



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση δισυσταδικών τριπολυμερών πολύ(αιθυλενοξειδίου)-b-πολύ(L-ιστιδίνη-
co-γλυκίνη) και μελέτη της επίδρασης της L-γλυκίνης στη
συσσωμάτωση και τη δευτεροταγή δομή**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΑΝΤΟΡΙΝΑΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΪΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση δισυσταδικών τριπολυμερών πολύ(αιθυλενοξειδίου)-b-πολύ(L-ιστιδίνη-co-γλυκίνη) και μελέτη της επίδρασης της L-γλυκίνης στη συσσωμάτωση και τη δευτεροταγή δομή

ΣΑΝΤΟΡΙΝΑΙΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

A.M.: 1510008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΜΑΪΟΣ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η σύνθεση συμπολυμερών με βάση την ιστοδίνη που τα οποία έχουν την ιδιότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα μεταβάλλοντας τη δομή τους. Παρουσιάζεται η πρότυπη μέθοδος για την σύνθεση του Nim-Trt-L-Histidine NCA με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα που δίνει τα πλεονεκτήματα της εκλεκτικής και εύκολης αποπροστασίας και της μη ρακεμείωσης. Επίσης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του NCA της L-γλυκίνης. Η επιτυχής σύνθεση των μονομερών επαληθεύτηκε με τεχνικές IR και NMR. Πραγματοποιήθηκε η επιτυχής σύνθεση τυχαίων δισυσταδικών συμπολυμερών με προσθήκη PGly σε ποσοστό 10%, 20% και 40% κατά mol ως προς την ιστοδίνη στη δεύτερη συστάδα ξεκινώντας με m-PEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή στην πρώτη συστάδα. Για την πραγματοποίηση των πολυμερισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ROP των NCA των αντίστοιχων αμινοξέων σε συνδυασμό με την χρήση των τεχνικών υψηλού κενού. Όλα τα πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με τις τεχνικές του GPC, NMR και IR.

Τα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται και να σχηματίζουν σε νανοκλίμακα και σε διαλύτη νερό μικκυλιακές δομές και κυστίδια. Αυτή η ικανότητα επιβεβαιώθηκε με περάματα DLS. Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα τους να αποκρίνονται σε μεταβολές του pH. Πραγματοποιήθηκε και μελέτη της δομής των πολυμερών με κυκλικό διχρωϊσμό όπου και βρέθηκαν οι διαφορετικές διαμορφώσεις που υιοθετεί το πολυμερές σε μεταβολή του pH και της θερμοκρασίας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπτίδια, N-καβοξυ ανυδρίτες, αυτοοργάνωση, βιοεφαρμογές

ABSTRACT

The purpose of this thesis is the synthesis of diblocks containing L-Histidine, that possess the ability to respond to external stimuli by altering their structure. It is presented a novel method for the synthesis of Nim-Trt-L-Histidine NCA with Trityl protecting group, which gives the advantages of selective and easy deprotection and no racemization. Also the synthesis of glycine NCA took place. The successful synthesis of the monomers was confirmed with IR and NMR techniques. The successful synthesis of co-diblocks with addition of PGly in rates of 10%, 20% and 40% in relation with histidine in the second block of the polymers took place beginning with m-PEO-NH₂ as macroinitiator in the first block. The ROP method for the polymerization of the NCAs of the aminoacids took place in combination with the use of high vacuum techniques. All polymers were characterized with GPC, NMR and IR techniques. The polymers have the ability of self-assembly by shaping in nanoscale micelles and clusters in water as solvent. This ability was confirmed with DLS. These polypeptides can respond in pH change. A study of the structure of the polymers took place by using circular dichroism. The different molds of the polymer were found by changing pH and temperature.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: polypeptides, NCAs, self-assembly, bioapplications

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ερμόλαο Ιατρού, καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την άριστη συνεργασία μας και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Επίσης, τους καθηγητές κ. Πιτσικάλη Μαρίνο και κ. Σακελλαρίου Γιώργο, για τις γνώσεις που μου παρείχαν και για τις πολύτιμες συμβουλές τους όσο καιρό βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Σκουλά για την συνεργασία μας κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας για την άριστη συνεργασία μας και την αμοιβαία συνεισφορά καθημερινά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	19
1.1 Σκοπός της εργασίας.....	20
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα.....	21
2.2 Πεπτιδική σύνθεση	25
2.2.1 Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου	26
2.2.2 Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων	27
2.2.3 Προστατευτικές ομάδες.....	28
2.2.4 Τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield	29
2.2.5 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA	31
2.3 Σύνθεση πολυμερικών πεπτιδίων	33
2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's)	34
2.3.2 Κανονικός μηχανισμός αμινών (Normal Amine Mechanism)	35
2.3.3 Μηχανισμός καρβαμιδικών(μηχανισμός του Blout).....	36
2.3.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (active monomer)	37
2.3.5 Εκκίνηση με δευτεροταγείς αμίνες	39
2.3.6 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης	44
2.3.7 Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες	46
2.3.8 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.	47
2.3.9 Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών και χρήση τεχνικών υψηλού κενού	49
2.4 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs)	52
2.4.1 Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων(Fuchs-Farthing method).	53

2.5	Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη.....	54
2.6	Γλυκίνη	64
2.6.1	Χημικές ιδιότητες της γλυκίνης	65
2.7	Μοριακός Χαρακτηρισμός	68
2.7.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.....	68
2.7.2	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός.....	69
2.7.3	Φασματοσκοπία Υπερύθρου	71
2.7.4	Δυναμική Σκέδαση Φωτός	73
2.7.5	Κυκλικός Διχρωϊσμός.....	76
2.7.6	Φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο Ορατό.....	79
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
3.1	Τεχνική υψηλού κενού (HVT)	80
3.2	Καθαρισμός διαλυτών	83
3.2.1	Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF).....	83
3.2.2	Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc).....	83
3.2.3	Εξάνιο	83
3.2.4	Βενζόλιο.....	84
3.2.5	Τετραϋδροφουράνιο (THF)	84
3.3	Καθαρισμός απαρχητών και αντιδραστηρίων.....	85
3.3.1	Διμεθυλαμίνη (DMA)	85
3.3.2	Τριαιθυλαμίνη (Et ₃ N).....	86
3.4	Πλεονεκτήματα της Τρίτυλο Προστατευτικής Ομάδας της Ιστιδίνης.....	87
3.5	Σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA	88
3.6	Σύνθεση NCA L-Γλυκίνης	96
3.7	Σύνθεση poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(GLY)] με 10% PGly	104
3.8	Αντίδραση αποπροστασίας της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας της Ιστιδίνης	112

3.9	Σύνθεση του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly.....	117
3.10	Σύνθεση του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly	120
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	124
4.1	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης	124
4.2	Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης	129
4.3	Μελέτη των πολυμερών με Κυκλικό Διχρωισμό.....	132
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	138
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	140
7.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	141

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χημική και στερεοχημική φύση των α-αμινοξέων.	22
Σχήμα 2: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.	23
Σχήμα 3: Πεπτιδικός δεσμός. Η σύνδεση δυο αμινοξέων συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού.	24
Σχήμα 4: α-έλικα και β-φύλλο	25
Σχήμα 5: Σύνθεση διπεπτιδίου με την μέθοδο DCC.	26
Σχήμα 6: Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.	27
Σχήμα 7: Προστατευτικές ομάδες Z, t-Boc και F-moc	28
Σχήμα 8: Προστατευτικές ομάδες μεθυλεστέρα και βενζυλεστέρα	29
Σχήμα 9: Διαδικασία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Y=προστατευτική ομάδα.	30
Σχήμα 10: Οι βάσεις του DNA, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη.	31
Σχήμα 11: Γενική αντίδραση των NCA's.	34
Σχήμα 12: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.	35
Σχήμα 13: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.....	37
Σχήμα 14: α)Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).	37
Σχήμα 15: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	38
Σχήμα 16: α)Ακετυλίωση απαρχητή, β)γρηγορότερη έναρξη λόγω του N-acetyl-Gly-NCA.....	41
Σχήμα 17: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως.	46
Σχήμα 18: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.	47
Σχήμα 19: Μηχανισμός πολυμερισμού μέσω τριμέθυλοπυριτικών αμινών.	48

Σχήμα 20: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνουν ισοκουανατοχλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.	49
Σχήμα 21: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.	52
Σχήμα 22: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.	53
Σχήμα 23: Σύνθεση poly-L-histidine κατά τον Katchalski [35].	56
Σχήμα 24: Πορεία για την σύνθεση του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP[71].	57
Σχήμα 25: Πολυμερισμός του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP [71].	58
Σχήμα 26: Σύνθεση πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξειδίου-b-πολύ(L-ιστιδίνη) [73].	59
Σχήμα 27: Σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη). [74]	60
Σχήμα 28: Πολυμερισμός ιστιδίνης σε συνδυασμό με χημεία click [75].	61
Σχήμα 29: Πολυμερισμός ιστιδίνης με σχηματισμό διακλαδισμένων πολυμερών [76]. ..	62
Σχήμα 30: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με συνδυασμό πολυμερισμών RAFT και ROP [77].	63
Σχήμα 31: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με υαλουρονικό οξύ [78].	64
Σχήμα 32: Η δομή της γλυκίνης.	64
Σχήμα 33: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.	81
Σχήμα 34: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.	82
Σχήμα 35: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.	85
Σχήμα 36: Συσκευή αραίωσης απαραίτητη.	86
Σχήμα 37: Αντίδραση σύνθεσης Nim-Trt-L-Histidine NCA.	89
Σχήμα 38: Αντίδραση σχηματισμού του NCA της γλυκίνης.	96
Σχήμα 39: Πορεία αντίδρασης πολυμερισμού poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)]	107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδιασμένου DNA.....	33
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των μονομερών NCAs με την χρήση τεχνικών υψηλού κενού.	50
Εικόνα 3: Φάσμα ¹³ C-NMR για την καθαρή PGly	67
Εικόνα 4: Φάσμα IR της Boc-L-Histidine-(Trt)-OH	90
Εικόνα 5: Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	91
Εικόνα 6: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA 2ώρες μετά την αντίδραση.....	91
Εικόνα 7: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA	95
Εικόνα 8: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.....	96
Εικόνα 9:Συσκευή για NCA γλυκίνης.	98
Εικόνα 10:Συσκευή παρασκευής NCA γλυκίνης με προσαρμοσμένο σταγονομετρικό χωνί και παροχή αργού	99
Εικόνα 11:NCA μετά από αντίδραση	100
Εικόνα 12:Διήθηση με τη βοήθεια φίλτρου και αντλίας	101
Εικόνα 13:NCA μετά από ανακρυσταλλώσεις	103
Εικόνα 14: Φάσμα NMR L-glycine NCA.	103
Εικόνα 15:Φασμα IR NCA-γλυκίνης.....	104
Εικόνα 16: Αμπούλα πολυμερισμού.	105
Εικόνα 17: Συσκευή πολυμερισμού.	106
Εικόνα 18:Απόσταξη βενζολίου	108
Εικόνα 19:Τελική συσκευή πολυμερισμού.	110
Εικόνα 20:Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.	111
Εικόνα 21:Πολυμερές μετά από διήθηση σε χωνί Buchner.....	112
Εικόνα 22:Μεμβράνη dialysis	113

Εικόνα 23:Συσκευή για freeze-drying.....	114
Εικόνα 24: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly μετά το πολυμερισμό.....	115
Εικόνα 25: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly μετά την αποπροστασία.....	116
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly.....	117
Εικόνα 27: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly μετά το πολυμερισμό.....	118
Εικόνα 28: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly μετά την αποπροστασία.....	119
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly.....	120
Εικόνα 30: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly μετά το πολυμερισμό.....	121
Εικόνα 31: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly μετά την αποπροστασία.....	122
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly.....	123
Εικόνα 33: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly σε τιμές pH 7,4 6,50 5 και 3.....	133
Εικόνα 34:Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly σε τιμές pH 7,4 6,50 5 και 3.	134
Εικόνα 36: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly σε τιμές pH 7,4 6,50 5 και 3.....	135
Εικόνα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10%,20% και 40% PGly σε τιμές pH 6,50.	136
Εικόνα 38: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10%,20% και 40% PGly σε τιμές pH 5.	137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Απόδοση (%) σε υδαντοϊκά οξέα από την αντίδραση αμινών με διάφορα NCA's.	42
Πίνακας 2: Επίδραση διαλύτη κατά την αντίδραση δυο ισοδυνάμων αμίνης με Phe-NCA.	42
Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 10% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	125
Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 20% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	126
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	127
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 10% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	130
Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 20% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	130
Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO- <i>b</i> -(His- <i>co</i> -Gly) με 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.	131

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Επιστήμης Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ερμόλαου Ιατρού. Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών πολυμερών και η μελέτη της αυτο-οργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα. Το παρόν ερευνητικό θέμα είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρο και προσφέρεται ως εναρκτήρια μελέτη για περαιτέρω διερεύνηση στο πεδίο των πολυπεπτιδικών νανοφορέων που αποκρίνονται σε μεταβολές των εξωτερικών ερεθισμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της Επιστήμης των Πολυμερών κατά τον προηγούμενο αιώνα υπήρξε ραγδαία. Από την υιοθέτηση της έννοιας του μακρομορίου μέχρι και τις σύγχρονες εξελίξεις και εφαρμογές των πολυμερών σε σχεδόν όλους τους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας η εποχή μας μπορεί να χαρακτηριστεί ως *η εποχή των πολυμερικών υλικών*.

Τα πολυμερή έδωσαν πρακτικές λύσεις σε πολλά προβλήματα της επιστήμης και της βιομηχανίας ενώ έφεραν και επανάσταση σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας και ζωής. Καθημερινά ερχόμαστε σε επαφή με τα αποτελέσματα της προόδου στον τομέα των πολυμερών. Χρώματα, πλαστικά, υφάνσιμες ύλες, φιλμ, υλικά συσκευασίας, κόλλες, λάστιχα αυτοκινήτων, σωλήνες, κινητά τηλέφωνα και υπολογιστές είναι μερικά από τα προϊόντα που όλοι μας χρησιμοποιούμε καθημερινά και αποτελούνται από πολυμερή. Παράλληλα τα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε εξελίξεις και εφαρμογές σε τομείς υψηλής τεχνολογίας όπως η διαστημική, η μικροηλεκτρονική, η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η νανοτεχνολογία. Μέλη ακόμα και όργανα σώματος έχουν αντικατασταθεί από πολυμερικά υλικά (οστά, καρδιά, τεχνητές αρτηρίες), ενώ πολλά μέρη αεροσκαφών και διαστημοπλοίων κατασκευάζονται από πολυμερή με ασυναγώνιστες μηχανικές και θερμικές ιδιότητες. Μικροηλεκτρονικά συστήματα, κυκλώματα στερεής κατάστασης αποτελούνται από πολυμερή και πραγματοποιούν λειτουργίες που άλλα υλικά δεν μπορούν.

Έχοντας ως δεδομένο ότι βιολογικά υλικά όπως το DNA και πολλές πρωτεΐνες είναι πολυμερή δεν άργησε να στραφεί το ενδιαφέρον σε αυτούς τους τομείς. Ανάμεσα στα υλικά που εμφανίζονται ιδιαίτερα υποσχόμενα είναι τα πολυπεπτίδια με τα οποία και ασχολούμαστε στην παρούσα εργασία. Τα πολυπεπτίδια όντας βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά ανοίγουν νέους ορίζοντες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων με εκλεκτική και ελεγχόμενη αποδέσμευση αυτών σε ιστούς που πάσχουν, αυξάνοντας τα οφέλη από την χρήση ιδιαίτερα ισχυρών φαρμάκων και μειώνοντας όποιες τυχόν παρενέργειες. Οι εφαρμογές τους

περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την χρήση τους ως βάση για την προετοιμασία συνθετικών αντιγόνων ή μιμητών πρωτεϊνών, βιοαισθητήρων βιοαπορροφούμενων ραμμάτων, ελασμάτων για ενίσχυση των οστών, βιολογικών μεμβρανών, οπτικών διακόπτων και υδροκρυσταλλικών υλικών.

1.1 Σκοπός της εργασίας

Η ικανότητα των πολυπεπτιδίων να αυτοοργανώνονται σε διάφορες δομές έδωσε το έναυσμα για την έρευνα και την μελέτη τους. Έτσι ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση πρότυπων πολυπεπτιδίων που θα έχουν την δυνατότητα να ανταποκρίνονται σε μεταβολές του pH και της θερμοκρασίας.

Ανάμεσα στα αμινοξέα που έγιναν προσπάθειες να πολυμεριστούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ιστοιδίνη. Αυτό οφείλεται στο ότι η ιστοιδίνη μπορεί να έχει πολλά πλεονεκτήματα και ιδιαίτερα εκλεκτικότητα, επειδή έχει μεγάλη αποκρισιμότητα στο pH. Εξαιτίας του ιμιδαζολίου, μπορεί το μόριο να φορτιστεί ή να παραμείνει αφόρτιστο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος που βρίσκεται.

Παρατηρείται λοιπόν στη βιβλιογραφία μια στροφή του ενδιαφέροντος και της μελέτης στον πολυμερισμό της ιστοιδίνης ειδικά τα τελευταία χρόνια όπου η τεχνολογία της μεταφοράς φαρμάκων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Ως προστατευτικές ομάδες έχουν χρησιμοποιηθεί η βένζυλο και η DNP. Η παρούσα εργασία περιέχει τον πολυμερισμό του NCA ιστοιδίνης με τρίτυλο προστατευτική ομάδα, η οποία και δίνει επιπλέον πλεονεκτήματα που θα αναφερθούν παρακάτω.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του Nim-Trt-L-Histidine NCA. Η σύνθεση poly(m-PEO)-*b*-[poly(L-His)-*co*-poly(Gly)] με διαφορετικές αναλογίες PGly κατά mol ως προς την πολυιστιδίνη έγινε ώστε να μελετηθεί το αποτέλεσμα που έχει η αύξηση του PGly στη μεταβολή της δομής των πολυμερών και συνεπώς στην αποκρισιμότητα που έχουν τα πολυμερή στην αλλαγή του pH. Παράλληλα έγινε μελέτη των δομών των πολυμερών σε διαφορετικά pH και θερμοκρασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Γενικά για τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα

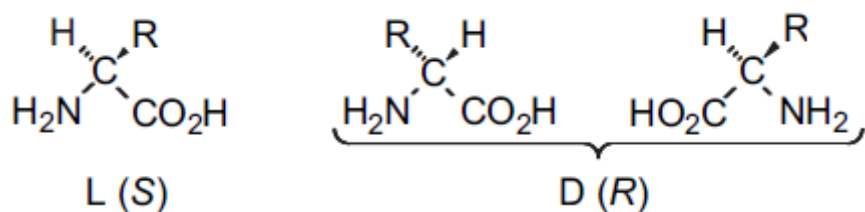
Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια που συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτά τα πολυδύναμα μακρομόρια παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλες τις βιολογικές λειτουργίες [1]. Πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργούν είτε ως καταλύτες, για την μεταφορά και αποθήκευση άλλων μορίων, να παρέχουν ανοσοπροστασία και μηχανική στήριξη, να δημιουργούν κίνηση, να διαβιβάζουν νευρικές ώσεις και να ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση.

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων και περιέχουν μια μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων όπως αλκοόλες, θειόλες, καρβοξυλικές ομάδες και διάφορες βασικές ομάδες. Έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν πολύπλοκα συσσωματώματα αλληλοεπιδρώντας με βιολογικά μακρομόρια, με τα οποία δρουν συνεργειακά αποκτώντας ιδιότητες που δεν προϋπήρχαν σε αυτά. Η μεταγωγή σημάτων αλλά και διάφορες μακρομοριακές μηχανές που βοηθούν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA είναι παραδείγματα τέτοιων συσσωματωμάτων. Ανάλογα με την ευκαμψία ή την ακαμψία τους λειτουργούν ως δομικά στοιχεία του κυτταρικού σκελετού ή του συνδετικού ιστού.

Τα α-αμινοξέα αποτελούνται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, τον α-άνθρακα, που συνδέεται με μια αμινική ομάδα, μια καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα **R**, που λέγεται πλευρική αλυσίδα. Έχοντας στο τετραεδρικό άτομο του άνθρακα τέσσερις διαφορετικές ομάδες, τα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Υπάρχουν λοιπόν δυο κατοπτρικά είδη τα L- και D- ισομερή (Σχήμα 1). Μόνο τα L-αμινοξέα συναντώνται στις πρωτεΐνες. Για όλα σχεδόν τα αμινοξέα, το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R.

Κάθε μια από τις λειτουργικές ομάδες ενός α-αμινοξέος μπορεί να υπάρχει στην πρωτονιωμένη ή την αποπρωτονιωμένη μορφή [2]. Η ιοντική κατάσταση

μιας λειτουργικής ομάδας καθορίζεται από δυο παραμέτρους: την χημική της φύση και το pH του περιβάλλοντος. Καθώς το pH αλλάζει η λειτουργική ομάδα κερδίζει ή χάνει ένα πρωτόνιο. Η χημική φύση της ομάδας καθορίζει σε ποια μικρή περιοχή του pH αυτό συμβαίνει. Αυτή η περιοχή ορίζεται από τον λογάριθμο της σταθεράς ιοντισμού της ομάδας (**pKa**).



Σχήμα 1: Χημική και στερεοχημική φύση των α-αμινοξέων.

Οι είκοσι πλευρικές αλυσίδες **R** διαφοροποιούν τα αμινοξέα, διότι αποτελούνται από διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες που διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τη δεσμευτική συγγένεια υδρογόνου, την υδροφοβικότητα και την χημική αντιδραστικότητα [1]. Τα 19 από τα 20 αμινοξέα είναι πρωτοταγείς αμίνες, ενώ μόνο η προλίνη είναι δευτεροταγής αμίνη. Κάθε αμινοξύ μπορεί να αναγραφεί συντομογραφικά με τους τρεις πρώτους χαρακτήρες της αγγλικής ονομασίας: Ala για την αλανίνη, Gly για την γλυκίνη κλπ. Και τα 20 αμινοξέα είναι απαραίτητα στην πρωτεϊνική σύνθεση, όμως ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να βιοσυνθέσει μόνο τα 10 από αυτά. Τα υπόλοιπα 10 ονομάζονται *απαραίτητα αμινοξέα*, γιατί ο οργανισμός πρέπει να τα αποκτήσει με την διατροφή [3].

Το απλούστερο αμινοξύ είναι η γλυκίνη, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα. Η αλανίνη είναι το επόμενο με μια μεθυλομάδα αντί του υδρογόνου. Μεγαλύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες (με τρία και τέσσερα άτομα άνθρακα) βρίσκονται στην βαλίνη την λευκίνη και την ισολευκίνη. Αυτές οι μεγαλύτερες αλυσίδες προσδίδουν υδροφοβικότητα μέσω της οποίας επέρχεται σταθεροποίηση των δομών στις πρωτεΐνες.

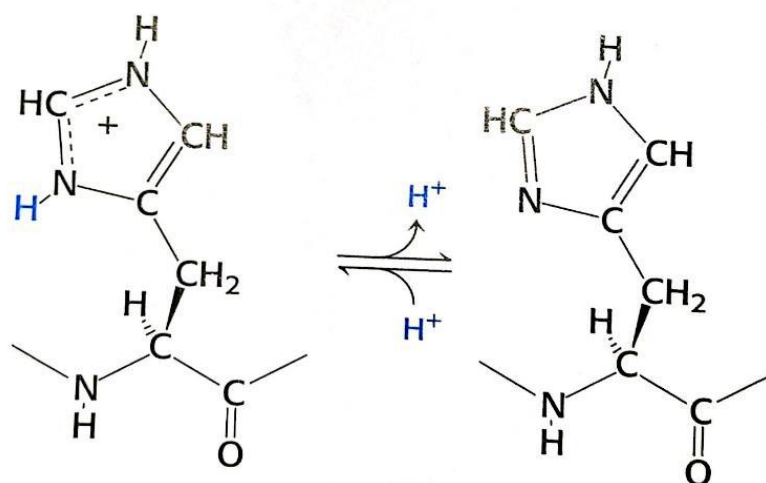
Εν συνεχεία ακολουθούν τρία αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Η φαινυλαλανίνη, περιέχει ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια μεθυλενική ομάδα καθώς και η τρυπτοφάνη που περιέχει ένα ινδολικό δακτύλιο. Τα δυο αυτά παρουσιάζουν μεγάλη υδροφοβικότητα. Τέλος η τυροσίνη που έχει έναν φαινολικό δακτύλιο. Οι αρωματικοί δακτύλιοι των

συγκεκριμένων αμινοξέων περιέχουν απεντοπισμένα τα ηλεκτρονικά τους νέφη π, που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με άλλα συστήματα π και να μεταφέρουν ηλεκτρόνια.

Ένα άτομο θείου εμφανίζεται στις πλευρικές αλυσίδες της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Η κυστεΐνη περιέχει σουλφιδρυλομάδα και η μεθειονίνη δεσμό θειοαιθέρα.

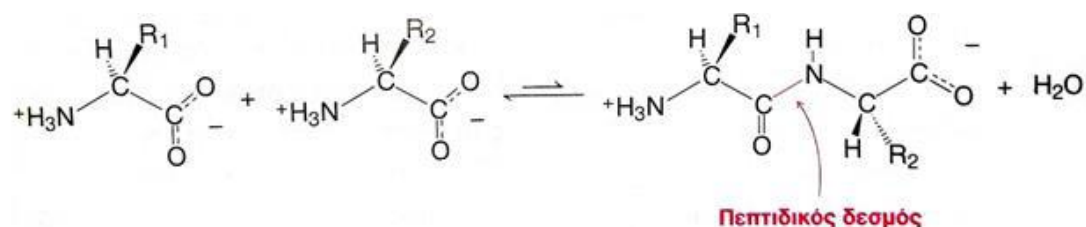
Δυο αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, περιέχουν αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες. Τα υδροξύλια τις καθιστούν πιο υδρόφιλες από τις αντίστοιχες αλειφατικές.

Αμινοξέα με πολύ πολικές πλευρικές ομάδες και μεγάλη υδροφιλικότητα είναι η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστιδίνη. Η λυσίνη και η αργινίνη είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Η ιστιδίνη περιέχει μια ομάδα ιμιδαζολίου, έναν αρωματικό δακτύλιο που μπορεί να φορτιστεί (Σχήμα 2). Με pKa κοντά στο 6, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να φορτιστεί θετικά ή να είναι αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον που θα βρεθεί. Πολύ συχνά απαντάται η ιστιδίνη στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, όπου το ιμιδαζόλιο μπορεί να δεσμεύει και να απελευθερώνει πρωτόνια κατά την διάρκεια των ενζυμικών αντιδράσεων.



Σχήμα 2: Ο ιοντισμός της ιστιδίνης.

Μεταξύ των αμινοξέων υπάρχουν επίσης και δυο με όξινης πλευρικές αλυσίδες, το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ. Τα μη φορτισμένα τους παράγωγα ονομάζονται ασπαραγίνη και γλουταμίνη και περιέχουν μια τελική αμιδική ομάδα στη θέση της καρβοξυλικής. Τα αμινοξέα, που είναι τα μονομερικά στοιχεία των πρωτεϊνών, ενώνονται μεταξύ τους με τον *πεπτιδικό δεσμό*. Ο πεπτιδικός δεσμός λέγεται και αμιδικός δεσμός και γίνεται ανάμεσα στην α-καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος και στην α-αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος με την απελευθέρωση ενός μορίου νερού (Σχήμα 3). Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται μάλλον προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης, κάτι που σημαίνει ότι η βιοσύνθεση του πεπτιδικού δεσμού χρειάζεται την προσθήκη ελεύθερης ενέργειας. Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αρκετά σταθεροί κινητικά.

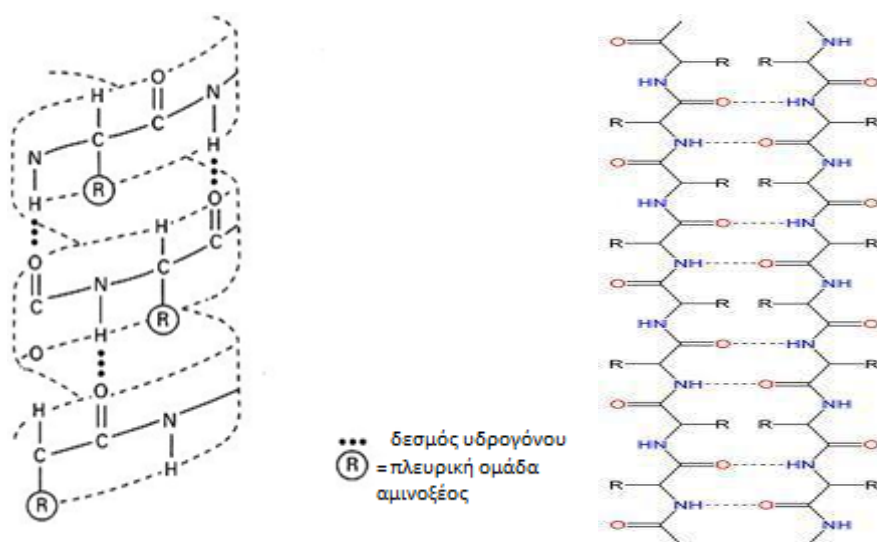


Σχήμα 3: Πεπτιδικός δεσμός. Η σύνδεση δυο αμινοξέων συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού.

Οι πρωτεΐνες έχουν τέσσερα διαφορετικά επίπεδα δομής [4]. Η *πρωτοταγής* δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στην ακολουθία με την οποία τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους. Οι χημικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης εξαρτώνται επίσης από τα ανώτερα επίπεδα δομών, δηλαδή από το πώς η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται ώστε να αποκτήσει το μόριο ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα. Η *δευτεροταγής δομή* αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τμήματα μιας πεπτιδικής αλυσίδας προσανατολίζονται, λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων. Η *τριτοταγής δομή* αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης περιελίσσεται συνολικά στον χώρο. Η *τεταρτοταγής δομή* αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο πολλά μόρια πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τον σχηματισμό μεγάλων δομικών συσσωματωμάτων.

Οι δυο βασικές περιοδικές δευτεροταγείς δομές που απαντώνται στις πρωτεΐνες είναι η α-έλικα και η β-πτυχωτή επιφάνεια [5] (Σχήμα 4). Η α-έλικα

είναι δεξιόστροφη και έχει δομή ράβδου, με την ελιγμένη κύρια αλυσίδα να σχηματίζει το εσωτερικό της και τις πλευρικές αλυσίδες να εκτείνονται προς τα έξω, διαμορφωμένες σε έλικα. Η διαμόρφωση α-έλικας σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ $-NH$ και $-CO$ που απέχουν τέσσερα κατάλοιπα στην κύρια αλυσίδα με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο $1,5 \text{ \AA}$ και να είναι στραμμένο 100° σε σχέση με τον κύριο άξονα ενώ το βήμα της έλικας είναι $3,6$ αμινοξέα ($5,4 \text{ \AA}$). Η β-πτυχωτή, δομή ανοιχτή και επίπεδη με δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ $-NH$ και $-CO$ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ των γειτονικών αμινοξέων είναι $3,5 \text{ \AA}$ ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μια β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα [6].



Σχήμα 4: α-έλικα και β-φύλλο

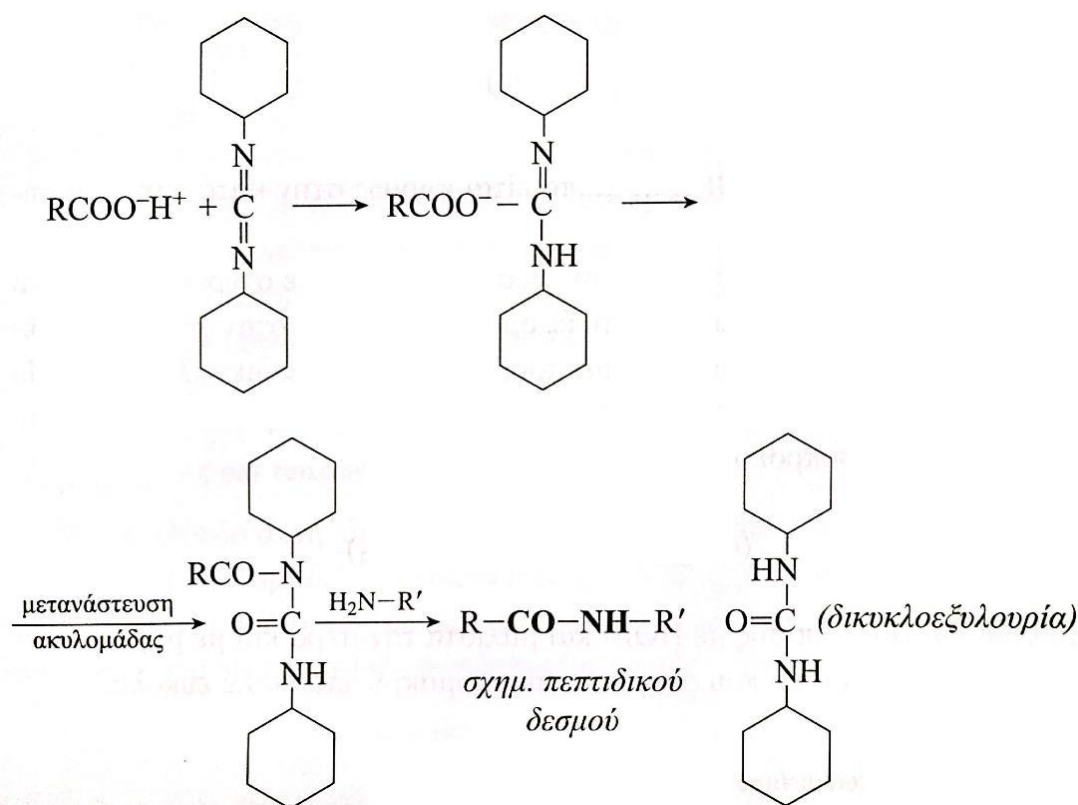
2.2 Πεπτιδική σύνθεση

Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δυο αμινοξέων απαιτεί την προστασία της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του δεύτερου. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να σχηματίσει τον πεπτιδικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος.

Για την πεπτιδική σύνθεση υπάρχουν πολλές μέθοδοι. Από αυτές η μέθοδος του **δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου** και η μέθοδος των **ενεργών εστέρων** είναι οι πιο γνωστές και εύχρηστες [7]. Παράλληλα ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκουν τόσο η **μέθοδος Merrifield** όσο και η τεχνική του **ανασυνδυσμένου DNA**.

2.2.1 Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου

Η μέθοδος των καρβοδιιμιδίων στην πεπτιδική σύνθεση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 από τους Sheehan και Hess. Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο είναι μέχρι σήμερα το πιο διαδεδομένο αντιδραστήριο (Σχήμα 5). Η αντίδραση γίνεται στους 0°C και σε διαλύτες απόλυτο DMF, EtAc και διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιούνται ισομοριακές ποσότητες DCC και των παραγώγων των δυο αμινοξέων.



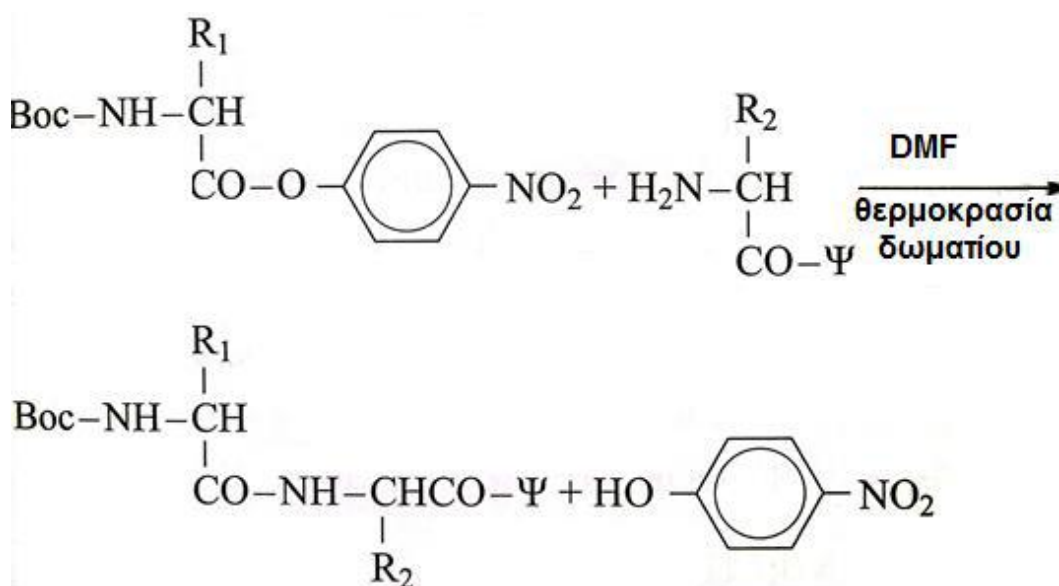
Σχήμα 5: Σύνθεση διπεπτιδίου με την μέθοδο DCC.

Η ευρεία χρήση του οφείλεται στο χρόνο αντίδρασης που είναι μικρός και στις μεγάλες συνήθως αποδόσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου του DCC είναι η τάση που έχει το πολύ ενεργό ενδιάμεσο να σχηματίζει οξαζολόνη, με αποτέλεσμα τη ρακεμείωση και σχηματισμό N-ακυλουρίας που δύσκολα απομακρύνεται.

Κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες και ασθενείς βάσεις όπως N-μεθυλομορφολίνη, για τον περιορισμό του σχηματισμού N-ακυλοουρίας.

2.2.2 Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων

Η ενεργοποίηση της προς αντίδρασης καρβοξυλομάδας του αμινοξέος με τη μέθοδο αυτή γίνεται σε ξεχωριστό στάδιο. Η καρβοξυλομάδα του N-προστατευμένου αμινοξέος μετατρέπεται σε π-νιτροφαινυλεστέρα με ισομοριακή ποσότητα π-νιτροφαινόλης, ο οποίος παρασκευάζεται και απομονώνεται σε καθαρή κατάσταση (Σχήμα 6). Στη συνέχεια ο εστέρας του συγκεκριμένου αμινοξέος αντιδρά με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος προς σχηματισμό του αντίστοιχου πεπτιδίου. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη απόλυτο DMF, EtAc ή απόλυτο THF. Η μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων και γενικά των ενεργών εστέρων μειονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων πεπτιδικής σύζευξης στο ότι ο χρόνος αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλος 24-72 ώρες. Αντίθετα έχει το πλεονέκτημα ότι δε λαμβάνεται καθόλου ρακεμικό προϊόν.



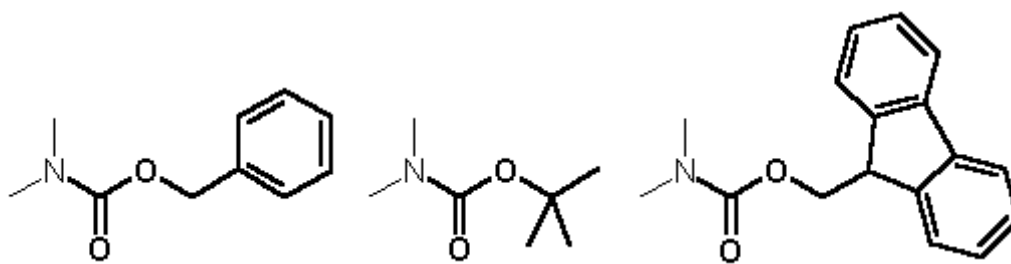
Σχήμα 6: Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.

2.2.3 Προστατευτικές ομάδες

Συχνά συμβαίνει, ιδιαίτερα κατά την σύνθεση περίπλοκων μορίων, μια λειτουργική ομάδα να παρεμποδίζει την πραγματοποίηση κάποιας επιθυμητής αντίδρασης σε μια άλλη λειτουργική ομάδα του ίδιου μορίου που βρίσκεται σε διαφορετική θέση. Όταν προκύπτει τέτοιο πρόβλημα μπορούμε να το παρακάμψουμε προστατεύοντας την λειτουργική ομάδα που αναστέλλει την πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης. Η προστασία περιλαμβάνει τρία στάδια :

1. Εισαγωγή της προστατευτικής ομάδας για να δεσμεύσει την ομάδα που παρεμποδίζει.
2. Πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης.
3. Απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας.

Υπάρχουν πολλές προστατευτικές ομάδες για την προστασία τόσο της αμινομάδας όσο και της καρβοξυλομάδας. Σε γενικές αρχές μια αμινομάδα μπορεί να προστατευτεί αντιστρεπτά με ακυλίωση, αλκυλίωση και αλκυλο-ακυλίωση. Για τις αμίνες οι κυριότερες προστατευτικές ομάδες είναι οι καρβοβενζοξυομάδα (**Z**), η τριτοταγής βουτυλοκαρβονυλομάδα (**t-Boc**) και η 9-φλουορενυλομεθυλοξυ-καρβονυλομάδα (**F-moc**) (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Προστατευτικές ομάδες Z, t-Boc και F-moc

Η προστασία της α-καρβοξυλομάδας των αμινοξέων γίνεται με εστεροποίηση και χρησιμοποιούνται συνήθως μεθυλ-εστέρες, αιθυλ-εστέρες, 4-νιτροβενζυλεστέρες και βενζυλεστέρες (Σχήμα 8). Η συνηθέστερη προστασία της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού και του γλουταμικού οξέος είναι η βενζυλική. Η προστασία γίνεται τοποεκλεκτικά ως προς το καρβοξύλιο του αμινοξέος με βενζυλική αλκοόλη και θειικό οξύ σε μεγάλες αποδόσεις.

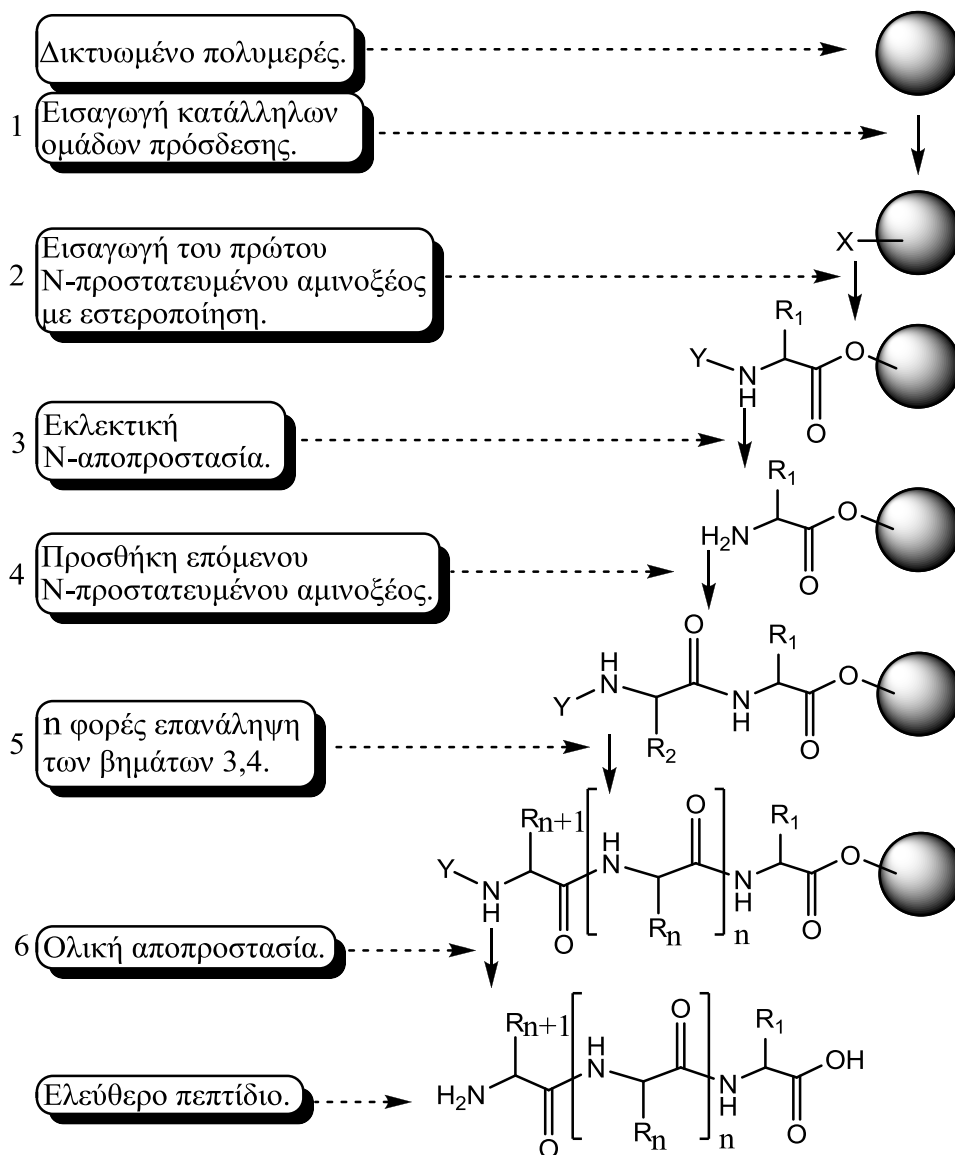


Σχήμα 8: Προστατευτικές ομάδες μεθυλεστέρα και βενζυλεστέρα

2.2.4 Τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield

Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων είναι ένα χρονοβόρο και επίπονο έργο λόγω της σταδιακής προσθήκης ενός αμινοξέος κάθε φορά. Μπορεί, ωστόσο, να απλοποιηθεί θεαματικά, εφαρμόζοντας τη μέθοδο στερεάς φάσης, που αναπτύχθηκε από τον R. Bruce Merrifield (Βραβείο Νόμπελ το 1984) το 1963. Σύμφωνα με την τεχνική Merrifield [8],[9],[10], η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση, συγκεκριμένα σε σφαιρίδια πολυμερούς πολυστυρενίου, το οποίο έχει παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε σε κάθε 100 περίπου βενζυλικούς δακτυλίους, ένας να φέρει σε θέση παρα- μία χλωρομεθυλο ομάδα (-CH₂Cl).

Κατά τη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε διάλυμα, που περιγράφηκε παραπάνω, για την προστασία της καρβοξυλικής ομάδας του ενός αμινοξέος στο στάδιο του σχηματισμού του αμιδικού δεσμού χρησιμοποιείται μία προστατευτική ομάδα, ένας εστέρας. Στην περίπτωση αυτή, το πρώτο αμινοξύ συνδέεται με εστερικό δεσμό στο αδιάλυτο υπόστρωμα και συγκεκριμένα στις θέσεις όπου το πολυστυρένιο είναι χλωρομεθυλιωμένο. Για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης απαιτούνται τέσσερα στάδια (Σχήμα 9) [11].



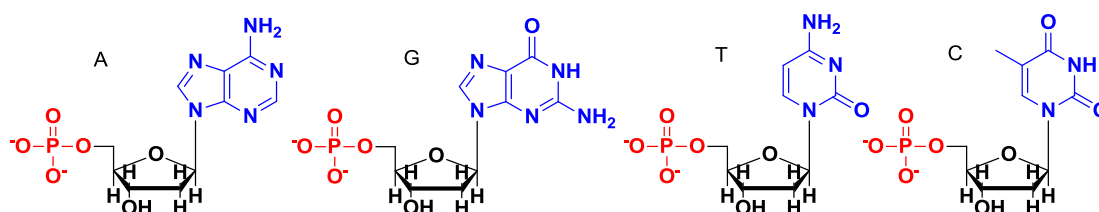
Σχήμα 9: Διαδικασία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Υ=προστατευτική ομάδα.

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η προστασία της αμινομάδας του πρώτου αμινοξέος. Στο δεύτερο στάδιο το προστατευμένο αμινοξύ συνδέεται με εστερικό δεσμό στο αδιάλυτο υπόστρωμα. Ακολουθεί έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν περίσσειες αντιδραστηρίων και τυχόν ποσότητα αμινοξέους που δε συνδέθηκε. Στο τρίτο στάδιο, η αμινομάδα του συνδεδεμένου πλέον αμινοξέος αποπροστατεύεται και στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης του δεύτερου κατά σειρά αμινοξέος, ακολουθούμενη από έκπλυση όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Το τρίτο και τέταρτο στάδιο επαναλαμβάνονται έως ότου σχηματιστεί το πεπτίδιο με την επιθυμητή γραμμική αλληλουχία και μήκος. Στο τέλος και μετά την

αποπροστασία όλων των λειτουργικών ομάδων των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, ο εστερικός δεσμός διασπάται με κατεργασία με άνυδρο HF και το ελεύθερο πεπτίδιο αποχωρίζεται και απομονώνεται. Τα πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεά φάση σε σχέση με αυτής σε διάλυμα είναι η μεγάλη της ταχύτητα, η αποφυγή των προβλημάτων διαλυτότητας στα πεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, η αυξημένη της απόδοση, λόγω της μείωσης των απωλειών κατά τα στάδια της αντίδρασης και της έκπλυσης των προϊόντων και η δυνατότητα αυτοματοποίησής της. Όμως και πάλι η απόδοση δεν είναι 100% με αποτέλεσμα στα λαμβανόμενα προϊόντα να απαιτείται καθαρισμός κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους. Επιπλέον, επειδή ο εστερικός δεσμός μεταξύ πεπτιδίου και αδιάλυτου υποστρώματος πρέπει να είναι σταθερός σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης και να μην επηρεάζεται από τα αντιδραστήρια αποπροστασίας των ενδιάμεσων σταδίων, απαιτούνται ισχυρές όξινες συνθήκες (άνυδρο HF) για τη διάσπασή του, οι οποίες είναι δυνατό να έχουν επίπτωση στην πεπτιδική αλυσίδα όπως να τη διασπάσουν ή να υποστεί ρακεμίωση. Ωστόσο, η τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield αποτελεί σήμερα την πλέον αξιόπιστη συνθετική μέθοδο για την παρασκευή πεπτιδίων με απολύτως καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων.

2.2.5 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA [12],[13]

Το DNA είναι ένα επίμηκες βιοπολυμερές από δεοξυνουκλεοτίδια που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του οργανισμού. Περιέχει ένα σάκχαρο (δεοξυριβόζη), μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Οι βάσεις του DNA μεταφέρουν τις γενετικές πληροφορίες ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα παίζουν δομικό ρόλο και αποτελούν την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς. Υπάρχουν τέσσερα είδη βάσεων η αδενίνη (A), η γουανίνη (G), η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) (Σχήμα 10).



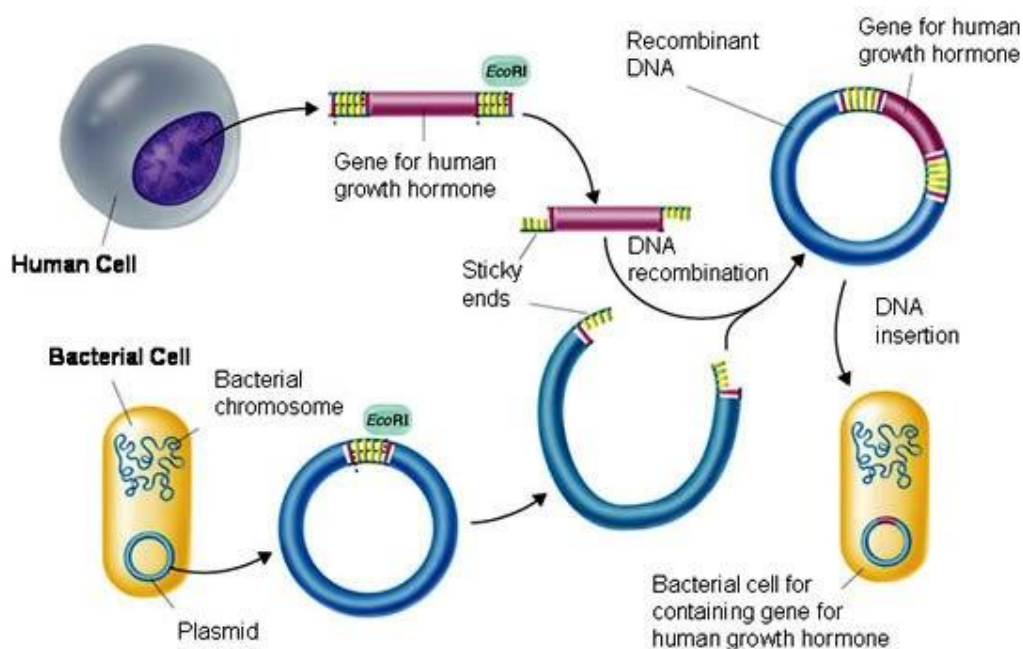
Σχήμα 10: Οι βάσεις του DNA, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη.

Το 1953 οι Watson και Crick ανακάλυψαν την δομή της διπλής έλικας του DNA και την εξειδίκευση των βάσεων όπου η αδενίνη ζευγαρώνει με την θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη λόγω δεσμών υδρογόνου και στερικών παραγόντων. Το DNA όμως δεν είναι το άμεσο εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Προηγείται η διαδικασία της μεταγραφής (transcription) προς αγγελιοφόρο RNA και ακολουθεί η διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσώματα (translation) δηλαδή η σύνθεση των πρωτεϊνών. Η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται ως εξής :



Υπάρχει σχέση μεταξύ της αλληλουχίας βάσεων του DNA και της αλληλουχίας των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη μέσω του γενετικού κώδικα. Ένα αμινοξύ κωδικοποιείται από μια ομάδα τριών βάσεων του DNA που λέγεται κωδικόνιο. Υπάρχουν $4^3=64$ πιθανές τριπλέτες, επομένως για τα περισσότερα αμινοξέα υπάρχουν περισσότερες από μια χαρακτηριστικές τριπλέτες δηλαδή ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος. Οι βάσεις διαβάζονται διαδοχικά ξεκινώντας από ένα συγκεκριμένο σημείο (που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστική αλληλουχία) και ονομάζονται προαγωγείς (promoters). Για παράδειγμα το 1961 ο Marsall Nirenberg [14] ανακάλυψε ότι προσθήκη πολυουρακίλης σε ένα σύστημα ελεύθερων κυττάρων οδηγεί στην σύνθεση πολυφαινουλαανίνης, διότι το κωδικόνιο UUU κωδικοποιεί την φαινουλαανίνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση ομοπολυμερών πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αγγελιοφόρους με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρινουκλεοτιδίων. Την δεκαετία του 1970 οι Berg (βραβείο Nobel το 1980), Boyer και Cohen ανέπτυξαν την « τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA». Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή πρωτεϊνών με συγκεκριμένη αλληλουχία καθώς και την παραγωγή μη φυσικών πολυπεπτιδικών αλληλουχιών με σχεδόν απόλυτο έλεγχο της σύστασης. Αρχικά είναι απαραίτητη η απομόνωση του φορέα και η δημιουργία του συνθετικού γονιδίου. Μπορούν να δημιουργηθούν στο εργαστήριο και νέοι συνδυασμοί από γονίδια και να πολλαπλασιαστούν με την εισαγωγή τους σε κατάλληλα κύτταρα (κλωνοποίηση) τα οποία αναπαράγονται,

χρησιμοποιώντας το DNA του ξενιστή. Η ενσωμάτωση του τμήματος του DNA γίνεται κυρίως σε φορείς που μπορούν να αναπαράγονται αυτόνομα όπως π.χ. τα πλασμίδια. Τα νέα τεχνητά γονίδια μπορούν να εκφραστούν σε μεγάλη απόδοση σε κύτταρα ξενιστών όπως τα βακτήρια (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδισμένου DNA.

Πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι η παρασκευή συγκεκριμένης αλληλουχίας πρωτεϊνών με μονομοριακή κατανομή, απαραίτητες για φαρμακευτικούς σκοπούς (όπως η ινσουλίνη) αλλά και για την σύνθεση δομικών πρωτεϊνών, ενώ μειονέκτημα, το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία των ανασυνδυσμένων γονιδίων και κατ' επέκταση των ανασυνδυσμένων φορέων (η όλη διαδικασία διαρκεί σχεδόν ένα χρόνο και παρακολουθείται στενά), με το είδος του κύτταρου ξενιστή να επηρεάζει σημαντικά τον χρόνο. Επίσης, η όλη διαδικασία της ανάπτυξης θα πρέπει να διακοπεί προτού τα κύτταρα εισέλθουν στην φάση του θανάτου.

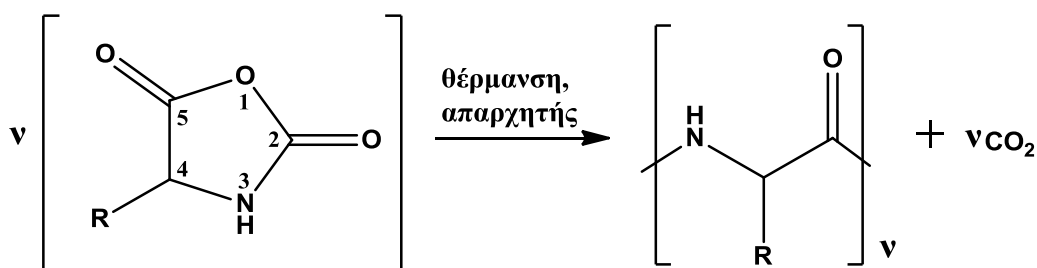
2.3 Σύνθεση πολυμερικών πεπτιδίων

Πολυμερή όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι παρόντα ως βασικά συστατικά σε όλα τα ζωντανά συστήματα. Συνθετικά πολυμερή που σχεδιάστηκαν να μιμούνται αυτά τα βιοπολυμερή, εξελίσσονται σε ένα πολύ ενεργό πεδίο λόγω της επιστημονικής και βιομηχανικής αξίας τους. Μια προσέγγιση περιλαμβάνει την απόκριση του βιοπολυμερούς σε

εξωτερικά ερεθίσματα, διαδικασία που είναι κοινότυπη για ένα φυσικό βιοπολυμερές. Με βάση αυτή την προσέγγιση έχουν συντεθεί πληθώρα πολυμερών, κυρίως πολυπεπτιδικών, με εφαρμογές στη μεταφορά φαρμάκων [15],[16], και στη βιοτεχνολογία [17],[18].

2.3.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's)

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος παρασκευής όμο- και συμπολυμερών πεπτιδίων αποτελεί ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων. Πλεονεκτήματά της η ευκολία, η ταχύτητα, οι μεγάλες αποδόσεις που λαμβάνονται και η αποφυγή ρακεμίωσης κατά την σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως οι αμίνες, αλκοξειδία, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα και με θέρμανση (Σχήμα 11). Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO₂ και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους.

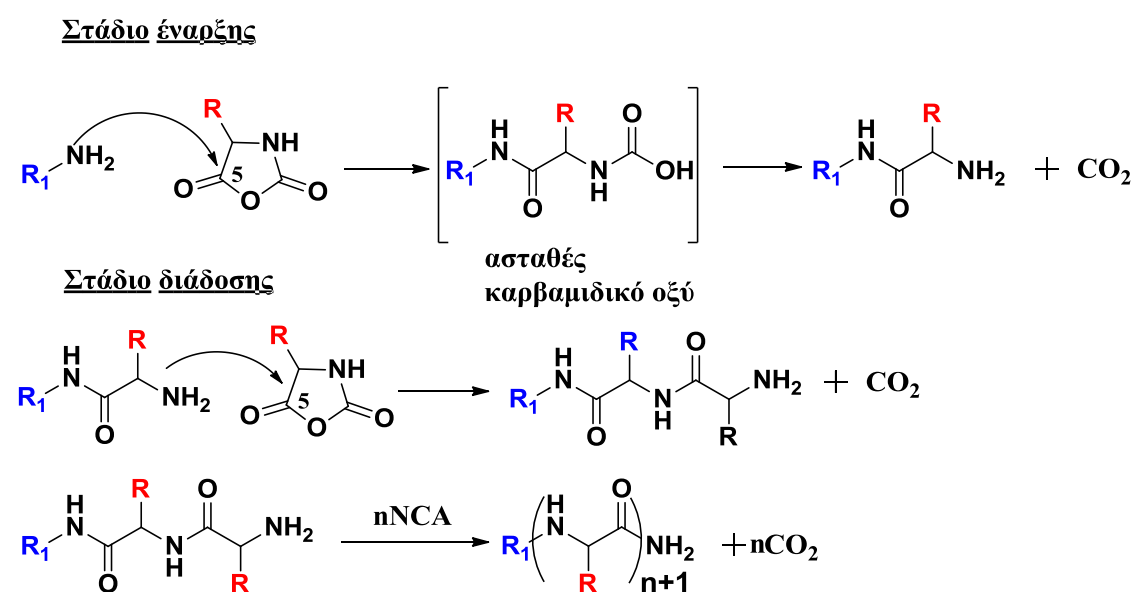


Σχήμα 11: Γενική αντίδραση των NCA's.

Με τη χρήση επισημασμένου ¹⁴C του NCA της γλυκίνης έχει αποδειχθεί ότι το CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον C(2) [19]. Παρά τη φαινομενική απλότητα αυτής της αντίδρασης, ένας γενικός μηχανισμός που περιλαμβάνει όλα τα μονομερή NCA's ή καλύτερα όλους τους απαρχητές, δεν έχει περιγραφεί.

2.3.2 Κανονικός μηχανισμός αμινών (Normal Amine Mechanism)

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά σε πολυμερισμούς που εκκινούνται από μη ιοντικούς απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα βασικό υδρογόνο, όπως οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, οι αλκοόλες και το νερό. Η αντίδραση είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή (Σχήμα 12) πολλών σταδίων από την τελική αμινομάδα στον C(5) του NCA, ακολουθούμενη από διάνοιξη του δακτυλίου, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση του αμινοτελικού άκρου.



Σχήμα 12: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των Ν-καρβοξυανυδριτών.

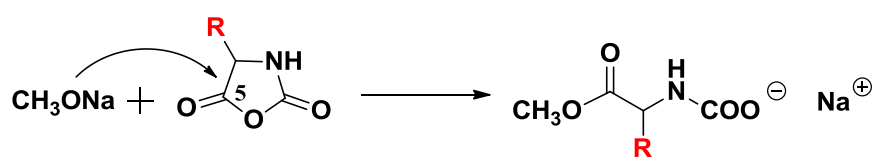
Κατά τον μηχανισμό αυτό κάθε μόριο απαρχητή εκκινεί μια πολυμερική αλυσίδα, έτσι ώστε ο κατά αριθμόν βαθμός πολυμερισμού να δίνεται από τον μοριακό λόγο μονομερούς προς τον απαρχητή. Η συγκέντρωση των αμινομάδων παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια του πολυμερισμού και είναι ίδια με την αρχική του απαρχητή [20]. Όταν η δραστηριότητα του απαρχητή είναι συγκρίσιμη με αυτή του τελικού άκρου της αναπτυσσόμενης αλυσίδας τότε η ταχύτητα πολυμερισμού υπακούει κινητική πρώτης τάξης – $d[M]/dt=k[M][I]_0$, κατά την οποία η σταθερά ταχύτητας παραμένει σταθερή για το κάθε επιμέρους στάδιο. Υπό τις συνθήκες αυτές τόσο τα θεωρητικά αλλά και πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατανομή του μοριακού βάρους θα είναι πολύ στενή (Poisson) [21],[22],[23].

Αποκλίσεις από την γενική κινητική πρώτης τάξης συμβαίνουν με αλλαγή του διαλύτη και της διαμόρφωσης του πολυμερούς δυο εννοιών που συνδέονται μεταξύ τους όπως και έχει αποδειχθεί. Κατά την αλλαγή από ισχυρό πολικό διαλύτη, (διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), ο-νιτροανισόλη και νιτροβενζόλιο), σε άπολο, τετραυδροφουράνιο (THF), 1,4- διοξάνιο, εμφανίζεται κινητική δυο σταδίων με το δεύτερο στάδιο να είναι πέντε φορές γρηγορότερο. Η αντίδραση γίνεται αυτοκαταλυτική και η κατανομή μοριακών βαρών μεγαλώνει [24]. Η αλλαγή της κινητικής συμβαίνει σε μετατροπή 20-40%, όταν ο βαθμός πολυμερισμού είναι της τάξης 6-12, για τον πολυμερισμό του NCA του γ-βενζυλοεστέρα του γλουταμικού οξέος σε διοξάνιο. Οι Idelson και Blout πρότειναν [25] ότι η αύξηση στην ταχύτητα της αντίδρασης οφείλεται στην εκκίνηση της ελικοειδούς δομής της αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Γεγονός που αποδεικνύει ότι η διαμόρφωση της αλυσίδας έχει επιρροή στην ταχύτητα της αντίδρασης. Περαιτέρω πειράματα εδραίωσαν την πρόταση αυτή. Βρέθηκε ότι το κρίσιμο μήκος για την διαμόρφωση της α-έλικας είναι της τάξης των επτά μονάδων γλουταμικού οξέος [26], επίσης με πειράματα κλασματοποίησης βρήκαν δυο πληθυσμούς, έναν με μήκος αλυσίδας γύρω στο πέντε και τον δεύτερο στο 135 περίπου με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών [27].

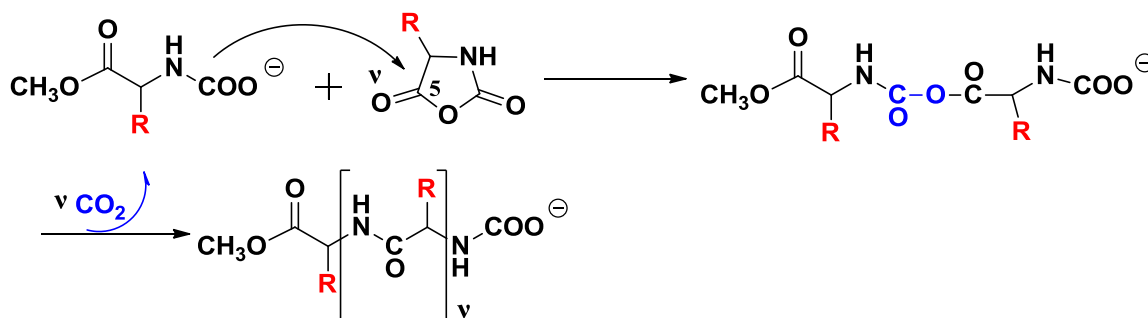
2.3.3 Μηχανισμός καρβαμιδικών(μηχανισμός του Blout).

Σύμφωνα με αυτό τον μηχανισμό των Idelson και Blout [28], μια ισχυρή βάση όπως το μεθοξείδιο του νατρίου αντιδρά με το μονομερές μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στον C(5) του ανυδρίτη (Σχήμα 13). Διάνοξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη προς σχηματισμό ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος.

Στάδιο έναρξης

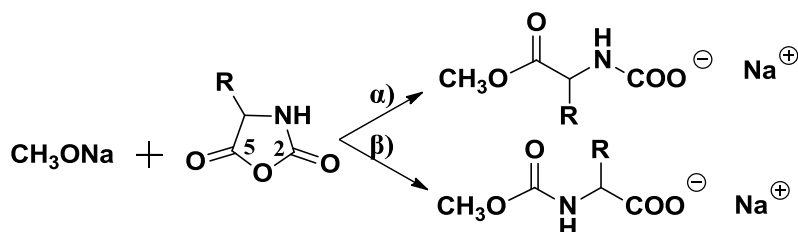


Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 13: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.

Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε ώστε να εξηγήσει το γεγονός ότι κατά την αντίδραση στοιχειομετρικών ποσοτήτων N-καρβοξυανυδριτών με μεθοξείδιο του νατρίου (Σχήμα 14) δυο προϊόντα λαμβάνονταν, το μετά νατρίου άλας του καρβαμιδικού εστέρα και το άλας του N-καρβοξυάμινο οξέος.



Σχήμα 14: α) Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).

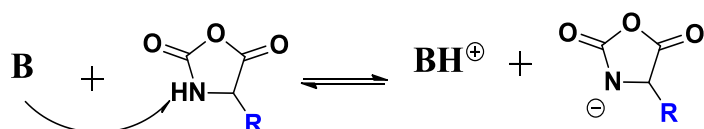
2.3.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (active monomer)

Για να ερμηνεύσουν τους πολυμερισμούς που δεν υπάκουαν στο μηχανισμό του Blout οι Bamford και Block [29], πρότειναν έναν νέο που μετέπειτα τροποποιήθηκε από τον Szwarc [30]. Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς όπου εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες. Στον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς ο βασικός απαρχητής δεν δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητας του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό

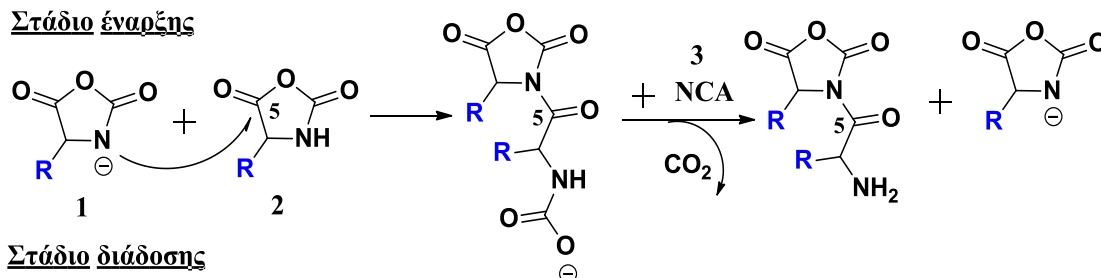
ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 15). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη.

Στην προέναρξη ο απαρχητής δρα ως βάση με το όξινο H του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά δεν είναι απαρχητής πολυμερισμού, αλλά καταλύτης. Το μονομερές σε αυτό το μηχανισμό υποχρεωτικά πρέπει να είναι μη υποκατεστημένο, να έχει το βασικό υδρογόνο (NH). Κατά την έναρξη το σχηματιζόμενο ανιόν του NCA δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον C(5) ενός μονομερούς NCA δίνοντας ένα διμερές και απελευθερώνοντας διοξείδιο του άνθρακα. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και ότι αυτό που αναγεννάται είναι το ανιόν του NCA σε κάθε στάδιο της αντίδρασης.

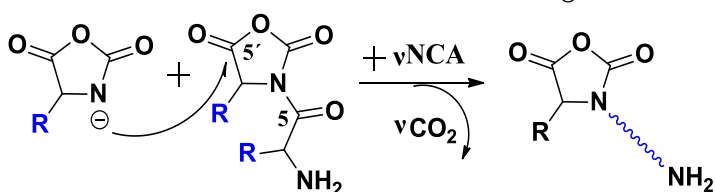
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 15: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

Η παρουσία της καρβαμιδικής ομάδας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την αντίδραση. Ελεύθερο καρβαμιδικό οξύ είναι πολύ ασταθές για να απομονωθεί και αποκαρβοξυλιώνεται γρήγορα, όμως καρβαμιδικά άλατα είναι σταθερά και σχηματίζονται εύκολα. Η σταθερότητα των καρβαμιδικών αλάτων εξαρτάται από την φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και από την φύση των υποκαταστατών του αζώτου στον ανυδρίτη. Στη περίπτωση που

χρησιμοποιούνται ισχυρές βάσεις ως απαραίτητες το αντισταθμιστικό ιόν εξασφαλίζει την σταθερότητα τους. Επίσης όση μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει το άζωτο τόσο πιο σταθερό είναι το καρβαμίδιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι καρβαμιδικές ομάδες δεν έχουν κανένα λόγο να αποκαρβοξυλιωθούν συστηματικά αλλά διατηρούνται μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση που σχετίζεται με την βασικότητα του μίγματος.

Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επίσης παρατηρούμε ότι το τμήμα του απαραίτητο δεν ενσωματώνεται στην τελική αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη μοριακή πολυδιασπορά. Το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία εκλεκτικότητα καθώς μπορεί να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στο τελικό προϊόν. Επίσης υπάρχουν πλήθος συνδυασμών και πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό. Για παράδειγμα και τα τρία καρβονύλια του τελικού διμερούς είναι λιγότερο ή περισσότερο πολωμένα και επιδέχονται προσβολή από NCA ανιόν. Από αυτά το μόνο που αποκαρβοξυλιώνεται είναι το ενδιάμεσο από την προσβολή του C(5). Αυξημένες είναι και οι πιθανότητες παράπλευρων αντιδράσεων, διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης.

2.3.5 Εκκίνηση με δευτεροταγείς αμίνες

Οι δευτεροταγείς αμίνες μπορούν να αντιδράσουν [31] με τους N-καρβοξυανυδρίτες με δυο τρόπους, ως πυρηνόφιλα, προσβάλλοντας τον C(5) όπως οι αμίνες και ως βάσεις, όπως οι τριτοταγείς αμίνες. Η πορεία που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τον λόγο της πυρηνοφιλίας προς την βασικότητα και τις συνθήκες της αντίδρασης. Με βάση αυτό τον λόγο επέρχεται ένας πρώτος διαχωρισμός μεταξύ των δευτεροταγών αμινών. Στην πρώτη ομάδα βρίσκονται οι αμίνες με χαμηλό λόγο πυρηνοφιλίας/βασικότητα. Εδώ ανήκουν όλες οι αλειφατικές με υποκαταστάτες πιο ογκώδεις από το αιθύλιο, όπως η διπροπυλαμίνη, διίσοπροπυλαμίνη και η δικυκλοεξυλαμίνη. Στην δεύτερη ανήκουν αυτές με υψηλό λόγο, αλλά και κάποιες αρωματικές λόγω της

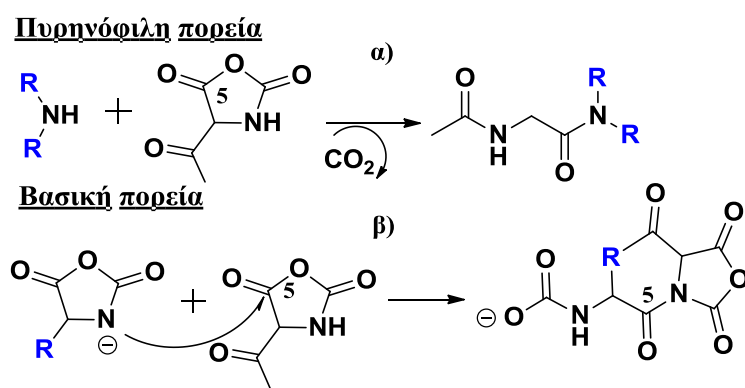
χαμηλής βασικότητάς τους, παραδείγματα αποτελούν η διμεθυλαμίνη, διαιθυλαμίνη, η πιπεριδίνη και η μορφολίνη. Μεταξύ των δυο ακραίων καταστάσεων βρίσκονται αμίνες όπως η διαιθυλαμίνη και η α-μεθυλοπιπεριδίνη, που μπορούν να δράσουν είτε ως βάσεις είτε ως πυρηνόφιλα αναλόγως των συνθηκών της αντίδρασης.

Ο διαχωρισμός σε ομάδες των δευτεροταγών αμινών βασίζεται σε πειραματικά αποτελέσματα, μέσω μεθόδων προσδιορισμού του μοριακού βάρους, ανάλυση ακραίων ομάδων, μετρήσεις κινητικής και μέτρηση του εκπεμπόμενου CO₂.

Οι Blout και Karlson [32], Bamford και Block [33], Goodman και Peggion [34], συνέκριναν τον μέσο βαθμό πολυμερισμού απαρχητή διαιθυλαμίνης ή της διίσοπροπυλαμίνης σε πολυμερισμούς του γ-O-Bz-Glu-NCA με αυτόν που προκύπτει από την μοριακή αναλογία μονομερούς προς απαρχητή, ο οποίος είναι ο μέσος βαθμός πολυμερισμού. Από την μεγαλύτερη πειραματική τιμή του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι απαρχητές εκκινούν πολυμερισμό αποκλειστικά μέσω ενεργοποιημένου μονομερούς. Ο βαθμός πολυμερισμού είχε εξαχθεί από μετρήσεις ιξωδομετρίας και έτσι ήταν κοντά στον μέσο κατά βάρος βαθμό, γεγονός που είναι επιδεκτικό σε σφάλματα καθώς την εποχή εκείνη λάμβαναν πολυμερή με μεγάλη πολυδιασπορά DP_w/DP_n που έφτανε και το δέκα. Έτσι το πειραματικό μοριακό βάρος θα μπορούσε να έχει υπερτιμηθεί κατά μια τάξη μεγέθους. Όσον αφορά τις κινητικές μελέτες πρώτοι οι Shalitin και Katchalski [35], βρήκαν κινητική πρώτης τάξης, ενδεικτικό του κανονικού μηχανισμού, για τον πολυμερισμό με διαιθυλαμίνη σε DMF.

Από την ανάλυση ακραίων ομάδων βγήκαν χρησιμότερα συμπεράσματα. Οι Goodman και Peggion [36],[37] χρησιμοποίησαν επισημασμένους απαρχητές με ¹⁴C, την διαιθυλαμίνη, την διβουτυλαμίνη και την διίσοπροπυλαμίνη και βρήκαν ότι η πρώτη δρούσε και σαν πυρηνόφιλο και ως βάση ενώ οι δυο τελευταίες αποκλειστικά ως βάσεις. Τα συμπεράσματα εξήχθηκαν από μέτρηση της ραδιενέργειας στα τελικά πολυμερή εκμεταλλευόμενοι μια βασική διαφορά μεταξύ των δυο μηχανισμών, την ύπαρξη ή όχι του απαρχητή στα προϊόντα.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τον Kricheldorf [38] με κινητικές και φασματοσκοπικές μελέτες. Ο προαναφερόμενος χρησιμοποίησε έναν έξυπνο και πρακτικό τρόπο να μελετήσει την μορφολίνη, την διαιθυλαμίνη, την διίσοπροπυλαμίνη και την δικυκλοεξυλαμίνη στον πολυμερισμό της γλυκίνης. Προσθέτοντας ακετυλιωμένο N-καρβοξυανυδρίτη της γλυκίνης στους πολυμερισμούς παρουσία των παραπάνω αμινών και του μη ακετυλιωμένου, μελέτησε τα προϊόντα που λάμβανε για κάθε σύστημα. Το πείραμα βασιζόταν στο γεγονός ότι η N-acetyl-Gly-NCA είναι περισσότερο ηλεκτρονιόφιλη από το αντίστοιχο NCA, έτσι ακετυλιώνει την δευτεροταγή αμίνη πριν αυτή προλάβει να εκκινήσει πολυμερισμό εάν και μόνο αν η τελευταία δρά ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 16). Στην αντίθετη περίπτωση η N-acetyl-Gly-NCA δρά ως συγκαταλύτης και επιταχύνει τον πολυμερισμό καθώς το στάδιο της έναρξης είναι γρηγορότερο από αυτό του κλασικού μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς.





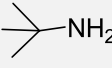
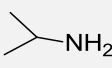
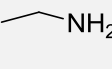
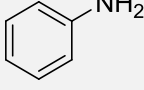
Σχήμα 16: α)Ακετυλίωση απαραίτητη, β)γρηγορότερη έναρξη λόγω του N-acetyl-Gly-NCA.

Η πορεία α) διαπιστώθηκε για την μορφολίνη και την διαιθυλαμίνη που δεν απέδωσαν πολυμερικά προϊόντα για διάφορες αναλογίες μονομερούς προς καταλύτη, αντιθέτως οι εναπομείναντες αμίνες έδωσαν την πορεία β). Επιπλέον με μελέτες IR και NMR αποδείχτηκε η συμμετοχή της ακέτυλο γλυκίνης στην πολυμερική αλυσίδα, γεγονός που αποτελεί απόδειξη για τον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς.

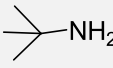

Πρώτος ο Korple [39],[40] διερεύνησε τις αντιδράσεις (Πίνακας 1) των αμινών με τους N-καρβοξυανυδρίτες καταλήγοντας στο ότι η πορεία της αντίδρασης

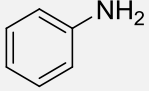
εξαρτάται από παράγοντες όπως η βασικότητα, οι στερεοχημικές απαιτήσεις, η συγκέντρωση, ο διαλύτης (Πίνακας 2) αλλά και το είδος του ανυδρίτη.

Πίνακας 1: Απόδοση (%) σε υδαντοϊκά οξέα από την αντίδραση αμινών με διάφορα NCA's.

Αμίνη	Gly-NCA	Sar-NCA	Phe-NCA
	100	–	80
	Low	Low	2.5
	90	0	60
	45	0	35(73)
	55	–	10(92)
	–	–	0(85)

Πίνακας 2: Επίδραση διαλύτη κατά την αντίδραση δυο ισοδυνάμων αμίνης με Phe-NCA.

Αμίνη	Διαλύτης	% σε υδαντοϊκό	% σε πολυπεπτιδίο
	CH ₂ Cl ₂	(1:1) 60	0
	Dioxane	9	45
	(CH ₃) ₃ N	6	50
	CH ₂ Cl ₂	(1:1)0	0
	Dioxane	0	0

	CH ₂ Cl ₂	(1:1)0	15
	(CH ₃) ₃ N	0	15

Αν η αμίνη προσβάλλει πυρηνόφιλα τον ανυδρίτη στους άνθρακες (5) και (2) ανάλογα με το Σχήμα 24, τότε θα προκύψουν τα αντίστοιχα αμιδοάμινο οξέα και τα υδαντοϊκά. Η πρώτη πορεία είναι που οδηγεί σε πολυπεπτίδια ενώ η δεύτερη αποτελεί τον συνήθη τερματισμό τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα πειράματα έγιναν με μεγάλη περίσσεια της αμίνης προς τον ανυδρίτη. Από τους παραπάνω πίνακες προκύπτουν τα κάτωθι συμπεράσματα. Με τον ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης και τις αλειφατικές αμίνες ο λόγος των ουρείδο οξέων προς τα αμιδοάμινο (δίνονται στην παρένθεση Πίνακας 1) φαίνεται να σχετίζεται με τις στερεοχημικές απαιτήσεις της κάθε αμίνης. Στην διμεθυλαμίνη και στην αιθυλαμίνη το αμιδοάμινο παράγωγο είναι το επικρατές προϊόν. Στην γλυκίνη υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά, αποδεικνύοντας ότι η βενζυλική ομάδα στην φαινυλαλανίνη δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πορεία της αντίδρασης. Αντιθέτως η σαρκοζίνη αντέδρασε αποκλειστικά με την πρώτη πορεία ανεξαρτήτως αμίνης. Επιπλέον για την φαινυλαλανίνη φαίνεται (Πίνακας 1) ότι για να προχωρήσει ο πολυμερισμός της οι στερεοχημικές απαιτήσεις πρέπει να είναι λιγότερες από αυτές τις ισοπροτυλαμίνης όπου σχεδόν μια στις δυο φορές καταλήγει στην λάθος πορεία, ικανοποίηση αυτών έρχεται από την ανιλίνη και την διμεθυλαμίνη.

Η ανιλίνη ως αρωματική αμίνη ($pK_a=4.58$), είναι ασθενέστερη βάση από τις αλειφατικές και αντιδρά αποκλειστικά με την πρώτη πορεία. Ορισμένο όμως ποσοστό πεπτιδίου σχηματίζεται παρά την μεγάλη της περίσσεια, γεγονός που δείχνει ότι δεν είναι τόσο δραστήρια προς τον NCA, όσο τα πιο βασικά αμιδοάμινο άκρα του πεπτιδίου που σχηματίζεται. Φαινόμενο το οποίο θα ήταν καταστροφικό για την έναρξη ενός πολυμερισμού καθώς η έναρξη θα ήταν πιο αργή από την διάδοση. Η διμεθυλαμίνη εμφανίζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα προς τον ανυδρίτη, εφόσον δεν παρατηρήθηκε καθόλου σχηματισμός πεπτιδίου ακόμα και στην περίπτωση που η αντίδραση έγινε στοιχειομετρικά.

Η επίδραση του διαλύτη μελετήθηκε από τους Peggion και Scoffone [41], με την χρήση της διίσοπροπυλαμίνης για τον πολυμερισμό του γ -O-Bz-Glu-NCA σε διαλύτη DMF και διοξάνιο καθώς και στα μίγματά τους. Χρησιμοποιώντας πάντα σταθερή στοιχειομετρία παρατήρησαν ότι καθώς μετέβαιναν από το λιγότερο πολικό διοξάνιο στο περισσότερο διμεθυλοφορμαμίδιο, τα μοριακά βάρη που λάμβαναν πλησίαζαν όλο και περισσότερο σε αυτήν. Γεγονός που εξηγείται ότι σε πιο πολικά περιβάλλοντα αυξάνονται οι πυρηνόφιλες προσβολές, άρα και η επίδραση του κανονικού μηχανισμού στα τελικά πολυπεπτίδια, ακόμα και στην περίπτωση της υψηλά παρεμποδισμένης αμίνης που χρησιμοποίησαν.

Συμπερασματικά ορισμένες δευτεροταγείς αμίνες όπως και οι πρωτοταγείς μπορούν να δώσουν σταθερές τελικές αμινομάδες μέσω πυρηνόφιλων προσβολών στον C(5) του NCA, μέσω του κανονικού μηχανισμού. Αρκεί η πυρηνοφιλία τους να υπερνικά την βασικότητά τους προϋπόθεση που εξαρτάται άμεσα από το στερεοχημικό περιβάλλον στο άτομο του αζώτου της αμινομάδας αλλά και από την συγκέντρωση και τον διαλύτη.

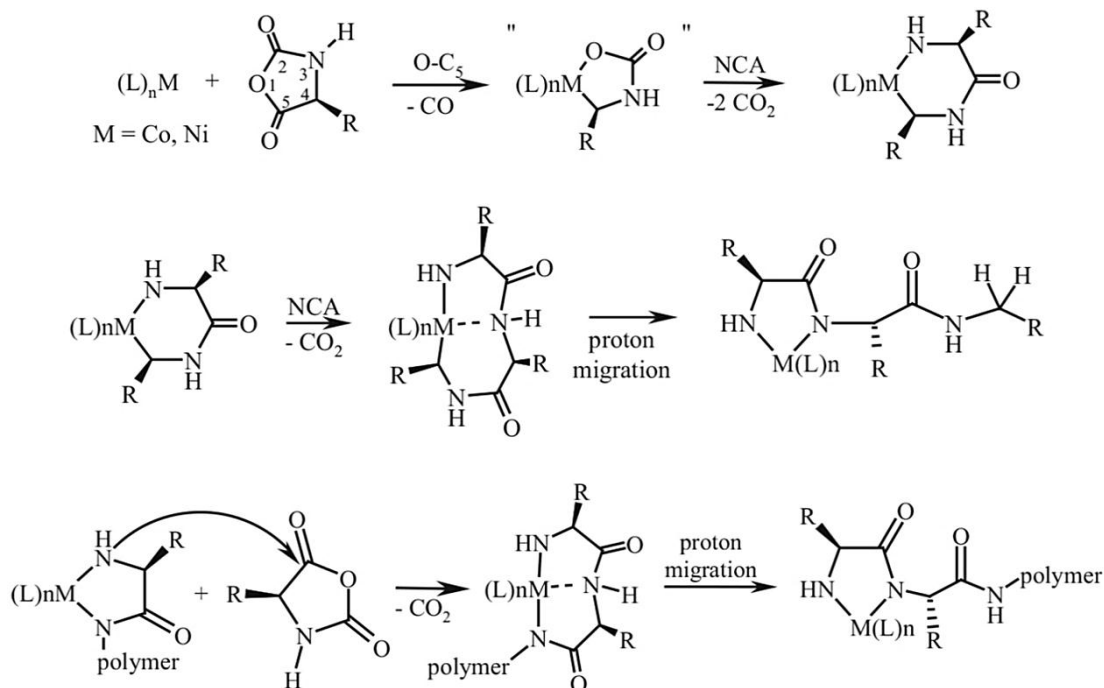
2.3.6 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης [42],[43],[44]

Μέχρι το 1997, οι προσπάθειες να συντεθούν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρή κατανομή, ήταν ανεπιτυχείς, λόγω του μεγάλου αριθμού ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων. Η ερευνητική ομάδα του Deming κατάφερε κάτι τέτοιο προτείνοντας μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να περιορίσουν σε σημαντικό βαθμό τις αντιδράσεις τερματισμού. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας σύμπλοκα των στοιχείων μετάπτωσης (κυρίως Ni και Co) ως δραστικά κέντρα, επιτεύχθηκε ο έλεγχος της προσθήκης των μονομερών στα άκρα των αναπτυσσόμενων αλυσίδων [42],[43],[44].

Αναπτύχθηκαν δραστικοί απαρχητές νικελίου και κοβαλτίου μηδενικού σθένους (π.χ. $bipyNi(COD)$, όπου $bipy=2,2'$ -διπυριδίνη, $COD=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο, και $(PMe_3)_4Co$), οι οποίοι επιτρέπουν το «ζωντανό» πολυμερισμό των NCAs δίνοντας πολυπεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους. Τα

μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από τα παραγόμενα πολυμερή με απλή καταβύθιση ή μέσω της διαδικασίας διαπίδωσης (dialysis). Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται παρέχουν ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικής και ηλεκτρονιακής παρεμπόδισης, με αποτέλεσμα οι παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας να περιορίζονται. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να παρασκευαστούν ομο- και συμπολυτεπτίδια με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και ελεγχόμενο μοριακό βάρος.

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στο συγκεκριμένο μηχανισμό, έδειξαν ότι αυτά τα μέταλλα αντιδρούν με τους NCAs, σχηματίζοντας μεταλλοκυκλικά σύμπλοκα, μέσω οξειδωτικής προσθήκης στους δεσμούς του ανυδρίτη. Οι αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης ακολουθούνται από προσθήκη ενός δεύτερου μορίου NCA για να δώσουν σύμπλοκα, που χαρακτηρίζονται ως εξαμελή αμιδο-αλκυλο μεταλλοκυκλικά. Όμως, έχει βρεθεί ότι με την προσθήκη των NCAs, κάποια στιγμή, οι ενδιάμεσοι εξαμελείς δακτύλιοι μετατρέπονται σε πενταμελείς, λόγω της μετανάστευσης ενός αμιδικού πρωτονίου στον άνθρακα που κάνει δεσμό με το μέταλλο, κάτι το οποίο απελευθερώνει το τέλος της αλυσίδας από το μέταλλο. Η διάδοση γίνεται, με την προσβολή της πυρηνόφιλης αμινομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο C(5) του NCA. Η αντίδραση αυτή καταλήγει σε ένα μεταλλοκυκλικό ενδιάμεσο, ενώ συνοδεύεται από ταυτόχρονη απελευθέρωση CO₂. Με αυτόν τον τρόπο, το μέταλλο μετακινείται σε όλο το μήκος της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, η οποία στο ενεργό της άκρο φέρει μια ισχυρά χηλική ένωση (Σχήμα 17). Ο σχηματισμός αυτών των χηλικών μεταλλοκυκλικών ενδιάμεσων κρίνεται απαραίτητος για να χαρακτηρίζεται «ζωντανός» ένας πολυμερισμός που χρησιμοποιεί μέταλλα μετάπτωσης.



Σχήμα 17: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως.

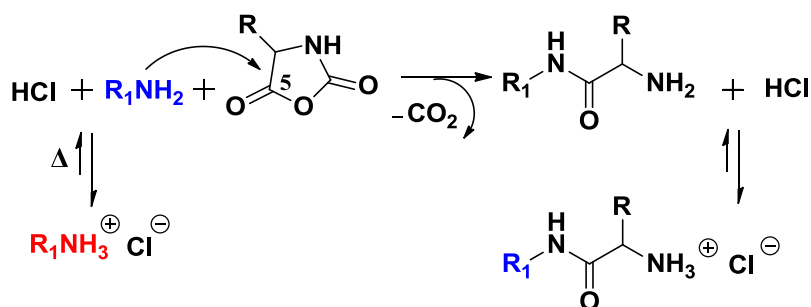
Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία ιχνών των μετάλλων στα τελικά πολυτεπτίδια, καθιστώντας τα τοξικά και άρα αδύνατο να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται μόνο σε μη N-υποκατεστημένους NCAs, καθώς απαιτείται το πρωτόνιο στο 3-N.

2.3.7 Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες

Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αμινών είχε πρώτα μελετηθεί από τον Kober [45],[46] σε αντιδράσεις με NCAs. Είχε διαπιστωθεί ότι μόνο ένα μόριο NCA αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της αμίνης και αυτό αποδόθηκε στην μειωμένη πυρηνοφιλία σε σχέση με την ελεύθερη αμίνη. Από τις ίδιες μελέτες ήταν γνωστό ότι η συγκέντρωση στο διάλυμα των ελεύθερων αμινών αυξάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι ελεύθερες αμινομάδες είναι αυτές που μπορούν να διαδώσουν τον πολυμερισμό στο σύστημα αυτό.

Έχοντας ως βάση τα παραπάνω ο Schlaad [47], χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα αμινοτελικών μακροαπαρχητών, με την σκέψη ότι τα επιπλέον πρωτόνια του συστήματος θα εμπόδιζαν τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, εφόσον η επαναπρωτονίωση του μονομερούς

θα ήταν γρηγορότερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα άλλο μονομερές (Σχήμα 18). Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αλάτων προκύπτει από το σχηματισμό μικρής ποσότητας της ελεύθερης αμίνης μέσω αντιστρεπτής αποδέσμευσης υδροχλωρίου. Αυτή η ισορροπία, η οποία βρίσκεται κυρίως προς την πλευρά των αλάτων, επιτρέπει την ύπαρξη ενεργών κέντρων για μικρό χρονικό διάστημα.



Σχήμα 18: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαραίτητη για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

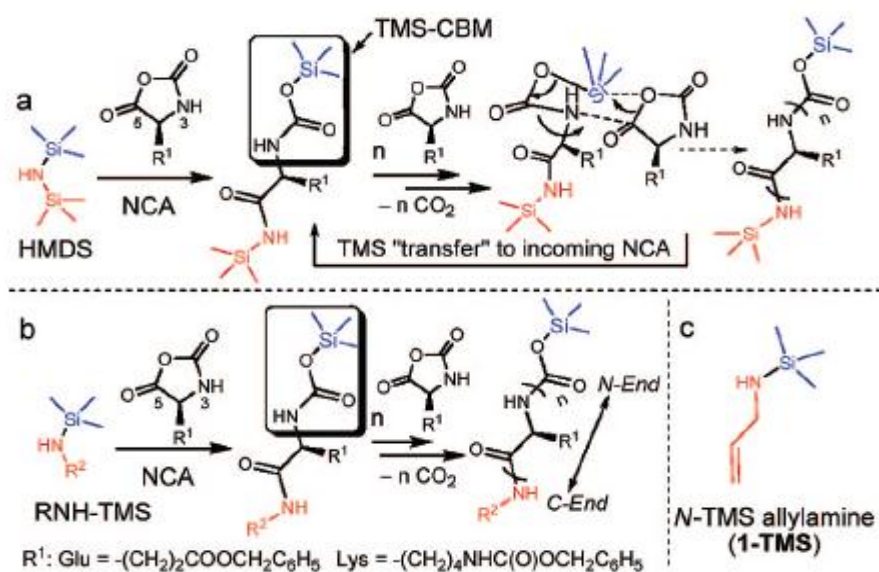
Για να επιτευχθεί ελεγχόμενος πολυμερισμός και όχι απλώς προσθήκη ενός μοναδικού NCA, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 40°C έως 80°C ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση ισορροπίας της ελεύθερης αμίνης, επομένως και των ενεργών κέντρων που εκκινούν ή διαδίδουν τον πολυμερισμό. Σε αυτή την περίπτωση ο πολυμερισμός διήρκεσε τρείς μέρες με αποδόσεις που κυμάνθηκαν από 60-85%, με τα υψηλότερα ποσοστά να προέρχονται από τις μεγαλύτερες σε θερμοκρασία συνθήκες. Παρόλο που η κατανομή ήταν αρκετά χαμηλή <1.1 τα μοριακά βάρη ήταν κατά 20-30% μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα.

Περιορισμοί προέρχονται από τις χαμηλές αποδόσεις της τεχνικής αυτής, καθώς απαιτείται απομόνωση του προϊόντος ώστε να απομακρυνθεί το μονομερές που δεν αντέδρασε. Πιθανόν το ίδιο να έχει ισχύ και για τον μακροαπαραχητή. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δυσκολία σύνθεσης πολυμερών με πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική πέραν της δισυσταδικής.

2.3.8 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.

Το 2007 ο Cheng [48],[49] πρότεινε ένα σύστημα με την χρήση του εξαμεθυλοδισυλαζανίου (HDMS) για τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών. Αυτός ο πολυμερισμός εξελίσσεται μέσω ενός μοναδικού

τριμεθυλοπυριτικού καρβαμιδικού (TMS-CBM) μέσω διάδοσης του πολυμερισμού, που περιλαμβάνει σπάσιμο του δεσμού Si-N του εξαμέθυλοδισυλαζανίου κατά την έναρξη (Σχήμα 19). Η προκύπτουσα τριμεθυλοπυριτική (TMS) αμίνη ανοίγει τον δακτύλιο του NCA στην θέση 5 προς σχηματισμό TMS-αμιδίου στον τελικό άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα στον N-τελικό άνθρακα σχηματίζεται η ομάδα που διαδίδει τον πολυμερισμό. Κατά την διάδοση γίνεται μεταφορά της τριμεθυλοπυριτικής ομάδας από τον τελικό άνθρακα στο εισερχόμενο μονομερές προς σχηματισμό νέου TMS-CBM.



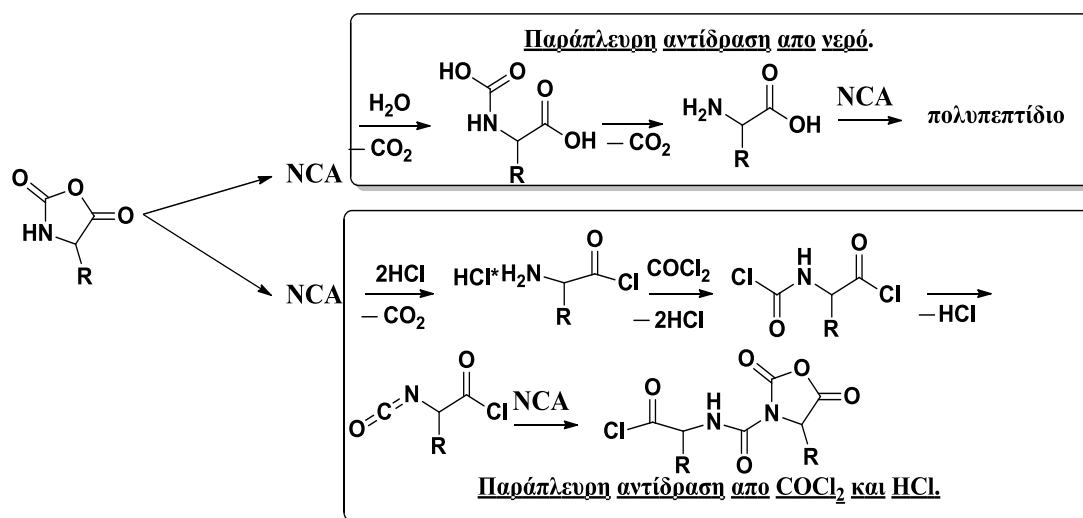
Σχήμα 19: Μηχανισμός πολυμερισμού μέσω τριμέθυλοπυριτικών αμινών.

Ο μηχανισμός του Σχήματος 19 διαφέρει τόσο από τον κανονικό μηχανισμό, όσο και από το μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs, ενώ παρουσιάζει ομοιότητες με το μηχανισμό που ακολουθείται στους πολυμερισμούς μεταφοράς ομάδας των ακρυλικών μονομερών. Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυτεππίδια (PBLG) και δισυσταδικά συμπολυτεππίδια (PZLL-PBLG) με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, με ικανοποιητικές κατανομές μοριακών βαρών (~1,2) και υψηλές αποδόσεις (>99%). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η εισαγωγή δραστικών ομάδων στο C-τελικό άκρο του πολυτεπτιδίου με την χρήση κατάλληλων αμινών.

2.3.9 Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών και χρήση τεχνικών υψηλού κενού

Το πρώτο ζωντανό σύστημα μέσω πρωτοταγών αμινών αναφέρθηκε το 2004 από τους Iatrou, Hadjichristidis [50], με την εφαρμογή τεχνικών υψηλού κενού. Βασισμένοι στις αδυναμίες του μηχανισμού των αμινών ως προς τις προσμίξεις από όλη την συνθετική πορεία των NCAs εφάρμοσαν την τεχνική του υψηλού κενού (HVT). Τηρώντας αυστηρά πρωτόκολλα καθαρισμού σε όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια κατάφεραν να απομονώσουν μονομερή των N-καρβοξυανυδριτών σε υψηλές αποδόσεις και καθαρότητα.

Οι N-καρβοξυανυδρίτες αποτελούν μοναδικό παράδειγμα ετεροκυκλικών ενώσεων ως προς την ευαισθησία τους σε θέρμανση, νερό και βάσεις (Σχήμα 20). Αντιδρούν ταχύτατα ακόμα και σε στερεή φάση δίνοντας πολυπεπτιδικά προϊόντα μέχρι την τελική τους κατανάλωση. Ακόμα και κατά την σύνθεσή τους αν δεν τηρηθούν τα πρότυπα καθαρότητας δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις [51],[52] (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλωρίδιο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανατοχλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση του υδροχλωρίου αλλά και του φωσγενίου που δεν αντέδρασε με το αρχικό αμινοξύ, γεγονός που επιτυγχάνεται με την χρήση του υψηλού κενού σε ποσοτικό βαθμό (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των μονομερών NCAs με την χρήση τεχνικών υψηλού κενού.

Το δεύτερο βήμα περιελάμβανε το κομμάτι του πολυμερισμού που ήταν και το ζητούμενο. Με την χρήση υψηλού κενού γίνεται συνεχείς απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂ οδηγώντας την αντίδραση (Σχήμα 20) προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου (Σχήμα 21). Με την χρήση αντιδραστήρων πολυμερισμού με όγκους τουλάχιστον τρεις φορές από το εκπεμπόμενο διοξείδιο του άνθρακα, απέφυγαν το σχηματισμό καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Με την τεχνική αυτή ο μηχανισμός οδηγήθηκε αποκλειστικά στην πορεία των κανονικών αμινών, τα προϊόντα είχαν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Επίσης έχουν συντεθεί ομο και συμπολυμερή [50], αστεροειδή [53] αλλά και υβριδικά [54] πολυπεπτίδια από πληθώρα μονομερών. Η τεχνική είναι γενική και μπορεί να εφαρμοστεί και σε πιο πολύπλοκες αρχιτεκτονικές [55]. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η τεχνική με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών στην βιβλιογραφία.

Για να χαρακτηριστεί τώρα ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια [56],[57]:

1. Να γίνεται πλήρης μετατροπή του μονομερούς σε πολυμερές. Μετά το πέρας του πολυμερισμού όλη η ποσότητα του μονομερούς πρέπει να έχει καταναλωθεί δηλαδή η απόδοση να είναι 100%.
2. Να υπάρχει γραμμική εξάρτηση του μέσου μοριακού βάρους M_n με την μετατροπή. Για να γίνει αυτό, πρέπει να μην υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και ο πολυμερισμός να προχωρά ομαλά και σταδιακά.
3. Το τελικό μοριακό βάρος M_n να είναι ελεγχόμενο και να καθορίζεται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης. Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με την σχέση:

$$\bar{M}_n = \frac{\mathcal{G}_{\text{μονομερές}}}{\text{moles}_{\text{απαρχητή}}}$$

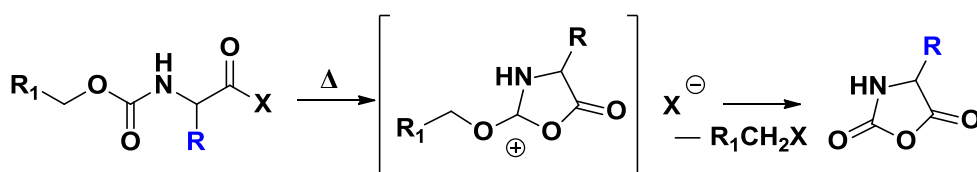
4. Να είναι εφικτή η σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Δηλαδή όλες οι αλυσίδες να παραμένουν ενεργές μετά το πέρας του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς και ταυτόχρονα το δεύτερο μονομερές να είναι τόσο καθαρό ώστε να μην περιέχει προσμίξεις που μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό. Αν ο πολυμερισμός είναι «ζωντανός» και η ταχύτητα έναρξης πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης, τότε είναι η δυνατή η παρασκευή πολυμερών με μικρή κατανομή μοριακών βαρών ($I = M_w/M_n < 1,1$).

Αν και στο σύστημα αυτό είχε αποδοθεί η έννοια του ζωντανού δεν είχε γίνει διερεύνηση ακραίων ομάδων των λαμβανόμενων πολυμερών. Αυτό έγινε το 2009 από την ομάδα του Avgeropoulos [58], μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού αλλά και τις παραδοσιακές. Ο Avgeropoulos διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπο συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπο αδρανή ατμόσφαιρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι και η σύνθεση των μονομερών ακολούθησε την ίδια λογική. Τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά ($^{13}\text{C-NMR}$, MALDI-TOF-MS). Συμπέραναν ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό και μόνο ένα μικρό ποσοστό των αμινοτελικών αλυσίδων του πολυπετιδίου είχε τερματιστεί με αλληλεπίδραση με το DMF, προς

σχηματισμό φόρμουλο ομάδας, όπως είχε προαναφέρει ο Gianni [59] σε αντίστοιχη μελέτη. Η πρόσφατη αυτή μελέτη ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο αυτά που είχε προαναφέρει η ομάδα της Αθήνας με επικεφαλή τον Hadjichristidis. Πάνω στην τεχνική και στα παραπάνω αποτελέσματα βασίστηκε και η παρούσα εργασία όπου θα δοθούν περισσότερες λεπτομέρειες στο πειραματικό μέρος.

2.4 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs)

Οι N-καρβοξυανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν πρώτα από τον Leuchs [60],[61] περισσότερο από εκατό χρόνια πριν. Η ανακάλυψή τους ήταν συμπτωματική, κατά την προσπάθεια του να απομονώσει σε καθαρότερη μορφή τα N-αλκοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων (Σχήμα 21) μέσω απόσταξης. Επίσης παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και απομόνωσε το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο, σε μια εποχή που δεν ήταν ακόμη αποδεκτή η ύπαρξη των μακρομορίων.



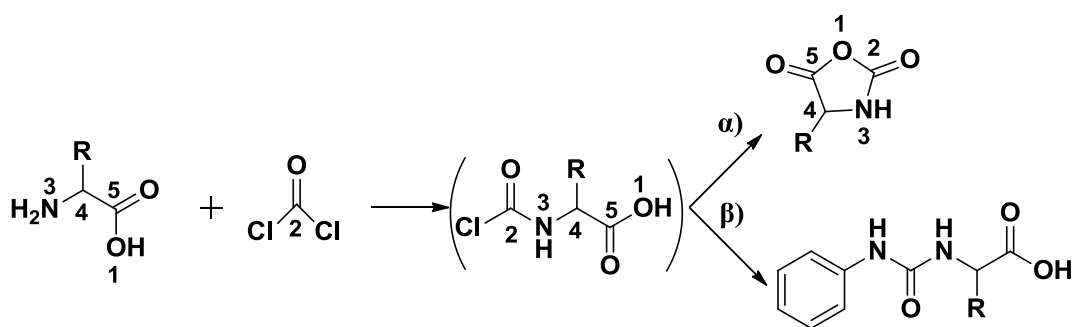
Σχήμα 21: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.

Κατά την μεθοδολογία του Leuchs η παρατεταμένη θέρμανση στους 70-90 βαθμούς οδηγεί στο σχηματισμό του ανυδρίτη. Υπό τις συνθήκες αυτές όμως οι NCAs αρχίζουν να αποσυντίθεται και το υδροχλώριο προκαλεί άνοιγμα του δακτυλίου. Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια όπου η δημιουργία του χλωριδίου οξέος θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο από τον ίδιο τον Leuchs [61]. Εν συνεχεία το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου [62], που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη. Το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης είναι το τριβρωμίδιο του φωσφόρου [63]. Επιπλέον λόγω του γεγονότος ότι το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου, στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το

τελικό στάδιο, η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες κάτω των 25 βαθμών. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R₁ ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου. Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η βένζυλο [64] ομάδα οδηγεί σε ακόμα πιο γρήγορες και λιγότερο απαιτητικές αντιδράσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για τον σχηματισμό διαφόρων NCAs.

2.4.1 Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων(Fuchs-Farthing method).

Η φωσγενίωση των ελεύθερων αμινοξέων (Σχήμα 22) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την σύνθεση των NCAs σήμερα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε πρώτα από τον Fuchs [65] το 1922 για την παρασκευή της N-φαινυλ-γλυκίνης NCA και αργότερα επεξεργάστηκε λεπτομερώς από τους Farthing [66], Coleman [67] και Levy [68] για μεγάλη πληθώρα N-Καρβοξυανυδριτών. Στην βιβλιογραφία έχει επικρατήσει ως η «μέθοδος Fuchs-Farthing». Το πρώτο στάδιο της φωσγενίωσης φαίνεται να είναι ο σχηματισμός του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος (Σχήμα 22) επειδή η προσθήκη ανιλίνης [69] οδηγεί στο σχηματισμό του 5-φαινυλ-υδαντοϊκού οξέος.



Σχήμα 22: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.

Το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Σε γενικές αρχές, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί όπως το

χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης κατά ένα παράγοντα 10-30. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για την σύνθεση του NCA της γλυκίνης. Οι παράπλευρες αντιδράσεις που συνοδεύουν την σύνθεση των NCAs με την μέθοδο αυτή περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.3.9.

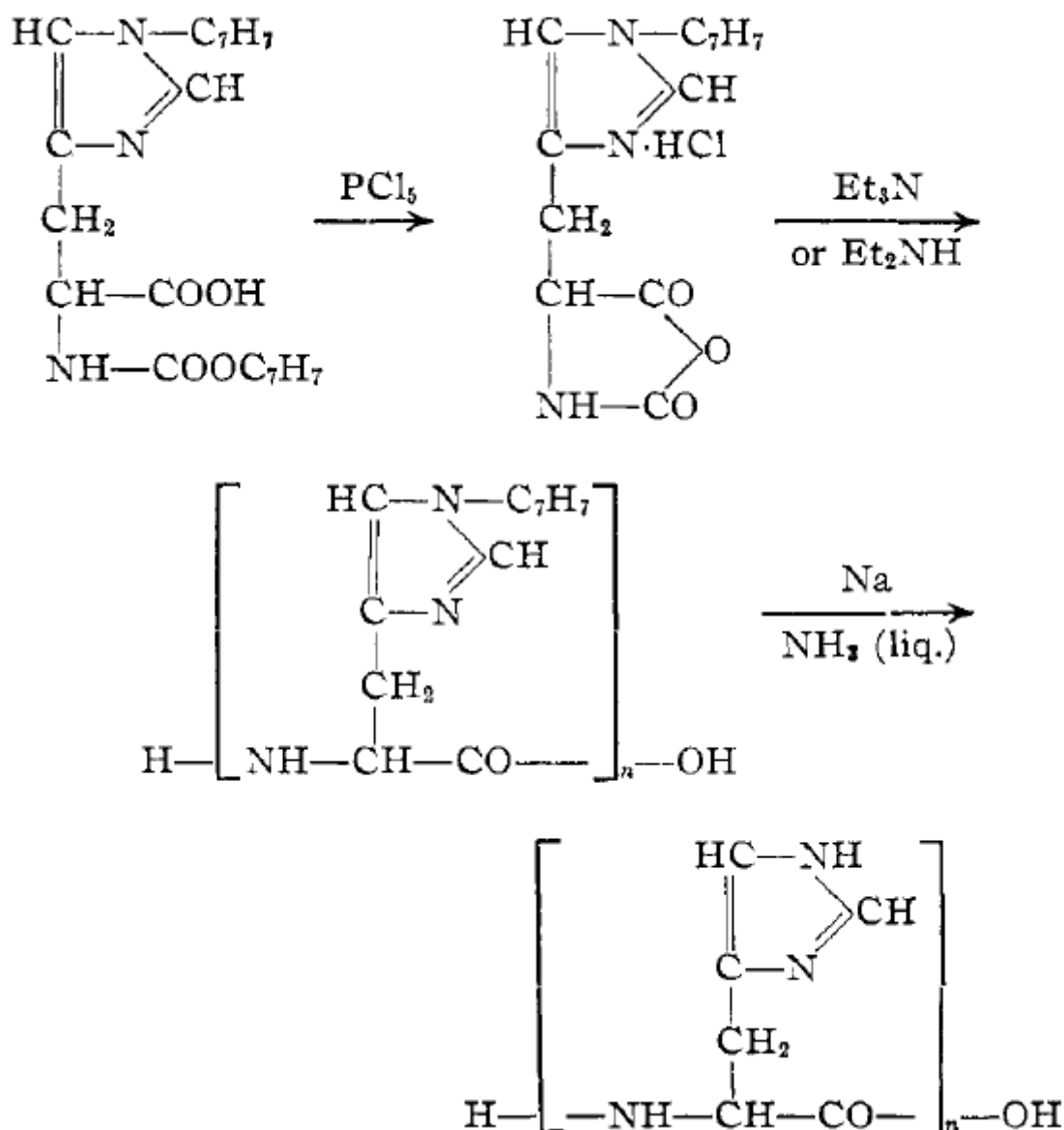
2.5 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Ιστιδίνη

Η ιστοδίνη είναι ένα από τα πιο ενδιαφέροντα μόρια καθότι διαθέτει μια σειρά από ιδιότητες που την καθιστούν μοναδική. Αυτές οι ιδιότητες είναι που άνοιξαν το ενδιαφέρον για την εξέταση και την έρευνα της καθώς ο πολυμερισμός της θα μπορούσε να ανοίξει τον δρόμο σε νέες δυνατότητες και προοπτικές.

Ο ιμιδαζολικός της δακτύλιος της δίνει την δυνατότητα να μπορεί να φορτίζεται και να αποφορτίζεται όταν αλλάζει το pH. Οπότε η ιστοδίνη είναι ένα μόριο το οποίο έχει αποκρισιμότητα στο pH όταν πολυμεριστεί. Μπορεί να φτιάχνει ένα σταθερό πολυιοντικό συγκρότημα που συνδέεται με ένα αρνητικά φορτισμένο πολυμερές, όπως το DNA, ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια ή και ένζυμα. Μπορεί να σχηματίζει πολυμερικά μικκύλια που θα έχουν τη δυνατότητα να παγιδεύουν στον υδρόφοβο πυρήνα τους λιπόφιλα φάρμακα. Ταυτόχρονα με την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της κατά την μεταβολή του pH θα μπορεί να απελευθερώνει το φάρμακο, όταν αλλάζουν οι εξωτερικές συνθήκες. Επίσης το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί για βιολογικούς και βιοφαρμακευτικούς σκοπούς. Η ικανότητα της να διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη των όξινων υποκυτταρικών διαμερισμάτων, όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα, έχει αναπτύξει το ενδιαφέρον για το σχεδιασμό μη ιικών μέσων μεταφοράς γονιδίων. Με κατάλληλη επιλογή των μοριακών χαρακτηριστικών της θα μπορούσε να σχηματίσει ακόμα και κυστίδια, ενώ η συμμετοχή της σε πολύπλοκες αρχιτεκτονικές θα αύξανε το πιθανό πεδίο εφαρμογών της. Παρά τις δυνατότητες που προκύπτουν από τον πολυμερισμό της ιστοδίνης τα εμπόδια στη σύνθεση περιορίσαν την εφαρμογή της. Ο σχηματισμός πολυπεπτιδίων με βάση την ιστοδίνη ξεκινά από το

σχηματισμό του αντίστοιχου NCA του μορίου της, το οποίο και αποτελεί το μονομερές, για τον πολυμερισμό. Διάφορες προσπάθειες με διαφορετικές προστατευτικές ομάδες έλαβαν χώρα.

Η πρώτη προσπάθεια που αναφέρεται στην βιβλιογραφία είναι η προσπάθεια της ομάδας του Katchalski [70] το 1957, ο οποίος ενδιαφερόταν να εξετάσει τις ιδιότητες της ιστιδίνης σε μεγαλύτερα μοριακά της βάρη και κυρίως της ικανότητας της να συνδέεται με μέταλλα, ερευνώντας τον ρόλο που παίζει στις μεταλλοπρωτεΐνες. Χρησιμοποίησε την βένζυλο ομάδα για την προστασία του αζώτου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο καθώς και για την προστασία του αζώτου δίπλα στον α-άνθρακα (Σχήμα 23). Ξεκινώντας από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη και αντιδρώντας την με πενταχλωριούχο φωσφόρο έφτιαξε τον αντίστοιχο N-καρβοξυανυδρίτη με απομάκρυνση της προστασίας στο άζωτο δίπλα στον α-άνθρακα. Ο διαλύτης ήταν το διοξάνιο ενώ απομάκρυνε το υδροχλώριο που παράγεται κατά την αντίδραση και σχηματίζει το αντίστοιχο αλάτι με χρήση τριαιθυλαμίνης και διήθηση του αδιάλυτου υδροχλωρικού άλατος του τριαιθυλοαμμωνίου. Ο πολυμερισμός έλαβε χώρα με διμεθυλαμίνη ή τριαιθυλαμίνη. Η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας έγινε με αντίδραση με νάτριο σε υγρή αμμωνία. Με ανάλυση των τελικών ομάδων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός πολυμερισμού ήταν 15-50. Επίσης ανέφερε ότι δεν μπόρεσε να διώξει το νερό με ξήρανση υπό κενό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχαν οι αργυρομετρικές τιτλοδοτήσεις καθώς και η εξάρτηση του pH από τον βαθμό ιοντισμού.

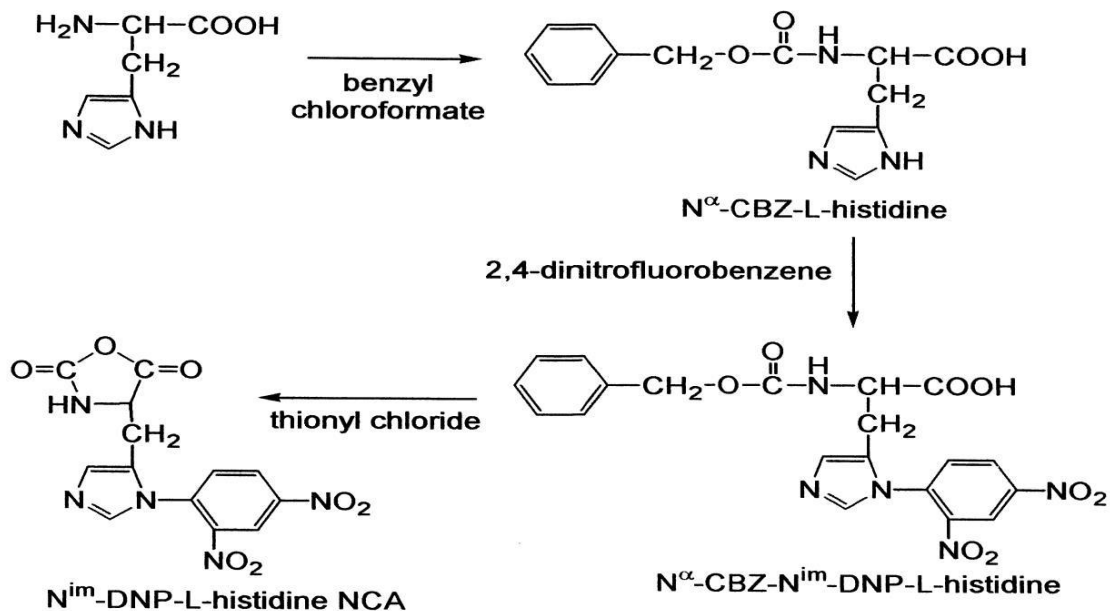


Σχήμα 23: Σύνθεση poly-L-histidine κατά τον Katchalski [35]

Από τότε διάφορα συνθετικά προβλήματα, τόσο με την προστασία του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου όσο και την καθαρότητα του NCA, εμπόδισαν την περαιτέρω πρόοδο. Υπήρξαν αναφορές στην βιβλιογραφία για προσπάθειες σύνθεσης πολυιστιδίνης με μεθόδους στερεάς φάσης, αλλά το μοριακό βάρος στο οποίο έφτασαν ήταν μικρό.

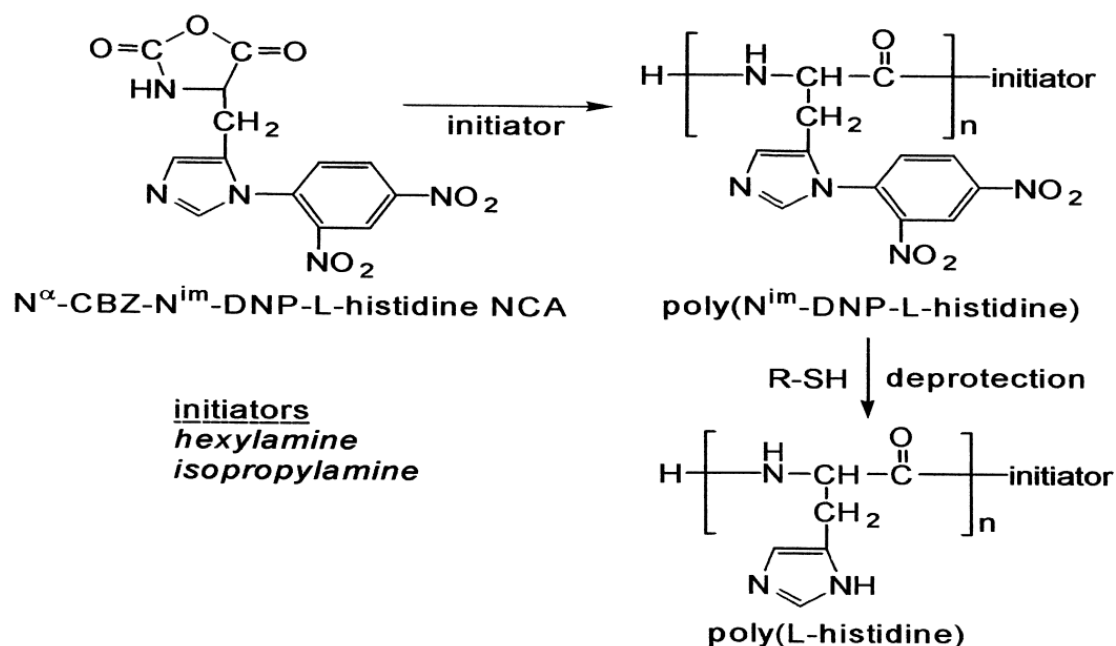
Το ενδιαφέρον στράφηκε το 2003 στον πολυμερισμό της ιστιδίνης με την προστατευτική ομάδα DNP [71] (Σχήμα 24). Σε αυτήν την προσπάθεια ξεκινώντας από την L-ιστιδίνη, συντέθηκε η N-καρβοβένζοξυ-L-ιστιδίνη με αντίδραση με χλωροφορμικό βενζύλιο. Στην συνέχεια προστέθηκε η DNP προστατευτική ομάδα κατά την αντίδραση του προϊόντος του προηγούμενου

βήματος με 2,4-δινιτροφθοροβενζόλιο. Τέλος έγινε η αντίδραση με θειόνυλο χλωρίδιο για την παραλαβή του αντίστοιχου NCA.



Σχήμα 24: Πορεία για την σύνθεση του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP[71].

Ακολούθησε ο πολυμερισμός του μονομερούς χρησιμοποιώντας ως απαρχητή εξυλαμίνη ή ισοπροπυλαμίνη σε διαλύτη άνυδρο DMF (Σχήμα 25). Ο πολυμερισμός έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με απελευθέρωση CO₂. Η αποπροστασία έγινε με μερκαπτοαιθανόλη, η οποία προστέθηκε σε διάλυμα του πολυμερούς σε DMF. Με αυτή την προστατευτική ομάδα, αν και η αποπροστασία γίνεται εύκολα, δεν αποφεύγεται η ρακεμείωση του πολυμερούς. Επίσης αποκλείεται η χρήση της σε οποιαδήποτε δομή φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς γιατί η μερκαπτοαιθανόλη σπάει τον δεσμό θείο-θείο.



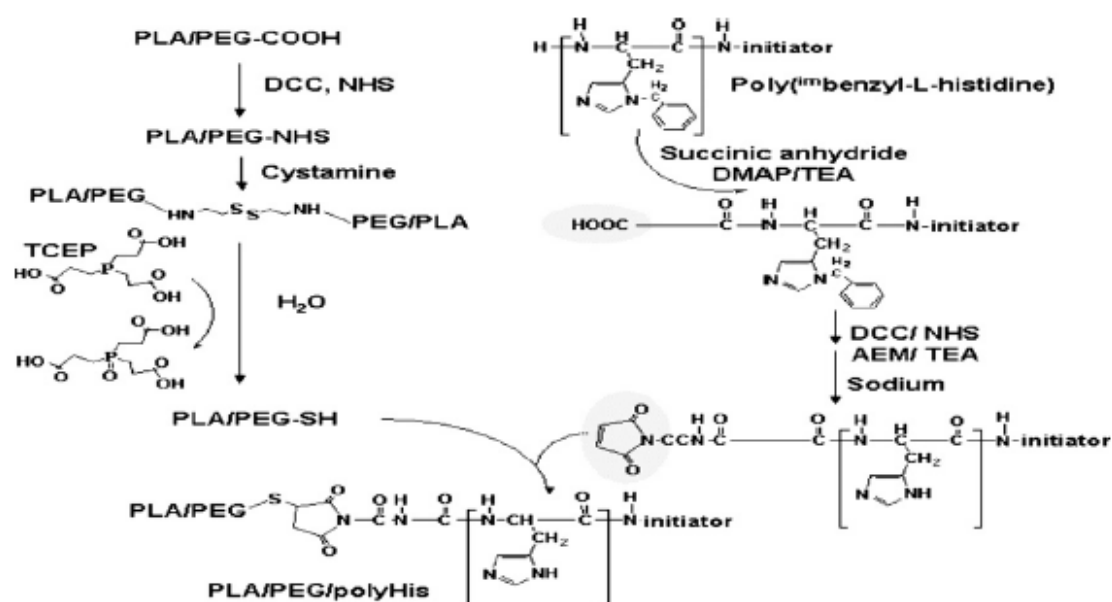
Σχήμα 25: Πολυμερισμός του NCA ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP [71].

Η σύνθεση συμπολυμερών ιστιδίνης με πολυαιθυλενοξειδίο σε μια χωριστή συστάδα δημιούργησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ιδιαίτερα σημαντική είναι στην βιβλιογραφία η σύνθεση του συμπολυμερούς πολύ(αιθυλενοξειδίο)-b-(πολυιστιδίνη-co-πολυφαινουλαανίνη) το οποίο έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικκύλια και να μεταφέρει φαρμακα [72]. Αρχικά συντέθηκε ο NCA της ιστιδίνης από την 1-βένζυλο-N-καρβοβενζοξυ-L-ιστιδίνη με πενταχλωρίδιο του φωσφόρου και διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Η L-φαινουλαανίνη μετατράπηκε με αντίδραση με τριφωσγένιο στον αντίστοιχο NCA σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Η απομάκρυνση του υδροχλωρίου από τον NCA της ιστιδίνης έγινε με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης και τον επακόλουθο σχηματισμό του αντίστοιχου αδιάλυτου υδροχλωρικού άλατος του τριαιθυλοαμμωνίου. Στην συνέχεια οι δυο NCAs αναμίχθηκαν σε διάφορες αναλογίες και το μίγμα πολυμερίστηκε σε DMF χρησιμοποιώντας ισοπροπυλαμίνη ως απαρχητή.

Επόμενο βήμα ήταν η προετοιμασία του πολυαιθυλενοξειδίου. Συντέθηκε ένα μίγμα από μονοκαβοξυλιομένο και δικαβοξυλιομένο πολυαιθυλενοξειδίο και με την χρήση στήλης απομονώθηκε το πρώτο. Με την χρήση NHS και DCC το μονοκαβοξυλιομένο πολυαιθυλενοξειδίο ενεργοποιήθηκε και στην συνέχεια προστέθηκε το συμπολυμερές πολυιστιδίνη-co-πολυφαινουλαανίνη. Η αντίδραση έγινε σε DMSO. Ακολούθησε η αποπροστασία της βένζυλο ομάδας της ιστιδίνης με μεταλλικό νάτριο σε υγρή αμμωνία. Σύμφωνα με αυτήν την

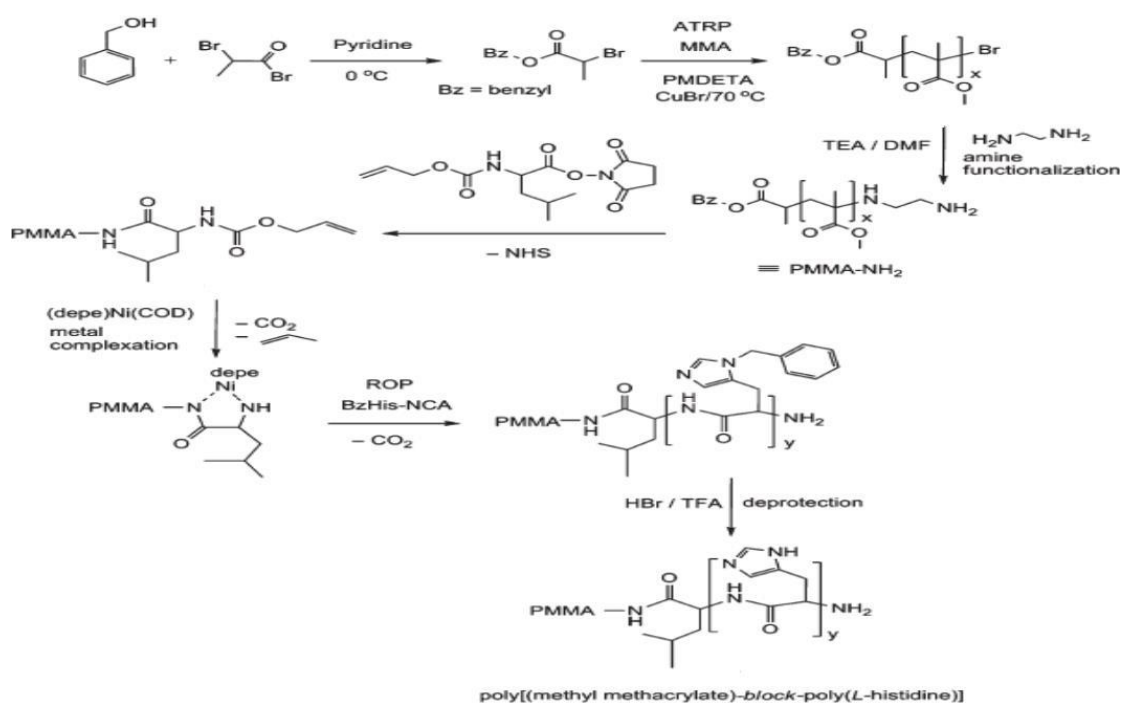
εργασία σχηματίστηκαν μικκύλια με αυτά τα πολυμερή και έγινε μελέτη της μεταβολής του pK_a ανάλογα με το ποσοστό της φαινυλαλανίνης με τιτλοδοτήσεις.

Ακολούθησε η σύνθεση τρισυπολυμερούς [73] πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο-b-πολύ(L-ιστιδίνη) το οποίο σχηματίζει μικκύλια με αποκρισιμότητα σε pH (Σχήμα 26). Χρησιμοποιήθηκε πολύ(βένζυλο-L-ιστιδίνη) όπου και έγινε τροποποίηση της ακραίας αμινομάδας με ηλεκτρικό ανυδρίτη, 4-διμεθυλάμινοπυριδίνη και τριαιθανολαμίνη σε DMF. Έτσι είχαμε την μετατροπή της ακραίας αμινομάδας σε καρβοξυλομάδα. Για να μετατρέψουμε την ακραία καρβοξυλομάδα σε N-(2-αμινοαιθυλο) μαλειμίδιο ομάδα χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση NHS και DCC. Στην συνέχεια προστέθηκε N-(2-αμινοαιθυλο) μαλειμίδιο τριφθοροξικό άλας και τριαιθανολαμίνη, ενώ με μεταλλικό νάτριο έλαβε χώρα η αποπροστασία. Το συμπολυμερές πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο ενεργοποιήθηκε με NHS και DCC και με προθήκη κυσταμίνης προστέθηκαν δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέλος έγινε η σύζευξη των δυο προϊόντων για την παραλαβή του τελικού πολυμερούς. Διαπιστώθηκε ότι σχηματίστηκαν μικκύλια ενώ παράλληλα έλαβαν χώρα μελέτες για την δέσμευση και την αποδέσμευση φαρμάκου.



Σχήμα 26: Σύνθεση πολύ(L-γαλακτικό οξύ)-b-πολυαιθυλενοξείδιο-b-πολύ(L-ιστιδίνη) [73].

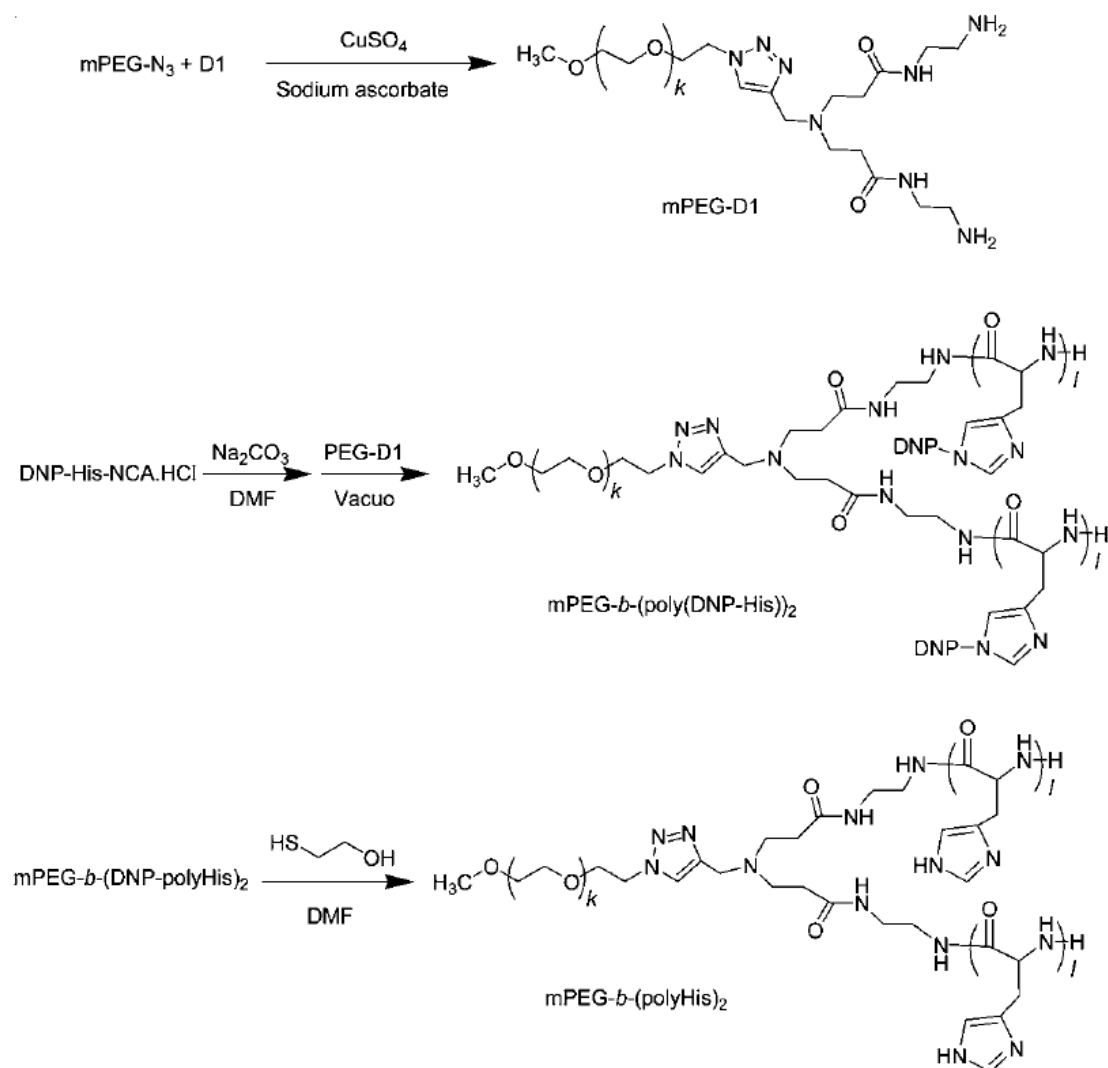
Επόμενη αξιολογία μελέτη ήταν και η σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη) συνδυάζοντας τους πολυμερισμούς ATRP και ROP [74] (Σχήμα 27). Αρχικά πολυμερίστηκε ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας ακολουθώντας την τυπική διαδικασία του ATRP. Στην συνέχεια και με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων προστέθηκαν ομάδες οι οποίες διαμόρφωσαν τον κατάλληλο μακροαπαρχητή για τον πολυμερισμό του NCA της βένζυλο-ιστιδίνης με ROP. Εξετάστηκαν οι δυνατότητες αυτοοργάνωσης αυτού του πολυμερούς όπου η συστάδα του μεθακρυλικού παίζει τον ρόλο του υδρόφοβου κομματιού στο μικκύλιο και η συστάδα της ιστιδίνης του υδρόφιλου. Σχηματίστηκαν κυκλικά μικκύλια με την παρουσία AgNO_3 όπου στον πυρήνα βρέθηκε το κομμάτι της πολυιστιδίνης, ενώ ο μεθακρυλικός ήταν έξω από αυτόν. Επίσης το μέγεθος των μικκυλίων μπορεί να ελεγχθεί από την θερμοκρασία μικυλλίωσης.



Σχήμα 27: Σύνθεση πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-b-πολύ(L-ιστιδίνη). [74]

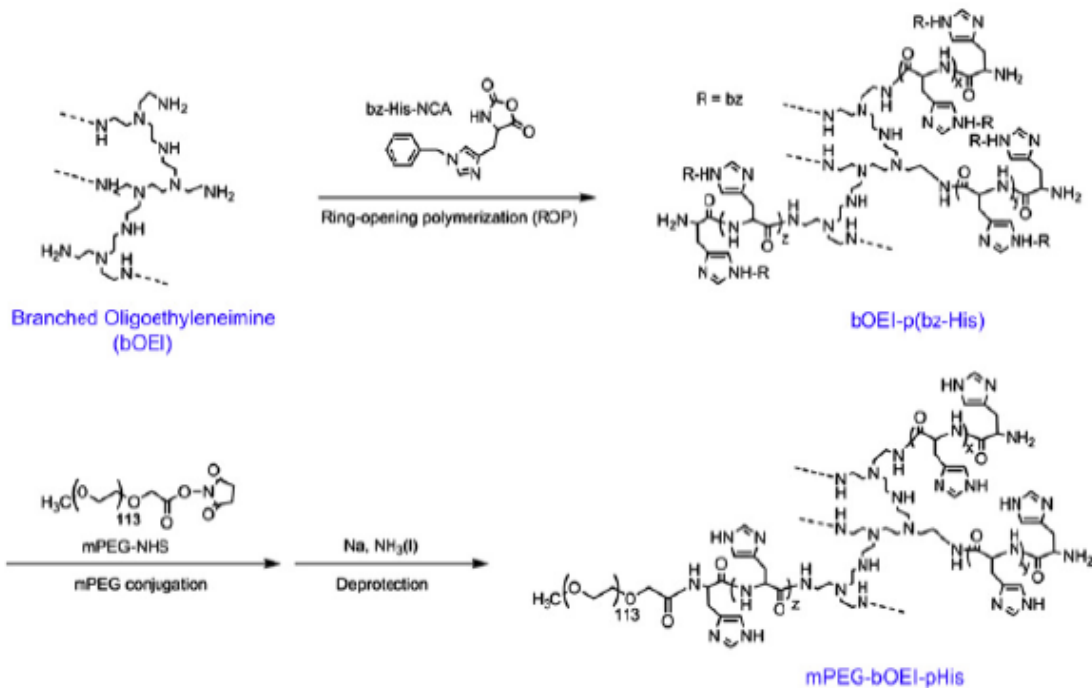
Ακολούθησε μια μελέτη όπου έγινε συνδυασμός του ROP με την χημεία click [75] (Σχήμα 28). Χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενοξείδιο με ακραία αζιδοομάδα στο οποίο με εφαρμογή της χημείας click προστέθηκε μια τριδραστική δενδριτικού τύπου πολυαμιδοαμίνη με προσαρμοσμένο έναν τριπλό δεσμό. Στην συνέχεια ακολούθησε πολυμερισμός ROP της ιστιδίνης με DNP προστατευτική ομάδα και αποπροστασία αυτής με 2-μερκαπτοαιθανόλη. Οι

αντιδράσεις έγιναν υπό ροή αζώτου. Σχηματίστηκαν δομές σε νανοκλίμακα με δέσμευση φαρμάκου.



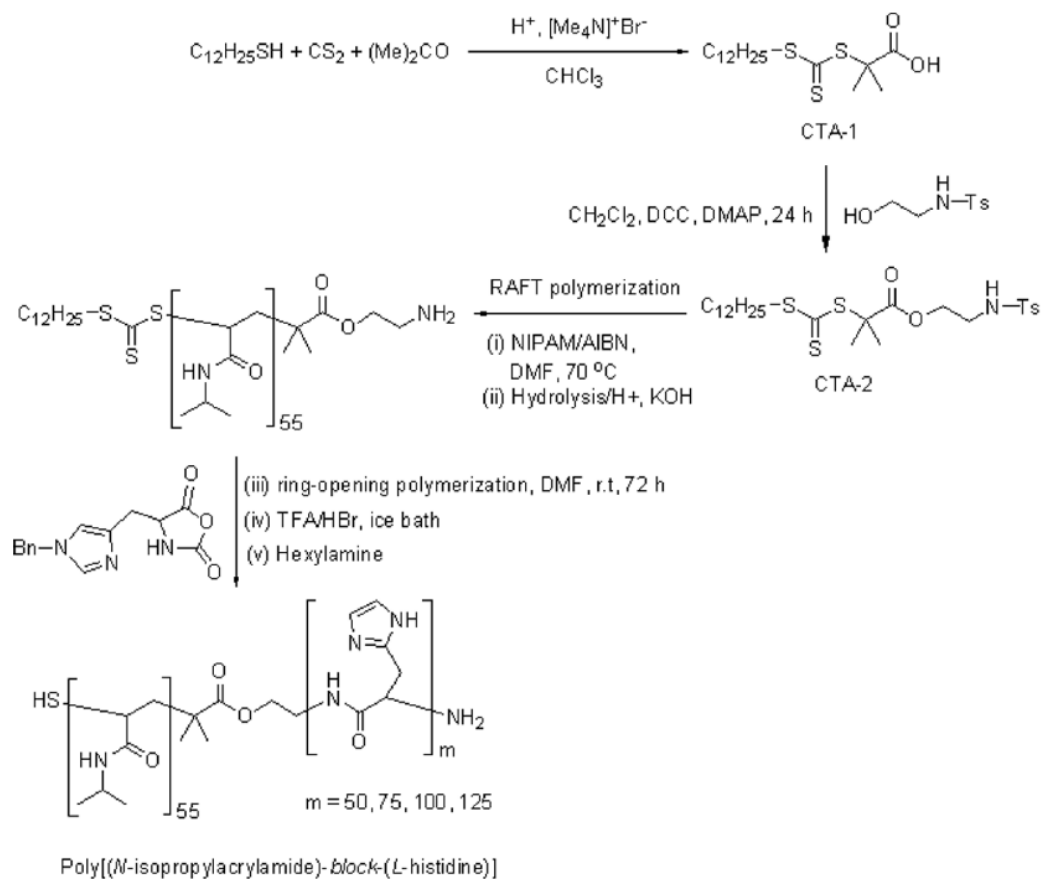
Σχήμα 28: Πολυμερισμός ιστιδίνης σε συνδυασμό με χημεία click [75].

Μια νέα μελέτη στην οποία είχαμε πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης εμφανίστηκε το 2012 [76] (Σχήμα 29). Σύμφωνα με αυτή, έλαβε χώρα η χρήση διακλαδισμένων ολιγοαιθυλενοϊμινών όπου οι ακραίες αμινομάδες εκκινούν τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, ο οποίος έχει την βένζυλο προστασία. Ακολουθεί η σύζευξη με πολυαιθυλενοξείδιο, ενώ στο τέλος έχουμε την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας. Σχηματίστηκαν έτσι μικροσφαίρες που μπορούσαν να μεταφέρουν ινσουλίνη.



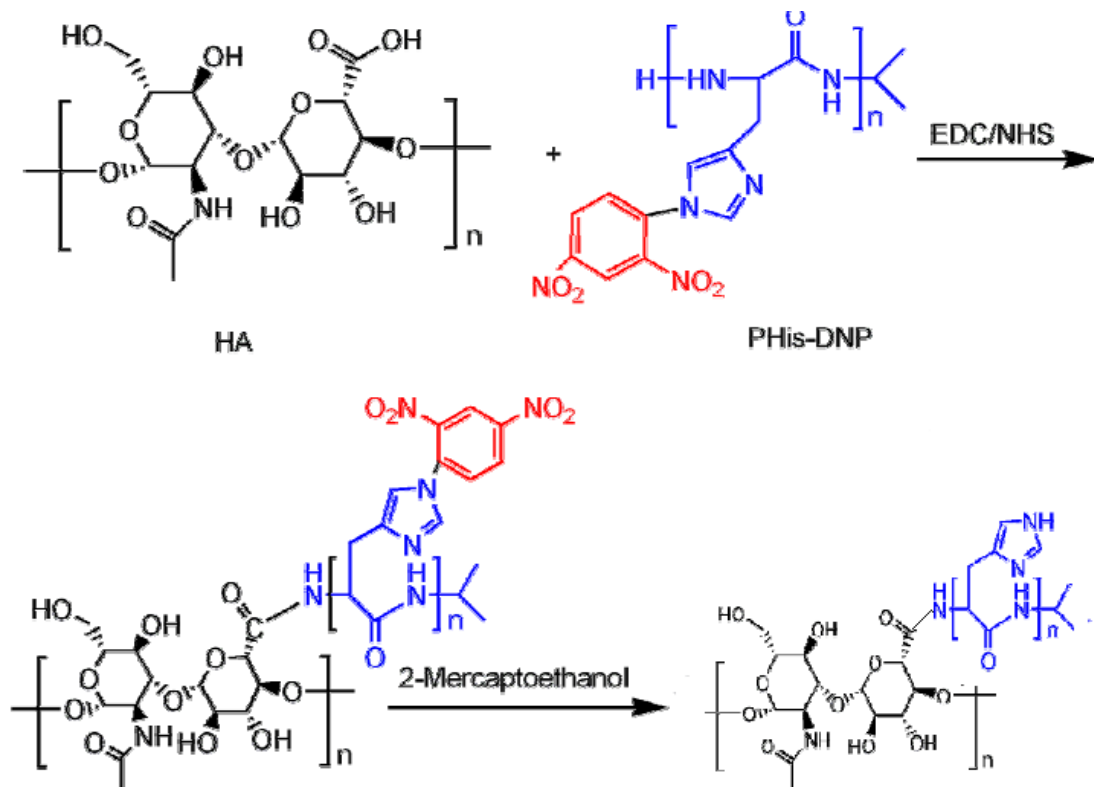
Σχήμα 29: Πολυμερισμός ιστιδίνης με σχηματισμό διακλαδισμένων πολυμερών [76].

Πρόσφατα μια νέα εργασία παρουσίασε τον πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης, φτιάχνοντας συμπολυμερή με την χρήση των πολυμερισμών RAFT και ROP [77] (Σχήμα 30). Αρχικά με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων για τον RAFT πολυμερισμό πολυμερίστηκε το N-ισοπρωτυλοακρυλαμίδιο και στην συνέχεια συμπολυμερίστηκε ο NCA της ιστιδίνης με την βένζυλο προστασία. Ακολούθησε η αποπροστασία της βένζυλο ομάδας. Σχηματίστηκαν σφαιρικά μικκύλια που ανταποκρίνονταν τόσο στην αλλαγή του pH όσο και της θερμοκρασίας.



Σχήμα 30: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με συνδυασμό πολυμερισμών RAFT και ROP [77].

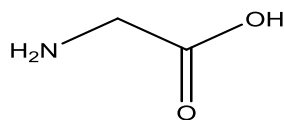
Τελευταίες μελέτες [78] αφορούν το πολυμερισμό του NCA της ιστιδίνης με προστατευτική ομάδα DNP και σύζευξη του με υαλουρονικό οξύ (Σχήμα 31). Τέτοια πολυμερή μπορούν να σχηματίζουν μικκύλια και να φέρουν αντικαρκινικά φάρμακα, που τα απελευθερώνουν σε μειωμένο pH.



Σχήμα 31: Συμπολυμερισμός ιστιδίνης με υαλουρονικό οξύ [78].

2.6 Γλυκίνη

Η γλυκίνη (glycine, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$) είναι το απλούστερο αμινοξύ της ομάδας των 20 αμινοξέων από τα οποία συντίθενται οι πρωτεΐνες των βιολογικών οργανισμών, γνωστά ως «πρωτεϊνογόνα αμινοξέα». Η καθαρή γλυκίνη είναι ένα άχρωμο και γλυκό στη γεύση κρυσταλλικό στερεό. Η γλυκίνη έχει τη διεθνή σύντμηση ονομασίας Gly ή G. Η συστηματική ονομασία της (κατά IUPAC) είναι 2-αμινοαιθανοϊκό οξύ, ωστόσο αναφέρεται συχνά και ως αμινοαιθανικό οξύ ή και αμινοοξικό οξύ (Σχήμα 32).



Σχήμα 32: Η δομή της γλυκίνης.

Η γλυκίνη δεν περιλαμβάνεται στην ομάδα των διατροφικώς απαραίτητων αμινοξέων (δηλ. δεν είναι απαραίτητο να λαμβάνεται μέσω της τροφής), αφού μπορεί να τη βιοσυνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός. Η γλυκίνη είναι το μοναδικό μη χειρόμορφο από τα πρωτεϊνογόνα αμινοξέα, αφού δεν διαθέτει ασύμμετρο άτομο άνθρακα. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν γλυκίνη σε

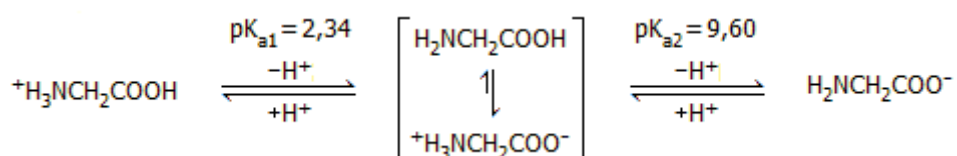
σχετικώς μικρά ποσοστά, όμως το κολλαγόνο αποτελεί εξαίρεση, αφού περιέχει 35% γλυκίνη. Ακόμη, πλούσια σε γλυκίνη είναι η φιβροΐνη, η πρωτεΐνη του μεταξιού και του ιστού της αράχνης με τυπική περιεκτικότητα σε γλυκίνη 42%.

Η γλυκίνη εντοπίζεται ελεύθερη στη φύση μόνο σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς, ενώ ενωμένη με το χολικό και το βενζοϊκό οξύ βρίσκεται ως συστατικό της χολής (ως γλυχολικό οξύ) και των ούρων (ως ιππουρικό οξύ), αντιστοίχως.

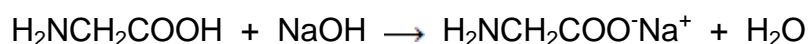
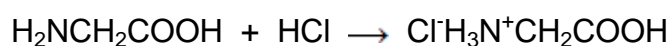
Η γλυκίνη παίζει σημαντικό ρόλο ως ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον νωτιαίο μυελό, στο εγκεφαλικό στέλεχος και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Επίσης, η γλυκίνη είναι απαραίτητο αμινοξύ για την ανάπτυξη των σκελετικών μυών, των ιστών και συμβάλλει στη σύνθεση και τη δομική σταθερότητα των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA).

2.6.1 Χημικές ιδιότητες της γλυκίνης

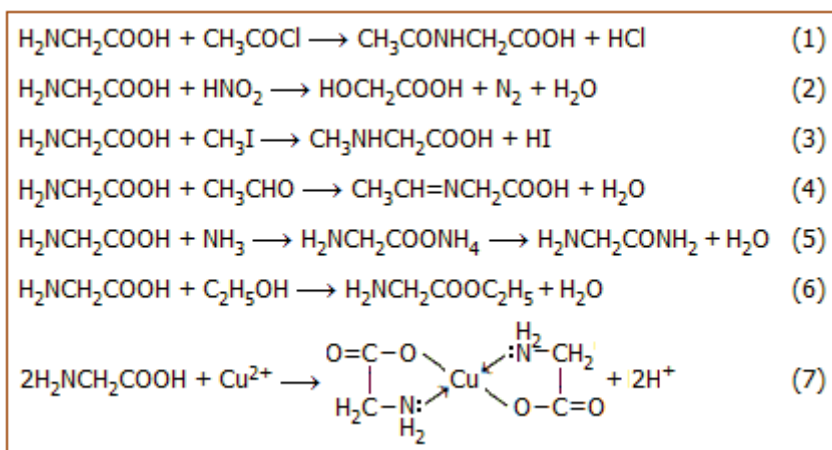
Η γλυκίνη μπορεί να δράσει ως ασθενές οξύ λόγω της παρουσίας της καρβοξυλικής ομάδας (-COOH) στο μόριό της και ως ασθενής βάση λόγω της παρουσίας της αμινομάδας (-NH₂). Η πρωτονιωμένη της μορφή μπορεί να θεωρηθεί ως κατιοντικό διπρωτικό οξύ, το οποίο υπόκειται σε δύο διαδοχικά στάδια διάστασης. Η ουδέτερη μορφή του αμινοξέος βρίσκεται σε ισορροπία με την επικρατέστερη **διδιοντική** (zwitterionic) μορφή του, όπως ισχύει και για τα άλλα αμινοξέα και γενικότερα για όλες τις οργανικές ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους βασικές και όξινες ομάδες σε σχετικώς μικρή απόσταση. Η διδιοντική μορφή (γνωστή και "εσωτερικό άλας") της γλυκίνης έχει διαπιστωθεί τόσο στη στερεή, όσο και στην αέρια φάση. Οι ισορροπίες μπορούν να περιγραφούν ως εξής:



Έτσι η γλυκίνη σχηματίζει άλατα, τόσο με οξέα, όσο και με βάσεις, π.χ.



Η γλυκίνη παρέχει όλες τις τυπικές αντιδράσεις μιας αλειφατικής αμίνης και καρβοξυλικού οξέος. Ενδεικτικά: παρέχει αντιδράσεις ακυλίωσης (αντίδρ. 1), αντιδρά με νιτρώδες οξύ οπότε η αμινομάδα αντικαθίσταται με υδροξύλιο με παραγωγή γλυκολικού οξέος και αερίου αζώτου (αντίδρ. 2). Η αντίδραση αυτή είναι γενική για τα αμινοξέα με πρωτοταγή αμινομάδα και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους με βάση τη μέτρηση του όγκου εκλυόμενου αζώτου (μέθοδος Van Slyke). Με αλκυλαγονίδια η γλυκίνη παρέχει *N*-αλκυλωμένα παράγωγα (αντίδρ. 3). Με αλδεΐδες παρέχει βάσεις Schiff (αντίδρ. 4). Ως καρβοξυλικό οξύ η γλυκίνη παρέχει αμίδιο (αντίδρ. 5) και εστέρες (αντίδρ. 6), ωστόσο, λόγω της παρουσίας της ισχυρώς βασικής αμινομάδας, δεν παρέχει ακυλαλογονίδιο και ανυδρίτη. Όπως όλα τα α-αμινοξέα παρέχει χηλικές ενώσεις με ορισμένα βαρέα μέταλλα, χαρακτηριστικότερα των οποίων είναι εκείνα του χαλκού λόγω του βαθέως κυανού χρώματος (αντίδρ. 7).

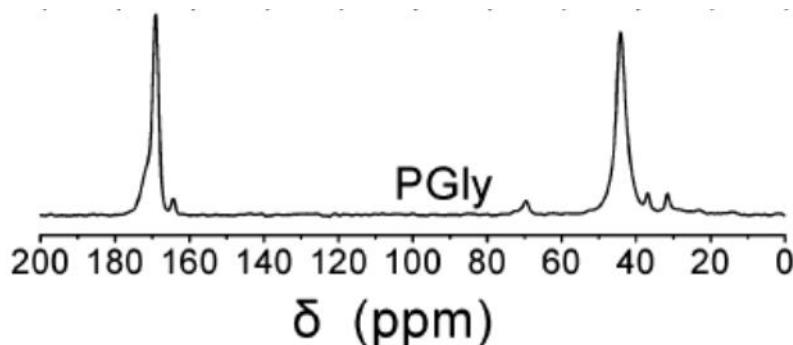


Η γλυκίνη στον οργανισμό μετέχει στη σύνθεση των πρωτεϊνών και επειδή πρόκειται για μικρό μόριο, η παρουσία της προσδίδει μια ευκαμψία στην αλυσίδα των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Κατά κανόνα, η ευκαμψία αυτή είναι ανεπιθύμητη και για τον λόγο αυτό η παρουσία γλυκίνης στις πρωτεΐνες είναι περιορισμένη και κατά κανόνα ως αμινοξύ εντοπίζεται σε μη κρίσιμα από άποψη δραστηκότητας τμήματά τους. Επιπλέον, λόγω του μικρού μεγέθους της, η γλυκίνη μπορεί να βρεθεί τόσο σε λιπόφιλες, όσο και υδρόφιλες περιοχές των μορίων των πρωτεϊνών.

Η PGly, το πολυμερές που συντίθεται από το απλούστερο αμινοξύ, μπορεί να υπάρξει σε δύο μορφές ανάλογα με τις συνθήκες [79]. Μπορεί να υπάρξει ως

β-φύλλο (γνωστό και ως PGly-I), η οποία είναι η πιο συνηθισμένη. Επίσης, μπορεί να υπάρξει ως μια πιο σπάνια ελικοειδής μορφή (γνωστή ως PGly-II με 3 κατάλοιπα ανά στροφή, δηλαδή ανά υπόλειμμα 0,3 nm και με βήμα 0,9 nm). Οι δύο μορφές δεν διαφέρουν παρά μόνο στις δευτεροταγείς δομές τους, αλλά και στη διαμόρφωσή τους. Η Gly δεν φέρει καμία πλευρική ομάδα.

Στην συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ για την καθαρή PGly (Εικόνα 3):



Εικόνα 3: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ για την καθαρή PGly

Η PGly αποτελείται αποκλειστικά από β-φύλλα, όπως υποδεικνύεται από τις χημικές μετατοπίσεις του α- άνθρακα στα 45 και του καρβονυλικού άνθρακα στα 169 ppm, αντίστοιχα.

Η αναγνώριση της δευτερογενούς δομής του πεπτιδίου βασίζεται στις διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα του $^{13}\text{C-NMR}$. Για παράδειγμα, στο φάσμα της καθαρής PGly οι συντονισμοί στα 45 και 169 ppm σημαίνουν ότι η PGly παίρνει τη διαμόρφωση β-φύλλου. Οι συνεισφορές από τον α-άνθρακα και τις ομάδες αμιδίου C=O οδηγούν στη διαμόρφωση των φύλλων της PGly. Ο ώμος κοντά στον συντονισμό του C=O προκύπτει από ένα μικρό κλάσμα αλυσίδων τύπου PGly άμορφης μορφής. Κάτω από ορισμένες συνθήκες η PGly μπορεί να υπάρχει σε μια ελικοειδή δευτεροταγή δομή (PGly-II), αλλά στο παρόν σύστημα, η PGly υπάρχει αποκλειστικά σε μορφή β-φύλλου.

2.7 Μοριακός Χαρακτηρισμός

2.7.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή αλλιώς χρωματογραφία μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC) σήμερα αποτελεί την ευρύτερα αναγνωρισμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, αλλά κυρίως της κατανομής μοριακών βαρών και της καθαρότητας των πολυμερών. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγαλομορίων όπως τα πολυμερή. Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε στήλες στις οποίες μεταφέρεται το δείγμα από το φέροντα διαλύτη. Οι στήλες περιέχουν κατάλληλα συσκευασμένο πορώδες υλικό με μεγάλο εύρος διαστάσεων πόρων ($10^2 - 10^6 \text{ \AA}$). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο με διβινυλοβενζόλιο) ή ανόργανο (silica gel ή πορώδες γυαλί). Συνήθως προτιμάται υλικό πλήρωσης από πολυστυρένιο, επειδή δε δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις (προσρόφηση, ασυμβατότητα) που θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις αυξάνουν το χρόνο έκλουσης με αποτέλεσμα να δίνουν μοριακό βάρος μικρότερο του πραγματικού για το άγνωστο δείγμα. Σε ιδανικές στήλες ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος (υδροδυναμικός όγκος) και δεν υπάρχει κανενός άλλου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων. Ο μηχανισμός διαχωρισμού (αποκλεισμός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης) επιτρέπει στα μεγαλύτερα μόρια να περάσουν μέσα από ένα μικρό ποσοστό πόρων, ενώ τα μικρότερα μόρια διέρχονται από περισσότερους πόρους. Κατά συνέπεια οι πολυμερικές αλυσίδες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, αφού τα μεγαλύτερα μακρομόρια διανύουν μικρότερη απόσταση και εκλούνται σε συντομότερους χρόνους από τα μικρότερα. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την ταχύτητα του φέροντος διαλύτη, το εύρος του πορώδους των στηλών, τη θερμοκρασία και την ποιότητα του διαλύτη σε σχέση με τα διαχωριζόμενα μόρια.

Η ανίχνευση των εκλουόμενων μορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι

ανιχνευτές βασίζονται στη μέτρηση της σκέδασης φωτός σε μικρές γωνίες, του ιξώδους του διαλύματος, των διαφορών στο δείκτη διάθλασης και τέλος στη μέτρηση των μεταβολών στην απορρόφηση των συστατικών του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (UV – Vis), εφόσον το πολυμερές απορροφά σε αυτή την περιοχή. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών. Για το λόγο αυτό απαιτείται βαθμονόμηση των στηλών, που πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων προτύπων γραμμικών πολυμερών, δηλαδή πολυμερών με γνωστό μοριακό βάρος και μικρή κατανομή μοριακών βαρών. Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης. Η απευθείας αντιστοίχιση του μοριακού βάρους στον όγκο έκλουσης μπορεί να γίνει μόνο στην περίπτωση που τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του οργάνου και τα άγνωστα δείγματα είναι ομοειδή. Η παράμετρος κλειδί για το διαχωρισμό των διαφόρων μακρομορίων του πολυμερούς είναι ο υδροδυναμικός τους όγκος V_h . Ο υδροδυναμικός όγκος εξαρτάται εκτός από το μοριακό βάρος και από τη χημική σύσταση και τη δομή (αρχιτεκτονική) των μακρομορίων. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους πολυμερών, με διαφορετική χημική σύσταση ή αρχιτεκτονική από αυτή των πολυμερών με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση, απαιτεί τη χρησιμοποίηση μίας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς. Συγκεκριμένα, λόγω της διαφοροποίησης στον υδροδυναμικό όγκο είναι αναγκαία η μετατροπή του “φαινόμενου” μοριακού βάρους, που λαμβάνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω κατάλληλων συντελεστών.

2.7.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες μεθόδους χαρακτηρισμού της δομής και χρησιμοποιείται ευρέως σε σχεδόν όλους τους κλάδους της χημείας. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο, εφόσον με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής μπορούμε να προσδιορίσουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ τελευταία έχει αναπτυχθεί και τεχνική για τη μελέτη της κίνησης των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά

κατάσταση. Υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτομέτρων, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά ή μετασχηματισμού Fourier. Τα συνεχούς κύματος φασματοφωτόμετρα διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται σαν συνάρτηση της συχνότητας της πηγής. Στα παλμικά, το δείγμα δέχεται περιοδικά ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σήμα στην περιοχή του χρόνου το οποίο φθίνει. Αυτό το σήμα στη συνέχεια με μετασχηματισμό Fourier μετατρέπεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, με αποτέλεσμα ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που λαμβάνεται από τα συνεχούς κύματος φασματοφωτόμετρα. Το φάσμα πρωτονίου ^1H NMR, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη των πολυμερών, αποτελείται από μία ομάδα φασματικών γραμμών οι οποίες οφείλονται στα διαφορετικά είδη πρωτονίων του δείγματος. Υπάρχουν τρεις βασικές πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε από ένα φάσμα:

1. Η θέση της φασματικής γραμμής ή όπως λέγεται η χημική μετατόπιση, η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους των πυρήνων και του μοριακού περιβάλλοντός τους.
2. Το εμβαδόν της περιοχής κάτω από κάθε φασματική γραμμή, το οποίο είναι ανάλογο με τον αριθμό των πυρήνων που υπάρχουν στο δείγμα.
3. Το εύρος της φασματικής γραμμής, το οποίο σχετίζεται με το μοριακό περιβάλλον του συγκεκριμένου πρωτονίου.

Ο συντονισμός του κάθε πυρήνα σε διαφορετική συχνότητα οφείλεται στην ύπαρξη ηλεκτρονίων τα οποία τον περιβάλλουν. Τα ηλεκτρόνια αυτά δημιουργούν τοπικά μαγνητικά πεδία τα οποία τον προασπίζουν, με αποτέλεσμα ο πυρήνας να αισθάνεται πεδίο B_{loc} διαφορετικό από το εφαρμοζόμενο B :

$$B_{loc}=B(1-\sigma)$$

όπου σ είναι η σταθερά προάσπισης, ένα αδιάστατο μέγεθος που καθορίζει την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα και άρα και το βαθμό προάσπισής του. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Η ουσία αναφοράς για το φάσμα πρωτονίου είναι το

τετραμεθυλοσιλάνιο (Si(CH₃)₄), που αναφέρεται ως TMS και έχει δώδεκα ισοδύναμα και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση δ ορίζεται από τις σχέσεις:

$$\delta = \frac{B_{\alpha} - B_{\delta}}{B_{\alpha}} \times 10^6 \text{ ppm}$$

$$\delta = \frac{\nu_{\alpha} - \nu_{\delta}}{\nu_{\alpha}} \times 10^6 \text{ ppm}$$

όπου B_α και B_δ τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ ν_α και ν_δ οι συχνότητες της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Γενικά όσο πιο προασπισμένος είναι ένας πυρήνας (μεγάλη τιμή του σ) τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία και σε χαμηλότερη συχνότητα.

Το γεγονός ότι η περιοχή κάτω από τη φασματική γραμμή είναι ανάλογη με τον αριθμό των σωματιδίων στο δείγμα αποτελεί τη βάση της ποσοτικής ανάλυσης. Παίρνοντας το λόγο διαφορετικών φασματικών γραμμών οι οποίες οφείλονται σε διαφορετικά είδη πυρήνων μπορούμε να προσδιορίσουμε τη σύσταση συμπολυμερών.

Τέλος, ο βαθμός διάσχισης της κορυφής μας βοηθάει στην ταυτοποίησή της. Ο αριθμός των φασματικών γραμμών που παίρνουμε δίνεται από τον τύπο (2n_xI_x + 1), όπου n_x είναι ο αριθμός των ισοδύναμων γειτονικών πυρήνων και I_x το spin του πυρήνα. Στην περίπτωση του ¹H και του ¹³C, όπου το spin τους είναι I = ½, η παραπάνω σχέση ανάγεται στην n_x + 1. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος (1 + x)ⁿ. Έτσι για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διασχίζεται από δύο άλλους γειτονικούς, θα δίνει μία τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1.

2.7.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Όταν οργανική ένωση προσβληθεί από μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, αλλά αφήνει να διέλθει ενέργεια σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αν ακτινοβολήσουμε ένα δείγμα με ενέργεια πολλών διαφορετικών μηκών κύματος και εντοπίσουμε ποια απορροφώνται και ποια διέρχονται, μπορούμε να προσδιορίσουμε το

φάσμα απορρόφησης της ένωσης. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε ένα γράφημα που καταγράφει το μήκος σε σχέση με την διερχόμενη ακτινοβολία. Η πρόσθετη ενέργεια που αποκτά ένα μόριο, όταν απορροφά ακτινοβολία, πρέπει να κατανεμηθεί με κάποιο τρόπο σε ολόκληρο το άτομο. Για παράδειγμα, η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αυξήσει την κινητική ενέργεια του μορίου, αναγκάζοντας τους δεσμούς να αποκτούν μεγαλύτερο μήκος ή να κάμπτονται περισσότερο. Εναλλακτικά, η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αναγκάσει κάποιο ηλεκτρόνιο να μεταπηδήσει από ένα τροχιακό χαμηλής ενέργειας σε ένα τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Διαφορετικές συχνότητες ακτινοβολίας επιδρούν στα μόρια με διαφορετικούς τρόπους. Υπάρχουν πολλά είδη φασματοσκοπίας, ανάλογα με την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που χρησιμοποιείται. Η περιοχή υπερύθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ($7,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$), μέχρι τα 10-2 cm περίπου, αλλά μόνο η ενδιάμεση περιοχή, από τα $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$ ως τα $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, χρησιμοποιείται από τους οργανικούς χημικούς. Τα μήκη κύματος εντός της περιοχής IR δίνονται συνήθως σε μικρότερα ($1 \mu\text{m} = 10^{-4} \text{ cm}$), ενώ οι συχνότητες εκφράζονται σε κυματαριθμούς (ν) μάλλον παρά σε Hertz. Ο κυματάριθμος, που εκφράζεται σε μονάδες αντιστρόφων εκατοστόμετρων (cm^{-1}), είναι απλώς το αντίστροφο του μήκους κύματος. Έτσι η χρήσιμη περιοχή του IR είναι από τα 4000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} . Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας, κατανεμημένη σε όλη την δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα, εξαιτίας της, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις. Μερικές επιτρεπτές μορφές δονήσεων και κάμψεων είναι οι παρακάτω: η συμμετρική δόνηση τάσης, η αντισυμμετρική δόνηση τάσης, η ομοεπίπεδη κάμψη και η κάμψη εκτός πεδίου. Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια, όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μία προκαθορισμένη μοριακή κίνηση, μπορούμε να διαπιστώσουμε τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα του IR. Από την ερμηνεία αυτών

των κινήσεων μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

2.7.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Για αραιά διαλύματα που δεν απορροφούν το φως, η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του μεταφορικού (και μερικές φορές και του περιστροφικού) συντελεστή διάχυσης σωματιδίων μεγέθους από μερικές δεκάδες angstroms μέχρι μερικά μm, κάτω από μία ποικιλία συνθηκών. Σε πολλές περιπτώσεις ο συντελεστής διάχυσης μπορεί να συνδεθεί με το φαινόμενο μοριακό μέγεθος και επομένως το μέγεθος των σκεδαζόντων σωματιδίων μπορεί να συνδεθεί με το περιβάλλον τους. Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από την θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown), εξαιτίας των οποίων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική αλλά και περιστροφική κίνηση. Η πιθανότητα $P(\rho, t)$ να βρεθεί ένα μόριο στη θέση στη χρονική στιγμή t , αν υποθεθεί ότι βρισκόταν στην αρχή των αξόνων τη χρονική στιγμή $t=0$ δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{\partial P(\rho, t)}{\partial t} = Dt \nabla^2 P(\rho, t)$$

όπου Dt είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown, η πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες θ, ϕ στο χρόνο t είναι $P(\theta/\theta_0, \phi/\phi_0, t)$ με θ_0, ϕ_0 τις συντεταγμένες σε $t=0$ και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{\Omega}{\sin^2 \theta} \left[\left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial t} \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial \phi^2} \right) \right] P$$

,όπου Ω ο συντελεστής διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από αυτές τις σχέσεις φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, τα πειράματα σκέδασης φωτός αποτελούν έναν τρόπο προσδιορισμού των συντελεστών διάχυσης των

μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθος των μορίων, καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα διαυγές υγρό, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων πυκνότητας. Στην περίπτωση διαλυμάτων η σκέδαση φωτός οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Αν δεν υπάρχει αλλαγή συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτήν της προσπίπτουσας, η σκέδαση ονομάζεται ελαστική. Αν οι διακυμάνσεις (πυκνότητας και συγκέντρωσης) δεν αλλάζουν πολύ με το χρόνο ή εάν η ένταση σκεδάσεως μετράται για μια χρονική περίοδο που είναι μεγάλη σε σχέση με το χρόνο μεταβολής των διακυμάνσεων, δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός.

Παρ' όλα αυτά οι διακυμάνσεις σε διαλύματα εξαρτώνται από το χρόνο εξαιτίας της κίνησης Brown. Έτσι η συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός θα έχει ένα φάσμα χαρακτηριστικό της χρονικής εξάρτησης των διακυμάνσεων και της κίνησης των μακρομορίων (φαινόμενο Doppler). Επειδή η διαφορά συχνότητας μεταξύ προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μικρή, το είδος αυτό της σκέδασης καλείται ημιελαστική σκέδαση φωτός. Τα σκεδάζοντα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας στην κίνησή τους το σκεδαζόμενο φως από τα μόρια αυτά λέγεται ότι έχει συσχέτιση στο χρόνο. Γενικά μια συνάρτηση συσχέτισης χρόνου (time correlation function) μεταξύ δύο σημάτων A και B έχει τη μορφή:

$$g(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t - \tau) dt$$

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας, delay time or sample time), t_0 ο αρχικός χρόνος, T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Αν το B είναι μια «αργοπορημένη» μορφή του A τότε η εξίσωση αποτελεί μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης αποτελεί πραγματική ποσότητα και μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλες διατάξεις. Μια

στενά συνδεδεμένη με την $g(\tau)$ συνάρτηση είναι το φάσμα ισχύος (power spectrum) $I(\omega)$ που δίνεται από την σχέση:

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega\tau} \langle A(t)A(t-\tau) \rangle dt$$

Η σχέση αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier της $g(\tau)$, οπότε ο πειραματικός προσδιορισμός της μίας οδηγεί στην άλλη. Η μέθοδος σκεδάσεως φωτός που περιγράφηκε παραπάνω ονομάζεται φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων ή δυναμική σκέδαση φωτός. Στην απλή περίπτωση ενός συνόλου από σφαιρικά, μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους, ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα υγρό (διάλυμα) η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης γράφεται:

$$g(\tau) = A^0 + Ae^{-\Gamma\tau}$$

με $\Gamma = D_t q^2$ τη σταθερά παρακμής της συνάρτησης και $q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$ το άνυσμα σκέδασης, όπου n ο δείκτης διάθλασης του μέσου, λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και θ η γωνία παρατήρησης. Αφού το Γ μπορεί να προσδιοριστεί με κατάλληλη ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και εφόσον είναι γνωστές οι παράμετροι που υπεισέρχονται στην τιμή του q μπορεί να υπολογιστεί το D_t .

Με τη βοήθεια του D_t μπορούν να προσδιοριστούν κάποιες μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς αλλά και θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος. Γενικά, το D_t δίνεται από τη σχέση Stokes-Einstein: $D_t^0 = \frac{kT}{f}$ όπου D_t^0 ο συντελεστής

διάχυσης σε άπειρη αραιώση, k η σταθερά Boltzmann και f ο μοριακός συντελεστής τριβής. Για σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα σωματίδια ισχύει: $f = 3\pi\eta d$ όπου η το ιξώδες του ρευστού σε θερμοκρασία T και d η διάμετρος του σωματιδίου. Έτσι για την πιο απλή περίπτωση, είναι δυνατόν με τη δυναμική σκέδαση φωτός να εξαχθεί το μέγεθος των σκεδαζόντων σωματιδίων. Για μη σφαιρικά σωματίδια, το d από τη σχέση γίνεται μια μέση τιμή. Στη γενική περίπτωση ισχύει η σχέση:

$$f = 6\pi\eta d (r^2)^{1/2}$$

όπου το F αποτελεί έναν παράγοντα δομής και $(r^2)^{1/2}$ είναι η τετραγωνική ρίζα του τετραγώνου της μέσης από άκρο σε άκρο απόστασης για το μόριο που εξετάζεται. Στην περίπτωση που υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων το D_t εμφανίζει σημαντική εξάρτηση από τη συγκέντρωση, οπότε:

$$D_t = D_t^0 (1 + k_D c + \dots)$$

Με $K_D = 2A_2M - k_f \frac{N_A V_1}{M}$, όπου A_2 ο δεύτερος συντελεστής Virial, M το μοριακό βάρος, N_A ο αριθμός Avogadro, V_1 ο όγκος του μορίου του πολυμερούς και k_f ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής f του πολυμερούς από τη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο διαλύτη, $f = f_0 (1 + k_f c)$. Για τις περισσότερες εφαρμογές είναι αρκετό να υπολογιστεί μια υδροδυναμική ακτίνα $R_h (=d_h/2)$ ισοδύναμης σφαίρας από την:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_t^0}$$

Η R_h αποτελεί ένα μέτρο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς στο διάλυμα όπως αυτός καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη, τη θερμοκρασία κλπ. Για ομόλογα γραμμικά πολυμερή ο συντελεστής διάχυσης συνδέεται με το μοριακό βάρος μέσω της σχέσης:

$$D_t^0 = k_A M^{-b}$$

πού είναι ανάλογη της σχέσης Mark-Houwink-Sakurada για το εσωτερικό ιξώδες. Οι σταθερές k_A και b έχουν συγκεκριμένες τιμές για δεδομένο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη-θερμοκρασίας. Για εύκαμπτα μακρομόρια σε θ διαλύτες $b=0,5$ ενώ για καλούς διαλύτες $b=0,55-0,58$.

2.7.5 Κυκλικός Διχρωϊσμός

Το φως είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα που ταλαντώνεται τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο. Στο κύμα, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό διάνυσμα που είναι αναλογικά μεταξύ τους σε μέγεθος, είναι αμοιβαίως κάθετα και επίσης κάθετα στη διεύθυνση διαδόσεως. Το μη πολωμένο φως αποτελείται από δονήσεις σε πολλές και διαφορετικές διευθύνσεις πολώσεως. Στο γραμμικά πολωμένο φως (συχνά αναφερόμενο ως επίπεδα πολωμένο φως) το

ηλεκτρικό διάνυσμα **E** ταλαντώνεται ημιτονοειδώς σε μια διεύθυνση (επίπεδο) που στη φασματοσκοπία ονομάζεται συμβατικά επίπεδο πολώσεως. Στο κυκλικά πολωμένο φως, το μέγεθος του **E** παραμένει σταθερό αλλά διαγράφει μια έλικα ως συνάρτηση του χρόνου. Σύμφωνα με τη σύμβαση που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD), στις δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένες ακτίνες φωτός ιδωμένες από παρατηρητή με μέτωπο προς την πηγή φωτός, το **E** θα εμφανίζεται περιστρεφόμενο κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού και αντιστρόφως αυτής, αντίστοιχα. Είναι πιο χρήσιμο να αντιμετωπιστεί το γραμμικά πολωμένο φως ως άθροισμα μιας δεξιά και μίας αριστερά κυκλικά πολωμένης ακτίνας ίδιας εντάσεως. Το άθροισμα των οριζοντίων συνιστωσών είναι μηδενικό κι επομένως το άθροισμα δύο ορθογωνικά κυκλικά πολωμένων ακτινών πραγματικά ανάγεται σε μία γραμμικώς (κατακορύφως) πολωμένη ακτίνα.

Συγκεκριμένα, μια ακτίνα γραμμικά πολωμένου φωτός μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο κυκλικά πολωμένες σε φάση ακτίνες της αυτής συχνότητας και μισού εύρους δονήσεως μια δεξιόστροφη και μια αριστερόστροφη. Η προβολή στο επίπεδο του χαρτιού (επίπεδο xy) του ανύσματος **E** του ηλεκτρικού πεδίου αναλύεται σε δύο συνιστώσες, το **ER**, που στρέφεται κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού και το **EL** που στρέφεται αντίθετα. Καθώς τα **ER** και **EL** περιστρέφονται, η συνισταμένη τους ιχνογραφεί μια ευθεία γραμμή. Επειδή οι οπτικά ενεργές ουσίες έχουν διαφορετική πολωσιμότητα για τη δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία, όταν μια επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία προσπίπτει σ' ένα τέτοιο υλικό, οι ταχύτητες με τις οποίες οι δύο συνιστώσες διέρχονται μέσω του υλικού θα είναι διαφορετικές.

Η γωνία στροφής α ενός διαλύματος σε δεδομένη θερμοκρασία διαλύτη και μήκος κύματος, εξαρτάται από την ειδική στροφική ικανότητα $[\alpha]$, το μήκος l της διαδρομής του φωτός στο δείγμα και από τη συγκέντρωση c (g/100ml διαλύματος) ή πυκνότητα d (g/ml). Ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες μονάδες η ειδική στροφική ικανότητα εκφράζεται από την εξίσωση:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha_{\lambda}^t}{l \times c} \times 100 \quad \text{ή} \quad [\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha_{\lambda}^t}{l \times d}$$

Όπως ένα υλικό μπορεί να έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης για τη δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία μπορεί επίσης να έχει διαφορετική μοριακή απορροφητικότητα, ϵ_R και ϵ_L . Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστωσών που θα συμβεί θα έχει ως αποτέλεσμα το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη και το εξερχόμενο φως χαρακτηρίζεται ως ελλειπτικά πολωμένο. Το φαινόμενο αυτό καλείται *κυκλικός διχρωϊσμός* και μπορεί να μετρηθεί είτε με τη διαφορά των μοριακών απορροφητικοτήτων της δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένης ακτινοβολίας σύμφωνα με την εξίσωση $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ είτε με την ελλειπτικότητα θ , που είναι η γωνία της οποίας η εφαπτομένη είναι ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης που ιχνογραφείται από το συνιστάμενο άνυσμα. Η μοριακή ελλειπτικότητα $[\theta]$ αποδεικνύεται ότι υπακούει στις σχέσεις :

$$[\theta] = 3300\Delta\epsilon \text{ και } [\theta] = \frac{\theta_{\text{παρατ}}(\text{cm}) \cdot f \cdot M}{10 \cdot c \cdot l}$$

,όπου $\theta_{\text{παρατ}}$ είναι το ύψος ή το εύρος σε cm της ταινίας της προκύπτουσας καμπύλης, f είναι παράγοντας ευαισθησίας οργάνου, M ο μέσος όρος του M.B των μονάδων των αμινοξέων-για διαλύματα πρωτεϊνών- c η συγκέντρωση σε g/ml και l το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε $\text{degrees} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimole}^{-1}$.

Η στροφή του επιπέδου μιας πολωμένης ακτινοβολίας που προκαλείται από ένα οπτικά ενεργό υλικό, ποικίλει με το μήκος κύματος. Η μέτρηση της οπτικής στροφής συναρτήσει του μήκους κύματος είναι η οπτική στροφική διασπορά (ORD) και *κυκλικός διχρωϊσμός* (CD) είναι η μέτρηση της άνισης απορρόφησης του δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένου φωτός. Τα δύο φαινόμενα σχετίζονται μεταξύ τους κατά τον ίδιο τρόπο που η διασπορά σχετίζεται με την απορρόφηση. Σχηματικά θα μπορούσε να γραφεί:

$$CD = A_L - A_R$$

Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι οι έννοιες κυκλικός διχρωϊσμός και ελλειπτικότητα είναι ισοδύναμες, καθώς όταν υπάρχει εκλεκτική απορρόφηση του ενός συστατικού του E (δηλ. $CD = A_L - A_R$, μη μηδενικό) οι δύο εντάσεις δεν παραμένουν ίσες κι επομένως η ακτίνα καθίσταται ελλειπτικά πολωμένη. Έτσι αν και οι σύγχρονοι διχρωγράφοι

μετρούν διαφορές απορρόφησης, είναι κοινή πρακτική να εκφράζεται ο κυκλικός διχρωϊσμός σε μονάδες ελλειπτικότητας, millidegrees (mdeg, 1mdeg = $3.3 \cdot 10^{-5}$ a.u.). Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού προκύπτει από την ενδο- ή διαμοριακή ασυμμετρία μιας μοριακής δομής. Χειρικότητα μιας δομής σημαίνει ότι η τελευταία δεν μπορεί να συμπέσει με το κατοπτρικό της είδωλο. Αυτή η έλλειψη συμμετρίας που προκύπτει για παράδειγμα όταν ένα άτομο άνθρακα ενός μορίου ενώνεται με τέσσερα διαφορετικά υπολείμματα αποτελεί ιδιότητα όλων σχεδόν των βιολογικά συντιθέμενων οργανικών μορίων.

2.7.6 Φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο Ορατό

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας, T , ή της απορρόφησης A διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b . Συνήθως η συγκέντρωση c ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

όπου P_0 : ισχύς ακτινοβολίας μετά την διέλευση της από την κυψελίδα για διαλύτη, P : ισχύς ακτινοβολίας μετά την διέλευση της από την κυψελίδα για αναλύτη, ϵ : Γραμμομοριακός συντελεστής απόσβεσης, b : μήκος διαδρομής ακτινοβολίας στην κυψελίδα.

Στις δυο επιφάνειες αέρα/τοιχώματος της κυψελίδας συμβαίνουν ανακλάσεις. Εξασθένιση μιας δέσμης μπορεί να συμβεί ακόμα και ως αποτέλεσμα σκέδασης από μεγάλα μόρια, αλλά και απορρόφησης από τα τοιχώματα της κυψελίδας. Για αντιστάθμιση αυτών των φαινομένων συγκρίνεται η ισχύς της δέσμης που διαπερνά το διάλυμα αναλύτη με την ισχύ της δέσμης που διαπερνά την κυψελίδα που περιέχει τον διαλύτη. Οι πειραματικές τιμές της διαπερατότητας και της απορρόφησης υπολογίζονται από τις εξισώσεις:

$$T = \frac{P_{\text{διάλυμα}}}{P_{\text{διαλύτη}}} = \frac{P}{P_0} \quad A = -\log T = \log \frac{P_{\text{διαλύτη}}}{P_{\text{διάλυμα}}}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών

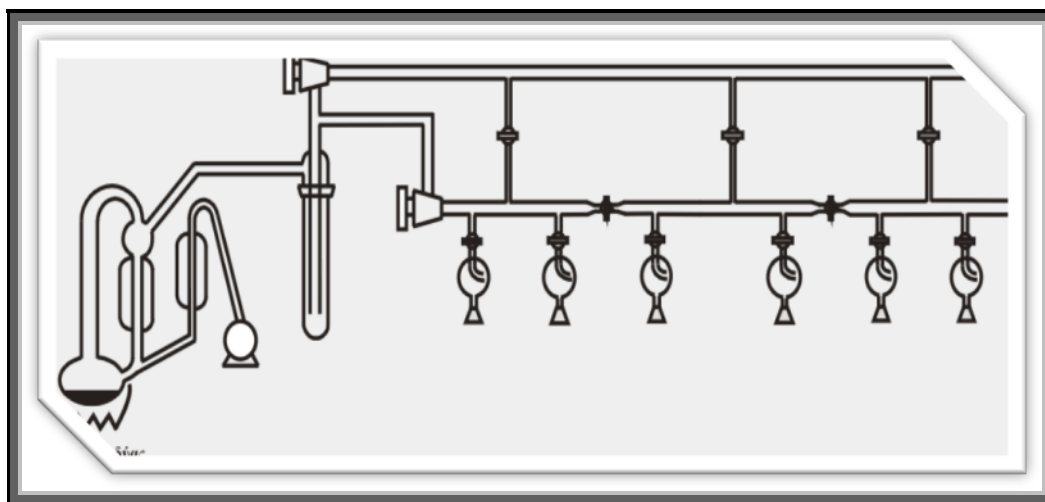
3.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT)

Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό τεχνικών υψηλού κενού και πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα όμως, απαιτούνται αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Για το λόγο αυτό, ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού και κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού χρησιμοποιούνται για να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμείξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Στη συνέχεια, με κατάλληλες τεχνικές καθαρισμού αντιδραστηρίων και διαλυτών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών, όπως αλκοόλες, αμίνες και οξέα, δραστικές προσμείξεις περιεχόμενες στα αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο.

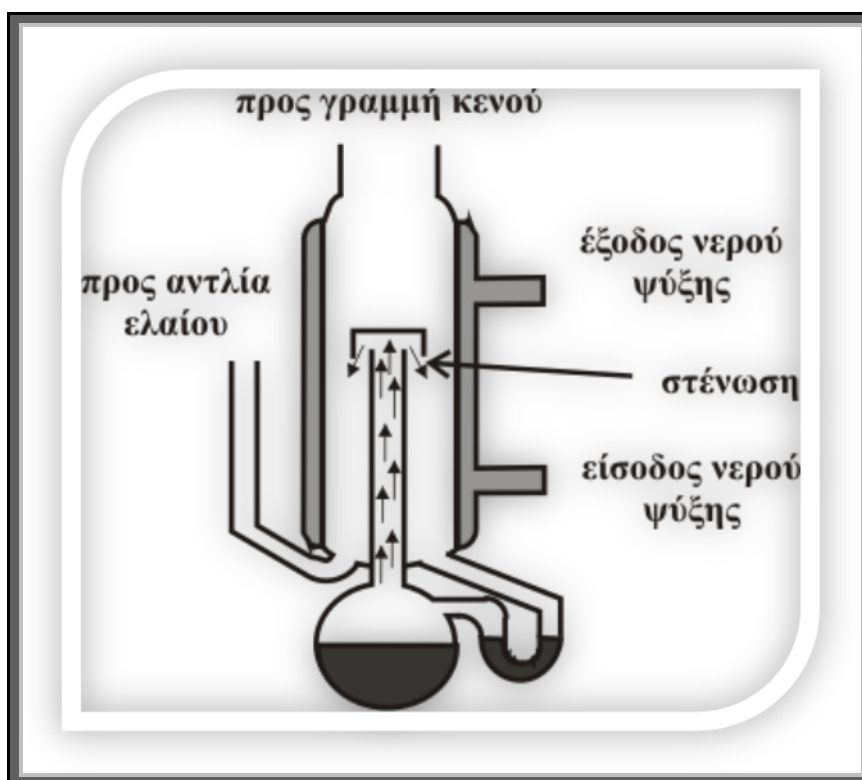
Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών και των πολυμερών έγιναν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflo HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου. Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των $10^{-2} - 10^{-3}$ mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως (Σχήμα 33), σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα

μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα ροής που δεν έχει σταθερή διατομή, η παροχή (ρυθμός ροής) του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται (Σχήμα 34). Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.



Σχήμα 33: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.



Σχήμα 34: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως προστατεύονται από πτητικά συστατικά με παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα μένουν απομονωμένα. Η γραμμή κενού περιλαμβάνει πολλές εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή). Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία [80].

3.2 Καθαρισμός διαλυτών

3.2.1 Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)

Το DMF αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού των NCAs, επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του απαραίτητη. Το DMF υπόκειται τόσο σε θερμική αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη αλλά και μονοξειδίο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού παράγοντας διμεθυλαμίνη και φορμικό οξύ [81], συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του. Αραίωση μονομερών NCAs σε αυτό κρίνεται ως μη φρόνιμη καθώς οδηγεί σε πολυμερισμό με εκκίνηση από την διμεθυλαμίνη όπως θα αποδειχθεί και παρακάτω. Το DMF φυλάσσεται υπο αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box σε μπουκαλάκια των 100ml, μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγά, που πριν έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού και περιέχει P₂O₅. Αφήνεται να αντιδράσει για μισή ώρα, απαερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη κλασματικά. Χρησιμοποιούνται τα μεσαία κλάσματα πάντα για κάθε απόσταξη της διαδικασίας. Το DMF που προκύπτει φυλάσσεται στην γραμμή κενού και προστατευμένο από το φώς. Επίσης πρέπει να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του.

(διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 36.71$ στους 25°C , $\Sigma.Z = 153^\circ\text{C}$)

3.2.2 Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc)

Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για την σύνθεση των μονομερών(BOC-Lys NCA) όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) για μια μέρα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζονται τα μεσαία κλάσματα σε διπλανή φιάλη 2 L με στρόφιγγα όπου απαερώνεται άλλη μια φορά. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 6.02$ στους 25°C, $\Sigma.Z = 77^\circ\text{C}$)

3.2.3 Εξάνιο

Το εξάνιο αποτελεί τον μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των N-Καρβοξυανυδριτών. Ο καθαρισμός του περιλαμβάνει κατεργασία με μεταλλικό νάτριο για μια ημέρα σε φιάλη των 2L,

απαέρωση και απόσταξη στη γραμμή του υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη που επίσης περιέχει νάτριο.

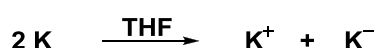
(διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 1.89$ στους 20°C , $\Sigma.Z = 69^\circ\text{C}$)

3.2.4 Βενζόλιο

Το βενζόλιο προστίθεται σε θειικό οξύ για να απομακρυνθεί το θειοφαίνιο και άλλες ολεφίνες. Αφού το ανακινήσουμε και το εκπλύνουμε με νερό, υδροξείδιο νατρίου και πάλι νερό, σχηματίζονται δυο φάσεις μια διαυγής και μια σκούρα. Εμείς παίρνουμε με προσοχή την διαυγή φάση σε φιάλη και προσθέτουμε λεπτότατα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου υπό ανάδευση για μια νύχτα για να αντιδράσει με την υγρασία. Ακολουθεί απόσταξη στη γραμμή του υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη που περιέχει κανονικό βουτυλολίθιο, το οποίο θα αντιδράσει με τις όποιες τυχόν προσμίξεις. Η φιάλη με το υδρίδιο του ασβεστίου απενεργοποιείται μετά με τολουόλιο και μεθανόλη.

3.2.5 Τετραϋδροφουράνιο (THF)

Το τετραϋδροφουράνιο αφήνεται για μια μέρα να αντιδράσει παρουσία μεταλλικού νατρίου, απαερώνεται και μεταφέρεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1000 ml που περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου σε αναλογία 3:1, όπου και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση :

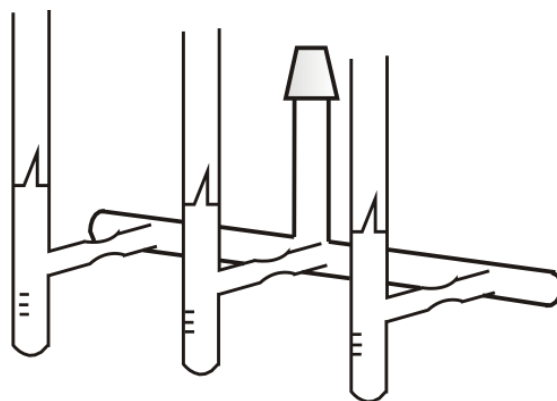


(διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 7.60$ στους 20°C , $\Sigma.Z = 66^\circ\text{C}$)

3.3 Καθαρισμός απαρχητών και αντιδραστηρίων

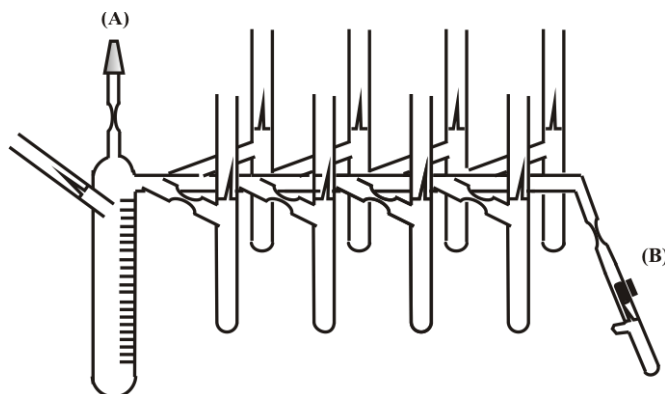
3.3.1 Διμεθυλαμίνη (DMA)

Η διμεθυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής για τον πολυμερισμό των NCAs. Η διαδικασία είναι τροποποιημένη σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εξυλαμίνη. Η διμεθυλαμίνη είναι αέριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σ.ζ.=7°C) με υψηλή τάση ατμών (1.8 atm) και πρέπει να υγροποιηθεί για να ακολουθήσει ο καθαρισμός της. Για την υγροποίηση προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή κενού και γίνεται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική στρόφιγγα προσαρμόζεται φιάλη των 100ml που περιέχει κάτοπτρο νατρίου και είναι απαερωμένη. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης ξηρού πάγου στους -78°C. Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με προσοχή για να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί 10ml περίπου το λουτρό ισοπροπανόλης ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δυο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της διμεθυλαμίνης. Εν συνεχεία αποστάζεται, σε συσκευή (Σχήμα 35) που περιέχει βαθμονομημένες αμπούλες, η επιθυμητή ποσότητα κάθε φορά. Η κάθε αμπούλα παγώνεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή δεν μπορεί να γίνει με την χρήση short-path καθώς η διμεθυλαμίνη έχει υψηλή τάση ατμών και παρατηρήθηκε, όταν έγινε αυτό, αποικοδόμηση κατά την σύντηξη.



Σχήμα 35: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.

Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης (Σχήμα 36), η οποία μέσω του εσφυρίσματος τοποθετείται στη γραμμή κενού. Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο A και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας (B).



Σχήμα 36: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της DMA ήταν τόσο το THF αλλά και το DMF. Καλύτερα αποτελέσματα απέδωσε το διάλυμα με διαλύτη το THF όσον αφορά τις στοιχειομετρίες στους διάφορους πολυμερισμούς. Ένα σημαντικό μειονέκτημα παρατηρήθηκε όταν παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα της τάξης 10^{-4} moles*ml⁻¹ που αφορούσε την αποικοδόμηση της διμεθυλαμίνης κατά την σύντηξη της αμπούλας. Σε αραιότερα διαλύματα 10^{-5} και 10^{-6} δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Όταν διαλύτης είναι το διμεθυλοφορμαμίδιο, η διαλυτότητα της διμεθυλαμίνης είναι καλύτερη και συνιστάται για παρασκευή διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης. Όσον αφορά την εξυλαμίνη, η παρουσία της στο DMF έδωσε διμοριακές κατανομές πολυμερών, γεγονός που υπαγορεύει την αποικοδόμηση του διαλύτη.

3.3.2 Τριαιθυλαμίνη (Et₃N)

Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση του Boc-Lys NCA ως μέσω δέσμευσης του υδροχλωρίου. Ο καθαρισμός της γίνεται με CaH₂ για μια

μέρα και μετά ακολουθεί απόσταξη σε φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει μεταλλικό νάτριο.

3.4 Πλεονεκτήματα της Τρίτυλο Προστατευτικής Ομάδας της Ιστιδίνης

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει τη σύνθεση του NCA της ιστιδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα στο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Με την έως τώρα γνώση μας, δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ο πολυμερισμός του NCA της ιστιδίνης με την συγκεκριμένη προστατευτική ομάδα. Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα για την προστασία του αζώτου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο είναι η DNP και η βένζυλο. Η βένζυλο είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες στα αμινοξέα γενικά, παρουσιάζει όμως μερικά σοβαρά μειονεκτήματα. Η βένζυλο προστατευτική ομάδα είναι ανεπαρκής σε αρκετές περιπτώσεις καθώς η απομάκρυνσή της με καταλυτική υδρογόνωση είναι αργή και όχι πάντα αποτελεσματική. Επίσης η απομάκρυνσή της με την χρήση νατρίου σε υγρή αμμωνία είναι μια πολύ δραστική διαδικασία που μπορεί να προκαλέσει ακόμα και ρήξη του πεπτιδικού δεσμού [82]. Επιπροσθέτως η βένζυλο προστατευτική ομάδα έχει παρατηρηθεί [83] ότι δεν μπορεί να εμποδίσει την ρακεμείωση των αντίστοιχων πεπτιδίων στα οποία φέρεται, δίνοντας ένα μίγμα των δυο ισομερών D και L.

Η DNP προστατευτική ομάδα είναι σαφώς πιο εύκολο να απομακρυνθεί με την χρήση μερκαπτοαιθανόλης [82]. Όμως δεν μπορεί να συνδυαστεί με καμία δομή στην οποία θα περιέχονται δισουλφιδικοί δεσμοί, γιατί κατά την αποπροστασία με μερκαπτοαιθανόλη σπάει ο δεσμός θείου-θείου. Μάλιστα η χρήση δισουλφιδικών δεσμών σε δομές με πολυπεπτίδια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της ύπαρξης ενζύμων στα κύτταρα όπως η αναγωγή του γλουταθείου που μπορούν να διασπάσουν στο κύτταρο τον δισουλφιδικό δεσμό. Έτσι σε μια δομή που περιέχει φάρμακο, μπορούμε να εκμεταλλευτούμε αυτήν την ιδιότητα για την απελευθέρωση του. Άρα η DNP δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

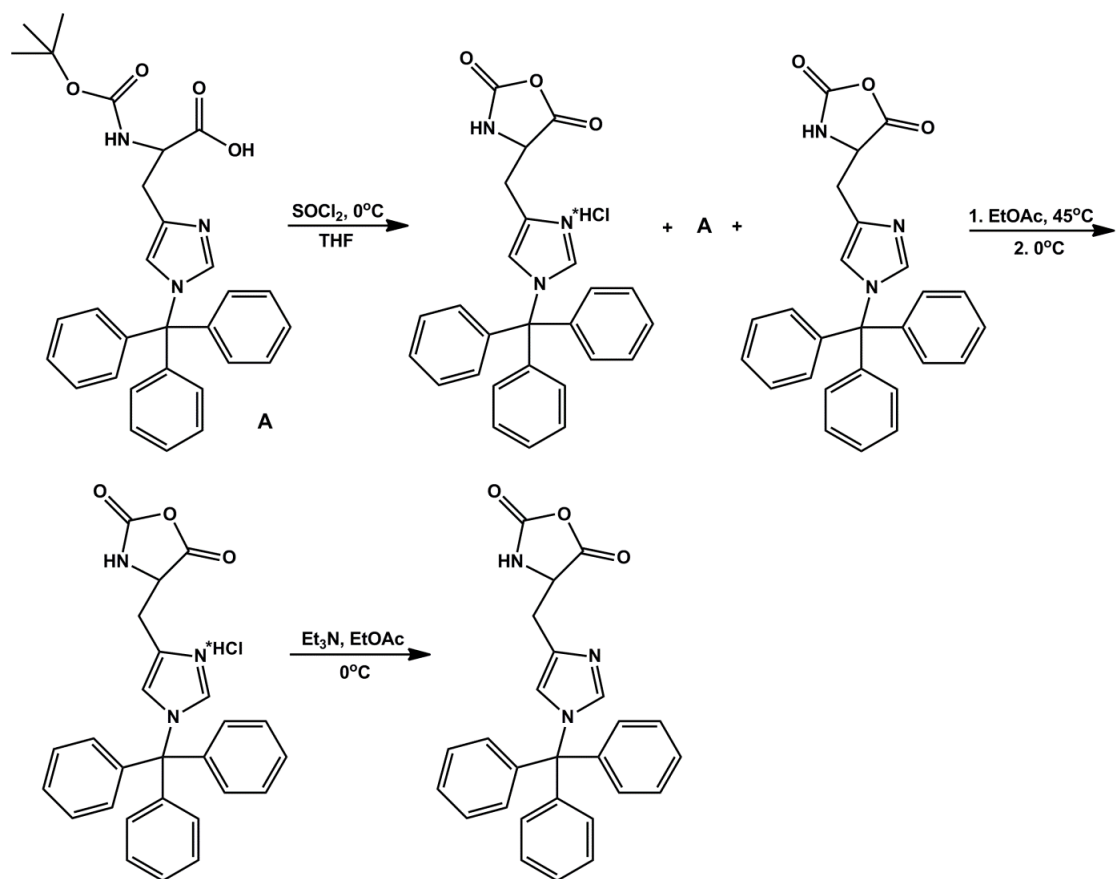
Η τρίτυλο προστατευτική ομάδα αποτελεί την καλύτερη λύση καθώς εμφανίζει τα παρακάτω συγκριτικά πλεονεκτήματα :

1. Εμποδίζει την ρακεμείωση των πεπτιδίων, στα οποία φέρεται δίνοντας σχεδόν αποκλειστικά το L ισομερές [84],[85],[86].
2. Είναι πολύ εύκολη και αποτελεσματική η αποπροστασία της με ασθενή οξέα [87].
3. Υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας καθώς με αυτές τις συνθήκες θα φύγει μόνο η τρίτυλο, ενώ οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν.
4. Η τρίτυλο προστατευτική ομάδα είναι απόλυτα σταθερή απέναντι σε ουδέτερα και αλκαλικά μέσα, αλλά και ως προς τα πυρηνόφιλα [84].

Για τη σύνθεση του αντίστοιχου NCA έγιναν αρκετές προσπάθειες, οι οποίες ήταν όλες ανεπιτυχείς, πριν καταλήξουμε στον τελικό τρόπο σύνθεσης. Αρχικά χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο Fuchs-Farthing με διάφορες παραλλαγές σε διαλύτες, εκχυλίσσεις, αντιδραστήρια και ανακρυσταλλώσεις. Είτε το προϊόν που πέρναμε δεν ήταν κατάλληλο είτε περιείχε ο τελικός NCA υδροχλώριο με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να είναι ιδιαίτερα αργός. Ο πιθανότερος λόγος για τον οποίο αυτές οι προσπάθειες δεν είχαν επιτυχία είναι ότι το τ-N του ιμιδαζολικού δακτυλίου δεν παραμένει ανενεργό παρά την προστασία του π-N, αλλά μεταφέρεται μέσω συντονισμού ηλεκτρονική πυκνότητα σε αυτό, με αποτέλεσμα να αντιδρά με το τριφωσγένιο.

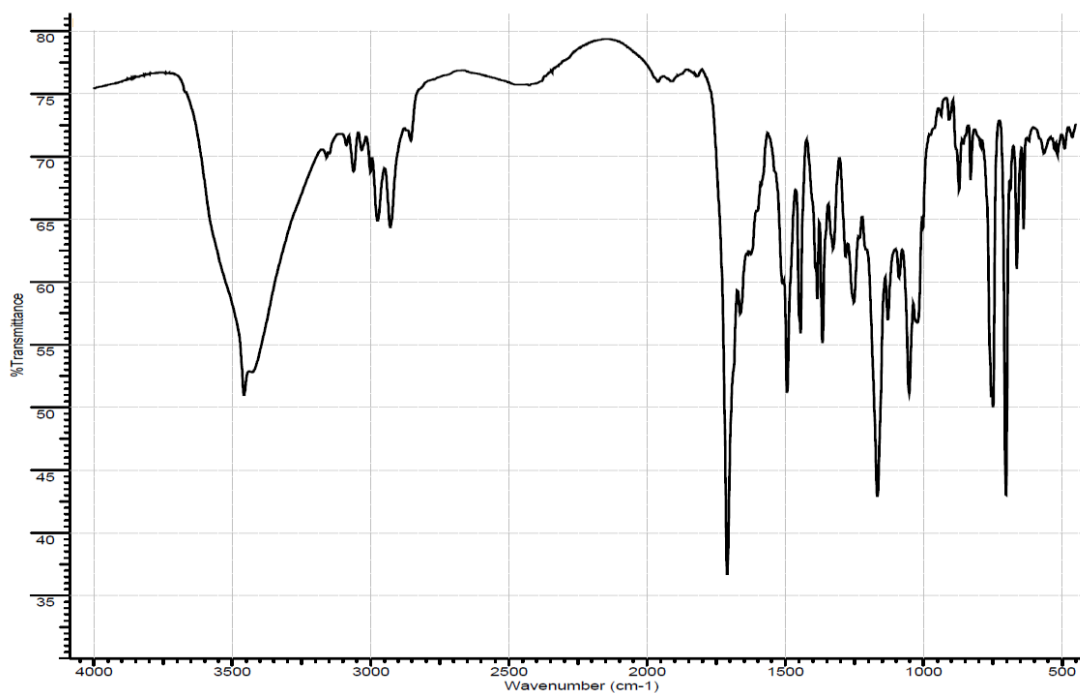
3.5 Σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA

Η διαδικασία της σύνθεσης του Nim-Trt-L-Histidine NCA διαρκεί περίπου τρεις ημέρες (Σχήμα 37). Σε όλα τα στάδια γίνεται χρήση ανάδευσης στις συσκευές με τη βοήθεια μαγνητών και ηλεκτρικού αναδευτήρα. Όλες οι συσκευές που χρησιμοποιούνται και τα φίλτρα έχουν μπει σε φούρνο για μία ημέρα στους 600°C, ώστε να έχει απομακρυνθεί κάθε είδους ανεπιθύμητη ένωση από αυτές και να είναι τελείως καθαρές. Σε αυτές τις θερμοκρασίες όλα αποσυντίθενται ή καταστρέφονται, εκτός από το γυαλί.



Σχήμα 37: Αντίδραση σύνθεσης Nim-Trt-L-Histidine NCA

1. Σε καθαρή δίκλιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα και την ανεβάζουμε στην γραμμή κενού. Εκεί απαερώνεται και υφίσταται τρία flame drying ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία.
2. Αφού κρυώσει, την κατεβάζουμε και ζυγίζουμε 20 γραμμάρια Boc-L-Histidine-(Trt)-OH. Στην συνέχεια αποστάζονται 200ml THF, ώστε να έχουμε ένα διάλυμα περίπου 10%. Οπως βλέπουμε στο αντίστοιχο φάσμα του IR (Εικόνα 4) υπάρχουν δυο χαρακτηριστικές κορυφές, μια οξεία στα 1710 cm⁻¹ του καρβονυλίου του α-αμινοξέος και μια ευρεία στα 1660 cm⁻¹ της αμινομάδας του α-αμινοξέος.



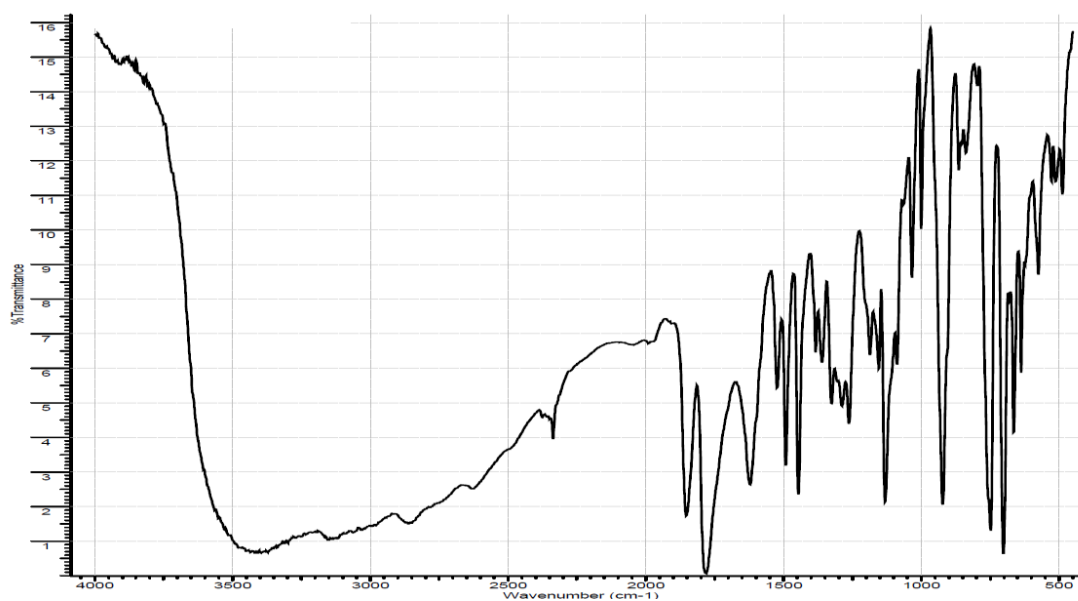
Εικόνα 4: Φάσμα IR της Boc-L-Histidine-(Trt)-OH

3. Μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης, κατεβάζουμε την φιάλη με τη στρόφιγγα κλειστή, ώστε μέσα να υπάρχει κενό. Με προσαρμογή ειδικού επιθέματος στον αντάπτορα κενού και χρήση φιάλης αργού, ανοίγουμε την στρόφιγγα και βάζουμε αργό στην συσκευή. Μετά κλείνουμε τη στρόφιγγα. Πετυχαίνουμε έτσι να υπάρχει αργό μέσα στην συσκευή, για όσο χρόνο θα αφαιρέσουμε τον αντάπτορα κενού. Το αργό είναι βαρύ και αδρανές αέριο οπότε θα βρίσκεται πάνω στο διάλυμα αποτρέποντας να έρθει σε επαφή το διάλυμα με την υγρασία και την ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε κατάλληλο δίκλιμο επίθεμα, ώστε να έχουμε τη συσκευή μας συνδεδεμένη στη φιάλη αργού συνέχεια (Εικόνα 5). Έτσι επιτυγχάνουμε συνεχή ροή αργού.



Εικόνα 5: Συσκευές κατά την αντίδραση για την σύνθεση Nim-Trt-L-Histidine NCA

Η συσκευή τοποθετείται πάνω σε αναδευτήρα και κάψα και στηρίζεται με την χρήση στατό και μοχλοβραχιόνων. Προσθέτουμε το θειότυλο χλωρίδιο με σταγονομετρικό χωνί, έχοντας προσέξει η αναλογία του να είναι πολλαπλασιασμένη επί 1,1 κατά mol ως προς το αντιδρών, δηλαδή την Boc-L-Histidine-(Trt)-OH. Προσθέτουμε στην κάψα παγόνηρο ώστε η θερμοκρασία της αντίδρασης να είναι στους 0°C. Η αντίδραση αφήνεται για δυο ώρες.



Εικόνα 6: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA 2ώρες μετά την αντίδραση

Στο φάσμα του IR μετά από δυο ώρες (Εικόνα 6) είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές στα 1780 cm^{-1} του C2 και στα 1820 cm^{-1} του C5 του σχηματισμένου πλέον NCA, ενώ οι κορυφές στα 1660 cm^{-1} και 1710 cm^{-1} του α-αμινοξέος δεν υπάρχουν πια.

4. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, χύνουμε το περιεχόμενο της συσκευής που έλαβε χώρα η αντίδραση σε ποτήρι ζέσης που περιέχει διαιθυλαιθέρα περίπου δέκα φορές σε σχέση με το THF. Εκεί το προϊόν της αντίδρασης θα καταπέσει και στη συνέχεια θα το φιλτράρουμε με φίλτρο Νο 3, στο οποίο έχουμε προσαρμόσει κατάλληλο πλαστικό πώμα και το έχουμε τοποθετήσει στον ένα από τους δυο λαιμούς μιας άλλης δίλαιμης σφαιρικής φιάλης 1000ml. Με κατάλληλο επίθεμα και προσαρμοσμένο σε αυτό λάστιχο συνδέουμε τον άλλο λαιμό της φιάλης στο κενό του πάγκου. Κατά τη διάρκεια του φιλτραρίσματος έχουμε προσαρμόσει χωνί στο λάστιχο εξόδου της φιάλης αργού, και έτσι όλη η διαδικασία του φιλτραρίσματος γίνεται υπό αργό. Κρατάμε το στερεό που παραμένει στο φίλτρο και το μεταφέρουμε προσεκτικά σε μια τρίτη σφαιρική φιάλη 1000 ml. Τοποθετούμε σε αυτήν κατάλληλο σύνδεσμο και την ανεβάζουμε στην γραμμή κενού όπου και απαερώνουμε. Στη συνέχεια αφήνουμε το στερεό μια νύχτα στη γραμμή κενού για ξήρανση.

5. Στην συνέχεια αποστάζουμε στην φιάλη οξικό αιθυλεστέρα με την βοήθεια της γραμμής κενού. Αποστάζουμε περίπου 250ml για κάθε 10 γραμμάρια. Αφού ολοκληρωθεί η απόσταξη, ξεπαγώνω την δίλαιμη φιάλη τοποθετώντας την σε δοχείο με νερό.

6. Μετά τοποθετούμε την φιάλη πάνω σε κάψα που περιέχει νερό και αυτήν σε αναδευτήρα με θέρμανση και θερμαίνω υπό ανάδευση στους 45°C για μια ώρα. Προσέχω την θερμοκρασία με την βοήθεια θερμόμετρου. Έτσι τα πάντα θα διαλυθούν στον EtAc.

7. Μετά το πέρας της μιας ώρας αντικαθιστώ το ζεστό νερό στην κάψα με λουτρό πάγου. Μειώνεται έτσι η διαλυτότητα του NCA και παρατηρούμε ότι ο σχηματισμένος λευκός NCA καταβυθίζεται ενώ πάνω σχηματίζεται ένα κίτρινο διάλυμα. Το κίτρινο διάλυμα είναι οι διάφορες προσμίξεις, ακαθαρσίες, παραπροϊόντα ή μη αντιδρώντα που είναι διαλυτά στον EtAc.

8. Στην συνέχεια φιλτράρουμε πάλι το περιεχόμενο της συσκευής μας. Χρησιμοποιώ φίλτρο Νο 3 προσαρμοσμένο σε πλαστικό πώμα και αυτό τοποθετείται στον ένα από τους δυο λαιμούς μιας δίλαιμης 1000αρας φιάλης. Στον άλλο λαιμό βάζω επίθεμα στο οποίο προσαρμόζω λάστιχο που συνδέεται με το κενό του πάγκου. Κατά την διάρκεια του διήθησης έχουμε προσαρμόσει χωνί στο λάστιχο εξόδου της φιάλης αργού, και έτσι όλη η διαδικασία του φιλτραρίσματος γίνεται υπό αργό. Κρατάμε το στερεό πάνω στο φίλτρο που είναι ο NCA με υδροχλώριο. Το υδροχλώριο που παράγεται κατά την αντίδραση δεν φεύγει, γιατί λόγω της ενεργότητας του τ-N του ιμιδαζολικού δακτυλίου το υδροχλώριο συνδέεται σε αυτό.

9. Το στερεό αυτό πάνω στο φίλτρο το ζυγίζουμε. Αυτό το κάνουμε για να υπολογίσουμε την ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που θα χρησιμοποιήσουμε σε επόμενο βήμα. Ζυγίσαμε 13,4 γραμμάρια του NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο. Ξέρουμε πως το μοριακό βάρος του NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο είναι 459,5. Είναι πολύ σημαντικό να υπολογίσουμε σωστά την ποσότητα της τριαιθυλαμίνης που θα χρησιμοποιήσουμε, γιατί αν ρίξουμε λιγότερο δεν θα φύγει όλο το υδροχλώριο με συνέπεια ο πολυμερισμός να μη γίνεται σωστά και αν ρίξουμε περισσότερο υπάρχει κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού, αφού η τριαιθυλαμίνη ως βάση μπορεί να εκκινήσει τον πολυμερισμό των NCAs.

10. Μετά μεταφέρουμε προσεκτικά σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 ml τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο. Σε αυτήν τοποθετούμε έναν σύνδεσμο για σύνδεση στη γραμμή κενού. Αφού ανεβάσουμε τη φιάλη στη γραμμή κενού, απαερώνουμε και αφήνουμε για ξήρανση για μια νύχτα.

11. Στην συνέχεια αποστάζω στην φιάλη με την βοήθεια της γραμμής κενού EtAc 250ml για κάθε 10γραμμάρια. Αφού ξεπαγώσω, τοποθετώ την τρίλαιμη σφαιρική 500αρα σε παγόλουτρο. Σε μια άλλη μικρή φιάλη αποστάζω επίσης άλλα 15ml EtAc.

12. Υπολογίσαμε πως στη φιάλη έχω 0,029 mol από τον NCA της τρίτυλο ιστιδίνης με υδροχλώριο ($13,4 \text{ g} / 459,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0,029 \text{ mol}$). Ξέρουμε ότι το μοριακό βάρος της τριαιθυλαμίνης είναι $101,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Άρα θα χρειαστούμε

$101,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,029 \text{ mol} = 2,95$ γραμμάρια τριαιθυλαμίνης. Η πυκνότητα της τριαιθυλαμίνης είναι $0,7255 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Και από τον τύπο της πυκνότητας

$d=m/V$ λύνω ως προς όγκο και έχω 4,06 ml τριαιθυλαμίνης. Οπότε αποστάζουμε με την βοήθεια της γραμμής κενού σε μια μικρή φιάλη περίπου 5ml τριαιθυλαμίνης από την φιάλη με το μεταλλικό νάτριο που φυλάσσεται. Με την βοήθεια σύριγγας παίρνουμε τέσσερα ml τριαιθυλαμίνης και τα βάζουμε σε σταγονομετρικό χωνί. Εκεί προσθέτουμε και τα 15 ml EtAc που απέσταξαμε σε μια άλλη μικρή φιάλη στο προηγούμενο βήμα.

13. Στην τρίλαιμη φιάλη ακολουθούμε την ίδια πορεία όπως στο βήμα 3 για να έχουμε συνεχή ροή αργού. Οπότε στον έναν λαιμό προσαρμόζουμε δίλαιμο επίθεμα για να υπάρχει ροή αργού και στον άλλο λαιμό βάζουμε το σταγονομετρικό χωνί με την τριαιθυλαμίνη διαλυμένη στον EtAc. Ρίχνουμε την τριαιθυλαμίνη στάγδην για 15 λεπτά περίπου και μετά αφήνουμε το διάλυμα για μια ώρα. Αυτό που θέλουμε να πετύχουμε είναι να αντιδράσει η τριαιθυλαμίνη που είναι βασική με το υδροχλώριο που υπάρχει στον NCA και εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας που έχουμε με το παγόλουτρο το άλας της τριαιθυλαμίνης, που δεν είναι διαλυτό, να καταβυθιστεί ώστε να μπορέσουμε με διήθηση στο επόμενο βήμα να το απομακρύνουμε.

14. Στην συνέχεια σε μια δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1000ml προσθέτω 600ml εξάνιο και ένα μαγνητάκι ώστε να βρίσκεται υπό ανάδευση. Χρησιμοποιώ φίλτρο No 3 προσαρμοσμένο σε πλαστικό πώμα και αυτό τοποθετείται στον ένα από τους δυο λαιμούς της φιάλης. Στον άλλο λαιμό βάζω επίθεμα στο οποίο προσαρμόζω λάστιχο που συνδέεται με το κενό του πάγκου. Ρίχνουμε το περιεχόμενο της τρίλαιμης σφαιρικής του προηγούμενου βήματος πάνω στο φίλτρο, έτσι ώστε το άλας της τριαιθυλαμίνης να μείνει πάνω σε αυτό και να περάσει κάτω διαλυτός ο NCA. Κρατάμε το περιεχόμενο της δίλαιμης που είναι ο NCA σε εξάνιο και παρατηρούμε να πέφτει στο εξάνιο έχοντας άσπρο χρώμα.

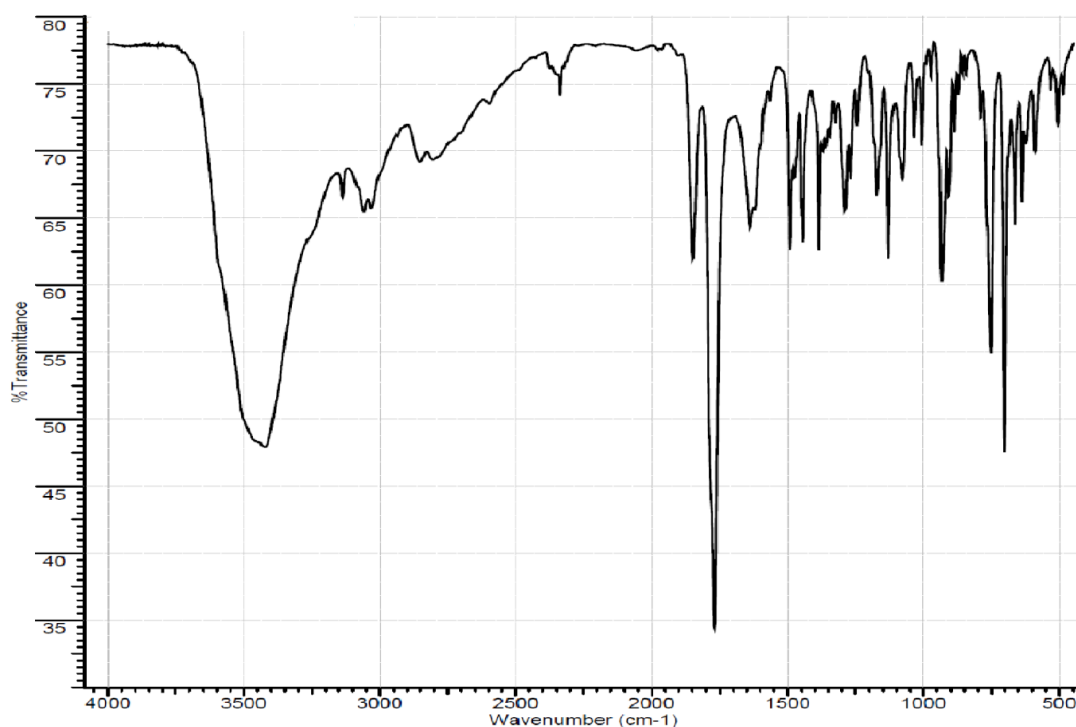
15. Σε αυτό το βήμα φιλτράρουμε ξανά τον NCA στο εξάνιο. Χρησιμοποιούμε μια νέα δίλαιμη 1000ml σφαιρική φιάλη, προσαρμόζουμε το φίλτρο και το επίθεμα με το κενό του πάγκου και κρατάμε τον στερεό NCA που κάθεται

πάνω στο φίλτρο. Η όλη διαδικασία γίνεται υπό ροή αργού ή αζώτου όπως στο βήμα 8.

16. Τέλος μεταφέρουμε τον NCA σε μια νέα μικρή φιάλη στην οποία προσαρμόζουμε έναν αντάπτορα κενού και ανεβαίνουμε στην γραμμή κενού όπου την αφήνουμε μια νύχτα για ξήρανση.

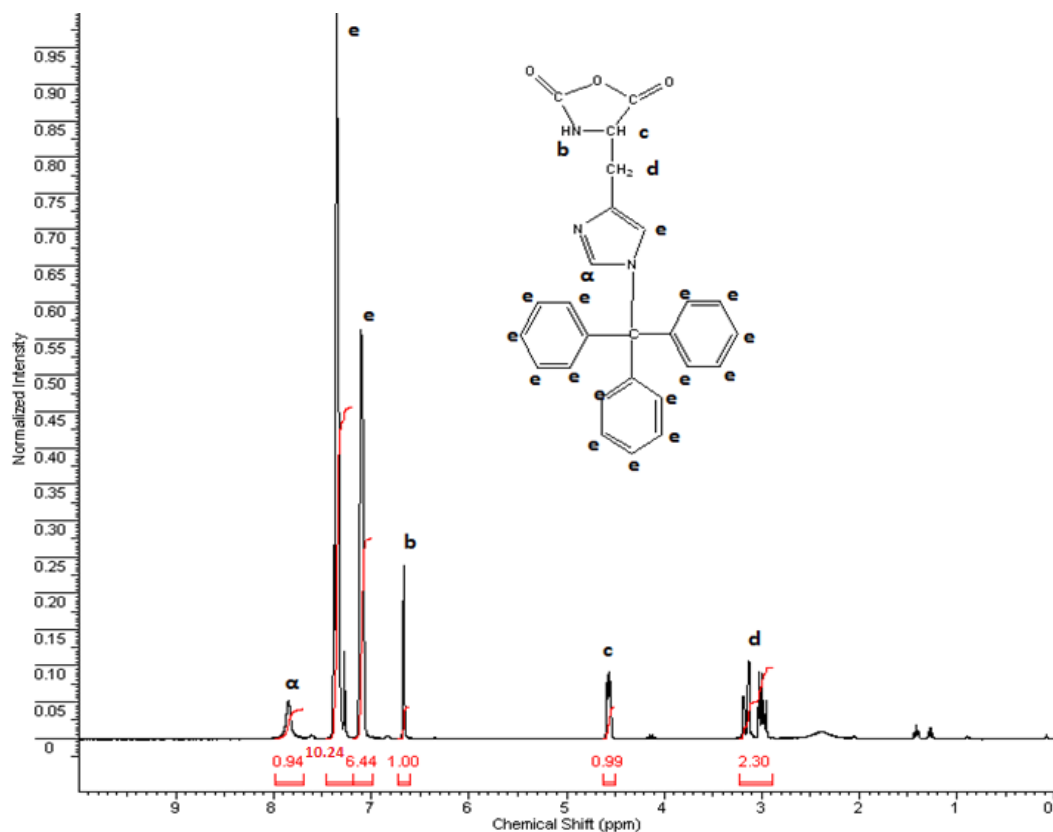
Ο NCA μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και φυλάσσεται εκεί, σε δοχείο υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Ζυγίσαμε τελικά 11 γραμμάρια. Για την απόδοση έχουμε: $20\text{g}/497,58\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0.0402\text{mol}$ για το αντιδρών και $11\text{g}/423\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}=0.0260\text{mol}$ για το προϊόν. Άρα η συνολική απόδοση είναι :

$$\frac{0.0260\text{ mol}}{0.0402\text{ mol}} \times 100 = 64.7\%$$



Εικόνα 7: Φάσμα IR της Nim-Trt-L-Histidine NCA

Στο τελικό φάσμα του IR (Εικόνα 7) για τον Nim-Trt-L-Histidine NCA είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές στα 1768 cm^{-1} του C2 και στα 1849 cm^{-1} του C5 του NCA. Για την εξακρίβωση της σύνθεσης του NCA της ιστοδίνης με την τρίτυλο προστατευτική ομάδα έγινε λήψη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Εικόνα 8).

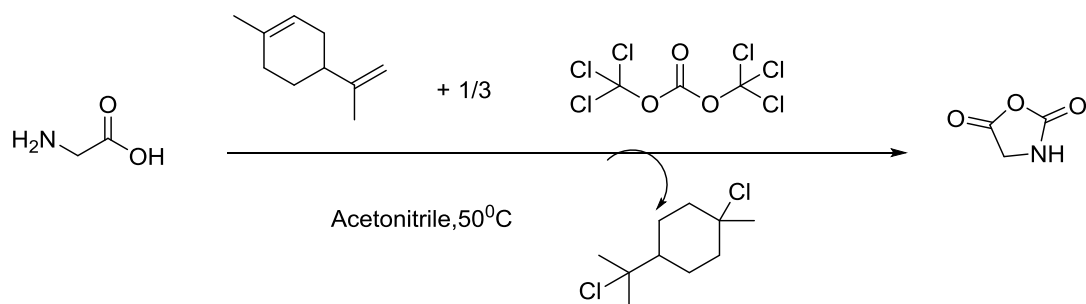


Εικόνα 8: Φάσμα NMR της Nim-Trt-L-Histidine NCA.

Στο φάσμα του $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε ότι το υδρογόνο του C του ιμιδαζολικού δακτυλίου που συνδέεται με το άζωτο που φέρει την προστασία (e) εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τα υδρογόνα της προστασίας. Επίσης στην ίδια περιοχή (7,2 ppm) έχουμε και την κορυφή από τον διαλύτη.

3.6 Σύνθεση NCA L-Γλυκίνης

Η πορεία της αντίδρασης για το σχηματισμό του NCA της γλυκίνης φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 38):



Σχήμα 38: Αντίδραση σχηματισμού του NCA της γλυκίνης.

Ξεκινώντας από L-γλυκίνη με προσθήκη λιμονενίου και τριφωσγενείου σε διαλύτη ακετονιτρίλιο διατηρώντας την θερμοκρασία στους 50 °C προκύπτει ο NCA της γλυκίνης.

Υπολογισμοί σύνθεσης NCA γλυκίνης :

$$n = \frac{m}{Mr} = \frac{5 \text{ gr}}{75.07 \text{ g/mol}} = 0.067 \text{ mol}$$

$$m_{\text{τριφωσ}} = 0,067/2,7 = 0,025 \text{ mol τριφωσγενείου}$$

$$m_{\text{τριφωσ}} = n \cdot Mr = 0.025 \cdot 296.748 = 7.32 \text{ g τριφωσγενείου}$$

$$m_{\text{λιμον}} = 0.025 \cdot 1,5 \text{ περισσεια} = 0,037$$

$$m_{\text{λιμον}} = n \cdot Mr = 0.037 \cdot 136.24 = 5.04$$

$$V = \frac{m}{d} = \frac{5.041}{0.8411} = 5.99 \text{ ml λιμονένιο}$$

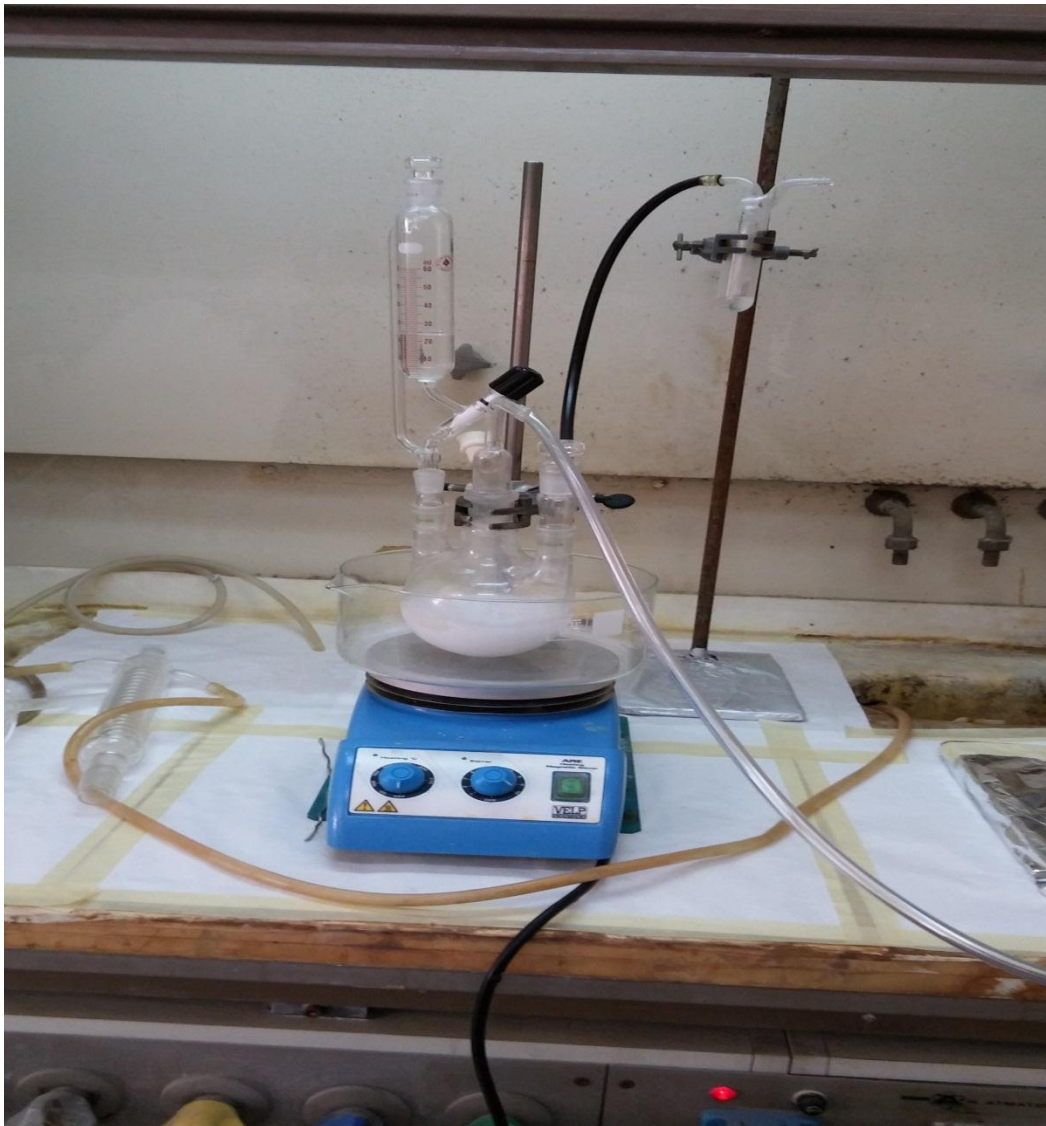
Σε μία τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml προσαρμόζω δύο πώματα και έναν αντάπτορα και την ανεβάζω στην γραμμή κενού για να κανώ 3 flame drying. Αφού ανεβάσω την συσκευή στην γραμμή απαερώνω και ελέγχω για κενό. Τον περισσότερο αέρα τον διώχνω από την αντλία και τον υπόλοιπο από τον υδράργυρο. Με βοήθεια φιάλης αργού θα προσθέσω την γλυκίνη **NH₂CH₂CO₂H MB=75,07**. Η προσθήκη της γλυκίνης θα γίνει στον απαγωγό με τη βοήθεια αργού ώστε να εμποδίσει όσο το δυνατόν περισσότερο την είσοδο του ατμοσφαιρικού αέρα. Αφού προσθέσω το αργό ανοίγω την μία είσοδο της τρίλαιμης σφαιρικής φιάλης και προσθέτω **5,0064 gr γλυκίνης** που ζύγισα. Μεταφέρω το όλο σύστημα στην γραμμή κενού και αφήνω για ξήρανση το αντιδρών για μία νύχτα.

Την επόμενη μέρα στην τρίλαιμη σφαιρική (Εικόνα 9) που έχω αφήσει για ξήρανση αποστάζω 200 ml περίπου ακετονιτρίλιο. Χρησιμοποιώ ακετονιτρίλιο γιατί θέλω πολικό διαλύτη ώστε να φύγει η αποχωρούσα ομάδα στην αντίδραση σύνθεσης του NCA. Αφού πάρω την ποσότητα που θέλω ξεπαγώνω την φιάλη και την αφήνω υπό ανάδευση.



Εικόνα 9:Συσκευή για NCA γλυκίνης.

Στη συνέχεια σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml προσαρμόζω αντάπτορα και με τον ίδιο τρόπο με προηγουμένως αποστάζω **25 ml περίπου ακετονιτρίλιο** αφού προηγουμένως απαερώσω την φιάλη και κάνω 3 flame drying. Προσθέτω στην φιάλη των 50 ml που περιέχει ακετονιτρίλιο **7,32 gr τριφωσγενείου** που έχω ζυγίσει. Αφου διαλυθεί όλη η ποσότητα τριφωσγενείου ζυγίζω σε ένα ποτήρι ζέσεως **6ml λιμονένιο**. Το διάλυμα ακετονιτριλίου και τριφωσγενείου θα το προσθέσω στάγδην στην τρίλαιμη σφαιρική που είχα πριν. Η διάταξη πλέον της τρίλαιμης σφαιρικής αλλάζει. Στην μία είσοδο έχω προσαρμόσει το σταγονομετρικό χωνί που περιέχει το διάλυμα ακετονιτριλίου και τριφωσγενείου, στην κεντρική είσοδο έχω την παροχή αργού, ενώ από την τρίτη είσοδο θα προσθέσω το λιμονένιο και θα κλείσω με ένα πώμα. Η διάταξη φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 10):



Εικόνα 10: Συσσκευή παρασκευής NCA γλυκίνης με προσαρμοσμένο σταγονομετρικό χωνί και παροχή αργού

Πρώτα προσθέτω το λιμονένιο και μετά σε διάρκεια 30 λεπτών το διάλυμα τριφωσγενείου και ακετονιτριλίου. Χρησιμοποιώ σταγονομετρικό χωνί γιατί δεν θέλω να πραγματοποιηθεί τοπική περίσσεια τριφωσγενείου και να σχηματιστούν δικετοπιπεραζίνες. Επίσης προσθέτω πρώτα το λιμονένιο για να δεσμεύσει τα χλώρια του τριφωσγενείου. Ταυτόχρονα βοηθάω το όλο σύστημα τοποθετώντας μία κάψα με ζεστό νερό κάτω από την φιάλη.

Παρατηρώ το διάλυμα να κιτρινίζει λόγω του ότι το λιμονένιο δεσμεύει τα χλώρια που δεν αντέδρασαν. Περιμένω να διαυγάσει το διάλυμα γιατί ο NCA είναι διαλυτός στο ακετονιτρίλιο. Αφού προστεθεί όλη ποσότητα από το σταγονομετρικό χωνί προσαρμόζω ψυκτήρα στην κεντρική είσοδο της

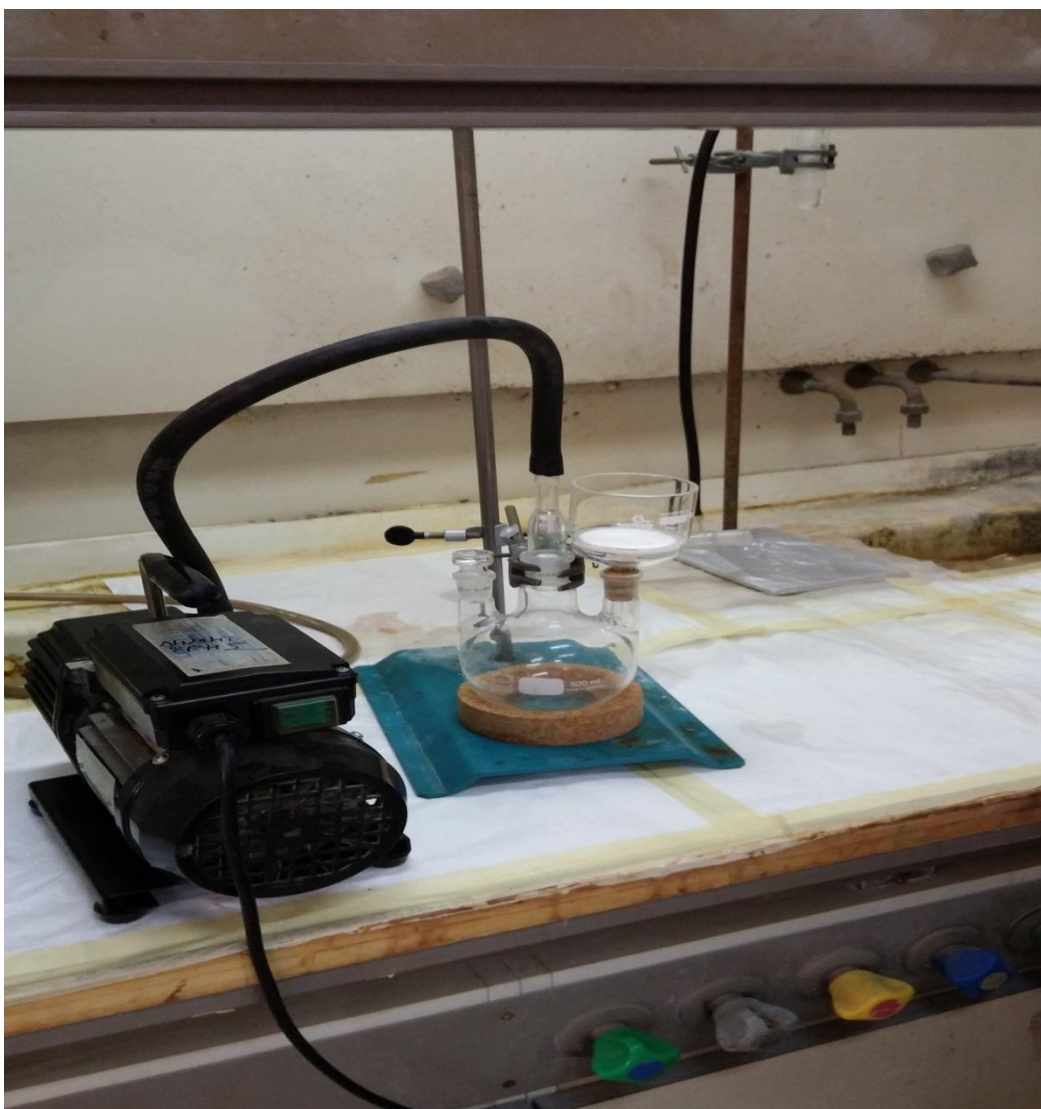
τρίλαιμης φιάλης. Τοποθετώ επίσης θερμομέτρο και ανεβάζω την θερμοκρασία του διαλύματος στους 60°C - 70°C . Ελέγχω συνέχεια τη θερμοκρασία.



Εικόνα 11: NCA μετά από αντίδραση

Παρατηρώ μετά την αντίδραση ότι κάτω πέφτει άσπρο ίζημα, ενώ πάνω μένει διαλυτό κίτρινο υγρό (Εικόνα 11), που μέσω IR βλέπω πως είναι ο NCA που θέλω. Πάνω είναι διαλυμένος ο NCA σε ακετονιτρίλιο, ενώ κάτω βρίσκονται οι δικετοπιπεραζίνες.

Σε επόμενο βήμα διηθώ το περιεχόμενο της σφαιρικής με την βοήθεια αντλίας αλλά και φίλτρου σε μία καινούρια τρίλαιμη σφαιρική φιάλη. Η διήθηση πραγματοποιείται με την βοήθεια αργού (Εικόνα 12). Έτσι το κίτρινο διάλυμα που περιέχει ακετονιτρίλιο με NCA το ανεβάζω στη γραμμή κενού για να διώξω το ακετονιτρίλιο.



Εικόνα 12: Διήθηση με τη βοήθεια φίλτρου και αντλίας

Αφήνω για ξήρανση τον NCA και όποια παραπροϊόντα. Η αντίδραση ευνοεί τον σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης γιατί μέσω IR δεν είδαμε ποσότητα NCA. Άρα ο NCA είναι παραπροϊόν της αντίδρασης. Ζυγίσαμε 4 gr δικετοπιπεραζίνης. Αυτό συμβαίνει κυρίως για κινητικούς λόγους, καθώς η γλυκίνη είναι μικρό μόριο και προτιμάει να ενωθεί με τον εαυτό της.

Την επόμενη μέρα ακολουθεί το στάδιο των ανακρυσταλλώσεων. Για τις ανακρυσταλλώσεις χρησιμοποιώ οξεικό αιθυλεστέρα με εξάνιο. Στο μείγμα εξανίου και οξεικού θα διαλυθούν οι ακαθαρσίες ενώ κάτω θα πέσει ο καθαρός NCA.

Αποστάζω για αρχή στη τρίλαιμη σφαιρική που περιέχει NCA με λιμονένιο οξεικό αιθυλεστέρα ώστε να διαλύσω τον NCA. Παίρνω περίπου 70-80 ml.

Μετά την απόσταξη βοηθάω να διλυθεί ο NCA με ζεστό νερό για να αποφύγω πιθανό αυτοπολυμερισμό. Αφού πήραμε τα 80 ml οξεικού αιθυλεστέρα είδαμε πάλι να σχηματίζεται ίζημα και κίτρινο υγρό. Ακολούθησε διήθηση. Μεσω IR διαπιστώθηκε πως το ίζημα προέρχεται από κάποιο χλωρίδιο. Το ακυλοχλωρίδιο αυτό είναι διαλυτό στο ακετονιτρίλιο ενώ στον οξεικό πέφτει.

Αφού διώξω το χλωρίδιο αποστάζω στη φιάλη μου εξάνιο και περιμένω να καταβυθιστεί ο NCA. Αφού πάρω αρκετή ποσότητα εξανίου ξεπαγώνω τη φιάλη και την αφήνω για μία νύχτα στους -20°C .

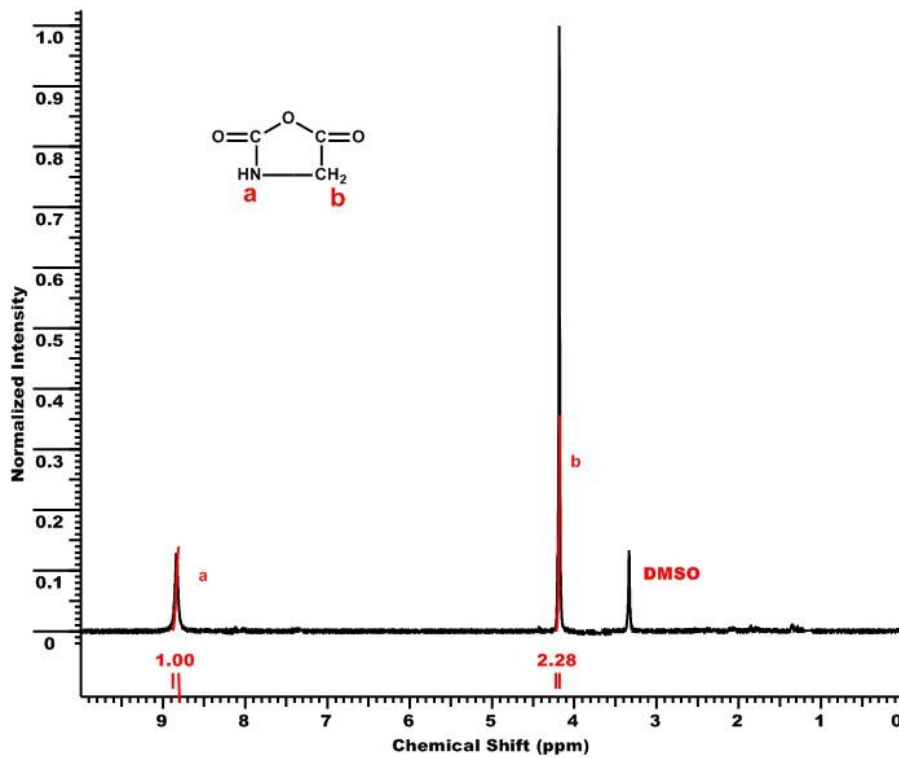
Την επόμενη μέρα παρατηρώ ότι έχει καταπέσει ο NCA. Φιλτράρω στον απαγωγό το περιεχόμενο της φιάλης και κρατάω το στερεό. Παρατηρώ ένα άσπρο-μπεζ χρώμα.

Ακολουθεί και 2^η ανακρυστάλλωση στην οποία παρατηρώ ξανά ότι δεν έφυγε τελείως το χλωρίδιο μέσω IR. Θα κάνω και τρίτη ανακρυστάλλωση με ακετονιτρίλιο και διαιθυλεθέρα. Αφού πάρω 100 ml ακετονιτρίλιου παρατηρώ πάλι ίζημα και από πάνω κίτρινο διάλυμα. Φιλτράρω και βλέπω πως ήταν το χλωρίδιο μέσω IR. Έπειτα αποστάζω και διαιθυλεθέρα. Κατά την απόσταξη διαιθυλαιθέρα παρατηρώ πως ο NCA είναι πλήρως διαλυτός. Αφήνω μία ώρα στο ψυγείο και μετά διώχνω τους διαλύτες αφήνοντας λίγο ακετονιτρίλιο στο τέλος και βάζοντας τη φιάλη στους -20°C κάνοντας ανακρυστάλλωση με θερμοκρασία (Εικόνα 13). Παρατηρώ ότι έχει πέσει ο NCA. Αποχύνω το περιεχόμενο της φιάλης και το στερεό μου είναι καθαρός NCA. Το ανεβάζω στη γραμμή για ξήρανση $m_{\text{NCA}}=0.6$ g. Τέλος μετά από ξήρανση στη γραμμή ζυγίζω 0,565 g NCA γλυκίνης στο Glove-box.



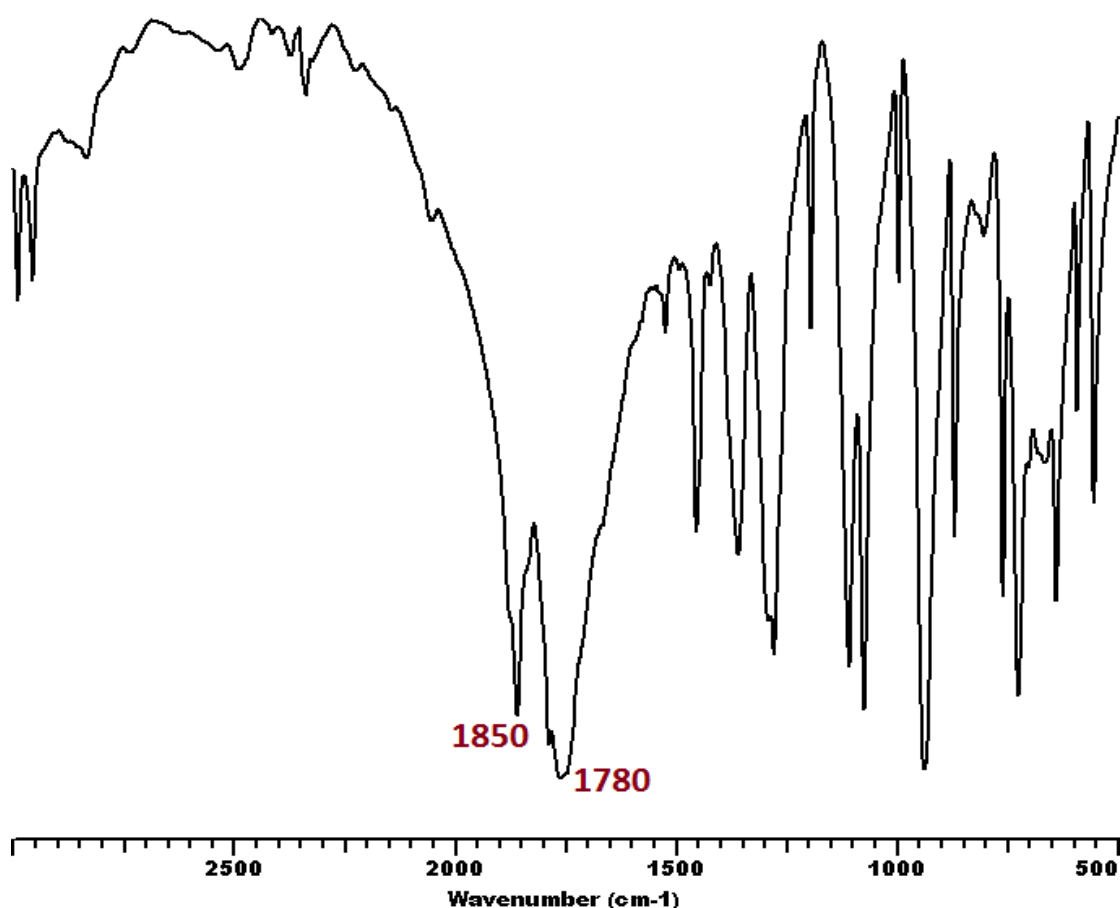
Εικόνα 13: NCA μετά από ανακρυσταλλώσεις

Στην συνέχεια παραδίδεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του NCA της L-γλυκίνης (Εικόνα 14):



Εικόνα 14: Φάσμα NMR L-glycine NCA.

Παρατηρούμε ότι το H του αζώτου απεντοπίζεται πολύ περισσότερο λόγω ηλεκτραρνητικότητας και εμφανίζεται στα 9 περίπου ppm σε αντίθεση με τα 2 υδρογόνα (-CH₂) που εμφανίζονται στα 4,2 περίπου ppm. Στα 3,3 ppm εμφανίζεται ο διαλύτης. Ο διαλύτης ήταν DMSO.



Εικόνα 15:Φάσμα IR NCA-γλυκίνης.

Η επιτυχής σύνθεση του NCA επιβεβαιώνεται από το φάσμα του IR (Εικόνα 15) όπου βλέπουμε τις εξής χαρακτηριστικές κορυφές: A: Δονήσεις έκτασης – C=O κοντά στο O στα 1883 cm⁻¹ B: Δονήσεις έκτασης –C=O κοντά στο N στα 1784 cm⁻¹. Επίσης, στα 1180-1360 cm⁻¹ έχουμε την ύπαρξη δεσμού C-N.

3.7 Σύνθεση poly(m-PEO)-*b*-[poly(L-His)-*co*-poly(GLY)] με 10% PGly

Αρχικά μέσω υαλουργίας φτιάχνουμε την συσκευή πολυμερισμού (Εικόνα 17) που θα χρειαστούμε για την σύνθεση των πολυμερών. Πρώτα φτιάχνουμε την αμπούλα πολυμερισμού (Εικόνα 16) και στην συνέχεια την κολλάμε στην υπόλοιπη συσκευή.

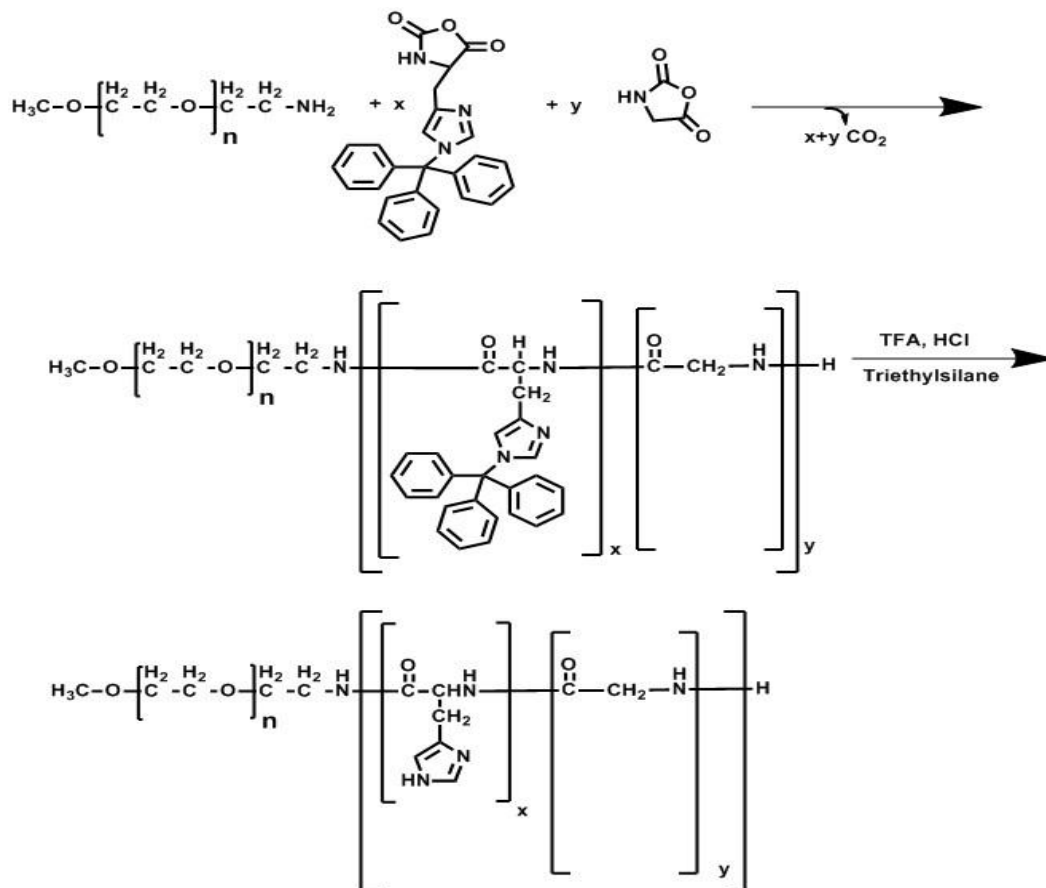


Εικόνα 16: Αμπούλα πολυμερισμού.



Εικόνα 17: Συσκευή πολυμερισμού.

Η πορεία αντίδρασης πολυμερισμού $\text{poly}(m\text{-PEO})\text{-}b\text{-}[\text{poly}(\text{L-His})\text{-co-poly}(\text{Gly})]$ είναι η εξής (Σχήμα 39):



Σχήμα 39: Πορεία αντίδρασης πολυμερισμού poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)]

Αφού φτιάξω την συσκευή πολυμερισμού ελέγχω για πιθανές τρύπες που μπορεί να έχει η συσκευή με τη βοήθεια πηνίου Tesla. Έπειτα κάνω 3 flame drying για να διώξω την υγρασία. Στη συνέχεια ζυγίζω 0,2 g methoxy polyethylene glycol amine (PEO-NH₂) που είναι ο μακροαπαρχητής μου. Ζύγισα 0,2004 gr PEO-NH₂. Πριν βάλω την ποσότητα που ζύγισα στη συσκευή πολυμερισμού είσαγω αργό. Αφού προσθέσω τον απαρχητή ανεβάζω τη συσκευή στη γραμμή κενού για ξήρανση μία νύχτα.

Την επόμενη μέρα φτιάχνω αζεοτροπικό μείγμα βενζολίου. Στη φιάλη πολυμερισμού που έχω τον απαρχητή αποστάζω βενζόλιο (Εικόνα 18). Το βενζόλιο σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με την υγρασία και την απομακρύνει αφήνοντας καθαρό τον απαρχητή. Με την προσθήκη του βενζολίου το διάλυμα που προκύπτει είναι τελείως διαυγές. Το αφήνω για μία ώρα υπό ανάδευση. Έπειτα ξανανεβαίνω στη γραμμή και διώχνω με προσοχή το βενζόλιο.



Εικόνα 18:Απόσταξη βενζολίου

Υπολογισμοί για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly:

Θέλω το μοριακό βάρος της πρώτης συστάδας να είναι 10.000 ενώ το μοριακό βάρος της δεύτερης συστάδας να είναι 6.000. Υπολογίζω με βάση τις δομικές μονάδες:

$$\text{Δομ.μονάδες αποπρ.Ιστιδίνης} = \frac{\text{ΜΒσυσταδας(His-co-gly)}}{\text{ΜΒ μονομερ.μονάδας}} \Rightarrow$$

$$\text{ΜΒμονομ.μονάδας} = \frac{\text{ΜΒσυσταδας(His-co-gly)}}{\text{Δομικές μονάδες αποπρ.Ιστιδίνης}} = \frac{6.000}{136} = 44,117$$

$$\text{ΜΒιστιδ} = 423(\text{συνολικο}) - 243(\text{προσασια Ιστιδίνης}) - 44(\text{CO}_2) = 136$$

Για πολυμερισμένη Ιστιδίνη με προστασία έχω:

$$\text{Δομ.μοναδ.προστατευμενου} = \frac{\text{MB συστάδας}}{\text{MB μονομ.μονάδας}}, \text{άρα}$$

$$\text{MB συστάδας} = \text{δομ.μον.προστατευμένης} * \text{MB μονομ.μονάδας} = 379 * 44,117 = 16.720,58$$

$$\text{Βρίσκω τα mol του απαρχητή: } n = \frac{m}{Mr} = \frac{0,2}{10.000} = 0,00002 \text{ mol απαρχητή}$$

$$\text{MB} = \frac{\text{gr μονομερούς}}{\text{mol απαρχητή}} \Rightarrow \text{gr μονομερούς} = 0,00002 * 16.720 = 0,3344 \text{ gr Ιστιδίνης}$$

$$\frac{379}{423} * X = 0,3344 \Rightarrow X = 0,3732 \text{ gr NCA Ιστιδίνης}$$

Για 10% γλυκίνη ως προς Ιστιδίνη έχω:

$$\text{mol Ιστιδίνης} = \frac{0,3732}{423} = 0,00088 \text{ mol Ιστιδίνης (αν όλη η συστάδα ήταν Ιστιδίνη)}$$

Στα 100 → 10

$$0,00088 \rightarrow X \quad \text{Άρα } x = 0,000088 \text{ mol γλυκίνης}$$

$$\text{Άρα mol Ιστιδίνης} = 0,00088 - 0,000088 = 0,000792 \text{ mol Ιστιδίνης}$$

$$\text{gr Ιστιδίνης} = 0,000792 * 423 = 0,335016$$

$$\text{gr Γλυκίνης} = 0,000088 * 101,61 (\text{MB NCA glycine}) = 0,009 \text{ gr}$$

Στη φιάλη που περιέχει m PEO –NH₂ κάνω απόσταξη DMF για να διαλύσω το στερεό. Παίρνω περίπου 20 ml ξεπαγώνω και προσαρμόζω ειδικό εσμύρισμα και ανεβάζω στη γραμμή για 3 flame drying (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Τελική συσκευή πολυμερισμού.

Αφού γίνει αυτό ζυγίζω στο glove-box 0,3350 gr Ιστιδίνης και 0,009 gr NCA γλυκίνης. Έπειτα ανεβάζω την συσκευή στη γραμμή και αποστάζω ξανά DMF στα μονομερή. Κόβω το 10άρι heavy γυαλί με την βοήθεια υαλουργίας και ξεπαγώνω το DMF. Αφού γίνει αυτό σπάω το brake-sill που χωρίζει τον

απαρχητή μου από τα μονομερή και ξεκινάει ο πολυμερισμός. Αφήνω το διάλυμα υπό ανάδευση. Ο πολυμερισμός διαρκεί 6 μέρες (Εικόνα 20). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανοίγω την στρόφιγγα για να διώχνω το CO₂.



Εικόνα 20: Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.

Μετά το πέρας των 6 ημερών κατεβάζω την συσκευή του πολυμερισμού και αποχύνω το περιεχόμενο της φιάλης σε ένα ποτήρι ζέσης των 1000 ml. Αφήνω το ποτήρι για 20 λεπτά στους -20 °C. Μετά τα 20 λεπτά παρατηρώ ότι έχει καταπέσει το πολυμερές και στο πάνω μέρος είναι διαλυτό το DMF με τον διαιθυλαιθέρα. Ακολουθεί φιλτράρισμα από χωνί Buchner και παίρνω το στερεό πολυμερές. Το συλλέγω σε μία φιάλη των 50 ml αφού την προζυγίσω, $m_{\text{προζ.φιαλ}}=64,6152$. Έπειτα ανεβάζω τη φιάλη για ξήρανση στη γραμμή κενού (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Πολυμερές μετά από διήθηση σε χωνί Buchner.

Ζυγίζω μετά από μία μέρα ξήρασης και βλέπω $m_{\text{πολ.10\%}}=0,4744 \text{ gr}$.

3.8 Αντίδραση αποπροστασίας της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας της Ιστιδίνης

Στην φιάλη με το πολυμερές προσθέτω 10 ml διχλωρομεθάνιο. Περιμένω να διαλυθεί. Παρατηρώ κίτρινο χρώμα στο διάλυμα. Έπειτα προσθέτω 10 ml TFA που κόβει την τρίτυλο προστατευτική ομάδα της Ιστιδίνης. Αφήνω υπό ανάδευση για μία ώρα. Παρατηρώ πιο έντονο κίτρινο χρώμα στο διάλυμα που οφείλεται στις ομάδες βενζολίου που πλέον απορροφούν στο UV και για αυτό φαίνεται αυτό το έντονο χρώμα. Πριν οι ομάδες του βενζολίου ήταν κολλημένες πάνω στην Ιστιδίνη και για αυτό δεν παρατηρούσαμε αυτό το φαινόμενο. Μετά από μία ώρα προσθέτω σταγόνες τριαιθυλοσιλάνιο μέχρι να αποχρωματιστεί ξανά το διάλυμα.

Επόμενο βήμα θα ήταν κανονικά η καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα και η διήθηση σε χωνί Buchner. Όμως επειδή δεν περνούσε ο διαιθυλαιθέρας από το χωνί ακολούθησε διαφορετική πορεία. Αποστάζουμε το διχλωρομεθάνιο και το TFA στη γραμμή κανού. Οπότε πλέον στη φιάλη μου έχω το πολυμερές με την τρίτυλο και τα ελεύθερα πλέον βενζόλια. Προσθέτω 30 ml περίπου διαιθυλαιθέρα στον απαγωγό που δεσμεύει την τρίτυλο ομάδα και καθαρίζει έτσι το πολυμερές.

Προσθέτω στη φιάλη που περιέχει το πολυμερές και την τρίτυλο προστατευτική ομάδα της Ιστιδίνης 10 ml H₂O και ανακινώ την φιάλη μέχρι να

διαλυθεί το πολυμερές. Έπειτα αφήνω για μισή ώρα περίπου στο νερό μία μεμβράνη dialysis (Εικόνα 22) 3.500 (ό,τι σωματίδιο είναι μεγαλύτερο από 3.500 δεν περνάει). Την αφήνω να φουσκώσει. Μετά από μισή ώρα μεταφέρω το περιεχόμενο της φιάλης μέσα στη μεμβράνη. Το όλο σύστημα το μεταφέρω σε ποτήρι των 2000 ml, συμπληρώνω το ποτήρι με νερό έτσι ώστε το πολυμερές να είναι βυθισμένο στο νερό και προσθέτω 4 σταγόνες HCl. Το HCl θα αντικαταστήσει το TFA που έχει κολλήσει στην ιστιδίνη. Θα ακολουθήσουν 6 αλλαγές νερού εκ των οποίων οι 2 θα είναι με HCl ,οι άλλες 2 με NaOH και οι άλλες 2 με H₂O.



Εικόνα 22:Μεμβράνη dialysis

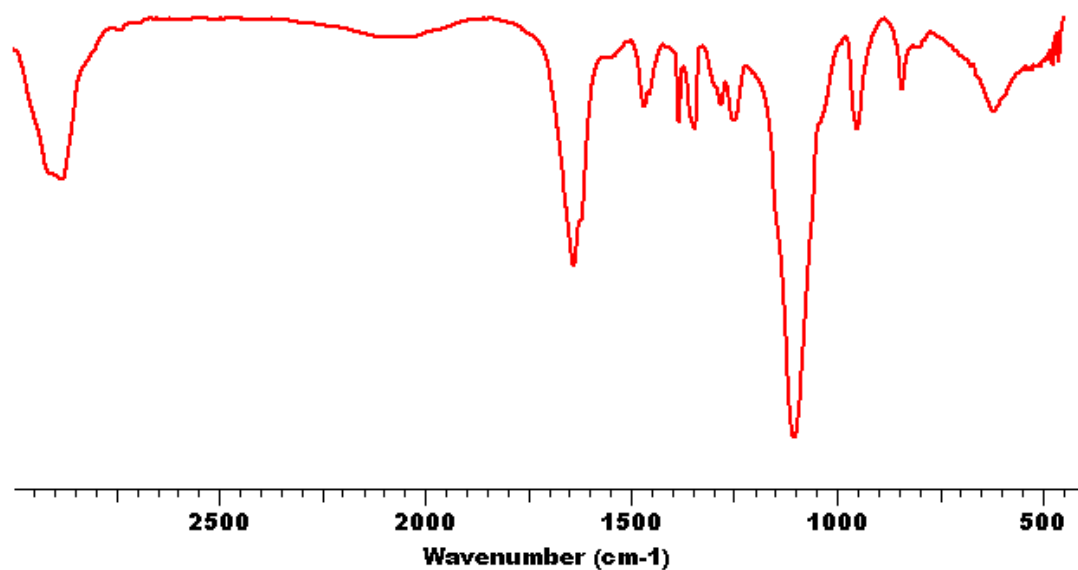
Αλλάζοντας το νερό παρατηρώ ότι το πολυμερές είναι διαλυτό που οφείλεται στο ότι η ιστιδίνη σε χαμηλό pH είναι διαλυτή. Άλλαξα 2 φορές με νερό γιατί το pH ήταν στο 7. Μετά το πέρας των 6 ημερών μεταφέρω το πολυμερές σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml για freeze-drying ή αλλιώς λυοφιλοποίηση μία

διαδικασία η οποία ευνοεί την εξάχνωση του νερού (Εικόνα 23). Μετά από μία μέρα παρατηρώ πως το περισσότερο νερό έχει απομακρυνθεί και το υπόλοιπο το διώχνω στη γραμμή κενού.



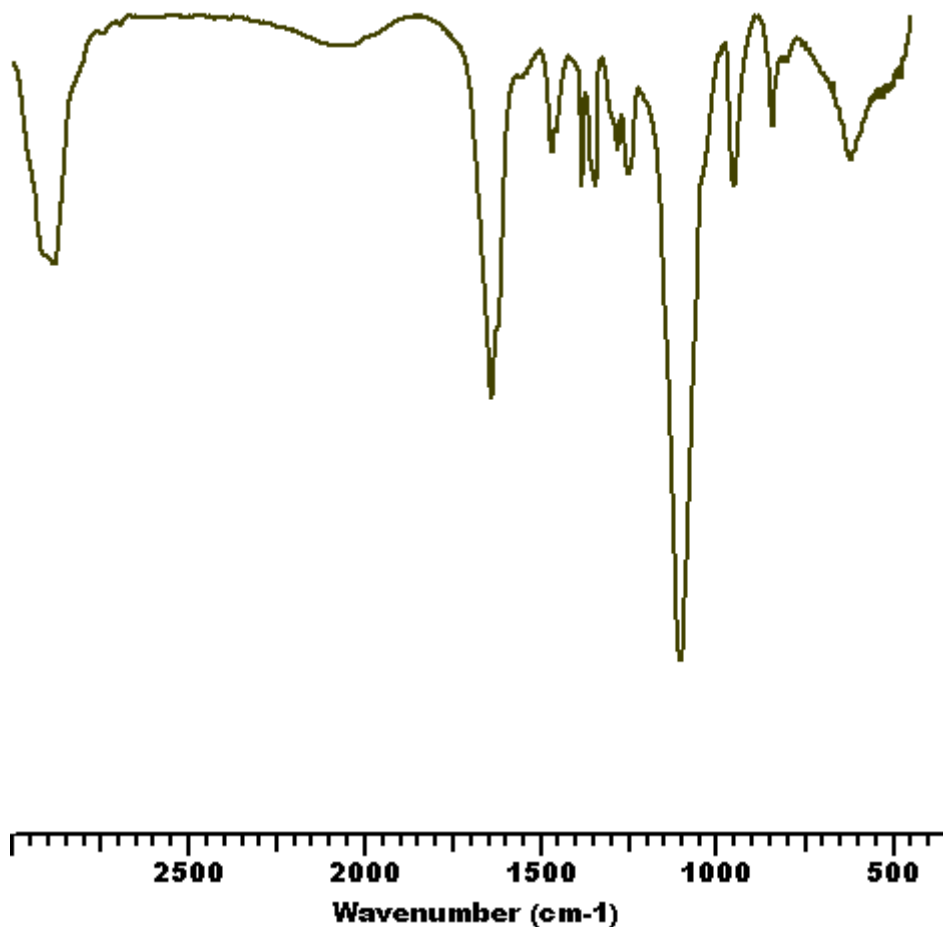
Εικόνα 23:Συσκευή για freeze-drying

Στη φιάλη με το στερεό που περιέχει το πολυμερές με την τρίτυλο ομάδα θα προσθέσω 30 ml διαιθυλαιθέρα που θα δεσμεύσει την τρίτυλο και θα καθαρίσει το πολυμερές. Έπειτα φιλτράρω από χωνί Buchner και ζυγίζω $m=0,1430$ g πολυμερούς. Η διαδικασία είναι η ίδια ακριβώς και για την σύνθεση των άλλων 2 πολυμερών με 20 % γλυκίνη ως προς ιστιδίνη και 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.



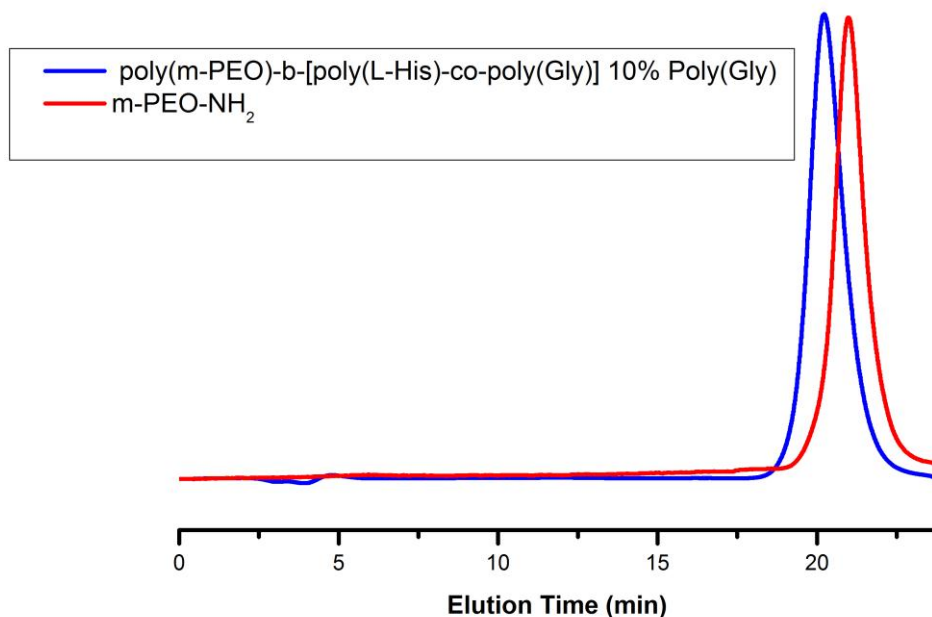
Εικόνα 24: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly μετά το πολυμερισμό.

Στο φάσμα του IR (Εικόνα 24) του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1650 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν μειωθεί πάρα πολύ κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα 700 cm^{-1} και 750 cm^{-1} .



Εικόνα 25: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly μετά την αποπροστασία.

Στο φάσμα IR του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία (Εικόνα 25) παρατηρούμε μια κορυφή στα 1650 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασίας στα 700 cm^{-1} και 750 cm^{-1} , σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε επιτυχώς. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα 1104 cm^{-1} που ανήκει στην τάση -C-O- του PEO και άλλη μία στα 2886 cm^{-1} που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly.

Στο χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 26) σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (μπλε). Η κατανομή βρέθηκε **1,16**. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 10% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

3.9 Σύνθεση του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly

Υπολογισμοί για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly:

Στα 100→20

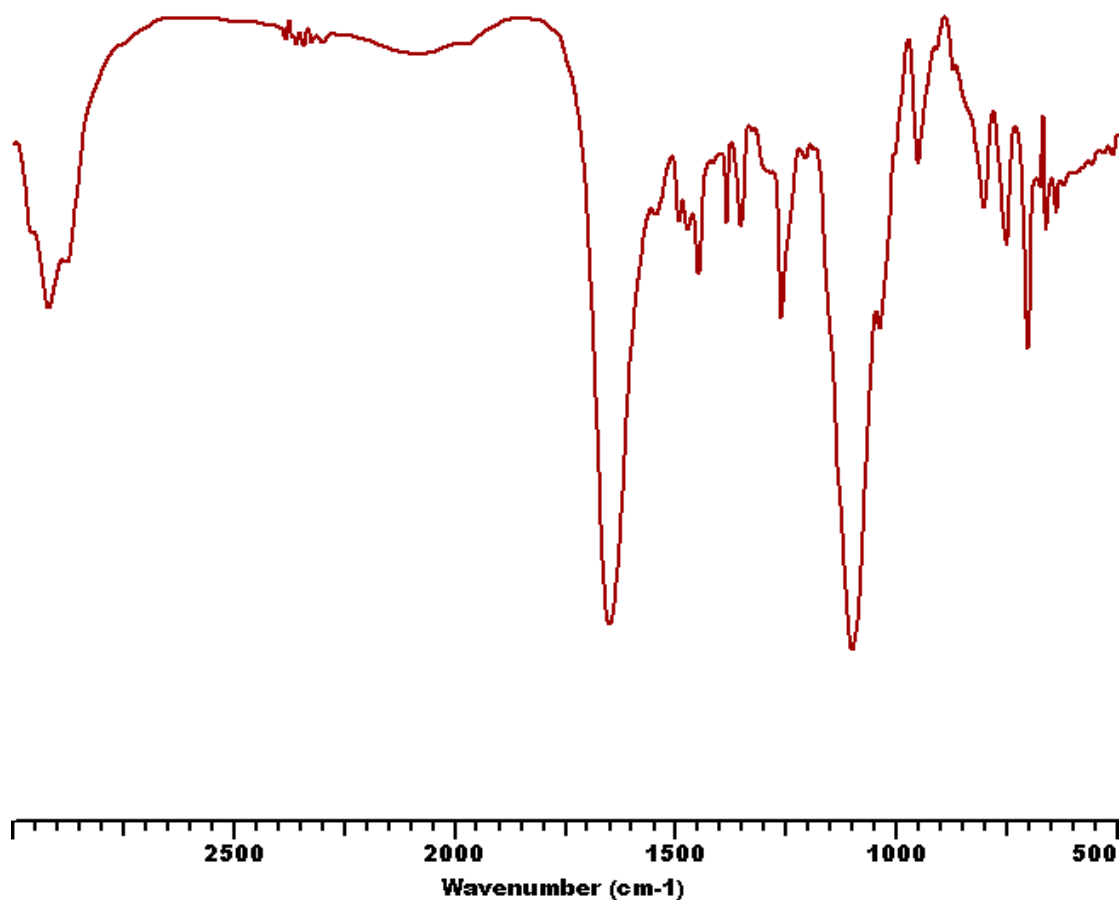
0,00088→X $X=20 \cdot 0,00088 / 100 = 0,000176$ mol γλυκίνης

Άρα mol ιστιδίνης = $0,00088 - 0,000176 = 0,000704$ mol ιστιδίνης

gr ιστιδίνης = $0,000704 \cdot 423 = 0,297792$ gr ιστιδίνης

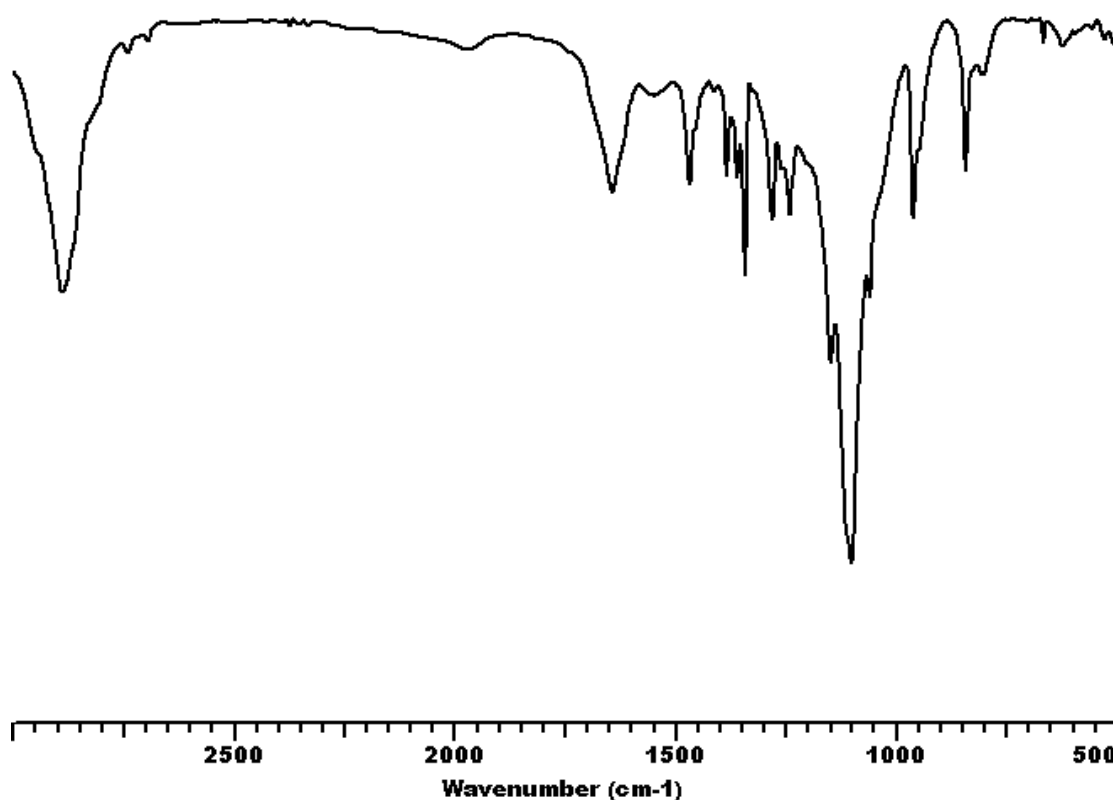
gr γλυκίνης = $0,000176 \cdot 101,61 = 0,01788$ gr γλυκίνης

Ζύγισα **0,21 gr** poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly.



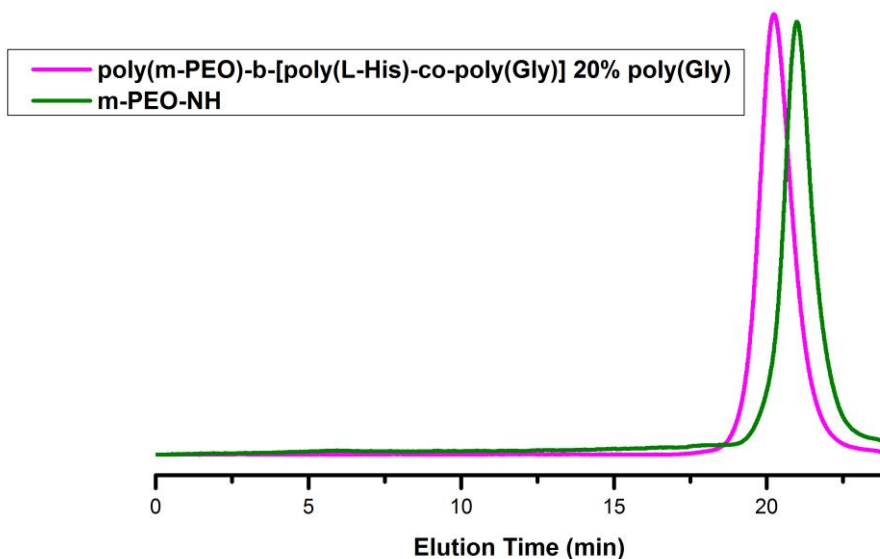
Εικόνα 27: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly μετά το πολυμερισμό.

Στο φάσμα του IR (Εικόνα 27) του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1647 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν σχεδόν εξαφανιστεί κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα 700 cm^{-1} και 750 cm^{-1} .



Εικόνα 28: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly μετά την αποπροστασία.

Στο φάσμα IR (Εικόνα 28) του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1655 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασίας στα 700 cm^{-1} και 750 cm^{-1} , σε αντίθεση με το IR μετά τον πολυμερισμό, οπότε η αποπροστασία έγινε επιτυχώς. Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα 1109 cm^{-1} που ανήκει στην τάση -C-O- του PEO και άλλη μία στα 2881 cm^{-1} που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly.

Στο χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 29) σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (μωβ). Η κατανομή βρέθηκε **1,15**. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 20% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

3.10 Σύνθεση του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly

Υπολογισμοί για το poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly:

Στα 100→40

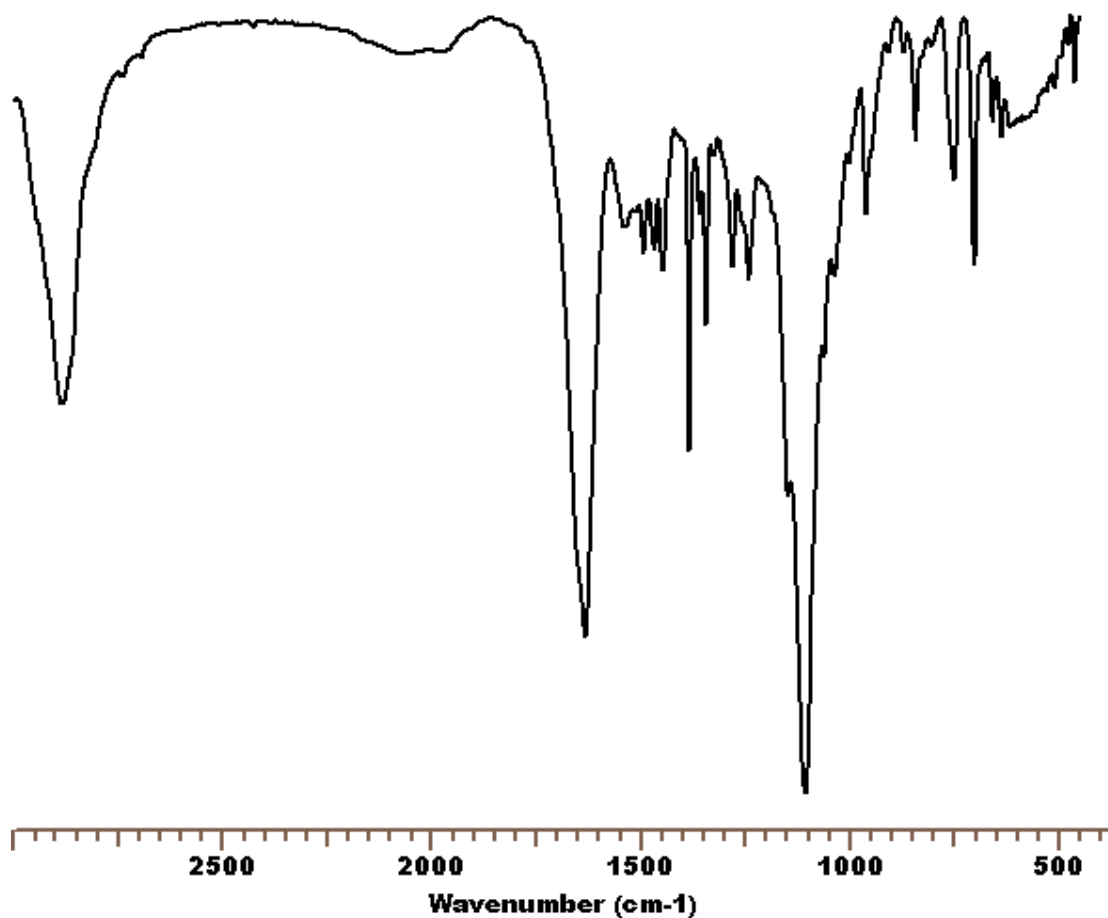
0,00088→X X=40*0,00088/100=0,000352 mol γλυκίνης

Άρα mol ιστιδίνης=0,00088-0,000352=0,000528 mol ιστιδίνης

gr ιστιδίνης=0,000528*423=0,223344 gr ιστιδίνης

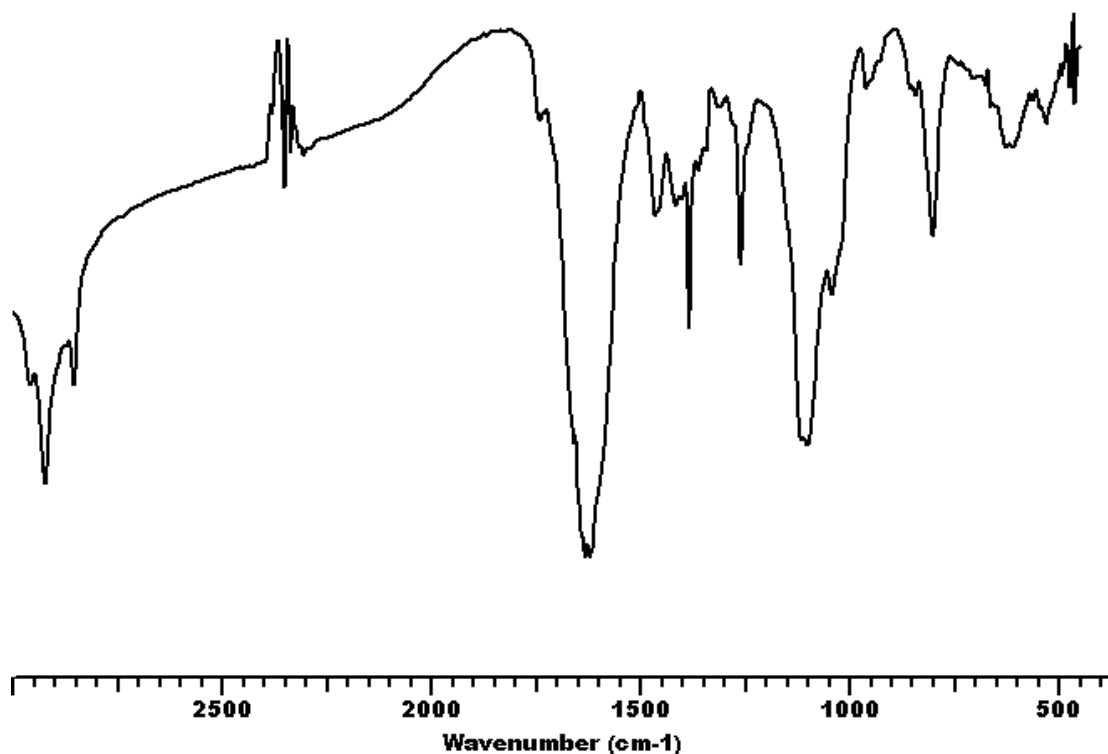
gr γλυκίνης =0,000352*101,61=0,0357 gr γλυκίνης

Ζύγισα **0,207 gr** poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly.



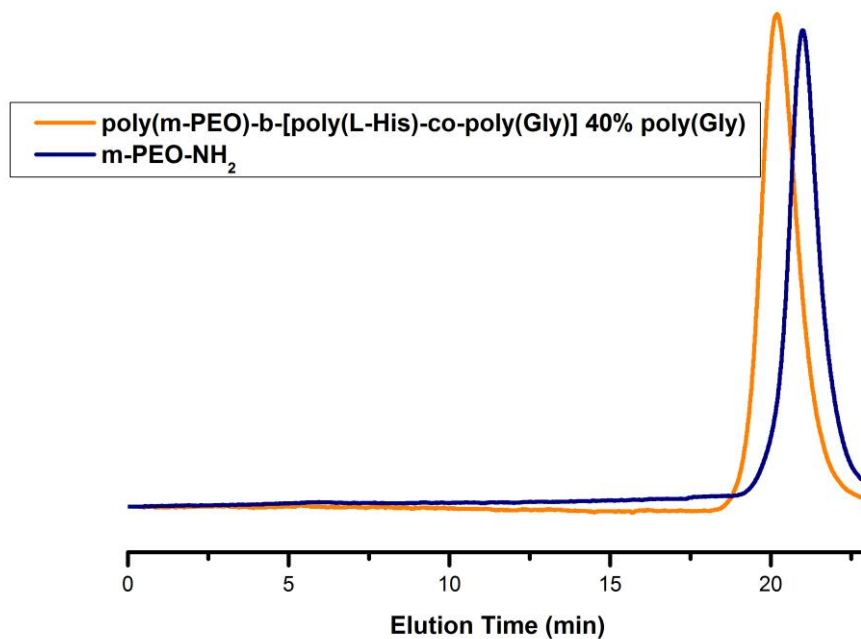
Εικόνα 30: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly μετά το πολυμερισμό.

Στο φάσμα του IR (Εικόνα 30) του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1655 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν σχεδόν εξαφανιστεί κάτι που υποδηλώνει ότι το μονομερές καταναλώθηκε. Υπάρχουν κανονικά οι κορυφές της τρίτυλο προστασίας στα 705 cm^{-1} και 746 cm^{-1} .



Εικόνα 31: Φάσμα IR του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly μετά την αποπροστασία.

Στο φάσμα IR (Εικόνα 31) του πολυμερούς μετά τον πολυμερισμό και την αποπροστασία παρατηρούμε μια κορυφή στα 1657 cm^{-1} που φανερώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού. Οι κορυφές στα 1850 cm^{-1} και στα 1780 cm^{-1} έχουν εξαφανιστεί τελείως κάτι που υποδηλώνει ότι ο καθαρισμός του πολυμερούς ήταν επιτυχής καθώς τα μικρού μοριακού βάρους μονομερή βγήκαν από την μεμβράνη. Δεν υπάρχουν οι κορυφές από την τρίτυλο προστασία στα 700 cm^{-1} και 750 cm^{-1} . Επίσης υπάρχει μια κορυφή στα 1109 cm^{-1} που ανήκει στην τάση -C-O- του PEO και άλλη μία στα 2888 cm^{-1} που ανήκει σε τάση δεσμού C-H.



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα GPC σε νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly.

Στο χρωματογράφημα GPC (Εικόνα 32) σε διαλύτη νερό του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly παρατηρούμε μια ομοιόμορφη καμπύλη με συμμετρική και στενή κατανομή (κίτρινη). Η κατανομή βρέθηκε **1,12**. Στο Χρωματογράφημα φαίνεται και η καμπύλη του μακροαπαρχητή που έχει 10000 μοριακό βάρος. Η καμπύλη του συμπολυμερούς 40% εμφανίζεται νωρίτερα, κάτι αναμενόμενο αφού έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης

Αφού επαληθεύεται η σύνθεση των πολυμερών με τα φάσματα IR, GPC και NMR στη συνέχεια, με τη τεχνική της δυναμικής σκέδασης μελετείται η αυτοοργάνωση τους και το μέγεθος τους. Για τα τρία πολυμερή γίνονται μετρήσεις σε pH= 7.4 (pH του αίματος), σε pH= 6.5 (pH εξωτερικά ενός καρκινικού κυττάρου) και pH= 5 (pH καρκινικού κυττάρου).

Σε κάθε pH γίνονται μετρήσεις σε τρεις θερμοκρασίες: 25°C που είναι η θερμοκρασία δωματίου, στους 37°C που είναι η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και 41°C που είναι η θερμοκρασία της φλεγμονής που κάνουν τα καρκινικά κύτταρα ώστε να παρατηρηθεί πως αυτοοργανώνονται τα πολυμεροσώματα σε μία ανώτερη τιμή θερμοκρασίας.

Σε κάθε pH και θερμοκρασία μετρείται η διάμετρος των σωματιδίων σε τρεις γωνίες 45°, 90°, 135° για να δούμε πως σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια και πως τα μεγάλα καθώς και αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Για τις αραιώσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται τα ρυθμιστικά διαλύματα Buffer pH= 7.4, 6.5, 5.0.

Προετοιμασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για DLS

- Για το pH 7.4

Σε μια άδεια κωνική φιάλη προστίθενται 0.30285 gr από το tris Base και ύστερα προστίθενται 250 ml milliQ. Στη συνέχεια, προστίθενται 2.1955 NaCl συγκέντρωσης 150 mM. Προστίθεται άλας γιατί το άλας κάνει το pH πιο σταθερό. Το pH του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος είναι βασικό λόγω του tris που είναι αμίνη (pH=9.0) και έτσι με προσθήκη σταγόνων πυκνού HCl κατεβαίνει στο επιθυμητό pH=7.37 (για προσομοίωση του pH του ανθρώπινου αίματος).

- Για το pH 6.5

Σε μια άδεια κωνική φιάλη προστίθενται 0,3915 gr MES και 200 ml milliQ. Στη συνέχεια, προστίθενται 1,7542 gr NaCl συγκέντρωσης 150 mM. Το pH του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος είναι όξινο και ανεβαίνει με προσθήκη σταγόνων NaOH συγκέντρωσης 1 M.

1. Για το pH 5.0

Τα ίδια βήματα γίνονται όπως και για το pH= 6.5.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι και για τα τρία πολυμερή με Buffer pH=7.4 και 6.5 γίνεται φιλτράρισμα ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης για να δίνει καλό σήμα ενώ για τα πολυμερή με Buffer pH=5 δε γίνεται φιλτράρισμα γιατί το πολυμερές θα μένει πάνω στο φίλτρο. Τα Buffer και στα τρία pH φιλτράρονται για να ελαχιστοποιηθεί η σκόνη.

Παρακάτω απεικονίζονται σε πίνακες τα αποτελέσματα του DLS για τα τρία πολυμερή σε pH=7.4, 6.5, 5.0 και T=25 °C, 37 °C, 41 °C, όπου, intensity είναι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, pdi είναι η πολυδιασπορά του συστήματος η οποία προέρχεται από τον τύπο μ^2/Γ^2 , Contin rh είναι η υδροδυναμική διάμετρος η οποία υπολογίζεται με τη χρήση του αλγόριθμου contin, wr% υποδηλώνει το ποσοστό του πληθυσμού.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 10% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

	pH	T	ANGLE	INT	pdi	Rh
			45°	853.51465	0.421	127
10% Gly	7.4	25°C	90°	812.29694	0.358	117.1
			135°	702.33813	0.387	1)26.3 2)112.5
			45°	657.53461	0.372	119.8
		37°C	90°	750.07635	0.328	108.6
			135°	694.91443	0.374	92.93
			45°	667.46997	0.409	140.2
	6.5	25°C	90°	721.49799	0.338	110.3
			135°	686.12006	0.376	96.16
			45°	704.88745	0.24	135.5
		37°C	90°	224.39009	0.252	112.4
			135°	203.05972	0.259	99.46
			45°	651.66333	0.213	122.8
			90°	208.98126	0.222	96.71

		41 °C	135°	195.45886	0.263	97.91
			45°	606.59857	0.232	132.0
			90°	211.90002	0.234	106.0
		135°	194.72881	0.265	96.44	
	5	25°C	45°	383.32672	0.345	113.9
			90°	425.66608	0.362	96.89
			135°	439.52194	0.423	109.6
		37°C	45°	375.84848	0.373	121.8
			90°	460.95197	0.358	100.9
			135°	452.37918	0.385	83.99
		41 °C	45°	368.03156	0.347	119.5
			90°	461.21533	0.365	96.97
			135°	461.02042	0.381	86.89

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 20% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

	pH	T	ANGLE	INT	pdi	Rh
20% Gly	7.4	25°C	45°	439.09015	0.213	150.9
			90°	873.15363	0.24	113.1
			135°	788.00964	0.301	99.69
		37°C	45°	472.43912	0.248	142.8
			90°	1043.58887	0.235	114.3
			135°	910.31964	0.269	95.46
		41 °C	45°	534.77466	0.246	143.9
			90°	375.23636	0.227	107.3
			135°	1007.29596	0.255	95.78
	6.5	25°C	45°	410.17670	0.205	181.7
			90°	732.43829	0.21	128.1
			135°	566.03308	0.268	120.8
		37°C	45°	583.85168	0.43	317.6
			90°	657.47400	0.416	183.7

5	41 °C	135°	522.90692	0.446	198.5	
		45°	621.20074	0.408	256.5	
			90°	665.11682	0.408	159.4
			135°	544.40973	0.455	150.0
	25°C	45°	416.16727	0.333	294.7	
		90°	432.56677	0.44	222.7	
		135°	345.43604	0.459	229.8	
	37°C	45°	449.65817	0.412	1)90.43 2)397.3	
		90°	427.82938	0.407	215.3	
		135°	358.82828	0.476	193.4	
	41 °C	45°	513.31024	0.442	270.6	
		90°	457.18265	0.442	206.3	
		135°	367.78287	0.479	185.4	

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων DLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

	pH	T	ANGL E	INT	pdi	Rh
40% Gly	7.4	25°C	45°	866.82629	0.427	434.0
			90°	907.75836	0.293	1)120.6 2)598.5
			135°	790.36835	0.311	1)114.1 2)773.5
		37°C	45°	421.6748	0.309	186.0
			90°	807.70306	0.295	103.7
			135°	566.6879	0.304	88.92
		41 °C	45°	445.43237	0.32	1)32.64 2)172.6

			90°	883.07916	0.288	99.64
			135°	842.21216	0.29	89.54
			45°	644.82202	0.469	1)39.11 2)323.8
	6.5	25°C	90°	827.42517	0.452	144.0
			135°	685.68121	0.467	162.4
			45°	688.12329	0.436	1)198.1 2)157.6
		37°C	90°	883.41122 9	0.476	156.8
			135°	766.78497	0.436	119
			45°	691.93042	0.396	1)144.4 2)664.7
		41°C	90°	880.00885	0.429	130.9
			135°	767.95050	0.431	114.5
			45°	596.58423	0.435	54.27
	5	25°C	90°	567.13727	0.505	1)80.01 2)673.9
			135°	488.90198	0.497	213.1
			45°	646.62695	0.357	350.3
		37°C	90°	542.32007	0.49	228.9
			135°	518.49969	0.495	183.7
			45°	705.58307	0.347	335.9
41°C		90°	600.45911	0.483	224.5	
		135°	537.75116	0.489	234.3	
		45°				

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα του DLS για τα τρία πολυμερή προκύπτουν το εξής συμπέρασμα:

1. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη διαφορά και στα τρία πολυμερή.
2. Όσο μειώνεται το pH η υδροδυναμική ακτίνα (Rh) αυξάνεται και αυτό συμβαίνει γιατί φορτίζονται οι αλυσίδες με αποτέλεσμα τα συσσωματώματα να φουσκώνουν επειδή θέλουν να είναι πιο υδατοδιαλυτά. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο έντονο στο πολυμερές με 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

4.2 Μελέτη των πολυμερών με την τεχνική της Στατικής Σκέδασης

Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται με το ίδιο όργανο του DLS σε γωνιακό εύρος 30°-150° λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του φαινόμενου μοριακού βάρους και του γυροσκοπικού λόγου γίνεται με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2ης τάξης η οποία είναι μια πολυωνυμική εξίσωση από την οποία βρίσκουμε το R_g/R_h . Πραγματοποιούνται μετρήσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς οι οποίες προκύπτουν με αραίωση ενός αρχικού διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης. Όλα τα διαλύματα διηθούνται με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45 μm πριν τη μέτρηση. Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη δομή των πολυμερών.

Στο pH 7.4 και 6.5 γίνεται φιλτράρισμα ενώ για το pH 5 δε γίνεται φιλτράρισμα γιατί τα σωματίδια είναι πολύ μεγάλα και δε γίνεται με τις υπάρχουσες θεωρίες να γίνει σωστό fitting ώστε να βγεί συμπέρασμα. Τα μόρια δεν μπορούν να αυτοοργανωθούν γιατί μπαίνει διαλύτης μέσα στο σωματίδιο και έτσι χαλάει η δομή τους. Γι'αυτό και ο λόγος R_g/R_h είναι πολύ μικρός σύμφωνα με τις μετρήσεις που γίνονται με φιλτράρισμα. Με λίγα λόγια, δε βγαίνει συμπέρασμα για τη δομή τους.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 10% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

ρΗ	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
7.4	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	126,1	180,726	0.69
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	135.6	385.942	0.35
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	134.2	255.643	0.52
6.5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	142.6	288.432	0.494
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	129.8	390.752	0.332
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	154.4	221.827	0.696
5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	197.1	898.621	0.219
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	194.9	736.309	0.264
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	190.6	220.357	0.865

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 20% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

ρΗ	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
7.4	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	137,3	222,247	0,61778
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	139,5	203,499	0,6855
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	139,7	198,675	0,70315
6.5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	194,1	886,799	0,2188
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	189,1	315,249	0,5998
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	187,7	328,350	0,5716

5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	197,8	479,149	0,4128
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	194,6	707,672	0,2749
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	195,9	753,585	0,2599

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων SLS για το PEO-b-(His-co-Gly) με 40% γλυκίνη ως προς ιστιδίνη.

pH	T	Εξίσωση	Rg	Rh	Rg/Rh
7.4	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	152,6	191,135	0,7983
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	239,9	180,682	1,32
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	282,2	185,479	1,52
6.5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	184,5	347,752	0,53
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	180,9	763,155	0,23
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	179,6	516,150	0,348
5	25 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	221,7	743,747	0,2980
	37 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	211,1	655,107	0,3222
	41 °C	Guinier 2 ^{ης} τάξης	213,1	603,012	0,3533

Η αναλογία $\rho=Rg/Rh$ είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο εξαρτάται από τη μορφολογία των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων (χρήση στατικής σκέδασης-SLS). Η τιμή ρ κοντά στο 1 αποδίδεται σε μια γεωμετρία κυστιδίου

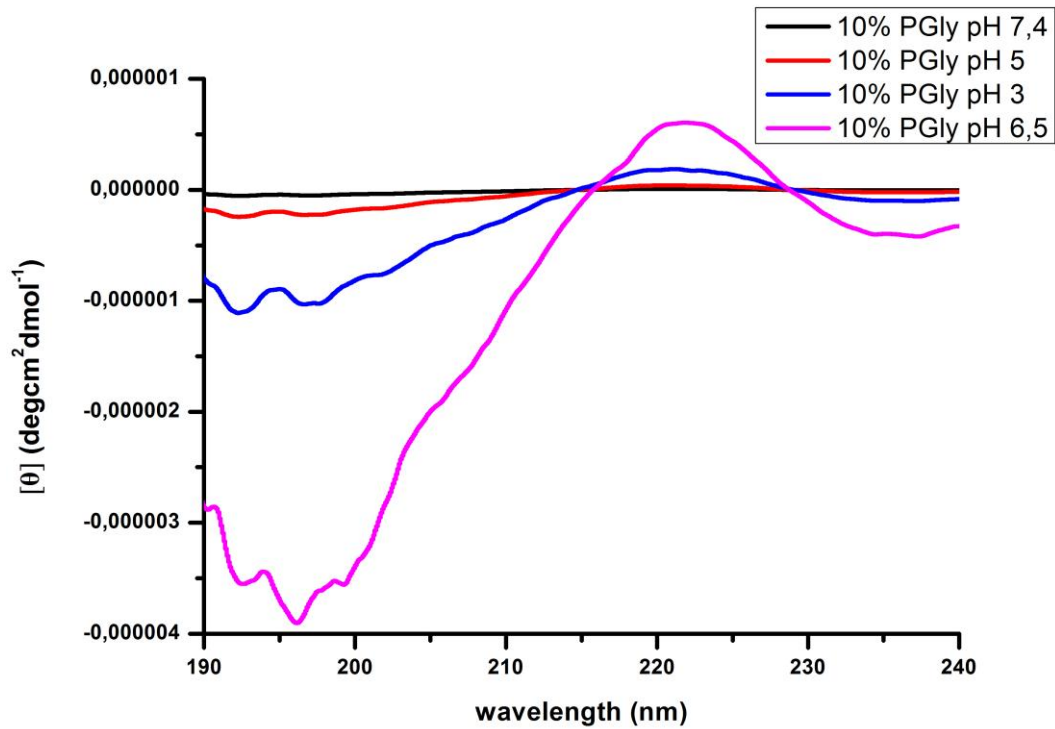
ενώ σε μικρότερες τιμές αποδίδεται σε σφαιρικά μικκύλια (θεωρητικά $\rho=0.775$). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη στατική σκέδαση και για τα τρία πολυμερή και συγκρίνοντας το λόγο R_g/R_h τα πολυμερή κατά κύριο λόγο σχηματίζουν μικκύλια.

4.3 Μελέτη των πολυμερών με Κυκλικό Διχρωισμό

Η μελέτη της δομής των πολυμερών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί ο τρόπος με τον οποίο αλλάζει η δομή του πολυμερούς σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του να αποκρίνεται στην μεταβολή του pH. Έτσι με την αλλαγή του pH αλλάζει και η αυτοοργάνωση του πολυμερούς, μια πολύ σημαντική ιδιότητα. Παράλληλα μελετήθηκε και η αλλαγή της δομής των πολυμερών στην αλλαγή της θερμοκρασίας.

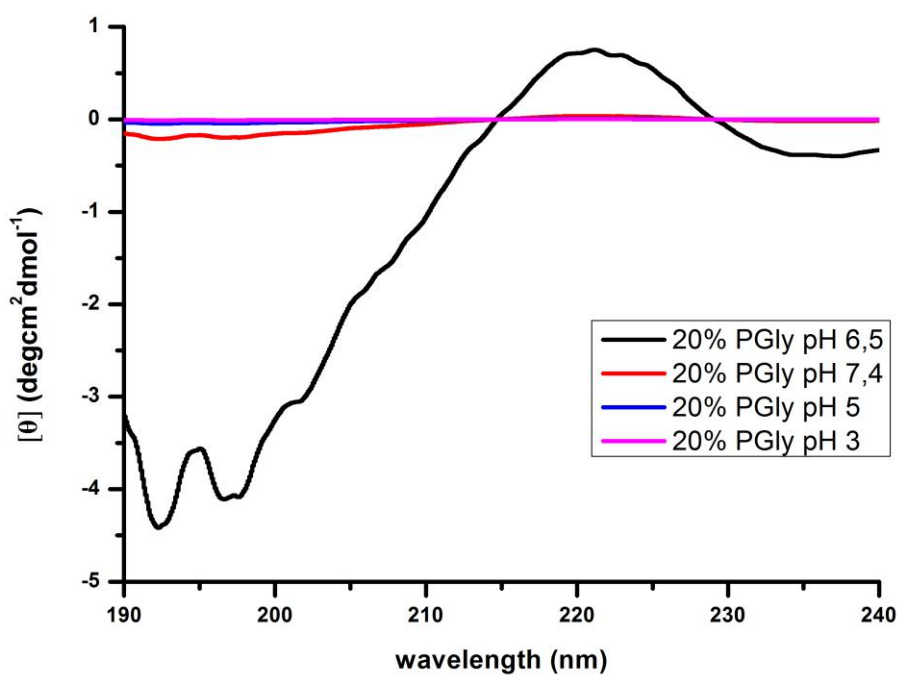
Για την λήψη του φάσματος χρησιμοποιούμε κυψελίδα διαστάσεων 0,1cm, όπου φέρεται υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενοξειδίου-b-(πολυ-L-ιστιδίνης-co-γλυκίνης) συγκέντρωσης 7x10⁻⁴g/ml η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 25°C, με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης και η παροχή του αζώτου στα 15 l/min. Πραγματοποιείται «σάρωση» του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260 – 185nm. Επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις από το μηχάνημα 10 φορές ώστε να έχουμε μείωση του θορύβου. Με μέτρηση με ψηφιακό πεχάμετρο προσδιορίζουμε την τιμή του pH, ενώ με την προσθήκη ποσότητας διαλύματος βάσης καυστικού νατρίου μεταβάλλουμε την τιμή του pH αυξάνοντας την και λαμβάνουμε το φάσμα για κάθε τιμή.

Παρακάτω δίνονται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού των τριών πολυμερών σε pH=7.4 ,6.5 ,5 και 3.



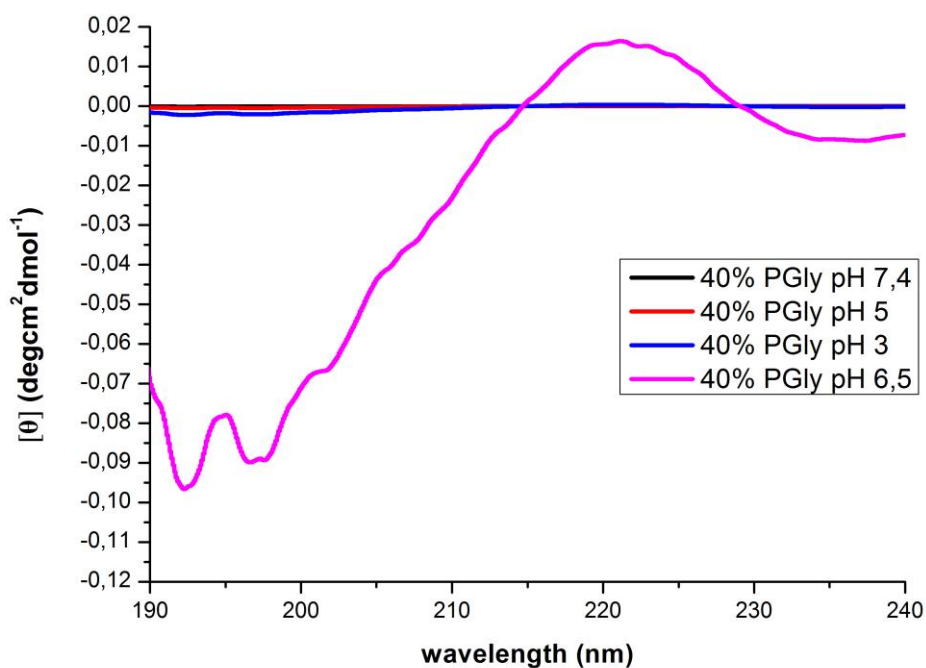
Εικόνα 33: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10% PGly σε τιμές pH 7,4 6,5 5 και 3

Σε pH 7.4 και 5 και 3 (Εικόνα 33) φαίνεται να έχουμε μηδενικό σήμα ενώ σε pH=6.5 και φαίνεται το πολυμερές να παίρνει μία συνδιαστική δομή τυχαίου σπειράματος και στροφής.



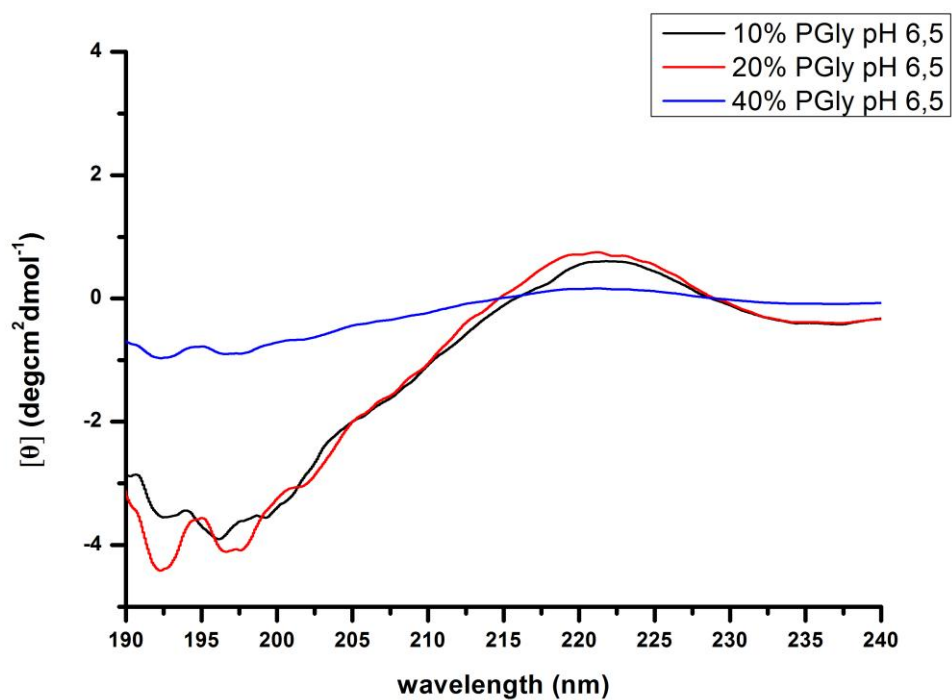
Εικόνα 34: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 20% PGly σε τιμές pH 7,4 6,5 5 και 3.

Στο συγκεκριμένο φάσμα (Εικόνα 34) παρατηρούμε ότι το πολυμερές με 20% γλυκίνη δεν εμφανίζει σήμα σε pH=7.4,5 και 3. Αντίθετα σε pH=6.5 φαίνεται το πολυμερές να παίρνει τη συνδιαστική δομή τυχαίου σπειράματος και στροφής.



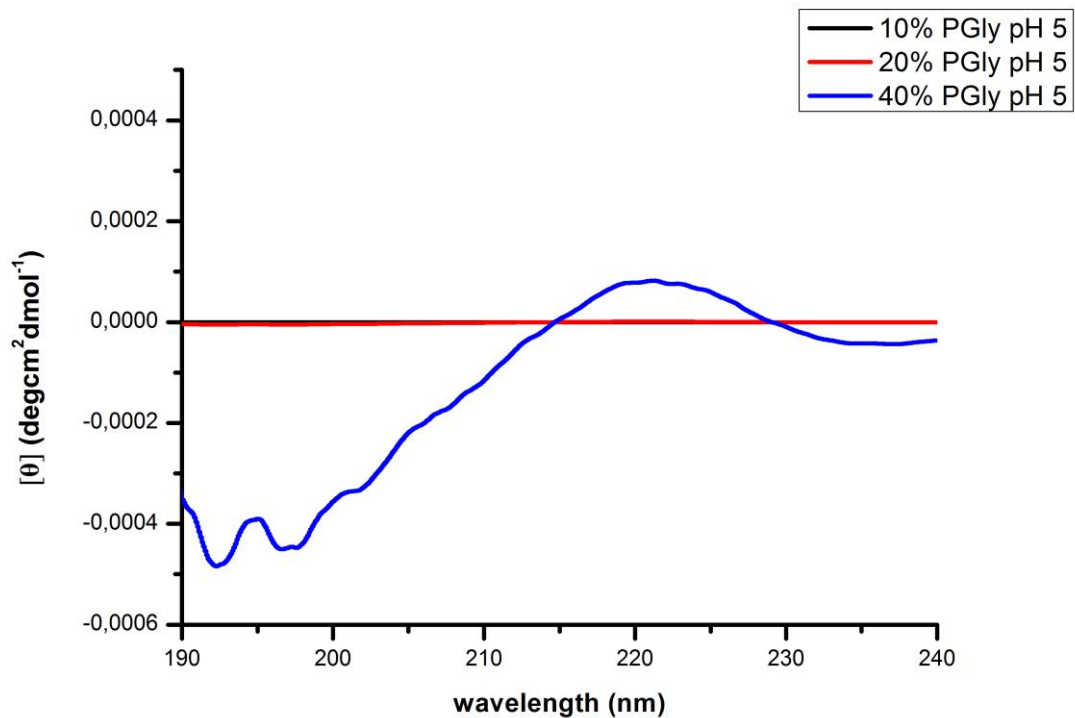
Εικόνα 35: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 40% PGly σε τιμές pH 7,4 6,50 5 και 3

Στο συγκεκριμένο φάσμα (Εικόνα 36) βλέπουμε πάλι ότι το πολυμερές εμφανίζει μηδενικό σήμα για pH=7.4,5 και 3 ενώ για pH=6.5 το πολυμερές παίρνει την συνδιαστική δομή τυχαίου σπειράματος και στροφής.



Εικόνα 36: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10%,20% και 40% PGly σε τιμές pH 6,50.

Σε pH=6.5 βλέπουμε (Εικόνα 37) ότι τα πολυμερή με 20% γλυκίνη και 40% γλυκίνη παίρνουν την συνδιαστική δομή τυχαίου σπειράματος και στροφής.



Εικόνα 37: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των poly(m-PEO)-b-[poly(L-His)-co-poly(Gly)] με 10%,20% και 40% P Gly σε τιμές pH 5

Στο συγκεκριμένο φάσμα (Εικόνα 38) βλέπουμε ότι σε pH 5 τα πολυμερή με 10% γλυκίνη και 20% γλυκίνη εμάνιζουν μηδενικό σήμα ενώ το πολυμερές με 40% γλυκίνη παίρνει τη συνδιαστική δομή τυχαίου σπειράματος και στροφής.

Η γλυκίνη επειδή δεν έχει ασύμμετρο άτομο άνθρακα (έχει 2 πρωτόνια στον α άνθρακα) δεν έχει οπτική δραστικότητα και έτσι δεν έχουμε κάποιο σήμα στον κυκλικό διχρωισμό για την γλυκίνη. Το σήμα που βλέπουμε είναι από την ιστοδίνη. Σε pH=7.4 επειδή η ιστοδίνη είναι υδρόφοβη δεν έχουμε ισχυρό σήμα και γίνεται ισχυρότερο καθώς κατεβαίνει το pH και πρωτονιώνεται, και γίνεται τυχαίο σπείραμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σύνθεση «έξυπνων» υβριδικών νανοδομών, που έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ειδικότερα, όπως γίνεται εμφανές από τα αποτελέσματα των τεχνικών χαρακτηρισμού, σε πρώτη φάση συντέθηκαν επιτυχώς τα απαιτούμενα μονομερή N(im)-Trt-His NCA και L-Gly NCA που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο ελεγχόμενος πολυμερισμός ROP ($I < 1.2$) με σκοπό τη σύνθεση καλά καθορισμένων γραμμικών συμπολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Gly) χρησιμοποιώντας PEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή των πολυμερισμών. Το γεγονός ότι τα παραγόμενα πολυμερή συντέθηκαν χωρίς την ανάγκη απομάκρυνσης μετάλλων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό των NCAs μέσω συμπλόκων στοιχείων μεταπτώσεως, τα καθιστά ικανά για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Ακολούθησε κατά σειρά η αποπροστασία των δομικών μονάδων της PHis. Αξίζει να τονιστεί ότι μόνο μέσω σωστού σχεδιασμού και επιλογής της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας για την PHis είναι εφικτός ο συνδυασμός των δύο πολυπεπτιδίων.

Σε επόμενο βήμα ακολούθως, έγιναν με επιτυχία οι πολυμερισμοί και στη συνέχεια, η σύνθεση όλων των πολυμερών επιβεβαιώθηκαν με χρήση μεθόδων μοριακού χαρακτηρισμού IR, NMR και GPC.

Στη συνέχεια, με τη μέθοδο του DLS παρατηρήθηκε η αυτοοργάνωση των πολυμερών αυτών όπου σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η επίτευξη μικκυλιακών και κυστιδιακών δομών από τα πολυμερή που συντέθηκαν στη παρούσα ερευνητική εργασία. Όλες οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων έγιναν σε γωνίες 45°, 90°, 135°, για να ελεγχθεί η ύπαρξη γωνιακής εξάρτησης σε θερμοκρασίες 25°C (θερμοκρασία δωματίου), 37°C (θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος) και 41°C (θερμοκρασία φλεγμονής) για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στη μεταβολή θερμοκρασίας και σε pH 7.4 (pH υγιούς κυττάρου), 6.5 (pH γύρω από το καρκινικό κύτταρο), 5.0 (pH

καρκινικού κυττάρου) για να παρατηρηθεί τυχόν απόκριση στο pH. Με τη μέθοδο του SLS παρατηρήθηκαν οι δομές των πολυμερών

Ως μελλοντικός στόχος, για περαιτέρω διερεύνηση, προτείνεται η σύνθεση νέων συμπολυμερών με βάση την πολυ(L-ιστιδίνη) και την πολυ(L-γλυκίνη), τα οποία θα διαθέτουν πολυπλοκότερη αρχιτεκτονική, οδηγώντας σε νέες αποκρινόμενες υπερμοριακές δομές. Τέτοια παραδείγματα είναι τα πολυμερή PEO-b-PHis-b-PGly, και $(PEO)_2$ -b-P(His-co-Gly). Θα μπορούσαν να συνθεθούν πολυμερή με διακλαδισμένο πολυαιθυλενοξείδιο (μακροαπαρχητής) με 2 κλάδους με σκοπό να παρατηρηθεί η αυτοοργάνωση και η δομή των πολυμερών με διαφορετική αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή αφού το πολυμερές με το διακλαδισμένο μακροαπαρχητή μπορεί να έχει σημαντικές διαφορές σε σχέση με το πολυμερές με το γραμμικό μακροαπαρχητή το οποίο, αποδεικνύει ότι η αρχιτεκτονική του μακροαπαρχητή παίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτοοργάνωση των πολυμερών.

Κλείνοντας πρέπει να τονισθεί ότι ο τομέας των βιοπολυμερών και η χημεία των πολυπεπτιδίων αναπτύσσονται τάχιστα τα τελευταία χρόνια δείχνοντας το σωστό μονοπάτι που πρέπει να στραφεί η επιστημονική έρευνα.

ΣΥΝΤΜΉΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΎΜΙΑ

NCA	N-Καρβοξυανυδρίτης
DMF	Διμέθυλοφορμαμίδιο
PHis	Πολυ(L-ιστιδίνη)
PEO	Πολυ(αιθυλενοξείδιο)
R.O.P	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
THF	Τετραϋδροφουράνιο
Ethyl Acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
CH ₂ Cl ₂	Διχλωρομεθάνιο
DCC	N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
Et ₃ N	τριαιθυλαμίνη
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
IR	Φασματοσκοπία υπέρυθρου ακτινοβολίας
SEC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
UV-Vis	Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας
GPC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
DNP	2,4-δινιτροφθοροβένζυλο προστατευτική ομάδα
Trt	Τρίτυλο προστατευτική ομάδα
Bz	Βένζυλο προστατευτική ομάδα
PGly	Πολυγλυκίνη
I=Mw/Mn	Συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών
DPw	Μέσος κατά βάρος βαθμός πολυμερισμού

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ¹ L. Stryer, J.M. Berg, and J.L. Tymoczko, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι, 3η έκδοση, 2006.
- ² N. L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, *CRC Press Taylor & Francis Group*, 2006.
- ³ Ε.Κ Βουδούρη, Μ.Γ. Κοντομηνά, Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων, ΟΕΔΒ, 2008.
- ⁴ J. McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι Ι, 5η έκδοση, 2006.
- ⁵ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, J. Roberts, J. Watson, Molecular Biology of the Cell, *Garland Publishing*, 5η έκδοση, 1989, 87-134 & 820-830.
- ⁶ P.Y. Chou, G.D. Fasman, Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, beta-Sheet and Random Coil regions calculated from Proteins, *Biochemistry*, **1974**, 211–222.
- ⁷ Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου, Βιοργανική Χημεία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2004.
- ⁸ Merrifield, R., Automated Synthesis of Peptides, *Science*, **1965**, 150, 178-185.
- ⁹ Merrifield, R. and Stewart, J., Automated Peptide Synthesis, *Nature*, **1966**, 207, 522-523.
- ¹⁰ Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. H. and Kent, S., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science*, **1994**, 266, 776-779.
- ¹¹ Sewald, N , Jakubke , H , *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley, **2002**, 62-67.
- ¹² Stryer, L., Βιοχημεία, Έκδοση 5^η, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, 73-141.
- ¹³ Jackson, D. A, Symons, R. H. and Berg, P., Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia Coli, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1972**, 69, 2904-2909.

-
- ¹⁴ Bernfield, M. R. and Nirenberg, M. W., RNA Codewords and Protein Synthesis. The Nucleotide Sequences of Multiple Codewords for Phenylalanine, Serine, Leucine and Proline, *Science*, **1965**, *147*, 479-484.
- ¹⁵ Gupta P, Vermani K, Garg S, Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery, *Drug Discov. Today*, **2002**, *7*, 569.
- ¹⁶ Jeong, B, Gutowska, A, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol*, **2002**, *20*, 305.
- ¹⁷ Galaev ,LY, Mattiasson, B., Controlled and Living Polymerizations: From Mechanisms to Applications, *Trends Biotechnol*, **2000**, *17*, 335.
- ¹⁸ Sharma, S., Kaur, P., Jain, A., Rajeswari, MR, Gupta, MN, A smart bioconjugate of chemotrypsin , *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 330.
- ¹⁹ Peggion, E., Goodman, α -amino acid N-carboxyanhydride polymerizations - a mechanistic analysis M., *Pure & Appl. Chem.*, **1981**, *53*, 699.
- ²⁰ Shalitin, Y., *Ring Opening Polymerization*, *Marcel Dekker*, **1969** , 145.
- ²¹ Katchalski, E., Shalitin, Y., Gehatia, M., Theoretical analysis of the polymerization kinetics of N-Carboxy-a-aminoacid-anhydrides , *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1925.
- ²² Fessler, J., Ogston, J., Studies of the sedimentation, diffusion and viscosity of some sarcosine polymers in aqueous solution, *Trans. Faraday Soc.*, **1951**, *47*, 667.
- ²³ Lundberg, R.D., Doty, P., Polypeptides. X. Configurational and stereochemical effects in the amine-initiated polymerization of N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 3961.
- ²⁴ Lundberg, R.D., Doty, P., Additional comments on the amine-initiated polymerization of N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *78*, 4810.
- ²⁵ Idelson, N., Blout, E.R., Infrared Spectroscopy and the Kinetics of the Synthesis of Polypeptides: Primary Amine Initiated Reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 3948.

-
- ²⁶ Goodman, M., Schmitt, E.E., Conformational transitions in polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 5507.
- ²⁷ Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Verdini, A.S., Chromatographic fractionation of primary amine initiated poly- γ -benzyl-L-glutamate, *Die Makromol. Chem.*, **1966**, *97*, 113.
- ²⁸ Blout, E. R. and Idelson, M., Polypeptides. XVIII.1 A Kinetic Study of the Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 2387-2393.
- ²⁹ Bamford, C.H., Block, H., Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins, Univ. Wisc. Press, **1962**, 125-159.
- ³⁰ Szwarc, M., NCAs a mechanistic approach , *Advan. Polymer Sci.*, **1965**, *4*, 1.
- ³¹ Kricheldorf, H.R., Models of Biopolymers by Ring Opening Polymerization, *CRC*, **1990**, 87-92.
- ³² Blout, E. R. and Karlson, R. H., Polypeptides, III. Synthesis of High Molecular Weight Poly- γ -benzyl-L-glutamates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 94-946.
- ³³ Bamford, C.H., Block, H., The initiation step in the polymerization of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides. Part II. Effects related to the structure of amine initiators, *J. Chem. Soc.(London)*, **1961**, 4992.
- ³⁴ Peggion, E., Goodman, M., Anionic polymerization mechanism of n-carboxy- α -amino acid anhydrides, *Vysokomol. Soedin*, **1967**, A9, 247.
- ³⁵ Katchalski, E., Shalitin, Y., Amine Initiated Copolymerization of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 1630.
- ³⁶ Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Mechanism of polymerization of N-carboxyanhydrides in dimethylformamide. Evidence of the presence of cyclic terminals in polymers obtained by strong-base initiation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 2733.
- ³⁷ Goodman, M., Hutchison, J., The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 3627.

-
- ³⁸ Kricheldorf, H.R., Mechanism of the NCA-polymerization, 5. Catalysis by secondary amines, *Makromol. Chem.*, **1977**, 178, 1959-1970.
- ³⁹ Kopple, K. D., The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 662-664.
- ⁴⁰ Kopple, K. D., Some Reactions of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 6442-6446.
- ⁴¹ Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Solvent effects in N-carboxyanhydride (NCA) polymerization initiated by strong base type initiators, *Biopolymers*, **1966**, 4, 595.
- ⁴² T. J. Deming, Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture, *Nature* **1997**, 390, 386-389.
- ⁴³ T. J. Deming, Amino acid derived nickelacycles: Intermediates in nickel-mediated polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4240-4241.
- ⁴⁴ T. J. Deming, Cobalt and iron initiators for the controlled polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides, *Macromolecules* **1999**, 32, 4500-4502.
- ⁴⁵ Knobler, Y., Bittner, S. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides of hydroxylamine, O-alkylhydroxylamines, and amines; syntheses of amino-hydroxamic acids, amido-oxy-peptides, and α -amino-acid amides, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3941.
- ⁴⁶ Knobler, Y., Bittner, S., Virov, D. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 1821.
- ⁴⁷ Dimitrov, I. and Schlaad, H., Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides, *Chem. Commun.*, **2003**, 23, 2944-2945.
- ⁴⁸ Lu, H. and Cheng, J., Hexamethyldisilazane-mediated controlled polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 14114.
- ⁴⁹ Lu, H. and Cheng, J., N-Trimethylsilyl Amines for Controlled Ring-Opening Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides and Facile End Group

Functionalization of Polypeptides, *J. Am. Chem.Soc.* **2008**, *130*, 12562-12563.

⁵⁰ Iatrou, H., Aliferis, T. and Hadjichristidis, N., Living polypeptides, *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 1653-1656.

⁵¹ Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., The synthesis and reactions of 2-isocyanatoacyl chlorides, *J.Org. Chem.*, **1965**, *30*, 1158.

⁵² Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., The Syntheses and Some Reactions of α -Isocyanatoalkanecarboxylic Acid Chlorides and Isocyanatobenzoyl Chlorides, *J.Org. Chem.*, **1966**, *31*, 142.

⁵³ Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry, *J. Polym. Sci.*, 2005, Part A, *43*, 4670-4673.

⁵⁴ Aliferis, T., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Messman, J. and Mays, J., Synthesis and Characterization of 3- and 4-Arm Star-Block Copolypeptides using Multifunctional Amino Initiators and High Vacuum Techniques, *J. Macromol. Symp.* **2006**, *240*, 12-17.

⁵⁵ Karatzas, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Inoue, K., Sugiyama, K. and Hirao, A., Complex Macromolecular Chimeras, *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 2072-2080.

⁵⁶ Fetters, L., *Encyclopedia of Polymer Science Engineering*, Έκδοση 2η, Τόμος 10ος, Wiley-Interscience, New York 1987, 19-25.

⁵⁷ Quirk, R. P. and Lee, B., Experimental Criteria for Living Polymerizations, *Polymer Internat.*, **1992**, *27*, 359-367.

⁵⁸ Pickel, D., Politakos, N., Avgeropoulos, A., Messman, J., A Mechanistic Study of α -(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, *Macromolecules*, **2009**, *42*, 7781–7788.

⁵⁹ Vayaboury, W., Giani, O., Cottet, H., Deratani, A. and Schué, F., Living Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon

Decreasing the Reaction Temperature, *Macromol. Rapid. Commun.*, **2004**, *25*, 1221-1224.

⁶⁰ Leuchs, H., Ueber die Glycin-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 857-861.

⁶¹ Leuchs, H. and Geiger, W., Über die Anhydride von α -Amino-N-Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1721-1726.

⁶² Bergmann, M., Zervas, L., Ross, W., On proteolytic enzymes VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain *J. Biol. Chem.*, **1935**, *111*, 245-260.

⁶³ Ben-Ishai, D. ; Katchalski, E., Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 3688-3689.

⁶⁴ Green, M., Stahmann, M.A., Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides, *J. Biol. Chem.*, **1952**, *197*, 771-782.

⁶⁵ Fuchs, F., Über N-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.*, **1922**, *55*, 2943.

⁶⁶ Coleman, D. And Farthing, A. C., Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3218-3222.

⁶⁷ Brown, C. J., Coleman, D. and Farthing, A.C., Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature*, **1949**, *163*, 834-835.

⁶⁸ Levy, A. L., Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature*, **1950**, *165*, 152-153.

⁶⁹ Farthing, A. C., Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3213-3217.

⁷⁰ S. J. Harding, J. H. Jones, A. N. Sabirov, V. V. Samukov, im-Triyl Protection of Histidine, *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 368–373.

-
- ⁷¹ E. S. Lee, H. J. Shin, K. Na, Y. H. Bae, Poly(L-histidine)–PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization, *J. Contr. Rel.*, **2003**, *90*, 363–374.
- ⁷² G. M. Kim, Y. H. Bae, W. H. Jo, pH-induced Micelle Formation of Poly(histidine-co-phenylalanine)-block-Poly(ethylene glycol) in Aqueous Media, *Macrom. Bio.*, **2005**, *5*, 1118-1124.
- ⁷³ E. S. Lee, K. T. Oh, D. Kim, Y. S. Youn, Y. H. Bae, Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine), *J. Contr. Rel.*, **2007**, *123*, 19–26.
- ⁷⁴ N. H. Shin, J. K. Lee, H. Li, C. S. Ha, Y. A. Shchipunov, Il Kim, Synthesis of Poly(methyl methacrylate)-Block-Poly(L-histidine) and Its Use as a Hybrid Silver Nanoparticle Conjugate, *J. Nanosci. Nanotech.*, **2010**, *10*, 1–6.
- ⁷⁵ H. Yin, H. C. Kang, K. M. Huh, Y. H. Bae, Biocompatible, pH-sensitive AB₂ miktoarm polymer-based polymersomes: preparation, characterization, and acidic pH-activated nanostructural transformation, *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 19168.
- ⁷⁶ W. Park, D. Kim, H. C. Kang, Y. H. Bae, K. Na, Multi-arm histidine copolymer for controlled release of insulin from poly(lactide-co-glycolide) microsphere, *Biomaterials*, **2012**, *33*, 8848-8857.
- ⁷⁷ R. P. Johnson, Y. Il Jeong, J. V. John, C. W. Chung, D. H. Kang, M. Selvaraj, H. Suh, Il Kim, Dual Stimuli-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(L-histidine) Chimeric Materials for the Controlled Delivery of Doxorubicin into Liver Carcinoma, *Biomacromolecules*, 2013.
- ⁷⁸ L. Qiu, Z. Li, M. Qiao, M. Long, M. Wang, X. Zhang, C. Tian, D. Chen, Self-assembled pH-Responsive Hyaluronic Acid-g-poly(L-histidine) Copolymer Micelles for Targeted Intracellular Delivery of Doxorubicin, *Act. Biomater.*, 2013.
- ⁷⁹ Papadopoulos P., Floudas G., Schnell I., Aliferis T., Iatrou H., Hadjichristidis N., Nanodomain-Induced Chain Folding in Poly(γ -benzyl-L-glutamate)b - polyglycine Diblock Copolymers, *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 2352-2361.

-
- ⁸⁰ Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas, S. and Pitsikalis, M., Anionic polymerization: high vacuum techniques, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **2000**, *38*, 3211-3234.
- ⁸¹ Juilliard, J., Purification of Dimethylformamide, *Pure & Appl. Chem.*, **1977**, *49*, 855-891.
- ⁸² M. Fridkin, S. Shaltiel, A New Route to Polyamino Acids Containing Histidine, *Arch. Biochem. Bioph.*, **1971**, *147*, 767-771.
- ⁸³ S. Terada, A. Kawabata, N. Mitsuyasu, H. Aoyagi, N. Izumiya, Racemization during the Synthesis of Histidine-Containing Peptides, *Bullet. Chem. Soc. Jap*, **1978**, *51*, 3409-3410.
- ⁸⁴ P. Sieber, B. Riniker, Protection of Histidine in Peptide Synthesis: A Reassessment of the Trityl Group, *Tetrah. Let.*, **1987**, *48*, 6031-6034.
- ⁸⁵ S. J. Harding, J. H. Jones, A. N. Sabirov, V. V. Samukov, im-Trityl Protection of Histidine, *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 368–373.
- ⁸⁶ Y. F. Zhu, R. K. Blair, W. D. Fuller, Esterification Of 4-Alkoxybenzyl Alcohol Resin With Fmoc-Histidine (Nim-Trityll-N-Carboxyanhydride, *Tetrah. Let.*, **1999**, *35*, 4673-4676.
- ⁸⁷ S. Eleftheriou, D. Gatos, A. Panagopoulos, S. Stathopoulos, K. Barlos, Attachment of Histidine, Histamine and Urocanic acid to Resins of the Trityl-Type, *Tetrah. Let.*, **1999**, *40*, 2825-2828.