέσεις συναρμογής για τον ιόν του υδραργύρου ενώ δεν περιλαμβάνει καθόλου άτομα του θείου στο χρωμοφόρο τμήμα.

Κατά τη συνθετική πορεία, το εμπορικά διαθέσιμο 2,2'-(αιθυλενοδιθειο)οξικό οξύ (1) αντέδρασε με το επίσης εμπορικά διαθέσιμο οξάλλυλο χλωρίδιο (4) σε διαλύτη άνυδρο βενζόλιο, προς σχηματισμό της ένωσης 5, με πολύ υψηλό ποσοστό απόδοσης.⁶³ Στη συνέχεια στη διαλυμένη σε ξηρό χλωροφόρμιο 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (6), προστέθηκε στάγδην, το επίσης διαλυμένο σε άνυδρο χλωροφόρμιο διακυλοχλωρίδιο 5. Τελικά σχηματίστηκε η ένωση 7, η οποία αποτελεί τον πρώτο συντιθέμενο δείκτη. *Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν απαιτήθηκε προσθήκη αιθανόλης στο δείγμα. Το εμπορικό χλωροφόρμιο περιέχει αιθανόλη σαν σταθεροποιητή η οποία επαρκεί για τον σχηματισμό του αιθυλεστέρα.



Σχήμα 5. Συνθετική πορεία του δείκτη 7

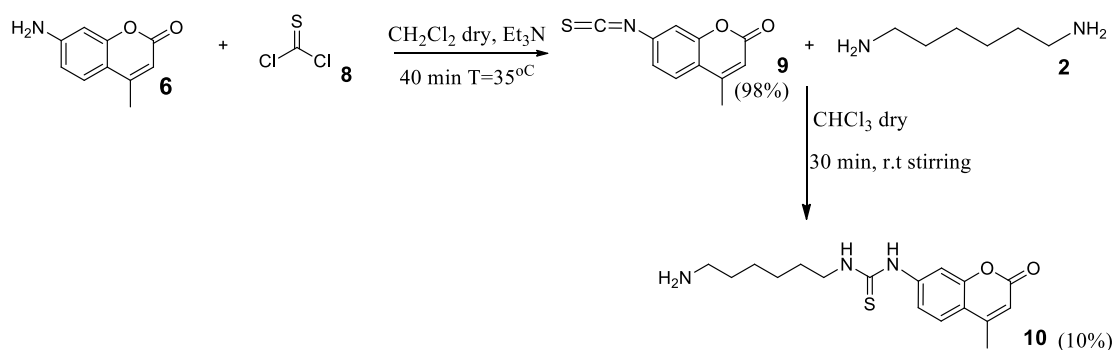
Σύνθεση του δείκτη 10



Σχήμα 6. Ρετροσυνθετική προσέγγιση του δείκτη 10

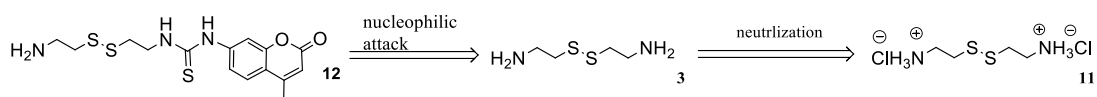
Με βάση το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα, η 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (**6**) αντιδρά με θειοφωσγένειο (**8**) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο προς σχηματισμό της ένωσης **9**, όπου η αμινομάδα της **6** μετατρέπεται σε ισοθειοκυανική ομάδα. Κατόπιν η ένωση **9** αντιδρά με την εμπορικά διαθέσιμη 1,6-εξανδιαμίνη (**2**) σε μία αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής με αποτέλεσμα τη σύνθεση της ένωσης **10**.

Συνθετικά, η ένωση **7** προέκυψε από την αντίδραση της εμπορικά διαθέσιμης 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης (**6**) και του εμπορικά διαθέσιμου θειοφωσγενείου (**8**) σε διχλωρομεθάνιο, υπό αυστηρά άνυδρες συνθήκες λόγω του πολύ ευαίσθητου σε υγρασία θειοφωσγενείου, με ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό απόδοσης.⁶⁴ Η ένωση **9** αντέδρασε με την εμπορικά διαθέσιμη 1,6-εξανδιαμίνη (**2**) προς σχηματισμό της επιθυμητής ένωσης **10**, η οποία αποτελεί και τον δεύτερο συντιθέμενο δείκτη, με χαμηλή μεν απόδοση, αλλά σε αρκετή ποσότητα δείκτη για τις φθορισμομετρικές μελέτες. Είναι απαραίτητο σε αυτό το σημείο να αναφερθεί πως, σε όλη τη δομή του δείκτη υπάρχει μόνο ένα άτομο θείου, αυτό της ομάδας της θειουρίας η οποία λειτουργεί σαν συνδέτης (linker) του χρωμοφόρου με το ιονοφόρο τμήμα.



Σχήμα 7. Συνθετική πορεία του δείκτη **10**

Σύνθεση του δείκτη **12**



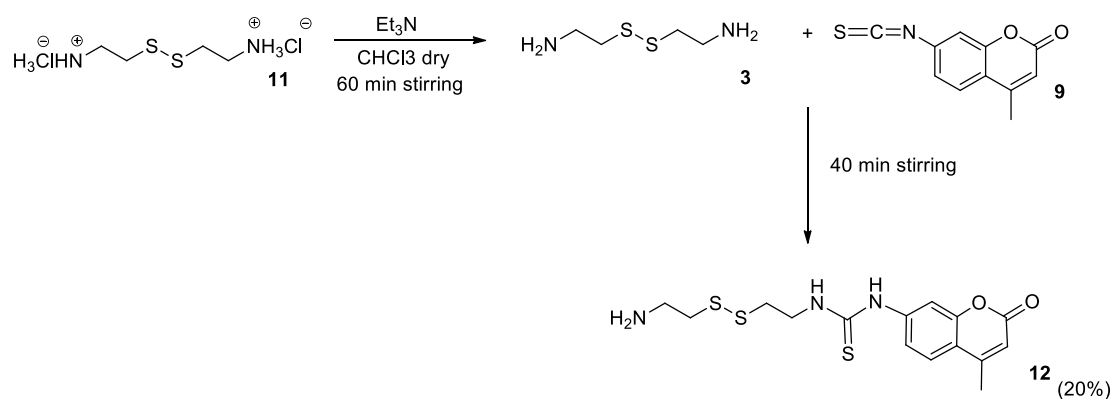
Σχήμα 8. Ρετροσυνθετική προσέγγιση του δείκτη **12**

Γνωρίζοντας πλέον τις συνθετικές μεθόδους για την αντίδραση του χρωμοφόρου με το ιονοφόρο μέρος του δείκτη, ως επόμενος στόχος τέθηκε η ενσωμάτωση των ατόμων θείου στον δομικό σκελετό τόσο του ιονοφόρου όσο και του χρωμοφόρου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την σύνθεση του δείκτη **12** ο οποίος περιέχει στο μόριό του τρία άτομα θείου, άρα και πιθανά τρεις τουλάχιστον θέσεις συναρμογής. Τα δύο από τα τρία άτομα θείου βρίσκονται στο ιονοφόρο τμήμα ενώ το τρίτο βρίσκεται στο συνδέτη του χρωμοφόρου με το ιονοφόρο τμήμα.

Σύμφωνα με το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα, η ένωση **12** προέρχεται μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής της κυσταμίνης (**3**) στην ένωση **9**. Η ένωση **3** προέρχεται από την αποπροστασία του διυδροχλωρικού άλατος της κυσταμίνης (**11**), ενώ η ένωση **9** προέρχεται από την 7-μεθυλο-4-αμινοκουμαρίνη (**6**) με μετατροπή της αμινομάδας της κουμαρίνης, όπως ήδη έχει προαναφερθεί.

Συνθετικά, το διυδροχλωρικό αλάτι της κυσταμίνης (**11**) διαλύθηκε σε χλωροφόρμιο και σε αυτό προστέθηκε τριαιθυλαμίνη σαν βάση για την εξουδετέρωση των υδροχλωρικών αλάτων των διαμινών.⁶⁵ Στη συνέχεια και αφού δημιουργήθηκε η

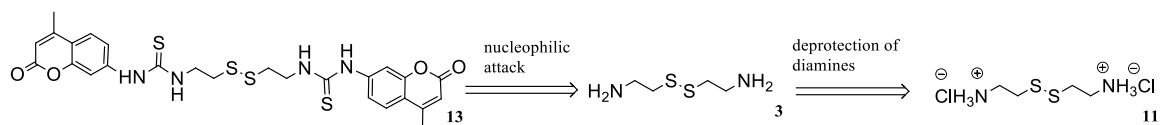
κυσταμίνη (**3**), προστέθηκε η ένωση **9** και κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δημιουργήθηκε ένα λευκό ίζημα το οποίο είναι και το επιθυμητό προϊόν **12**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα και η απομόνωση του προϊόντος ήταν αρκετά εύκολη.



Σχήμα 9. Συνθετική πορεία του δείκτη **12**

Σύνθεση του δείκτη **13**

Οι μέχρι τώρα συνθετικές πορείες, είχαν σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή μίας μόνο ομάδας χρωμοφόρου στον ιονοφόρο σκελετό. Επόμενο λοιπόν βήμα ήταν η προσπάθεια εισαγωγής μίας δεύτερης ομάδας χρωμοφόρου, στο ίδιο ιονοφόρο τμήμα. Η προσπάθεια αυτή πραγματοποιήθηκε, για να διαπιστωθεί εάν η επιπλέον εισαγωγή του ίδιου χρωμοφόρου βελτιώνει τις φθορισμομετρικές ιδιότητες του δείκτη.

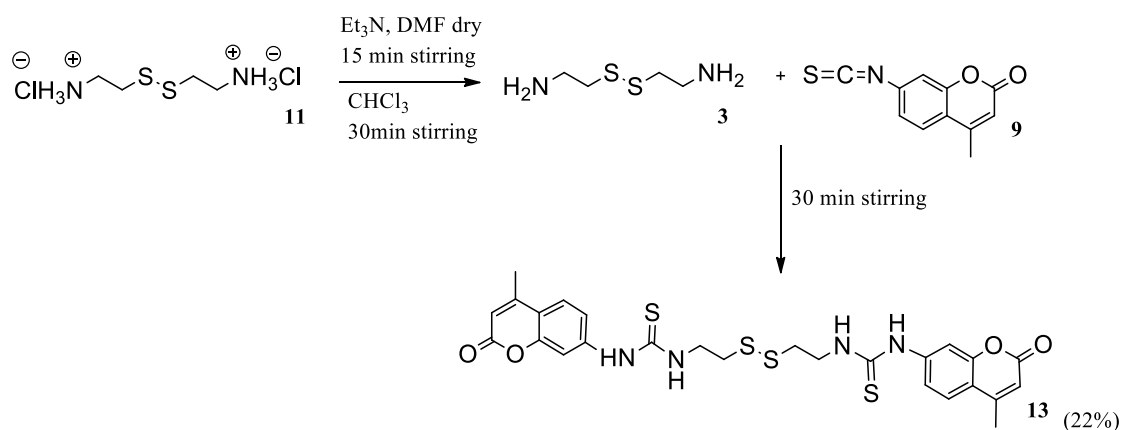


Σχήμα 10. Ρετροσυνθετική προσέγγιση του δείκτη **13**

Σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα για την σύνθεση της ένωσης **13**, αρκεί να πραγματοποιηθεί πυρηνόφιλη προσβολή της κυσταμίνης (**3**) στην ένωση **9**.

Στην συνθετική πορεία, το διυδροχλωρικό αλάτι της κυσταμίνης (**11**) εξουδετερώθηκε παρουσία τριαιθυλαμίνης και άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου, δίνοντας την **3**.⁶⁶ Στη συνέχεια η **3** αντέδρασε με την ένωση **9** σε διαλυτή χλωροφόρμιο με αποτέλεσμα τη σύνθεση της ένωσης **13**. Η ένωση **13** αποτελεί τον

τέταρτο επιτυχώς συντιθέμενο δείκτη, και περιέχει δύο ίδια τμήματα χρωμοφόρου. Επίσης η απομόνωση του προϊόντος είναι εύκολη και ο δείκτης παράγεται με ικανοποιητική απόδοση. Η διαφορά των συνθηκών για την σύνθεση του μονοϋποκατεστημένου δείκτη **12** και του διυποκατεστημένου **13** εστιάζεται στο διαλύτη εξουδετέρωσης του διυδροχλωρικού άλατος της κυσταμίνης (**11**). Στην πρώτη περίπτωση σαν βάση χρησιμοποιείται η τριαιθυλαμίνη και σαν διαλύτης το ξηρό χλωροφόρμιο, ενώ στην δεύτερη σαν διαλύτης το ξηρό διμέθυλοφορμαμίδιο. Δεδομένου ότι η **12** είναι δυσδιάλυτη σε χλωροφόρμιο, το προϊόν καθιζάνει και δεν είναι διαθέσιμο για τη δεύτερη υποκατάσταση. Η αντικατάσταση του χλωροφορμίου με το πολικότερο διμέθυλοφορμαμίδιο επέτρεψε στο μονοϋποκατεστημένο **12** να παραμείνει διαλυτό και, παρουσία περίσσειας 7-μεθυλο-4-αμινοκουμαρίνης (**6**), να επανακυλιωθεί δίνοντας το δείκτη **13**.



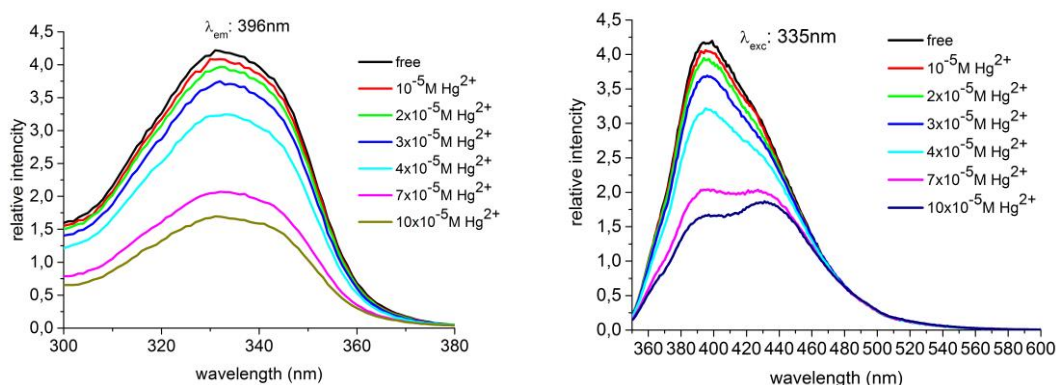
Σχήμα 11. Συνθετική πορεία του δείκτη **13**

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Όλοι οι παραπάνω δείκτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές και έχει μελετηθεί πλήρως το φθορισμετρικό τους προφίλ.

Για τις μετρήσεις φθορισμού τα διαλύματα όλων των δεικτών παρασκευάστηκαν προσθέτοντας 3ml διαλύματος δείκτη σε DMSO συγκέντρωσης $10^{-2}M$ σε 3ml υπερκαθαρό νερό, δίνοντας διαλύματα τελικής συγκέντρωσης $10^{-5}M$ (10μM).

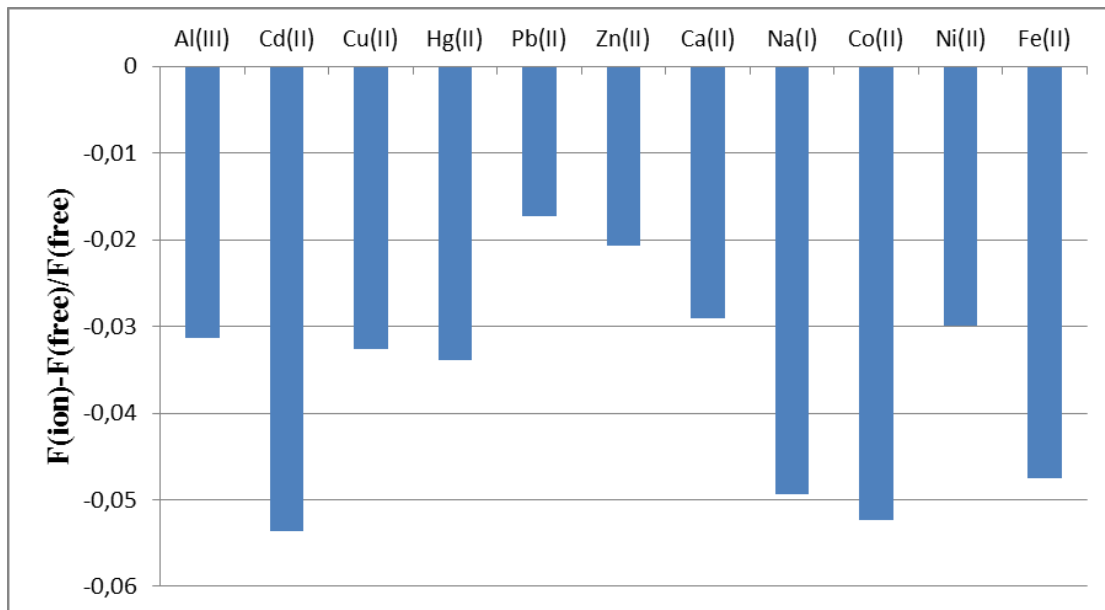
Πιο συγκεκριμένα για το δείκτη **7** πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού χρησιμοποιώντας διάφορα ιόντα μετάλλων με πρώτο και κύριο το δισθενές ιόν του υδραργύρου. Τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 1. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **7** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Hg^{2+}

Όπως φαίνεται από την εικόνα 1, ο δείκτης **7** αποκρίνεται στο ιόν Hg^{2+} και μάλιστα συμπεριφέρεται σαν “turn off”, δηλαδή η αυξανόμενη συγκέντρωση του ιόντος Hg^{2+} συνεπάγεται μείωση της σχετικής έντασης φθορισμού. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης είναι λ_{em} : 396 nm και λ_{exc} : 335 nm αντίστοιχα και με τιμή $K_d = 37.58 \mu M$ για το ιόν Hg^{2+} .

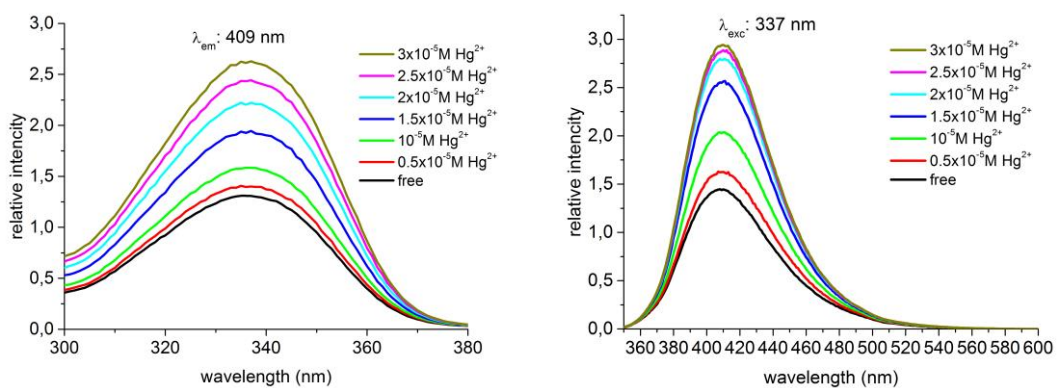
Τα αποτελέσματα των φθορισμομετρικών μετρήσεων με τα διάφορα υπό εξέταση μέταλλα συνοψίζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 1. Συγκριτικός πίνακας απόκρισης φθορισμού του δείκτη **7** συγκέντρωσης 10μM σε διαλύματα ιόντων συγκέντρωσης 10μM

Από το παραπάνω ραβδόγραμμα τα συμπεράσματα που εξάγονται είναι πως ο δείκτης **7**, παρουσία οποιουδήποτε ιόντος παρουσιάζει απόσβεση του φθορισμού (“turn-off”), ενώ δεν φαίνεται να παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς κάποιο συγκεκριμένο μεταλλικό ιόν.

Η επόμενη ένωση που μελετήθηκε ήταν ο δείκτης **10** με πρώτο υπό εξέταση ιόν μετάλλου αυτό του υδραργύρου. Τα φάσματα φθορισμού που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 2:



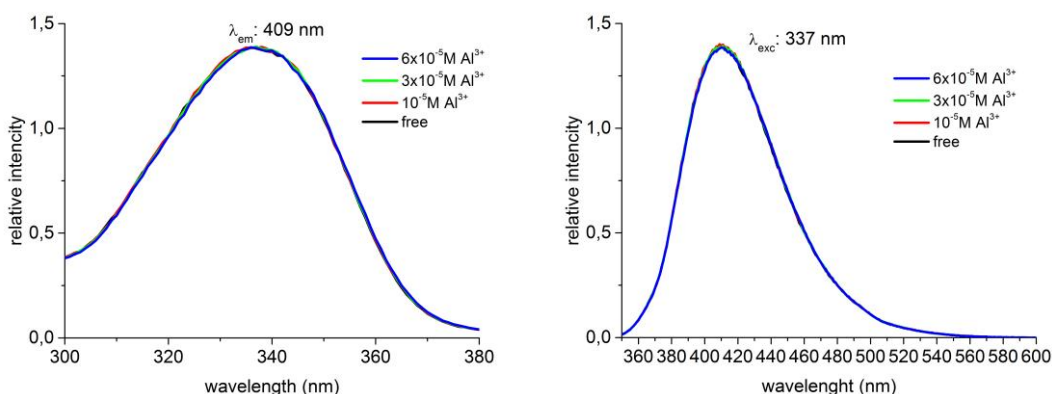
Εικόνα 2. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Hg^{2+}

Συμφώνα με την παραπάνω εικόνα ο δείκτης **10** αποκρίνεται στο ιόν του Hg^{2+} και μάλιστα, αυξανόμενης της συγκέντρωσης των ιόντων υδραργύρου αυξάνεται και η

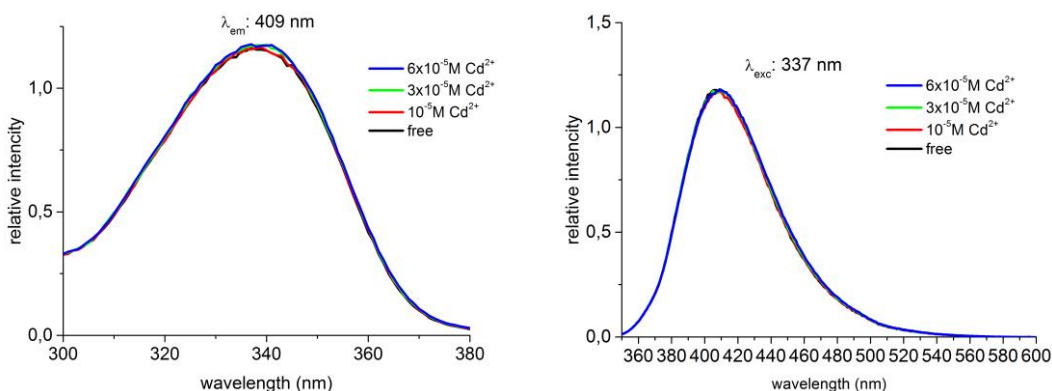
σχετική ένταση φθορισμού, άρα ο δείκτης **10** συμπεριφέρεται ως “turn-on”. Το μέγιστο μήκος διέγερσης και εκπομπής είναι λ_{exc} : 337 nm και λ_{em} : 409 nm αντίστοιχα και με τιμή $K_d = 10.17 \mu\text{M}$ για το ιόν Hg^{2+} .

Η φθορισμομετρική μελέτη του δείκτη **10** και με άλλα υπό εξέταση μεταλλικά ιόντα, υποδεικνύει πως το μόνο μεταλλικό ιόν το οποίο ενισχύει το φθορισμό είναι αυτό του ιόντος υδραργύρου, ενώ όλα τα υπόλοιπα ιόντα είτε τον αποσβένουν είτε δεν τον μεταβάλλουν.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των ιόντων Al^{3+} και του Cd^{2+} .

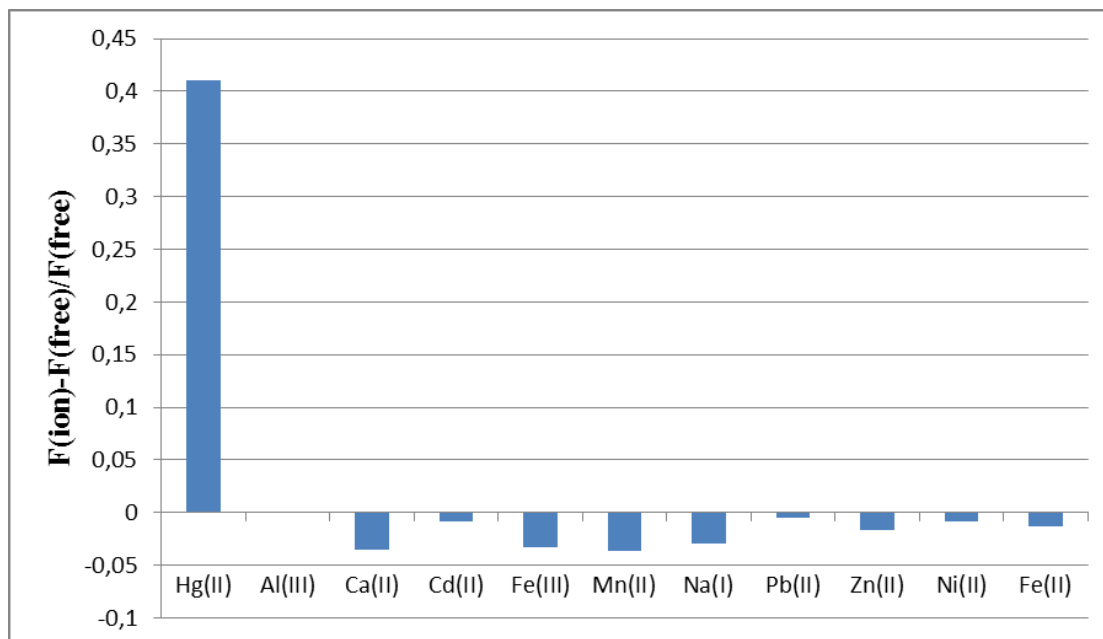


Εικόνα 3. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+}



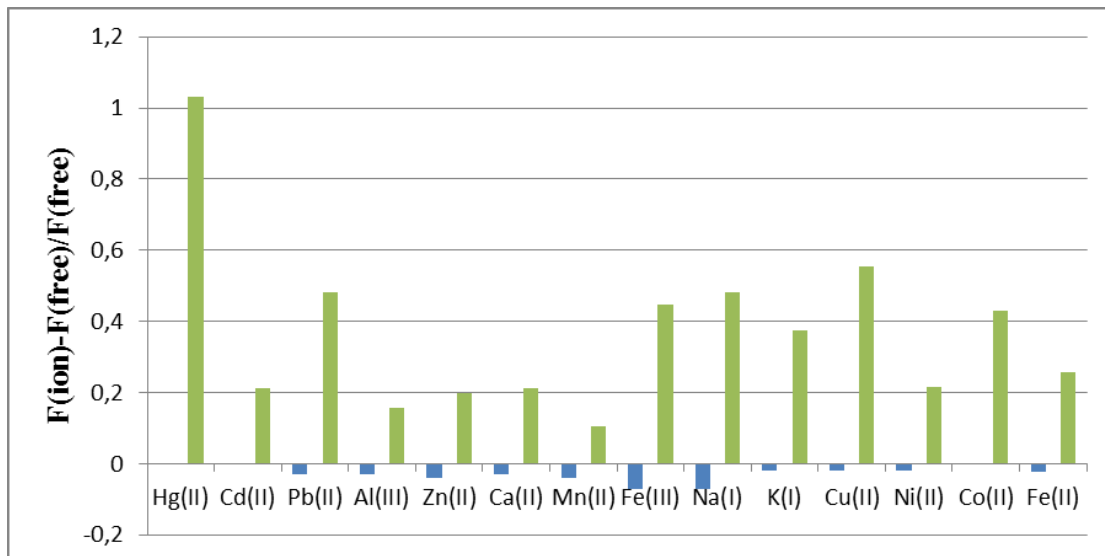
Εικόνα 4. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cd^{2+}

Το σύνολο των φθορισμομετρικών μετρήσεων συνοψίζεται στο επόμενο ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 2. Συγκριτικός πίνακας απόκρισης φθορισμού του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10 μM σε διαλύματα ιόντων συγκέντρωσης 10 μM

Με δεδομένη την εκλεκτική “turn on” ανταπόκριση του δείκτη **10** στα ιόντα Hg^{2+} θεωρήθηκε απαραίτητη η μελέτη ανταγωνισμού ιόντων για το δείκτη. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα **3**. Η κατά κανόνα αποδεκτή πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει σειρά μετρήσεων οι οποίες απεικονίζονται ως εξής: α) στο διάλυμα της ελεύθερης ένωσης προστίθεται συγκεκριμένη συγκέντρωση του εξεταζόμενου ιόντος και β) στη συνέχεια προστίθεται η ίδια συγκέντρωση του ιόντος Hg^{2+} , προκειμένου να διαπιστωθεί η «προτίμηση» του δείκτη ως προς το ιόν Hg^{2+} .^{41,67}



Διάγραμμα 3. Μελέτη ανταγωνισμού κατιόντων για το δείκτη **10**.

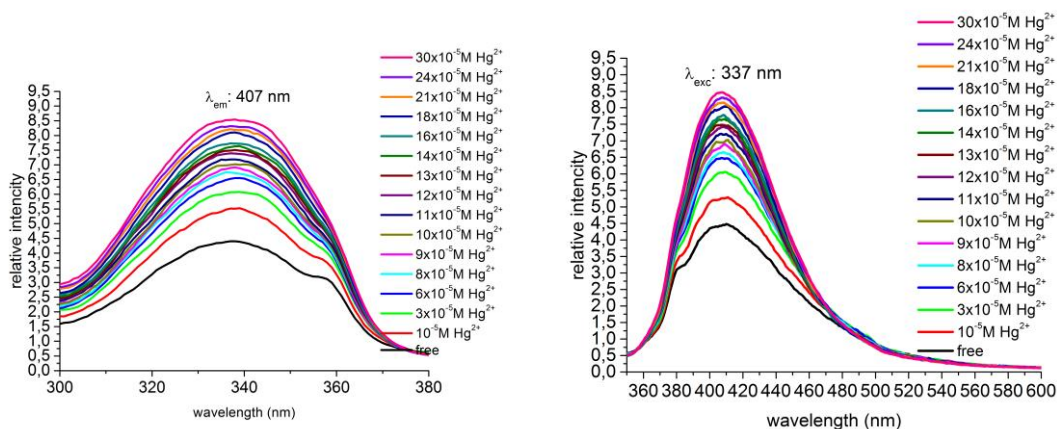
Η πρώτη μέτρηση (μηδενική) είναι αυτή του ελεύθερου δείκτη. Ακολουθείται από την πράσινη ράβδο της σχετικής έντασης φθορισμού (θετικής) του δείκτη με την προσθήκη μόνο ιόντων Hg^{2+} . Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού (μηδενική ή αρνητική) του δείκτη **10** παρουσία 30μM των υπό εξέταση μεταλλικών ιόντων, ενώ οι πράσινες αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού με την επακόλουθη προσθήκη 30μM Hg^{2+} στο κάθε δείγμα. Η μελέτη εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 30μM ιόντων καθώς, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση εμφανίζεται ο κορεσμός του δείκτη **10** ως προς το ιόν του Hg^{2+} .

Το συμπέρασμα τα οποία εξάγονται από τη μελέτη του ραβδογράμματος είναι ότι:

- ο δείκτης **10** είναι εκλεκτικός ως προς το ιόν του υδραργύρου παρουσία οποιουδήποτε άλλου υπό εξέταση ιόντος.
- τα ιόντα τα οποία ανταγωνίζονται σε κάποιο βαθμό το ιόν υδραργύρου στη συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι κυρίως το ιόν του Mn^{2+} , και ύστερα τα ιόντα Al^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} και Fe^{2+} .
- δεδομένου ότι η συναρμογή των ιόντων αυτών με τον δείκτη προκαλεί μείωση της έντασης φθορισμού η συναρμογή αυτή δεν επηρεάζει «προσθετικά» την αύξηση της έντασης φθορισμού που οφείλεται στη σύνδεση του δείκτη με τα ιόντα υδραργύρου όταν αυτά προστεθούν στο διάλυμα.

- εάν η προσθήκη οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος σε διάλυμα του **10** θα οδηγήσει σε αύξηση του σήματος φθορισμού, αυτό θα είναι ένδειξη ύπαρξης των ιόντων Hg^{2+} στο βιολογικό δείγμα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο δείκτης **12**. Όπως και στις προηγούμενες φθορισμομετρικές μελέτες, έτσι και τώρα, το πρώτο μεταλλικό ιόν το οποίο μελετήθηκε ήταν αυτό του υδραργύρου. Τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής παρατίθενται στην Εικόνα 5.

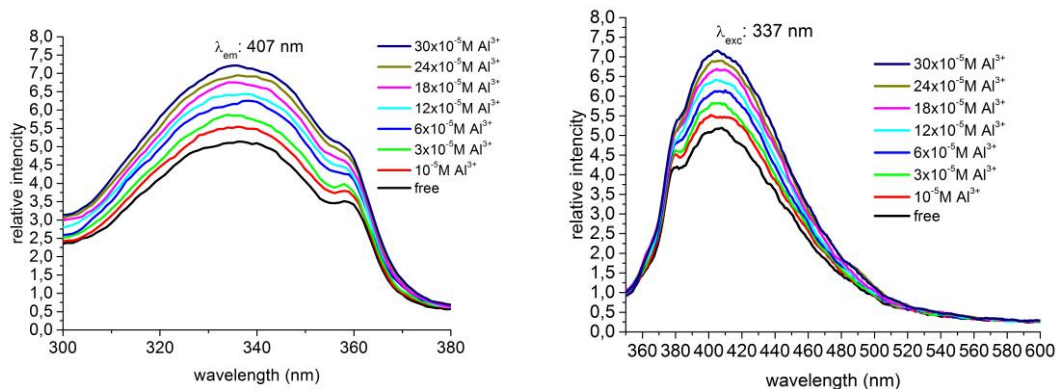


Εικόνα 5. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Hg^{2+}

Από την Εικόνα 5 φαίνεται πως ο δείκτης **12** αποκρίνεται στο ιόν του Hg^{2+} και μάλιστα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων Hg^{2+} αυξάνεται και η σχετική ένταση φθορισμού, άρα ο δείκτης **12** παρουσιάζει σαν ιδιότητα την “turn-on” απόκριση, με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 337 nm και λ_{em} : 409 nm αντίστοιχα, και τιμή $K_d = 36.31 \mu\text{M}$. Επίσης σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί η υψηλή τιμή επιπέδων κορεσμού του δείκτη **12** ως προς το υπό εξέταση ιόν του Hg^{2+} , καθώς αυτή εμφανίζεται να είναι στη συγκέντρωση των $300 \mu\text{M Hg}^{2+}$.

Επιπροσθέτως παρουσιάζονται κάποια ιδιαίτερος χαρακτηριστικά φάσματα φθορισμού του δείκτη **12** παρουσία σειράς μεταλλικών ιόντων.

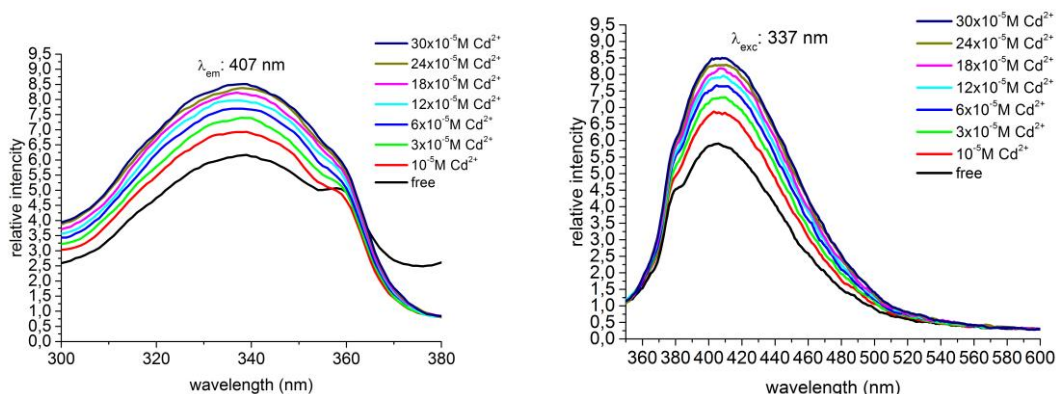
Τα πρώτα χαρακτηριστικά φάσματα φθορισμού που παρατίθενται είναι αυτά του δείκτη **12** παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+} .



Εικόνα 6. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+}

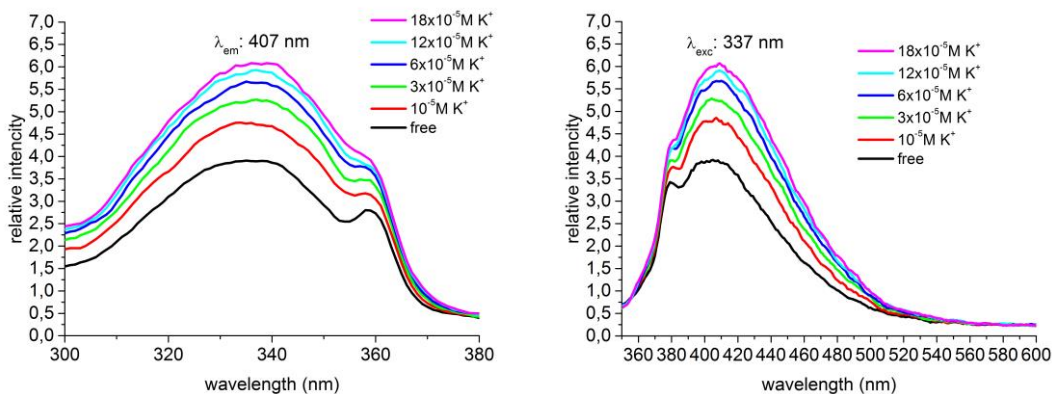
Από την παραπάνω εικόνα είναι εμφανές πως ο δείκτης **12** αποκρίνεται και στο ιόν του Al^{3+} , όπως και στην περίπτωση του ιόντος Hg^{2+} , καθώς η σχετική ένταση φθορισμού αυξάνεται με την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+} .

Ένα δεύτερο παράδειγμα μετρήσεων φθορισμού για το δείκτη **12** είναι η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του «μαλακού» ιόντος Cd^{2+} , όπου και πάλι η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Cd^{2+} στο διάλυμα του ελεύθερου δείκτη έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σχετικής έντασης φθορισμού, με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 337 nm και λ_{em} : 407nm αντίστοιχα και τιμή K_d = 22.33 μM , για το υπό εξέταση ιόν, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.

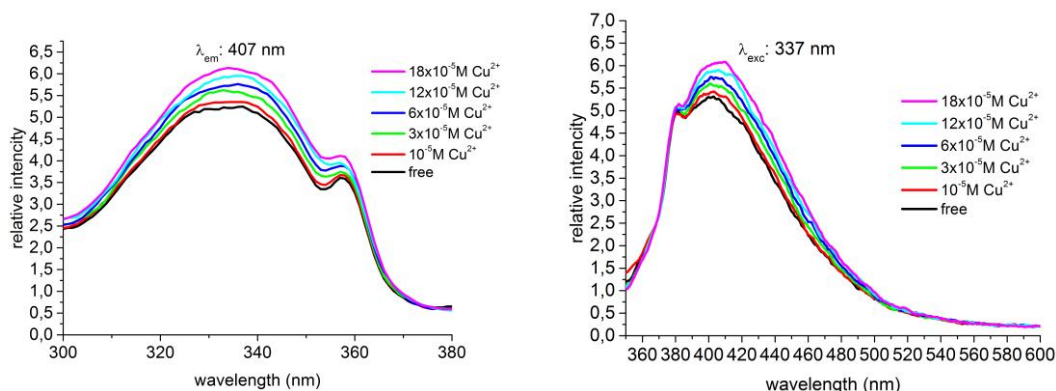


Εικόνα 7. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cd^{2+}

Επίσης ο δείκτης **12** αποκρίνεται θετικά στο ιόν του K^+ και στο δισθενές ιόν του Cu^{2+} .



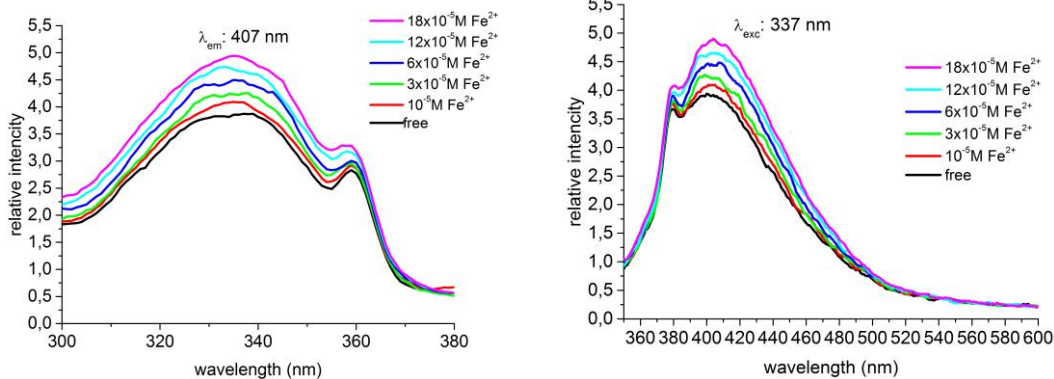
Εικόνα 8. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων K^+



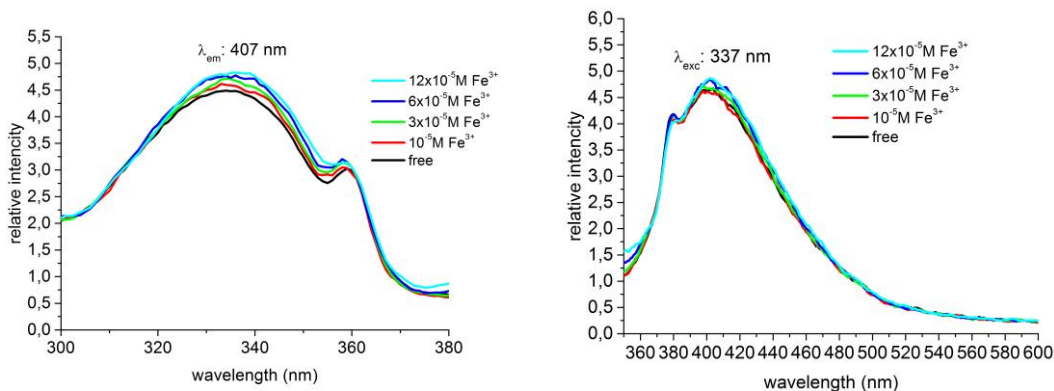
Εικόνα 9. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cu^{2+}

Αξίζει σε αυτό το σημείο να σημειωθεί πως η προσθήκη των ιόντων Cu^{2+} στο διάλυμα του ελεύθερου δείκτη **12** έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σχετικής έντασης του φθορισμού, δηλαδή ο δείκτης συμπεριφέρεται σαν “turn-on”, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις η προσθήκη ιόντων Cu^{2+} σε διαλύματα ελεύθερων δεικτών προκαλεί απόσβεση φθορισμού.⁶⁸

Ακόμη παρατίθενται τα φάσματα εκπομπής των ιόντων Fe^{2+} και Fe^{3+} καθώς παρατηρείται ότι, προσθήκη ιόντων Fe^{2+} στο διάλυμα του ελεύθερου δείκτη **12** έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της σχετικής έντασης του φθορισμού, σε αντίθεση με την προσθήκη των ίδιων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{3+} , που έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της σχετικής έντασης φθορισμού.

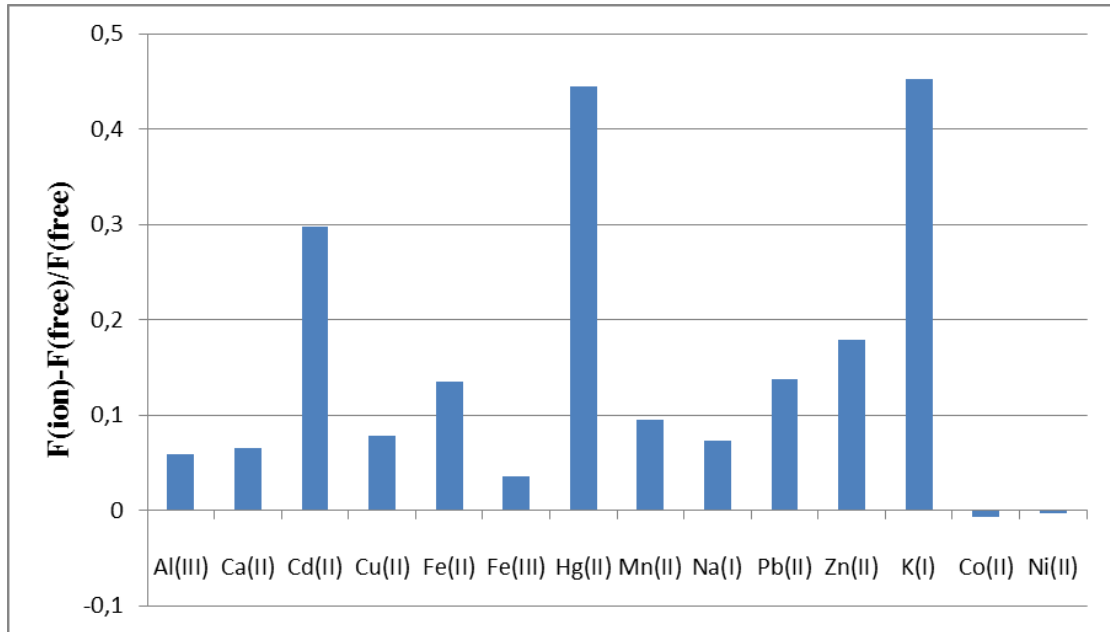


Εικόνα 10. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{2+}



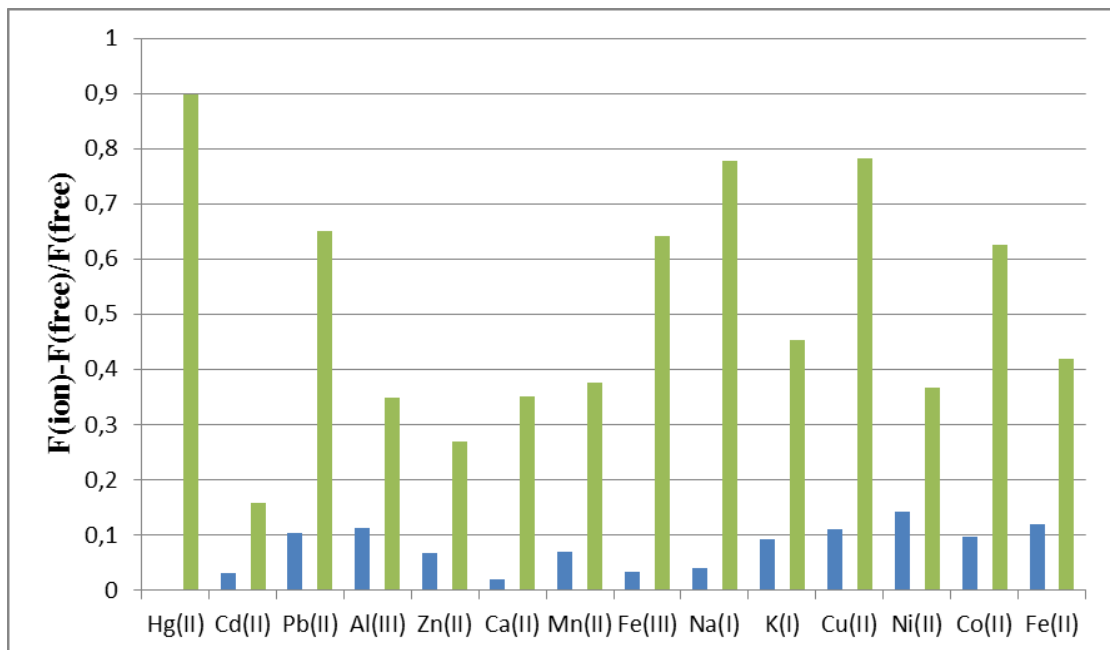
Εικόνα 11. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{3+}

Τα αποτελέσματα των μελετών φθορισμού παρουσία τόσο των μεταλλικών ιόντων των οποίων παρατέθηκαν τα χαρακτηριστικά φάσματα εκπομπής, όσο και των υπολοίπων ιόντων που μελετήθηκαν συγκεντρώνονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 4. Συγκριτικό ραβδόγραμμα απόκρισης φθορισμού του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10μΜ σε διαλύματα ιόντων συγκέντρωσης 60μΜ

Επειδή ο δείκτης **12** αποκρίνεται σε σχεδόν όλα τα μεταλλικά ιόντα που εξετάστηκαν, κρίθηκε απαραίτητη η πραγματοποίηση μελέτης εκλεκτικότητας του **12** ως προς τα υπό εξέταση μεταλλικά κατιόντα, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 5. Μελέτη ανταγωνισμού κατιόντων για το δείκτη **12**.

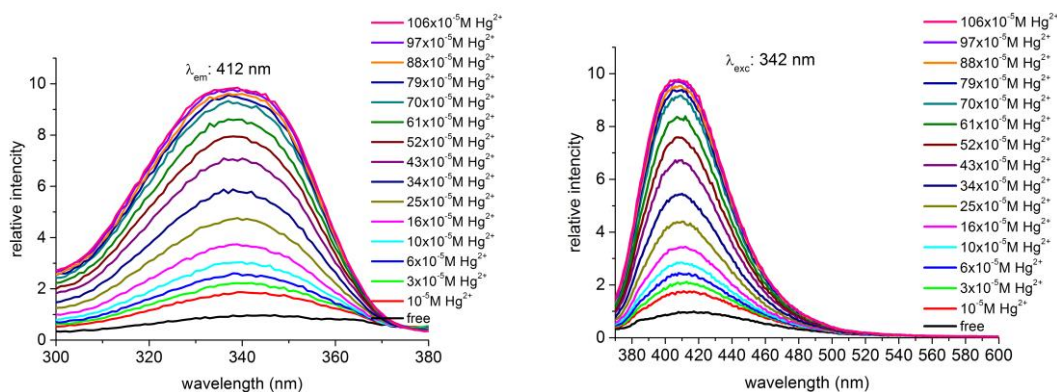
Η πρώτη μέτρηση (μηδενική) είναι αυτή του ελεύθερου δείκτη. Ακολουθείται από την πράσινη ράβδο της σχετικής έντασης φθορισμού (θετικής) του δείκτη με την

προσθήκη μόνο ιόντων Hg^{2+} . Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού (θετική) του δείκτη **12** παρουσία 300 μM των υπό εξέταση μεταλλικών ιόντων, ενώ οι πράσινες αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού με την επακόλουθη προσθήκη 300 μM Hg^{2+} στο κάθε δείγμα. Η μελέτη εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 300 μM ιόντων καθώς, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση εμφανίζεται ο κορεσμός του δείκτη **12** ως προς το ιόν του Hg^{2+} .

Τα συμπεράσματα τα οποία εξάγονται από τον παραπάνω πίνακα είναι πως τα μεταλλικά ιόντα τα οποία ανταγωνίζονται το ιόν του Hg^{2+} είναι κυρίως το ιόν του Cd^{2+} , ακολουθούμενο από τα ιόντα Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Ni^{2+} και του Fe^{2+} .

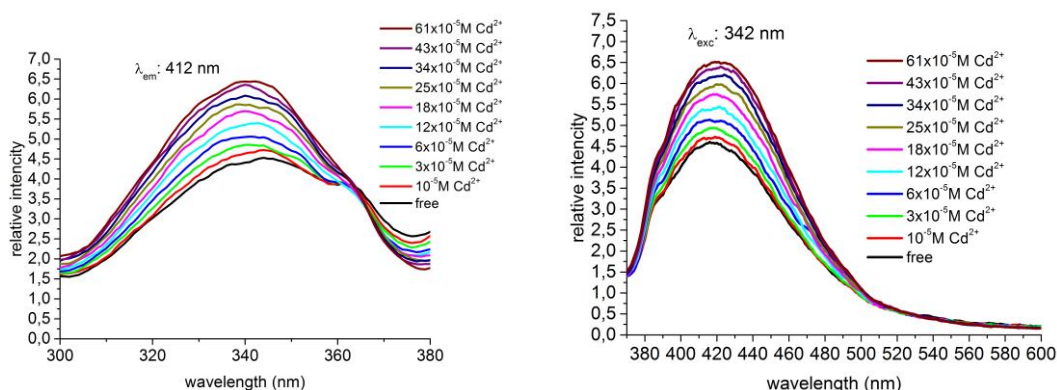
Η τελευταία ένωση η οποία μελετήθηκε ήταν ο δείκτης **13**, του οποίου, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η κύρια διαφορά από τους υπόλοιπους δείκτες, είναι ότι περιλαμβάνει δύο ομάδες του ίδιου χρωμοφόρου στη δομή του.

Η πρώτη μέτρηση φθορισμού η οποία πραγματοποιήθηκε ήταν αυτή για τα ιόντα Hg^{2+} , και τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής παρατίθενται ακολούθως. Να σημειωθεί πως το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής παρουσία ιόντων Hg^{2+} είναι λ_{exc} : 342nm και λ_{em} : 412nm αντιστοίχως και με τιμή $K_d = 179.7\mu\text{M}$. Είναι σημαντικό να αναφερθεί η υψηλή τιμή συγκέντρωσης κορεσμού του δείκτη **13** ως προς το υπό εξέταση ιόν του Hg^{2+} , καθώς αυτή εμφανίζεται να είναι στη συγκέντρωση των 970 μM Hg^{2+} , συγκέντρωση κορεσμού ακόμα υψηλότερη σε σχέση με αυτήν του δείκτη **12**. Επίσης είναι εμφανής η “turn-on” απόκριση του δείκτη **13**, αφού η σχετική ένταση φθορισμού αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων Hg^{2+} στο διάλυμα του ελεύθερου δείκτη.

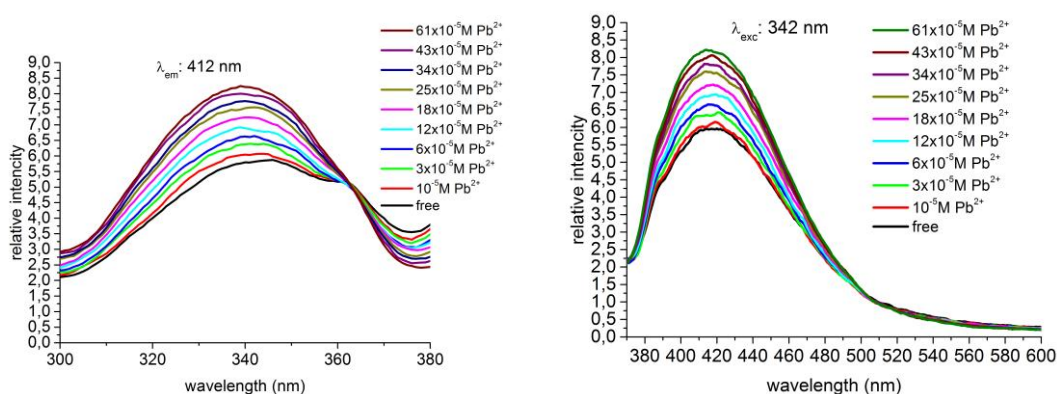


Εικόνα 12. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Hg^{2+}

Ακολουθως παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού του δείκτη **13** παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των «μαλακών» ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+} .



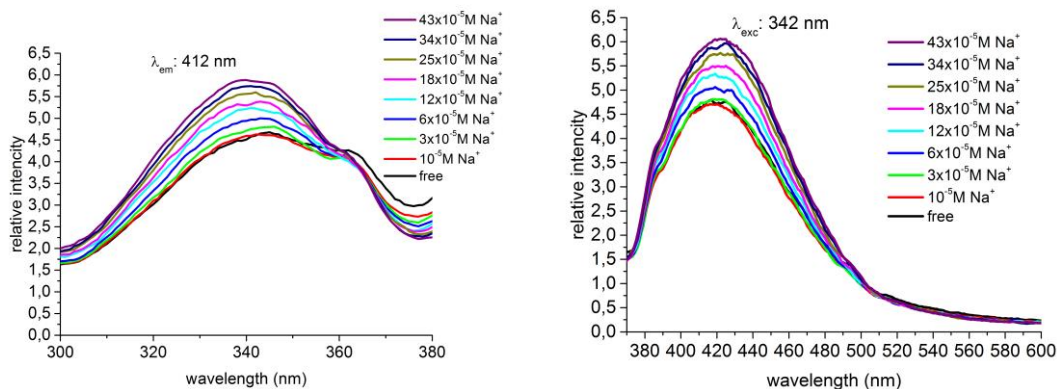
Εικόνα 13. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cd^{2+}



Εικόνα 14. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Pb^{2+}

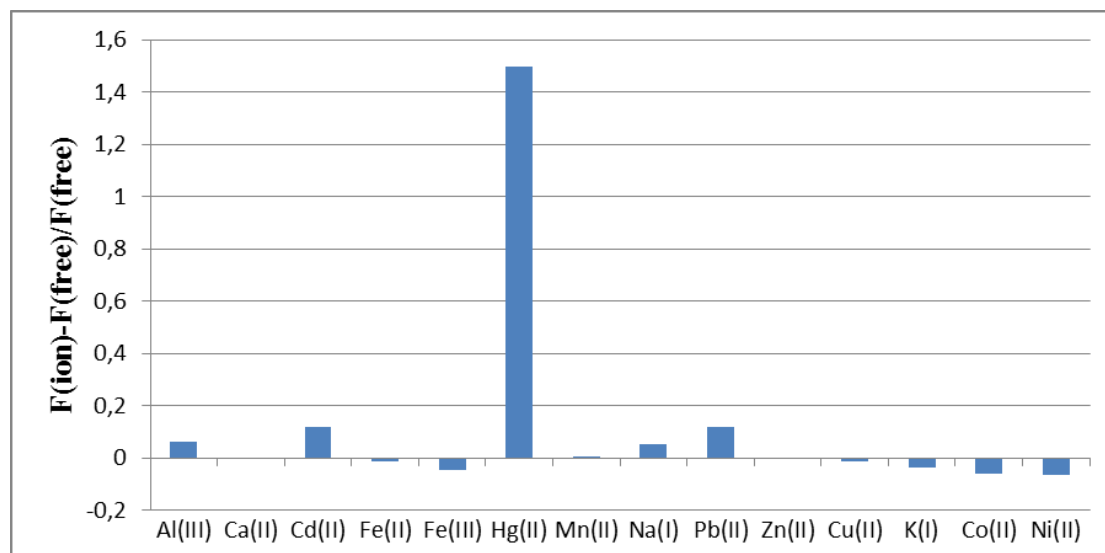
Σύμφωνα με τα παραπάνω φάσματα φθορισμού ο δείκτης **13** αποκρίνεται επίσης θετικά στα «μαλακά» ιόντα του Cd^{2+} και του Pb^{2+} , και συγκεκριμένα η σχετική ένταση φθορισμού αυξάνεται, αυξανόμενων των συγκεντρώσεων Cd^{2+} και Pb^{2+} αντίστοιχα, επομένως ο δείκτης **13** παρουσία των δύο αυτών ιόντων συμπεριφέρεται σαν “turn-on”.

Ωστόσο, ένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής και διέγερσης του δείκτη **13** είναι ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων Na^+ στο διάλυμα, αλλάζει η συμπεριφορά του δείκτη. Συγκεκριμένα σε συγκεντρώσεις μέχρι και $30\mu\text{M}$ ο δείκτης **13** δε φαίνεται να αποκρίνεται στο ιόν Na^+ . Αντιθέτως, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Na^+ , έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σχετικής έντασης φθορισμού. Η παραπάνω παρατήρηση αποτυπώνεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Na^+

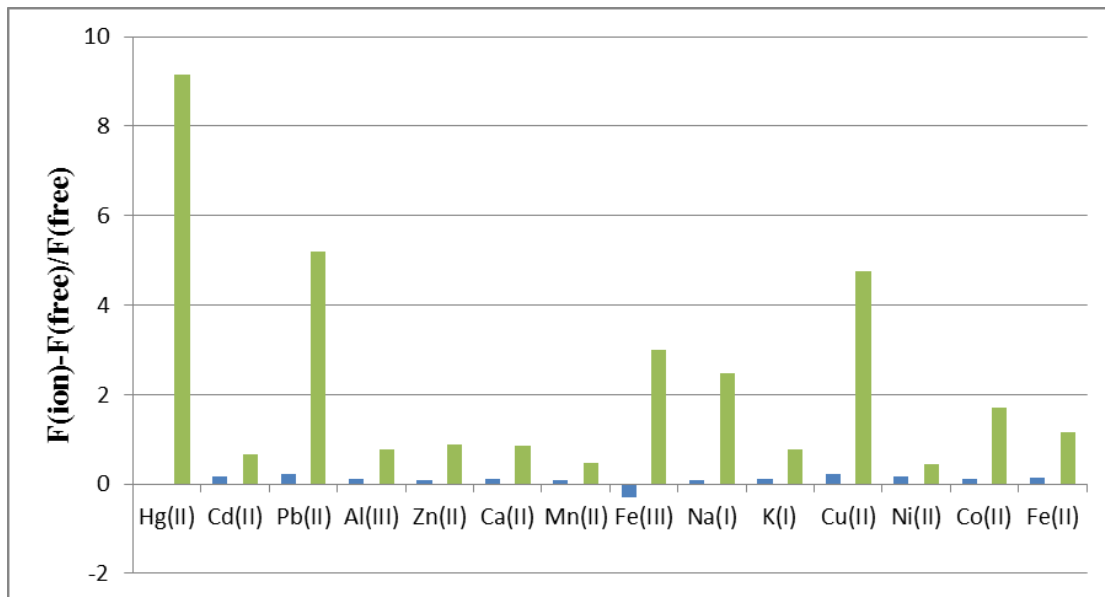
Κατόπιν, παρατίθεται το συγκριτικό ραβδόγραμμα απόκρισης φθορισμού του δείκτη **13** με όλα τα ιόντα που μελετήθηκαν.



Διάγραμμα 6. Συγκριτικό ραβδόγραμμα απόκρισης φθορισμού του δείκτη **13** συγκέντρωσης $10\mu M$ σε διαλύματα ιόντων συγκέντρωσης $60\mu M$

Από το παραπάνω ραβδόγραμμα το βασικό συμπέρασμα το οποίο εξάγεται είναι πως ο δείκτης **13** αποκρίνεται κατά κύριο λόγο στο ιόν του Hg^{2+} .

Το φθορισμομετρικό προφίλ του δείκτη **13** ολοκληρώνεται με την μελέτη εκλεκτικότητας μετάλλων, η οποία και παρουσιάζεται στο παρακάτω ραβδόγραμμα.



Διάγραμμα 7. Μελέτη ανταγωνισμού κατιόντων για το δείκτη **13**.

Η πρώτη μέτρηση (μηδενική) είναι αυτή του ελεύθερου δείκτη. Ακολουθείται από την πράσινη ράβδο της σχετικής έντασης φθορισμού (θετικής) του δείκτη παρουσία μόνο ιόντων Hg^{2+} . Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού (θετική ή αρνητική) του δείκτη **13** παρουσία $970 \mu\text{M}$ των υπό εξέταση μεταλλικών ιόντων, ενώ οι πράσινες αντιπροσωπεύουν τη σχετική ένταση φθορισμού με την επακόλουθη προσθήκη $970 \mu\text{M}$ Hg^{2+} στο κάθε δείγμα. Η μελέτη εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση των $970 \mu\text{M}$ ιόντων καθώς, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση εμφανίζεται ο κορεσμός του δείκτη **13** ως προς το ιόν του Hg^{2+} .

Το συμπέρασμα που εξάγεται από την μελέτη ανταγωνισμού κατιόντων για το δείκτη **13** είναι ότι:

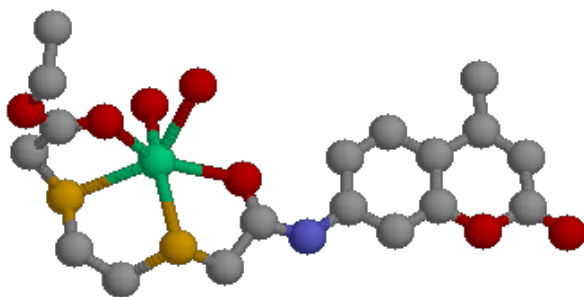
- ο δείκτης **13** αποκρίνεται με αύξηση φθορισμού κατά κύριο λόγο στην αύξηση συγκέντρωσης των ιόντων Hg^{2+} .
- αποκρίνεται όμως επίσης με αύξηση φθορισμού στην αύξηση συγκέντρωσης όλων των υπό μελέτη ιόντων.
- ταυτόχρονη παρουσία άλλων ιόντων στο ελεύθερο διάλυμα του δείκτη, όπως για παράδειγμα των ιόντων Cd^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Ni^{2+} και Fe^{2+} , με τα ιόντα Hg^{2+} έχει σαν αποτέλεσμα τα ιόντα αυτά να ανταγωνίζονται την δέσμευση του Hg^{2+} με τον **13**.

Τέλος παρουσιάζονται οι βελτιστοποιημένες γεωμετρίες μέσω υπολογισμών DFT (Density Functional Theory) που πραγματοποιήθηκαν για τα σύμπλοκα δεικτών – Hg^{2+} σε περιβάλλον νερού.

Σε πρώτη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκαν ημι-εμπειρικές μέθοδοι κβαντικής χημείας για να εντοπισθούν κάποιες ενεργειακά προτιμώμενες διαμορφώσεις των συμπλόκων υδραργύρου.⁶⁹

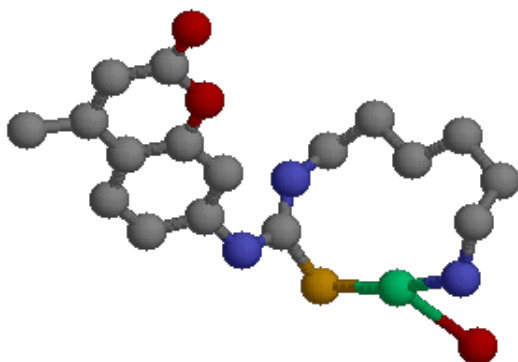
Οι μοριακές διαμορφώσεις που προέρχονται από τους ημι-εμπειρικούς υπολογισμούς διερευνήθηκαν περαιτέρω με την εκτέλεση πιο εξελιγμένων υπολογισμών της κβαντικής χημείας στο πλαίσιο της Density Functional Theory (DFT).⁷⁰

Όπως φαίνεται στο σχήμα 12 το ιόν Hg^{2+} συναρμόζεται με το αμιδικό άζωτο τα δύο άτομα θείου και το οξυγόνο του εστερικού καρβονυλίου του δείκτη **7**, ενώ εμφανίζει τη δυνατότητα συναρμογής με δύο μόρια νερού σε μία γεωμετρία παραμορφωμένου οκταέδρου.



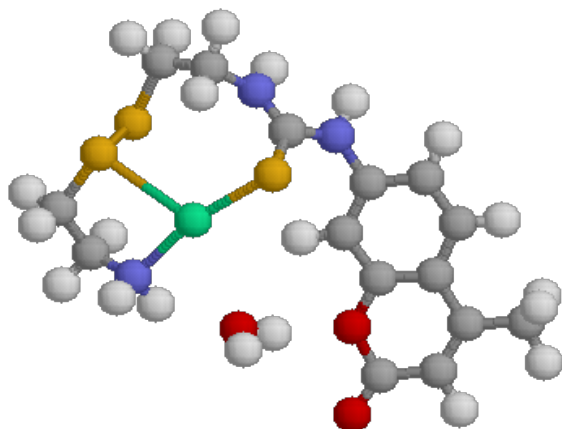
Σχήμα 12. Βελτιστοποίηση γεωμετρίας μέσω υπολογισμών DFT για το σύμπλοκο **7**- Hg^{2+} παρουσία μορίων νερού. Τα άτομα αντιπροσωπεύονται με τα εξής χρώματα: υδράργυρος: πράσινο, θείο: κίτρινο, άζωτο: μπλε, οξυγόνο: κόκκινο, άνθρακας: γκρι. Τα άτομα υδρογόνου δεν εμφανίζονται για λόγους ευκρίνειας του σχήματος. Διακρίνονται δύο μόρια νερού συναρμοσμένα με το άτομο υδραργύρου.

Στο σχήμα 13 η συναρμογή του ιόντος Hg^{2+} με το δείκτη **10** είναι η πλέον απλουστευμένη. Τα σημεία συναρμογής είναι το άτομο θείου του δυνδέτη της θειουρίας και το τελικό άζωτο της διαμίνης, ενώ εμφανίζει δυνατότητα συναρμογής και με ένα μόριο νερού. Η γεωμετρία του συμπλόκου εμφανίζεται τριγωνική γεωμετρία.



Σχήμα 13. Βελτιστοποίηση γεωμετρίας μέσω υπολογισμών DFT για το σύμπλοκο **10**-Hg²⁺ παρουσία μορίων νερού. Τα άτομα αντιπροσωπεύονται με τα εξής χρώματα: υδράργυρος: πράσινο, θείο: κίτρινο, άζωτο: μπλε, οξυγόνο: κόκκινο, άνθρακας: γκρι. Τα άτομα υδρογόνου δεν εμφανίζονται για λόγους ευκρίνειας του σχήματος. Διακρίνεται ένα μόριο νερού συναρμοσμένο με το άτομο υδραργύρου.

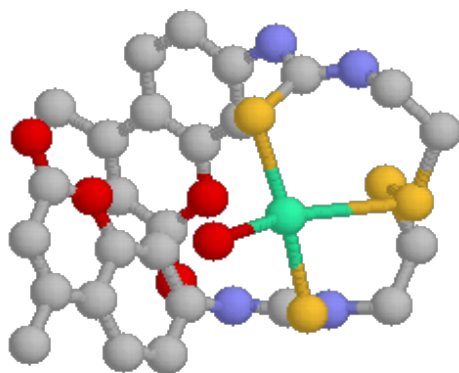
Στο σχήμα 14 το ιόν Hg²⁺ συναρμόζεται με το άτομο θείου του δυνδέτη της θειουρίας, το ένα από τα δύο άτομα θείου και την τελική αμινομάδα του ιονοφόρου. Ενδιαφέρον εμφανίζει η τάση του συμπλόκου να μην συναρμόζει μόρια νερού με αποτέλεσμα να εμφανίζει τριγωνική γεωμετρία.



Σχήμα 14. Βελτιστοποίηση γεωμετρίας μέσω υπολογισμών DFT για το σύμπλοκο **12**-Hg²⁺ παρουσία μορίων νερού. Τα άτομα αντιπροσωπεύονται με τα εξής χρώματα: υδράργυρος: πράσινο, θείο: κίτρινο, άζωτο: μπλε, οξυγόνο: κόκκινο, άνθρακας: γκρι, υδρογόνο: λευκό. Δεν υπάρχουν μόρια νερού συναρμοσμένα με το άτομο υδραργύρου.

Στο σχήμα 15 το ιόν Hg²⁺ συναρμόζεται με τα δύο άτομα θείου των δύο δυνδετών θειουρίας, και το ένα από τα δύο άτομα θείου του ιονοφόρου. Το σύμπλοκο εμφανίζει

δυνατότητα συναρμογής με ένα μόριο νερού εμφανίζοντας τελικά μία τετραεδρική γεωμετρία. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι σε υδατικό περιβάλλον ο ελεύθερος δείκτης εμφανίζει ισχυρές π-π αλληλεπιδράσεις των δύο αρωματικών χρωμοφόρων με αποτέλεσμα το μόριο να έχει χαρακτηριστικά μακροκυκλικού συστήματος.



Σχήμα 15. Βελτιστοποίηση γεωμετρίας μέσω υπολογισμών DFT για το σύμπλοκο **13**-Hg²⁺ παρουσία μορίων νερού. Τα άτομα αντιπροσωπεύονται με τα εξής χρώματα: υδράργυρος: πράσινο, θείο: κίτρινο, άζωτο: μπλε, οξυγόνο: κόκκινο, άνθρακας: γκρι. Τα άτομα υδρογόνου δεν εμφανίζονται για λόγους ευκρίνειας του σχήματος. Διακρίνεται ένα μόριο νερού συναρμοσμένο με το άτομο υδραργύρου.

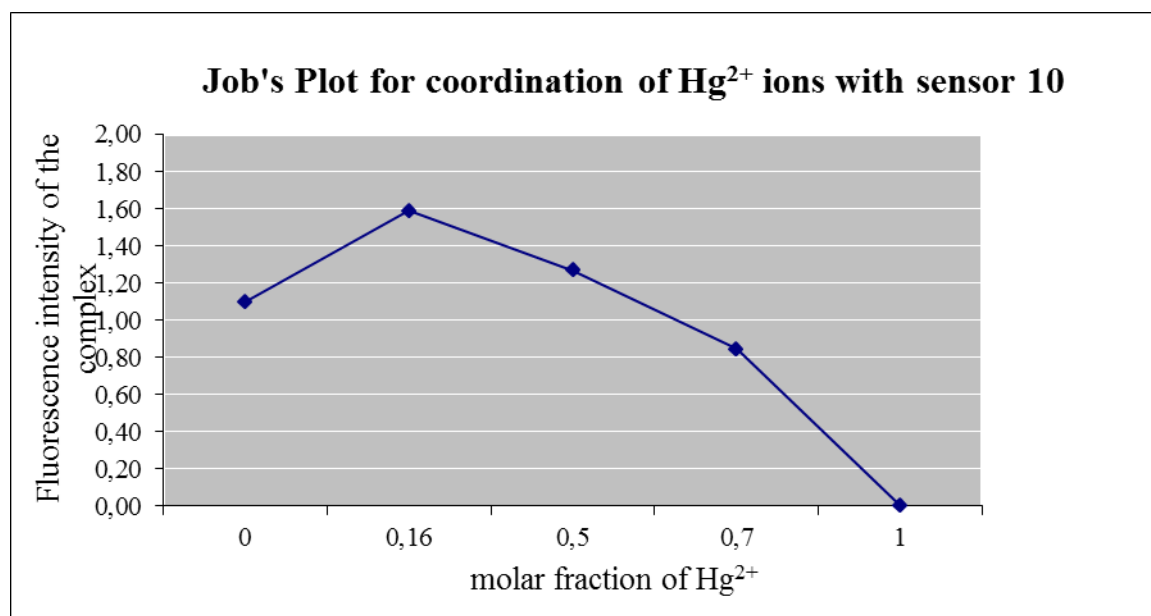
Από τις ανωτέρω μελέτες και από τις μελέτες εκλεκτικότητας των δεικτών για το ιόν Hg²⁺ θα μπορούσε να εξαχθεί το ακόλουθο συμπέρασμα: Οι δείκτες **12** και **13** συναρμόζονται με το ιόν Hg²⁺ μέσω τριών και ο δείκτης **7** μέσω τεσσάρων ατόμων-δότη. Οι ενώσεις **12** και **13** είναι «turn-on» δείκτες Hg²⁺ αλλά ανταγωνίζονται από άλλα βιολογικά ιόντα. Η ένωση **7** εμφανίζει το πλέον μειονεκτικό φθορισμομετρικό προφίλ σαν «turn-off» δείκτης ο οποίος ανταγωνίζεται από όλα τα υπό μελέτη ιόντα. Αντίθετα, ο δείκτης **10**, ο οποίος παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το ιόν Hg²⁺ διαθέτει μόνο δύο θέσεις συναρμογής. Κατά συνέπεια, είναι πιθανόν στα μη κυκλικά συστήματα μικρών μορίων-δεικτών Hg²⁺ η μείωση του αριθμού συναρμογής να συνεπάγεται αύξηση της εκλεκτικότητας.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η πρόταση, ότι η μείωση των θέσεων συναρμογής σε άκυκλα συστήματα συνεπάγεται αύξηση της εκλεκτικότητας για το ιόν του Hg²⁺ εφαρμόστηκε η μέθοδος του Job (Job's plot).^{71,72}

Το Job's plot είναι μια απλή και αποτελεσματική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της χημικής στοιχειομετρίας μιας αντίδρασης στο πλαίσιο της γενικής αντίδρασης $A+B \leftrightarrow AB$, η οποία μπορεί να απεικονίζει π.χ. τη δημιουργία ενός συμπλόκου. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά διαλύματα των οποίων η συνολική συγκέντρωση των ιόντων Hg^{2+} και του δείκτη **10** ήταν σταθερή στα 100 μM . Το γραμμομοριακό κλάσμα για το ιόν Hg^{2+} είναι για το πρώτο διάλυμα 0 για το δεύτερο 0.16 για το τρίτο 0.50 για το τέταρτο 0.70 και για το πέμπτο 1. Η σύσταση των διαλυμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Hg^{2+} (μM)	0	16	50	70	100
Sensor 10 (μM)	100	84	50	30	0
Molar fraction of Hg^{2+}	0	0.16	0.50	0.70	1

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει το επόμενο διάγραμμα το οποίο είναι συνάρτηση του γραμμομοριακού κλάσματος των ιόντων Hg^{2+} σε σχέση με την ένταση φθορισμού του συμπλόκου **10**- Hg^{2+} όταν αυτή μετράται στα 409 nm.



Διάγραμμα 1. Job's plot για τον δείκτη **10**

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται ένα μέγιστο περίπου στο 0.2 του γραμμομοριακού κλάσματος των ιόντων του Hg^{2+} το οποίο σημαίνει πως το γραμμομοριακό κλάσμα για τον δείκτη **10** είναι 0.8. Συνεπώς από τα γραμμομοριακά κλάσματα προκύπτει μία αναλογία ιόντων Hg^{2+} /δείκτη **10**, 1 προς 4. Η αναλογία αυτή υποδηλώνει πως πιθανά ένα ιόν Hg^{2+} συναρμόζεται με τέσσερα μόρια του δείκτη **10**.

Άρα η υπόθεση πως σε άκυκλα συστήματα η μείωση των θέσεων συναρμογής έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της εκλεκτικότητας για τα ιόντα Hg^{2+} δεν μπορεί να ισχύει, όπως υποστηρίζουν τα δεδομένα του Job's plot.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της ερευνητικής αυτής εργασίας ήταν η σύνθεση φθορίζοντων δεικτών που θα εμφάνιζαν εκλεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και ιδιαίτερα στο μεταλλικό ιόν του υδραργύρου

Τελικά συντέθηκαν τέσσερις δείκτες, καθένας εκ των οποίων περιείχε στο βασικό του σκελετό τουλάχιστον ένα άτομο θείου ή αζώτου ή και τα δύο εξ αυτών με τα οποία αναμένεται να συναρμοστεί το ιόν του Hg^{2+} .

- Όσο αφορά στο δείκτη **7**, περιέχει στο βασικό του σκελετό δύο άτομα θείου και σαν χρωμοφόρο την 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη.

Από τις μετρήσεις φθορισμού αποδείχθηκε πως δεν είναι επιλεκτικός ως προς τον υδράργυρο αλλά σε όλα μεταλλικά ιόντα τα οποία εξετάστηκαν και μάλιστα συμπεριφέρεται σαν δείκτης “turn off”, με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης λ_{exc} : 335nm και μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής λ_{em} : 395nm.

Η σταθερά διάστασής του για τα ιόντα Hg^{2+} υπολογίστηκε ως $K_d = 37.58\mu\text{M}$.

- Ο δείκτης **10**, εμπεριέχει στο σκελετό του μόνο ένα άτομο θείου, αυτό της ομάδας της θειουρίας η οποία λειτουργεί σαν συνδέτης (linker) του χρωμοφόρου με το ιονοφόρο τμήμα.

Είναι απόλυτα επιλεκτικός ως προς τα ιόντα του Hg^{2+} , με συμπεριφορά “turn on”, με μέγιστα μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης λ_{em} : 409nm και λ_{exc} : 337nm, αντίστοιχα και τιμή $K_d = 10.17\mu\text{M}$.

Δεδομένου ότι η συναρμογή άλλων ιόντων εκτός του υδραργύρου με τον δείκτη προκαλεί μείωση της έντασης φθορισμού, η συναρμογή αυτή δεν επηρεάζει «προσθετικά» την αύξηση της έντασης φθορισμού που οφείλεται στη σύνδεση του δείκτη με τα ιόντα υδραργύρου όταν αυτά βρίσκονται σε κάποιο βιολογικό δείγμα.

Γενικά, εάν η προσθήκη οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος σε διάλυμα του **10** οδηγήσει σε αύξηση του σήματος φθορισμού, αυτό θα είναι ένδειξη ύπαρξης των ιόντων Hg^{2+} στο βιολογικό δείγμα.

- Ο δείκτης **12**, διαθέτει στο βασικό του σκελετό δύο άτομα θείου τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με απλό δεσμό, χωρίς την ύπαρξη κάποιου ατόμου άνθρακα ανάμεσά τους.

Διαθέτει επιπλέον ένα άτομο θείου, αυτό της θειουρίας το οποίο λειτουργεί ως συνδέτης ανάμεσα στο χρωμοφόρο και το ιονοφόρο τμήμα. Η συγκεκριμένη ένωση επίσης αποκρίνεται στα ιόντα Hg^{2+} με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 337nm και λ_{em} : 407nm αντιστοίχως και τιμή $K_d = 36.31\mu\text{M}$. Αποκρίνεται όμως και στο επίσης «μαλακό» ιόν του Cd^{2+} στα ίδια μέγιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής όπως αυτά του Hg^{2+} και με τιμή $K_d = 22.33\mu\text{M}$.

Ένα από τα μειονεκτήματα του δείκτη **12** είναι ότι έχει μεγάλη απόκριση στα ιόντα K^+ , τα οποία και ανταγωνίζεται τα ιόντα Hg^{2+} , όπως φαίνεται από τη μελέτη εκλεκτικότητας, ενώ μειονέκτημα θεωρείται επίσης ο ισχυρός ανταγωνισμός των ιόντων Hg^{2+} από τα ιόντα Cd^{2+} .

- Τέλος, για τον δείκτη **13** είναι σημαντικό να αναφερθεί πως είναι ο μόνος δείκτης ο οποίος εμπεριέχει δύο ομάδες του ίδιου χρωμοφόρου στη δομή του. Αυτό συνεπάγεται την ύπαρξη τεσσάρων ατόμων θείου στο βασικό του σκελετό, καθώς τα δύο βρίσκονται στο ιονοφόρο τμήμα και τα άλλα δύο προέρχονται από την ομάδα της θειουρίας.

Από το συγκριτικό ραβδόγραμμα 6 είναι εμφανής η προτίμηση του δείκτη **13** ως προς τα ιόντα του Hg^{2+} , με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα λ_{exc} : 342nm και λ_{em} : 412nm αντιστοίχως και με τιμή $K_d = 179.7\mu\text{M}$.

Το μειονέκτημα του συγκεκριμένου δείκτη είναι ότι, η παρουσία των περισσότερων ιόντων που εξετάστηκαν στη μελέτη εκλεκτικότητας, ανταγωνίζονται το ιόν του Hg^{2+} .

- Η αρχική υπόθεση που προέκυψε από τις θεωρητικές μελέτες ότι σε άκυκλα συστήματα η μείωση των θέσεων συναρμογής έχει σαν αποτέλεσμα της αύξηση της εκλεκτικότητας για τα ιόντα Hg^{2+} απορρίφθηκε από τα πειραματικά δεδομένα (Job's plot), τα οποία έδειξαν ότι είναι δυνατό το ιόν του υδραργύρου να συναρμόζεται με περισσότερα από ένα των υπό μελέτη μορίων δεικτών.
- Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, ο καταλληλότερος δείκτης για την μέτρηση ιόντων Hg^{2+} σε βιολογικά συστήματα είναι ο δείκτης **10**, καθώς εμφανίζει τα περισσότερα πλεονεκτήματα.

ΣΤ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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

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

Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας T.L.C. σε γυάλινα πλακίδια επιστρωμένα με ξηροπηκτική διοξειδίου του πυριτίου- Silica Gel τύπου 60F₂₅₄. Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία UV 254nm και 360 nm, εμφάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα 7% φωσφομολυβδαινικού οξέος και θέρμανση ή έκθεση των πλακιδίων σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου. Ως διαλύτες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα CH₂Cl₂-διαιθυλαιθέρα (0,2:8) ή EtOAc-πετρελαϊκού αιθέρα (4:6) ή EtOAc-πετρελαϊκού αιθέρα(5:5). Για την χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε silica gel 60, 230-400 mesh.

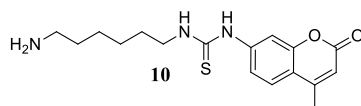
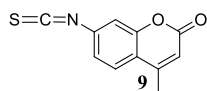
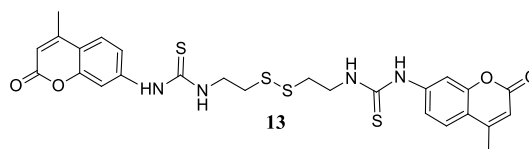
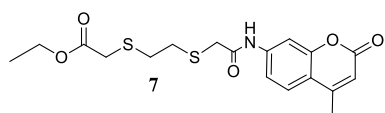
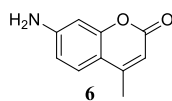
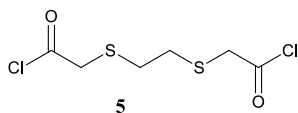
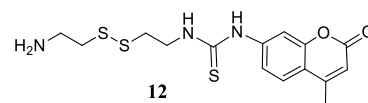
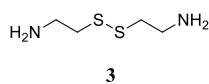
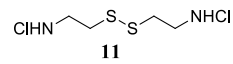
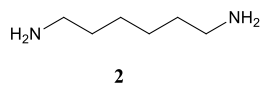
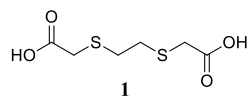
Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρα FT-NMR AMX500 (500MHz) και MSL300 (300MHz) της εταιρίας Bruker. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων αναγράφονται σε ppm, σε σχέση με την μετατόπιση του τετραμεθυλοσιλανίου.

Τα μονοδιάστατα φάσματα ¹H-NMR ελήφθησαν με 64K πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν από 16 έως 64 FIDs οι οποίες αποθηκεύτηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Το φασματικό εύρος ήταν από 12 έως 14 ppm. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν από την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών. Ο χρόνος ανάκτησης (acquisition time) ήταν 2,7s, ενώ ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) μεταξύ δυο συνεχόμενων ακολουθιών παλμών ήταν 1s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης.

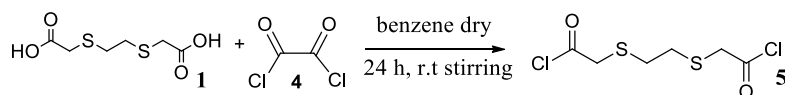
Τα μονοδιάστατα φάσματα ¹³CNMR ελήφθησαν με 64K πραγματικά δεδομένα και φασματικό εύρος από 200 έως 220 ppm. Για κάθε φάσμα ελήφθησαν από 2000 έως 10000 FIDs, οι οποίες αποθηκεύτηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ψευδοσαρώσεις ώστε η θερμοκρασία του δείγματος και το σύστημα των spin να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 3s. Η τιμή του παλμού 90 είχε διάρκεια 10.3μs. Πριν το μετασχηματισμό Fourier η ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) πολλαπλασιάστηκε με μια εκθετική συνάρτηση, με εκθέτη lb= 3Hz, για την αύξηση της ευαισθησίας του πειράματος και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη 64K μηδενικών στη μνήμη του υπολογιστή. Μετά το μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης.

Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν σε φασματοφωτοφθορισμόμετρο Aminco Bowman (Spectronics Co., USA).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (g/ml)
2,2'-(αιθυλενοδιθειο) οξικό οξύ	210.27	1.535	0.0073 ⁽¹⁾		
Οξάλλοχλωρίδιο	126.93	11.12	0,088 ⁽¹²⁾	7.4	1.4785
Βενζόλιο (dry)				22	

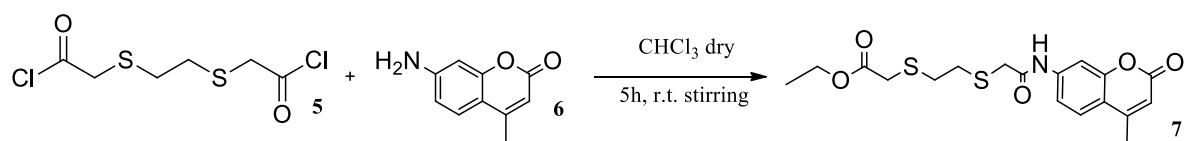
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη των 100ml, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, μεταφέρθηκαν γρήγορα 1.535g 2,2'-(αιθυλενοδιθειο)αιθανικού οξέος. Στη συνέχεια προστέθηκε το άνυδρο βενζόλιο και τέλος προστέθηκαν 7.4ml οξάλλοχλωριδίου. Η φιάλη καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, καθώς τα χλωρίδια είναι ευαίσθητα στο φως, και αφέθηκε σε ανάδευση για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης και η περίσσεια οξάλλοχλωριδίου απομακρύνθηκαν με απόσταξη υπό κενό. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο ξηρού πάγου-ακετόνης και προστέθηκε πεντάνιο για 30 min. Ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών με απόχυση. Η διαδικασία προσθήκης πεντανίου και απόχυσης πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 98% (1,77g).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 2.80 (s, 4H), 3.71 (s, 4H).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 7



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (g/ml)
Ένωση 5	247.16	0.140	0.0006 ⁽¹⁾		
7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη	175.19	0.210	0.0012 ⁽²⁾		
CHCl ₃ (dry)				15	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε δίλαμη προξηραμένη φιάλη των 50ml, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, προστέθηκαν 15ml ξηρού χλωροφορμίου και 210mg 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης, τα οποία αφέθηκαν σε ανάδευση για 15min. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε στάγδην προσθήκη της διαλυμένης σε ξηρό χλωροφόρμιο ένωσης **5** και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες, όπου και παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού ιζήματος (παραπροϊόν). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε σε σωλίνες φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο από τις φυγοκεντρήσεις συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε ξανά για την πλήρη απομάκρυνση του λευκού ιζήματος. Τα συνολικά υπερκείμενα μέρη μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και υποβλήθηκαν σε απόσταξη υπό κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη. Το μίγμα διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel, με σύστημα έκλουσης: οξικός αιθυλεστέρας:πετρελαϊκός αιθέρας = 4:6. Η ένωση **7** παραλήφθηκε σε ποσοστό 23% (18mg).

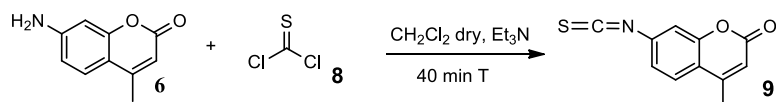
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ= 8.99 (br.s, 1H), 7.66 (d, *J*= 2 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J*₁= 2 Hz, *J*₂= 8.5 Hz, 1H), 7.56 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 4.18 (q, *J*= 7 Hz 2H), 3.43 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.91 (m, 4H), 2.42 (d, *J*= 1.5 Hz, 3H), 1.28 (t, *J*₁= 7.5 Hz,).

¹³C-NMR (500MHz, CDCl₃): δ= 170.42, 167.56, 161.11, 154.19, 152.34, 141.04, 125.34, 116.43, 115.65, 113.58, 107.16, 61.72, 36.95, 33.52, 32.49, 32.03, 18.62, 14.14

TLC-SSI-MS (m/z): 396 (M⁺), 418 (M+Na⁺), 434 (M+K⁺).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 9



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (^g /ml)
7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη	175.19	0.245	0.0014 ⁽¹⁾		
θειοφοσγένειο	114.98	0.483	0.0042 ⁽³⁾	0.320	1.508
Et ₃ N	101.19	0.283	0.0028 ⁽²⁾	0.390	0.726
CH ₂ Cl ₂ (dry)				14	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

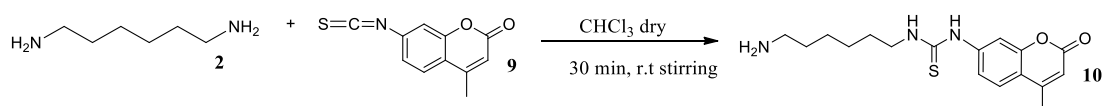
Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 50ml, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, μεταφέρθηκαν γρήγορα 245mg 7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνης και στην ίδια φιάλη εισήχθησαν 14ml άνυδρου CH₂Cl₂ και 0.390ml Et₃N. Το διάλυμα αυτό αναδευτήκε στους 35°C για 10min. Αφού το διάλυμα επανήλθε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε πολύ προσεκτικά η περίσσεια του θειοφοσγενείου. (το θειοφοσγένειο εισέρχεται σε περίσσεια καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην υγρασία και υδρολύεται πάρα πολύ γρήγορα). Μετά την προσθήκη του θειοφοσγενείου το μίγμα θερμάνθηκε στους 35°C για 20min. Κατόπιν από το μίγμα απομακρύνθηκε ο διαλύτης με απόσταξη υπό κενό σε rotary evaporator. (Προσοχή: θεωρείται απαραίτητη η χρήση παγίδας για την συγκέντρωση των υπολειμμάτων θειοφωσγενίου). Η απομάκρυνση του άλατος της τριαιθυλαμίνης πραγματοποιήθηκε με διήθηση υπό κενό του αραιωμένου σε 10ml CH₂Cl₂ μίγματος, δια μέσου silica gel. Η αντίδραση έλαβε χώρα με απόδοση 98% (301mg).

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ= 7.57 (d, J= 9 Hz, 1H), 7.16 (m, 2H), 6.29 (s, 1H), 2.43 (d, J= 1 Hz, 3H)

¹³C-NMR (500MHz, CDCl₃): δ= 160.13, 154.21, 151.61, 138.83, 134.67, 125.90, 122.10, 119.11, 115.38, 113.99, 18.81.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 10



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (g/ml)
1,6-εξανδιαμίνη	116.20	0.030	0.00026 ⁽¹⁾		
Ένωση 9	217.25	0.112	0.0052 ⁽²⁾		
CHCl_3 (dry)				6	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε δίλαιμη προξηραμένη φιάλη των 25ml, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, προστέθηκαν αρχικά 6ml άνυδρου χλωροφορμίου, κατόπιν 30mg 1,6-εξανδιαμίνης και τέλος 112mg της ένωσης 9. Μετά το πέρας 30min ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση έλαβε τέλος ενώ παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού ιζήματος (παραπροϊόν). Το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε και το διήθημα αποστάχθηκε σε rotary evaporator για απομάκρυνση του διαλύτη. Τα 17mg του μίγματος που παραλήφθηκε, διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης silica gel με σύστημα έκλουσης: οξικός αιθυλεστέρας : πετρελαϊκός αιθέρας = 1:1. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 10% (8mg).

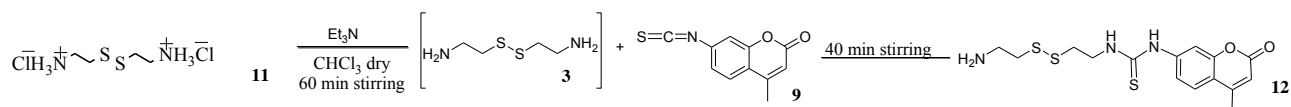
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.54 (d, J = 9.0 Hz), 7.45 (dd, J_1 = 9.0 Hz, J_2 = 2,5 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.27 (br.s., 1H) 7.13 (br. s, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.81 (dd, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 14,5 Hz, 4H), 2.41 (d, J = 1 Hz, 3H), 1.35 (m, 6H), 1.25 (br.s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ = 180.32, 161.28, 153.98, 152.67, 143.61, 124.45, 121.41, 116.85, 113.80, 11.87, 46.08, 45.08, 29.89, 29.82, 28.79, 18.80, 12.83.

ESI-MS (m/z): 334 (M^+) 315 (M-16), 303 (M-30), 289 (M-44), 275 (M-58), 261 (M-72), 247 (M-86), 235 (M-100), 217 (M-116)

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (^g /ml)
Διυδροχλωρικό άλας της κυσταμίνης	225.50	0.090	0.0004 ⁽¹⁾		
Ένωση 9	217.25	0.177	0.0008 ⁽²⁾		
Et ₃ N	101.19	0.283	0.0008 ⁽²⁾	0.111	0.726
CHCl ₃ (dry)				14	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

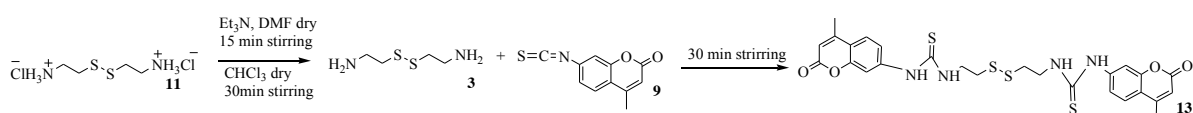
Σε δίλιαιμη προξηραμένη σφαιρική φιάλη, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, μεταφέρθηκαν 90mg διυδροχλωρικού άλατος της κυσταμίνης, 14ml άνυδρου χλωροφορμίου και 110 μl Et₃N. Το διάλυμα αυτό αφέθηκε σε ανάδευση για 1 ώρα και από θολό με παρουσία κόκκων μετατράπηκε σε διαυγές, υποδηλώνοντας το σχηματισμό της ένωσης **3**. Τέλος προστέθηκαν 283mg της ένωσης **9** και η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 40min ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ιζήματος. Το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε και απομονώθηκαν 59mg ιζήματος, το οποίο ήταν η ένωση **12** η οποία περιείχε μέρος της ένωσης **3** η οποία δεν αντέδρασε. Ο καθαρισμός του ιζήματος πραγματοποιήθηκε με ανάδευση σε θερμό οξικό αιθυλεστέρα και επαναλαμβανόμενες διηθήσεις. Τελικά το ίζημα που απομονώθηκε ήταν 29mg με απόδοση αντίδρασης 20%.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ= 10.18 (br.s, 1H), 8.33 (br.s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.68 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.39 (dd, J₁= 8.4 Hz, J₂= 1.8 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.83 (dd, J₁= 6.3 Hz, J₂=5.1 Hz, 2H), 3.10 (t, J₁= 6.9 Hz, 2H), 3.01 (t, J₁= 6.3 Hz, 2H), 2.94 (t, J₁= 6.9 Hz, 2H), 2.40 (d, J= 1.2 Hz, 3H).

¹³C-NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ= 180.25, 160.02, 153.12, 143.14, 125.63, 117.60, 115.09, 112.38, 107.74, 42.81, 37.80, 36.13, 33.95, 18.01.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 13



Ένωση	Μοριακό Βάρος (Mr)	m (g)	Moles (eq)	V (ml)	d (g/ml)
Διυδροχλωρικό άλας της κυσταμίνης	225.50	0.090	0.0004 ⁽¹⁾		
Ένωση 9	217.25	0.177	0.0008 ⁽²⁾		
Et ₃ N	101.19	0.283	0.0004 ⁽¹⁾	0.05	0.726
CHCl ₃ (dry)				14	
DMF (dry)				3	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε δίλιμη προξηραμένη σφαιρική φιάλη, εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα και 3-way-βαλβίδα με μπαλόνι αργού, προστέθηκαν 90mg διυδροχλωρικού άλατος της κυσταμίνης, 3ml ξηρού DMF και 50μl Et₃N. Το διάλυμα αναδεύτηκε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 14ml ξηρού χλωροφορμίου και συνεχίστηκε η ανάδευση για 30min. Κατόπιν μεταφέρθηκαν στο διάλυμα της αντίδρασης 177mg της ένωσης 9. Η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου συνεχίστηκε για ακόμα 30min, οπότε η αντίδραση ολοκληρώθηκε. Το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε καθώς κατά την αντίδραση δημιουργήθηκε ίζημα (προϊόν). Το ίζημα υπέστη πολλαπλές και επαναλαμβανόμενες αναδεύσεις με CH₂Cl₂ και διαιθυλαιθέρα για απομάκρυνση του διαλύτη DMF. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 22% (50mg).

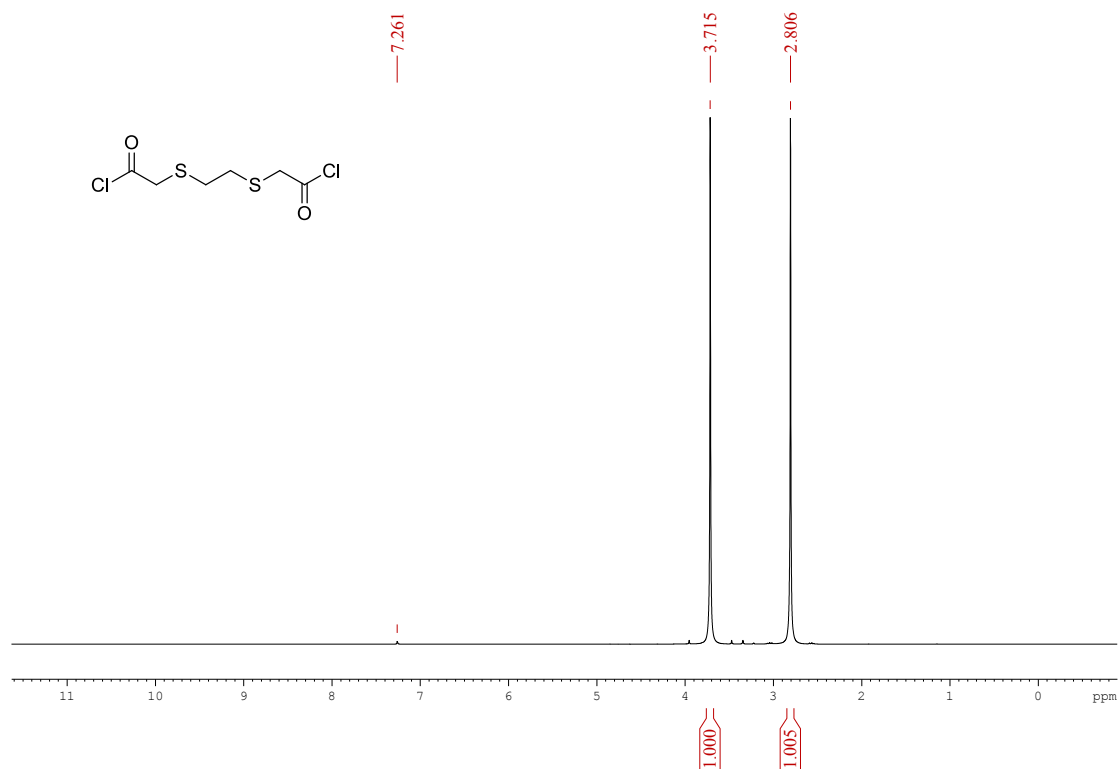
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ= 10.13 (br. s, 2H), 8.30 (br. s, 2H), 7.76 (br.s, 2H), 7.68 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 7.38 (br.d, J= 8.7 Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 3.83 (dd, J₁₂= 6.0 Hz, J₂=4.5 Hz, 4H), 3.01 (t, J= 6.3 Hz, 4H), 2.40 (br.s, 6H)

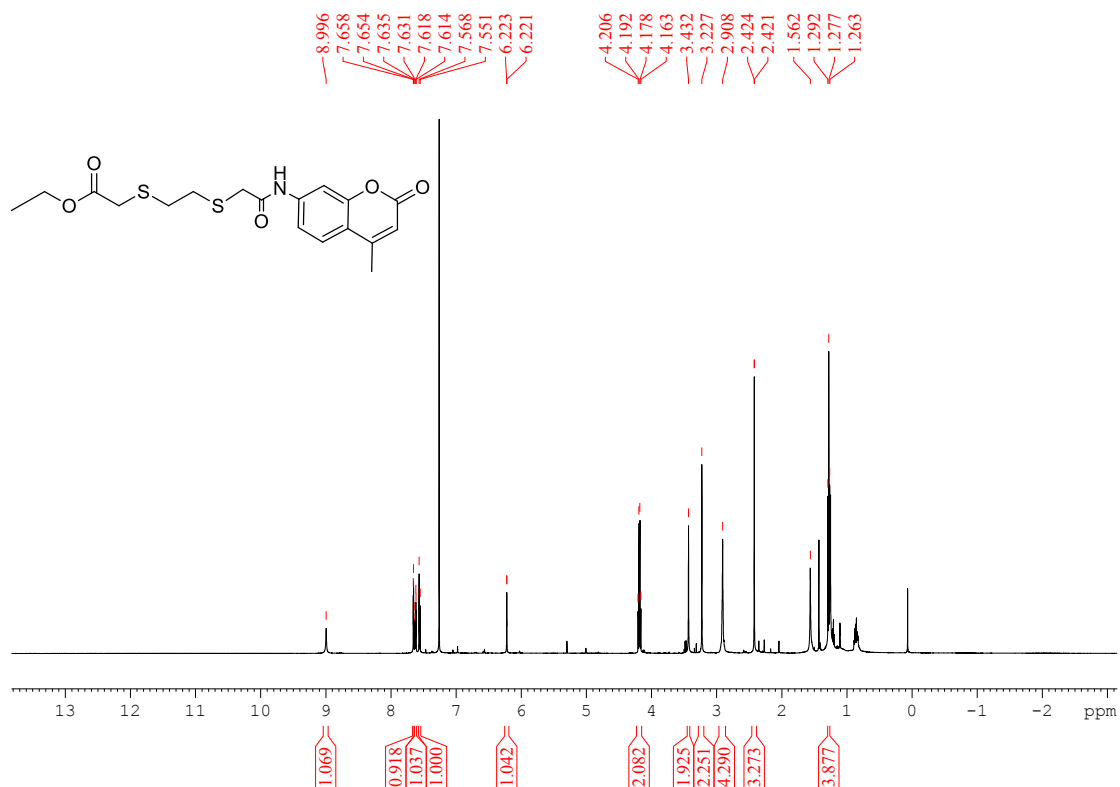
¹³C-NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ= 180.11, 162.30, 160.00, 153.32, 153.10, 142.93, 125.51, 117.61, 115.08, 112.25, 107.83, 45.68, 42.82, 36.14, 18.01.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

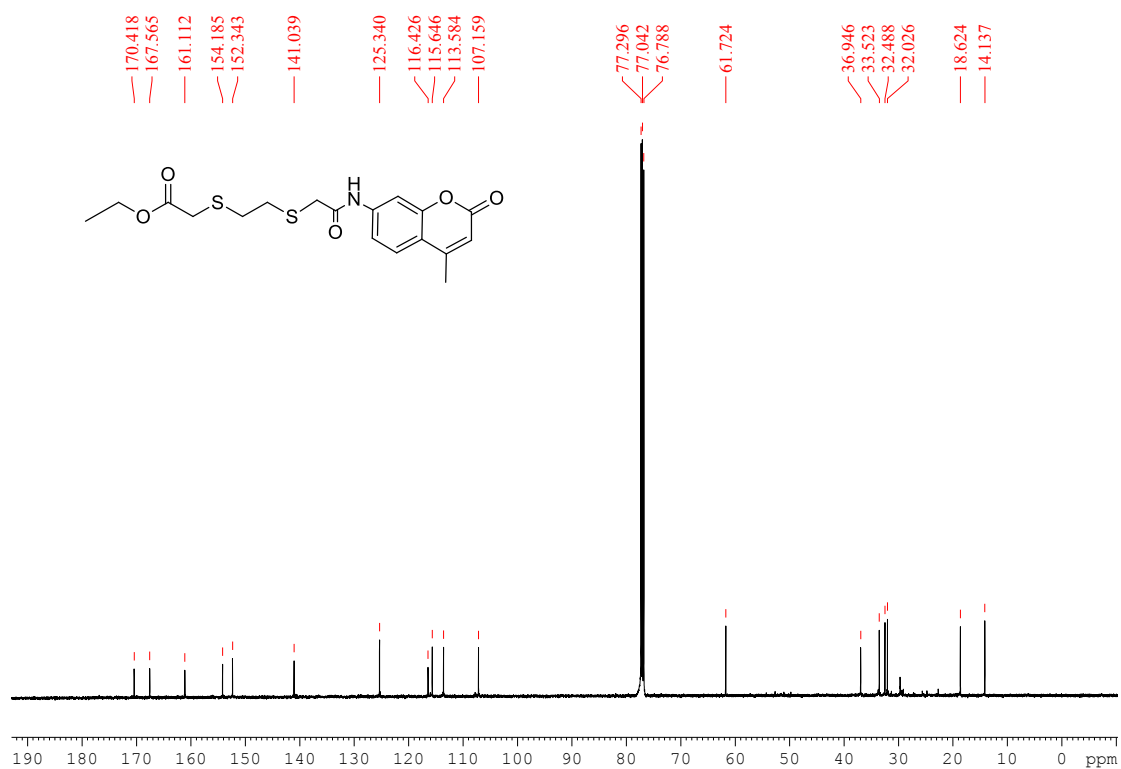
ΕΝΩΣΗ 5- ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$ (300MHz- CDCl_3)



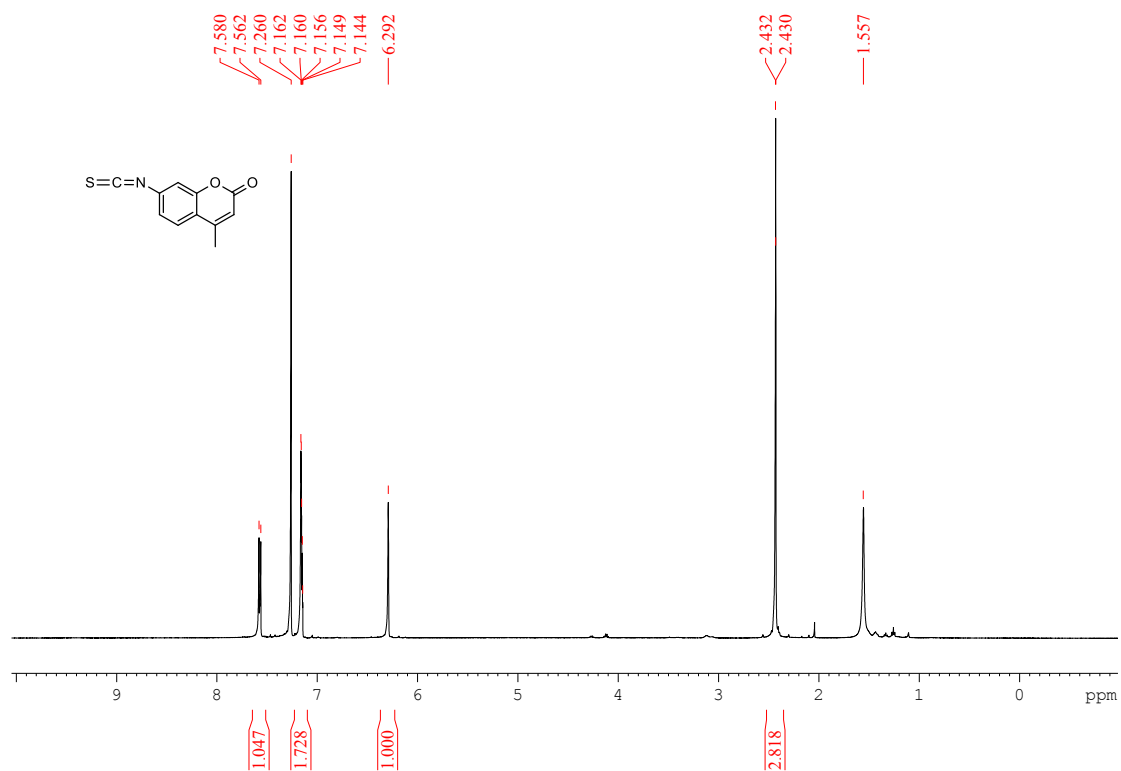
ΕΝΩΣΗ 7- ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz- CDCl_3)



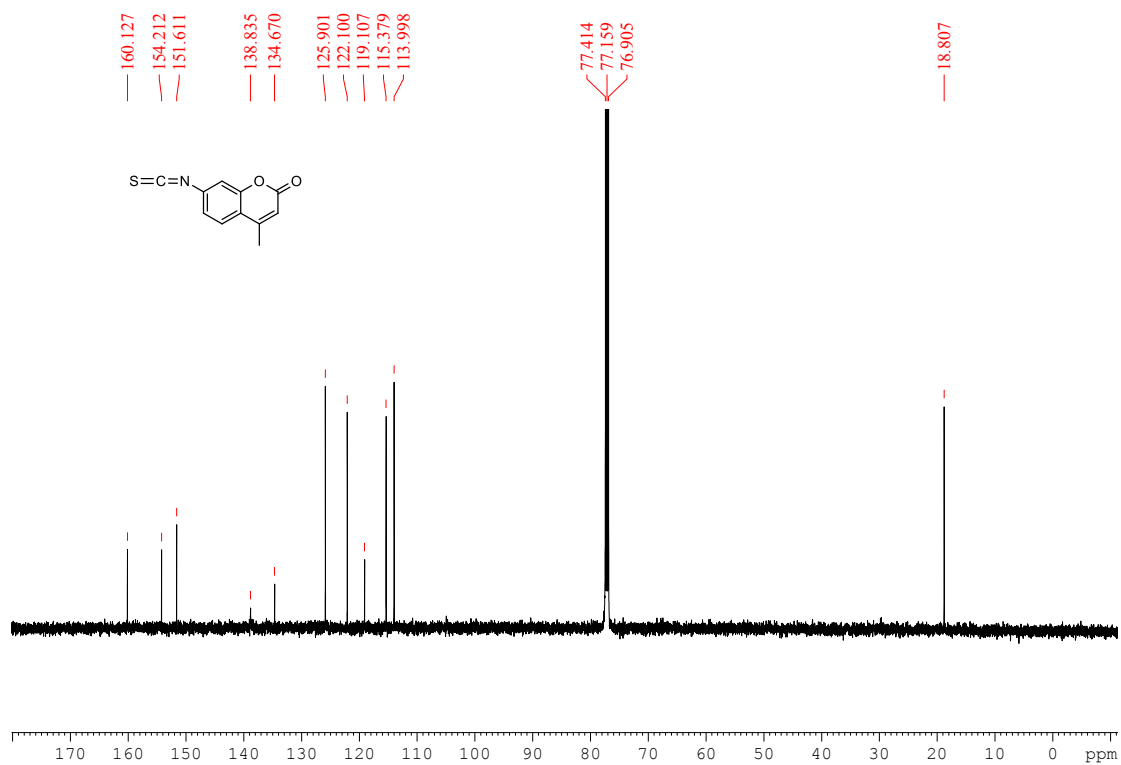
ΕΝΩΣΗ 7- ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C-NMR}$ (500MHz- CDCl_3)



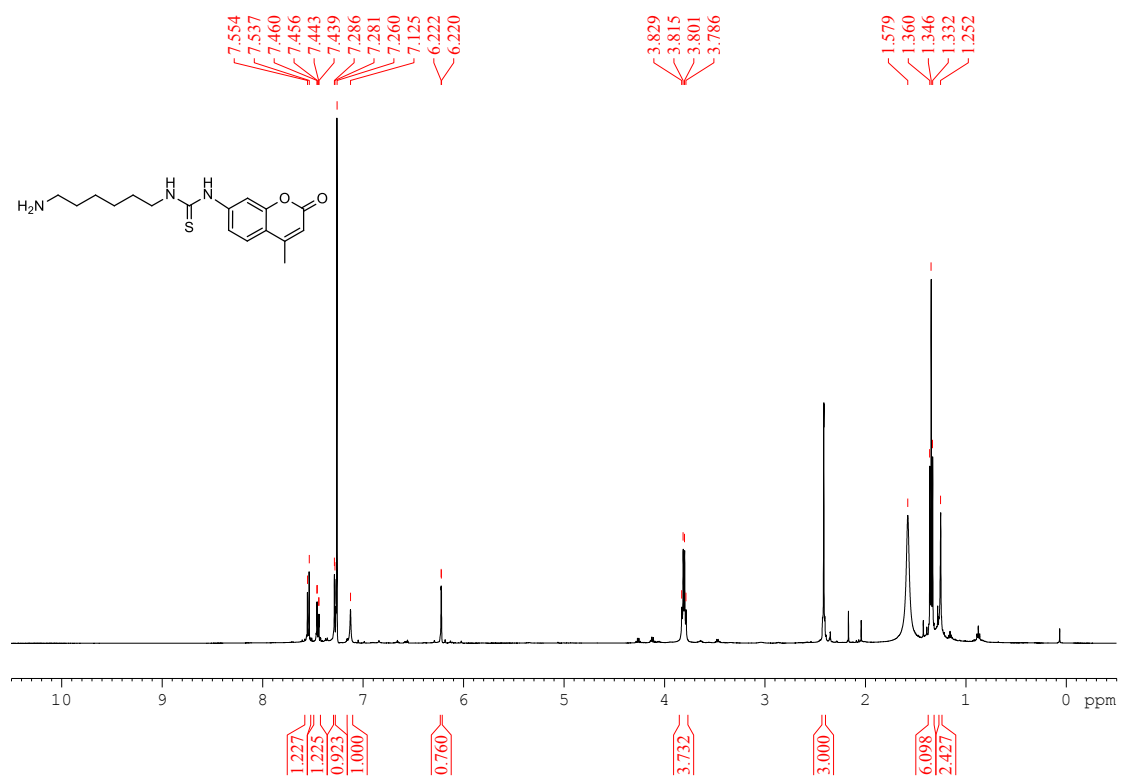
ΕΝΩΣΗ 9- ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz- CDCl_3)



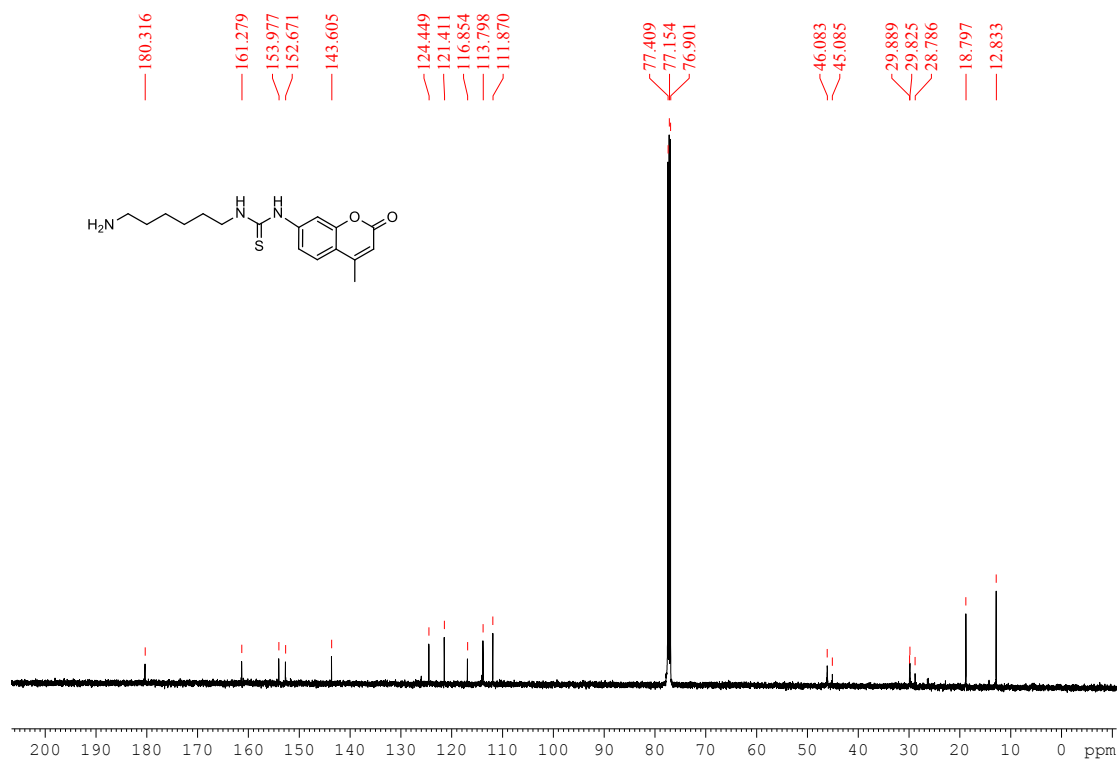
ΕΝΩΣΗ 9- ΦΑΣΜΑ ¹³C-NMR (500MHz- CDCl₃)



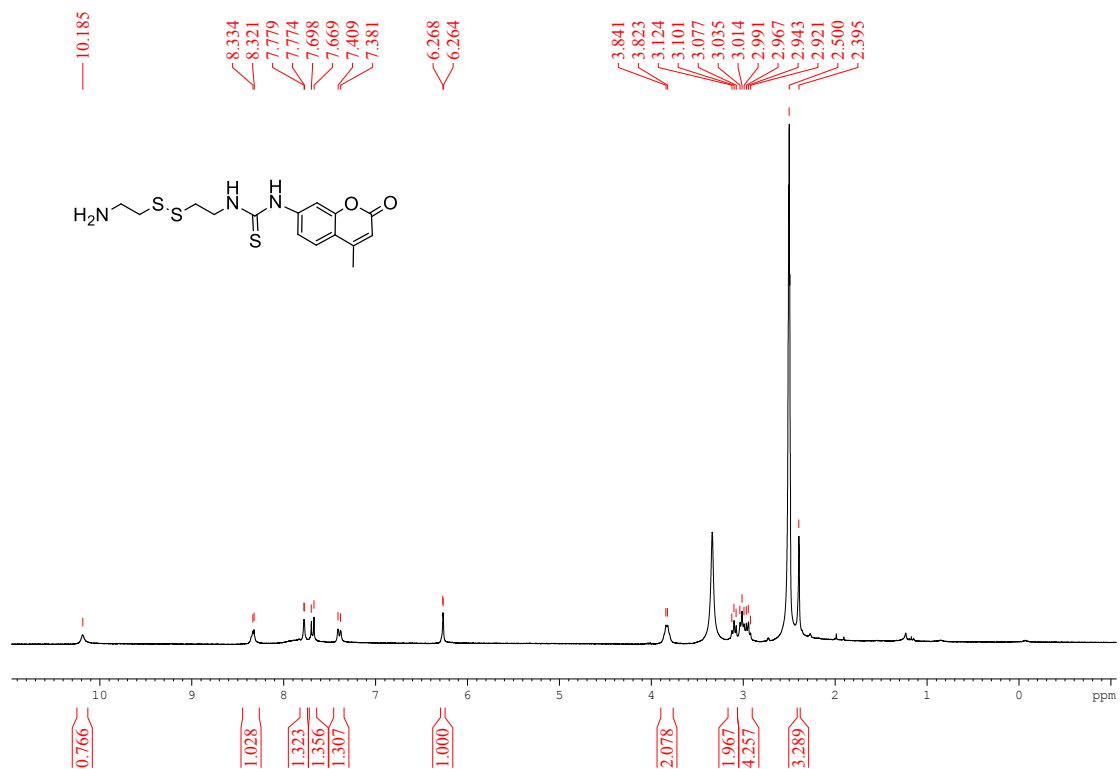
ΕΝΩΣΗ 10- ΦΑΣΜΑ ¹H-NMR (500MHz- CDCl₃)



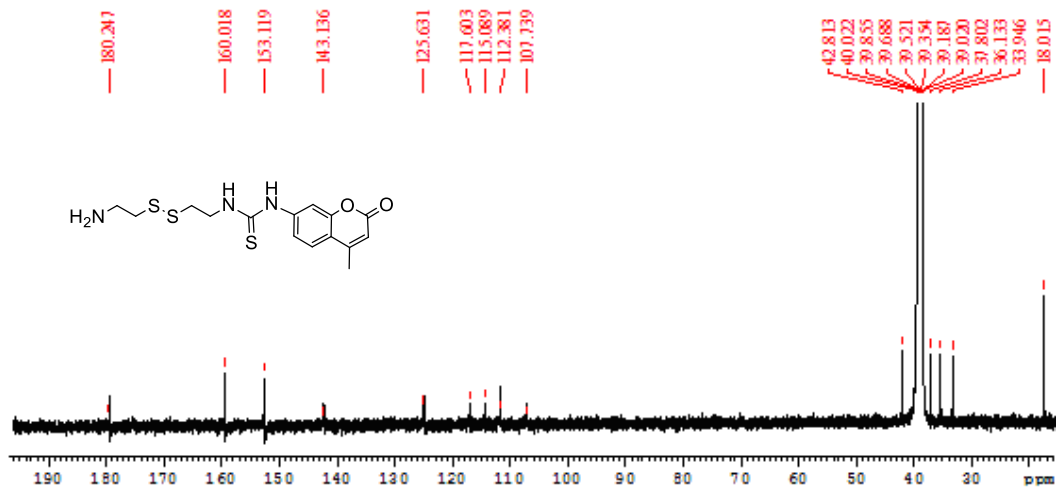
ΕΝΩΣΗ 10- ΦΑΣΜΑ ¹³C-NMR (500MHz- CDCl₃)



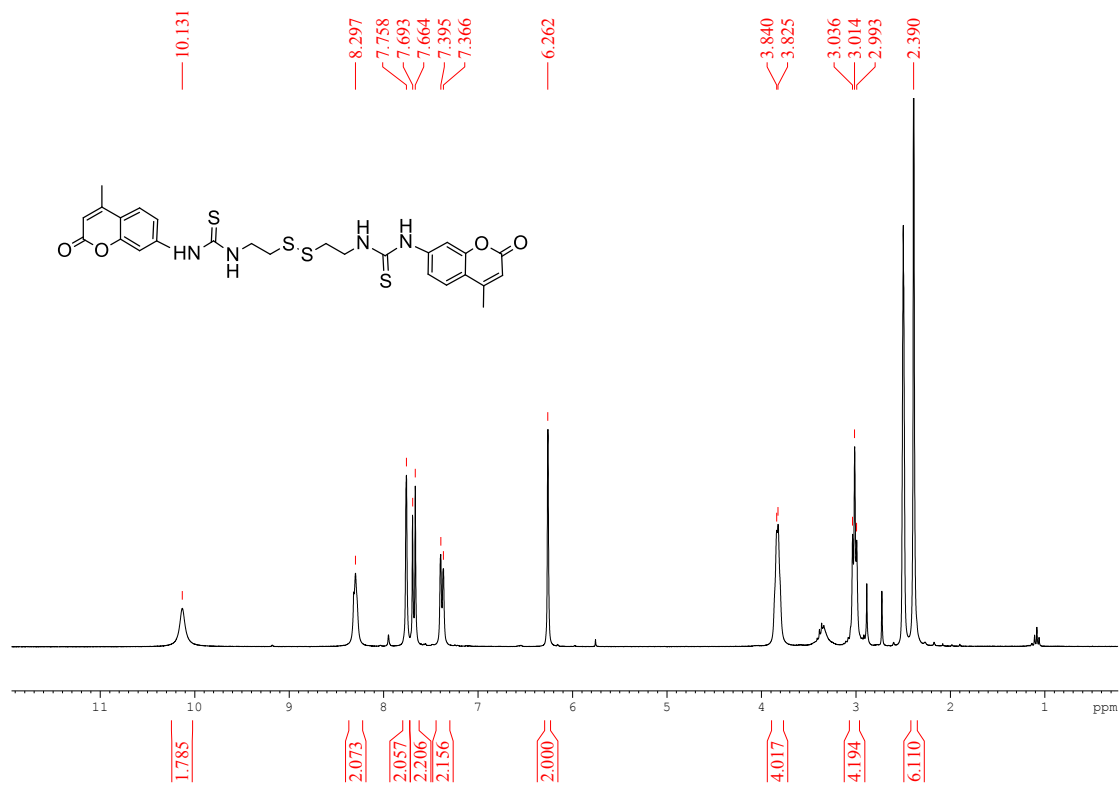
ΕΝΩΣΗ 12- ΦΑΣΜΑ ¹H-NMR (300MHz- DMSO-d₆)



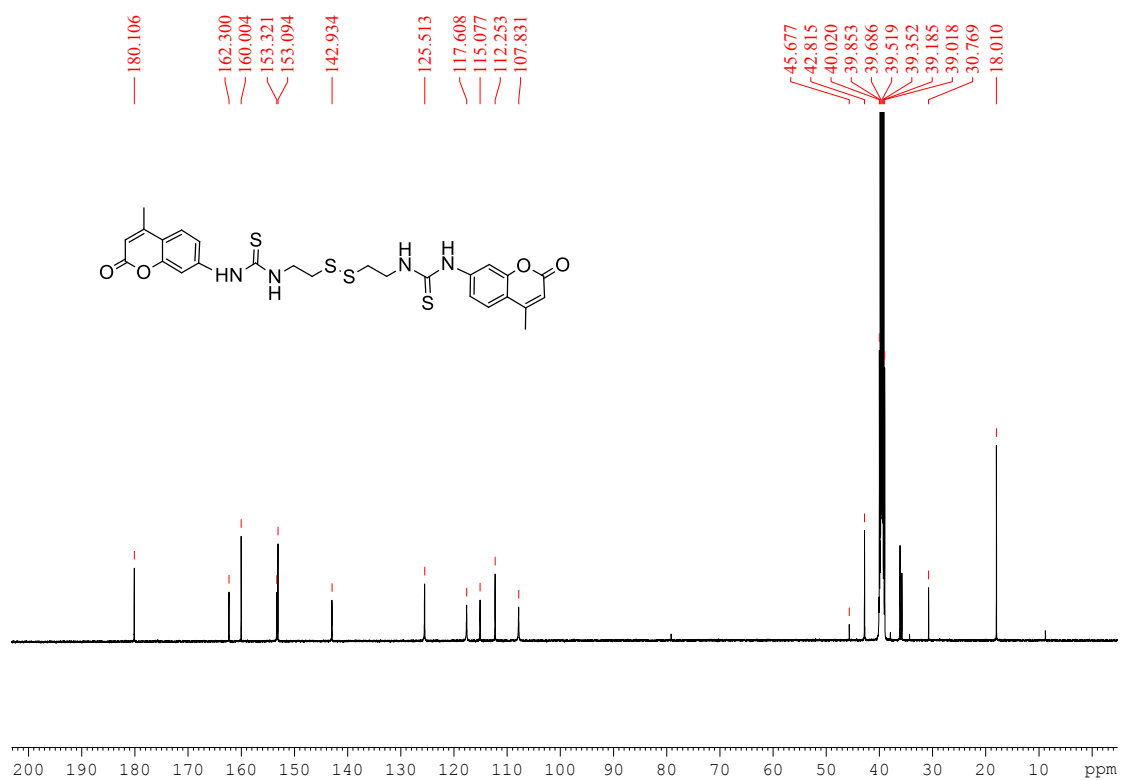
ΕΝΩΣΗ 12- ΦΑΣΜΑ $^{13}\text{C-NMR}$ (500MHz- DMSO- d_6)



ΕΝΩΣΗ 13- ΦΑΣΜΑ $^1\text{H-NMR}$ (300MHz- DMSO- d_6)



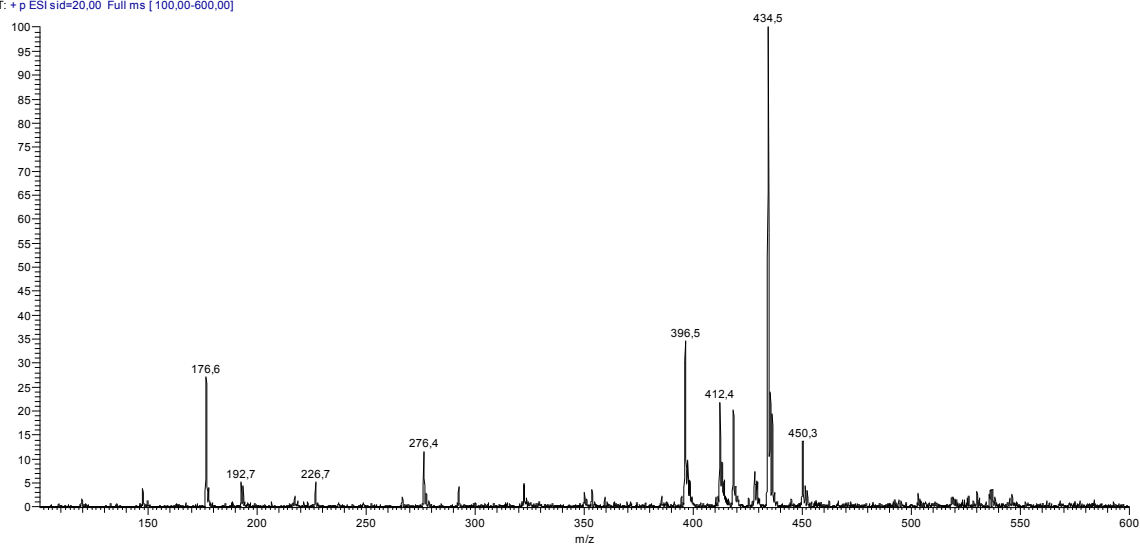
ΕΝΩΣΗ 13- ΦΑΣΜΑ ¹³C-NMR (500MHz- DMSO-d₆)



ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΜΑΖΑΣ

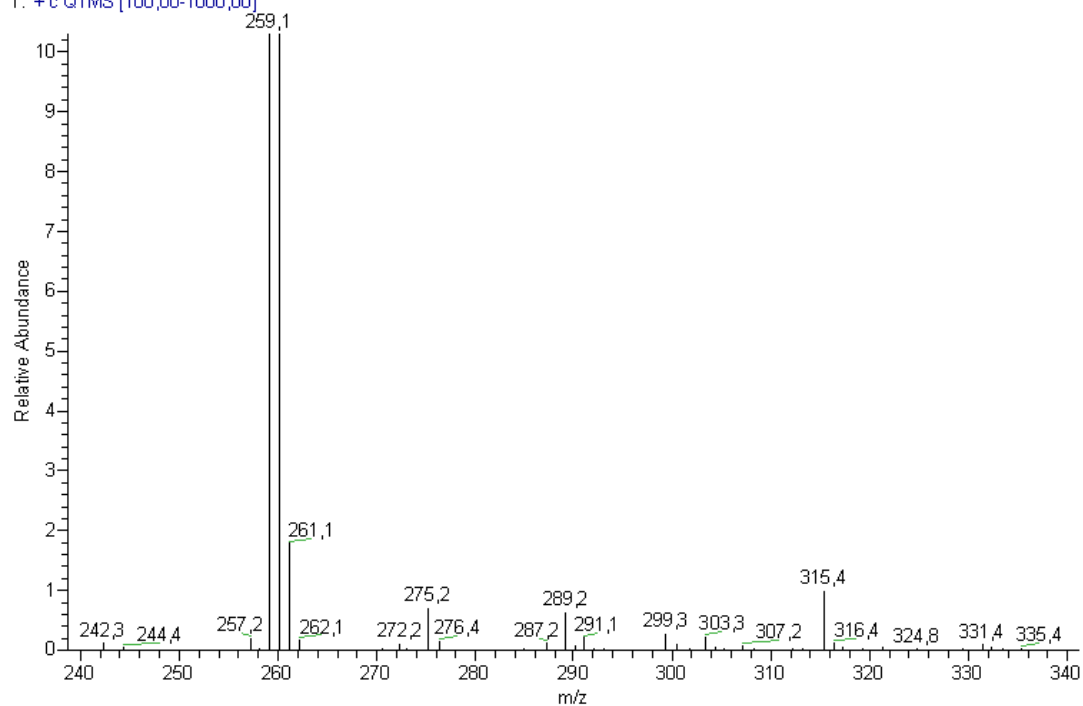
ΕΝΩΣΗ 7 TLC-SSI-MS

070314_08_Aminocoumarin_Silicagel_ACN_pos_01 #57-88 RT: 1.55-2.22 AV: 32 SR: 40 0,02-0,63, 3,80-4,28 NL: 8,31E4
T: + p ESI sid=20,00 Full ms [100,00-600,00]



ΕΝΩΣΗ 10 ESI-MS

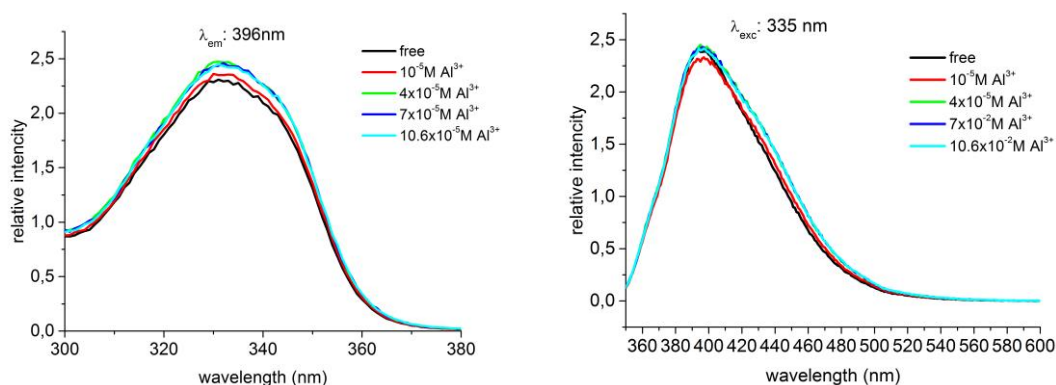
148282 #1 RT: 0,02 AV: 1 NL: 1,19E7
T: + c Q1MS [100,00-1000,00]



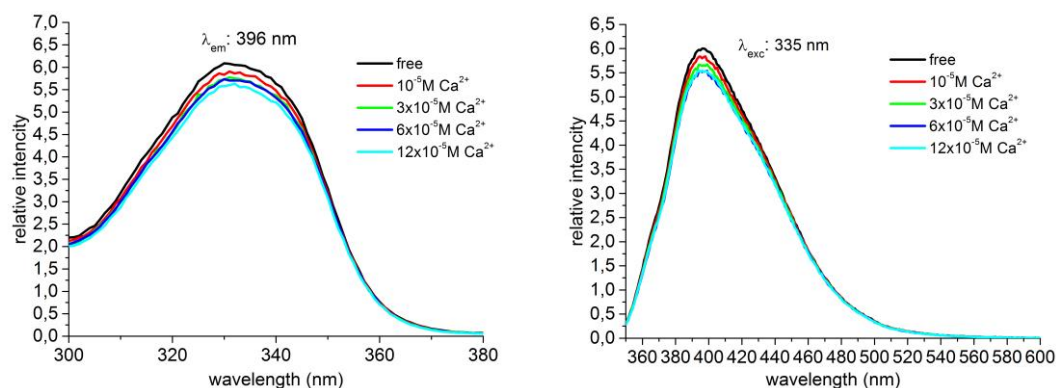
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Για κάθε συντιθέμενο δείκτη παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού τα οποία δεν παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο Δ.

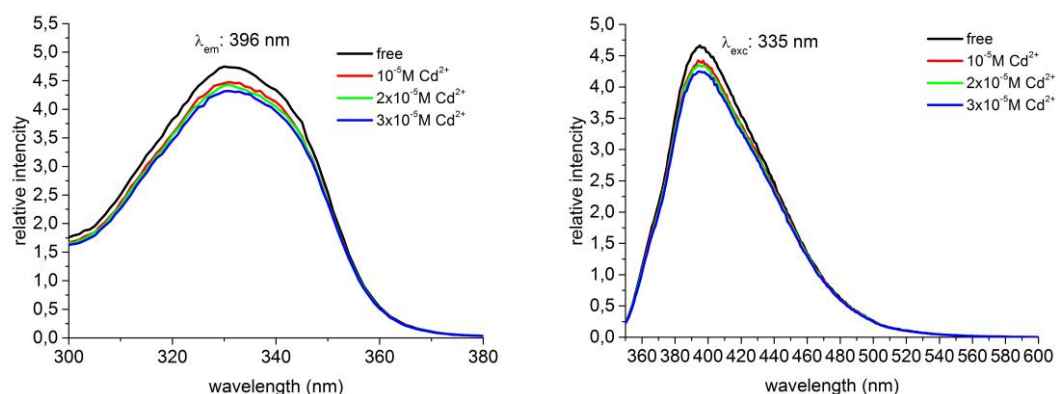
- Δείκτης 7



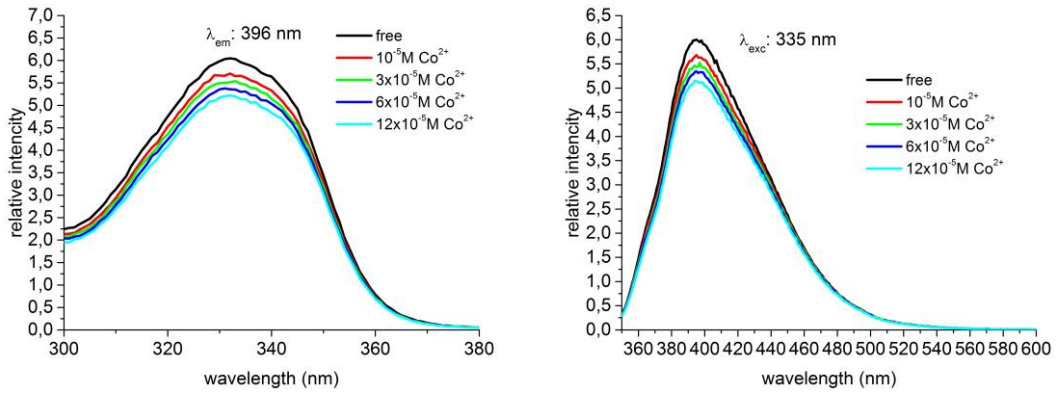
Εικόνα 16. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+}



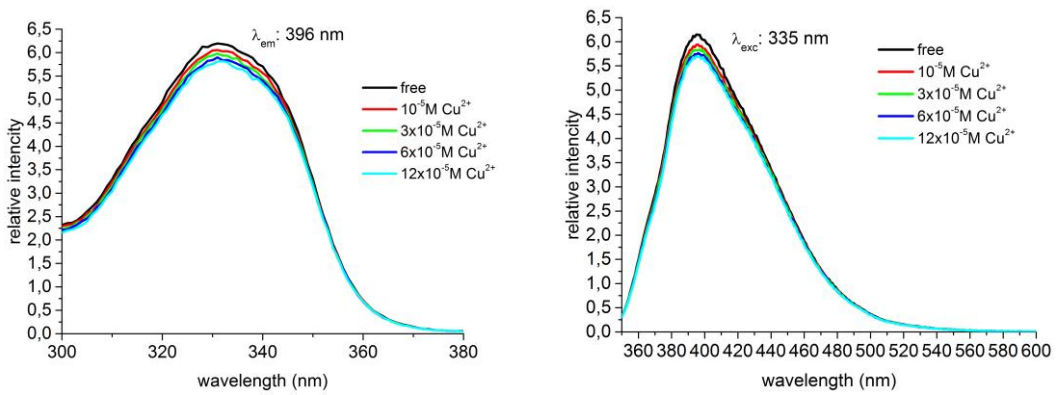
Εικόνα 17. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+}



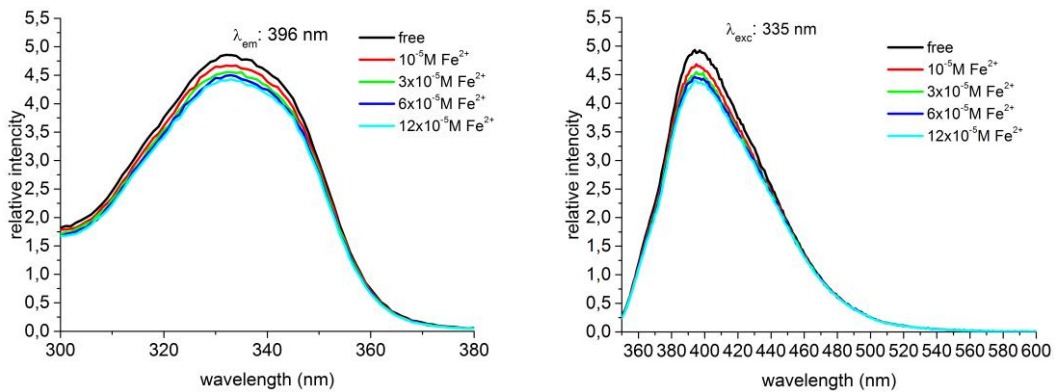
Εικόνα 18. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cd^{2+}



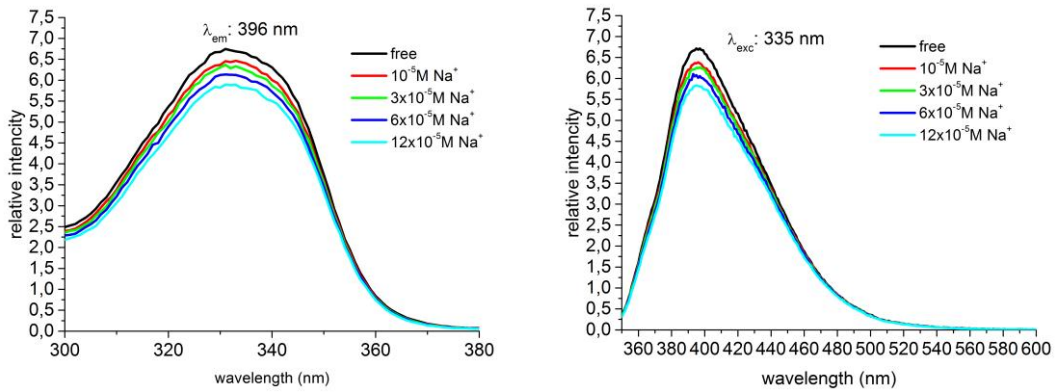
Εικόνα 19. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Co^{2+}



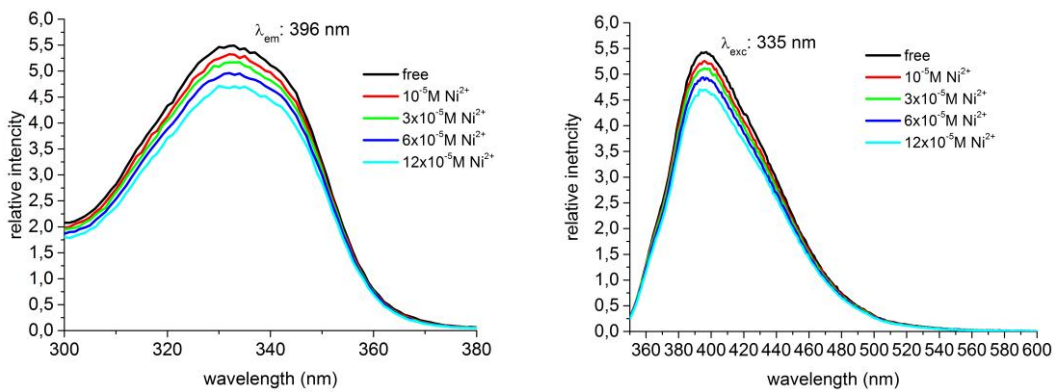
Εικόνα 20. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cu^{2+}



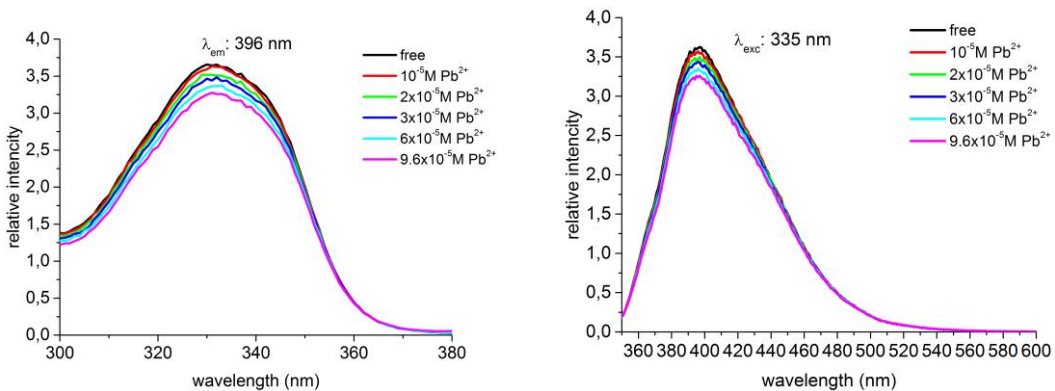
Εικόνα 21. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{2+}



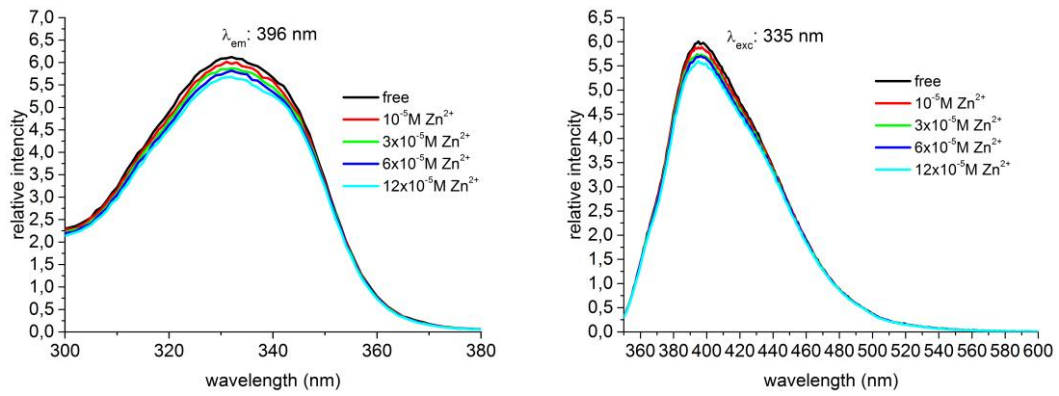
Εικόνα 22. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Na^+



Εικόνα 23. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ni^{2+}

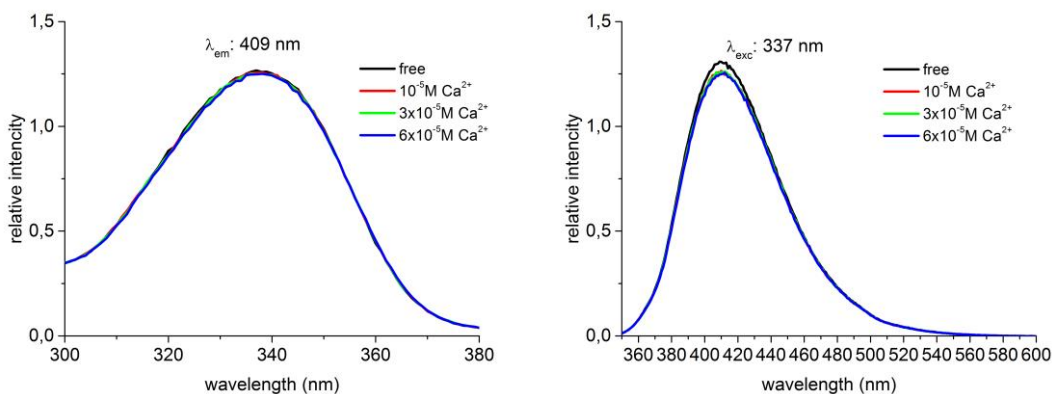


Εικόνα 24. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Pb^{2+}

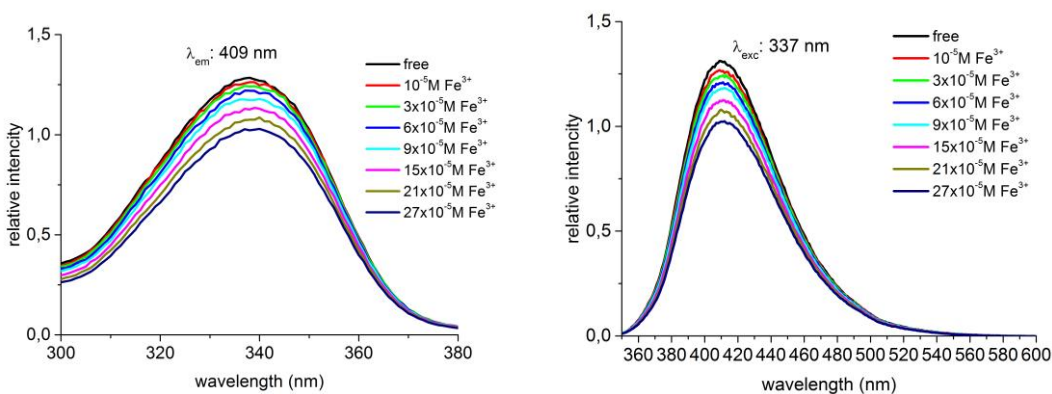


Εικόνα 25. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη 7 συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Zn^{2+}

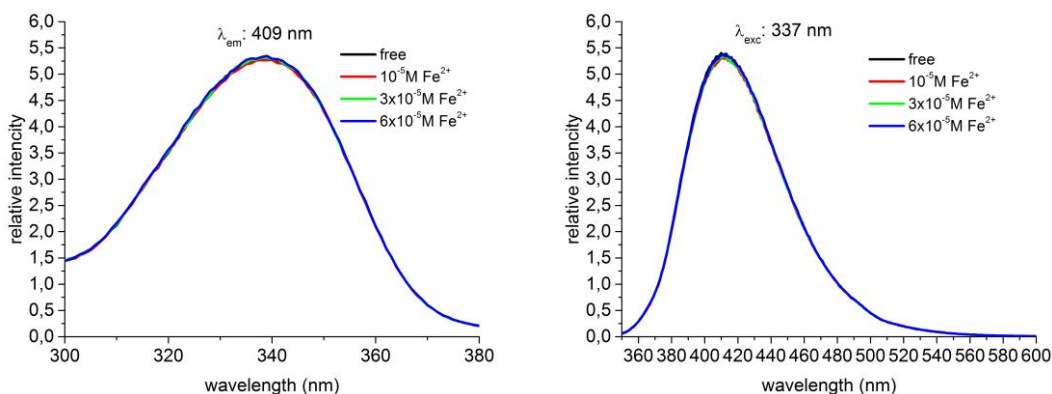
• Δείκτης 10



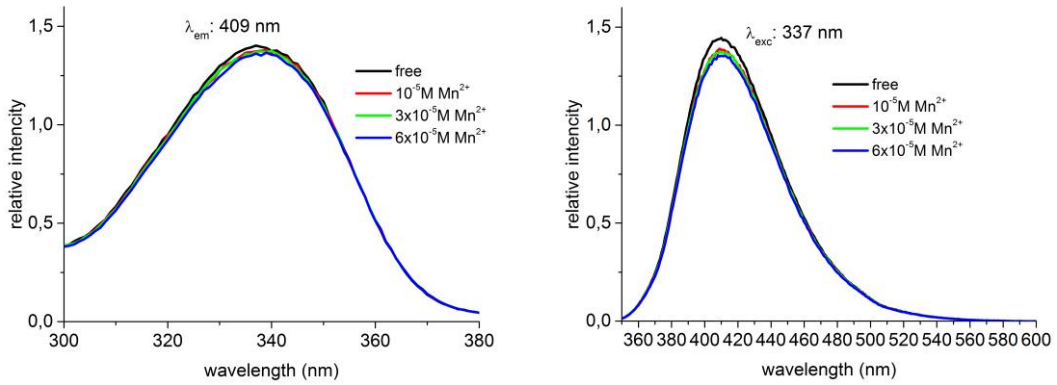
Εικόνα 26. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+}



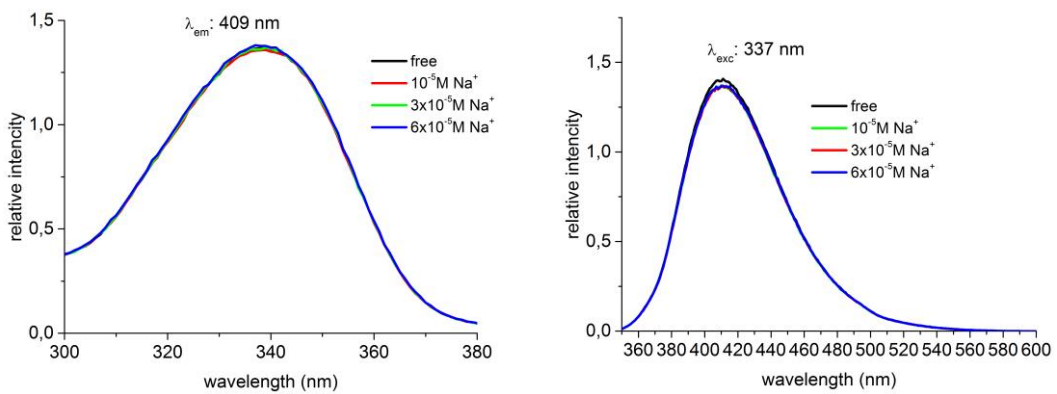
Εικόνα 27. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{3+}



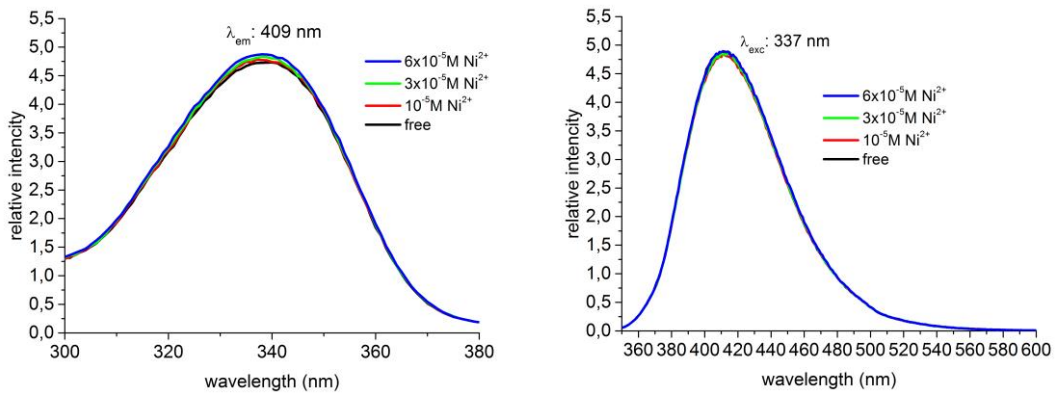
Εικόνα 28. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{2+}



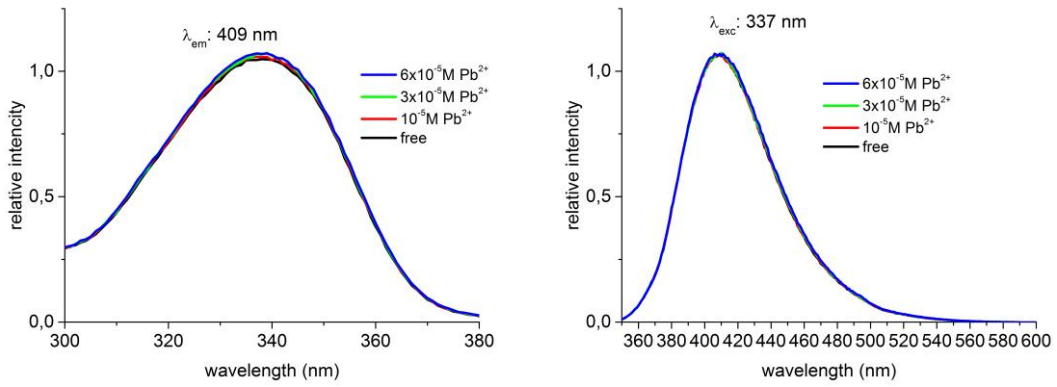
Εικόνα 29. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Mn^{2+}



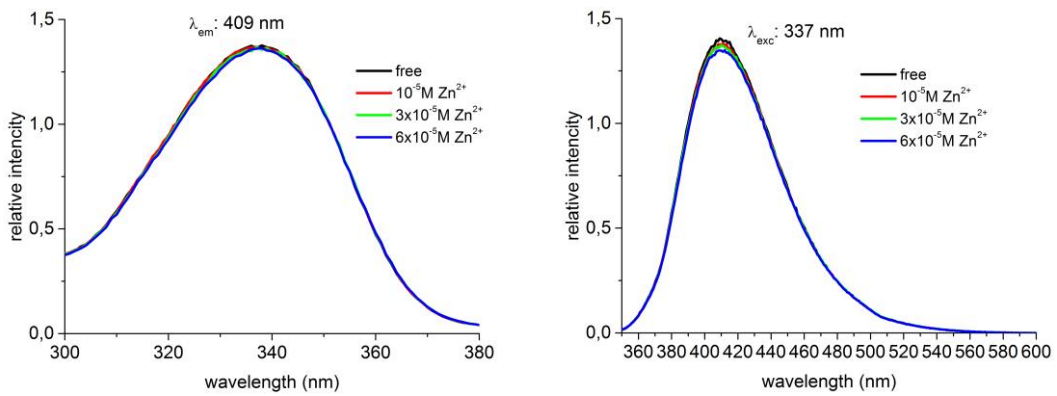
Εικόνα 30. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Na^{+}



Εικόνα 31. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ni^{2+}

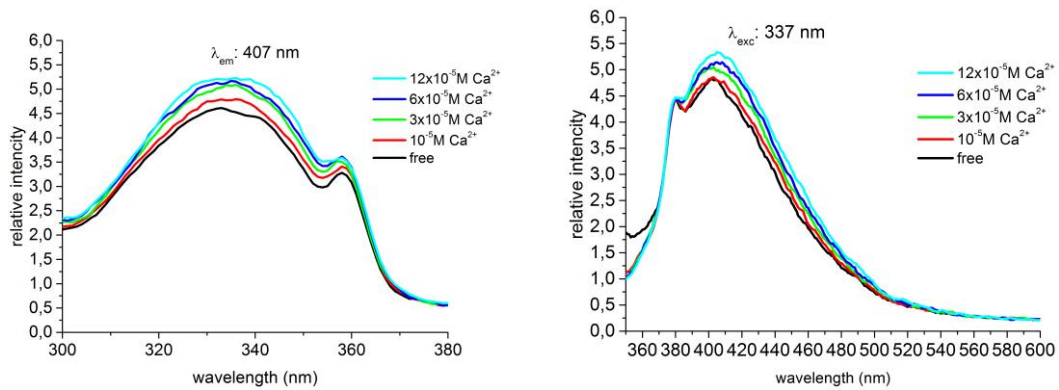


Εικόνα 32. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Pb^{2+}

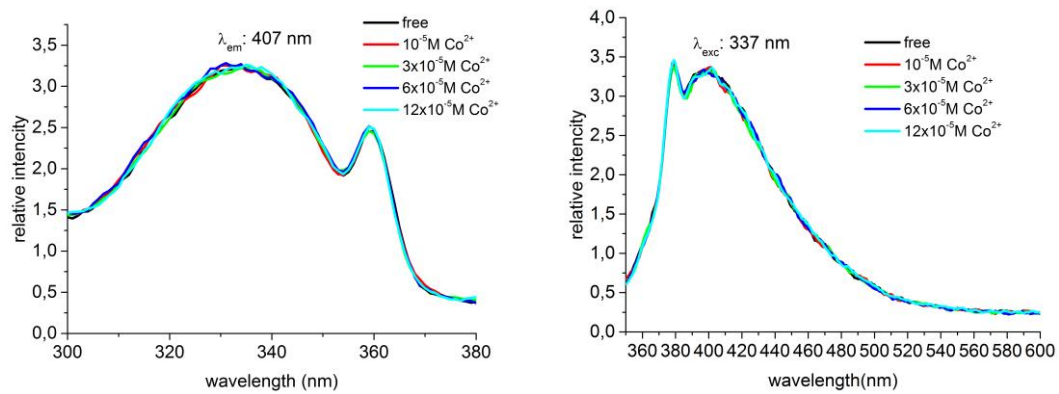


Εικόνα 33. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **10** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Zn^{2+}

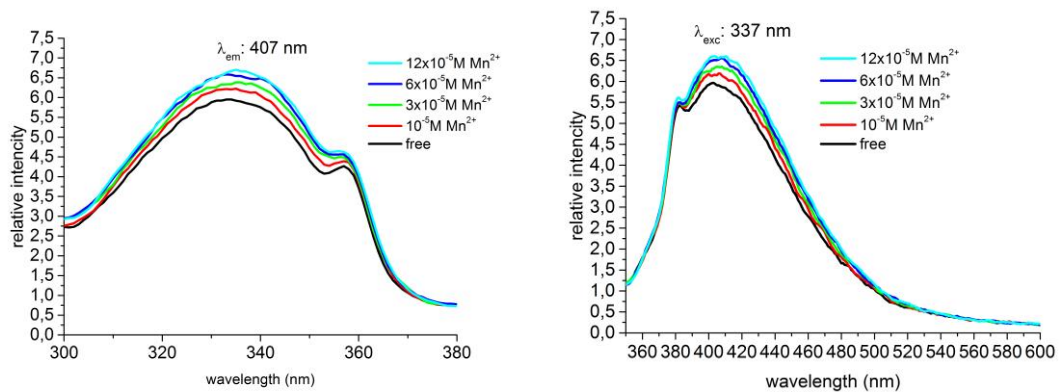
• Δείκτης 12



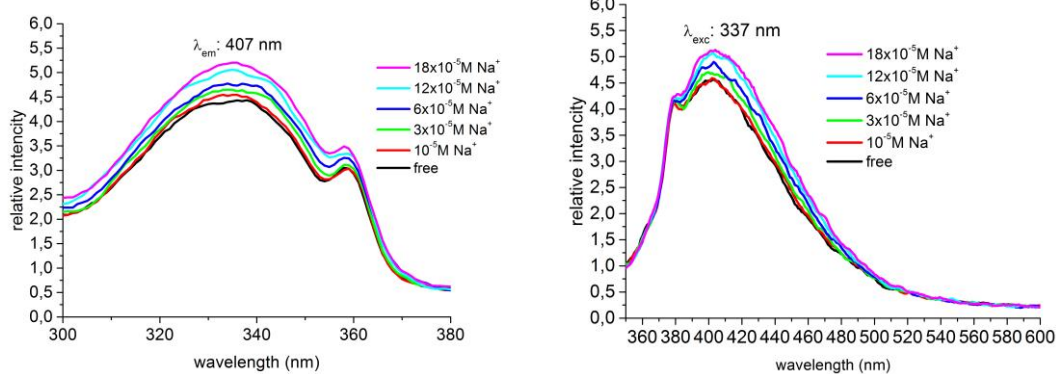
Εικόνα 34. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+}



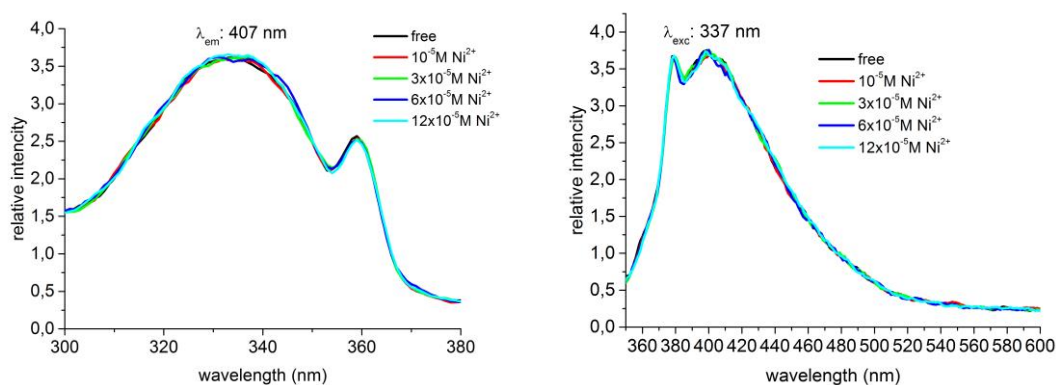
Εικόνα 35. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Co^{2+}



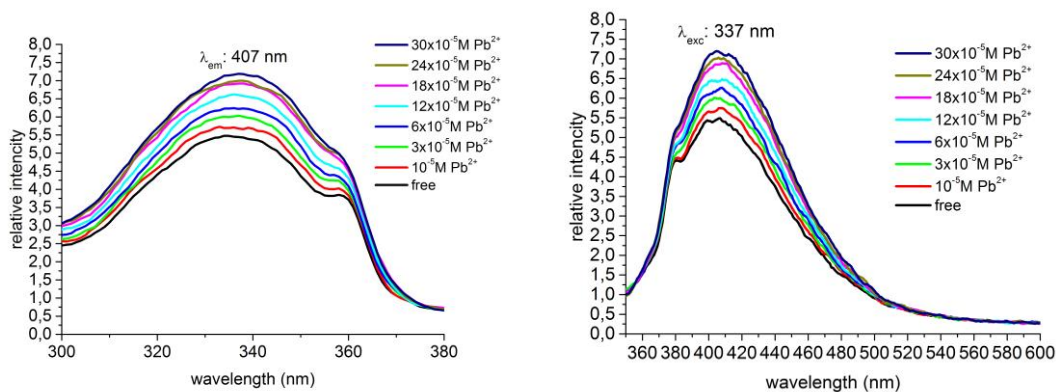
Εικόνα 36. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Mn^{2+}



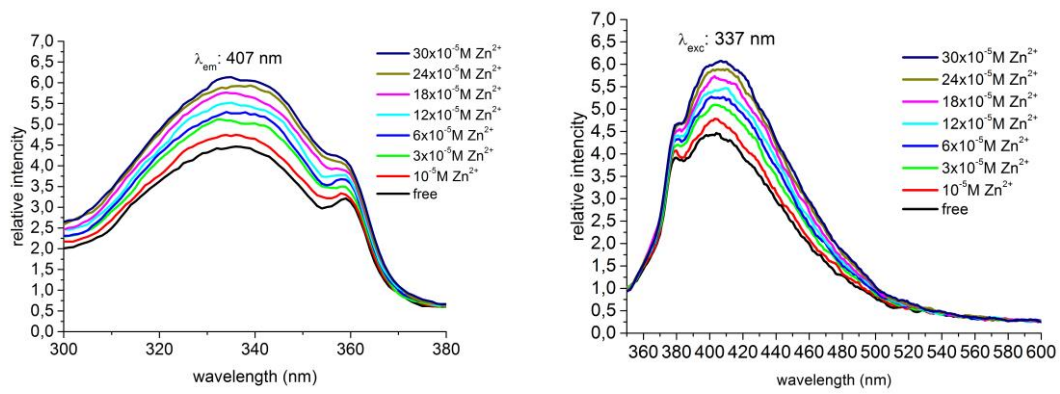
Εικόνα 36. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Na^2



Εικόνα 37. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ni^{2+}

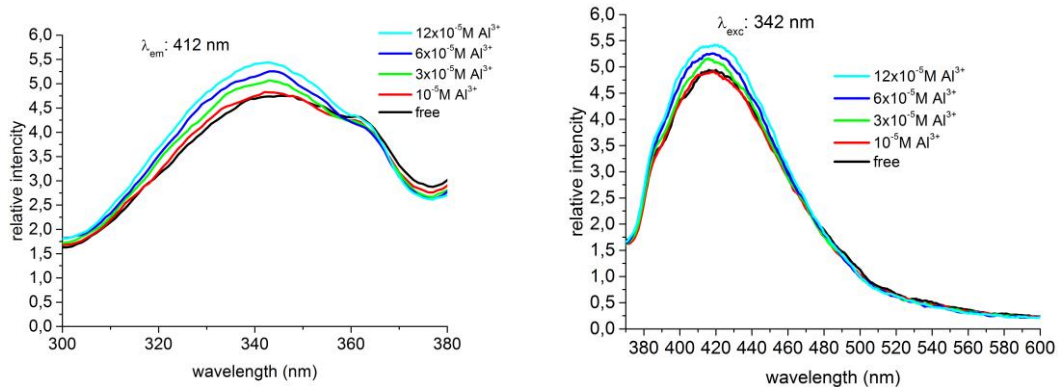


Εικόνα 38. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Pb^{2+}

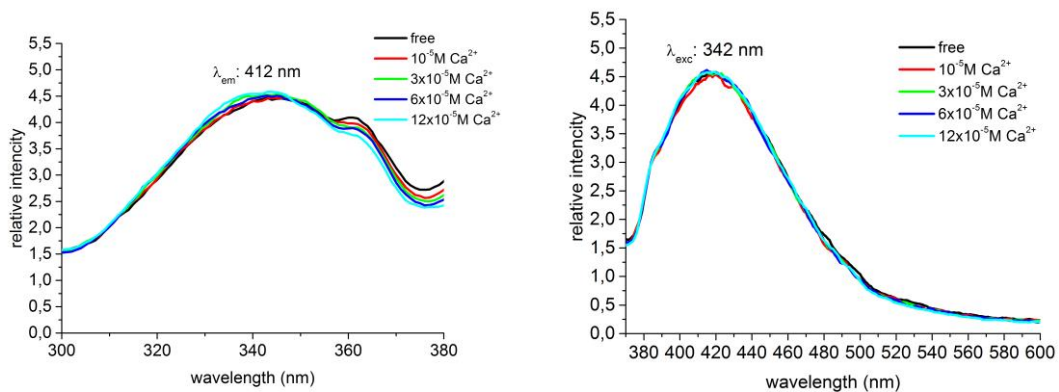


Εικόνα 39. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **12** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Zn^{2+}

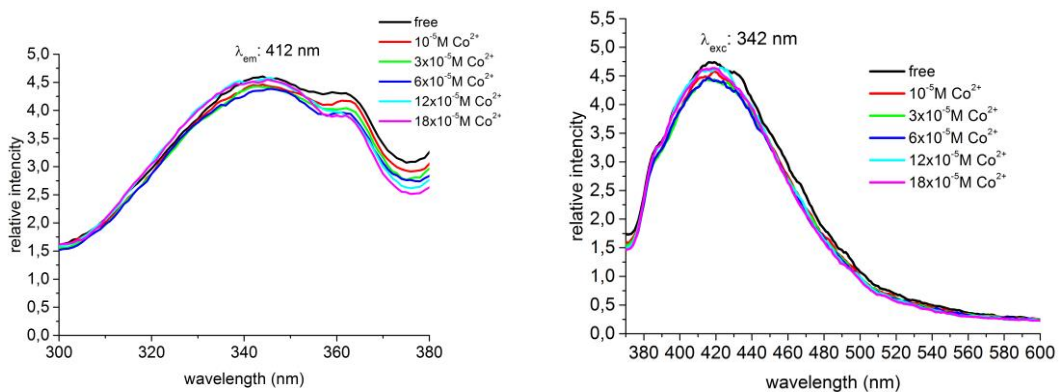
• Δείκτης 13



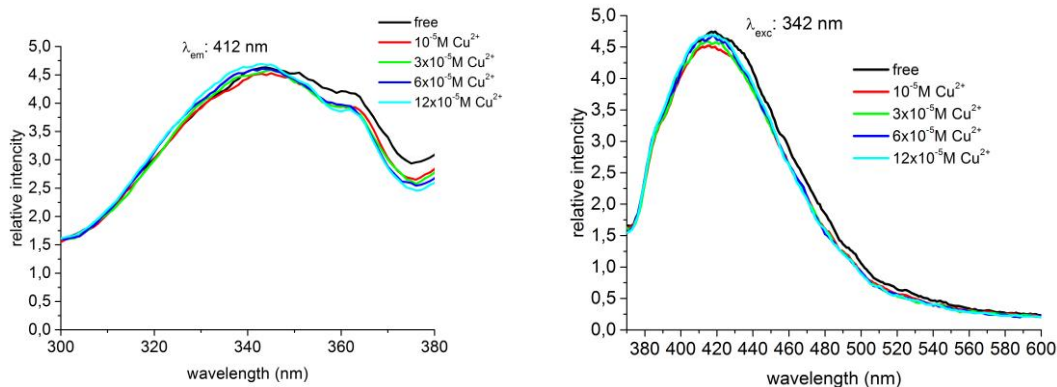
Εικόνα 40. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Al^{3+}



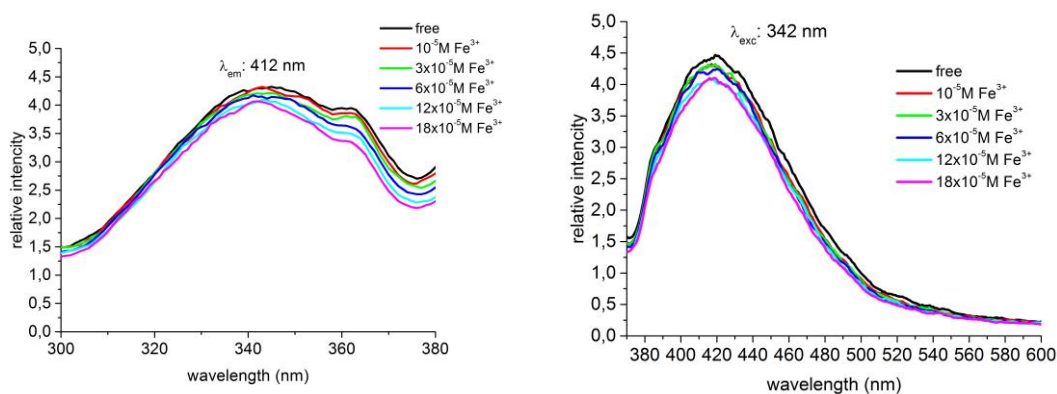
Εικόνα 41. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+}



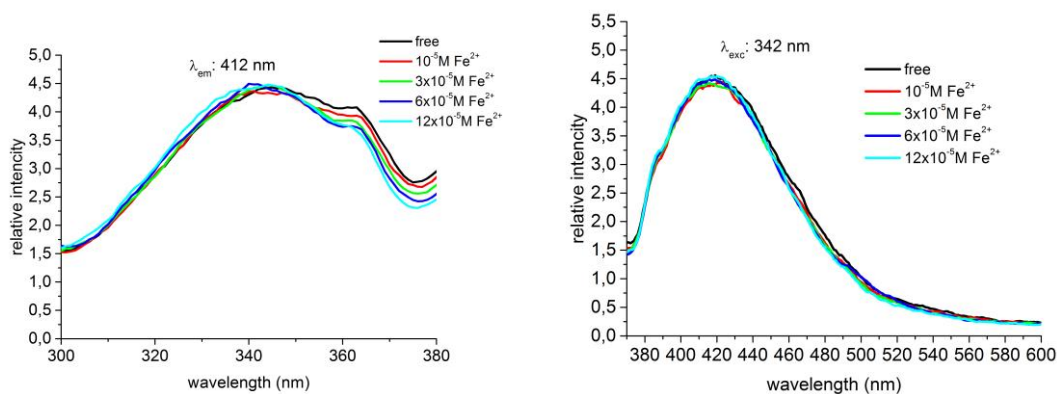
Εικόνα 42. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Co^{2+}



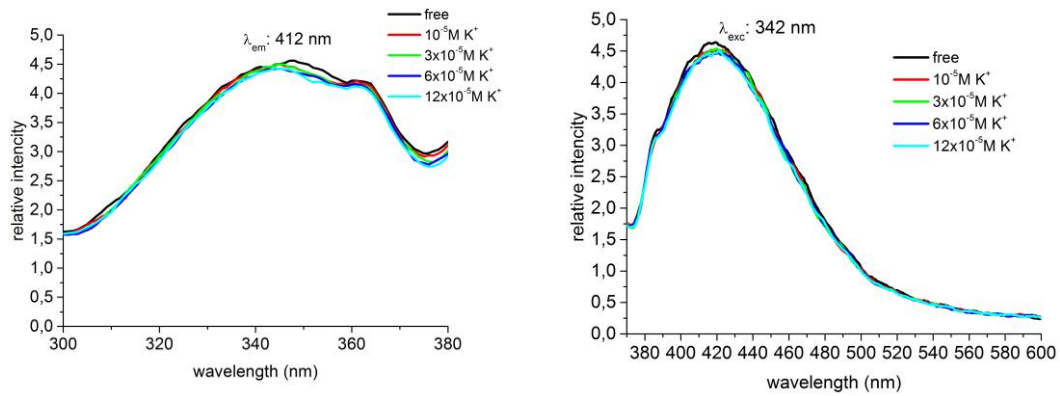
Εικόνα 43. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Cu^{2+}



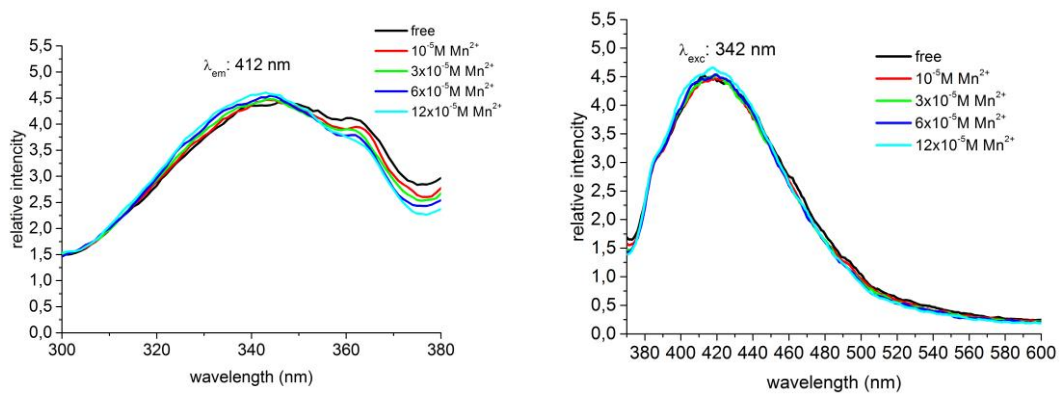
Εικόνα 44. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{3+}



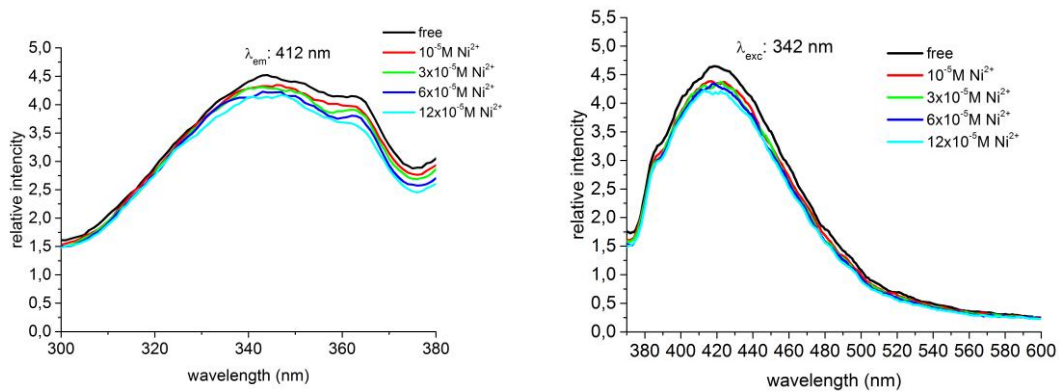
Εικόνα 45. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5} M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Fe^{2+}



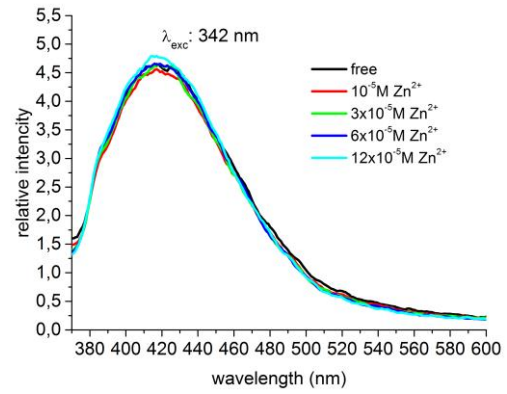
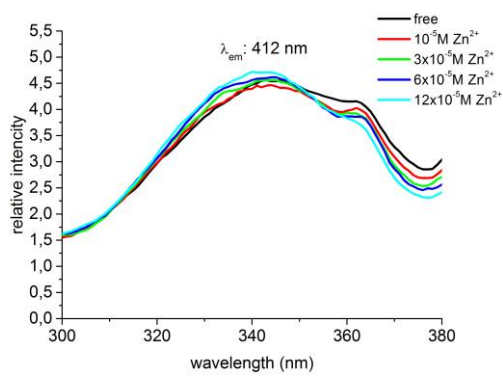
Εικόνα 46. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων K^+



Εικόνα 47. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Mn^{2+}



Εικόνα 48. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης $10^{-5}M$ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Ni^{2+}



Εικόνα 49. Φάσματα διέγερσης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) του δείκτη **13** συγκέντρωσης 10^{-5}M παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιόντων Zn^{2+}

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 R. Xie, Y. Yi, Y. He, X. Liu and Z.-X. Liu, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 8541–8546.
- 2 J. Duffus, *Purr. Appl. Chem.*, 2002, **74**, 793.
- 3 W. De Vries., P. F. A. M., Römken. and G., Schütze., *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007, **191**, 91.
- 4 S. A. El-Safty and M. A. Shenashen, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **38**, 98–115.
- 5 S. Schäfer, G. Buchmeier, E. Claus, L. Duester, P. Heininger, K. A., P. Mayer, A. Paschke, C. Rauert, G. Reifferscheid, H. Rüdell, C. Schlechtriem, C. Schröter-Kermani, D. Schudoma, F. Smedes, D. Steffen and F. Vietoris., *Environ. Sci. Eur.*, 2015, **27**, 5.
- 6 J.E. Fergusson, *The Heany Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Pergamon Press, Oxford, 1990.
- 7 M. Vahter, M. Berglund, A. Akesson and C. Lidén, *Environ. Res.*, 2002, **88**, 145–155.
- 8 K. Sato, Y. Kusaka, K. Okada, *Toxicol. Lett.*, 1995, **80**, 161.
- 9 P.B. Hammond, E.C. Foulkes, *Metal Ions In Biology*, Marcel Decker, New York, 1986.
- 10 Y. Zhao, X. Lv, Y. Liu, J. Liu, Y. Zhang, H. Shi and W. Guo, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 11475.
- 11 T. W. Clarkson and L. Magos, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2006, **36**, 609–662.
- 12 P. B. Tchounwou, W. K. Ayensu, N. Ninashvili and D. Sutton, *Environ. Toxicol.*, 2003, **18**, 149–175.
- 13 N. Basu, A. Scheuhammer, N. Grochowina, K. Klenavic, D. Evans, M. O'Brien and H. M. Chan, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 3585–3591.
- 14 Z. Zhang, D. Wu, X. Guo, X. Qian, Z. Lu, Q. Xu, Y. Yang, L. Duan, Y. He and Z. Feng, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 1814–1820.
- 15 P. Grandjean, P. Weihe, R. F. White and F. Debes, *Environ. Res.*, 1998, **77**, 165–172.
- 16 T. Takeuchi, N. Morikawa, H. Matsumoto and Y. Shiraishi, *Acta Neuropathol.*, 1962, **2**, 40–57.
- 17 M. Harada, *Crit. Rev. Toxicol.*, 1995, **25**, 1–24.

- 18 F. N. Moreno, C. W. N. Anderson, R. B. Stewart and B. H. Robinson, *Environ. Pollut.*, 2005, **136**, 341–352.
- 19 H. N. Kim, W. X. Ren, J. S. Kim and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3210.
- 20 E. M. Nolan and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 3443–3480.
- 21 Z. Qin, J. A. Caruso, B. Lai, J. S. Becker and B. Lai, *Metallomics*, 2011, 28–37.
- 22 M. Kapp, N., Studer, D., Gerh, P., Geiser, *Methods Mol. Biol.*, 2007, **369**, 431–447.
- 23 M. Morello, A. Canini, P. Mattioli, R. P. Sorge, A. Alimonti, B. Bocca, G. Forte, A., Martorana, G. Bernardi and G. Sancesario, *Neurotoxicology*, 2008, **29**, 60–72.
- 24 C. J. Fahrni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 121–127.
- 25 M. Ralle and S. Lutsenko, *BioMetals*, 2009, **22**, 197–205.
- 26 I. Leray and B. Valeur, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 3525–3535.
- 27 C. M. Tseng, A. De Diego, F. M. Martin, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 743–750.
- 28 B. Vallant, R. Kadnar, and W. Goessler, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 322–325.
- 29 N. Chen, Y. W., Tong, J., D’ulivo, and A., Belzile, *Analyst*, 2002, **127**, 1541–1546.
- 30 A. N. Anthemidis, G. a. Zachariadis, C. E. Michos and J. a. Stratis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 764–769.
- 31 L. Bennun and J. Gomez, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, 1997, **52**, 1195–1200.
- 32 J. Tan and X. P. Yan, *Talanta*, 2008, **76**, 9–14.
- 33 N. Kaur and S. Kumar, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 9233–9264.
- 34 M. Dutta and D. Das, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2012, **32**, 113–132.
- 35 R. Purrello, S. Gurrieri and R. Lauceri, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190-192**, 683–706.
- 36 G. Gryniewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 3440–3450.

- 37 E. Roussakis, S. A. Pergantis and H. E. Katerinopoulos, *Chem. Commun.*, 2008, 6221–6223.
- 38 H. H. Wang, L. Xue, C. L. Yu, Y. Y. Qian and H. Jiang, *Dye. Pigment.*, 2011, **91**, 350–355.
- 39 B. N. Ahamed and P. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta.*, 2011, **372**, 100–107.
- 40 J. H. Soh, K. M. K. Swamy, S. K. Kim, S. Kim, S. H. Lee and J. Yoon, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 5966–5969.
- 41 S. Voutsadaki, G. K. Tsikalas, E. Klontzas, G. E. Froudakis and H. E. Katerinopoulos, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3292–3294.
- 42 W., Zhu, Y., Xu and X., Qian, *Prog. Chem.*, 2007, **19**, 1229.
- 43 D. W., Domaille, E. L., Que and C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.*, 2008, **4**, 168–175.
- 44 Y.-W., Lin, C.-C., Huang and H.-T., Chang, *Analyst*, 2011, **136**, 863–871.
- 45 S. Voutsadaki, G. K. Tsikalas, E. Klontzas, G. Froudakis, S. A. Pergantis, K. Demadis and H. E. Katerinopoulos, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 12679–12682.
- 46 E. Unterreitmaier and M. Schuster, *Anal. Chim. Acta.*, 1995, **309**, 339–344.
- 47 M. Schuster and E. Unterreitmaier, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 1993, **346**, 630–633.
- 48 B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **205**, 3–40.
- 49 P. Jiang and Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 205–229.
- 50 H. E. Katerinopoulos, *Curr. Pharm. Des.*, 2004, **10**, 3835–3852.
- 51 R. L. Atkins and D. E. Bliss, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 9–14.
- 52 A. Kulkarni, P. G. Avaji, G. B. Bagihalli, S. a. Patil and P. S. Badami, *J. Coord. Chem.*, 2009, **62**, 481–492.
- 53 S. U. Rehman, Z. H. Chohan, F. Gulnaz and C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2005, **20**, 333–340.
- 54 P. Laurin, D. Ferroud, M. Klich, C. Dupuis-Hamelin, P. Mauvais, P. Lassaigne, A. Bonnefoy and B. Musicki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2079–2084.
- 55 D. Hadjipavlou-Litina, C. Kontogiorgis, E. Pontiki, M. Dakanali, A. Akoumianaki and H. E. Katerinopoulos, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2007, **22**, 287–292.

- 56 H. E. Katerinopoulos and E. Foukaraki, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 275–306.
- 57 F. Liepouri, E. Foukaraki, T. G. Deligeorgiev and H. E. Katerinopoulos, *Cell Calcium*, 2001, **30**, 331–335.
- 58 F. Liepouri, T. G. Deligeorgiev, Z. Veneti, C. Savakis and H. E. Katerinopoulos, *Cell Calcium*, 2002, **31**, 221–227.
- 59 M. Dakanali, E. Roussakis, A. R. Kay and H. E. Katerinopoulos, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 4193–4196.
- 60 E. Roussakis, F. Liepouri, A. P. Nifli, E. Castanas, T. G. Deligeorgiev and H. E. Katerinopoulos, *Cell Calcium*, 2006, **39**, 3–11.
- 61 E. Roussakis, S. Voutsadaki, E. Pinakoulaki, D. P. Sideris, K. Tokatlidis and H. E. Katerinopoulos, *Cell Calcium*, 2008, **44**, 270–275.
- 62 H. Iatridou, E. Foukaraki, M. a. Kuhn, E. M. Marcus, R. P. Haugland and H. E. Katerinopoulos, *Cell Calcium*, 1994, **15**, 190–198.
- 63 Y. Agnus, R. Louis, J. Gisselbrecht and R. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 93–102.
- 64 B. A. Salameh, A. Sundin, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Bioorganic Med. Chem.*, 2006, **14**, 1215–1220.
- 65 J. Zhang, C. Li, Y. Wang, R.-X. Zhuo and X.-Z. Zhang, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4457–4459.
- 66 D. Cairns., R. J. Aderson, W. A. Cardwell, M. Case, P. W. Groundwater, A. G. Hall, L. Hogarth, A. L. Jones, O. Meth-Cone and P. Suryadevara, *Letts. Drug Des. Discov.*, 2006, **3**, 336–345.
- 67 D. Riccardi, H. B. Guo, J. M. Parks, B. Gu, A. O. Summers, S. M. Miller, L. Liang and J. C. Smith, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 2317–2322.
- 68 K. M. Dean, Y. Qin and A. E. Palmer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2012, **1823**, 1406–1415.
- 69 J. J. P. Stewart, MOPAC2009; (b) J. J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Version 9.259W, web: <http://OpenMOPAC.net>.
- .70 F. Weigend, M. Haser, and H. Patzelt and R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **294**, 143.
- 71 J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge and D. B. Collum, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2013, **52**, 11998–12013.
- 72 J. Hatai, S. Pal, G. P. Jose, T. Sengupta and S. Bandyopadhyay, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 7033.