



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΑΥΡΟΓΙΩΡΓΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

**ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ Ν-ΚΑΡΒΟΞΥΑΝΥΔΡΙΤΗ ΤΗΣ L-ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ
ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΞΕΙΔΙΟ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον καθηγητή κ. Ε. Ιατρού, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο πολυμερών του τμήματος χημείας, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια της εκτέλεσης και συγγραφής της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Δ. Σκουλά για τις πολύτιμες συμβουλές του και την συνεργασία του κατά την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και την Άρτεμη για την στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.Δομή, λειτουργία, σύνθεση των πρωτεϊνών.....	7
1.1.Τα 20 φυσικά αμινοξέα.....	7
1.2.Πεπτιδικός δεσμός(πρωτοταγής δομή).	11
1.3.Δευτεροταγής δομή.	13
1.3.1.Η α-έλικα.....	13
1.3.2.Η β-πτυχωτή.	14
1.4. Πεπτιδική σύνθεση.	16
1.4.1. Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου.	16
1.4.2. Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.....	17
1.4.3. Σύνθεση στερεάς φάσης κατά Merrifield.....	18
1.4.5. Σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA.....	20
1.5. Προστατευτικές ομάδες.....	21
1.5.1.Προστασία αμίνης.....	22
1.5.2.Προστασία καρβοξυλίου.....	23
2.ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ	24
2.1 Ιστορική αναδρομή	24
2.2.Σύνθεση πολυμερικών πεπτιδίων	25
2.2.1Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου N-καρβοξυανυδριτών(NCA's)	25
2.2.2.Κανονικός μηχανισμός αμινών(Normal Amine Mechanism).....	26
2.2.3.Μηχανισμός καρβαμιδικών(μηχανισμός του Blout).....	27
2.2.4.Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς(active monomer)	28
2.2.5.Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες	30
2.3.Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών και χρήση τεχνικών υψηλού κενού ..	31
2.4. Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA)	34
2.4.1.Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων(Fuchs-Farthing method)	35
2.4.2.Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing	36
3.ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	40
3.1.Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών(SEC)	40

3.2.Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός(NMR)	42
3.3.Φασματοσκοπία υπερύθρου(IR).....	45
Γ.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	49
4.1 Προετοιμασία απαρχητή	49
4.2 Σύνθεση του τριτ-Βουτυλ προστατευμένο N-καρβοξυανυδρίτη της L-Τυροσίνη (Tyr (tBu) -NCA).....	54
4.3 Σύνθεση του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι.....	55
4.4 Καταβύθιση του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι.....	58
4.4 Αποπροστασία tert-Bu.....	59
4.5 Χαρακτηρισμός πολυμερούς	64
Δ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

A. Εισαγωγή

Τα βιολογικά συστήματα παράγουν πρωτεΐνες που κατέχουν ειδικά καθορισμένες, δομές. Αυτά τα αξιοπρόσεκτα υλικά είναι πολυπεπτίδια με ιδιότητες που καθορίζονται από τις ακριβώς ελεγχόμενες ακολουθίες και ιδρυτικά τους μονομερή, δηλαδή τα αμινοξέα.

Έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για να αναπτυχθούν συνθετικές διαδρομές για την προετοιμασία των μίμων των φυσικών αυτών πολυμερών, καθώς επίσης και για την σύνθεση πλήρως τεχνητών πολυπεπτιδίων με εφαρμογές στη βιοτεχνολογία, όπως η εφαρμοσμένη μηχανική ιστού και η μεταφορά φαρμάκων. Υπάρχουν και πλεονεκτήματα και περιορισμοί στη χρήση συμπολυμερών πολυπεπτιδίων ως μεταφορείς φαρμάκων. Τα πρωτότυπα βιολογικά συστήματα παράδοσης είναι μόρια ιών, τα οποία χρησιμοποιούν ιδιαίτερα περίπλοκους μηχανισμούς ώστε να παραδίδουν τις γενετικές πληροφορίες στα κύτταρα. Ένας συνθετικός πολυπεπτιδικός μιμητής πρωτεϊνών προσφέρει το εμφανές πλεονέκτημα να αποτελείται από τα πολύ απλούστερα συστατικά, όπου μόνο τα επιθυμητά χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενσωματώνονται, κάνοντας κατά συνέπεια την προετοιμασία ευκολότερη. Η επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορεί να προσεγγίσει επαρκέστερα τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών απαιτεί τη δυνατότητα ελέγχου της ακολουθίας των αμινοξέων καθώς επίσης και το ίδιο το μήκος αλυσίδων, δηλαδή στενή κατανομή μοριακών βαρών.

Οι προσπάθειες για την σύνθεση πρότυπων πολυμερών αμινοξέων έχουν αρχίσει πριν από περίπου πενήντα έτη, χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία. Αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού λάμβαναν χώρα με αποτέλεσμα να μην ήταν δυνατός ο έλεγχος του μοριακού βάρους και της κατανομής των πολυμερών που παράγονταν. Αυτό οφειλόταν στις πειραματικές συνθήκες καθόλη την διαδικασία της παρασκευής. Τα μονομερή είναι ανυδρίτες και είναι ευαίσθητοι στην υγρασία του αέρα. Οι συνθήκες παρασκευής, καθαρισμού, φύλαξης και πολυμερισμού μέχρι τώρα με χρήση αδρανούς ατμόσφαιρας δεν επέτρεπαν τον αποκλεισμό της υγρασίας. Δεν είναι τυχαίο ότι το μονομερές που παρασκεύαζαν το χρησιμοποιούσαν όσο τον δυνατόν συντομότερα γιατί παρατεταμένη φύλαξη είχε ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό του μονομερούς. Αυτό σημαίνει επίσης ότι το μονομερές δεν ήταν απολύτως καθαρό, αλλά περιείχε ουσίες εν δυνάμει

απαρχητές όπως υγρασία, αμίνες, άλατα. Εγκαθιστώντας στο σύστημα τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην τεχνική του ανιονικού πολυμερισμού, όπως χρήση αντιδραστηρίων και διαλυτών υψηλής καθαρότητας απαλλαγμένων από υγρασία καθώς και την τεχνική υψηλού κενού έχει ως αποτέλεσμα τον ελεγχόμενο ζωντανό πολυμερισμό.

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων, τα οποία περιέχουν διαφορετικού είδους προστατευτικές ομάδες στην πλευρική αλυσίδα και οι οποίες είναι δυνατό να απομακρυνθούν ανεξάρτητα, έχει ενδιαφέρον καθώς παρέχει τη δυνατότητα να παρασκευαστούν περίπλοκες αρχιτεκτονικές πολυπεπτιδίων ή ακόμη και να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την προετοιμασία των συνθετικών αντιγόνων ή ως μιμητές πρωτεϊνών. Η κύρια εφαρμογή των συνθετικών ομοπολυμερών βασισμένα σε α-αμινοξέα είναι ως π.χ. βιοαισθητήρες ή εκλεκτική και ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, βιοαπορροφούμενα ράμματα και βίδες, ελάσματα για ενίσχυση των οστών, βιολογικές μεμβράνες, οπτικοί διακόπτες και ως υδροκρυσταλλικά υλικά. Οι υδροκρυσταλλικές ιδιότητες πολύ(α-αμινοξέων) δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της παρουσίας στο σκελετό ή στην πλευρική αλυσίδα σκληρών μεσογενικών ομάδων. Λόγω της ακαμψίας της κύριας αλυσίδας τους μπορούν να οργανωθούν και να σχηματίσουν υγρούς κρυστάλλους.

B. Θεωρητικό μέρος.

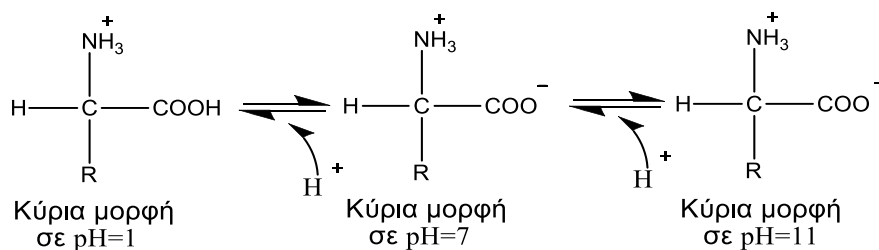
1. Δομή, λειτουργία, σύνθεση των πρωτεϊνών.

Πρωτεΐνες, ένας όρος που χρησιμοποιήθηκε από τον J. Berzelius το 1838 για να τονιστεί η σημασία αυτής της τάξης μορίων. Προέρχεται από την ελληνική λέξη πρώτος, που σημαίνει της «πρώτης γραμμής». Παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες, με εξαιρετική ποικιλία στις δράσεις που είναι εμφανής στις ακόλουθες περιπτώσεις. 1. Ενζυμική κατάλυση: Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις στα βιολογικά συστήματα καταλύονται από ειδικά μακρομόρια, τα ένζυμα, τα οποία εμφανίζουν τεράστια καταλυτική δύναμη. Σχεδόν όλα τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. 2. Μεταφορά και αποθήκευση: Μικρά μόρια και ιόντα μεταφέρονται από ειδικές πρωτεΐνες (το οξυγόνο από την αιμοσφαιρίνη στα ερυθροκύτταρα) 3. Κίνηση και μηχανική υποστήριξη: Η κίνηση των μυών, η μεγάλη αντοχή του δέρματος και των οστών στον εφελκυσμό είναι αποτέλεσμα μιας ινώδους πρωτεΐνης του κολλαγόνου. 4. Ανοσολογική προφύλαξη: Τα αντισώματα είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες που αντιδρούν και συνδέονται με ξένες ουσίες όπως ιοί, βακτήρια και κύτταρα άλλων οργανισμών. Τις παραπάνω διεργασίες και ιδιότητες προσπαθεί η σύγχρονη έρευνα να τιθασεύσει και να αναπαράγει.

1.1. Τα 20 φυσικά αμινοξέα.

Τα αμινοξέα^[1] είναι τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών. Ένα α-αμινοξύ αποτελείται από μία αμινο-ομάδα, μία καρβοξυλο-ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R δεσμευμένη στο άτομο του άνθρακα που λέγεται α-άνθρακας καθώς γειτνιάζει με την καρβοξυλική ομάδα.

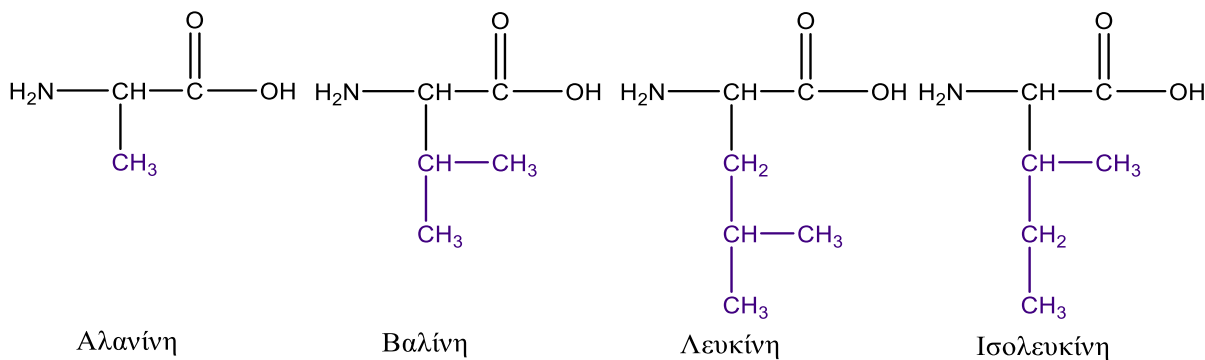
Σε διάλυμα με ουδέτερο pH είναι κυρίως διπολικά ιόντα (zwitterions) και όχι μη ιοντισμένα μόρια. Στη διπολική του μορφή ένα αμινοξύ έχει πρωτονιωμένη αμινομάδα και διϊσταμένη την καρβοξυλική (σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1
Οι καταστάσεις ιοντισμού ενός αμινοξέως εξαρτώνται από το pH.

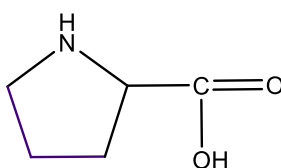
Στις πρωτεΐνες συναντούμε είκοσι είδη πλευρικών αλυσίδων R με διαφορετικό μέγεθος, σχήμα, φορτίο, ικανότητα δέσμευσης υδρογόνου και χημική δραστηριότητα. Το απλούστερο αμινοξύ είναι η γλυκίνη, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα (σχ. 1.2). Η αλανίνη είναι το επόμενο με μια μεθυλομάδα 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. Τα διαφορετικά μεγέθη και σχήματα δίνουν την δυνατότητα σε αυτά τα αμινοξέα να δημιουργούν συμπαγείς δομές με λίγους κενούς χώρους.

Σχήμα 1.2
Αλειφατικά αμινοξέα.

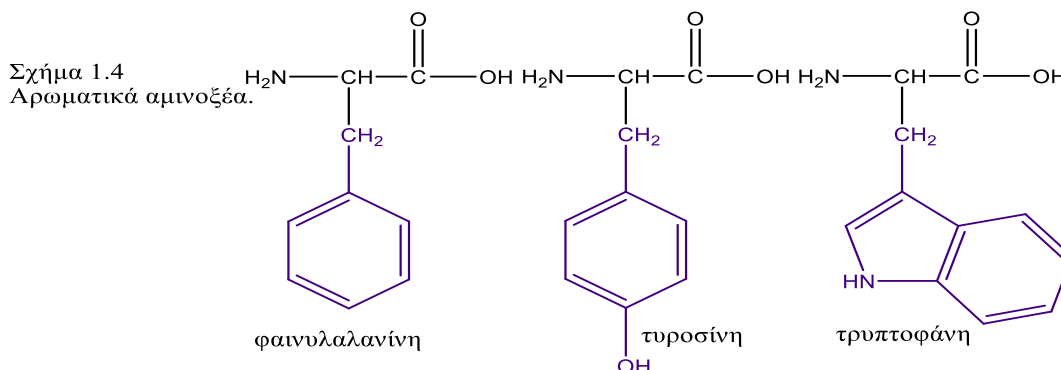


Η προλίνη έχει επίσης αλειφατική αλυσίδα, αλλά συνδέεται στο άτομο του αζώτου και στον α-άνθρακα. Το αποτέλεσμα είναι η κυκλική δομή (σχ. 1.3) που επηρεάζει πολύ την αρχιτεκτονική των πρωτεϊνών. Η προλίνη συχνά εμφανίζεται στα σημεία κάμψης των αλυσίδων.

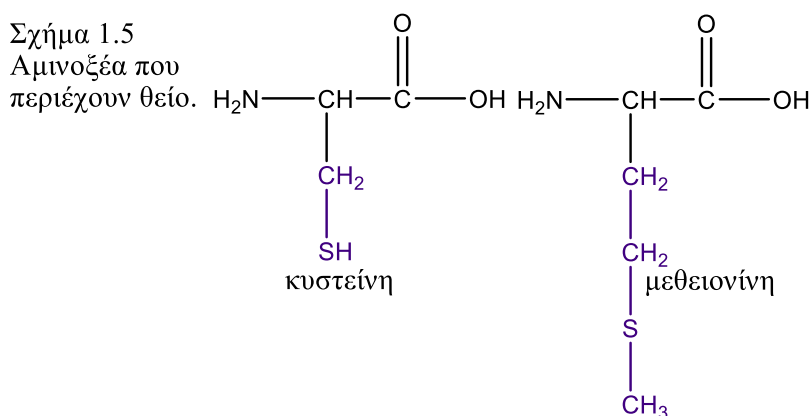
Σχήμα 1.3
Προλίνη ένα ιμινοξύ, έχει δευτεροταγές άζωτο.



Εν συνεχεία ακολουθούν τρία αμινοξέα(σχ. 1.4) με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Η φαινυλαλανίνη, περιέχει ένα φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μια μεθυλενική ομάδα. Η τρυπτοφάνη που περιέχει ένα ινδολικό δακτύλιο, τα δυο αυτά παρουσιάζουν μεγάλη υδροφοβικότητα. Τέλος η τυροσίνη με 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.



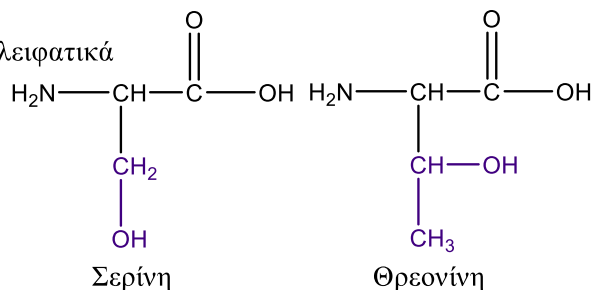
Ένα άτομο θείου εμφανίζεται στις πλευρικές αλυσίδες της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Η κυστεΐνη περιέχει σουλφιδρυλομάδα και η μεθειονίνη δεσμό θειοαιθέρα. Η κυστεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των δομών μέσω των δισουλφιδικών δεσμών(σχ. 1.5).



Δυο αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, περιέχουν αλειφατικές υδροξυλικές ομάδες(σχ. 1.6). Η σερίνη μπορεί να θεωρηθεί μια υδροξυλιωμένη μορφή της αλανίνης και η θρεονίνη της βαλίνης. Τα υδροξύλια τις καθιστούν πιο υδρόφιλες από τις αντίστοιχες αλειφατικές.

Σχήμα 1.6

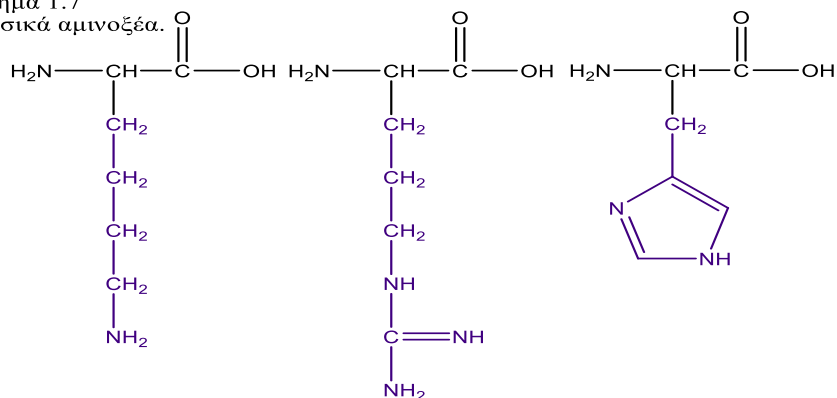
Αμινοξέα με αλειφατικά υδροξύλια.



Αμινοξέα με πολύ πολικές πλευρικές ομάδες και μεγάλη υδροφιλικότητα είναι η λυσίνη, η αργινίνη και η ιστιδίνη(σχ. 1.7). Η λυσίνη και η αργινίνη είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH ενώ η ιστιδίνη μπορεί να φορτιστεί ανάλογα με το άμεσο περιβάλλον της. Η ιστιδίνη εμφανίζεται τακτικά στο μέσο των ενζύμων όπου ο ιμιδαζολικός δακτύλιος αλλάζει γρήγορα κατάσταση καταλύοντας τη δημιουργία ή τη διάσπαση δεσμών. Οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης και λυσίνης είναι οι μεγαλύτερες από το σύνολο των είκοσι αμινοξέων.

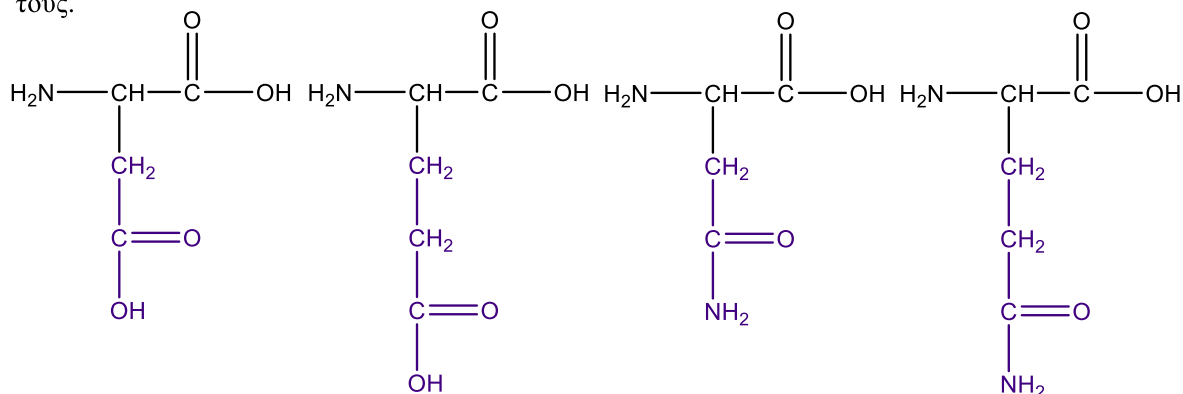
Σχήμα 1.7

Βασικά αμινοξέα.



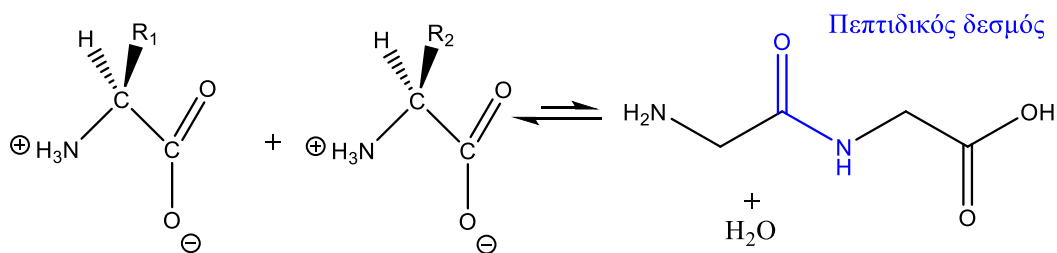
Μεταξύ των αμινοξέων υπάρχουν επίσης και δυο με όξινες πλευρικές αλυσίδες, το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ. Τα μη φορτισμένα τους παράγωγα ονομάζονται ασπαραγίνη και γλουταμίνη και περιέχουν μια τελική αμιδική ομάδα στη θέση της καρβοξυλικής(σχ. 1.8).

Σχήμα 1.8
Οξίνα αμινοξέα
και τα παράγωγά
τους.



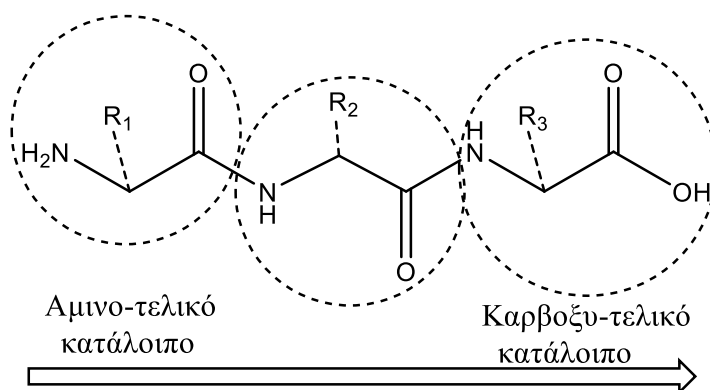
1.2.Πεπτιδικός δεσμός(πρωτοταγής δομή).

Στις πρωτεΐνες^[2], η α-καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέως ενώνεται με την α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέως με έναν πεπτιδικό δεσμό(λέγεται και αμιδικός), με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού(σχ. 1.9). Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται προς την υδρόλυση παρά στη σύνθεση. Παρά την θερμοδυναμική αστάθεια ο πεπτιδικός δεσμός είναι κινητικά σταθερός, ο χρόνος ζωής του σε υδατικό διάλυμα προσεγγίζει τα χίλια χρόνια.



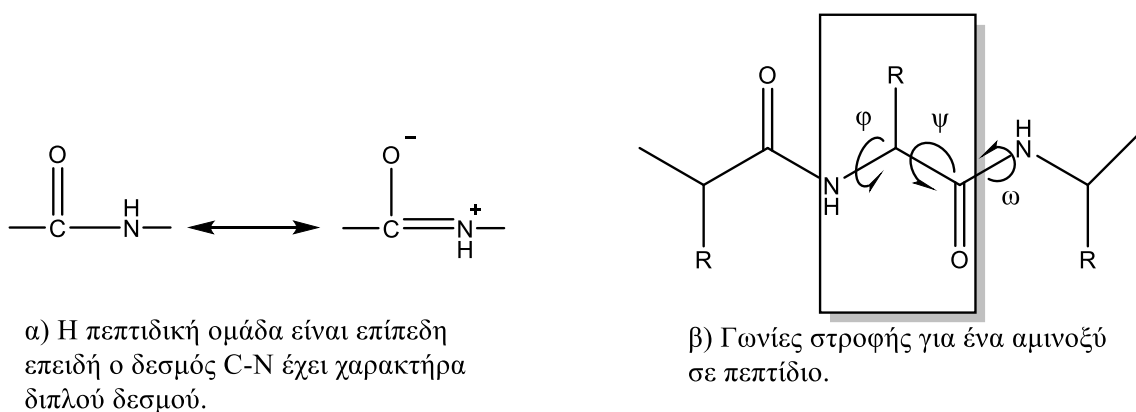
Σχήμα 1.9: Πεπτιδικός δεσμός

Πολλά αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να δημιουργήσουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα(σχ. 1.10). Μια ομάδα αμινοξέος λέγεται κατάλοιπο στην αλυσίδα, επιπλέον κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση καθώς τα δομικά της στοιχεία έχουν διαφορετικά άκρα. Από χημικής πλευράς δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Ονοματολογικά αλυσίδες με λιγότερα από δεκαπέντε αμινοξέα λέγονται πεπτίδια, έως πενήντα πολυπεπτίδια και μεγαλύτερες ως πρωτεΐνες.



Σχήμα 1.10: Η πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει κατεύθυνση.

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αμινοξέων, αμιδίων τους και απλών πεπτιδίων ότι ο δεσμός C-N είναι βραχύτερος από τον απλό δεσμό. Η απεντόπιση λόγω συντονισμού προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού. Η διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας χαρακτηρίζεται από τρεις γωνίες στροφής (σχ. 1.11) την ϕ $\{C(=O)-N-C^{\alpha}-C(=O)\}$, την ψ $\{N-C^{\alpha}-C(=O)-N\}$ και την ω $\{C^{\alpha}-C(=O)-N-C-\}$



Σχήμα 1.11

Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον C-N αμιδικό δεσμό περιορίζεται δραστικά με ένα φράγμα περιστροφής $\sim 105 \text{ kJ mol}^{-1}$. Αντίθετα οι δεσμοί μεταξύ ενός ατόμου α-άνθρακα και του αζώτου και του άνθρακα του καρβονυλίου είναι καθαρά απλοί. Επομένως υπάρχει μεγάλη ελευθερία περιστροφής γύρω από αυτούς τους δεσμούς και προς τις δυο πλευρές της άκαμπτης πεπτιδικής ομάδας. Οι διαμορφώσεις που λαμβάνονται είναι η trans ($\omega=180^\circ$) και η cis ($\omega=0^\circ$). Η τελευταία είναι ενεργειακά προτιμότερη κατά 8 kJ mol^{-1} και συναντάται στα περισσότερα πεπτίδια που δεν περιέχουν προλίνη.

1.3.Δευτεροταγής δομή.

Η διαμόρφωση που θα προτιμηθεί από την πολυπεπτιδική αλυσίδα ορίζεται από τις γωνίες περιστροφής ϕ , ψ και ω , μαζί με παράγοντες σταθεροποίησης όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σε σύγκριση με μια αλειφατική αλυσίδα ως προς τον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων, η πολυπεπτιδική έχει περιορισμό λόγω του αμιδικού δεσμού(σχ. 1.11). Πρόσθετες πληροφορίες για την στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών προκύπτουν από το γεγονός ότι τα αμινοξέα έχουν διαφορετικές συχνότητες εμφάνισης στις δευτεροταγής δομές(Πίν. 1.1). Η δημιουργία α -έλικας διευκολύνεται από το γλουταμικό, τη μεθειονίνη και τη λευκίνη. Δομές β -πτυχής διευκολύνονται από την βαλίνη, την ισολευκίνη και την φαινυλαλανίνη. Οι στροφές αναστροφής από την προλίνη, την γλυκίνη και την σερίνη.

1.3.1.Η α -έλικα.

Η α -έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διαμόρφωση(σχ. 1.12). Η α -έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται 4 μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Επομένως, όλες οι ομάδες CO και NH της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 0,15 nm (1,5 Å) κατά μήκος του άξονα της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση με αυτό κατά 100° , δίνοντας έτσι 3,6 αμινοξέα ανά στροφή της έλικας. Επομένως, αμινοξέα που απέχουν τρεις ή τέσσερις θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται πολύ κοντά σε μία α -έλικα. Αντιθέτως, αμινοξέα που απέχουν δύο θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται απέναντι στην έλικα και επομένως δεν είναι δυνατόν να συναντηθούν. Το βήμα της έλικας είναι 0,54 nm, δηλαδή το γινόμενο της μετατόπισης (0,15 nm) και του αριθμού των καταλοίπων ανά στροφή (3,6). Η φορά στροφής μπορεί να είναι είτε προς τα δεξιά είτε προς τα αριστερά. Οι α -έλικες στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι δεξιόστροφες, γιατί η αριστερόστροφη ευνοείται λιγότερο ενεργειακά.

1.3.2.Η β-πτυχωτή.

Η β-πτυχωτή επιφάνεια διαφέρει από την α-έλικα γιατί είναι μία επίπεδη δομή και όχι ράβδος. Μία πολυπεπτιδική αλυσίδα στη β-πτυχωτή επιφάνεια είναι σχεδόν τελείως ανοικτή και όχι σφιχτά περιελιγμένη όπως στην α-έλικα (σχ. 1.12). Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3,5 Å σε αντίθεση με το 1,5 Å της α-έλικας. Μία άλλη διαφορά είναι ότι οι β-πτυχωτές επιφάνειες σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ NH και CO σε διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ στην α-έλικα πρόκειται για ομάδες της ίδιας αλυσίδας. Γειτονικές αλυσίδες σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες) ή αντίθετη (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες).

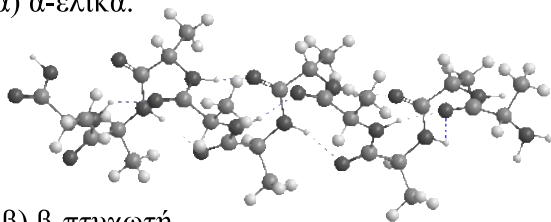
Πίνακας 1.1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης καταλοίπων αμινοξέων στη δευτεροταγή

Ονομασία	Σύντμηση	α-έλικα	β-πτυχωτή επιφάνεια	β-στροφή
Αλανίνη	Ala	1,29	0,90	0,78
Κυστεΐνη	Cys	1,11	0,74	0,80
Λευκίνη	Leu	1,30	1,02	0,59
Μεθειονίνη	Met	1,47	0,97	0,39
Γλουταμικό οξύ	Glu	1,44	0,75	1,00
Γλουταμίνη	Gln	1,27	0,80	0,97
Ιστιδίνη	His	1,22	1,08	0,69
Λυσίνη	Lys	1,23	0,77	0,96
Βαλίνη	Val	0,91	1,49	0,47
Ισολευκίνη	Ile	0,97	1,45	0,51
Φαινυλαλανίνη	Phe	1,07	1,32	0,58
Τυροσίνη	Tyr	0,72	1,25	1,05
Θρυπτοφάνη	Trp	0,99	1,14	0,75
Θρεονίνη	Thr	0,82	1,21	1,03
Γλυκίνη	Gly	0,56	0,92	1,64
Σερίνη	Ser	0,82	0,95	1,33
Ασπαρτικό οξύ	Asp	1,04	0,72	1,41
Ασπαραγίνη	Asn	0,90	0,76	1,28
Προλίνη	Pro	0,52	0,64	1,91
Αργινίνη	Arg	0,96	0,99	0,88

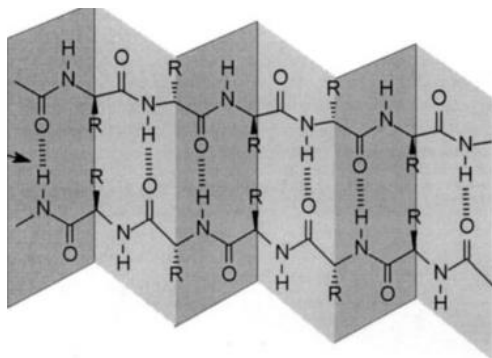
Επίσης, η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάζει κατεύθυνση λόγω ενός δομικού στοιχείου που ονομάζεται β -στροφή. Η ουσία αυτής της στροφής φουρκέτας είναι ότι η ομάδα CO της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου ενώνεται με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH της θέσης $(n+3)$. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β -στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες, για το λόγο αυτό πήραν και αυτό το όνομα. Είναι ακόμα γνωστές ως στροφές αναστροφής ή κάμψεις φουρκέτας. Υπάρχουν τέσσερα επίπεδα δομής που αναφέρονται σχετικά με την αρχιτεκτονική των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και ειδικότερα των πρωτεϊνών. Η πρωτοταγής δομή είναι η αλληλουχία αμινοξέων και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών, δηλαδή των διασυνδέσεων που προκύπτουν από την οξείδωση της κυστεΐνης (αμινοξύ που περιέχει την ομάδα HS-) μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων ή απομακρυσμένων περιοχών στην ίδια αλυσίδα. Μπορούμε να πούμε ότι η πρωτοταγής δομή αποτελεί την πλήρη περιγραφή των ομοιοπολικών συνδέσεων σε μία πρωτεΐνη. Η δευτεροταγής δομή εξετάζει τη χωροδιάταξη των αμινοξέων που βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στην αλληλουχία (π.χ. α -έλικα, β -πτυχωτή). Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στη στερεοδιάταξη αμινοξέων απομακρυσμένων μεταξύ τους στη γραμμική αλληλουχία και ο διαχωρισμός της από αυτή της δευτεροταγούς δομής είναι σχετικός. Τέλος, οι πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) έχουν ακόμη ένα επίπεδο δομής. Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη χωροδιάταξη αυτών των υπομονάδων και στα είδη των επαφών τους.

Σχήμα 1.12

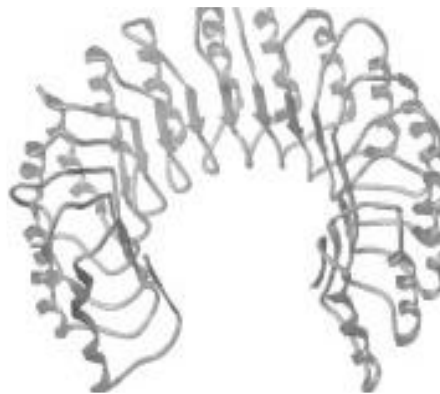
α) α-έλικα.



β) β-πτυχωτή.



γ) Δομή που περιέχει τα α),β)



1.4. Πεπτιδική σύνθεση.

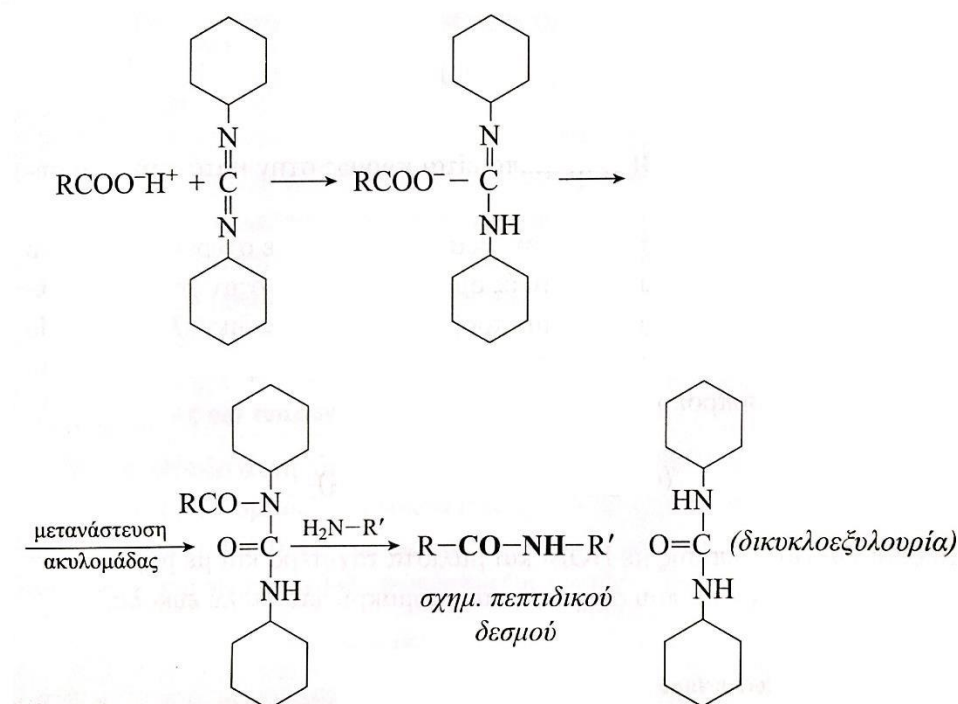
Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δυο αμινοξέων απαιτεί την προστασία της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του δεύτερου. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να σχηματίσει τον πεπτιδικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου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

Για την πεπτιδική σύνθεση υπάρχουν πολλές μέθοδοι. Από αυτές η μέθοδος του **δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου** και η μέθοδος των **ενεργών εστέρων** είναι οι πιο γνωστές και εύχρηστες^[3]. Παράλληλα ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκουν τόσο η **μέθοδος Merrifield** όσο και η τεχνική του **ανασυνδυσμένου DNA**.

1.4.1. Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου.

Η μέθοδος των καρβοδιμιδίων στην πεπτιδική σύνθεση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 από τους Sheehan και Hess. Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο είναι μέχρι σήμερα το πιο διαδεδομένο αντιδραστήριο. Η αντίδραση γίνεται στους 0oC και σε διαλύτες απόλυτο

DMF, EtAc και διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιούνται ισομοριακές ποσότητες DCC και των παραγώγων των δυο αμινοξέων.



Σχήμα 1. 13: Σύνθεση διπεπτιδίου με την μέθοδο DCC

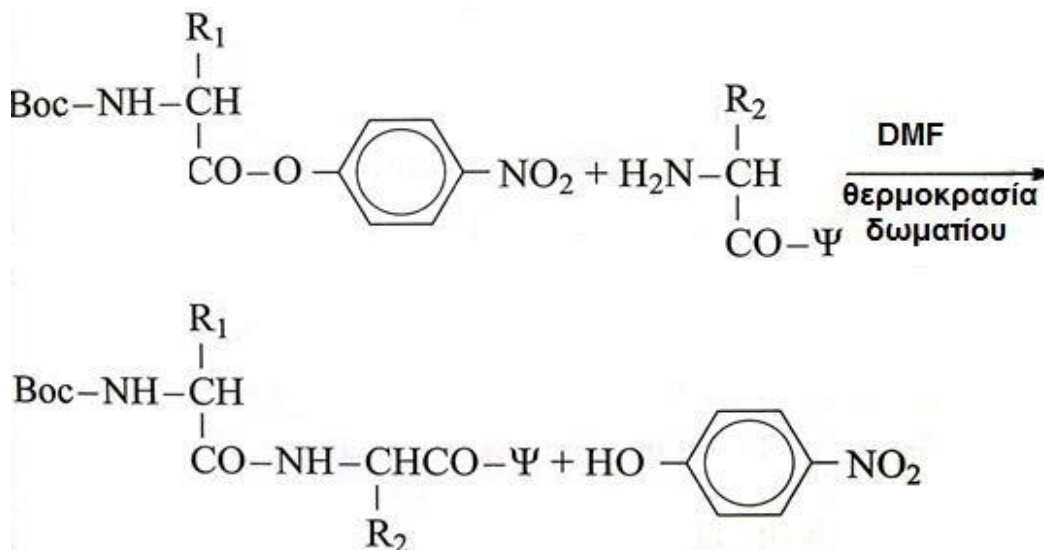
Η ευρεία χρήση του οφείλεται στο χρόνο αντίδρασης που είναι μικρός και στις μεγάλες συνήθως αποδόσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου του DCC είναι η τάση που έχει το πολύ ενεργό ενδιάμεσο να σχηματίζει οξαζολόνη, με αποτέλεσμα τη ρακεμείωση και σχηματισμό N-ακυλουρίας που δύσκολα απομακρύνεται.

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

1.4.2. Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων.

Η ενεργοποίηση της προς αντίδρασης καρβοξυλομάδας του αμινοξέος με τη μέθοδο αυτή γίνεται σε ξεχωριστό στάδιο. Η καρβοξυλομάδα του Nπροστατευμένου αμινοξέος μετατρέπεται σε π-νιτροφαινυλεστέρα με ισομοριακή ποσότητα π-νιτροφαινόλης, ο οποίος παρασκευάζεται και απομονώνεται σε καθαρή κατάσταση. 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 πνιτροφαινυλεστέρων 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.



1.4.3. Σύνθεση στερεάς φάσης κατά Merrifield.

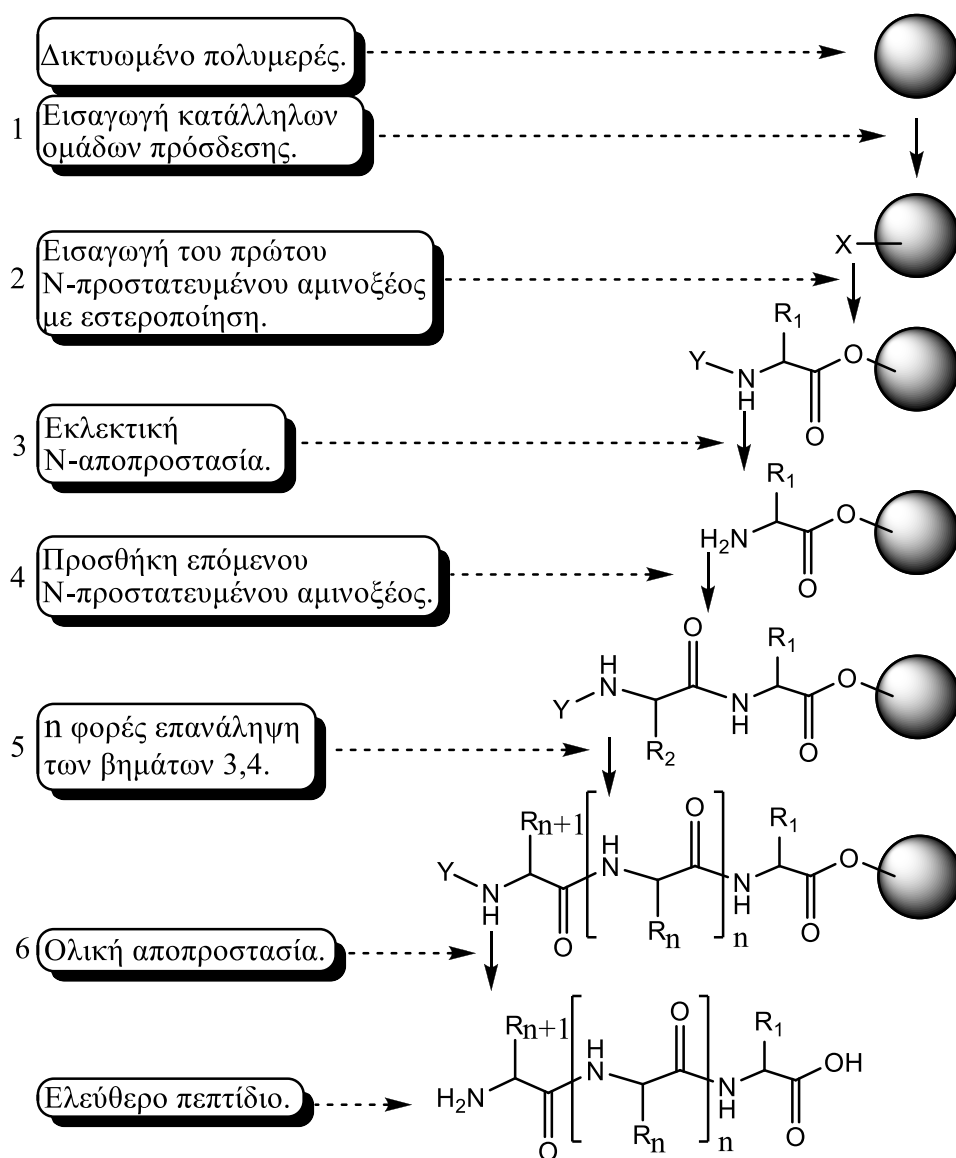
Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων είναι ένα χρονοβόρο και επίπονο έργο λόγω της σταδιακής προσθήκης ενός αμινοξέος κάθε φορά, όπως επισημάνθηκε παραπάνω. Μπορεί, ωστόσο, να απλοποιηθεί θεαματικά, εφαρμόζοντας τη μέθοδο στερεάς φάσης, που αναπτύχθηκε από τον R. Bruce Merrifield (Βραβείο Νόμπελ το 1984) το 1963. Σύμφωνα με την τεχνική Merrifield^[4,5], 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 πάρα- 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 1.14)^[2].

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 αυτή 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.



Σχήμα 1.14: Διαδικασία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Y=προστατευτική ομάδα.

1.4.5. Σύνθεση με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA

Το DNA είναι ένα επιμήκης βιοπολυμερές από δεοξυνουκλεοτίδια που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του οργανισμού. 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. 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.

Την δεκαετία του '70 οι Berg (βραβείο Νόμπελ 1980), Boyer και Cohen ανέπτυξαν την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA^[6,7]. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή 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 με συγκεκριμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη. 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 όπου η μεταγραφή και η μετάφραση τους οδηγεί σε πρωτεΐνες με μεγάλη απόδοση.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η παρασκευή συγκεκριμένης αλληλουχίας πρωτεϊνών με μονομοριακή κατανομή, απαραίτητες για φαρμακευτικούς σκοπούς όπως η ινσουλίνη. Μειονέκτημα αποτελεί το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία των ανασυνδυασμένων φορέων με το είδος του κυττάρου ξενιστή να επηρεάζει σημαντικά τον χρόνο.

1.5. 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

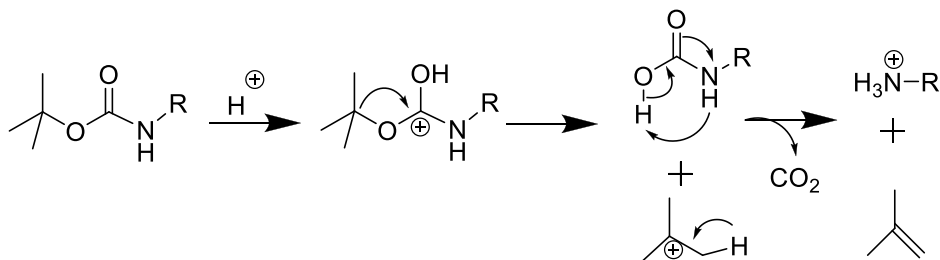
2. Πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης
3. Απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας

1.5.1.Προστασία αμίνης

Σε γενικές αρχές μια αμινομάδα μπορεί να προστατευτεί αντιστρέπτά με ακυλίωση, αλκυλίωση και αλκυλο-ακυλίωση. Μερικές εκατοντάδες έχουν αναφερθεί και εξελιχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Ταξινόμηση μπορεί να γίνει με βάση τις συνθήκες αποπροστασίας: όξινη υδρόλυση, βασική, οξείδωση/αναγωγή, πυρηνόφιλη προσθήκη και φωτόλυση.

- tert-Βουτοξυκαρβονύλιο (Boc).

Η Boc ομάδα είναι από τις πιο σημαντικές στην πεπτιδική σύνθεση. Είναι σταθερή σε βασικό περιβάλλον και ιδιαίτερα ευαίσθητη σε όξινο (Σχήμα 1.15). Επίσης παρουσιάζει σταθερότητα στην καταλυτική υδρογόνωση στην αλκαλική υδρόλυση και στην αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία. Η αποπροστασία γίνεται συνήθως με TFA, TFA/CH₂Cl₂ και HCl σε οργανικό διαλύτη.



Σχήμα 1.15: Μηχανισμός αποπροστασίας από οξέα. Τα τριτοταγή καρβοκατιόντα που παράγονται μπορούν να δώσουν παράπλευρες αντιδράσεις σε πυρηνόφιλα κέντρα του πεπτιδίου.

- Βενζυλοξυκαρβονύλιο (Z).

Η ομάδα αυτή εισήχθη από τον Λεωνίδα Ζέρβα και προς τιμήν του αναφέρεται ως Z και συνέβαλε στην ανάπτυξη της σύγχρονης πεπτιδικής χημείας. Η αποπροστασία γίνεται με συστήματα όξινα όπως: HBr/HCOOH, TFA, HBr/TFA, HF και από καταλυτική υδρογόνωση.

- 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονύλιο (Fmoc).

Αποτελεί ομάδα μεγάλης πρακτικής σημασίας καθώς είναι η μοναδική από της προστασίες τύπου ουρεθάνης που είναι ευαίσθητη σε βασικές συνθήκες. Συνήθως η

αποπροστασία γίνεται με μια αντίδραση ρουτίνας με πιπεριδίνη 20% σε DMF για ορισμένα δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αλλυλοξυκαρβονύλιο (Alloc).

Η ομάδα αυτή είναι σταθερή τόσο σε όξινες αλλά και βασικές συνθήκες γεγονός που την καθιστά ορθογωνική με τις ομάδες Boc, Fmoc. Το στάδιο αποπροστασίας περιλαμβάνει μεταλλικό παλλάδιο και κάποιο πυρηνόφιλο.

1.5.2. Προστασία καρβοξυλίου

Η προστασία γίνεται τοποεκλεκτικά ως προς το καρβοξύλιο του αμινοξέος με βενζυλική αλκοόλη και θεικό οξύ σε μεγάλες αποδόσεις. Οι περισσότερες προστασίες είναι εστερικού τύπου με διάφορες ανθεκτικότητες σε οξέα και βάσεις.

- Μέθυλ, αίθυλ εστέρες (Me, Et).

Η γενική διαδικασία για να αφαιρεθούν οι μεθυλικοί ή αιθυλικοί εστέρες είναι να προστεθεί ένα διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου, του νατρίου, ή υδροξειδίου του καλίου σε έναν οργανικό διαλύτη για μια 1 h ή με ενζυματική υδρόλυση.

- 4-Νιτροβενζυλ εστέρας (Nbz).

Έχει τις ίδιες ιδιότητες με την βενζυλική ομάδα με την μόνη διαφορά ότι είναι σταθερή στο σύστημα HBr/HCOOH.

- Βενζυλ εστέρας (Bz).

Το σχήμα προστασίας Boc/Bz αποτελεί την τακτική Merrifield καθώς είναι ορθογωνικό στις συνθήκες αποπροστασίας της Boc. Η βένζυλο ομάδα μπορεί να αποσπαστεί με καταλυτική υδρογόνωση παρουσία της Boc.

2.Πολυμερισμός

2.1 Ιστορική αναδρομή

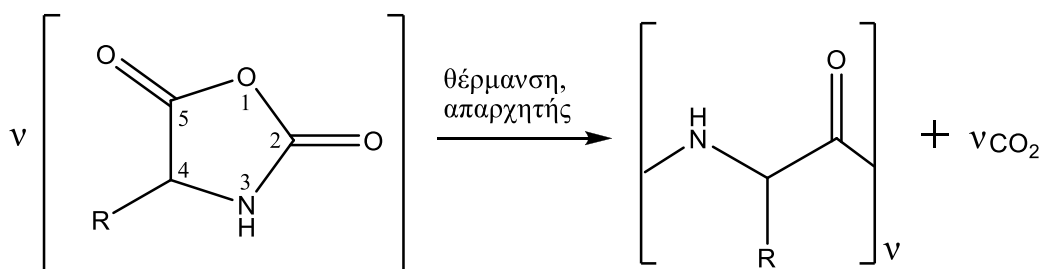
Η αρχή έγινε το 1906 που ο H. Leuchs παρασκεύασε για πρώτη φορά N-καρβόξυ ανυδρίτη α-αμινοξέος και έκανε πολυμερισμό χρησιμοποιώντας νερό για απαρχητή. Από τότε έγιναν πολλές δοκιμές με διαφορετικούς απαρχητές και συνθήκες πολυμερισμού. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτικές και απρωτικές αμίνες καθώς επίσης και βασικά άλατα για απαρχητές. Επίσης έγινε και θερμικός πολυμερισμός καρβοβενζοξυ λυσίνης NCA σε υψηλό κενό από τους Katchalski, Grossfeld και Frankel. Όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα ούτε η δουλειά ήταν συστηματική. για παράδειγμα δεν μελετήθηκε η επίδραση του απαρχητή, του λόγου μονομερούς απαρχητή, των συνθηκών αντίδρασης, του μέσου της αντίδρασης και του διαλύτη στο τελικό προϊόν και του μοριακού βάρους και πολυδιασποράς των τελικών προϊόντων. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1940, κυρίως τις δεκαετίες του 50 και του 60 μια πιο συστηματική δουλειά έγινε και οι πολυμερισμοί αυτού του είδους χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για την παρασκευή πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους. Έγιναν αρκετές μελέτες από πολλές ερευνητικές ομάδες κυρίως για την κινητική των αντιδράσεων σε διάφορους διαλύτες και θερμοκρασίες, για την επίδραση του λόγου μονομερούς προς απαρχητή στο λαμβανόμενο προϊόν, για τις διαμορφώσεις των αλυσίδων σε στερεή φάση και σε διάλυμα. Πολλές φορές τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα και τα συμπεράσματα ασαφή, γίνονταν πειραματικά λάθη και να χρησιμοποιούσαν απλουστεύσεις στους υπολογισμούς τους αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι δεν έγινε μια συστηματική δουλειά πάνω σε πολλούς τομείς και ξεδιάλυθηκαν πολλοί παράμετροι. Παρόλα αυτά τα πολυμερή που λάμβαναν είχαν γενικά μεγάλη πολυδιασπορά ($I > 2$) και ήταν δύσκολος ο έλεγχος του μήκους της αλυσίδας. Επίσης πολλές φορές μεγάλη ετερογένεια παρατηρούνταν στο τελικό προϊόν με αλυσίδες μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους να συνυπάρχουν. Αργότερα προσπάθειες για την παρασκευή συμπολυμερών κατά συστάδες είχαν ως αποτέλεσμα να λαμβάνονται πολυμερή με διαφορετική σύσταση και μοριακό βάρος από τα προβλεπόμενα που περιείχαν σημαντικές ποσότητες αντίστοιχων ομοπολυμερών. Συμπολυμερή κατά συστάδες σε καθαρή μορφή μπορούσαν να ληφθούν μόνο έπειτα από κλασματοποιήσεις που μείωναν την απόδοση και την ικανότητα αυτής της μεθόδου.

2.2.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 κοινότητα για ένα φυσικό βιοπολυμερές. Με βάση αυτή την προσέγγιση έχουν συντεθεί πληθώρα πολυμερών, κυρίως πολυπεπτιδικών, με εφαρμογές στη μεταφορά φαρμάκων^[8,9], και στη βιοτεχνολογία^[10,11].

2.2.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου N-καρβοξυανυδριτών(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 ρακεμώσεως κατά την σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως οι αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα και με θέρμανση(Σχήμα 2.1). Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO₂ και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους.

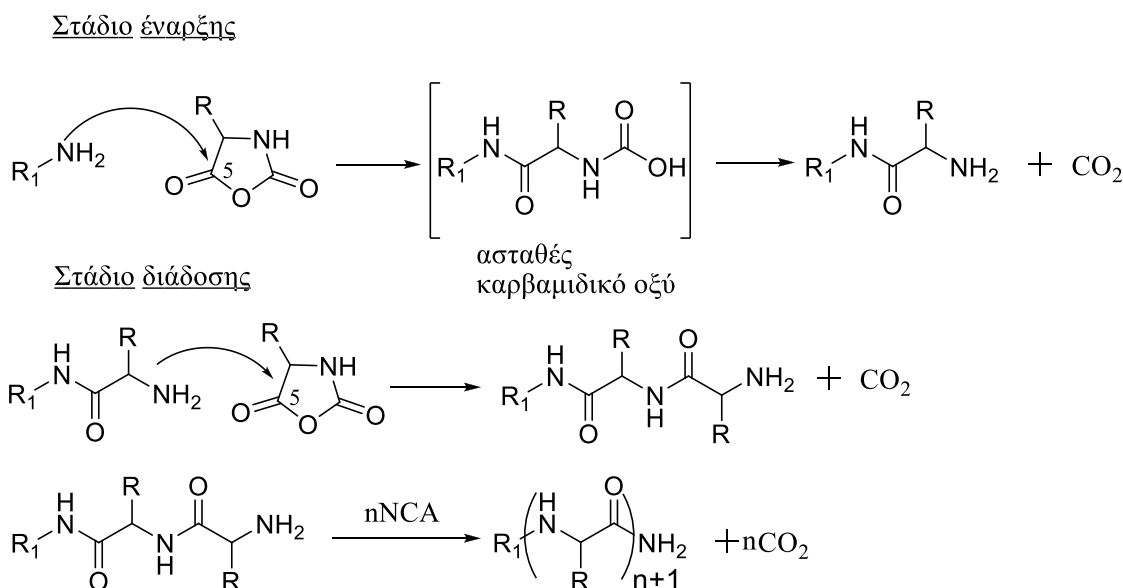


Σχήμα 2.1: Γενική αντίδραση των NCA's.

Με τη χρήση επισημασμένου ¹⁴C του NCA της γλυκίνης έχει αποδειχθεί ότι το CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον C(2)^[12]. 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.

2.2.2.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 2.2) πολλών σταδίων από την τελική αμινομάδα στον C(5) του NCA, ακολουθούμενη από διάνοιξη του δακτυλίου, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση του αμινοτελικού άκρου.



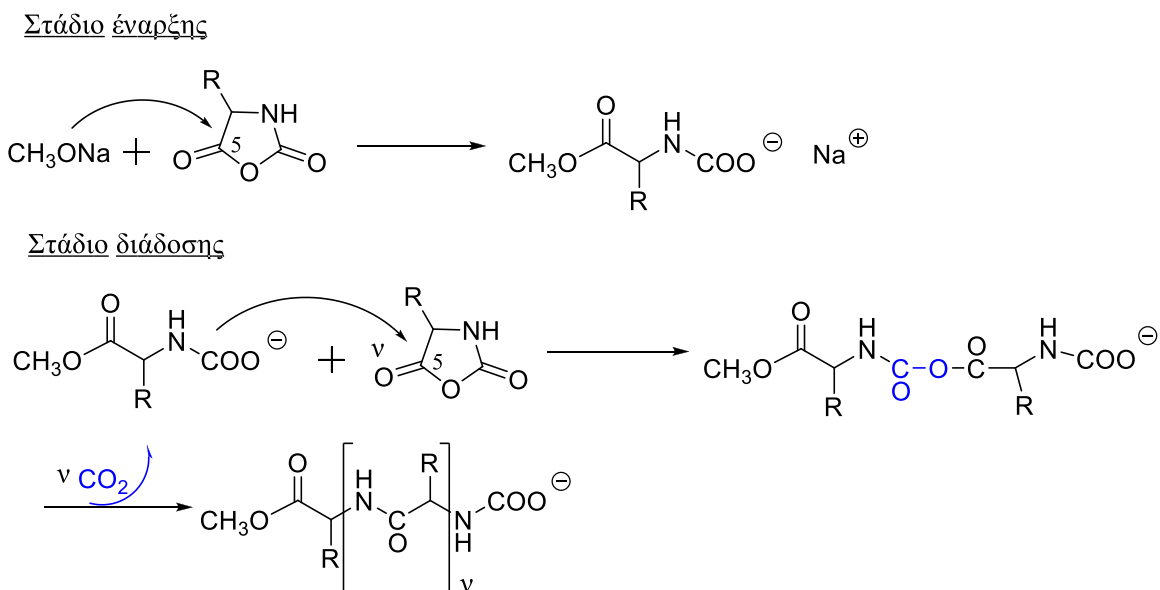
Σχήμα 2.2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.

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^[13]. Όταν η δραστηριότητα του απαρχητή είναι συγκρίσιμη με αυτή του τελικού άκρου της αναπτυσσόμενης αλυσίδας τότε η ταχύτητα πολυμερισμού υπακούει πρώτο νόμο ταχύτητας $-d[M]/dt=k[M][I]_0$, κατά τον οποίο 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)^[14,15,16].

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 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^[17]. 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^[18] 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^[19], 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^[20].

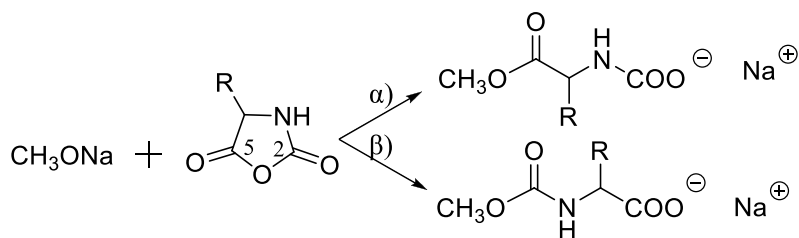
2.2.3.Μηχανισμός καρβαμιδικών(μηχανισμός του Blout)

Σύμφωνα με αυτό τον μηχανισμό των Idelson και Blout^[21], μια ισχυρή βάση όπως το μεθοξείδιο του νατρίου αντιδρά με το μονομερές μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στον C(5) του ανυδρίτη(σχήμα 2.3). Διάνοιξη 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.



Σχήμα 2.3: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.

Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε ώστε να εξηγήσει το γεγονός ότι κατά την αντίδραση στοιχειομετρικών ποσοτήτων Ν-καρβοξυανυδριτών με μεθοξείδιο του νατρίου (σχήμα 2.4) δυο προϊόντα λαμβάνονταν, το μετά νατρίου άλας του καρβαμιδικού εστέρα και το άλας του Ν-καρβοξυάμινο οξέος.



Σχήμα 2.4: α) Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).

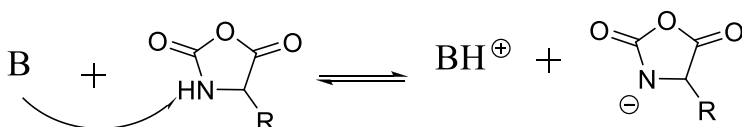
2.2.4. Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (active monomer)

Για να ερμηνεύσουν τους πολυμερισμούς που δεν υπάκουαν στο μηχανισμό του Blout οι Bamford και Block^[22], πρότειναν έναν νέο που μετέπειτα τροποποιήθηκε από τον Szwarc^[23]. 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

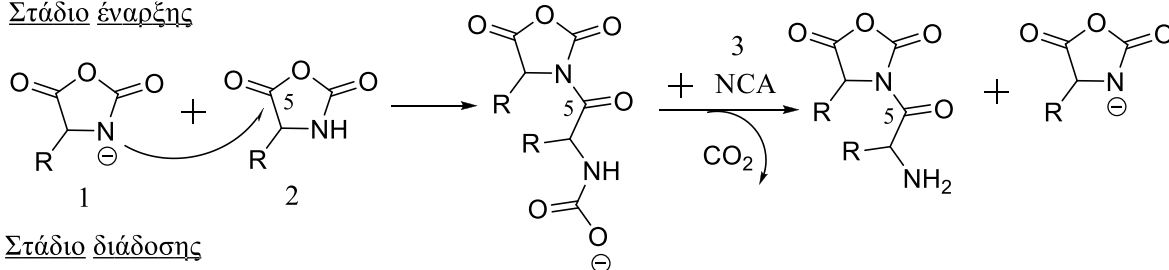
ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (σχήμα 2.5). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη.

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.

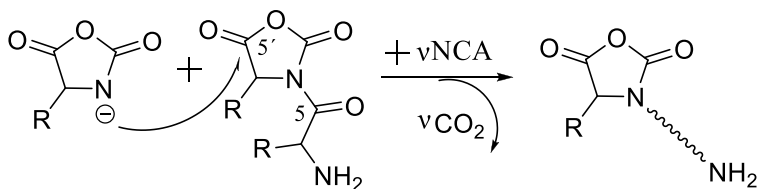
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 2.5: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

Η παρουσία της καρβαμидικής ομάδας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την αντίδραση. Ελεύθερο καρβαμидικό οξύ είναι πολύ ασταθές για να απομονωθεί και αποκαρβοξυλιώνεται γρήγορα, όμως καρβαμидικά άλατα είναι σταθερά και σχηματίζονται εύκολα. Η σταθερότητα των καρβαμидικών 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 απαρχητές 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.

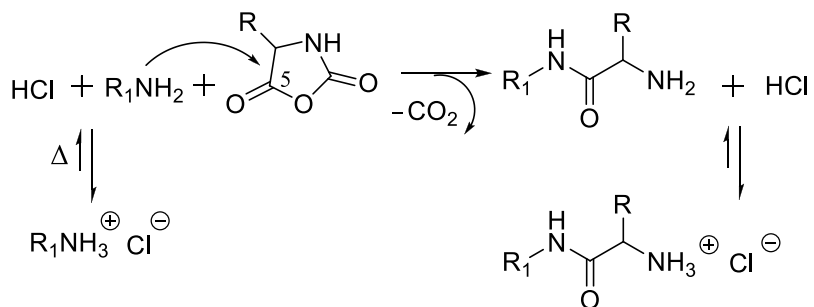
Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επίσης παρατηρούμε ότι ο τμήμα του απαρχητή δεν ενσωματώνεται στην τελική αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη μοριακή πολυδιασπορά. Το 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.

2.2.5. Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες

Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αμινών είχε πρώτα μελετηθεί από τον Knober^[24,25] 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^[26], 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 2.6). 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 2.6: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

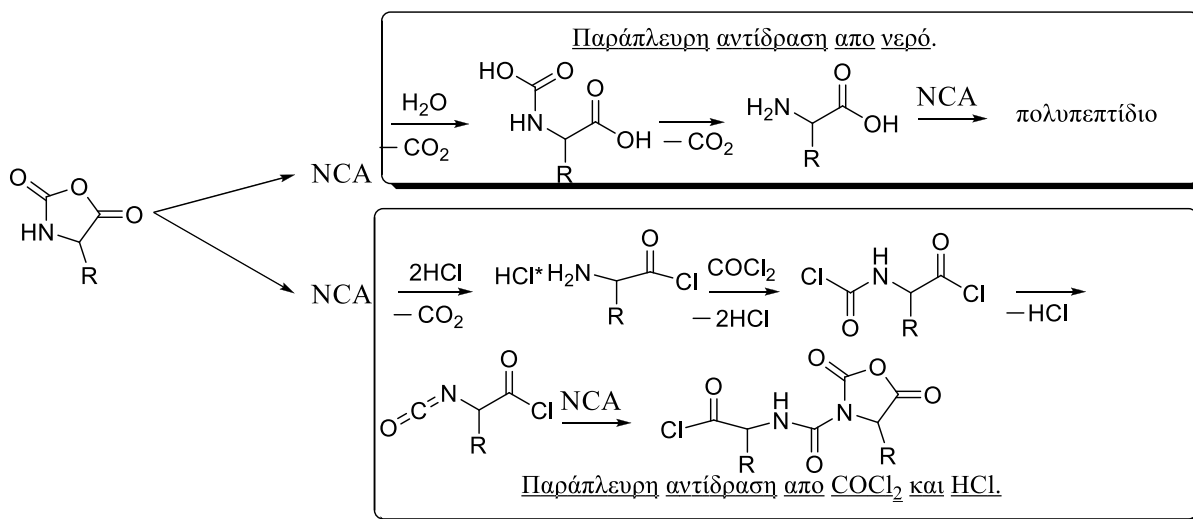
Για να επιτευχθεί ελεγχόμενος πολυμερισμός και όχι απλώς προσθήκη ενός μοναδικού NCA, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 40 °C έως 80 °C ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση ισορροπίας της ελεύθερης αμίνης, επομένως και των ενεργών κέντρων που εκκινούν ή διαδίδουν τον πολυμερισμό. Σε αυτή την περίπτωση ο πολυμερισμός 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 μακροαπαρχητή. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δυσκολία σύνθεσης πολυμερών με πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική πέραν της δισυσταδικής.

2.3.Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών και χρήση τεχνικών υψηλού κενού

Το πρώτο ζωντανό σύστημα μέσω πρωτοταγών αμινών αναφέρθηκε το 2004 από τους Iatrou, Hadjichristidis^[27], με την εφαρμογή τεχνικών υψηλού κενού(σχήμα 2.8). 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

Οι Ν-καρβοξυανυδρίτες αποτελούν μοναδικό παράδειγμα ετεροκυκλικών ενώσεων ως προς την ευαισθησία τους σε θέρμανση, νερό και βάσεις. 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^[28,29](σχήμα 2.7).



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. Αυτό αποτέλεσε στην συγκεκριμένη εργασία το πρώτο βήμα στο δρόμο για την σύνθεση προτύπων πολυπεπτιδίων.



Σχήμα 2.8: 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 CO_2 οδηγώντας την αντίδραση προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου. 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.

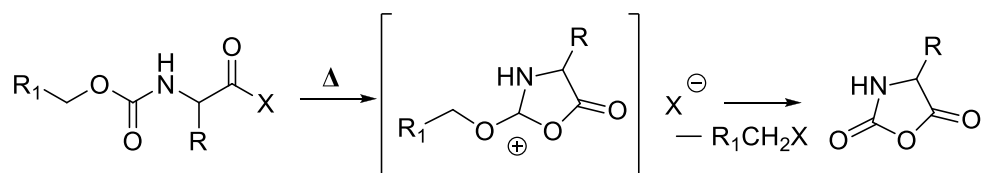
Με την τεχνική αυτή ο μηχανισμός οδηγήθηκε αποκλειστικά στην πορεία των κανονικών αμινών, τα προϊόντα είχαν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Επίσης έχουν συντεθεί ομο και συμπολυμερή^[27], αστεροειδή^[30] αλλά και υβριδικά^[31] πολυπεπτίδια από πληθώρα μονομερών. Η τεχνική είναι γενική και μπορεί να εφαρμοστεί και σε πιο πολύπλοκες αρχιτεκτονικές^[32]. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η τεχνική με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών στην βιβλιογραφία.

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^[33], 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}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^[34] σε αντίστοιχη μελέτη. Η πρόσφατη αυτή μελέτη ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο αυτά που είχε προαναφέρει η ομάδα της Αθήνας με επικεφαλή τον Hadjichristidis.

2.4. Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α -αμινοξέων (NCA)

Οι N-Καρβοξυανυδρίτες των α -αμινοξέων περιγράφηκαν πρώτα από τον Leuchs^[35,36,37] περισσότερο από εκατό χρόνια πριν. Επίσης παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και απομόνωσε το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. 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 αποσυντίθενται και έχουμε διάνοιξη 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. Εν συνεχεία το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου^[51], 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^[52]. Επιπλέον λόγω του γεγονότος ότι το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου, στο στάδιο της κυκλοποίησης, (σχήμα 2.9) αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο, η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες κάτω των 25 βαθμών. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R_1 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.

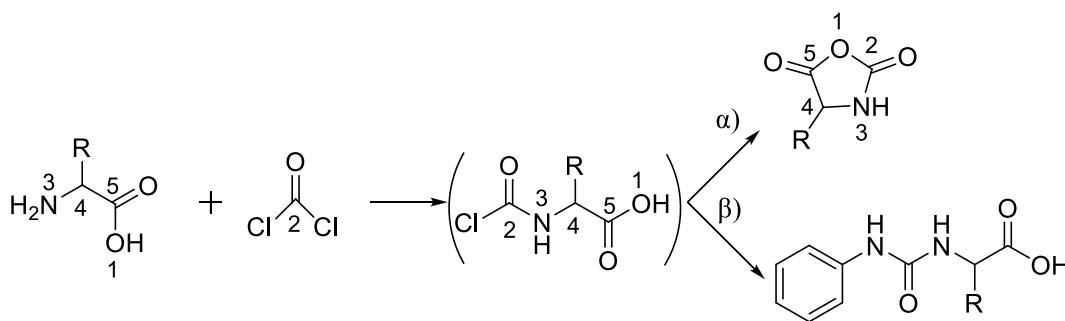


Σχήμα 2.9: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου

X=Cl ή Br

2.4.1. Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων (Fuchs-Farthing method)

Η φωσγενίωση των ελεύθερων αμινοξέων (σχήμα 2.12) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την σύνθεση των NCAs σήμερα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε πρώτα από τον Fuchs^[39] το 1922 για την παρασκευή της N-φαινυλ-γλυκίνης NCA και αργότερα επεξεργάστηκε λεπτομερώς από τους Farthing^[40], Coleman^[41] και Levy^[42] 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 2.10) επειδή η προσθήκη ανιλίνης οδηγεί στο σχηματισμό του 5-φαινυλ-υδαντοϊκού οξέος.



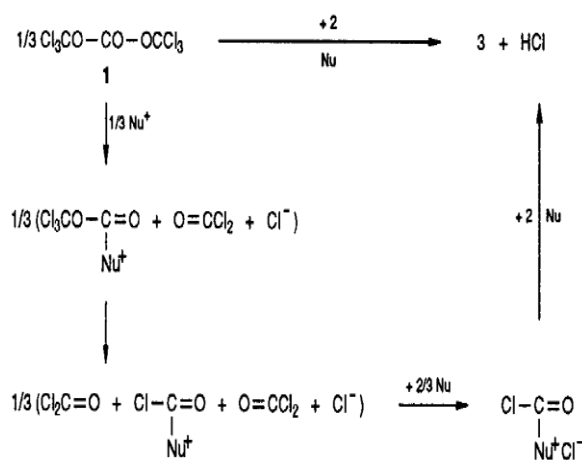
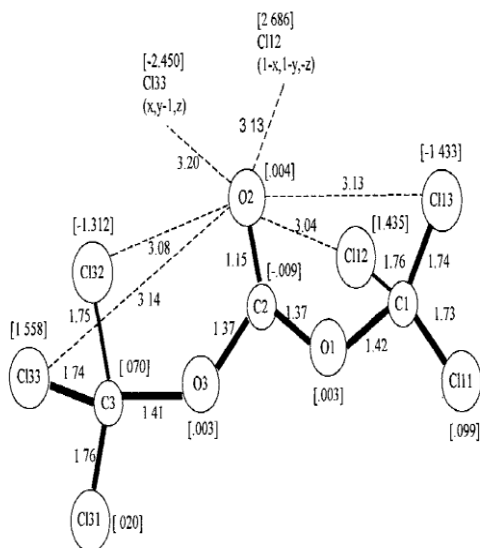
Σχήμα 2.10: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.

Το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότεροι 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.

2.4.2.Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing

Το φωσγένιο είναι ένα υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήριο που έχει χρησιμοποιηθεί από τις πρώιμες μέρες της χημικής βιομηχανίας^[52], αλλά και ως όπλο κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο. Εξαιτίας της υψηλής τοξικής του φύσης, η μεταχείρισή του, ακόμα και σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Ολιγομερή του φωσγενίου έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις φωσγενίωσης ώστε να παράγουν *in situ* το τοξικό αέριο. Το τριχλωρομέθυλο χλωροφορμικό ή αλλιώς διφωσγένιο και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό ή τριφωσγένιο(BTC) έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου. Το διφωσγένιο και το τριφωσγένιο είναι υγρό και κρυσταλλικό στερεό αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την πρακτικότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομα δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχουν χρησιμοποιηθεί και τα δυο αλλά το τριφωσγένιο έχει επικρατήσει.

Το τριφωσγένιο^[53] συντέθηκε πρώτη φορά από τον Councler το 1880, ενώ η δομή του έγινε γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ το 1971(σχήμα 2.13). Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει βρει μεγάλη αναγνώριση παρά το γεγονός ότι ήταν γνωστό για πάνω από έναν αιώνα.

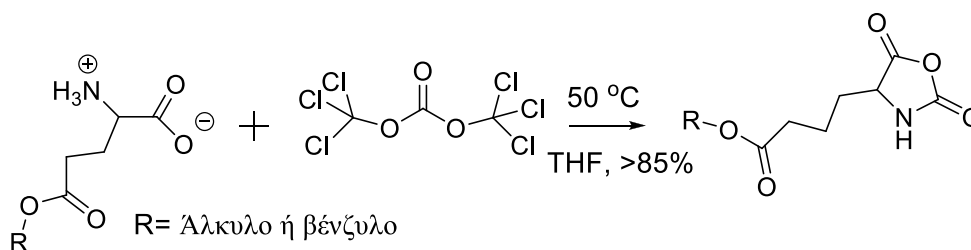


Σχήμα 2.11: Αριστερά δομή τριφωσγενίου από ακτίνες X^[53], δεξιά πορεία αντίδρασης με ένα πυρηνόφιλο Nu προς σχηματισμό του τελικού προϊόντος σύμφωνα με τον Eckert^[54].

Ο Eckert το 1987 πρότεινε μια κυκλική πορεία για τις πυρηνόφιλες αντιδράσεις του BTC. Σύμφωνα με το σχήμα 2.11 1/3 του BTC αντιδρά με 1/3 από το πυρηνόφιλο προς σχηματισμό 1/3 mole φωσγενίου. Στο επόμενο βήμα ένα δεύτερο και ένα τρίτο mole φωσγενίου δημιουργούνται, όπου αντιδρούν με 2/3 του πυρηνόφιλου προς σχηματισμό του τελικού προϊόντος.

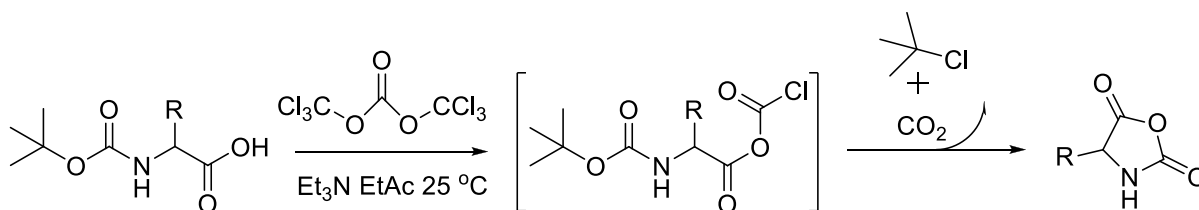
Πρώτος που χρησιμοποίησε το BTC στην σύνθεση των NCAs ήταν ο Roche^[55] το 1988 και αποτελεί σήμερα μια από τις πιο δημοφιλείς πορείες. Επιλέχτηκε το τριφωσγένιο διότι ήταν διαλυτό στα διάφορα μέσα που μετέχουν στην σύνθεση (THF) και καθαρισμό (εξάνιο) και έτσι θα ήταν εύκολο να εκδιωχθεί μέσω ανακρυσταλλώσεων του ανυδρίτη. Η

πορεία που πρότεινε ο Roche ήταν ιδιαίτερα αποδοτική για NCAs με μακριές αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες και προστασίες που δεν είναι ευαίσθητες σε όξινα περιβάλλοντα όπως η άλκυλο και βενζυλοξυκαρβόνυλο(Bz). Σε μια τυπική πορεία(σχήμα 2.13) αντιδρά 1/3 τριφωσγενίου σε αιώρημα του αμινοξέος σε THF(10g για κάθε 100ml) στους 40-50 βαθμούς μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές(το αμινοξύ αδιάλυτο σε THF ενώ ο ανυδρίτης όχι). Η αντίδραση αυτή είναι αρκετά εκλεκτική όταν ικανοποιούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις αλλά για αμινοξέα με μικρότερες πλευρικές ομάδες όπως η αλανίνη και η λευκίνη οι αποδόσεις πέφτουν γύρω στο 50%. Βρίσκει τέλεια εφαρμογή στις περιπτώσεις του γ-βενζυλογλουταμικού, της ο-βενζυλοτυροσίνης, της φαινυλαλανίνης της βαλίνης και σε όλους τους αλκυλοεστέρες του γλουταμικού οξέος.



Σχήμα 2.13: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Roche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.

Τρία χρόνια αργότερα ο Mobashery^[56] αναφέρει μια τροποποιημένη πορεία όπου ξεκινώντας από το N-BOC αμινοξύ και παρουσία τριαιθυλαμίνης ως δέκτη του υδροχλωρίου καταλήγει σε NCA με ηπιότερες συνθήκες σε ένα στάδιο. Σε ένα τυπικό πείραμα το N-BOC αμινοξύ και το τριφωσγένιο αναδεύονται σε οξικό αιθυλεστέρα(EtAc). Έπειτα προσθήκη τριαιθυλαμίνης στο διάλυμα με ταυτόχρονη καταβύθιση του υδροχλωρικού της άλατος οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσου(σχήμα 2.14). Η αντίδραση μπορεί να ελεγχθεί από το παραγόμενο CO₂ απλά με ένα συνδεδεμένο μανόμετρο στη φιάλη της αντίδρασης. Η διάρκεια της ποικίλει από δυο ως είκοσι ώρες ανάλογα με την φύση του αμινοξέος. Ο οξικός αιθυλεστέρας επιλέχθηκε καθώς σε αυτόν το σχηματιζόμενο άλας είναι τελείως αδιάλυτο και μπορεί να διαχωριστεί με απλή διήθηση ποσοτικά.



Σχήμα 2.14: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Mobashery, η μέθοδος είναι γενική και εφαρμόζεται και σε αμινοξέα με ευαίσθητες προστασίες σε οξέα.

Κλειδί στην αντίδραση αποτελεί ότι η BOC κατά τον σχηματισμό του ενδιαμέσου, λειτουργεί ως αποχωρούσα ομάδα και επιτρέπει στην αμινομάδα να προσβάλλει πυρηνόφιλα το καρβονύλιο της χλωροφόρμυλο ομάδας προς ενδομοριακή κυκλοποίηση και σχηματισμό του NCA. Οι αποδόσεις σε αυτή την πορεία είναι χαμηλότερες και προσδίδονται στην χαμηλότερη διαλυτότητα των NCAs στον οξικό αιθυλεστέρα από ότι στο τετραυδροφουράνιο. Επίσης οι αντιδράσεις διαρκούν περισσότερο και υπάρχει κίνδυνος ύπαρξης του άλατος της τριαιθυλαμίνης στον ανυδρίτη.

3.Μοριακός χαρακτηρισμός πολυμερών

3.1.Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών(SEC)

Μετά τις πρώτες προσπάθειες του Moore^[40,41] στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ή αλλιώς χρωματογραφία μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC), η τεχνική αναπτύχθηκε σημαντικά και σήμερα αποτελεί την ευρύτερα αναγνωρισμένη μέθοδο^[42] για τον προσδιορισμό του μέσου μοριακού βάρους, αλλά κυρίως της κατανομής μοριακών βαρών και την καθαρότητα των πολυμερών. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μεγαλομορίων, όπως τα πολυμερή^[43]. Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε στήλες στις οποίες μεταφέρεται το δείγμα από το φέροντα διαλύτη (για στυρενικά και διενικά πολυμερή ο πιο κοινός διαλύτης είναι το THF σε θερμοκρασία 40 °C). Οι στήλες περιέχουν κατάλληλα συσκευασμένο πορώδες υλικό με μεγάλο εύρος διαστάσεων πόρων ($10^2 - 10^6$ Å). 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^[44] (υδροδυναμικό όγκο) 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 (π.χ. πολυστυρένιο).

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 (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). 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. Για το λόγο αυτό στην περίπτωση μιγμάτων ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ή αστεροειδών ομοπολυμερών ή συμπολυμερών θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι:

- Για δεδομένο μοριακό βάρος ο υδροδυναμικός όγκος των διακλαδισμένων πολυμερών είναι μικρότερος του αντίστοιχου γραμμικού.

- Σε ένα συμπολυμερές, ο μερικός μοριακός όγκος M_i/V_h είναι διαφορετικός για κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες.

Συνεπώς, 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 της μορφής

$\log([\eta]M) = f(V_e)_{[45]}$ όπου $[\eta]$ είναι το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς με μοριακό βάρος M και V_e ο όγκος έκλουσής του. Σύμφωνα με την εξίσωση ιξώδους του Einstein $[\eta]M = 0,025N_A V_h$, όπου N_A η σταθερά Avogadro, το γινόμενο $[\eta]M$ είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου και η παγκόσμια καμπύλη αναφοράς θα είναι η ίδια ανεξάρτητα από το είδος και τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του πολυμερούς.

Συγκεκριμένα, λόγω της διαφοροποίησης στον υδροδυναμικό όγκο είναι αναγκαία η μετατροπή του “φαινομένου” μοριακού βάρους, που λαμβάνεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω κατάλληλων συντελεστών. Για παράδειγμα, το πραγματικό μοριακό βάρος των γραμμικών πολυισοπρενίων προκύπτει με πολλαπλασιασμό του “φαινομένου” μοριακού βάρους με το συντελεστή μετατροπής 0,625 αν η βαθμονόμηση έχει γίνει με πρότυπα πολυστυρένια. Στην περίπτωση πολύπλοκων αρχιτεκτονικών (π.χ. μικτόκλωνα αστεροειδή συμπολυμερή) δεν καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του ακριβούς μοριακού βάρους και τα αποτελέσματα είναι μόνο ποιοτικά. Αυτό οφείλεται στο ότι ο υδροδυναμικός όγκος των συμπολυμερών αυτών εξαρτάται και από τη δομή και από τη σύσταση.

Συμπεραίνουμε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μία εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μία πρώτη εικόνα για το πολυμέρες που παρασκευάστηκε, ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου.

3.2.Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός(NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^[46,47] είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα “χάρτη” του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και

τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I = 0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $I = 1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_I = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I = -1/2$) προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν τώρα με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία. Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα.

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}}. \quad (3.1)$$

Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, μπορούμε να πούμε ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου, λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα και έτσι να απορροφούν διαφορετικής συχνότητας (ενέργειας) ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:

$$\delta = (H_{\alpha} - H_{\delta}) / H_{\alpha} \times 10^6 \text{ ppm}, \quad (3.2)$$

$$\delta = (\nu_{\alpha} - \nu_{\delta}) / \nu_{\alpha} \times 10^6 \text{ ppm}, \quad (3.3)$$

όπου H_{α} και H_{δ} τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ ν_{α} και ν_{δ} οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις Σχέσεις 5.2 και 5.3, είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του $H_{\text{εφαρμοζόμενο}}$. Από τις ίδιες εξισώσεις φαίνεται ότι όσο πιο θωρακισμένος είναι ένας πυρήνας τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, όταν σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο, αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα, όταν μεταβάλλεται η ραδιοσυχνότητα.

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ^1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό

πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας $n+1$, πυρήνες με n ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+\chi)^n$. Έτσι για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται J . Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγγονται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου.

Τέλος, στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

3.3.Φασματοσκοπία υπερύθρου(IR)

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.

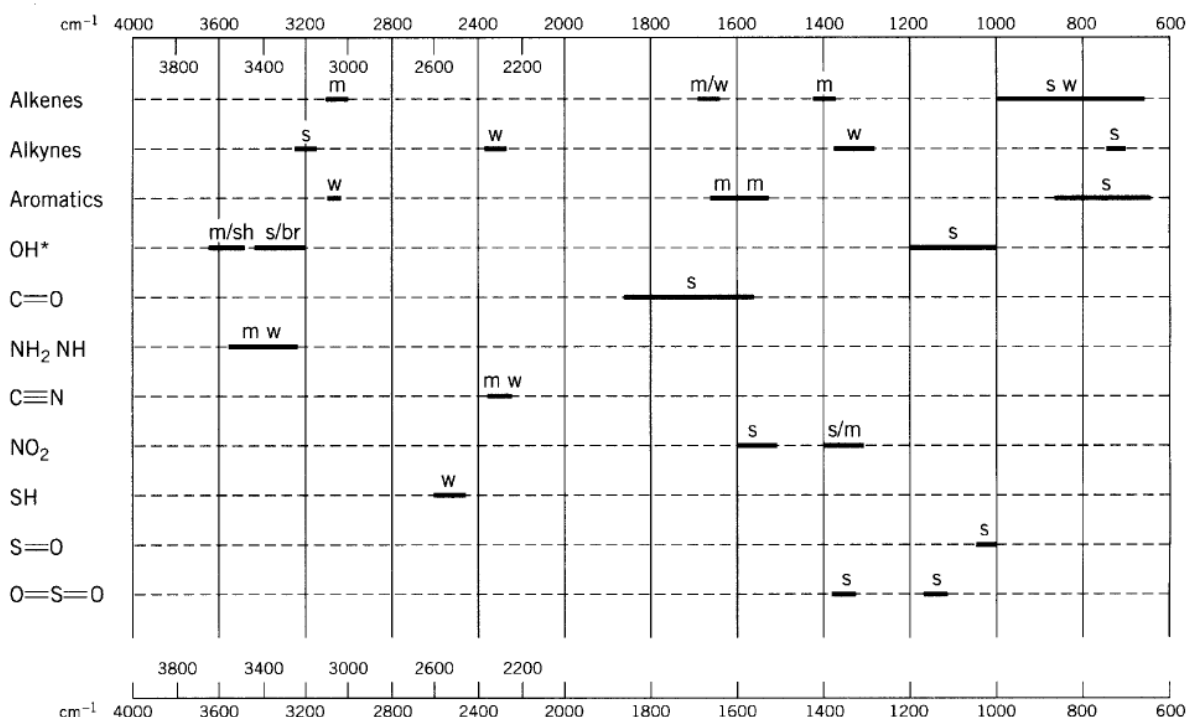
Η περιοχή υπερύθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ($7,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$), μέχρι τα 10^{-2} cm περίπου, αλλά μόνο η ενδιάμεση περιοχή, από τα $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$ ως τα $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, χρησιμοποιείται από τους οργανικούς 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 κυματάριθμους ($\square$) μάλλον παρά σε Hertz. Ο κυματάριθμος, που εκφράζεται σε μονάδες αντιστρόφων εκατοστώμετρων (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} . Χρησιμοποιώντας την εξίσωση $E = (20 \cdot 10^{-2} \text{ kJ/mol})/\lambda$, μπορούμε να υπολογίζουμε τα επίπεδα ενέργειας της ακτινοβολίας IR.

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

(Πίνακας 3.1). Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

Πίνακας 3.1: Απορροφήσεις διάφορων χαρακτηριστικών ομάδων με τις αντίστοιχες εντάσεις^[48].



Η υπέρυθη περιοχή από τις 4.000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:

- Η περιοχή από 4.000 cm^{-1} έως 2500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμήκυνσεις(τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή $3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1}
- Στην περιοχή $2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης(τάσης) του τριπλού δεσμού. Εδώ απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκύνια.
- Στην περιοχή από $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων συμβαίνει συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .

- Η περιοχή κάτω από τα 1500 cm^{-1} είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Εδώ εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X.

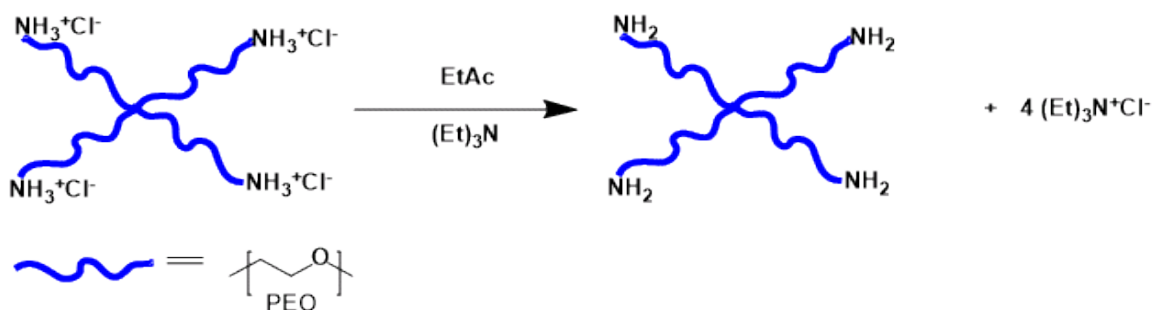
Γ.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Προετοιμασία απαρχητή

Ως απαρχητής θα χρησιμοποιηθεί το 4-κλωνο αστέρι πολυαιθυλενοξειδίου που στις άκρες του περιέχει αμινομάδες , και βρίσκεται με την μορφή άλατος με μοριακό βάρος $M_r=20.000$. Αρχικά θα πρέπει να καθαριστεί ο μακροαπαρχητής σε μορφή άλατος από τα μόρια HCl.

Πρώτο βήμα :

Ζυγίστηκαν 2,063 gr πολυ-αιθυλενοξειδίου και τοποθετήθηκαν σε μία δίλιμη φιάλη. Στην συνέχεια προστέθηκαν 20ml οξικού αιθυλεστέρα (EtAc) που είναι καλός διαλύτης προς την διάλυση του πολυ-αιθυλενοξειδίου, και αναδεύτηκαν έως ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές που σήμαινει ότι θα έχει διαλυθεί πλήρως το πολυ-αιθυλενοξείδιο. Στην συνέχεια προστέθηκε τρι-αιθυλαμίνη για την απομάκρυνση του HCl από την αμινομάδα με την μορφή άλατος, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Από την στοιχειομετρία της αντίδρασης μπορούν να βρεθούν τα mol των αμινομάδων στον μακροαπαρχητή $n = m / M_r$, όπου $m=2.036$ $M_r=20.000$. Άρα $n=0,0001018$ mol επί 4 (κλώνοι μακροαπαρχητή-αμινομάδες) ,τελικώς $n=0.0004072$ mol (αμινομάδων)

Επομένως τόσα mol HCl είναι συνδεδεμένα στις αμινομάδες του απαρχητή. Άρα τόσα mol τρι-αιθυλαμίνης θα πρέπει να προστεθούν για την απομάκρυνση του HCl. Υπάρχουν 0,0004072 mol τρι-αιθυλαμίνης επί 1,1 για να είναι σε περίσσεια , ώστε να είναι σίγουρο ότι θα αντιδράσουν όλα τα mol HCl ,επομένως $n=0,00044792$ mol τρι-αιθυλαμίνης.

Γνώριζοντας τα mol τρι-αιθυλαμίνης με μοριακό βάρος $M_r=101.19$ μπορούν να βρεθούν τα γραμμάρια που χρειάζονται από τον τύπο $m=n \times M_r$, δηλαδή $0,04532502 \text{ gr}$ τριαιθυλαμίνης.

Και από τον τύπο της πυκνότητας $d=m/V$ όπου $d=0,725$, άρα έχουμε $V=m/d=0.06247\text{ml}=62,47\mu\text{L}$.

Έπειτα ακολουθεί τιτλοδότηση του αρχικού διαλύματος που περιέχει το διαλυμένο τετράκλωνο άλας πολυαιθυλενοξειδίου με την ποσότητα τριαιθυλαμίνης που υπολογίσαμε παραπάνω.

Τοποθετείται το διάλυμα με την τριαιθυλαμίνη σε παγδόλουτρο (εικόνα 4. 1) περίπου 1,5h, ώστε να ξεκινήσει η καταβύθιση του άλατος.



Εικόνα 4. 1: Παγδόλουτρο

Στην συνέχεια γίνεται φιλτράρισμα σε φίλτρο νούμερο 4, για τον διαχωρισμό του άλατος από το υπόλοιπο διάλυμα.

Και τέλος ακολουθεί έλεγχος με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) , σε δείγμα απο το άλας για να δούμε αν είναι καθαρό αλάτι ή περιέχει και ποσότητα πολυθαιθυλενοξειδίου. Στο φάσμα του IR παρατηρήθηκε μια κορυφή που οφείλονταν στην ύπαρξη πολυθαιθυλενοξειδίου.

Δεύτερο βήμα :

Στο στάδιο αυτό το διάλυμα του προηγούμενου βήματος, που περιέχει διαλυμένο πολυαιθυλενοξείδιο με οξικό αιθυλεστέρα (EtAc), θα συνδεθεί με την γραμμή κενού(Εικόνα 4. 2).



Εικόνα 4. 2: Γραμμή κενού

Αρχικά τοποθετείται ένα μαγνητάκι για ανάδευση, στην δίλαιομη φιάλη που βρίσκεται το διάλυμα. Ανεβάζεται η φιάλη στην γραμμή κενού , αφού πρώτα τοποθετηθεί λίπος στο εσμύρισμα της φιάλης ώστε να αποφευχθεί το σπάσιμο της γραμμής.

Κλείνεται η στρόφιγγα του υδραργύρου (απομονώνεται ο υδράργυρος) για να απομακρυνθεί ο αέρας από το διάλυμα του πολυαιθυλενοξειδίου με οξικό αιθυλεστέρα (EtAc). Η στρόφιγγα που ενώνει την αντλία με την γραμμή ανοίγεται και έτσι τραβάται ο αέρας από την φιάλη. Γίνεται έλεγχος με το Tesla για να εξετάστεί πως όλα πάνε καλά. Η απaréωση συνεχίζεται βάζοντας υγρό άζωτο ώστε να παγώσει το διάλυμα. Απαιτείται καλό πάγωμα για να μην απομακρυνθεί ο οξικός αιθυλεστέρας προς την γραμμή. Απομονώνεται πάλι ο υδράργυρος κλείνοντας την στρόφιγγα που τον συνδέει με την γραμμή και ανοίγονται εκείνες που ενώνουν την αντλία με την φιάλη. Στο τέλος η στρόφιγγα του υδραργύρου ξανανοίγεται ώστε να ξανασυμμετάσχει στη γραμμή. Γίνεται έλεγχος ξανά με το Tesla.

Σε μια διπλανή θέση της γραμμής τοποθετείται μία άδεια φιάλη με τον ίδιο τρόπο , στην οποία θα μεταφερθεί ο διαλύτης. Δημιουργείται παντού κενό. Ακολουθεί το ξεπάγωμα του διαλύματος.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη θερμαίνοντας τη φιάλη που περιέχει πολυαιθυλενοξείδιο και οξικό αιθυλεστέρα, προστίθεται ζεστό νερό μέσα σε μία κάψα, τοποθετείται κάτω από το διάλυμα και ενεργοποιείται η ανάδευση του. Ακολουθεί πάγωμα της άδειας φιάλης με υγρό άζωτο. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ενεργειακή διαφορά οπότε σχηματίζεται οξικός αιθυλεστέρας σε μορφή αερίου (που έχει χαμηλότερο σ.ζ από το PEO) που μεταφέρεται στην άδεια φιάλη και παγώνει.

Όσο προχωράει η απόσταξη του διαλύτη, παρατηρείται ο σχηματισμός στερεού πολυαιθυλενοξειδίου στην πρώτη φιάλη. Μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης αφήνεται η φιάλη για μισή ώρα περίπου στην γραμμή προς ξήρανση.

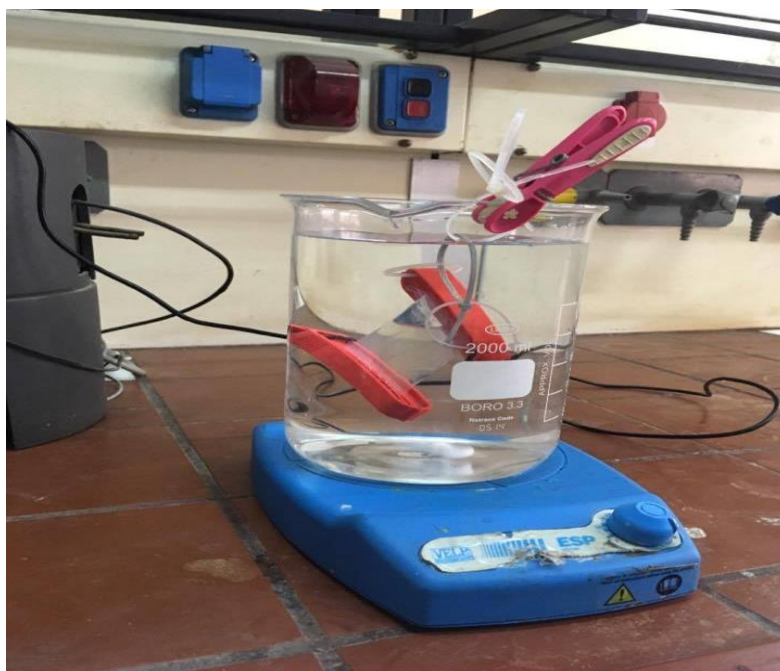
Στην συνέχεια συλλέγεται δείγμα από το στερεό PEO της φιάλης και πραγματοποιείται έλεγχος με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) , για να ελεγχθεί αν είναι καθαρό ή περιέχει υπολείμματα HCl.

Στο διάγραμμα (IR) παρατηρείται κορυφή που οφείλεται σε μόρια Cl , άρα ο απαρχητής δεν είχε καθαρίσει τελείως.

Τρίτο βήμα :

Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος dialysis. Αρχικά τοποθετείται ειδική μεμβράνη(κάθε cm ζελατίνης χωράει 10ml νερό) σε ποτήρι ζέσεως γεμάτο με νερό για περίπου 10 λεπτά ώστε να διογκωθούν. Έπειτα το διάλυμα του μακροαπαρχητή κλείνεται μεταξύ της ειδικής μεμβράνης και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 1000ml, όπου με την βοήθεια της ωσμωτικής πίεσης τα μόρια HCl θα απομακρυνθούν.

Την πρώτη μέρα τοποθετείται στο ποτήρι ζέσεως διάλυμα νερού και καυστικού νατρίου 1M(Εικόνα 4. 3) και αφήνεται για ένα ολόκληρο εικοσιτετράωρο. Την δεύτερη μέρα εκπλένεται με νερό και αφήνεται σε νερό. Την τρίτη μέρα ακολουθείται η ίδια διαδικασία.



Εικόνα 4. 3: Συσκευή dialysis

Ύστερα απο την διαδικασία dialysis, τοποθετείται το διάλυμα του απαρχητή στην γραμμή προς λυοφιλοποίηση (Freeze Drying).

Με τον όρο λυοφιλοποίηση εννοείται η μέθοδος αφυδάτωσης ενός προϊόντος με γρήγορη κατάψυξη, την οποία ακολουθεί η εξάτμιση τού σχηματισμένου πάγου. Η αρχή στην οποία στηρίζεται η λυόφιλη αποξήρανση συνίσταται στην απομάκρυνση τού ύδατος του

καταψυχθέντος υλικού με εξάχνωση. Η ουσία που πρόκειται να λυοφιλοποιηθεί καταψύχεται και στη συνέχεια φέρεται υπό χαμηλή πίεση ώστε να εξαχνωθεί το νερό το οποίο είχε μετατραπεί σε πάγο.

Στην συνέχεια γίνεται έλεγχος με IR σε δείγμα απο τον απαρχητή, απο το διάγραμμα δεν παρατηρείται κορυφή που οφείλεται στην ύπαρξη μορίων Cl, άρα ο απαρχητής έχει καθαρίσει.

4.2 Σύνθεση του τερτ-Βουτυλ προστατευμένο N-καρβοξυανυδρίτη της L-Τυροσίνη (Tyr (tBu) -NCA)

Σε μία στρογγυλή φιάλη προστέθηκε 3g (8,9mmol) Boc-Tyr (tBu) -OH με ένα μαγνητάκι ανάδευσης. Τοποθετείται η στρογγυλή φιάλη στην γραμμή κενού και αφήνεται προς ξήρανση για μία νύκτα.

Έπειτα προστίθονται 30 ml THF με απ'οσταξη στην στρογγυλή φιάλη δίνοντας ένα διαυγές διάλυμα. Γεμίζοντας την φιάλη αντίδρασης με αργό (Ar) τοποθετείται σε παγόλουτρο. Προστίθεται στάγδην σε περίοδο 10 λεπτών 0,95 mL (13,1mmol) θειονυλοχλωριδίου αραιωμένα σε 10 ml THF.. Η αντίδραση αφέθηκε στους 0° C για 1 h και στους 25 ° C για 3 ώρες, δίνοντας ένα διαυγές κίτρινο διάλυμα.^[50]

Στην συνέχεια το διάλυμα χύθηκε μέσα σε 700 mL εξανίου και ένα κίτρινο στερεό άρχισε να καθιζάνει. Το στερεό διηθήται και στη συνέχεια μεταφέρεται σε μία στρογγυλή φιάλη, η οποία τοποθετείται στην γραμμή κενού. Μία ποσότητα 40 ml οξικού αιθυλεστέρα αποστάχθηκε δίνοντας ένα κίτρινο εναιώρημα. Το εναιώρημα διηθήθηκε, και το διήθημα χύθηκε σε 600 mL εξανίου υπό έντονη ανάδευση. Τέλος, το λευκό στερεό ίζημα Tyr (tBu) - NCA απομονώθηκε με διήθηση και αφέθηκε προς ξήρανση όλη τη νύχτα στην στήλη υψηλού κενού.

Ζυγίστηκαν 1,85 g (7,0 mmol, 79% απόδοση παραγωγής). Η καθαρότητα του Tyr (tBu) -NCA επιβεβαιώθηκε με H-NMR και FTIR φασματοσκοπίας.

4.3 Σύνθεση του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι

Για τον πολυμερισμό θα χρησιμοποιηθεί συσκευή πολυμερισμού που σχεδιάστηκε και φτιάχθηκε από εμάς με την χρήση υαλουργίας. Η συγκεκριμένη συσκευή είναι μια 250αρα σφαιρική φιάλη στην οποία προσαρμόζεται ένα γυάλινο εξάρτημα ιδιοκατασκευής όπου θα προσθεθεί το μονομερές. Το εξάρτημα αυτό αποτελείται από ένα προσαρμοσμένο γυάλινο μπράτσο κολλημένο στην φιάλη, μια στένωση ώστε να μην πέσει ο breaker στο μπράτσο, ένα break seal, το τμήμα όπου τοποθετείται το μονομερές, που είναι μια γυάλινη ράβδος 18αρα που κλείνεται από κάτω και είναι ενωμένη με γυάλινη ράβδο 10αρα τύπου heavy wall(παχιά τοιχώματα γυαλιού), με προσαρμοσμένο εσμύρισμα που κολλάται από εμάς πάνω στην 10αρα ράβδο. Μια γέφυρα (14αρα γυάλινη ράβδος) ενώνει το break seal με το τμήμα που τοποθετείται το μονομερές.

Οπότε τοποθετείται για μια ημέρα η συσκευή πολυμερισμού, με το επιπλέον εξάρτημα που θα χρησιμοποιήθει, στον φούρνο ώστε να καθαρίσει. Την επομένη κολλάται με υαλουργία το εξάρτημα μας στην φιάλη, αφού προσαρμοστεί ο breaker πάνω από την μύτη του break seal και τοποθετηθεί εξωτερικά ένας άλλος μαγνήτης τυλίγοντας τον με κατάλληλη κολλητική ταινία ώστε να ελεγχθεί ο εσωτερικός μαγνήτης. Αφού τοποθετηθεί ο μαγνήτης ανάδευσης και κατάλληλη στρόφιγγα στην φιάλη τοποθετείται στην γραμμή κενού όπου απαερώνεται, ελέγχεται για τυχόν μικρές τρύπες με την βοήθεια πηνίου Tesla και αφού βεβαιωθεί ότι το σύστημα είναι στεγανό κάνουμε τρία flame drying για απομάκρυνση της υγρασίας. Στην συνέχεια ζυγίζεται 1 γραμμάριο από τον μακροαπαρχητή και τοποθετούνται στην φιάλη, η συσκευή τοποθετείται στην γραμμή κενού, απαερώνεται και αφήνεται μια νύχτα για ξήρανση.

Επόμενο βήμα είναι να αποσταχθεί βενζόλιο. Στόχος είναι να απομακρυνθεί ακόμα και σε ίχνη η υγρασία που έχει ο μακροαπαρχητής, καθώς το βενζόλιο με το νερό κάνουν αζεοτροπικό μίγμα^[49,50]. Μετά θα αφαιρεθεί όλος ο διαλύτης με την χρήση γραμμής κενού και έτσι μαζί με το βενζόλιο θα φύγει και η υγρασία. Αποστάζεται 30ml βενζολίου και αφού ο μακροαπαρχητής διαλυθεί καλά, τον αφήνουμε υπό ανάδευση για μια ώρα. Στην συνέχεια διώχνεται το αζεοτροπικό μίγμα με χρήση της γραμμής κενού και αφήνεται μια νύχτα ο μακροαπαρχητής για ξήρανση.

Την επομένη ημέρα ζυγίστηκε 1 gr μακροαπαρχητή και αποστάζεται στην συσκευή του πολυμερισμού που βρίσκεται στη γραμμή κενού 25ml DMF. Απομακρύνεται από την γραμμή, ξεπαγώνεται και ανακινείται μέχρι να διαλυθεί καλά ο μακροαπαρχητής στο DMF. Χρειάζεται προσοχή να μην πάει το διάλυμα στο break seal. Τοποθετείται κατάλληλο επίθεμα στο εσμύρισμα του εξαρτήματος για τον NCA αφού τοποθετηθεί λίπος και πιαστεί με κατάλληλο μεταλλικό keck, και τοποθετείται με την βοήθεια του επιθέματος στη γραμμή κενού και απαρώνεται. Πρέπει να υπάρχει κενό και εκεί ώστε να μπει στο glove box. Ελέγχεται για τρύπες το εξάρτημα για τον NCA και μετά τον έλεγχο απόλυτης στεγανότητας, πραγματοποιούνται τρία flame drying. Στην συνέχεια ζυγίζεται στο glove box 1 γραμμάριο L-Τυροσίνη (Tyr (tBu) -NCA). Τοποθετούνται στο εξάρτημα της συσκευής για τον NCA με την βοήθεια ενός μικρού χωνιού, αφού αφαιρεθεί το επίθεμα, το οποίο και θα ξανατοποθετηθεί μετά με προσθήκη λίπους και του keck. Τοποθετείται η συσκευή πολυμερισμού στην γραμμή κενού με την βοήθεια του επιθέματος και απαρώνεται, διώχνοντας το αδρανές αέριο που μπήκε στο glove box (Εικόνα 4. 4). Αποστάζεται σε αυτό το επιπλέον εξάρτημα, 10ml DMF και παγώνεται το διάλυμα πολύ καλά με την βοήθεια υγρού αζώτου. Αφού βεβαιωθεί ότι το διάλυμα έχει παγώσει πολύ καλά κόβεται με την χρήση φλόγας από πυρσό υαλουργίας η 10αρα υάλινη ράβδος τύπου heavy wall. Κρατάται παγωμένο το διάλυμα έως ότου κρυώσει το κομμένο γυαλί. Στη συνέχεια το διάλυμα ξεπαγώνεται με νερό κανονικής θερμοκρασίας και αφού ελεγχθεί ότι ο NCA διαλύθηκε καλά στο DMF σπάμε την μύτη του break seal και ανακινείται η φιάλη ώστε να ενωθεί με το διάλυμα DMF του μακροαπαρχητή (Εικόνα 4. 5). Αφήνεται το διάλυμα υπό έντονη ανάδευση και κατά διαστήματα ανοίγεται η στρόφιγγα για απομάκρυνση του CO₂ που παράγεται κατά τον πολυμερισμό.



Εικόνα 4. 4: Glove box



Εικόνα 4. 5: Συσκευή πολυμερισμού

4.4 Καταβύθιση του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι

Σε ένα ποτήρι ζέσεως των 500 ml προστίθενται 250 ml διαιθυλεθαίρα(Εικόνα 4. 6) ο οποίος είναι κακός διαλύτης για το πολυμερές αλλά αναμιγνύεται καλά με το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)^[49,50] που χρησιμοποιήθηκε κατα το στάδιο του πολυμερισμού για την διάλυση του μονομερούς της τυροσίνης. Στην συνέχεια τοποθετείται το διάλυμα του πολυμερούς στο ψυγείο στους -20 °C για περίπου 20-30 λεπτά.

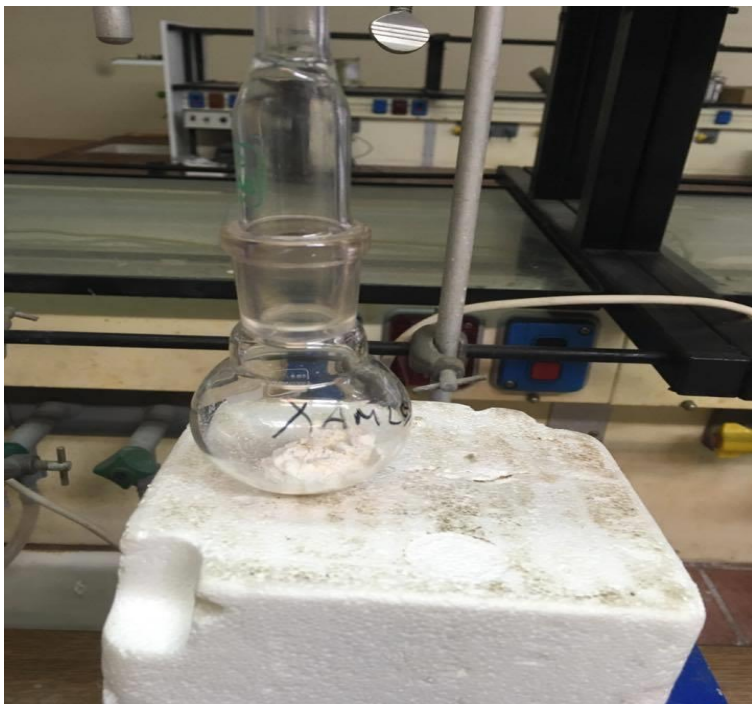


Εικόνα 4. 6: Προϊόν καταβύθισης poly (L-τυροσίνης) -PEO-Poly (L-τυροσίνης)

Έπειτα ακολουθεί διήθηση σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου 45 μm , λόγω του ότι ο διαιθυλεθέρας είναι ένας οργανικός διαλύτης. Για καλύτερο αποτέλεσμα συνδέεται το χωνί Buchner με αντλία λαδιού εφαρμόζοντας κενό κατά την διήθηση.

Λαμβάνεται το ποτήρι ζέσεως και υπο συνεχή ανάδευση ρίχνεται το διάλυμα πάνω στο φίλτρο. Το πολυμερές μένει πάνω στο φίλτρο και οι οργανικοί διαλύτες περνούν απο κάτω μέσα στο δοχείο, οι διαλύτες αυτοί (DMF,διδιοθειοεθέρης) πλέον μπορούν να πεταχτούν στα απόβλητα.

Τέλος συλλέγεται το πολυμερές απο το χωνί Buchner με μία σπάτουλα και μεταφέρεται σε στρογγυλή φιάλη με εσμύρισμα. Τοποθετείται λίπος στο εσμύρισμα της φιάλης και η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού. Η στρόφιγγα του υδραργύρου κλείνεται , για να απομακρυνθεί ο αέρας πάνω απο την φιάλη με το πολυμερές. Ανοίγεται η στρόφιγγα που ενώνει την αντλία με την γραμμή και έτσι τραβιέται ο αέρας από την φιάλη. Γίνεται έλεγχος με Tesla για να ελεγχθεί ότι έχει εφαρμοστεί κενό σε ολόκληρο το σύστημα. Η φιάλη αφήνεται στην γραμμή κενού προς ξήρανση του πολυμερούς(Εικόνα 4. 7).



Εικόνα 4. 7: Συσκευή απαέρωσης του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι

4.4 Αποπροστασία tert-Bu

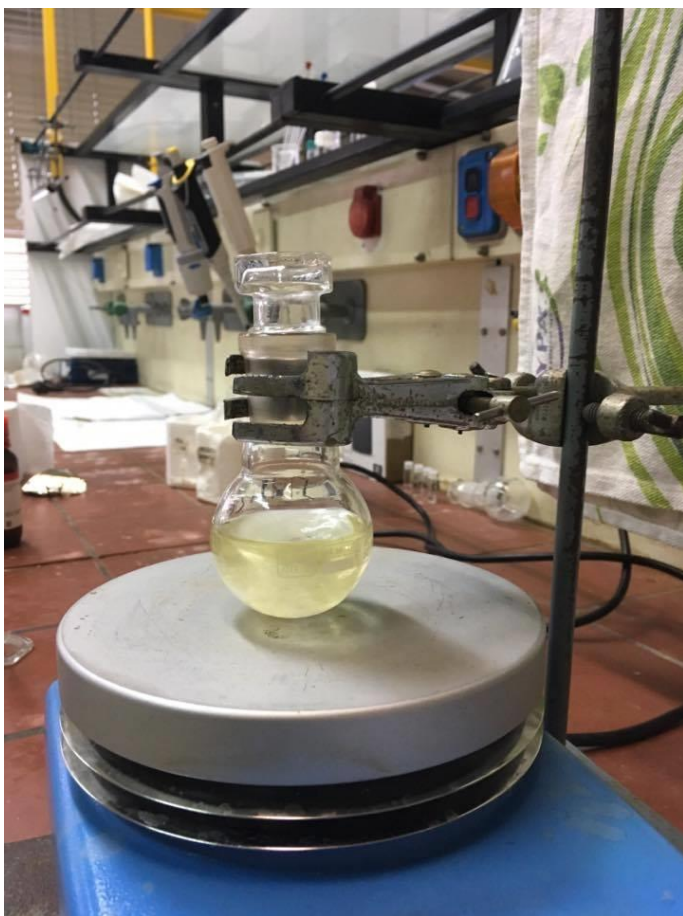
Στο στάδιο αυτό θα πραγματοποιηθεί η αποπροστασία της πλευρικής ομάδας OH του αμινοξέος (τυροσίνης) απο την προστατευτική ομάδα t-Bu.

Αρχικά πρέπει να διαλυθεί το πολυμερές. Μέσα στην στογγυλή φιάλη προστιθενται 10 ml δίχλωρομεθανίου (20% w/v) και ένα μαγνητάκι για ανάδευση. Αφήνεται το διάλυμα προς ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το πολυμερές(*Εικόνα 4. 8*).



Εικόνα 4. 8: Διάλυση πολυμερούς με δίχλωρομεθάνιο

Εφόσον έχει διαλυθεί καλά το πολυμερές, προστίθενται 10 ml τριφθοροξεικού οξέος (TFA)^[50] το οποίο θα κόψει την tert-Bu προστατευτική ομάδα. Το πολυμερές διαλύεται πλήρως και αφήνεται να αποπροστατεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται αλλαγή χρώματος στο διάλυμα από θωλό άσπρο σε διαυγές(*Εικόνα 4. 9*).

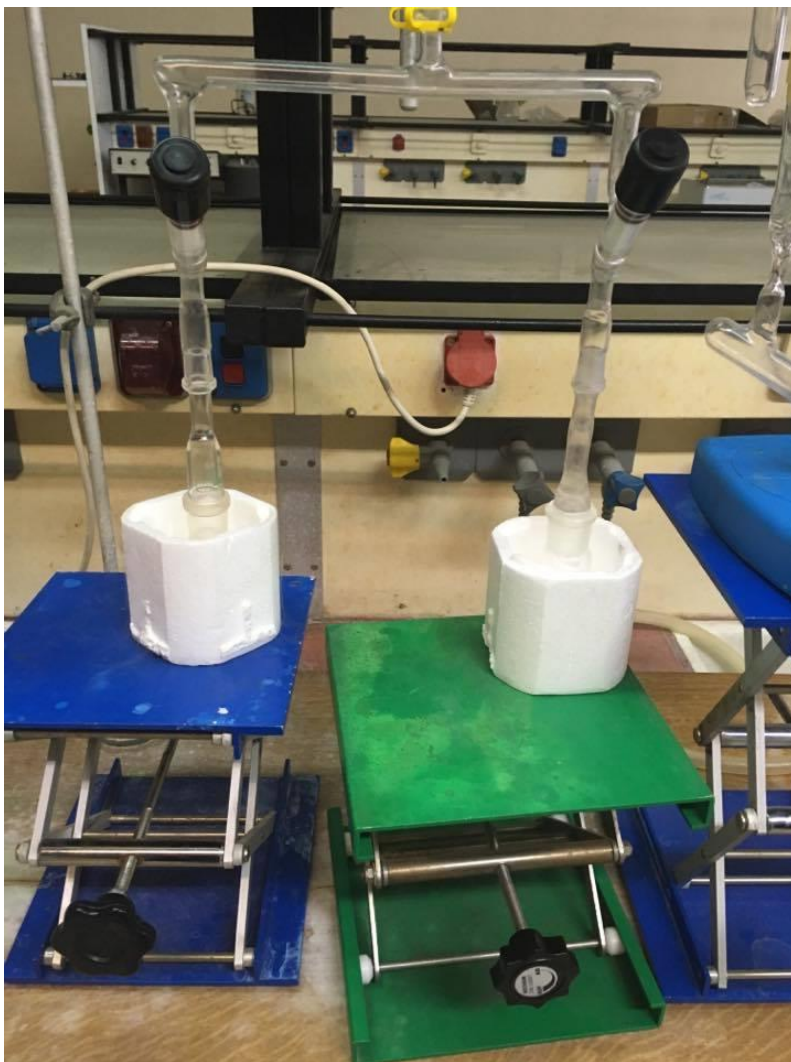


Εικόνα 4. 9: Έπειτα απο την προσθήκη TFA

Αυτό συμβαίνει διότι κατά την αποπροστασία της *tert*-Bu ομάδας τα π-ηλεκτρόνια του δακτυλίου της τυροσίνης συντονίζονται , με αποτέλεσμα να απορροφά ακτινοβολία στο UV. Η αλλαγή του χρώματος σε διαυγές είναι μια ένδειξη ότι η αντίδραση γίνεται καλά.

Εν συνεχεία προστίθενται ισομοριακή ποσότητα (σε σχέση με τον αριθμό των μονομερικών μονάδων Tyr) τριαίθυλου συλανίου (Scavenger) προς την δέσμευση των προστατευτικών ομάδων του *tert*-βουτυλίου.

Ύστερα το διάλυμα του πολυμερούς τοποθετείται στην γραμμή κενού προς απόσταξη των διαλυτών. Η απόσταξη θα γίνει με την βοήθεια -π-(Εικόνα 4. 10), που είναι μία βοηθητική στήλη, τοποθετείται πάνω στην βασική μας στήλη και μας βοηθάει στην απόσταξη διαλυτών όπως του Τριφθοροξεικού οξέος (TFA) , ώστε να μην βρωμίσουμε την στήλη κενού.



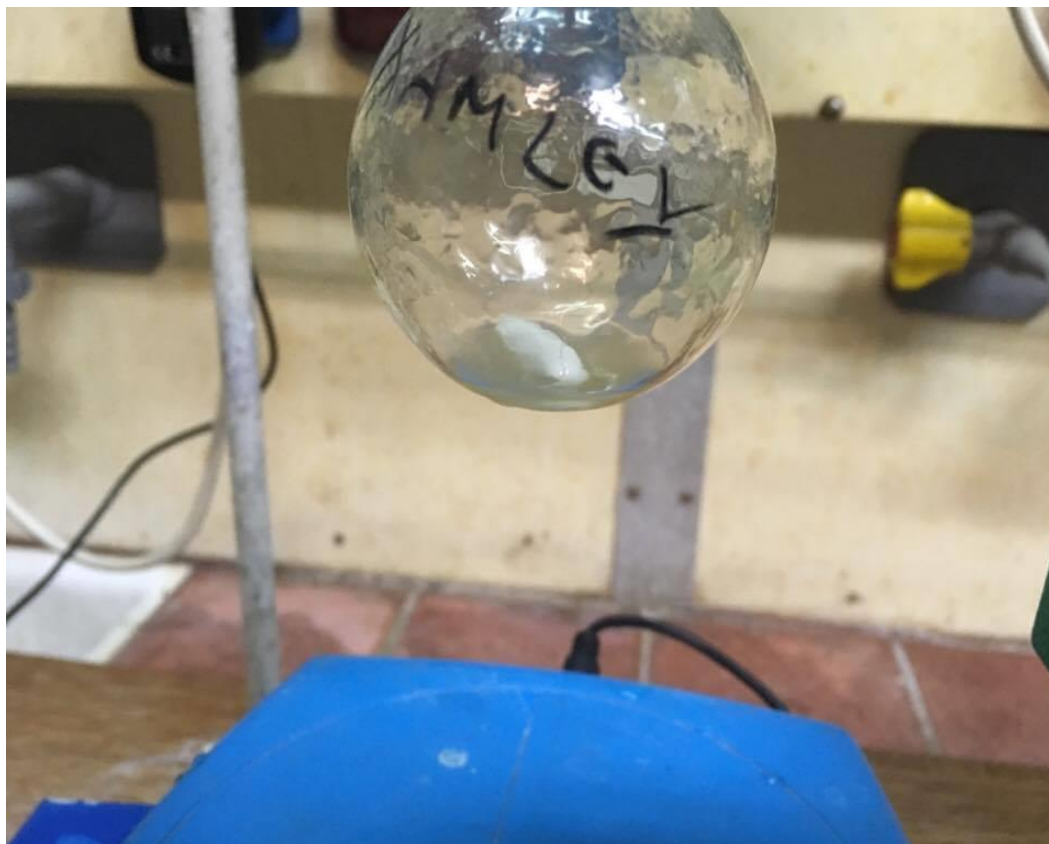
Εικόνα 4. 10: Βοηθητική στήλη -π-

Αρχικά εφαρμόζεται κενό στο -π-, στην συνέχεια στην μία θέση βάζεται η στρογγυλή φιάλη που περιέχει το διαλυμένο πολυμερές , και με την χρήση υγρού αζώτου παγώνεται έτσι ώστε να απαερωθεί πλήρως. Κλείνεται η στρόφυγγα που τον συνδέει με την στήλη.

Στην άλλη θέση τοποθετείται μία άδεια στρογγυλή φιάλη και εκεί θα αποστάξουν οι διαλύτες. Παγώνουμε την φιάλη με υγρό άζωτο. Τοποθετείται μια κάψα κάτω απο την στρογγυλή φιάλη που περιέχει το πολυμερές και προστιθέται ζεστό νερό για την θέρμανση του διαλύματος. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ενεργειακή διαφορά οπότε οι διαλύτες σχηματίζονται σε μορφή αερίου και μεταφέρονται στην παγωμένη άδεια φιάλη. Στο τέλος της

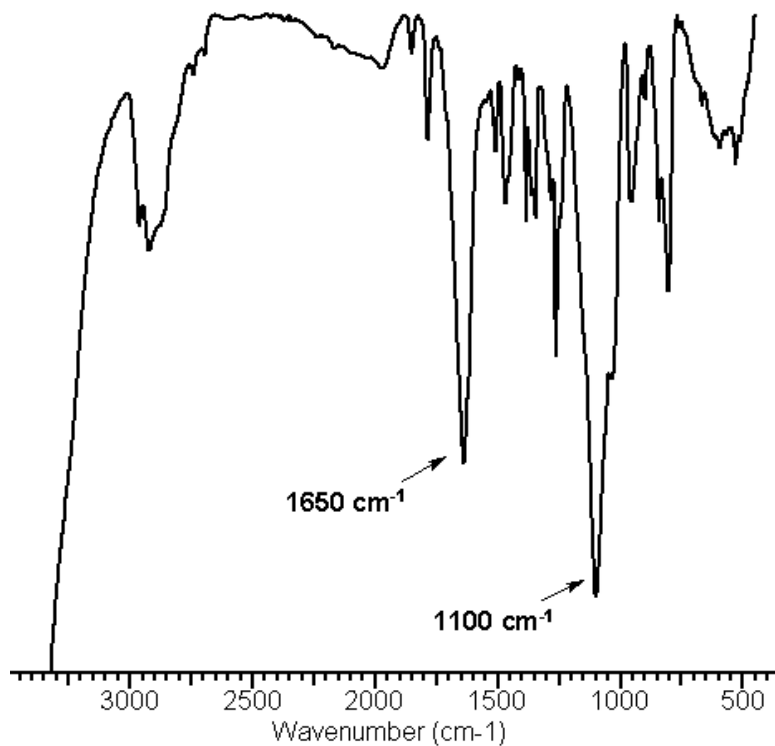
απόσταξης μένει μόνο το στερεό αποπροστατευμένο πολυμερές, αφήνεται προς ξήρανση στην στήλη τουλάχιστον για μία ημέρα(Εικόνα 4. 11).

Ζυγίστηκαν 0,4 gr poly (L-τυροσίνης) -PEO-Poly (L-τυροσίνης)



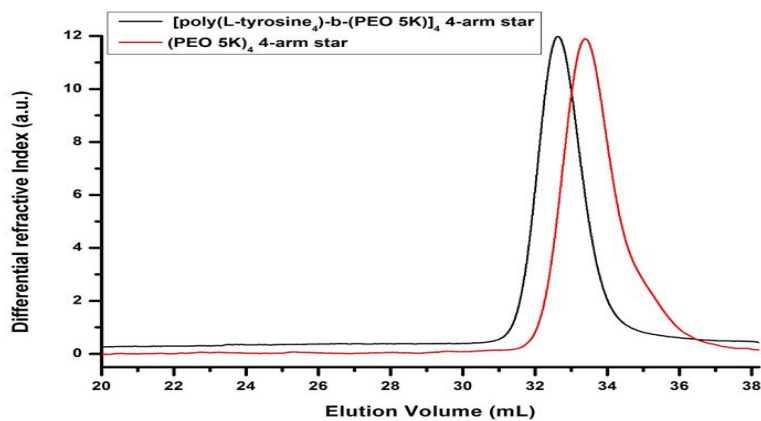
Εικόνα 4. 11: Τελική μορφή του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι μετά από την αποπροστασία

4.5 Χαρακτηρισμός πολυμερούς



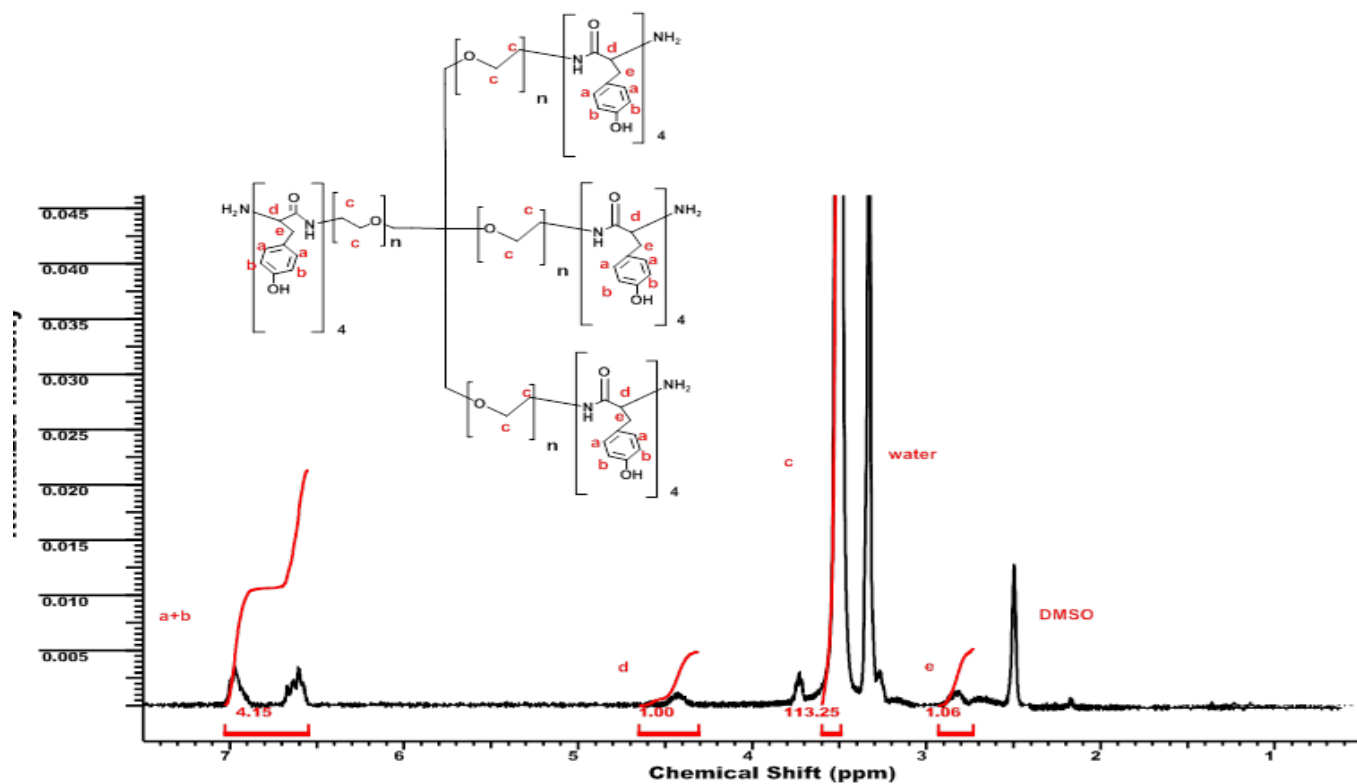
Σχήμα 4. 1: Φάσμα IR του [poly(L-tyrosine4)-b-(PEO 5K)]4 τετράκλωνο αστέρι

Παρατηρείται κορυφή στα 1650 cm^{-1} που οφείλεται στον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού, άρα έχει γίνει πολυμερισμός. Επίσης παρατηρείται κορυφή στα 1100 cm^{-1} που οφείλεται στο πολυαιθυλενοξείδιο. Η απουσία κορυφών στα $1780, 1850\text{ cm}^{-1}$ που οφείλονται σε κορυφές του καρβόξυανυδρίτη, δείχνει την απουσία των μονομερικών μονάδων τυροσίνης.



Σχήμα 4. 2: Χρωματογράφημα GPC του [poly(L-tyrosine₄)-b-(PEO 5K)]₄ τετράκλωνο αστέρι

Στο διάγραμμα αυτό διακρίνεται η καμπύλη του πολυμερούς σε σχέση με την καμπύλη του μακροαπαρχητή. Το πολυμερές έχει μεγαλύτερο M.B, με αποτέλεσμα να εκλούεται σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Η ομοιόμορφη στενή καμπύλη δείχνει ομοιογενές πολυμερισμό.



Σχήμα 4. 3: Φάσμα ^1H -NMR του $[\text{poly}(\text{L-tyrosine}4)\text{-}b\text{-(PEO 5K)}]_4$ τετράκλωνο αστέρι

Από την ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών προκύπτει ότι έχουν προστεθεί 16 μονομερικές μονάδες τυροσίνης.

Δ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stryer, L., Βιοχημεία I, 3η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997
2. Sewald, N , Jakubke , H , Peptides: Chemistry and Biology, Wiley, 2002
3. Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου, Βιοργανική Χημεία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2004.
4. Merrifield, R., Science, 1965, 150, 178
5. Merrifield, R. and Stewart, J., Nature, 1966, 207, 522
6. S. Cohen, A. Chang, H. Boyer, R. Helling, Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro, Proc. Nat. Sci. USA, 1973, 70, pp 3240-3244
7. D. A. Tirrell, M. Fournier, T. Mason, Genetic Engineering of Polymeric Materials, MRS Bull., 1991, 16 , pp 23-28
8. Gupta P, Vermani K, Garg S, Drug Discov. Today, 2002, 7,569
9. Jeong, B, Gutowska, A, Trends Biotechnol, 2002,20, 305
10. Galaev ,LY, Mattiasson, B., Trends Biotechnol, 2000, 17,335
11. Sharma, S., Kaur, P., Jain, A., Rajeswari, MR, Gupta, MN, Biomacromolecules, 2003, 4, 330
12. Peggion, E., Goodman, M., Pure & Appl. Chem., 1981, 53, 699
13. Heyns, K., Brockmann, R., Z. Naturforsch.,1954,96, 21
14. Katchalski, E., Shalitin, Y., Gehatia, M.,J. Am. Chem. Soc., 1955,77, 1925
15. Fessler, J., Ogston, J., Trans. Faraday Soc., 1951, 47, 667
16. Lundberg, R.D., Doty, P., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3961
17. Lundberg, R.D., Doty, P., J. Am. Chem. Soc., 1958, 78, 4810
18. Idelson, N., Blout, E.R., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3948
19. Goodman, M., Schmitt, E.E., J. Am. Chem. Soc.,1959, 81, 5507
20. Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Verdini, A.S., Die Makromol. Chem., 1966, 97, 113
21. Idelson, N., Blout, E.R., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 2387
22. Bamford, C.H., Block, H., Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins, Univ. Wisc. Press, 1962
23. Szwarc, M., Advan. Polymer Sci., 1965, 4, 1
24. Knobler, Y., Bittner, S. and Frankel, M., *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3941
25. Knobler, Y., Bittner, S., Virov, D. and Frankel, M., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 1821

26. Dimitrov, I. and Schlaad, H., *Chem. Commun.*, **2003**, 2944
27. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 1653
28. Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., *J.Org. Chem.*, **1965**, 30, 1158
29. Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., *J.Org. Chem.*, **1966**, 31, 142
30. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2005**, 43, 4670
31. Karatzas, A.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Inoue, K.; Sugiyama, K.; Hirao, A., *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 2072
32. Sakellariou, G., Pitsikalis, M., Iatrou, H.; Hadjichristidis, N., *Chem. Rev.*, **2009**, 00, 0000
33. Pickel, D., Politakos, N., Avgeropoulos, A., Messman, J., *Macromolecules*, **2009**, XXX, 000
34. Vayaboury, W., Giani, O., Cottet, H., Deratani, A. and Schué, F., *Macromol. Rapid. Commun.*, **2004**, 25, 1221
35. Leuchs, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1906**, 39, 857
36. Leuchs, H. ; Geiger, W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1908**, 41, 1721
37. Leuchs, H., Mannase, W., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1907**, 40, 3235
38. F. Fuchs, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1922, 55, 2943
A. C. Farthing, *J. Chem. Soc.*, 1950, 3213
39. Fuchs, F. *Chem. Ber.*, 1922, 55, 2943
40. Moore, J. C., *J. Polym. Sci.*, **1964**, A2, 835
41. Moore, J. C. and Hendrickson, J. G., *J. Polym. Sci.*, **1965**, C8, 233
42. Balke, S. T., *Modern Methods Of Polymer Characterization*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1991**
43. Χατζηχρηστίδης, Ν. Χ., *Χημεία Πολυμερών*, Αθήνα, **1983**
44. McCaffery, E. L., *Laboratory Preparation for Macromolecular Chemistry*, McGraw – Hill Book Co., New York, **1970**
45. Grubisic, Z., Rempp, P. and Benoit, H., *J. Polym Sci. Phys. Ed.*, **1967**, 5, 753
46. McMurry, J., *Οργανική Χημεία Ι*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, **1998**
47. Yalcin, T. and Li, L., *J. Am. Soc. Mass Specrom.*, **1998**, 9, 1303
48. Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, **2004**

49. S. Kirkham, Valeria Castelletto, Ian W Hamley, Mehedi Reza, Janne, Ruokolainen, Daniel Hermida Merino, Panayiotis Bilalis, and Hermis Iatrou, Self-Assembly of Telechelic Tyrosine End-Capped PEO and Poly(alanine) Polymers in Aqueous solution. *Biomacromolecules* 2016, 17, 1186-1197.
50. Hamley, I. W. Kirkham, S. Dehsorkhi, A. Castelletto, V. Adamcik, J. Mezzenga, R. Ruokolainen, J. Mazzuca, C. Gatto, E. Venanzi, M. Placidi, E. Bilalis, P. Iatrou, H., Self-Assembly of a Model Peptide Incorporating a Hexa-Histidine Sequence Attached to an Oligo-Alanine Sequence, and Binding to Gold NTA/Nickel Nanoparticles. *Biomacromolecules* 2014, 15, 3412-3420.
51. Bergmann, M., Zervas, L., Ross, W., *J. Biol. Chem.*, **1935**, 111, 245
52. Ben-Ishai, D. ; Katchalski, E. *J. Am. Chem.. Soc.*, **1952**, 74, 3688