

Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja ciklopentafenilalanina s anionima u otopini

Petters, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:702586>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivan Petters

**Termodinamičko i strukturno istraživanje
kompleksiranja ciklopentafenilalanina s
anionima u otopini**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Gordana Horvata

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Koordinacijske reakcije makrocikličkih liganada u otopini (IP-2019-04- 9560).

Zahvale

Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Gordanu Horvatu na pruženoj prilici za rad, pomoći, strpljenju, prenesenom znanju i vještinama.

Veliko hvala Matiji Modrušanu na pomoći pri izvođenju titracija i obradi podatka. Također bi se zahvalio dr. sc. Ivi Crnolatu na CD titracijama.

Mojim roditeljima Stjepanu i Sanji, sestri Anamariji bez kojih ništa ne bi bilo moguće.
Ogromno hvala!

Sadržaj

SAŽETAK	X
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Supramolekulski fluorescentni receptori	3
2.1.1. <i>Ciklopeptidi</i>	3
2.2. Eksperimentalno određivanje konstanti stabilnosti.....	6
2.2.1. <i>Određivanje konstanti stabilnosti spektrofotometrijskim titracijama</i>	8
2.2.2. <i>Određivanje konstanti stabilnosti fluorimetrijskim titracijama.....</i>	10
2.2.3. <i>Određivanje konstanti stabilnosti ¹H NMR titracijama</i>	10
2.2.4. <i>Određivanje konstanti stabilnosti mikrokolorimetrijskim titracijama</i>	12
2.3. Molekulska dinamika.....	14
2.4. Cirkularni dikroizam.....	17
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.2. Priprava otopina	21
3.2.1. <i>Fluorimetrijske titracije</i>	21
3.2.2. <i>Spektrofotometrijske titracije</i>	21
3.2.3. <i>¹H NMR titracije.....</i>	21
3.2.4. <i>Mikrokolorimetrijske titracije.....</i>	22
3.2.5. <i>CD titracije.....</i>	22
3.3. Fizikalno kemijska mjerenja	23
3.3.1. <i>Fluorimetrijske titracije</i>	23
3.3.2. <i>Spektrofotometrijske titracije</i>	23
3.3.3. <i>¹H NMR titracije.....</i>	23
3.3.4. <i>Mikrokolorimetrijske titracije.....</i>	23
3.3.5. <i>CD titracije.....</i>	24
3.4. Molekulska dinamika.....	25
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. Kompleksi ciklopeptida L u acetonitrilu	26
4.2. Kompleksi ciklopeptida L u metanolu.....	47
4.3. Kompleksi ciklopeptida L u dimetil-sulfoksidu	58

§ 5. ZAKLJUČAK.....	62
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI).....	64
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	65
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

TERMODINAMIČKO I STRUKTURNO ISTRAŽIVANJE KOMPLEKSIRANA CIKLOPENTAFENILALANINA S ANIONIMA U OTOPINI

Ivan Petters

U okviru ovog rada istražen je kompleksacijski afinitet ciklopentafenilala (L) s halogenidnim, tiocijanatnim i oksoanionima u acetonitrilu, metanolu i dimetil-sulfoksidu. Konstante stabilnosti navedenih kompleksa određene su fluorimetrijskim, spektrofotometrijskim, ^1H NMR i mikrokolorimetrijskim titracijama. Za detaljan uvid u strukture nastalih kompleksa receptor-anion te veznog mjesta liganda korištena je računalna metoda klasične molekulske dinamike (MD). U acetonitrilu su provedene i titracije spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD). CD spektri kompleksa određeni su i računski iz struktura dobivenih MD simulacijama i kvalitativno slažu s eksperimentom. Rezultati ^1H NMR titracija i MD simulacija ukazuju na to da se koordinacija aniona odvija preko amidnih protona ciklopeptida. Stehiometrija skoro svih nastalih kompleksa je 1:1 (receptor:anion) s iznimkom dihidrogen fosfata gdje je u acetonitrilu uočeno vezanje dimera dihidrogen fosfata. Afinitet ciklopeptidnog receptora koreliran je sa strukturom anionske koordinacijske sfere te sa solvacijskim svojstvima promatranih otapala.

(68 stranica, 49 slika, 6 tablica, 78 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ciklopeptidi; vezanje aniona; fluorimetrija, cirkularni dikroizam; UV-Vis spektrofotometrija; ^1H NMR; MD simulacije; utjecaj otapala

Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
 2. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stilinović
 3. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 14. srpnja 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THERMODYNAMIC AND STRUCTURAL STUDIES ON THE COMPLEXATION OF CYCLOPENTAPHENYLALANINE WITH ANIONS IN SOLUTION

Ivan Petters

For the purpose of this thesis, the complexation affinities of cyclopentaphenylalanine (**L**) towards halide, thiocyanate and oxoanions in acetonitrile, methanol and dimethylsulfoxide were investigated. The binding affinities of mentioned complexes were determined by means of fluorimetric, spectrophotometric, ^1H NMR and microcalorimetric titrations. For a detailed structural overview of receptor-anion complexes, as well as the anion binding site of ligand **L**, classical molecular dynamics (MD) simulations were performed. Circular dichroism (CD) titrations were carried out in acetonitrile. The CD spectra were also calculated from the structures obtained by MD simulations and were qualitatively in agreement with the experiment. The results of ^1H NMR and MD studies indicated that the bound anions were coordinated by the amide groups of cyclopeptide. The stoichiometry of almost all complexes was 1:1 (receptor:anion), with the exception of dihydrogen phosphate where the binding of dihydrogen phosphate dimer was observed in acetonitrile. The affinity of the cyclopeptide receptor was correlated with the structure of anion coordination sphere as well as with the solvation properties of the examined solvents.

(68 pages, 49 figures, 6 tables, 78 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: Cyclopeptide; Anion binding; Fluorimetry; Circular dichroism; UV-Vis spectrometry; ^1H NMR; MD simulations; Solvent effect

Mentor: Dr. sc. Gordan Horvat, Associate Professor

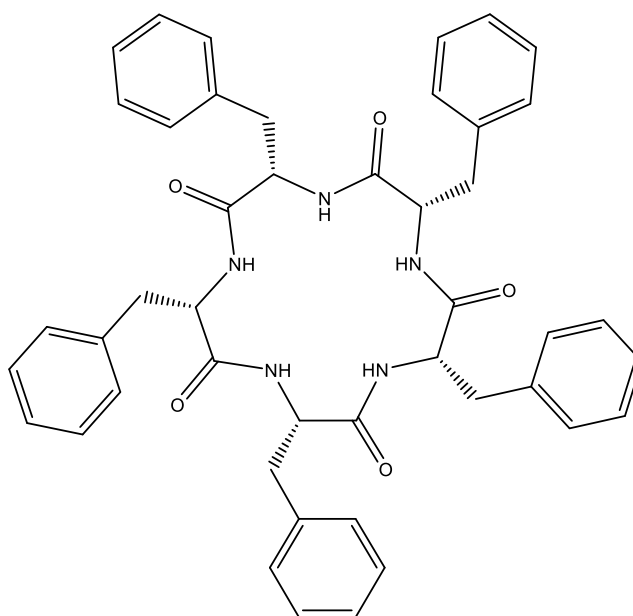
Reviewers:

1. Dr. sc. Gordan Horvat, Associate Professor
 2. Dr. sc. Vladimir Stilinović, Associate Professor
 3. Dr. sc. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
- Substitute: Dr. sc. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: 14 July 2022

§ 1. UVOD

Dizajn i sinteza anionskih receptora svrstavaju se u aktualna područja istraživanja u supramolekularnoj kemiji.¹⁻⁵ Kombinacijom termodinamičke i strukturne karakterizacije nastalih kompleksa u otopini moguće je steći detaljan uvid u energetiku kompleksiranja, odnosno u povezanost strukture receptora i njegovog afiniteta prema pojedinom anionu.⁶⁻¹⁰ Kako bi u otopini mogao nastati stabilan anionski kompleks, potrebno je anion koordinirati sa što većim brojem vodikovih veza što podrazumijeva uređen raspored proton-donorskih skupina na receptoru. Zbog tog svojstva, najčešći receptori aniona u otopini su različiti amini, amidi, uree i tiouree.^{2,4} Jedna od klasa makrocikličkih spojeva koja u svojoj okosnici sadrži amidnu skupinu, i stoga može poslužiti kao receptor anionskih vrsta, su ciklopeptidi.^{1,10-12} Njihova dobra kompleksacijska svojstva posljedica su izvanrednih donorskih svojstava peptidnih skupina, fleksibilnosti makrocikličkog prstena i varijabilnosti podjedinica, čime je moguće postići specifičnost prema određenoj ionskoj vrsti.



Slika 1. Molekulska struktura homociklopeptida L istraživanog u ovom radu

U ovom radu bit će proučen kompleksacijski afinitet ciklopentafenilalanina (**L**, slika 1.) prema halogenidnim anionima (Cl^- , Br^- , I^-), oksoanionima (NO_3^- , HSO_4^- , H_2PO_4^-) i tiocijanatu (SCN^-) u otopini pomoću fluorimetrijskih, spektrofotometrijskih, ^1H NMR i mikrokolorimetrijskih titracija.¹³ Također, fluorimetrijskim i spektrofotometrijskim titracijama bit će ispitan utjecaj vezanja aniona na emisijske i apsorpcijske spektre liganda. Titracijama cirkularnog dikroizma (CD) proučit će se strukturne promjene u ligandu uslijed vezanja aniona u acetonitrilu. Simulacijama molekulske dinamike (MD) s eksplicitnim molekulama otapala istražiti će se strukturne karakteristike veznog mjesta ciklopeptida te će se dobiti uvid u mikroskopsku sliku procesa vezanja aniona. Iz struktura dobivenih MD simulacijama bit će izračunani CD spektri liganda i komplekse koji će biti uspoređeni s eksperimentalnim podacima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Supramolekulski fluorescentni receptori

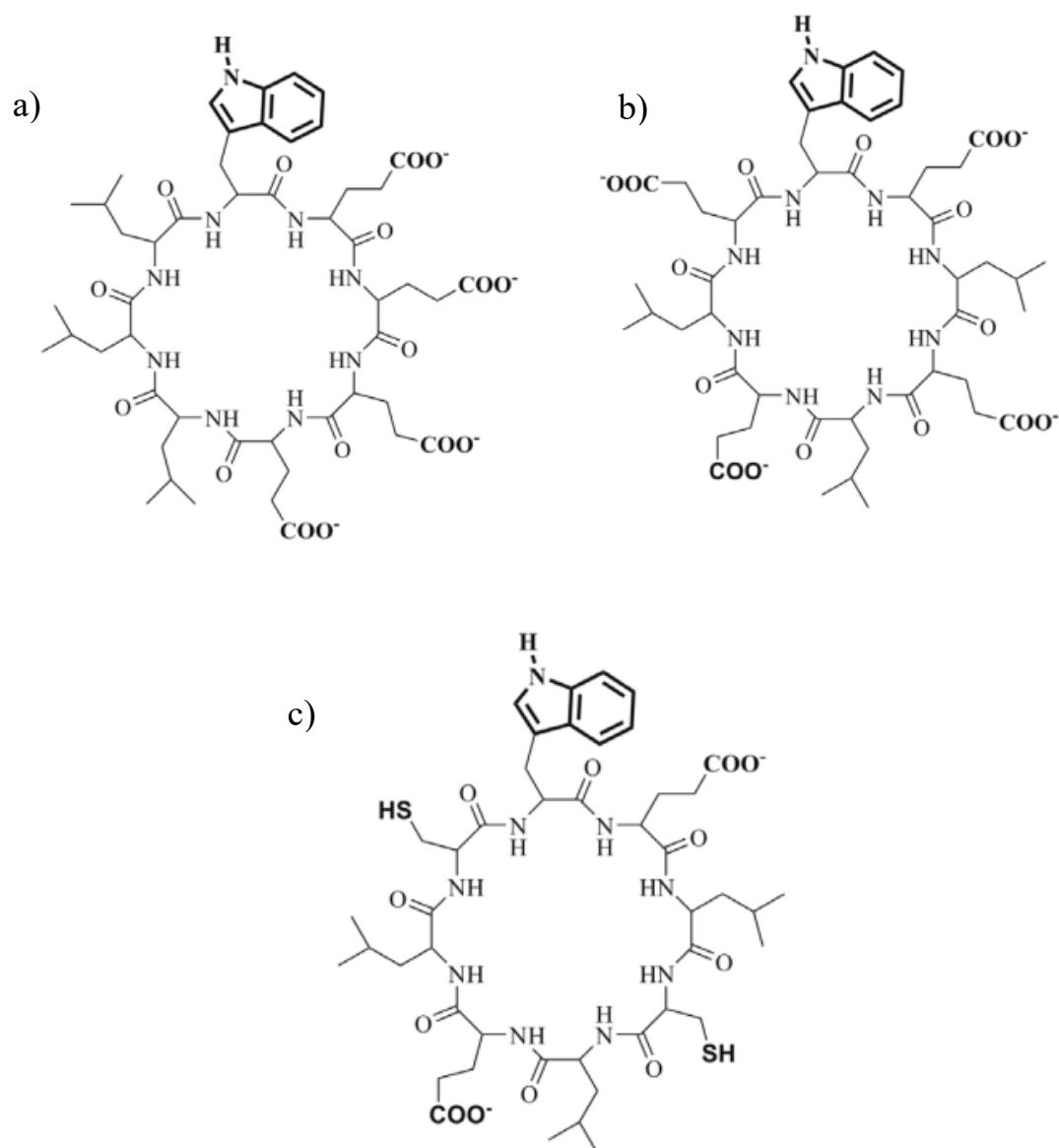
Receptori ili senzori su molekule koje pokazuju određenu selektivnosti i afinitet prema pojedinim spojevima. Kao takvi, mogu služiti za uvid u stanje proučavanog sustava. Kada se govori o receptorima u kemiji najčešće se misli na analitičke receptore koji omogućuju kvantitativnu i kvalitativnu analizu analita u uzorku. Jedno od zanimljivih svojstava koji neki receptori imaju je fluorescentnost.¹⁴

Supramolekulski fluorescentni receptori svoju selektivnost i afinitet temelje na nekovalentnim interakcijama s analitom. Kada je riječ o vezanju receptora na ion misli se prvenstveno na elektrostatske i van der Waalove nekovalentne interakcije. Strukturno, fluorescentnu molekulu odnosno fluorofor može se podijeliti na veznu jedinicu koja veže ion i signalnu jedinicu koja kada se pobudi elektromagnetskim zračenjem daje fluorescentni signal. Vezanje iona utječe na fluorescenciju, veličina promjene te veličine ukazuje na osjetljivost proučavanog receptora prema ionu.¹⁴

2.1.1. Ciklopeptidi

Jedna skupina supramolekulskih fluorescentnih receptora su ciklopeptidi, ukoliko sadržavaju fluoroforne aminokiseline kao što su triptofan, tirozin i fenilalanin.¹⁵ Ciklopeptidi se koriste kao makrociklički receptori aniona čija su dobra kompleksacijska svojstva posljedica donorskih svojstava peptidnih skupina, fleksibilnosti makrocikličkog prstena i varijabilnosti podjedinica, čime je moguće postići specifičnost prema određenoj ionskoj vrsti. Vezanje aniona na ciklopeptide odvija se preko cikličkog prstena koji tvore peptidi, odnosno ulaska aniona unutar prstena. Signalna jedinica ciklopeptida najčešće je sadržana u bočnim ograncima peptida. Ciklopeptidi su pogodni za eksperimentalno i računalno proučavanje, jer uspoređujući s linearnim peptidima, poprimaju mnogo manji broj konformacija te su relativno jednostavne strukture za razliku od proteina.

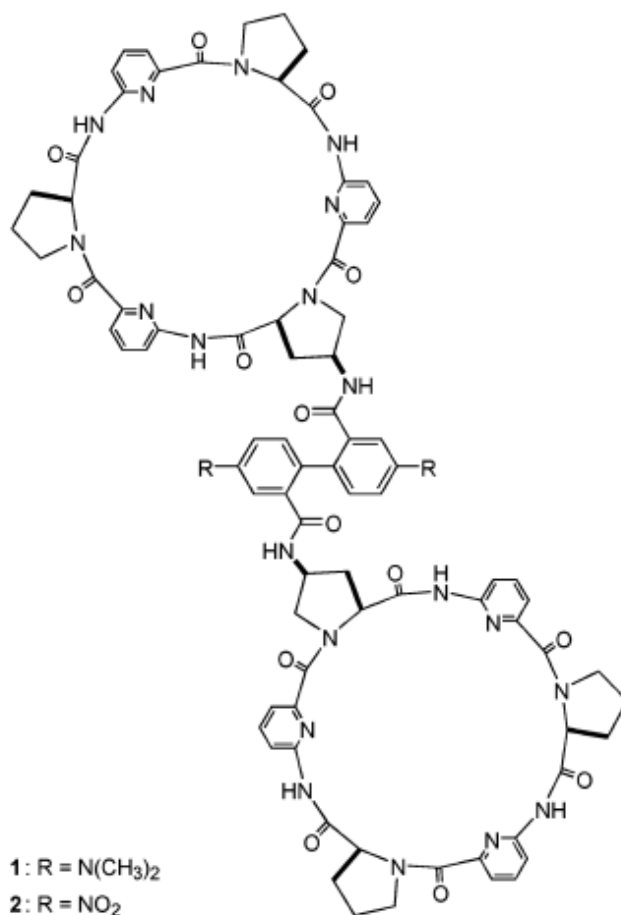
Poznato je više ciklopeptidnih kationskih receptora¹⁶ (slika 2.) koji vežu dvovalentne katione prijelaznih metala. Ciklopeptid prikazan na slici 2.a veže ih u sljedećem redoslijedu prema afinitetu: $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$.



Slika 2. Molekulske strukture ciklopeptida koji pokazuju selektivnost prema kationima prijelaznih metala, podebljana je označena signalna jedinica odgovorna za fluorescenciju (ref. 16)

Reyheller i suradnici proveli su istraživanja s ciklopeptidnim receptorom koji služi za detektiranje sulfata u vodenoj otopini, čija je struktura prikana na slici 3.¹⁷ Prikazani ciklopeptid uz sulfat veže i halogenidne ione, ali jedino u prisustvu sulfata dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije što ga čini specifičnim receptorom za sulfat s obzirom na metodu detekcije aniona. Navedeni ciklopeptid veže anione u redosljedju $\text{SO}_4^{2-} > \text{I}^- > \text{Br}^- >$

Cl^- , NO_3^- . U radu su opisane i titracije s prisutnim kompetitivnim vrstama te je utvrđeno da prisutnost Cl^- ne utječe na selektivnost ciklopeptida prema SO_4^{2-} .



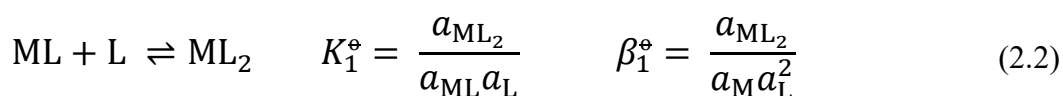
Slika 3. Struktura bis(ciklopeptida) od alternirajućih jedinica prolina i 6-aminopikolinske kiseline povezanih bifenilnom poveznicom (ref. 17)

Osim navedenih receptora, u literaturi su opisani ciklopeptidi odgovorni za selektivno vezanje i transport kationa preko stanične membrane^{18,19}, fluorescentni ciklički peptidi za oslikavanje stanice vezanjem na receptore ili enzime u stanici²⁰ te fluorimetrijsko praćenje propusnosti stanične stjenke i membrane parazita *Toxoplasma gondii*.²¹ Posebno zanimljiva skupina ciklopeptida su fluorescentni ciklopeptidi^{22–28} koji se mogu koristiti za detekciju aniona u otopini. Pritom se vezanje aniona nerijetko odvija vodikovim vezama.

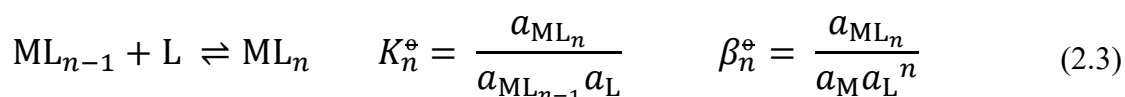
2.2. Eksperimentalno određivanje konstanti stabilnosti

Supramolekulski sustavi²⁹ su sustavi povezani nekovalentim interakcijama. Za opis procesa u supramolekulskim sustavima često se koriste sljedeće termodinamičke veličine: standardna konstanta ravnoteže (K^\ominus), standardna reakcijska Gibbsova energija ($\Delta_r G^\ominus$), standardna reakcijska entalpija ($\Delta_r H^\ominus$) i standardna reakcijska entropija ($\Delta_r S^\ominus$). Ove reakcijske veličine daju informacije o energetskim promjenama i spontanosti kemijskih procesa te o stabilnosti nastalih vrsta u sustavu pri određenim uvjetima. Pomoću tih termodinamičkih veličina mogu se kvantificirati nekovalente interakcije koje su odgovorne za nastajanje supramolekule.

Standardna konstanta ravnoteže (K^\ominus) mjera je jakosti vezanja supramolekula te indikator selektivnosti vezanja liganda prema anionu.²⁹ Za reakciju kompleksiranja između ionske vrste M i liganda L vrijede sljedeće relacije:



...



pri čemu su K_i^\ominus sukcesivne, a β_i^\ominus kumulativne konstante stabilnosti kompleksa dok su s oznakom a dani relativni aktiviteti sudionika ravnoteže. Dvije navedene vrste konstanti stabilnosti povezane su izrazom:

$$\beta_i^\ominus = \prod_{j=1}^i K_j^\ominus \quad (2.4)$$

Konstante stabilnosti K_i^\ominus i β_i^\ominus definirane su preko relativnih ravnotežnih aktiviteta sudionika reakcija koji je za reakcije u otopini definiran izrazom:

$$a_B = \gamma_B \frac{[B]}{c^\ominus} \quad (2.5)$$

gdje je a_B relativni ravnotežni aktivitet sudionika reakcije ($B = M, L$ ili ML), γ_B je koeficijent aktiviteta vrste u otopini, c^\ominus označava standardnu koncentraciju koja iznosi 1 mol dm^{-3} i $[B]$ ravnotežnu koncentraciju vrste u otopini. Uvrštavanjem izraza (2.5) u izraze za konstantu stabilnosti dobije se:

$$K_i^\ominus = \frac{a_{ML_i}}{a_{ML_{i-1}} a_L} = \frac{\gamma_{ML_i} [ML_i] (c^\ominus)^i}{\gamma_{ML_{i-1}} \gamma_L [ML_{i-1}] [L]} = \frac{\gamma_{ML_i} (c^\ominus)^i}{\gamma_{ML_{i-1}} \gamma_L} K_i \quad (2.6)$$

$$\beta_i^\ominus = \frac{a_{ML_i}}{a_M a_L^i} = \frac{\gamma_{ML_i} [ML_i] (c^\ominus)^i}{\gamma_M \gamma_L^i [M] [L]^i} = \frac{\gamma_{ML_i} (c^\ominus)^i}{\gamma_M \gamma_L^i} \beta_i \quad (2.7)$$

i čemu su K_i i β_i koncentracijske (empirijske, stehiometrijske) konstante stabilnosti. Za razliku od standardne konstante ravnoteže, koja ovisi samo o temperaturi, koncentracijske konstante stabilnosti ovise i o ravnotežnom sastavu otopine zbog koncentracijske ovisnosti koeficijenta aktiviteta. Iz toga slijedi da su empirijske konstante ravnoteže usporedive samo ako su mjerene pri stalnoj temperaturi i ionskoj jakosti.³⁰ Ionska jakost može varirati tijekom eksperimenta zbog nastajanja ili nestajanja nabijenih vrsta tijekom reakcije, no može se održati približno stalnom dodatkom suviška inertnog elektrolita reakcijskoj smjesi. Time su i koeficijenti aktiviteta sudionika reakcije približno stalni, a empirijska konstanta ravnoteže razlikuje se po iznosu od standardne za vrijednost kvocijenta koeficijenata aktiviteta što se vidi iz jednadžbe (2.6) i (2.7). Vrlo često se kvocijent koeficijenata aktiviteta zanemaruje jer je $\frac{\gamma_{ML_i} (c^\ominus)^i}{\gamma_{ML_{i-1}} \gamma_L} \approx 1$ pri stalnoj ionskoj jakosti te je u tom slučaju standardna konstanta ravnoteže jednaka empirijskoj:

$$K_i^\ominus = K_i \quad (2.8)$$

$$\beta_i^{\circ} = \beta_i \quad (2.9)$$

Određivanje konstanti stabilnosti, s naglaskom na procese nastajanja supramolekula, najčešće se provodi titracijskim eksperimentima. Tijekom titracije prati se koncentracija prisutnih vrsta ili se prati promjena nekog svojstva koje ovisi o koncentraciji sudionika reakcije. Neke od metode za određivanje konstanti stabilnosti su izotermna titracijska kalorimetrija, NMR spektroskopija, UV-Vis spektrofotometrija, fluorimetrija, potenciometrija, polarografske metode i kromatografija.³⁰

U ovom radu kao metode za određivanje konstanti stabilnosti korištene su fluorimetrija, UV-Vis spektrofotometrija, ¹H NMR spektroskopija i mikrokalorimetrija uz 1:1 stehiometrijski model vezanja liganda i aniona.

2.2.1. Određivanje konstanti stabilnosti spektrofotometrijskim titracijama

Spektrofotometrija³⁰ je metoda određivanja konstanti stabilnosti koja se temelji na interakciji elektromagnetskog zračenja sa tvarima. Pritom se najčešće koriste valne duljine koje se nalaze u ultraljubičastom i vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Metoda je pogodna za određivanje konstanti stabilnosti reda veličine do 10⁴. Prilikom prolaska zrake kroz uzorak dolazi do smanjenja intenziteta uslijed raspršenja, refleksije i apsorpcije. Pritom se može definirati transmitancija, T prema jednadžbi:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.10)$$

gdje je I_0 intenzitet upadne zrake, a I intenzitet transmitirane zrake. Ako se raspršenje i refleksija svjetlosti svedu na minimum (stjenke kivete moraju biti čiste i otopina ne smije sadržavati neotopljene tvari) tada je transmitancija povezana s ravnotežnom koncentracijom spektralno aktivne vrste, $[B]$ preko Bouguer-Beer-Lambertovog zakona:

$$A = -\log T = \varepsilon_B [B] l \quad (2.11)$$

pri čemu je A apsorbancija, l duljina puta zrake svjetlosti kroz uzorak, a ϵ_B molarni apsorpcijski koeficijent spektralno aktivne vrste B. Bouguer-Beer-Lambertovog zakon vrijedi pri uvjetima strogog monokromatskog zračenja, razrijeđenih otopina i optički homogenog (izotropnog) medija. Za smjesu u kojoj više vrsta apsorbira vrijedi da je:

$$A = l \sum_{i=1}^n c_i \epsilon_i \quad (2.12)$$

gdje je n broj spektralno aktivnih vrsta. Spektrofotometrijska titracija pogodna je za određivanje ravnotežnih konstanti u slučajevima kad se molarni apsorpcijski koeficijenti reaktanata i produkata razlikuju u određenom području valnih duljina. Za slučaj u kojem apsorbiraju ligand L i kompleks ML vrijedi sljedeći izraz za konstantu stabilnosti K :

$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} = \frac{[\text{ML}]}{(c_M - [\text{ML}])(c_L - [\text{ML}])} \quad (2.13)$$

gdje su c_M i c_L analitičke koncentracije ionske vrste M i liganda L. Također vrijedi:

$$a = \frac{A}{l} = [\text{L}]\epsilon_L + [\text{ML}]\epsilon_{\text{ML}} = c_L\epsilon_L - (\epsilon_L - \epsilon_{\text{ML}})[\text{ML}] \quad (2.14)$$

Kombinacijom jednadžbi i dobije se izraz:

$$a = c_L\epsilon_L - (\epsilon_L - \epsilon_{\text{ML}}) \frac{c_M + c_L + \frac{1}{K} \sqrt{(c_M + c_L + \frac{1}{K})^2 - 4c_M c_L}}{2} \quad (2.15)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti a o c_M (i/ili c_L) moguće je odrediti iznos konstante ravnoteže, kao i molarne apsorpcijske koeficijente ϵ_M i ϵ_{ML} . Ukoliko se spektar

kompleksa značajno ne razlikuje od spektra samog liganda tada je moguće koristiti multivarijatnu analizu spektralnih podataka. Takva analiza omogućuje korištenje cjelokupnih spektara, a ne samo podataka pri jednoj valnoj duljini. Računski programi za multivarijatnu analizu su primjerice LETAGROP-SPEFO³¹, SPECFIT³² i DATAN³³.

2.2.2. Određivanje konstanti stabilnosti fluorimetrijskim titracijama

Fluorescencija³⁴ je pojava emisije zračenje svjetlosti iz tvari koje imaju mogućnost apsorpcije svjetlosti ili neke vrste ionizirajućeg zračenja (elektronsko, rendgensko ili ultraljubičasto). Fluorescencijska titracija temelji se na mjerenju relativnom intenzitetu fluorescencije vrsta u reakcijskoj smjesi. Ta metoda pokazuje veliku osjetljivost prema koncentraciji analita te je njome moguće odrediti jako niske koncentracije vrsta koje fluoresciraju (mikromolarne ili čak nanomolarne koncentracije). Kao takva, izrazito je pogodna za određivanje konstanti stabilnosti slabo topljivih vrsta. Ova se metoda najčešće koristi pri jako niskim koncentracijama jer fluorescencija pri većim koncentracijama ne zadovoljava linearnu ovisnost o koncentraciji fluorescentne vrste. Pogodna je za određivanje konstanti vezanja reda veličine do 10^8 . Prilikom određivanja potrebno je paziti da ne dolazi do fotoraspada fluorescentno aktivne vrste. Postupak određivanja konstante ravnoteže iz podataka dobivenih fluorescencijskom titracijom analogan je postupku za spektrofotometrijsku titraciju, jedina razlika je u tome što se umjesto apsorpcije mjeri intenzitet fluorescencije F . Pri niskim koncentracijama F je dan jednadžbom:

$$F = kI_0\Phi\varepsilon_B l[B] \quad (2.16)$$

gdje je k konstanta proporcionalnosti ovisna o instrumentu, I_0 intenzitet upadne zrake, Φ kvantni prinos fluorescencije (omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula), ε_B molarni apsorpcijski koeficijent vrste B, l je duljina puta zrake svjetlosti kroz uzorak i $[B]$ ravnotežna koncentracija fluorescente vrste B.

2.2.3. Određivanje konstanti stabilnosti ¹H NMR titracijama

Tehnika NMR primjenjuje se na jezgre koje imaju magnetski moment. NMR titracije temelje se na mjerenju relativnog kemijskog pomaka jezgara i promjena u simetriji molekule. Najčešće se mjeri signal jezgre ¹H te u tom slučaju govorimo o protonskoj odnosno ¹H NMR

titraciji. Osim protona, često mjerene jezgre su ^{31}P , ^{13}C i ^{19}F . Proton koji se nalazi u vanjskom magnetskom polju B može se orijentirati na $2I + 1$ načina pri čemu je I kvanti broj nuklearnog spina koji za proton iznosi $\frac{1}{2}$. To znači da se proton može orijentirati na 2 načina, u smjeru polja B (niže energije) i suprotno smjeru B (više energije). Energetska razlika između ovih dvaju stanja ovisi o vanjskom magnetskom polju, ali uglavnom je mala. Kada se molekula koja sadrži vodikove atome iznosi radiofrekvencijom zračenju čija je energija jednaka razlici između ova dva spinska stanja tada dolazi do rezonancije jezgara. Jezgre apsorbiraju zračenje te se pobude u stanje više energije, nakon čega slijedi relaksacija u niže stanje emisijom elektromagnetskog zračenja koje se detektira kao signal u NMR spektru. U ^1H NMR titraciji mijenjaju se kemijski pomaci protona, odnosno položaj linija u NMR spektru na kojoj se javlja rezonancija pojedine jezgre u određenoj magnetskoj okolini u vrstama koje tvore kompleks. Ta se pojava naziva kemijska izmjena. Kemijska izmjena dijeli se na sporu, srednju i brzu.^{35,36}

Spora kemijska izmjena³⁷ događa se kada je vrijeme odvijanja kompleksiranja manje od vremena provođenja NMR titracije. U slučaju spore kemijske pojavljuju se odvojeni signali za svaku od vrsta prisutnih u otopini, a omjer njihovih množinskih udjela jednak je omjeru površina pripadajućih signala. Za sporu kemijsku izmjenu promjena kemijskog pomaka dana je izrazom:

$$\Delta\delta = \delta_L - \delta_{LA^-} \quad (2.17)$$

pri čemu je δ_L kemijski pomak receptora, a δ_{LA^-} kemijski pomak kompleksa.

Kod srednje kemijske izmjene konstanta brzine reakcije kompleksiranja je usporediva s promjenom kemijskog pomaka te kod takvih reakcija nije moguće odrediti konstantu stabilnosti NMR spektroskopijom.³⁷

Kod brze kemijske izmjene³⁷ postoji jedan signal koji je uprosječen na kemijskom pomaku komponenti δ_L i δ_{LA^-} te je dan izrazom:

$$\delta_{obs} = x_L\delta_L + x_{LA^-}\delta_{LA^-} \quad (2.18)$$

gdje je δ_{obs} promatrani kemijski pomak x_L množinski udio ciklopeptida i x_{LA^-} množinski udio kompleksa. Uvrštavanjem izraza za bilance mase moguće je dobiti izraz za ovisnost opaženog kemijskog pomaka o množinskim koncentracijama sudionika reakcije:

$$\delta_{obs} = c_L \delta_L - (\delta_L - \delta_{LA^-}) \frac{x_L + x_{A^-} + \frac{1}{K} - \sqrt{(x_L + x_{A^-} + \frac{1}{K})^2 - 4x_L x_{A^-}}}{2} \quad (2.19)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti δ_{obs} o koncentraciji ili množinskom udjelu titransa moguće je odrediti iznose konstanti ravnoteže, kao i kemijske pomake određene vrste protona u svim formama molekule koja sadrži te atome vodika. Kako bi se što točnije i pouzdanije odredili parametri, potrebno je koristiti pomake signala za više jezgara prisutnih u spektru, a podatke u tom slučaju obraditi multivarijatom analizom spektralnih podataka. Računski program pogodan za multivarijatu analizu takvih podataka je HYPNMR.³⁸

NMR titracijom se osim kvantitativnih podataka mogu dobiti informacije o prirodi veze između molekula kompleksa te stehiometrija vezanja. Metoda je pogodna za određivanje konstanti stabilnosti do reda veličine $\approx 10^4$.

2.2.4. Određivanje konstanti stabilnosti mikrokolorimetrijskim titracijama

Izotermna titracijska kalorimetrija ili samo kalorimetrijska titracija^{30,39} je metoda kojom se direktno mjeri toplina nakon dodatka titransa u otopinu titranda pri konstantnoj temperaturi i tlaku. Pogodna je za određivanje konstanti vezanja iznosa do $\approx 10^6$. Za razliku od drugih opisanih titracija moguće je iz samo jednog eksperimenta odrediti reakcijske entalpiju i konstantu ravnoteže, a time i reakcijsku Gibbsovu energiju i reakcijsku entropiju. Zbog svoje velike osjetljivosti, male količine potrebnog materijala, točnosti i relativnog kratkog eksperimenta jedna je od najprimjenjivijih metoda za termodinamičku karakterizaciju supramolekula.

U reakcijskoj ćeliji nalazi se otopina titranda u koju se dodaju alikvoti titransa, a u referentnoj ćeliji nalazi se otopina rektanata. Svaki novi alikvot titransa dodaje se tek nakon uspostave kemijske i termodinamičke ravnoteže nakon prethodnog dodatka titransa. Konačni rezultat kalorimetrijskih mjerenja je izmijenjena toplina nakon svakog dodatka titransa. Za toplinu q_p izmjerenu nakon jednog dodatka titransa vrijedi:

$$q_p = \Delta H = \Delta_r H \cdot \Delta \xi \quad (2.20)$$

u kojoj ΔH promjenu entalpije, $\Delta_r H$ promjenu reakcijske entalpije te $\Delta\xi$ označava promjenu dosega između dva dodatka titransa. Ako se promatra reakcija kompleksiranja ciklopeptida i aniona, te ako se promjena dosega reakcije izrazi preko promjene koncentracije nastalog kompleksa, dobiva se izraz:

$$q_p = \Delta_r H \cdot \Delta\xi = \Delta_r H ([LA^-]_2 - [LA^-]_1)V \quad (2.21)$$

pri čemu je $[LA^-]_1$ ravnotežna koncentracija kompleksa prije, a $[LA^-]_2$ ravnotežna koncentracija kompleksa poslije dodatka titransa dok je V volumen sustava. Uvrštavanjem izraza za koncentracije kompleksa prije i nakon dodatka titransa u jednadžbu (2.21) dobiva se ovisnosti izmjerene topline prilikom dodatka o analitičkim koncentracijama reaktanata:

$$q_p = \Delta_r H \left(\frac{c_{A_2^-} - c_{A_1^-} + c_{L_2} - c_{L_1} + \sqrt{(c_{A_2^-} + c_{L_2} + \frac{1}{K_c})^2 - 4c_{A_2^-}c_{L_2}} + \sqrt{(c_{A_2^-} + c_{L_2} + \frac{1}{K_c})^2 - 4c_{A_2^-}c_{L_2}}}{2} \right) V \quad (2.22)$$

gdje su $c_{A_1^-}$, i c_{L_1} analitičke koncentracije aniona i ciklopeptida prije, te $c_{A_2^-}$, c_{L_2} analitičke koncentracije poslije dodatka titransa. Iz izraza (2.22) uz korištenje nelinearne regresije može se doći do koncentracijske konstante ravnoteže, K_c i reakcijske entalpije $\Delta_r H$.

2.3. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda kojom je moguće simulirati mnoštvo atoma i molekula u određenim uvjetima. Metoda omogućuje predviđanje svojstava i struktura promatranih vrsta na temelju međumolekulskih interakcija. Danas se molekulskom dinamikom mogu proučavati složeni kemijski procesi poput kompleksiranja liganda ili konformacijske promjene makromolekula poput smatanja proteina. Također, molekulska dinamika daje mogućnost modeliranje sustava u uvjetima koji se nisu eksperimentalno dostupni. Metoda molekulske dinamike često je komplementarna eksperimentalnim mjerenjima. Za razliku od eksperimentalnih mjerenja koja daju uprosječena svojstva sustava, simulacije daju uvid u svojstva sustava na mnogo manjoj skali kao što su fleksibilnost ili rigidnost veznog mjesta liganda, konformacijske promjene tijekom reakcije i interakcije makromolekula s ionima i molekulama otapala koje su nekad ključne za proces od interesa. Simulacije također služe za izgradnju strukturnih modela složenih molekula na temelju eksperimentalnih podataka dobivenih rendgenskom difrakcijom ili krio-elektronskom mikroskopijom.^{40,41}

Rezultat simulacije klasične molekulske dinamike je trajektorija atoma i molekula koja se dobije iterativnim numeričkim rješavanjem klasičnih jednažbi gibanja:

$$f_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt_i^2} \quad (2.23)$$

pri čemu je m_i masa atoma, r_i položaj atoma i f_i sila na pojedini atom. Sile na pojedini atom dobiju se iz potencijalne energije sustava, U koji je funkcija položaja svih atoma sustava prema jednažbi:

$$f_i = \frac{\partial}{\partial r_i} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (2.24)$$

Potencijalna energija sustava dobiva se iz polja sila. Polje sile je naziv za skup parametara i jednažbi koje se pridružuju atomima ili njihovim kombinacijama, a mogu biti dobiveni kvanto–mehaničkim izračunima, eksperimentalno ili kombinacijom navedenog. Neki od

parametra su masa i naboj atoma, parametri za van der Waalsove interakcije, duljina veze ili torzijski kutovi.^{40–42}

Prije početka simulacije potrebno je dodijeliti početne brzine atoma. Početne brzine v_0 dodjeljuju se u trenutku t_0 iz Maxwell–Boltzmanove raspodjele prema jednadžbi:

$$\rho(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{\frac{-mv_i^2}{2k_B T}} \quad (2.25)$$

pri čemu je ρ funkcija raspodjele iznosa brzine, v_i iznos vektor brzine, m_i masa i -te jezgre, k_B Boltzmannova konstanta, a T je termodinamička temperatura. Pri dodjeljivanju početnih brzina pazi se da ukupna kinetička energija sustava zadovoljava ekviparticijski teorem.

Postupak simulacije molekulske dinamike započinje računom sila koje djeluju na atome na temelju jednadžbi korištenog polja sila (2.24). Uz poznavanje sila koje djeluju na atome u sustavu iz sila se računaju ubrzanja atoma prema drugom Newtonovom zakonu:

$$a_i(t) = \frac{f_i(t)}{m_i} \quad (2.26)$$

Kada su poznati početni položaji i brzine atoma moguće je izračunati položaje i akceleracije atoma nakon nekog kratkog vremenskog intervala (npr. 1 fs). Novi početni položaji i akceleracije se zapisuju, a nakon toga se ponovno računaju sile i daljnji je postupak iterativan te obuhvaća numeričko rješavanje Newtonovih jednadžbi gibanja i dobivanje trajektorije nekim od propagacijskih algoritama.

Najčešći algoritam za rješavanje skupa Newtonovih jednadžbi je algoritam *velocity Verlet*. Algoritam prvo računa brzinu svake čestice iz brzine u prethodnom koraku i odgovarajućeg ubrzanja:

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t \quad (2.27)$$

Iz brzine u i -tom koraku računaju se novi položaji čestica:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\Delta t \quad (2.28)$$

Nakon što su određeni novi položaji čestica, pomoću vektora $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ dobivaju se nova ubrzanja čestica iz sila koje djeluju na čestice. Dobiveno ubrzanje se koristi za izračun nove brzine:

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{1}{2}\vec{a}_i(t + \Delta t)\Delta t \quad (2.29)$$

nakon čega algoritam ponavlja sve opisane korake. Nedostatak ovog algoritma je što algoritam pretpostavlja da ubrzanje ovisi samo o položaju, a ne i o brzini, odnosno da su sile konstantne unutar jednog vremenskog perioda propagacije. Simulacija molekulske dinamike također može dati i informacije o vremenskoj ovisnosti fizikalnih svojstava kao što su volumen, tlak, potencijalna i kinetička energija. Tijekom simulacije može doći do promjene kinetičke energije sustava čime se mijenja i temperatura sustava. U svrhu održavanja konstantne temperature sustava tijekom simulacije potrebno je koristiti termostat, dodatan algoritam za kontrolu temperature u sustavu.⁴³⁻⁴⁵ Također, tijekom simulacija pri konstantnom tlaku moguće je koristiti algoritme za kontrolu tlaka.⁴⁶⁻⁴⁹

2.4. Cirkularni dikroizam

Linearno polarizirano zračenje se sastoji od desno i lijevo polariziranog zračenja. Cirkularni dikroizam^{50,51} (CD) je pojava nejednake apsorpcije lijevo i desno polariziranog zračenja pri prolasku kroz medij s optički aktivnim (kiralnim) spojem. Zračenje koje izlazi iz uzorka neće biti linearno polarizirano već eliptično, a intenzitet te pojave i njezina ovisnost o valnoj duljini svjetlosti služe za objašnjenje strukture, odnosno apsolutne konfiguracije spojeva. Nakon svakog sukcesivnog dodatka titransa mjeri se promjena u apsorpciji lijevo i desno polarizirajućeg zračenja. Metoda je brza i zahtijeva malo uzorka, mali broj mjerenja je potreban za analizu te je obrada podataka jednostavna. Titracije CD-a najčešće se koriste za razlučivanje sekundarnih struktura proteina (slika 4.) na temelju elektronskih prijelaza u rasponu valnih duljina od 170 nm do 240 nm. Cirkularni dikroizam pogodan je i za provjeru pravilnog smatanja proteina, uočavanje strukturnih promjena vezanjem određenih liganada na protein te utvrđivanje stabilnosti proteina. Titracije cirkularnog dikroizma najčešće se koriste kao dopuna već postojećim metodama jer se radi o metodi niske rezolucije, te često dolazi do krivog interpretiranja dobivenih podataka, odnosno netočnog povezivanja promjena u CD spektru sa strukturom proučavanog spoja.

Kombinacijom Beer–Lambertovog zakon i razlike u apsorpciji lijevo, A_L i desno, A_D polarizirajućeg zračenja prema izrazu:

$$\Delta A = A_L - A_D \quad (2.30)$$

može se dobiti sljedeća jednadžba:

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_D)cl = \Delta\varepsilon cl \quad (2.31)$$

pri čemu je c koncentracija optički aktivne vrste, l duljina optičkog puta, ε_L molarni apsorpcijski koeficijent lijevo polariziranog i ε_D molarni apsorpcijski koeficijent desno polariziranog zračenja. Iako se mjeri ΔA , CD spektar se prikazuje eliptičnošću, θ koja je mjera eliptičnosti zračenja koje napušta uzorak, a njen je tangens dan izrazom:

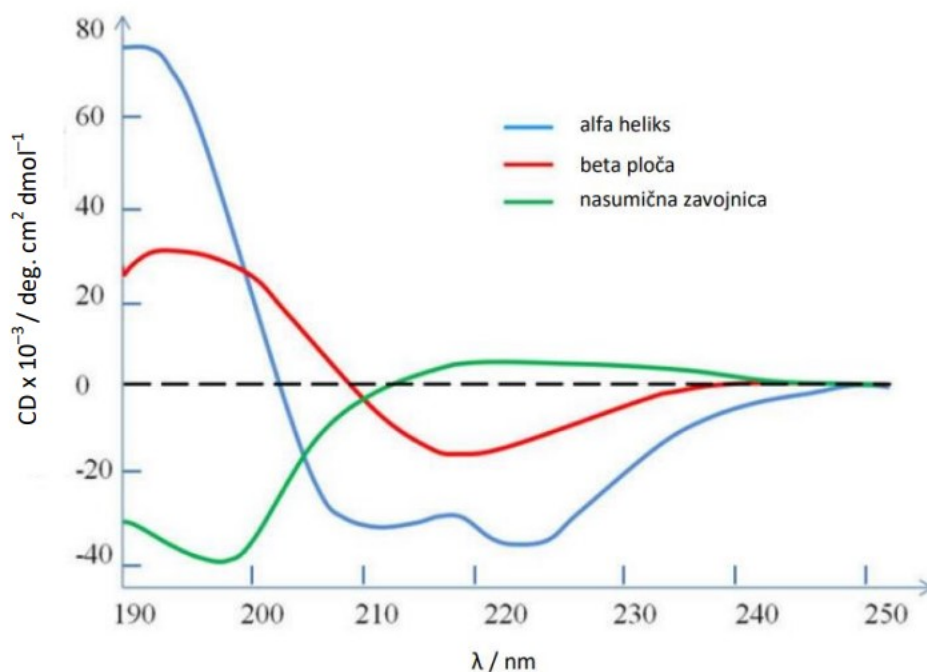
$$\tan\theta = \frac{E_L - E_D}{E_L + E_D} \quad (2.32)$$

gdje je E_L iznos vektora električnog polja lijevo polariziranog zračenja, a E_D iznos desnog. Uzimajući u obzir da je pojava cirkularnog dikroizma relativno mala, može se pretpostaviti $\tan\theta \approx \theta$, te da je kvadrat vektora E_L i E_D proporcionalan intenzitetu zračenja pri čemu se dobiva sljedeći izraz za eliptičnost:

$$\theta = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \quad (2.33)$$

koja je dana u stupnjevima kuta. Često se rezultati CD titracija prikazuju u jedinicama molarne eliptičnosti $[\theta]$ koja je dana izrazom:

$$[\theta] = 100 \Delta \varepsilon \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \quad (2.34)$$



Slika 4. Karakteristični CD spektri sekundarnih struktura proteina (preuzeto i prilagođeno prema referenci 52.)

Postoje brojne koji metode mogu poslužiti za izračun CD spektra na temelju atomskih koordinata proteina, neke od njih su javno dostupne na online web serverima poput DichroCalc⁵³ i PDB2CD⁵⁴ server. DichroCalc koristi *ab initio* kvanto–mehaničke izračune za predikciju CD spektra. Ti se serveri korisni za predviđanje spektra proteina iz poznate strukture. Na temelju izračunatog i eksperimentalno dobivenog spektra može se vrlo brzo usporediti homologija između proteina, učinak vezanja liganada na protein te provjera pravilnog smatanja proteina.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za eksperimentalni dio rada korišten je ciklopentafenilalaninski ligand **L** (slika 1) kojeg su sintetizirali dr. sc. Nikolina Vidović i mag. chem. Matija Modrušan prema već opisanom postupku.⁵⁵ Za pripremu otopina halogenidnih iona, oksoaniona i tiocijanatnog aniona korišteni su tetraetilamonijev klorid (Sigma-Aldrich, > 98%), tetrabutilamonijev bromid (Sigma-Aldrich, > 99%), tetrabutilamonijev jodid (Sigma-Aldrich, > 99%), tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich, > 99%), tetrabutilamonijev hidrogensulfat (Sigma-Aldrich, > 99%), tetrabutilamonijev nitrat (Sigma-Aldrich, > 97%), tetrabutilamonijev tiocijanat (Sigma-Aldrich, > 98%) i tetrametilamonijev sulfat (Sigma-Aldrich, > 99%). Otapala korištena pri fluorimetrijskim, spektrofotometrijskim, kalorimetrijskim titracijama te za titracije cirkularnog dikroizma su acetonitril (Fisher Chemical, > 99.9%), metanol (J. T. Baker, *HPLC grade*) i dimetil-sulfoksid (Acros organics, > 99.9%). Za NMR titracije korištena otapala su deuterirani acetonitril (MeCN-*d*₃, Euriso-top, 99.80%), deuterirani metanol (MeOH-*d*₄, Euriso-top, 99.8%) i deuterirani dimetil-sulfoksid (DMSO-*d*₆, Euriso-top, 99.80%).

3.2. Priprava otopina

U svim mjerenjima otopine su pripravljene odvagama homociklopeptida **L** i tetraetilamonijevih i tetrabutilamonijevih soli aniona uz dodatak acetonitrila, metanola ili dimetil-sulfoksida.

3.2.1. Fluorimetrijske titracije

U fluorimetrijskim titracijama u acetonitrilu koncentracija spoja **L** bila je u rasponu od $3,71 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ do $5,94 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ dok su koncentracije otopina soli bile: TEACl koncentracije $2,84 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, TBABr koncentracije $8,00 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, TBAI koncentracije $9,15 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, TBAHSO₄ koncentracije $0,0155$ mol dm⁻³, TBAH₂PO₄ koncentracije $8,96 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, TBANO₃ koncentracije $9,09 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ i TBASCN koncentracije $0,0302$ mol dm⁻³.

Za titracije u metanolu pripravljene su otopine liganda **L** raspona koncentracija od $5,09 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ do $5,10 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ te otopine soli TEACl koncentracije $0,308$ mol dm⁻³, TBAHSO₄ koncentracije $0,0903$ mol dm⁻³ i TBAH₂PO₄ koncentracije $0,0120$ mol dm⁻³.

Za titracije u DMSO-u pripravljene su otopine liganda **L** koncentracija $4,57 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ i $5,20 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ te otopine soli TEACl koncentracije $0,0153$ mol dm⁻³, TBABr koncentracije $0,0150$ mol dm⁻³.

3.2.2. Spektrofotometrijske titracije

U spektrofotometrijskim titracijama u acetonitrilu koncentracija spoja **L** bila je u rasponu od $4,23 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ do $1,27 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³. Također su pripravljene otopine TEACl koncentracije $7,38 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, TBABr koncentracije $5,03 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, TBAI koncentracije $0,0151$ mol dm⁻³, TBAHSO₄ koncentracije $2,88 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, TBAH₂PO₄ koncentracije $3,45 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, TBANO₃ koncentracije $0,0149$ mol dm⁻³ i TBASCN koncentracije $0,0213$ mol dm⁻³.

Za titracije u metanolu pripravljene su otopine liganda **L** u rasponu od $4,04 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ do $4,58 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ te otopine soli TEACl $0,301$ mol dm⁻³, TBAHSO₄ koncentracije $0,0451$ mol dm⁻³ i TBAH₂PO₄ koncentracije $6,19 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³.

3.2.3. ¹H NMR titracije

Koncentracija spoja **L** u ^1H NMR titracijama u acetonitrilu bila je u rasponu od $4,19 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ do $5,17 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$. Pripravljene su i otopine soli: TEACl koncentracije $2,33 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBABr koncentracije $2,61 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBAI koncentracije $0,0105$ mol dm $^{-3}$, TBAHSO $_4$ koncentracije $5,34 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBAH $_2$ PO $_4$ koncentracije $2,71 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBANO $_3$ koncentracije $2,67 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$ i TBASCN koncentracije $0,0178$ mol dm $^{-3}$.

Za titracije u metanolu pripravljene su otopine liganda **L** u rasponu koncentracija od $4,19 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ do $4,80 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ te otopine soli TEACl $0,0702$ mol dm $^{-3}$, TBAHSO $_4$ koncentracije $0,0809$ mol dm $^{-3}$ i TBAH $_2$ PO $_4$ koncentracije $6,58 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$.

Za titracije u DMSO-u pripravljene su otopine liganda **L** raspona koncentracija $4,26 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ i $4,80 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ te otopine soli TEACl koncentracije $9,41 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$ i TBABr koncentracije $0,151$ mol dm $^{-3}$.

3.2.4. Mikrokalorimetrijske titracije

Za mikrokalorimetrijsku titraciju spoja **L** koncentracije $5,25 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ u acetonitrilu pripravljena je otopina TEACl koncentracije $5,22 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$.

3.2.5. CD titracije

Za titracije cirkularnog dikroizma (CD) u acetonitrilu pripravljena je otopina spoja **L** koncentracije $5,00 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$ te otopine soli TEACl koncentracije $2,00 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBABr koncentracije $2,00 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$, TBAH $_2$ PO $_4$ koncentracije $0,0100$ mol dm $^{-3}$ i TBAHSO $_4$ koncentracije $5,00 \times 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$.

3.3. Fizikalno kemijska mjerenja

3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Fluorimetrijske titracije izvedene su pomoću spektrofluorimetra Cary Eclipse tvrtke Agilent. Titracije su provedene dodavanjem titransa direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta od 1 cm. U kivetu je dodano 2,2 mL otopine liganda **L** koja je titrirana otopinama soli. Sve titracije ponovljene su tri puta. Eksitacijska valna duljina za sve spektre iznosi 260 nm s emisijskim i eksitacijskim prorezom od 10 nm. Spektri su snimani korakom od 2 nm i integracijskim vremenom 0,4 s pri konstantnoj temperaturi ($25,0 \pm 0,1$)°C. Za određivanje konstante stabilnosti kod kompleksa s $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ u acetonitrilu uzeta je u obzir dimerizacija aniona.⁵⁶ Dobiveni podaci obrađeni su u programu HypSpec unutar programskog paketa Hyperquad.⁵⁷

3.3.2. Spektrofotometrijske titracije

Spektrofotometrijske titracije izvedene su koristeći UV–Vis–NIR spektrometra Cary 5000 tvrtke Agilent. Titracije su provedene dodavanjem titransa direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta od 1 cm. U kivetu je dodano 2 mL otopine liganda **L** te su titrirane otopinama soli. Spektri su snimljeni s korakom od 2 nm i integracijskim vremenom od 0,2 s uz korekciju osnovne linije pri konstantnoj temperaturi ($25,0 \pm 0,1$)°C. Dobiveni podaci obrađeni su u programu HypSpec unutar programskog paketa Hyperquad.⁵⁷

3.3.3. ^1H NMR titracije

^1H NMR titracije izvedene su koristeći spektrometar Bruker Advance III HD 400 MHz pri 25 °C. Dobiveni spektri snimljeni su sa 16 pulseva. U svim titracijama kao standard korišten je signal otapala. Za svaku titraciju prikupljen je po jedan set podataka. Iz ovisnosti kemijskog pomaka signala o volumenu titransa regresijskom analizom dobivene su konstante stabilnosti nastalih kompleksa liganda i aniona korištenjem programa HypNMR iz programskog paketa Hyperquad.⁵⁷

3.3.4. Mikrokalorimetrijske titracije

Mikrokalorimetrijske titracije izvedene su pomoću izotermnog titracijskog kalorimetra VP–ITC tvrtke Microcal. U reakcijsku ćeliju volumena 1,4 ml koja sadrži otopinu liganda dodavana je odgovarajuća sol u dodatcima od 5 μL pomoću birete ukupnog volumena od 300

μL . Vremenski razmak između dvaju dodataka tijekom titracije iznosio je od 400 s. Pomoću programa Origin 7.0 Microcal praćena je vremenska ovisnost toka topline pri konstantnoj temperaturi od 25,0 °C s korakom od 2 s. Sve titracije ponovljene su tri puta. Konstante ravnoteže dobivene su nelinearnom regresijskom analizom kalorimetrijskih podataka, odnosno iz sukcesivnih toplina koje su korigirane za topline razrjeđenja otopina soli. Za obradu podataka korišten je program OriginPro 7.5.

3.3.5. CD titracije

CD titracije izvedene su izvedene pomoću spektrofotometra JASCO J815. Titracije su provedene dodavanjem titransa direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm. U kvarcnu kivetu je dodano od 2 do 2,3 mL otopine liganda **L** te su titrirane otopinama soli. Sve titracije su izvedene pri sobnoj temperaturi od otprilike 25°C. Spektar je snimljen u rasponu valnih duljina od 200 do 300 nm s vrijednosti parametra *data pitch* od 0.2 nm te brzinom skeniranja od 200 nm/min.

3.4. Molekulska dinamika

Simulacije molekulske dinamike provedene su koristeći programski paket GROMACS, verzije 2019.5.^{58–64} Intramolekulske i nevezne interakcije opisane su korištenjem polja sila OPLS-AA (Optimized Parameters for Liquid Simulation – All Atoms).⁶⁵ Parametri za ione HSO_4^- i H_2PO_4 određeni su pomoću LigParGen servera.^{66–68} Početna struktura za simulaciju molekulske dinamike u otopini dobivena je kao rezultat simulacije kompleksa u vakuumu. Molekule otapala dodane su eksplicitno. Kako bi se postigla elektroneutralnost sustava dodan je tetrametilamonijev kation čiji je položaj fiksiran kako ne bi ometao vezanje aniona na ligand. Zatim je provedena simulacija molekulske dinamike u NpT uvjetima u trajanju od 50,5 ns pri čemu prvih 0,5 ns nije uzeto u obzir u daljnjoj analizi. Kao numerički integrator korišten je Verletov algoritam⁶⁹ s vremenskim korakom od 1 fs. Tijekom simulacije održavana je temperatura sustava od 298,15 K pomoću Nose–Hoverovog^{70,71} termostata s vremenskom konstantom od 0,2 ps, dok je tlak održavan pomoću Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein⁴⁸ barostata s vremenskom konstantom od 10 ps. Za izračun neveznih van der Waalsovih interakcija i Coulombovih interakcija kratkog dometa korišten je radijus od 16 Å. Za izračun Coulombovih interakcija dugog dometa korišten je Ewaldov algoritam implementiran u PME (*Particle mesh Ewald*) proceduru.⁷²

Molekulske strukture anionskih kompleksa liganda **L** dobivene su PCA (*Principal Component Analysis*) obradom koordinacijske matrice čiji su redci sadržavali udaljenosti ion–amidni proton i kutove između aniona, amidnih protona i amidnih atoma dušika u pojedinim vremenima tijekom simulacije. Nakon toga je provedena klsterska analiza koordinata struktura iz trajektorije dobivenih iz prve tri komponente. Kao reprezentativne strukture uzete su one koje pripadaju centroidu klastera koji sadrži najveći broj molekulskih struktura. Molekulske strukture slobodnog peptida dobivene su na isti način iz koordinacijske matrice za nastajanje intramolekulskih vodikovih veza. Molekulske strukture prikazane su pomoću programa VMD.⁷³

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kompleksi ciklopeptida L u acetonitrilu

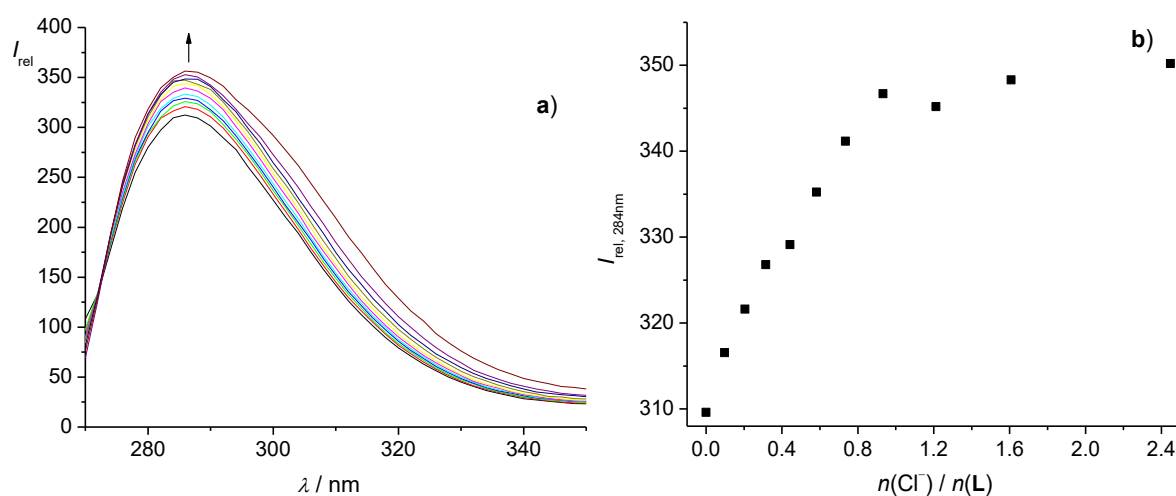
Afinitet vezanja ciklopeptida L s halogenidnim anionima, oksoanionima i tiocijanatom određen je fluorimetrijskim, spektrofotometrijskim, ^1H NMR i mikrokalorimetrijskim titracijama te su rezultati prikazani u tablici 1. Napravljene su i titracije cirkularnog dikroizma (CD) kako bi se dobio uvid u strukturne promjene koje se odvijaju prilikom reakcije kompleksiranja, a strukture kompleksa su određene simulacijama molekulske dinamike.

Tablica 1. Konstante ravnoteže za vezanje spoja L s halogenidnim ionima, oksoanionima i tiocijanatom u acetonitrilu pri 25°C.

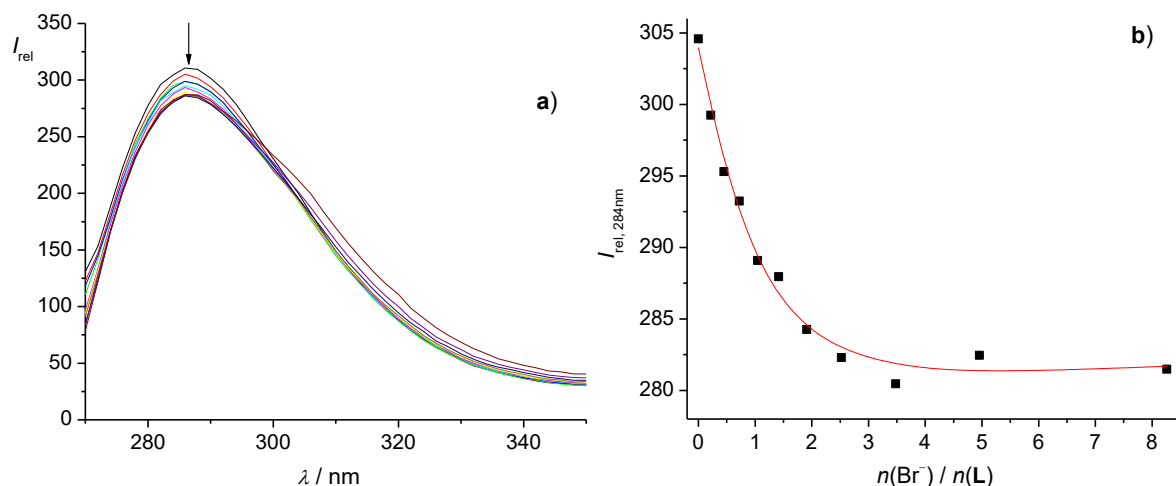
anion	$\log\left(\frac{K}{\text{dm}^{-3}\text{mol}^{-1}}\right) \pm SE$
Cl^-	$6,06 \pm 0,04^{\text{d}}$
Br^-	$4,97 \pm 0,10^{\text{a}}$
I^-	$3,39^{\text{c}}$
HSO_4^-	$4,31 \pm 0,07^{\text{a}}$
H_2PO_4^-	$4,18 \pm 0,08^{\text{a}}$
NO_3^-	$3,27 \pm 0,03^{\text{a}}$ $3,43^{\text{c}}$
SCN^-	$2,91 \pm 0,07^{\text{a}}$ $2,92^{\text{c}}$

^afluorimetrija, ^bUV-Vis spektrofotometrija, ^c ^1H NMR titracija, ^dmikrokalorimetrija, SE – standardna devijacija ($N = 3$)

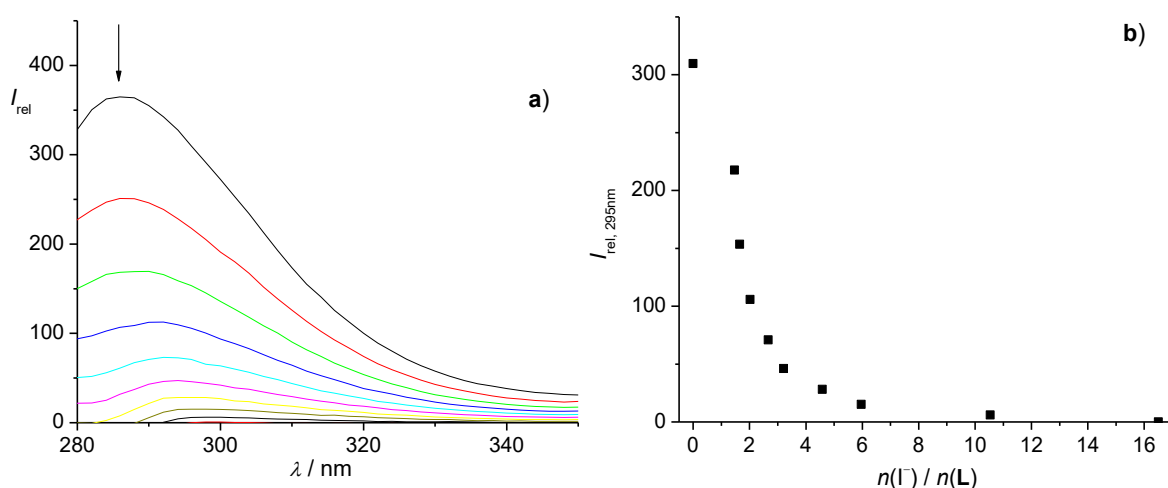
Iz tablice 1. vidljivo je da ciklopeptid **L** veže halogenidne ione pri čemu stabilnost kompleksa opada u redoslijedu $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. Također se vežu oksoanioni HSO_4^- , H_2PO_4^- , NO_3^- te anion SCN^- . Mogućnost korištenja ciklopeptida **L** kao fluorimetrijskog senzora aniona ispitana je fluorimetrijskim titracijama. Dodavanje svih aniona u otopinu ciklopeptida **L** dovodi do promjene relativnog intenziteta fluorescencije (slike 5–11). Za Cl^- , HSO_4^- i H_2PO_4^- dolazi do povećanja relativnog intenziteta fluorescencije u području oko 280 nm dok za isti dio spektra intenzitet opada za ione Br^- , I^- , NO_3^- i SCN^- . Fluorimetrijskim titracijama određene su konstante ravnoteže za skoro sve komplekse osim za kompleks s kloridom koja je određena mikrokalorimetrijskom titracijom (slika 12) i kompleks s jodidom koja je određena ^1H NMR titracijom (slika 22). U titraciji s kloridom opažena je linearna ovisnost emisijskog intenziteta do ekvimolarnog omjera (slika 5.) dok vezanje I^- uzrokuje jako utišavanje fluorescencije ciklopeptida **L** pa se dobiveni podaci nisu mogli pouzdano obraditi (slika 7.). Efekt utišavanja fluorescencije sličan je onom za cijanofenilalanin opisan u radu *Pazos et al.*⁷⁴



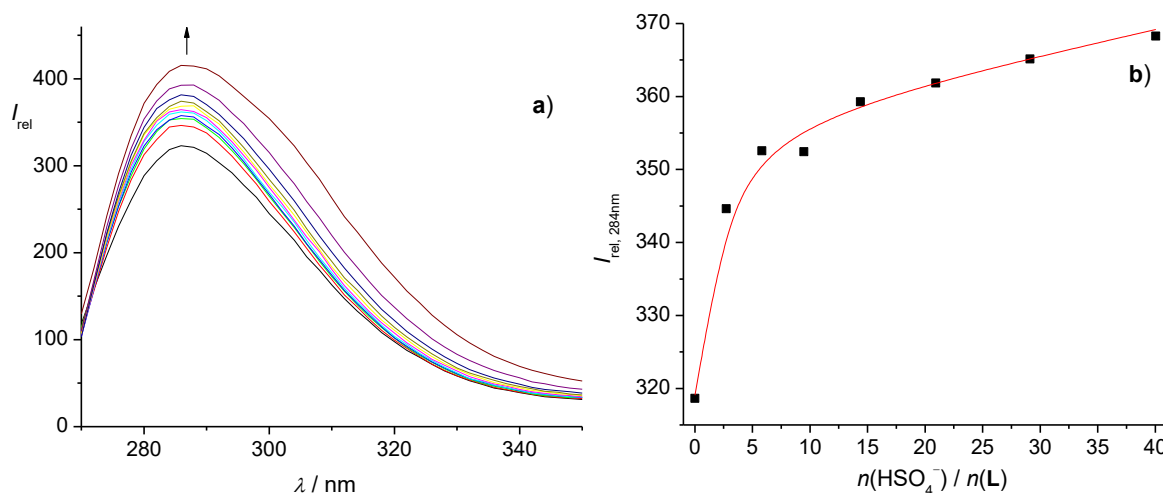
Slika 5. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,29 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 2,84 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



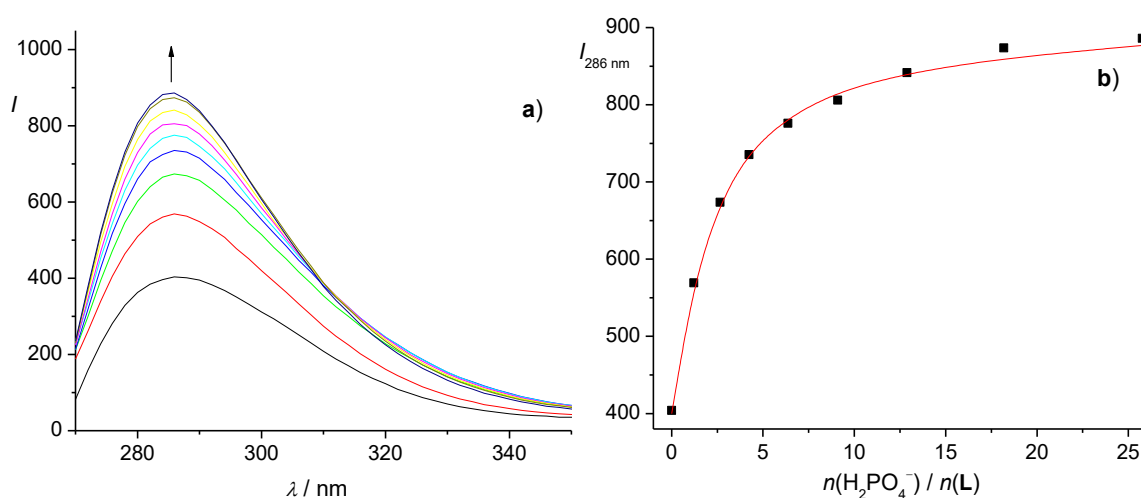
Slika 6. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 4,00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 8,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.



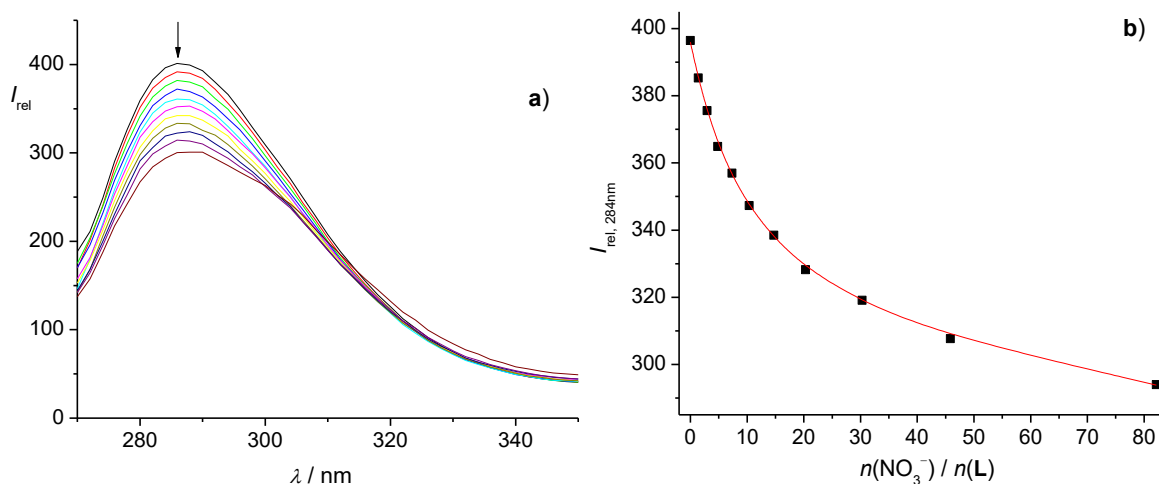
Slika 7. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 4,34 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 9,15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



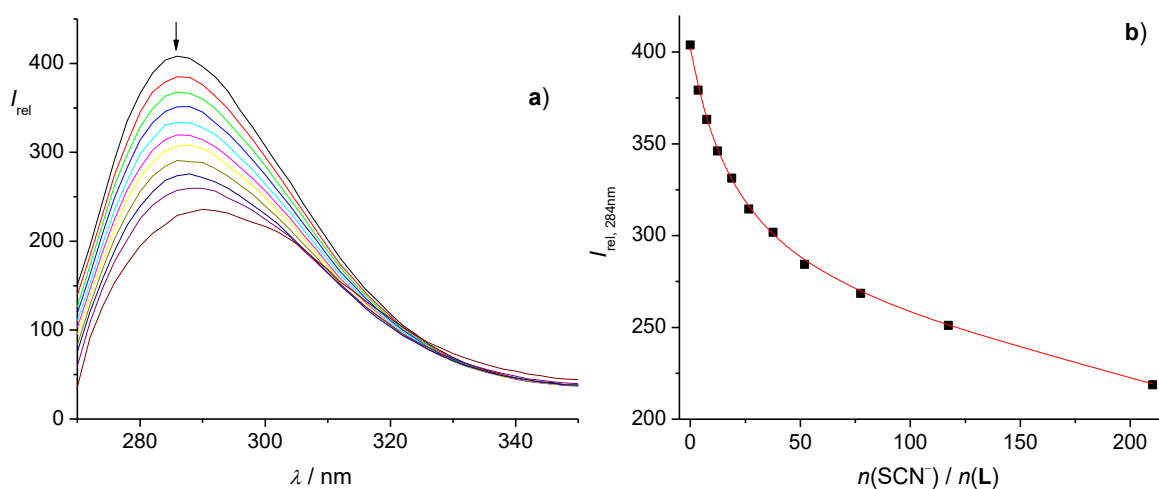
Slika 8. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 3,71 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0155 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.



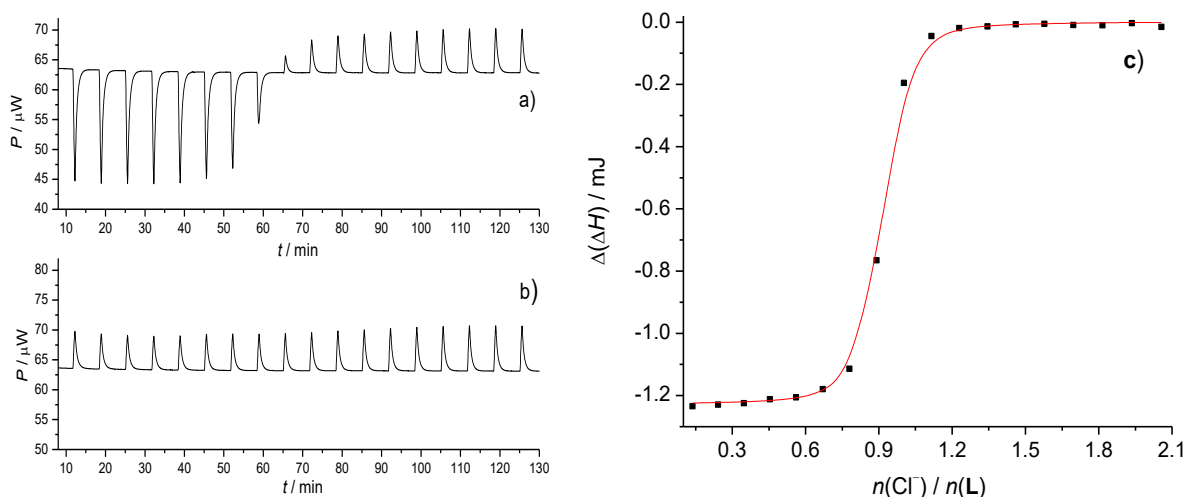
Slika 9. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,14 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 8,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.



Slika 10. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 4,57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 9,09 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

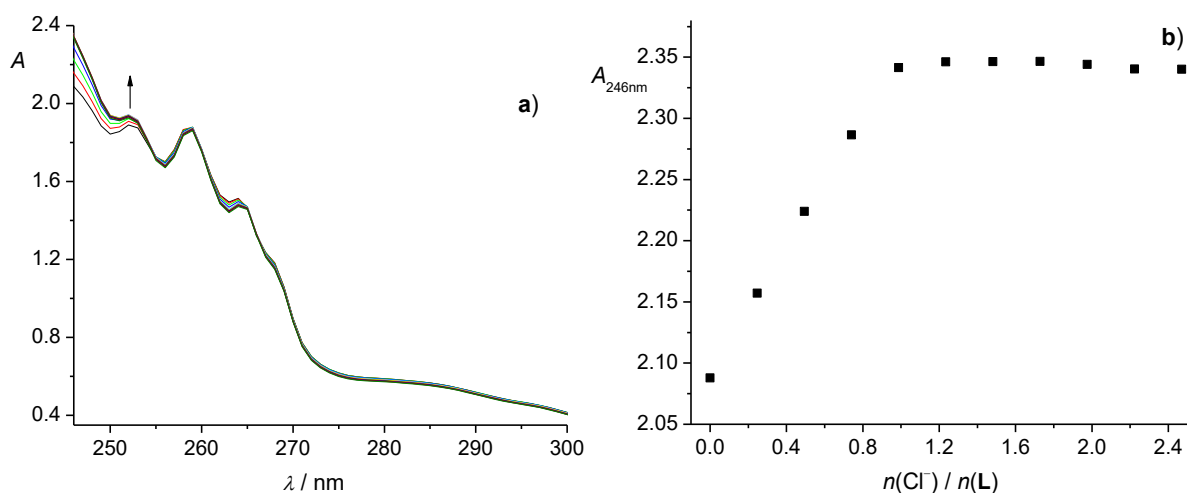


Slika 11. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,94 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,0302 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

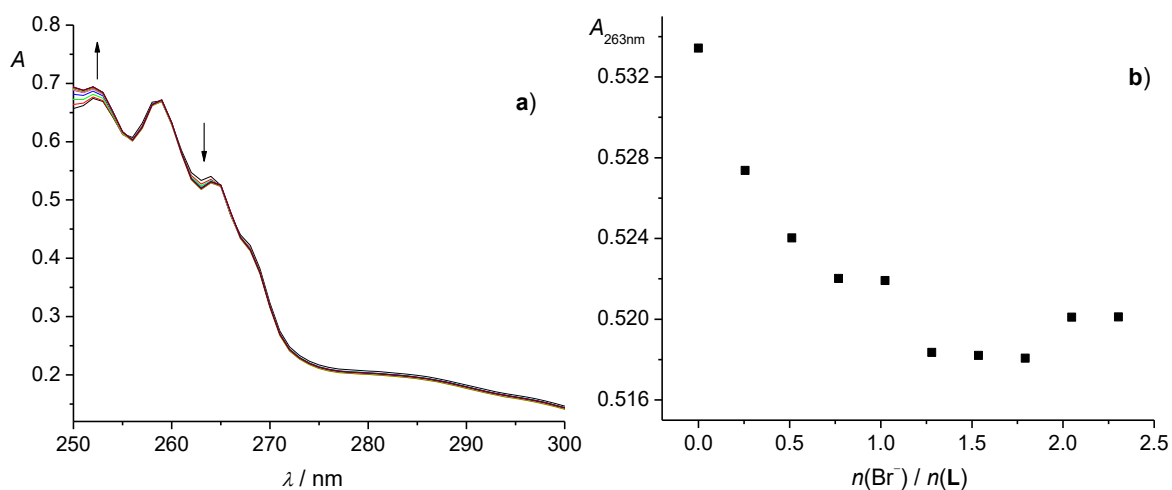


Slika 12. a) Mikrokolorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,25 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 5,22 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokolorimetrijska titracija čistog acetonitrila s TEACl ($c = 5,22 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

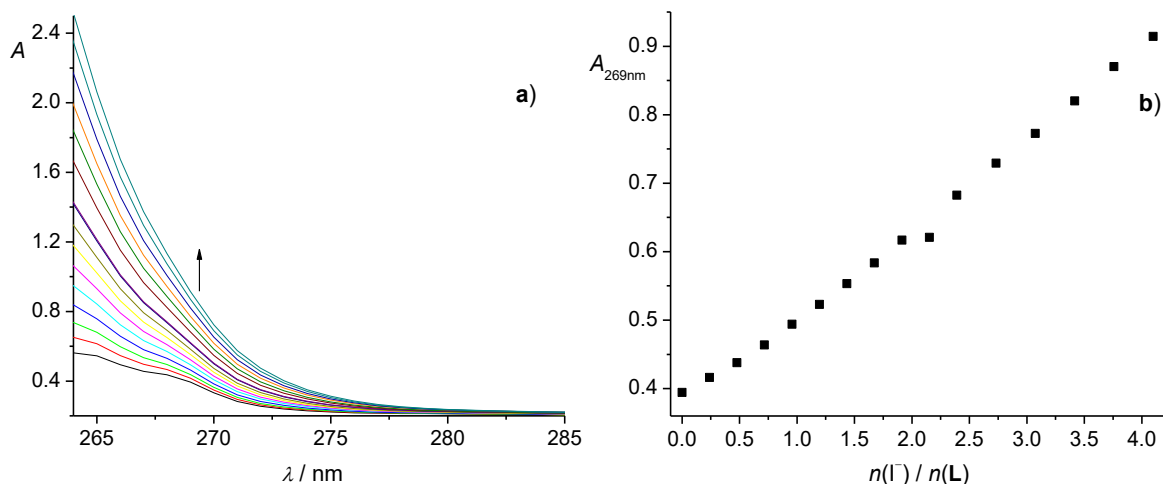
Spektrofotometrijskim titracijama praćena je promjena u spektralnom području u kojem apsorbiraju fenilne podjedinice ciklopeptida **L** (slike 13–19). Opažene promjene u apsorbanciji uslijed vezanja svih su male, dok su u titracijama s ionima I^- , NO_3^- i SCN^- te promjene zamaskirane apsorpcijom aniona (slike 15, 18 i 19) što dovodi do skoro linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji aniona. Pri kraju titracija uočeno je blago taloženje, osobito kod titracija kod kojih su korištene veće koncentracije ciklopeptida **L**.



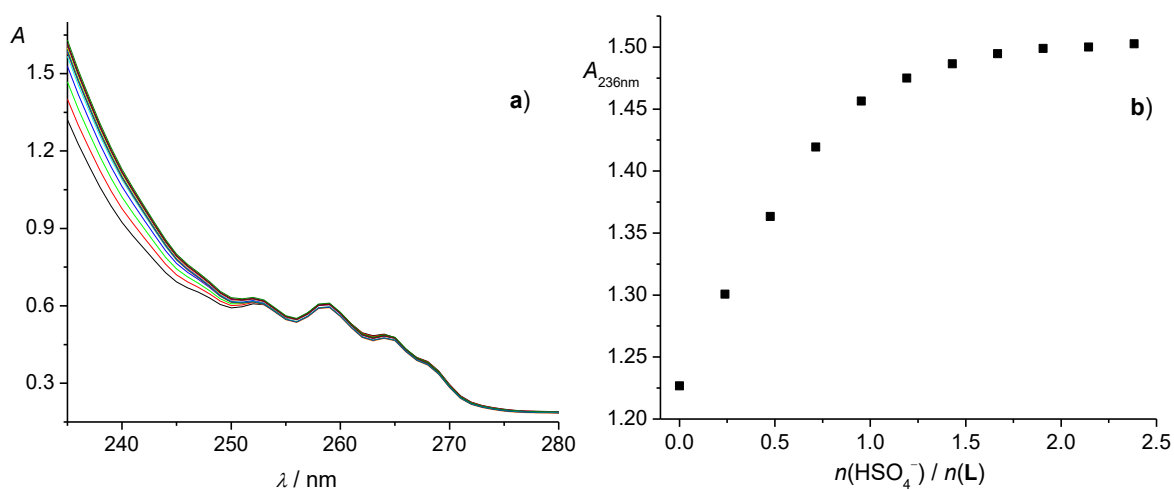
Slika 13. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 1,27 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 7,38 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



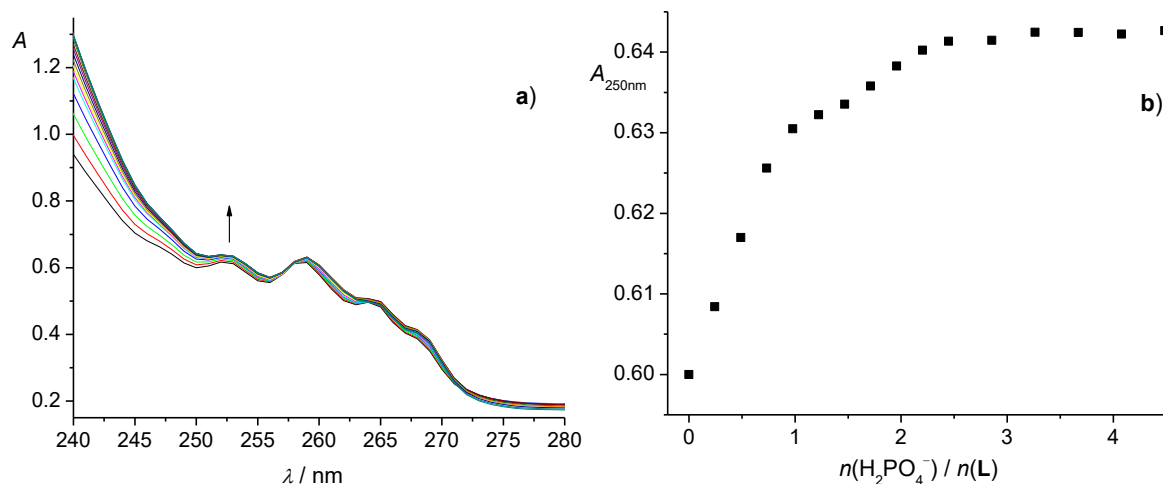
Slika 14. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 5,03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



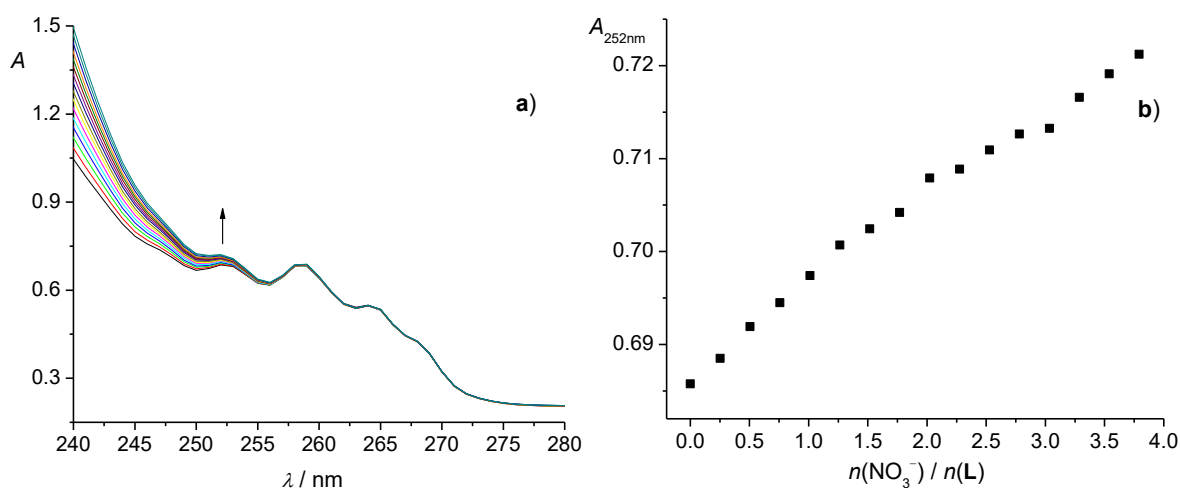
Slika 15. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,0151 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



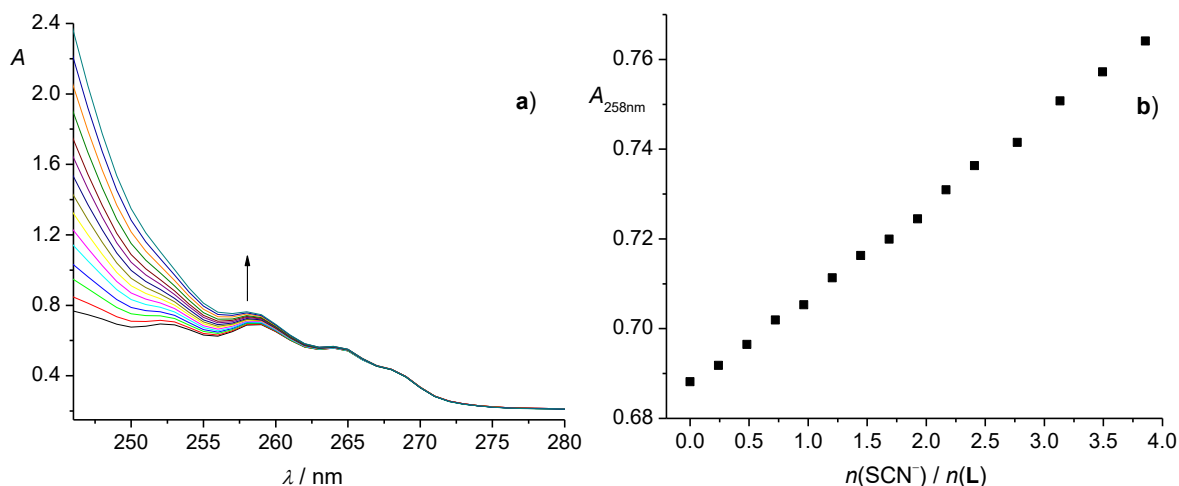
Slika 16. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,23 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 2,88 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika 17. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,23 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH₂PO₄ ($c = 3,45 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika 18. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO₃ ($c = 0,0149 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.

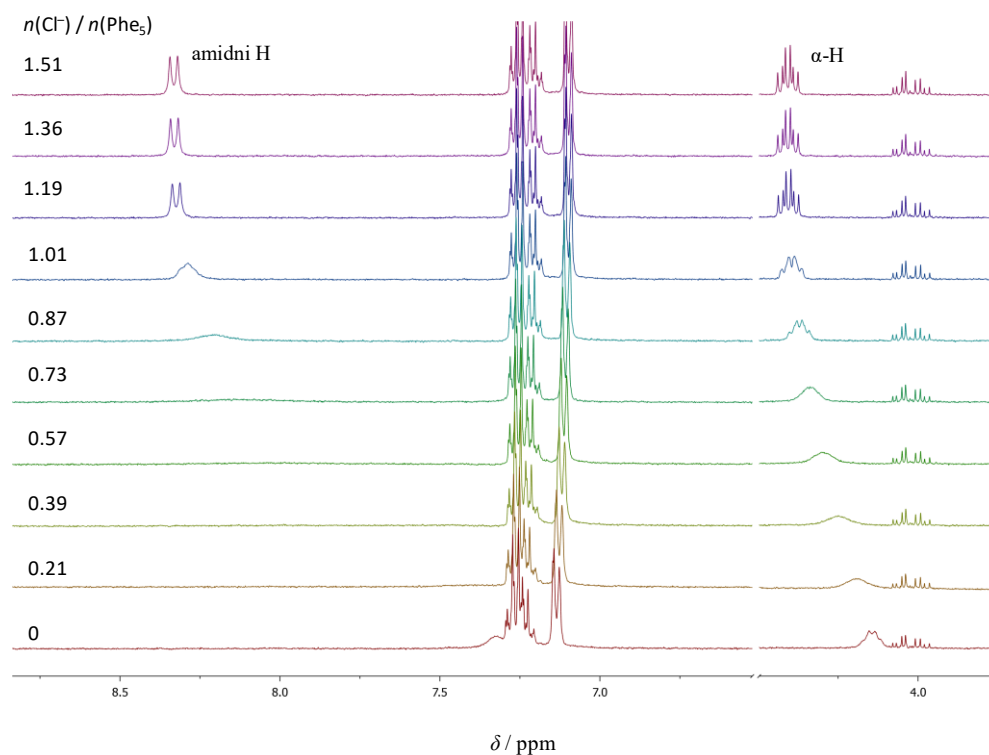


Slika 19. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,0213 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.

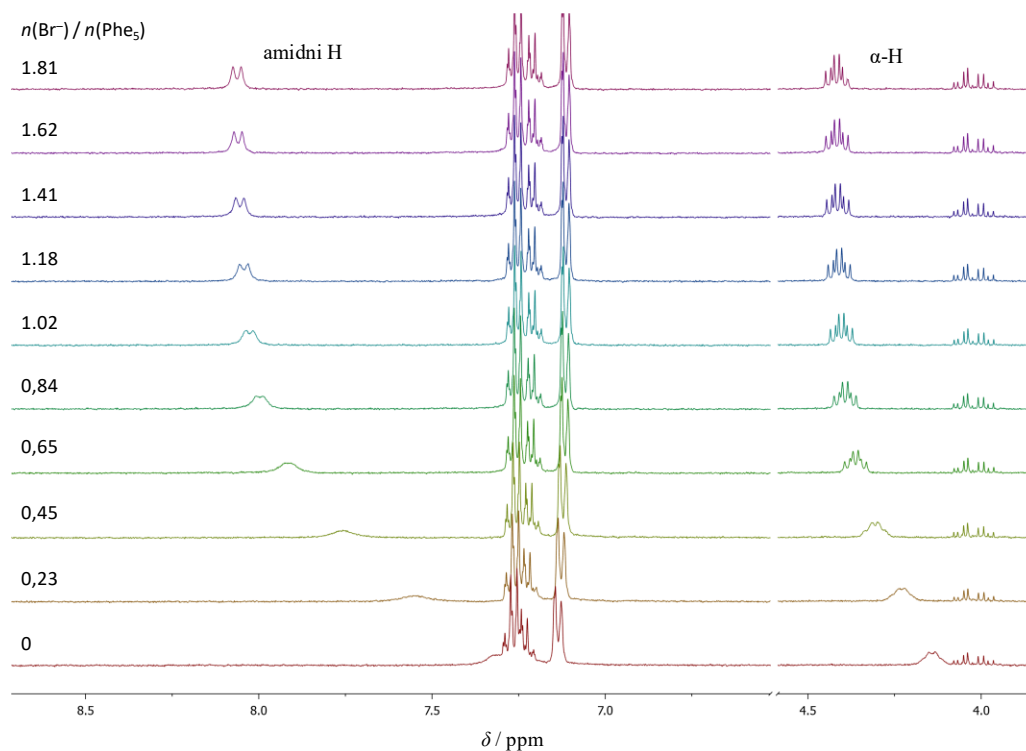
Kompleksiranje aniona s ligandom **L** praćeno je i pomoću ^1H NMR titracija (slike 20–26). Uočeni su kemijski pomaci amidnih i C_α protona što ukazuje na to da se anioni vežu na okosnicu ciklopeptida **L** preko amidnih grupa. Iz ^1H NMR titracija dobivene su konstante stabilnosti za I^- , NO_3^- i SCN^- koje su u dobrom slaganju sa fluorimetrijskim titracijama. U titraciji spoja **L** s H_2PO_4^- protoni amidne skupine pomaknuti su niz polje čemu slijedi pojava novog signala protona pri većim množinskim omjerima aniona i ciklopeptida (slika 24). Analogan fenomen je opažen u spektrofotometrijskoj titraciji **L** s H_2PO_4^- gdje dolazi do velike promjene u spektru iznad ekvimolarnog omjera (slika 17). Ove dvije observacije ukazuju na mogući nastanak kompleksa više stehiometrije, najvjerojatnije 1:2 (receptor : anion). Nastanak 1:2 kompleksa nije potvrđeno regresijskom analizom jer je kvaliteta dobivenih podataka nedovoljna za pouzdano određivanje konstante stabilnosti. U prijašnjim istraživanjima kompleksiranja ciklopentalucina s anionima⁷⁵ opažen je kompleks s dihidrogen fosfatom stehiometrije 1:2 što dodatno upućuje na to da dolazi do nastanka istog kompleksa i u slučaju ciklopeptida **L**.

Vrijednosti dobivenih konstanti stabilnosti slične su kao i za komplekse ciklopentalucina,⁷⁵ što ukazuje da alifatski i aromatski bočni ogranci ne utječu puno na vezanje aniona. Reakcijske entalpije ($\Delta_r H = -15 \text{ kJ mol}^{-1}$) i entropije ($\Delta_r S = 65 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) za kompleks spoja **L** s Cl^- su slične za vezanje Cl^- s ciklopentalucinom ($\Delta_r H = -11 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta_r S = 76 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Prema tome, može se zaključiti da umetanje fluorescentnih grupa u

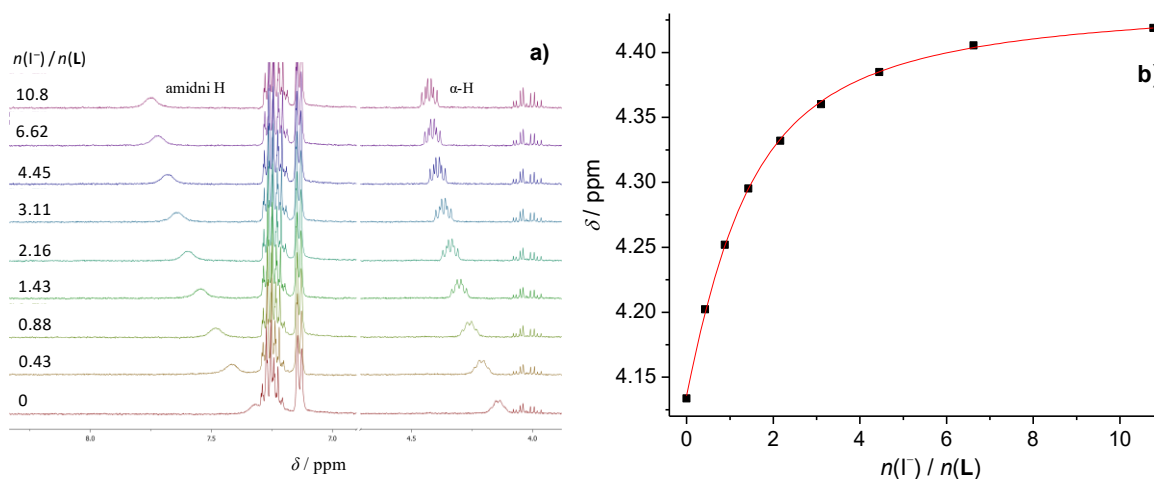
bočne ogranke ciklopeptida poboljšava osjetljivost detekcije aniona, ali ne dovodi do promjene afiniteta vezanja u usporedbi s ciklopentaleucinom. Jedina razlika koja je uočena između ciklopentaleucina i receptora **L** je u tome što **L** ne stvara sendvič komplekse s HSO_4^- , kao što je slučaj s ciklopentaleucinom.



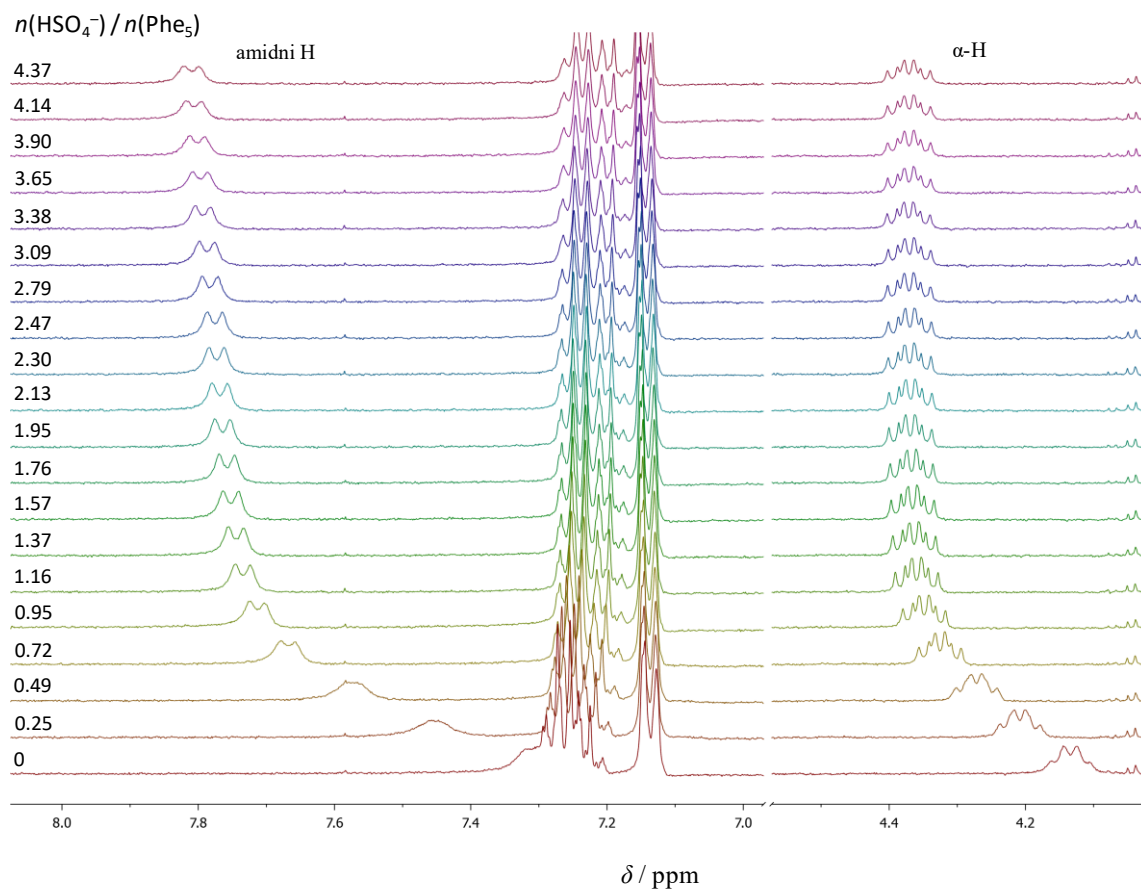
Slika 20. ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 5,17 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 2,33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri 25 °C.



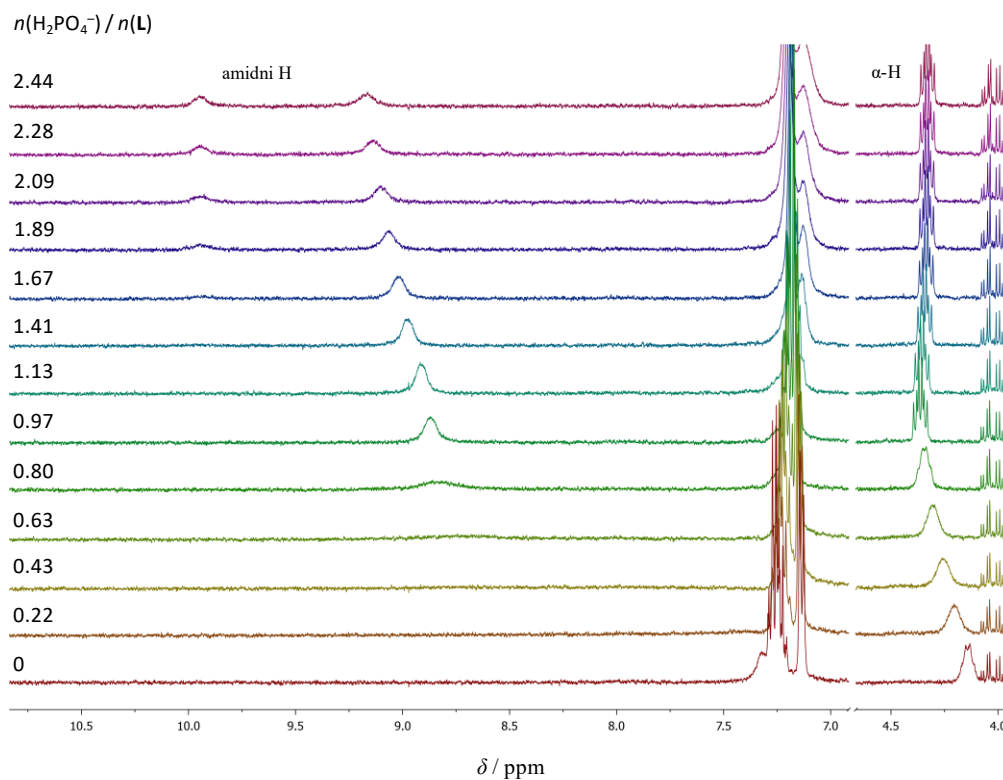
Slika 21. ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,26 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 2,61 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



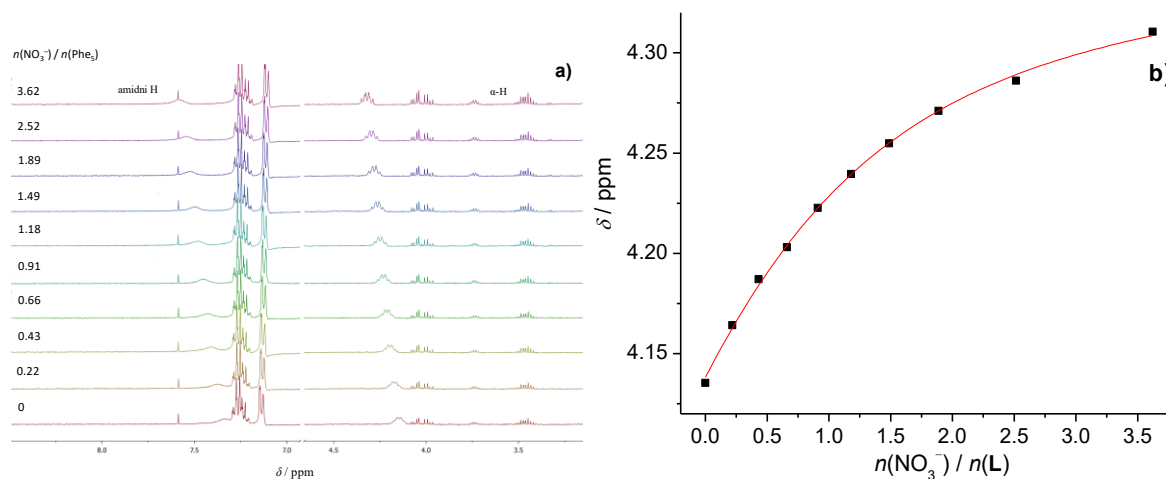
Slika 22. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,80 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,0105 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



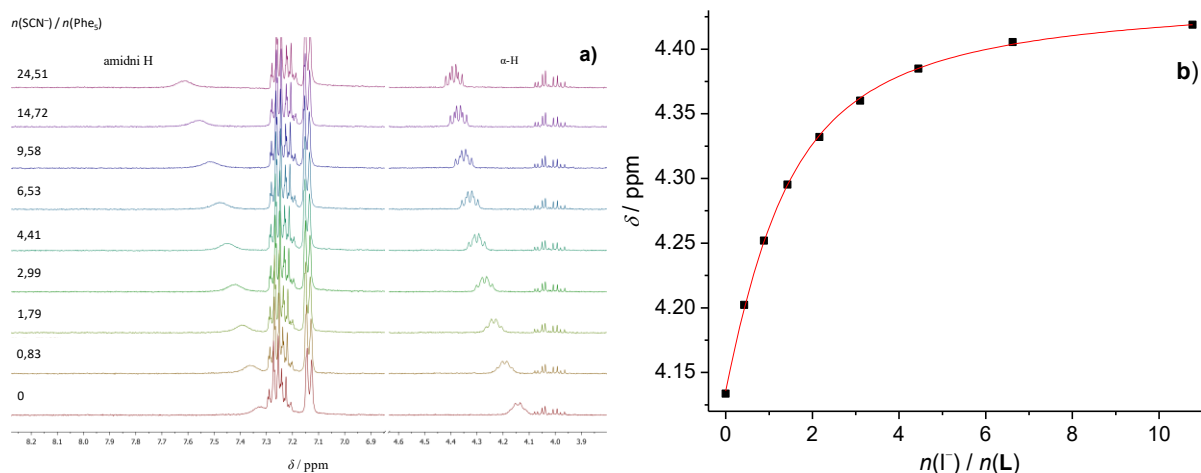
Slika 23. ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,19 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 5,34 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri 25 °C.



Slika 24. ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,65 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 2,71 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri 25°C .



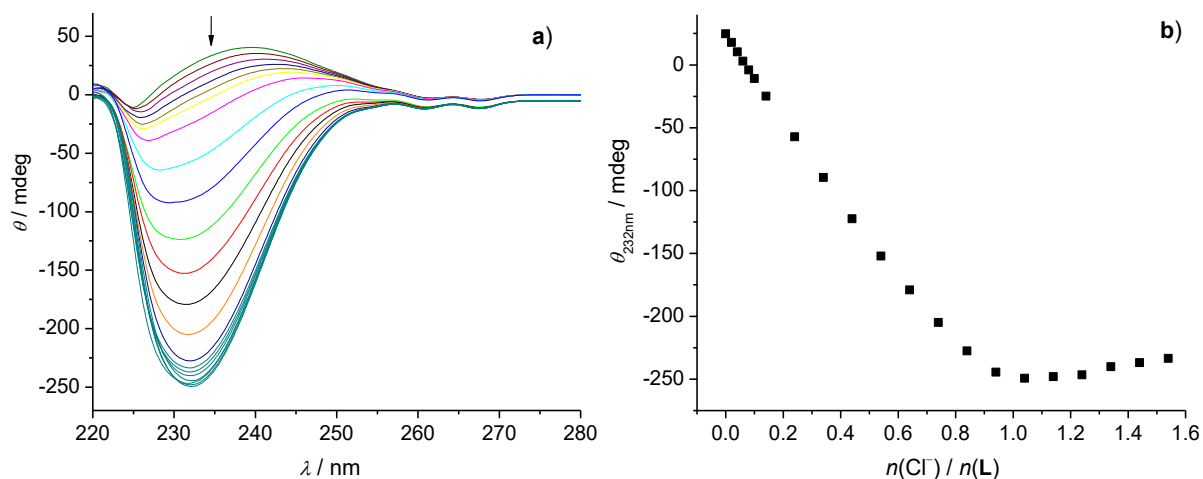
Slika 25. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,26 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri 25°C . b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



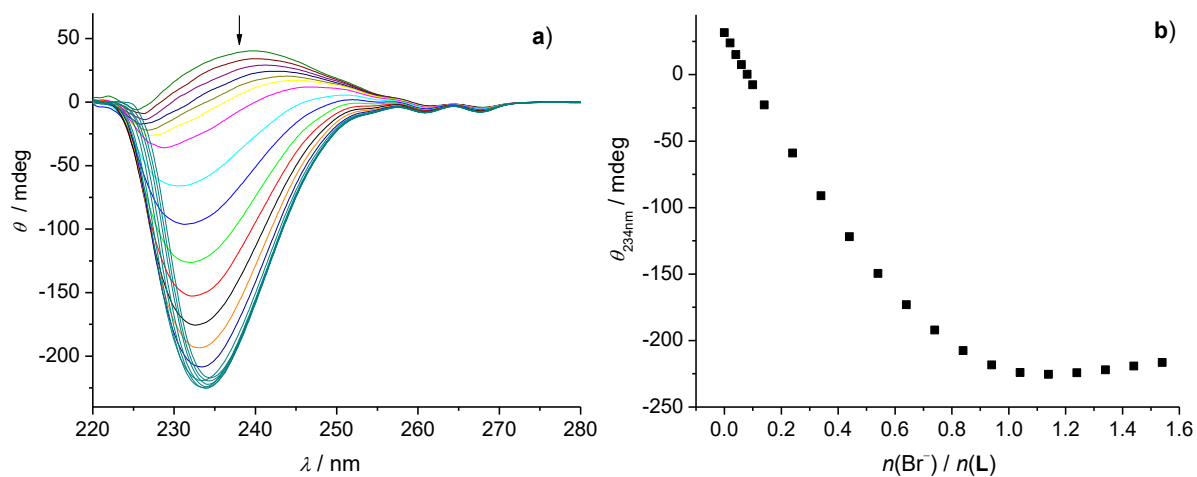
Slika 26. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,19 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,0178 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.

U acetonitrilu su napravljene titracije cirkularnog dikroizma (CD) s ionima Cl^- , Br^- , HSO_4^- i H_2PO_4^- u kojima su uočene promjene u CD spektru uslijed nastanka kompleksa (slike 27–30). Strukturne promjene očituju se u CD spektru u $n-\pi^*$ prijelaznoj vrpici bočnih ogranaka pri $\approx 230 \text{ nm}$. U svim slučajevima promatran je jak negativni signal koji se pojavljuje nakon dodatka aniona u otopinu liganda. Ove titracije izvedene su samo za navedene ione i to samo u acetonitrilu, ali je za očekivati slične rezultate za ostale anione. CD spektri također su izračunati iz struktura liganda **L** u anionskim kompleksima dobivenim simulacijama molekulske dinamike uz korištenje DichroCalc^{76,77} mrežnog servera. Pri izračunu CD spektara iz MD simulacije uzeta je svaka pedeseta struktura ciklopeptida u kompleksu, ukupno 1000 struktura po kompleksu. Izračunat je spektar za svaku strukturu te je kao reprezentativni spektar uzet prosjek svih spektara. Postoji dobro kvalitativno slaganje između eksperimentalnih i izračunatih spektara (slika 31), pogotovo u odnosu spektara slobodnog liganda **L** i njegovih kompleksa. Treba spomenuti da su izračunati spektri u odnosu na eksperimentalne plavo pomaknuti (eng. *blue shifted*) te se razlikuju u intenzitetu dok su eksperimentalno određeni molarni koeficijenti eliptičnosti slični za sva četiri kompleksa. Razlog tomu najvjerojatnije leži u metodi korištenoj za izračun spektara gdje su CD spektri izračunati samo iz strukture **L**, ne uzimajući u obzir molekule otapala i aniona te uz korištenje parametara optimiziranih za vodene otopine.⁷⁷ Bez obzira, ova usporedba eksperimentalnih i računalnih podataka je zadovoljavajuća, te donekle potvrđuje strukturne karakteristike

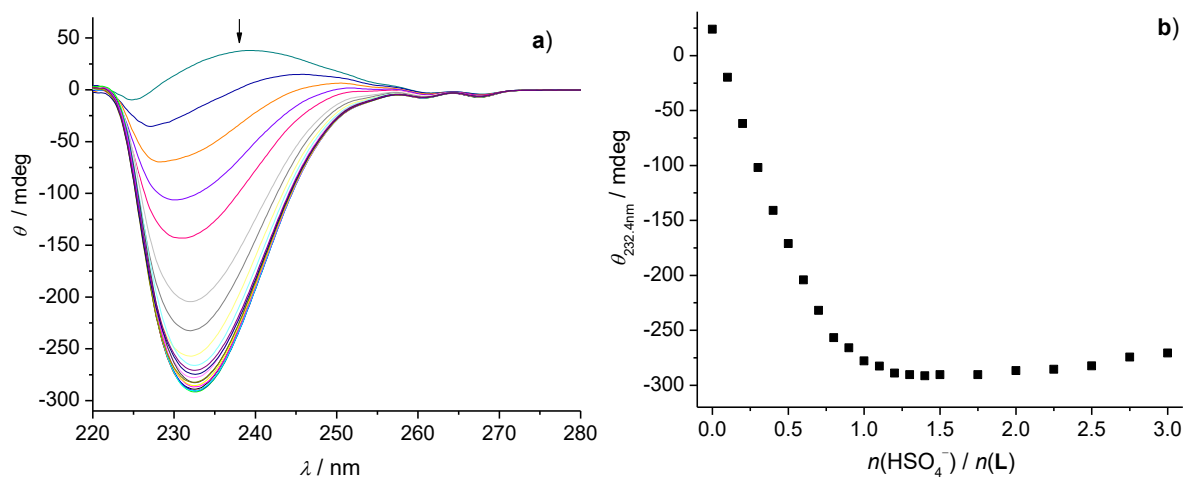
slobodnog ciklopeptida i anionskih kompleksa dobivenih MD simulacijama, točnije na reorijentiranje amidnih skupina prilikom kompleksiranja aniona.



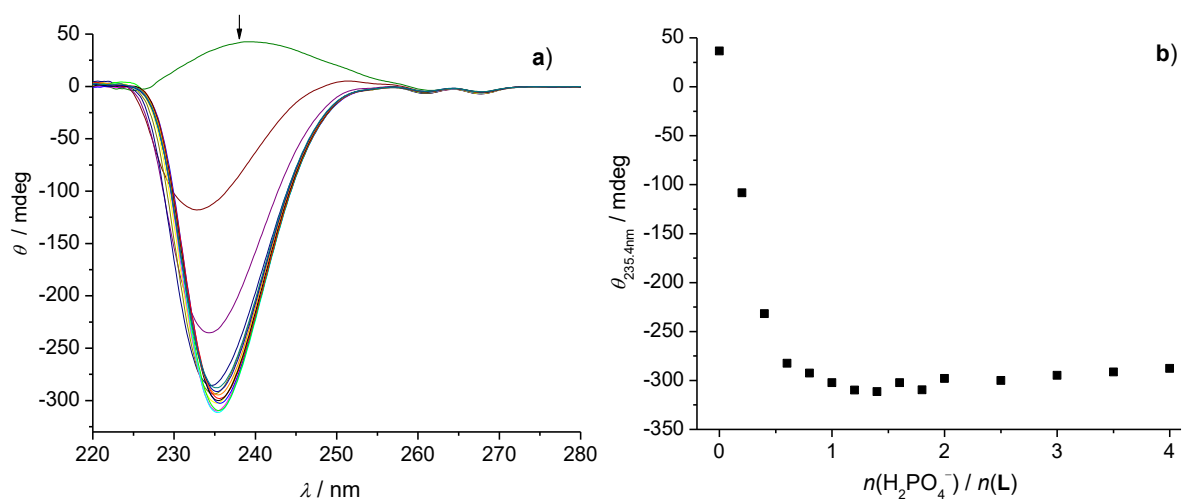
Slika 27. a) CD titracija spoja **L** ($c = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost eliptičnosti o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



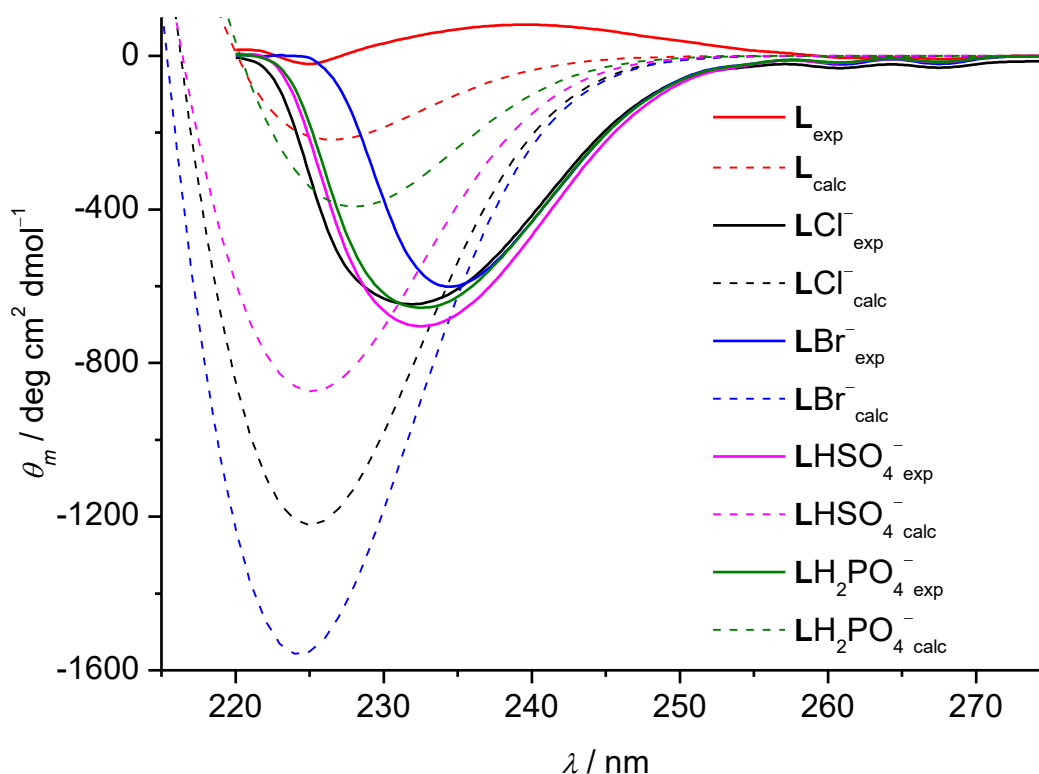
Slika 28. a) CD titracija spoja **L** ($c = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost eliptičnosti o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika 29. a) CD titracija spoja **L** ($c = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 5,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost eliptičnosti o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika 30. a) CD titracija spoja **L** ($c = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH₂PO₄ ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri 25 °C. b) Ovisnost eliptičnosti o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika 31. Eksperimentalni i izračunati CD spektri slobodnog spoja **L** u kompleksa s Cl^- , Br^- , HSO_4^- i H_2PO_4^- u acetonitrilu pri 25 °C.

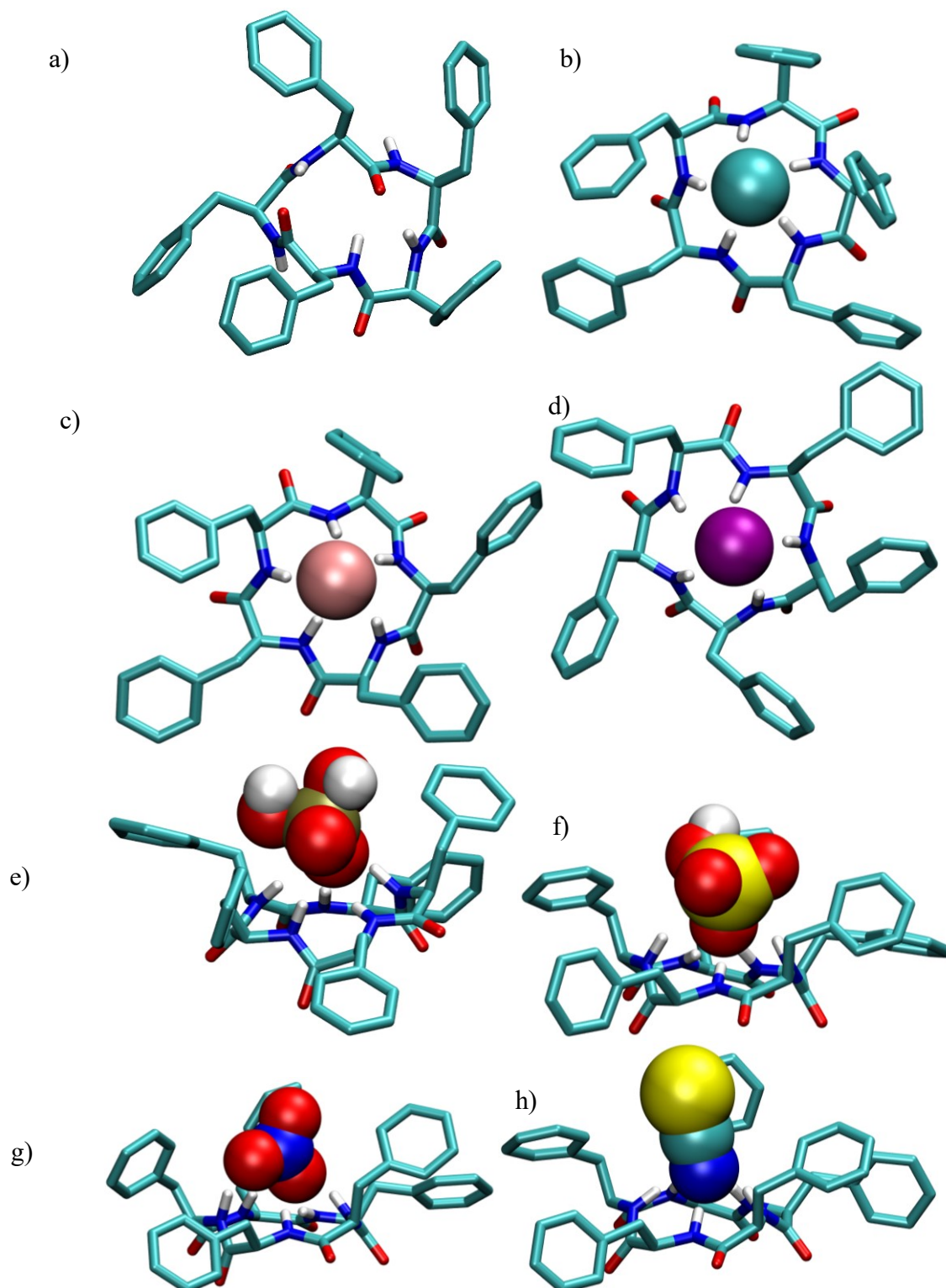
U svrhu određivanja strukture kompleksa liganda **L** s proučavanjem anionima u acetonitrilu provedene su simulacije molekulske dinamike (MD). Rezultati tih simulacija su prosječni koordinacijski brojevi aniona (tablica 2) i prosječne geometrije kompleksa u otopini (slika 32).

Tablica 2. Prosječni broj koordiniranih atoma amidnih vodika u anionskim kompleksima liganda **L** u acetonitrilu

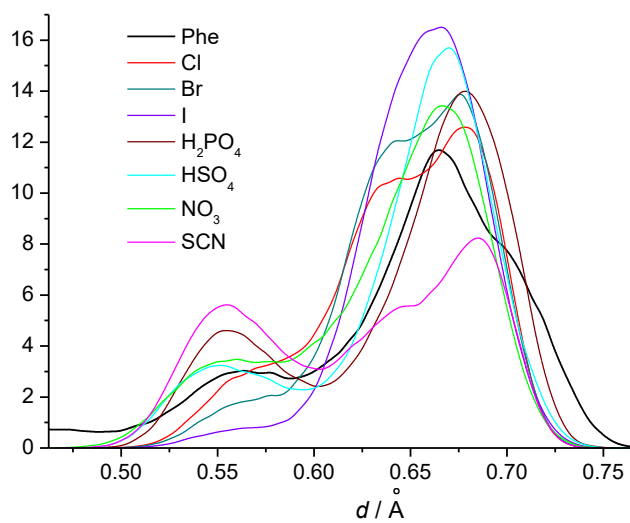
anion	Cl^-	Br^-	I^-	H_2PO_4^-	HSO_4^-	NO_3^-	SCN^-
N(-H)	4,98	4,97	4,85	4,93	4,33	4,90	4,93

MD simulacijama promatrani su kompleksi stehiometrije 1:1 s dvije početne konformacije liganda, *endo* i *egzo*. *Endo* konformacija je ona u kojoj su anioni smješteni iznad centra okosnice ciklopeptida, na istoj strani na kojoj se nalaze bočni ogranci ciklopeptida, dok je *egzo* konformacija ona u kojoj su anioni na drugoj strani okosnice ciklopeptida. U MD

simulacijama s *endo* konformacijom potvrđeno je da su anioni povezani intermolekulskim vodikovim vezama sa gotovo svim amidnim protonima okosnice ciklopeptida te da tvore strukturu sličnu pentagonalnoj piramidi. U simulacijama sa *egzo* konformacijom anioni su bili koordinirani sa manjim brojem amidnih protona što je u nekim slučajevima dovelo do disocijacije kompleksa. Rezultati ukazuju da je *endo* konformacija preferirana za vezanje aniona. Oksoanioni su vezani za preko jednog ili dva atoma kisika za ciklopeptid, dok je tiocijanat isključivo vezan preko dušikovog atoma. Pozicija fenilnih prstenova u slobodnom **L** i kompleksima je utvrđena na temelju distribucije udaljenosti između centra mase fenilnih prstenova i geometrijskog centra liganda koji je određen α -C atomima okosnice ciklopeptida (slika 33). Za komplekse s halogenidnim ionima pokazano je da su fenilni prstenovi udaljeniji od veznog mjesta u usporedbi sa slobodnim **L**, dok su kod višeatomnih aniona fenilni prstenovi bliže veznom mjestu.



Slika 32. Strukture a) slobodnog liganda **L** i anionskih kompleksa **L** s b) Cl^- , c) Br^- , d) I^- , e) H_2PO_4^- , f) HSO_4^- , g) NO_3^- i h) SCN^- u acetonitrilu dobivene MD simulacijama. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi jasnijeg prikaza.



Slika 33. Distribucija udaljenosti centra mase fenilnih prstenova i geometrijskog centra definiranog α -C atomima kompleksa spoja **L** s anionima u acetonitrilu.

4.2. Kompleksi ciklopeptida L u metanolu

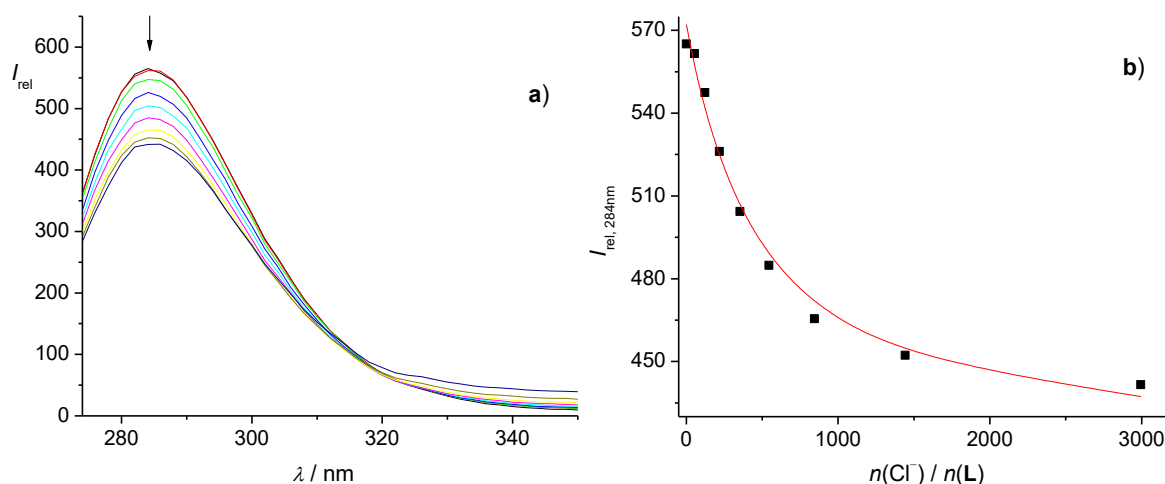
Afinitet vezanja ciklopeptida L s halogenidnim, oksoanionima i tiocijanatom određen je, fluorimetrijskim, spektrofotometrijskim i ^1H NMR titracijama te su rezultati prikazani u tablici 3. Konstante ravnoteže za Br^- , I^- , NO_3^- i SCN^- odredio je Matija Modrušan.¹³

Tablica 3. Konstanta ravnoteže za vezanje spoja L s halidima, oksoanionima i tiocijanatom u metanolu, MeOH pri 25°C.

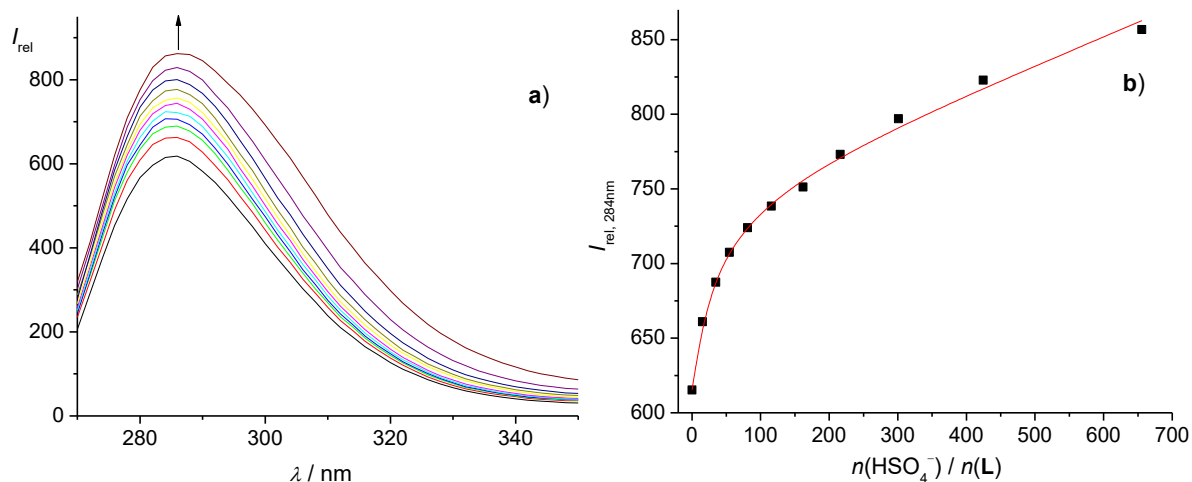
anion	$\log\left(\frac{K}{\text{dm}^{-3}\text{mol}^{-1}}\right) \pm SE$
Cl^-	1,50 ± 0,01 ^a 1,57 ^b 1,64 ^c
Br^- (d)	1,42 ± 0,04 ^a 1,25 ^b 1,60 ^c
I^- (d)	1,72 ± 0,01 ^a 1,28 ^b 1,24 ^c
HSO_4^-	2,88 ± 0,12 ^a 2,43 ^b 2,46 ^c
H_2PO_4^-	3,19 ± 0,04 ^a 2,95 ^b 3,32 ^c
NO_3^- (d)	1,58 ± 0,04 ^a 1,51 ^b 1,11 ^c
SCN^- (d)	1,30 ± 0,01 ^a 0,76 ^b 0,69 ^c

^afluorimetrija, ^bUV-Vis spektrofotometrija, ^c ^1H NMR titracija, SE – standardna devijacija ($N = 3$), ^(d) konstante ravnoteže odredio Matija Modrušan

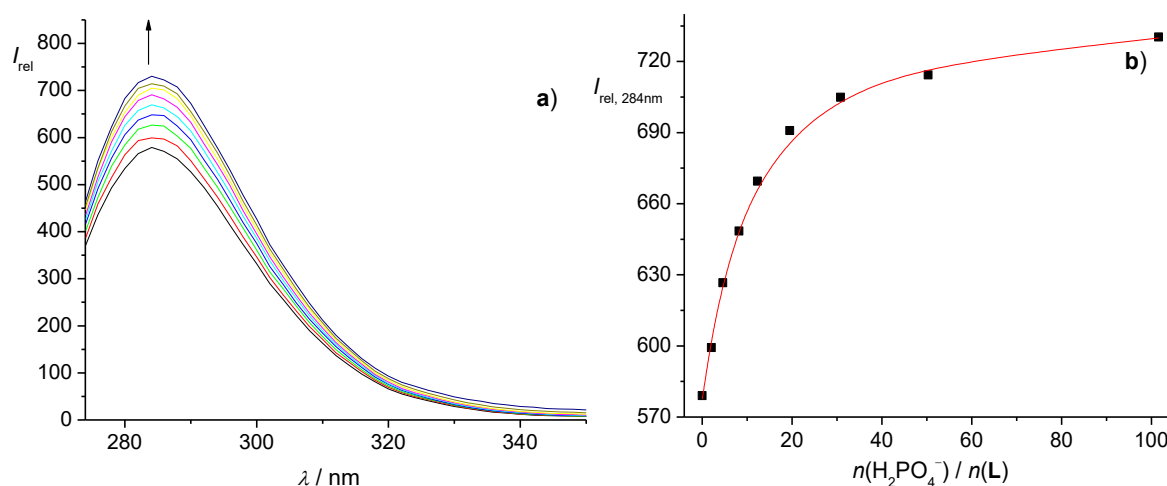
Iz tablice 5 vidljivo je da u metanolu ciklopeptid **L** veže sve anione koji su tvorili komplekse i u acetonitrilu. Pritom nastaju kompleksi stehiometrije 1:1 za koje su konstante stabilnosti određene s tri različite metode. Jedina razlika u odnosu na acetonitril je da H_2PO_4^- ne tvori komplekse viših stehiometrija. Svi su kompleksi relativno niske konstante stabilnosti (oko 1.5) osim onih s ionima HSO_4^- i H_2PO_4^- . Na slikama 34–36 prikazani su rezultati fluorimetrijskih titracija. Svi anioni, osim HSO_4^- i H_2PO_4^- , vezanjem na ciklopeptid **L** uzrokuju utišavanje relativnog intenziteta fluorescencije u području oko 285 nm.



Slika 34. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,10 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,308 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

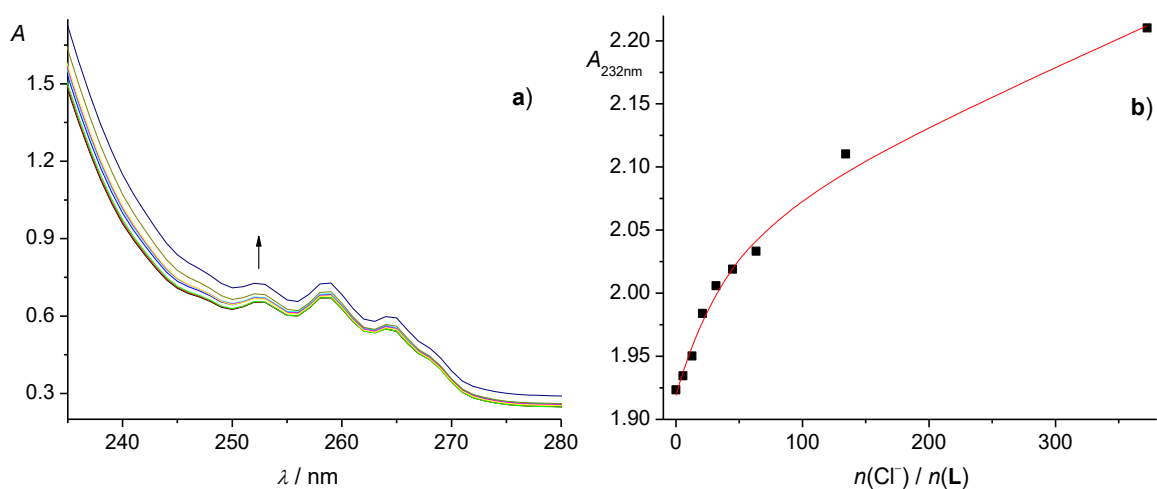


Slika 35. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,09 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0903 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

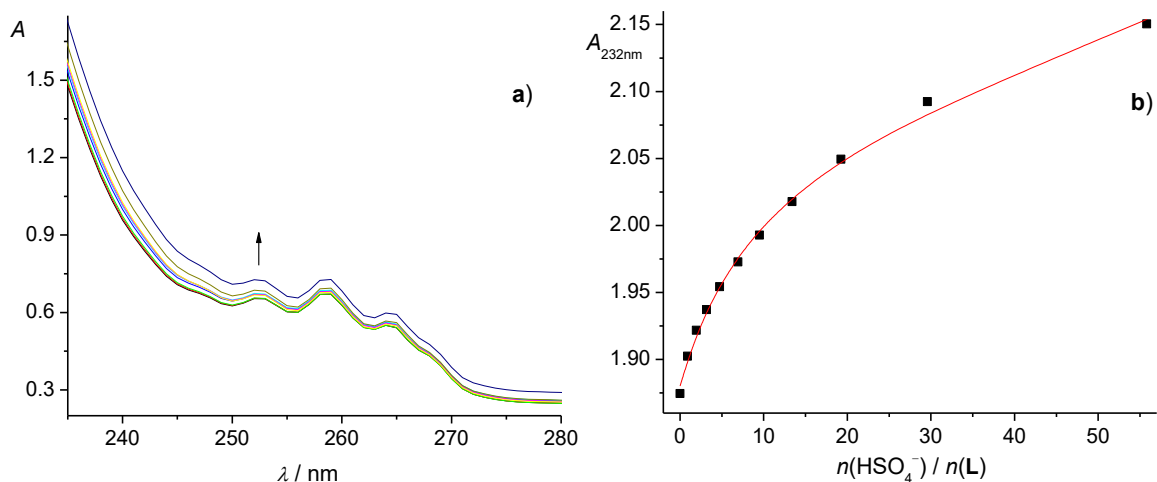


Slika 36. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5,09 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,012 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm , emisijski prorez = 10 nm . b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

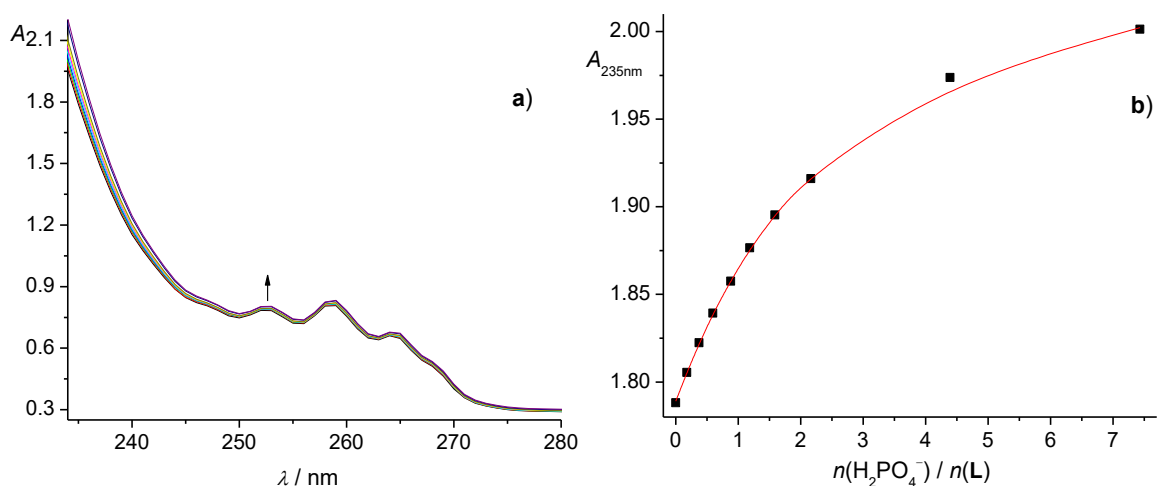
Za razliku od acetonitrila, u spektrofotometrijskim titracijama u metanolu opažene su značajne promjene u apsorpcijskom spektru reakcijske smjese (slike 37–39). Obradom rezultata spektrofotometrijskih titracija određene su konstante stabilnosti. U nekim slučajevima promjene u apsorpcijskom spektru bile su na granici osjetljivosti instrumenta što je dodatno otežalo određivanje konstante stabilnosti. Usprkos tome, dobivene konstante stabilnosti su u prihvatljivom slaganju s onim dobivenim iz fluorimetrijskih i ^1H NMR eksperimentu.



Slika 37. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,04 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,301 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbanije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

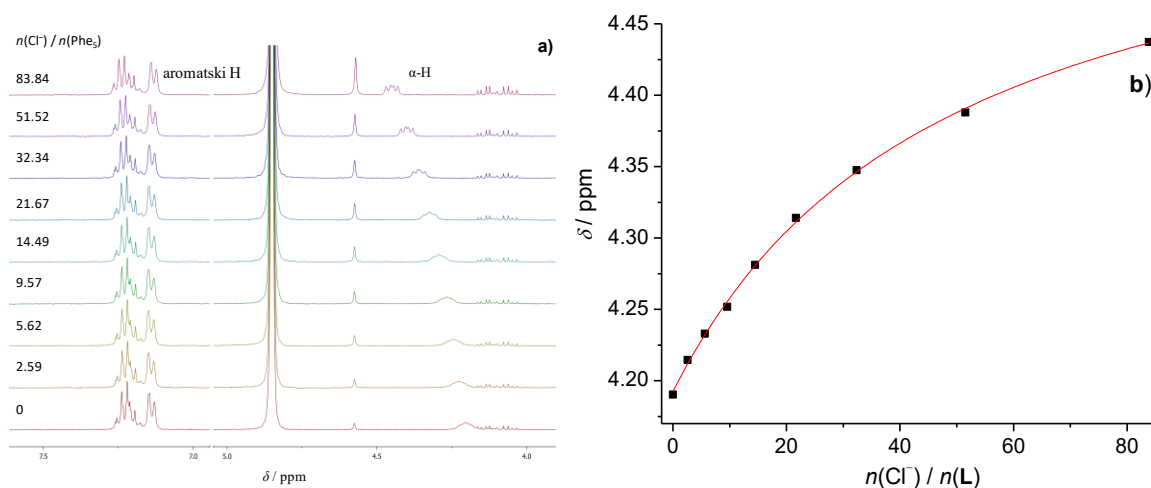


Slika 38. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,04 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0451 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

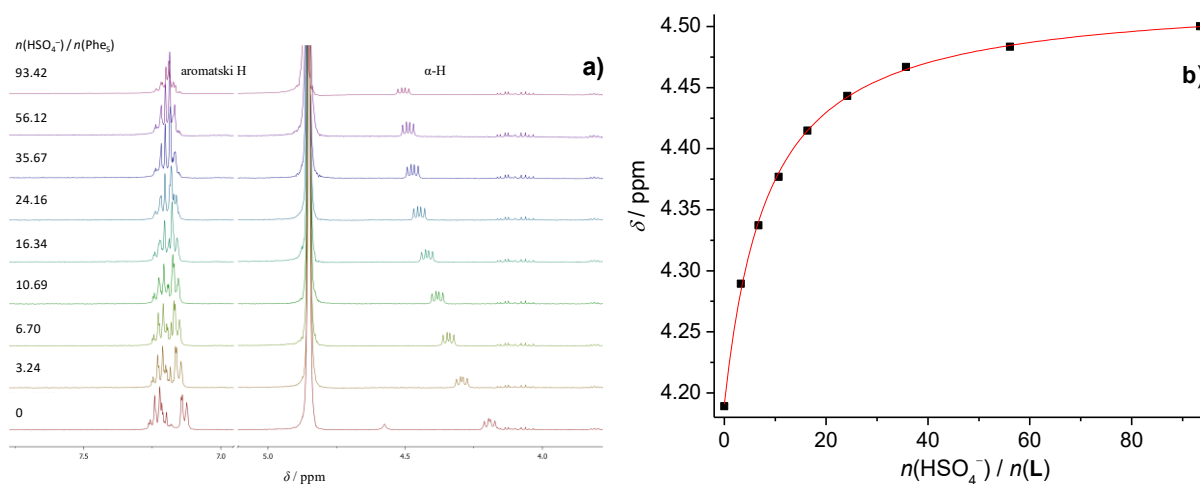


Slika 39. a) Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 4,58 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH₂PO₄ ($c = 6,19 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu pri 25 °C. b) Ovisnost apsorbancije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti; — izračunate vrijednosti.

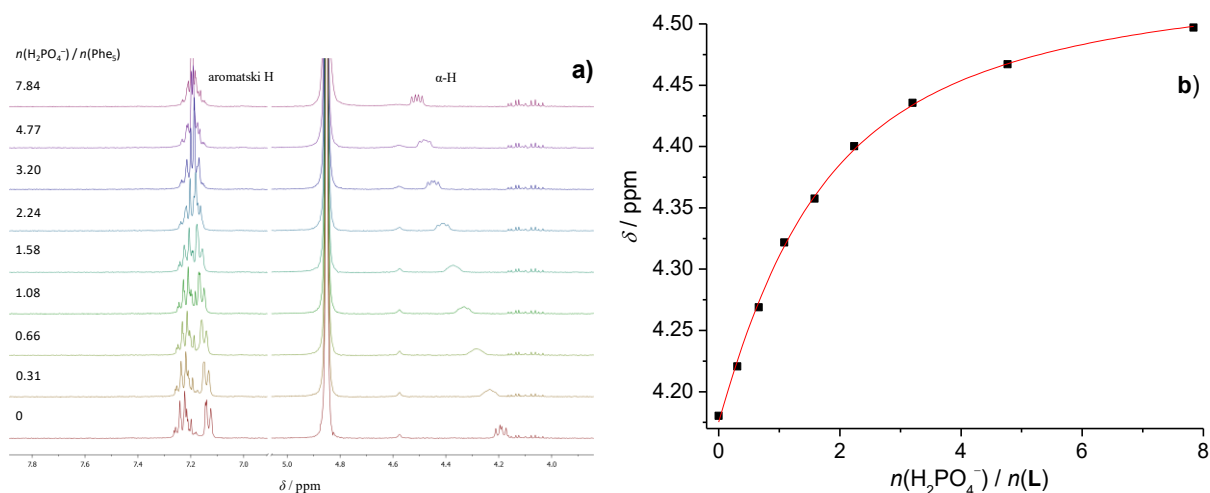
Napravljene su i ^1H NMR titracije (slike 40–42) u metanolu. Iz dobivenih rezultata određene su konstante stabilnosti nastalih kompleksa koje su u zadovoljavajućem slaganju s konstantama dobivenim fluorimetrijskim eksperimentima.



Slika 40. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,80 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0702 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri 25 °C. b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



Slika 41. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0809 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri 25 °C. b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.

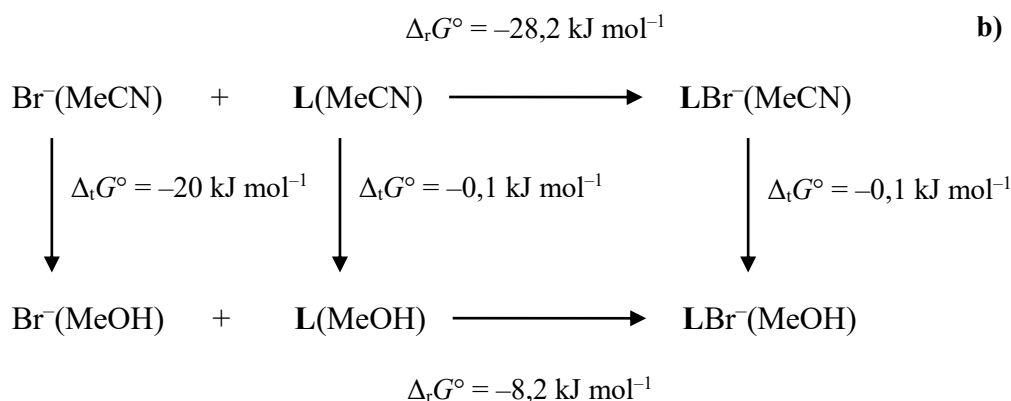
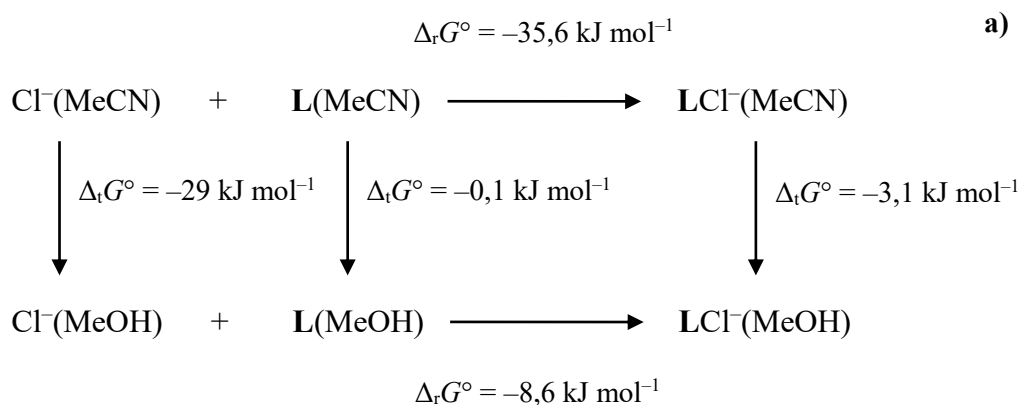


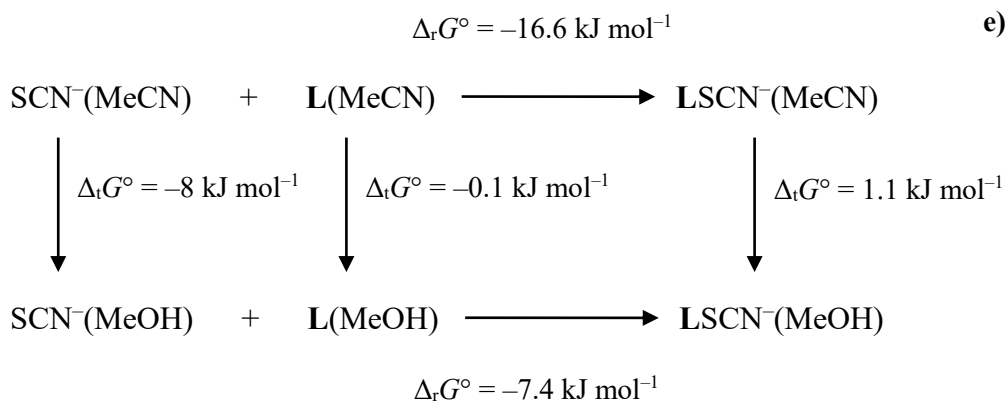
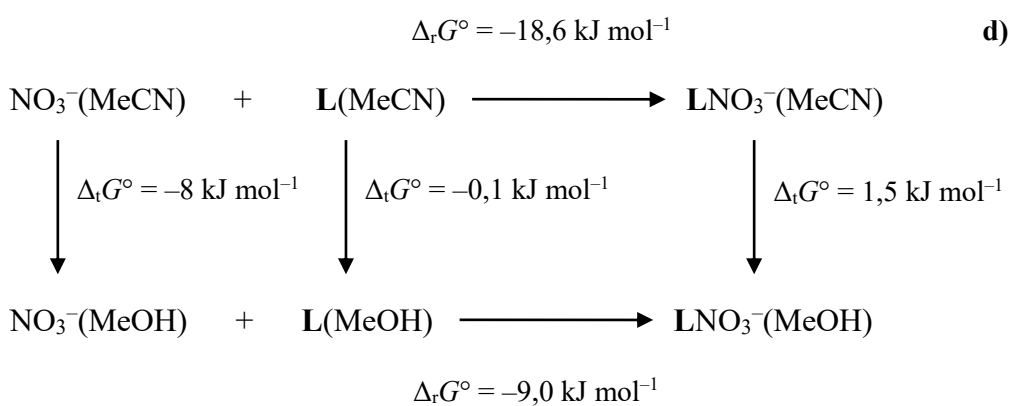
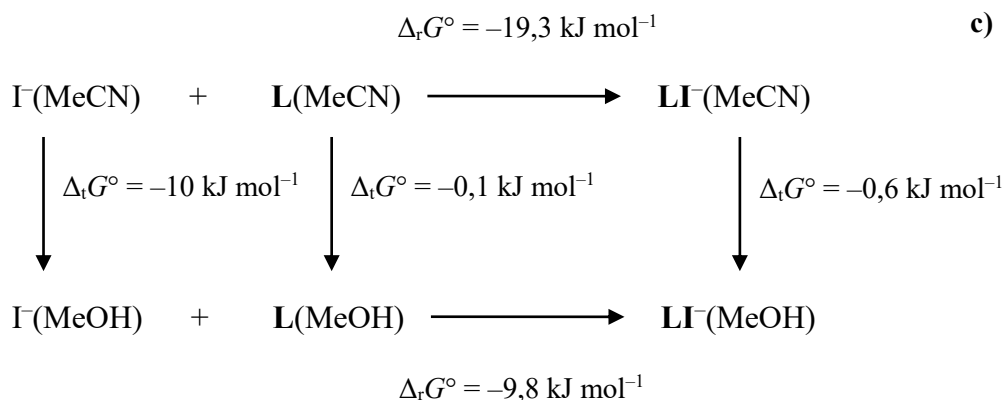
Slika 42. a) ^1H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,19 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 6,58 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka C_α protona o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.

Afinitet receptora **L** prema anionima u metanolu manji je od onog u acetonitrilu. Smanjenje konstante stabilnosti izražene u log K jedinicama za metanol u odnosu acetonitril je 4,5 za Cl^- , 3,5 za Br^- te 1 do 2 za ostale anione. Kako bi se termodinamički objasnile ove razlike, konstruirani su termodinamički ciklusi za reakciju kompleksiranja u acetonitrilu i metanolu preko transfera reaktanata i produkata iz jednog otapala u drugo (slika 43). Standardne reakcijske Gibbsove energije izračunate su iz titracijskih podataka, Gibbsova energija transfera receptora **L** iz acetonitrila u metanol određena je iz topljivosti receptora u tim otapalima dok su Gibbsove energije za transfer aniona preuzete iz literature.⁷⁸ Standardna Gibbsova energija transfera kompleksa ciklopeptida **L** s anionima $\Delta_t G^\circ (\text{LA}^-)$, pri čemu A^- predstavlja anion), određena je iz jednadžbe:

$$\begin{aligned} \Delta_t G^\circ (\text{LA}^-, \text{MeCN} \rightarrow \text{MeOH}) \\ = \Delta_t G^\circ (\text{A}^-, \text{MeCN} \rightarrow \text{MeOH}) + \Delta_t G^\circ (\text{A}^-, \text{MeCN} \rightarrow \text{MeOH}) \\ + \Delta_r G^\circ (\text{MeOH}) - \Delta_r G^\circ (\text{MeCN}) \end{aligned} \quad (4.1)$$

gdje je $\Delta_t G^\circ$ standardna Gibbsova energija prijelaza, a $\Delta_r G^\circ$ standardna reakcijska Gibbsova energija za reakciju kompleksiranja. Eksperimentalno određene topljivosti slobodnog receptora **L** u acetonitrilu iznose $((2,72 \pm 0,02) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3})$, dok je topljivost spoja **L** u metanolu $((2,81 \pm 0,03) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3})$. Te su topljivosti slične što kao posljedicu ima nezatnu vrijednost standardne Gibbsove energije transfera slobodnog spoja **L**. Transfer kompleksa iz acetonitrila u metanol blago je povoljan za kompleks s kloridom, dok su slučaju kompleksa s ionima Br^- , I^- , NO_3^- i SCN^- dobivene male apsolutne vrijednosti standardne Gibbsove energije prijelaza. S druge strane, standardne Gibbsove energije transfera aniona iz acetonitrila u metanol su u rasponu od -8 do -29 kJ mol^{-1} što ukazuje na bolju solvataciju slobodnih aniona u metanolu. Iz svega navedenog može se zaključiti da je manja stabilnost kompleksa receptora **L** s anionima u metanolu u odnosu na acetonitril posljedica bolje solvatacije slobodnih aniona u metanolu.





Slika 43. Termodinamički ciklus za kompleksiranje iona a) Cl^- , b) Br^- , c) Γ^- , d) NO_3^- i e) SCN^- sa spojem **L** u acetonitrilu i metanolu izražen preko Gibbsove energije.

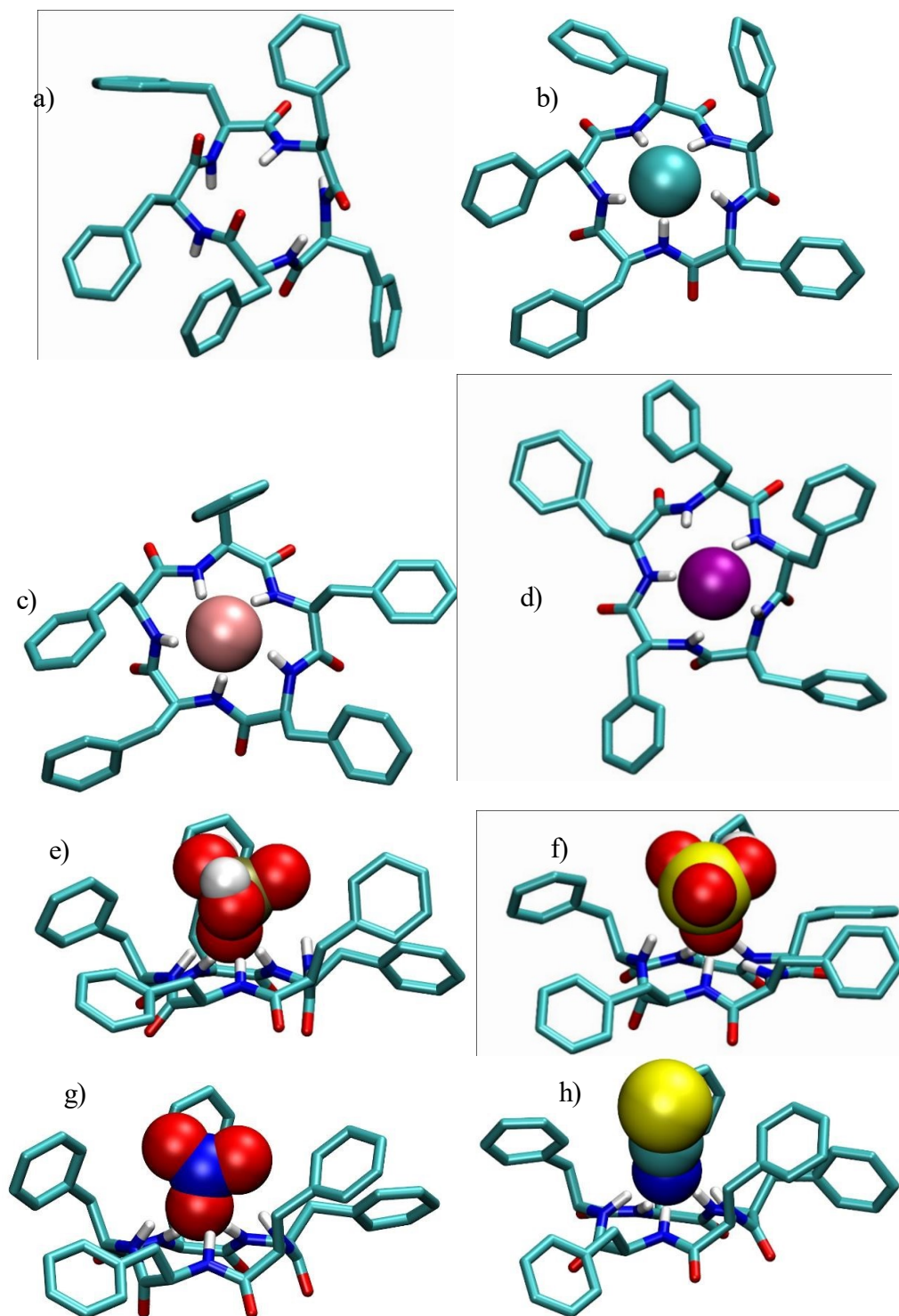
U svrhu određivanje strukture kompleksa liganda **L** s proučavanjem anionima u metanolu provedene su simulacije molekulske dinamike (MD). Rezultati tih simulacija su

prosječni koordinacijski brojevi aniona (tablica 4.) i prosječne geometrije kompleksa u otopini (slika 44)

Tablica 4. Prosječni broj koordiniranih atoma amidnih vodika u anionskim kompleksima liganda **L** u metanolu

anion	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	HSO ₄ ⁻	NO ₃ ⁻	SCN ⁻
N(-H)	4,94	4,91	4,80	4,95	4,25	4,76	4,98

Kao i kod acetonitrila, u metanolu su dobiveni slični rezultati. Pokazano je da su *endo* konformacije odgovorne za vezanje aniona pri čemu se vezanje ostvaruje preko amidnih protona okosnice ciklopeptida vodikovim vezama. Koordinacijska sfera aniona slična je pentagonskoj piramidi. Broj vodikovih veza manji je u usporedbi s kompleksima u acetonitrilu što je najvjerojatnije posljedica boljih proton- donorskih i akceptorskih svojstava metanola.



Slika 44. Strukture a) slobodnog liganda **L** i anionskih kompleksa **L** s ionima b) Cl⁻, c) Br⁻, d) I⁻, e) H₂PO₄⁻, f) HSO₄⁻, g) NO₃⁻ i h) SCN⁻ u metanolu dobivene MD simulacijama. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi jasnijeg prikaza.

4.3. Kompleksi ciklopeptida **L** u dimetil-sulfoksidu

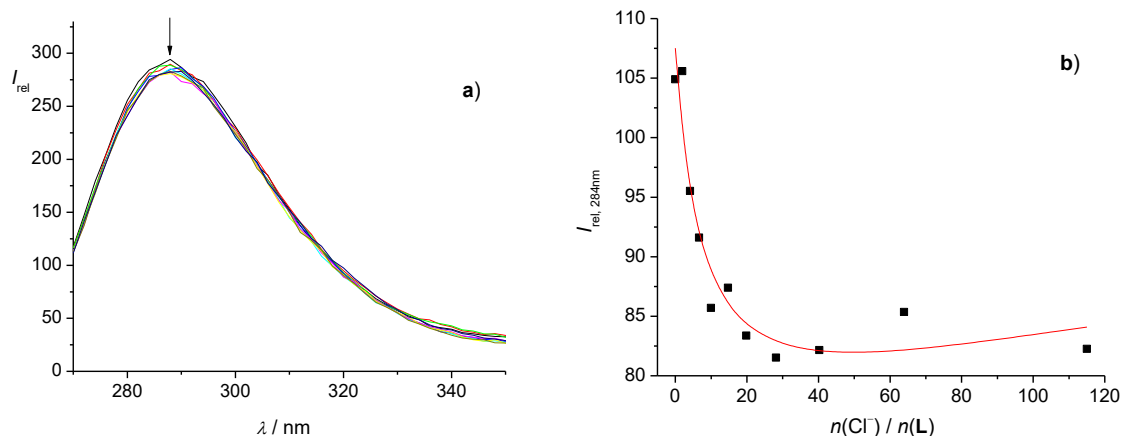
Afinitet vezanja ciklopeptida **L** s odabranim ionima, kloridom i bromidom, određen je i u dimetil-sulfoksidu fluorimetrijskim i ^1H NMR titracijama, rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Konstante ravnoteže vezanja spoja **L** s kloridom i bromidom u dimetil-sulfoksidu pri 25°C.

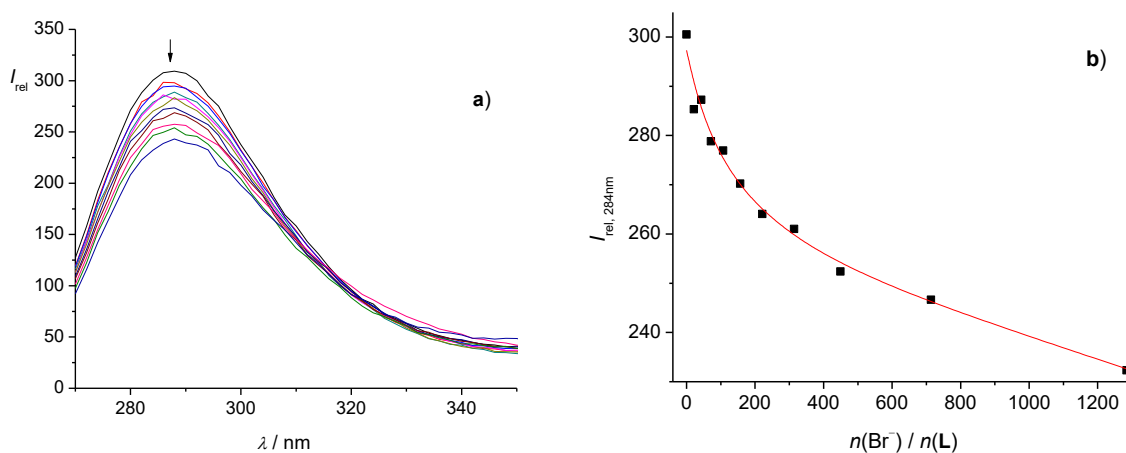
anion	$\log\left(\frac{K}{\text{dm}^{-3}\text{mol}^{-1}}\right) \pm \text{SE}$
Cl^-	$3,57 \pm 0,16^{\text{a}}$
	$3,40^{\text{b}}$
Br^-	$2,17 \pm 0,02^{\text{a}}$
	$2,31^{\text{b}}$

^afluorimetrijska titracija, ^b $^1\text{HNMR}$ titracija, SE – standardna devijacija ($N = 3$)

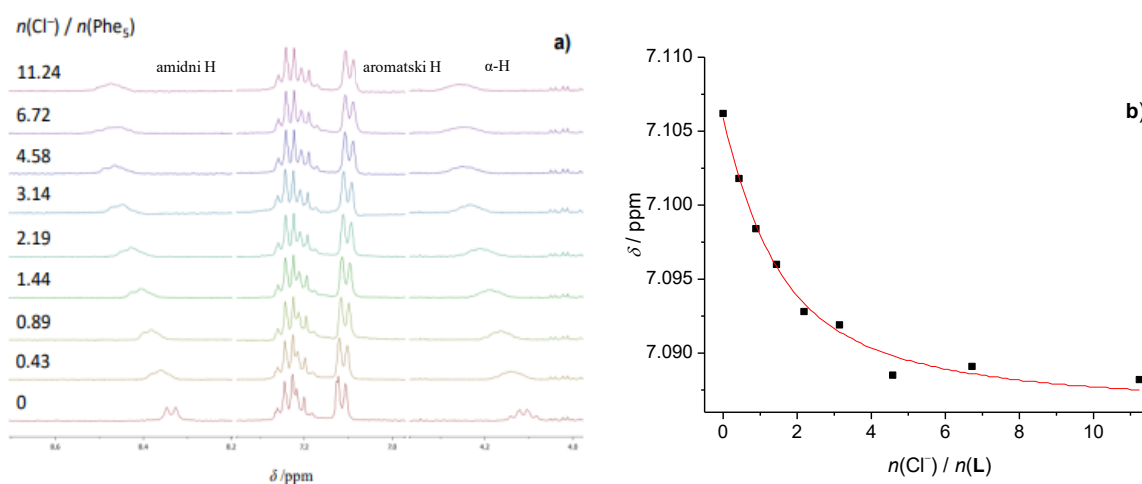
Iz rezultata titracijskih eksperimenata može se zaključiti da ciklopeptid **L** veže kloridne i bromidne ione u DMSO-u. Dobiveno je jako dobro slaganje konstanti stabilnosti određenih iz podataka prikupljenih fluorimetrijskim i ^1H NMR mjerenjima. Vrijednosti dobivenih konstanti stabilnosti nešto su veće nego za komplekse ciklopentalucina.⁷⁵ Relativni intenzitet fluorescencije pada za Br^- u području od oko 310 nm dok za Cl^- u istom području ne pokazuje jednosmjernan trend. Konstante stabilnosti su veće nego u metanolu, ali manje od onih u acetonitrilu.



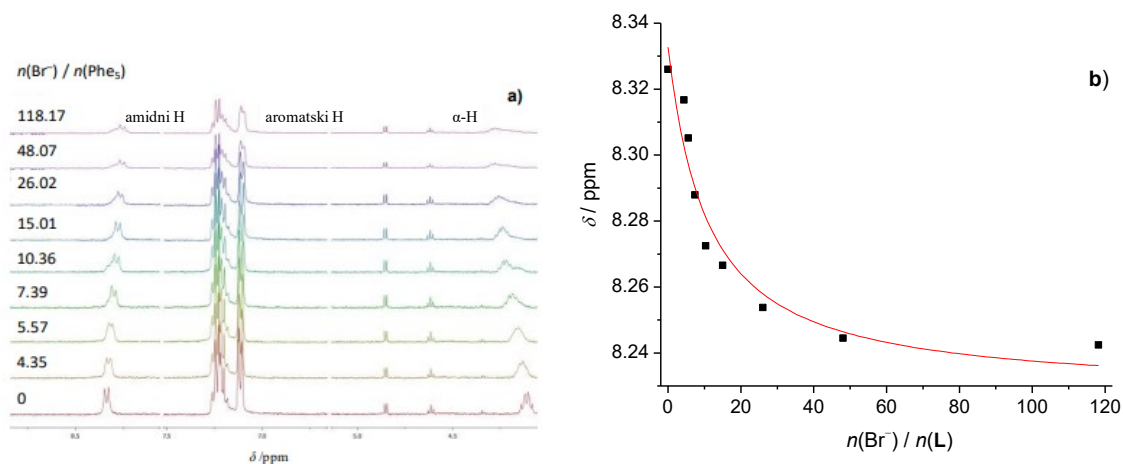
Slika 45. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 5.20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0153 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMSO–u pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



Slika 46. a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ($c = 4,57 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 1,50 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u DMSO–u pri 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, eksitacijski prorez = 10 nm, emisijski prorez = 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



Slika 47. a) ¹H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,26 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 9,41 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMSO–u pri 25 °C. b) Ovisnost kemijskog pomaka aromatskog protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.



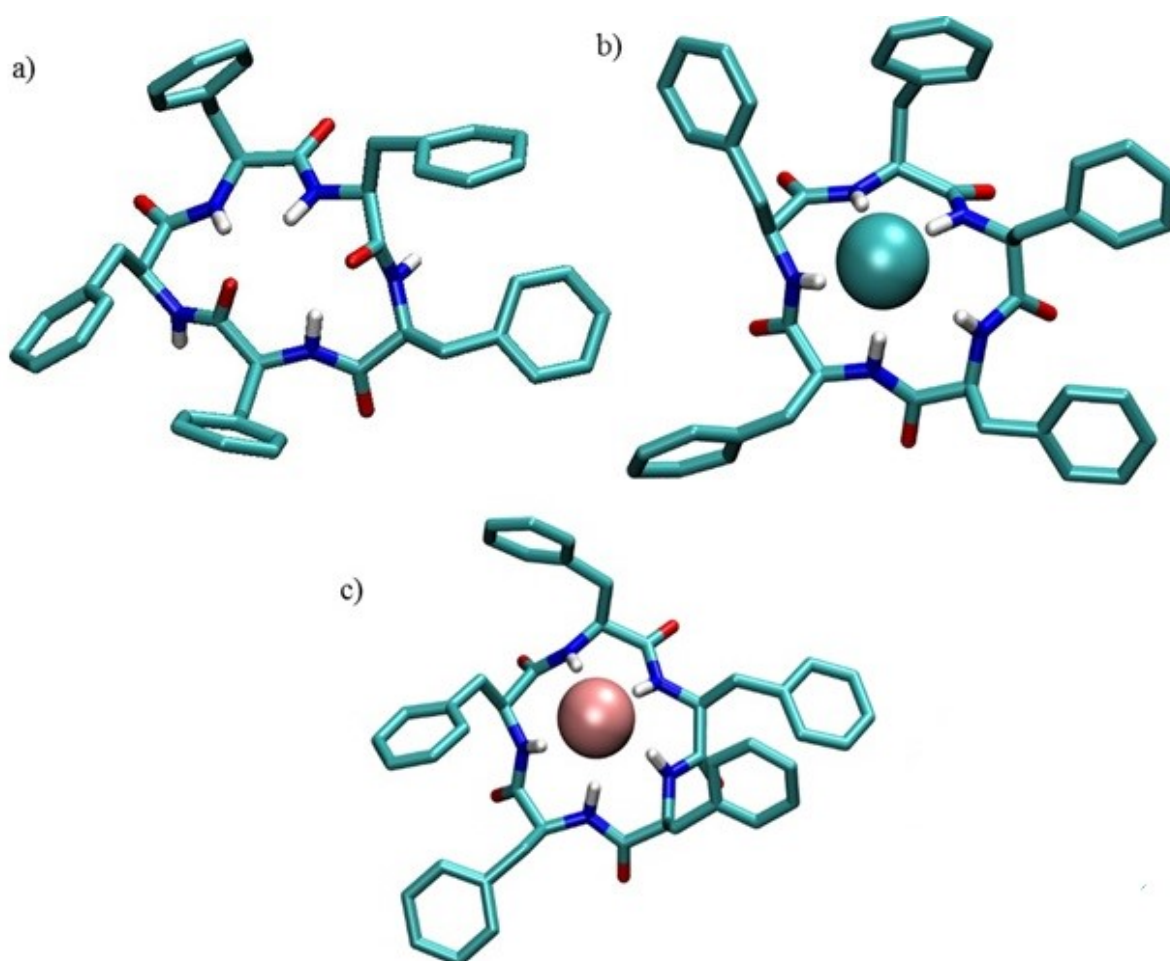
Slika 48. a) ¹H NMR titracija spoja **L** ($c = 4,80 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMSO–u pri 25 °C. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnog protona o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunate vrijednosti.

U svrhu određivanje strukture slobodnog liganda **L** i kompleksa s proučavanjem anionima u DMSO-u provedene su simulacije molekulske dinamike. Rezultati tih simulacija su prosječni koordinacijski brojevi aniona (tablica 6) i prosječne geometrije kompleksa u otopini (slika 49).

Tablica 6. Prosječni broj koordiniranih atoma amidnih vodika u anionskim kompleksima liganda **L** u DMSO-u

anion	Cl ⁻	Br ⁻
N(-H)	4,99	4,92

Kao i u slučaju acetonitrila i metanola, u dimetil-sufoksidu preferirani su *endo* kompleksi. Anioni su vezani preko amidnih protona vodikovim vezama te tvore strukturu sličnu pentagonskoj piramidi.

**Slika 49.** Strukture a) slobodnog liganda **L** i anionskih kompleksa **L** s b) Cl⁻ i c) Br⁻ u DMSO-u dobivene MD simulacijama. Vodikovi atomi vezani na ugljikove atome izostavljeni su radi jasnijeg prikaza.

§ 5. ZAKLJUČAK

Afinitet ciklopeptida **L** prema anionima proučavan je eksperimentalno i računalno. Uočeno je da u acetonitrilu i metanolu ligand **L** veže sve testirane ione te da može poslužiti kao osjetljiv anionski senzor zbog svojih fluorescentnih svojstava. U acetonitrilu ciklopeptid pokazuje najveći afinitet za klorid, zatim bromid te za hidrogen sulfat i dihidrogen fosfat. Afinitet vezanja prema halogenidnim ionima u acetonitrilu pada u nizu $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ što je najvjerojatnije posljedica odnosa u veličini između halogenidnih aniona. Receptor **L** gotovo isključivo tvori komplekse stehiometrije 1:1, osim za vezanje dihidrogen fosfata u acetonitrilu gdje su u rezultatima $^1\text{HNMR}$ titracije s tim ionom opažene indikacije za nastanak kompleksa **L** i dimera tog iona. U metanolu, u odnosu na acetonitril, dolazi do gubitka afiniteta i selektivnosti prema anionima, što je posljedica bolje solvatacije slobodnih iona u tom otapalu. Razlog gubitka selektivnosti u metanolu može se zaključiti iz termodinamičkih ciklusa prezentiranih u radu. Vidljivo je da su razlike u standardnim Gibbsovim kompleksacijskim energijama ciklopeptida **L** sa anionima u acetonitrilu gotovo jednake kao razlike Gibbsove energije prijelaza za iste anione. Ovi se efekti poništavaju prilikom prijenosa reaktanta iz acetonitrila u metanol čineći kompleksacijske Gibbsove energije za halogenide, nitrat i tiocijanat sličnim po vrijednosti. Vezanje kloridnog i bromidnog aniona slabije je u dimetil-sulfoksidu nego u acetonitrilu, ali ipak jače nego u metanolu. Vrijednosti dobivenih konstanti stabilnosti u acetonitrilu slične su kao i kod kompleksa ciklopentaleucina, dok su nešto veće u dimetil-sulfoksidu.

Vezanje aniona na receptor dovodi do konformacijskih promjena receptora što je opaženo u titracijama cirkularnog dikroizma kao pojava snažne negativne vrpce pri ≈ 230 nm. CD spektri slobodnog liganda i anionskih kompleksa određeni su i računski iz MD struktura, uočeno je da su glavne spektralne karakteristike tih spektara usporedive s eksperimentalnim. Ta sličnost donekle potvrđuje konformacijske promjene uslijed kompleksiranja s anionima uočene u MD simulacijama. Pokazano je da su anioni vezani na receptor preko amidnih protona na istoj strani prstena kao i bočni ogranci (*endo* konformacija), te da koordinacijska sfera aniona slični pentagonskoj piramidi.

Nastavak ovog istraživanja uključivao bi proučavanje vezanja iona I^- , HSO_4^- , H_2PO_4^- , NO_3^- i SCN^- u dimetil-sulfoksidu, te određivanje konstanti stabilnosti nastalih kompleksa

istim metodama korištenim za proučavanje kompleksiranja u acetonitrilu i metanolu. Poželjno bi bilo i pratiti nastanak anionskih kompleksa ciklopeptida **L** u metanolu i dimetil-sulfoksidu pomoću titracija cirkularnog dikroizma kako bi se potvrdile konformacijske promjene tijekom kompleksiranja opažene u MD simulacijama u tim otapalima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

DMSO	dimetil-sulfoksid
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
L	pentafenilalaninski homociklopeptid
TBA	tetrabutilamonijev
TEA	tetraetilamonijev
TMA	tetrametilamonijev

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Kubik, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2870.
2. P.A. Gale, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 82.
3. K. Fujiwara, *Anion Recognition in Supramolecular Chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2010**, str. 75–102.
4. A. Matsumoto, *Anion Sensing, Top Curr Chem, Vol. 255* (Eds: I. Stribor) Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**
5. S. Kubik, C. Reyheller, S. Stüwe, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2005**, *52*, 137.
6. S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752.
7. Z. Rodriguez-Docampo, S.I. Pascu, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206.
8. C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 2391.
9. S. Kaabel, J. Adamson, F. Topić, A. Kiesilä, E. Kalenius, M. Öeren, M. Reimund, E. Prigorchenko, A. Lõökene, H.J. Reich, K. Rissanen, R. Aav, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2184.
10. D. Mungalpara, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Kubik, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6005.
11. R.B.P. Elmes, K.A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4951.
12. Q. He, M. Kelliher, S. Bähring, V.M. Lynch, J.L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7140.
13. I. Petters, M. Modrušan, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Molecules* **2022**, *27*, 3981.
14. C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao, J.L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213650.
15. C. M. Deber, V. Madison, E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 106.
16. M. Ngu-Schwemlein, W. Gilbert, K. Askew, S. Schwemlein, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5778.
17. C. Reyheller, S. Kubik, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5271.
18. B.F. Gisin, H.P. Ting-Beall, D.G. Davis, E. Grell, D.C. Tosteson, *Biochi. Biophys. Acta* **1978**, *509*, 201.

19. N. D. Barth, R. Subiros-Funosas, L. Mendive-Tapia, R. Duffin, M. A. Shields, J. A. Cartwright, S. T. Henriques, J. Sot, F. M. Goñi, R. Lavilla, J. A. Marwick, S. Vermeren, A. G. Rossi, M. Egeblad, I. Dransfield, M. Vendrell, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4027.
20. L. Mendive-Tapia, J. Wang, M. Vendrell, *Pept. Sci.* **2021**, *113*, 4027.
21. C. Dard, B. Leforestier, F. F. Hilário, M. D. M. Traoré, M. A. Lespinasse, B. Pérès, M. C. Molina, R. P. de Freitas, A. Milet, D. Maubon, Yung-Sing Wong, *Mol.* **2021**, *26*, 7506.
22. D. A. McNaughton, M. Fares, G. Piccib, P. A. Galea, C. Caltagironeb, *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213573.
23. B. W. Tresca, L. N. Zakharov, C. N. Carroll, D. W. Johnson, M. M. Haley, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7240.
24. M. Zaleskaya-Hernik, Ł. Dobrzycki, M. Karbarz, J. Romański, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13396.
25. M. K. Goshisht, N. Tripathi, *J. Mater. Chem. C* **2021**, *9*, 9820.
26. K. Choi, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3912.
27. C. I. C. Esteves, M. M. M. Raposo, S. P. G. Costa, *Dyes Pig.* **2016**, *134*, 258.
28. W. S. Vanscyoc, M. A. Shea, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1758.
29. J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons, **2009**, str. 9–11.
30. G. Horvat, *Neobjavljeni nastavni materijali, Eksperimentalno određivanje konstanti ravnoteže*
31. V. Kubáň, J. Havel, *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 528.
32. H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 257.
33. J. Ghasemi, A. Niazi, M. Kubista, A. Elbergali, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *455*, 335.
34. J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons, **2009**, str. 13–15.
35. V. Petrović-Petroković, D. Kiđemet, R. Odžak, D. Parat, I. Primožić, V. Šimunić, *Praktikum organske kemije*, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek prirodoslovno matematičkog fakulteta, Zagreb, rujan 2004, str. 30
36. M. Modrušan, *Određivnaje kinetičkih i termodinamičkih veličina u otopini iz eksperimentiranja podataka*, Završni rad, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagreb, 2018, str. 26–27.

37. R. S. Macomber, *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 375.
38. L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311.
39. T. Rinkovec, *Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji kemijskih i fizikalnih procesa u supramolekulskim i biokemijskim sustavima*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2001, str. 9–11.
40. K.A. Connors, *Chemical Kinetics, The Study Of Reaction Rates In Solution*, (VCH Publishers: 1990).
41. B. Bertoša, N. Mrnjavac, *Upute za vježbe iz računalne biofizike* (2015).
42. S. Páll, M.J. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, E. Lindahl, *Lect. Notes Comput. Sci.* **2015**, *3*.
43. S. Nosé, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 511.
44. G.S. Grest, K. Kremer, *Phys. Rev. A* **1986**, *33*, 3628.
45. H.C. Andersen, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 2384.
46. S.E. Feller, Y. Zhang, R.W. Pastor, B.R. Brooks, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4613.
47. M. Parrinello, A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182.
48. G. J. Martyna, M.E. Tuckerman, D.J. Tobias, M.L. Klein, *Mol. Phys.* **1996**, *87*, 1117.
49. M. E. Tuckerman, J. Alejandre, R. Lopez-Rendon, A. L. Jochim, G. J. Martyna, *J. Phys. A: Math. Gen.* **2006**, *39*, 5629.
50. A. J. Miles, Robert W. Janes, B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 8400.
51. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=11939> (pristupljeno 20.06.2022)
52. Y. Wei, A. A. Thyparambil, R. A. Latour, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 2331.
53. S. B. Jasim, Z. Li, E. E. Guest and J. D. Hirst, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2196.
54. L. Mavridis and R. W. Janes, *Bioinformatics* **2017**, *33*, 56.
55. N. Vidović, *Synthesis and ion binding properties of cyclic homopeptides*, (2018)
56. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739.
57. N. Bregović, N. Cindro, L. Frkanec, K. Užarević, V. Tomišić, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 15863.
58. H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43.
59. E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306.

60. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701.
61. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435.
62. S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, *Bioinformatics* **2013**, *29*, 845.
63. M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19.
64. S. Páll, M.J. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, E. Lindahl, *Lect. Notes Comput. Sci.* **2015**, *3*.
65. W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225.
66. W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 6665.
67. L.S. Dodda, I. Cabeza de Vaca, J. Tirado-Rives, W.L. Jorgensen, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W331.
68. L.S. Dodda, J.Z. Vilseck, J. Tirado-Rives, W.L. Jorgensen, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 3864.
69. W.C. Swope, H.C. Andersen, P.H. Berens, K.R. Wilson, *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 637.
70. S. Nosé, *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255.
71. W. Hoover, *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 1695.
72. T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
73. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33.
74. I.M. Pazos, R.M. Roesch, F. Gai, *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *563*, 93.
75. G. Horvat, S. Tarana, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, *J. Mol. Liq.* **2021**, *340*, 116848.
76. B.M. Bulheller, J.D. Hirst, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 539.
77. N.A. Besley, J.D. Hirst, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9636.
78. Y. Marcus, *Ion Properties*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997., (CRC Press, Boca Raton, FL: 1997).

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivan Petters

Datum rođenja: 27. studeni 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003–2011. Osnovna škola kralja Tomislava, Zagreb

2011–2015. IX. gimnazija, Zagreb

2015–2019. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb

2019–2022. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: biokemija i fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Postersko izlaganje *Cyclopentaphenylalanine as a fluorescent anion sensor in solution* na IV.–om simpoziju supramolekulske kemije – Supramolecular Chemistry 2021 Zagreb, Hrvatska.
2. Postersko izlaganje *Anion binding properties of two pentameric homocyclopeptides in acetonitrile and methanol* na 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers 2021, Veli Lošinj, Hrvatska.

Publikacije

1. I. Petters, M. Modrušan, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Anion-Sensing Properties of Cyclopentaphenylalanine*, *Molecules* 27 (2022) 3981.