



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Emilija Petrović Hađar

**ION-RECEPTORSKA SVOJSTVA  
CIKLOHEKSAPEPTIDA Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> U  
ACETONITRILU**

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

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Gordana Horvata uz potporu Hrvatske zaklade za znanost, projekt IP-2019-04-9560 (Macrosol), i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

# Sadržaj

<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Kompleksiranje ciklopeptida .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>Općenito o ciklopeptidima .....</i>	4
2.1.2. <i>Ciklopeptidi kao ionski akceptori.....</i>	5
<b>2.2. Određivanje konstanti stabilnosti.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Fluorescencija i fluorimetrijske titracije.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Simulacije molekulske dinamika .....</b>	<b>9</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Fluorimetrijske titracije .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Simulacije molekulske dinamike .....</b>	<b>13</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Kationi.....</b>	<b>14</b>
4.1.1. <i>Detaljna analiza vezanja kalcijeva kationa i perkloratnog aniona .....</i>	14
4.1.2. <i>Magnezijev perklorat .....</i>	20
4.1.3. <i>Stroncijev perklorat.....</i>	23
4.1.4. <i>Barijev perklorat.....</i>	26
<b>4.2. Vezanje kationa na spoj L .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. Anioni .....</b>	<b>32</b>
4.3.1. <i>Tetraetilamonijev klorid.....</i>	32
4.3.2. <i>Tetrabutilamonijev bromid .....</i>	35
4.3.3. <i>Tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat.....</i>	38
<b>4.4. Vezanje aniona na spoj L .....</b>	<b>41</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>42</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XLIV</b>
<b>§ 7. SAŽETAK .....</b>	<b>XLVII</b>
<b>§ 8. SUMMARY .....</b>	<b>XLVIII</b>
<b>§ 9. ZAHVALE.....</b>	<b>XLIX</b>
<b>§ 10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>L</b>



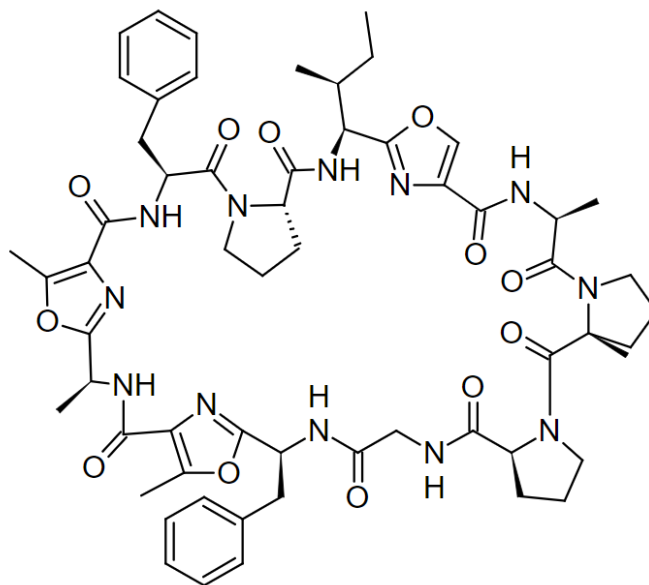
## § 1. UVOD

Supramolekulska kemija je grana kemije koja se bavi proučavanjem sustava u kojima se diskretne kemijske vrste povezuju nekovalentnim vezama u supramolekulske komplekse.<sup>1</sup> Pritom se ostvarene interakcije između molekule „domaćina“ – receptora i molekule „gosta“ – supstrata temelje na molekulskom prepoznavanju i komplementarnosti. Kod vezanja neutralnog supstrata prevladavaju vodikove veze i Van der Waalsove interakcije, dok se nabijene ionske vrste vežu pomoću elektrostatskih interakcija.<sup>2</sup> Kao molekule receptora često se koriste makrociklički spojevi poput ciklodekstrina, ciklopeptida, kaliksarena, krunastih etera i kukurbiturila. Navedeni receptori imaju dobro definirane strukture veznog mjesta što im omogućuje vezanje iona,<sup>3</sup> molekula,<sup>4</sup> ali i drugih makrocikličkih spojeva,<sup>5</sup> stoga pronalaze svoju upotrebu u brojnim područjima medicine i farmaceutike.<sup>6,7</sup>

Među makrocikličkim receptorima, svojom raznolikošću, svojstvima i potencijalnom primjenom ističu se manji ciklopeptidi koji sadrže do desetak podjedinica. Ciklopeptidi su, općenito, skupina spojeva koja u prirodi nastaje kao produkt metabolizma nižih organizama poput bakterija, gljiva i biljaka.<sup>8</sup> Sastavljeni su od aminokiselinskih monomera međusobno povezanih peptidnom vezom u cjeloviti prsten.<sup>9</sup> Zajedničko svojstvo svih ciklopeptida je izraženija bioaktivnost i proteolitička stabilnost u odnosu na njihove acikličke (linearne) analoge. Nadalje, konformacijska zakočenost njihove okosnice, sukladno makrocikličkom efektu, povećava stabilnost kompleksa nastalih vezanjem ionskih vrsta na glavni lanac ciklopeptida. Slabija ion-receptorska svojstva linearnih analoga mogu se objasniti činjenicom da vezanje gosta na okosnicu linearnih peptida uzrokuje značajne konformacijske promjene pri čemu dolazi do gubitka stupnjeva slobode, što nepovoljno utječe na entropijski doprinos reakcijskoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja.<sup>8</sup>

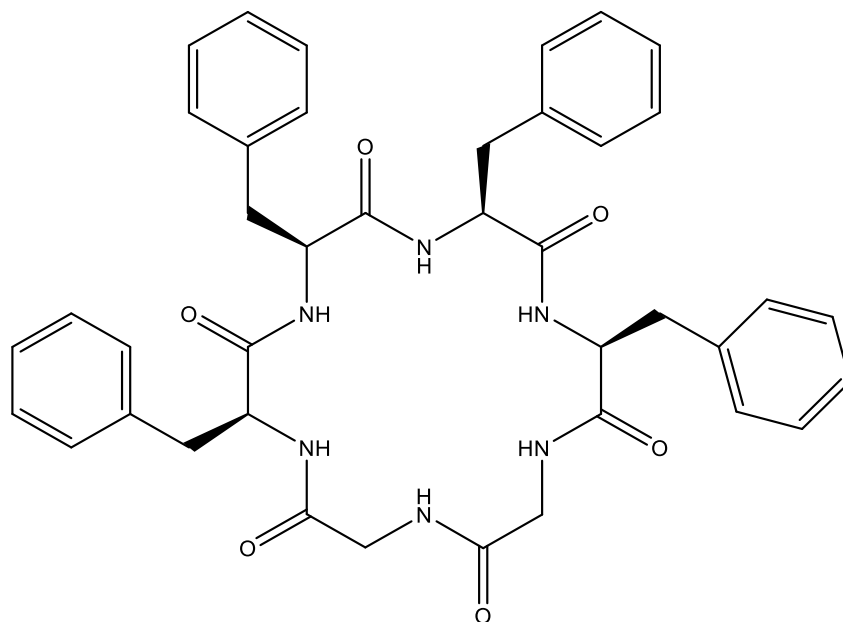
Ciklopeptidi se međusobno uvelike strukturno razlikuju, što uvjetuje njihova svojstva poput toksičnosti, specifičnosti prema vezanju određenih iona, antibiotskim svojstvima i slično, stoga je i njihova primjena vrlo široka. Najčešće korišteni ciklopeptidi su iz prirodnih izvora te se koriste u medicini, biomedicini i neurologiji. Primjerice, na slici 1 prikazan je wewakazole B, prirodni ciklopseudopeptid izoliran iz cijanobakterije *Moorea producens* iz Crvenog mora. Navedeni spoj ima antitumorska svojstva, specifično za ljudski H460 rak pluća.<sup>8</sup> Nadalje, skupina cikloheksapeptida, pod imenom ehinokandini, ima sposobnost inhibicije sinteze  $\beta$ -1,3-

D-glukana koji je ključna komponenta stanične stijenke gljivica te na taj način djeluju kao antifungicidi.<sup>6,7</sup> Pseudoksilalemicini su ciklotrapeptidi primarno izolirani iz gljivice *Pseudoxylaria* sp. X802 s izraženim antibakterijskim svojstvima, prvenstveno za Gram-negativne patogene bakterije. S obzirom na izraženu biološku aktivnost, mogućnost sinteze u laboratoriju i njihova antibakterijska svojstva predstavljaju velik potencijal za komercijalne antibiotike.<sup>7,10</sup>



Slika 1. Ciklopseuropeptid wewakazole B.<sup>8</sup>

U ovom istraživanju korišten je cikloheksapeptid Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> (slika 2) dalje označen kao **L**. Navedenom ciklopeptidu određen je afinitet prema zemnoalkalijskim kationima (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>) i anorganskim anionima (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) u acetonitrilu. Kationi i anioni su odabrani prema prijašnjim istraživanjima naše grupe<sup>11,12</sup> i istraživanjima opisanim u literaturi.<sup>13,14</sup> Otapalo je odabrano s obzirom na jačinu solvatacije iona, pri čemu je acetonitril jedan od najslabije ion-solvatirajućih otapala,<sup>15</sup> što povećava stabilnost nastalih kompleksa. S obzirom na vrlo malu topljivost navedenog peptida (<5×10<sup>-5</sup> mol dm<sup>-3</sup>) vezanje iona bilo je moguće pratiti jedino fluorimetrijskim titracijama pri čemu su određene i konstante ravnoteže kompleksiranja. Strukturne karakteristike nastalih kompleksa proučavane su računalnim simulacijama molekulske dinamike.



Slika 2. Struktura cikloheksapeptida Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> (L).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kompleksiranje ciklopeptida

#### 2.1.1. Općenito o ciklopeptidima

Ciklopeptidi su makrociklički spojevi sastavljeni od monomernih podjedinica aminokiselina povezanih kovalentnom vezom u prsten. U slučaju glava-rep ciklizacije ostvaruje se veza između *N*-terminalnog dušika amino-skupine i *C*-terminalnog karbonilnog ugljika pri čemu nastaje amidna skupina.<sup>9</sup> Navedena kovalentna veza naziva se peptidna veza, a odlikuju ju planarnost nastale amidne skupine i nemogućnost rotacije oko C–N osi. Kisik iz karbonilne skupine je elektronegativniji u odnosu na dušik, stoga ima parcijalno negativan naboj, dok dušik iz amino-skupine ima parcijalno pozitivan naboj što čini navedenu vezu polariziranom.<sup>16,17</sup> Kod ciklopeptida svaka je aminokiselina s oba svoja kraja povezana peptidnom vezom za susjednu aminokiselinu čime se dobiva zatvoreni prsten. Navedeno ograničava fleksibilnost okosnice ciklopeptida i čini ih metabolički stabilnijim u odnosu na njihove acikličke analoge.<sup>11</sup> Također, sekundarna amidna skupina peptida ima mogućnost stvaranja vodikovih veza s drugim amidnim skupinama, molekulama otapala ili supstratima poput kationa i aniona. Ovisno o međumolekulskim interakcijama koje peptidne veze ostvaraju s drugim molekulama/ionima ciklopeptid mijenja svoju konformaciju.<sup>13</sup> Ciklopeptidi pokazuju selektivnost pri vezanju ovisno o kompatibilnosti veličine ciklopeptida i gosta. U slučaju manjih ciklopeptida prsten je relativno uzak bez naglašene šupljine, stoga ti spojevi preferentno vežu ione u odnosu na neutralne molekule i makrocikličke spojeve. Za koordinacijske veze s kationima na raspolaganju su karbonilni kisici amidnih skupina<sup>13,14</sup> dok su za ostvarivanje vodikovih veza s anionima zaslužni NH protoni iz istih skupina.<sup>16,18</sup> Za razliku od sintetičkih organskih molekula s upitnom biokompatibilnosti, ciklopeptidi predstavljaju sigurne, učinkovite i selektivne prijenosnike.<sup>12</sup> S anionima ostvaruju međumolekulske interakcije poput vodikovih veza, koje se promjenom uvjeta i okoline (primjerice promjenom polarnosti okruženja), mogu prekinuti pri čemu dolazi do otpuštanja aniona na željenu lokaciju. Transmembranski transport je biološki vrlo važan proces za sve stanične aktivnosti. Abnormalnosti transportera ili nemogućnost



transporta dovode do brojnih bolesti poput cistične fibroze, epilepsije, bubrežne tubularne acidoze i drugih.<sup>19–21</sup>

### 2.1.2. Ciklopeptidi kao ionski akceptori

Vežanje kationa na cikloheksapeptide temelji se na elektrostatskom privlačenju parcijalno negativno nabijenih karbonilnih kisika ciklopeptida koji koordiniraju pozitivno nabijene katione.<sup>13</sup> Relativno rigidna struktura tih spojeva omogućuje im preciznije orijentiranje funkcionalnih skupina koje sudjeluju u interakcijama pri čemu je smanjen entropijski trošak reorganizacije samog cikloheksapeptida u odnosu na linearne analoge. Naime, aciklički analozi moraju proći kroz veći broj konformacijskih promjena, a naposljetku zbog svoje fleksibilne strukture najčešće ne ostvaruju maksimalan broj interakcija sa supstratom.

Iako je njihova struktura rigidna, ciklopeptidi prolaze kroz značajne konformacijske promjene pri kompleksiranju s ionima.<sup>14,22</sup> Promjena konformacije ciklopeptida utječe na njegov afinitet prema određenom ionu te omogućava smanjenje odbojnih interakcija i optimizaciju koordinacije u nastalom kompleksu.<sup>22</sup> Promjene konformacija moguće je pratiti metodama poput cirkularnog dikroizma i NMR-spektroskopije što nadalje omogućava identifikaciju sekundarnih stabilnih struktura i detaljnu strukturnu karakterizaciju.<sup>14</sup>

Ovo istraživanje potaknuto je radom *Niu i sur.* u kojem autori opisuju kompleksiranje cikloheksapeptida (Ala-Pro-Gly)<sub>2</sub>. U tom radu su određene i konstante stabilnosti nastalih kompleksa što omogućava usporedbu rezultata. Autori su koristili cirkularni dikroizam kako bi pratili promjene spektara nastale dodavanjem otopina koje sadrže istraživane katione. Pri tome su pretpostavili da ciklopeptid veže katione na specifičan način što uzrokuje konformacijske promjene koje se mogu pratiti navedenom metodom te da se vežanje odvija u dva stupnja. U prvom stupnju nastaje 1:1 kompleks, dok u drugom stupnju dolazi do vežanja dodatnog ciklopeptida ili kationa, što ovisi o analitičkim koncentracijama pojedinih vrsta. Također, pretpostavili su da ciklopeptid preferabilno veže katione s većim radijusom, poput kalcijeva i barijeva kationa, u odnosu na magnezijev kation. Pokazano je da navedeni ciklopeptid pokazuje svoj potencijal kao ionski akceptor i transporter.

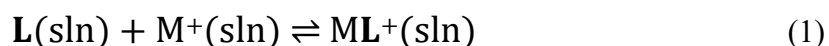
Osim eksperimentalnih, provedena su i računalna istraživanja slične tematike. *Shahangi i sur.*<sup>23</sup> Korištenjem teorije funkcionala gustoće (DFT, engl. *Density Functional Theory*) autori su istražili selektivnost ciklopeptida prema vežanju kationa i proveli strukturnu analizu

dobivenih supramolekulskih sustava. Zaključili su da ciklopeptid bolje veže manje katione zemnoalkalijskih metala, poput magnezijeva i kalcijeva, u odnosu na stroncijev i barijev kation. Tim redoslijedom opada i stabilnost samih kompleksa. Također, pokazano je da ciklopeptidi prolaze kroz konformacijske promjene kako bi ostvarili optimalne interakcije s navedenim kationima. Ovo teorijsko istraživanje pokazalo je da je moguće dizajnirati ciklopeptide selektivne prema određenim ionima koji nadalje imaju potencijalnu primjenu kako ionski receptori ili transporteri.

Suvremena istraživanja pokazuju da cikloheksapeptidi mogu biti korišteni kao senzori i receptori aniona s potencijalnom ulogom transportera.<sup>12</sup> Glavna prepreka korištenja cikloheksapeptida u komercijalno dostupnim lijekovima je nedostatak oralne dostupnosti istih. Novija istraživanja bave se različitim strategijama modifikacije kako bi otklonile ovaj problem.<sup>24,25</sup>

## 2.2. Određivanje konstanti stabilnosti

Supramolekulski kompleksi između dvije ili više jedinki nastaju ostvarivanjem intermolekularnih nekovalentnih interakcija. U svrhu kvantifikacije afiniteta receptora prema molekulama i/ili ionima, odnosno stabilnosti nastalih kompleksa određuju se njihove konstante stabilnosti. Sustav u kojem se zbiva reakcija između dvije jedinice: liganda (**L**) i metalnog kationa ( $M^+$ ) u odnosu 1:1 može se opisati na sljedeći način:



Za navedenu reakciju standardna konstanta ravnoteže definirana je kao:

$$K^\circ = \prod a_i^{v_i} \quad (2)$$

Pri čemu je  $a_i$  aktivitet pojedine vrste koja sudjeluje u reakciji, a  $v_i$  pripadajući stehiometrijski koeficijent. Ako je sustav (1) u ravnoteži, to se može zapisati na sljedeći način:

$$K^\circ = \frac{a(\mathbf{ML}^+)}{a(M^+)a(\mathbf{L})} = \frac{\gamma_{\mathbf{ML}^+}[\mathbf{ML}^+]c^\circ}{\gamma_{M^+}[M^+]\gamma_{\mathbf{L}}[\mathbf{L}]} \quad (3)$$

U navedenoj formuli  $\gamma_i$  predstavlja koeficijent aktiviteta pojedine vrste,  $c^\circ$  odgovara standardnoj koncentraciji ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), dok uglate zagrade predstavljaju ravnotežnu koncentraciju. Kod razrijeđenih otopina korektno je pretpostaviti da su koeficijenti aktiviteta svih ionskih vrsta približno jednaki, a koeficijenti aktiviteta neutralnih vrsta iznose približno 1. Primjenom navedenih pretpostavki, jednadžba (3) se može pojednostaviti na:

$$K^\circ \approx \frac{[\text{ML}^+]c^\circ}{[\text{M}^+][\text{L}]} = K_c \cdot c^\circ \quad (4)$$

U navedenoj jednadžbi  $K_c$  označava koncentracijsku konstantu ravnoteže. Gornja jednadžba može se svesti na jednu nepoznanicu korištenjem jednadžbe bilance masa:

$$c_{\text{M}^+} = [\text{M}^+] + [\text{ML}^+] \quad (5)$$

$$c_{\text{L}} = [\text{L}] + [\text{ML}^+] \quad (6)$$

u kojima su  $c_{\text{M}^+}$  i  $c_{\text{L}}$  analitičke koncentracije vrsta  $\text{M}^+$  i  $\text{L}$ . Uvrštavanjem jednadžbi (5) i (6) u jednadžbu (4) dobiva se izraz:

$$K_c = \frac{[\text{ML}^+]}{(c_{\text{M}^+} - [\text{ML}^+])(c_{\text{L}} - [\text{ML}^+])} \quad (7)$$

pri čemu koncentracijska konstanta ravnoteže ovisi samo o analitičkim koncentracijama vrsta  $\text{M}^+$  i  $\text{L}$  te o ravnotežnoj koncentraciji  $\text{ML}^+$ .

U suvremenoj znanosti konstante stabilnosti određuju se mjerenjem nekog svojstva sustava koje ovisi o koncentraciji vrsta koje sudjeluju u reakciji. U slučaju fluorimetrijskih titracija mjeri se intenzitet fluorescencije koji je ovisan o količini dodanog titransa pri čemu se mogu odrediti konstante stabilnosti do reda veličine  $\approx 10^8$ .

### 2.3. Fluorescencija i fluorimetrijske titracije

Fluorescencija je proces u kojem se atomi ili molekule iz osnovnog vibracijskog pobuđenog elektronskog stanja vraćaju u osnovno elektronsko stanje pri čemu otpuštaju energiju u obliku fotona veće valne duljine od pobudnog zračenja. Fluorescencijska emisija događa se kroz 10  $\mu\text{s}$  ili manje.<sup>26</sup>

Vrsta koja fluorescira naziva se fluorofor. Među molekulama s najintenzivnijom fluorescencijskom emisijom su one koje sadrže aromatske prstenove. Intenzitet fluorescencije ovisi o temperaturi, pH, otapalu, raspršenju i koncentraciji kisika u otapalu, ali ponajviše o primarnom okruženju fluorofora u molekuli što omogućava praćenje reakcija kompleksiranja fluorimetrijskim titracijama.<sup>26</sup>

Cikloheksapeptid L pogodan je za fluorimetrijsko istraživanje kompleksiranja iona jer sadrži aminokiselinu fenilalanin čija benzenska skupina ima sposobnost fluorescencije. Vezanjem iona dolazi do promjena u raspodjeli elektronske gustoće, ali i do konformacijskih promjena domaćina što najčešće uzrokuje porast ili smanjenje intenziteta fluorescencije. Iz spektara dobivenih fluorimetrijskom titracijom moguće je i odrediti standardnu konstantu ravnoteže nastalog kompleksa.

Intenzitet fluorescencije uzorka u kiveti mjeri se spektrofluorimetrom, a ovisan je o koncentraciji tvari X prema formuli:

$$F = kI_0\phi\epsilon_x l[X] \quad (8)$$

Konstanta  $k$  je konstanta proporcionalnosti koja ovisi o instrumentu,  $I_0$  je intenzitet upadnog zračenja,  $\phi$  je kvantno iskorištenje fluorescencije (omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula),  $\epsilon_x$  je molarni apsorpcijski koeficijent tvari X pri određenoj valnoj duljini emisije,  $l$  je duljina optičkog puta, a  $[X]$  je ravnotežna koncentracija tvari koja fluorescira. Ovu relaciju moguće je koristiti samo u razrijeđenim sustavima jer pri većim koncentracijama dolazi do odstupanja od linearne ovisnosti intenziteta o koncentraciji fluorescentne vrste. Također, potrebno je obratiti pozornost na fotostabilnost svih sudionika reakcije jer ukoliko dođe do fotoraspada fluorescentno aktivne vrste, prikupljeni podatci neće biti reprezentativni.

## 2.4. Simulacije molekulske dinamika

Simulacije molekulske dinamike su uz Monte-Carlo metode osnovna računalna metoda pretraživanja konformacijskog prostora molekula. Početak simulacije je početni skup koordinata i brzina nakon čega se sustav propagira u vremenu prema Newtonovim zakonima gibanja uz korištenje polja sila za opis intra- i intermolekulskih interakcija. Simulacijom se dobiva trajektorija, odnosno niz vremenski ovisnih točaka u faznom prostoru sustava. Metoda je u teoriji deterministička, što znači da ako dvije simulacije počnu iz identičnih početnih koordinata i brzina, rezultat će biti jednake trajektorije. U praksi, metoda je deterministička do na numeričku preciznost računala. Uvođenjem termostata, u čijim se izrazima često nalaze i nasumični članovi, metoda postaje stohastička.

Tijek simulacije može se opisati na sljedeći način: prvo je potrebno odabrati početni položaj atoma kojima se dodjeljuju početne brzine principom slučajnog odabira. Pri tome je nužno poštivanje Maxwell-Boltzmannove raspodjele za određenu temperaturu:

$$\rho(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{mv_i^2}{2k_B T}} \quad (9)$$

U navedenoj relaciji  $\rho$  predstavlja funkciju raspodjele iznosa brzine,  $v_i$  je iznos vektora brzine  $i$ -te jezgre,  $m_i$  masa  $i$ -te jezgre,  $k_B$  Boltzmannova konstanta, a  $T$  je termodinamička temperatura. Pri dodjeljivanju početnih količina gibanja treba obratiti pozornost na ekviparticijski teorem, naime ukupna kinetička energija sustava mora zadovoljavati izraz:

$$\langle E_k \rangle = \frac{3}{2} k_B T \quad (10)$$

Količine gibanja računaju se iz brzina, odnosno položaja i masa prema jednadžbi:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = f_i \quad (11)$$

Gdje  $r_i$  predstavlja položaj  $i$ -te jezgre. Slijedi računanje sila koje djeluju na pojedine atome, odnosno određivanje međuatomskih interakcija, koje se najčešće određuju iz potencijalne energije sustava prema jednadžbi:

$$f_i = \frac{\partial}{\partial r_i} U(r_1, r_2, r_3, \dots, r_N) \quad (12)$$

Iz tih sila se, zatim, prema drugom Newtonovom zakonu računaju ubrzanja atoma:

$$a_i(t) = \frac{f_i(t)}{m_i} \quad (13)$$

Iz poznatih položaja, količina gibanja i ubrzanja atoma računaju se novi položaji i količine gibanja u kratkom vremenskom intervalu, za koji se pretpostavlja da se sila ne mijenja. Novo izračunati početni položaji i akceleracije se zapisuju te se postupak iterativno nastavlja. Navedeno se ponavlja dok se ne uspostavi ravnoteža, nakon čega slijedi spremanje podataka u obliku trajektorija. Trajektorije se dobivaju nekim od propagacijskih algoritama, od kojih je često korišteni *velocity Verlet*<sup>27</sup>. Navedeni algoritam računa položaj  $i$ -te jezgre,  $r_i$ , u trenutku  $t+\Delta t$  računa iz položaja, brzine i akceleracije te jezgre u trenutku  $t$ :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t)\Delta t^2 \quad (14)$$

A brzina svakog atoma računa se prema jednadžbi:

$$v_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v_i(t) + \frac{1}{2}a_i(t)\Delta t \quad (15)$$

Kao rezultat simulacije dobiva se trajektorija, odnosno koordinate atoma kao funkcije vremena. Naposljetku, potrebno je analizirati trajektorije kako bi se dobili reprezentativni podatci o sustavu. Tijekom simulacije dolazi do prelaska kinetičke energije u potencijalnu i obrnuto te samim tim promjene temperature sustava. Kako bi se temperatura održavala približno konstantnom kroz cijelu simulaciju potrebno je koristiti dodatan algoritam za regulaciju kinetičke energije čestica u sustavu, odnosno termostat. Analogno, kako bi se regulirao tlak, do

čije promjene dolazi zbog promjene sila koje djeluju na atome, moguće je koristiti dodatan algoritam–barostat. Kako bi čestice na granicama sustava bile u istom okruženju kao i one u sredini kutije osnovna kutija se periodički ponavlja u prostoru. Dakle, u slučaju kubičnog oblika kutije, oko originalne kutije dodatno je postavljeno još 26 njenih replika.<sup>28–32</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Za pripremu otopina u eksperimentima korišten je cikloheksapeptid Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> (**L**) kojeg su pripravili i pročistili doc. dr. sc. Nikola Cindro i apsolvant Mirko Duvnjak na Zavodu za organsku kemiju. Također, korištene su soli: tetrabutilamonijev perklorat (Acros Organics, 98 %), kalcijev perklorat tetrahidrat (Sigma-Aldrich, 99 %), magnezijev perklorat heksahidrat (Aldrich, 99 %), stroncijev perklorat trihidrat (Alfa Aesar, 98 %), barijev perklorat (Fluka, ≥ 98 %), tetraetilamonijev klorid (Sigma, ≥ 98 %), tetrabutilamonijev bromid (Sigma-Aldrich, ≥ 99,0 %, p.a.), tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich ≥ 99,0 %, p.a.). Kao otapalo korišten je acetonitril (Fisher Chemical, HPLC Gradient grade, ≥ 99,9 %, p.a.) bez dodatnog pročišćavanja.

### 3.2. Fluorimetrijske titracije

Fluorimetrijske titracije provedene su pomoću spektrofluorimetra Cary Eclipse tvrtke Varian. Titracije su izvedene ručnim dodavanjem titransa u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm. Pobudna valna duljina iznosila je 260 nm, a fluorimetrijska emisija snimana je u rasponu od 270 nm do 500 nm. Eksitacijski i emisijski prorezi bili su širine 10 nm. Spektri su snimani s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 0,4 s. Sve titracije provedene su pri konstantnoj temperaturi od  $(25,0 \pm 0,1)$  °C. Otopina cikloheksapeptida **L** ( $c = 1,94 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> –  $2,19 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) početnog volumena 2,2 – 2,3 mL titrirana je otopinama soli:

- tetrabutilamonijeva perklorata ( $c = 0,0151$  mol dm<sup>-3</sup> –  $0,0501$  mol dm<sup>-3</sup>),
- kalcijeva perklorata tetrahidrata ( $c = 1,42 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> –  $7,70 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>),
- magnezijeva perklorata heksahidrata ( $c = 2,21 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> –  $0,0300$  mol dm<sup>-3</sup>),
- stroncijeva perklorata trihidrata ( $c = 2,21 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> –  $0,0305$  mol dm<sup>-3</sup>),
- barijeva perklorata ( $c = 2,21 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> –  $0,0301$  mol dm<sup>-3</sup>),
- tetraetilamonijeva klorida ( $c = 7,86 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>),
- tetrabutilamonijeva bromida ( $c = 0,0748$  mol dm<sup>-3</sup>).



Podatci su obrađeni multivarijantnom regresijskom analizom te su određene konstante ravnoteže nastanka pojedinih kompleksa pomoću programskog paketa HYPERQUAD<sup>33</sup>, a titracijski spektri i rezultati prikazani su pomoću programa OriginPro 7.5.<sup>34</sup>

Svaka titracija provedena je jednom zbog niske dostupnosti korištenog cikloheksapeptida i velike vremenske zahtjevnosti.

### 3.3. Simulacije molekulske dinamike

Cikloheksapeptid L je najprije konstruiran u programu *Avogadro*. Simulacije molekulske dinamike provedene su pomoću programskog paketa *Gromacs 2022.6*.<sup>35</sup> Prije početka simulacije, u datoteke koje sadrže koordinate i brzine atoma cikloheksapeptida, dodane su početne koordinate pojedinih iona (ili atoma). Korišteno je polje sila *Charmm36*<sup>36,37</sup> za komplekse s kationima i *OPLS-AA*<sup>27,37</sup> za komplekse s anionima. Na početku svih simulacija ciklopeptidni ionski kompleks nalazio se u centru kutije dimenzija 6 nm × 6 nm × 6 nm. Simulacije su najprije provedene u vakuumu, a zatim u otapalu uvođenjem eksplicitnih molekula acetonitrila.

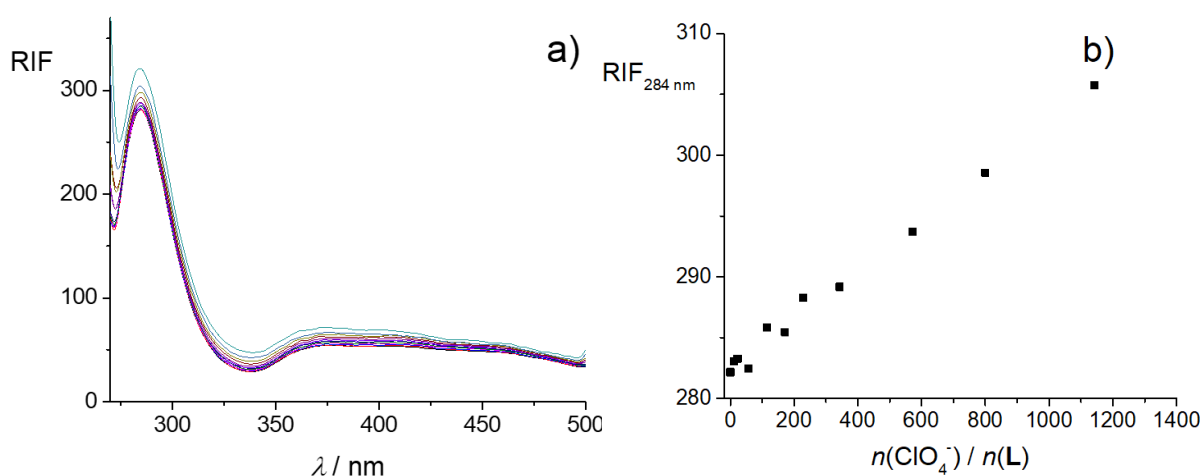
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kationi

#### 4.1.1. Detaljna analiza vezanja kalcijeva kationa i perkloratnog aniona

##### 4.1.1.1. Kompleksiranje ciklopeptida **L** s TBAClO<sub>4</sub>

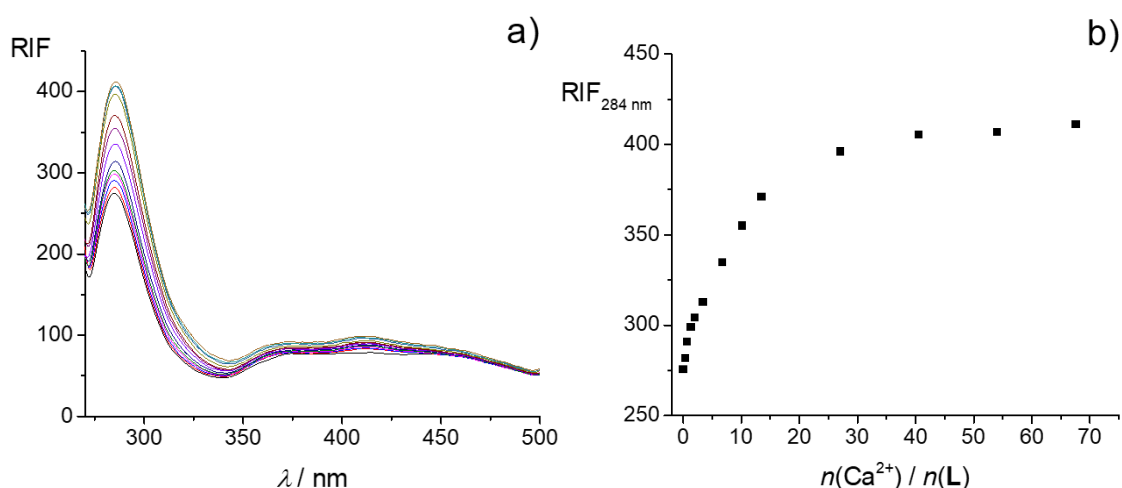
Prije istraživanja afiniteta vezanja metalnih kationa bilo je potrebno pronaći prikladni protuion koji se neće ili će se vrlo slabo vezati na ligand. Titracijom cikloheksapeptida otopinom tetrabutilamonijeva perklorata u acetonitrilu, prikazanoj na slici 3, pokazano je kako se perkloratni anion vrlo slabo veže na ligand. Značajniji stupanj nastanka kompleksa opažen je tek pri vrlo visokim omjerima aniona i peptida koji u daljnjim titracijama neće biti postignuti što ga čini dobrim izborom za protuion u solima kationa čije je vezanje proučavano.



**Slika 3. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s TBAClO<sub>4</sub> ( $c = 0,0501 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\mathbf{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog TBAClO<sub>4</sub> i spoja **L**.

4.1.1.2. Kompleksiranje ciklopeptida **L** s ionom  $\text{Ca}^{2+}$ 

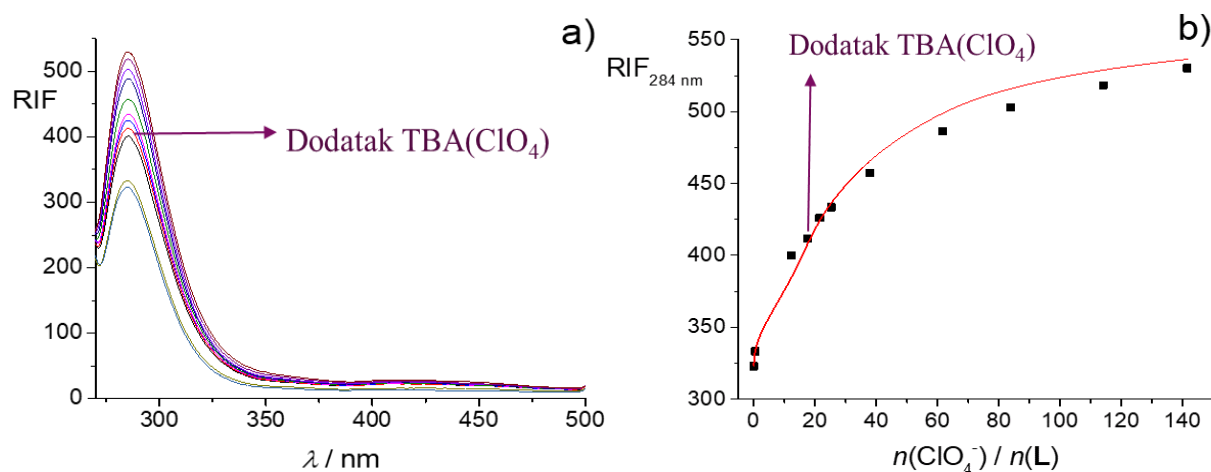
Na početku istraživanja provedena je titracija odabranog cikloheksapeptida s kalcijevim perkloratom tetrahidratom u acetonitrilu. Kalcijev ion je imao veći prioritet u odnosu na ostale radi istraživanja *Niu i sur.*<sup>13</sup> u kojem su provedene titracije sličnog cikloheksapeptida s otopinom kalcijevog perklorata u acetonitrilu. U našoj titraciji uočene su promjene koje ukazuju na nastanak kompleksa (slika 4) međutim nije bilo moguće odrediti predviđene konstante ravnoteže nastanka kompleksa opisane u radu.



**Slika 4. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c = 2,96 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**.

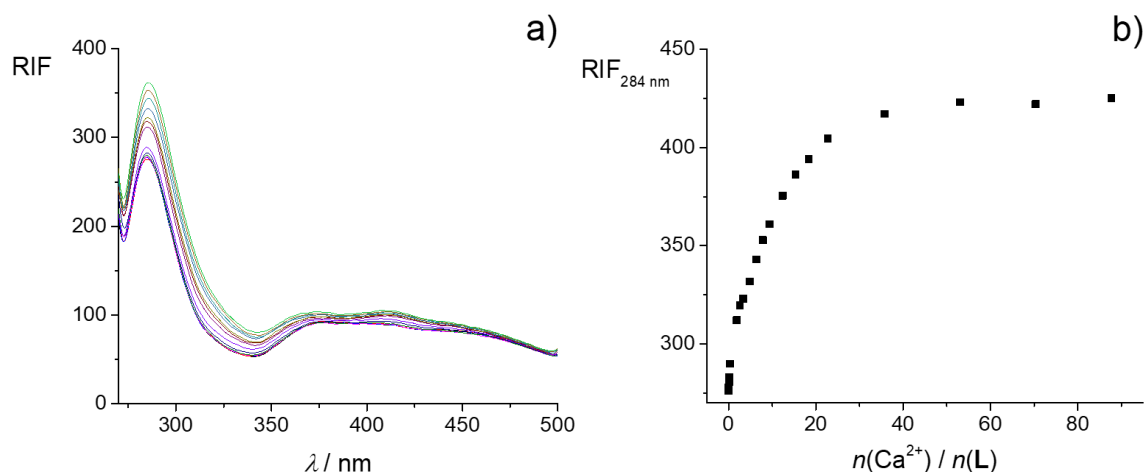
Nemogućnost određivanja konstanti stabilnosti literaturno opisanih kompleksa učinila je daljnje istraživanje ovog sustava neophodnim. Pretpostavljeno je da treći kompleks koji nastaje ne odgovara kompleksu  $\text{L}(\text{Ca}^{2+})_2$  opisanom u literaturi.<sup>2</sup> Takav kompleks imao bi naboj +4 i dva kalcijeva kationa na vrlo maloj udaljenosti, što je energijski vrlo nepovoljno. Umjesto toga pretpostavljeno je da nastaje kompleks koji sadrži cikloheksapeptid, kalcijev kation i perkloratni anion, dakle kompleks  $\text{L}\text{Ca}^{2+}$  veže perkloratni anion, a ne još jedan kalcijev kation. Navedeno je potvrđeno kombiniranom titracijom prikazanom na slici 5, u kojoj je otopina cikloheksapeptida titrirana otopinom kalcijeva perklorata tetrahidrata do omjera kalcija i

liganda 6,15, nakon čega je nastavljena titracija otopinom tetrabutilamonijeva perklorata pri čemu su otopine titransa sadržavale ligand koncentracije jednake početnoj koncentraciji titranda kako se ona ne bi mijenjala tijekom eksperimenta. Promjene u spektru ukazuju na nastavak reakcije i nastanak nove vrste što potvrđuje nastajanje kompleksa  $(\text{LCaClO}_4)^+$ .



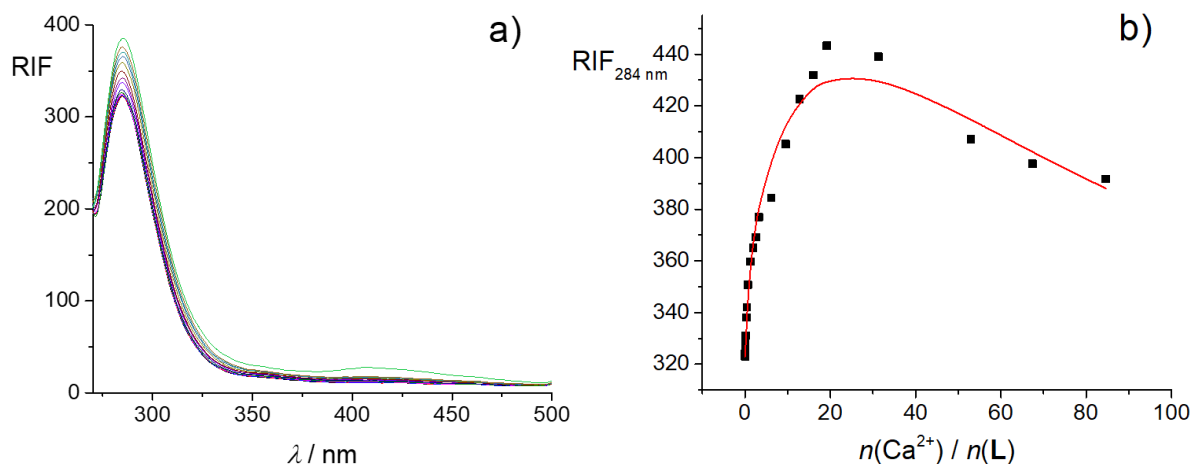
**Slika 5. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 1,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i  $\text{TBAClO}_4$  ( $c = 0,0151 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{ClO}_4^-$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Nakon što su stehiometrije svih kompleksa koji, u značajnoj količini, nastaju u opisanom sustavu bile poznate, pristupilo se određivanju njihovih konstanti stabilnosti. Za određivanje tri konstante stabilnosti bilo je potrebno vrlo detaljno pokriti veliki raspon omjera iona i cikloheksapeptida. Navedeno je postignuto korištenjem tri različite koncentracije otopine kalcijeva perklorata tetrahidrata (slika 6). Međutim, tako kompleksan sustav nije bilo moguće pouzdano okarakterizirati dok god postoji promjena intenziteta fluorescencije koja nastaje uslijed razrjeđenja.

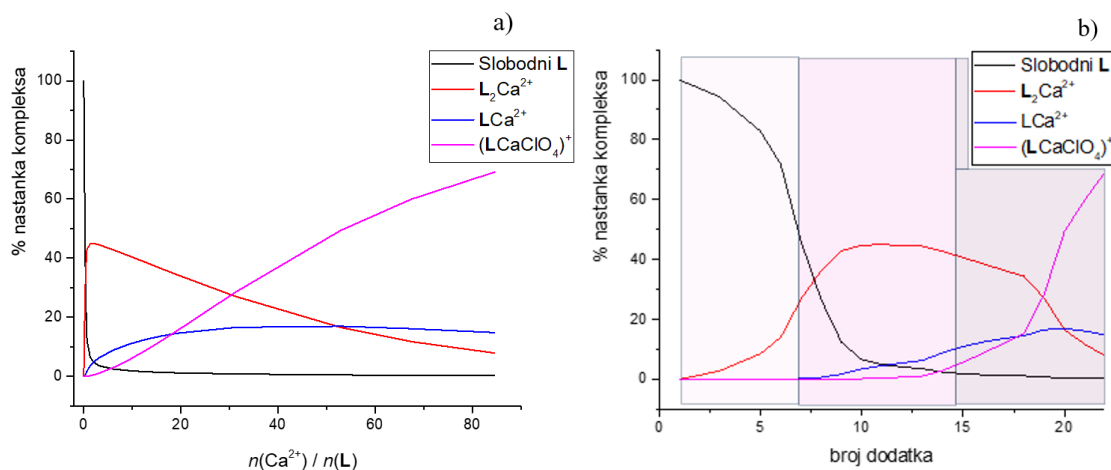


**Slika 6. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 1,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 1,32 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_3 = 7,60 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**.

U svrhu rješavanja problema razrjeđenja titracija je provedena tako da je u otopinu titranda dodavana otopina titransa koja sadrži jednaku koncentraciju cikloheksapeptida kao i titrand (soli su otopljene u otopini cikloheksapeptida u acetonitrilu, stoga nema razrjeđenja). Na taj način uspješno su određene tri konstante ravnoteže (slika 7, tablica 1). Tijek reakcije u obliku distribucijskih dijagrama, prikazan je na slici 7 „Sendvič“ kompleks  $\text{L}_2\text{Ca}^{2+}$  nastaje na samom početku reakcije, do omjera kalcijeva kationa i liganda od 0,50, i tijekom reakcije nestaje. Kompleksa  $\text{LCa}^{2+}$  nastaje oko 10% te kroz titraciju njegova koncentracija ostaje gotovo konstantna. Kompleks  $(\text{LCaClO}_4)^+$  počinje se značajnije stvarati tek nakon omjera kationa i liganda od 6,5, a zatim kontinuirano nastaje do kraja titracije.



**Slika 7. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 1,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 1,32 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_3 = 7,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

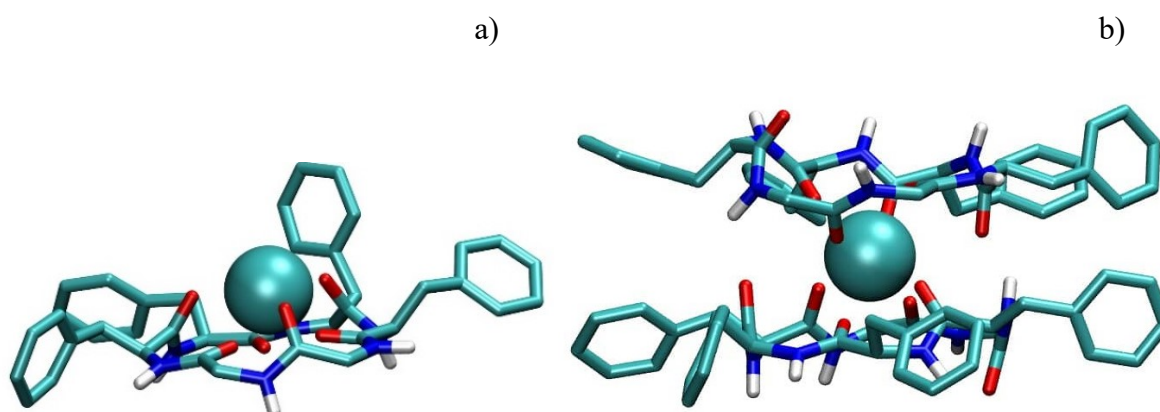


**Slika 8. a)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $\text{Ca}^{2+}$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ; pravokutnicima su označeni dodatci pojedinih koncentracija otopine  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  (svijetlo ružičasti pravokutnik:  $c_1 = 1,42 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ; ružičasti pravokutnik:  $c_2 = 1,32 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; smeđi pravokutnik:  $c_3 = 7,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

**Tablica 1.** Usporedba kumulativnih konstanti ravnoteže nastanka kalcijevih kompleksa spoja **L** određenih fluorimetrijskim titracijama i literaturnih podataka za kompleksiranje strukturno sličnog cikloheksapeptida s kalcijevim kationom u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .

Eksperimentalno određene		Literaturne <sup>13</sup>	
Kompleks	logK	Kompleks	logK
<b>L<sub>2</sub>Ca<sup>2+</sup></b>	10,69	<b>L<sub>1</sub><sub>2</sub>Ca<sup>2+</sup></b>	6,48
<b>LCa<sup>2+</sup></b>	4,35	<b>L1Ca<sup>2+</sup></b>	4,85
<b>(LCaClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup></b>	7,39	<b>L1(Ca<sup>2+</sup>)<sub>2</sub></b>	8,10

Strukturne karakteristike kompleksa dobivene su simulacijama molekulske dinamike. Rezultati simulacija pokazuju da se kalcijev kation veže preko karbonilnih kisika u svim kompleksima. U kompleksu **LCa<sup>2+</sup>** (slika 9a) kalcijev kation vezan je u prosjeku sa 4 karbonilna kisika dok je u „sendvič“ kompleksu **L<sub>2</sub>Ca<sup>2+</sup>** (slika 9b) kalcijev kation koordiniran u prosjeku preko 8 karbonilnih kisika cikloheksapeptida (tablica 3). Strukturu kompleksa **(LCaClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup>** u otopini nije bilo moguće dobiti korištenjem odabranog klasičnog polja sila. Za reprezentativne rezultate potrebno je koristiti kombinaciju molekulske mehanike i kvantno mehaničkih računa (MM/QM metode), što izlazi izvan okvira ovog istraživanja.

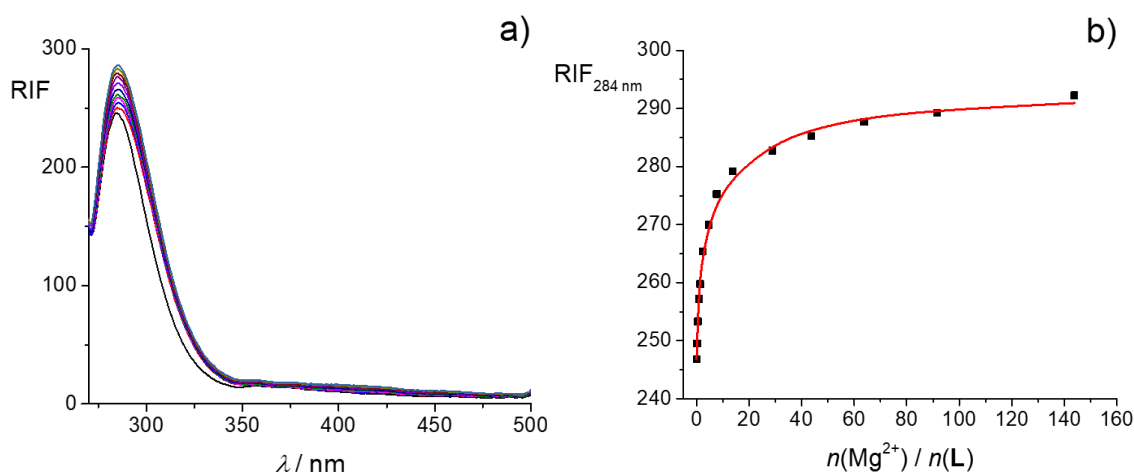


**Slika 9. a)** kompleks **LCa<sup>2+</sup>**-peptid : Ca<sup>2+</sup> = 1 : 1.

**b)** „Sendvič“ kompleks **L<sub>2</sub>Ca<sup>2+</sup>**-peptid : Ca<sup>2+</sup> = 2 : 1.

## 4.1.2. Magnezijev perklorat

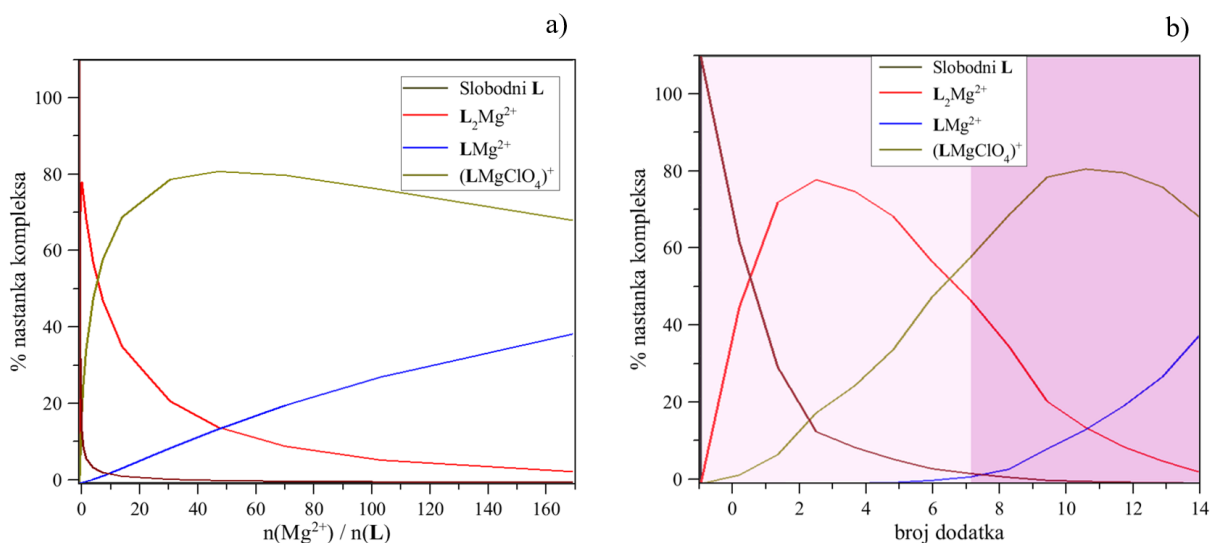
Provedena je fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s dvjema otopinama magnezijeva perklorata heksahidrata različitih koncentracija (slika 10a). Tijekom titracije relativni intenzitet fluorescencije raste, a najveća promjena uočena je pri 284 nm (slika 10b). Iz provedene fluorimetrijske titracije, uspješno su određene tri konstante ravnoteže nastanka kompleksa (tablica 2).



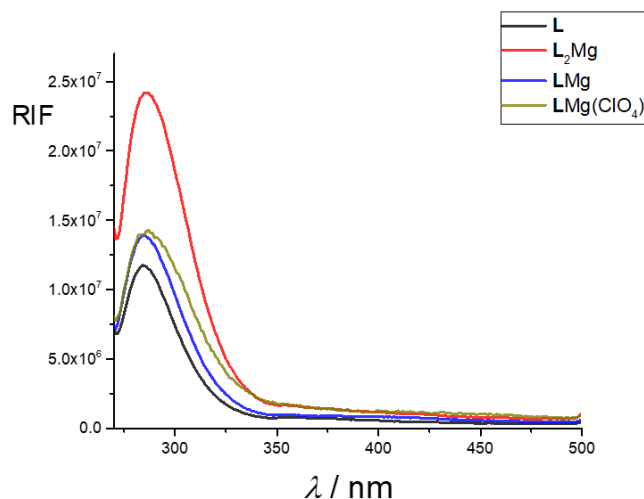
**Slika 10. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 2,11 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 3,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\mathbf{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Prva konstanta ravnoteže odgovara kompleksu  $\text{LMg}^{2+}$  te iznosi  $\log\beta = 5,18$ . Osnovni spektar ima drugi najveći intenzitet (slika 12), a tijekom titracije kontinuirano raste do udjela oko 30 % (slika 11). Druga konstanta odgovara „sendvič“ kompleksu  $\text{L}_2\text{Mg}^{2+}$ , a iznosi  $\log\beta = 11,11$ . Navedeni kompleks ima osnovni spektar najvećeg intenziteta u odnosu na ostale vrste koje nastaju u otopini tijekom titracije (slika 12). Koncentracija „sendvič“ kompleksa naglo raste do omjera kationa i cikloheksapeptida koji iznosi 0,95, nakon čega opada uslijed nastanka ostalih kompleksa (slika 11). Analogno titraciji s kalcijevim perkloratom, u slučaju magnezijeva perklorata nastaje ternarni kompleks u kojem su peptid,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{ClO}_4^-$  u omjeru 1 : 1 : 1, čija je konstanta nastanka  $\log\beta = 7,15$ . Koncentracija navedenog kompleksa raste do udjela oko 70 % te on odgovara najzastupljenijoj vrsti u otopini na kraju titracije (slika 11).



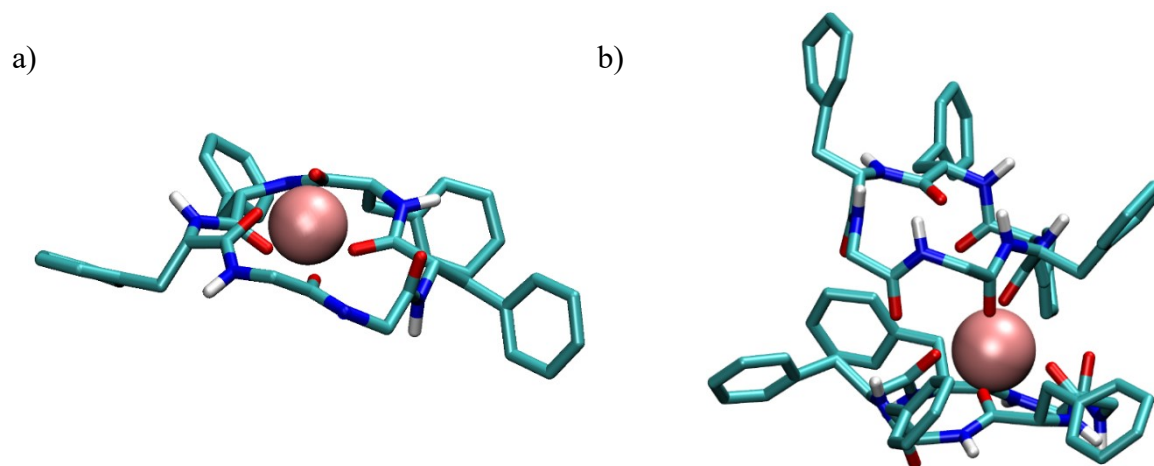


**Slika 11. a)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $Mg^{2+}$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ C$ ; **b)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka  $Mg(ClO_4)_2$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ C$ ; pravokutnicima su označeni dodatci pojedinih koncentracija otopine  $Mg(ClO_4)_2$  (svijetlo ružičasti pravokutnik:  $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; ružičasti pravokutnik:  $c_2 = 0,0300 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



**Slika 12.** Osnovni emisijski spektri pojedinih kompleksa koji nastaju tijekom titracije spoja **L** s  $Mg(ClO_4)_2$  u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ C$ .

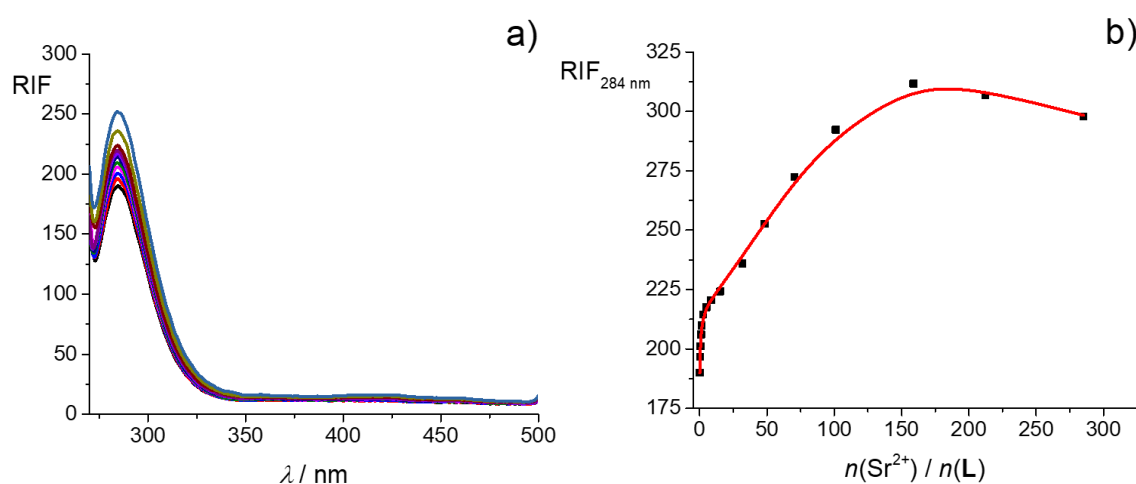
Iz trajektorija simulacija molekulske dinamike određena su reprezentativne strukture kompleksa. Vidljivo je da magnezij u kompleksu  $\text{LMg}^{2+}$  (slika 13a) u prosjeku ostvaruje 5 interakcija s karbonylnim kisicima cikloheksapeptida. Nadalje, u „Sendvič“ kompleksu,  $\text{L}_2\text{Mg}^{2+}$  (slika 13b) magnezijev kation u prosjeku stvara 5 koordinacijskih veza s karbonylnim kisicima cikloheksapeptida.



**Slika 13.** a) kompleks  $\text{LMg}^{2+}$  – peptid :  $\text{Mg}^{2+} = 1 : 1$ ;  
b) „Sendvič“ kompleks  $\text{L}_2\text{Mg}^{2+}$  – peptid :  $\text{Mg}^{2+} = 2 : 1$  simulirani u acetonitrilu.

## 4.1.3. Stroncijev perklorat

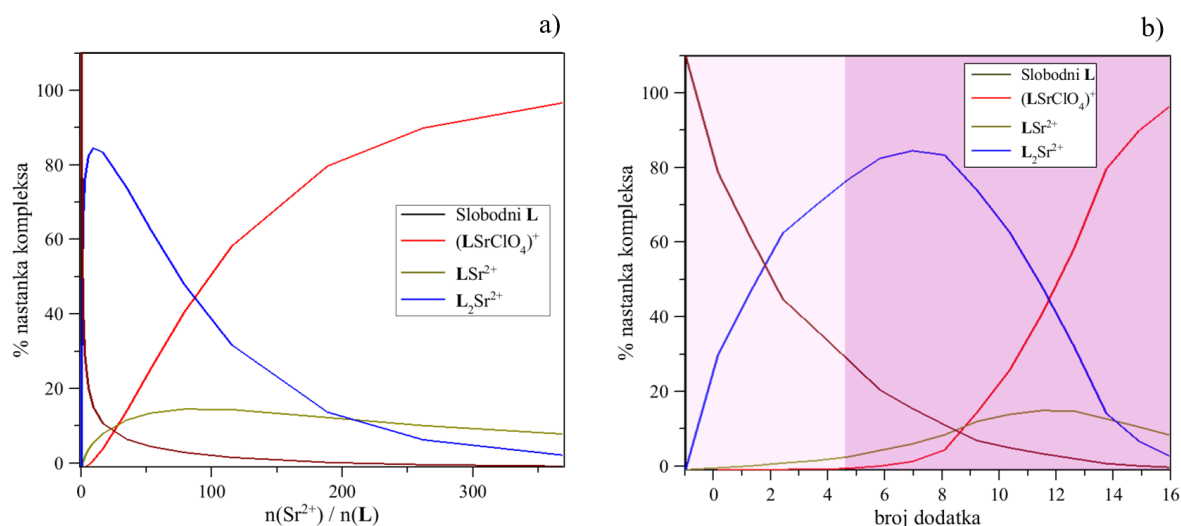
Analogno, provedena je fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s dvjema otopinama stroncijeva perklorata heksahidrata različitih koncentracija kako bi se detaljnije obuhvatio širi raspon omjera peptida i kationa (slika 14a). Relativni intenzitet fluorescencije tijekom titracije raste do omjera  $\text{Sr}^{2+}$  i peptida koji iznosi oko 150, nakon čega pada. Relativni intenzitet fluorescencije najviše se mijenja pri valnoj duljini 284 nm (slika 14b). Određene su tri konstante ravnoteže nastanka kompleksa (tablica 2).



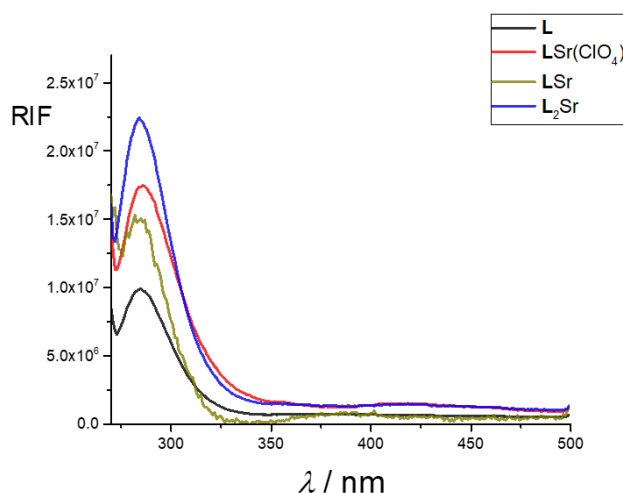
**Slika 14. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,94 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 0,0305 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Nastanak kompleksa  $\text{LSr}^{2+}$  opisan je konstantom  $\log\beta = 3,06$ . Nadalje, konstanta nastanka „sendvič“ kompleksa iznosi  $\log\beta = 9,22$ , a odgovara kompleksu  $\text{L}_2\text{Sr}^{2+}$ . Konstanta stabilnosti posljednje detektirane vrste, ternarnog kompleksa  $\text{LSr}(\text{ClO}_4)^+$ , iznosi  $\log\beta = 6,24$ . Osnovni spektar „sendvič“ kompleksa ima veći intenzitet od osnovnih spektara ostalih vrsta koje nastaju u otopini tijekom titracije (slika 16). Slijedi intenzitet svojstvenog spektra ternarnog kompleksa  $\text{LSr}(\text{ClO}_4)^+$ , zatim kompleksa  $\text{LSr}^{2+}$ , dok najmanji intenzitet ima čisti cikloheksapeptid.

Koncentracija  $\text{LSr}^{2+}$  kompleksa raste do udjela od 10 % pri nižim omjerima kationa i cikloheksapeptida te ostaje gotovo konstantna do kraja titracije (slika 15). „Sendvič“ kompleks nastaje na početku titracije i dolazi do udjela od 80 % te nakon omjera kationa i liganda koji iznosi 8 pada nauštrb nastanka ternarnog kompleksa  $\text{LSr}(\text{ClO}_4)^+$ , koji raste tijekom cijele titracije do konačnog udjela od gotovo 90 %.

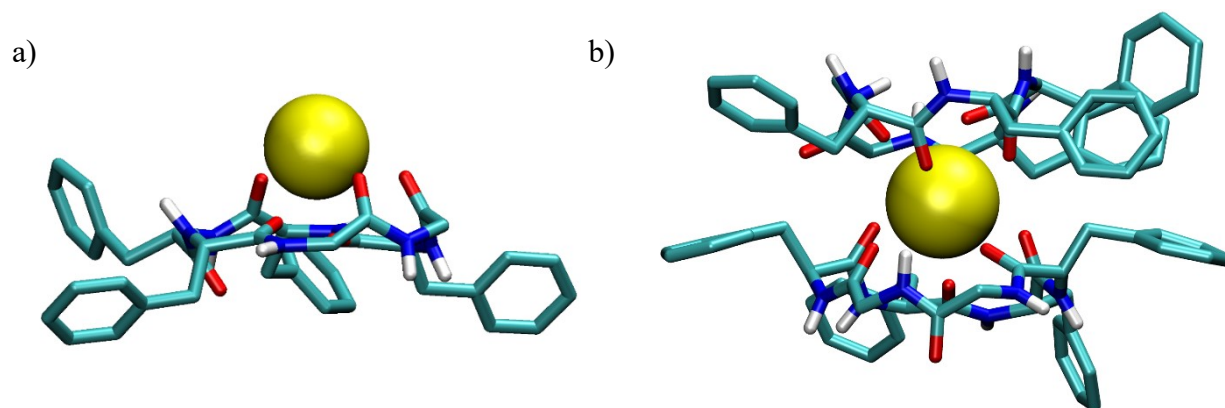


**Slika 15. a)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora  $\text{L}$  o omjeru množina dodanog  $\text{Sr}^{2+}$  i spoja  $\text{L}$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ; pravokutnicima su označeni dodatci pojedinih koncentracija otopine  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$  (svijetlo ružičasti pravokutnik:  $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; ružičasti pravokutnik:  $c_2 = 0,0305 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



**Slika 16.** Osnovni emisijski spektri pojedinih kompleksa koji nastaju tijekom titracije spoja **L** s  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$  u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

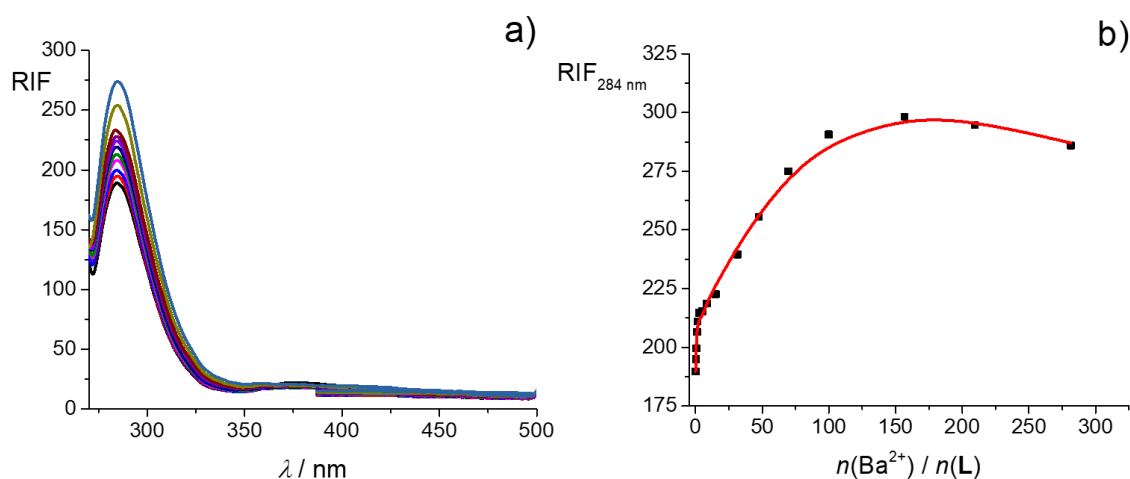
Reprezentativna struktura pokazuje da je kompleks u kojem su peptid i  $\text{Sr}^{2+}$  u odnosu 1 : 1 piramidalnog oblika. Kation je iznad ravnine prstena peptida te u prosjeku stvara 4 koordinacijske veze s karbonilnim kisicima peptida (slika 17a). U „sendvič“ kompleksu kation je u sredini između dva peptida te je u prosjeku okružen s 9 karbonilnih kisika (tablica 3) s kojima tvori koordinacijske veze (slika 17b).



**Slika 17. a)** kompleks  $\text{LSr}^{2+}$  – peptid :  $\text{Sr}^{2+} = 1 : 1$ ,  
**b)** „Sendvič“ kompleks  $\text{L}_2\text{Sr}^{2+}$  – peptid :  $\text{Sr}^{2+} = 2 : 1$  simulirani u acetonitrilu.

## 4.1.4. Barijev perklorat

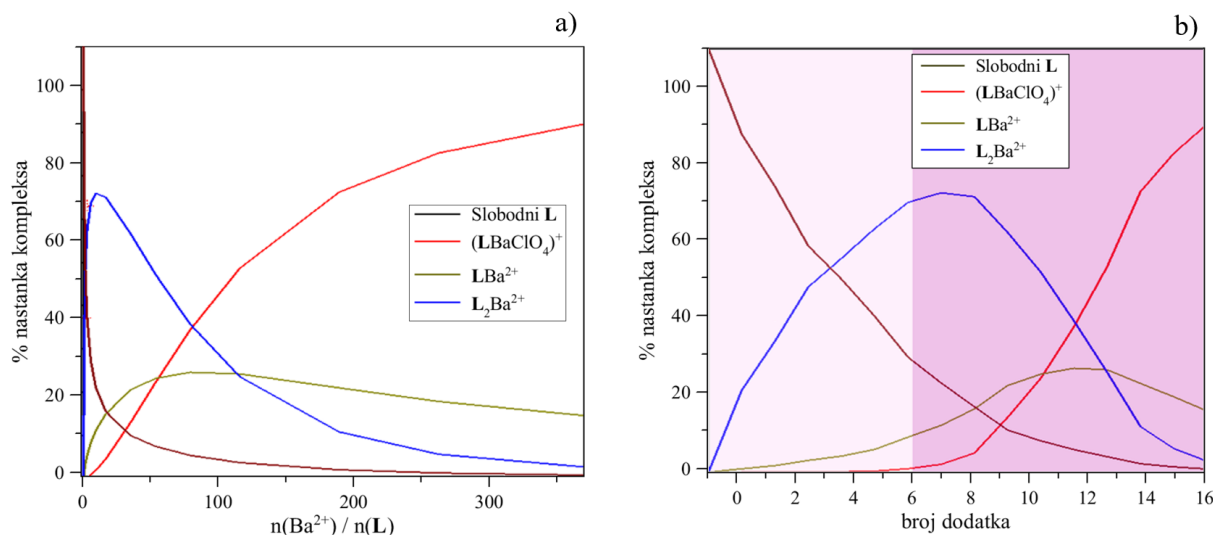
Provedena fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s dvjema otopinama barijeva perklorata heksahidrata različitih koncentracija (slika 18a) pokazuje nastanak tri kompleksa (tablica 2). Najveća promjena intenziteta fluorescencije uočena je pri 284 nm (slika 18b).



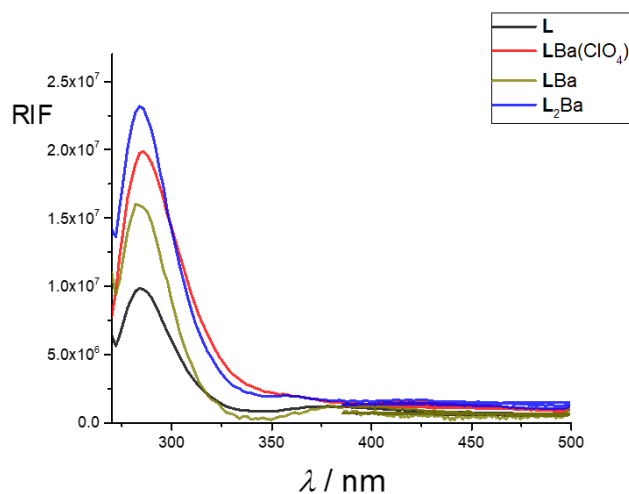
**Slika 18.** **a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,94 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  ( $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_2 = 3,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\mathbf{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Prva konstanta ravnoteže odgovara kompleksu  $\text{L}\text{Ba}^{2+}$  te iznosi  $\log\beta = 3,54$ . Druga konstanta odgovara „sendvič“ kompleksu  $\text{L}_2\text{Ba}^{2+}$ , a iznosi  $\log\beta = 9,42$ . Treća konstanta ravnoteže odgovara kompleksu  $\text{L}\text{Ba}(\text{ClO}_4)^+$  te iznosi  $\log\beta = 6,26$ .

Osnovni spektar najvećeg intenziteta odgovara „sendvič“ kompleksu (slika 20.), njegova koncentracija raste pri omjerima kationa i peptida do 8, nakon čega pada do udjela manjeg od 5 % (slika 19). Sljedeći po jačini intenzitet svojstvenog spektra odgovara ternarnom kompleksu  $\text{L}\text{Ba}(\text{ClO}_4)^+$  (slika 20) čija koncentracija raste kroz cijelu titraciju te naposljetku doseže udio iznad 80 % (slika 19). Čisti peptid ima najmanji intenzitet svojstvenog spektra (slika 20) i tijekom titracije se troši (slika 19). Intenzitet svojstvenog spektra kompleksa  $\text{L}\text{Ba}^{2+}$  veći je od onog za čisti peptid, a manji u odnosu na kompleks  $\text{L}\text{Ba}(\text{ClO}_4)^+$  (slika 20). Pri omjerima kationa i peptida do 15, koncentracija kompleksa  $\text{L}\text{Ba}^{2+}$  raste do gotovo 20 % nakon čega opada do kraja titracije (slika 19).

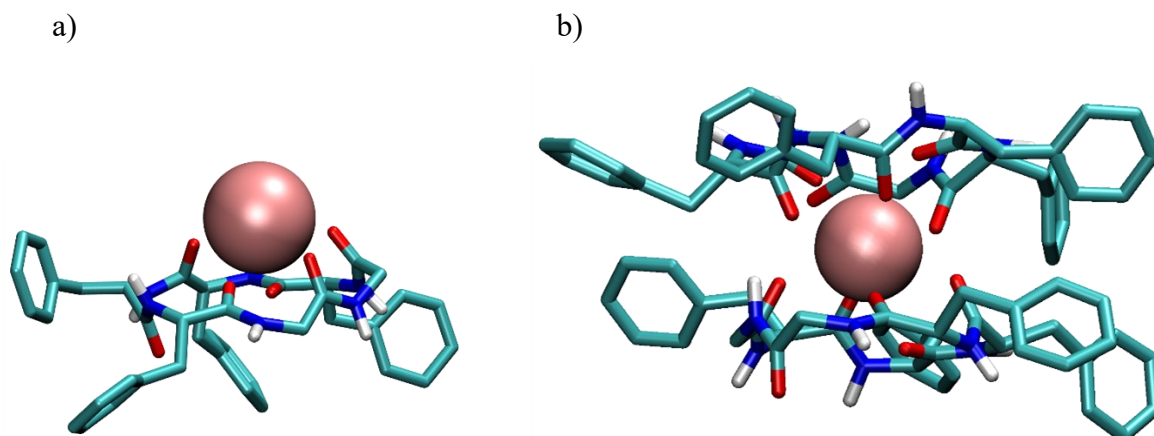


**Slika 19.** a) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $\text{Ba}^{2+}$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ; b) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ; pravokutnicima su označeni dodatci pojedinih koncentracija otopine  $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$  (svijetlo ružičasti pravokutnik:  $c_1 = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; ružičasti pravokutnik:  $c_2 = 0,0301 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



**Slika 20.** Osnovni emisijski spektri pojedinih kompleksa koji nastaju tijekom titracije spoja **L** s  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

Barijev kation u kompleksu  $\text{LBa}^{2+}$  nalazi se iznad ravnine prstena cikloheksapeptida te u prosjeku ostvaruje 4 koordinacijske veze s karbonilnim kisicima (slika 21a). U „sendvič“ kompleksu kation je vezan preko, u prosjeku, 9 karbonilnih kisika (tablica 3) te je smješten u sredini između dva cikloheksapeptida (slika 21b).



**Slika 21. a)** Kompleks  $\text{L}\text{Ba}^{2+}$  – peptid :  $\text{Ba}^{2+} = 1 : 1$ ;  
**b)** „sendvič“ kompleks  $\text{L}_2\text{Ba}^{2+}$  – peptid :  $\text{Ba}^{2+} = 2 : 1$  simulirani u acetonitrilu.



## 4.2. Vežanje kationa na spoj L

Istraživani cikloheksapeptid **L** veže katione u acetonitrilu što je utvrđeno fluorimetrijskim titracijama i potvrđeno simulacijama molekulske dinamike. Pokazano je da u titracijama s perkloratima zemnoalkalijskih metala nastaju tri različita kompleksa, od kojih je prvi koji nastaje 1:1 kompleks  $LM^{2+}$ , dok nadalje vežanjem dodatnog liganda ili perkloratnog aniona nastaju preostala dva kompleksa. „Sendvič“ kompleks nastaje na samom početku titracije, pri nižim omjerima kationa i cikloheksapeptida te u ostatku titracije postepeno nestaje. Dodavanjem otopine kationa iznad omjera kationa i liganda koji iznosi 1 : 1 dominantno nastaje kompleks  $LM^{2+}$  te je njegova količina u prosjeku konstanta ili blago pada u nastavku titracije. Vežanjem perkloratnog aniona na navedeni kompleks nastaje treća vrsta  $(LMClO_4)^+$ , koja nije opisana u literaturi, odnosno krivo je pripisana kompleksu s dva kalcijeva iona.<sup>13</sup> Kompleks  $(LMClO_4)^+$  nastaje pri većim omjerima kationa i liganda te se njegova količina do kraja titracije kontinuirano povećava. Dakle, iako je odabran anion kojeg ligand vrlo slabo veže, pokazano je da ga kompleksi  $LM^{2+}$  vrlo dobro vežu.

**Tablica 2.** Konstante ravnoteže ( $\log \beta$  i  $\log K$ ) nastalih kompleksa u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)$  °C; određeno fluorimetrijskim titracijama.

Kation	Peptid:kation:ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	log $\beta$	logK
Mg <sup>2+</sup>	2:1	11,11	5,93
	1:1	5,18	5,18
	1:1:1	7,15	1,97
Ca <sup>2+</sup>	2:1	10,44	5,31
	1:1	5,13	5,13
	1:1:1	8,63	3,50
Sr <sup>2+</sup>	2:1	9,22	6,16
	1:1	3,06	3,06
	1:1:1	6,24	3,18
Ba <sup>2+</sup>	2:1	9,42	5,88
	1:1	3,54	3,54
	1:1:1	6,26	2,72

**Tablica 3.** Prosječan broj karbonilnih kisika peptida koji s kationom tvore koordinacijske veze u acetonitrilu, rezultati simulacija molekulske dinamike.

Kation	Prosječan broj karbonilnih kisika	
	$L_2M^{2+}$	$LM^{2+}$
$Mg^{2+}$	5,0	5,0
$Ca^{2+}$	7,9	4,3
$Sr^{2+}$	9,0	4,4
$Ba^{2+}$	9,2	4,4

S obzirom na vrijednosti konstanti nastanka pojedinih kompleksa (tablica 2), te na prosječan broj interakcija koje u prosjeku ioni ostvaruju s karbonilnim kisicima cikloheksapeptida (tablica 3) može se provesti komparativna analiza rezultata. U nizu proučavanih zemnoalkalijskih kationa, najpovoljnije vezanje pokazuje magnezijev kation, a razlog tome je činjenica da je navedeni kation dovoljno malen te se smješta u sredinu prstena cikloheksapeptida (slika 13b) i okružuje u prosjeku s 5 karbonilnih kisika. Kao takav je potpuno desolvatiran, što je entalpijski nepovoljno, pogotovo zato što je magnezijev kation malog promjera ( $0,71 \text{ \AA}$ )<sup>15</sup> i velike gustoće naboja ( $\Delta_{\text{solv}}H(Mg^{2+}, \text{MeCN}) > 1600 \text{ kJ mol}^{-1}$ )<sup>15</sup>. S druge strane, s obzirom na to da otapalo gubi svoju strukturiranost oko kationa, nastanak kompleksa je entropijski povoljan. Sličan trend pokazuje i kalcijev kation, čija promjena entalpije solvatacije u acetonitrilu niža u odnosu na magnezijev kation (iznosi oko  $1580 \text{ kJ mol}^{-1}$ )<sup>15</sup>, ali je on prevelik da bi u potpunosti bio u ravnini prstena cikloheksapeptida, stoga se smješta malo iznad ravnine prstena te je kompleks piramidalnog oblika pri čemu su ostvarene u prosjeku 4 koordinacijske veze s karbonilnim kisicima. Kation je dodatno zaklonjen jednom fenilnom skupinom (slika 9b), stoga je potpuno okružen atomima cikloheksapeptida, odnosno desolvatiran i na taj način je njegov nastanak entropijski povoljan.

S druge strane, stroncijev i barijev kation se slabije vežu u opisane komplekse, a međusobno pokazuju sličan trend. Zbog svoje veličine oni su, u 1:1 kompleksima (slike 17b i 21b), iznad prstena cikloheksapeptida te su samo djelomično desolvatirani. Njihova desolvatacija je povoljnija u odnosu na magnezijev i kalcijev kation ( $\Delta_{\text{solv}}H(Sr^{2+}, \text{MeCN}) \approx 1460 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta_{\text{solv}}H(Ba^{2+}, \text{MeCN}) \approx 1335 \text{ kJ mol}^{-1}$ )<sup>15</sup>, ali su svojom veličinom manje kompatibilni s cikloheksapeptidom **L**. U prosjeku ostvaruju između 4 i 5 koordinacijskih veza s karbonilnim kisicima cikloheksapeptida koje su slabije u odnosu na magnezijev i kalcijev

kation, stoga su i konstante ravnoteže manje. S druge strane nastanak „sendvič“ kompleksa (slike 17a i 21a) iz 1:1 kompleksa je izrazito povoljan, kationi ne moraju izlaziti iz prstena, već se nalaze na povoljnoj poziciji te se dodatno stabiliziraju karbonilnim kisicima drugog cikloheksapeptida ostvarujući u prosjeku 9 interakcija s karbonilnim kisicima.

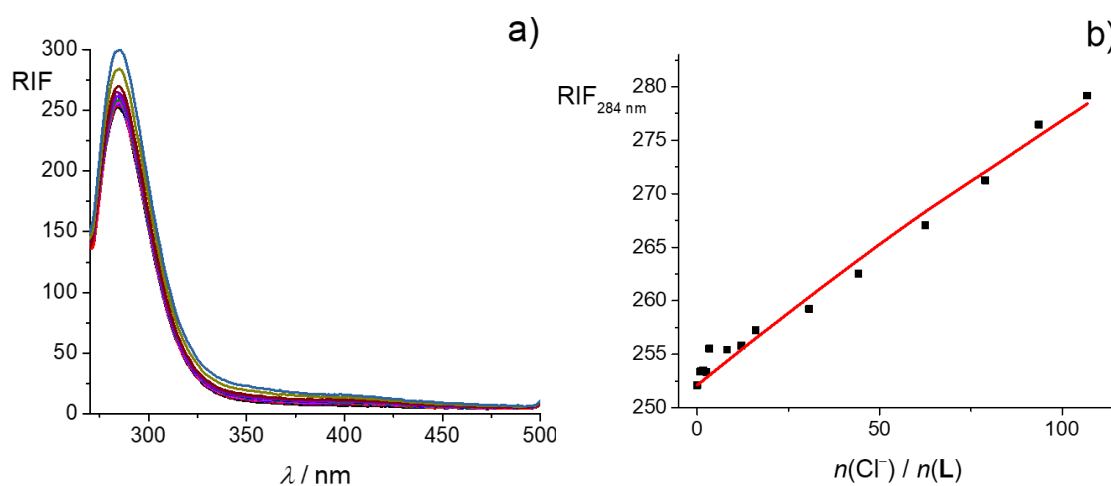
Iako struktura ternarnog kompleksa koji sadrži cikloheksapeptid, zemnoalkalijski kation i perkloratni anion nije uspješno određene računalnim metodama, iz strukture kompleksa  $LM^{2+}$  mogu se donijeti neke pretpostavke. Načelno je moguć nastanak dva tipa ternarnog kompleksa. Kod prvog tipa, perkloratni anion veže se sa suprotne strane u odnosu na kation. U peptidnoj vezi, kut između karbonilnog kisika i amidne skupine je  $180^\circ$ , stoga će anion u kompleksu u kojem su karbonilni kisici usmjereni prema kationu, teže ostvarivati vodikove veze s amidnim protonima koji su vrlo razmaknuti. Kako bi bio dovoljno blizu za ostvarivanje interakcija anion mora biti desolvatiran, što je entalpijski nepovoljno. Nastajat će manji broj slabijih vodikovih veza te će stabilnost ternarnog kompleksa biti manja u odnosu na kompleks u kojem su cikloheksapeptid i kation u odnosu 1:1. Drugi način vezanja perkloratnog aniona na 1:1 kompleks je povezivanje sa strane kationa, odnosno stvaranje ionskog para. U tom slučaju perkloratni anion ne ostvaruje nikakve interakcije s cikloheksapeptidom i na taj način nije stabiliziran, jedine interakcije koje ostvaruje su privlačne interakcije s kationom. Dolazi do kompeticije između elektrostatskog privlačenja kationa i aniona te solvatacije aniona. Kao i u prethodnom tipu, nastanak ternarnog kompleksa je manje povoljan u odnosu na nastanak 1:1 kompleksa.

### 4.3. Anioni

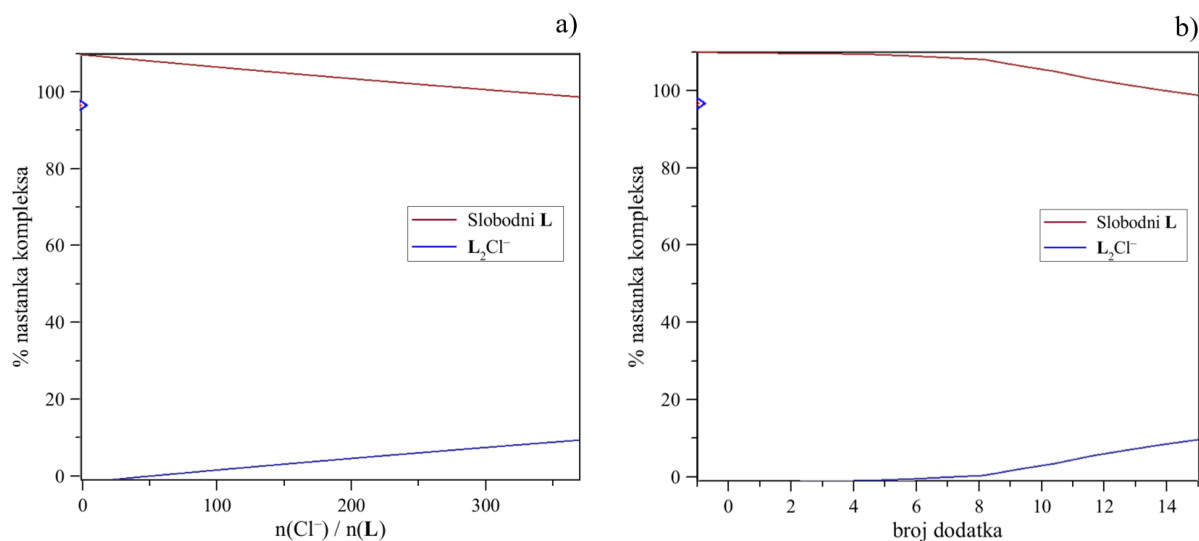
Korišteni cikloheksapeptid sadrži šest sekundarnih amidnih skupina, što ga čini dobrim donorom vodikove veze. Stoga su provedene fluorimetrijske titracije i simulacije molekulske dinamike s monoatomnim i poliatomnim anionima te su određene konstante nastanka pojedinih kompleksa te broj amidnih protona koji sudjeluju u interakciji s anionom.

#### 4.3.1. Tetraetilamonijev klorid

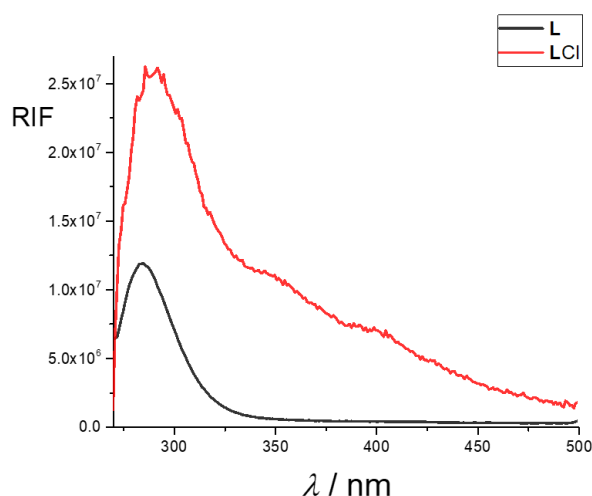
Provedena je fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s otopinom tetraetilamonijevog klorida (slika 22a). Relativni intenzitet fluorescencije najviše se mijenja pri valnoj duljini 284 nm i raste tijekom cijele titracije (slika 22b). S obzirom na izgled distribucijske krivulje (slika 23) u odnosu na tijek titracije i oblik svojstvenih spektara (slika 24), sami rezultati nisu pouzdani. Nastala količina kompleksa je oko 10 %, stoga ne možemo tvrditi da je izračunata konstanta ravnoteže reprezentativna, ipak određena je u svrhu usporedbe s drugim anionima u nizu.



**Slika 22.** a) Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 2,13 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s TEACl ( $c = 7,86 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu bez razrjeđenja,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog TEACl i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

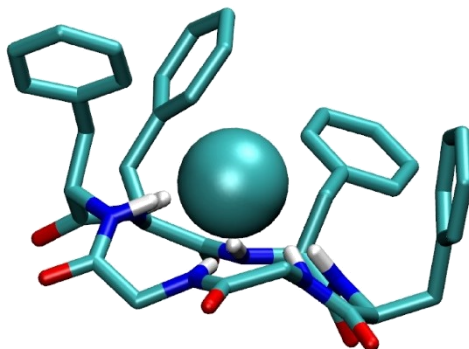


**Slika 23.** a) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $\text{Cl}^-$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ; b) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka TEACl,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .



**Slika 24.** Osnovni emisijski spektar kompleksa koji nastaje tijekom titracije spoja **L** s TEACl u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

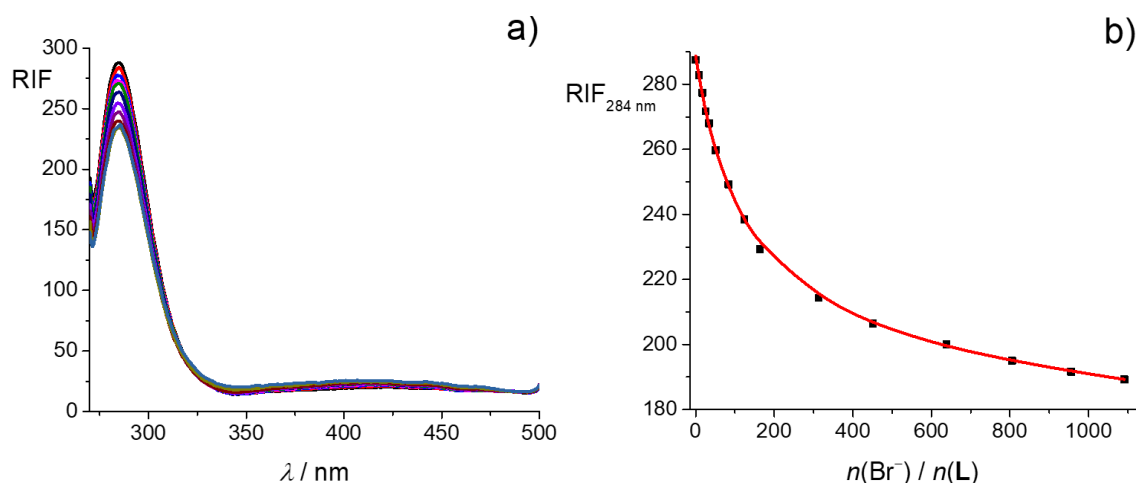
Konstanta nastanka kompleksa iznosi  $\log \beta = 1,69$ , a odgovara kompleksu  $\text{LCl}^-$ . Osnovni spektar navedenog kompleksa je veći u odnosu na čisti ligand (slika 24). Reprezentativna struktura pokazuje da u kompleksu  $\text{LCl}^-$  anion se nalazi iznad ravnine prstena te u prosjeku 3 do 4 amidna protona sudjeluju u vodikovoj vezi s anionom (slika 25).



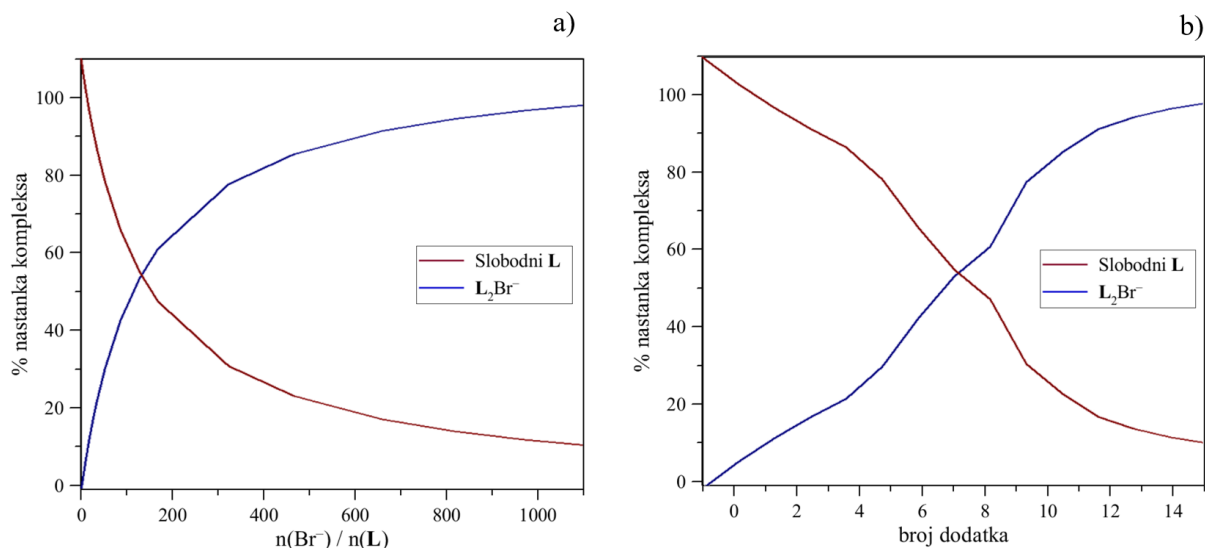
**Slika 25.** Kompleks  $\text{LCI}^-$  – peptid :  $\text{Cl}^- = 1 : 1$  simuliran u acetonitrilu.

## 4.3.2. Tetrabutilamonijev bromid

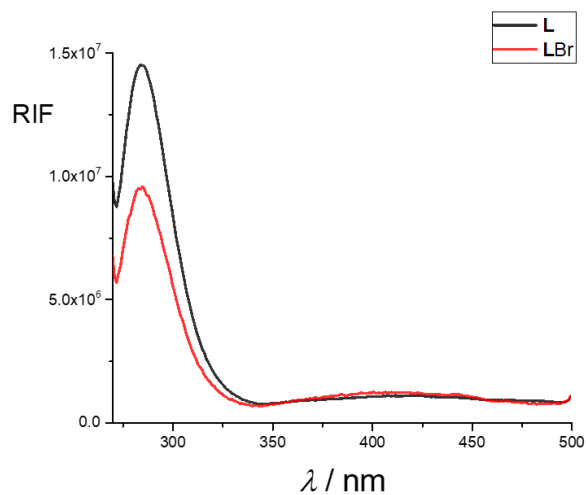
Analogno, provedena je fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s otopinom tetrabutilamonijevog bromida (slika 26a). Relativni intenzitet fluorescencije najviše se mijenja pri valnoj duljini 284 nm i nelinearno pada tijekom cijele titracije (slika 26b).



**Slika 26. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s TBABr ( $c = 7,49 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu bez razrjeđenja,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\mathbf{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog TBABr i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



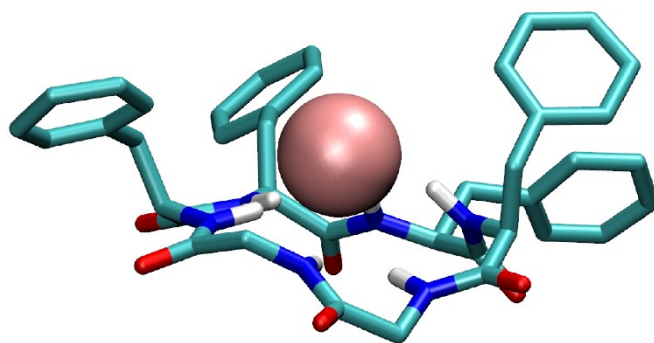
**Slika 27.** a) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $\text{Br}^-$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ; b) Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka TBABr,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .



**Slika 28.** Osnovni emisijski spektar kompleksa koji nastaje tijekom titracije spoja **L** s TBABr u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .



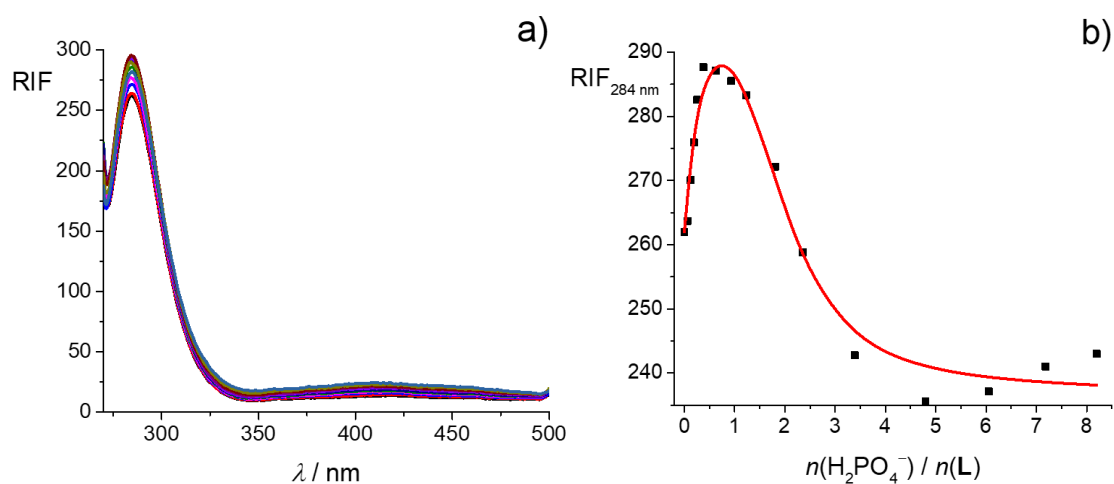
Konstanta nastanka kompleksa  $LBr^-$  iznosi  $\log\beta = 2,60$  te kompleks nastaje tijekom cijele titracije do udjela od 90 % (slika 27). Osnovni spektar navedenog kompleksa ima manji intenzitet u odnosu na čisti ligand (slika 28). U prosjeku 3 amidna protona sudjeluju u stvaranju vodikove veze s bromidom, a sami se bromid nalazi iznad ravnine prstena cikloheksapeptida (slika 29).



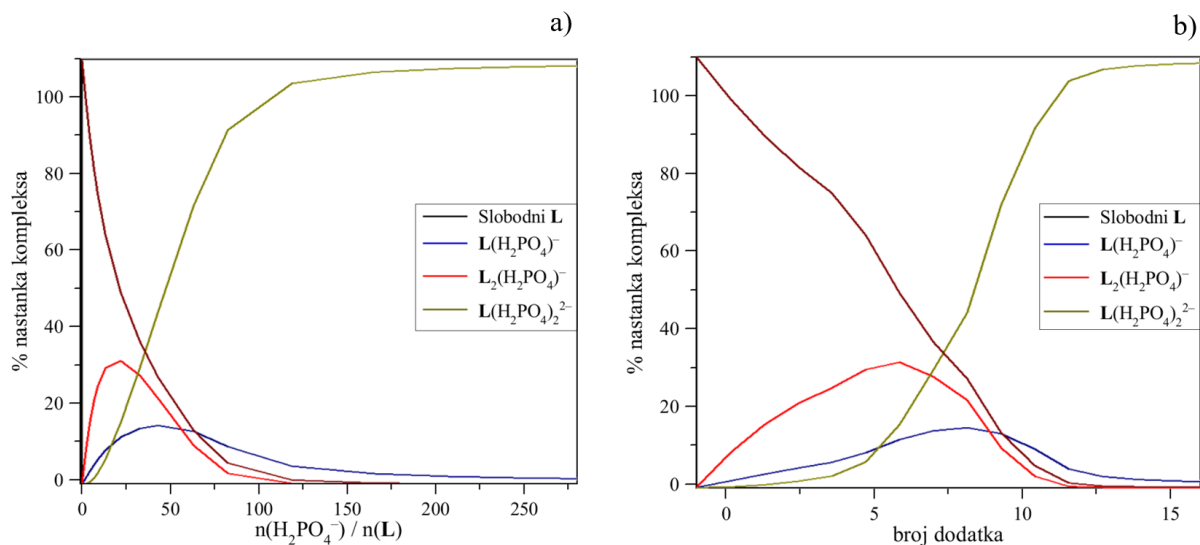
**Slika 29.** Kompleks  $LBr^-$  – peptid :  $Br^- = 1 : 1$  simuliran u acetonitrilu.

## 4.3.3. Tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat

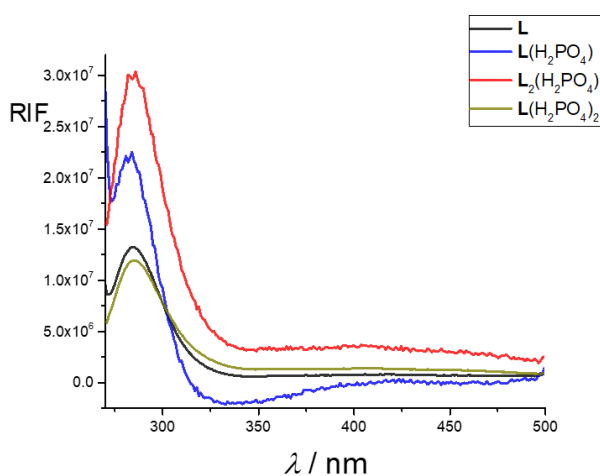
U nastavku istraživanja provedena je fluorimetrijska titracija otopine cikloheksapeptida u acetonitrilu s otopinom tetrabutilamonijevog dihidrogensulfata (slika 34a) kako bi se istražilo vezanje poliatomnog aniona. Relativni intenzitet fluorescencije najviše se mijenja pri valnoj duljini 284 nm i tijekom titracije raste do omjera 1:1, a zatim pada do konstantne vrijednosti (slika 34b). Iz oblika navedene krivulje može se pretpostaviti nastanak više kompleksa s različitim omjerima liganda i aniona. U skladu s time iz provedene fluorimetrijske titracije, uspješno su određene tri konstante ravnoteže nastanka kompleksa.



**Slika 34. a)** Fluorimetrijska titracija spoja **L** ( $c = 1,96 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $(\text{TBA})\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $c = 5,54 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $V_0(\text{L}) = 2,2 \text{ cm}^3$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{Slit}_{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ ; **b)** Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru množina dodanog  $(\text{TBA})\text{H}_2\text{PO}_4$  i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



**Slika 35. a)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa izraženog preko receptora **L** o omjeru množina dodanog  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i spoja **L**,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ; **b)** Distribucijski dijagram ovisnosti stupnja nastanka kompleksa o rednom broju dodatka  $(\text{TBA})\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

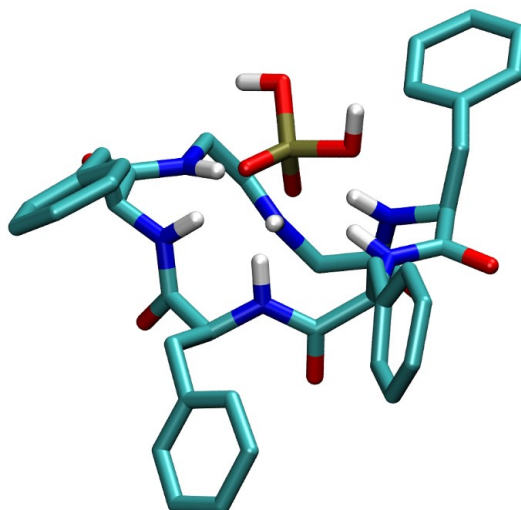


**Slika 36.** Osnovni emisijski spektri pojedinih kompleksa koji nastaju tijekom titracije spoja **L** s  $(\text{TBA})\text{H}_2\text{PO}_4$  u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

Prva konstanta odgovara kompleksu u kojem su peptid i  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  u odnosu 2 : 1, a iznosi  $\log\beta = 10,36$ . Osnovni spektar navedenog kompleksa ima najveći intenzitet u odnosu na ostale vrste koje nastaju u otopini tijekom titracije (slika 36). Koncentracija  $\text{L}_2\text{H}_2\text{PO}_4^-$  kompleksa raste do omjera 0,60 i udjela od oko 30 %, nakon čega opada uslijed nastanka ostalih kompleksa (slika 35).

Druga konstanta ravnoteže odgovara kompleksu  $\text{LH}_2\text{PO}_4^-$  te iznosi  $\log\beta = 5,20$ . Osnovni spektar ima manji intenzitet u odnosu na kompleks  $\text{L}_2\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (slika 36), a tijekom titracije kontinuirano raste do omjera 1,2 pri kojem ima udio od oko 10 % (slika 35). U prosjeku ostvaruje 4,64 interakcija s amidnim protonima cikloheksapeptida, što je vidljivo na reprezentativnoj strukturi (slika 37).

Dihidrogenfosfat ima izraženo svojstvo dimerizacije (konstanta dimerizacije u acetonitrilu iznosi  $\log\beta = 3,38^{38}$ ). U skladu s navedenim nastaje kompleks u kojem je na cikloheksapeptid vezan dimer dihidrogenfosfata  $\text{L}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2^{2-}$ . Konstanta nastanka navedenog kompleksa iznosi  $\log\beta = 11,13$ , a njegova osnovni spektar ima najniži intenzitet u odnosu na ostale zastupljene vrste. Koncentracija kompleksa raste tijekom cijele titracije, a naposljetku njegov udio iznosi iznad 98 % (slika 36).



**Slika 37.** Kompleks  $\text{LH}_2\text{PO}_4^-$  – peptid  $\text{H}_2\text{PO}_4^- = 1 : 1$  simuliran u acetonitrilu.

#### 4.4. Vežanje aniona na spoj L

Korišteni cikloheksapeptid sadrži sekundarne amidne skupine koje s anionima stvaraju vodikove veze, ali su konstante stabilnosti kompleksa koji sadrže anione (tablica 4) značajno niže u odnosu na komplekse koji sadrže katione (tablice 2). Istraživane anione moguće je podijeliti u dvije skupine, prema pokazanim trendovima vežanja. U slučaju monoatomnih aniona, desolvatacija je entalpijski nepovoljna, ali to je kompenzirano ostvarivanjem u prosjeku tri vodikove veze te povoljnim interakcijama između aniona i fenilnih prstenova. S druge strane, poliatomni anion, dihidrogenfosfat, ima više središta koja mogu ostvarivati vodikove veze s cikloheksapeptidom (kisikovi atomi) te su konstante stabilnosti, za sva tri kompleksa koja stvara s ciklopeptidom L, veće u odnosu na monoatomne anione. U prosjeku ostvaruje 4 ili više vodikovih veza, a zbog veličine aniona fenilne skupine se orijentiraju izvan prstena cikloheksapeptida.

**Tablica 4.** Konstante ravnoteže ( $\log \beta$  i  $\log K$ ) nastalih kompleksa u acetonitrilu,  $\vartheta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ; određeno fluorimetrijskim titracijama.

Anion	Peptid:anion	$\log\beta$	$\log K$
$\text{Cl}^-$	1:1	1,69	1,69
$\text{Br}^-$	1:1	2,60	2,60
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	2:1	10,36	5,16
	1:1	5,20	5,20
	1:2	11,13	5,93

**Tablica 5.** Prosječan broj kontakata amidnih protona peptida i kisika oksoaniona u kompleksima stehiometrijskog omjera 1:1, rezultati simulacija molekulske dinamike.

Anion	Prosječan broj amidnih protona
$\text{Cl}^-$	3,49
$\text{Br}^-$	2,88
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	4,64

## § 5. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pruža uvid u interakcije cikloheksapeptida s kationima i anionima, odnose konstanti stabilnosti nastalih kompleksa te njihove strukture. Cikloheksapeptid **L** uspješno veže zemnoalkalijske katione ostvarivanjem koordinacijskih veza preko karbonilnih kisika. Uvid u strukture i stabilnosti nastalih kompleksa dobiveni su provođenjem fluorimetrijskih titracija i simulacija molekulske dinamike. Pokazano je da cikloheksapeptid u reakcijama s perkloratima zemnoalkalijskih metala stvara 3 različita kompleksa. Osnovni kompleks je  $LM^{2+}$  u kojem su cikloheksapeptid i kation u omjeru 1:1, a preostali kompleksi nastaju vezanjem dodatnog liganda ili perkloratnog aniona. Svi istraženi zemnoalkalijski metali pokazuju sličan trend. „Sendvič“ kompleks nastaje na samom početku titracije, pri niskim omjerima kationa i liganda te njegova koncentracija dalje kroz titraciju opada. Pri omjerima cikloheksapeptida i kationa većim od 1:1 nastaje kompleks  $LM^{2+}$  te njegova koncentracija ostaje gotovo konstanta kroz cijelu titraciju, usprkos dominantnom nastanku ternarnog kompleksa. U istraživanju je utvrđeno nastajanje kompleksa  $(LMClO_4)^+$ , što se ne slaže s istraživanjem *Niu i sur.*<sup>13</sup> te dokazuje da je vezanje dodatnog kationa na 1:1 kompleks nepovoljno, već dolazi do vezanja „inertnog“ aniona.

Postoji dobra korelacija između konstanti stabilnosti pojedinih kompleksa određenih iz fluorimetrijskih titracija te samog izgleda i prosječnog broja ostvarenih interakcija između liganda i kationa određenih simulacijama molekulske dinamike. Konstanta stabilnosti za nastanak 1:1 kompleksa najveća je u slučaju vezanja magnezijeva kationa na cikloheksapeptid zbog njihove međudobne kompatibilnosti. Simulacijama molekulske dinamike je pokazano da se magnezijev kation smješta unutar prstena cikloheksapeptida i ostvaruje optimalne interakcije s karbonilnim kisicima. S druge strane, nastanak „sendvič“ kompleksa najpovoljniji je u slučaju stroncijeva i barijeva kationa jer njihova veličina omogućuje povoljno pozicioniranje između dva cikloheksapeptida i ostvarivanje većeg broja koordinacijskih veza, što je u slaganju s konstantama stabilnosti kompleksa. Ternarni kompleks ima značajno manje konstante stabilnosti zbog nepovoljnih entalpijskih uvjeta vezanja aniona.

Konstante stabilnosti nastanka kompleksa cikloheksapeptida i aniona niže su u odnosu na katione, pri čemu su konstante stabilnosti nastanka kompleksa s poliatomnim anionom veće u odnosu na monoatomne anione. Iako je u slučaju vezanja aniona desolvatacija entalpijski

nepovoljna, kompenzirana je stvaranjem vodikovih veza i povoljnim interakcijama s fenilnim prstenovima.

Vežanje bromida pokazalo se povoljnije u odnosu na klorid zbog veće kompatibilnosti veličine prstena cikloheksapeptida i aniona te povoljne interakcije s fenilnim skupinama. Poliatomni anion, dihidrogenfosfat, ima više središta preko kojih ostvaruje vodikove veze s ligandom što rezultira većim konstantama stabilnosti. Anioni se, općenito, smještaju iznad ravnine prstena cikloheksapeptida i u prosjeku interagiraju s 3–4 amidna protona.

Rezultati istraživanja upućuju na to da navedeni cikloheksapeptid ima potencijalnu primjenu kao kationski i anionski transporter. Njegova ciklička struktura omogućuje potrebnu rigidnost i stabilnost, smanjuje entropijski utrošak prilikom vezanja iona te osigurava selektivnost i afinitet za specifične katione i anione. Također, cikloheksapeptid je biokompatibilan, a njegova rigidnost smanjuje vjerojatnost proteolitičke razgradnje, što ga čini sigurnim za upotrebu u biološkim sustavima. Nadalje, potencijalno može biti korišten kao fluorimetrijski senzor iona. Njegov afinitet i visoka osjetljivost prema određenim kationima i anionima omogućuju mu otkrivanje istih u složenim smjesama, što je vrlo značajno u području analitičke kemije.

Daljnjim istraživanjem bilo bi korisno odrediti i ostale termodinamičke parametre kompleksiranja te utvrditi razlog nepouzdanosti titracije s TEACl. Također, u svrhu bolje identifikacije ternarnih kompleksa, trebalo bi provesti simulacije koje kombiniraju metode molekulske mehanike i kvantno-mehaničkih računa.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. J. -M. Lehn, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 89–112.
2. C. Zhang, R. S. Patil, J. L. Atwood, in: *Adv Inorg Chem*, (2018) 247–276.
3. D. A. Nation, J. Reibenspies, A. E. Martell, *Inorg Chem* **35** (1996) 4597–4603.
4. Ž. Car, I. Kodrin, J. Požar, R. Ribić, D. Kovačević, V. P. Peroković, *Tetrahedron* **69** (2013) 8051–8063.
5. N. Basílio, V. Francisco, L. García-Río, *J. Org. Chem.* **77** (2012) 10764–10772.
6. J. C. Song, D. A. Stevens, *Crit Rev Microbiol* **42** (2016) 813–846.
7. X. Wang, M. Lin, D. Xu, D. Lai, L. Zhou, *Molecules* **22** (2017) 2069.
8. M. A. Abdalla, L. J. McGaw, *Molecules* **23** (2018) 2080.
9. International Union Of Pure And Applied Chemistry, *Pure & Appl Chem.* **56** (1984) 595–624.
10. H. Guo, N. B. Kreuzenbeck, S. Otani, M. Garcia-Altares, H.M. Dahse, C. Weigel, D. K. Aanen, C. Hertweck, M. Poulsen, C. Beemelmans, *Org Lett* **18** (2016) 3338–3341.
11. G. Horvat, S. Tarana, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, *J Mol Liq* **340** (2021) 116848.
12. I. Petters, M. Modrušan, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Molecules* **27** (2022) 3918.
13. C.-H. Niu, V. Madison, L. G. Pease, E. R. Blout, *Biopolymers* **17** (1978) 2747–2751.
14. V. Madison, M. Atreyi, C. M. Deber, E. R. Blout, *J Am Chem Soc* **96** (1974) 6725–6734.
15. Y. Marcus, in: *Ionic Interactions in Natural and Synthetic Macromolecules* (2012) str. 1–47.
16. S. Kubik, R. Goddard, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002) 5127–5132.
17. J. Boyle, *Biochemistry and Molecular Biology Education* **33** (2005) str. 71–113.
18. S. Kubik, J. Bitta, R. Goddard, D. Kubik, S. Pohl, *Mater. Sci. Eng. C* **18** (2001) 125–133.
19. J. E. Reiner, A. Balijepalli, J. W. F. Robertson, J. Campbell, J. Suehle, J. J. Kasianowicz, *Chem Rev* **112** (2012) 6431–6451.



20. B. Shen, X. Li, F. Wang, X. Yao, D. Yang, *PLoS One* **7** (2012) e34694.
21. R. N. Das, Y. P. Kumar, O. M. Schütte, C. Steinem, J. Dash, *J Am Chem Soc* **137** (2015) 34–37.
22. V.T. Ivanov, L.B. Senyavina, E.S. Efremov, V. V. Shilin, Yu.A. Ovchinnikov, *Chem Nat Compd* **7** (1971) 325–332.
23. F. Shahangi, A.N. Chermahini, H. Farrokhpour, A. Teimouri, *RSC Adv* **5** (2015) 2305–2317.
24. N. Vidović, G. Horvat, D. Riva, T. Rinkovec, N. Cindro, V. Tomišić, G. Speranza, *Org Lett* **22** (2020) 2129–2134.
25. T. A. Hill, R. J. Lohman, H. N. Hoang, D. S. Nielsen, C. C. G. Scully, W. M. Kok, L. Liu, A.J. Lucke, M. J. Stoermer, C. I. Schroeder, S. Chaousis, B. Colless, P. V. Bernhardt, D. J. Edmonds, D. A. Griffith, C. J. Rotter, R. B. Ruggeri, D. A. Price, S. Liras, D. J. Craik, D. P. Fairlie, *ACS Med Chem Lett* **5** (2014) 1148–1151.
26. D. Skoog, *Fundamental of Analytical Chemistry 9e*, Brooks/Cole, Cengage Learning, 1996, str. 760–773.
27. W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J Am Chem Soc* **118** (1996) 11225–11236.
28. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2004, str. 72–80.
29. F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, str. 380–420, 445–485.
30. G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, M. L. Klein, *Mol Phys* **87** (1996) 1117–1157.
31. S. Nosé, *Mol Phys* **52** (1984) 255–268.
32. W. G. Hoover, *Phys Rev A (Coll Park)* **31** (1985) 1695–1697.
33. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
34. Origin 7.5. OriginLab Corp., Northampton, MA, <http://www.originlab.com>.
35. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J Comput Chem* **26** (2005) 1701–1718.
36. S. Piana, K. Lindorff-Larsen, D. E. Shaw, *Biophys J* **100** (2011) L47–L49.
37. V. Gapsys, S. Michielssens, D. Seeliger, B. L. De Groot, *J Comput Chem* **36** (2015) 348–354.

38. N. Bregović, N. Cindro, L. Frkanec, K. Už Arević, V. Tomišić, *Chemistry - A European Journal* **20** (2014) 1–10.

## § 7. SAŽETAK

### ION-RECEPTORSKA SVOJSTVA CIKLOHEKSAPEPTIDA Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> U ACETONITRILU

Emilija Petrović Hađar

Cikloheksapeptid sastavljen od 4 uzastopna fenilalanina i 2 glicina može vezati katione ostvarivanjem koordinacijskih veza s karbonilnim kisicima, odnosno anione stvaranjem vodikovih veza pomoću amidnih skupina. U otopinama cikloheksapeptida i perklorata zemnoalkalijskih metala nastaju 3 različita kompleksa: „sendvič“ kompleks gdje su cikloheksapeptid i kation u omjeru 2:1, kompleks gdje su cikloheksapeptid i kation u omjeru 1:1 te ternarni kompleks gdje su cikloheksapeptid, kation i perklorat u omjeru 1:1:1. Iako ternarni kompleks ima značajno manje konstante stabilnosti, dokazano je da nastaje u reakcijama kompleksiranja. Kationi u 1:1 kompleksima u prosjeku ostvaruju 4–5 koordinacijskih veza s karbonilnim kisicima što je pokazano simulacijama molekulske dinamike.

Konstante stabilnosti nastanka kompleksa cikloheksapeptida i aniona niže su u odnosu na katione, pri čemu su konstante stabilnosti nastanka kompleksa s poliatomnim anionom veće u odnosu na monoatomne anione. Anioni se smještaju iznad ravnine prstena cikloheksapeptida i u prosjeku interagiraju s 3–4 amidna protona.

Ključne riječi: cikloheksapeptid, fluorimetrija, kompleksiranje, MD simulacije

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

## § 8. SUMMARY

### ION-RECEPTOR PROPERTIES OF CYCLOHEXAPEPTIDE Phe<sub>4</sub>Gly<sub>2</sub> IN ACETONITRILE

Emilija Petrović Hađar

A cyclohexapeptide composed of 4 consecutive phenylalanines and 2 glycines can bind cations via coordination bonds with carbonyl oxygens, and anions through hydrogen bonds with amide groups. Complexation reactions with alkaline earth metals perchlorates yield 3 different complexes: a complex where the cyclohexapeptide and cation are in a 1:1 ratio, a "sandwich" complex where the cyclohexapeptide and cation are in a 2:1 ratio, and a ternary complex where the cyclohexapeptide, cation, and perchlorate are in a 1:1:1 ratio. Although the ternary complex has significantly lower stability constants, it has been shown that it forms in complexation reactions. Cations in 1:1 complexes typically form 4–5 coordination bonds with carbonyl oxygens, as demonstrated by molecular dynamics simulations.

The stability constants for the formation of cyclohexapeptide-anion complexes are lower compared to those with cations. Also the stability constants for complexes with polyatomic anion are higher comparing to those with monoatomic anions. Anions position themselves above the plane of the cyclohexapeptide ring and typically interact with 3–4 amide protons.

Key words: complexation, cyclohexapeptide, fluorimetry, MD simulations

Mentor: Assoc. Prof. Gordan Horvat

## § 9. ZAHVALE

*Hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Gordanu Horvatu na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju za provedbu ovog istraživanja i pisanja rada za Rektorovu nagradu. Veliko hvala za sve savjete i preneseno znanje.*

*Hvala mom neposrednom mentoru Matiji Modrušanu, mag. chem. na velikom strpljenju, podršci i pomoći u labosu i pri obradi podataka, kao i logističkoj pomoći do same predaje rada.*

*Hvala doc. dr. sc. Nikoli Cindri i apsolventu Mirku Duvnjaku na pripravi i pročišćavanju ciklopeptida korištenog u istraživanju.*

*Naposljetku, hvala svim mojim divnim prijateljima, obitelji i dečku, što su mi, svatko na svoj način, bili podrška i motivacija.*

## § 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Emilija Petrović Hađar

Datum rođenja: 8. listopada 2000.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2007.–2015. Osnovna škola Izidora Kršnjavog, Zagreb

2015.–2019. II. gimnazija, Zagreb

2019.–2022. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2022.–danas Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grana Anorganska i fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2022. znanstveno-popularni festival Women in Science

2022. Znanstveni piknik

2022. 4. Dan karijera WorkIn' Science

2023. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2023., 2024. Dan i noć na PMF-u

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. E. Petrović Hađar, N. Jakupec, A. Palčić, *Mechanochemical modification of FAU zeolite with transition metal iodides and its gas adsorption properties*, Solid-State Science & Research, Zagreb, 28–30 June 2023, Book of Abstracts str. 89.

2. E. Petrović Hađar, M. Modrušan, M. Duvnjak, N. Cindro, V. Tomišić, G. Horvat, Peptide Chemistry Day, Zagreb, 2023, Best Poster Prize

3. E. Petrović Hađar, N. Jakupec, L. Posavec, A. Palčić, *Karakterizacija i određivanje svojstava jodidnih kompleksa prijelaznih metala pripremljenih mehanokemijskom modifikacijom zeolita FAU*, 8. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, 2023, Knjiga sažetaka str. 31