

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Magdalena Paluch

Rozprawa doktorska pt.

**„Projektowanie, synteza i badanie właściwości responsywnych
polimerów z funkcją termo-uwalniania”**

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
celem uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor: dr hab. Marcin K. Chmielewski

Promotor pomocniczy: dr Marcin Jarek

Poznań 2023

Serdeczne podziękowania składam:

*Promotorowi, dr. hab. Marcinowi K. Chmielewskiemu, prof. IChB PAN
za wsparcie i opiekę przez czas trwania doktoratu
oraz za energetyzujące dyskusje naukowe.*

*Dr. Marcinowi Jarkowi
za cenne rady i okazaną pomoc.*

*Dr. Jolancie Brzezińskiej
za gotowość do pomocy i krytyczne uwagi.*

*Wszystkim obecnym i byłym współpracownikom Zakładu Chemii Biopolimerów
za miłą atmosferę pracy i okazaną serdeczność, w szczególności
mgr inż. Dominice Krygier
za serdeczność, wsparcie i pomocną dłoń.
Dr. Agnieszce Witkowskiej oraz dr. Annie Stasińskiej
za wspólne rozmowy i motywację.*

*Wszystkim stałym bywalcom 115
za śmiech przy porannej kawie.*

*Mamie oraz Siostrom
za wiarę we mnie, pozytywne afirmację oraz nieocenione wsparcie.*

*Moim wyjątkowym Chłopakom -
bez Was To i Wszystko, nie miałoby sensu.*

Pracę dedykuję mojemu śp. dziadkowi – Rudolfowi

Streszczenie

Materiały polimerowe, w szczególności takie, które reagują na zmianę czynników środowiska zewnętrznego, znajdują coraz większe zastosowanie w biomedycynie. Różnica we właściwościach fizykochemicznych tego typu układów polimerowych, zwanych również „inteligentnymi polimerami”, jest odpowiedzią na zmianę temperatury, pH, czy stężenia konkretnego związku chemicznego.

Przemiana w polimerach o właściwościach responsywnych wywołana działaniem czynnika zewnętrznego, zazwyczaj jest procesem odwracalnym, a układ wraca do stanu początkowego, kiedy bodziec zostanie usunięty. Niniejsza dysertacja dotyczy syntezy oraz badania właściwości nowych materiałów polimerowych charakteryzujących się funkcją termo-uwalniania, czyli wrażliwością na temperaturę. Opracowane w pracy homopolimery i kopolimery ulegają nieodwracalnym przemianom, w wyniku których następuje uwolnienie bicyklicznego związku modolewego. Synteza tych materiałów bazuje na nowo zaprojektowanych monomerach z termowrażliwym ugrupowaniem 2-pirydynylowym. Pochodne tego typu ulegają procesowi wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji inicjowanej temperaturą, który dla układów makromolekularnych został wykorzystany jako mechanizm uwalniania modelowych związków bicyklicznych. Opracowanie nowych materiałów termoresponsywnych jest ważnym problemem badawczym, gdyż polimery termo- i pH-responsywne często znajdują zastosowanie w systemach dostarczania leków lub jako nośniki substancji aktywnych biologicznie.

W toku prac badawczych otrzymano responsywne homopolimery PMPyAEA, PBPyAEA, PMPyAPA oraz serie kopolimerów statystycznych PNIPAM-co-PMPyAEA, charakteryzujących się zarówno odwracalną, jak i nieodwracalną czułością na zmiany temperatury. W tym celu zoptymalizowano metodę kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT) oraz uniwersalnym reagentem RAFT, jako czynnikiem wzrostu łańcucha. Prezentowane polimery otrzymano z zaprojektowanych monomerów z ugrupowaniem 2-pirydynylowym, pozwalających na prowadzenie termicznie kontrolowanego uwalniania związku bicyklicznego z układu makromolekularnego. W wyniku tego procesu modelowy termo/pH-responsywny polimer jest przekształcany w układ jonowy, w którym łańcuch pH-responsywnego poli(kwasu akrylowego) jest naładowany ujemnie, a uwalniany związek bicykliczny - dodatnio. Struktura chemiczna otrzymanych homo-

i kopolimerów została potwierdzona przy użyciu metod spektroskopowych (NMR, FT-IR). Ponadto, przy użyciu chromatografii wykluczenia (GPC/SEC) oraz spektroskopii NMR, dla każdego z otrzymanych produktów została określona masa molowa i polidispersyjność.

Wyniki badań pokazały, że proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, a tym samym szybkość uwalniania związku bicyklicznego, może być kontrolowana poprzez modyfikację struktury monomeru oraz protonację endogennego azotu w ugrupowaniu 2-pirydynylowym. Dzięki zmianie profilu absorpcyjnego układu, proces termocyklizacji może być monitorowany przy użyciu spektroskopii UV-Vis. Dodatkowo znaczące zmiany struktury chemicznej przy przejściu formy liniowej łańcucha bocznego do jonowego układu cyklicznego, mogą być monitorowane za pomocą ^1H NMR.

Otrzymane wyniki badań są doskonałym punktem wyjścia, do projektowania polimerowych systemów dostarczania substancji aktywnych biologicznie oraz ich kontrolowanego termo-uwalnianiu poprzez proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

Abstract

Polymer materials in particular those being able to adapt to changes in environmental conditions are of increasing interest and application in biomedicine. The alteration in physical and chemical properties such polymeric systems, also known as “smart polymers”, is a response to the change in environmental parameters, like temperature, pH, or concentrations of certain chemical compounds.

The transformation in responsive polymers caused by an external trigger is usually a reversible process, and the system returns to its initial state when the stimulus has been removed. This dissertation is devoted to the synthesis and studies of properties of new polymeric materials with characteristic of the thermo-release feature, which is an irreversible thermo-sensitivity. The homopolymers and copolymers developed in the presented work undergo irreversible transformations, resulting in the release of a bicyclic model compound. The synthesis of these materials is based on newly designed monomers with a thermosensitive 2-pyridinyl function. Derivatives of this kind undergo temperature initiated intramolecular cyclization, which has been accepted as a mechanism of release of model bicyclic compounds for macromolecular systems. Development of new thermo-responsive materials is an important scientific task, as thermo- and pH-responsive polymers are often used in drug delivery systems or as carriers of biologically active substances.

In presented research, responsive homopolymers PMPyAEA, PBPYAEA, PMPyAPA, and a series of statistical copolymers PNIPAM-co-PMPyAEA, both reversible and irreversible thermo-sensitive, were obtained. For this purpose, the controlled radical polymerization with addition-fragmentation chain transfer (RAFT) together with universal RAFT reagent as a chain transfer agent, were optimized. Polymers of interest were obtained from designed monomers containing 2-pyridinyl group, allowing thermally controlled release of the bicyclic compound from the macromolecular system. As a result of this process, the model thermo/pH-responsive polymer is transformed into an ionic system in which the pH-responsive poly(acrylic acid) chain is negatively charged, and the released bicyclic compound is bearing a positive charge. The chemical structure of homo- and copolymers was confirmed by spectroscopic methods (NMR, FT-IR). Additionally, molar mass and polydispersity were determined for each of the obtained products using size exclusion chromatography (GPC/SEC) and NMR spectroscopy.

The results of presented study indicate that the process of intramolecular cyclization, and thus the rate of release of the bicyclic compound, can be controlled by modifications in chemical structure of the monomer and the protonation of endogenous nitrogen in 2-pyridinyl moiety. The thermocyclization process can be monitored using UV-Vis spectroscopy, due to the absorption profile change. In addition, significant chemical structure transformations, i.e., the transition of the linear form of the side chain to the ionic form can be successfully monitored by ^1H NMR.

Results obtained in presented investigations are an excellent starting point for the design of polymer systems useful in delivery of biologically active substances and their controlled thermo-release through the process of intramolecular cyclization.

Dorobek naukowy

Publikacje

- **M. Paluch**, D. Wang, M. R. Buchmeiser, M. K. Chmielewski: *Pyridin-2-yl-substituted smart polymers sensitive to thermally triggered side group cyclization*. European Polymer Journal, March 2023, Volume 186, IF 5.546,
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111865>
- P. Piszcz, **M. Woźniak**, M. Asztemborska, B.K. Głód: *Comparative Analysis of Antioxidative Activity of Flavonoids Using HPLC–ED and Photometric Assays*. Food Analytical Methods August 2014, Volume 7, Issue 7, pp 1474–1480, IF 3.498,
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9776-4>

Doniesienia konferencyjne

- **M. Paluch**, M. Jarek and M.K. Chmielewski; *Stimuli-responsive polymers with intramolecular thermal cyclization function as potential polymeric carriers*, International Soft Matter Conference (ISCM), Poznań, 2022 – plakat naukowy
- **M. Paluch**, M. Jarek and M.K. Chmielewski; *Wrażliwe na bodźce nośniki polimerowe z aktywowaną termicznie funkcją uwalniania*, 64 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, 2022 – plakat naukowy
- **M. Paluch**, M. Jarek and M.K. Chmielewski; *Response character of PMPyAEA and PMPyAPA thermo-responsive polymers*; AMPERE NMR School 2021, Zakopane, 2021 – plakat naukowy
- **M. Paluch**, M. Jarek and M.K. Chmielewski; *Intramolecular cyclization study of PMPyAEA and PMPyAPA thermo-responsive polymers*; NanoTech Poland 2021, Poznań, 2021 – plakat naukowy
- Young Researchers Forum; *Designing the novel thermo-responsive polymers*, NanoTech Poland 2019, Poznań 2019 - wystąpienie ustne w języku angielskim

- **M. Paluch**, J. Brzezińska and M.K. Chmielewski; *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerization as a starting point to innovative thermo-response biopolymers developing*; NanoTech Poland 2018, Poznań 2018 – plakat naukowy

Staż naukowy

- Staż zagraniczny w grupie badawczej Prof. Dr. Michaela R. Buchmeisera, Institute of Polymer Chemistry, University of Stuttgart, Germany, 01.08.2021 - 30.11.2021 (4 m-ce)

Praca została zrealizowana w ramach projektu POWER „Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii”, POWR.03.02.00-00-I032/16

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	9
Dorobek naukowy	11
Objaśnienie skrótów	18
Założenia i cel pracy.....	21
I. Część literaturowa	23
1 Polimery wykorzystywane w biomedycynie	23
1.1 Polimery jako nośniki substancji aktywnych biologicznie	23
1.2 Koniugaty nośnik polimerowy-lek	24
1.3 Koniugaty polimer-białko	25
1.4 Kompleksy polimer-DNA.....	26
1.5 Systemy dostarczania leków.....	27
2 Polimery wrażliwe na bodźce	29
2.1 Polimery wrażliwe na zmiany pH.....	30
2.2 Polimery wrażliwe na zmiany temperatury.....	32
2.2.1 Teoria Flory-Hugginsa	33
2.2.2 Dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności	34
2.2.3 Górna krytyczna temperatura rozpuszczalności.....	35
3 Metody otrzymywania responsywnych polimerów	36
3.1 Polimeryzacja rodnikowa.....	36
3.1.1 Polimeryzacja z odwracalną dezaktywacją	38
3.2 Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)	40

3.2.1	Mechanizm polimeryzacji RAFT	40
3.2.2	Czynnik przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT	42
4	Metody identyfikacji masy molowej	45
4.1	Chromatografia wykluczenia (GPC/SEC).....	48
4.1.1	Główne zasady doboru optymalnych warunków rozdzielania polimerów	50
4.1.2	Krzywa kalibracyjna.....	51
4.2	Metoda grup końcowych.....	53
5	Związki 2-pirydynylo-TGO	54
II.	Badania własne i dyskusja wyników.....	57
1	Otrzymywanie alkoholowych prekursorów monomerów	57
2	Otrzymywanie monomerów 2-pirydynyloowych.....	61
3	Otrzymywanie polimerów responsywnych.....	62
3.1	Otrzymywanie poli(<i>N</i> -izopropylakrylamidu) – PNIPAM _(DDMAT)	62
3.2	Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) –PMPyAEA	67
3.2.1	Polimeryzacja PMPyAEA przy użyciu DDMAT jako reagent RAFT.....	67
3.2.2	Polimeryzacja PMPyAEA z użyciem uniwersalnego reagenta RAFT	73
3.3	Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(benzylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) – PBPyAEA	79
3.4	Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu) – PMPyAPA	81
4	Charakterystyka fizykochemiczna homopolimerów	84
4.1	Spektroskopia w podczerwieni.....	85
4.2	Określenie masy cząsteczkowej.....	89
4.2.1	Analiza grup końcowych przy użyciu widm ¹ H NMR.....	89
4.2.2	Analiza chromatograficzna (GPC/SEC).....	92

4.3	Wyznaczenie dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności dla polimerów PNIPAM	96
4.4	Analiza termiczna.....	99
4.4.1	Pomiary TGA.....	99
4.4.2	Pomiary DSC.....	102
5	Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja	104
5.1	Pomiary UV-Vis	104
5.2	Pomiary $^1\text{H-NMR}$	112
6	Otrzymywanie kopolimerów responsywnych - PNIPAM-co-PMPyAEA.....	117
7	Charakterystyka fizykochemiczna PNIPAM-co-PMPyAEA.....	119
8	Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja w kopolimerach	122
8.1	Pomiary $^1\text{H-NMR}$	122
8.2	Pomiary UV-Vis	124
III.	Najważniejsze wyniki.....	127
IV.	Część eksperymentalna	129
1	Materiały	129
1.1	Rozpuszczalniki organiczne.....	129
2	Metody	130
2.1	Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa.....	130
2.2	Reaktor mikrofalowy	130
2.3	Spektroskopia NMR i spektrometria mas	130
2.4	Spektroskopia UV-Vis.....	131
2.5	Spektroskopia FT-IR	132
2.6	Chromatografia GPC/SEC.....	132
2.7	Analiza termiczna.....	134

2.8	Oprogramowania specjalistyczne.....	134
2.9	Synteza chemiczna.....	135
2.9.1	Otrzymywanie 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etanolu (3a)	135
2.9.2	Otrzymywanie 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etanolu (3b)	136
2.9.3	Otrzymywanie 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propan-1-olu (3c).....	137
2.9.4	Otrzymywanie akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (4a).....	138
2.9.5	Otrzymywanie akrylanu 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etylu (4b)	139
2.9.6	Otrzymywanie akrylanu 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu (4c).....	140
2.9.7	Otrzymywanie poli(<i>N</i> -izopropylaktylamidu) (PNIPAM)	141
2.9.8	Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) (5a)	143
2.9.9	Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etylu) (5b)...	144
2.9.10	Otrzymywanie poli(akrylanu 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu) (5c, 8c)	145
2.10	Izolacja produktów cyklicznych	146
2.10.1	Otrzymywanie 2,2-dichlorooctanu 1-metylo-2,3-dihydro-1H-imidazolo[1,2- α]pirydyniowego (6a)	147
2.10.2	Otrzymywanie octanu 1-benzyl-2,3-dihydro-1H-imidazolo[1,2- α]pirydyniowego (6b).....	147
2.10.3	Otrzymywanie octanu 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydropirydylo[1,2- α]pirymidyniowego (9).....	148
2.11	Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM _x -PMPyAEA _y	148
2.11.1	Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM _{0,93} -PMPyAEA _{0,07}	148
2.11.2	Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM _{0,80} -PMPyAEA _{0,20}	150
2.11.3	Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM _{0,60} -PMPyAEA _{0,40}	151
2.12	Widma 2D NMR	152
2.13	Wyniki analizy chromatograficznej.....	155

V. Bibliografia..... 161

Objaśnienie skrótów

2PyTGO – 2-pirydynylowe termolabilne grupy ochronne

4VP - 4-winylopirydyna

AA – kwas akrylowy

ACHN - 1,1'-azobis-(cykloheksankarbonitryl)

AM - akrylamid

AMRP – polimeryzację z udziałem rodników aminoksylowych (ang. *aminoxyl-mediated radical polymerization*)

AN - akrylonitryl

API - substancja aktywna farmaceutycznie (ang. *active pharmaceutical ingredient*)

ATR - wewnętrznego odbicia promieniowania w podczerwieni (ang. *attenuated total reflectance*)

ATRP - polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. *atom transfer radical polymerization*)

Bd - butadien

BPVS - siarczek 4-bromofenylo winylu

Cp – chloropren

Cys – cysteina

COSY – ang. *correlated spectroscopy*

CTA – czynnik przeniesienia łańcucha (ang. *chain transfer agent*)

DCA - kwas dichlorooctowy

DCM – dichlorometan

DDS - systemy dostarczania leków (ang. *drug delivery systems*)

DDMAT – kwas 2-

(dodecylotiokarbonotioyltio)-2-metylopropianowy

DMAEMA – metakrylan *N,N*- dimetyloaminoetylu

DMAPMA - metakrylan *N*-3-(dimetylamino)propylu

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DOX – doksorubicyna

DSC – skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *differential scanning calorimetry*)

DTRP - polimeryzacji rodnikowej z degeneratywnym przeniesieniem łańcucha (ang. *degenerative chain transfer polymerization*)

EDG – ang. *electron donating group*

EWG - ang. *electron withdrawing group*

FT-IR - spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transformation infrared spectroscopy*).

GA – octan glatirameru

GPC - chromatografia żelowa (ang. *gel permeation chromatography*).

GT - terapia genowa (ang. *gene therapy*)

HEA - akrylan 2-hydroksyetylu

HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)

HPMA – *N*-(2-hydroksypropylo)meta-kryloamid

HR-MS – spektrometria mas wysokiej rozdzielczości (ang. *high-resolution mass spectrometry*)

HSQC - ang. *heteronuclear single quantum correlation*

HMBC – ang. *heteronuclear multiple bond correlation*)

Hz – herz

Ip - izopren

IR – spektroskopia w podczerwieni (ang. *infrared spectroscopy*)

IUPAC - Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LAM – „słabiej aktywowane” monomery (ang. *“less activated” monomers*)

LCST - dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności (ang. *lower critical solution temperature*)

MAA – kwas metakrylowy

MALDI – metoda jonizacji próbki w spektrometrii mas (ang. *matrix assisted laser desorption and ionization*)

MAM - „bardziej aktywowane” monomery (ang. *„more activated” monomers*)

MW – mikrofałe

NAM - *N*-akrylylmorfolina

NHS – *N*-hydroksysukcynoimid

NIPAM – *N*-izopropylakrylamid

NMP - polimeryzacje rodnikową modyfikowaną trwałymi rodnikami nitroksylowymi (ang. *nitroxide-mediated polymerization*)

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

NVP - *N*-winył-2-pirolidon

PAA – poli(kwas akrylowy)

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffered saline*)

PBPyAEA – poli(akrylan 2-(benzylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu)

PDMAEMA - poli(metakrylan 2-dimetyloaminoetylu)

pDNA – plazmid DNA

PEG - glikol polietylenowy

PEI – polietylenoimina

PGA - polimer kwasu glutaminowego

pH - $-\log[H^+]$

PHEMA – poli(metakrylan hydroksyetylu)

PLA - polimer kwasu mlekowego

PLC - preparatywna chromatografia cienkowarstwowa

PMPyAEA – poli(akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu)

PMPyAPA - poli(akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propyłu)

PNIPAM – poli(*N*-izopropylakrylamid)

ppm - parts per million

*p*TsOH – kwas *p*-toluenosulfonowy

PVA – poli(alkohol winylowy)

PVME – poli(eter winylometylowy)	siRNA - krótkie interferujące kwasy
RAFT - polimeryzację z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (ang. <i>reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization</i>)	rybonukleinowe (ang. <i>small interfering RNA</i>)
RDRP – polimeryzacja rodnikowa z odwracalną dezaktywacją (ang. <i>reversible – deactivation radical polymerization</i>)	sRAFT - uniwersalny reagent RAFT (ang. „ <i>switchable RAFT agent</i> ”)
RID - refraktometr różnicowy (ang. <i>refractive index detector</i>).	ST - styren
RNA -kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)	TBAB - bromek tetrabutylamoniowy
RP – polimeryzacja rodnikowa (ang. <i>radical polymerization</i>)	TEA – trietyloamina
RRMS – nawracające stwardnienie rozsiane (ang. <i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>)	TGA – analiza termogravimetryczna (ang. <i>thermogravimetry</i>)
RT - temperatura pokojowa	TGO - termolabilne grupy ochronne
SAXS - ang. <i>small angle X-ray scattering</i>	THF – tetrahydrofuran
SEC - chromatografia wykluczenia (ang. <i>size exclusion chromatography</i>),	TLC - chromatografia cienkowarstwowa
	TT - terapia celowana (ang. <i>terget therapy</i>)
	UCST - górna krytyczna temperatura rozpuszczalności (ang. <i>upper critical solution temperature</i>)
	UV-Vis - ultrafiolet-światło widzialne
	VAC - octan winylu

Komentarz autorki pracy.

W dysertacji zastosowano anglosaski separator dziesiętny kropkę (.) w miejsce stosowanego w literaturze polskojęzycznej przecinka (,) celem zwiększenia przejrzystości zapisu. Podobny zabieg wykonany został dla określenia czasu. W opisach eksperymentów i procedur ilość godzin zapisano zamiennie z anglojęzycznym skrótem (h, ang. *hours*).

Założenia i cel pracy

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza i zbadanie właściwości nowych responsywnych polimerów z funkcją termo-uwalniania. Podstawową hipotezą badawczą było pokazanie możliwości przeprowadzenia wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji indukowanej podniesieniem temperatury z poziomu polimeru, a tym samym utworzenie jonowej formy polimeru z ujemnie naładowanym łańcuchem głównym oraz uwolnienie związku bicyklicznego obdarzonego ładunkiem dodatnim. Otrzymany układ polimerowy o powyższych cechach powinien charakteryzować się zmianą właściwości fizykochemiczne pod wpływem sygnałów środowiskowych (np. temperatura, pH).

W ramach pracy doktorskiej realizowane były trzy główne cele badawcze obejmujące syntezę polimerów, charakterystykę otrzymanych układów, oraz optymalizację procesu cyklizacji:

1. Synteza responsywnych modelowych układów polimerowych opartych na termolabilnym ugrupowaniu 2-pirydynylowym.

Podczas syntezy zastosowano standardowe techniki wykorzystywane w chemii organicznej oraz w chemii polimerów. Szczegółowe cele syntetyczne obejmowały:

- otrzymanie prekursorów monomerów oraz monomerów zawierających termolabilne ugrupowanie 2-pirydynylowe (2PyTG),
- optymalizację polimeryzacji typu RAFT z wykorzystaniem monomeru *N*-izopropylakrylamidu (NIPAM) oraz uzyskanie szeregu polimerów PNIPAM,
- polimeryzację wybranych homopolimerów opartych na zsyntezowanych wcześniej monomerach 2PyTG: PMPyAEA, PBPyAEA, PMPyAPA,
- polimeryzację kopolimerów statystycznych PNIPAM-co-PMPyAEA.

2. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych polimerów.

Równolegle do procesu polimeryzacji wykonywana była charakterystyka fizykochemiczna otrzymanywanych substancji, z wykorzystaniem technik spektroskopowych (NMR, IR, UV-Vis), spektrometrycznych (MS) oraz analizy termicznej (TGA, DSC). W celu określenia mas molowych uzyskanych polimerów przeprowadzono optymalizację analizy chromatograficznej (GPC/SEC).

3. Badanie procesu uwalniania związków bicyklicznych z układów homo- i kopolimerowych w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

Realizacja tej części badań obejmowała pomiary uwalniania związku bicyklicznego w temperaturze 90 °C, z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis oraz ¹H NMR. Dodatkowo zbadano zależność szybkości uwalniania związku bicyklicznego w funkcji pH oraz obecności soli.

I. Część literaturowa

1 Polimery wykorzystywane w biomedycynie

Rozwój chemii polimerów przyczynił się do szerokiego zastosowania materiałów polimerowych w medycynie i biochemii. Możliwości wykorzystania związków wielocząsteczkowych w medycynie nie ograniczają się tylko do produkcji wyrobów medycznych, takich jak protezy, nici chirurgiczne czy materiały opatrunkowe. Polimery mogą być stosowane w farmakologii między innymi jako produkty lecznicze [1], związki krwiozastępcze [2], związki o działaniu przeciwbakteryjnym [3], a także jako materiały stosowane w implantologii [4]. Jednym z ważniejszych zastosowań układów polimerowych w biomedycynie jest szeroko rozumiane dostarczanie leków [5]. Polimery, mogą być w tym kontekście wykorzystywane jako nośniki, substancje pomocnicze, jak również materiały opakowaniowe do szeroko rozumianych substancji leczniczych (np. mikrokapsułki, otoczki polimerowe, itp.). Zasadne wydaje się omówienie roli polimerów, jako materiałów stosowanych przy dostarczaniu substancji aktywnych biologicznie, gdyż ich projektowanie i synteza jest cały czas zagadnieniem bardzo aktualnym.

1.1 Polimery jako nośniki substancji aktywnych biologicznie

Intensywne badania nad nowymi, potencjalnymi substancjami terapeutycznymi, takimi jak białka, peptydy czy oligonukleotydy, wymagają opracowania efektywnych systemów ich dostarczania. Struktura chemiczna polimerów oraz wynikające z niej właściwości fizykochemiczne, umożliwiają projektowanie różnego rodzaju koniugatów - kompleksów cząsteczki czynnej biologicznie oraz nośnika. Częścią aktywną biologicznie może być np. lek, białko (peptyd) czy kwas nukleinowy, nośnikiem natomiast jest makrocząsteczka, polimer syntetyczny lub polimery pochodzenia naturalnego [6, 7]. W celu uzyskania określonego typu koniugatu konieczne jest przygotowanie polimeru posiadającego w swej strukturze różne grupy funkcyjne, najczęściej aminowe, przez które możemy kowalencyjnie przyłączyć biomolekułę [8, 9]. Jako nośniki używane są homopolimery, kopolimery łańcuchowe, jak również kopolimery o bardziej złożonej architekturze np. „szczotki”, „grzebienia”, czy polimery „gwiazdźiste” [10]. Najbardziej

Część literaturowa

popularnymi polimerami syntetycznymi, stosowanymi jako nośniki są: glikol polietylenowy (PEG), polimer kwasu glutaminowego (PGA), polimer kwasu mlekowego (PLA) oraz *N*-(2-hydroksypropylo)metakryloamid (HPMA). Polimery pochodzenia naturalnego takie jak np. chitosan, kwas hialuronowy czy alginiany [11] są również wykorzystywane jako nośniki, jednak większość z nich szybko ulega biodegradacji [12]. Polimery naturalne ulegają rozkładowi w komórkach pod wpływem różnych warunków takich jak np. pH, temperatura czy obecności jonów metali. Szybkość ich rozkładu zależy między innymi od stopnia krystaliczności, porowatości, masy molowej oraz jej rozrzutu. Chemiczna modyfikacja łańcuchów polimerowych cząsteczkami hydrofobowymi ma na celu obniżenie podatności polimeru naturalnego na działanie enzymów hydrolitycznych. Zmniejszenie szybkości degradacji możliwe jest również poprzez kopolimeryzację polimeru pochodzenia naturalnego z syntetycznym łańcuchem np. akrylanu.

Uwalnianie substancji aktywnej z wykorzystaniem nośnika ma różny mechanizm który jest zależny od rodzaju monomerów wchodzącego w skład struktury polimeru. Nośniki polimerowe pełnią określoną funkcję w koniugatach, która zależna jest zarówno od właściwości danego polimeru, jak również od sposobu jego połączenia z częścią aktywną. Polimery pełniące funkcję nośników muszą spełniać szereg warunków takich jak np.: być chemicznie obojętne, nietoksyczne, wykazywać dużą biokompatybilność, a ich synteza chemiczna powinna być stosunkowo prosta.

1.2 Koniugaty nośnik polimerowy-lek

Głównym celem połączenia cząsteczki aktywnej z danym nośnikiem polimerowym jest poprawienie biodystrybucji związku terapeutycznego. Usprawnienie transportu leków i produktów ich metabolizmu (metabolitów) przez błony biologiczne do tkanek i komórek, to główne kryterium doboru nośnika (jego właściwości). Wybór odpowiedniego rodzaju nośnika polimerowego zależy od tego w jaki sposób transportowany jest związek aktywny farmakologicznie. Na przykład, małowcząsteczkowe związki organiczne o działaniu terapeutycznym zazwyczaj transportowane są do komórek na drodze dyfuzji biernej, zgodnie z gradientem stężeń. Leki ulegają w ustroju biotransformacji, czyli przekształceniu w związki hydrofilowe, które mogą być wydalone przez nerki. Biotransformacja zachodzi głównie w wątrobie, a w jej wyniku lek traci swoją aktywność farmakologiczną. Dlatego, polimer połączony w kompleks z lekiem powinien pełnić funkcję ochronną, uniemożliwiając przedwczesną degradację leku. Dodatkowo, takie

połączenie polepsza farmakokinetykę substancji aktywnej. Nośnik polimerowy wydłuża okres przeżywalności leku w organizmie, dzięki czemu może on być dostarczony do miejsca działania i dopiero tam uwolniony, a następnie, po wywołaniu pożądanego efektu biologicznego, usunięty. Jak pokazują badania zastosowanie nośnika pozwala na wzrost hydrofilowości leku, a także jego metabolitów, co usprawnia ich wydalanie przez nerki [13]. Koniugaty polimer-lek projektuje się między innymi w celu wspomaganie terapii antynowotworowych [14] oraz w leczeniu przewlekłych chorób zapalnych [15]. Utworzenie kompleksu polimeru liniowego (homopolimeru i/lub polimeru blokowego) z związkiem terapeutycznym, pozwala na pasywny mechanizmy jego transportu. Jest to niezwykle istotne w leczeniu nowotworów, ponieważ lek w koniugacie dyfunduje tylko do chorych tkanek, które mają nieszczelną sieć naczyń krwionośnych. Rozmiar koniugatu polimer-lek uniemożliwia przedostanie się leku do zdrowych tkanek, czego nie da się uniknąć kiedy lek podawany jest samodzielnie.

1.3 Koniugaty polimer-białko

Białka to kluczowe związki wykorzystywane w metodach leczenia takich chorób jak cukrzyca, nowotwory, zaburzenia psychiczne oraz choroby metaboliczne i autoimmunologiczne [16]. Białka terapeutyczne posiadają wysoką aktywność biologiczną, wykazują niską stabilność w komórkach, niską rozpuszczalność oraz immunogenność¹. Czynniki te, powodują że biologiczna funkcjonalność białek nie może być zachowana. Poprzez sprzężanie polimerów z białkami, czyli tworzeniem koniugatu polimer-białko, zwiększa się okres półtrwania białka, jego stabilność oraz obniża i/lub niweluje immunogenność [17]. Utworzenie kompleksu polimer-białko pozwala również na efektywne maskowanie powierzchni białka, co w konsekwencji wpływa na ich ochronę przed innymi makrocząsteczkami, takimi jak np. enzymy proteolityczne [18]. Najbardziej efektywne metody tworzenia kompleksu polimer-białko to „grafting to” lub „grafting from” [19]. W podejściu „grafting to”, łańcuchy polimerowe zawierające w swej strukturze m.in. aktywowane estry N-hydroksysukcynoimidu (NHS), pentafluorofenyl, tiazolidyno-2-tion czy aldehydy,

¹ Immunogenność - zdolność wywoływania odpowiedzi immunologicznej wynikająca ze swoistej, rozpoznawanej przez limfocyty konfiguracji molekuł.

[<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/immunogenosc;3914330.html>, 24.11.2022].

Część literaturowa

sprzęgane są z reaktywnymi resztami docelowego białka, takimi jak grupy aminowe, tiolowe czy fenolowe. Wprowadzenie do struktury polimeru grup funkcyjnych np. hydroksylowej, pozwala połączyć polimer z grupami aminowymi białka. Dodatkowo, polimery, które posiadają w łańcuchu grupy tiolowe będą łączone z cysteiną (Cys) tworząc biokoniugat za pomocą mostków disiarczkowych [20]. Drugą strategią tworzenia koniugatów polimer-białko jest „grafting from”. Metoda ta odnosi się do polimeryzacji zachodzącej bezpośrednio na cząsteczkach białka i pozwala na syntezę koniugatów o dużej masie cząsteczkowej. W przypadku tej metody, z góry określamy miejsce przyłączenia nośnika oraz ilość łańcuchów polimerowych. Należy również podkreślić, że oczyszczanie końcowych koniugatów jest dużo prostsze. Badanie pokazują, że metoda „grafting from” jest mniej skuteczna, ponieważ tworzący się kompleks ma dużą przeszkodę steryczną, w trakcie wzrostu łańcucha polimerowego. Pomimo tych wad podejście „grafting from” jest coraz bardziej popularne, dzięki nowym technikom polimeryzacji, takimi jak ATRP [21] czy RAFT [22].

1.4 Kompleksy polimer-DNA

Terapia genowa (GT, ang. *gene therapy*) ma na celu zapobieganie i leczenie chorób genetycznych poprzez wprowadzenie materiału genetycznego do komórek pacjenta. Pomimo, iż w terapiach genowych i testach klinicznych nośniki biologiczne w formie wirusów są znacznie częściej wykorzystywane, to wektory niebiologiczne zyskują coraz większą popularność jako skuteczna metoda transportu genów [23]. Wektory wirusowe pozwalają na transport materiału genetycznego w postaci kwasów nukleinowych. Oznacza to, że dostarczając odpowiednią sekwencję plazmidu DNA (pDNA) lub krótkiego niekodującego RNA (siRNA) do komórki, możemy wpływać na ekspresję określonych białek lub enzymów. W przypadku wektorów wirusowych, materiał genetyczny jest zamknięty w białkowej otoczce, zwanej kapsydem. Po zainfekowaniu gospodarza następuje namnażanie się wprowadzonego wcześniej terapeutycznego kwasu nukleinowego. Wirusowe nośniki kwasów nukleinowych mogą jednak wywoływać odpowiedź immunologiczną, dlatego cały czas bada się alternatywne systemy dostarczania. Jednym z takich systemów są kompleksy polimer-DNA czyli polipleksy [24, 25], które powstają pomiędzy ujemnie

naładowanym oligonukleotydem a kationowym lub amfifilowym polimerem². Kompleksy polimer-DNA pozwalają na zwiększenie upakowania materiału genetycznego oraz odznaczają się niższą odpowiedzią immunologiczną w porównaniu do wektorów wirusowych. Główne strategie wykorzystywane przy projektowaniu poliopleksów opierają się na tworzeniu układów kopolimerowych z polietylenoiminą (PEI) [26]. Materiały polikationowe, takie jak PEI, wykazują zdolność dostarczania genów, dzięki wysokiej skuteczności kapsułkowania DNA, w porównaniu z preparatami nanocząsteczkowymi opartymi na polimerach naturalnych. Polimer PEI wykorzystywany jest również w syntezie nowych układów polimerów rozgałęzionych (dendrymerów) [27]. Dodatkowo, niskocząsteczkowe łańcuchy PEI w połączeniu z cyklodekstrynami oraz ich β -pochodnymi mogą pełnić funkcję polimerowych przenośników kwasów nukleinowych [28, 29].

1.5 Systemy dostarczania leków

Polimery, jako nośniki cząstek aktywnych biologicznie, m. in. dzięki możliwości samoorganizacji, mogą być wykorzystywane w systemach kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych (DSS, ang. *drug delivery systems*) [30, 31, 32]. Dodatkowo prowadzone są również intensywne badania dotyczące możliwości wykorzystania polimerów w terapiach celowanych (TT, ang. *target therapy*) przy wspomaganiu leczenia przeciwnowotworowego [33, 34], jak i wspomnianych już terapiach genowych [35, 36]. Układy kontrolowanego uwalniania leków opierają się na stopniowym dostarczaniu do wybranych tkanek, czy komórek, substancji aktywnej farmaceutycznie (API, ang. *active pharmaceutical ingredient*). Systemy te umożliwiają dozowanie leku, pod względem farmakokinetycznym, w bardziej kontrolowany sposób, w porównaniu z tradycyjną tabletką, czy lekiem o przedłużonym działaniu. Istotne znaczenie w efektywnym wykorzystaniu systemów dostarczania leków w terapii odgrywają również niekwalencyjne oddziaływania międzycząsteczkowe. Rozpoznawanie molekularne, polegające na utworzeniu selektywnego wiązania według modelu „klucz do zamka” pozwala kontrolować uporządkowanie

² Amfifilowość - właściwość substancji polegająca na zdolności jej cząsteczek do silnego oddziaływania zarówno z cząsteczkami rozpuszczalników polarnych, jak i niepolarnych.
[<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/amfifilowosc;3868679.html>, 24.11.2022]

Część literaturowa

i właściwości polimeru w sposób odwracalny i adaptacyjny [37]. Dodatkowo, tworzenie złożonych struktur supramolekularnych typu micelle, które możliwe jest w przypadku amfifilowych dwu- lub trzyblokowych układów kopolimerowych, pozwala m.in. na polepszenie transportu związków terapeutycznych [38].

Polimery mogą być wykorzystywane nie tylko jako nośniki leków, ale również same mogą posiadać właściwości terapeutyczne [39]. Przykładowo, zwiększenie masy cząsteczkowej związku aktywnego poprzez jego polimeryzację, może spowodować polepszenie jego efektywności terapeutycznej. Równocześnie możliwe jest obniżenie dawki leku, w porównaniu z niskocząsteczkowymi analogami [40, 41]. Leki polimerowe, w zależności od tego czy są rozpuszczalne, czy nierozpuszczalne w płynach biologicznych, będą miały inne zastosowanie kliniczne. Leki polimerowe, które nie rozpuszczają się w organizmie, stosowane są jako środki maskujące. Mają one m.in. za zadanie wiązać niepożądane związki w przewodzie pokarmowym, takie jak kwasy czy jony metali nieorganicznych (jony potasu, fosforany). Równocześnie, same polimery nie są wchłaniane, co umożliwia usunięcie kompleksu z organizmu. Przykładem leku polimerowego działającego jako środek maskujący jest Renagel[®], zatwierdzony do leczenia hiperfosfatemii³, u pacjentów poddawanych dializom. Substancją czynną w tym leku jest sewelamer, będący usieciowaną formą poli(alliloaminy) z pierwszo- i drugorzędowymi resztami amin alifatycznych. Budowa chemiczna tego polimeru umożliwia jonowe wiązanie fosforanów w jelicie [42]. Terapeutyki, bazujące na polimerach rozpuszczających się w płynach ustrojowych wykorzystywane są m.in. jako leki immunomodelujące⁴. Przykładem takiego leku jest Copaxone[®], stosowany w leczeniu nawracającego stwardnienia rozsianego (RRMS, ang. *relapsing-remitting multiple sclerosis*). Polimerem o działaniu terapeutycznym jest w tym przypadku octan glatirameru (GA, ang. *glatiramer acetate*). Jest to mieszanina syntetycznych polipeptydów, która minimalizuje autoimmunologiczną odpowiedź na białko mieliny. Dokładny mechanizm tego procesu nie jest znany, a działanie terapeutyczne tłumaczy się sumą kilku efektów immunologicznych [41, 43].

³ Hiperfosfatemia – podwyższony stężenie fosforanów we krwi.

⁴ Leki immunomodelujące stymulują układ odpornościowy i wygaszają stan zapalny poprzez hamowanie produkcji cytokin.

2 Polimery wrażliwe na bodźce

Na bardziej szczegółowe omówienie zasługują polimery wrażliwe na bodźce środowiskowe, zwane również „inteligentnymi polimerami” (ang. *smart polymers*), które można uznać jako odrębny rodzaj nośników substancji aktywnych [44]. Polimery te, określane również jako polimery responsywne, to jedne z najciekawszych struktur polimerowych, których unikalną właściwością jest możliwość reagowania na zmiany środowiska zewnętrznego. Nieznaczna zmiana środowiska może powodować znaczącą zmianę właściwości fizykochemicznych takiego materiału. Odpowiedź na działanie bodźca zewnętrznego jest przeważnie odwracalna i układ wraca do stanu początkowego, po zakończeniu ekspozycji na czynnik środowiskowy [45]. Możliwe jest zaprojektowanie polimerów reagujących na bodźce chemiczne, fizyczne czy biologiczne. Najbardziej popularnymi czynnikami chemicznymi wywołującymi odpowiedź układu polimerowego są: zmiana pH [46, 47] oraz zmiana stężenia gazów [48, 49]. Związki chemiczne w stanie gazowym, takie jak np.: tlenek azotu, dwutlenek węgla, jak również siarkowodór, są czynnikami, które mają wpływ na funkcjonowaniu wielu narządów, w tym mózgu. Często określa się je mianem przekaźników czy transmitterów gazowych. Do czynników fizycznych możemy zaliczyć m.in. zmianę temperatury [50, 45] oraz natężenia światła [51, 52]. W przypadku bodźców biologicznych można zaprojektować polimery wrażliwe np. na zmiany stężenia glukozy [53, 54] oraz obecność, w układzie określonych antygenów [55, 56]. Czas odpowiedzi układu na wymienione czynniki oraz jej charakter będzie zależał zarówno od struktury chemicznej danego polimeru, jak również od jego topologii czy architektury. Oddziaływania międzycząsteczkowe i/lub wewnątrzcząsteczkowe pomiędzy poszczególnymi fragmentami łańcucha tego samego polimeru, będą również odgrywały istotne znaczenie, nie tylko w szybkości odpowiedzi na dany bodziec, ale także będą wpływały na rodzaj tej odpowiedzi. Inteligentne polimery przeważnie badane są jako roztwory polimerowe w wodzie (hydrożele), które mogą przybierać kształt np.: samoorganizujących się struktur nanoprzenośników [57], miceli [58] czy rozgałęzionych struktur dendrymerycznych [59]. W przypadku układów tworzących hydrożele przemiana wywołana czynnikiem środowiskowym określana jest jako objętościowe przejście fazowe i jest procesem odwracalnym [60]. Przejście fazowe żelu polimerowego może mieć charakter ciągły lub nieciągły. W sytuacji kiedy zmiana układu, w pewnym zakresie czasu, jest stopniowa przemianę określa się jako ciągłą. Poszczególne etapy przemiany są niemożliwe do odróżnienia i scharakteryzowania.

Część literaturowa

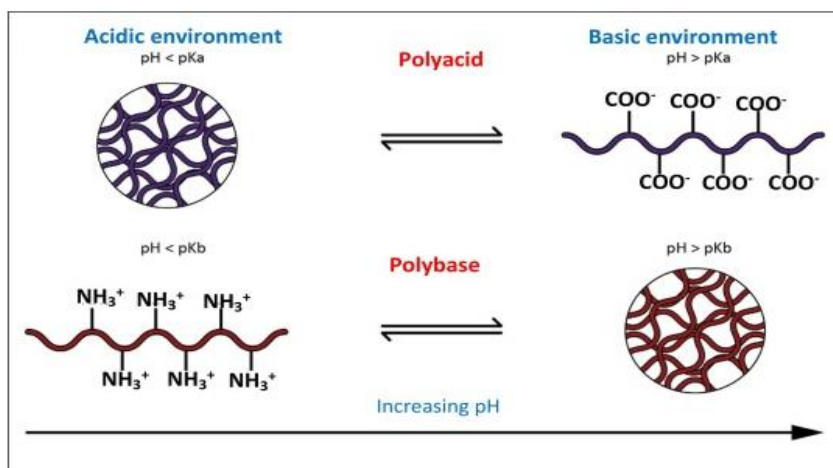
Natomiast przemiana fazowa, w trakcie której obserwujemy gwałtowną zmianę stopnia spęcznienia, w funkcji czasu, określamy jako przemianę nieciągłą. W trakcie procesu możliwe jest współistnienie dwóch faz żelowych różniących się stopniem spęcznienia. Jest to szczególny rodzaj równowagi fazowej odnoszący się do spęczniałych usieciowanych układów.

Do najważniejszych właściwości inteligentnych polimerów należą termo-responsywność i pH-responsywność. Te dwa czynniki są głównym powodem tak dużego zainteresowania układami polimerowymi, co przekłada się na możliwości ich szerokiego wykorzystania w biomedycynie i farmakologii.

2.1 Polimery wrażliwe na zmiany pH

W obrębie całego organizmu obserwujemy zmiany pH charakteryzujące konkretne procesy, co sprawia, że pH jest istotnym czynnikiem, który należy uwzględnić przy tworzeniu układów dostarczania leków. Dlatego też, fizjologiczne zmiany pH w układzie pokarmowym, od kwaśnego w żołądku, do zasadowego w jelicie, muszą być uwzględnione w przypadku projektowania leku do podawania doustnego. W przypadku chorób, takich jak niektóre nowotwory, stany zapalne w tkankach czy rany, wartość pH różni się od fizjologicznego. Tkanki i komórki objęte nowotworem charakteryzują się niższym pH płynów pozakomórkowych, co jest wykorzystane przy dostarczaniu leków chemoterapeutycznych np. doksorubicyny (DOX) [61, 62]. Polimery stosowane jako nośniki są zwykle wchłaniane na drodze endocytozy receptorowej lub pinocytozy. W trakcie tych procesów następuje zmiana pH (z 6.2 do 5.0), która może być wykorzystana do uwolnienia cząsteczek leku z pęcherzyków endocytarnych do cytozolu [41]. Układy polimerowe charakteryzujące się pH-wrażliwością, nawet przy niewielkiej zmianie pH w komórce, mogą zmienić swoją konformację, a w konsekwencji właściwości [63]. Polimery, których struktura merów bazuje na słabych kwasach lub zasadach, a wartość logarytmu stałej dysocjacji kwasu (pKa) mieści się w przedziale od 3 do 10, wykazują pożądaną zmianę konformacji, w wyniku zmiany pH środowiska. Wśród polimerów wrażliwych na zmiany stężenia jonów wodorowych można wyróżnić materiały o charakterze kationowym i anionowym, a także samoorganizujące się polimery o charakterze amfifilowym [64]. Polikwasy i polizasady otrzymywane są przez polimeryzację takich monomerów jak np.: kwas akrylowy (AA), kwas metakrylowy (MAA), bezwodnik maleinowy, metakrylan *N,N*-dimetyloaminoetylu (DMAEMA) czy azyrydyna, która

polimeryzuje do wspomnianego już polimeru PEI, wykorzystywanego do tworzenia polipeksów. Zmiana konformacji polimerów, w wyniku procesów protonacji/deprotonacji, powoduje rozciąganie lub zwijanie się łańcuchów polimerowych w roztworze. Proces, w którym łańcuchy polimerowe są stabilizowane przez wzajemne odpychanie się ładunków dodatnich/ujemnych, często opisuje się jako pęcznienie polimeru. Proces odwrotny określany jest jako agregacja, ponieważ łańcuchy polimeru są stabilizowane poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i przyjmują konformację globularną. Dla polimerów posiadających w strukturze grupy kwasowe ($-\text{SO}_3\text{H}$ oraz $-\text{COOH}$) „prostowanie” łańcuchów zachodzi w środowisku zasadowym, natomiast dla polimerów zawierających w strukturze grupy aminowe, w pH kwasowym (**Rysunek 1**) [65]. Kontrola odwracalnego procesu protonacji i deprotonacji pH-czułych polimerów pozwala na sterowanie procesami uwalniania [66]. Jest to szczególnie istotne w kompleksach kationowych polimerów z plazmidami DNA, gdzie deprotonacja następująca w endosomach powoduje rozerwanie błony endosomalnej i uwolnienie kompleksu do cytozolu, zanim zostanie on rozłożony przez enzymy hydrolityczne w lizosomach [67].



Rysunek 1 Schematyczne przedstawienie procesów protonacji i deprotonacji w polimerach wrażliwych na zmiany pH [65].

Przykładem polimeru kwasowego (polikwasu) zawierającego grupy karboksylowe jest poli(kwas akrylowy) (PAA). W kwaśnym środowisku łańcuchy PAA są niezjonizowane, co umożliwia tworzenie się wiązań wodorowych, pomiędzy grupami hydroksylowymi i karboksylowymi. Wynikiem całkowitej stabilizacji polimeru przez ładunki ujemne jest pęcznienie PAA w $\text{pH} \geq 7$. Całkowicie zdeprotonowany PAA staje się polielektrolitem, który może adsorbować

Część literaturowa

na swoje powierzchni cząsteczki lub jony dodatnio naładowane [68, 69]. Właściwości sorbcyjne tego polimeru i jego kopolimerów, są wykorzystywane m.im. do wiązania jonów metali przejściowych [70], a także kontrolowanego uwalniania leków [71]. PAA jest również wykorzystywany w medycynie, jako materiał o bardzo dobrych właściwościach adhezyjnych [72].

2.2 Polimery wrażliwe na zmiany temperatury

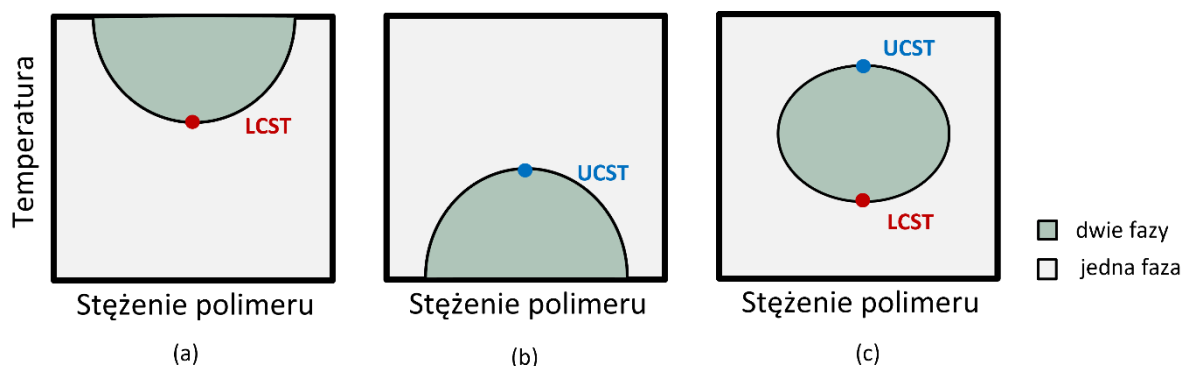
Polimery, których charakter hydrofobowy ulega zmianie, po wpływie działania podwyższonej temperatury określane są jako termowrażliwe. Układy tego typu określa się również mianem polimerów z termiczną pamięcią kształtu [73]. Charakteryzują się one krytyczną temperaturą rozpuszczalności (CST, ang. *critical solution temperature*), która pomaga określić jakie może być potencjalne zastosowanie danego układu polimerowego [74]. Wyróżniamy polimery charakteryzujące się dolną i/lub górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności [75]. Przemiana polimerów wrażliwych na zmianę temperatury ma charakter przejścia fazowego, którego siłą napędową jest zmiana entropii układu. Analizując wygląd diagramu fazowego polimeru, możemy określić jak zmienia się jego mieszalność w danym środowisku np. wodzie. Diagram fazowy polimeru, przy stałym ciśnieniu, określa się przez wykreślenie temperatury, przy której następuje rozdzielenie faz, w funkcji całkowitego stężenia polimeru. **Rysunek 2** przedstawia uproszczone schematy diagramów fazowych dla trzech różnych typów polimerów. **Rysunek 2a** przedstawia polimer z dolną CST, **Rysunek 2b** z górną CST, natomiast **Rysunek 2c** jest przykładem układu kopolimerowego zarówno z górną, jak i dolną temperaturą krytyczną rozpuszczalności. W roztworach wodnych polimery są rozpuszczane głównie dzięki interakcjom dipol-dipol, oddziaływaniom van der Waalsa i wiązaniom wodorowym, pomiędzy polarnymi grupami w polimerze. Oddziaływania między niepolarnymi grupami a wodą, są znacznie słabsze niż wiązania wodorowe między cząsteczkami wody. W zależności od tego, które z oddziaływań mają większy wpływ, wodny roztwór polimeru składa się z jednej lub dwóch faz. Na zmianę temperatury krytycznej wpływa szereg czynników, takich jak: stężenie polimeru, obecność związków jonowych w roztworze, czy hydrofobowość grup końcowych polimeru.

2.2.1 Teoria Flory-Hugginsa

Wprowadzono wiele matematycznych opisów zjawiska przejścia fazowego dla układów polimerowych, bazujących na równaniu potencjału termodynamicznego. Termodynamikę przejścia fazowego polimerów termoresponsywnych można opisać ogólnym równaniem Gibbsa na zmianę entalpii swobodnej mieszania (1).

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m, \quad (1)$$

gdzie: ΔG_m - zmiana entalpii swobodnej mieszania, ΔH_m - zmiana entalpii mieszania, T - temperatura, ΔS_m - zmiana entropii mieszania.



Rysunek 2 Schematyczne przedstawienie diagramu fazowego dla termoresponsywnych polimerów, gdzie UCST i LCST to odpowiednio górna i dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności.

Proces termodynamiki mieszania się roztworów polimerowych oraz zmiany entropii mieszania można wytłumaczyć dokładniej stosując półempiryczną teorię Flory-Hugginsa [76, 77]. Model zaproponowany przez chemików Paula Flory'ego i Maurica Loyala Hugginsa służy do opisu różnych układów polimerowych, także polimerów wrażliwych na bodźce. Rozszerzoną postać modelu Flory-Hugginsa przedstawia równanie (2), które uwzględnia jednocześnie oddziaływania rozpuszczalnik-rozpuszczalnik, rozpuszczalnik-polimer, polimer-polimer oraz temperaturę. Równanie można wykorzystywać jako model początkowy do opisu wszystkich trzech rodzajów oddziaływań w roztworze polimerowym:

Część literaturowa

$$\Delta G_m = kT(n_1 \ln \varphi_1 + n_2 \ln \varphi_2 + \chi n_1 \varphi_2) \quad (2)$$

$$\chi \propto \frac{1}{T} \quad (3)$$

gdzie: k - stała Boltzmann, n_i - liczba moli, φ_i - ułamek molowy lub objętościowy rozpuszczalnika ($i = 1$) lub polimeru ($i = 2$), χ - parametr oddziaływań polimer-rozpuszczalnik.

Ułamki molowe dla rozpuszczalnika i polimeru wyliczamy z równań:

$$\varphi_1 = \frac{x_1 n_1}{x_1 n_1 + x_2 n_2} \quad (4)$$

$$\varphi_2 = \frac{x_2 n_2}{x_1 n_1 + x_2 n_2} \quad (5)$$

gdzie: x_i - liczba cząstek dla rozpuszczalnika ($i = 1$) lub polimeru ($i = 2$).

Właściwości roztworów polimerów, takie jak rozpuszczalność (mieszalność), równowaga pęcznienia zależą od składu mieszaniny i można je wyrazić za pomocą parametru interakcji polimer-rozpuszczalnik – χ . Parametr χ zwany jest również parametrem Flory-Hugginsa lub parametrem mieszania i jest on charakterystyczny dla danego stężenia polimeru, w badanym rozpuszczalniku. Parametr χ nie jest jednak wielkością stałą dla danego układu ponieważ zależy zarówno od stężenia polimeru jak i temperatury (patrz Równanie nr 3). Mieszanina polimerów będzie stabilna, kiedy segmenty polimeru wzajemnie się przyciągają. Opis matematyczny teorii pozwala określić przy jakim stężeniu dana mieszanina tą stabilność może osiągnąć.

2.2.2 Dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności

Polimery charakteryzujące się dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (LCST, ang. *lower critical solution temperature*) uzyskiwane są najczęściej z monomerów N -pochodnych akrylamidu. Polimery charakteryzujące się LCST, poniżej tej temperatury są „rozpuszczalne” - hydrofilowe, natomiast powyżej przechodzą w formę „nierozpuszczalną” – hydrofobową [50]. W pełni rozpuszczalnym żelu polimerowym łańcuchy stabilizowane są przez drugorzędowe

oddziaływania elektrostatyczne np. hydratację czy ogólnie solwatację. Wraz ze wzrostem temperatury, ruchy cząsteczek polimeru oraz rozpuszczalnika są szybsze i bardziej chaotyczne, powoduje to, że wpływ oddziaływań międzycząsteczkowych polimer-rozpuszczalnik zmniejsza się. Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe, między polarnymi grupami funkcyjnymi łańcucha polimeru, zaczynają odrywać znacząca rolę, czego wynikiem jest agregacja polimeru. Proces ten określany jest w literaturze anglojęzycznej jako *collapsing* czyli zwijanie się łańcucha polimerowego lub „kurczenie się” żelu polimerowego. Siłą napędową procesu jest wzrost sumarycznej entropii układu. Stopień uporządkowania rozpuszczalnika zmniejsza się, przy równoczesnym wzroście uporządkowania łańcuchów polimerowych. Przykładem polimeru LCST wrażliwego na zmiany temperatury jest poli(*N*-isopropylakrylamid) (PNIPAM). Jest to polimer, który w ostatnich latach stał się bardzo popularnym materiałem, o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym [78, 79, 80]. Głównym powodem tak dużego zainteresowania jest temperatura krytyczna polimeru PNIPAM, która w wodzie wynosi 32 °C. Poniżej tej temperatury roztwór PNIPAM składa się z jednej fazy, a po szybkim podgrzaniu do temperatury ciała (około 36.5 – 37.5 °C) polimer tworzy żel. W takiej postaci może działać jako matryca o przedłużonym uwalnianiu leków. Bioaktywne cząsteczki związane w żelu zostaną uwolnione do organizmu przez dyfuzję. Zmiana rozpuszczalności polimerów LCST, w przypadku PNIPAM następuje w obrębie około 1 °C.

2.2.3 Górna krytyczna temperatura rozpuszczalności

W przypadku polimerów charakteryzujących się górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (UCST, ang. *upper critical solution temperature*) oddziaływania polimer-polimer oraz rozpuszczalnik-rozpuszczalnik są znacznie silniejsze w porównaniu ze słabymi oddziaływaniami polimer-rozpuszczalnik. Efekt entropowy, dla tego typu polimerów, jest mniej dominujący, czyli siła oddziaływań hydrofobowych w trakcie procesu maleje. Dlatego powyżej UCST polimer wykazuje dobrą mieszalność z rozpuszczalnikiem, tworząc roztwór jednorodny. Natomiast poniżej UCST następuje rozdzielenie się faz. Na proces pęcznienia polimerów ma wpływ szereg czynników, wśród których najważniejszymi są: masa molowa polimeru, wpływ grup jonowych w polimerze oraz elektrolitów w roztworze [81]. Siła jonowa roztworu oraz rodzaj użytej soli często definiują możliwość zaobserwowania przemiany. Pozwala również określić górną

Część literaturowa

krytyczną temperaturę rozpuszczalności [82]. Dla niektórych polimerów, przykładowo poli(kwas akrylowy) oraz jego kopolimery, wyznaczenie UCST możliwe jest tylko przy bardzo wysokiej sile jonowej (>400 mM NaCl) lub niskim pH (pH < 4) [83]. Uporządkowanie układu polimerowego może być sterowana także wiązaniami wodorowymi (HB-UCST) lub oddziaływaniami kolumbowskiemi (C-UCST) [84]. Tylko niektóre polimery wrażliwe na temperaturę, wykazują zachowanie UCST w czystej wodzie, o bardzo niskiej sile jonowej. Oddziaływania łańcuchów polimeru, dla którego chcemy w takich warunkach wyznaczyć UCST, muszą być bardzo silnie [85]. Natomiast, do polimerów, gdzie wiązania wodorowe ogrywają dominującą rolę w przemianie, można zaliczyć np.: poli(tlenek etylenu) (PEG), modyfikowane poli(alkohole winylowe) (PVA), poli(eter winylometylowy) (PVME), poli(metakrylan hydroksyetylu) (PHEMA) oraz poli(*N*-akryloiloglicynoamid) (PNAGA) [86].

Odpowiedz badanego układu na zmianę temperatury może mieć też bardziej złożony charakter. Układy polimerowe, w których obserwujemy zarówno dolną jak i górną krytyczną temperaturę rozpuszczalności to przeważnie roztwory kopolimerów blokowych [87, 88, 89].

3 Metody otrzymywania responsywnych polimerów

3.1 Polimeryzacja rodnikowa

Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) polimeryzacja rodnikowa (RP, ang. *radical polymerization*) to addycyjna polireakcja łańcuchowa, w której aktywnym centrum reakcyjnym jest rodnik [90]. Rodniki to reaktywne indywidua chemiczne mające na jednym z zewnętrznych orbitali niesparowany elektron, przez co odznaczają się dużą reaktywnością. Organiczne wolne rodniki w polimeryzacji rodnikowej to produkty przejściowe, przeważnie o hybrydyzacji sp^2 , odznaczające się słabą stereoselektywnością⁵. Jednakże polimery uzyskane w wyniku polimeryzacji rodnikowej wykazują dobrą regio- i chemoselektywność [91]. Rodniki, biorące udział w reakcji

⁵ W reakcji stereoselektywnej z określonego substratu, w danych warunkach, powstają co najmniej jeden z dwóch możliwych produktów, będących stereoizomerami. [Buza D., Sas W., Szczeciński P., *Chemia organiczna. Kurs podstawowy*, Oficyna Wydawnicza PW, Warszawa 2006].

mogą być stabilizowane poprzez rezonans oraz w mniejszym stopniu poprzez oddziaływania elektrostatyczne. Czynniki wpływające na gęstość elektronową miejsca aktywnego, takie jak grupy funkcyjne wyciągające elektrony (EWG, ang. *electron withdrawing group*), również będą miały wpływ na reaktywność rodnika, a tym samym na szybkość wzrostu łańcucha. Do najważniejszych zalet polimeryzacji rodnikowej można zaliczyć: wysoką reaktywność używanych monomerów, co wpływa na wysoką wydajność reakcji, znaczną tolerancję na zanieczyszczenia oraz możliwość prowadzenia reakcji w środowisku wodnym. Polimeryzacja rodnikowa może być prowadzona zarówno w układach jednofazowych jak i wielofazowych. Dodatkowo, jeżeli polimer jest nierozpuszczalny w środowisku reakcji, możliwe jest prowadzenie polimeryzacji strąceniowo. Ponieważ mechanizm procesu pozwala na monitorowanie kinetyki reakcji, synteza jest stosunkowo prosta technologicznie. Bardzo korzystną cechą jest również możliwość prowadzenia polimeryzacji rodnikowej w szerokim zakresie temperatur [92].

Główne etapy reakcji polimeryzacji rodnikowej są tożsame z innymi polireakcjami. Proces polimeryzacji rozpoczyna się od inicjacji składającej się z wytworzenia rodnika inicjatora i przyłączeniu go do pierwszej cząsteczki monomeru. Inicjacja jest najwolniejszym etapem, w trakcie którego inicjator przekształcany jest w aktywną formę rodnika. Inicjatory muszą mieć możliwość utworzenia rodnika, dlatego najczęściej w tym celu stosuje się związki azowe oraz nadtlarki (np. nadtlarek benzoilu). Związki te ulegają rozpadowi homolitycznemu, w wyniku którego powstają dwa takie same rodniki oraz cząsteczka gazu np. azotu czy dwutlenku węgla [93]. Drugim etapem jest prolongacja czyli wzrost łańcucha, w którym następuje przyłączanie kolejnych monomerów do makrorodnika. Następne etapy to przeniesienie ładunku, oraz reakcje rekombinacji, które prowadzą do zakończenia łańcuchów – terminacji, czyli procesu powstawania niereaktywne łańcuchy polimeru.

Duża reaktywność wolnych rodników oraz niska ich stabilność powodują, że reakcja polimeryzacji jest trudna do kontrolowania, na każdym etapie. Dodatkowo, z postępem reakcji maleje stężenie aktywnych makrorodników, co spowalnia proces. Po zakończeniu polimeryzacji w układzie nie ma aktywnych rodników, dlatego uzyskania bardziej złożonych układów blokowych, poprzez wprowadzenie kolejnego monomeru do układu, jest niemożliwe.

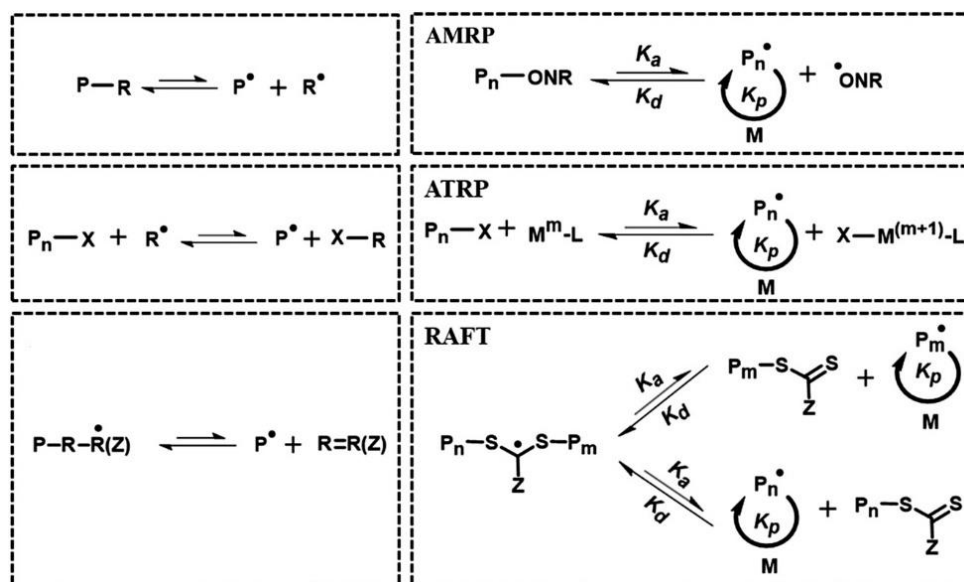
Część literaturowa

3.1.1 Polimeryzacja z odwracalną dezaktywacją

Ograniczenia konwencjonalnej polimeryzacji rodnikowej wymusiły poszukiwanie nowych technik polimeryzacji, które pozwoliłyby na syntezę polimerów, w bardziej kontrolowany sposób. Wprowadzanie dodatkowych czynników stabilizujących i przyspieszających reakcję, pozwoliło na rozwój alternatywnych metod polimeryzacji rodnikowej. Metody te opierają się na procesach odwracalnej dezaktywacji aktywnych centrów reakcyjnych (RDRP, ang. *reversible – deactivation radical polymerization*). Reakcje te wykorzystują koncepcje „żyjącej polimeryzacji rodnikowej” (ang. *living free radical polymerization*), w której proces terminacji jest całkowicie wyeliminowany z syntezy [94, 95]. Dlatego też często „żyjąca” RP i RDRP są mylnie określane jako ten sam proces [96]. W metodach RDRP proces inicjacji następuje bardzo szybko, dodatkowo udział terminacji jest zminimalizowany, co wpływa na zmniejszenie rozrzutu ciężarów cząsteczkowych polimeru. Najistotniejszym etapem polimeryzacji rodnikowej jest wzrost łańcucha, w czasie którego ustala się równowaga dynamiczna pomiędzy poszczególnymi fragmentami wydłużającego się polimeru. Łańcuch wzrastającego polimeru ulega kilkukrotnie dezaktywacji i reaktywacji podczas etapu prolongacji. Dla każdej pojedynczej reakcji dezaktywacji/reaktywacji ustala się czasowa równowaga, co pomaga wydłużać łańcuch. Aktywowanie łańcucha pozwala przyłączać kolejne jednostki monomeru, co w konsekwencji powoduje zwiększenie masy cząsteczkowej polimeru. W przeciwieństwie do konwencjonalnej polimeryzacji rodnikowej, techniki RDRP dają możliwość tworzenia łańcuchów polimerowych o wcześniej zdefiniowanych masach molowych oraz wąskim rozkładzie mas. Polimeryzację z odwracalną dezaktywacją wykorzystuje się również do tworzenia kopolimerów blokowych, a także łańcuchów polimerowych sfunkcjonalizowanych związkami niskocząsteczkowymi. Do najważniejszych metod polimeryzacji typu RDRP zaliczamy:

- polimeryzację z udziałem rodników aminoksyłowych (AMRP, ang. *aminoxyl-mediated radical polymerization*), określaną również jako polimeryzacje rodnikową, modyfikowaną trwałymi rodnikami nitroksyłowymi (NMP, ang. *nitroxide-mediated polymerization*) [97],
- polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (ATRP, ang. *atom transfer radical polymerization*) [98, 99],
- polimeryzację z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT, ang. *reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) [100].

Wyróżniamy trzy główne mechanizmy odwracalnej dezaktywacji, na których opierają się najważniejsze metody RDRP. Ogólny schemat reakcji i ich mechanizm przedstawia **Schemat 1** [94]. W reakcji z wykorzystaniem rodnika aminoksyłu (metoda AMRP), utworzenie początkowego rodnika propagującego umożliwia stabilny wzrost łańcucha poprzez jednocząsteczkową aktywację i dezaktywację wiązania. Natomiast w metodzie ATRP w aktywacji biorą udział dwie cząsteczki. Tworzenie się aktywnego łańcucha propagującego następuje w wyniku przeniesienia



Schemat 1 Główne mechanizmy polimeryzacji RDRP, gdzie P - łańcuch polimeru, X - halogenek (np. Br, Cl), M - metal przejściowy (np. Cu(I), Ni(II) lub Ru(II)), L – ligand, Z- reaktywna grupa w reagentie RAFT [94].

halogenku (przeważnie atomu bromu) z uśpionego makroinicjatora na aktywator w postaci kompleksu miedzi (I). Dezaktywatorem jest w tym przypadku kompleks miedzi (II). Polimeryzacja typu RAFT jest szczególnym przypadkiem polimeryzacji rodnikowej z degeneratywnym przeniesieniem łańcucha (DTRP, ang. *degenerative chain transfer polymerization*) i obejmuje odwracalne przeniesienie reagenta RAFT między „uśpionym” a wzrastającym makrorodnikiem.

Część literaturowa

3.2 Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)

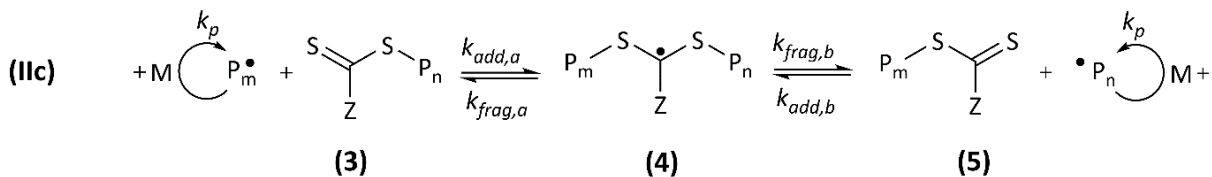
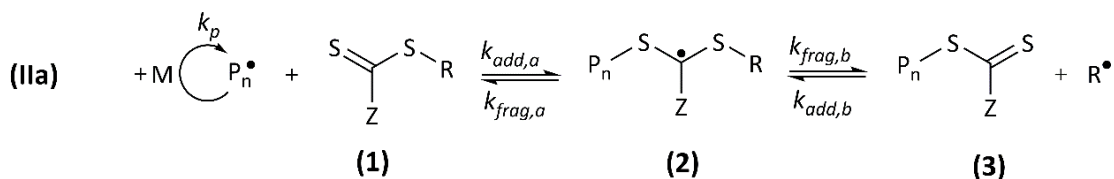
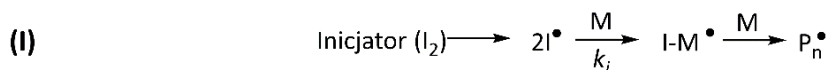
Polimeryzację typu RAFT wykorzystuje się do tworzenia złożonych struktur chemicznych, które mają zastosowanie w systemach biologicznych [5, 101]. Metoda ta umożliwia syntezę materiałów o dobrze zdefiniowanej, złożonej strukturze i wąskim rozrzucie mas cząsteczkowych. Polimeryzacja z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha jest również stosowana do syntezy polimerów wrażliwych na bodźce zewnętrzne [100]. Dodatkową zaletą polimeryzacji RAFT jest możliwość prowadzenia reakcji w szerokim zakresie temperatur oraz w wielu rodzajach rozpuszczalników [102].

3.2.1 Mechanizm polimeryzacji RAFT

Znajomość mechanizmu polimeryzacji RAFT jest bardzo istotna, szczególnie w przypadku syntezy monomerów, które nie są dostępne komercyjnie. Poszczególne etapy polimeryzacji RAFT przedstawia **Schemat 2**. Synteza polimerów metodą RAFT odbywa się w trzech głównych etapach, które są analogiczne do innych polimeryzacji rodnikowych. Inicjacja polimeryzacji RAFT **(I)** następuje poprzez wytworzenie rodnika inicjatora (I^*) - homolityczny rozpad związku diazowego, np. AIBN, 2,2'-azobis(2-metylpropionitril)⁶. Aktywacja termiczna przebiega w charakterystycznej dla inicjatora temperaturze inicjacji. Proces inicjacji można również zapoczątkować promieniowaniem UV lub w wyniku reakcji redoks [103]. Wytworzony rodnik inicjatora (I^*) reaguje z pierwszą cząsteczką monomeru, tworząc rodnik pierwotny ($I - M^*$), który następnie przekształcany jest w oligomeryczny rodnik propagujący (P_n^*). Rodnik ten szybko reaguje z czynnikiem przeniesienia łańcucha (CTA, ang. *chain transfer agent*) (patrz symbol (1), **Schemat 2**). W przypadku polimeryzacji RAFT, związki pełniące funkcję czynnika przeniesienia łańcucha określane są jako reagenty RAFT (ang. *RAFT agent*). Dobór odpowiedniego czynnika RAFT jest kluczowy dla otrzymania polimeru. Reakcja P_n^* z reagentem RAFT rozpoczyna kolejny etap polimeryzacji, którym jest wydłużanie się łańcucha - prolongacja **(II)**. Na etap ten składają się trzy procesy: równowaga wstępna **(IIa)**, reinicjacja **(IIb)** oraz główna równowaga reakcji **(IIc)**.

⁶ Inicjatory to związki, z których generowane są rodniki po wpływie np. temperatury.

W trakcie addycji rodnika propagującego do podwójnego wiązania ditiowęglanu, tworzy się rodnik przejściowy (2), który następnie ulega fragmentacji. W wyniku rozpadu słabego wiązania C-S z rodnika przejściowego, tworzy się „uśpiony” makroreagent RAFT (3) i rodnik reinicjujący (R^\bullet). Proces reinicjacji prowadzi do wytworzenia aktywnego łańcucha (P_m^\bullet), będącego kolejnym rodnikiem propagującym. Następnie „uśpiony” łańcuch polimeru (3) jest aktywowany co prowadzi do utworzenia kolejnego rodnika przejściowego (4). Makroczynnik RAFT (5), który jest również „uśpionym” łańcuchem polimerowym, może być wydłużony przez kolejny aktywny łańcuch. Wzrost łańcucha następuje naprzemiennie z obydwu stron grupy ditiowęglowej. Dwukrotne ustalenie się równowagi termodynamicznej, w trakcie całej reakcji polimeryzacji, pozwala na kontrolowany wzrost masy oraz na uzyskanie polimerów o niskiej polidispersyjności. W omawianej metodzie wpływ etapu terminacji (III) jest zminimalizowany.



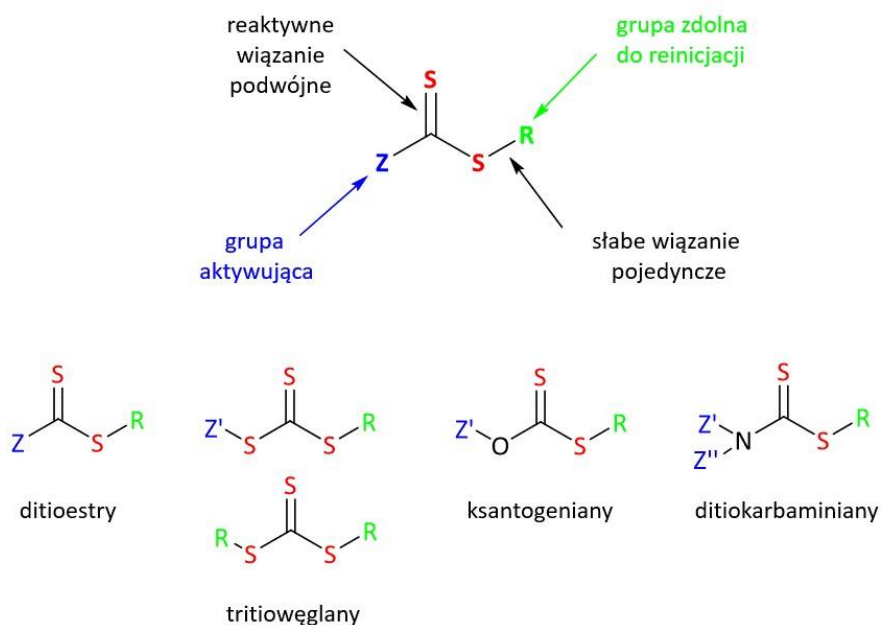
Schemat 2 Mechanizm poszczególnych etapów polimeryzacji z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha.

Część literaturowa

Na prawidłowy przebieg polimeryzacji ma wpływ kilka parametrów m.in. dobór czynnika przeniesienia łańcucha oraz inicjatora, który będzie uzależniony od aktywności użytego monomeru. Do pozostałych warunków reakcji, które również trzeba zoptymalizować należą: temperatura, środowisko oraz czas reakcji, a także stosunki molowe odczynników.

3.2.2 Czynniki przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT

Struktura chemiczna i właściwości czynnika przeniesienia łańcucha (CTA, ang. *chain transfer agent*) odgrywają znaczącą rolę w polimeryzacji RAFT [104, 105]. Reagenty RAFT są związkami organicznymi o charakterystycznej budowie (**Rysunek 3**). Zawierają one ugrupowanie ditiowęglowe⁷ [-C(=S)S-], grupę aktywującą Z oraz zdolną do reinicjacji grupę odchodzącą R. Skuteczność reagenta RAFT zależy od polimeryzowanego monomeru oraz od struktury chemicznej grup Z i R, podstawionych do tiowęglanu [106].



Rysunek 3 Schematyczne przedstawienie czynnika przeniesienia łańcucha w polimeryzacji RAFT.

⁷ ksantogeniany

Część literaturowa

Monomery, używane w syntezie polimerów wrażliwych na bodźce, należą w większości do grupy „bardziej aktywowanych” monomerów (MAM, ang. „*more activated*” monomers). Reaktywność monomerów MAM wynika z obecności w strukturze wiązania winylowego, sprzężonego z innymi wiązaniami podwójnymi, w tym, z pierścieniem aromatycznym, grupami karbonyłowymi lub nitrowymi. Do najczęściej używanych monomerów MAM zaliczamy:

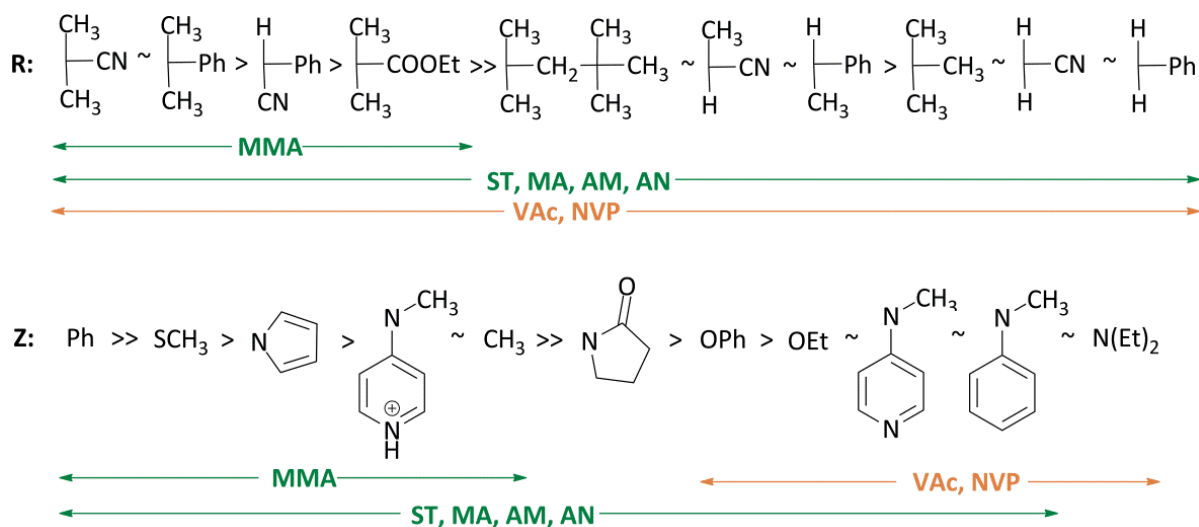
- dieny np. izopren (Ip), butadien (Bd), chloropren (Cp);
- akrylany i metakrylany, np. kwas akrylowy, akrylan metylu, akrylan 2-hydroksyetylu (HEA), kwas metakrylowy (MAA), metakrylan *N*-3-(dimetylamino)propylu (DMAPMA);
- akrylamidy i metakrylamidy np. akrylamid (AM), *N*-akrylylmorfolina (NAM);
- nityle np. akrylonitryl (AN);
- styreny i aromatyczne monomery winylowe np. styren (ST), 4-winylopirydyna (4VP);
- bezwodnik maleinowy.

Polimeryzacja RAFT umożliwia nie tylko syntezę monomerów MAM, ale również „mniej aktywowanych” monomerów (LAM, ang. „*less activated*” monomers). Do monomerów LAM należą związki organiczne, których wiązanie podwójne sąsiaduje z atomem tlenu, azotu, halogenu lub atomem siarki z wolną parą elektronową. Do najczęściej używanych monomerów LAM należą: octan winylu (VAC), *N*-winył-2-pirolidon (NVP), siarczek 4-bromofenylo winylu (BPVS). Klasyyczna polimeryzacja rodnikowa nie była powszechnie używana do syntezy monomerów LAM, ze względu na ich niską reaktywność. Opracowanie metod RDRP, w szczególności polimeryzacji RAFT, pozwala na efektywne otrzymywanie polimerów w których skład wchodzi monomery LAM. Przy odpowiednim doborze czynnika RAFT np. uniwersalne reagenty RAFT, metoda umożliwia polimeryzację polimerów blokowych, które zawierają segmenty składające się zarówno z merów MAM, jak i LAM. Polimeryzacja bloków o różnej reaktywności jest możliwa bez konieczności zmiany czynnika przeniesienia łańcucha [107, 108].

Reaktywność czynnika RAFT, względem konkretnych monomerów, wynika z jego charakterystycznej budowy chemicznej, która ma bezpośredni wpływ na szybkość i efektywność procesu oraz na jego skuteczność. Grupa *R* odpowiada za trwałość i reaktywność wolnych rodników propagujących oraz musi być dobrą grupą odchodzącą. Powstające rodniki propagujące (R^* oraz P_m^*), muszą być zdolne do reinicjacji procesu wzrostu łańcucha, co pozwala zapobiec retardacji reakcji. Szybkość fragmentacji rośnie wraz z rzędowością grupy *R*, podstawionej do

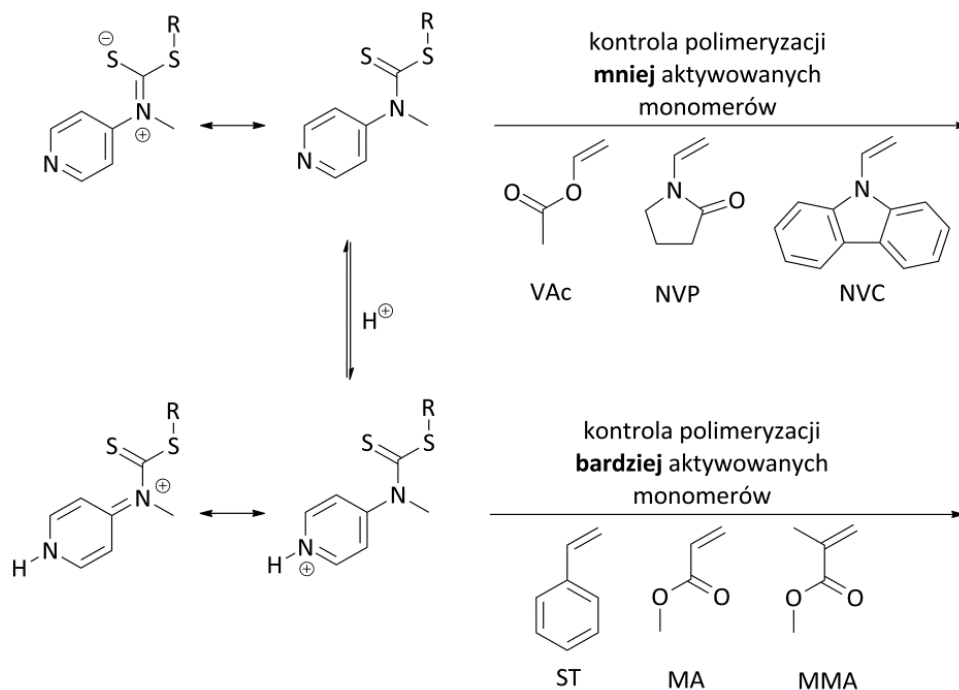
Część literaturowa

ksantogenianu. Tworzące się rodniki trzeciorzędowe będą lepszymi grupami odchodzącymi, niż rodniki pierwszorzędowe (**Rysunek 4**). Reaktywność może być również kontrolowana poprzez odpowiedni dobór grupy Z, która wpływa na aktywację i dezaktywację wiązania podwójnego C=S, czyli stabilizację rodnika przejściowego. Grup funkcyjnych w pozycji Z pozwala sterować wielkością stałych szybkości addycji (k_{add}) i fragmentacji (k_{frag}) w trakcie addycyjno-fragmentacyjnego przeniesienia łańcucha. **Rysunek 4** przedstawia malejącą w szeregu szybkość addycji, która rośnie w przeciwną stronę niżeli szybkość fragmentacji. Dobór grup funkcyjnych podstawionych, w pozycjach R i Z, powinien być również rozpatrywany w kontekście modyfikacji gotowego polimeru np. modyfikacji grup końcowych czy dalszej funkcjonalizacji polimeru [109].



Rysunek 4 Ogólne reguły dotyczące wyboru grupy R i grupy Z.

Szczególnym rodzajem czynnika przeniesienia łańcucha są uniwersalne reagenty RAFT, które mogą być użyte w reakcji polimeryzacji „bardziej aktywowanych”, jak i „mniej aktywowanych” monomerów. Uniwersalne reagenty RAFT, których reaktywność będzie się zmieniać w zależności od pH reakcji, określane są jako „przełączniki” (ang. *switchable RAFT agents*) [110, 111]. Zmiana reaktywności tych czynników opiera się na protonacji pierścienia pirydynowego, w grupie Z ditiokarbaminianu, silnym kwasem organicznym, np. kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*TsOH) (**Schemat 3**). Aktywowany w ten sposób czynnik RAFT jest stabilizowany poprzez rezonans chemiczny. W efekcie ma on mniejszą zdolność oddawania



Schemat 3 Mechanizm zmiany reaktywności uniwersalnego czynnika RAFT.

elektronów w środowisku kwaśnym, co wpływa na podwyższenie reaktywności wiązania C=S. Dodatkowo, wprowadzenie grupy elektrodonorowej sąsiadującej z wiązaniem podwójnym sprawia, że atom siarki jest mniej podatny na przyjęcie elektronów [112]. Sprotonowana forma czynnika RAFT kontroluje polimeryzację monomerów MAM. Wiązanie C=S w obojętnej formie „przełącznika” ma niską reaktywność, a rodnik przejściowy fragmentuje szybciej. Pozwala to na lepszą kontrolę polimeryzacji monomerów LAM.

4 Metody identyfikacji masy molowej

Syntetyczne polimery to mieszanina makrocząsteczek o różnej wielkości lub/i długości łańcuchów. Ze względu na złożoność polimerów masa molowa musi być w pewien sposób uśredniona, a jej dokładne określenie nie jest rzeczą prostą. Zdefiniowanie i wyznaczenie masy molowej polimerów (M) jest bardziej złożonym procesem niżeli określenie masy związków niskocząsteczkowych [113]. Jest to jednak kluczowe, ponieważ wiele właściwości materiałów polimerowych jest zależnych od masy cząsteczkowej. Wielkość makrocząsteczek ma wpływ na

Część literaturowa

fizyczne i mechaniczne właściwości polimerów, m.in. na rozpuszczalność, zdolność do krystalizacji, odporność chemiczną oraz zdolność do tworzenia błon i włókien [114]. Masa molowa odzwierciedla liczbę łańcuchów polimerowych w roztworze oraz stopień ich splątania. Dodatkowo, roztwory polimerowe o niskiej masie cząsteczkowej tworzą inne struktury niżeli polimery o większej masie cząsteczkowej. Wiele właściwości materiałów polimerowych np. zdolność do krystalizacji, zależy nie tylko od ich masy cząsteczkowej, ale także od stopnia polimeryzacji (X_n). Stopień polimeryzacji określa liczbę merów (powtarzających się jednostek) z których zbudowany jest łańcuch polimerowy. Kolejnym parametrem, który pozwala określić w jakiej części otrzymaliśmy polimer o założonej masie teoretycznej, jest rozrzut masy cząsteczkowej czyli dyspersyjność polimeru (\mathfrak{D}_M). Rozkład mas molowych określa stopień złożoności mieszaniny, czyli pomaga ocenić, czy metoda polimeryzacji jest optymalna dla syntezy danego polimeru. Dyspersyjność masy molowej definiuje się jako stosunek wagowo średniej masy cząsteczkowej (\overline{M}_w) do liczbowo średniej masy cząsteczkowej (\overline{M}_n) (6). Polimery o niewielkim rozrzucie mas cząsteczkowych będą odznaczały się niską dyspersyjnością ($1 < \mathfrak{D}_M < 1.5$), natomiast polimery polidispersyjne będą stanowić bardziej złożoną i niejednorodną mieszaninę makromolekuł ($\mathfrak{D}_M > 1.5$).

$$\mathfrak{D}_M = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (6)$$

Duża dyspersyjność ma negatywny wpływ na właściwości użytkowe polimerów, dlatego nowoczesne metody polimeryzacji skupiają się na uzyskaniu produktów o niskim rozrzucie mas [113]. **Tabela 1** przedstawia zakresy polidispersyjności, z jakimi możemy uzyskać polimer, używając popularnych metod polimeryzacji. Polimery o takiej samej średniej masie molowej mogą mieć inny rozrzut mas molowych, a tym samym różne właściwości fizykochemiczne [115]. Wartość $\mathfrak{D}_M = 1$, jest dla polimerów syntetycznych czysto teoretyczna, ponieważ żadna z metod polimeryzacyjnych nie umożliwia syntezy polimeru, w którym wszystkie łańcuchy są równe.

Tabela 1. Typowe zakresy wartości polidispersyjności polimerów syntetycznych otrzymywanych popularnymi metodami polimeryzacji.

METODA POLIMERYZACJI	DYSPERSYJNOŚĆ
Polimeryzacja rodnikowa	1.5 - 2.0
Kontrolowane polimeryzacje rodnikowe	1.01 – 1.3
Polimeryzacja stopniowa (poliaddycja, polikondensacja)	około 2.0
Inne polimeryzacje łańcuchowe	>> 2.0

Analizy rozrzutu poszczególnych mas cząsteczkowych dostarczają informacji o określonych właściwościach fizycznych polimerów [116]. Na podstawie liczbowo średniej masy cząsteczkowej (\overline{M}_n), można określić kruchość polimeru, właściwości płynięcia oraz ściskania. Wagowo średnią masę cząsteczkową (\overline{M}_w), można powiązać z wytrzymałością polimeru i jego udarnością, czyli podatnością na dynamiczne złamanie. Informacje związane z wydłużaniem i elastycznością polimerów możemy uzyskać z analizy rozrzutu Z-średnich mas cząsteczkowych (\overline{M}_z). Wprowadzenie różnie zdefiniowanych mas molowych, nie jest zatem czysto teoretycznym zabiegiem. Duża różnorodność w definiowaniu mas cząsteczkowych polimerów spowodowana jest tym, że różne techniki analityczne są w stanie dostarczyć informacji przeważnie o jednej z nich. Zależność poszczególnych mas molowych możemy przedstawić następująco:

$$\overline{M}_n < \overline{M}_v < \overline{M}_w < \overline{M}_z \quad (7)$$

gdzie: \overline{M}_v to średnia masa molowa lepkości wyznaczana metodami wiskozymetrycznymi.

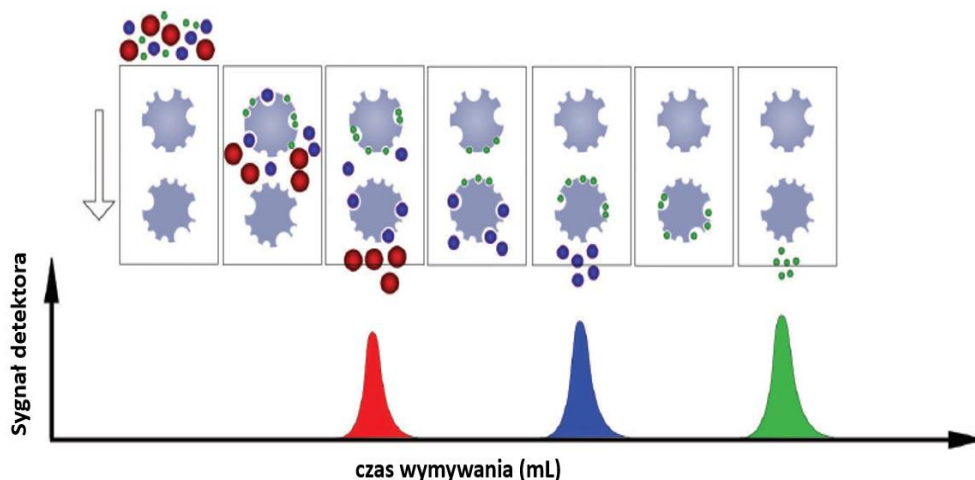
Masa molowa polimerów może być wyznaczona kilkoma metodami. Niektóre z metod służących do wyznaczania masy cząsteczkowej polimerów wymagają wstępnej kalibracji, bazującej na znanych masach standardów polimerowych np. polistyrenu. Metody te określamy jako pośrednie, gdyż otrzymanie wiarygodnego wyniku uzależnione jest od dokładności krzywej kalibracyjnej. Jeżeli krzywa kalibracyjna jest wykonana nieprawidłowo obliczona na jej podstawie masa polimeru będzie obarczona dużym błędem. Metodami pośrednimi są metody chromatograficzne, a także pomiary wykorzystujące lepkość roztworów polimerowych. Drugim typem metod wyznaczania masy cząsteczkowej polimeru są metody bezpośrednie, które nie

Część literaturowa

wymagają wcześniejszej kalibracji. Do metod bezpośrednich możemy zaliczyć m.in. osmometrię, ultrawiórowanie analityczne, metody spektrometrii mas np. MALDI (MALDI, ang. *matrix assisted laser desorption and ionisation*) [117, 118] oraz metody oparte na rozpraszaniu światła np. SAXS (SAXS, ang. *small angle X-ray scattering*). Oddzielną grupą metod wyznaczania mas molowych polimerów są metody równoważnikowe, oparte na strukturze chemicznej badanego polimeru. Metody te opierają się na analizie grup końcowych, przykładowo z wykorzystaniem jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*).

4.1 Chromatografia wykluczenia (GPC/SEC)

Jedną z najbardziej popularnych i szeroko stosowanych metod oznaczania mas molowych polimerów jest chromatografia wykluczenia (SEC, ang. *size exclusion chromatography*), która jest również określana jako chromatografia żelowa (GPC, ang. *gel permeation chromatography*). Terminy SEC i GPC, w kontekście analizy polimerów są używane zamiennie, a często w literaturze spotyka się zapis GPC/SEC, którym będę posługiwała się w niniejszej pracy [76]. Chromatografia wykluczenia to jedna z metod chromatografii cieczowej, która pozwala na badanie rozkładu masy cząsteczkowej polimerów, biopolimerów oraz białek [119, 120]. W zależności od dobranych warunków możemy analizować (frakcjonować) zarówno polimery rozpuszczalne w wodzie, jak również w rozpuszczalnikach organicznych. Metoda GPC/SEC pozwala na określenie mas polimerów o niskiej dyspersyjności, ale również może być wykorzystywana do wstępnego rozdzielania mieszanin. Podstawą rozdziału w chromatografii wykluczenia jest względna wielkość cząstek/frakcji polimeru, a dokładniej, promień hydrodynamiczny makrocząsteczek. Czas pozostania poszczególnych frakcji polimeru w porach kolumny, zależy od dopasowania wielkości ich cząsteczek do wielkości porów. **Rysunek 5** pokazuje drogę „przejścia” cząsteczek o różnym rozmiarze (promieniu hydrodynamicznym) przez kolumnę chromatograficzną, wypełnioną usieciowanym żelem [121]. Makrocząstki o dużych masach cząsteczkowych zatrzymywane są tylko przez największe pory, co powoduje że ich droga przejścia przez kolumnę będzie krótsza. Analogicznie, substancje o mniejszym rozmiarze będą mogły penetrować większą liczbę porów, czego wynikiem jest znacznie dłuższa droga wytlukania (permeacji) tych frakcji. Całkowicie wykluczane frakcje, to te o bardzo dużym promieniu hydrodynamicznym, którym



Rysunek 5 Schemat rozdzielania mieszaniny polimeru przy użyciu chromatografii wykluczenia (GPC) [121].

przypisywane są duże masy cząsteczkowe. Takie makrocząsteczki nie są zatrzymywane przez żadne pory, dlatego też migrują przez kolumnę najszybciej. Czas wykluczenia frakcji wysokocząsteczkowej będzie krótszy, niż czas wykluczenia frakcji o pośrednich masach, a niskocząsteczkowe części polimeru będą wyfukiwane z kolumny jako ostatnie. Rozdzielanie cząstek powinno odbywać się z jak najmniejszym udziałem sorpcji cząsteczek na kolumnie, czyli w warunkach eliminacji. O rozdziale powinien decydować tylko czas dyfuzji molekuł w przestrzeni porów. Nie zawsze jednak eliminacja oddziaływań sorbcyjnych jest możliwa, szczególnie utrudnione jest to w przypadku rozdzielania mieszanin polarnych polimerów. Interakcje pomiędzy fazą stacjonarną, a rozpuszczonym w fazie ruchomej polimerem, będą rzutowały na rozdział. Oddziaływania te mogą prowadzić do zmiany dyfuzji poszczególnych części polimeru co na chromatogramie obserwujemy m.in. jako rozmycie frontalne pików, ogonowanie pików czy wręcz wydłużony czas przebywania wszystkich frakcji polimeru na kolumnie. Te niepożądane interakcje będą wpływały na prawidłowe określenie mas molowych polimeru oraz jego dyspersyjności.

Część literaturowa

4.1.1 Główne zasady doboru optymalnych warunków rozdziału polimerów

Odpowiednie dobranie fazy stacjonarnej, fazy ruchomej oraz pozostałych warunków analizy, przykładowo temperatury czy rodzaju detektora, jest niezwykle istotne przy określeniu mas molowych polimeru metodą chromatografii wykluczenia [122]. Proces frakcjonowania przebiega na kolumnach chromatograficznych, które upakowane są wysokoporowatą fazą stacjonarną, o zdefiniowanej wielkości porów (od 50 Å do 10^7 Å). Układ przeważnie składa się z kilku kolumn połączonych szeregowo, gdzie każda kolumna frakcjonuje cząsteczki o innym zakresie mas/rozmiarów (od 100 do nawet $\sim 20\,000\,000$ g/mol). Kolumny łączymy od największych do najmniejszych wykluczanych mas cząsteczkowych. Obecnie na rynku jest szeroki wybór kolumn z dedykowanym wypełnieniem dla różnych klas związków polimerowych. W zależności od użytego złoża w kolumnie, limit wykluczanych mas może być wąski, kilka/kilkadziesiąt tysięcy, albo bardzo szeroki, od kilkuset do miliona jednostek masy. Pozwala to na dobranie odpowiedniej fazy stacjonarnej do rozdziału badanych mas polimerów. Dopasowanie rodzaju złoża do badanych polimerów może być wyzwaniem w przypadku złożonych układów makromolekularnych oraz nowoprojektowanych polimerów. W tych przypadkach interpretacja otrzymanych wyników może być utrudniona. W analizie GPC/SEC kolumny są termostatowane, a temperatura przeważnie podwyższona. Ogrzewanie kolumny powoduje zwiększenie współczynnika rozdzielczości oraz poprawę procesu przenikania. W niektórych przypadkach aby poprawić wykluczanie, zmniejsza się lepkość rozpuszczalnika np. poprzez stosowanie fazy ruchomej z DMF, co dodatkowo powoduje zmniejszenie ciśnienia wstecznego w układzie. Skład eluentu dobieramy na podobnej zasadzie jak w innych metodach chromatografii cieczowej pamiętając, że w chromatografii żelowej dążymy do wyeliminowania sorpcji cząsteczek na powierzchni wypełnienia. Faza ruchoma musi dobrze rozpuszczać rozdzielane substancje, a ponadto dobór rozpuszczalnik będzie zależny od warunków rozdziału. Do rozdziału w warunkach niewodnych, popularnie stosowanymi fazami ruchomymi, są takie rozpuszczalniki organiczne jak: tetrahydrofuran (THF), toluen, chloroform, *N*-metylopirolidon czy sulfotlenek dimetylu (DMSO). Natomiast do analizy polimerów polarnych stosują się wodne fazy ruchome lub polarne niewodne rozpuszczalniki organiczne, przykładowo: dimetyloformamid (DMF), acetonitryl, metanol oraz mieszaniny tych rozpuszczalników z wodnymi roztworami kwasów, zasad i soli.

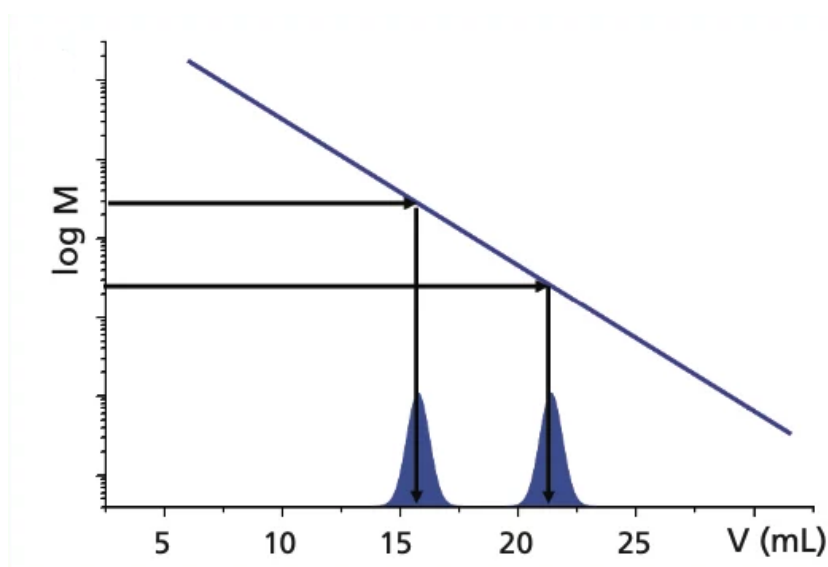
Standardowym układem do chromatografii żelowej jest zestaw od wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *high performance liquid chromatography*). Jednym z kluczowych elementów układu chromatograficznego jest detektor. Obecnie najczęściej używanym detektorem w chromatografii wykluczenia jest refraktometr różnicowy (RID, ang. *refractive index detector*). Jest to detektor stężeniowy, którego sygnał jest proporcjonalny do ilości badanych składników rozpuszczonych w fazie ruchomej. Detektor refraktometryczny mierzy różnicę współczynnika załamania światła pomiędzy eluentem w celi odniesienia, a zawartością eluentu przepływającego w trakcie analizy, przez celę pomiarową. Detektor ten jest określany jako uniwersalny, ponieważ jego odpowiedź nie zależy od struktury związku chemicznego. Nie jest również wymagana obecności konkretnych grup funkcyjnych w cząsteczce, jak ma to miejsce w przypadku detektora UV-Vis, który jest drugim detektorem stężeniowym popularnie stosowanym w analizie polimerów. Niska czułość detektora refraktometrycznego nie utrudnia identyfikacji mas cząsteczkowych polimerów, gdyż stężenie próbki badanej w tym przypadku analizy polimerów jest dość wysokie (~2 mg/mL). Do określenia mas cząsteczkowych polimerów stosuje się również inne detektory lub łączy się w szereg dwa/kilka różnych typów detektorów. Detektor refraktometryczny jest umieszczany w takim przypadku na początku, ponieważ nie niszczy on próbki w trakcie analizy. Łączenie detektorów pozwala uzyskać więcej informacji o badanym materiale, dzięki czemu możliwa jest kompleksowa charakterystyka makrocząsteczek [123]. Do popularnie stosowanych detektorów w pomiarach GPC/SEC należą również: laserowy detektor rozpraszania światła (LLSD, ang. *laser light scattering detector*) [124] oraz detektor wiskozymetryczny. Do określania mas cząsteczkowych polimerów używane są również układy wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączone z spektrometrią mas [125] oraz z detektorem wyładowań koronowych CORONA-CAD [126].

4.1.2 Krzywa kalibracyjna

Chromatografia wykluczenia umożliwia określenie rozkładu masy cząsteczkowej polimeru poprzez wyznaczenie wartości \overline{M}_n , \overline{M}_w , \overline{M}_z oraz umożliwia określenie dyspersyjność polimeru. W celu prawidłowego wyznaczenia średnich mas cząsteczkowych przy użyciu chromatografii wykluczenia, konieczne jest wykreślenie krzywej kalibracyjnej. Rozdział w metodzie GPC/SEC jest zależna od wielkości cząstek w roztworze, nie zaś mas molowych. Poszczególne frakcje

Część literaturowa

wymywane są z kolumny w określonym czasie/objętości elucji. Krzywa kalibracyjna pozwala na przypisanie masy molowej do wielkości cząstek i wykreślana jest na podstawie polimerowych wzorców mas molowych. Do najczęściej używanych wzorców polimerowych zaliczamy polistyren, glikol polietylenowy, polimery polisacharydowe, takie jak pullulan oraz dekstran. Jeżeli struktura chemiczna i/lub promień hydrodynamiczny znacznie odbiega od struktury badanego polimeru, oznaczone masy molowe są błędne i odnoszą się tylko do zastosowanych wzorców kalibracyjnych [127]. Najczęściej kalibracja polega na pomiarze objętości retencji kilku/kilkunastu wzorców polimerów, których zakres mas cząsteczkowych jest znany, a rozrzut mas bardzo wąski $\overline{M}_w \sim \overline{M}_n$. Uniwersalna krzywa kalibracyjna przedstawia zależność masy cząsteczkowej ($\log M$) od czasu retencji (t_R) lub objętości elucji (V) polimeru (**Rysunek 6**) [128]. Różnica między masami molowymi oddzielonych frakcji polimeru będzie zależna od nachylenia krzywej kalibracyjnej. Należy pamiętać, że im bardziej „stroma” jest krzywa kalibracyjna tym mniejsza będzie różnica objętości elucji pomiędzy poszczególnymi standardami polimerowymi. Przy dużym współczynniku nachylenia krzywej kalibracyjnej, interpretacja wyników mas molowych dla poszczególnych części mieszaniny może być bardzo trudna lub wręcz niemożliwa.



Rysunek 6 Uniwersalna krzywa kalibracyjna stosowana w chromatografii GPC/SEC [128].

4.2 Metoda grup końcowych

Oddzielną grupą metod używanych do określania masy molowej są metody równoważnikowe takie jak np. analiza grup końcowych. Metoda grup końcowych polega na określeniu liczbowo średniej masy cząsteczkowej polimeru, poprzez ilościowe określenie grup funkcyjnych (-COOH, -OH, -NH₂) znajdujących się na końcach łańcucha makrocząsteczek. Oznaczenie grup kwasowych przeprowadza się poprzez miareczkowanie roztworu polimeru mianowanym roztworem wodorotlenku sodu (NaOH) lub potasu (KOH) w środowisku niewodnym. Grupy hydroksylowe oznacza się m.in. poprzez reakcję polimeru rozpuszczonego w chloroformie z chlorkiem 2,4-dinitrobenzylu. Natomiast do określenia ilości grup aminowych stosuje się miareczkowanie mianowanym roztworem mocnego nieorganicznego np. kwasu siarkowego (H₂SO₄) [114]. Metodę alkacymetryczną stosuje się głównie do oznaczania polimerów z kwasowymi grupami końcowymi takimi jak np. poliamidy. Ilościowe określenie grup karboksylowych i hydroksylowych możemy przeprowadzić również metodami miareczkowania potencjometrycznego oraz metodą wolumetryczną tj. miareczkowaniem metodą Karla Fischera.

Analiza grup końcowych możliwa jest także za pomocą spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego (¹H NMR) [129, 130]. Określenie wartości \overline{M}_n przy użyciu tej techniki opiera się na kilku założeniach. Najważniejszym z nich jest możliwość identyfikacji sygnałów protonów należących do jednej z grup końcowych. Określenie masy molowej metoda NMR jest ściśle związane z prawidłową identyfikacją tych sygnałów. Przesunięcia chemiczne od protonów grup końcowych muszą być łatwe do odróżnienia, od sygnałów powtarzających się jednostek polimeru. Poprawność oznaczeń tą metodą jest uzależniona nie tylko od rodzaju grupy funkcyjnej, ale także od wielkości polimeru. Przy bardzo dużych masach polimeru sygnał protonów grupy końcowej będzie trudny do zidentyfikowania i prawidłowej integracji, co będzie utrudniało określenie masy molowej polimeru. Ostatnią istotną kwestią jest znajomość struktury merów oraz masa molowa powtarzającej się jednostki. Po określeniu stosunków sygnałów protonów w grupach końcowych, do sygnałów protonów w łańcuchu oraz uwzględnieniu ilości protonów odpowiadających każdemu sygnałowi i pomożeniu otrzymanego wyniku przez masę molowa powtarzającej się jednostki, jesteśmy w stanie wyliczyć wartość \overline{M}_n . Dodatkowo, w przypadku,

Część literaturowa

gdy grupy końcowe mają rozbudowaną strukturę, ich masa powinna być uwzględniona w obliczeniach, czyli dodana do otrzymanego iloczynu.

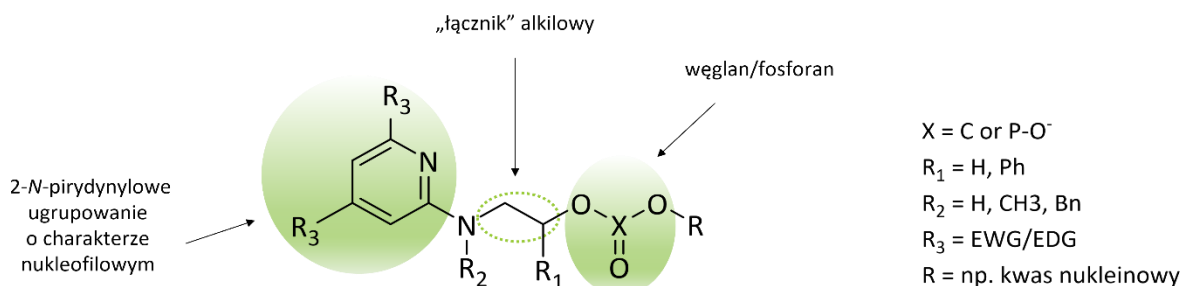
Metoda grup końcowych jest również wykorzystywana w określeniu masy molowej polimerów przy użyciu spektroskopii NMR polimerów w fazie stałej (ssNMR, ang. *solid-state NMR*) [131], spektrometrii mas z jonizacją próbki laserem wspomaganą matrycą z detektorem czasu przelotu (MALDI-TOF-MS, ang. *matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry*) [132] oraz spektroskopii w bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *near infrared spectroscopy*) [133].

5 Związki 2-pirydynylo-TGO

Modyfikacje struktur chemicznych polegają na wprowadzeniu do cząsteczki konkretnych grupy funkcyjnych, na drodze charakterystycznych reakcji chemicznych. Odbywa się to poprzez przeprowadzenie jednej lub wielu grup funkcyjnych w inne ugrupowanie. W cząsteczkach z dużą ilością różnych grup funkcyjnych konieczne jest czasowe zablokowanie aktywności niektórych z nich. W tym celu stosuje się grupy ochronne, które zabezpieczają grupę funkcyjną np. hydroksylową, na danym etapie syntezy. Grupy ochronne w chemii organicznej stosowane są w wieloetapowej syntezie związków organicznych m.in. związków aktywnych biologicznie, takich jak białka, kwasy nukleinowe czy lipidy [134]. Powinny one wykazywać szereg właściwości, wśród których najistotniejszą kwestią jest wysoka wydajność procesów blokowania i odblokowywania. Blokowanie powinno odbywać się w sposób selektywny, bez użycia agresywnych odczynników chemicznych. W trakcie syntezy grupa ochronna powinna być stabilna, a jej wprowadzenie do cząsteczki nie powinno generować dodatkowych centrów symetrii, co może powodować zmniejszenie wydajności syntezy docelowego produktu. Usuwanie grupy ochronnej powinno przebiegać w sposób selektywny, a sama grupa, po odblokowaniu, nie powinna przeszkadzać w oczyszczaniu produktu [134].

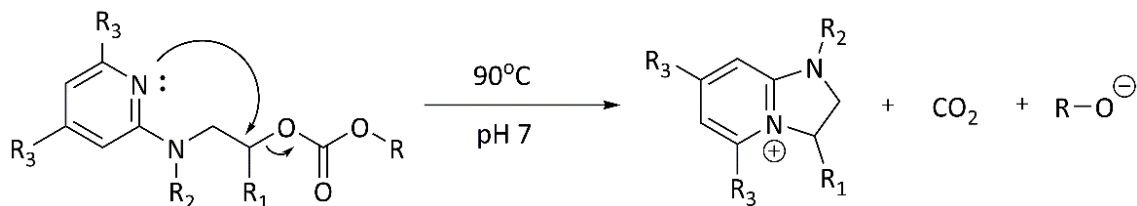
W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej otrzymane monomery są analogami termolabilnych grup ochronnych (TGO), których budowa bazuje na ugrupowaniu 2-N-pirydynylowym. Termolabilne grupy ochronne są związkami organicznymi wykorzystywanymi w chemii kwasów nukleinowych do blokowania aktywności grupy fosforanowej [135], aminowej [136] oraz hydroksylowej [137]. Właściwości TGO wynikają z ich

budowy chemicznej, w szczególności z obecności pierścienia pirydyny w strukturze. **Rysunek 7** przedstawia ogólny schemat budowy TGO oraz pokazuje możliwe miejsca modyfikacji grupy ochronnej. Modyfikacje struktury chemicznej, poprzez wprowadzanie odpowiednich grup funkcyjnych, wpływa na reaktywność chemiczną TGO oraz szybkość procesu odblokowania. Uwalnianie funkcji ochraniającej grupy funkcyjnej następuje w warunkach neutralnych, bez udziału



Rysunek 7 Struktura chemiczna szkieletu termolabilnych grup ochronnych oraz możliwe miejsca modyfikacji.

powszechnie używanych w tym celu reagentów, takich jak kwasy, zasady czy związki utleniające. Proces odblokowania następuje poprzez atak nukleofilowy atomu azotu pierścienia pirydyny na węgiel α łańcucha hydroksyetylowego, w wyniku czego tworzy się związek bicykliczny, a blokowana grupa funkcyjna zostaje uwolniona (**Schemat 4**). Właściwości absorpcyjno-emisyjne produktu bicyklicznego pozwalają na łatwą jego identyfikację oraz stanowią potwierdzenie mechanizmu, według którego zachodzi odblokowanie. Jonowy charakter cyklicznej formy termolabilnej grupy ochronnej, ułatwia oddzielenie jej od pozostałych składników mieszaniny



R₁ = H, Ph
 R₂ = H, CH₃, Bn
 R₃ = EWG/EDG
 R = ochraniająca grupa funkcyjna

Schemat 4 Proces usunięcia termolabilnej grupy ochronnej poprzez wewnątrzcząsteczkową cyklizację.

Część literaturowa

w procesie oczyszczania np. poprzez ekstrakcję, czy oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej, co wpływa to na zwiększenie efektywności i wydajności procesu.

Głównym narzędziem w sterowaniu procesem wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji jest modyfikacja struktury termolabilnych grup ochronnych. Funkcjonalizacja ugrupowania 2-*N*-pirydynowego (R_2) pozwala na zmianę reaktywności TGO, poprzez efekty elektronowe. Wprowadzenie grupy EDG (EDG, ang. *electron donating group*) w pozycji R_2 , ułatwia stabilizację tworzącego się pierścienia heterocyklicznego. Natomiast wprowadzenie w tej pozycji grupy EWG (EWG, ang. *electron withdrawing group*) oraz grupy o dużej zawadzie sterycznej, będzie zmniejszało efektywność ataku nukleofilowego azotu pirydyny. Wprowadzenie modyfikacji w obrębie pierścienia pirydyny (R_3) wpływa na nukleofilowość pierścienia, a tym samym na efektywność wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Grupy elektrodonorowe będą przyspieszały proces, a grupy odciągające elektrony z pierścienia heterocyklicznego będą reakcję spowalniały. Zmiany strukturalne w obrębie łańcucha alifatycznego będą również wpływały na szybkość procesu usunięcia grupy TGO. Wprowadzenie grupy EWG/EDG jako podstawnik R_1 będzie w analogiczny sposób, jak w pozostałych miejscach modyfikacji, wpływało na proces usunięcia grupy termolabilnej. Możemy kontrolować proces odblokowania nie tylko poprzez modyfikacje strukturalne, a także przez czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura czy pH środowiska reakcji. Podwyższenie temperatury reakcji odblokowania powoduje przyspieszenie usuwania TGO. W reakcji modelowej prowadzonej w temperaturze 90 °C odblokowanie następuje bardzo szybko, w zależności od budowy grupy, nawet po kilku/kilkunastu minutach. Szybkość reakcji może być kontrolowana nie tylko zmianą temperatury, ale także poprzez pH reakcji. Wewnątrzcząsteczkową cyklizacją może być czasowo blokowana, poprzez protonację azotu pirydyny, przy użyciu mocnego kwasu. Zmiana pH reakcji na obojętne/zasadowe pozwala na wznowienie procesu odblokowania. Dodatkowym czynnikiem, dzięki któremu proces usuwania może być kontrolowany, jest polarność środowiska reakcji. W rozpuszczalnikach polarnych reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji będzie przebiegała szybciej niż w rozpuszczalnikach niepolarnych, czy polarnych aprotycznych.

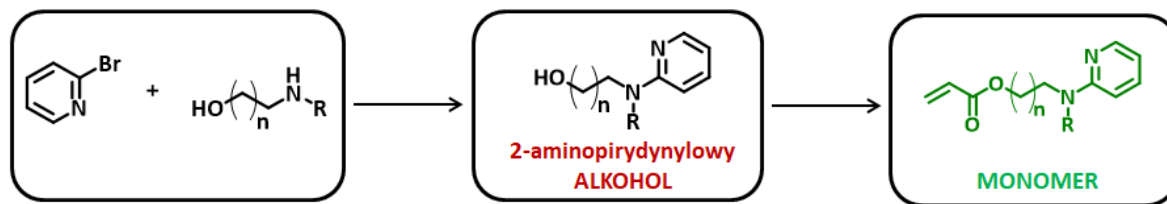
II. Badania własne i dyskusja wyników

1 Otrzymywanie alkoholowych prekursorów monomerów

W części literaturowej omówiono jak podstawniki chemiczne w strukturze termolabilnych grup ochronnych wpływają na szybkość uwalniania związku cyklicznego (deprotekcji), podczas ochrony ważnych grup funkcyjnych takich jak: hydroksylowa, fosforanowa czy estrowa. Dotychczas zastosowanie TGO ograniczało się do ortogonalnej ochrony reaktywnych centrów np. w nukleozydach, nukleotydach czy kwasach nukleinowych (patrz Rozdział 5, Części I, str. 54). Potencjał tkwiący w procesie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji może być także wykorzystany w układach makromolekularnych np. sterując uwalnianiem związków aktywnych. W związku z powyższym w niniejszej pracy podjęłam próbę wykazania, że cyklizacja wspomagana temperaturą może być również skutecznie wykorzystywana w systemach polimerowych, jako mechanizmu uwalniania cząsteczek do układu. Zagadnienie to podzieliłam na kilka etapów badawczych, które łączą cele syntetyczne i analityczne. Głównym celem syntetycznym pracy było zaprojektowanie i otrzymanie polimerów, dla których proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji byłby możliwy do przeprowadzenia. Zbadanie właściwości modelowych polimerów umożliwi zaprojektowanie nowych materiałów polimerowych, takich jak nośniki czy kapsuły polimerowe. Głównym mechanizmem uwalniania związków aktywnych biologicznie, z polimerów zawierających układy 2-aminopirydynylowe, byłaby wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja. Zaprojektowanie polimeru posiadającego możliwość uwalniania części łańcucha bocznego w wyniku reakcji cyklizacji, nie jest rzeczą prostą. Dodatkowo, kontrola szybkości procesu powinna być łatwa. W proponowanych modelowych polimerach, funkcja grupy TGO jest zmieniona, gdyż ugrupowanie 2-aminopirydynylowe nie pełni już roli ochronnej, tylko jest integralną częścią makrocząsteczki. Każda jednostka polimeru (mer) zawierająca linową formę TGO, w wyniku zmian środowiska zostaje przekształcona w formę cykliczną. Tworzący się związek bicykliczny jest w tym przypadku modelowym związkiem aktywnym, który ma być ochroniany przez pozostałą część cząsteczki czyli łańcuch polimerowy, do momentu jego uwolnienia z układu.

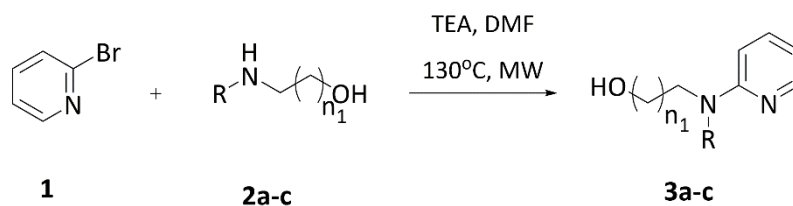
Badania własne i dyskusja wyników

Charakterystyczne właściwości spektroskopowe (m.in. absorpcja w zakresie UV) związku cyklicznego, pozwalają w łatwy sposób monitorować proces uwalniania.



Schemat 5 Schemat blokowy syntezy alkoholi i monomerów.

Pierwszym etapem otrzymywania polimeru modelowego, w którym proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji indukowanej temperaturą mógłby być badany, była synteza alkoholowych prekursorów monomerów, które następnie przeprowadzane były w odpowiednie monomery (**Schemat 5**). Synteza 2-aminopirydynyłowemu alkoholi polegała na substytucji do pierścienia aromatycznego i była wspomagana za pomocą promieniowania mikrofalowego. Przebieg syntezy przedstawia **Schemat 6**. Pomimo obecności wolnej grupy hydroksylowej, to drugorzędowa grupa aminowa, ze względu na większą kwasowość protonu, ulega reakcji substytucji do pierścienia pirydyny. Wybrałam trzy warianty 2-aminopirydynyłowemu analogów TGO (**3a-c**), które różniły się szybkością uwalniania funkcji hydroksylowej. Podczas projektowania TGO zauważono, że podstawnik przy egzocyklicznym atomie azotu ma duży wpływ na szybkość reakcji cyklizacji, tzn. szybkość termicznego odblokowania wzrasta, gdy podstawniki



a R = CH₃, n₁ = 1

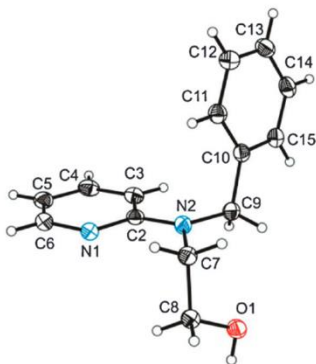
b R = CH₂C₆H₅, n₁ = 1

c R = CH₃, n₁ = 2

Schemat 6 Ogólny schemat syntezy pirydyn-2-yl-aminoalkoholi.

Badania własne i dyskusja wyników

R uszeregujemy w następujący sposób $H < CH_3 < CH_2C_6H_5$ [137]. Nukleofilowość atomu azotu w pierścieniu pirydyny jest siłą napędową (warunkiem koniecznym) reakcji cyklizacji, jednakże to układ przestrzenny atomów w cząsteczce (konformacja) determinuje szybkość termocyklizacji. Krystalizacja związku pozwala na zbadanie konformacji o najniższej energii. Na podstawie badań krystalograficznych aminoalkoholi zidentyfikowano dwa kąty torsyjne ($N1-C2-N2-C7$ oraz $C2-N2-C7-C8$) jako kluczowe do przewidywania termolabilnych właściwości cząsteczek TGO (**Rysunek 8**). Dodatkowo, skrócenie w konformacji odległości $N1-C8$ sprzyja procesowi cyklizacji w węglanach. Związki w których odległość $N1-C8$ jest najmniejsza charakteryzują się najkrótszym czasem termocyklizacji [138]. Ponadto, najkorzystniejsze energetycznie jest formowanie się pierścienia pięciocłonowego. Dla niektórych związków możliwe jest również tworzenie się pierścienia sześciocłonowego, jednak szybkość cyklizacji znacząco się zmniejsza. Wprowadzenie zmian w strukturze 2-aminopirydynylowych alkoholi ma na celu sprawdzenie jak modyfikacje chemiczne wpływają na tworzenie polimeru oraz szybkość procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla wprowadzonych 2PyTGO. Hipotetycznie, proces uwalniania związku bicyklicznego powinien przebiegać podobnie, jak odblokowywanie centrum hydroksylowego np. w nukleozydach.



Rysunek 8 Model strukturalny TGO z uwzględnieniem kątów torsyjnych na przykładzie alkoholu **3b** [138].

Zdecydowałam się na badanie struktur zawierających dwa różne podstawniki w pozycji R: grupę metylową (**3a**, **3c**) oraz grupę benzyłową (**3b**) (**Schemat 6**). Obie modyfikacje zwiększają nukleofilowość endogennego atomu azotu. Podstawnik metylowy, będący niedużym objętościowo podstawnikiem alifatycznym, będzie dostarczał elektrony do cząsteczki, stabilizując powstający układ bicykliczny. Jednocześnie wielkość podstawnika nie powinna przeszkadzać w ataku nukleofilowym azotu pirydyny, na węgiel α łańcucha alifatycznego. Wprowadzenie

Badania własne i dyskusja wyników

podstawnika benzyloвого w pozycji R również będzie stabilizowało powstający związek cykliczny. Jest to podstawnik typu EDG⁸, który jest objętościowo większy niż grupa metylowa. Dodatkowo, rotacja pierścienia aromatycznego wokół wiązania pojedynczego może, w przypadku układów makromolekularnych, potencjalnie powodować zawadę przestrzenną. Pomimo to, formowanie się związku bicyklicznego powinno być nadal możliwe, ewentualnie czas jego odłączenia może ulec zmianie. Jako trzecią modyfikację (**3c**) wybrałam wydłużenie mostka alifatycznego, o jeden atom węgla ($n_1=2$) przy jednoczesnym wprowadzeniu podstawnika metylowego w pozycji R. Wprowadzona modyfikacja pozwala sprawdzić, czy tworzenie się związku bicyklicznego, o pierścieniu sześciocłonowym, jest możliwe dla makromolekularnych układów, oraz jak wydłużenie łańcucha alifatycznego wpływa na polimeryzację.

Synteza 2-aminopirydynyloowych alkoholi polegała na reakcji addycji 2-bromopirydyny **1** do aminoalkoholu **2a-c**. Reakcje przeprowadzone były w polarnym rozpuszczalniku aprotycznym, jakim jest *N,N*-dimetylformamid (DMF), natomiast moc użytych mikrofal wynosiła ok. 300 W. W trakcie reakcji powstaje gazowy bromowodór, który był wiązany w sól, poprzez aminę trzeciorzędową - trietyloamina (TEA). W reakcjach wykorzystywałam procedury syntez alkoholi opracowanych i opublikowanych przez Zakład Chemii Biopolimerów [139]. Metodykę syntez związków **3a-c** zamieszczono w dalszej części pracy w sekcji „Synteza chemiczna”, w Części IV. Reakcje syntezy 2-aminopirydynyloowych prekursorów monomerów przebiegają z wydajnością na poziomie 25-45%. Okazuje się, że pomimo użycia wspomaganie mikrofalowego, jest to najwolniejszy etap syntezy. Otrzymane produkty **3a-c** mają postać gęstych olejowych cieczy, a ich oczyszczanie musi być przeprowadzane za pomocą chromatografii kolumnowej, przy zastosowaniu elucji gradientowej. Jako fazy ruchomej używałam mieszaniny składającej się z *n*-heksanu i octanu etylu. Produkty zbierane były przy gradiencie 50-60% octanu etylu. Struktura chemiczna **3a-c** została potwierdzona przy użyciu spektroskopii ¹H NMR i ¹³C NMR, natomiast masa alkoholi została potwierdzona za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas z jonizacją elektrorozpyleniem (ESI, ang. *electrospray ionisation*). Ponadto dla alkoholu z podstawnikiem benzylowym (**3b**) przeprowadziłam również analizę widm dwuwymiarowych: COSY (ang.

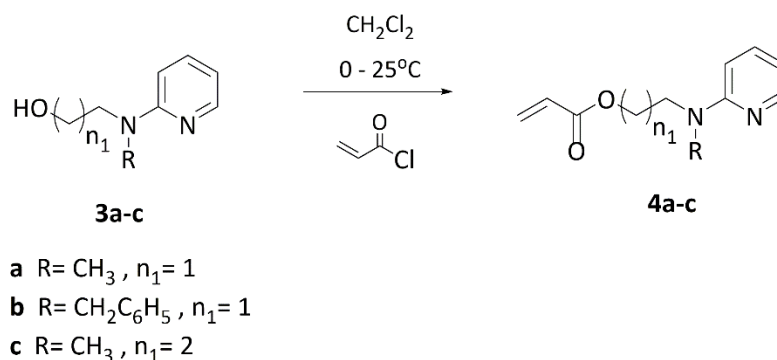
⁸ EDG (ang. *electron donating group*) – podstawnik zwiększające gęstość elektronową sprzężonego układu wiązań π. [J. McMurry, *Chemia organiczna*, t. 3, PWN, Warszawa 2007, Rozdział 16.5]

Badania własne i dyskusja wyników

correlated spectroscopy), HSQC (ang. *heteronuclear single-quantum coherence*) oraz HMBC (ang. *heteronuclear multiple bond correlation*).

2 Otrzymywanie monomerów 2-pirydynylowych

Kolejnym etapem było przekształcenie otrzymanych alkoholi w monomery, które następnie będą poddawane polimeryzacji. Synteza monomerów **4a-c** polegała na reakcji odpowiedniego prekursora monomeru w postaci 2-aminopirydynyloвого alkoholu (**3a-c**) z chlorkiem akryloilu (**Schemat 7**). Otrzymane monomery (akrylany) są estrowymi pochodnymi kwasu akrylowego, które łatwo ulegają reakcjom polimeryzacji, ze względu na wysoką reaktywność wiązania podwójnego. Reaktywność akrylanów wynika z ich budowy chemicznej. Sprężone z grupa karboksylową wiązanie winylowe pomaga w osiągnięciu wyższych stałych szybkości procesu propagacji (k_p). Reaktywność monomeru to obok reaktywności rodników oraz lepkości mieszaniny, jeden z głównych czynników wpływających na szybkość wzrostu łańcucha [140]. Reakcja substytucji do chlorku kwasu akrylowego przebiega z bardzo dobrą wydajnością [141], wymaga jednak nadzwyczajnych środków ostrożności (np. maska z filtrem i dodatkowa ochrona dłoni), ponieważ chlorek akryloilu jest substancją wysoce łatwo palną, niebezpieczną dla środowiska i bardzo toksyczną. Reakcja jest również egzoenergetyczna, dlatego roztwór alkoholu musi być na samym początku schłodzony, dlatego też, dopiero do mieszanego roztworu o temperaturze ok. 5 °C, dodawałam kroplami roztwór chlorku kwasu akrylowego. Postęp reakcji sprawdzany był na bieżąco przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymane monomery



Schemat 7 Ogólny schemat syntezy pirydyn-2-yl-aminoalkoholi.

Badania własne i dyskusja wyników

4a-c oczyszczałam przy użyciu chromatografii cieczowej, w gradiencie chlorek metylenu/metanol. Faza ruchoma potrzebna do wymycia monomerów z kolumny zawierała 3% metanolu. Dokładna procedura syntezy monomerów została umieszczona w Części IV (podrozdziały 2.9.4 – 2.9.6). Struktura chemiczna monomerów **4a-c** została potwierdzona przy użyciu spektroskopii ^1H NMR oraz ^{13}C NMR, natomiast masa akrylanów przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas z jonizacją elektrorozpylaniem.

3 Otrzymywanie polimerów responsywnych

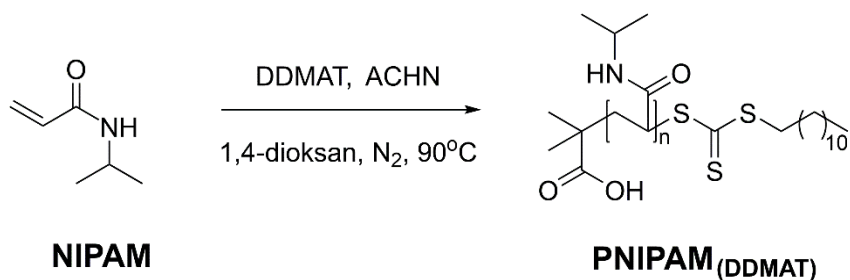
3.1 Otrzymywanie poli(*N*-izopropylakrylamidu) – PNIPAM_(DDMAT)

Uzyskanie monomerów **4a-c** pozwoliło przejść do kolejnego etapu syntetycznego, którym była homopolimeryzacja. Jako metodę syntezy wybrałam polimeryzację rodnikową z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem ładunku (RAFT). Szereg zalet polimeryzacji RAFT (podrozdział 3.2, Część I), a w szczególności otrzymywanie polimerów o niskiej polidispersyjności, było jednym z głównych powodów wykorzystania tej techniki do syntezy zaprojektowanych polimerów. Dodatkowo duża popularność metody polimeryzacji RAFT w syntezie polimerów o różnej aktywności, a co za tym idzie mnogość doniesień literaturowych, było kolejnym istotnym czynnikiem przy wyborze tej metody [108, 141, 142].

Do wstępnych reakcji polimeryzacji postanowiłam wykorzystać stosunkowo niedrogi i dostępny komercyjnie monomer *N* – izopropylakrylamidu (NIPAM). Reaktywność chemiczna NIPAM jest zbliżona do otrzymanych monomerów, opartych o 2PyTGO. W związku z tym, po zakończeniu optymalizacji mogłam przenieść dobrane warunki na polimeryzację monomerów **4a-c**. Całkowity proces otrzymywania i oczyszczania monomerów **4a-c** jest czasochłonny, dlatego wybór bardziej dostępnego monomeru do wstępnej optymalizacji, wydawał się zasadny. Właściwości poli(*N*-izopropylakrylamidu) (patrz podrozdział 2.2.2, Część I) są szeroko wykorzystywane, od inżynierii tkankowej, poprzez hodowle komórek, powlekanie biomedyczne czy dostarczanie leków. Skutkuje to dostępnością w literaturze naukowej wielu procedur syntezy polimerów i kopolimerów PNIPAM [143]. Optymalizacja reakcji, w kontekście polimeryzacji RAFT, polega na dobraniu odpowiednich stosunków inicjatora, czynnika przeniesienia łańcucha i monomeru oraz kolejno czasu reakcji, ilości rozpuszczalnika, a także temperatury reakcji. Każdy

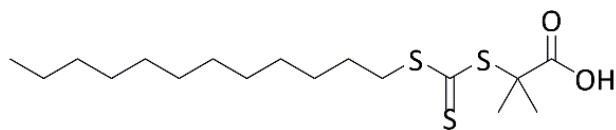
Badania własne i dyskusja wyników

z wymienionych wyżej czynników ma istotny wpływ na szybkość reakcji polimeryzacji, konwersję monomeru oraz średnie masy cząsteczkowe otrzymywanego polimeru (rozzrut masy molowej).



Schemat 8 Schemat polimeryzacji PNIPAM, przy użyciu DDMAT jako reagenta RAFT i inicjatora ACHN.

Reakcje polimeryzacji PNIPAM przeprowadziłam na linii Schlenka, w atmosferze gazu obojętnego (azot), używając bezwodnego 1,4-dioksanu jako środowiska reakcji (**Schemat 8**). Wybrany czynnik RAFT to kwas 2-(dodecyltiokarbonotioyltio)-2-metylopropianowy (DDMAT) (**Rysunek 9**), który jest czynnikiem wzrostu łańcucha odpowiednim do polimeryzacji akrylamidów. Do inicjacji reakcji polimeryzacji użyłam 1,1'-azobis-(cykloheksankarbonitryl) (ACHN), który jest stabilnym termicznie inicjatorem używanym w polimeryzacjach rodnikowych.

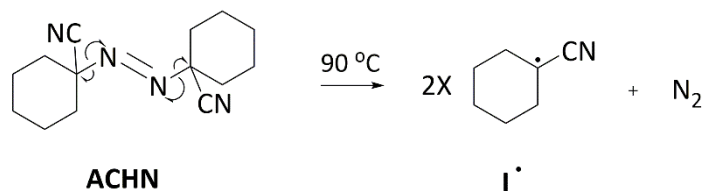


DDMAT

Rysunek 9 Czynniki przeniesienia łańcucha – reagent RAFT.

Reakcja polimeryzacji PNIPAM została przeprowadzona według standardowej procedury, według której monomer i inicjator rozpuszcza się w medium reakcyjnym i umieszcza w ampułce lub kolbie Schlenka. Następnie dodaje się roztwór reagenta RAFT i przeprowadza procedurę usunięcia nasyconych gazów z roztworu, takich jak tlen cząsteczkowy (O₂). W tym celu mieszaninę wymraża się, a następnie obniża ciśnienie za pomocą pompy próżniowej, aby odpompować gaz nad roztworem, a po usunięciu podciśnienia doprowadza się roztwór do temperatury pokojowej. Cały cykl FPT (ang. *freeze-pump-thaw*) powtarza się trzykrotnie. W kolejnym kroku mieszanina jest ogrzewana do temperatury, w której następuje reakcja inicjacji. Temperaturę inicjacji

Badania własne i dyskusja wyników



Schemat 9 Reakcja generowania rodnika inicjującego na przykładzie inicjatora ACHN.

warunkuje użyty związek inicjujący np. inicjatory azowe, które pod wpływem temperatury i/lub światła ulegają rozpadowi na dwa reaktywne karborodniki inicjujące (I^{\bullet}) oraz gazowy azot (**Schemat 9**). Szybkość rozkładu inicjatora w roztworze jest zgodna z kinetyką szybkości reakcji pierwszego rzędu i jest różna ze względu na różnice w strukturze inicjatorów. Dobór temperatury reakcji, w której generowany jest I^{\bullet} wpływa na kolejne etapy reakcji polimeryzacji. Optymalna temperatura formowania się rodnika inicjatora jest przeważnie zbliżona do 10-godzinnej temperatury półtrwania użytego inicjatora. Parametr, ten określa temperaturę, w której obserwujemy zmniejszenie się stężenia (ilości) grupy azowej o połowę, w ciągu 10 godzin ogrzewania w rozpuszczalniku. Generowanie rodnika inicjatora w temperaturze niższej, niż temperatura półtrwania powoduje obniżenie szybkości formowania się rodnika inicjującego. Natomiast znaczne podwyższenie temperatury reakcji względem temperatury półtrwania, skutkuje szybkim zużywaniem się rodnika węglowego w konkurencyjnych do polimeryzacji reakcjach rekombinacji i dysproporcjonowania. Dla inicjatora ACHN 10-godzinna temperatura półtrwania wynosi 88 °C, dlatego temperatura reakcji równa 90 °C okazała się optymalna, co potwierdziłam prowadząc reakcje w temperaturze 70 °C oraz 80 °C. W obydwu przypadkach konwersja monomeru, po takim samym czasie prowadzenia reakcji, była niższa niż dla reakcji prowadzonych w 90 °C (**Tabela 2**). Postęp reakcji badałam za pomocą widma ¹H NMR, gdzie analizowałam zmiany stosunku sygnałów pochodzących od formującego się polimeru (δ 4.00 ppm, 1H; 2.88 – 0.93 ppm, 9H), oraz protonów wiązania winylowego monomeru (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Reakcję polimeryzacji PNIPAM uznawałam za zakończoną, kiedy konwersja monomeru wynosiła ponad 85%, a czas reakcji nie był dłuższy niż 12 godzin. Jeżeli w tym czasie konwersja monomeru była poniżej 50% kontynuowałam proces optymalizacji syntezy. Czas trwania reakcji był wydłużany tylko w przypadku syntezy polimerów o masie molowej większej niż 40 000 g/mol.

Badania własne i dyskusja wyników

Po uzyskaniu zadowalającej konwersji monomeru, mieszanina reakcyjna była szybko wymrażana ciekłym azotem, co powodowało wygaszenie wszystkich aktywnych rodników. Uzyskany polimer oczyszczałam metodą precypitacji z zimnego n-heksanu, a następnie suszyłam przez 24 h pod próżnią. Uzyskane polimery PNIPAM miały postać białego, sypkiego proszku.

Tabela 2 Zestawienie reakcji chemicznych mających na celu optymalizację temperatury. Kolorem zostały zaznaczone wybrane warunki do dalszej optymalizacji.

Symbol reakcji	[M]/[RAFT]/[I]			ΔT [°C]	Czas [h]	Konwersja [%] ^{a)}
	[NIPAM]	[DDMAT]	[ACHN]			
4.2	300	1.5	1	70	10	35
4.5	300	1.5	1	80	10	47
4.6	300	1.5	1	90	10	89

^{a)} wyznaczona z pomiarów ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)

Istotnym parametrem podlegającym optymalizacji była ilość regenta RAFT względem inicjatora. Wartość ta wpływa m.in. na masę molową otrzymanego polimeru (Równanie 8) oraz na ilość aktywnych rodników propagujących. Wraz z redukcją ilości czynnika wzrostu łańcucha, generowanych jest mniej aktywnych rodników propagujących, co skutkuje wyższą masę molową otrzymanych polimeru. Dla wszystkich polimeryzacji PNIPAM, które były przeprowadzane konwersja monomeru była bardzo wysoka (**Tabela 3**).

$$M_{n,teoretyczna} = \frac{([M] \times M_{monomeru})}{[RAFT]} \times \frac{Konwersja}{100\%} + M_{RAFT} \quad (8)$$

Badania własne i dyskusja wyników

Tabela 3 Reakcje optymalizujące ilości reagenta RAFT. Kolorem zostały zaznaczone warunki wybrane do homopolimeryzacji monomerów 2PyTGO.

Symbol reakcji	[M]/[RAFT]/[I]			ΔT [°C]	M_n , teoretyczna ^{a)}	Czas [h]	Konwersja [%] ^{b)}	M_n , NMR ^{c)}
	[NIPAM]	[DDMAT]	[ACHN]					
4.7	300	0.75	1	90	47 000	15	91	-
4.6	300	1.5	1	90	22 000	10	89	8 800
4.10	300	3	1	90	12 000	10	93	3 200
4.9	300	4	1	90	9 000	10	96	2 500
4.11	300	5	1	90	7 000	10	84	-

^{a)} teoretyczna masa molowa została obliczana przy założeniu 100% konwersji monomeru
^{b)} konwersja monomeru wyznaczona z pomiarów ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)
^{c)} masa molowa w oparciu o analizę ¹H NMR sygnałów grup końcowych

Wyznaczenie średniej masy molowej, w oparciu o grupy końcowe okazało się dość trudne. Ze względu na brak dostatecznie silnych sygnałów, które można byłoby prawidłowo zintegrować, wyznaczenie mas molowych dla niektórych produktów PNIPAM_(DDMAT) okazało się niemożliwe. Dla tych polimerów, dla których na widmie ¹H NMR widoczny był sygnał grup końcowych wyznaczone masy trudno było porównywać z masami teoretycznymi. Pomimo tego, potwierdzono zależność ilości użytego czynnika wzrostu łańcucha względem masy otrzymywanych polimerów. Do reakcji startowych z monomer **4a** postanowiłam użyć warunków z reakcji 4.10.

Bazując na wybranej ilości molowej DDMAT do ACHN (3/1) sprawdziłam również, czy ilość użytego monomeru NIPAM wpływa na czas reakcji (**Tabela 4**). Z obserwacji wynika, że w przypadku polimeryzacji większych ilości monomeru, zadawalające konwersje monomeru otrzymujemy dopiero po 20 godzinach. Natomiast, dla niższych stosunków molowych monomeru względem inicjatora reakcję można zakończyć już po 4 godzinach.

Tabela 4 Zestawienie reakcji mające na celu sprawdzenie wpływ ilości użytego monomeru na czas polimeryzacji.

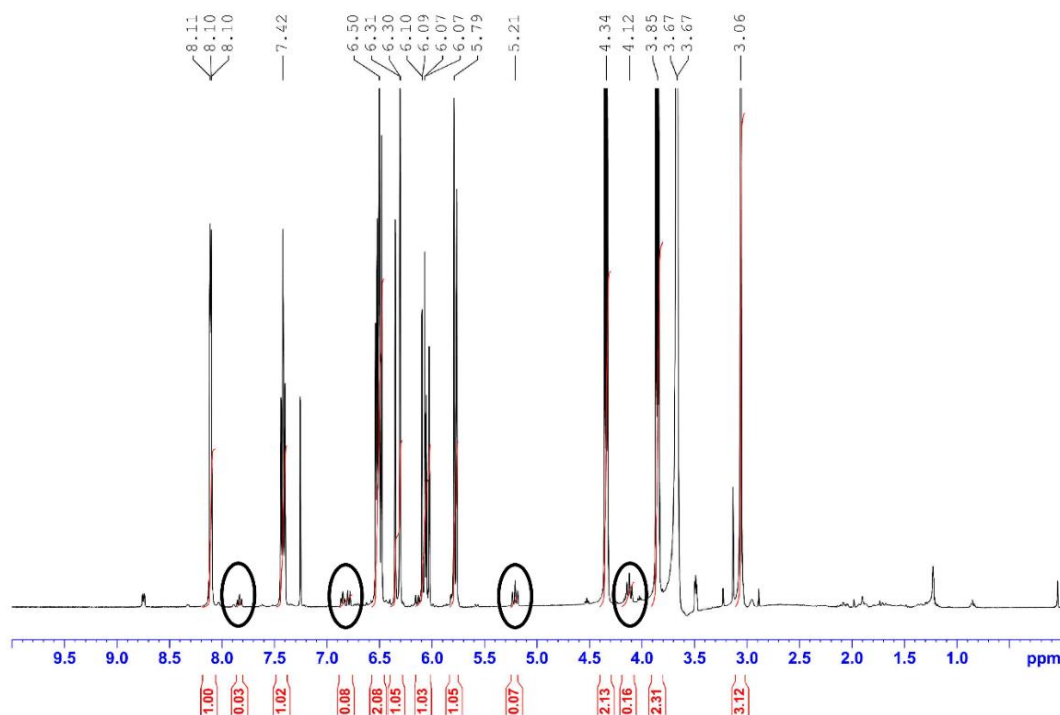
Symbol reakcji	[M]/[RAFT]/[I]			ΔT [°C]	M_n , teoretyczna ^{a)}	Czas [h]	Konwersja [%] ^{b)}
	[NIPAM]	[DDMAT]	[ACHN]				
4.20	150	3	1	90	6 000	4	97
4.17	300	3	1	90	12 000	9	91
4.24	800	3	1	90	30 000	20	86

^{a)} teoretyczna masa molowa została obliczana przy założeniu 100% konwersji monomeru
^{b)} konwersja monomeru wyznaczona z pomiarów ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)

3.2 Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) – PMPyAEA

3.2.1 Polimeryzacja PMPyAEA przy użyciu DDMAT jako reagent RAFT

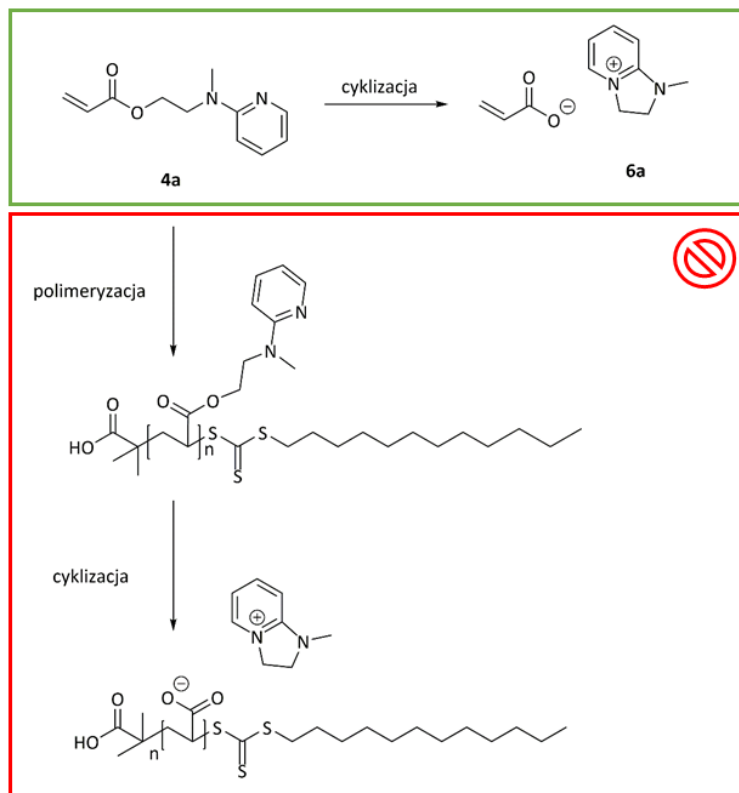
W kolejnym kroku podjęto próbę polimeryzacji homopolimeru poli(akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu), PMPyAEA, w zoptymalizowanych warunkach (reakcja 4.10, **Tabela 3**). Po pierwszych reakcjach pilotażowych okazało się, że monomer **4a** uczestniczy w reakcji konkurencyjnej, w wyniku czego polimeryzacja nie zachodzi. Analiza mieszaniny reakcyjnej wykazała, że już po 3 godzinach prowadzenia reakcji, na widmie ^1H NMR widoczne są sygnały charakterystyczne dla protonów alifatycznych związku bicyklicznego **6a** (t, 5.21 ppm, 2H oraz t, 4.12 ppm, 2H) (**Rysunek 10**).



Rysunek 10 Formowanie się związku bicyklicznego **6a** w trakcie reakcji homopolimeryzacji PMPyAEA. Na widmie ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) charakterystyczne sygnały zostały zakreślone.

Badania własne i dyskusja wyników

Teoretycznie, możliwe są dwie sekwencje syntetyczne prowadzące do powstania związku **6a**. Pierwsza zakłada, że związek cykliczny zostaje utworzony od razu z monomeru, uniemożliwiając tym samym zajście polimeryzacji (zielona ramka, **Schemat 10**). Przy tym założeniu, monomer jest zużywany bardzo szybko, od samego początku reakcji, w uprzywilejowanym procesie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji i nie ma możliwości wzrostu łańcucha polimerowego. Drugi scenariusz zakłada, że reakcja polimeryzacji zachodzi, jednak warunki reakcji również wpływają na bardzo szybkie formowanie się związku cyklicznego, który jest uwalniany z polimeru, w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Aktywność grupy labilnej jest tak duża, że proces tworzenia się związku cyklicznego następuje kaskadowo, praktycznie równoległe z polimeryzacją (czerwona ramka, **Schemat 10**). W tym przypadku, na widmie ^1H NMR, powinna być możliwa identyfikacja zarówno przesunięć chemicznych od związku **6a** jak i od łańcucha poli(kwasu akrylowego), PAA. Jednakże, na analizowanych widmach ^1H NMR nie



Schemat 10 Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja jako konkurencyjna reakcja do polimeryzacji monomeru **4a**.

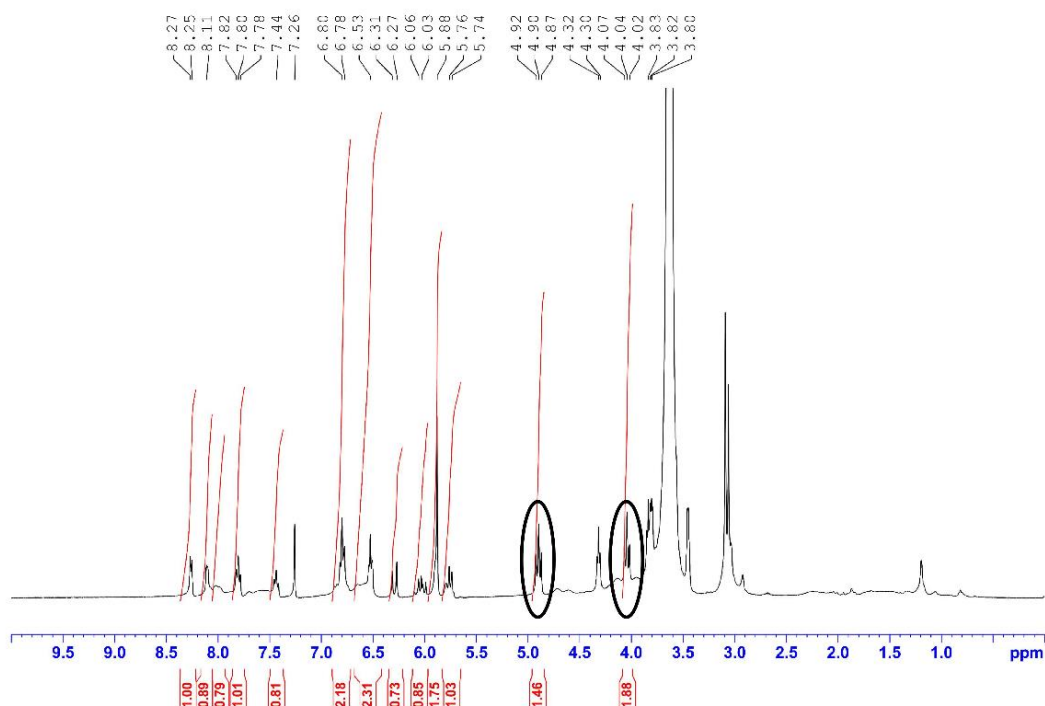
W zielonej ramce przedstawione jest tworzenie się związku cyklicznego **6a** bezpośrednio z monomeru. W ramce czerwonej przedstawiony jest proces tworzenia się **6a** z polimeru PMPyAEA, w trakcie polimeryzacji.

Badania własne i dyskusja wyników

zauważyłam żadnych sygnałów, które mogłyby świadczyć o tworzeniu się łańcuchów polimeru PMPyAEA. Dodatkowo, nie zaobserwowałam sygnałów przy przesunięciach chemicznych charakterystycznych dla łańcucha PAA, który mógłby pozostać po cyklizacji PMPyAEA. Brak charakterystycznych sygnałów dla polimerów świadczy o tym, że **6a** tworzy się bezpośrednio z **4a**. Ponieważ proces cyklizacji uniemożliwia tworzenie się polimeru, dlatego kolejne działania koncentrowały się na znalezieniu takich warunków, w których możliwe będzie przeprowadzenie polimeryzacji PMPyAEA.

Budowa chemiczna monomeru **4a** pozwala przypuszczać, że protonacja endocyklicznego atomu azotu może czasowo wstrzymać reakcję cyklizacji monomeru, poprzez zmniejszenie jego nukleofilowości [144]. Aby udowodnić, że obniżenie pH reakcji umożliwi przeprowadzenie syntezy polimeru PMPyAEA, przeprowadziłam badania wpływu kwasów protonowych na reakcję polimeryzacji. Nie zmieniając stosunków molowych monomeru i pozostałych substratów, do środowiska reakcji wprowadziłam dodatkowo 1.2 eq kwasu dichlorooctowego (DCA), względem monomeru **4a**. Pomimo, że kwas dichlorooctowy należy do mocnych kwasów organicznych (pKa +1.25) użycie go nie spowodowało zatrzymania procesu cyklizacji. Na widmie ^1H NMR, po 2.5 h prowadzenia reakcji, pojawiły się sygnały odpowiadające protonom alifatycznym pierścienia heterocyklicznego związku **6a** (t, 4.90 ppm, 2H oraz t, 4.04 ppm, 2H), (**Rysunek 11**).

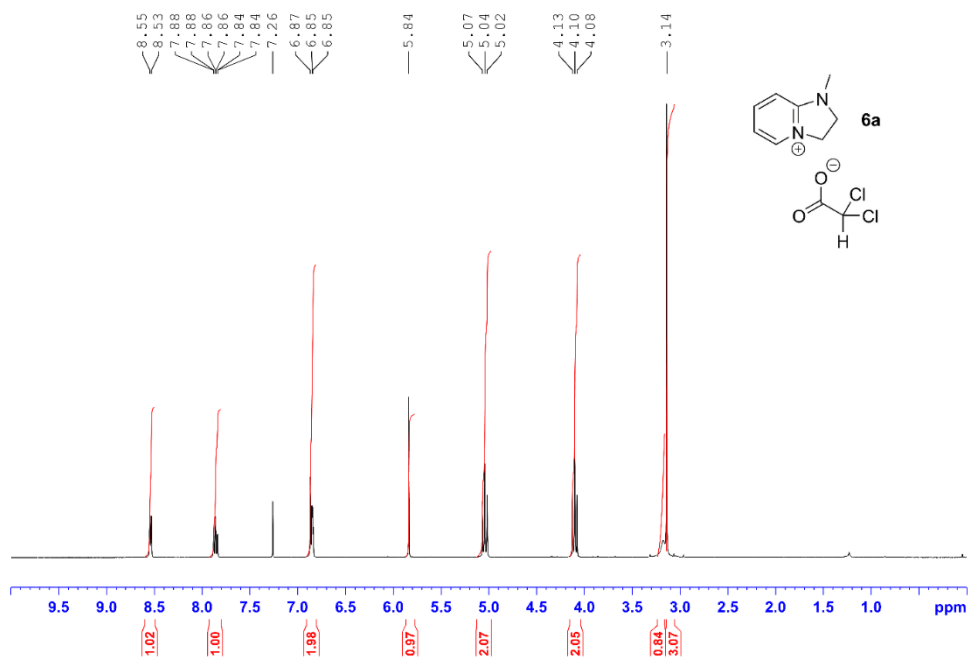
Badania własne i dyskusja wyników



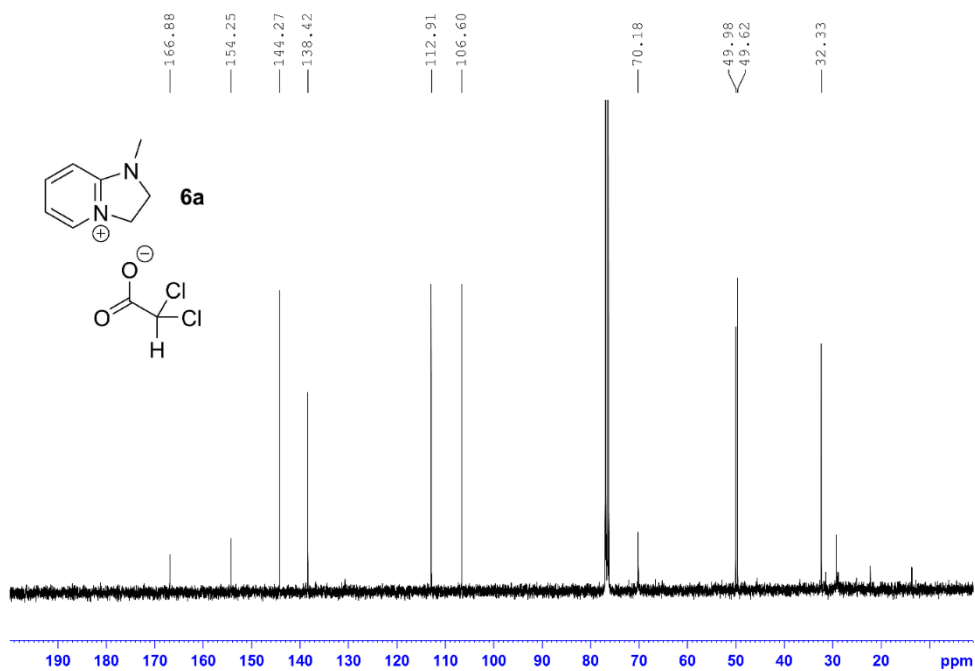
Rysunek 11 Widmo ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) obrazujący brak postępu reakcji polimeryzacji PMPyAEA w środowisku kwasowym, z równoczesnym tworzeniem się związku cyklicznego.

W celu potwierdzenia, że otrzymano bicykliczny produkt postanowiłam wyizolować z reakcji powstały produkt uboczny. Wcześniejsze reakcje polimeryzacji, bez dodatku kwasu, pokazały że pH w trakcie tworzenia się związku cyklicznego nie ulega zmianie. Świadczy to o tym, że wolny kwas akrylowy nie jest obecny w mieszaninie reakcyjnej po cyklizacji. Można zatem stwierdzić, że związek **6a** ma postać soli jonowej, gdzie bicykliczna część jest kationem, natomiast reszta kwasu akrylowego anionem. W przypadku reakcji z DCA, po wyizolowaniu produktu ujemnie naładowanym jonem okazał się anion dichlorooctanowy. Kwas akrylowy (pK_a +4.25) jest słabszym kwasem niż kwas dichlorooctowy, dlatego nastąpiła wymiana anionu akrylowego na bardziej dostępny anion mocniejszego kwasu. Struktura związku bicyklicznego została potwierdzona analizą spektroskopową (widma ^1H NMR (**Rysunek 12**), ^{13}C NMR (**Rysunek 13**)). Dodatkowo, analiza masowa pozwala stwierdzić obecność kationu cyklicznego (135.10 $[\text{M}]^+$) oraz anionu reszty kwasu dichlorooctowego (126.95 $[\text{M}]^-$).

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 12 Widmo ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) wyizolowanego związku cyklicznego **6a**.



Rysunek 13 Widmo ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) wyizolowanego związku cyklicznego **6a**.

Badania własne i dyskusja wyników

Kolejnym krokiem było zastosowanie mocnego kwasu organicznego który pozwoli zablokować proces cyklizacji, a równocześnie nie utworzy aktywnych rodników. Do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam kwas *p*-toluenosulfonowy (*p*-TsOH) (pKa -1.50) oraz przeprowadziłam reakcję potwierdzającą, że kwas *p*-TsOH ma wpływ na układ elektronowy w monomerze, zmniejszając jego nukleofilowość. Równomolową mieszaninę **4a** i kwasu *p*-toluenosulfonowego ogrzewałam w temperaturze 90 °C przez 10 h, a następnie poddałam ją analizie ¹H NMR. Widoczny brak sygnałów charakterystycznych dla związku cyklicznego pozwala stwierdzić, że można zatrzymać proces cyklizacji monomeru z ugrupowaniem 2-pirydynylowym.

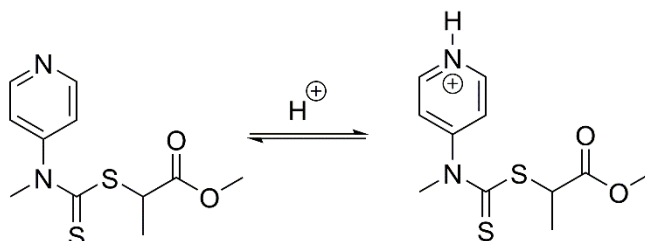
W kolejnym etapie przeprowadziłam homopolimeryzację w warunkach kwasowych, czasowo blokując nukleofilowość monomeru kwasem *p*-TsOH. Z obserwacji wynika, że polimeryzacja RAFT monomeru **4a**, z użyciem DDMAT jako czynnika wzrostu łańcucha, nie może być przeprowadzana w środowisku kwaśnym. Przy wprowadzeniu kwasu *p*-toluenosulfonowego, konwersja monomeru jest bardzo niewielka, rzędu 10% po 10 godzinach prowadzenia reakcji. Konieczne było zatem znalezienie takich warunków i odczynników, które pozwoliłyby na przeprowadzenie reakcji polimeryzacji w warunkach obniżonego pH. Na podstawie doniesień literaturowych podjęłam decyzję o zmianie czynnika przeniesienia łańcucha, z DDMAT na jeden z uniwersalnych reagentów RAFT [145, 146].

3.2.2 Polimeryzacja PMPyAEA z użyciem uniwersalnego reagenta RAFT

Konieczność blokowania aktywności nukleofilowej monomeru w trakcie polimeryzacji poprzez zastosowanie środowiska kwasowego, wymusiła zmianę czynnika przeniesienia łańcucha. Uniwersalne reagenty RAFT (ang. „*switchable RAFT agents*”) mogą być używane w niższym pH. Sposób działania tych czynników były już opisany w podrozdziale 3.2.2, Części I. Do uniwersalnych reagentów RAFT możemy zaliczyć m.in. ester metylowy kwasu 2-(metylo(pirydyn-4-ylo)karbamotionylo)propionowego, który w dalszej części pracy będę oznaczała jako sRAFT (**Schemat 11**). Polimeryzacja „bardziej aktywowanych” monomerów (MAMs) np. akrylanów i akrylamidów, z użyciem uniwersalnego reagenta RAFT, wymaga zmiany aktywności wiązania C=S w strukturze związku, co możemy określić jako aktywację czynnika względem monomerów MAM. W procesie tym azot pirydyny będzie ulegał protonacji a niesprotonowana (neutralna) forma uniwersalnego reagenta będzie wspierać prolomagację łańcucha składającego się z „mniej

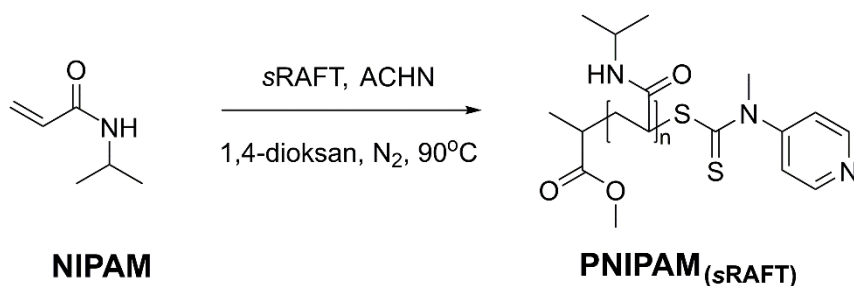
Badania własne i dyskusja wyników

aktywowanych” monomerów, co możemy określić jako aktywacja względem monomerów LAM (**Schemat 11**). Postawiłam hipotezę, że w reakcji polimeryzacji monomeru **4a**, przy odpowiedniej ilości kwasu organicznego nastąpi protonacja endogennego atomu azotu czynnika wzrostu łańcucha, jak i monomeru. W trakcie jednego kroku możliwa będzie aktywacja sRAFT względem akrylanu **4a**, z równoczesną czasową dezaktywacją tego monomeru względem procesu cyklizacji. Postanowiłam zatem wykorzystać właściwości uniwersalnego reagenta RAFT w innym celu niż jest to ogólnie przyjęte w literaturze.



Schemat 11 Zmiana aktywności uniwersalnego reagenta RAFT w zależności od środowiska reakcji.

Przed przystąpieniem do reakcji z monomerem **4a**, przeprowadziłam reakcję z NIPAM, w poprzednio zoptymalizowanych warunkach zamieniając DDMAT na sRAFT, który musiał zostać aktywowany przed polimeryzacją NIPAM i wprowadzeniem go do mieszaniny reakcyjnej (**Schemat 12**). Aktywacja polegała na zmieszaniu reagenta RAFT z kwasem *p*-TsOH (1.2 eq). Dalsza procedura reakcji przebiegała analogicznie jak w przypadku poprzedniego czynnika wzrostu łańcucha. Reakcja została zakończona po potwierdzeniu, że na widmie ^1H NMR nie są obserwowane sygnały odpowiadające protonom wiązania podwójnego (po czasie 9 h). Równocześnie na widmie widoczne były poszerzone sygnały odpowiadające powstałemu



Schemat 12 Schemat polimeryzacji PNIPAM, przy użyciu uniwersalnego reagenta RAFT i ACHN jako inicjatora.

Badania własne i dyskusja wyników

polimerowi PNIPAM. Do oczyszczania otrzymanego polimeru wykorzystałam procedurę dla polimerów zakwaszonych, która składała się z dwóch etapów [142]. Pierwszy krok polegał na zobojętnieniu mieszaniny reakcyjnej nasyconym, wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3), w wyniku czego wytrącał się biały osad. Po odfiltrowaniu go rozpuszczalniki z przesączu zostały odparowane na wyparce, a zatężona mieszanina rozpuszczona w niewielkiej ilości 1,4-dioksanu (<1.5 ml). Ostatnim krokiem była precypitacja polimeru z zimnego n-heksanu. Po filtracji, otrzymany polimer suszyłam przez 24h pod próżnią. Uzyskane polimery PNIPAM_(sRAFT) miały postać białego, sypkiego proszku. Powyższa procedura oczyszczania stosowana była dla każdego otrzymanego polimeru, którego polimeryzacja prowadzona była w warunkach kwasowych. W późniejszych eksperymentach została ona nieznacznie zmodyfikowana, gdzie n-heksan zastąpiłam eterem dietylowym, w którym inicjator reakcji polimeryzacji (ACHN) rozpuszcza się lepiej. Uzyskany w ten sposób polimer jest wyższej czystości, ponieważ w produkcji nie pozostają ślady inicjatora.

Kolejnym krokiem była homopolimeryzacja monomeru **4a** w środowisku kwaśnym, przy użyciu uniwersalnego reagenta RAFT. W reakcjach polimeryzacji zmniejszyłam o połowę ilość moli monomeru **4a** względem użytego wcześniej NIPAM, uwzględniając że przy stosunku molowym 150/3/1 nadal możemy oczekiwać wysokiej konwersji monomeru (**Tabela 4**). Zatłoczenie przestrzenne mieszaniny reakcyjnej w obu przypadkach jest podobne, gdyż masa molowa NIPAM (113.16 g/mol) jest niższa niż monomeru **4a** (206.24 g/mol). W przypadku polimeryzacji PNIPAM mamy więcej moli mniejszych cząsteczek, a w przypadku polimeru 2-pirydynylowego ilość moli jest mniejsza, ale monomer jest objętościowo większy. Należy dodać, że samo zmniejszenie ilości moli monomeru **4a** przy użyciu DDMAT nie powodowało zatrzymania cyklizacji i otrzymania polimeru. W celu przeprowadzenia reakcji w środowisku kwasowym, do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam nadmiarową ilość kwasu *p*-TsOH wyliczoną na podstawie równania (9).

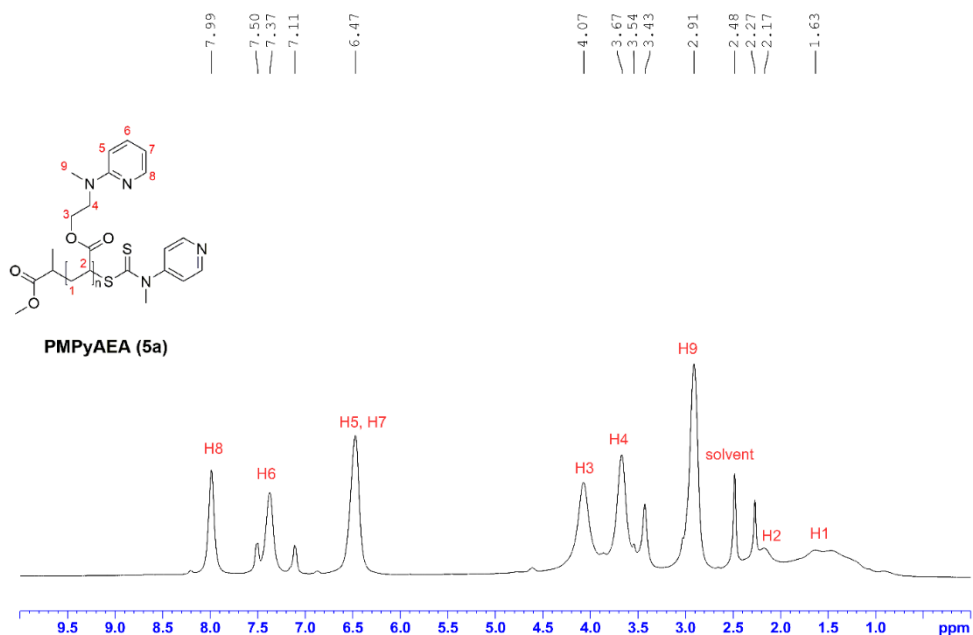
$$[p - TsOH] = 1.5 \times ([M] + [sRAFT]) \quad (9)$$

Dalsza część polimeryzacji przeprowadzona była w analogiczny sposób, jak polimeryzacja NIPAM. Po 12 h prowadzenia reakcji, nie zaobserwowałam na widmie ^1H NMR sygnałów charakterystycznych dla związku cyklicznego. Sygnały od protonów wiązania winylowego również nie były widoczne, natomiast poszerzone sygnały przy charakterystycznych przesunięciach

Badania własne i dyskusja wyników

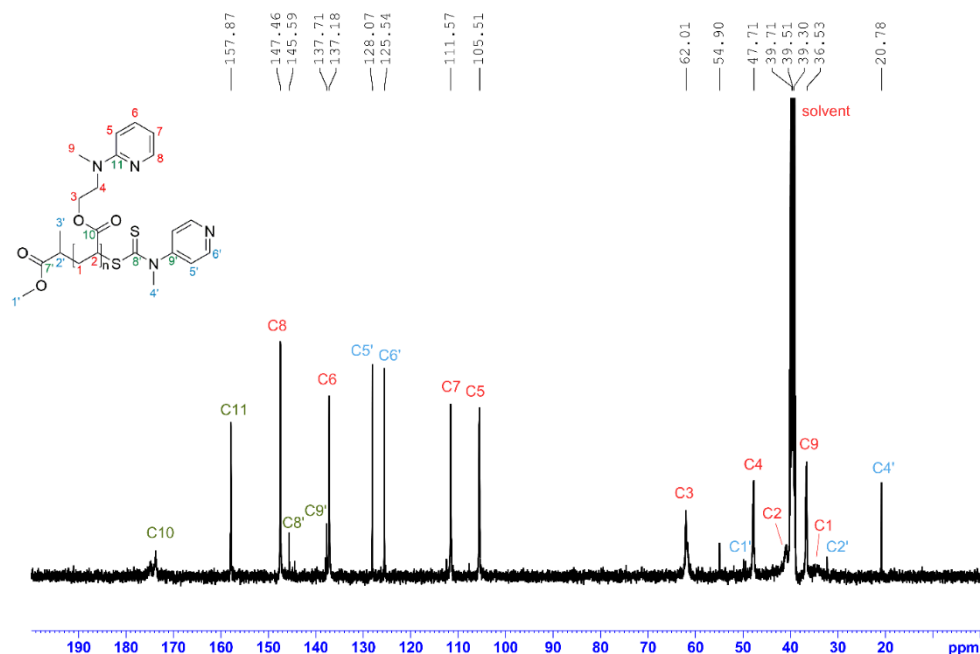
chemicznych potwierdzały powstanie polimeru PMPyAEA (**5a**). Dodatkowo, wykazałam, że w tym samym czasie możliwe jest czasowe zatrzymanie procesu cyklizacji, bez szkody dla prowadzonej reakcji polimeryzacji. Po zakończeniu reakcji proces oczyszczania przeprowadziłam za pomocą precypitacji z zimnego n-heksanu. Uzyskany produkt miał postać ciała stałego o zabarwieniu różowym.

Analiza widm ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (**Rysunek 15**) oraz ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (**Rysunek 16**) potwierdziła strukturę uzyskanego polimeru **5a**. Poszerzenie sygnałów na widmie protonowym potwierdza utworzenie się mieszaniny makrocząsteczek. Należy podkreślić, że otrzymanie polimeru PMPyAEA świadczy o tym, że odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji polimeryzacji oraz ich ilości, zostały dobrane w sposób prawidłowy.



Rysunek 15 Widmo ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) polimeru PMPyAEA (**5a**).

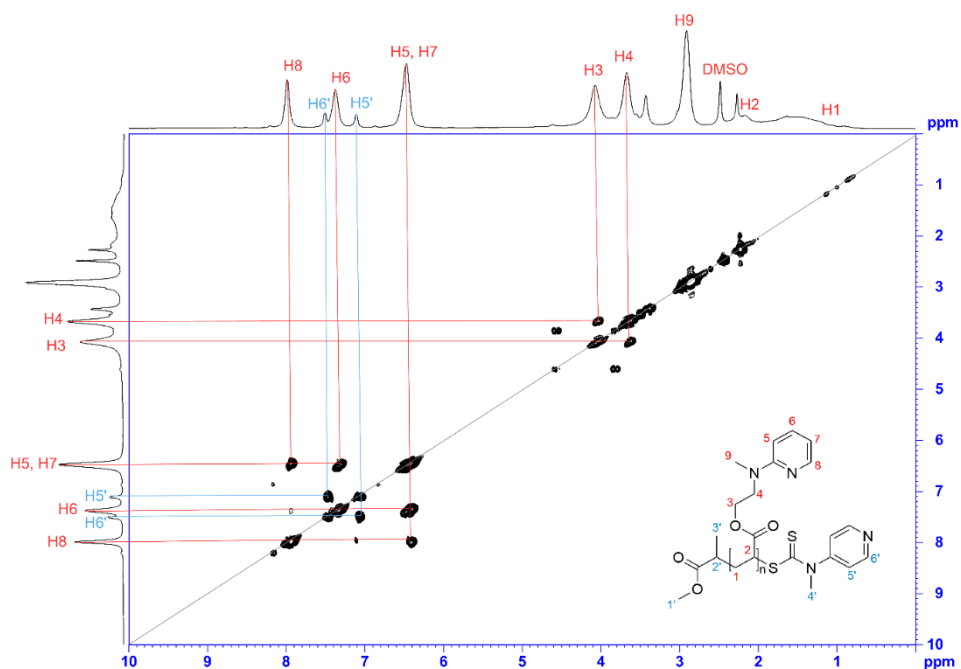
Badania własne i dyskusja wyników



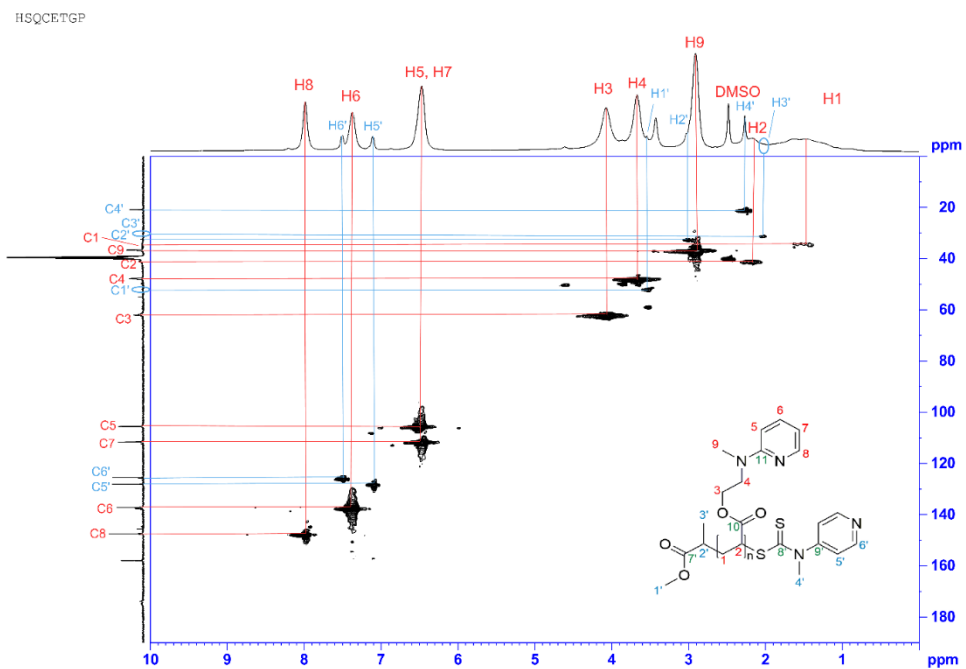
Rysunek 16 Widmo ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) polimeru PMPyAEA (5a).

Właściwie przypisanie sygnałów na widmach ^1H i ^{13}C możliwe było dopiero po przeprowadzeniu dodatkowych analiz 2D NMR. Widma te pozwoliły na określenie korelacji pomiędzy poszczególnymi grupami funkcyjnymi znajdującymi się w polimerze. Analiza danych ^1H - ^1H COSY NMR umożliwiła przypisanie sygnałów pochodzących od grupy końcowej Z uniwersalnego reagenta RAFT (**Rysunek 17**), natomiast przesunięcia chemicznych na widmie ^{13}C , przypisałam bazując na widmach ^1H - ^{13}C HSQC NMR (**Rysunek 18**) oraz ^1H - ^{13}C HMBC NMR (**Rysunek 19**).

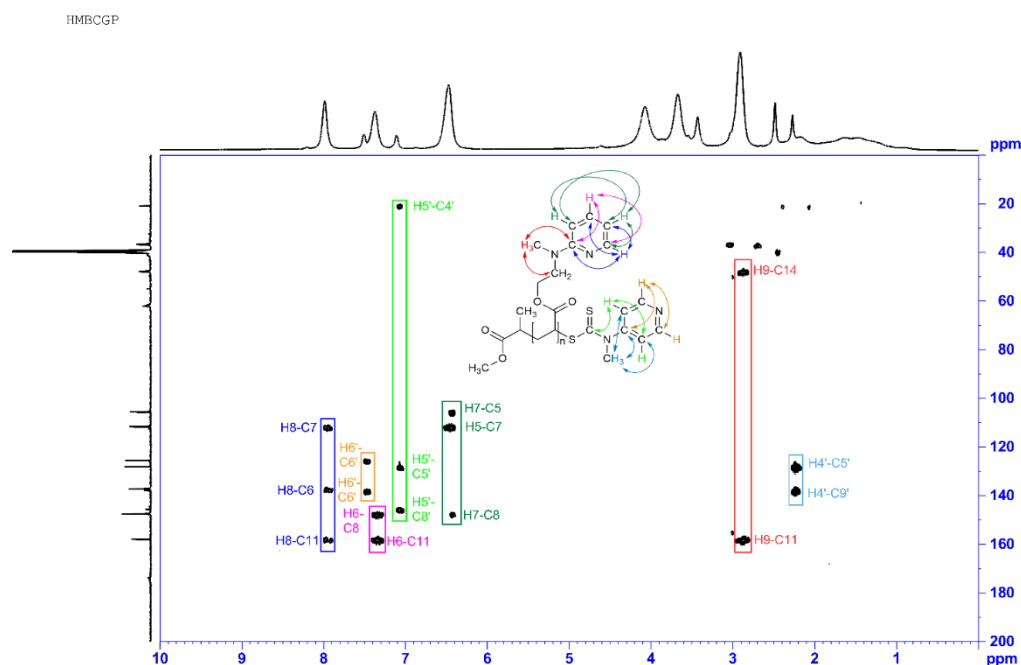
Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 17 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^1H COSY NMR (F1 400 MHz, F2 400 MHz, DMSO- d_6) polimeru 5a.



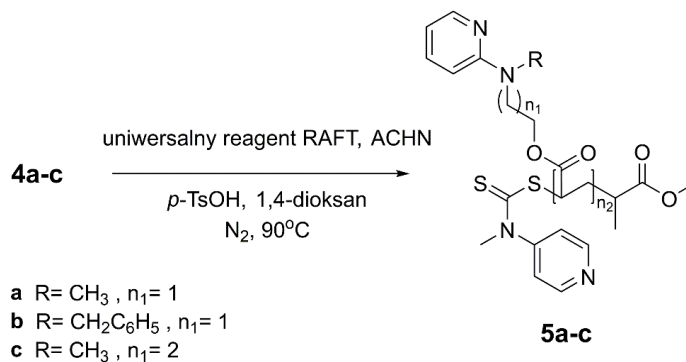
Rysunek 18 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^{13}C HSQC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, DMSO- d_6) polimeru 5a.



Rysunek 19 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^{13}C HMBC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, DMSO-d_6) polimeru **5a**.

3.3 Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(benzylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) – PBPYAEA

Otrzymanie polimeru **5a** pozwoliło na przeprowadzenie polimeryzacji z udziałem kolejnych monomerów 2-pirydynylovych, które zawierają objętościowo większą grupę benzyłową (**4b**) albo mają wydłużony łańcuch alkilowy (**4c**) (Schemat 13).



Schemat 13 Schemat polimeryzacji monomerów 2-pirydynylovych, przy użyciu uniwersalnego reagenta RAFT i ACHN jako inicjatora.

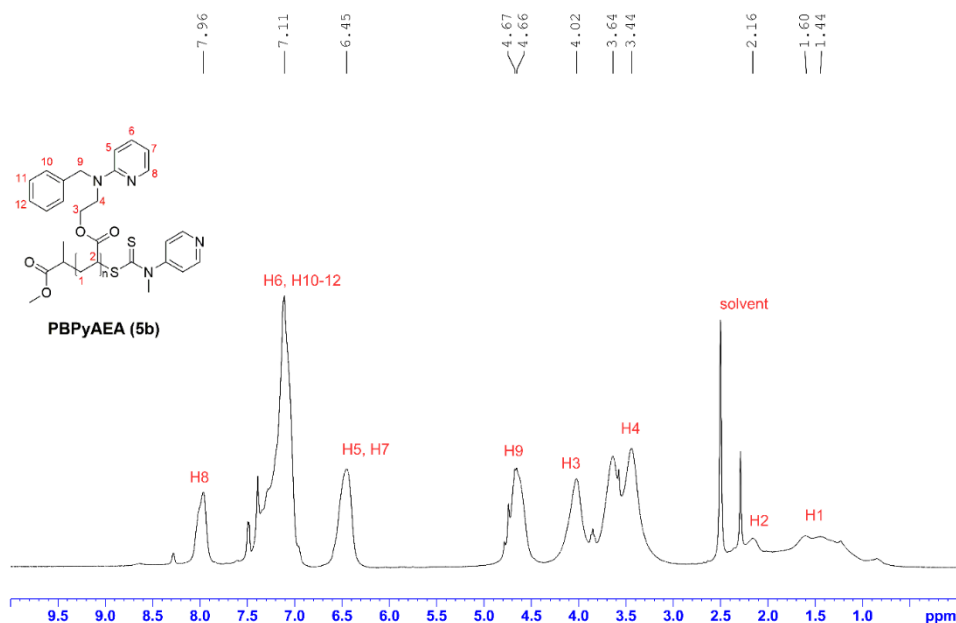
Badania własne i dyskusja wyników

Kolejnym otrzymanym polimerem był PBP_yAEA (**5b**), który w łańcuchu bocznym posiada grupę benzylową w pozycji R. Polimeryzacja monomeru **4b** została przeprowadzona w analogiczny sposób jak monomeru **4a**. Warunki reakcji oraz stosunki molowe substratów przedstawia **Tabela 5**. Po 10 h prowadzenia reakcji na widmie ¹H NMR nie stwierdziłam obecności sygnałów, które wskazywałyby na tworzenie się związku cyklicznego. Widoczne były nadal sygnały od protonów wiązania winylowego, dlatego reakcja została przedłużona o dodatkowe 2 h. Ponowna analiza widma protonowego, potwierdziła dużą konwersję monomeru oraz powstanie polimeru **5b**. Reakcja została zakończona (po ok. 12 h) poprzez szybkie wymrożenie mieszaniny reakcyjnej w ciekłym azocie. Polimer PBP_yAEA został oczyszczony według procedury stosowanej jak dla polimerów zakwaszonych. Produkt miał postać ciała stałego o zabarwieniu lekko różowym. Po liofilizacji i suszeniu przez 24 h pod próżnią, w celu potwierdzenia czystości otrzymanego polimeru wykonałam analizę NMR (**Rysunek 20**). Dodatkowo, została przeprowadzona próba polimeryzacji **5b** w warunkach neutralnych, z DDMAT jako czynnikiem wzrostu łańcucha. W trakcie, reakcji już po 2 h, widoczne były charakterystyczne przesunięcia chemiczne dla protonów związku cyklicznego. Reakcja potwierdziła, że obecność większego objętościowo podstawnika benzylowego nie blokuje reakcji polimeryzacji, natomiast konieczne jest czasowe blokowanie aktywności monomeru **4b** do otrzymania PBP_yAEA.

Tabela 5 Warunki syntezy polimerów PNIPAM oraz polimerów 2-pirydynylowych **5a-8c**.

Polimer	Monomer [mol]	RAFT [mol]	ACHN [mol]	<i>p</i> -TsOH [mol]	Czas [h]	Konwersja [%]		
PNIPAM ^{a)}	NIPAM	2.7 × 10 ⁻³	5.0 × 10 ^{-5 a)}	1.8 × 10 ⁻⁵	8.0 × 10 ⁻⁵	10	91	
PNIPAM ^{b)}	NIPAM	4.0 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ^{-5 a)}	1.3 × 10 ⁻⁵	-	10	86	
[M]/[RAFT]/[I]/[H⁺] [300]/[3]/[1]/[230]								
5a	PMP _y AEA ^{a)}	4a	2.0 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ^{-5 a)}	1.3 × 10 ⁻⁵	3.06 × 10 ⁻³	12	98
5b	PBP _y AEA ^{a)}	4b	1.5 × 10 ⁻³	3.0 × 10 ^{-5 a)}	1.0 × 10 ⁻⁵	2.35 × 10 ⁻³	12	96
5c	PMP _y APA ^{a)}	4c	2.0 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ^{-5 a)}	1.3 × 10 ⁻⁵	3.06 × 10 ⁻³	12	95
8c	PMP _y APA ^{b)}	4c	2.0 × 10 ⁻³	4.0 × 10 ^{-5 b)}	1.3 × 10 ⁻⁵	-	16	95
[M]/[RAFT]/[I]/[H⁺] [150]/[3]/[1]/[230]								
Polimeryzacja z ^{a)} uniwersalnym reagentem RAFT ^{b)} DDMAT								

Badania własne i dyskusja wyników



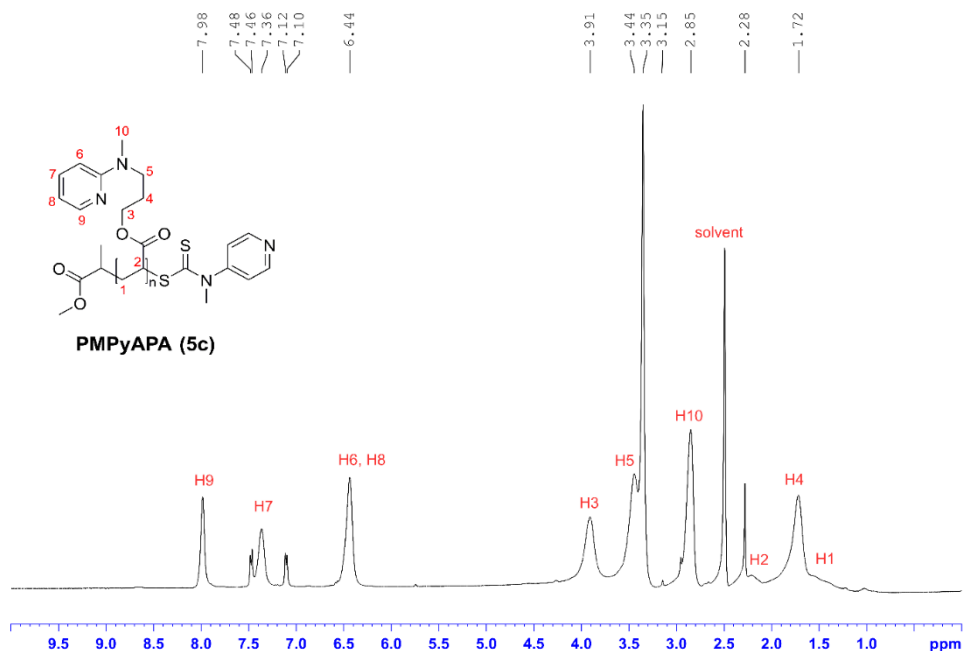
Rysunek 20 Widmo ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) polimeru PBPYAEA (5b).

3.4 Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu) – PMPyAPA

Długość łącznika alkilowego determinuje rodzaj powstającego związku bicyklicznego, przykładowo przy dwuwęglowym łączniku powstaje energetycznie uprzywilejowany pięciocłonowy związek cykliczny. Ma to miejsce w przypadku monomerów **4a** oraz **4b**. Syntezy polimerów **5a** i **5b** jest możliwa tylko w przypadku protonacji atomu azotu w pierścieniu pirydyny, która zachodzi dzięki czasowemu zablokowaniu cyklizacji. Wydłużenie łańcucha alifatycznego o jeden atom węgla spowoduje, że w wyniku ataku nukleofilowego atomu azotu pirydyny na węgiel α , będzie tworzył się sześciocłonowy związek heterocykliczny. W chemii organicznej tworzenie się pierścienia sześciocłonowego wymaga większych nakładów energii niżeli formowanie się pierścienia pięciocłonowego. Bazując na poprzednio przeprowadzonych reakcjach, postanowiłam w pierwszej kolejności użyć uniwersalnego reagenta RAFT, aby otrzymać polimer **5c** (Schemat 13). Polimeryzacja monomeru z łącznikiem propylenowym w środowisku kwasowym przebiegała z wysoką konwersją, a warunki reakcji nie wymagały dalszych modyfikacji

Badania własne i dyskusja wyników

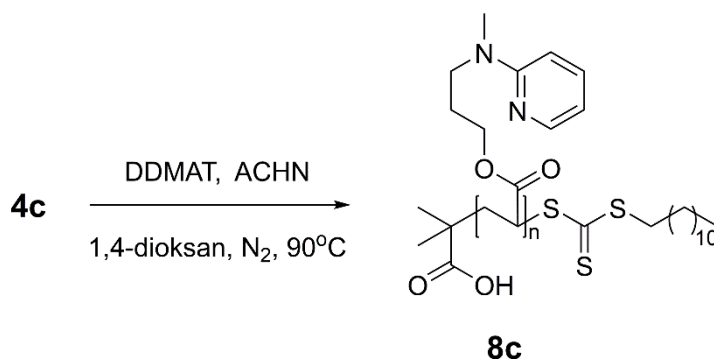
(Tabela 5). Analiza widm ^1H NMR wykazała, że związek cykliczny w trakcie polimeryzacji nie powstaje, dlatego reakcja została zakończona po 12 h grzania. Otrzymany polimer **5c** został oczyszczony według procedury stosowanej dla polimerów zakwaszonych. Polimer **5c** miał postać ciała stałego o zabarwieniu różowym, a jego struktura chemiczna została potwierdzona analizą ^1H NMR (Rysunek 21).



Rysunek 21 Widmo ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) polimeru PMPyAPA (**5c**).

Jak wspominałam wcześniej, struktura monomeru **4c** różni się od pozostałych analizowanych monomerów 2-pirydynylowych długością łącznika alifatycznego. Dla monomerów z łącznikiem etylowym, w wyniku procesu cyklizacji powstaje pięcioczłonowy związek heterocykliczny. Postanowiłam sprawdzić, czy protonacja z tym samym czasie blokowanie aktywności nukleofilowej pirydyny w trakcie polimeryzacji jest również konieczne dla monomeru **4c**. Przeprowadziłam reakcję, bez wstępnej protonacji monomeru, a jako czynnik przeniesienia łańcucha użyłam DDMAT (Schemat 14). Polimeryzacja została przeprowadzona w środowisku neutralnym (Tabela 5), a po 3 h na widmie ^1H NMR nie stwierdziłam obecności sygnałów charakterystycznych dla powstania związku cyklicznego. Sygnały protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H) w monomerze były nadal widoczne, dlatego reakcja była kontynuowana.

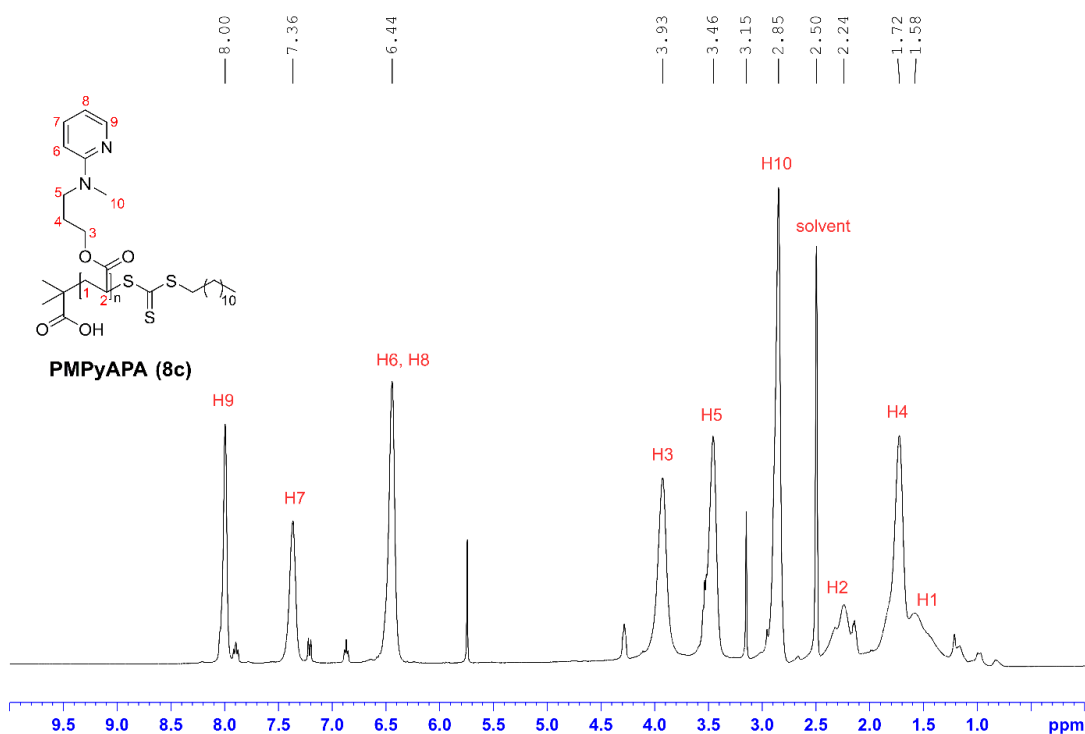
Badania własne i dyskusja wyników



Schemat 14 Schemat polimeryzacji monomeru **4c**, przy zastosowaniu DDMAT jako czynnik przeniesienia łańcucha oraz ACHN jako inicjator.

Po 10 h protonowe widmo NMR wykazało znaczne zmniejszenie się sygnałów protonów winylowych. Po uzyskaniu wysokiej konwersji monomeru (> 85%), reakcja została zakończona (łącznie 16 h). Produkt PMPyAPA, z grupami końcowymi pochodzącymi od DDMAT (**8c**), został oczyszczony poprzez precypitację z zimnego heksanu, a następnie suszony przez 24 h pod próżnią. Otrzymany polimer ma postać ciała stałego (lekko różowego). Widmo ^1H NMR oczyszczonego produktu potwierdziło otrzymanie polimeru **8c** (**Rysunek 22**). Synteza PMPyAPA była możliwa przy zastosowaniu obydwu omawianych wcześniej czynników wzrostu łańcucha: sRAFT oraz DDMAT. Wynika z tego, że w przypadku monomeru **4c** proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji przebiega na tyle wolno, że nie przeszkadza to w reakcji polimeryzacji.

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 22 Widmo ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) polimeru PBPYAEA (8c).

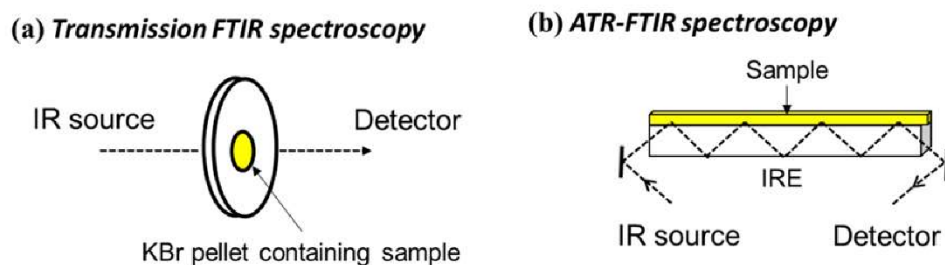
4 Charakterystyka fizykochemiczna homopolimerów

Zakończenie etapu syntezy homopolimerów **5a-c** pozwoliło na rozpoczęcie kolejnego etapu badań – analizy procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji wspomaganej temperaturą. Przed przystąpieniem do tej części, konieczne było scharakteryzowanie uzyskanych polimerów. W pierwszej kolejności wykonałam analizę ^1H NMR, która opierała się na identyfikacji głównych sygnałów występujących na widmach NMR, co pozwoliło potwierdzić struktury otrzymanych polimerów. Dodatkowo, w analizie struktury polimerów PNIPAM oraz **5a-c** przydatna okazała się spektroskopia w podczerwieni. Dzięki tej technice możliwe było potwierdzenie obecności głównych grup funkcyjnych w strukturze polimerów - grupy estrowej i aminy trzeciorzędowej. Kolejnym istotnym elementem weryfikacji otrzymanych polimerów było porównanie mas molowych teoretycznych (wyliczonych), z masami które zostały wyznaczone technikami eksperymentalnymi. Dla polimerów PNIPAM została również potwierdzona ich dolna krytyczna

temperatura rozpuszczalności (LCST), jako dodatkowa weryfikacja poprawności wykonywanych syntez.

4.1 Spektroskopia w podczerwieni

Do identyfikacji grupy estrowej oraz aminowej w polimerze użyto spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR, ang. *Fourier transformation infrared spectroscopy*). Uzyskane widma pozwalają na potwierdzenie struktury otrzymanych polimerów, a ponieważ wszystkie są ciałami stałymi postanowiłam wykorzystać metodę wewnętrznego odbicia promieniowania w podczerwieni (ATR, ang. *attenuated total reflectance*). W metodzie tej próbka może być bezpośrednio nałożona na specjalny kryształ, a widmo rejestrowane jest z powierzchni ciała stałego. **Rysunek 23** przedstawia schematycznie, w jaki sposób zbierane jest widmo IR w metodzie odbiciowej (b) a jak w transmisyjnej (a) [147]. Technika ATR pozwala na szybką analizę, ponieważ w przeciwieństwie do standardowego pomiaru transmisyjnego, nie wymaga czasochłonnego przygotowywania próbki do badań.



Rysunek 23 Metody zbierania widma w podczerwieni gdzie (a) technika transmisyjna, (b) technika odbiciowa [147].

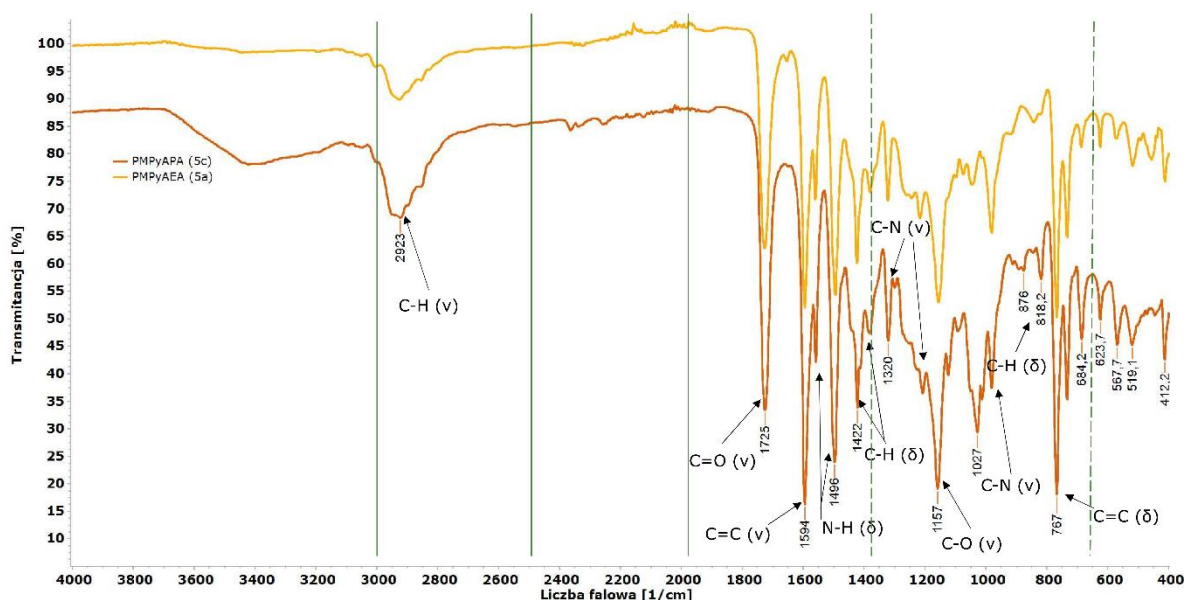
Interpretacja każdego pasma na widmie IR, nawet dla związków niskocząsteczkowych jest bardzo trudna, ze względu na występowanie wielu drgań rozciągających i deformacyjnych w cząsteczce. Im większy i bardziej złożony związek chemiczny tym to zadanie jest trudniejsze. Różnicę energii wiązań chemicznych i odpowiadające im poziomy oscylacyjne często są zbliżone, dlatego różne grupy funkcyjne dają często charakterystyczne pasma absorpcyjne w podobnym zakresie liczb falowych. Widma w podczerwieni rejestrowane są przeważnie w zakresie 4 000 –

Badania własne i dyskusja wyników

400 cm^{-1} i dla ułatwienia identyfikacji poszczególnych pasm zakres ten możemy podzielić na cztery obszary, w których każdy jest charakterystyczny dla pewnej grupy wiązań chemicznych [114, 148]. Obszar liczb falowych od 4 000 do 2 500 cm^{-1} możemy przypisać drganiom rozciągającym (ν) wiązań N-H pierwszo- i drugorzędowych amin czy amidów, szerokim pasmom drgań rozciągających O-H alkoholi, fenoli czy kwasów karboksylowych oraz drganiom rozciągającym C-H m.in. w aldehydach, alkanach oraz alkenach, w tym aromatycznych. W obszarze 2 500 – 2 000 cm^{-1} znajdują się charakterystyczne drgania rozciągające dla związków zawierających wiązanie potrójne $\text{C}\equiv\text{C}$ (alkiny) i $\text{C}\equiv\text{N}$ (nityle). Natomiast pasma absorpcji w obszarze 2 000 – 1 500 cm^{-1} wskazują na obecność drgań rozciągających wiązań podwójnych ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$). W tym obszarze widoczne są zwłaszcza silne pasma dla drgań rozciągających $\text{C}=\text{O}$ aldehydów, ketonów, estrów, bezwodników i innych związków karbonylowych. Najtrudniejszy obszar do identyfikacji pasm na widmie IR znajdują się poniżej 1 500 cm^{-1} . Jest to równocześnie charakterystyczny obszar dla danej cząsteczki, nazwany zakresem daktyloskopowym lub zakresem „odcisku palca” (ang. *the fingerprint region*) i służy on do identyfikacji związku chemicznego poprzez porównanie ze wzorcem. W obszarze daktyloskopowym znajdują się pasma drgań rozciągających dla wiązań pojedynczych C-C, C-N, C-O, a także pasma absorpcji dla symetrycznych i asymetrycznych drgań rozciągających wiązania N-O w nitrozwiązkach. W tym zakresie widoczne są również pasma odpowiadające drganiom deformacyjnym (δ) w płaszczyźnie cząsteczki (nożycowe, wahadłowe), jak i poza płaszczyzną (wachlarzowe, skręcające).

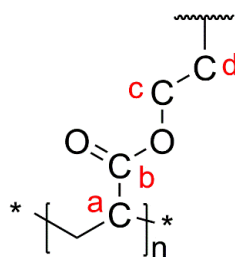
Uzyskane, dla otrzymanych polimerów wyniki, pozwoliły na określenie najważniejszych pasm absorpcji w podczerwieni i przypisanie ich do głównych grup funkcyjnych w cząsteczce. Widma IR dla polimerów **5a** oraz **5c**, czyli z podstawnikiem metylowym, ale różniących się długością łańcucha węglowego, były bardzo podobne (**Rysunek 24**). Jedyne różnice można zaobserwować w zakresie 1 150 -950 cm^{-1} , który odpowiada zarówno drganiom C-N (ν) amin alifatycznych oraz C-O (ν) estrów. W przypadku polimeru **5c** na widmie obserwujemy także pasmo absorpcji około 1 027 cm^{-1} , które nie jest widoczne na widmie **5a**. Dla omawianych polimerów powinniśmy zaobserwować trzy intensywne pasma pochodzące od grupy estrowej, tzw. „reguła trzech”. Pierwszym z tych pików jest intensywne pasmo w okolicach 1 700 cm^{-1} odpowiadające $\text{C}_b=\text{O}$ (ν) (**Rysunek 25**). Drugie pasmo odpowiada za rozciąganie C-O, a dokładnej $\text{C}_a-\text{C}_b-\text{O}$ (1 210 – 1 160 cm^{-1}). Natomiast, trzecie pasmo dotyczy asymetrycznego odcinka estru węgla O- C_c-C_d , czyli atomu tlenu i jednego, lub dwóch atomów węgla. Pasma te pojawiają się dla estrów

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 24 Widma w podczerwieni polimerów **5a** i **5c**. Drgania rozciągające poszczególnych wiązań oznaczone jako (v), natomiast drgania zginające jak (δ).

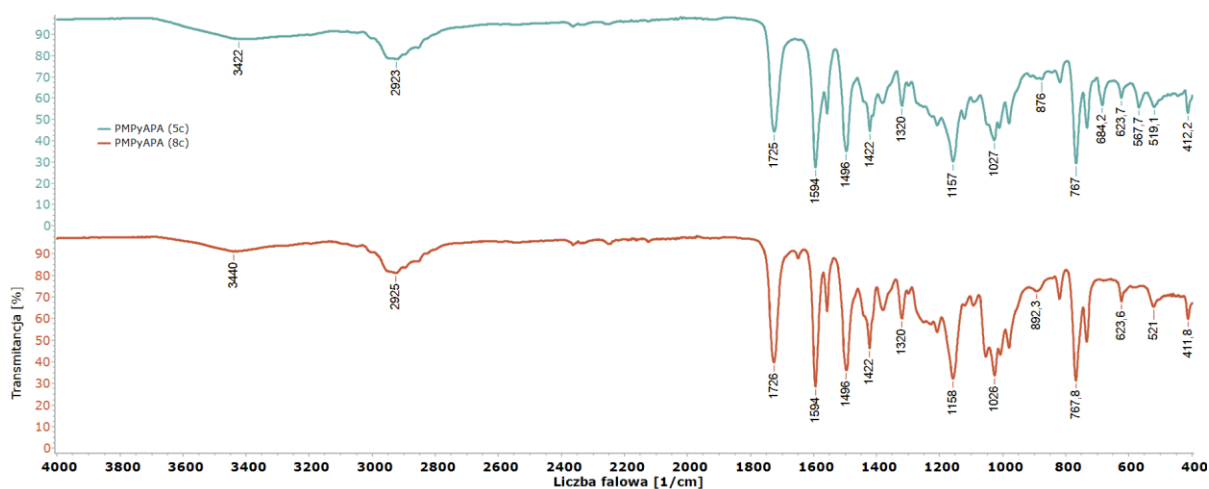
nasyconych w przedziale się od $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ do $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$ [149, 150]. Ponieważ jedno z wiązań C-O w grupie estrowej jest przyłączone do węgla karbonylowego, a drugie nie, możemy oczekiwać, że będą one chemicznie różne. Oznacza to, że charakteryzują je różne stałe siły drgań rozciągających, co powoduje powstanie dwóch oddzielnych pików między $1\ 300$ a $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ [151]. Dłuższy łańcuch węglowy w polimerze **5c** sprawia, że trzeciorzędowa grupa aminowa oraz grupa estrowa są od siebie odizolowane trzema atomami węgla. Siła drgań rozciągających O-C_c-C_d grupy estrowej jest w tym przypadku większa i pasmo absorpcyjne jest widoczne na widmie, a zatem „reguła trzech” jest spełniona. Dla polimeru **5a**, węgiel C_d jest połączony bezpośrednio z trzeciorzędową aminą. Prawdopodobnie, wpływ drgań wiązania C-N (v) jest znacznie większy niż O-C_c-C_d(v), dlatego też nie widzimy trzeciego pasma adsorpcji dla grupy



Rysunek 25 Struktura molekularna estrowej grupy funkcyjnej.

Badania własne i dyskusja wyników

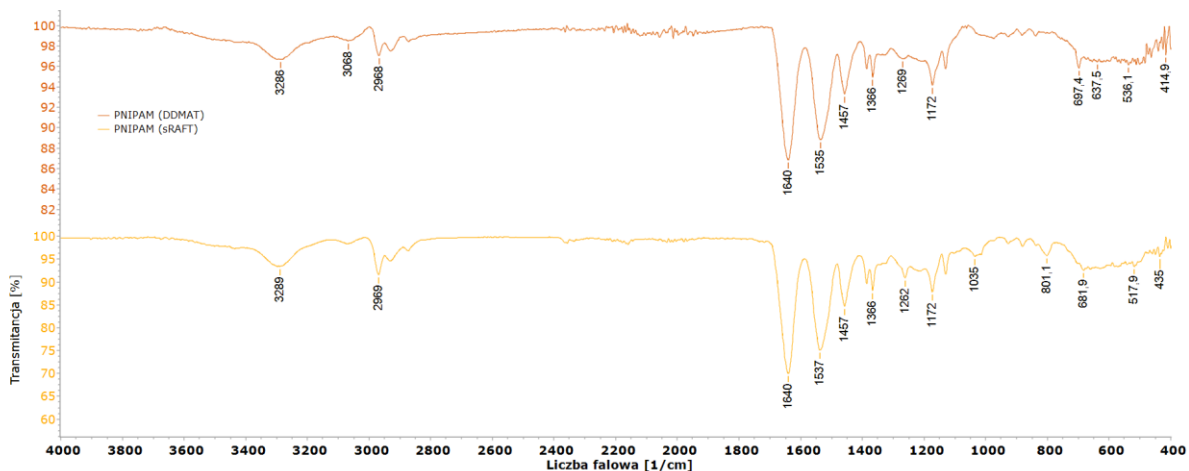
estrowej. Pasma adsorpcji przy 1027 cm^{-1} jest widoczne natomiast dla **8c**, co potwierdza powyższe założenia (**Rysunek 26**).



Rysunek 26 Widma w podczerwieni polimerów **5c** i **8c**.

Technika FT-IR pozwala potwierdzić strukturę chemiczną łańcucha głównego, ale nie daje odpowiedzi na pytanie jakie grupy końcowe znajdują się w polimerach. Widma IR dla polimerów **5c** i **8c** nie różnią się znacząco, co potwierdza, że łańcuch główny oraz boczny składa się z tak samo połączonych grup funkcyjnych. Zakres daktyloskopowy, charakterystyczny dla cząsteczki, różni się jedynie intensywnością pasm adsorpcji, nie zaś ich położeniem (**Rysunek 26**). Dlatego postanowiłam dodatkowo wykonać pomiary widm w podczerwieni dla polimerów PNIPAM, różniących się grupami końcowymi, tj. $\text{PNIPAM}_{(\text{DDMAT})}$ oraz $\text{PNIPAM}_{(\text{SRAFT})}$. Uzyskane widma pokazują, że analiza w podczerwieni jest niewystarczająca, aby zidentyfikować pasma adsorpcji grup funkcyjnych pochodzących od grup końcowych (**Rysunek 27**), a jedynie pozwala potwierdzić identyczność łańcucha głównego. Dzieje się tak ponieważ pasma te są ekranowane przez silniejsze sygnały pochodzące od grup funkcyjnych łańcucha bocznego. Analiza w podczerwieni pozwala na szybką kontrolę jakości uzyskanych polimerów oraz określenie różnic w łańcuchu bocznym. Nie jest wystarczająca do określenia dokładnej struktury polimeru, ale jest dobrym uzupełnieniem spektroskopii NMR.

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 27 Widma w podczerwieni polimerów PNIPAM_(DDMAT) i PNIPAM_(sRAFT). Identyfikacja pasm adsorpcji pochodzących od grup końcowych polimerów była niemożliwa.

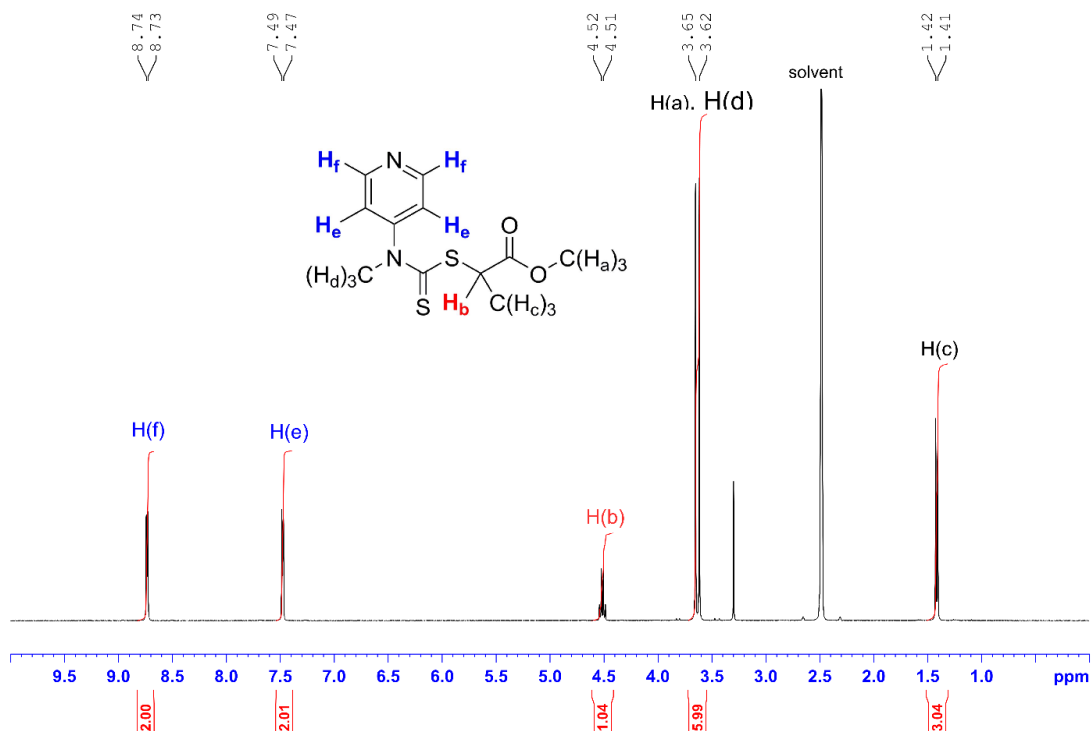
4.2 Określenie masy cząsteczkowej

Masa cząsteczkowa dla otrzymanych polimerów została określona dwoma metodami i porównana z „założoną” masą teoretyczną. Przyjmuje się, że masa molowa polimerów syntetycznych, które nie są biodegradowalne, ale są wykorzystywane w systemach dostarczania leków, powinna być mniejsza niż 50 000 g/mol [152, 153]. Masa teoretyczna otrzymanych polimerów 2-pirydynylowych wynosi około 12 000 g/mol i została tak dobrana aby spełniać powyższe kryterium.

4.2.1 Analiza grup końcowych przy użyciu widm ¹H NMR

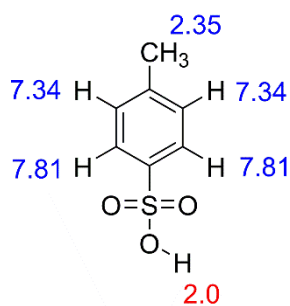
Pierwszą metodą zastosowaną do wyznaczenia masy molowej była metoda grup końcowych, przy użyciu spektroskopii NMR (Rozdział 4.2, Część I). Do obliczeń zostały użyte sygnały trzech różnych grup protonów uniwersalnego czynnika przeniesienia łańcucha, o następujących przesunięciach chemicznych: δ 4.51 ppm (q, $J = 22.02$, 7.34 Hz, 1H_b), δ 7.48 ppm (d, $J = 5.76$ Hz, 2H_e), δ 8.74 ppm (d, $J = 5.90$ Hz, 2H_f) (**Rysunek 28**). Sygnał protonu H_b pochodzi od grupy metylowej w części aktywującej sRAFT, natomiast sygnały H_e i H_f to protony aromatyczne w homolitycznej grupie odchodzącej. W przypadku polimerów otrzymanych w warunkach

Badania własne i dyskusja wyników

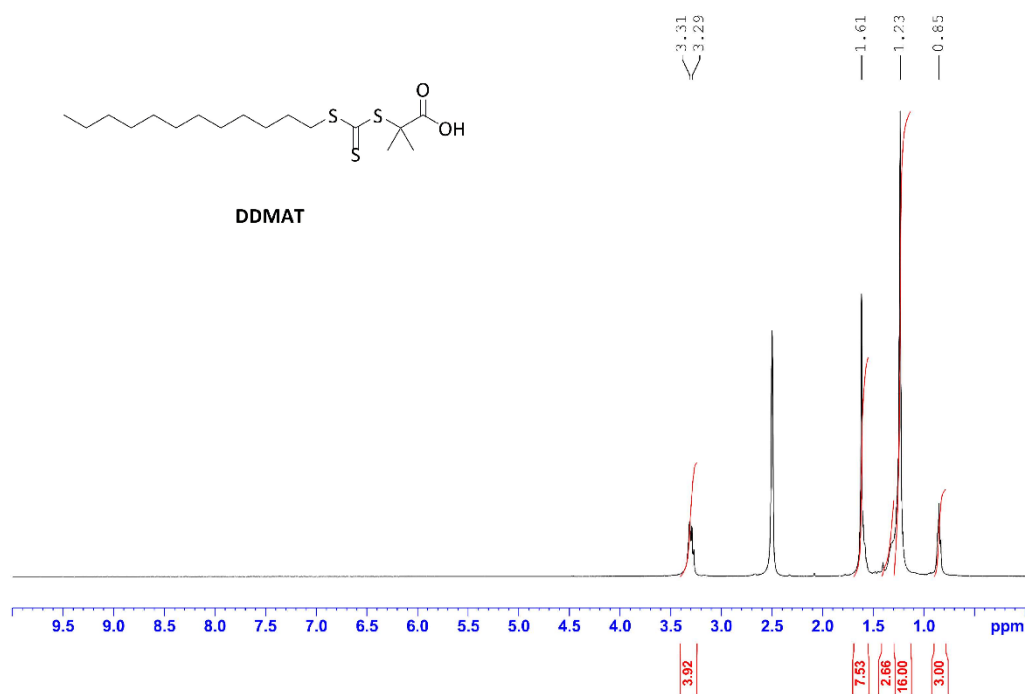


Rysunek 28 Widmo ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) uniwersalnego reagenta RAFT.

kwasowych bardzo istotnym krokiem, w prawidłowym określeniu ich masy molowej, jest proces oczyszczania polimeru, a w szczególności neutralizacja mieszaniny reakcyjnej. Tylko w przypadku bardzo czystego polimeru na widmie ^1H NMR nie będą widoczne sygnały pochodzące od pozostałości kwasu *p*-TsOH. W innej sytuacji sygnały jego protonów aromatycznych, δ 7.34 ppm (2H) i δ 7.81 ppm (2H) (**Rysunek 29**), będą nakładały się na z sygnałami H_e i H_f grupy końcowej



Rysunek 29 Przesunięcia chemiczne charakterystyczne dla protonów kwasu *p*-toluenosulfonowego. Estymacja programu ChemDraw Professional 16.0.0.86.



Rysunek 30 Widmo ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) DDMAT.

makrocząsteczki. Może to spowodować błędy w integracji oraz w określeniu ilości powtarzających się jednostek polimeru, a co za tym idzie, nieprawidłowym wyliczeniu średniej masy molowej polimeru. Dlatego niezwykle istotną kwestią jest znalezienia dodatkowego sygnału referencyjnego grupy końcowej na widmie protonowym (δ 4.51 ppm, H_b, **Rysunek 28**). Określenie masy molowej z wykorzystaniem analizy grup końcowych nie było możliwe dla wszystkich otrzymanych polimerów. W szczególności, było to utrudnione dla polimerów syntezowanych z użyciem DDMAT. W strukturze DDMAT wszystkie protony na widmie ¹H NMR mają przesunięcia chemiczne w obszarze alifatycznym (**Rysunek 30**). Wyjątkiem jest kwasowy proton, którego labilny charakter nie pozwala na wykorzystanie go jako sygnału referencyjnego. Trudności w prawidłowej integracji sygnałów, pochodzących od grup końcowych DDMAT sprawiają, że wyliczone wartości masy są obarczone większym błędem, niż dla polimerów z grupami końcowymi pochodzącymi od uniwersalnego reagenta RAFT. Masy molowe homopolimerów obliczone na podstawie widm protonowych NMR ($M_{n, \text{NMR}}$) są zbliżone z masami wyliczonymi teoretycznie, przy założeniu 100% konwersji monomeru ($M_{n, \text{teoretyczna}}$) (**Tabela 6**).

Badania własne i dyskusja wyników

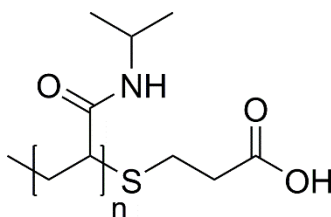
Tabela 6 Porównanie mas molowe otrzymanych polimerów PNIPAM oraz **5a-8c**.

Polimer		M_n , teoretyczna ^{c)} [g/mol]	M_n , NMR ^{d)} [g/mol]
PNIPAM _(sRAFT)		6 000	3 300
PNIPAM _(DDMAT)		11 600	11 100
5a	PMPyAEA ^{a)}	11 000	10 500
5b	PBPyAEA ^{a)}	11 600	13 000
5c	PMPyAPA ^{a)}	11 000	7 700
8c	PMPyAPA ^{b)}	11 600	6 000

^{a)} grupy końcowe pochodzące od uniwersalnego reagenta RAFT
^{b)} grupy końcowe od DDMAT
^{c)} teoretyczna masa molowa wyliczona z równania (8)
^{d)} liczbowo średnia masa molowa wyliczona z analizy grup końcowych

4.2.2 Analiza chromatograficzna (GPC/SEC)

Otrzymane 2-pirydynylowe polimery są nowymi materiałami, które według mojej wiedzy, do tej pory nie były opisane w literaturze. Brak doniesień literaturowych dotyczących analizy podobnych układów, do których można się odnieść spowodował, że opracowanie optymalnych warunków analizy chromatograficznej (GPC/SEC) było niezwykle czasochłonne. Postanowiłam zoptymalizować warunki wykluczenia, stosując polimery referencyjne: PNIPAM_(DDMAT) oraz PNIPAM_(sRAFT), które umożliwiły zbadanie wpływu grup końcowych na proces. Dodatkowo, analizie poddałam komercyjnie zakupiony polimer PNIPAM z kwasową grupą końcową o masie cząsteczkowej $M_n = 10\,000$ g/mol (**Rysunek 31**), jako odnośnik zewnętrzny o zbliżonym promieniu hydrodynamicznym do pozostałych polimerów PNIPAM.



Rysunek 31 Struktura polimeru referencyjnego PNIPAM ($M_n=10\,000$ g/mol).

Badania własne i dyskusja wyników

Analizy zostały przeprowadzone w przepływie izokratycznym (1 mL/min), na trzech połączonych szeregowo kolumnach PLGel 10 μ m Mixed-B, o całkowitym zakresie wykluczania mas 200 – 2 000 000 g/mol. Aby zapobiec agregacji polimerów PNIPAM, w trakcie analizy, układ kondycjonowany był w temperaturze 30 °C (LSCT dla PNIPAM to 32 °C). Zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej wyposażony był w uniwersalny detektor refraktometryczny, natomiast do sporządzenia krzywej kalibracyjnej, w zakresie 800 – 1 500 000 g/mol, użyłam standardów polistyrenu (PS) o niskiej polidispersyjności. Do kontroli poprawności krzywej kalibracyjnej, pomiędzy poszczególnymi analizami, użyty był PS o masie 9 550 g/mol. Próbki standardów PS, o stężeniu 1 mg/mL, przygotowane były w fazie ruchomej, w której przeprowadzana była analiza. Krzywa kalibracyjna wyznaczana była każdorazowo przy zmianie warunków w układzie chromatograficznym. Próbki polimerów, o stężeniu 3 mg/mL, przygotowywane były w fazie ruchomej korespondującej z warunkami na kolumnie.

Początkowo użytą fazą ruchomą był chloroform (CHCl_3). Okazało się jednak, że profil pików dla wszystkich referencyjnych próbek PNIPAM znacznie odbiegał od krzywej Gaussa. Dodatkowo, wyznaczona masa molowa dla komercyjnego PNIPAM była znacznie niższa niż podana przez producenta. Dlatego, postanowiłam zmienić fazę ruchomą na bardziej polarny rozpuszczalnik organiczny, tetrahydrofuran (THF), aby sprawdzić czy zaobserwujemy podobne zależności. Profile pików były w tym przypadku bardziej symetryczne, ale nadal widoczne było silne rozmycie tylne piku tzw. ogonowanie, a masa $\text{PNIPAM}_{(10\text{kDa})}$ znacznie odbiegała od deklarowanej przez producenta. Z otrzymanych wartości (**Tabela 7**) wynika, że czas dyfuzji próbki polimeru przez kolumnę jest zdecydowanie za długi i PNIPAM jest w jakiś sposób zatrzymywany w porach. Może to być spowodowane niepożądanymi oddziaływaniami z fazą stacjonarną, co wydłuża czas wykluczenia polimeru, a tym samym uzyskane masy molowe są obarczone dużym błędem. W kolejnym kroku postanowiłam wprowadzić modyfikator, który pozwolił zminimalizować wpływ oddziaływań drugorzędowych w trakcie analizy. PNIPAM w swej strukturze ma ugrupowanie amidowe, z szczytkowym ładunkiem dodatnim na atomie azotu i szczytkowym ładunkiem ujemnym na tlenie. Wprowadzenie odczynnika działającego jak para jonowa powinno zmniejszyć oddziaływanie polimeru z fazą stacjonarną. W tym celu do THF dodałam 1% bromku tetrabutylamonowego (TBAB), który powinien skrócić czas retencji (wykluczania) próbki polimeru z kolumny oraz usunąć ewentualne ogonowanie piku. Analiza przeprowadzona w THF z 1% TBAB wykazała, że liczbowo średnia masa molowa $\text{PNIPAM}_{(10\text{kDa})}$ jest

Badania własne i dyskusja wyników

zbliżona do określonej przez producenta pomimo, że polidispersyjność nadal była dość duża (rozmycie tylne pików). Dla kolejnych polimerów referencyjnych, okazało się że profil pików jest bardziej symetryczny, a wyniki polidispersyjności znacznie się polepszyły (**Tabela 7**). Dodatkowo, wyznaczone masy molowe dość dobrze korespondowały z masami wyliczonymi teoretycznie. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że powyższe warunki analizy będą optymalne do wyznaczenia masy dla pozostałych zsyntezowanych polimerów. Krzywa kalibracyjna została wyznaczona w zakresie czasów retencji (t_R) 10-19 minut, względem standardów polistyrenu. Wyznaczone dla krzywej współczynniki determinacji liniowej $R = 0.999575$ oraz $R^2 = 0.999151$, potwierdzają wiarygodność procesu kalibracji (**Rysunek 58**, podrozdział 2.6, Część IV).

Tabela 7 Porównanie liczbowo średnich mas molowych polimerów referencyjnych, w różnych warunkach analiz chromatograficznych. Kolorem zaznaczone zostały wybrane warunki analizy GPC/SEC.

Polimer referencyjny	M_n , teoretyczna ^{b)} [g/mol]	$CHCl_3$		THF		THF, 1% TBAB	
		M_n , [g/mol]	\mathcal{D} ^{c)}	M_n , [g/mol]	\mathcal{D} ^{c)}	M_n , [g/mol]	\mathcal{D} ^{c)}
PNIPAM _(10kDa) ^{a)}	10 000	1 200	1.52	1 400	1.50	7 900	1.54
PNIPAM _(sRAFT)	6 000	1 100	1.63	1 200	1.59	4 800	1.16
PNIPAM _(DDMAT)	11 600	1 200	1.64	1 350	1.64	11 300	1.16
PS	9 500	9 000	1.06	9 700	1.04	8 000	1.07

^{a)} polimer PNIPAM zakupiony w firmie MERCK
^{b)} teoretyczna masa molowa wyliczona z równania (8)
^{c)} polidispersyjność wyliczona na podstawie analizy chromatograficznej

Struktura chemiczna polimerów 2-pirydynylowych różni się od struktury polimerów PNIPAM, co sugeruje że promienie hydrodynamiczne również będą odmienne. Zostało to uwzględnione przy optymalnym doborze warunków analizy oraz przy wyborze polimerów referencyjnych. Piki chromatograficzne dla analizowanych polimerów nie są symetryczne tak jak w przypadku polimerów referencyjnych, co ma swoje odzwierciedlenie w wartościach polidispersyjności oraz w wartościach M_w , GPC/SEC (**Tabela 8**) Polidispersyjność otrzymanych polimerów można określić jako niską, gdy wartość jest mniejsza niż 1.5. Wartości polidispersyjności polimerów **5a-c** są typowe dla produktów otrzymanych metodą polimeryzacji rodnikowej, a wartość polidispersyjności dla polimeru **8c** jest zbliżona do 2.0, co świadczy o większym rozrzucie mas molowych. Wyższe wartości polidispersyjności dla polimeru z grupą

Badania własne i dyskusja wyników

kończącą DDMAT wynikają z wysokiej wartości średniej wagowej masy molowej, gdzie wartość polidispersyjności liczymy jako iloraz wagowo średniej masy molowej i liczbowo średniej masy molowej (**Równanie 6**).

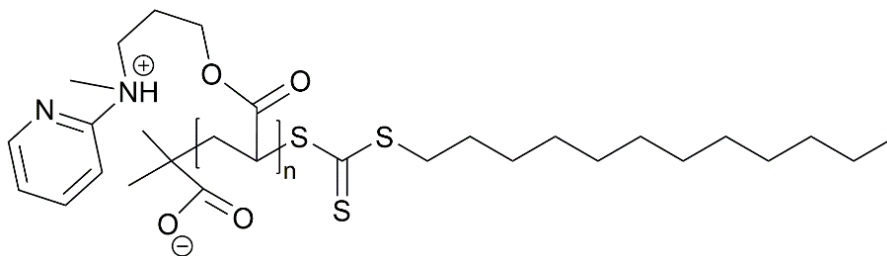
Tabela 8 Porównanie mas molowych polimerów 2-pirydynylowych, otrzymanych w zoptymalizowanych warunkach analizy chromatograficznej

Polimer		M_n , teoretyczna ^{c)} [g/mol]	M_w , GPC/SEC ^{d)} [g/mol]	M_n , GPC/SEC ^{e)} [g/mol]	\mathcal{D} ^{f)}
5a	PMPyAEA ^{a)}	11 000	12 200	8 000	1.54
5b	PBPYAEA ^{a)}	11 600	9 000	6 000	1.49
5c	PMPyAPA ^{a)}	11 000	-	-	-
8c	PMPyAPA ^{b)}	11 600	20 900	10 800	1.94

^{a)} grupy końcowe pochodzące od uniwersalnego reagenta RAFT
^{b)} grupy końcowe od DDMAT
^{c)} teoretyczna masa molowa wyliczona z równania (8)
^{d)} wagowo średnie masy molowe
^{e)} liczbowo średnie masy molowe
^{f)} polidispersyjność wyliczona na podstawie analizy chromatograficznej

Wysoka wartość polidispersyjności świadczy również o asymetryczności polimeru **8c**, która prawdopodobnie wynika z tworzenia się jonu obojnaczego pomiędzy wolnym kwasem karboksylowym grupy końcowej, a zasadowym ugrupowaniem 2-pirydynylowym łańcucha bocznego (**Rysunek 32**). Z otrzymanych wartości M_w , GPC/SEC wynika, że oddziaływania nie są niwelowane, nawet poprzez dodanie 1% TBAT do fazy ruchomej. Wielkości M_n , GPC/SEC są zatem bardziej wiarygodnym określeniem masy dla polimerów 2-pirydynylowych. Wartości mas molowych dla polimerów 2-pirydynylowych otrzymanych w analizie GPC/SEC zostały również porównane z masami wyliczonych teoretycznie.

Badania własne i dyskusja wyników

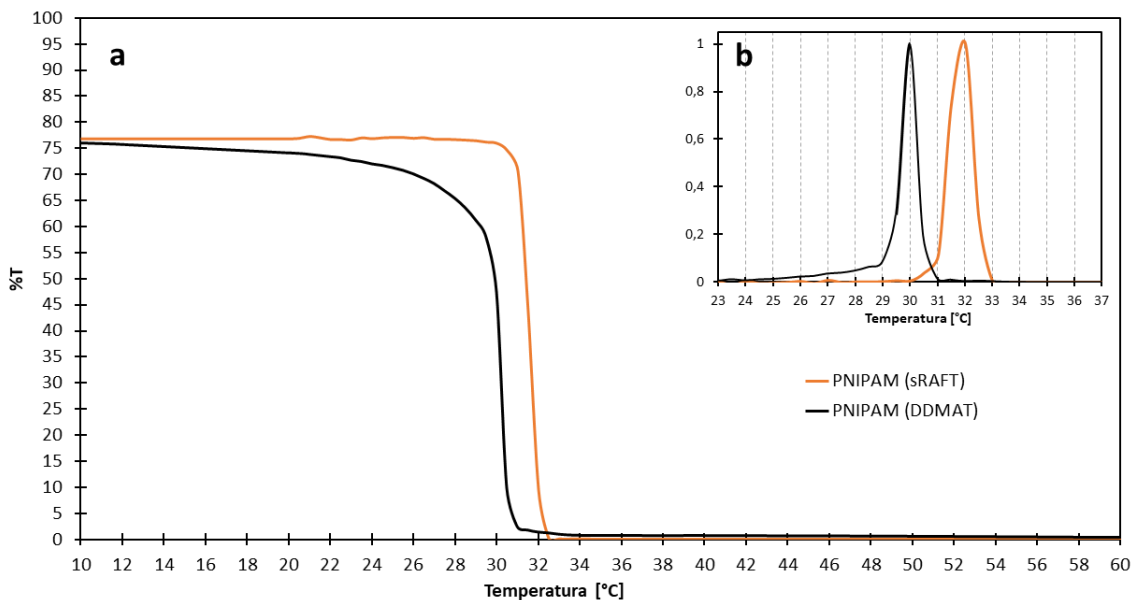


Rysunek 32 Proponowana struktura jonu obojnego w polimerze 8c.

4.3 Wyznaczenie dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności dla polimerów PNIPAM

W trakcie optymalizacji warunków analizy okazało się, że dla otrzymanych syntetycznie polimerów referencyjnych, pomocne będzie określenie dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności (LCST). Polimer PNIPAM jest polimerem czułym na zmianę temperatury a poniżej LCST składa się tylko z jednej fazy, natomiast po jej przekroczeniu „zwija się” tworząc układ dwóch faz (podrozdział 2.2.2, Część I). Z danych literaturowych wiadomo, że wartość LCST dla PNIPAM w wodzie wynosi 32 °C [80]. Wyznaczenie LCST dla polimerów PNIPAM_(DDMAT) oraz PNIPAM_(SRAFT) zostało wykonane przy użyciu spektroskopii UV-Vis. Polimery zostały zdyspergowane w wodzie milli-Q, po czym został wykonany pomiar turbidymetryczny. Próbką 1% roztworu polimeru była podgrzewana w zakresie temperatur 10 °C do 60 °C z szybkością 0.5 °C/min. W trakcie ogrzewania, przy każdej zmianie układu o 1 °C, wykonywany był pomiar transmitancji, przy długości fali λ równej 500 nm. Wyniki pomiarów, w formie krzywych, pokazano na **Rysunek 33a**, na których punkt przegięcia określa temperaturę krytyczną. Transmitancja roztworu polimeru poniżej LCST jest wysoka, a następnie po przekroczeniu temperatury krytycznej, spada do zera.

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 33 Krzywe turbidymetryczne (a) oraz wyznaczone wartości LCST (b) dla polimerów referencyjnych $\text{PNIPAM}_{(\text{DDMAT})}$ i $\text{PNIPAM}_{(\text{sRAFT})}$.

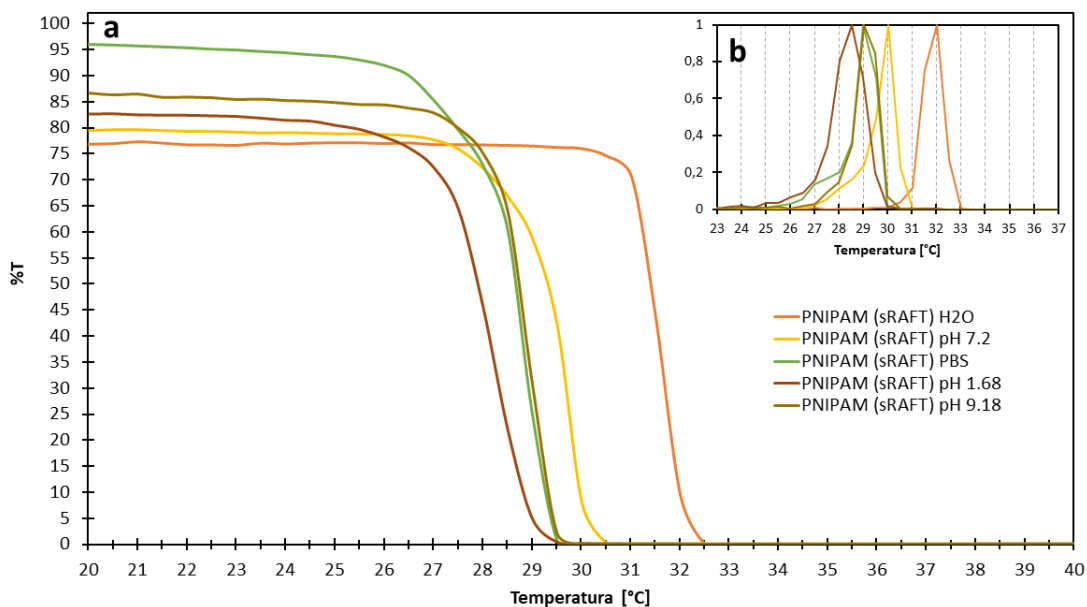
Wyznaczone z pomiarów UV-Vis wartości LCST (**Rysunek 33b**) dla $\text{PNIPAM}_{(\text{DDMAT})}$ oraz $\text{PNIPAM}_{(\text{sRAFT})}$ są zbliżone do wartości literaturowych. Wodny roztwór polimeru z grupą końcową DDMAT ma niższą transmitancję początkową, a wyznaczona wartość LCST jest niższa niż 32 °C. Spowodowane jest to obecnością długiego niepolarnego łańcuchem alkilowego na jednym z końców polimeru, który przyspiesza szybkość jego agregacji. Dodatkowo należało sprawdzić, czy zmiana pH oraz dodatek soli będą wpływały na „zwijanie się” polimeru, a tym samym na LCST. W tym celu wybrałam polimer $\text{PNIPAM}_{(\text{sRAFT})}$ którego dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności jest zgodna z danymi literaturowymi. Pomiary przeprowadzone były w analogiczny sposób, jak dla czystych roztworów wodnych. Każdorazowo polimer zdyspergowany był w roztworze wodnym o różnych parametrach (**Tabela 9**), wybrałam trzy różne roztwory buforowe o stężeniu 0.1 M, które pozwalały na kontrole pH w środowisku kwasowym, obojętnym oraz zasadowym. Dla sprawdzenia wpływu zasolenia, wykonałam dodatkowo pomiar transmisyjny w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS, ang. *phosphate buffered saline*).

Badania własne i dyskusja wyników

Tabela 9 Zestawienie warunków pomiarów transmisyjnych dla wodnych roztworów polimerów referencyjnych PNIPAM oraz wyznaczone wartości LCST.

Polimer	Warunki analizy UV-Vis			LCST [°C]
	ΔT [°C]	Roztwór	pH	
PNIPAM _(DDMAT)	10 – 60	H ₂ O	7.0	30.0
PNIPAM _{(sRAFT) H2O}	10 – 60	H ₂ O	7.0	32.0
PNIPAM _{(sRAFT) pH.7.2}	10 – 60	Bufor fosforanowy	7.0	30.0
PNIPAM _{(sRAFT) PBS}	10 – 60	PBS	7.2	29.0
PNIPAM _{(sRAFT) pH 9.18}	10 – 60	Bufor boraksowy	9.18	29.0
PNIPAM _{(sRAFT) pH 1.68}	10 – 60	Bufor szczawianowy	1.68	28.5

Wyznaczone krzywe dobrze obrazują wpływ pH i obecność soli na szybkość „zwijania się” polimeru (**Rysunek 34a**). Wyznaczone z pierwszej pochodnej wartości LCST (**Rysunek 34b**) pokazują, że wysokie stężenie jonów wodorowych [H⁺] ma największy wpływ na solwatację polimeru. Dolna krytyczna temperatura rozpuszczalności dla PNIPAM_(sRAFT) w środowisku kwasowym jest prawie 4 °C niższa od wyznaczonej dla roztworu polimeru w wodzie (**Tabela 9**). Przejście z układu jednofazowego do dwufazowego w środowisku kwasowym też jest wolniejsze, a zmiana nie następuje w obrębie 1 °C, tak jak w pozostałych przypadkach. Natomiast dodatek



Rysunek 34 Krzywe turbidymetryczne (a) oraz wyznaczone wartości LCST (b) dla polimeru referencyjnego PNIPAM_(sRAFT). Pomiary wykonane w różnych warunkach pH oraz dodatku soli.

Badania własne i dyskusja wyników

soli buforowej lub NaCl powoduje, że wpływ oddziaływań elektrostatycznych w obrębie polimeru jest silniejszy niż siła solwatacji roztworu. Wynika z tego, że zawartość soli przyspiesza proces „zwijania się” polimeru PNIPAM. W przeprowadzonej wcześniej analizie chromatograficznej dążyliśmy dokładnie to takiego rezultatu, czyli uzyskania bardziej globularnej struktury polimeru, co pozwoliło polepszyć proces wykluczenia z kolumny. Dodatek soli (TBAB) znacznie polepszał ten proces, poprzez zmniejszenie interakcji z fazą stacjonarną.

Wykonano również pomiary zmiany transmitancji roztworów polimerów 2-pirydynylowych. Wodne roztwory polimerów **5a-c**, o stężeniu 1%, zostały zbadane w takich samych warunkach jak polimery referencyjne. Niestety, uzyskane krzywe nie pozwoliły na poprawne wyznaczenie krytycznej temperatury rozpuszczalności, zarówno dla LCST, jak również dla UCST.

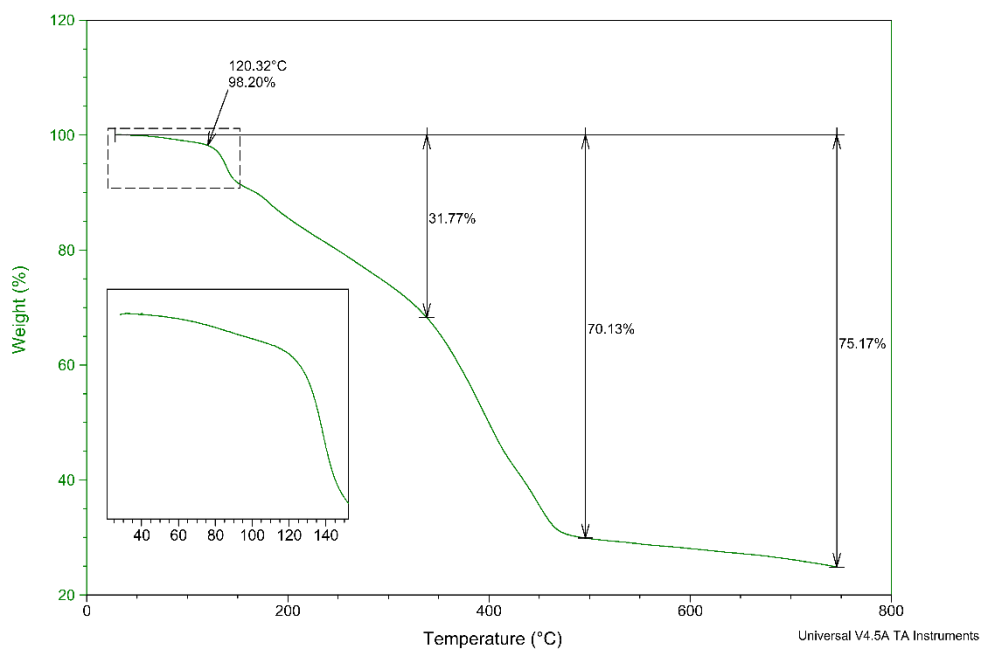
4.4 Analiza termiczna

Metody analizy termicznej mogą być wykorzystywane do zbadania procesów towarzyszącym zmianom właściwości fizycznych polimerów, zachodzących pod wpływem temperatury. Przy użyciu technik termoanalitycznych takich jak termogravimetria (TGA, ang. *thermogravimetric analysis*) oraz różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC, ang. *differential scanning calorimetry*), możemy uzyskać informacje o polimerze np. dane o temperaturze rozkładu produktu, temperaturze zeszklenia, czy przemianach fazowych w materiale. Uzyskane dane pozwalają m.in. na określenie przydatności polimeru pod kontem jego zastosowania [114].

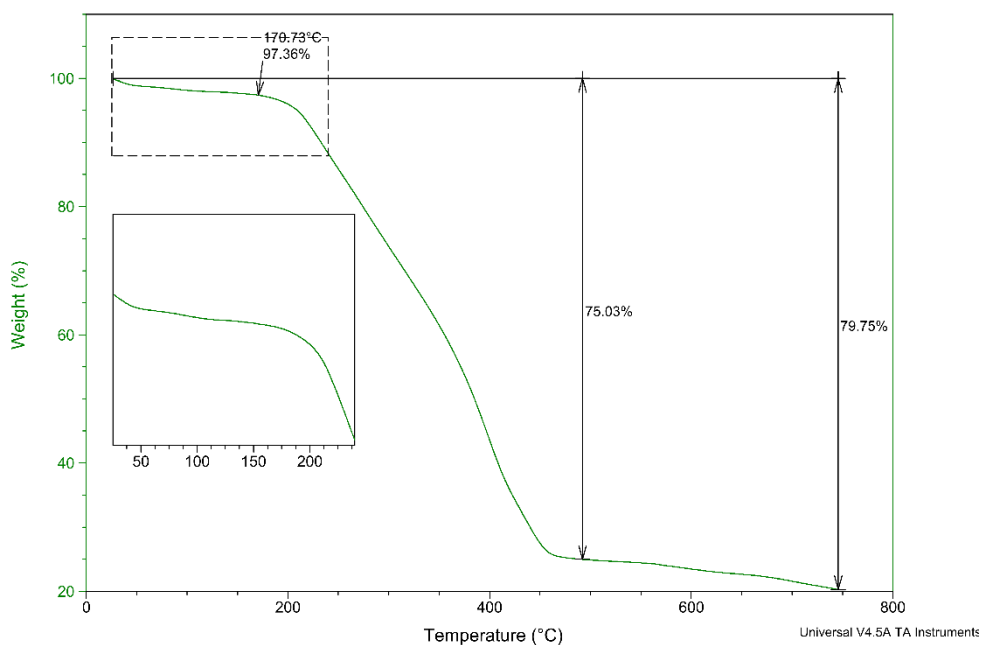
4.4.1 Pomiary TGA

Analiza TGA została wykonana dla polimerów z podstawnikiem metylowym (**5a**, **5c** oraz **8c**). Wynikiem pomiaru jest krzywa termogravimetryczna, zwana również krzywą TGA, która obrazuje zależność utraty masy próbki od temperatury. Na otrzymanych krzywych (**Rysunek 35 -Rysunek 37**) zaobserwowano charakterystyczne „stopnie”, odpowiadające ubytkowi masy polimeru podczas ogrzewania.

Badania własne i dyskusja wyników



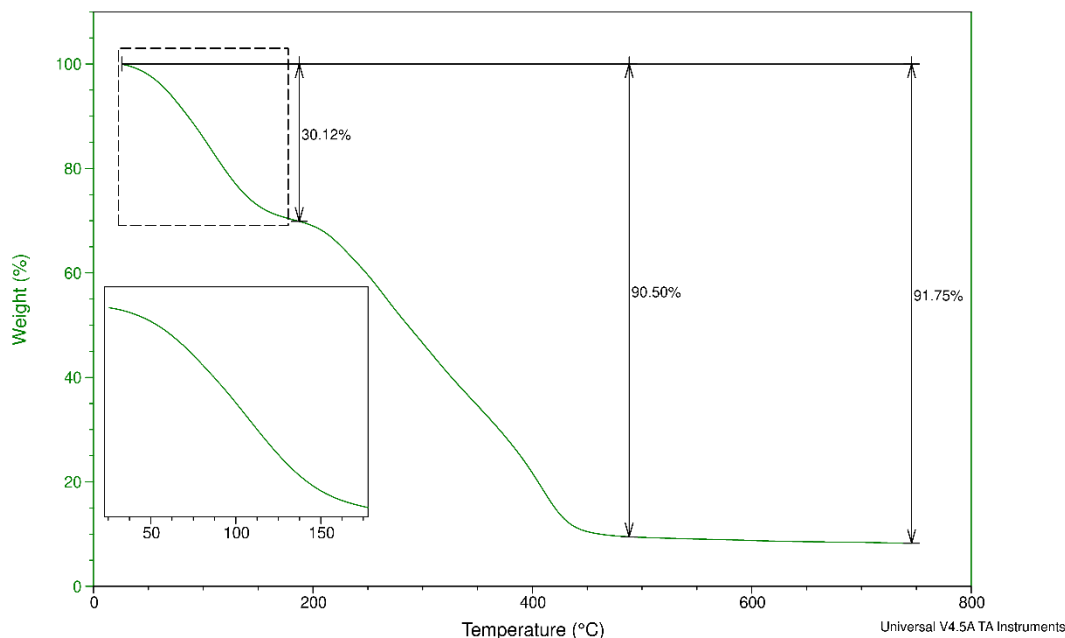
Rysunek 35 Krzywa termograwimetryczna dla polimeru 5a.



Rysunek 36 Krzywa termograwimetryczna dla polimeru 5c.

Wyniki pomiarów pozwalają stwierdzić, że stabilność termiczna polimerów 5a i 5c jest zbliżona. Krzywe TGA dla tych polimerów mają podobny przebieg, z tą różnicą, że masa polimeru

Badania własne i dyskusja wyników



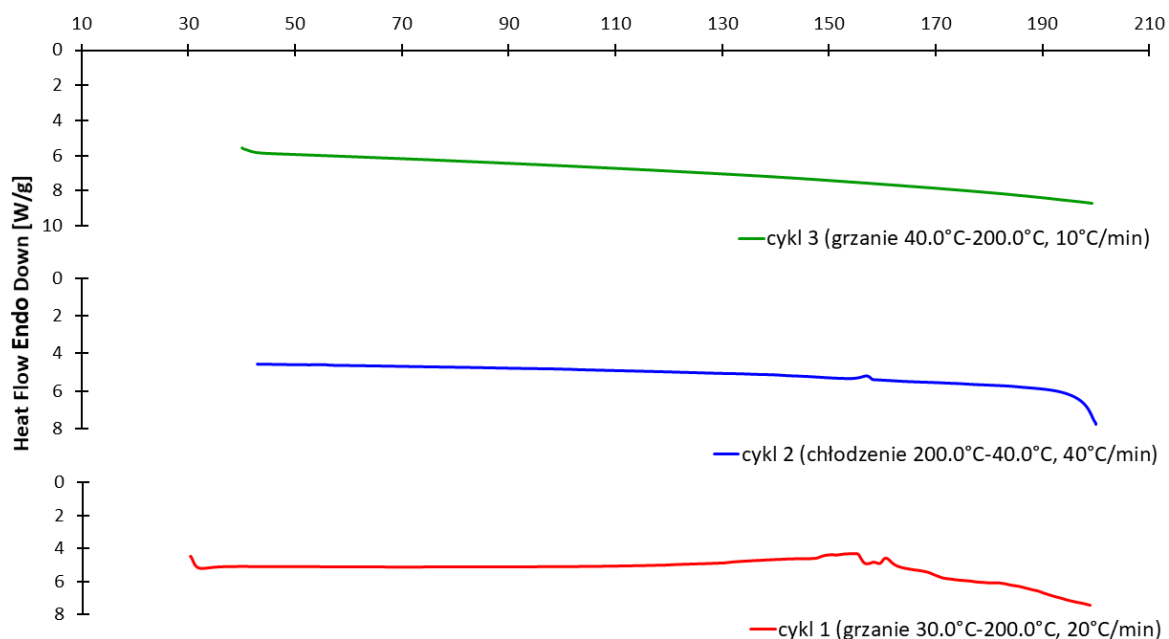
Rysunek 37 Krzywa termogravimetryczna dla polimeru **8c**.

5c pozostaje niezmienną w szerszym zakresie temperatury. Masa próbki PMPyAPA z grupą końcową uniwersalnego reagenta RAFT (**5c**) pozostaje stabilna (poniżej 3% ubytku masy) do temperatury ok. 170 °C. Powyżej tej temperatury obserwujemy liniowy spadek masy, aż do temperatury ok. 450 °C, świadczący o stopniowym rozkładzie polimeru. Po przekroczeniu temperatury 450 °C praktycznie cała próbka ulega rozkładowi (75% ubytku masy). Podobne zachowanie obserwujemy w przypadku polimeru **5a**, gdzie do temperatury ok. 120 °C obserwujemy tylko 2% ubytek masy, a następnie polimer ulega rozkładowi. Stabilność polimeru **8c**, który różni się od **5c** jedynie grupami końcowymi, okazała się dużo niższa, ponieważ już od temperatury pokojowej (RT) zauważyć można istotny spadek masy ogrzewanej próbki. Z uzyskanych danych wynika, że całkowity rozkład materiału następuje do temperatury ok. 450 °C. Wyników pomiarów termogravimetrycznych nie można bezpośrednio powiązać z wewnątrzcząsteczkową cyklizacją, dają one jednak cenne informacje o stabilności polimerów w temperaturze 90 °C, która była kluczowa w kontekście badań procesów termo-uwalniania.

Badania własne i dyskusja wyników

4.4.2 Pomiary DSC

Pomiary skaningowej kalorymetrii różnicowej zostały przeprowadzone dla polimeru **5a**, celem sprawdzenia przydatności w badaniu procesu termocyklizacji. Metoda DSC polega na pomiarze ciepła wydzielanego lub pochłanianego (entalpii (ΔH)), w trakcie zaprogramowanego wzrostu lub obniżania temperatury. Zmiana ciepła układu jest skutkiem zachodzących w polimerze reakcji egzo- lub endoenergetycznych. Wynikiem pomiaru kalorymetrycznego, jest charakterystyczna dla danej substancji krzywa DSC, przedstawiająca ilość ciepła wymienionego przez próbkę z otoczeniem, w funkcji czasu lub temperatury. Dla polimeru **5a** wykonano pomiary dla dwóch różnych programów temperaturowych. W pierwszym podejściu termogram rejestrowany był w zakresie 30 – 200 °C, natomiast w drugim próbka polimeru ogrzewana była do temperatury 90 °C, po czym schładzana do 20 °C. Metodyka pomiarów została dokładnie opisana w części eksperymentalnej (podrozdział 2.7). Otrzymane krzywe DSC dla pomiarów przedstawia **Rysunek 38** oraz **Rysunek 39**.

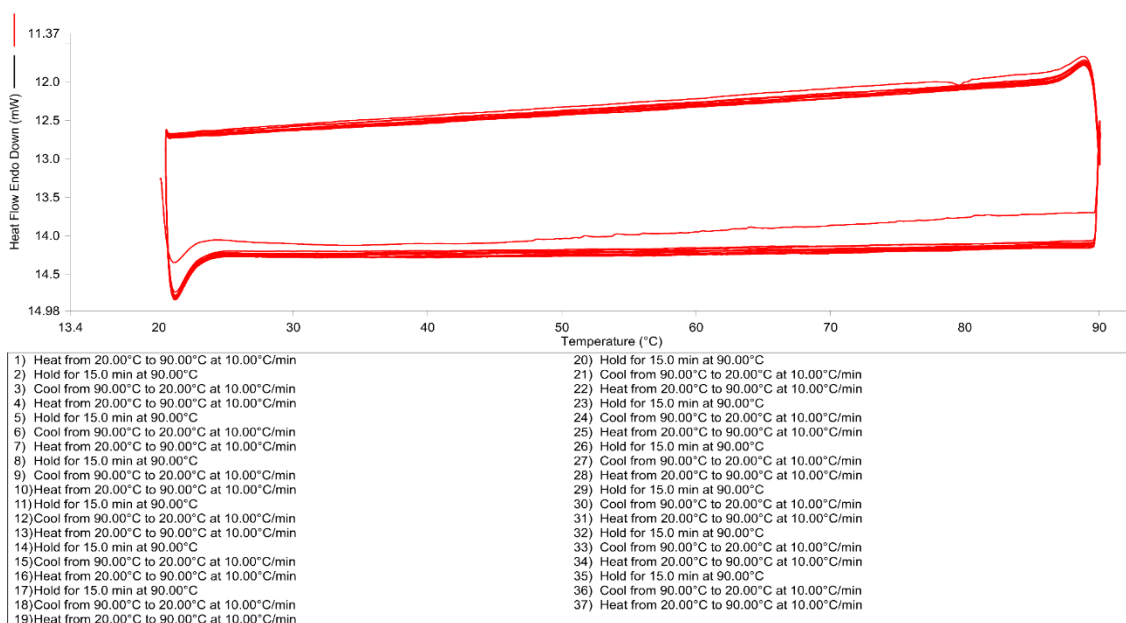


Rysunek 38 Krzywa DSC dla polimeru **5a** w zadanych warunkach pomiaru.

Badania własne i dyskusja wyników

Termogram przedstawiony na **Rysunku 38**, potwierdza wyniki z analizy TGA dla polimeru **5a**. Do temperatury 100 - 120 °C polimer ten jest stabilny i nie ulega także żadnej przemianie fazowej. Szeroka anomalia, z maksimum ok. 150 °C, związana jest z procesem dekompozycji materiału, co potwierdzają dwa kolejne cykle pomiarowe – cykl chłodzenia oraz ponowny cykl grzania. Krzywe DSC na **Rysunku 39** przedstawiają pomiar w cyklach 10 – 90 °C. Jak wyraźnie widać, w badanym zakresie temperaturowym, nie zaobserwowano żadnych anomalii cieplnych świadczących o zmianie stanu układu.

Otrzymane wyniki wskazują, że przejściu z formy liniowej łańcucha bocznego polimeru do formy cyklicznej nie towarzyszą żadne przemiany fazowe, co oznacza, że proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji nie następuje wraz ze zmianą entalpii układu.

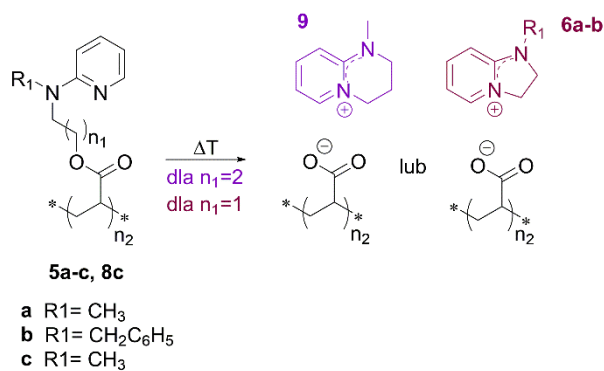


Rysunek 39 Krzywa DSC dla polimeru **5a** w zadanych warunkach pomiaru.

Badania własne i dyskusja wyników

5 Wewnętrzcząsteczkowa cyklizacja

Proces wewnętrzcząsteczkowej cyklizacji był dotychczas rozpatrywany tylko jako mechanizm usuwania termolabilnych grup ochronnych (Rozdział 5, Część I). W niniejszej pracy przedstawiono badania wewnętrzcząsteczkowej cyklizacji wspomaganej temperaturą w polimerach 2-pirydynylowych (**Schemat 15**). Proces ten jest w tym przypadku wykorzystany jako mechanizm uwalniania modelowego związku aktywnego (związku bicyklicznego). Takie związki heterocykliczne występują jako część struktury chemicznej niektórych niskocząsteczkowych leków, takich jak na przykład Zolpidem⁹. Proces formowania się związków cyklicznych (**6a-b**, **9**) z polimerów **5a-c** oraz **8c** został zbadany przy użyciu dwóch metod: spektroskopii UV-Vis oraz ¹H NMR.



Schemat 15 Ogólny schemat procesu wewnętrzcząsteczkowej cyklizacji w otrzymanych układach polimerowych.

5.1 Pomiary UV-Vis

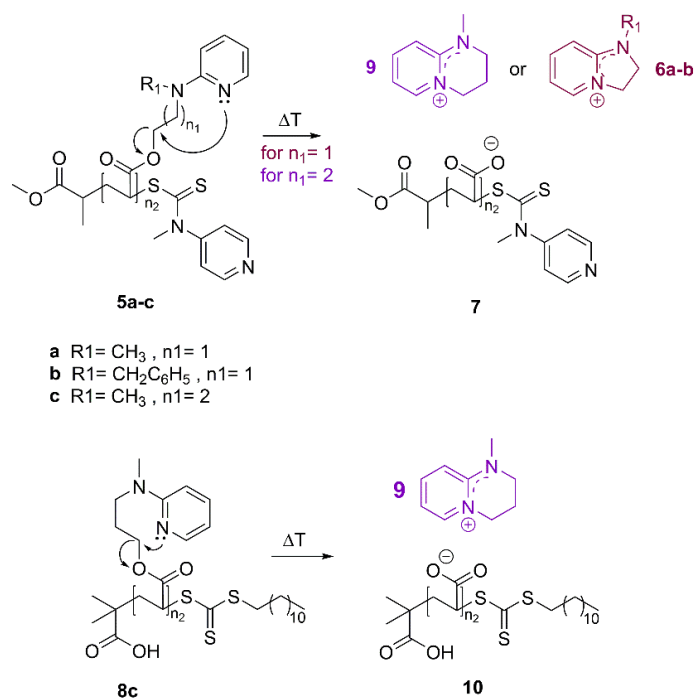
Pierwszą metodą pozwalającą na zbadanie procesu uwalniania związku cyklicznego w wyniku wewnętrzcząsteczkowej cyklizacji wspomaganej temperaturą była spektroskopia UV-Vis. Dla wszystkich badanych polimerów, przed procesem cyklizacji, zarejestrowane zostało widmo ciągłe, po czym wodne roztwory polimerów były kondycjonowane w temperaturze 90 °C, do momentu całkowitego uwolnienia związku bicyklicznego. Widmo rejestrowane było co 10

⁹ Zolpidem – lek z grupy imidazopirydyn o działaniu nasennym i uspokajającym.
[<https://go.drugbank.com/drugs/DB00425>, 16.02.2023]

Badania własne i dyskusja wyników

minut, a cykl pomiarowy był zatrzymany gdy profil krzywych nie ulegał zmianie. Zebrane widma pozwoliły na obserwację przesunięć pasm absorpcji w czasie procesu uwalniania związku modelowego.

W trakcie procesu cyklizacji, liniowa forma łańcucha bocznego homopolimeru (**5a-c** lub **8c**) ulega przekształceniu w układ jonowy, gdzie związek bicykliczny (**6a**, **6b** albo **9**) jest kationem, natomiast łańcuch główny poli(kwasu akrylowego) zostaje naładowany ujemnie (**7** albo **10**) (Schemat 16).

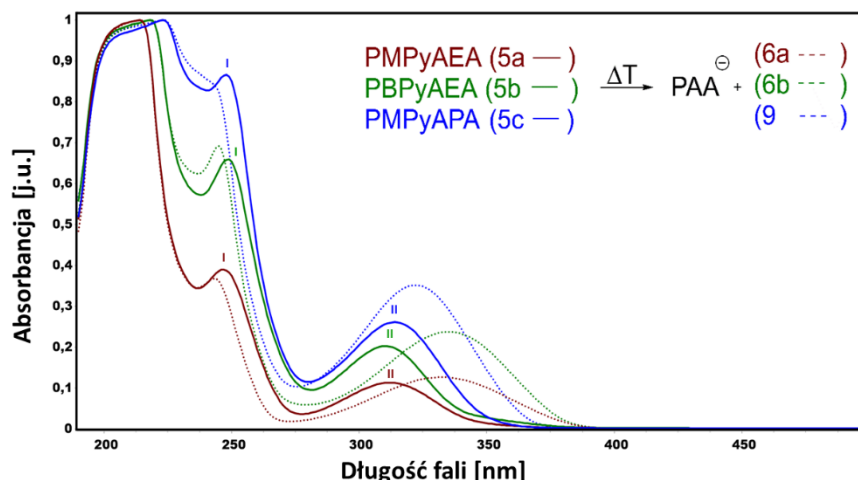


Schemat 16 Mechanizm procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w homopolimerach.

Proces uwalniania przeprowadziłam w temperaturze 90 °C, która umożliwia badanie procesu w krótszym czasie. Należy pamiętać, że wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja może zachodzić również w niższym zakresie temperatur, bardziej odpowiednim dla układów biologicznych, jednakże wtedy czas odblokowania/uwalniania jest przeważnie dłuższy. Badania uwalniania związku bicyklicznego, w różnych temperaturach było przeprowadzane wcześniej dla karboksylowych pochodnych nukleozydów [154], jednakże dla celów niniejszych badań bardziej odpowiednie było zastosowanie wyższej temperatury (90 °C).

Przed rozpoczęciem ogrzewania, na widmach UV-Vis polimerów **5a-c**, widoczne jest szerokie pasmo o średniej intensywności, przy λ_{max} 310–314 nm, które można przypisać przejściu

Badania własne i dyskusja wyników



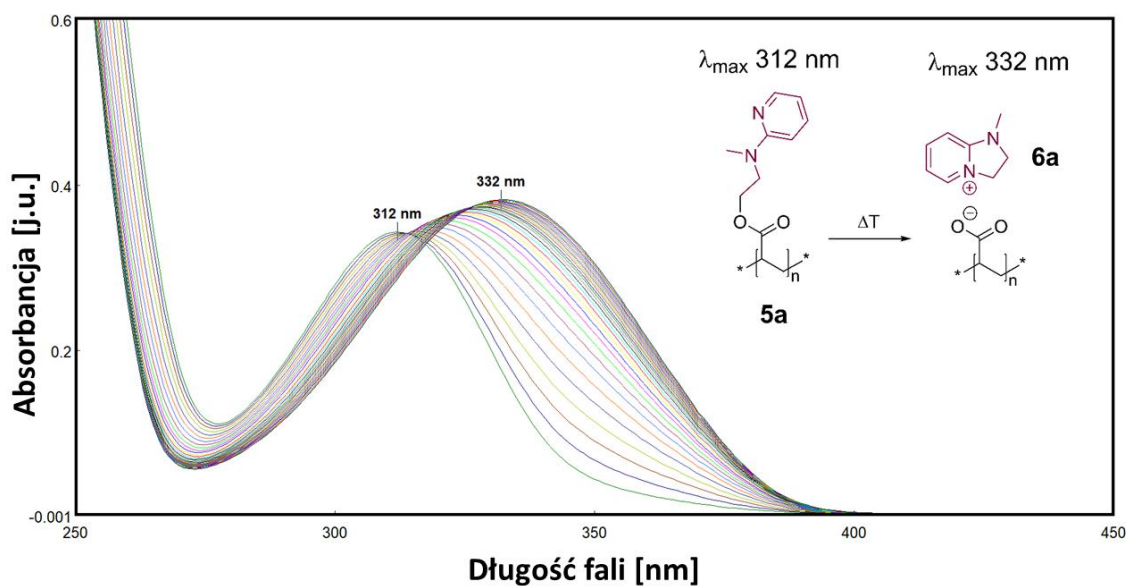
Rysunek 40 Widma UV-Vis dla początkowego i końcowego etapu cyklizacji. Linią ciągłą oznaczono profile UV-Vis przed cyklizacją, natomiast linią przerywana po cyklizacji.

$\pi - \pi^*$ części 2-pirydynylowej polimeru (pasmo II, **Rysunek 40**). Dla wszystkich badanych polimerów 2-pirydynylowych zaobserwowałam przesunięcie tego pasma w kierunku podczerwieni. Przesunięcia batochromowe¹⁰ potwierdzają, że w badanych polimerach przejście od postaci liniowej do cyklicznej jest możliwe, a zmiana profilu widma UV-Vis obrazuje proces uwalniania. Na widmach UV-Vis widoczne jest również pasmo przy λ_{max} 240-250 nm, które można przypisać przejściom wzbronionym $n - \pi^*$ układu karbonylowego (pasmo I, **Rysunek 40**) [148]. Pasma te, w wyniku procesu cyklizacji, przesuwa się w stronę fal krótszych (efekt hipsochromowy). Przyczyną tego jest rozerwanie wiązania estrowego i utworzenie związku jonowego w roztworze polimeru. Zgodnie z założeniem, czas potrzebny do pełnego uwolnienia związku cyklicznego (Δt), zależy od podstawnika pirydynowego atomu azotu oraz od długości łącznika alkilowego. Dla polimerów **5a** i **5b** zaobserwowałam przesunięcia batochromowe odpowiednio o 21 nm oraz 24 nm (**Rysunek 41**, **Rysunek 42**). Przesunięcie pasma w kierunku fal dłuższych można przypisać powstawaniu pięciocłonowych związków heterocyklicznych **6a** i **6b**.

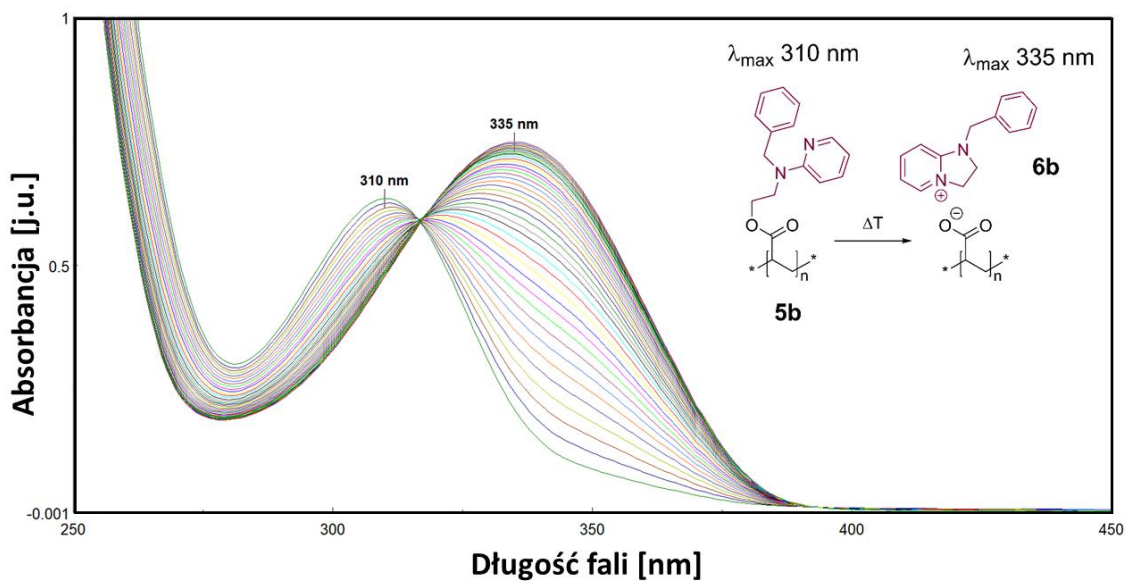
¹⁰ Efekt batochromowy - przesunięcie pasm w widmie absorpcyjnym związku organicznego w stronę fal dłuższych, tzw. pogłębienie barwy, wywołane wprowadzeniem do cząsteczki tzw. grupy batochromowej. [<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/batochromowy-efekt;3875034.html>, 04.02.2023]

Badania własne i dyskusja wyników

Przejście $\pi-\pi^*$ w tych cząsteczkach jest możliwe, ponieważ chmura elektronowa jest równomiernie rozmieszczona na obu pierścieniach heterocyklicznych, tworząc układ sprzężony.

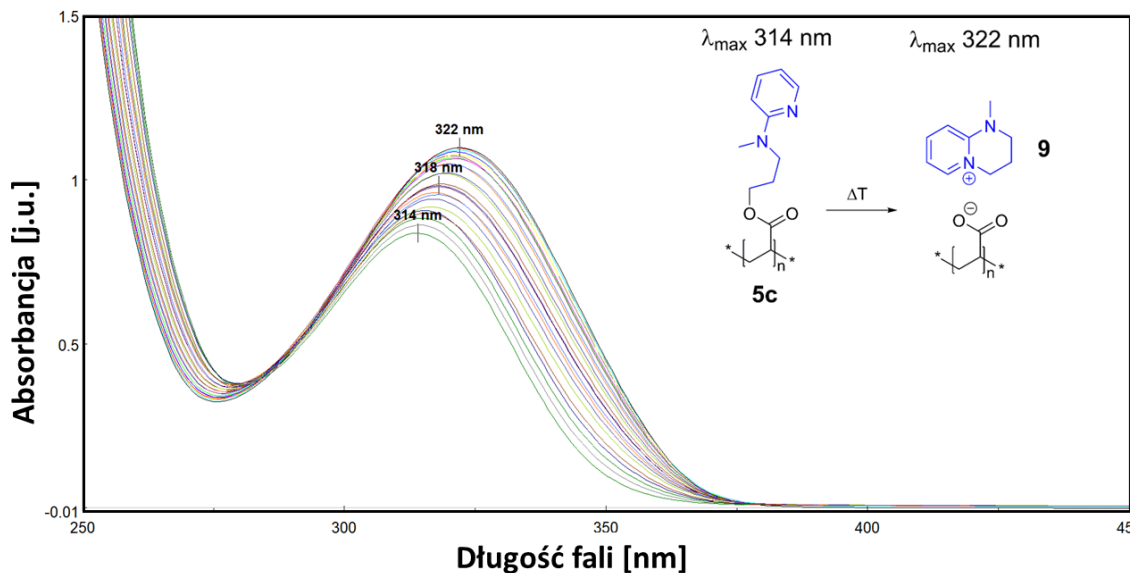


Rysunek 41 Widma UV-Vis procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla PMPyAEA (**5a**). Całkowite uwolnienie zawiązku bicyklicznego **6a** nastąpiło po 150 minutach (2.5 h). Po tym czasie nie zaobserwowano żadnych zmian na widmie ciągłym.



Rysunek 42 Widma UV-Vis procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla PBPYAEA (**5b**). Całkowite uwolnienie zawiązku bicyklicznego **6b** nastąpiło po 195 minutach (3 h 25 min.). Po tym czasie nie zaobserwowano żadnych zmian na widmie ciągłym.

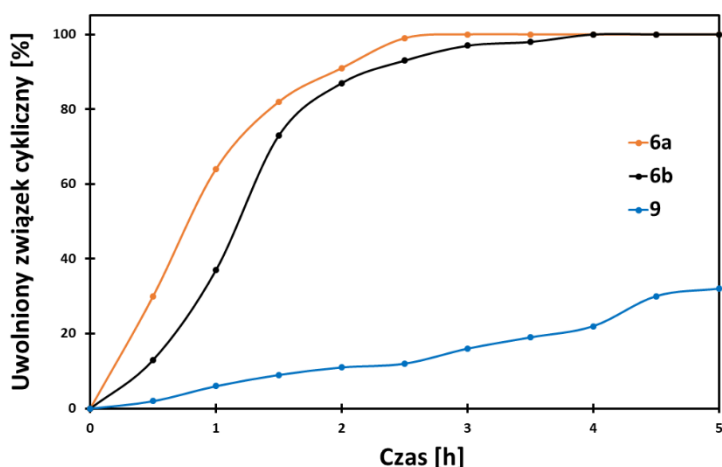
Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 43 Widma UV-Vis procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla PMPyAPA (**5c**). Całkowite uwolnienie związku bicyklicznego **9** nastąpiło po 22 h. Po tym czasie nie zaobserwowano żadnych zmian na widmie ciągłym.

Formowanie się sześciocząłowego związku bicyklicznego **9** z wodnego roztworu polimeru **5c** również spowodowało przesunięcie pasma w kierunku fal dłuższych, jednak zmiana ta jest znacznie mniejsza, około 8–10 nm (**Rysunek 43**). Ponadto, czas potrzebny do zakończenia procesu cyklizacji był znacznie dłuższy, całkowite uwolnienie związku modelowego **9** wymagało aż 22 godzin grzania, w temperaturze 90 °C. Dłuższy Δt dla bicyklicznego kationu **9** można wytłumaczyć wyższym zapotrzebowaniem energetycznym tego procesu, wymaganym do powstania sześciocząłowego związku heterocyklicznego. W przypadku, energetycznie uprzywilejowanego pięciocząłowego związku heterocyklicznego **6a**, całkowite uwolnienie przebiegło w ciągu 150 minut (2.5 h) (**Rysunek 44**). Podobny czas zaobserwowano dla całkowitego uwolnienia związku **6b**, gdzie Δt wynosi 195 minut (3 h 25 min). W czasie 5 h nastąpiło całkowite uwolnienie pięciocząłowych związków cyklicznych, natomiast sześciocząłowy związek cykliczny (**9**) został uwolniony zaledwie w 32%.

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 44 Kinetyka procesu całkowitego uwalniania modelowych związków bicyklicznych z polimerów 2-pirydynylowych w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w temperaturze 90 °C.

Pomimo różnic w czasie uwalniania związków bicyklicznych, z polimerów podstawionych grupą metylową (**5a** i **5c**) zmiana profili UV-Vis była porównywalna. W obydwu przypadkach obserwowaliśmy przesunięcie batochromowe, z równoczesnym wzrostem absorpcji czyli hiperchromizmem. Natomiast, w trakcie uwalniania związku bicyklicznego **6b** obserwowałam nieliniową zmianę absorbancji (**Rysunek 42**). Proces powstawania **6b** wydaje się przebiegać w odmienny sposób, niż w przypadku polimerów podstawionych grupą metylową. Na widmach UV-Vis, obrazujących proces cyklizacji w polimerze **5b**, obserwujemy powstanie punktu izobestycznego¹¹ przy długości fali 317.3 nm. Dla pozostałych polimerów, nie stwierdziłam powstawania miejsca przecięcia się krzywych spektrofotometrycznych w trakcie cyklizacji. Stabilny punkt izobestyczny potwierdza, że reakcja przebiega bez tworzenia się związku pośredniego, a dodatkowo w trakcie procesu powstaje równowaga chemiczna pomiędzy częścią linową a cykliczną. Ponadto, podstawnik benzyloowy powoduje większą delokalizację elektronów, a układy sprzężone osiągają niższe energie dla przejścia $\pi - \pi^*$. Przesunięcie pasma absorpcji było największe właśnie dla polimeru **5b**, z λ_{\max} przy 335 nm. Interakcje niekowalencyjne, takie jak oddziaływania warstwowe układów sprzężonych $\pi - \pi$, które są teoretycznie możliwe dla **5b**, mogą być kolejną istotną cechą pozwalającą na wykorzystanie **5b** w systemach dostarczania

¹¹ Punkt izobestyczny – punkt przecięcia wielu krzywych absorpcji przy zmianie jednego z parametrów układu będącego w równowadze. [A. Cygański, *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002, s.209]

Badania własne i dyskusja wyników

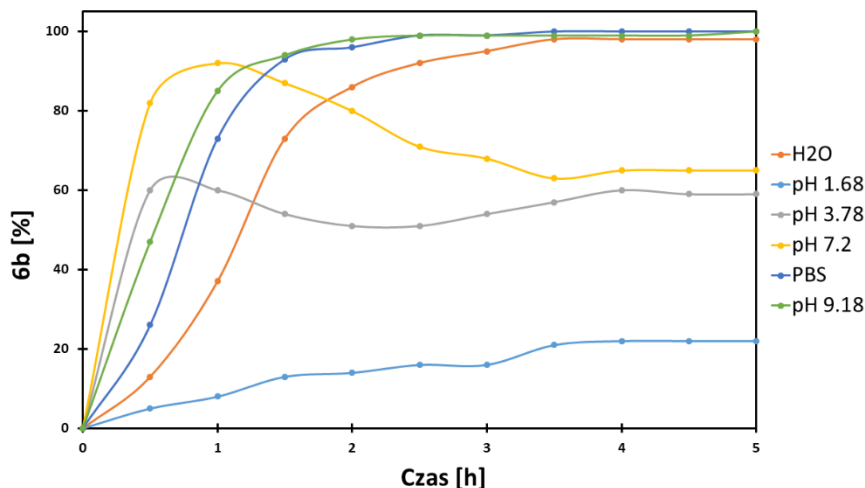
leków, opartych na materiałach polimerowych. Interakcje niekowalencyjne mogą powodować dodatkową stabilizację pomiędzy łańcuchami polimerowymi oraz zwiększać retencję leków aromatycznych, takich jak dokсорubicyna czy paklitaksel, z miceli polimerowych [155].

Kolejnym istotnym celem było zbadanie wpływu pH roztworu na proces uwalniania związku bicyklicznego **6b** oraz tworzącą się w jego trakcie równowagę chemiczną. Z tego względu postanowiłam przeprowadzić dodatkowe pomiary wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji polimeru **5b**, w zależności od pH roztworu. Polimer **5b** został zdyspergowany w kilku roztworach buforowych o stężeniu 0.1 M, co umożliwiło kontrolę pH w czasie pomiarów (**Tabela 10**). W każdym przypadku widma ciągle zbierane były co 10 minut, w czasie 5 godzin grzania, w temperaturze 90 °C. Przed procesem grzania, dla każdej próbki wykonałam pomiar widm UV-Vis w temperaturze pokojowej, na których widoczne są przesunięcia pasm absorpcji początkowej spowodowane obecnością soli buforowych. Duże przesunięcie λ_{\max} części 2-pirydynylowej, względem roztworu wodnego, obserwujemy w przypadku próbki polimeru **5b** zdyspergowanego w buforze fosforanowym, pH 7.0. W przypadku PBS, różniącym się od buforu fosforanowego tylko dodatkiem chlorku sodu i potasu, wartość początkowa λ_{\max} pozostaje praktycznie nie zmieniona. Znaczne przesunięcie pasma absorpcji obserwujemy również dla próbki polimeru przygotowanej w buforze cytrynianowym, pH 3.78, natomiast dla pozostałych roztworów buforowych nie zauważyłam przesunięć pasma dla układu 2-pirydynylowego.

Tabela 10 Zestawienie warunków pomiarów uwalniania związku cyklicznego **6b** z wodnych roztworów polimeru **5b**.

Próbka polimer 5b	Warunki analizy UV-Vis			λ początkowa [nm]
	Temperatura cyklizacji [°C]	Roztwór	pH	
5b _(pH 1.68)	90	Bufor szczawianowy	1.68	314.6
5b _(pH 3.78)	90	Bufor cytrynianowy	3.78	326.0
5b _(H₂O)	90	H ₂ O	7.0	310.2
5b _(pH 7.2)	90	Bufor fosforanowy	7.0	330.8
5b _(PBS)	90	PBS	7.2	311.6
5b _(pH 9.18)	90	Bufor boraksowy	9.18	306.0

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 45 Wpływ pH na kinetyka procesu całkowitego uwalniania związku cyklicznego **6b** z roztworu polimeru **5b** w temperaturze 90 °C.

Przeprowadzone badania wykazały, że wprowadzenie buforów do układu wpływa na szybkość uwalniania związku cyklicznego **6b** (**Rysunek 45**). Z otrzymanych widm UV-Vis wynika, że wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja jest częściowo wstrzymana w środowisku kwasowym. W trakcie pięciogodzinnego grzania polimeru **5b** zdyspergowanego w buforze szczawianowym, o pH 1.68, nastąpiło przejście zaledwie 20% formy liniowej w formę cykliczną, co spowodowane jest częściową protonacją atomu azotu pirydyny. W pH 3.78 ilość związku bicyklicznego, w tym samym czasie, jest 3 krotnie większa, mimo to całość łańcucha bocznego polimeru nie ulega cyklizacji. Proces ten w środowisku kwasowym nie przebiega z utworzeniem się punktu izozbestycznego dla pasma II, co oznacza, że w układzie nie występują różne formy spektralne układu 2-pirydylowego, o podobnej absorpcji. W środowisku obojętnym i zasadowym, część liniowa łańcucha bocznego polimeru **5b** ulega całkowitej cyklizacji. Kinetyka procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w pH 9.18 oraz w PBS, jest podobna do kinetyki procesu w czystym roztworze wodnym. Dodatkowo, proces cyklizacji przeprowadzony w tych warunkach powoduje niewielkie przesunięcie punktu izozbestycznego, w kierunku fal krótszych (**Tabela 11**).

W przypadku procesu cyklizacji skupiłam się na analizie pasma absorpcji dla części 2-pirydynylowej (pasma II). Nie można jednak zapominać, że pasmo I pochodzące od układu karbonylowego także ulega przesunięciom (**Rysunek 40**). Dla wodnego roztworu polimeru **5b** widoczne jest przesunięcie hipsochromowe pasma I przebiegające z utworzeniem punktu izozbestycznego przy 247 nm (**Tabela 11**). Podobne przesunięcia obserwowałam w buforze

Badania własne i dyskusja wyników

borakowym oraz w PBS. Efekt ten jest wynikiem równowagi chemicznej pomiędzy częścią zdysocjowaną oraz niezdisocjowaną łańcucha głównego, w trakcie cykliczacji. W przypadku pomiarów w środowisku kwasowym dla pasma I, tak samo jak dla pasma II, nie tworzą się punkty równowagi. Zastanawiające jest natomiast tworzenie się punktu izobestycznego przy przesunięciu hipsochromowym pasma I dla pomiarów cykliczacji **5b** w buforze fosforanowym, przy równoczesnym braku punktu izobestycznego dla pasma II. Wynika z tego, że obecność soli fosforanowych pozwala na utworzenie równowagi spektralnej części pochodzącej od poli(kwasu akrylowego) – pasmo I, natomiast proces formowania się związku **6b** przebiega w tych warunkach, z utworzeniem się produktów przejściowych.

Tabela 11 Punkty izobestyczne dla procesu uwalniania związku cyklicznego **6b** z roztworów polimeru **5b**.

Próbka polimer 5b	Punkt izobestyczny	
	pasmo I	pasmo II
5b _(pH 1.68)	-	-
5b _(pH 3.78)	-	-
5b _(H₂O)	247.0	317.3
5b _(pH 7.2)	253.5	-
5b _(PBS)	251.0	314.5
5b _(pH 9.18)	250.8	315.8

W celu potwierdzenia struktury związków cyklicznych zostały one, po zakończeniu procesu cykliczacji, wyizolowane z wodnych roztworów polimerów. W tym celu ujemnie naładowany łańcuch poli(kwasu akrylowego) musiał być wymieniony na inny niskocząsteczkowy anion, aby sole związków cyklicznych mogły być oczyszczone. Dokładna procedura izolacji wszystkich związków cyklicznych została umieszczona w Części Eksperymentalnej (podrozdział 2.10). Struktury związków cyklicznych zostały potwierdzone za pomocą widm ¹H NMR oraz ¹³C NMR.

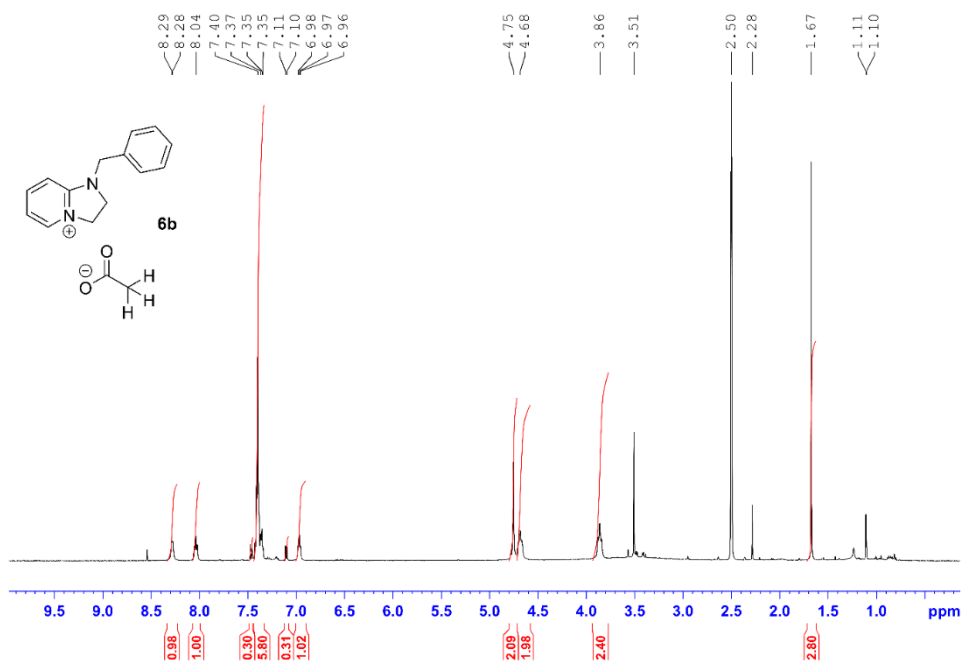
5.2 Pomiary ¹H-NMR

Kolejną metodą, wykorzystaną do monitorowania procesu uwalniania związków bicyklicznych, była spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego. Przy jej użyciu wykonywano dwa rodzaje eksperymentów. Pierwszym, była analiza widm protonowych NMR, w trakcie ogrzewania polimeru, rozpuszczonego w rozpuszczalniku deuterowanym. Drugi

Badania własne i dyskusja wyników

eksperyment miał na celu sprawdzenie, czy cyklizacja może przebiegać w ciele stałym bez udziału rozpuszczalnika. W obydwu przypadkach proces prowadzony był w temperaturze 90 °C.

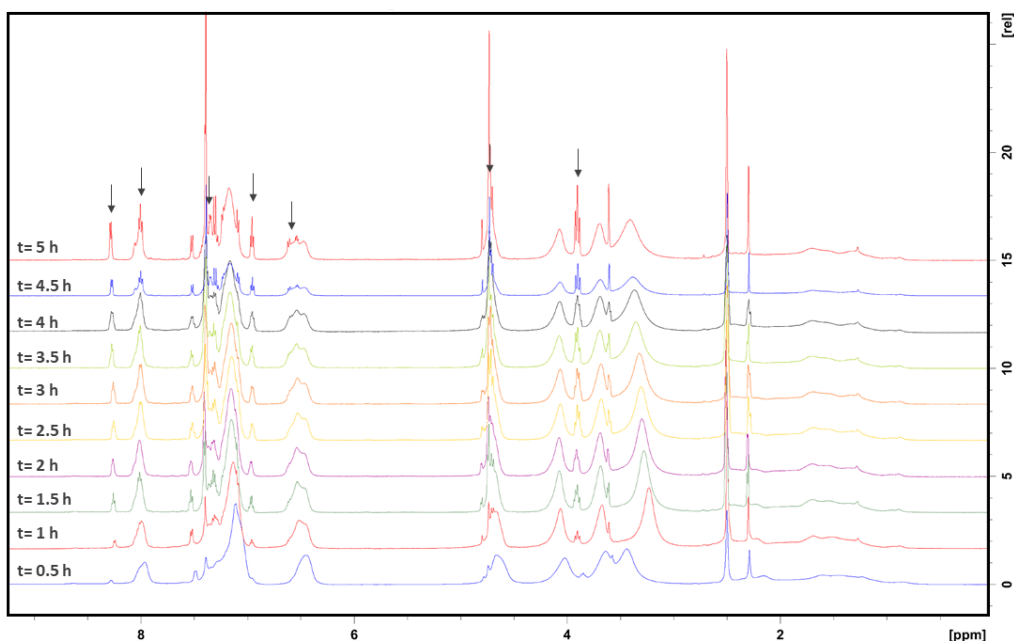
W pierwszym eksperymencie zmierzyłam widmo referencyjne w temperaturze 25 °C, dla próbki polimeru **5b** rozpuszczonej w DMSO-d₆. Na zarejestrowanym widmie nie obserwowałam sygnałów odpowiadających protonom związku cyklicznego **6b**. Do identyfikacji sygnałów, pomocne było widmo ¹H NMR czystej, wyizolowanej soli związku **6b** (**Rysunek 46**). Temperatura pomiaru na spektrometrze (90 °C) została ustalona po 30 minutach, a na widmie pojawiły się słabe sygnały od związku bicyklicznego, co świadczy o tym że proces cyklizacji już się rozpoczął (**Rysunek 47**). Widma ¹H NMR zbierane w odstępach 10-minutowych przez 5 godzin, pokazują wzrost intensywności sygnałów charakterystycznych dla protonów związku cyklicznego. W trakcie pięciogodzinnego grzania próbki nie nastąpiło jednak całkowite przekształcenie formy linowej polimeru w formę cykliczną. Dla porównania proces cyklizacji polimeru **5b** w wodzie przebiegał z całkowitym uwolnieniem związku bicyklicznego już po 3.5 h. Zakładam, że różnice w szybkości tworzenia się związku cyklicznego **6b** spowodowane są właściwościami użytego rozpuszczalnika,



Rysunek 46 Widmo ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) wyizolowanego związku cyklicznego **6b**.

Badania własne i dyskusja wyników

więc użycie aprotycznego, bezwodnego rozpuszczalnika, jakim jest DMSO, nie sprzyja procesowi wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.



Rysunek 47 Widma ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) przedstawiające kinetykę procesu uwalniania związku cyklicznego **6b** z roztworu polimeru **5b** w temperaturze 90°C . Strzałkami zaznaczone są sygnały protonów związku bicyklicznego.

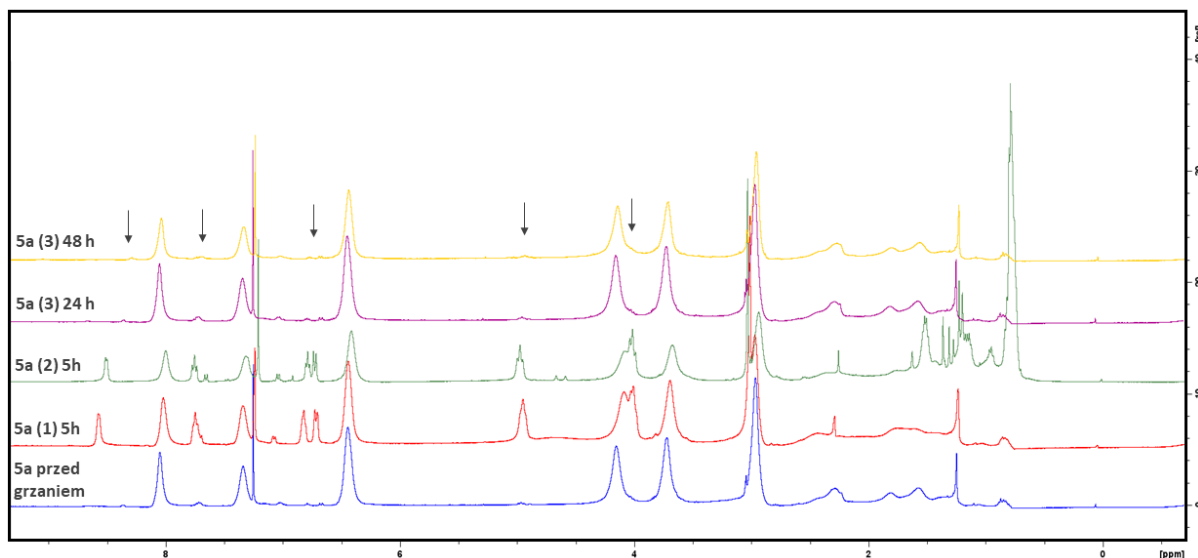
W drugim przypadku technika NMR służyła do identyfikacji i oceny procesu cyklizacji próbek stałych polimerów 2-pirydynylowych. Próbki stałe polimeru z podstawnikiem metylowym (**5a**, **5c**) były grzane (90°C) w termomikserze przez 5 godzin. Następnie, proces był zatrzymywany przez gwałtowne wychłodzenie polimeru, umieszczając go w ciekłym azocie. Próbki do pomiarów widma protonowego przygotowane były w deuterowanym chloroformie (CDCl_3). Równocześnie dla każdego polimeru przygotowano dwie próbki odniesienia w rozpuszczalniku deuterowanym, z czego jedna była ogrzewana w 90°C , a druga pozostawiona w temperaturze pokojowej (25°C) na 48 h (**Tabela 12**). Dla tak przygotowanych próbek polimerów zostały wykonane widma protonowe, co pokazano na rysunkach poniżej (**Rysunek 48**, **Rysunek 49**).

Badania własne i dyskusja wyników

Tabela 12 Warunki przygotowania próbek polimerów **5a** i **5c** do pomiarów wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w ciele stałym.

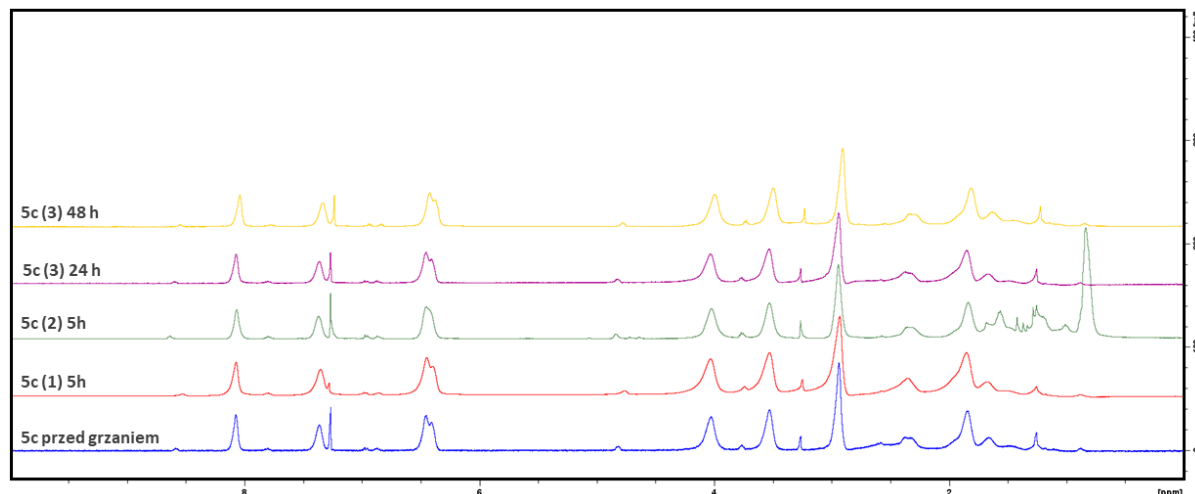
Warunki	5a			5c		
	(1) ciało stałe	(2) CDCl ₃	(3) CDCl ₃	(1) ciało stałe	(2) CDCl ₃	(3) CDCl ₃
temperatura grzania	90 °C	90 °C	25 °C	90 °C	90 °C	25 °C
rozpuszczalnik deuterowany	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃
1H NMR po czasie	5 h	5 h	24 h 48 h	5 h	5 h	24 h 48 h

Na podstawie widm otrzymanych dla polimeru **5a** nie można jednoznacznie stwierdzić, czy cyklizacja w ciele stałym jest możliwa. Wprawdzie na widmie próbki 5a (1), po 5 h widoczne są charakterystyczne sygnały dla związku cyklicznego **6a**, co można uznać jako potwierdzenie procesu cyklizacji, ale jednocześnie proces ten może zachodzić dopiero od momentu dodania rozpuszczalnika. Uwzględniając przebieg krzywej uwalniania związku **6a** (**Rysunek 44**), można stwierdzić, że proces cyklizacji w pierwszych 15 minutach przebiega szybko (około 16% związku cyklicznego w układzie). Aby udowodnić jednoznacznie, że proces cyklizacji w ciele stałym dla polimeru **5a** jest możliwy należałoby przeprowadzić pomiary NMR ciała stałego, co jest ciekawym zagadnieniem na dalsze badania wykraczające poza niniejszą pracę. W przypadku próbek



Rysunek 48 Widma ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) przedstawiające kinetykę procesu uwalniania związku cyklicznego **6a** z polimeru **5a**. Oznaczenia próbek są zgodnie z **Tabelą 12**. Strzałkami zaznaczone są charakterystyczne sygnały protonów związku bicyklicznego.

Badania własne i dyskusja wyników



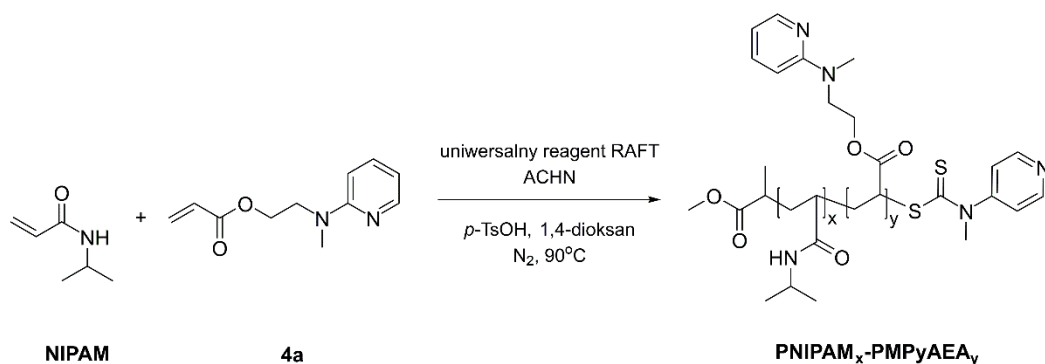
Rysunek 49 Widma ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) przedstawiające kinetykę procesu uwalniania związku cyklicznego **9** z polimeru **5c**. Oznaczenia próbek są zgodnie z **Tabelą 12**.

ogrzewanej w deuterowanym chloroformie, po 5 h eksperymentu pozostało ponad 50% formy linowej polimeru **5a** (próbka 5a (3)), natomiast w warunkach wodnych, w tym czasie, nastąpiło całkowite uwolnienie **6a**. Świadczy to, o tym że woda odgrywa w procesie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji istotną rolę, co potwierdzają otrzymane widma. Równie ważnym czynnikiem jest także temperatura procesu, co wyraźnie widać na widmach polimeru **5a**, pozostawionego w temperaturze pokojowej (próbka 5a(3)), gdzie proces cyklizacji zachodzi bardzo wolno.

Analiza widm protonowych, dla serii próbek polimeru **5c** (**Rysunek 49**) potwierdza dotychczasowe wnioski wyciągnięte z pomiarów UV-Vis. Obecność wody sprzyja procesowi wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, a tym samym uwolnieniu związku bicyklicznego. Natomiast w CDCl₃, po 5 h grzania, nie widzimy zmian na widmie protonowym, gdzie w tym samym czasie w roztworze wodnym, w formę cykliczną przeszło 32% polimeru **5c**. Na żadnym z zarejestrowanych widm protonowych dla polimeru **5c** nie zaobserwowałam sygnałów charakterystycznych dla związku cyklicznego **9**.

6 Otrzymywanie kopolimerów responsywnych - PNIPAM-co-PMPyAEA

Kolejnym etapem prac badawczych opisanych w niniejszej dysertacji, było uzyskanie polimerów dla których omawiana nieodwracalna termo-responsywność występuje wraz z innymi właściwościami responsywnymi. W tym celu postanowiłam zsyntezować kopolimery statystyczne PNIPAM-co-PMPyAEA, w których głównym monomerem jest NIPAM, tworzący polimer z odwracalną wrażliwością na temperaturę (PNIPAM). Drugą powtarzającą się jednostką jest MPyAEA (**4a**), monomer z układem 2-pirydynylowym, który łatwo ulega nieodwracalnej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji (**Schemat 17**). Bazując na wcześniejszych reakcjach homopolimeryzacji polimerów PNIPAM i PMPyAEA (**5a**), uzyskałam serię kopolimerów PNIPAM-co-PMPyAEA różniących się zawartością jednostek ulegających cyklizacji (**Tabela 13**). Do reakcji kopolimeryzacji techniką RAFT użyłam sprawdzonych i zoptymalizowanych, w poprzednich etapach odczynników m.in. ACHN (inicjator reakcji) oraz uniwersalny reagent RAFT jako czynnik przeniesienia łańcucha. Temperatura oraz środowisko reakcji były analogiczne jak w syntezie homopolimerów, a monomery były wprowadzone do procesu równocześnie jako mieszanina.



Schemat 17 Ogólny schemat kopolimeryzacji PNIPAM_x-PMPyAEA_y przy użyciu uniwersalnego reagenta RAFT i ACHN jako inicjatora.

Badania własne i dyskusja wyników

Tabela 13 Warunki polimeryzacji RAFT kopolimerów PNIPAM_x – PMPyAEAy.

Symbol reakcji	Kopolimer	%NIPAM	%MPyAEA	[M] ^{a)} /[RAFT]/[I]	[H ⁺]	M _n , teoretyczna ^{b)} [g/mol]
16.0	PNIPAM _{0.93} – PMPyAEA _{0.07}	93	7	[150]/[3]/[1]	20	6 200
16.1	PNIPAM _{0.80} – PMPyAEA _{0.20}	80	20		50	6 600
16.3	PNIPAM _{0.93} – PMPyAEA _{0.07}	93	7	[300]/[2]/[1]	33	18 300
16.6	PNIPAM _{0.60} – PMPyAEA _{0.40}	60	40		183	20 200
^{a)} [M]=[NIPAM]+[MPyAEA] ^{b)} teoretyczna masa molowa wyliczona z równania (10)						

W trakcie syntez PNIPAM_x-PMPyAEAy, tak jak w przypadku homopolimeryzacji, nukleofilowość atomu azotu w monomerze **4a** była czasowo blokowana, poprzez protonację mocnym kwasem organicznym (*p*-TsOH). Ilość potrzebnego kwasu została wyznaczona z równania (9), gdzie ilość moli monomeru odnosi się tylko do związku 2-pirydynylowego. Kopolimery syntezowane były w mieszaninach monomerów o zdefiniowanym składzie, co pozwoliło na określenie docelowego zakresu mas molowych. Teoretyczna masa molowa kopolimerów, przy założeniu 100% konwersji każdego monomeru, została wyznaczona z równania poniżej.

$$M_{n,teoretyczna} = \left(\frac{[NIPAM] \times M_{NIPAM}}{[sRAFT]} + \frac{[MPyAEA] \times M_{MPyAEA}}{[sRAFT]} \right) \times \frac{Konwersja}{100\%} + M_{sRAFT} \quad (10)$$

Zestawienie warunków reakcji kopolimeryzacji oraz stosunki molowe substratów przedstawia (**Tabela 14**). Postęp reakcji monitorowany był przy pomocy spektroskopii ¹H NMR, a po uzyskaniu zadowalającego przereagowania obydwu jednostek monomerów (> 65%), mieszanina reakcyjna była wymrażana w ciekłym azocie. W celu uzyskania wysokiej konwersji synteza kopolimerów PNIPAM_x-PMPyAEAy została wydłużona do 20 h, względem homopolimeryzacji. Ze względu na fakt, że monomer **4a** ma większą masę molową niż NIPAM i jest większy objętościowo, zaobserwowałam że całkowita konwersja monomerów maleje ze wzrostem zawartością jednostek 2-pirydynylowych. Natomiast zmniejszenie ilości czynnika wzrostu łańcucha nie wpłynęło na konwersję monomerów, ani na czas reakcji.

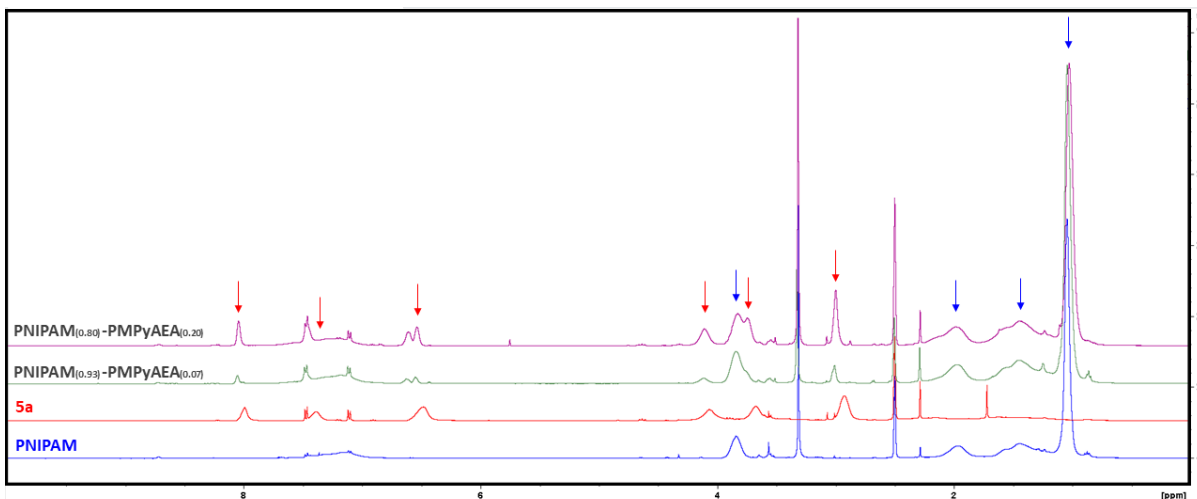
Tabela 14 Warunki reakcji kopolimeryzacji

Symbol reakcji	Monomery [mol]		sRAFT [mol]	ACHN [mol]	<i>p</i> -TsOH [mol]	Czas [h]	Konwersja [%]
	NIPAM	MpYAEA					
16.0	3.4×10^{-3}	2.0×10^{-4}	7.0×10^{-5}	2.4×10^{-5}	4.7×10^{-4}	20	85
16.1	1.0×10^{-3}	2.0×10^{-4}	2.0×10^{-5}	0.8×10^{-5}	4.0×10^{-4}	20	70
16.3	6.8×10^{-3}	5.0×10^{-4}	5.0×10^{-5}	2.4×10^{-5}	8.0×10^{-4}	20	86
16.6	5.3×10^{-3}	3.5×10^{-3}	7.0×10^{-5}	3.5×10^{-5} </tr			

Wstępne oczyszczanie kopolimeru polegało na zneutralizowaniu użytego kwasu *p*-TsOH, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu. Po odfiltrowaniu powstałego osadu, produkt został wytrącony z zimnego eteru dietylowego, a następnie suszony pod próżnią przez 24 h. Wszystkie uzyskane kopolimery mają postać ciał stałych, o lekko różowym zabarwieniu.

7 Charakterystyka fizykochemiczna PNIPAM-co-PMPyAEA

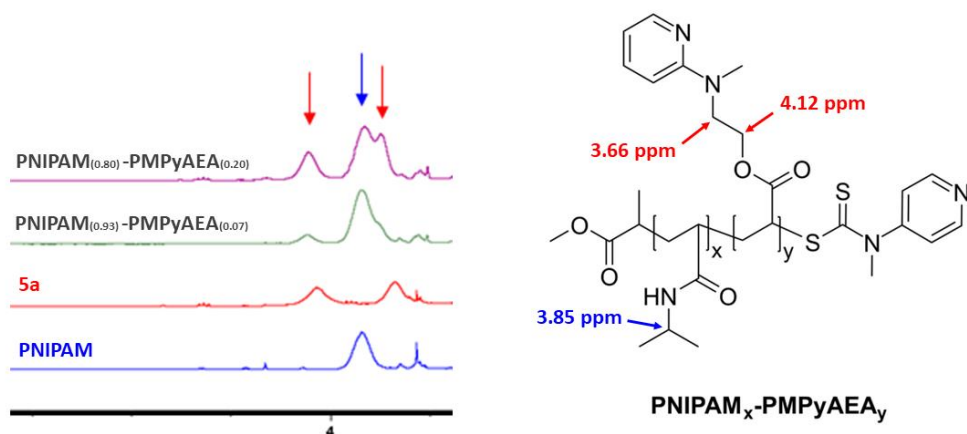
Struktura chemiczna otrzymanych kopolimerów została potwierdzona przy użyciu spektroskopii ^1H NMR. Widma protonowe kopolimerów zostały porównane i zestawione z widmami protonowymi homopolimerów PNIPAM oraz PMPyAEA (**5a**) (**Rysunek 50**). Utrudnieniem przy ustaleniu struktury, dla kopolimerów zawierających niewielką ilość jednostek 2-pirydynylowych, może być ekranowanie sygnału pochodzącego od protonów łańcucha



Rysunek 50 Zestawienie widm ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) homopolimerów (PNIPAM, **5a**) oraz kopolimerów PNIPAM $_x$ -PMPyAEA $_y$ (produkty reakcji 16.0, 16.1). Czerwonymi strzałkami oznaczone są sygnały charakterystyczne dla polimeru **5a**, natomiast niebieskimi strzałkami dla polimeru PNIPAM.

Badania własne i dyskusja wyników

alifatycznego trzeciorzędowej aminy, w jednostkach **5a** (δ 3.66 ppm, 2H) przez sygnał pochodzący od jednego z protonów izopropylu, w jednostkach pochodzących od *N*-izopropylakrylamidu (δ 3.85 ppm, 1H) (**Rysunek 51**). Jednakże, obecność kolejnego sygnału od łącznika alifatycznego (δ 4.12 ppm, 2H), umożliwia identyfikację i wyznaczenie stosunku molowego poszczególnych segmentów w kopolimerze.



Rysunek 51 Fragment widma ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) przedstawiający efekt ekranowania protonów o zbliżonych przesunięciach chemicznych.

Średnie masy molowe dla otrzymanych kopolimerów zostały wyznaczone dwoma metodami, metodą grup końcowych oraz przy użyciu chromatografii wykluczenia. Dodatkowo, otrzymane wartości zostały porównane z teoretycznie wyliczonymi masami kopolimerów (**Tabela 15**).

Tabela 15 Zestawienie mas molowych kopolimerów $\text{PNIPAM}_x - \text{PMPyAEA}_y$.

Symbol reakcji	Kopolimery	M_n , teoretyczna ^{a)} [g/mol]	M_n , NMR ^{b)} [g/mol]	M_w , GPC/SEC ^{c)} [g/mol]	M_n , GPC/SEC ^{d)} [g/mol]	\mathcal{D} ^{e)}
16.0	$\text{PNIPAM}_{0.93} - \text{PMPyAEA}_{0.07}$	6 200	4 200	10 700	9 200	1.16
16.1	$\text{PNIPAM}_{0.80} - \text{PMPyAEA}_{0.20}$	6 600	4 500	12 200	10 200	1.19
16.3	$\text{PNIPAM}_{0.93} - \text{PMPyAEA}_{0.07}$	18 300	11 600	21 100	18 200	1.16
16.6	$\text{PNIPAM}_{0.60} - \text{PMPyAEA}_{0.40}$	20 200	9 000	15 400	12 900	1.20

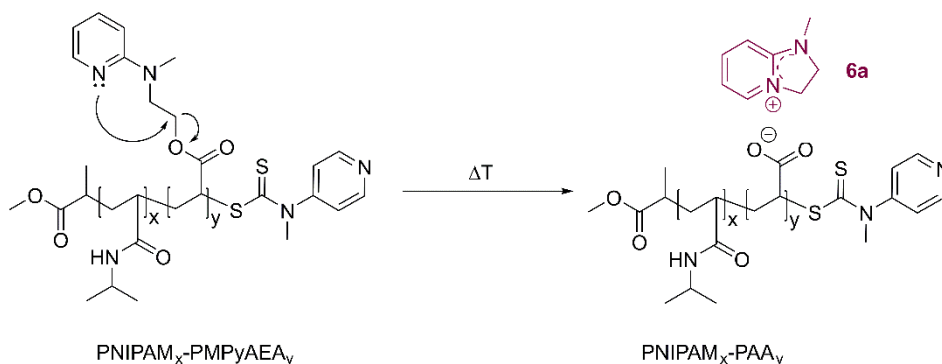
^{a)} teoretyczna masa molowa wyliczona z równania (10)
^{b)} masa molowa wyznaczona metoda grup końcowych
^{c)} wagowo średnie masy molowe
^{d)} liczbowo średnie masy molowe
^{e)} polidispersyjność wyliczona na podstawie analizy chromatograficznej

Badania własne i dyskusja wyników

Dla kopolimerów, które mają krótsze łańcuchy główne, masy molowe wyznaczone z pomiarów ^1H NMR są zbliżone do teoretycznych oraz są obarczone mniejszym błędem. Integracja sygnałów pochodzących od grup końcowych kopolimerów o wyższych masach (dłuższych łańcuchach), była znacznie trudniejsza. Dlatego też, $M_{n, \text{NMR}}$ dla produktów reakcji 16.3 oraz 16.6 znacznie różnią się od mas teoretycznych, pomimo że konwersja w tych syntezach była wysoka. W przypadku średnich mas molowych obydwu serii zakresów M_n kopolimerów $\text{PNIPAM}_x\text{-PMPyAEA}_y$ wartości wyznaczone chromatograficznie obarczone są podobnym błędem. Analizy GPC/SEC pokazują, że zarówno kopolimery o niższych masach (około 6 000 g/mol), jak i te o wyższych masach (około 20 000 g/mol), mają lokalizację, w tym samym wycinku krzywej kalibracyjnej (**Rysunek 58**, podrozdział 2.6, Część IV). Dzieje się tak ponieważ całkowity zakres sporządzonej krzywej kalibracyjnej, dla użytych kolumn jest bardzo szeroki. Analiza GPC/SEC była przeprowadzona w warunkach zoptymalizowanych dla homopolimerów PNIPAM, dlatego też piki rozrzutu mas molowych kopolimerów, mających w strukturze mniej jednostek 2-pirydynylowych, są bardziej symetryczne. Ma to swoje odzwierciedlenie w niewielkiej różnicy pomiędzy wartością wagowo średniej i liczbowo średniej masy molowej. Niezależnie od założonej masy, polidispersyjność dla kopolimerów $\text{PNIPAM}_{0.93} - \text{PMPyAEA}_{0.07}$ jest niska. Dodatkowo, jest ona zbliżona do wartości polidispersyjności dla homopolimeru PNIPAM. Ze wzrostem zawartości jednostek 2-pirydynylowych zauważyłam większą rozbieżność pomiędzy $M_{w, \text{GPC/SEC}}$ a $M_{n, \text{GPC/SEC}}$. Wartości \bar{D} dla $\text{PNIPAM}_{0.80}\text{-PMPyAEA}_{0.20}$ oraz $\text{PNIPAM}_{0.60}\text{-PMPyAEA}_{0.40}$ są większe, co potwierdza spostrzeżenia z analizy **5a-b** oraz **8c**. Wynika z tego, że polimery 2-pirydynylowe i PNIPAM różnią się promieniami hydrodynamicznymi, stąd analiza GPC/SEC w oparciu o kalibrację pojedynczej masy molowej nie pozwoli na bardzo dokładne określenie masy kopolimerów. Promień hydrodynamiczny kopolimeru będzie zależał od lokalnego składu i ułożenie poszczególnych jednostek w makrocząsteczce [156]. Najlepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie instrumentu GPC/SEC zawierającego kilka detektorów, w tym lepkościomierz, co pozwoliłoby na analizę masy kopolimerów o wyższej zawartości jednostek 2-pirydynylowych. Aby obydwie jednostki kopolimeru byłyby wkluczane z podobną efektywnością, proces optymalizacji musi być przeprowadzony ponownie, co wykracza poza zakres niniejszej pracy.

Badania własne i dyskusja wyników

8 Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja w kopolimerach



Schemat 18 Mechanizm procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w kopolimerach PNIPAM_x-PMPyAEA_y.

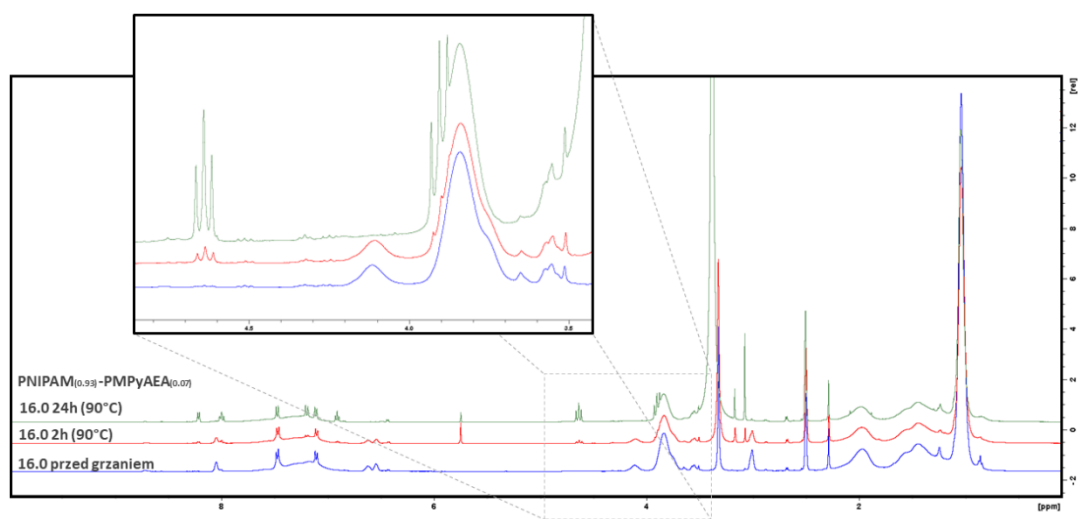
Proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla homopolimeru **5a** przebiegał z całkowitym uwolnieniem związku bicyklicznego **6a**, w trakcie 2.5 h (**Rysunek 44**). Cyklizacja w układach kopolimerowych powinna przebiegać według tego samego mechanizmu (**Schemat 18**), jednakże czas całkowitego uwolnienia **6a**, z tych układów będzie zależny od otoczenia jednostki 2-pirydynylowej i prawdopodobnie będzie się różnił od wyznaczonego dla homopolimerów. Ilość jednostek ulegających cyklizacji w PNIPAM_x-PMPyAEA_y jest znacznie mniejsza niż w **5a**, co by wskazywało, że proces przebiegnie szybciej. Obecność segmentów PNIPAM może teoretycznie spowalniać proces, dlatego wartość całkowitego uwolnienia musi być wyznaczona doświadczalnie. Przeprowadziła zatem badania procesu uwalniania dla kopolimerów, o niższym zakresie mas (produkty reakcji 16.0 oraz 16.1).

8.1 Pomiary ¹H-NMR

Badania postępu uwalniania **6a**, rozpoczęłam od oceny widm ¹H NMR, kopolimerów PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07} oraz PNIPAM_{0.80}-PMPyAEA_{0.20} rozpuszczonych w deuterowanym DMSO oraz ogrzewanych w temperaturze 90 °C. Widma były rejestrowane po 2 h oraz po 24 h, od rozpoczęcia ogrzewania (**Rysunek 52**, **Rysunek 53**), co pozwoliło na obliczenie stopnia uwolnienia związku bicyklicznego **6a**. Na widmach ¹H NMR obserwujemy zmniejszanie się sygnałów charakterystycznych dla protonów formy liniowej łańcucha bocznego (δ 4.12 ppm oraz 3.66 ppm), przy równoczesnym wzroście sygnałów odpowiadających protonom w pierścieniu

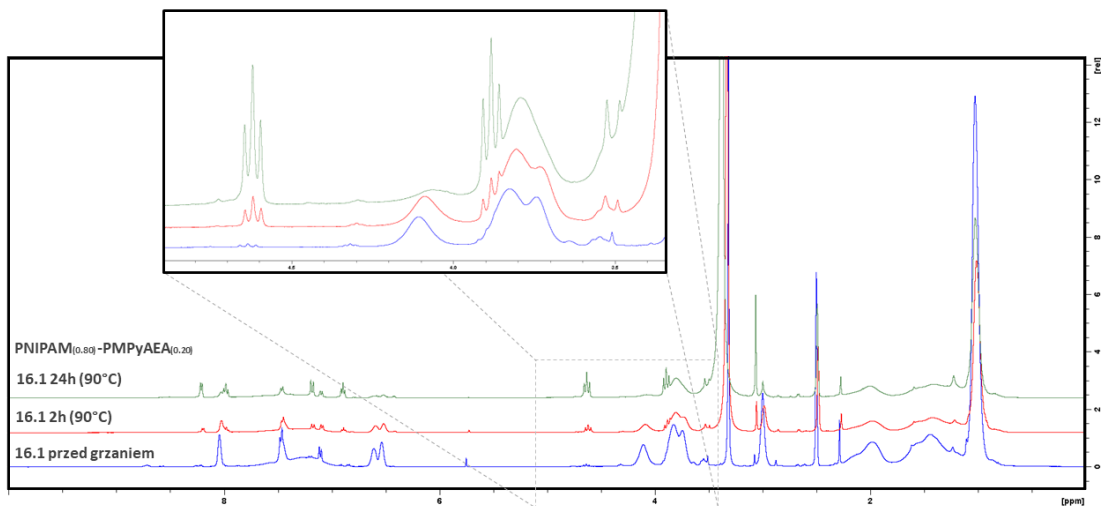
Badania własne i dyskusja wyników

heterocyklicznym **6a** (δ 4.62 ppm (t) oraz 3.86 ppm(t)). Po 2 h ilość uwolnionego związku cyklicznego, dla obydwu kopolimerów była niewielka, w porównaniu z **5a**, dla PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07} - około 17%, natomiast dla PNIPAM_{0.80}-PMPyAEA_{0.20} - 23%. Na podstawie wyników pomiaru widm protonowych, po 24 h, możemy stwierdzić, że dla kopolimeru z mniejszą ilością jednostek 2-pirydynylovych (**Rysunek 52**), uwolnienie związku bicyklicznego było całkowite, w przeciwieństwie do kopolimeru z większą ilością jednostek które mogłyby ulec cyklizacji. W tym przypadku, po 24 h, zostało jeszcze ponad 34% łańcuchów bocznych w formie liniowej (**Rysunek 53**).



Rysunek 52 Widma ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) przedstawiające proces cyklizacji PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07}. Zaznaczony fragment widma przedstawia sygnały związku bicyklicznego **6a**, według których liczony był postęp procesu.

Badania własne i dyskusja wyników



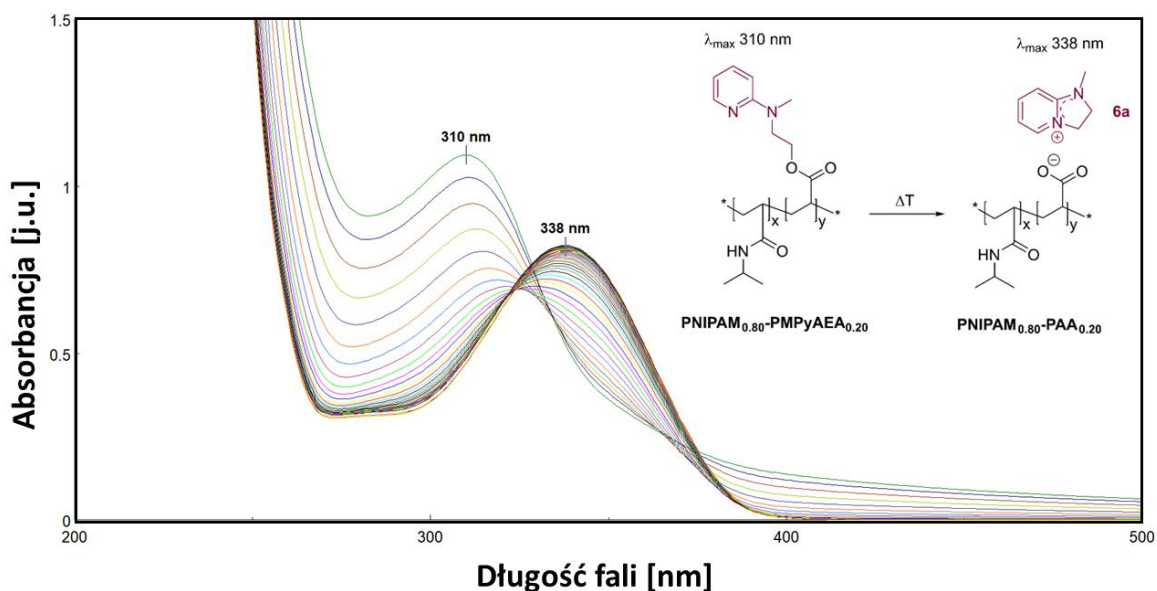
Rysunek 53 Widma ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) przedstawiające proces cyklizacji $\text{PNIPAM}_{0.80}\text{-PMPyAEA}_{0.20}$. Zaznaczony fragment widma przedstawia sygnały związku **6a**, według których liczony był postęp procesu.

8.2 Pomiary UV-Vis

Z badań widm protonowych nie można jednoznacznie stwierdzić, czy spowolnienie procesu uwalniania spowodowane jest warunkami bezwodnymi, czy obecnością segmentów PNIPAM, które w temperaturze $90\text{ }^\circ\text{C}$ agregują, utrudniając tym samym wewnątrzcząsteczkową cyklizację. Znaczne obniżenie efektywności procesu, może być w równym stopniu spowodowane wypadkową obu tych czynników. Dlatego też, konieczne było przeprowadzenie uwalniania związku bicyklicznego w warunkach wodnych. Proces monitorowany był przy użyciu spektroskopii UV-Vis, a pomiary przeprowadzone w analogiczny sposób, jak w przypadku homopolimerów. Wodne roztwory kopolimerów $\text{PNIPAM}_{0.93}\text{-PMPyAEA}_{0.07}$ oraz $\text{PNIPAM}_{0.80}\text{-PMPyAEA}_{0.20}$, były ogrzewane przez 5 h w temperaturze $90\text{ }^\circ\text{C}$, a co 10 minut rejestrowane było widmo UV-Vis (**Rysunek 55** oraz **Rysunek 54**). Proces wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji przebiegał dla obu układów, w czasie dłuższym, niż dla homopolimeru **5a**. W obydwu przypadkach obserwujemy batochromowe przesunięcie pasma absorpcji II, o około 20 - 28 nm, przy równoczesnym zmniejszeniu natężenia absorpcji promieniowania, efekt hipochromowy. W przypadku kopolimeru $\text{PNIPAM}_{0.93}\text{-PMPyAEA}_{0.07}$ pasmo pochodzące od ugrupowania 2-pirydynyloвого jest bardzo słabe, dlatego też określenie początkowej wartości λ_{max} jest umowne. Interesujący jest

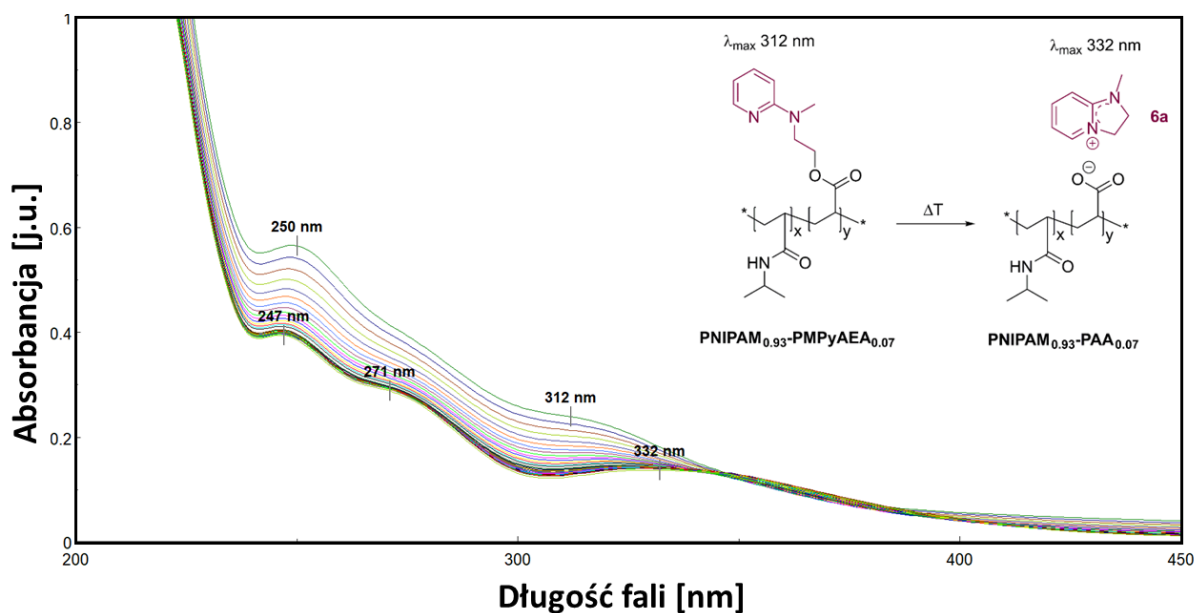
Badania własne i dyskusja wyników

również fakt, że dla tego kopolimeru proces całkowitego uwolnienia związku bicyklicznego **6a** trwał niemal dwa razy dłużej, niż dla kopolimeru, w którym grup ulegających cyklizacji jest więcej (**Rysunek 56**). Świadczy to o tym, że wydłużenie procesu termo-uwalniania wynika z zawady przestrzennej, którą tworzą zagregowane segmenty *N*-izopropylakrylamidu. Taki wniosek potwierdza fakt że, dla kopolimeru zawierającego mniej łańcuchów bocznych z ugrupowanie 2-pirydynyłowym efekt ten jest silniejszy, w przeciwieństwie do kopolimeru PNIPAM_{0,80}-PMPyAEA_{0,20}, co skutkuje efektywniejszym uwalnianiem związku modelowego. Wyniki pomiarów procesu cyklizacji, w wodnych roztworach kopolimerów wykazały, że stosunki zawartości jednostek z odwracalną termo-responsywnością, względem ilości łańcuchów bocznych z ugrupowaniem 2-pirydynyłowym, mają wpływ na szybkość procesu termo-uwalniania. Wprowadzenie, w sposób losowy fragmentów *N*-izopropylakrylamidu może być dodatkowym czynnikiem, poza temperaturą i środowiskiem reakcji, który pozwoli na sterowanie procesem wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

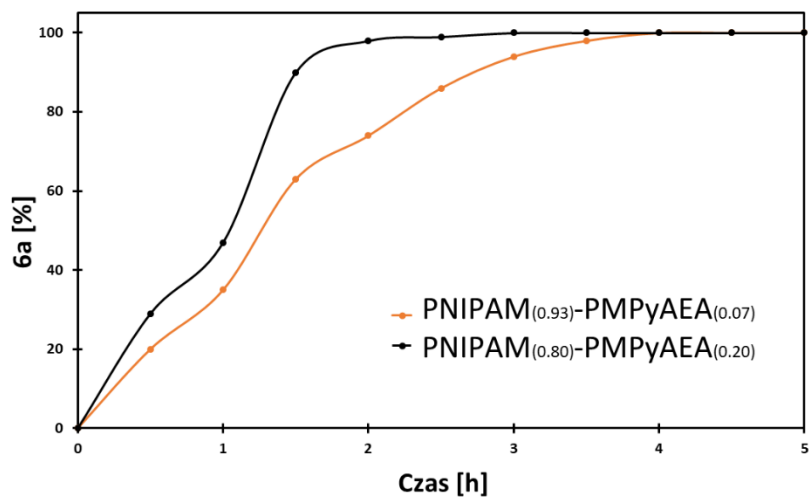


Rysunek 54 Widma UV-Vis procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla PNIPAM_{0,80}-PMPyAEA_{0,20}. Całkowite uwolnienie związku bicyklicznego **6a** nastąpiło po 170 minutach (2 h 50 min.).

Badania własne i dyskusja wyników



Rysunek 55 Widma UV-Vis procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dla PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07}. Całkowite uwolnienie związku bicyklicznego **6a** nastąpiło po 250 minutach (4 h 10 min.).



Rysunek 56 Kinetyka procesu całkowitego uwalniania związku **6a** z kopolimerów polimerów PNIPAM_x-PMPyAEA_y, w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w temperaturze 90 °C.

III. Najważniejsze wyniki

1. Opracowałam metodę syntezy nowych monomerów zawierających termowrażliwą grupę 2-pirydynylową (**4a-4c**).
2. Zoptymalizowałam metodę syntezy polimeryzacji RAFT, bazując na monomerze *N*-izopropylakrylamidu (NIPAM), która posłużyła do opracowania metody polimeryzacji monomerów **4a-c**.
3. Opracowałam metodę homopolimeryzacji polimerów z ugrupowaniem 2-pirydynylowym (**5a-c**). Czasowe zablokowanie termowrażliwości monomerów, poprzez obniżenie ich nuklofilowości w wyniku protonacji endogennego azotu pirydyny, pozwoliło na przeprowadzenie reakcji polimeryzacji.
4. Potwierdziłam strukturę chemiczną otrzymanych polimerów **5a-c** metodą jądrowego rezonansu magnetycznego (^1H , ^{13}C NMR oraz ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni (FT-IR).
5. Dla wszystkich otrzymanych polimerów określiłam masy molowe przy użyciu metody grup końcowych, w oparciu o widma ^1H NMR.
6. Zoptymalizowałam metodę chromatografii wykluczenia GPC/SEC, co pozwoliło na oznaczenie rozrzutu mas molowych oraz polidispersyjności homopolimerów.
7. Wyzaczyłam wartości dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności (LCST) dla otrzymanych polimerów PNIPAM, potwierdzając jej zgodność z danymi literaturowymi.
8. Określiłam wpływ pH i dodatku soli na wartości LCST otrzymanych polimerów PNIPAM.
9. Przeprowadziłam badanie procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w roztworach homopolimerów, metodą spektroskopii UV-Vis i wyznaczyłam krzywe uwalniania dla związków cyklicznych **6a-b**, **9**.
10. Zbadałam wpływ pH oraz dodatku soli na proces uwalniania związku modelowego, na przykładzie związku bicyklicznego **6b**, metodą spektroskopii UV-Vis, wykazując, że proces cyklizacji jest utrudniony w środowisku kwasowym.
11. W układach homopolimerowych, przeprowadziłam badanie kinetyki procesu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji wykorzystując metodę ^1H NMR oraz udowodniłam wpływ środowiska wodnego na proces termo-uwalniania.

Najważniejsze wyniki

12. Zbadałam proces cyklizacji w ciele stałym, polimery **5a** i **5c**, wykazując kluczowy wpływ temperatury na proces cyklizacji.
13. Otrzymałam 4 kopolimery statystyczne PNIPAM-co-PMPyAEA, różniące się ilością jednostek 2-pirydynylowych, w dwóch zakresach mas molowych około 6 000 g/mol oraz około 20 000 g/mol.
14. Określiłam masy molowe otrzymanych kopolimerów metoda chromatografii wykluczenia GPC/SEC).
15. Potwierdziłam strukturę chemiczną otrzymanych kopolimerów PNIPAM_x-PMPyAEA_y, metodą ¹H NMR.
16. Przeprowadziłam badania procesu uwalniania związku bicyklicznego **6a** z kopolimerów, o masach molowych około 6 000 g/mol, potwierdzając wpływ agregacji segmentów PNIPAM na spowolnienie procesu termo-uwalniania.

IV. Część eksperymentalna

1 Materiały

1.1 Rozpuszczalniki organiczne.

Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki użyte do syntez zostały zakupione w firmach MERCK, ChemPure lub Avantor i stosowane były bez dalszego oczyszczania. Rozpuszczalniki dla których istotne było usunięcie śladów wody, były destylowane i przechowywane nad sitami molekularnymi (4 Å).

- Rozpuszczalniki: *N,N*-dimetyloformamid, eter dietylowy, heksan, octan etylu oraz chlorek metylenu, używane do syntezy i oczyszczania były przechowywane nad sitami molekularnymi (4 Å).
- Benzen używany do liofilizacji, był przygotowany poprzez zasypianie rozpuszczalnika KOH na 24 h, po czym destylowany nad CaH_2 i przechowywany nad sitami molekularnymi (4 Å).
- Bezwodny 1,4-dioksan używany do polimeryzacji był przechowywany nad sitami molekularnymi 4 Å.
- Tetrahydrofuran, używany do pomiarów chromatograficznych, był czystości przeznaczonej do chromatografii cieczowej (LiChrosolv®).
- Metanol do pomiarów spektrometrii masowej, był czystości przeznaczonej do pomiarów wysokosprawnej chromatografii cieczowej, dla pomiarów LC-MS.
- Pozostałe rozpuszczalniki używane do pomiarów spektroskopowych, oczyszczania mieszanin reakcyjnych na drodze ekstrakcji lub chromatografii kolumnowej były zakupione w firmie POCH, ChemPur lub Merck.

Część eksperymentalna

2 Metody

2.1 Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa.

Postęp reakcji syntezy alkoholi i monomerów monitorowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W tym celu używałam aluminiowych płytek o wymiarach 2.5 cm × 6.0 cm, powleczonych warstwą żelu krzemionkowego z indykatorem fluorescencyjnym (Silica gel 60 F254, Merck). Obraz na płytkach odczytywany był po naświetlaniu światłem UV, o długościach fali 254 lub 356 nm. Rozdziały chromatograficzne prowadziłam na kolumnie chromatograficznej, dobranej odpowiednio do ilości oczyszczanego produktu, używając żelu krzemionkowego 60 (70-230 mesh, ASTM, Merck) jako fazę stacjonarną. Faza ruchoma dobrana była do polarności konkretnych związków. Do izolacji związków cyklicznych użyłam szklanych płytek do preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PLC) z indykatorem fluorescencyjnym (1 mm Silica gel 60 F254), zakupionych w firmie Merck.

2.2 Reaktor mikrofalowy

Syntezę organiczną wspomaganą mikrofalami (MAOS, ang. *microwave-assisted organic syntheses*) wykonałam na reaktorze mikrofalowym Magnum II firmy Erte-Poland dr Edward Reszke z otwartym naczyniem i chłodnicą powietrzną. Zakres mocy reaktora ustawiony był od 0 do 750 W, natomiast częstotliwość pola wynosiła 2450 MHz. Oprogramowanie sterujące reaktorem pozwalało na monitorowanie mocy odbitej. Pomiar temperatury, w zakresie 0-500 °C, był realizowany za pomocą pirometru.

2.3 Spektroskopia NMR i spektrometria mas

Widma jądrowego rezonansu magnetycznego ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC, wykonałam w Pracowni NMR, Instytutu Chemii Bioorganicznej w Poznaniu na spektrometrach firmy Bruker Avance o częstościach 400 i 500 MHz. Widma rejestrowane były

Część eksperymentalna

w temperaturze 25 °C. Przesunięcia chemiczne (δ) podane zostały w ppm, względem użytych rozpuszczalników deuterowanych: DMSO- d_6 (δ dla pomiarów 1H 2.50 ppm, a dla widm ^{13}C 39.52 ppm) oraz $CDCl_3$ (δ dla 1H 7.26 ppm, natomiast dla widm ^{13}C 77.16 ppm). Stałe sprzężenia (J), podane w Hz, wyznaczone były przy użyciu programu TopSpin 3.6.2 firmy Bruker, działającego na licencji do użytku akademickiego. Próbki do pomiarów przygotowane według standardowo obowiązującej w chemii organicznej procedury: 10-20 mg związku rozpuszczone w około 600 μL deuterowanego rozpuszczalnika. Do opisu sprzężeń użyte zostały następujące symbole: s (singlet), d (dublet), t (tryplet), q (kwadrupelet), dd (dublet dubletów), dt (dublet trypletów) oraz m (multiplet).

Widma masowe wysokiej rozdzielczości wykonane zostały w Pracowni Spektrometrii Mass, Instytutu Chemii Bioorganicznej w Poznaniu, na spektrometrze mas Q-Exactive Orbitrap firmy Thermo Scientific z zastosowaniem elektrorozpylania (ESI), ze sprzężonym źródłem jonów TriVersa NanoMate (Advion BioSciences Ltd.) oraz analizatorem q-TOF. W trakcie pomiarów zastosowano następujące parametry: napięcie źródła ESI 3,2 kV, nebulizacja azotem w 0,4 bar, natężenie przepływu suchego gazu 4,0 L/min, temperatura źródła 220 °C, (dla związków cyklicznych 100 °C). Próbki do pomiarów, o stężeniu około 10^{-5} M, były przygotowane w metanolu.

2.4 Spektroskopia UV-Vis

Pomiary spektroskopowe w zakresie nadfioletu i światła widzialnego przeprowadziłam przy użyciu spektrofotometru UV-Vis JASCO V-650 z termoprogramatorem. Widma UV-Vis dla pomiarów procesu cyklizacji były rejestrowane w zakresie 800 - 190 nm, ze skokiem 1 nm, w odstępach 5-cio minutowych przez 250 minut, na drodze optycznej 1 cm. Próbki polimerów, o stężeniach 0.015 mg/L, przygotowane w były wodzie MiliQ lub w 0.1 M wodnych roztworach buforowych. W trakcie pomiaru kuwetki kwarcowe były zamknięte i kondycjonowane w 90 °C.

Pomiary transmitancji, do wyznaczenia dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności polimerów PNIPAM, zbierane były w zakresie temperatur 10 – 60 °C, przy długości fali 500 nm, co 1 °C i drogą optyczną - 1 cm. Próbki polimerów do pomiarów o stężeniu 1% były przygotowane w wodzie MiliQ lub w 0.1 M wodnych roztworach buforowych. W trakcie pomiarów kuwetki kwarcowe były zamknięte.

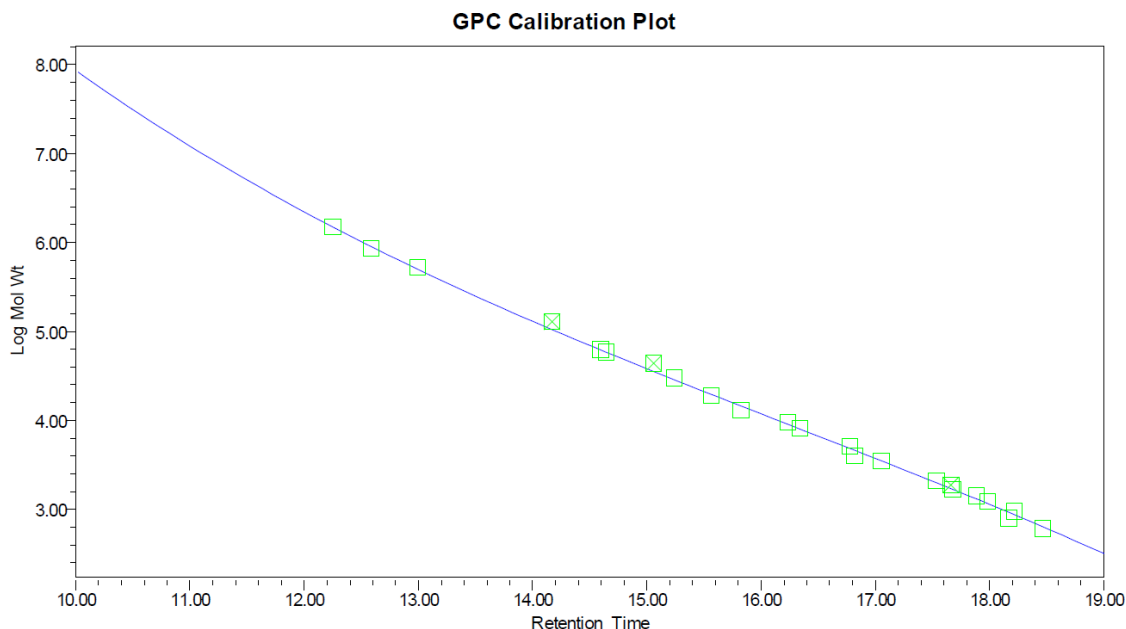
Część eksperymentalna

2.5 Spektroskopia FT-IR

Pomiary w podczerwieni wykonałam w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Widma FT-IR zbierane były w trybie osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia, w którym pomiar odbywa się przez dociśnięcie kryształu, z bardzo cienką końcówką do cienkiego filmu próbki. Do pomiarów użyto spektrometru FT-IR JASCO 4700 type A wyposażonego w przystawkę ATR PRO ONE. Pomiary przeprowadzone były z rozdzielczością 4 cm^{-1} w zakresie pomiarowym $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Próbki polimerów były wcześniej wysuszone pod próżnią i nanoszone na kryształ pomiarowy w formie proszku.

2.6 Chromatografia GPC/SEC

Pomiary wysokosprawnej chromatografii żelowej GPC/SEC wykonałam w ramach 4 miesięcznego stażu doktorskiego w grupie badawczej prof. dr. Michaela R. Buchmeisera w Institute of Polymer Chemistry, University of Stuttgart. Masy molowe dla zsyntezowanych polimerów wyznaczone zostały przy użyciu systemu firmy Waters, wyposażonego w pompę do analiz izokratycznych, model 515, detektor refraktometryczny model 410 oraz automatyczny podajnik próbek. Masy molowe polimerów analizowałam na kolumnie PLGel $10\ \mu\text{m}$ Mixed-B (zakres wykluczania mas $200 - 2\ 000\ 000\ \text{g/mol}$), kondycjonowanej w temperaturze $30\ ^\circ\text{C}$. Jako fazę ruchomą użyłam tetrahydrofuran zawierający 1% bromku tetrabutylamoniumowego (TBAB), szybkość przepływu $1\ \text{mL/min}$. Kolumna chromatograficzna została skalibrowana przy użyciu standardów polistyrenu o niskiej polidispersyjności (PS, PSS Mainz, Germany), w zakresie $600 - 1\ 500\ 000\ \text{g/mol}$ (**Rysunek 58** oraz **Rysunek 57**). Próbki badanych polimerów, o stężeniu $3\ \text{mg/mL}$, przygotowałam w fazie ruchomej i analizowałam w oparciu o krzywą kalibracyjną wyznaczoną w programie Empower 3 (Waters).



Rysunek 58 Krzywa kalibracyjna pomiarów GPC/SEC dla próbek homopolimerów i kopolimerów.

GPC Calibration Table

	Mol Wt (Daltons)	RT (min)	Calculated Weight (Daltons)	% Residual
1	1500000	12.250	1494527	0.366
2	864000	12.585	902069	-4.220
3	524000	12.993	500267	4.744
4	128600	14.170		
5	62300	14.595	61945	0.573
6	58900	14.643	58409	0.840
7	44000	15.061		
8	30000	15.240	28623	4.809
9	19100	15.563	19625	-2.678
10	13000	15.826	14477	-10.201
11	9550	16.235	9035	5.696
12	8210	16.339	8014	2.450
13	5150	16.775	4848	6.239
14	4000	16.820	4604	-13.118
15	3510	17.052	3516	-0.169
16	2090	17.532	1999	4.533
17	1880	17.661		
18	1681	17.677	1681	-0.017
19	1420	17.886	1308	8.585
20	1220	17.983	1161	5.037
21	800	18.167	927	-13.724

	Mol Wt (Daltons)	RT (min)	Calculated Weight (Daltons)	% Residual
22	953	18.217	872	9.344
23	607	18.467	637	-4.725

Rysunek 57 Wartości czasów retencji standardów polistyrenu dla krzywej kalibracyjnej analiz GPC/GPC.

Część eksperymentalna

2.7 Analiza termiczna

Pomiary termogravimetryczne (TGA) zostały wykonane przy użyciu termogravimetru TGA Q50 firmy TA Instruments znajdującego się w Zakładzie Fizyki Dielektryków na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Próbkę polimerów, o naważkach 5.395 mg (**5a**), 3.457 mg (**5c**) oraz 8.270 mg (**8c**), były umieszczone na szalkach platynowych, a następnie w piecu połączonym z termowagą. Próbkę ogrzewane były z prędkością 10 °C/min, w zakresie od temperatury pokojowej (RT) do temperatury 750 °C. Pomiary TGA prowadzone były w atmosferze gazu obojętnego (N₂).

Pomiary skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) wykonano w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, przy użyciu kalorymetru DSC 8000 firmy ParkinElmer, bazującego na metodzie kompensacji mocy. Próbkę polimeru **5a**, o masach ok. 5 mg umieszczono w aluminiowych naczynkach pomiarowych, a następnie przeprowadzono pomiar w zadanych zakresach temperaturowych. W pierwszym podejściu termogram rejestrowany był w zakresie 30 – 200 °C, w sekwencji składającej się z pięciu kroków. W pierwszym kroku próbka była ogrzewana od 30 do 200 °C z szybkością 20 °C/min i pozostawiona w docelowej temperaturze przez minutę. Po cyklu grzania następowało szybkie ochładzanie próbki do 40 °C, z prędkością 40 °C/min, a następnie próbka była ponownie ogrzewana do 200 °C, tym razem z prędkością 10 °C/min. Kolejny eksperyment obejmował, naprzemienne cykle grzanie/ochładzanie w zakresie 20 – 90 °C, pomiędzy którymi następowało 15-minutowe kondycjonowanie próbki, w temperaturze docelowej. Prędkość ogrzewania/chłodzenia badanej próbki wynosiła 10 C/min, a cały cykl był powtarzany kilkanaście razy. Zastosowana metoda pomiarowa była opracowana na bazie [157].

2.8 Oprogramowania specjalistyczne

Wszystkie schematy reakcji i procesów oraz wzory cząsteczek zostały przygotowane w programie ChemDraw® Professional, wersja 16.0. Program był również pomocny w estymacji przesunięć chemicznych dla użytych reagentów do polimeryzacji.

Widma IR zostały opracowane przy użyciu programu stworzonego przez dr. Friedricha Menesa do spektroskopii optycznej – Spectragryph, wersja 1.2.12 do użytku niekomercyjnego.

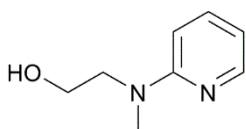
Część eksperymentalna

Program ten wykorzystywałam również do przygotowania części widm UV-Vis, wraz z programem Spectra Manager, wersja 2.07.02 z licencją dla instrumentu Jasco V-650.

Wszystkie widma NMR zostały przygotowane w programie TopSpin 3.6.2 firmy Bruker, działającego na licencji do użytku akademickiego.

2.9 Synteza chemiczna

2.9.1 Otrzymywanie 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etanolu (**3a**)



W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 2-bromopirydynę (**1**, 30.0 g, 190 mmol, 1 eq) oraz 2-(metyloamino)etanol (**2a**, 42.8 g, 570 mmol, 3 eq), w 5 mL bezwodnego *N,N*-dimetylformamidu (DMF). Następnie do mieszaniny dodano 39.7 mL (1.5 eq) trietylaminy (TEA), w celu neutralizacji wydzielającego się w trakcie reakcji gazowego bromowodoru (HBr). Reakcje prowadzono w reaktorze mikrofalowym (130 °C, 300 W). Grzanie odbywało się w 4 cyklach, po 90 minut, a całkowity czas reakcji wyniósł 6 h. Postęp reakcji badano po każdym cyklu, przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik został odparowany i przeprowadzono wstępne oczyszczenie. Mieszanina reakcyjna została przemyta, 100 mL nasyconego wodnego roztworu NaHCO₃, a następnie przeprowadzono ekstrakcję z 100 mL CH₂Cl₂. Ekstrakcję powtórzono dwukrotnie, każdorazowo przemywając warstwę organiczną 100 mL wody bidestylowanej. Po odparowaniu rozpuszczalnika, produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej, używając mieszaniny heksan/octan etylu (v/v) jako fazy ruchomej. Mieszanina została nałożona na kolumnę przygotowaną w heksanie, a następnie prowadzony był rozdział w elucji gradientowej. Produkt **3a** został wymyty z kolumny przy 60% octanu etylu. Faza ruchoma została odparowana na wyparce obrotowej, po czym produkt suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymano 9.18 g 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etan-1-olu (**3a**), w postaci żółtawej oleistej cieczy, z wydajnością 32%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS.

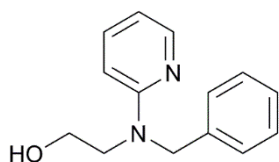
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 8.00 (dd, *J* = 4.92, 1.00 Hz, 1H), 7.41 (td, *J* = 15.73, 7.24, 1.92 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 12.59, 5.27 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 8.52 Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 3.78 (t, *J* = 9.94,

Część eksperymentalna

4.77 Hz, 1H), 3.64 (t, $J = 9.72, 5.08$ Hz, 1H), 3.00 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] 158.8, 146.6, 137.3, 111.7, 105.8, 62.2, 53.7, 37.4.

HR-MS m/z ; wyliczone: 153.1022 $[\text{M}+\text{H}]^+$; znaleziono: 153.1022 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

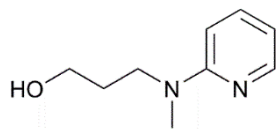
2.9.2 Otrzymywanie 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etanolu (**3b**)



W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-bromopirydynę (**1**, 3.36 g, 0.021 mmol, 1 eq), 2-(benzylamino)etanol (**2b**, 5.04 g, 0.032 mmol, 1.5 eq) dodając 4 mL (1.5 eq) TEA. Reakcję przeprowadzono w reaktorze mikrofalowym (130 °C, 300 W), w 3 cyklach, po 90 minut, a całkowity czas reakcji wyniósł 2 h. Po każdym cyklu postęp reakcji sprawdzano przy użyciu chromatografii cienkowsarstwowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym, wodnym roztworem NaHCO_3 (100 mL), po czym odano 100 mL CH_2Cl_2 , aby przeprowadzić ekstrakcję. Warstwę organiczną przemyto trzykrotnie, każdorazowo użyto 100 mL wody bidestylowanej. Po odparowaniu rozpuszczalnika, produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej, używając mieszaniny heksan/octan etylu (v/v) jako fazy ruchomej, w elucji gradientowej. Produkt **3b** został wymyty z kolumny przy 50% octanu etylu. Faza ruchoma została odparowana na wyparce obrotowej, po czym produkt został wymrożony, a następnie suszony pod próżnią przez 24 h. Otrzymano 1.11 g 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etanolu (**3b**), w postaci bezbarwnej oleistej cieczy, z wydajnością 23%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS. Ze względu, na mnogość sygnałów na widmach NMR, dodatkowo przeprowadzono analizę widm dwuwymiarowych (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC) (podrozdział 2.12, Część IV). Widma dwuwymiarowe umożliwiły prawidłowe przypisanie przesunięć chemicznych oraz potwierdzenie struktury otrzymanego produktu.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] 8.05 (d, $J = 4.68$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 15.61, 7.16$ Hz, 1H), 7.32 – 7.19 (m, 5H), 6.58 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 6.54 (t, $J = 11.92, 6.24$ Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.72 (s, 1H), 3.58 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] 157.7, 147.4, 139.0, 137.2, 128.3, 126.5, 111.4, 105.7, 58.5, 51.3, 50.4.

HR-MS m/z ; wyliczone: 229.1335 $[\text{M}+\text{H}]^+$; znaleziono: 229.1336 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.9.3 Otrzymywanie 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propan-1-olu (**3c**)

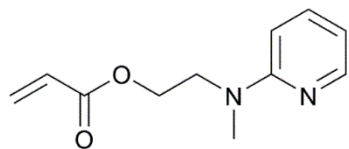
W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 2-bromopirydynę (**1**, 1.80 g, 0.019 mmol, 1 eq) i 3-(metylamino)propanolu (**2c**, 3.03 g, 0.034 mmol, 3 eq), w 3 mL bezwodnego DMF. Do mieszaniny reakcyjnej dodano również 2.37 mL (1.5 eq) TEA, aby zneutralizować wydzielające się opary HBr. Reakcję przeprowadzono w reaktorze mikrofalowym (130 °C, 300 W), w 4 cyklach, po 60 minut, a całkowity czas reakcji wyniósł 4 h. Po każdym cyklu postęp reakcji badano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (100 mL), po czym dodano 100 mL CH₂Cl₂ aby przeprowadzić ekstrakcję. Produkt znajduje się w warstwie organicznej, przemyto trzykrotnie 100 mL wody bidestylowanej. Po odparowaniu rozpuszczalnika, produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej, używając mieszaniny heksan/octan etylu (v/v) jako fazy ruchomej, w elucji gradientowej. Produkt **3c** został wymyty z kolumny przy 60% octanu etylu. Faza ruchoma została odparowana na wyparce obrotowej, po czym produkt suszono pod próżnią, przez 24 h. Otrzymano 1.40 g 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propan-1-olu (**3c**), w postaci bezbarwnej oleistej cieczy, z wydajnością 41%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS. Dodatkowo, przeprowadzono analizę widm dwuwymiarowych (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC) (podrozdział 2.12, Część IV). Widma dwuwymiarowe umożliwiły prawidłowe przypisanie przesunięć chemicznych oraz potwierdzenie struktury otrzymanego produktu.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 8.04 (dd, *J* = 6.20, 1.16 Hz, 1H), 7.44 (td, *J* = 17.67, 8.97, 2.01 Hz, 1H), 5.62 (dd, *J* = 12.17, 5.25 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 8.62 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 3.72 (t, *J* = 11.76, 5.77 Hz, 2H), 3.48 (t, *J* = 11.04, 5.77 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 1.74 (q, *J* = 22.84, 5.75 Hz, 2H);
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 159.2, 147.5, 137.9, 111.7, 105.6, 57.8, 45.7, 35.9, 30.6.

HR-MS *m/z*; wyliczone: 167.1179 [M+H]⁺; znalezione: 167.1181 [M+H]⁺.

Część eksperymentalna

2.9.4 Otrzymywanie akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (4a)



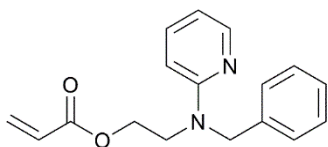
2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etanol (**3a**, 3.00 g, 19.7 mmol, 1 eq) rozpuszczono w CH₂Cl₂ (16 mL), w kolbie okrągłodennej. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej i schładzano mieszając, przez 10 minut. Chlorek akryloilu (1.92 mL, 23.66 mmol, 1.2 eq)

rozpuszczono w 16 mL CH₂Cl₂ i umieszczono w strzykawce. Następnie chlorek wkraplano do roztworu alkoholu, przez godzinę. Po dodaniu całości odczynnika reakcję kontynuowano przez kolejną godzinę, w temperaturze 25 °C, do całkowitego zużycia alkoholu **3a**. Reakcję prowadzono w atmosferze argonu, a po jej zakończeniu przeprowadzono wstępne oczyszczanie. Mieszanina reakcyjna została przemyta nasyconym, wodnym roztworem NaHCO₃ (200 mL, 1 mol/L), a następnie dwukrotnie wodą bidestylowaną (łącznie 400 mL). Organiczny roztwór, po ekstrakcji, suszony był nad bezwodnym Na₂SO₄. Po oddzieleniu środka suszącego, rozpuszczalnik organiczny został usunięty, w warunkach obniżonego ciśnienia. Następnie produkt był oczyszczany na kolumnie chromatograficznej, w gradiencie chlorek metylenu/metanol. Produkt **4a** został wymyty z kolumny i zebrany, przy 3% metanolu. Fazę ruchomą odparowano na wyparce obrotowej, po czym produkt suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymano 3.28 g monomeru w postaci bezbarwnej, oleistej cieczy, z wydajnością 81%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 8.05 (dd, *J* = 6.08, 2.44 Hz, 1H), 7.49 (td, *J* = 8.84, 4.00 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.60 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 12.00 5.40 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 18.87, 1.64 Hz, 1H), 6.12 (dd, *J* = 27.57, 10.28 Hz, 1H), 5.91 (dd, *J* = 11.92, 1.64 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 11.56, 5.88 Hz, 2H), 8.82 (t, *J* = 11.40, 5.72 Hz, 2H), 3.00 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 165.4, 158.0, 147.5, 137.3, 131.5, 128.2, 111.6, 105.7, 61.9, 47.9, 36.7.

HR-MS *m/z*; wyliczone: 207.1128 [M+H]⁺; znalezione: 207.1128 [M+H]⁺.

2.9.5 Otrzymywanie akrylanu 2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4b**)



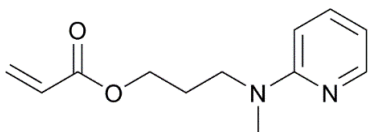
2-(benzyl(pirydyn-2-yl)amino)etanol (**3b**) (0.393 g, 1.72 mmol, 1 eq) rozpuszczono w CH₂Cl₂ (2 mL) w kolbie okrągłodennej. Następnie kolbę, z mieszadłem magnetycznym, umieszczono w łaźni lodowej i schładzano alkohol przed 10 minut. Chlorek akryloilu (308 μL, 3.784 mmol, 1.2 eq) rozpuszczono w CH₂Cl₂ (2 mL) i umieszczono w strzykawce. Następnie chlorek wkraplano do roztworu alkoholu, przez 30 minut, po czym reakcję kontynuowano przez kolejną godzinę, w temperaturze 25 °C, do całkowitego zużycia alkoholu **3b**. Reakcja była prowadzona w atmosferze argonu, a po jej zakończeniu przeprowadzono wstępne oczyszczanie. Mieszanina reakcyjna została przemyta nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (100 mL, 1 mol/L), a następnie dwukrotnie wodą bidestylowaną (łącznie 200 mL). Organiczny roztwór, po ekstrakcji, suszono nad bezwodnym Na₂SO₄. Po oddzieleniu środka suszącego, rozpuszczalnik organiczny usunięto w warunkach obniżonego ciśnienia. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, w gradiencie chlorek metylenu/metanol. Frakcję główną monomeru **4b** zebrano przy 3% metanolu. Po odparowaniu rozpuszczalnika produkt suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymano 0.388 g monomeru w postaci bezbarwnej oleistej cieczy, z wydajnością 80%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 8.04 (dd, *J* = 5.44, 1.72 Hz, 1H), 7.45 (td, *J* = 8.80, 2.20 Hz, 1H), 7.31 – 7.19 (m, 5H), 6.61 (d, *J* = 8.56 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 7.04, 2.04 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 17.44, 1.71 Hz, 1H), 6.08 (dd, *J* = 17.25, 10.32 Hz, 1H), 5.90 (dd, *J* = 10.32, 1.60 Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.30 (t, *J* = 5.88 Hz, 2H), 3.86 (t, *J* = 5.80 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 165.4, 157.6, 147.6, 138.8, 137.3, 131.5, 128.1, 126.7, 126.6, 112.0, 106.0, 62.0, 51.5, 46.8.

HR-MS *m/z*; wyliczone: 282.1368 [M+H]⁺; znalezione: 282.1365 [M+H]⁺.

Część eksperymentalna

2.9.6 Otrzymywanie akrylanu 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu (**4c**)



3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propanol (**3c**, 1.30 g, 8.07 mmol, 1 eq) rozpuszczono w CH_2Cl_2 (7 mL), w kolbie okrągłodennej. Następnie kolbę, z mieszadłem magnetycznym, umieszczono w łaźni lodowej i schładzano alkohol przed 10 minut. Chlorek akryloilu (0.787 mL, 9.69 mmol, 1.2 eq) rozpuszczono w 7 mL CH_2Cl_2 i umieszczono w strzykawce. Następnie chlorek wkraplano do roztworu alkoholu przez 45 minut, po czym kontynuowano reakcję przez kolejną godzinę, w temperaturze 25 °C, do całkowitego zużycia alkoholu. Reakcja była prowadzona w atmosferze argonu, a po jej zakończeniu przeprowadzono wstępne oczyszczanie. Mieszanina reakcyjna została przemyta nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (200 mL, 1 mol/L), a następnie dwukrotnie wodą bidestylowaną (łącznie 400 mL). Organiczny roztwór, po ekstrakcji, suszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po oddzieleniu środka suszającego, rozpuszczalnik organiczny usunięto w warunkach obniżonego ciśnienia. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, w gradiencie chlorek metylenu/metanol. Monomer **4c** został wymyty z kolumny i zebrany przy 3% metanolu. Fazę ruchomą odparowano na wyparce obrotowej, po czym produkt suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymano 1.31 g monomeru w postaci bezbarwnej oleistej cieczy, z wydajnością 74%. Produkt został scharakteryzowany przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii HR-MS.

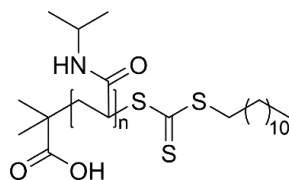
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] 8.05 (d, J = 4.56 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 6.20, 15.49 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 6.51 (t, J = 11.84, 5.80 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 17.26 Hz, 1H_b), 6.17 (dd, J = 27.57, 10.28 Hz, 1H), 5.93 (d, J = 10.28 Hz, 1H_a), 4.11 (t, J = 12.96, 6.56 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 13.96, 6.56 Hz, 2H), 2.96 (s, 3H), 1.87 (q, J = 26.63, 6.62, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] 165.5, 158.1, 147.6, 137.2, 131.4, 128.4, 111.2, 105.5, 62.2, 46.0, 35.9, 26.0.

HRMS-ESI m/z ; calculated: 221.1285 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 221.1285 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.9.7 Otrzymywanie poli(*N*-izopropylakrylamidu) (PNIPAM)

Polimer poli(*N*-izopropylakrylamid) (PNIPAM) został otrzymany z komercyjnie dostępnego monomeru NIPAM. Reakcja została przeprowadzona przy użyciu dwóch różnych czynników wzrostu łańcucha. Pierwszym z nich był kwas 2-(dodecylokarbonylotio)-2-metylopropionowy (DDMAT), natomiast drugim uniwersalny reagent RAFT (sRAFT) - ester metylowy kwasu 2-(metylo(pirydyn-4-ylo)karbamotionylo)propionowego, który przed inicjacją reakcji, wymaga protonacji mocnym kwasem.

2.9.7.1 Otrzymywanie PNIPAM_(DDMAT)



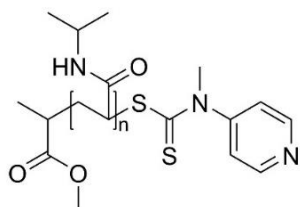
W suchej kolbie Schlenka zmieszano monomer *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 453 mg, 4.00 mmol, 300 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl) (ACHN, 3.21 mg, 0.013 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w odgazowanym, suchym 1,4-dioksanie (4 mL). Do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór DDMAT (14.37 mg, 0.04 mmol, 3 eq), rozpuszczony w 1,4-dioksanie (2 mL). Przed rozpoczęciem polimeryzacji przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu ¹H NMR. Po 8 h polimeryzacji, stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85 %) reakcję zakończono (po 12 h) poprzez wymrożenie kolby Schlenka, w ciekłym azocie. W wyniku wymrożenia wygaszono wszystkie wolne rodniki. Otrzymany polimer oczyszczono poprzez precypitację z zimnego *n*-heksanu, a następnie suszono pod próżnią, przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_(DDMAT) w postaci białego proszku, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 3.84 ppm (1H), 1.95 ppm (1H), 1.76 - 1.18 ppm (2H), 1.04 ppm (6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 173.3, 41.8, 38.5, 22.3.

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 11 300 g/mol, M_w 13 100 g/mol, Đ 1.16.

Część eksperymentalna

2.9.7.2 Otrzymywanie PNIPAM_(sRAFT)

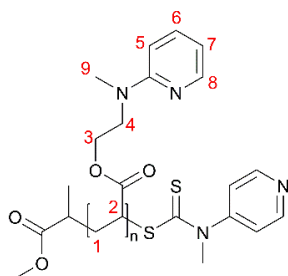


W suchej kolbie Schlenka umieszczono monomer *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 455 mg, 4.00 mmol, 300 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl (ACHN, 3.58 mg, 0.015 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w odgazowanym, suchym 1,4-dioksanie (4 mL). Do mieszaniny reakcyjnej dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 15.74 mg, 0.08 mmol, 6 eq) roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (11.02 mg, 0.04 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję rozpoczęto przez wygenerowanie wolnych rodników inicjujących, w temperaturze 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 8 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Polimeryzację kontynuowano przez kolejne 4 h. Reakcję zakończono po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85 %), po 12 h. Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym, wodnym roztworem NaHCO₃. Wytrącony, biały osad, został odfiltrowany, a rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem. Otrzymany polimer oczyszczono poprzez precypitację z zimnego *n*-heksanu, a następnie suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_(sRAFT), w postaci białego proszku, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 3.84 ppm (1H), 1.96 ppm (1H), 1.76 - 1.25 ppm (2H), 1.04 ppm (6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 173.0, 41.6, 38.5, 22.0.

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 4 800 g/mol, M_w 5 600 g/mol, D 1.16.

2.9.8 Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) (5a)



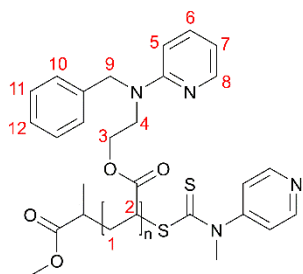
W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4a**, 412.5 mg, 2.00 mmol, 150 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl) (ACHN, 3.26 mg, 0.013 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL), po czym dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 582.0 mg, 3.06 mmol, 230 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (10.81 mg, 0.04 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 8 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Polimeryzacja zakończono po 12 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃, w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego *n*-heksanu. Otrzymany polimer suszono, pod próżnią, przez 24 h. Otrzymany PMPyAEA, w postaci różowego proszku, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 8.00 (1H, H₈), 7.50 (1H, H₆), 6.47 (2H, H₅, H₇), 4.06 (2H, H₃), 3.87 (2H, H₄), 2.91 (3H, H₉), 2.17 (1H, H₂), 1.90 – 1.48 (2H, H₁). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 173.7, 157.9, 147.5, 145.6, 137.7, 137.2, 128.1, 125.5, 111.5, 62.0, 54.9, 47.7, 40.8, 36.5, 32.2, 20.8.

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 8 000 g/mol, M_w 12 200 g/mol, Đ 1.54.

Część eksperymentalna

2.9.9 Otrzymywanie poli(akrylanu 2-(benzylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu) (5b)

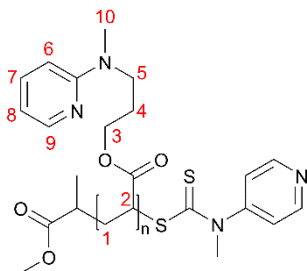


W suchej ampułce Schlenka umieszczono akrylan 2-(benzylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4b**, 350.0 mg, 1.50 mmol, 150 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksanokarbonitryl) (ACHN, 3.26 mg, 0.013 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 446.4 mg, 2.35 mmol, 230 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (8.30 mg, 0.03 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 8 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Reakcje zakończono, po 12 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka, w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C) zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃. Biały osad wytrącono podczas zobojętnienia i odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego *n*-heksanu i suszono pod próżnią, przez 24 h. Otrzymany PBPyAEA, w postaci proszku, o różowym zabarwieniu scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii ¹H NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 7.96 (1H, H₈), 7.55 – 6.80 (6H, H₆, H₁₀₋₁₂), 6.45 (2H, H₅, H₇), 4.67 (2H, H₉), 4.02 (2H, H₃), 3.44 (2H, H₄), 2.16 (1H, H₂), 1.70 – 1.28 (2H, H₁).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 6 000 g/mol, M_w 9 000 g/mol, \bar{D} 1.49.

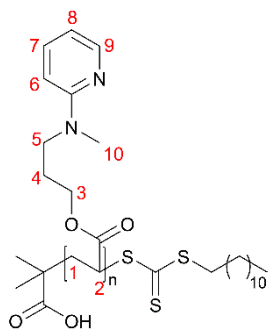
2.9.10 Otrzymywanie poli(akrylanu 3-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu) (5c, 8c)



W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu (**4c**, 440.2 mg, 2.00 mmol, 150 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl) (ACHN, 3.26 mg, 0.013 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 582.1 mg, 3.06 mmol, 230 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (10.81 mg, 0.04 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 8 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Polimeryzacja została zakończona po 12 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃, w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego *n*-heksanu. Polimer suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PMPyAPA (**5c**), w postaci proszku, o różowym zabarwieniu, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 7.98 (1H, H₉), 7.46 (1H, H₇), 6.44 (2H, H₆, H₈), 3.91 (2H, H₃), 3.44 (2H, H₅), 2.85 (3H, H₁₀), 2.29 (1H, H₂), 1.72 (2H, H₄), 1.90 – 1.48 (2H, H₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 173.5, 158.0, 147.5, 137.0, 128.0, 125.5, 111.2, 105.4, 62.2, 45.9, 35.8, 26.2, 20.8.

Część eksperymentalna



W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)propylu (**4c**, 440.2 mg, 2.00 mmol, 150 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl) (ACHN, 3.26 mg, 0.013 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszanina rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (3 mL) i dodano roztwór DDMAT (14.59 mg, 0.04 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (1 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ^1H NMR. Po 8 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązania winylowego (δ 6.32 – 5.93 ppm, 3H). Polimeryzacja zakończono po 16 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 85%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu do temperatury pokojowej (25 °C), mieszaninę reakcyjną zneutralizowano nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 , w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego n-heksanu i suszono, pod próżnią, przez 24 h. Otrzymany PMPyAPA (**8c**), w postaci proszku o zabarwieniu lekko różowym, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii ^1H NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

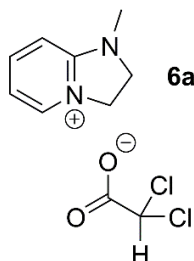
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] 8.00 (1H, H₉), 7.36 (1H, H₇), 6.44 (2H, H₆, H₈), 3.93 (2H, H₃), 3.46 (2H, H₅), 2.85 (3H, H₁₀), 2.24 (1H, H₂), 1.72 (2H, H₄), 1.94 – 1.30 (2H, H₂).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 10 700 g/mol, M_w 20 900 g/mol, \bar{D} 1.94.

2.10 Izolacja produktów cyklicznych

Związki heterocykliczne (**6a-b**, **9**) wyizolowano z jonowych układów, po procesie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w celu potwierdzenia ich struktury chemicznej.

2.10.1 Otrzymywanie 2,2-dichlorooctanu 1-metylo-2,3-dihydro-1H-imidazolo[1,2- α]pirydyniowego (**6a**)

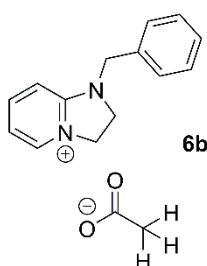


Niskocząsteczkową sól związku bicyklicznego **6a** wyizolowano z roztworu polimerowego, przy użyciu chromatografii preparatywnej (PLC). Na płytę PLC nałożono jonowy układ polimerowy, powstały po procesie cyklizacji polimeru **5a**. Jako fazę rozwijającą zastosowano mieszaninę izopropanolu i wody (7/3, v/v). Część wodna zawierała 5% kwasu dichlorooctowego, aby wymienić anion

poli(kwasu akrylowego). Po rozdziale, produkt wymyto z żelu krzemionkowego przy użyciu wody. Po odparowaniu rozpuszczalnika związek bicykliczny suszono, pod zmniejszonym ciśnieniem, przez 24 h. Otrzymaną sól związku **6a** scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 8.54 (d, J = 6.30, 1.00 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 16.11, 7.46, Hz, 1H), 6.89 – 6.82 (m, 2H), 5.84 (s, 1H w dichlorooctanie), 5.04 (t, J = 19.83, 9.79 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 19.83, 10.04 Hz, 2H), 3.14 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 166.9 (anion), 15.3, 144.3, 138.4, 112.9, 106.6, 70.2 (anion) 49.6, 49.6, 32.3.

2.10.2 Otrzymywanie octanu 1-benzyl-2,3-dihydro-1H-imidazolo[1,2- α]pirydyniowego (**6b**)



Niskocząsteczkową sól związku bicyklicznego **6b** wyizolowano z roztworu polimerowego, przy użyciu chromatografii preparatywnej (PLC). Na płytę PLC nałożono jonowy układ polimerowy, powstały po procesie cyklizacji polimeru **5b**. Jako fazę rozwijającą zastosowano mieszaninę izopropanolu i wody (7/3, v/v). Część wodna zawierała 5% kwasu octowego, aby wymienić anion

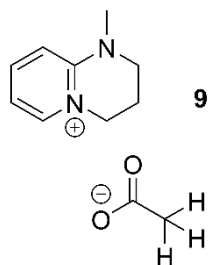
poli(kwasu akrylowego). Po rozdziale, produkt wymyto z żelu krzemionkowego przy użyciu wody. Po odparowaniu rozpuszczalnika związek bicykliczny suszono, pod zmniejszonym ciśnieniem, przez 24 h. Otrzymaną sól związku **6b** scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 8.28 (d, J = 4.41 Hz, 1H), 8.04 (t, J = 15.71, 7.89 Hz, 1H), 7.32 – 7.19 (m, 6H), 6.97 (t, J = 12.36, 6.05 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.68 (t, J = 17.70, 9.00 Hz, 2H),

Część eksperymentalna

3.86 (t, $J = 18.77, 9.48$ Hz, 2H), 1.67 (s, 3H w octanie); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 172.5 (anion), 154.2, 144.8, 138.2, 134.7, 128.8, 128.0, 128.0, 127.8, 113.0, 107.7, 69.8 (anion), 50.0, 48.7, 47.4.

2.10.3 Otrzymywanie octanu 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydropirydylo[1,2- α]pirymidyniowego (9)



Niskocząsteczkową sól związku bicyklicznego **9** wyizolowano z roztworu polimerowego, przy użyciu chromatografii preparatywnej (PLC). Na płytę PLC nałożono jonowy układ polimerowy, po powstały po procesie cyklizacji polimeru **5c**. Jako fazę rozwijającą zastosowano mieszaninę izopropanolu i wody (7/3, v/v). Część wodna zawierała 5% kwasu octowego, aby wymienić anion poli(kwasu akrylowego). Po rozdziale, produkt wymyto z żelu krzemionkowego przy użyciu wody. Po odparowaniu rozpuszczalnika związek bicykliczny suszono, pod zmniejszonym ciśnieniem, przez 48 h. Otrzymaną sól związku **9** scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 8.02 (d, $J = 4.51$ Hz, 1H), 7.91 (t, $J = 14.63, 7.09$ Hz, 1H), 7.35 – 7.20 (dd, $J=28.72, 8.97$, 1H), 6.89 (t, $J = 12.23, 5.62$ Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.16 (s, 2H), 1.74 (s, 3H w octanie); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] 174.7 (anion), 150.9, 142.1, 140.3, 112.4, 111.5, 69.7 (anion), 50.6, 48.0, 23.4, 18.7.

2.11 Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM_x-PMPyAEA_y

2.11.1 Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07}

2.11.1.1 Reakcja 16.0

W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4a**, 50.0 mg, 0.2 mmol, 10 eq), *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 384.1 mg, 3.4 mmol, 140 eq) oraz 1,1'-

Część eksperymentalna

azobis(cycloheksankarbonitryl (ACHN, 5.92 mg, 0.07 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 89.9 mg, 0.47 mmol, 20 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (19.66 mg, 0.07 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 10 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązań winylowych w monomerach (δ 6.32 – 5.93 ppm, 6H). Polimeryzacja została zakończona po 20 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 65%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃, w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego eteru dietylowego. Polimer suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07}, w postaci proszku, o lekko różowym zabarwieniu, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 8.06 (1H), 6.64 (1H), 6.55 (2H), 4.11 (2H), 3.84 (3H), 2.50 (3H), 2.29 (2H), 1.97 ppm (2H), 1.75 – 1.20 (4H), 1.04 (6H).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 9 200 g/mol, M_w 10 700 g/mol, \bar{D} 1.16.

2.11.1.2 Reakcja 16.3

W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4a**, 100.0 mg, 0.5 mmol, 20 eq), *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 768.2 mg, 6.8 mmol, 280 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl (ACHN, 5.92 mg, 0.024 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 152.2 mg, 0.80 mmol, 33 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (13.11 mg, 0.05 mmol, 2 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie

Część eksperymentalna

mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ^1H NMR. Po 10 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązań winylowych w monomerach (δ 6.32 – 5.93 ppm, 6H). Polimeryzacja została zakończona po 20 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 65%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 , w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego eteru dietylowego. Polimer suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_{0.93}-PMPyAEA_{0.07}, w postaci proszku, o lekko różowym zabarwieniu, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] 8.10 (1H), 7.45 (1H), 6.53 (2H), 4.22 (2H), 3.99 (3H), 3.05 (3H), 2.78 (2H), 1.96 ppm (2H), 1.90 – 1.48 (4H), 1.12 (6H).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 18 200 g/mol, M_w 21 100 g/mol, D 1.16.

2.11.2 Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM_{0.80}-PMPyAEA_{0.20}

W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4a**, 50.0 mg, 0.2 mmol, 30 eq), *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 109.7 mg, 1.0 mmol, 120 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl (ACHN, 1.97 mg, 0.008 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 76.09 mg, 0.40 mmol, 50 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (6.55 mg, 0.02 mmol, 3 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ^1H NMR. Po 10 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązań winylowych monomerów (δ 6.32 – 5.93 ppm, 6H). Polimeryzacja została zakończona po 20 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 65%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku

Część eksperymentalna

czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃, w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego eteru dietylowego. Polimer suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_{0.80}-PMPyAEA_{0.20}, w postaci proszku, o lekko różowym zabarwieniu, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 8.04 (1H), 6.60 (1H), 6.53 (2H), 4.10 (2H), 3.82 (3H), 3.74 (3H), 2.99 (2H), 1.98 ppm (2H), 1.78 – 1.14 (4H), 1.03 (6H).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 10 200 g/mol, M_w 12 200 g/mol, Đ 1.19.

2.11.3 Otrzymywanie kopolimerów PNIPAM_{0.60}-PMPyAEA_{0.40}

W suchej ampułce Schlenka zmieszano akrylan 2-(metylo(pirydyn-2-yl)amino)etylu (**4a**, 800.0 mg, 3.9 mmol, 120 eq), *N*-izopropylakrylamid (NIPAM, 600 mg, 5.3 mmol, 180 eq) oraz 1,1'-azobis(cycloheksankarbonitryl (ACHN, 8.60 mg, 0.035 mmol, 1 eq), jako inicjator. Następnie mieszaninę rozpuszczono w suchym 1,4-dioksanie (2 mL) i dodano aktywowany kwasem *p*-toluenosulfonowym (*p*-TsOH, 1530 mg, 8.0 mmol, 183 eq), roztwór uniwersalnego reagenta RAFT (19.00 mg, 0.07 mmol, 2 eq), w 1,4-dioksanie (2 mL). Całość mieszaniny schłodzono i przeprowadzono trzy cykle *freeze-pump-thaw*. Reakcję zainicjowano przez podgrzanie mieszaniny do 90 °C, w atmosferze azotu. Polimeryzację kontynuowano w podanych warunkach, monitorując jej postęp przy użyciu ¹H NMR. Po 10 h reakcji stwierdzono zmniejszenie sygnałów charakterystycznych dla protonów wiązań winylowych monomerów (δ 6.32 – 5.93 ppm, 6H). Polimeryzacja została zakończona po 20 h, po osiągnięciu zadowalającej konwersji monomeru (> 65%). Zakończenie reakcji polegało na wymrożeniu kolby Schlenka w ciekłym azocie, w wyniku czego wygaszono wszystkie wolne rodniki. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej (25 °C), zneutralizowano ją nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃, w wyniku czego wytrącił się biały osad, który odfiltrowano. Rozpuszczalnik usunięto pod obniżonym ciśnieniem, po czym polimer oczyszczono poprzez precypitację, z zimnego eteru dietylowego. Polimer suszono pod próżnią przez 24 h. Otrzymany PNIPAM_{0.60}-PMPyAEA_{0.40}, w postaci proszku,

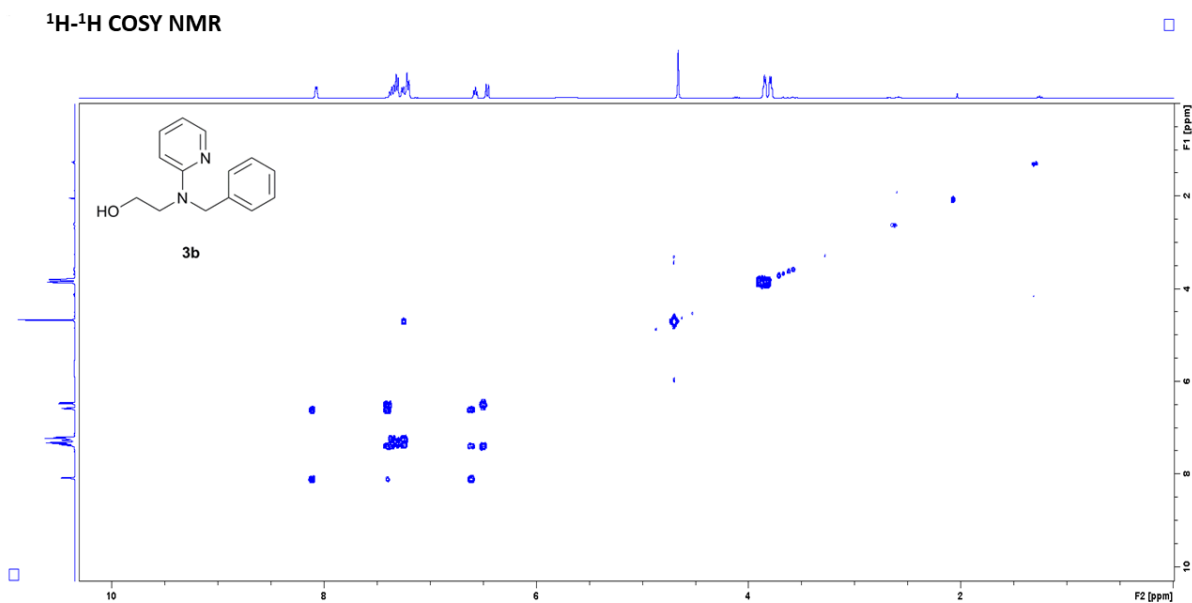
Część eksperymentalna

o różowym zabarwieniu, scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz chromatografii GPC/SEC.

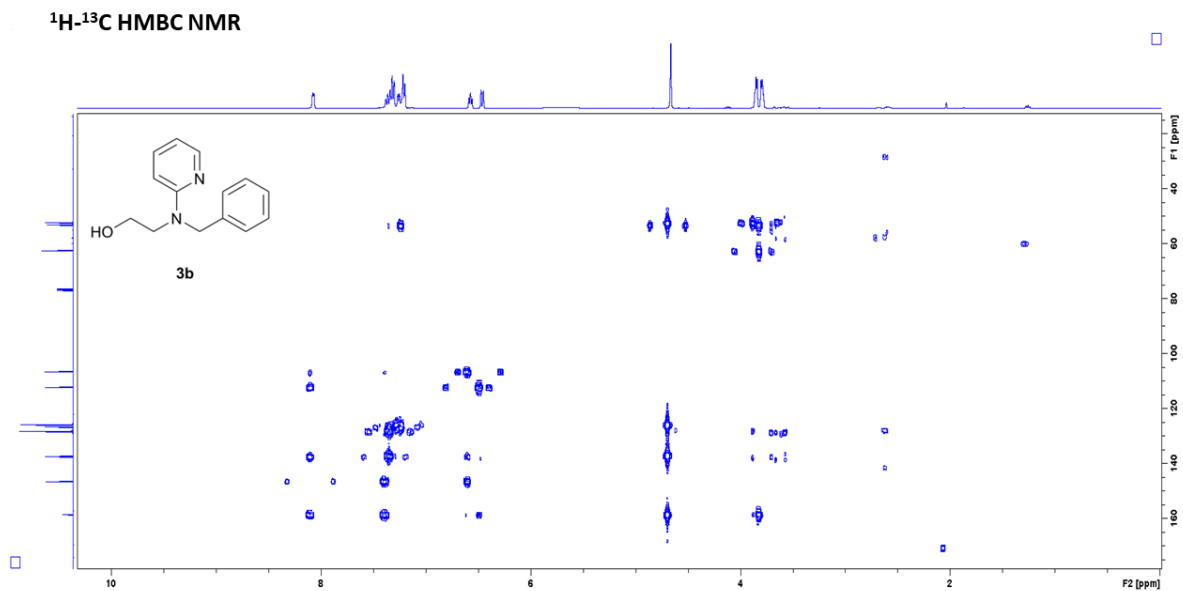
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] 8.14 (1H), 6.81 (3H), 4.29 (2H), 3.96 (3H), 3.63 (3H), 3.25 (2H), 2.14 ppm (2H), 1.97 – 1.45 (4H), 1.12 (6H).

GPC/SEC (THF, 1%TBAB, 30 °C RID) M_n 12 900 g/mol, M_w 15 400 g/mol, \bar{D} 1.20.

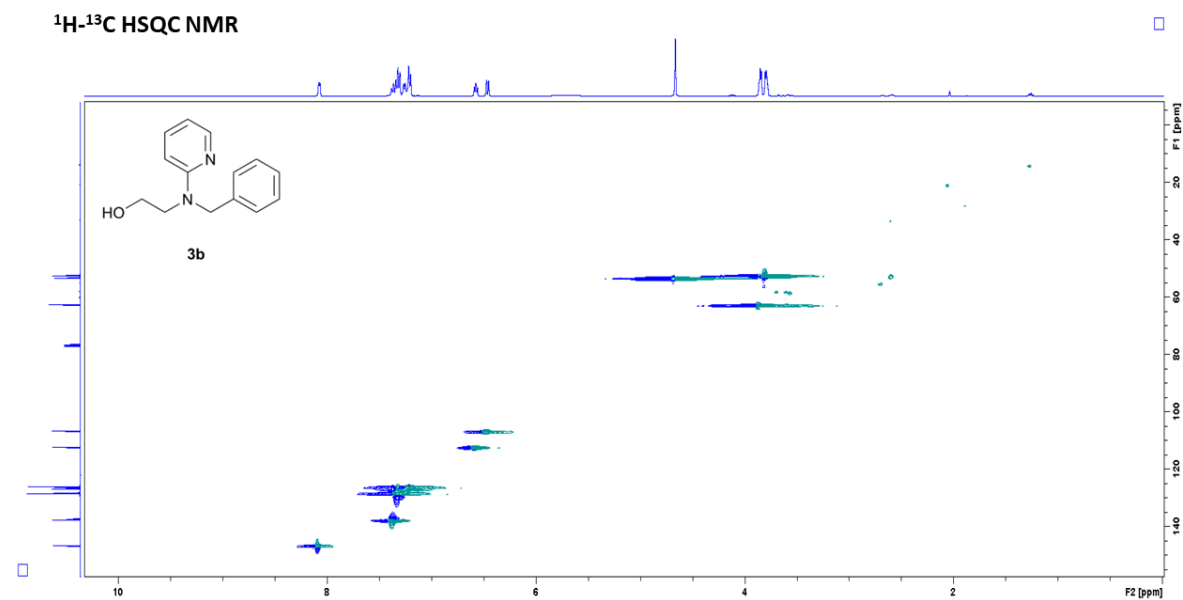
2.12 Widma 2D NMR



Rysunek 59 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^1H COSY NMR (F1 400 MHz, F2 400 MHz, CDCl_3) alkoholu **3b**.

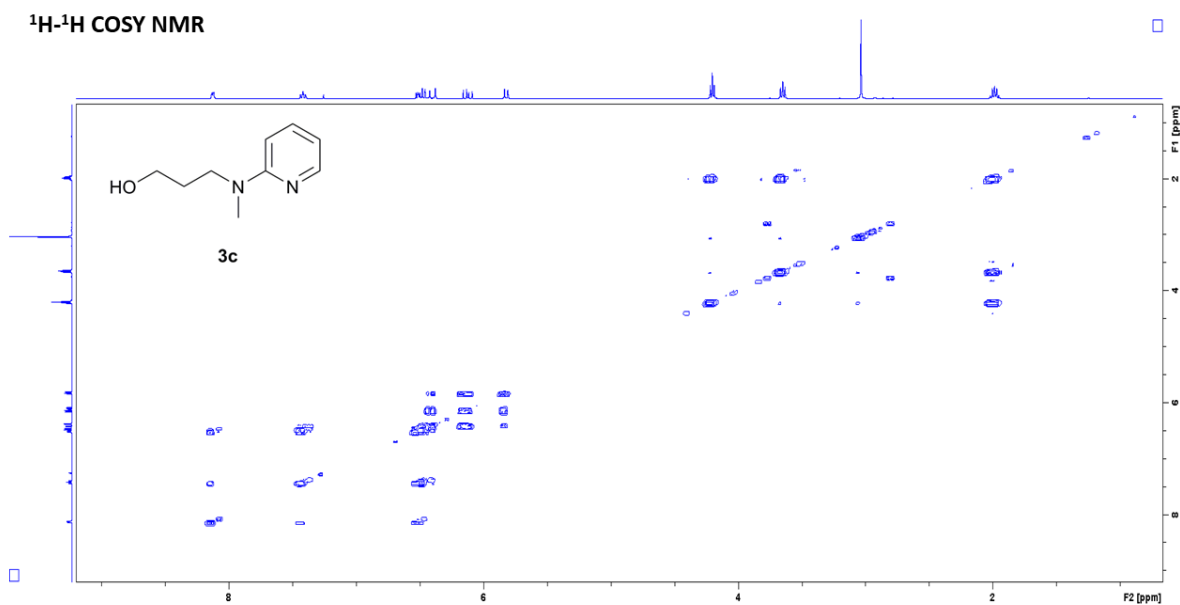


Rysunek 61 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^{13}C HMBC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, CDCl_3) alkoholu **3b**.

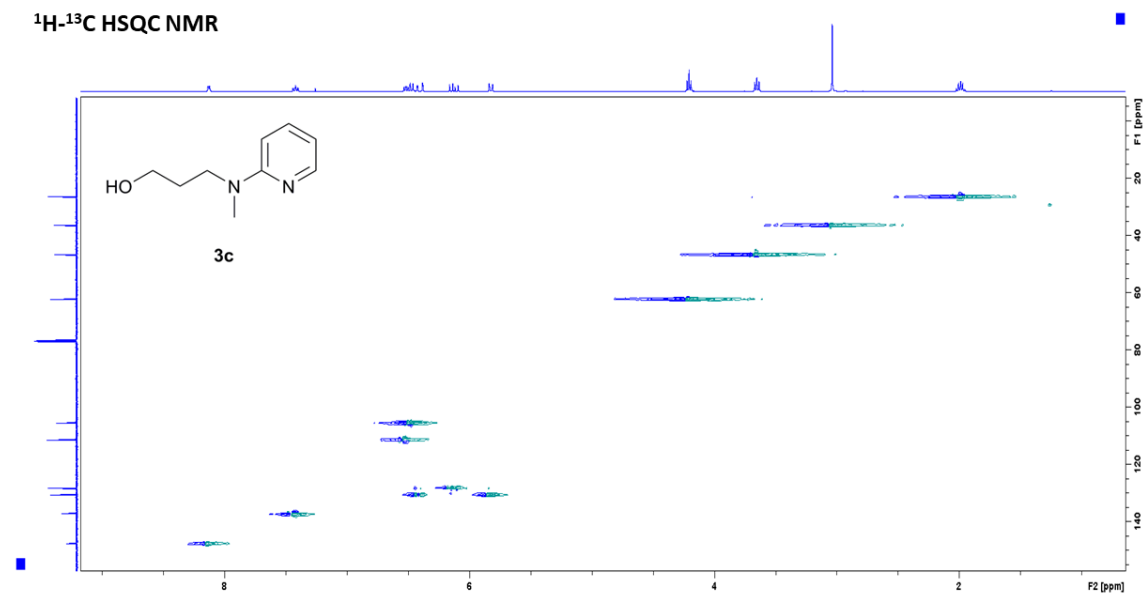


Rysunek 60 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^{13}C HSQC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, CDCl_3) alkoholu **3b**.

Część eksperymentalna

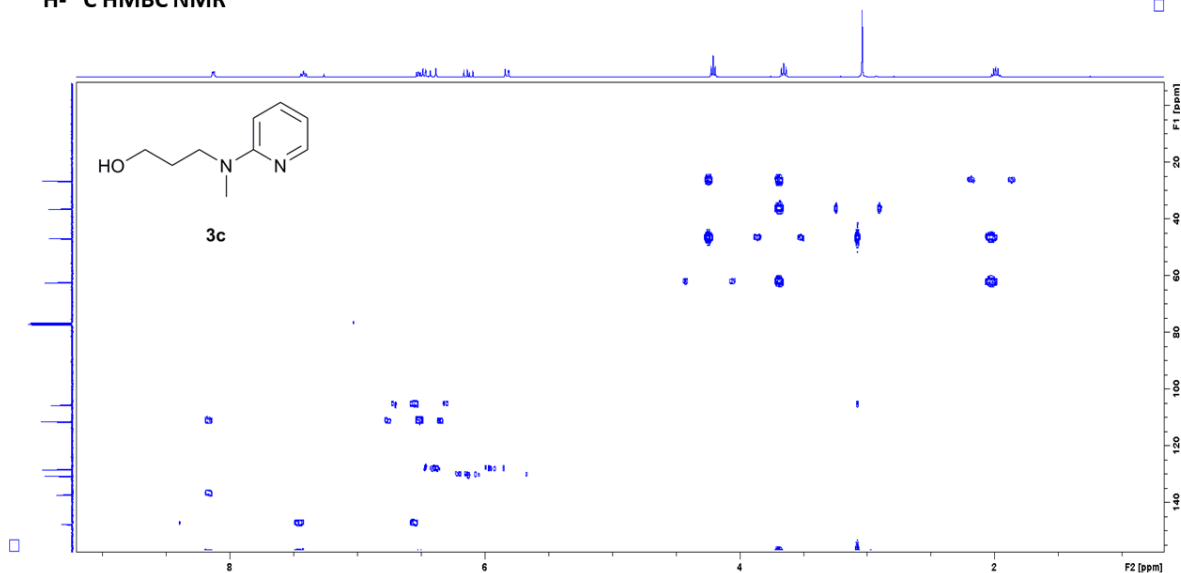


Rysunek 62 Widmo dwuwymiarowe ¹H-¹H COSY NMR (F1 400 MHz, F2 400 MHz, CDCl₃) alkoholu **3c**.



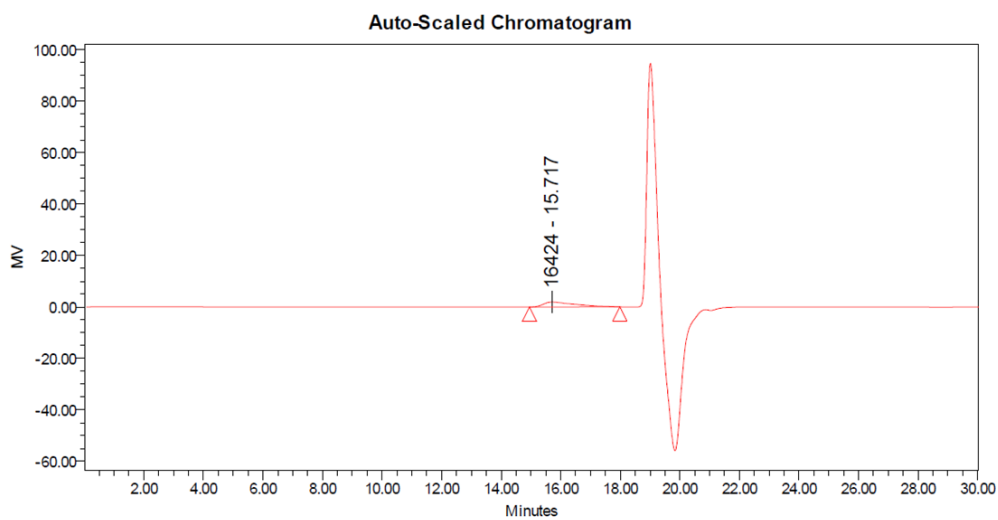
Rysunek 63 Widmo dwuwymiarowe ¹H-¹³C HSQC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, CDCl₃) alkoholu **3c**.

^1H - ^{13}C HMBC NMR



Rysunek 64 Widmo dwuwymiarowe ^1H - ^{13}C HMBC NMR (F1 100 MHz, F2 400 MHz, CDCl_3) alkoholu **3c**.

2.13 Wyniki analizy chromatograficznej

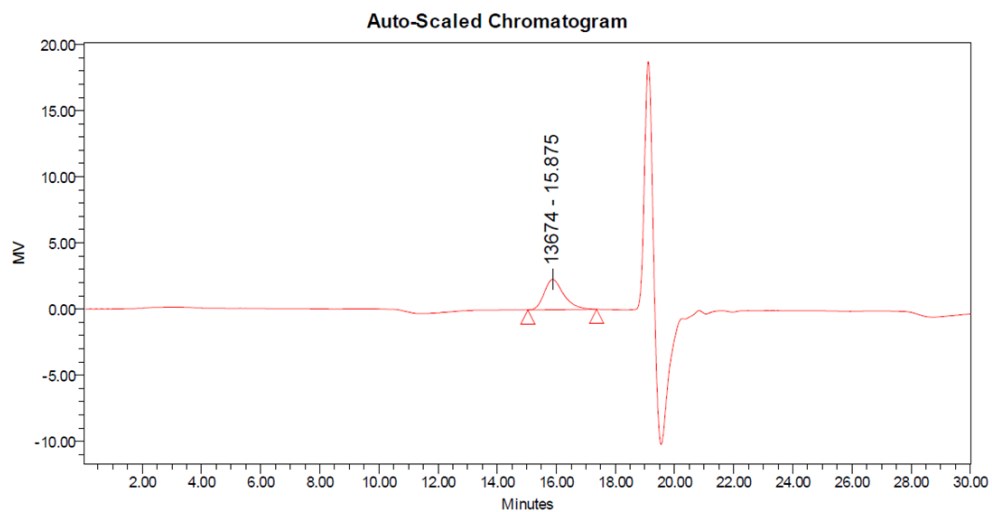


GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1 PNIPAM	7908	12189	16424	15877	18651	-	1.541343	-	-

Rysunek 65 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla polimeru PNIPAM_(10kDa).

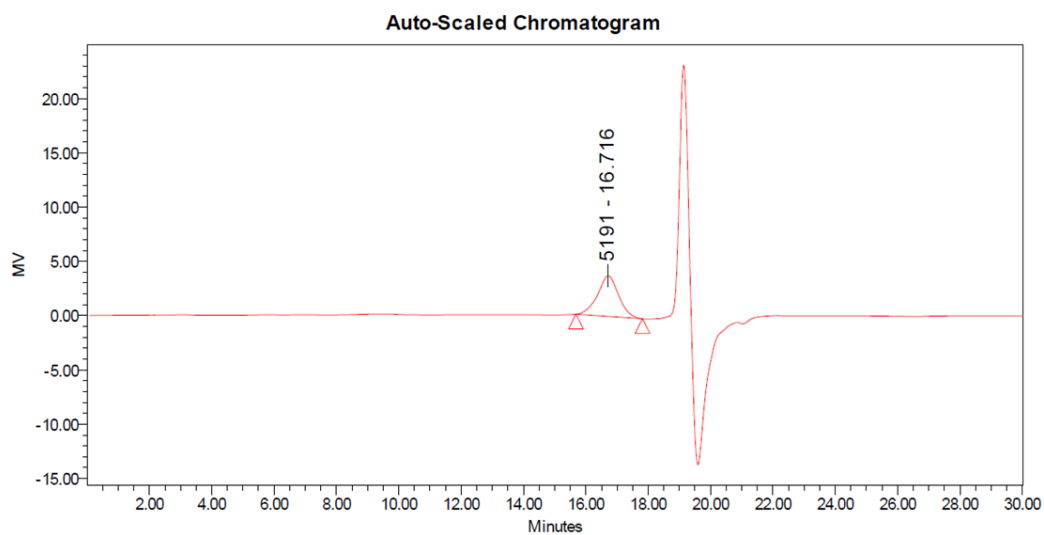
Część eksperymentalna



GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1 PNIPAM	11257	13109	13674	14804	16382	-	1.164506	-	-

Rysunek 67 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla polimeru PNIPAM_(DDMAT).

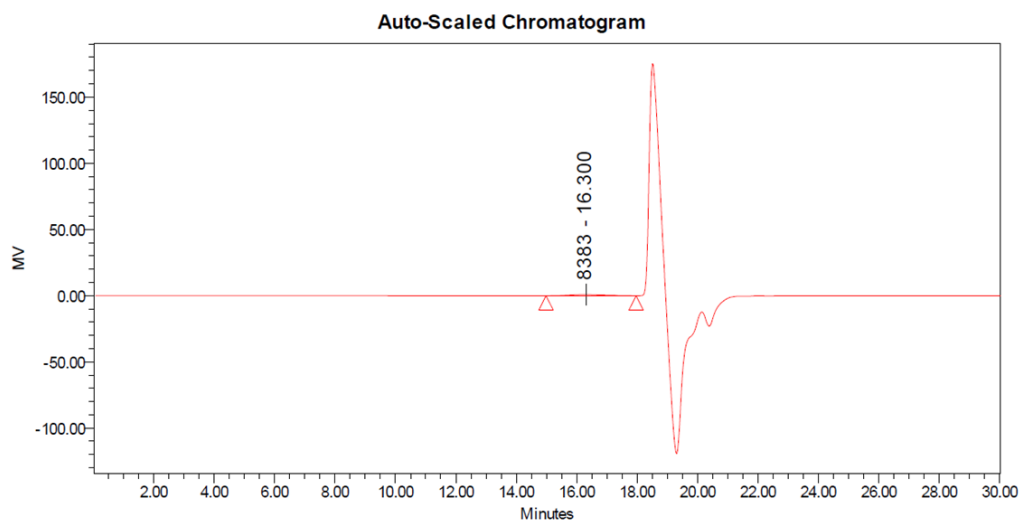


GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1 PNIPAM	4839	5600	5191	6477	7459	-	1.157380	-	-

Rysunek 66 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla polimeru PNIPAM_(sRAFT).

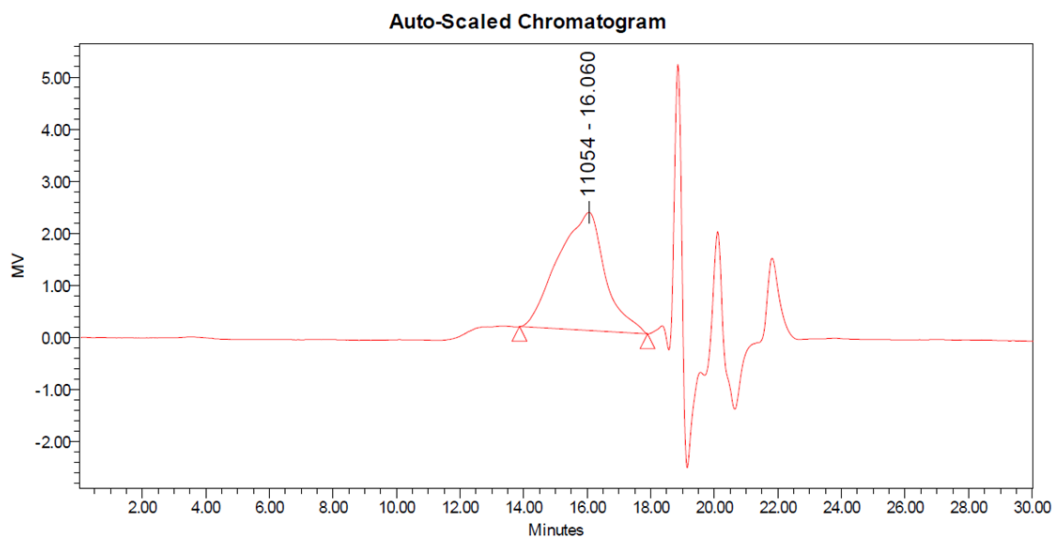
Część eksperymentalna



GPC Results

	Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1	5b	6005	8922	8383	12327	15704	-	1.485774	-	-

Rysunek 69 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla polimeru **5b**.

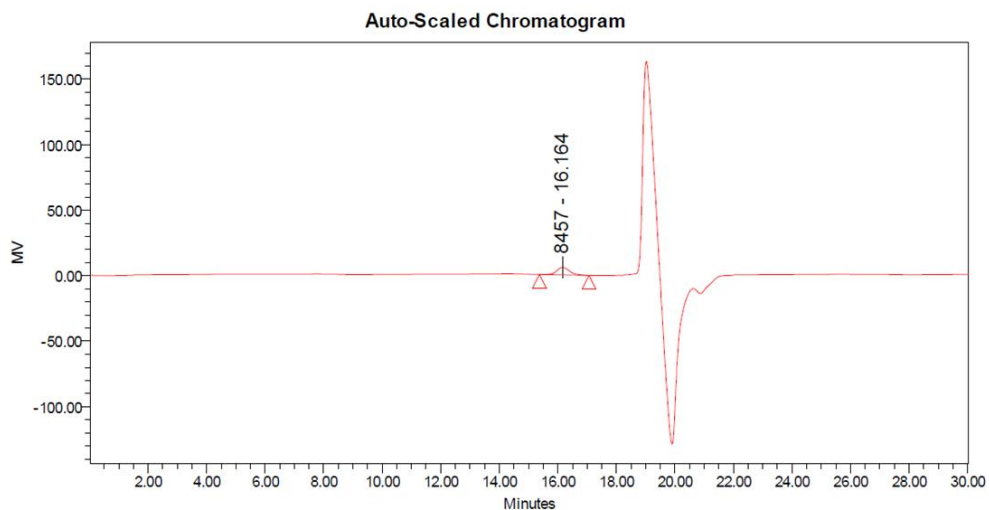


GPC Results

	Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1	8c	10789	20930	11054	36760	54504	-	1.939892	-	-

Rysunek 70 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla polimeru **8c**.

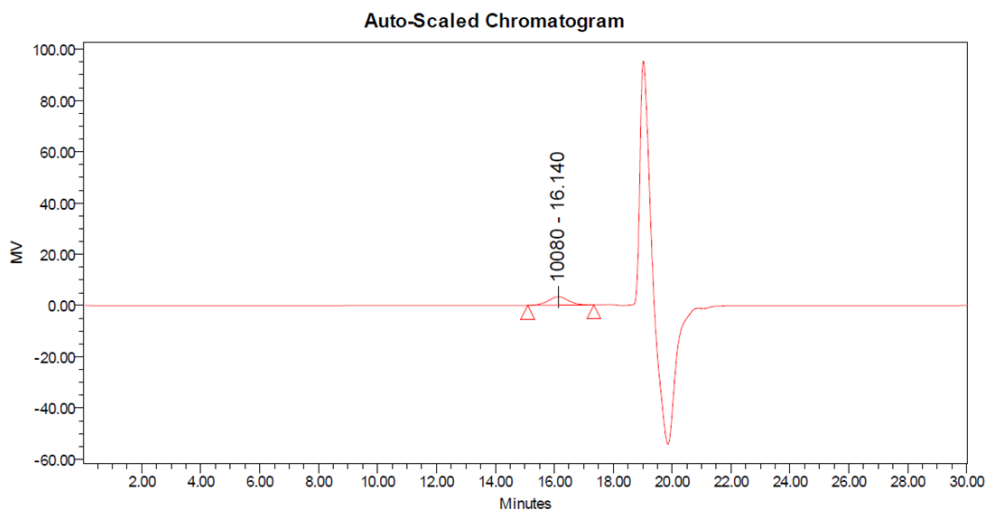
Część eksperymentalna



GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1 PS 9500	7894	8435	8457	8985	9559	-	1.068461	-	-

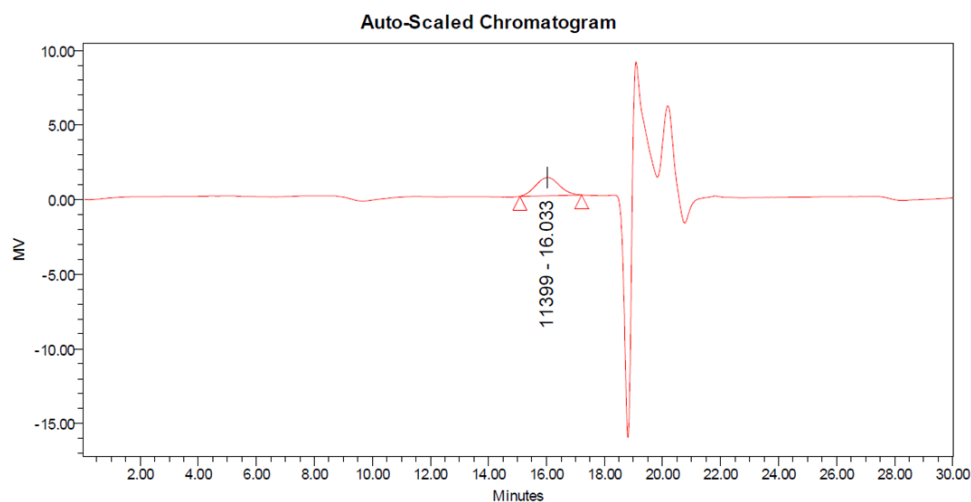
Rysunek 71 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla standardu polistyrenu, o M_n 9500 g/mol.



GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1 16.0	9203	10666	10080	12262	13986	-	1.158938	-	-

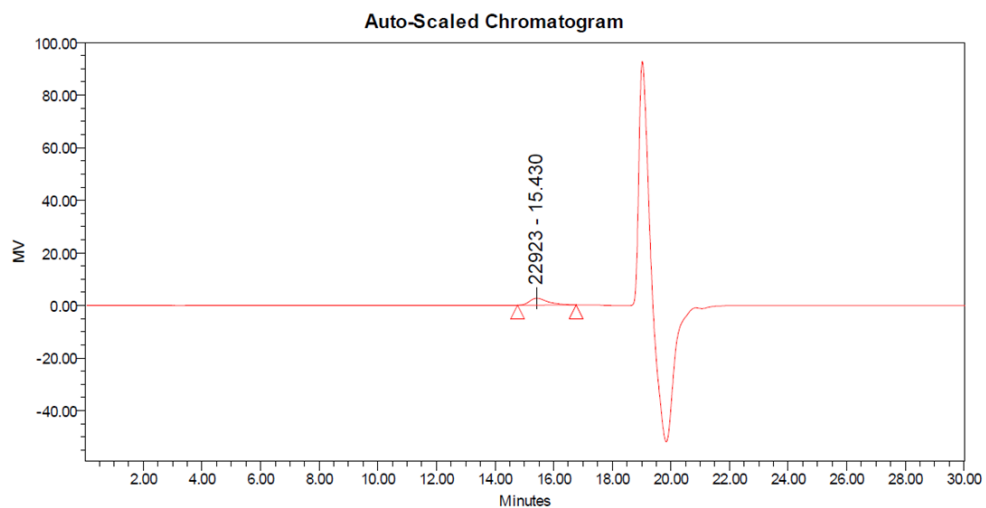
Rysunek 72 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla kopolimeru PNIPAM_{0.93} – PMPyAEA_{0.07} (produkt reakcji 16.0).



GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2	
1	16.1	10172	12141	11399	14280	16463	-	1.193584	-	-

Rysunek 73 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla kopolimeru PNIPAM_{0.80} – PMPyAEA_{0.20}.

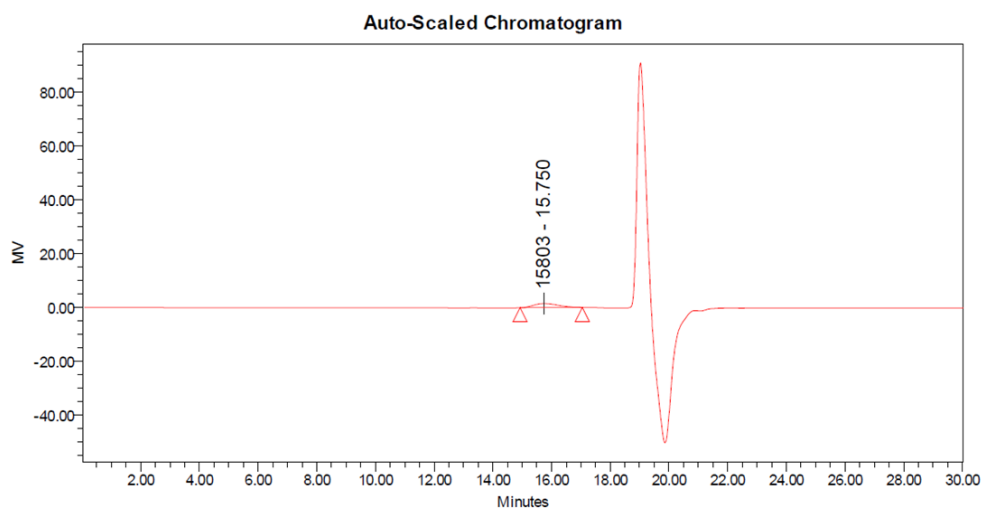


GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2	
1	16.3	18239	21107	22923	23632	25842	-	1.157241	-	-

Rysunek 74 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla kopolimeru PNIPAM_{0.93} – PMPyAEA_{0.07} (produkt reakcji 16.3).

Część eksperymentalna



GPC Results

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2	
1	16.6	12881	15359	15803	17849	20196	-	1.192389	-	-

Rysunek 75 Chromatogram oraz wartości średnich mas molowych dla kopolimeru PNIPAM_{0.60} – PMPyAEA_{0.40}.

V. Bibliografia

1. Debotton, N. & Dahan, A. Applications of Polymers as Pharmaceutical Excipients in Solid Oral Dosage Forms. *Med. Res. Rev.* **37**, 52–97 (2017).
2. Li, B. *et al.* Asymmetric copolymer vesicles to serve as a hemoglobin vector for ischemia therapy. *Biomater. Sci.* **2**, 1254–1261 (2014).
3. Huang, K.-S. *et al.* Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 (2016).
4. Teo, A. J. T. *et al.* Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2**, 454–472 (2016).
5. Fairbanks, B. D., Gunatillake, P. A. & Meagher, L. Biomedical applications of polymers derived by reversible addition – fragmentation chain-transfer (RAFT). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **91**, 141–152 (2015).
6. Stenzel, M. H. Glycopolymers for Drug Delivery: Opportunities and Challenges. *Macromolecules* (2022) doi:10.1021/acs.macromol.2c00557.
7. Jacob, J., Haponiuk, J. T., Thomas, S. & Gopi, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Mater. Today Chem.* **9**, 43–55 (2018).
8. Cobo, I., Li, M., Sumerlin, B. S. & Perrier, S. Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. *Nat. Mater.* **14**, 143–159 (2015).
9. Nair, D. P. *et al.* The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **26**, 724–744 (2014).
10. Spiegel, S. Recent advances in applied polymer science. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 46279 (2018).
11. Davidenko, N., Cameron, R. & Best, S. Natural Biopolymers for Biomedical Applications. in *Encyclopedia of Biomedical Engineering* 162–176 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11026-8.
12. AZEVEDO, H. S., SANTOS, T. C. & REIS, R. L. Controlling the degradation of natural polymers for biomedical applications. in *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications* (eds. Reis, R. L. et al.) 106–128 (Elsevier, 2008). doi:10.1533/9781845694814.1.106.
13. Patrick, G. L. *Chemia medyczna. Podstawowe zagadnienia.* (Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2003).
14. Vilar, G., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery* vol. 9 367–394 (2012).

Bibliografia

15. KOZIOLOVÁ, E., VENCLÍKOVÁ, K. & ETRYCH, T. Polymer-Drug Conjugates in Inflammation Treatment. *Physiol. Res.* **67**, S281–S292 (2018).
16. Dimitrov, D. S. *Therapeutic Proteins. Methods in Molecular Biology* vol. 899 (Humana Press, 2012).
17. Al-Tahami, K. & Singh, J. Smart Polymer Based Delivery Systems for Peptides and Proteins. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **1**, 65–71 (2007).
18. Hoffman, A. S. *et al.* Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 577–586 (2000).
19. Wang, Y. & Wu, C. Site-Specific Conjugation of Polymers to Proteins. *Biomacromolecules* **19**, 1804–1825 (2018).
20. Ju, Y., Zhang, Y. & Zhao, H. Fabrication of Polymer–Protein Hybrids. *Macromol. Rapid Commun.* **39**, 1–17 (2018).
21. Magnusson, J. P., Bersani, S., Salmaso, S., Alexander, C. & Caliceti, P. In Situ Growth of Side-Chain PEG Polymers from Functionalized Human Growth Hormone—A New Technique for Preparation of Enhanced Protein–Polymer Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **21**, 671–678 (2010).
22. Liu, J. *et al.* In situ formation of protein-polymer conjugates through reversible addition fragmentation chain transfer polymerization. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 3099–3103 (2007).
23. Santana-Armas, M. L. & Tros de Ilarduya, C. Strategies for cancer gene-delivery improvement by non-viral vectors. *Int. J. Pharm.* **596**, 120291 (2021).
24. Ita, K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks. *Eur. J. Pharm. Sci.* **150**, 105358 (2020).
25. Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 159–170 (2010).
26. Sung, Y. K. & Kim, S. W. Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomater. Res.* **23**, 8 (2019).
27. DUFES, C., UCHEGBU, I. & SCHATZLEIN, A. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2177–2202 (2005).
28. Vetter, V. C. & Wagner, E. Targeting nucleic acid-based therapeutics to tumors: Challenges and strategies for polyplexes. *J. Control. Release* **346**, 110–135 (2022).
29. Lai, W.-F. *et al.* Cyclodextrin-PEI-Tat Polymer as a Vector for Plasmid DNA Delivery to Placenta Mesenchymal Stem Cells. *Bionanoscience* **1**, 89–96 (2011).

Bibliografia

30. Adepu, S. & Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* vol. 26 (2021).
31. Jacob, J., Haponiuk, J. T., Thomas, S. & Gopi, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Mater. Today Chem.* **9**, 43–55 (2018).
32. Le, P. N., Huynh, C. K. & Tran, N. Q. Advances in thermosensitive polymer-grafted platforms for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **92**, 1016–1030 (2018).
33. Mok, H. & Park, T. G. Functional Polymers for Targeted Delivery of Nucleic Acid Drugs. *Macromol. Biosci.* **9**, 731–743 (2009).
34. Kavand, A., Anton, N., Vandamme, T., Serra, C. A. & Chan-Seng, D. Synthesis and functionalization of hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *J. Control. Release* **321**, 285–311 (2020).
35. Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 581–593 (2005).
36. Dinçer, S., Türk, M. & Pişkin, E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, S139–S145 (2005).
37. de la Rosa, V. R., Woisel, P. & Hoogenboom, R. Supramolecular control over thermoresponsive polymers. *Mater. Today* **19**, 44–55 (2016).
38. Kakizawa, Y. & Kataoka, K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 203–222 (2002).
39. Connor, E. F., Lees, I. & Maclean, D. Polymers as drugs—Advances in therapeutic applications of polymer binding agents. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **55**, 3146–3157 (2017).
40. Li, J., Yu, F., Chen, Y. & Oupický, D. Polymeric drugs: Advances in the development of pharmacologically active polymers. *J. Control. Release* **219**, 369–382 (2015).
41. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 347–360 (2003).
42. Cizman, B. Hyperphosphataemia and treatment with sevelamer in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 47v – 49 (2003).
43. Zecca, C., Caporro, M., Disanto, G. & Gobbi, C. Two decades of subcutaneous glatiramer acetate injection: current role of the standard dose, and new high-dose low-frequency glatiramer acetate in relapsing–remitting multiple sclerosis treatment. *Patient Prefer. Adherence* **8**, 1123 (2014).

Bibliografia

44. Wei, M., Gao, Y., Li, X. & Serpe, M. J. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym. Chem.* **8**, 127–143 (2017).
45. Sponchioni, M., Capasso Palmiero, U. & Moscatelli, D. Thermo-responsive polymers: Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **102**, 589–605 (2019).
46. Su, M. *et al.* Enzymatic multifunctional biodegradable polymers for pH- and ROS-responsive anticancer drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **193**, 111067 (2020).
47. Bazban-Shotorbani, S. *et al.* Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications. *J. Control. Release* **253**, 46–63 (2017).
48. Lin, S. & Theato, P. CO₂-Responsive Polymers. *Macromol. Rapid Commun.* **34**, 1118–1133 (2013).
49. Deng, Z., Hu, J. & Liu, S. Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species (RONSS)-Responsive Polymersomes for Triggered Drug Release. *Macromol. Rapid Commun.* **38**, 1600685 (2017).
50. Gandhi, A., Paul, A., Sen, S. O. & Sen, K. K. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 99–107 (2015).
51. Yap, J. E., Zhang, L., Lovegrove, J. T., Beves, J. E. & Stenzel, M. H. Visible Light—Responsive Drug Delivery Nanoparticle via Donor–Acceptor Stenhouse Adducts (DASA). *Macromol. Rapid Commun.* **41**, 2000236 (2020).
52. Zhou, Y. *et al.* Light-responsive polymersomes with a charge-switch for targeted drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **8**, 727–735 (2020).
53. Miyata, T., Uragami, T. & Nakamae, K. Biomolecule-sensitive hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 79–98 (2002).
54. Volpatti, L. R., Burns, D. M., Basu, A., Langer, R. & Anderson, D. G. Engineered insulin-polycation complexes for glucose-responsive delivery with high insulin loading. *J. Control. Release* **338**, 71–79 (2021).
55. Zhang, R., Bowyer, A., Eisenthal, R. & Hubble, J. A smart membrane based on an antigen-responsive hydrogel. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 976–984 (2007).
56. Roy, D., Cambre, J. N. & Sumerlin, B. S. Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 278–301 (2010).
57. Zhang, Q., Colazo, J., Berg, D., Mugo, S. M. & Serpe, M. J. Multiresponsive Nanogels for Targeted Anticancer Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **14**, 2624–2628 (2017).

Bibliografia

58. Jia, T., Huang, S., Yang, C. & Wang, M. Unimolecular Micelles of Amphiphilic Cyclodextrin-Core Star-Like Copolymers with Covalent pH-Responsive Linkage of Anticancer Prodrugs. *Mol. Pharm.* **14**, 2529–2537 (2017).
59. Zhao, Z., Lou, S., Hu, Y., Zhu, J. & Zhang, C. A Nano-in-Nano Polymer–Dendrimer Nanoparticle-Based Nanosystem for Controlled Multidrug Delivery. *Mol. Pharm.* **14**, 2697–2710 (2017).
60. Dušek, K. & Dušková-Smrčková, M. Volume Phase Transition in Gels: Its Discovery and Development. *Gels* **6**, 22 (2020).
61. Gao, Z. G., Lee, D. H., Kim, D. I. & Bae, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle targeting acidic extracellular pH of human ovarian A2780 tumor in mice. *J. Drug Target.* **13**, 391–397 (2005).
62. Lee, E. S., Na, K. & Bae, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J. Control. Release* **103**, 405–418 (2005).
63. Kocak, G., Tuncer, C. & Bütün, V. pH-Responsive polymers. *Polym. Chem.* **8**, 144–176 (2017).
64. Schmaljohann, D. *et al.* Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1655–1670 (2006).
65. Ofridam, F. *et al.* pH-sensitive polymers: Classification and some fine potential applications. *Polym. Adv. Technol.* **32**, 1455–1484 (2021).
66. Wang, Y., Luo, Q., Zhu, W., Li, X. & Shen, Z. Reduction/pH dual-responsive nano-prodrug micelles for controlled drug delivery. *Polym. Chem.* **7**, 2665–2673 (2016).
67. Storrie, H. & Mooney, D. J. Sustained delivery of plasmid DNA from polymeric scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 500–514 (2006).
68. Dai, S., Ravi, P. & Tam, K. C. pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications. *Soft Matter* **4**, 435–449 (2008).
69. Musarurwa, H. & Tawanda Tavengwa, N. Recent progress in the application of pH-responsive polymers in separation science. *Microchem. J.* **179**, 107503 (2022).
70. Lv, Q. *et al.* Highly efficient removal of trace metal ions by using poly(acrylic acid) hydrogel adsorbent. *Mater. Des.* **181**, 107934 (2019).
71. Wang, Y. *et al.* Chitosan cross-linked poly(acrylic acid) hydrogels: Drug release control and mechanism. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **152**, 252–259 (2017).
72. Zhang, X. *et al.* Fabrication of adhesive hydrogels based on poly (acrylic acid) and modified hyaluronic acid. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **126**, 105044 (2022).

Bibliografia

73. Rabek, J. F. *Współczesna wiedza o polimerach. Polimery naturalne i syntetyczne, otrzymywanie i zastosowanie.* (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2017).
74. Zarrintaj, P. *et al.* Thermo-sensitive polymers in medicine: A review. *Eur. Polym. J.* **117**, 402–423 (2019).
75. Taylor, M. J., Tomlins, P. & Sahota, T. S. Thermoresponsive Gels. *Gels* vol. 3 (2017).
76. Hiemenz, Paul C., Lodge, T. P. *Polymer Chemistry.* (Taylor & Francis, 2007).
77. Swift, T., Swanson, L., Geoghegan, M. & Rimmer, S. The pH-responsive behaviour of poly(acrylic acid) in aqueous solution is dependent on molar mass. *Soft Matter* **12**, 2542–2549 (2016).
78. Guan, Y. & Zhang, Y. PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter* **7**, 6375 (2011).
79. Xu, X. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers* vol. 12 (2020).
80. Lanzalaco, S. & Armelin, E. Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* vol. 3 (2017).
81. Niskanen, J. & Tenhu, H. How to manipulate the upper critical solution temperature (UCST)? *Polym. Chem.* **8**, 220–232 (2017).
82. Kohno, Y., Saita, S., Men, Y., Yuan, J. & Ohno, H. Thermoresponsive polyelectrolytes derived from ionic liquids. *Polym. Chem.* **6**, 2163–2178 (2015).
83. Flory, P. J. & Osterheld, J. E. Intrinsic Viscosities of Polyelectrolytes. Poly-(acrylic Acid). *J. Phys. Chem.* **58**, 653–661 (1954).
84. Seuring, J. & Agarwal, S. Polymers with Upper Critical Solution Temperature in Aqueous Solution: Unexpected Properties from Known Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2**, 597–600 (2013).
85. Yoshimitsu, H., Kanazawa, A., Kanaoka, S. & Aoshima, S. Well-Defined Polymeric Ionic Liquids with an Upper Critical Solution Temperature in Water. *Macromolecules* **45**, 9427–9434 (2012).
86. Seuring, J. & Agarwal, S. Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 1898–1920 (2012).

Bibliografia

87. Sun, W., An, Z. & Wu, P. UCST or LCST? Composition-Dependent Thermoresponsive Behavior of Poly(N -acryloylglycinamide- co -diacetone acrylamide). *Macromolecules* **50**, 2175–2182 (2017).
88. Najafi, M., Habibi, M., Fokkink, R., Hennink, W. E. & Vermonden, T. LCST polymers with UCST behavior. *Soft Matter* **17**, 2132–2141 (2021).
89. Papadakis, C. M., Müller-Buschbaum, P. & Laschewsky, A. Switch It Inside-Out: “Schizophrenic” Behavior of All Thermoresponsive UCST–LCST Diblock Copolymers. *Langmuir* **35**, 9660–9676 (2019).
90. Jenkins, A. D., Kratochvíl, P., Stepto, R. F. T. & Suter, U. W. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* **68**, 2287–2311 (1996).
91. Braunecker, W. A. & Matyjaszewski, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 93–146 (2007).
92. Müller, A. H. E. & Matyjaszewski, K. *Controlled and Living Polymerizations: From Mechanisms to Applications*. *Controlled and Living Polymerizations: From Mechanisms to Applications* (2010). doi:10.1002/9783527629091.
93. Matyjaszewski, K. & Davis, T. P. *Handbook of Radical Polymerization*. (Wiley, 2003).
94. Bagheri, A., Boniface, S. & Fellows, C. M. Reversible-Deactivation Radical Polymerisation: chain polymerisation made simple. *Chem. Teach. Int.* **3**, 19–32 (2021).
95. Muller, Axel H.E, Matyjaszewski, K. *Control and Living Polymerizations*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009).
96. Jenkins, A. D., Jones, R. G. & Moad, G. Terminology for reversible-deactivation radical polymerization previously called ‘controlled’ radical or ‘living’ radical polymerization (IUPAC recommendations 2010). *Pure Appl. Chem.* **82**, 483–491 (2010).
97. Grubbs, R. B. Nitroxide-Mediated Radical Polymerization: Limitations and Versatility. *Polym. Rev.* **51**, 104–137 (2011).
98. Krol, P. & Chmielarz, P. Przegląd najważniejszych metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej (CRP). *Polimery* **5**, 347–426 (2011).
99. Matyjaszewski, K. Controlled radical polymerization. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1**, 769–776 (1996).
100. Moad, G. RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers. *Polym. Chem.* **8**, 177–219 (2017).

Bibliografia

101. Nothling, M. D. *et al.* Progress and Perspectives Beyond Traditional RAFT Polymerization. *Adv. Sci.* **7**, 1–12 (2020).
102. Semsarilar, M. & Perrier, S. 'Green' reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization. *Nat. Chem.* **2**, 811–820 (2010).
103. Perrier, S. *et al.* Searching for more effective agents and conditions for the RAFT polymerization of MMA: Influence of dithioester substituents, solvent, and temperature. *Macromolecules* **5**, 3129–3140 (2017).
104. Podzimek, S. *et al.* Recent advances in stimuli-responsive polymer systems for remotely controlled drug release. *Macromolecules* **3**, 101164 (2019).
105. Barner, L. & Perrier, S. Polymers with Well-Defined End Groups via RAFT - Synthesis, Applications and Postmodifications. *Handb. RAFT Polym.* 455–482 (2008) doi:10.1002/9783527622757.ch12.
106. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer (Guildf)*. **49**, 1079–1131 (2008).
107. Semsarilar, M. & Abetz, V. Polymerizations by RAFT: Developments of the Technique and Its Application in the Synthesis of Tailored (Co)polymers. *Macromol. Chem. Phys.* **222**, 2000311 (2021).
108. Keddie, D. J. A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 496–505 (2014).
109. Willcock, H. & O'Reilly, R. K. End group removal and modification of RAFT polymers. *Polym. Chem.* **1**, 149–157 (2010).
110. Benaglia, M. *et al.* Universal (Switchable) RAFT Agents Universal (Switchable) RAFT Agents. *Society* 6914–6915 (2009) doi:10.1021/ja901955n.
111. Stace, S. J., Fellows, C. M., Moad, G. & Keddie, D. J. Effect of the Z- and Macro-R-Group on the Thermal Desulfurization of Polymers Synthesized with Acid/Base "Switchable" Dithiocarbamate RAFT Agents. *Macromol. Rapid Commun.* **39**, 1–9 (2018).
112. Stace, S. J., Moad, G., Fellows, C. M. & Keddie, D. J. The effect of Z-group modification on the RAFT polymerization of N-vinylpyrrolidone controlled by "switchable" N-pyridyl-functional dithiocarbamates. *Polym. Chem.* **6**, 7119–7126 (2015).
113. Carraher, C. E. J. *Polymer chemistry. Science in the Twentieth Century* (Marcel Dekker, INC, 2003).

Bibliografia

114. Rabek, J. F. *Współczesna wiedza o polimerach. Budowa strukturalna polimerów i metody badawcze.* (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2017).
115. Johnson, L. M. *et al.* Impact of Polymer Excipient Molar Mass and End Groups on Hydrophobic Drug Solubility Enhancement. *Macromolecules* **50**, 1102–1112 (2017).
116. Kosbar, L. L. & Wenzel, T. J. Inclusion of Synthetic Polymers within the Curriculum of the ACS Certified Undergraduate Degree. *J. Chem. Educ.* **94**, 1599–1602 (2017).
117. Hanton, S. D. Mass Spectrometry of Polymers and Polymer Surfaces. *Chem. Rev.* **101**, 527–570 (2001).
118. Macha, S. F. & Limbach, P. a. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of polymers. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **6**, 213–220 (2002).
119. Lou, Y., Fulchiron, D., Rea, J. & Darer, L. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Complex and Novel Biotherapeutic Products. *LCGC Eur.* **33**, 87–95 (2020).
120. Snejdrova, E., Podzimek, S., Martiska, J., Holas, O. & Dittrich, M. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharm.* **70**, 63–75 (2020).
121. Held, D. Tips & Tricks GPC/ SEC: What Are the Differences Between GPC, SEC, and GFC, and How Do You Get Started with the Technique? *The Column* **14**, 2–8 (2018).
122. Boczkaj, G., Fokt, A., Mamotko, M. & Kamiński, M. Zastosowania chromatografii wykluczania (SEC) w analityce technicznej i preparatyce - część I-sza. *Camera Separatoria* **6**, 87–105 (2014).
123. Wang, W.-J., Kharchenko, S., Migler, K. & Zhu, S. Triple-detector GPC characterization and processing behavior of long-chain-branched polyethylene prepared by solution polymerization with constrained geometry catalyst. *Polymer (Guildf).* **45**, 6495–6505 (2004).
124. Se, K., Sakakibara, T. & Ogawa, E. Molecular weight determination of star polymers and star block copolymers using GPC equipped with low-angle laser light-scattering. *Polymer (Guildf).* **43**, 5447–5453 (2002).
125. Crotty, S., Gerişlioğlu, S., Endres, K. J., Wesdemiotis, C. & Schubert, U. S. Polymer architectures via mass spectrometry and hyphenated techniques: A review. *Anal. Chim. Acta* **932**, 1–21 (2016).
126. Kou, D., Manius, G., Zhan, S. & Chokshi, H. P. Size exclusion chromatography with Corona charged aerosol detector for the analysis of polyethylene glycol polymer. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5424–5428 (2009).

Bibliografia

127. Held, D. & Wolfgang, R. Tips & Tricks GPC/SEC: Cumulative Distributions and Cumulative Match Calibration. *The Column* **17**, 37–31 (2021).
128. Held, D. & Wolfgang, R. Tips & Tricks GPC/SEC: Separation Range and Resolution. *The Column* **17**, 26–30 (2021).
129. Wackerly, J. W. & Dunne, J. F. Synthesis of Polystyrene and Molecular Weight Determination by ¹H NMR End-Group Analysis. *J. Chem. Educ.* **94**, 1790–1793 (2017).
130. Hatada, K., Kitayama, T., Ute, K., Terawaki, Y. & Yanagida, T. End-Group Analysis of Poly(methyl methacrylate) Prepared with Benzoyl Peroxide by 750 MHz High-Resolution ¹H NMR Spectroscopy. *Macromolecules* **30**, 6754–6759 (1997).
131. Lappan, U., Fuchs, B., Geißler, U., Scheler, U. & Lunkwitz, K. Number-average molecular weight of radiation-degraded poly(tetrafluoroethylene). An end group analysis based on solid-state NMR and IR spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **43**, 4325–4330 (2002).
132. Hosseini, S., Ibrahim, F., Djordjevic, I., Aeinehvand, M. M. & Koole, L. H. Structural and end-group analysis of synthetic acrylate co-polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry: Distribution of pendant carboxyl groups. *Polym. Test.* **40**, 273–279 (2014).
133. Dong, Q. *et al.* Determination of molecular weight of hyaluronic acid by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 274–278 (2010).
134. Schelhaas, M. & Waldmann, H. Protecting Group Strategies in Organic Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **35**, 2056–2083 (1996).
135. Chmielewski, M. K. Protecting of a Thermolabile Protecting Group: “Click-Clack” Approach. *Org. Lett.* **11**, 3742–3745 (2009).
136. Chmielewski, M. K. *et al.* Thermolytic Carbonates for Potential 5'-Hydroxyl Protection of Deoxyribonucleosides. *J. Org. Chem.* **68**, 10003–10012 (2003).
137. Chmielewski, M. K. Novel thermolabile protecting groups with higher stability at ambient temperature. *Tetrahedron Lett.* **53**, 666–669 (2012).
138. Chmielewski, M. K., Tykarska, E., Markiewicz, W. T. & Rypniewski, W. Engineering N-(2-pyridyl)aminoethyl alcohols as potential precursors of thermolabile protecting groups. *New J. Chem.* **36**, 603–612 (2012).

Bibliografia

139. Brzezinska, J. *et al.* 2-Pyridinyl Thermolabile Groups As General Protectants for Hydroxyl, Phosphate, and Carboxyl Functions. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2017**, 2.20.1-2.20.25 (2017).
140. Szymanski, R. & Sosnowski, S. Modeling of polymerization kinetics as a tool for investigation of mechanism and predicting progress. *Polimery* **61**, 387–396 (2016).
141. Song, Z., Wang, K., Gao, C., Wang, S. & Zhang, W. A New Thermo-, pH-, and CO₂-Responsive Homopolymer of Poly[N-[2-(diethylamino)ethyl]acrylamide]: Is the Diethylamino Group Underestimated? *Macromolecules* **49**, 162–171 (2016).
142. Keddie, D. J., Guerrero-Sanchez, C., Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Switchable Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization in Aqueous Solution, N,N-Dimethylacrylamide. *Macromolecules* **44**, 6738–6745 (2011).
143. Aoshima, S. & Kanaoka, S. Synthesis of Stimuli-Responsive Polymers by Living Polymerization: Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(Vinyl Ether)s. in *Advances in Polymer Science* vol. 210 169–208 (2007).
144. Brzezinska, J. *et al.* Experimental and computational studies on a protonated 2-pyridinyl moiety and its switchable effect for the design of thermolytic devices. *PLoS One* **13**, e0203604 (2018).
145. Benaglia, M. *et al.* Universal (Switchable) RAFT Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6914–6915 (2009).
146. Moad, G., Keddie, D., Guerrero-Sanchez, C., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Advances in Switchable RAFT Polymerization. *Macromol. Symp.* **350**, 34–42 (2015).
147. Chen, Y. *et al.* Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 30223–30250 (2015).
148. Silverstein, R. M. *Spectrometric identification of organic compounds.* (2005).
149. Smith, B. C. The Infrared Spectra of Polymers, VI: Polymers With C-O Bonds. *Spectroscopy* **37**, 15-19,27 (2022).
150. Smith, B. C. Infrared Spectroscopy of Polymers, VIII: Polyesters and the Rule of Three. *Spectroscopy* **37**, 25–28 (2022).
151. Smith, B. C. Infrared Spectroscopy of Polymers X: Polyacrylates. *Spectroscopy* **38**, 10–14 (2023).

Bibliografia

152. Etrych, T. *et al.* HPMA copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *J. Control. Release* **164**, 346–354 (2012).
153. Coelho, J. F. *et al.* Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J.* **1**, 164–209 (2010).
154. Brzezinska, J., Witkowska, A., Balbańska, S. & Chmielewski, M. K. 2-Pyridinyl-N-(2,4-difluorobenzyl)aminoethyl Group As Thermocontrolled Implement for Protection of Carboxylic Acids. *Org. Lett.* **18**, 3230–3233 (2016).
155. Zhuang, W.-R. *et al.* Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *J. Control. Release* **294**, 311–326 (2019).
156. Runyon, J. R., Barnes, D. E., Rudd, J. F. & Tung, L. H. Multiple detectors for molecular weight and composition analysis of copolymers by gel permeation chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 2359–2369 (1969).
157. Shieh, Y.-T., Chen, B.-H., Wang, T.-L. & Kuo, S.-W. Supercritical CO₂ affects the copolymerization, LCST behavior, thermal properties, and hydrogen bonding interactions of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *J. Supercrit. Fluids* **130**, 373–380 (2017).