



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Matija Modrušan

**ION-RECEPTORSKA SVOJSTVA KRATKIH
LINEARNIH I CIKLIČKIH HOMOPEPTIDA U
ORGANSKIM OTAPALIMA**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Matija Modrušan

**ION-RECEPTOR PROPERTIES OF SHORT LINEAR
AND CYCLIC HOMOPEPTIDES IN ORGANIC
SOLVENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Associate Professor Gordan Horvat, PhD

Zagreb, 2026

Ova doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za fizikalnu kemiju pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordana Horvata.

Doktorska disertacija izrađena je u okviru projekata Hrvatske zaklade za znanost „Koordinacijske reakcije makrocikličkih liganada u otopini“ (MacroSol, IP-2019-04-9560; voditelj projekta: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić), „Termodinamički, spektroskopski i strukturni aspekti koordinacijskih reakcija kaliksarena“ (CalixCORE, IP-2024-05-3012; voditelj projekta: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić) i „Kompleksi ciklopeptida s funkcionalnim ionima“ (CPepFunxIon, IP-2025-02-8238; voditelj projekta: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat)

ZAHVALE

Prije svega hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Gordanu Horvatu na iskazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ove doktorske disertacije. Hvala na svakom razgovoru, pomoći, podršci i na beskrajno mnogo ideja u trenucima kada su se stvari činile neriješivima.

Veliko hvala i voditelju projekta u sklopu kojeg je izrađena ova disertacija prof. dr. sc. Vladislavu Tomišiću na svim savjetima, razgovorima, radovima i na znanju koje ste mi prijenijeli kroz sve ove godine.

Hvala i ostatku MacroSol i CalixCORE tima na druženjima, kemijskim i nekemijskim razgovorima, brainstormanju. Posebno bih se zahvalio Josipu Požaru i Nikoli Bregoviću (mojim prvim „šefovima“) od kojih sam mnogo naučio i još uvijek učim.

Hvala i mojim „*džoker zovi*“ osobama za sintezu Nikoli Cindri i Nikolini Vidović bez kojih bi sintetski dio trajao mnogo mnogo mnogo... duže.

Hvala prof. dr. sc. Vladimiru Stilinoviću na određivanju kristalnih struktura i dr. sc. Almi Ramić na snimljivim MS spektrima SVIH novih spojeva.

Katarini, Marinu te (bivšim) cimerima Mariji i Gregoru hvala vam na podršci, znanstvenim diskusijama, običnim razgovorima, druženju...

Najdražim tehničarkama: Đurđici, Mirjani i Valentini (abecednim redom) neizmerno hvala na svakoj (uspješno) odrađenoj koloni, svakoj odvagi, svakoj jutarnjoj kavi i na svim razgovorima onako *random* na hodniku ili u praktikumu nakon kojih je dan odmah bio bolji.

Hvala i svim članovima ZFK-a te svim suradnicima, kolegama sa i izvan fakulteta, mojim bivšim studenticama (Luciji × 2 i Emiliji) na ugodnoj radnoj atmosferi, dobroj suradnji te pomoći.

Prijateljima „hvala“ na svakom *Kad ćeš doktorirat?* pitanju na koje bih uvijek odgovorio sa *Još malo* iako sam znao da je to samo djelomično točno. Istrijani, Zagorci, Zagrepčanci (od kojih 33 % nije iz Zg-a 🤪) sad vam konačno mogu odgovoriti na to pitanje. Šalu na stranu, hvala vam na podršci i poticaju na sve moguće načine 🍷.

Kozulićima fala za uvijek raširenu kapiju.

Mami, tati i bratu hvala na beskrajnoj i bezuvjetnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i brizi, jednostavno hvala vam za sve...

Petri, mom suputniku i supatniku, najboljem drugu, stanici za punjenje, hvala ti što postojiš...

I ponovo da se rodim ja bi opet bio s tobom... ❤️

Sadržaj

SAŽETAK	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD	1
1.1. Supramolekulska kemija	1
1.2. Cilj rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Molekulsko prepoznavanje ionskih vrsta	4
2.2. Neutralni amidni receptori za vezanje kationa i aniona.....	9
2.3. Linearni i ciklički peptidi i pseudopeptidi	10
2.3.1. Sinteza (pseudo)peptida i ciklo(pseudo)peptida	10
2.3.2. Templatni efekt iona.....	11
2.3.3. Vezanje iona na cikličke (pseudo)peptide	13
2.4. Eksperimentalne i računalne metode proučavanja kompleksiranja iona	24
2.4.1. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)	25
2.4.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)	28
2.4.3. Spektrofluorimetrija	30
2.4.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD).....	31
2.4.5. Simulacije molekulske dinamike (MD).....	32
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Materijali	35
3.1.1. Sinteza	35
3.1.2. Fizikalno-kemijska mjerenja	35
3.2. Metode.....	36
3.2.1. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....	36
3.2.2. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)	36
3.2.3. Spektrofluorimetrija	36
3.2.4. Cirkularni dikroizam (CD).....	37
3.2.5. Simulacije molekulske dinamike (MD simulacije)	37
3.2.6. Određivanje kristalnih struktura.....	38
3.3. Sinteza spojeva	38
3.3.1. Sinteza N-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanin metilnog estera (P1).....	38
3.3.2. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanin metilnog estera (P2)	39

3.3.3. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (P3).....	39
3.3.4. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (P4).....	39
3.3.5. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (P5).....	40
3.3.6. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (L1).....	40
3.3.7. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanina (P6).....	41
3.3.8. Sinteza ciklo-(<i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanina) (C1).....	42
3.3.9. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (P7).....	43
3.3.10. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (L2).....	43
3.3.11. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanina (P8).....	44
3.3.12. Sinteza ciklo-(<i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanila) (C2).....	45
3.3.13. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (P9).....	45
3.3.14. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanin metilnog estera (L3).....	46
3.3.15. Sinteza <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanina (P10).....	47
3.3.16. Sinteza ciklo- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanina (C3).....	48
3.3.17. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P11).....	49
3.3.18. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P12).....	49
3.3.19. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P13).....	49
3.3.20. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P14).....	50
3.3.21. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P15).....	50
3.3.22. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P16).....	51
3.3.23. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina (P17).....	52
3.3.24. Sinteza ciklo-(<i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina) (C4).....	53
3.3.25. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P18).....	53
3.3.26. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P19).....	54
3.3.27. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina (P20).....	54
3.3.28. Sinteza ciklo-(<i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina) (C5).....	55
3.3.29. Sinteza <i>N</i> -benziloksikarbonil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P21).....	55
3.3.30. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucin metilnog estera (P22).....	56
3.3.31. Sinteza <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina (P23).....	57
3.3.32. Sinteza ciklo- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucil- <i>L</i> -leucina (C6).....	58

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	59
4.1. Sinteza linearnih i cikličkih homopeptida.....	59
4.2. Ion-receptorska svojstva linearnih homofenilalaninskih peptida	62
4.2.1. Kompleksi peptida <i>L1, L2 i L3</i> s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu	62
4.2.2. Kompleksi peptida <i>L1, L2 i L3</i> s jednostavnim anorganskim anionima u DMF-u.....	67
4.2.3. Kompleksi peptida <i>L1, L2 i L3</i> sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu.....	73
4.2.4. Kompleksi peptida <i>L1, L2 i L3</i> sa zemnoalkalijskim kationima u DMF-u	77
4.3. Ion-receptorska svojstva homociklofenilalaninskih peptida.....	78
4.3.1. Kompleksi ciklopeptida <i>C1</i> s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu, metanolu i DMSO-u	78
4.3.2. Kompleksi ciklopeptida <i>C2 i C3</i> s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu	82
4.3.3. Kompleksi ciklopeptida <i>C2 i C3</i> s jednostavnim anorganskim anionima u metanolu	88
4.3.4. Kompleksi ciklopeptida <i>C1</i> sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu i metanolu.....	91
4.3.5. Kompleksi ciklopeptida <i>C2 i C3</i> sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu.....	93
4.3.6. Kompleksi ciklopeptida <i>C2 i C3</i> sa zemnoalkalijskim kationima u metanolu.....	101
4.4. Ion-receptorska svojstva homocikloleucinskih peptida.....	104
4.4.1. Kompleksi ciklopeptida <i>C4</i> s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu, metanolu i DMSO-u	104
4.4.2. Kompleksi ciklopeptida <i>C5 i C6</i> s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu	108
4.4.3. Kompleksi ciklopeptida <i>C5 i C6</i> s jednostavnim anorganskim anionima u metanolu	114
4.4.4. Kompleksi ciklopeptida <i>C4</i> sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu i metanolu.....	119
4.4.5. Kompleksi ciklopeptida <i>C5 i C6</i> sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu.....	121
4.4.6. Kompleksi ciklopeptida <i>C5 i C6</i> sa zemnoalkalijskim kationima u metanolu.....	129
§ 5. ZAKLJUČAK	132
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	136
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	138
§ 8. DODATAK	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	CLXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ION-RECEPTORSKA SVOJSTVA KRATKIH LINEARNIH I CIKLIČKIH HOMOPEPTIDA U ORGANSKIM OTAPALIMA

Matija Modrušan

Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a,
10000 Zagreb

U ovom je radu provedena sinteza tri linearna i šest cikličkih leucinskih i fenilalaninskih homopeptida sastavljenih od četiri, pet ili šest aminokiselinskih ostataka. Pripremljenim peptidima proučavan je afinitet prema zemnoalkalijskim kationima i jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu, *N,N*-dimetilformamidu i metanolu pri 25 °C pomoću više fizikalno-kemijskih metoda (izotermna titracijska kalorimetrija, spektroskopija NMR, spektrofluorimetrija, spektroskopija cirkularnog dikroizma). Na temelju rezultata može se zaključiti da vezanje iona na linearne peptide ne ovisi značajno o duljini peptida, dok na afinitet ciklopeptida prema proučavanim ionima utječe veličina peptida i vrsta aminokiselinskog ostatka. Vezanje iona na ciklotetrapeptide nije bilo moguće kvantitativno okarakterizirati zbog njihove male topljivosti i moguće ravnoteže među geometrijskim izomerima u otopini, ali rezultati upućuju na visoki afinitet prema anionima usporediv s ciklopentapeptidnim receptorima. Linearni i ciklički peptidi tvore 1:1 tip kompleksa s većinom proučavanih aniona, dok su kod vezanja hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog aniona detektirani i kompleksi viših stehiometrija. S druge strane, ciklopeptidi s kationima u većini slučajeva tvore komplekse stehiometrije 1:1 i 2:1 (peptid:kation). Afinitet peptida prema većini iona značajno je manji u otapalima koja dobro solvativiraju ione tj. metanolu i *N,N*-dimetilformamidu u odnosu na acetonitril. Uz eksperimentalna, provedena su i računalna istraživanja simulacijama molekulske dinamike. Time su istražene strukturne karakteristike koordinacije iona te su dobivene reprezentativne strukture slobodnih i kompleksnih vrsta u otopini.

(144 + clxviii stranica, 317 slika, 2 sheme, 30 tablica, 150 literaturnih navoda, jezik izvornika:
hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: peptidi/vezanje iona/makrociklički efekt/utjecaj aminokiseline/veličina peptida

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

Rad prihvaćen: 3. lipnja 2026.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Nikola Bregović
2. dr. sc. Leo Frkanec, zn. savj.
3. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ION-RECEPTOR PROPERTIES OF SHORT LINEAR AND CYCLIC HOMOPEPTIDES IN ORGANIC SOLVENTS

Matija Modrušan

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

In this work, synthesis of three linear and six cyclic leucine and phenylalanine homopeptides comprised of four, five, and six amino acid residues was carried out. Affinities of the obtained peptides towards alkaline earth metal cations and simple inorganic anions in acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide, and methanol at 25 °C were investigated by means of several physico-chemical methods (isothermal titration calorimetry, NMR spectroscopy, spectrofluorimetry, and circular dichroism spectroscopy). Based on the results, it can be concluded that the affinity of linear peptides towards ions does not depend significantly on the length of the peptide, whereas the affinity of cyclopeptides towards ions depends on their size and the type of amino acid residue. The binding to the tetrapeptides could not be quantitatively characterized due to their low solubility and possible equilibrium between geometric isomers in solution, but the obtained results suggest high affinity towards anions, comparable to that of the cyclopentapeptide receptors. Linear and cyclic peptides form 1:1 type of complexes with most of studied anions, with the exception of hydrogen sulfate and dihydrogen phosphate for which higher stoichiometry complexes have also been detected. On the other hand, cyclopeptides form 1:1 and 2:1 (peptide:cation) complexes with most cations. The affinity of peptides towards most of the ions is significantly lower in solvents with good ion solvation properties, namely methanol and *N,N*-dimethylformamide compared to acetonitrile. In addition to the experimental studies, computational approach was also applied using molecular dynamics simulations. In that way, the structural characteristics of the ion coordination were obtained along with the representative structures of the free and complexed species in solution.

(144 + clxviii pages, 317 figures, 30 tables, 2 schemes, 150 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: peptides/ion binding/macrocyclic effect/amino acid type impact/peptide size

Supervisor: Associate Professor Gordan Horvat, PhD

Thesis accepted: June 3, 2026

Reviewers:

Associate Professor Nikola Bregović, PhD

Scientific Adviser Leo Frkanec, PhD

Associate Professor Aleksandra Maršavelski, PhD

§ 1. UVOD

1.1. Supramolekulska kemija

Supramolekulska kemija je grana kemije koja proučava nekovalentno međudjelovanje većih molekula receptora, odnosno „domaćina“, i manjih molekula „gosta“. U posljednjih 50 godina dolazi do naglog razvoja moderne supramolekulske kemije, a spojevi razvijeni u tom području koriste se kao biomimetici¹, sustavi za dostavu lijekova² i/ili prijenos preko stanične membrane^{3,4}, kao senzori⁵⁻⁹, katalizatori^{10,11} i dr.

Supramolekulski receptori najčešće su makrociklički spojevi jasno definiranih (uređenih) struktura koji interagiraju s gostima putem nekovalentnih interakcija. Takva implementacija makrocikličkog efekta uzrokuje veliku selektivnost prema određenim gostima u odnosu na druge. Kroz desetljeća istraživanja ovakvih sustava razvijeni su receptori za neutralne ili nabijene molekule gosta. Među najpoznatijim receptorima kationa su krunasti eteri¹², kriptandi¹³ i kaliksareni¹⁴, anionskih vrsta poliamini, amidi, uree i tiouree¹⁵⁻¹⁷, a neutralnih vrsta ciklodekstrini^{18,19} i kukurbiturili.²⁰ Dodatnom funkcionalizacijom receptora skupinama koje interagiraju s ionima suprotnog naboja moguće je prirediti spojeve koji (dobro) vežu ionske parove.²¹ Proučavanjem termodinamike vezanja gosta na receptor, odnosno određivanjem konstante stabilnosti kompleksa i ostalih standardnih reakcijskih veličina kompleksiranja, može se dobiti uvid u utjecaj značajki bitnih za nastanak stabilnih kompleksa. Pokazalo se da su najvažniji faktori vezani uz funkcijske skupine receptora i uz vrstu otapala (solvatacija reaktanata i produkata). Poznavanjem tih utjecaja moguće je daljnjom funkcionalizacijom receptora u svrhu uvođenja novih interagirajućih skupina ili promjene veličine veznog mjesta te korištenjem prikladnih otapala povećati stabilnost nastalih kompleksa ili selektivnost prema pojedinim vrstama gosta. Stoga je termodinamička karakterizacija vrlo bitan dio istraživanja procesa u supramolekulske kemiji.

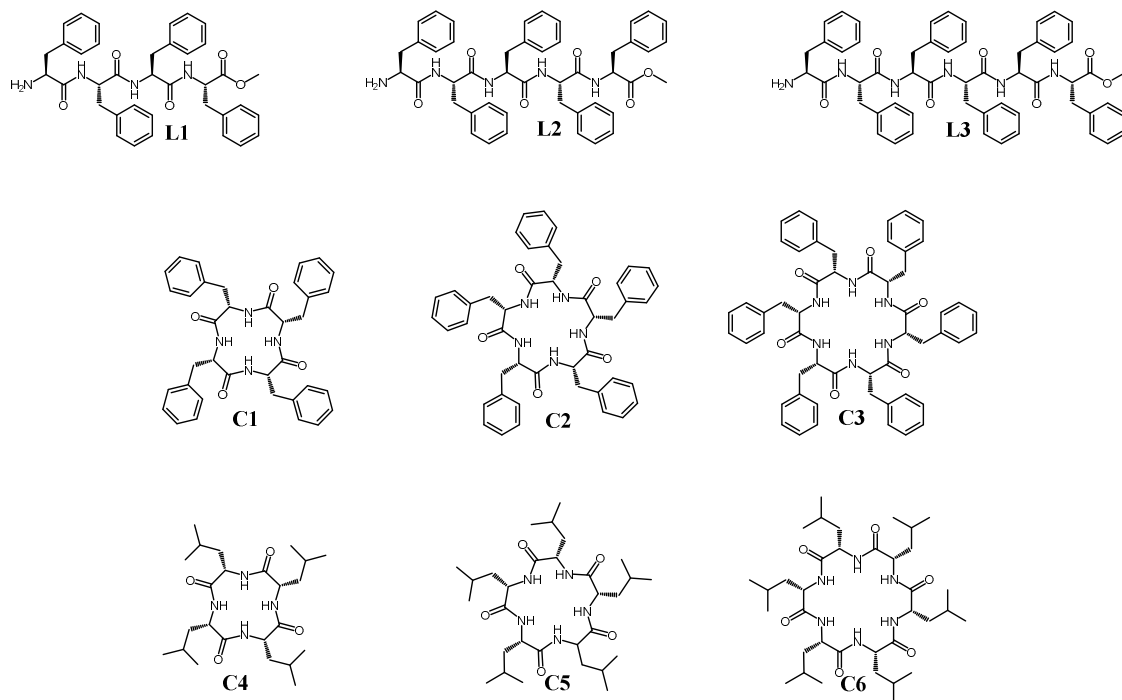
Zanimljiva klasa supramolekulskih spojeva koja se u posljednje vrijeme sve više istražuje su ciklo(pseudo)peptidi. Vezno mjesto koje tvore amidne skupine u okosnici ciklopeptida može poslužiti u vezanju aniona, ali i kationa. Također, zbog velike raznolikosti aminokiselinskih bočnih ogranaka (duljina, ali i funkcionalne skupine), postoji mogućnost da se ioni dodatno stabiliziraju interakcijama s bočnim ograncima aminokiselinskih ostataka. To je naročito izraženo ako bočni ogranci sadrže permanentni suprotni naboj, elektron-donorske skupine ili

donore vodikove veze. Uz navedeno, nepolarni bočni lanci mogu sudjelovati u procesu desolvatacije iona čime direktno utječu na stabilnost nastalih kompleksa. Ciklopeptidi, osim što posjeduju veću bioraspoloživost u usporedbi s linearnim analogima, također posjeduju i veću otpornost prema enzimskoj hidrolizi što ih čini dobrim kandidatima za antibiotike te za transmembranske transportere iona.

1.2. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je sintetizirati linearne i cikličke homopeptide koji se razlikuju po broju i vrsti aminokiselinskih ostataka (slika 1) i istražiti njihov afinitet prema jednostavnim anorganskim anionima (Cl^- , Br^- , I^- , HSO_4^- , H_2PO_4^- , NO_3^- , SCN^-) i zemnoalkalijskim kationima. Vezanje navedenih iona na sintetizirane peptide praćeno je ^1H NMR spektroskopijom, spektrofluorimetrijom, izotermnom titracijskom kalorimetrijom, cirkularnim dikroizmom i računalnim simulacijama molekulske dinamike. Rezultati dobiveni proučavanjem vezanja iona na linearne peptide pružili su uvid u templatni efekt tih iona na reakciju makrociklizacije u kojoj iz linearnih prekursora nastaju ciklički peptidi. Također, proučen je utjecaj duljine lanca na konstantu stabilnosti kompleksa peptid-ion, ali i na ostale termodinamičke parametre kompleksiranja (reakcijska Gibbsova energija, entalpija i entropija). Eksperimenti su provedeni u acetonitrilu, otapalu koje slabo solvatira slobodne ione što omogućava nastanak stabilnih kompleksa s linearnim peptidima. Kao drugo otapalo je korišten dimetilformamid, medij u kojemu se provodi makrociklizacija peptida. Radi toga, očekuje se da će se rezultati ovog istraživanja moći iskoristiti u svrhu povećanja iskorištenja reakcije makrociklizacije.

S druge strane, istraživanje ionskog afiniteta ciklopeptida različitih veličina i vrste aminokiselinskih ostataka daje uvid u utjecaj tih strukturno-kemijskih parametara na termodinamičke veličine kompleksiranja. Ti eksperimenti su također provedeni u acetonitrilu, zbog prije navedenih razloga, te u metanolu kao polarnijem i protičnom otapalu sličnom vodi u kojoj ciklopeptidi nisu dovoljno topljivi.



Slika 1. Molekulske strukture istraživanih kratkih linearnih i cikličkih homopeptida.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Molekulsko prepoznavanje ionskih vrsta

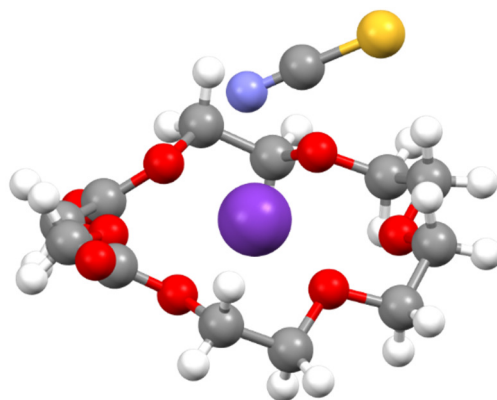
Sinteza prvog krunastog etera 1967. godine smatra se početkom supramolekulske kemije.²² U tom je istraživanju Pedersen pokazao da krunasti eteri posjeduju mogućnost vezanja metalnih kationa. Također, iznio je svoju pretpostavku da krunasti eteri s vezanim kationima ostvaruju ion-dipol interakcije preko svojih eterskih kisika. Nedugo zatim objavljene su kristalne strukture derivata 18-kruna-6 etera s raznim kationima čime je potvrđena njegova pretpostavka o veznom mjestu krunastih etera.^{23,24} Nadalje, rezultati su upućivali da kationski kompleksi međusobno nisu jednako stabilni iz čega je pretpostavljeno da odnos veličine receptora i iona igra važnu ulogu u stabilnosti kompleksa. Upravo je to dovelo do naglog razvoja istraživanja kationskih receptora u svrhu poboljšanja njihove selektivnosti, bilo sintezom novih vrsta receptora ili modifikacijom postojećih krunastih etera uvođenjem dodatnih funkcijskih skupina koje će ostvarivati interakciju s kationima.

Razvoj supramolekulskih anionskih receptora započinje 1968. godine otkrićem diazabiciklo spoja koji veže kloridni anion u svoju šupljinu stvaranjem vodikovih veza između spoja i aniona.^{25,26} Iako je vremenska razlika između sinteze prvog krunastog etera i ovog spoja samo nekoliko mjeseci, razvoj anionskih receptora je značajno sporiji od kationskih. Uzrok tome su različita strukturalna i kemijska svojstva kationa i aniona. Naime, kationi su manji i njihov se oblik obično može aproksimirati kao pozitivno nabijena „kuglica“ dok su anioni puno veći i dolaze u raznim oblicima, stoga je sinteza selektivnog receptora s veznim mjestom prilagođenom veličini i obliku aniona kompliciranija. Nadalje, prilično snažna solvatacija aniona u polarnim (i protičnim) otapalima otežava proces desolvatacije gosta do koje mora doći prilikom vezanja na receptor, a to se pak odražava na stabilnost nastalih kompleksa.

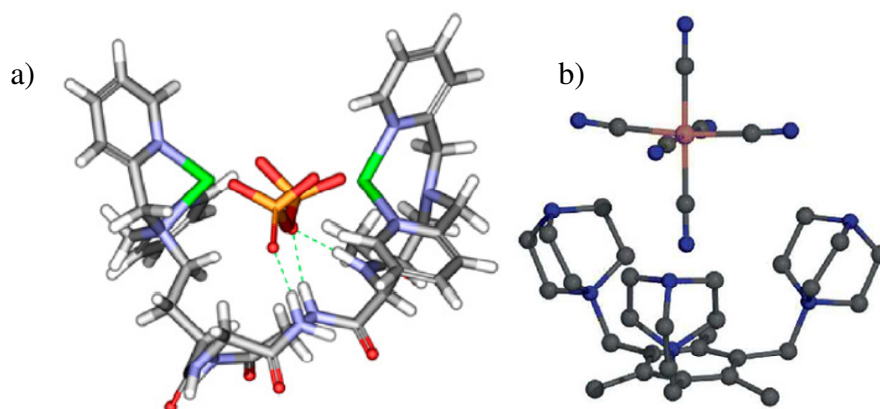
Vežanje iona na supramolekulske receptore najčešće je uvjetovano prisutnošću dijela receptora čiji je (parcijalni) naboj komplementaran naboju iona, što se postiže uvođenjem odgovarajućih funkcionalnih skupina na receptor. Kationi posjeduju pozitivan naboj, stoga funkcionalne skupine receptora koje dolaze u interakciju s njima moraju posjedovati permanentni negativni naboj ili biti parcijalno negativne, što se najčešće ostvaruje uvođenjem skupina bogatim π -elektronima ili koje posjeduju slobodne elektronske parove. S druge strane, vežanje aniona ostvaruje se najčešće vodikovim vezama, iako postoje i primjeri vezanja aniona

na molekule koje imaju elektron-deficijentne skupine ili koje mogu ostvarivati halogenske veze. Vidljivo je da postoji veliki broj interakcija kojima supramolekulski receptori mogu vezati goste, stoga će u ovome radu biti spomenute one najzastupljenije u dizajnu receptora.

Ion-ion interakcije su jedne od jačih interakcija u kemiji općenito. Energija tih interakcija je u rasponu od 100 – 350 kJ mol⁻¹ i usporediva je s energijom kovalentne veze. Supramolekulska ion-ion interakcija u čvrstom stanju opažena je prilikom kristalizacije 18-kruna-6 etera s kalijevim tiocijanatom.²⁷ U tom su istraživanju Larson i sur. pokazali da je tiocijanatni ion u direktnoj interakciji s kalijevim ionom vezanim na krunasti eter (slika 2). Do nastajanja ovakvih kompleksa teže dolazi u protičnim otapalima, ponajviše zbog snažne solvatacije iona. Ipak, jedan od primjera opisan je u istraživanju provedenim u grupi K. A. Jolliffe u sklopu kojeg su proučavani sintetski ciklopeptidni receptori aniona koji sadržavaju jednu ili više dipikolilaminskih skupina na koje je vezan iona cinka.²⁸ Takvi receptori snažno vežu ATP, ADP i pirofosfatni ion u otopini pomoću prethodno kompleksiranog iona cinka (slika 3 a). Vezanje je toliko jako da čak i u kompetitivnom otapalu kao što je voda receptori selektivno vežu pirofosfatni anion s konstantom stabilnosti većom od 10⁹. Postoje supramolekulski sustavi kod kojih su prisutne ion-ion interakcije koje se ne ostvaruju direktnim kontaktom s vezanim anionom, primjerice u slučaju kada receptor sadrži protonirane amino skupine ili kvaterne dušikove atome. Garratt i sur. su u svom radu sintetizirali receptor koji sadrži tri 1,4-diazabiciklo[2,2,2]oktan (DABCO) skupine vezane na benzenski prsten što dovodi do nastanka kvaternog dušikovog atoma s permanentnim pozitivnim nabojem. Pokazano je da takav receptor može vezati složene anione kao što su benzen-1,3-dikarboksilat, benzen-1,2,4,5-tetrakarboksilat i Fe(CN)₆³⁻, pri čemu je struktura kompleksa s heksacijanoferatnim(III) anionom određena i difrakcijom na jediničnom kristalu (slika 3 b).²⁹



Slika 2. Kristalna struktura kompleksa 18-kruna-6 etera s kalijevim tiocijanatom.²⁷



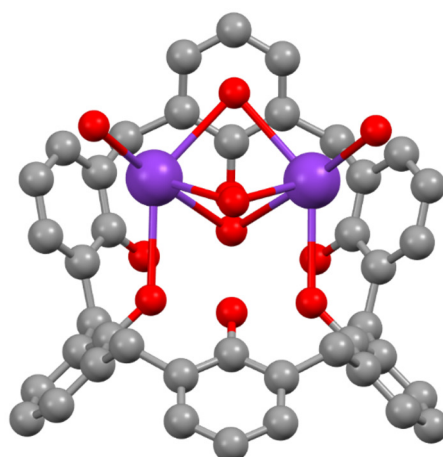
Slika 3. a) DFT-om optimirana struktura kompleksa pirofosfatnog aniona i ciklopeptidnog receptora koji sadrži katione cinka.²⁸ b) Kristalna struktura anionskog receptora s heksacijanoferatnim(III) anionom.²⁹

Ion-dipol interakcije su najčešći tip interakcije u supramolekulskim sustavima, a njihova energija kreće se oko $50 - 200 \text{ kJ mol}^{-1}$. Najčešći su tip interakcija, primarno zbog mnogobrojnih funkcijskih skupina u organskim spojevima koje posjeduju izraženi dipolni moment i još većeg broja načina na koje se takve funkcijske skupine mogu kombinirati tijekom dizajna ionskog receptora. Neutralni kationski receptori interagiraju sa svojim gostima preko nepodijeljenog elektronskog para koji se najčešće nalazi na atomima kisika (eteri, esteri, ketoni, amidi, ureidi), sumpora (tioeteri, tioesteri, tioketoni, tioamidi, tioureidi) i dušika (amini, razni *N*-heterociklički spojevi). Interakcije s kationima mogu se ostvariti i preko drugih atoma, poput fosforovih u fosfinima³⁰ ili ugljikovih u karbenima.³¹ Međutim, zbog slabijih interakcija koje takvi receptori tvore s gostima tek su odnedavno počeli biti u fokusu istraživanja. Bitna vrsta ion-dipol interakcija su i vodikove veze koje predstavljaju primaran način povezivanja aniona i njihovih receptora, no zbog važnosti i specifičnosti takvih interakcija o njima će detaljnije biti riječi u sljedećem odlomku. Stabilnost kompleksa receptora i kationa, između ostalog, ovisi i o energijama ion-dipol interakcija, odnosno o funkcijskoj skupini koja sadrži atom s izraženom elektronskom gustoćom. U pravilu, doprinos pojedine interakcije s kationom standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja pozitivno je koreliran s bazičnim svojstvima skupine. Primjerice, za skupine u kojima je atom kisika elektron-donirajući atom stabilnost kompleksa opada u nizu amidi > esteri > ketoni.¹⁴ Pri tome treba imati na umu da su primarni i sekundarni amidi manje bazični od tercijskih, a osim toga su i donori i akceptor vodikovih

veza. Stoga postoji mogućnost stvaranja interakcija s drugim skupinama u receptoru čime se konstanta stabilnosti kompleksa može smanjiti za nekoliko redova veličina.^{32,33}

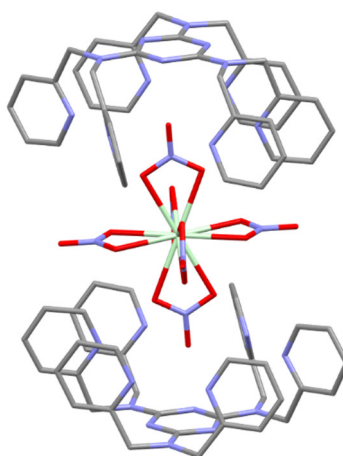
Vodikove veze smatraju se jednom od najbitnijih nekovalentnih interakcija u biologiji i kemiji. Iako se po jakosti mogu svrstati u slabe dipol-dipol interakcije ($4 - 60 \text{ kJ mol}^{-1}$) one su odgovorne za mnoge fenomene, primjerice za tekuće agregatno stanje vode pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi, za oblik DNA kao dvostruke zavojnice, za pravilno smatanje proteina i njihovu funkciju te za još mnogo drugih pojava. Vodikove veze u supramolekulskim sustavima se gotovo isključivo koriste u svrhu vezanja anionskih vrsta, pri čemu su funkcijske skupine koje sudjeluju kao donori vodikove veze najčešće amini, sekundarni (tio)amidi, (tio)uree. Novija istraživanja u području ionskih receptora uključuju i sintezu receptora ionskih parova gdje se receptor koji posjeduje vezno mjesto za katione često dodatno funkcionalizira skupinama koje mogu djelovati kao donori vodikove veze.^{34,35}

Kation- π interakcije jedne su od rjeđih interakcija kojima supramolekulski receptori vežu pozitivno nabijene goste. One se ubrajaju u slabe interakcije, no afinitet receptora koji posjeduje više funkcionalnih skupina s delokaliziranim π -elektronima može biti značajan. Jednu klasu takvih receptora čine kaliksareni čiji negativno nabijeni fenolni π -sustav može potaknuti inkluziju kationa u šupljinu na gornjem obodu. Primjer takvog kompleksa opisan je u radu Murayame i Aokija³⁶ u kojemu su priređeni kristali kaliks[6]arena uz dodatak KOH. U dobivenoj strukturi kompleksa dva iona kalija premoštena su molekulama vode i/ili metanola, što je stabilizirano fenolnim kisicima i π -interakcijama s fenolnim skupinama (slika 4).



Slika 4. Kristalna struktura kompleksa kaliks[6]arena i kalijevih kationa opisana u radu Murayame i Aokija.³⁶

Interakcije između kationa i π -elektrona već su desetljećima predmet znanstvenih istraživanja. U znanstvenom svijetu nije bilo upitno postojanje takvih interakcija s obzirom na to da nastaju privlačnim silama između pozitivno nabijenog kationa i područja povećane elektronske gustoće π -sustava. Ono što jest bilo upitno je postojanje sličnih interakcija s anionima, odnosno anion- π interakcija koje su početkom 1990-ih predviđene teorijskim istraživanjima. Takva interakcija je nakon toga eksperimentalno potvrđena te je prihvaćena u znanosti, a nastaje interakcijom između aniona i elektron-deficijentnog π -sustava, primjerice u molekuli koja sadrži jednu ili više elektron-odvlačećih skupina. S obzirom na to da je riječ o vrlo slabim interakcijama, kompleksiranje aniona često je potpomognuto ion-dipol, dipol-dipol ili vodikovim vezama koje dodatno nastaju u kompleksima. Primjer takvog kompleksa objavljen je u radu Bettencourt-Dias i sur.³⁷, a odgovarajuća je struktura prikazana na slici 5. Uočeno je da anion $[\text{Nd}(\text{NO}_3)_6]^{3-}$ ostvaruje interakciju s π -sustavom dvaju triazina preko dva nasuprotna (aksijalna) nitratna atoma kisika. Te su interakcije dodatno stabilizirane vodikovim vezama između protoniranih piridinskih skupina i kisikovih atoma tih istih nitratnih skupina.

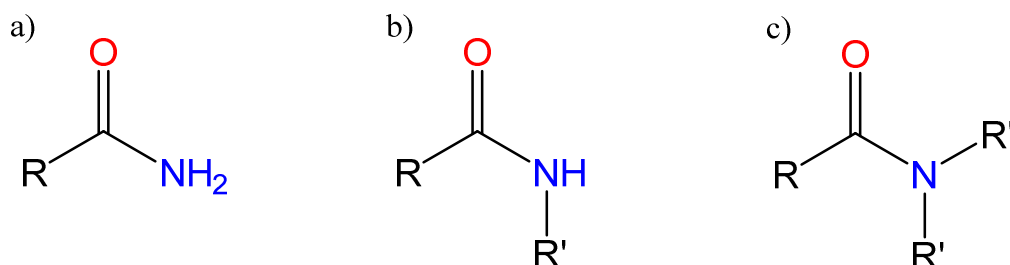


Slika 5. Kristalna struktura 1,3,5-tris(dipikolilamin)-triazina s anionom $[\text{Nd}(\text{NO}_3)_6]^{3-}$.³⁷

2.2. Neutralni amidni receptori za vezanje kationa i aniona

Prilikom dizajna selektivnih receptora za ione, ali i općenito za molekule, poželjno je da receptor ne mijenja svoju strukturu zbog održavanja sposobnosti interakcije s gostima. Primjerice, u slučaju neutralnog receptora za katione koji posjeduje skupine u veznom mjestu koje sudjeluju u kiselo-baznim ravnotežama, protonirani oblik receptora će slabije ili nepovoljno interagirati s kationima dok će deprotonirani oblik ostvarivati jake elektrostatske interakcije. Iako je takvo svojstvo možda poželjno kod receptora čija je svrha transport molekula, svakako nije poželjno za one koji služe kao detektori određenih vrsta. Stoga se, u posljednje vrijeme mnogo više proučavaju neutralni receptori u kojima kiselo-bazne ravnoteže nisu moguće ili je bitno smanjena vjerojatnost njihove pojave ili pojave sličnih promjena u strukturi.

Ion-kompleksacijska svojstva amidnih receptora znatno ovise tipu amida kojim je receptor funkcionaliziran. Tip amida definiran je prema broju supstituenata vezanih na amidni dušik te može biti primaran, sekundaran ili tercijaran (slika 6). Primarni i sekundarni amidi mogu poslužiti u vezanju aniona vodikovim vezama zbog svojih proton-donorskih svojstava, pri čemu supramolekulski anionski receptori u većini slučajeva sadrže sekundarne amide. S druge strane, sva tri tipa amida sadrže elektron-donorsku skupinu koja omogućuje interakciju s kationima, no jačina tih interakcija znatno ovisi o tipu amida u veznom mjestu. Primjerice, afinitet sekundarno-amidnih derivata kaliksarena prema kationima znatno je manji nego u slučaju onih s tercijarnim amidima. Razlike u konstantama stabilnosti, koje sežu i do nekoliko redova veličine, posljedica su manje bazičnosti karbonilnog kisika u sekundarnom amidu, kao i mogućnosti stvaranja intramolekulskih vodikovih veza između tih skupina.^{32,33,38,39}



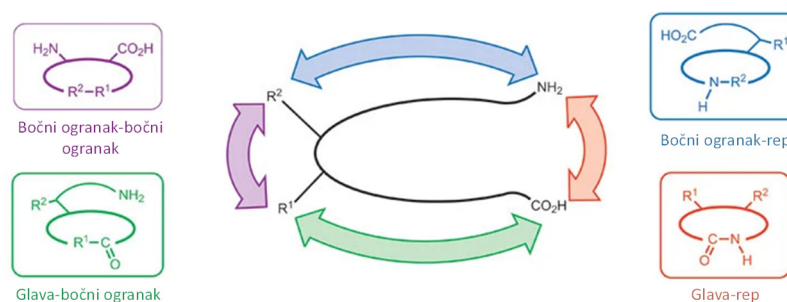
Slika 6. Struktura a) primarnog amida, b) sekundarnog amida, c) tercijarnog amida.

2.3. Linearni i ciklički peptidi i pseudopeptidi

2.3.1. Sinteza (pseudo)peptida i ciklo(pseudo)peptida

Sinteza linearnih peptida konceptualno je jednostavna te se najčešće temelji na produljenju peptidnog lanca reakcijama kondenzacije između N- i C-zaštićenih peptida/aminokiselina uz naknadno uklanjanje zaštitnih skupina s krajeva linearnog peptida željene duljine. Obično se lanac peptida produljuje za jednu aminokiselinu, no peptid određene duljine može se dobiti i drugim kombinacijama. Primjerice, tetrapeptid se može sintetizirati reakcijom „2+2“, odnosno *coupling* reakcijom između N- i C-zaštićenog dipeptida. Produljenje lanca za jednu aminokiselinu je ipak najčešći pristup zbog izbjegavanja epimerizacije koja je u tom slučaju rjeđa. Što se tiče medija u kojem se provodi, linearni peptidi mogu se dobiti reakcijom u otopini ili sintezom na čvrstom nosaču (*solid phase synthesis*), što podrazumijeva uzastopno provođenje reakcijskih koraka bez izolacije odgovarajućih produkata, pri čemu čvrsti nosač dolazi u obliku smole. Sinteza na čvrstom nosaču je izvedbom jednostavnija jer pripada skupini sinteza „u jednom loncu“ (engl. *one pot synthesis*) te je popraćena visokim ukupnim iskorištenjem. Nedostatak je mala količina linearnog peptida koju je moguće sintetizirati u jednom procesu (oko 50 mg), dok se otopinskom sintezom mogu dobiti višestruko veće količine, nauštrb iskorištenja.

Ciklopeptidi se dobivaju reakcijom makrociklizacije na linearnom prekursoru s nezaštićenim krajevima. Postoje četiri načina na koje se iz linearnog prekursora može dobiti ciklička struktura (slika 7).⁴⁰ Najučestaliji način ciklizacije peptida je tzv. glava-rep ciklizacija u kojoj dolazi do reakcije između slobodnih N- i C-krajeva peptida. Osim što se na taj način dobiva struktura u kojoj je ciklički dio sastavljen samo od peptidne okosnice, što osigurava simetričnost tog dijela ciklopeptida, ovakva ciklizacija ostavlja bočne ogranke slobodnima za interakciju s metama ili dodatnu funkcionalizaciju u cilju poboljšanja interakcije. Nadalje, glava-rep ciklizacijom N- i C-krajevi peptida više nisu slobodni pa je ciklopeptid manje podložan enzimskoj razgradnji, što je korisno kada se ciklopeptid koristi u medicinske svrhe.



Slika 7. Načini makrociklizacije linearnih peptida. Prilagođeno prema ref. 40.

Glava-rep ciklizacija često rezultira vrlo malim iskorištenjima zbog neželjenih reakcija poput oligomerizacije i epimerizacije do kojih dolazi zbog reaktivnosti slobodnih N- i C-krajeva. Jedno rješenje je provođenje reakcije u vrlo razrijeđenim uvjetima ($< 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) uz uporabu velike količine otapala, što se posljednjih godina izbjegava jer nije ekološki prihvatljivo. Drugo rješenje je prije spomenuta reakcija na čvrstom nosaču u kojoj se peptidi „usidre“ na smolu pomoću bočnih ogranaka pri čemu dolazi do pseudorazrijeđenih uvjeta jer je mala vjerojatnost da se dva peptida nađu jedan blizu drugoga. Time se onemogućava, odnosno otežava intramolekulska reakcija. Iako ima više nedostataka, ciklizacija se provodi češće u otopini nego na krutom nosaču, ponajviše zbog maksimalne količine produkta koje je moguće dobiti. Nadalje, iskorištenje makrociklizacije može se povećati uvođenjem skupina koje induciraju reorganizaciju peptida, poput aminokiselina suprotne optičke rotacije, korištenjem prolina ili neke druge aminokiseline koja zbog steričkih razloga može pospješiti makrociklizaciju što dovodi do stvaranja pseudopeptida.^{40,41} Duljina peptida također igra značajnu ulogu u iskorištenju makrociklizacije peptidnog lanca pri čemu dulji peptidi lakše tvore intramolekulske vodikove veze pa samim time i pospješuju ciklizaciju.⁴² U novije vrijeme istražuju se drugi načini povećanja iskorištenja u reakciji makrociklizacije među koje spada pristup temeljen na templatnom efektu iona i mehanokemijska sinteza ciklopeptida.⁴³

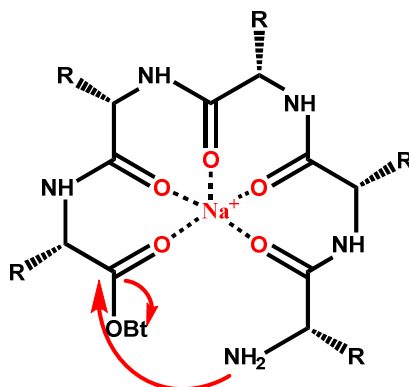
2.3.2. *Templatni efekt iona*

Prema definiciji koju je postavio Busch⁴⁴ „templatne molekule su one molekule koje organiziraju skup atoma, s obzirom na jedan ili više geometrijskih mjesta, kako bi se postiglo određeno povezivanje atoma. Templati se razlikuju od reagensa po tome što utječu na makroskopsku geometriju reakcije, a ne na intrinzičnu kemiju.“ Templati se dijele na termodinamičke i kinetičke.⁴⁵ Termodinamički templati pomiču ravnotežu reakcije vezanjem na jedan od produkata reakcije što usmjerava reakciju prema nastajanju tog produkta. S druge strane, kinetički templati organiziraju reaktivne skupine reaktanta s obzirom na orijentaciju i geometriju pritom olakšavajući nastajanje produkta. Templatni efekt iona pospješuje sintezu supramolekulskih spojeva i/ili formiranje veznog mjesta gosta te sprječava neželjene intra i intermolekulske reakcije.

Iako nije vezano uz sintezu ciklopeptidnih receptora, klasičan primjer templatnog efekta kationa na sintezu makrocikličkog receptora je sinteza krunastih etera. Pedersen i sur. pokazali su da iskorištenje reakcije nastajanja prstena dibenzo-18-kruna-6 etera ovisi o kationu koji je u

obliku hidroksida dodan kao reagens. Veća iskorištenja opažena su kada se u reakciju dodaju natrijev ili kalijev hidroksid u usporedbi s litijevim ili tetrabutilamonijevim hidroksidom. Opaženi efekt objasnili su time da dolazi do jačeg vezanja natrijeva i kalijeva kationa na linerani polieter pri čemu dolazi do povoljnijeg približavanja reaktivnih krajeva. Ovo objašnjenje vrlo je zanimljivo jer povezuje stabilnost kompleksa prekursor-kation i jačinu templatnog efekta kationa. Dodatna potvrda templatnog efekta je i to što u slučaju ostalih manjih i većih poliestera dolazi do smanjenja iskorištenja zbog nekompatibilnosti veličine kationa i prstena koji nastaje reorganizacijom poliestera oko kationa.⁴⁶

Utjecaj templatnih iona na makrociklizaciju peptida proučavali su Liu i suradnici.⁴⁷ Proučavanjem utjecaja kloridnih soli metala na iskorištenje makrociklizacije zaključili su da ioni Na^+ i Cs^+ promoviraju makrociklizaciju te su pretpostavili mehanizam u kojem se linearni peptid karbonilnim skupinama veže na kation (slika 8).

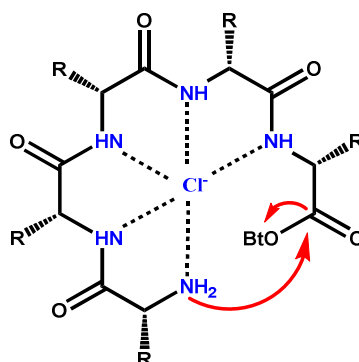


Slika 8. Pretpostavljeni mehanizam templatnog efekta kationa na makrociklizaciju peptida.

Prilagođeno prema ref. 47.

Zbog otprije poznate sposobnosti ciklopeptidnih receptora da vežu anionske vrste Vidović i suradnici⁴⁸ proveli su istraživanje o utjecaju klorida na iskorištenje glava-rep makrociklizacije peptidnog lanca. Na primjeru nekoliko linearnih peptida pokazali su da je korištenjem TEACl soli kao templatnog reagensa iskorištenje mnogo veće nego uz korištenje LiCl, NaCl, NaTPB ili NaClO_4 . Također, ITC i ^1H NMR titracijama pokazali su da se litijev, natrijev i kalijev kation ne vežu na istraživane linearne peptide, već da kloridni ion tvori relativno stabilne komplekse s linearnim peptidima ($\log K \approx 2,0$). Autori su predložili mehanizam u kojem se anion veže na NH skupinu peptidne okosnice, što dovodi do reorganizacije peptida u pseudocikličku strukturu (slika 9). Zaključeno je da templatni efekt koji su opazili Liu i suradnici proizlazi iz korištenja

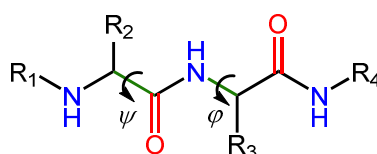
soli alkalijskih klorida kao izvora kloridnog aniona koji je zapravo templat u koraku makrociklizacije.



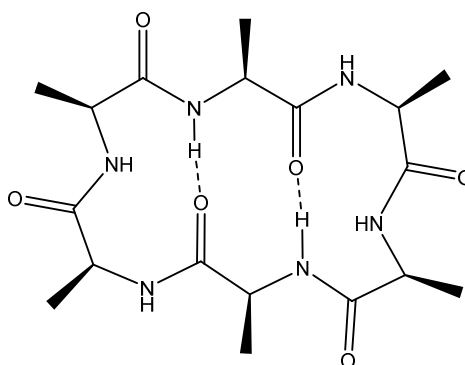
Slika 9. Pretpostavljeni mehanizam templatnog efekta aniona na preorganizaciju lanca u reakciji makrociklizacije peptida. Prilagođeno prema ref. 48.

2.3.3. Vežanje iona na cikličke (pseudo)peptide

Makrocikličke se molekule često opisuju kao spojevi rigidnih konformacija. To je točno za vezno mjesto mnogih vrsta receptora, no ne i za ciklopeptide. Zbog slobodne rotacije oko dva torzijska kuta φ i ψ (slika 10) te sposobnosti amidne skupine da djeluje kao donor i akceptor vodikove veze, peptidna okosnica može ostvarivati inter-, ali i intramolekulske vodikove veze, kao i interakcije s otapalom. Strukturna istraživanja ciklopeptidnih receptora započeta su 60-ih godina prošlog stoljeća u grupama Blouta^{49–54}, Kopplea^{55–59} i Ivanova^{60–62} uz korištenje spektroskopskih metoda poput ¹H i ¹³C NMR te CD-a. Analizom konstanti sprege amidnih protona iz protonskog NMR spektra dobivene su vrijednosti torzijskog kuta φ ,^{63,64} a proučavanjem temperaturne ovisnosti njihovih kemijskih pomaka identificirani su protoni koji su u interakciji s otapalom, a koji stvaraju intra-, odnosno intermolekulske vodikove veze. Proučavani cikloheksapeptidi u DMSO-u poprimaju konformaciju sličnu onoj prikazanoj na slici 11 s dvije antiparalelne intramolekulske vodikove veze, dok su ostale amidne skupine u interakciji s otapalom.^{55,56,58,60}

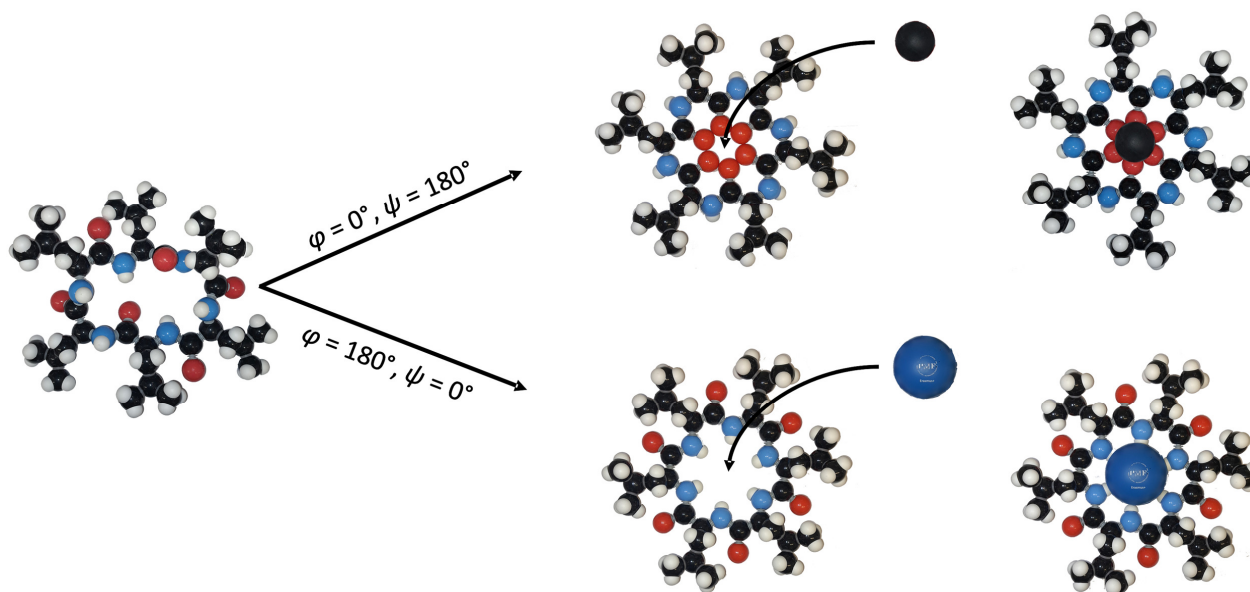


Slika 10. Peptidna veza s označenim jednostrukim vezama okosnice oko kojih je moguća rotacija.



Slika 11. Općenita konformacija cikloheksapeptida u DMSO-u na kojoj su naznačene intramolekulske veze peptida. (Prilagođeno prema ref. 58)

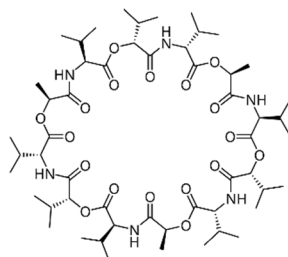
Navedene interakcije omogućavaju postojanje raznih konformacija peptidne okosnice stabiliziranih intramolekulskim vodikovim vezama. Stoga, prilikom vezanja iona na ciklopeptid mora doći do značajnih konformacijskih promjena i kidanja postojećih interakcija, pri čemu su doprinosi tih procesa u ukupnoj entalpiji i entropiji kompleksiranja nepovoljni (slika 12).



Slika 12. Primjer konformacijskih promjena ciklopeptidnog prstena prilikom vezanja kationa (gore) i aniona (dolje).

Potencijal ciklopeptida kao kationskih receptora prvotno je uočen u slučaju valinomicina, dodekadepsipectidu izoliranom 1955. godine čija je struktura prikazana na slici 13. Ovaj se ciklopeptid koristi kao antibiotik još od 60-ih godina prošlog stoljeća, a zbog svoje selektivnosti

prema kalijevom kationu i za transmembranski prijenos tih iona. Konstanta stabilnosti s K^+ ionom je u nekim otapalima za više od četiri reda veličine veća nego s ionom Na^+ .⁶⁵



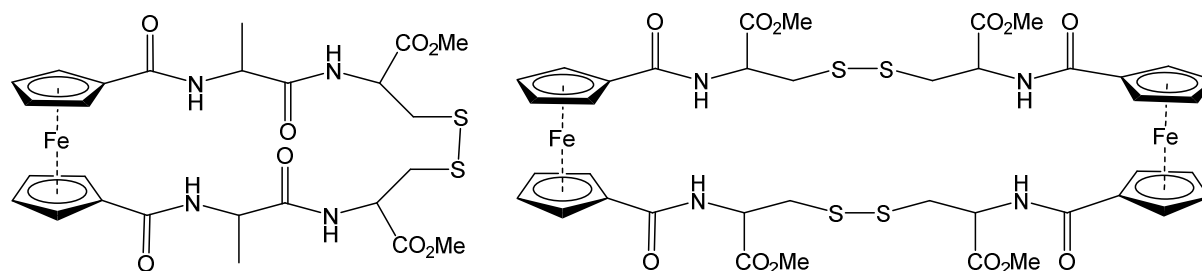
Slika 13. Struktura antibiotika valinomicina.

Nakon tih otkrića započeto je istraživanje na manjim peptidima u cilju dobivanja selektivnih kationskih receptora. Madison i sur.⁵¹ pratili su vezanje alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa na *ciklo*-(Pro-Gly)₃ u vodi, acetonitrilu i miješanom otapalu (80 % MeOH, 20 % voda). Natrijev kation se gotovo i ne veže u vodi ($K \approx 2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$), dok je u acetonitrilu konstanta stabilnosti tog kompleksa za dva reda veličine veća. Primijećeno je da spoj u acetonitrilu s magnezijevim i kalcijevim kationima tvori stabilnije komplekse slične stabilnosti ($K \approx 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$). Svi ovi kationi tvore samo 1:1 tip kompleksa, osim magnezijeva kationa kod kojeg je opaženo nastajanje kompleksa stehiometrije 1:2 (peptid:kation). To je moguće zbog prikladne molekulske strukture tog heksapeptida. Rezultati NMR istraživanja pokazali su da zbog tri prolina inkorporirana u peptid, on poprima strukturu C_3 simetrije takvu da su tri karbonilne skupine pozicionirane s jedne strane plohe koju zatvara okosnica peptida, dok su preostale tri s druge strane prstena. Prema autorima, takva struktura omogućava vezanje dva magnezijeva kationa, po jednog na tri karbonilne skupine, što je u slučaju većih kationa otežano. U miješanom otapalu najveće konstante stabilnosti opažene su za komplekse sa zemnoalkalijskim kationima (Ca^{2+} i Ba^{2+}), ali je isto tako primijećeno i vezanje alkalijskih kationa (Li^+ , Na^+ i K^+) pri čemu stabilnost kompleksa opada s porastom radijusa kationa u objema skupinama.

Ista istraživačka grupa je proučavala i vezanje kationskih vrsta na oktapeptid *ciklo*-(Pro-Gly)₄.⁵² Pokazano je da kompleksi oktapeptida u vodi imaju nižu stabilnost od odgovarajućih heksapeptidnih, u slučaju kalcijeva kompleksa čak i za dva reda veličine. S druge strane, u acetonitrilu je vezanje kalcijeva kationa na oktapeptid jače nego na heksapeptid, dok magnezijevi kompleksi imaju sličnu stabilnost. U pravilu se na ciklopeptide jače vežu veći kationi te oni s većim nabojem. Nadalje, kompleksi stehiometrije 1:2 nisu detektirani u slučaju

oktapeptida, no za sve proučavane alkalijske i zemnoalkalijske katione u acetonitrilu pokazano je da nastaju kompleksi stehiometrije 2:1, tzv. „sendvič“ kompleksi u kojima se kation nalazi između dva ciklopeptida. Ovo je vrlo značajan pokazatelj utjecaja otapala, ne samo na stabilnost i odnose stabilnosti među pojedinim receptorima, nego i na vrste kompleksa koji nastaju u reakcijama kompleksiranja. Osim navedenih kationa, autori su pratili i vezanje hidrokloridnih oblika estera aminokiselina. Pokazano je da se L-Val-OMe×HCl veže jednako dobro kao D-Val-OMe×HCl u acetonitrilu i to s konstantom stabilnosti od $K \approx 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Možda najzanimljiviji rezultat je da dodatkom racemične smjese Phe-OMe×HCl u otopinu ciklopeptida dolazi do pojave dva seta signala u ^{13}C NMR spektru što znači da se inače nerazlučivi enantiomeri mogu razlučiti ako dođu u interakciju s peptidom zbog nastanka dijastereoizomernih oblika kompleksa.

Funkcionalizacijom ciklopseudopeptidnih receptora mogu se dizajnirati receptori zanimljivih svojstava. Jedna od takvih funkcionalizacija je uvođenje skupine koja može postojati u dva ili više oksidacijskih stanja. Dobiveni peptid može poslužiti kao elektrokemijski senzor ili za transport iz redukcijske okoline u oksidacijsku. Huang i sur.⁶⁶ proučavali su desetak pseudociklopeptidnih receptora funkcionaliziranih ferocenskom skupinom. Primjer dva takva receptora prikazan je na slici 14. Dobivenim spojevima proučavan je afinitet prema kationima alkalijskih i zemnoalkalijskih metala s obzirom na oksidacijska stanja peptida. Kao i u ranije spomenutim radovima,^{51,52} konstante stabilnosti kompleksa zemnoalkalijskih kationa nekoliko su redova veličine veće nego u slučaju kompleksa alkalijskih kationa. Nadalje, kompleksi receptora višeg oksidacijskog stanja manje su stabilni od onih u kojima je receptor u nižem oksidacijskom stanju. Uspoređujući afinitete prema zemnoalkalijskim kationima, većina receptora u nižem oksidacijskom stanju ima najmanji afinitet prema barijevom kationu. S druge strane, većina receptora u višem oksidacijskom stanju najslabije veže kalcijev kation. Promjena redoslijeda afiniteta objašnjena je povećanjem gustoće naboja željezovog iona ferocena, zbog čega dolazi do boljeg vezanja iona s manjom gustoćom naboja. S druge strane, zadržavanje velikog afiniteta prema magnezijevom kationu autori objašnjavaju nastajanjem izuzetno povoljne koordinacije tog kationa karbonilnim skupinama receptora.



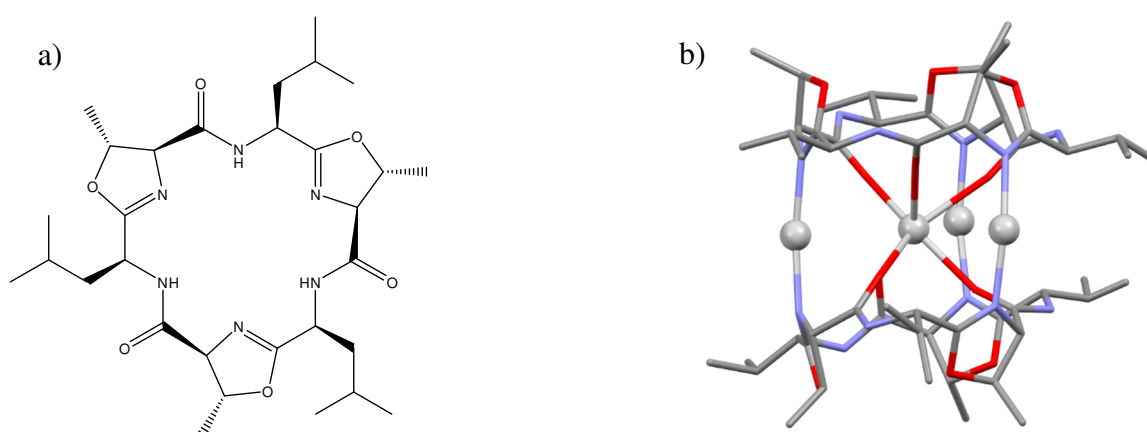
Slika 14. Strukture dvaju od desetak elektrokemijski aktivnih receptora istraživanih u radu Huang i sur.⁶⁶

Receptorska svojstva ciklopeptida proučavana su i za ione prijelaznih metala, pri čemu je najviše istražen afinitet prema bakrovim(II) ionima. S obzirom da ovi ioni preferiraju dušik kao donor koordinativne veze, u ciklopeptide se često ugrađuju aminokiseline poput histidina, lizina ili triptofana. Bočni ogranci tih aminokiselina mogu biti u različitim protonacijskim stanjima, stoga se afinitet prema bakrovim ionima vrlo često prati potencimetrijski. Istraživanja pokazuju da pri porastu pH vrijednosti otopine prvo dolazi do deprotonacije bočnih ogranka te nastaju kompleksi kod kojih su bakrovi ioni većinski koordinirani dušikovim atomima bočnih ogranka. Pri većim pH vrijednostima (> 7) dolazi i do deprotonacije amidne skupine peptidne okosnice te nastajanja kompleksa u kojima su bakrovi ioni koordinirani dušikovim atomima glavnog lanca.^{67–69} Nastali kompleksi vrlo su stabilni, a stabilnost im se povećava s porastom pH zbog većeg broja deprotoniranih dušikovih atoma. Stabilnost, ali i stehiometrija kompleksa između bakrovih(II) iona i peptida koji imaju veći broj histidina u strukturi ovise o međusobnom položaju histidina.⁶⁹ Osim toga, peptidi koordinacijom bakrovih(II) iona mogu olakšati njihovu oksidaciju do vrlo nestabilnog trovalentnog bakra na način da smanjuju vrijednost redukcijskog potencijala te mogu stabilizirati novonastale ione na nekoliko sati prije njihove ponovne redukcije.^{70,71}

Istraživanja su provedena i s drugim kationima prijelaznih metala, iako više kvalitativno nego kvantitativno. Osim bakrovih iona, niklovi, željezovi, cinkovi, manganovi i kobaltovi ioni uzrokuju promjene u CD spektru peptida, što je indikator reakcije kompleksiranja.⁷² Za razliku od bakrovih iona, MD simulacije pokazuju vezanje Ni^{2+} na karbonilne kisikove atome peptidne okosnice, a ne na deprotonirane amidne dušikove atome.⁷³ Ngu-Schwemlein i sur.^{74,75} kvantitativno su istražili vezanje iona prijelaznih metala i aluminija na ciklooktapeptide koji sadrže različit broj glutamata u svojoj strukturi kao potencijalne kation-vezujuće aminokiseline. Rezultati mikrokolorimetrijskih titracija upućuju na nastajanje 1:1 i 2:1 „sendvič“ kompleksa u

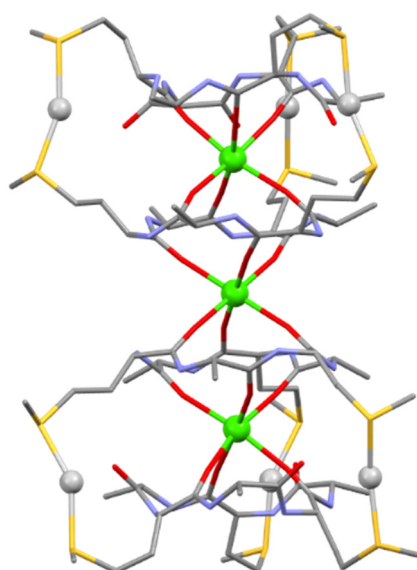
slučaju nekih kationa i ciklopeptida, dok afinitet prema kationima manjim dijelom ovisi i o položaju glutamata. Supstitucijom dva glutamata cisteinom dolazi do znatnog povećanja konstante stabilnosti ciklopeptida s Hg^{2+} , dok je vezanje Pb^{2+} i Cd^{2+} slabo izraženo. Spektrofluorimetrijska istraživanja pokazuju snažno utišavanje fluorescencije ciklopeptida u vodi dodatkom kationa, čak i do 99 %, što omogućuje korištenje takvog peptida kao fluorimetrijskog senzora za detekciju kationa.

Jedan od najzanimljivijih kationa, prema vrsti kompleksa koju stvara s ciklopeptidima, je srebrov(I) kation. Wipf i sur.⁷⁶ objavili su totalnu sintezu morskog citotoksina westiellamida, pseudopeptida sastavljenog od tri izoleucina i tri metil-oksazola (slika 15 a). Dodatkom srebrovih iona uočeno je nastajanje iznimno stabilnog kompleksa te je dobivena kristalna struktura 4:2 (Ag:peptid) kompleksa u kojem se četiri srebrova iona nalaze između dva peptida. Jedan od njih je koordiniran s tri karbonilna kisika svakog ciklopeptida, dok ostala tri srebrova kationa povezuju ciklopseudopeptide preko dva dušika oksazolnih skupina (slika 15 b).



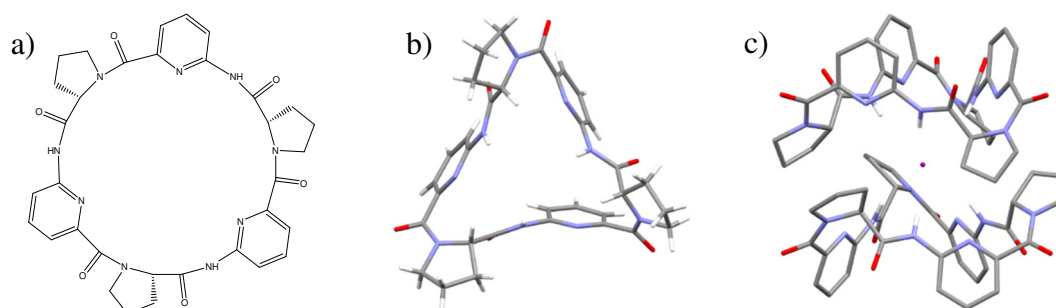
Slika 15. a) Struktura ciklopseudopeptida westiellamida. b) Kristalna struktura kompleksa westiellamida s kationima srebra.⁷⁶

Kompleksi peptida i kationa mogu se udruživati u veće supramolekulske sustave, a jedan takav primjer objavljen je u radu Okade i sur.⁷⁷ Autori su sintetizirali peptid *ciklo*-(L-Ala-L-Met)₃ koji dodatkom srebrova i kalcijeva kationa stvara kompleks 2:3:1 (peptid:Ag⁺:Ca²⁺) detektiran NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Dva takva kompleksa mogu se premostiti dodatnim ionom kalcija pri čemu nastaje zanimljiv supramolekulski kompleks čija je kristalna struktura dobivena difrakcijom na jediničnom kristalu, a prikazan je na slici 16.



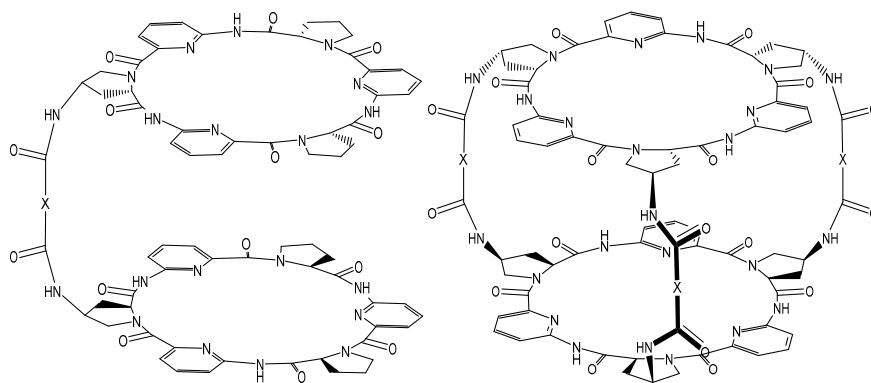
Slika 16. Kristalna struktura kompleksa *ciklo*-(L-Ala-L-Met)₃ sa srebrovim i kalcijevim ionima (peptid:Ag⁺:Ca²⁺ = 4:6:3).⁷⁷

Kao što je vidljivo iz spomenutih radova, peptidna skupina može vrlo dobro poslužiti kao koordinirajuća grupa za katione, no isto tako njena NH skupina ima svojstvo donora vodikove veze te se može iskoristiti u vezanju anionskih vrsta. S obzirom da se u posljednje vrijeme supramolekulska kemija sve više okreće pronalaženju senzora i selektivnih receptora anionskih vrsta, tako se i ciklopeptidi sve više istražuju u tu svrhu. Kubik i sur.⁷⁸ sintetizirali su ciklički heksapeptid (slika 17 a) sastavljen od prolina i 6-aminopikolinske kiseline koji poprima zanimljivu strukturu u vodi (slika 17 b). Spektroskopijom NMR pokazano je da peptid veže halogenidne, ali i razne oksoanione. Masenom spektrometrijom detektirani su kompleksi tipa 1:1, dok je u slučaju jodidnog i sulfatnog aniona dodatno uočen signal 2:1 (peptid:anion) „sendvič“ kompleksa. Konstante stabilnosti 1:1 kompleksa u miješanom otapalu voda/metanol su u rasponu od 10 do 100 dm³ mol⁻¹, a za nastajanje 1:2 kompleksa vezanjem dodatnog ciklopeptida su u rasponu 10³ – 10⁴ dm³ mol⁻¹.⁷⁹ Iz kristalne strukture jodidnog „sendvič“ kompleksa (slika 17 c) vidljiva je interakcija peptida i aniona preko NH skupina peptidne okosnice što znači da je kompleks stabiliziran stvaranjem intermolekulskih vodikovih veza.⁷⁸ Funkcionalizacijom prolina hidroksilnim skupinama stabilnost kompleksa stehiometrije 1:1 ostaje slična u odnosu na nefunkcionalizirani receptor, ali 2:1 kompleksi nisu detektirani.⁷⁹



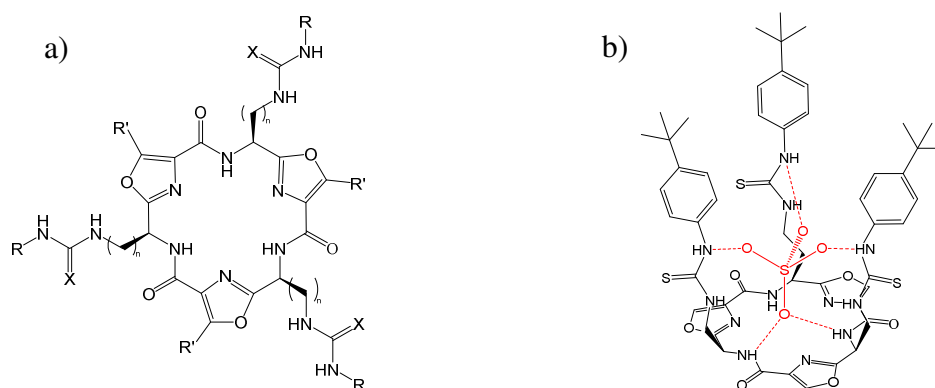
Slika 17. a) 2D i b) 3D struktura cikloheksapeptida sastavljenog od prolinskih i 6-aminopikolinskih podjedinica. c) Kristalna struktura „sendvič“ kompleksa peptida i jodidnog aniona (vodikovi atomi izvan peptidne okosnice izostavljeni su zbog jasnoće).⁷⁸

Kako bi osigurali nastajanje samo 1:1 kompleksa, ista istraživačka grupa sintetizirala je receptor koji se sastoji od dva peptida prikazanih na slici 17 povezanih s jednom,^{80–84} odnosno s tri poveznice^{82,84} što je rezultiralo djelomično i potpuno zakočenim receptorima (slika 18). Navedeni receptori tvore samo 1:1 tip kompleksa s proučavanim anionima pri čemu su najstabilniji kompleksi s jodidnim i sulfatnim anionom. Takav rezultat ukazuje na važnost strukturne kompatibilnosti peptida i aniona, jer bi jakost vodikovih veza trebala biti veća u slučaju vezanja manjih aniona. Ukupni afinitet peptida prikazanog na slici 17 prema sulfatnom i jodidnom anionu veći je od afiniteta receptora koji se sastoji od dva peptida povezanih jednom poveznicom što je posljedica povoljnog entalpijskog i entropijskog doprinosa standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja.⁸⁰ Također, pokazano je da afinitet receptora s jednom poveznicom ne ovisi značajno o funkcijskim skupinama koje se nalaze u poveznici, dok se pojedini doprinosi u nekim slučajevima znatno razlikuju.^{80,81,83} Potpuno zakočeni receptor bolje veže anione od onog s jednom poveznicom, pri čemu su reakcije kompleksiranja endotermne i entropijski kontrolirane. Endotermno vezanje objašnjeno je nemogućnošću reorganizacije receptora oko aniona na energijski efikasan način, dok je vrlo povoljan entropijski doprinos objašnjen otpuštanjem molekula vode iz šupljine receptora. Naime, iz kristalne strukture vidljivo je da se u šupljini između dva peptida nalazi 21 molekula vode. Njihovo otpuštanje je entropijski vrlo povoljno, ali zato dodatno povećava endotermnost reakcije kompleksiranja.⁸²



Slika 18. Anionski receptori sastavljeni od dva kovalentno povezana ciklopeptida.⁸⁰⁻⁸⁴

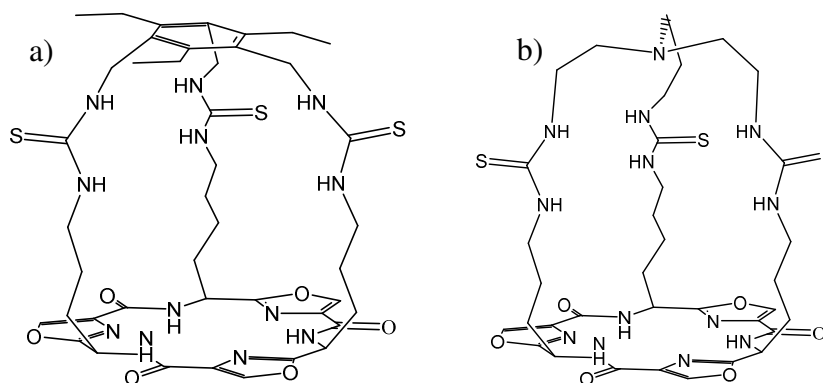
Jolliffe i sur. dizajnirali su ciklopeptid koji selektivno veže sulfatni anion. Prilikom dizajna vodili su se strukturnom kompatibilnošću receptora aniona. S tim na umu sintetizirali su receptor čija je osnovna struktura ciklopseudeopeptid koji sadrži tri ureidne i tioureidne skupine (slika 19 a). Pokazano je da takav receptor selektivno veže sulfatni anion čak i u vrlo kompetitivnom okruženju (smjesa vode i DMSO). Ovakvu selektivnost autori objašnjavaju predloženim načinom vezanja u kojem je jedan kisikov atom u interakciji s kosnicom ciklopseudeopeptida, dok su ostala tri u interakciji s (tio)amidnim skupinama koje su na takvim mjestima da odgovaraju položajima kisikovih atoma u sulfatnom anionu (slika 19 b).^{85,86}



Slika 19. a) Ciklopseudeopeptidni receptor s trima (tio)ureidnim skupinama koje osiguravaju selektivno vezanje sulfatnog aniona. b) Predloženi način vezanja sulfatnog aniona na receptor.

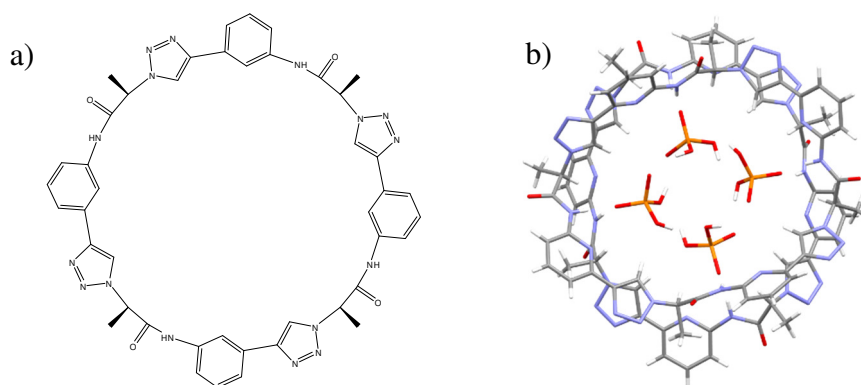
S ciljem osiguravanja unaprijed određene strukture kompleksa do koje dolazi bez velike reorganizacije receptora uslijed vezanja aniona, autori su odlučili povezati bočne skupine čime su dobili receptore nalik kriptandima (slika 20). Receptor na slici 20 a pokazuje veliki afinitet za acetatne i sulfatne anione u 0,5 % (v/v) H₂O/DMSO, dok receptor na slici 20 b u istoj smjesi otapala, uz dva navedena iona, vrlo dobro veže fluoridne i kloridne anione.^{87,88} Povećanjem

udjela vode u otapalu potonji receptor značajno gubi na afinitetu prema anionima, osim prema sulfatnom anionu kojeg veže vrlo dobro čak i u smjesi otapala s 25 % vode.⁸⁸ Daljnja istraživanja na spojevima prikazanim na slikama 19 i 20 pokazala su da ti spojevi mogu sudjelovati u transportu raznih iona (SO_4^{2-} , HCO_3^- , Cl^- , Mn^{2+}) preko membrane vezikula.⁸⁹



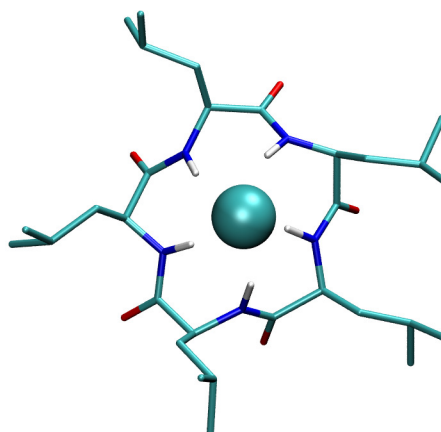
Slika 20. Struktura receptora nalik kriptandima s povezanim bočnim skupinama.

Neki anioni, poput dihidrogenfosfata, u nepolarnim otapalima tvore dimere, trimere i druge agregate.⁹⁰⁻⁹² U takvim sustavima ciklopeptidi mogu poslužiti kao dodatni stabilizatori tih vrsta. Mungalpara i sur.⁹³ pokazali su da pseudopeptidi mogu tvoriti vrlo stabilne komplekse s dimerom dihidrogenfosfatnog aniona u DMSO-u. Rezultati kalorimetrijskih titracija pokazali su da je nastajanje kompleksa stehiometrije 1:1 posljedica entalpijski i entropijski povoljnog doprinosa standardnoj reakcijskoj Gibbssovoj energiji, što također vrijedi i za vezanje drugog dihidrogenfosfatnog aniona na nastali 1:1 kompleks. Zanimljivo je da je vezanje drugog aniona entalpijski povoljnije, a entropijski manje povoljno od vezanja prvog. Kristalizacijom iz DMSO-a dobivena je struktura 2:3 (peptid:anion) kompleksa u kojoj svaki peptid interagira s dvije molekule DHP aniona što upućuje na to da ciklopeptid posjeduje vezno mjesto koje odgovara dimeru DHP-a. Dodatna potvrda kompatibilnosti veznog mjesta prema dimeru DHP-a je da je u otopini detektiran 1:2 kompleks, ali ne i kompleks 1:3 stehiometrije. Veći pseudopeptidi (slika 21) mogu tvoriti komplekse s više DHP aniona, ili čak s pirofosfatnim anionima.⁹⁴



Slika 21. a) Struktura pseudopeptida koji sadrži triazolne podjedinice. b) Kristalna struktura kompleksa stehiometrije 2:4 (peptid:DHP anion).⁹⁴

Detaljan uvid u termodinamiku i strukturne karakteristike procesa vezanja aniona na ciklopentapeptid s leucinskim ostacima dan je u radu Horvata i sur.⁹⁵ Pokazano je da većina istraživanih aniona tvori kompleks stehiometrije 1:1 s ciklopentaleucinom u acetonitrilu, osim dihidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog aniona koji redom tvore 2:1 i 1:2 (peptid:anion) komplekse. Najveća konstanta stabilnosti određena je za kompleks s kloridnim anionom i iznosi oko $10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, a kompleksiranje je gotovo u svim slučajevima entalpijski povoljno i entropijski kontrolirano. U DMSO-u su konstante stabilnosti nekoliko redova niže te ih nije bilo moguće odrediti za većinu proučavanih anionskih kompleksa. Reakcije kompleksiranja halogenidnih aniona su u tom otapalu endotermne, dok je vezanje dihidrogenfosfata egzotermno. Dodatan značaj istraživanju dale su računalne simulacije molekulske dinamike kojima su dobivene strukture nastalih kompleksa u otopini. Opaženo je da se anion veže s iste strane prstena na kojoj se nalaze i bočni ogranci (*endo* strana) te da je koordiniran amidnim protonima peptidne okosnice u obliku pravilne pentagonske piramide (slika 22).

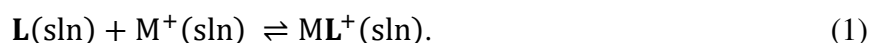


Slika 22. Struktura kompleksa ciklopentaleucina i kloridnog aniona.⁹⁵

2.4. Eksperimentalne i računalne metode proučavanja kompleksiranja iona

Strukturne i termodinamičke karakteristike kompleksiranja iona i receptora moguće je odrediti eksperimentalnim i računalnim metodama. Eksperimentalne metode pri tome najčešće služe za određivanje stehiometrije nastalih kompleksa i pripadajućih termodinamičkih parametara kompleksiranja, što uključuje standardnu konstantu ravnoteže, reakcijsku entalpiju i entropiju. Postoje metode, koje osim navedenih parametara mogu dati informaciju o tome u kojem dijelu receptora dolazi do vezanja gosta, no samo malim brojem metoda (spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije i difrakcija na jediničnom kristalu) može se stvarno odrediti struktura nastalih kompleksa. S druge strane, računalne metode, poput simulacija molekulske dinamike, daju mikroskopsku sliku procesa kompleksiranja u vidu nastanka ion-receptor interakcija, pripadajućih konformacijskih promjena receptora i solvatacije sudionika reakcije. Kombinacija eksperimentalnih i računalnih metoda pruža potpunu sliku reakcije kompleksiranja na makroskopskoj i mikroskopskoj razini što je vrlo bitno za razumijevanje tog procesa i daljnji dizajn receptora u svrhu povećanja ionske selektivnosti.

Temelj eksperimentalnih metoda za kvantitativno praćenje kompleksiranja kationa i aniona je identičan, stoga će u ovom dijelu Doktorskog rada detaljno biti objašnjena metodologija određivanja konstante ravnoteže u slučaju kompleksiranja kationa dok isti principi vrijede i za anione. Vezanje jednostruko nabijenog kationa (M^+) na neutralni receptor (L) u otopini može se prikazati jednadžbom kemijske reakcije:



Standardna konstanta stabilnosti koja opisuje ovu ravnotežu dana je izrazom:

$$K^\circ = \frac{a(ML^+)}{a(L)a(M^+)} = \frac{\gamma(ML^+)[ML^+]c^\circ}{\gamma(L)\gamma(M^+)[L][M^+]}, \quad (2)$$

pri čemu je a ravnotežni aktivitet pojedine vrste, γ koeficijent aktiviteta, a uglatim zagradama su označene ravnotežne koncentracije sudionika reakcije. Standardna koncentracija, koja dogovorno iznosi 1 mol dm^{-3} označena je s c° . Koeficijent aktiviteta neutralnih vrsta približno je jednak 1, a budući da su pri kompleksiranju neutralnim receptorom naboji slobodnog iona i nastalog kompleksa jednaki tada su i njihovi koeficijenti približno isti. Stoga se izraz za standardnu konstantu ravnoteže pojednostavljeno može zapisati kao:

$$K^\circ \approx \frac{[ML^+]c^\circ}{[L][M^+]} = K_c c^\circ, \quad (3)$$

gdje K_c označava koncentracijsku konstantu ravnoteže. Kada se u tu jednadžbu uvrste izrazi za bilancu masa:

$$c(\mathbf{L}) = [\mathbf{L}] + [\mathbf{ML}^+], \quad (4)$$

$$c(\mathbf{M}^+) = [\mathbf{M}^+] + [\mathbf{ML}^+], \quad (5)$$

gdje su c analitičke koncentracije liganda i iona, dobiju se tri moguća izraza povezanosti konstante ravnoteže o ravnotežnoj koncentraciji jednog od sudionika reakcije:

$$K_c = \frac{[\mathbf{ML}^+]c^\circ}{(c(\mathbf{L})-[\mathbf{ML}^+])(c(\mathbf{M}^+)-[\mathbf{ML}^+])}, \quad (6)$$

$$K_c = \frac{(c(\mathbf{L})-[\mathbf{L}])c^\circ}{[\mathbf{L}](c(\mathbf{M}^+)-c(\mathbf{L})+[\mathbf{L}])} \text{ ili} \quad (7)$$

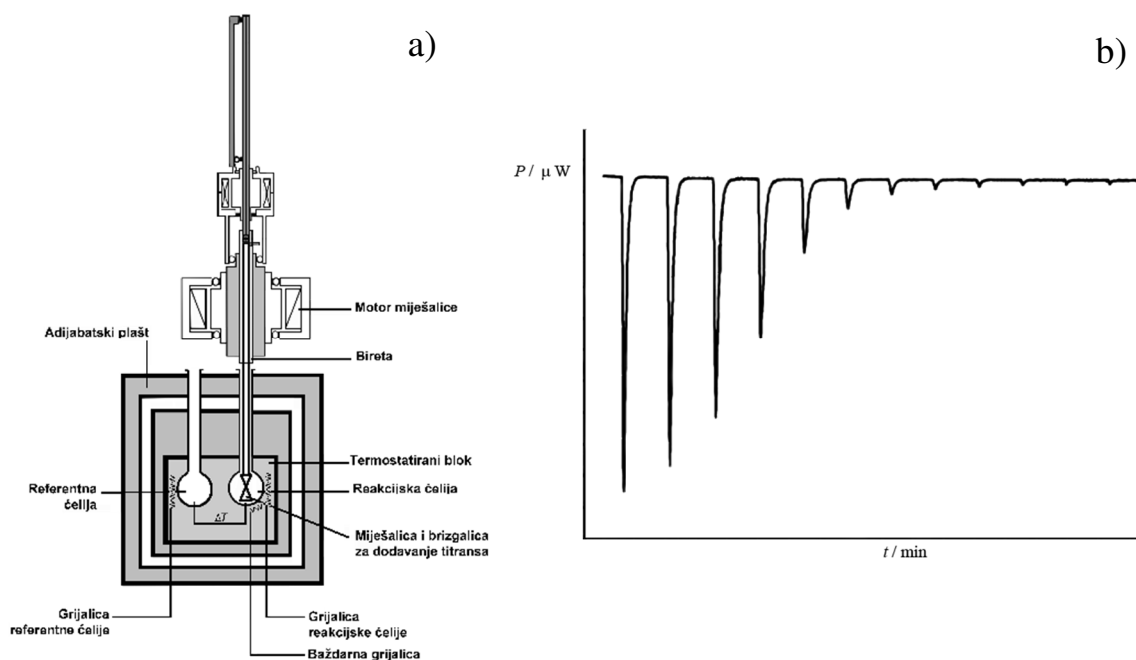
$$K_c = \frac{(c(\mathbf{M}^+)-[\mathbf{M}^+])c^\circ}{(c(\mathbf{L})-c(\mathbf{M}^+)+[\mathbf{M}^+])[\mathbf{M}^+]}. \quad (8)$$

Iz ovih je relacija vidljivo da se iz poznavanja ravnotežne koncentracije bilo kojeg sudionika reakcije i analitičkih koncentracija reaktanata može odrediti vrijednost konstante stabilnosti nastalih kompleksa. S obzirom da koncentraciju neke vrste u otopini nije moguće direktno odrediti, ona se određuje mjerenjem druge fizikalne veličine povezane s koncentracijom. To može biti apsorbancija, intenzitet fluorescencije, provodnost, množinski udio i dr. Ponekad se može mjeriti i fizikalna veličina koja nije nužno vezana uz koncentraciju nego uz doseg reakcije, primjerice promjena entalpije u kalorimetrijskim mjerenjima. Pouzdanost određivanja konstante stabilnosti ovisi o osjetljivosti korištene metode, odnosno o minimalnoj promjeni mjenenog signala koji uređaj može detektirati. Tako se, za komplekse stehiometrije 1:1, spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije pouzdano mogu odrediti konstante stabilnosti iznosa do $10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, spektrofotometrijom do $10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, izotermnom titracijskom kalorimetrijom do $10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, dok se spektrofluorimetrijom mogu odrediti i veće vrijednosti.

2.4.1. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je metoda kojom se određuje toplinski efekt reakcije. Kalorimetar dvojne izvedbe sastoji se od dvije ćelije (reakcijska i referentna) kraj kojih se nalaze električni grijači (slika 23 a). U izotermnoj izvedbi grijač referentne ćelije posjeduje konstantnu toplinsku snagu koja aktivno utječe na toplinsku snagu grijača reakcijske ćelije na način da su temperature ćelija jednake tijekom cijelog trajanja eksperimenta. Dodatkom titransa dolazi do oslobađanja termičke energije (egzotermna reakcija) ili njenog apsorbiranja

(endotermna reakcija) što uzrokuje promjenu snage grijača reakcijske ćelije u svrhu održavanja razlika temperatura između ćelija na minimalnoj razini.



Slika 23. a) Shematski prikaz izoternog titracijskog kalorimetra. b) Primjer termograma dobivenog pomoću takvog instrumenta. (Prilagođeno prema VP-ITC Microcalorimeter, User's manual, Microcal).

Entalpija je funkcija triju varijabli: tlaka, temperature i sastava sustava:

$$H = H(p, T, \xi). \quad (9)$$

čiji totalni diferencijal ima oblik:

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial p}\right)_{T, \xi} dp + \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p, \xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{p, T} d\xi. \quad (10)$$

Parcijalna derivacija entalpije po temperaturi uz konstantan tlak i sastav jednaka je izobarnom toplinskom kapacitetu, a parcijalna derivacija entalpije po dosegu pri konstantnom tlaku i temperaturi jednaka reakcijskoj entalpiji. Ukoliko je riječ o izobarnim uvjetima, što je vrlo čest slučaj u laboratoriju, tada se prvi član jednadžbe (10) može izostaviti te ona prelazi u oblik:

$$dq = C_p dT + \Delta_r H d\xi. \quad (11)$$

pri čemu je promjena entalpije jednaka izmijenjenoj toplini uz konstantan tlak. U kalorimetrijskim mjerenjima nužno je poznavati izmjenu topline sustav-okolina, stoga je bitno znati i vremensku dinamiku tog procesa. Deriviranjem izraza (11) po vremenu dobije se osnovna jednadžba za opis dinamičnog rada kalorimetra:

$$\frac{dq}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + \Delta_r H \frac{d\xi}{dt}. \quad (12)$$

Izotermni titracijski kalorimetri najčešće su napravljeni u dvojnoj izvedbi što znači da posjeduju referentnu i reakcijsku ćeliju koje uz sebe imaju pripadajući grijač. Izmjena topline između sustava i okoline za obje ćelije prije reakcije podijeljena je na izmjenu topline s kompenzacijskim dijelom (grijačem) i izmjenu topline s blokom:

$$\frac{dq}{dt} = C_p \frac{dT_R}{dt} - P_R(t), \quad (13)$$

$$\frac{dq}{dt} = C_p \frac{dT_{REF}}{dt} - P_{REF}(t), \quad (14)$$

gdje su T_R , T_{REF} , P_R , i P_{REF} , redom temperature reakcijske i referentne ćelije i toplinske snage reakcijskog, odnosno referentnog grijača. Grafički prikaz funkcije $P_R(t)$ naziva se termogram (slika 23 b). U reakcijskoj ćeliji tijekom reakcije dolazi do oslobađanja ili vezanja termičke energije zbog termodinamike promatranog procesa, stoga se u jednadžbu (13) mora dodati pripadajući član koji uključuje reakcijsku entalpiju $\Delta_r H$:

$$\frac{dq}{dt} = C_p \frac{dT_R}{dt} - P_R(t) + \Delta_r H \frac{d\xi}{dt}. \quad (15)$$

Uz pretpostavku da su članovi koji se odnose na toplinsku snagu izmjene i brzine promjene temperature jednaki za obje ćelije dobiva se izraz:

$$\Delta_r H \frac{d\xi}{dt} = P_R(t) - P_{REF}(t). \quad (16)$$

koji integriranjem lijeve strane po doseg (budući da je entalpija funkcija stanja) i desne strane po vremenu daje:

$$\int_{\xi_1}^{\xi_2} \Delta_r H d\xi = \int_{t_1}^{t_2} (P_R(t) - P_{REF}(t)) dt. \quad (17)$$

Iz jednadžbe je vidljivo da je integral desne strane po vremenu jednak promjeni entalpije za pripadajuću promjenu dosega. Ukupna ili kumulativna promjena entalpije povezana je s reakcijskom entalpijom i dosegom reakcije prema relaciji:

$$\Delta H = \Delta_r H \xi. \quad (18)$$

Za reakciju kompleksiranja danu jednadžbom (1) vrijedi:

$$\xi = [LM^+]V, \quad (19)$$

gdje uglate zagrade označavaju ravnotežnu koncentraciju kompleksa, a V ukupni volumen reakcijske smjese. Korištenjem jednadžbi bilance masa (4) i (5) dobiva se izraz:

$$\xi = \left[\frac{(K_c c_L + K_c c_{M^+} + 1) - \sqrt{(K_c c_L + K_c c_{M^+} + 1)^2 - 4K_c^2 c_L c_{M^+}}}{2K_c} \right] V, \quad (20)$$

odnosno:

$$\Delta H = \Delta_r H \left[\frac{(K_c c_L + K_c c_{M+} + 1) - \sqrt{(K_c c_L + K_c c_{M+} + 1)^2 - 4K_c^2 c_L c_{M+}}}{2K_c} \right] V. \quad (21)$$

Prilikom obrade podataka vrlo često se umjesto kumulativne (21) koriste sukcesivne promjene entalpije ($\Delta(\Delta H)$):

$$\Delta(\Delta H) = \Delta_r H (\xi_n - \xi_{n-1}). \quad (22)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti sukcesivne promjene entalpije o promjeni doseg između pojedinih dodataka mogu se odrediti koncentracijska konstanta stabilnosti i standardna reakcijska entalpija, dok se standardna reakcijska entropija, uz pretpostavku da je K_c iznosom približno jednak K° , može izračunati prema sljedećoj relaciji:

$$\Delta_r S^\circ = \frac{\Delta_r H^\circ - \Delta_r G^\circ}{T} = \frac{\Delta_r H^\circ}{T} + R \ln(K^\circ). \quad (23)$$

Najčešći programi za obradu mikrokolorimetrijskih podataka su Origin 7.5,⁹⁶ HypDH,⁹⁷ PEAQ-ITC Analysis Software i SEDPHAT⁹⁸.

2.4.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) proučava interakcije elektromagnetskog zračenja i atomskih jezgri koje posjeduju nuklearni spin. Kada se atom nalazi u vanjskom magnetnom polju, elektronski omotač inducira lokalno magnetsko polje suprotnog smjera što smanjuje efektivno magnetsko polje koje djeluje na jezgru. S obzirom da osjetljivost jezgre na vanjsko magnetsko polje ovisi o zasjenjenju jezgre, odnosno o elektronskoj gustoći u njoj blizini, rezonancijska frekvencija jezgre bit će specifična za pojedine skupine. Kako bi se neovisno o primijenjenom vanjskom magnetskom polju mogli uspoređivati spektri dobiveni NMR spektroskopijom, uvedena je fizikalna veličina nazvana kemijski pomak. On je definiran kao razlika između rezonantne frekvencije promatrane jezgre (ν_{uzorak}) i rezonantne frekvencije jezgara referentnog spoja (ν_{standard}) podijeljena s ν_{standard} . Zbog vrlo visoke rezonantne frekvencije referentnog spoja naspram vrlo malih razlika rezonantnih frekvencija uzorka i referentne jezgre, kemijski pomak definiran je jednadžbom (24) izražava se u dijelovima na milijun (ppm):

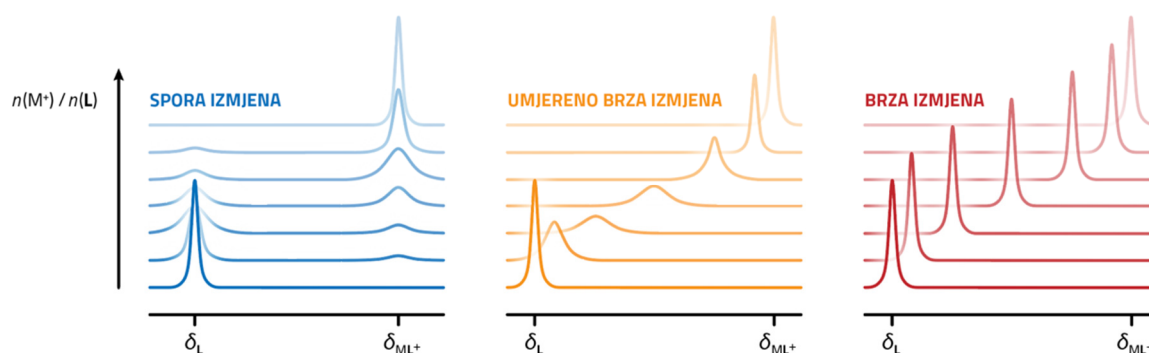
$$\delta / \text{ppm} = \frac{\nu_{\text{uzorak}} - \nu_{\text{standard}}}{\nu_{\text{standard}}} \cdot 10^6. \quad (24)$$

Reakcijom između iona i receptora dolazi do nastanka novih i nestanka postojećih interakcija. Na taj se način redovito mijenja elektronska gustoća unutar strukture receptora, ponajviše onom dijelu receptora koji interagira s ionom, što uzrokuje promjenu kemijskog

promjena određenih jezgara. Kada je sustav u ravnoteži, iako na makroskopskoj razini nema promjene sastava otopine, na mikroskopskoj razini procesi asocijacije slobodnih vrsta i disocijacije kompleksa kontinuirano se odvijaju, što se naziva kemijska izmjena. Tip spektralnih promjena koji se primijećuje tijekom titracije receptora gostom uvelike ovisi o brzini kemijske izmjene. U slučaju spore kemijske izmjene, u spektru se opažaju odvojeni signali slobodnog i kompleksiranog oblika. Jedan skup signala pripada kompleksiranom obliku molekule, a drugi slobodnim molekulama receptora. U takvom spektru omjer površina ispod signala ekvivalentnih protona odgovara omjeru koncentracija slobodne i kompleksirane forme temeljem čega je moguće izračunati odgovarajuću konstantu stabilnosti kompleksa receptor-ion. U slučaju brze kemijske izmjene dobiva se signal koji odgovara vaganom prosjeku signala slobodne forme i kompleksa pri čemu su težinski koeficijenti ravnotežni množinski udjeli pojedinih vrsta (25). Sukladno tome, konstanta stabilnosti može se izračunati nelinearnom regresijom uz pomoć jednadžbe (6) ili (7):

$$\delta_{\text{obs}} = \chi_{\text{ML}^+} \delta_{\text{ML}^+} + \chi_{\text{L}} \delta_{\text{L}}. \quad (25)$$

U slučaju umjereno brze kemijske izmjene rezultat je spektar sa širokim signalima i tada konstantu stabilnosti nije moguće odrediti. Primjeri signala za svaki tip kemijske izmjene prikazani su na slici 24.



Slika 24. Promjene u NMR spektru liganda prilikom kompleksacije s kationom za slučajeve spore, umjereno brze i brze kemijske izmjene. (Prilagođeno prema ref. 99).

U slučaju da se prilikom titracije istovremeno prati promjena signala nekoliko protona tada jednadžba (25) poprima matrični oblik:

$$\begin{bmatrix} \delta_{\text{obs},1}(\text{H}_1) & \cdots & \delta_{\text{obs},n}(\text{H}_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \delta_{\text{obs},1}(\text{H}_m) & \cdots & \delta_{\text{obs},n}(\text{H}_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \delta_{\text{ML}^+}(\text{H}_1) & \delta_{\text{L}}(\text{H}_1) \\ \vdots & \vdots \\ \delta_{\text{ML}^+}(\text{H}_m) & \delta_{\text{L}}(\text{H}_m) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \chi_{\text{ML}^+,1} & \cdots & \chi_{\text{ML}^+,n} \\ \chi_{\text{L},1} & \cdots & \chi_{\text{L},n} \end{bmatrix}, \quad (26)$$

koji u skraćenom zapisu glasi:

$$\Delta_{\text{obs}} = \Delta \cdot X \quad (27)$$

gdje je Δ_{obs} matrica kemijskih pomaka u kojoj se svaki stupac odnosi na jedan ravnotežni sastav u titraciji, redci predstavljaju kemijske pomake m protona, Δ je matrica kemijskih pomaka vrsta ML^+ i L , a X matrica njihovih ravnotežnih množinskih udjela. Konstanta stabilnosti se određuje iterativno, na način da se u prvom koraku pretpostavi njezina vrijednost te se pomoću nje računa matrica ravnotežnih množinskih udjela X . Djelovanjem desne pseudoinverze matrice X na matricu Δ_{obs} dobiva se matrica izračunatih kemijskih pomaka Δ' . Iz dobivenih matrica računa se Δ_{obs}' . Postupak se ponavlja do pronalaska minimuma sume kvadrata odstupanja (28):

$$SS = \sum_i \sum_j (\delta'_{\text{obs},ij} - \delta_{\text{obs},ij})^2. \quad (28)$$

Najčešći programi za obradu ^1H NMR titracija su HypNMR,¹⁰⁰ dok se za vizualizaciju koriste TopSpin¹⁰¹ ili MestReNova.¹⁰²

2.4.3. Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija je metoda kojom se mjeri intenzitet fluorescencije nekog uzorka nakon pobuđivanja zračenjem određene valne duljine. Pri niskim koncentracijama intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji fluorescentne tvari prema jednadžbi:

$$F = I_0 \phi \varepsilon_X l c(X), \quad (29)$$

gdje je I_0 intenzitet upadnog zračenja, ϕ kvantno iskorištenje, ε_X molarni apsorpcijski koeficijent tvari X , l duljina optičkog puta. U slučaju da se u sustavu nalazi nekoliko spektralno aktivnih vrsta, ukupni intenzitet fluorescencije jednak je zbroju emisijskih intenziteta svake vrste:

$$F = \sum_i F_i = I_0 l \sum_i \phi_i \varepsilon_i c_i. \quad (30)$$

Za reakcije koje se zbivaju prema jednadžbi (1) najčešće su dvije spektralno aktivne vrste L i ML^+ . Tada jednadžba (30) poprima oblik:

$$F = I_0 l (\phi_{\text{L}} \varepsilon_{\text{L}} [\text{L}] + \phi_{\text{ML}^+} \varepsilon_{\text{ML}^+} [\text{ML}^+]) = I_0 l (\phi_{\text{L}} \varepsilon_{\text{L}} c_{\text{L}} - (\phi_{\text{L}} \varepsilon_{\text{L}} - \phi_{\text{ML}^+} \varepsilon_{\text{ML}^+}) [\text{ML}^+]). \quad (31)$$

Kada se iz jednadžbe (6) izrazi ravnotežna koncentracija ML^+ i uvrsti u jednadžbu (31) dobiva se izraz:

$$F = I_0 l \left(\phi_{\text{L}} \varepsilon_{\text{L}} c_{\text{L}} - (\phi_{\text{L}} \varepsilon_{\text{L}} - \phi_{\text{ML}^+} \varepsilon_{\text{ML}^+}) \frac{c_{\text{L}} + c_{\text{M}^+} + \frac{1}{K_c} - \sqrt{(c_{\text{L}} + c_{\text{M}^+} + \frac{1}{K_c})^2 - 4c_{\text{L}}c_{\text{M}^+}}}{2} \right). \quad (32)$$

U slučaju kada se prilikom titracije snimaju emisijski spektri otopine tada se koristi multivarijatna obrada podataka, a jednadžba (31) poprima oblik:

$$\begin{bmatrix} F_{\text{obs},1}(\lambda_1) & \cdots & F_{\text{obs},n}(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ F_{\text{obs},1}(\lambda_m) & \cdots & F_{\text{obs},n}(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \phi_{\text{ML}+\varepsilon_{\text{ML}^+}(\lambda_1)} & \phi_{\text{L}\varepsilon_{\text{L}}(\lambda_1)} \\ \vdots & \vdots \\ \phi_{\text{ML}+\varepsilon_{\text{ML}^+}(\lambda_m)} & \phi_{\text{L}\varepsilon_{\text{L}}(\lambda_m)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_{\text{ML}^+,1} & \cdots & c_{\text{ML}^+,n} \\ c_{\text{L},1} & \cdots & c_{\text{L},n} \end{bmatrix} I_0 l, \quad (33)$$

odnosno u matičnom obliku:

$$\mathbf{F}_{\text{obs}} = \mathbf{F} \mathbf{C} I_0 l \quad (34)$$

gdje je \mathbf{F}_{obs} matrica emisijskih spektara u kojoj stupci matrice sadržavaju snimljene spektre, stupci matrice \mathbf{F} sadržavaju molarne emisijske spektre fluorescentnih vrsta u reakciji, a matrica \mathbf{C} sadrži njihove ravnotežne množinske koncentracije na način da se svaki stupac odnosi na pojedini ravnotežni sastav u titraciji. Postupak određivanja konstante stabilnosti konceptualno je identičan je opisanom u prethodnom poglavlju. Prvo se pretpostavi konstanta ravnoteže i izračuna matrica ravnotežnih koncentracija \mathbf{C}' . Djelovanjem desne pseudoinverze matrice \mathbf{C}' na matricu \mathbf{F}_{obs} dobiva matrica \mathbf{F}' iz čega se računa matrica $\mathbf{F}_{\text{obs}'}$. Postupak se ponavlja do pronalaska minimuma sume kvadrata odstupanja (38):

$$SS = \sum_i \sum_j (F'_{\text{obs},ij} - F_{\text{obs},ij})^2. \quad (35)$$

Osim konstante stabilnosti, multivarijatnom regresijom mogu se dobiti svojstveni spektri i kvantna iskorištenja spektralno aktivnih vrsta. Najčešći programi za obradu spektrofluorimetrijskih titracija su HypSpec,^{103,104} Specfit¹⁰⁵ ili Kev.¹⁰⁶

2.4.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD)

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda kojom se određuje razlika u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polariziranog elektromagnetskog zračenja. Ovo svojstvo pokazuju optički aktivne, odnosno kiralne molekule. S obzirom da aminokiseline posjeduju kiralne centre, (ciklo)peptidi također imaju to svojstvo. Prilikom mjerenja cirkularnog dikroizma zapravo se mjeri razlika u apsorpciji lijevo (A_L) i desno (A_D) cirkularno polariziranog elektromagnetskog zračenja:

$$\Delta A = A_L - A_D = \varepsilon_L c l - \varepsilon_D c l = c l (\varepsilon_L - \varepsilon_D), \quad (36)$$

gdje je c koncentracija spoja, l duljina optičkog puta, a ε_L i ε_D molarni apsorpcijski koeficijenti molekule koja interagira s lijevo, odnosno desno cirkularno polariziranim elektromagnetskim zračenjem pri određenoj valnoj duljini. Iako se kao odziv metode mjeri ΔA , rezultati mjerenja se zbog povijesnih razloga prikazuju preko eliptičnosti θ . Eliptičnost je definirana kao:

$$\tan \theta = \frac{E_L - E_D}{E_L + E_D}, \quad (37)$$

gdje su E_L i E_D magnitudo vektora električnog polja lijevo, odnosno desno cirkularno polariziranog zračenja. U pravilu je efekt cirkularnog dikroizma mali, stoga se može pisati:

$$\tan \theta \approx \theta. \quad (38)$$

Eliptičnost izražena u stupnjevima računa se na način:

$$\theta = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right). \quad (39)$$

Molarna eliptičnost (ekvivalent molarnom apsorpcijskom koeficijentu) jednaka je:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{cl} = 100\Delta\varepsilon \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right). \quad (40)$$

Kada u reakciji kompleksiranja postoje dvije optički aktivne vrste, primjerice \mathbf{L} i \mathbf{ML}^+ , razlika u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polariziranog zračenja iznosi:

$$\begin{aligned} \Delta A = A_L - A_D &= l(\varepsilon_{L,L}[\mathbf{L}] + \varepsilon_{L,ML^+}[\mathbf{ML}^+]) - l(\varepsilon_{D,L}[\mathbf{L}] + \varepsilon_{D,ML^+}[\mathbf{ML}^+]) = \\ &= l((\varepsilon_{L,L} - \varepsilon_{D,L})[\mathbf{L}] + (\varepsilon_{L,ML^+} - \varepsilon_{D,ML^+})[\mathbf{ML}^+]) = \\ &= l((\varepsilon_{L,L} - \varepsilon_{D,L})c_L - ((\varepsilon_{L,L} - \varepsilon_{D,L}) - (\varepsilon_{D,L} - \varepsilon_{D,ML^+}))[\mathbf{ML}^+]). \end{aligned} \quad (41)$$

Gornja jednadžba slična je jednadžbi (31) stoga je i postupak određivanja konstante stabilnosti nelinearnom regresijom identičan kao i u slučaju spektrofluorimetrije. Ukoliko se mjeri cijeli spektar cirkularnog dikroizma, konstanta stabilnosti određuje se multivarijatom analizom na način opisan u prethodnom poglavlju. Programi za obradu i vizualizaciju podataka identični su onima za obradu spektara spektrofluorimetrijskih titracija.

2.4.5. Simulacije molekulske dinamike (MD)

Simulacije molekulske dinamike (MD simulacije) su računalna metoda kojom se opisuje dinamika sustava tijekom određenog vremena na molekularnoj razini. MD simulacije najčešće se koriste u istraživanjima biomakromolekula, poput proteina ili membrana, vezikula i drugih biomolekulskih sustava čije se strukturne promjene na mikroskopskoj razini odražavaju na makroskopska svojstva koja se mogu eksperimentalno mjeriti. Najčešće se provode pomoću programskih paketa GROMACS,¹⁰⁷ AMBER,¹⁰⁸ NAMD,¹⁰⁹ CHARMM^{110–112} ili OpenMM^{113,114}.

MD simulacije temelje se na numeričkom rješavanju Newtonovih jednadžbi gibanja za N interagirajućih atoma na temelju početnih položaja i brzina atoma (42):

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i; i = 1, 2, \dots, N \quad (42)$$

pri čemu je m_i masa atoma, \mathbf{r}_i radij-vektor položaja atoma, t je vrijeme, a \mathbf{F}_i sila koja djeluje na i -ti atom i računa se kao negativna parcijalna derivacija potencijalne energije po radij-vektoru položaja tog atoma:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}. \quad (43)$$

Ukupna potencijalna energija sustava najčešće se dobiva iz sume veznih (E_{vezne}) i neveznih (E_{nevezne}) interakcija, a ponekad se može dodati član za polarizaciju (E_{pol}) te članovi koji ograničavaju položaje ili udaljenosti određenih atoma (E_{ogr} , engl. *restraints*):

$$V = E_{\text{vezne}} + E_{\text{nevezne}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{ogr}}. \quad (44)$$

Jednadžbe kojima se računaju pojedini energijski doprinosi ovise o polju sila, odnosno o skupu empirijskih funkcija potencijalne energije i pripadajućih parametara koji se koriste za izračunavanje interakcijske potencijalne energije i sila međudjelovanja unutar molekuskog sustava. Najčešće korištena polja sila su OPLS-AA¹¹⁵ (Optimized Potential for Liquid Simulations-All Atom) i CHARMM¹¹⁶ (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics). U vezne interakcije spadaju energije istezanja veza, savijanja kutova i energije torzija koje se u OPLS polju sila računaju preko relacija:

$$E_{\text{vezne}}(\mathbf{r}_N) = \sum_{\text{veze}} K_r (r_{i,j} - r_{\text{eq},i,j})^2 + \sum_{\text{kutovi}} K_\theta (\theta_{i,j,k} - \theta_{\text{eq},i,j,k})^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{V_1^{i,j,k,l}}{2} [1 + \cos(\phi_{i,j,k,l} + f_{i,j,k,l^1})] + \frac{V_2^{i,j,k,l}}{2} [1 - \cos(2\phi_{i,j,k,l} + f_{i,j,k,l^2})] + \frac{V_3^{i,j,k,l}}{2} [1 + \cos(3\phi_{i,j,k,l} + f_{i,j,k,l^3})] \quad (45)$$

gdje su K_r i K_θ konstante sile istezanja veza i savijanja kutova, $r_{i,j}$ i $\theta_{i,j,k}$ su duljine veza, odnosno iznosi kutova, a njihove vrijednosti u ravnotežnom stanju označene su indeksom „eq“. U relaciji koja opisuje energiju torzijskih kutova V_1 , V_2 i V_3 su koeficijenti u Fourierovoj seriji, f_1 , f_2 i f_3 su fazni kutovi, a ϕ je torzijski kut. CHARMM polje sila ima dodatan član za energiju savijanja kutova koji se zove Urey-Bradley potencijal koji je zapravo korekcija energije savijanja kutova s obzirom na udaljenost prvog i zadnjeg atoma u kutu. Osim toga, u tom polju sila energijski profil torzijske rotacije računa se na drugačiji način:

$$E_{\text{vezne}}(\mathbf{r}_N) = \sum_{\text{veze}} K_r (r_{i,j} - r_{\text{eq},i,j})^2 + \sum_{\text{kutovi}} K_\theta (\theta_{i,j,k} - \theta_{\text{eq},i,j,k})^2 + K_\theta^{\text{UB}} (r_{i,k} - r_{\text{eq},i,k})^2 + \sum_{\text{torzije}} K_\phi [1 + \cos(n\phi_{i,j,k,l} - \delta)] \quad (46)$$

gdje su K_θ^{UB} i K_ϕ konstante sila Urey-Bradley potencijala i torzijskih kutova, n je multiplicitet torzija, a δ je fazni pomak. Nevezne interakcije primarno se sastoje od Coulombovog i Lennard-Jonesovog potencijala:

$$E_{\text{nevezne}}(\mathbf{r}_N) = f_{i,j} \left[\sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N 4\epsilon_{i,j} \left[\left(\frac{\sigma_{i,j}}{d_{i,j}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{i,j}}{d_{i,j}} \right)^6 \right] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r d_{i,j}} \right] \quad (47)$$

gdje je ε_{ij} dubina potencijalne jame, σ_{ij} udaljenost pri kojoj je potencijal jednak 0, d_{ij} udaljenost između atoma, q_i i q_j parcijalni naboji atoma, ε_0 permitivnost vakuuma, ε_r relativna permitivnost medija, a $f_{i,j}$ skalirajući faktor koji za 1,4-nevezne interakcije u OPLS-AA polju sila iznosi 0,5 dok za CHARMM iznosi 1.

Prije početka simulacije, početne koordinate i brzine atoma moraju biti poznate. Koordinate atoma se najčešće dobivaju iz eksperimentalno određene strukture, primjerice kristalne strukture ili pomoću programa za generiranje geometrije molekula (Avogadro,¹¹⁷ GaussView¹¹⁸), a početne brzine generiraju se nasumičnim uzorkovanjem iz Maxwell-Boltzmannove distribucije pri željenoj temperaturi. Vektor ukupne sile koja djeluje na neki atom određuje njegovu akceleraciju:

$$\mathbf{a}_i(t) = \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}. \quad (48)$$

Propagacija sustava određena je algoritmom, a najčešće se koristi *velocity Verlet* algoritam. Njime se novi položaj i brzina atoma nakon vremenskog koraka Δt računaju na način:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t)\Delta t^2 \\ \mathbf{v}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{v}_i(t) + \frac{1}{2}[\mathbf{a}_i(t) + \mathbf{a}_i(t + \Delta t)]\Delta t. \end{aligned} \quad (49)$$

Zbog promjene brzine atoma i sila koje djeluju na njih dolazi i do promjene temperature i tlaka sustava ukoliko simulacijska kutija ima pomične stjenke. Stoga se dodatno uvode algoritmi koji održavaju stalnu temperaturu sustava (Berendsen¹¹⁹ i Nosé-Hooverov^{120,121} termostat) i tlak (Berendsen¹¹⁹, Parrinello-Rahman^{122,123} i Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein¹²⁴ barostat).

Kao rezultat MD simulacija dobiva se niz vremenski uređenih konfiguracija sustava u vremenu što se naziva trajektorija. Njenom analizom moguće je dobiti strukturalna i dinamička svojstva promatranih molekula i energije inter- i međumolekulskih interakcija. U slučaju prikladno postavljenih simulacija procesa moguće je odrediti i pripadajuće promjene termodinamičkih veličina sustava, primjerice slobodne energije, uz primjenu odgovarajućih metoda uzorkovanja i analize.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Sinteza

Sve kemikalije korištene u sintezi spojeva su čistoće *p.a.* i nabavljene su od proizvođača Carbolution, Sigma-Aldrich i Fluka. Za sintezu su korištena sljedeća otapala: *N,N*-dimetilformamid (DMF, Fisher Chemical 99,5 %), metanol (MeOH, J. T. Baker, (Ultra) Gradient HPLC Grade), etil-acetat (EtOAc, Gram-Mol *p.a.*). Navedena otapala korištena su bez daljnjeg pročišćavanja, dok je diklormetan (DCM, Fisher Chemical 99,8 %) destilirana prije uporabe. Novi spojevi okarakterizirani su snimanjem ^1H i ^{13}C spektara pomoću spektrometra Bruker Avance III HD 400 MHz, HRMS spektara pomoću masenog spektrometra Termo Fisher *Q extractive ESI orbitrap*, IR Spektara metodom totalne prigušene refleksije (engl. ATR, *attenuated total reflectance*) pri 25 °C na FTIR spektrometru Perkin Elmer Spectrum Two s dijamantnim dodatkom te određivanjem specifične optičke rotacije pomoću polarimetra POLAAR21 tvrtke Optical Activity i tališta pomoću Büchi Melting Point B-540.

3.1.2. Fizikalno-kemijska mjerenja

Otopine kationa korištene u fizikalno-kemijskim mjerenjima pripremljene su otapanjem odvaganih krutina sljedećih soli: tetraetilamonijev klorid (TEACl, Sigma-Aldrich ≥ 98 %), tetrabutilamonijev bromid (TBABr, Sigma-Aldrich $\geq 99,0$ %), tetrabutilamonijev jodid (TBAI, Sigma-Aldrich $\geq 99,0$ %), tetrabutilamonijev dihidrogenfosfat (TBAH₂PO₄, Sigma-Aldrich $\geq 99,0$ %), tetrabutilamonijev hidrogensulfat (TBAHSO₄, Sigma-Aldrich $\geq 99,0$ %), tetrabutilamonijev nitrat (TBANO₃, Sigma-Aldrich 97 %), tetrabutilamonijev tiocijanat (TBASCN, Sigma-Aldrich 98 %), magnezijev perklorat heksahidrat (Mg(ClO₄)₂ × 6H₂O, Sigma-Aldrich 99 %), kalcijev perklorat tetrahidrat (Ca(ClO₄)₂ × 4H₂O, Sigma-Aldrich 99 %), stroncijev perklorat trihidrat (Sr(ClO₄)₂ × 3H₂O, Alfa Aesar 98 %) i barijev perklorat (Ba(ClO₄)₂, Fluka ≥ 98 %). Otapala korištena u fizikalno-kemijskim mjerenjima bila su: acetonitril (MeCN, J. T. Baker, HPLC Gradient Grade), deuterirani acetonitril (CD₃CN, Eurisotop, 99,80 % D), metanol (MeOH, J. T. Baker, (Ultra) Gradient HPLC Grade), deuterirani metanol (CD₃OD, Eurisotop, 99,80 % D), *N,N*-dimetilformamid (DMF, Supelco, *for spectroscopy*), deuterirani *N,N*-dimetilformamid (DMF-*d*₇, Eurisotop, 99,50 % D),

deuterirani dimetil sulfoksid (DMSO-*d*₆, Eurisotop, 99,80 % D). Acetonitril, DMF i sva deuterirana otapala korištena su bez dodatnog pročišćavanja, dok je metanol destiliran prije upotrebe.

3.2. Metode

3.2.1. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

¹H NMR mjerenja provedena su na uređaju Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend opremljenim s 5 mm PA BBI ¹H/D-BB probnom glavom sa z-gradijentom i automatskim ugađanjem. Svi protonski spektri dobiveni su korištenjem 64K podatkovnih točaka, spektralne širine od 20 ppm na temelju 16 snimaka. Eksperimenti su provedeni pri 25 °C na način da se u otopinu peptidnog receptora postupno dodavala otopina iona i peptidnog receptora iste koncentracije kao i u titrandu. Kao interni standard za kemijske pomake protona u slučaju acetonitrila i DMF-a korišten je signal otapala, dok je u slučaju metanola korišten signal TMS-a. Dobiveni spektralni podaci obrađeni su pomoću HypNMR programa.¹⁰⁰

3.2.2. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Mikrokalorimetrijska mjerenja provedena su pomoću izotermnog mikrokalorimetra MicroCal VP-ITC tvrtke Malvern volumena reakcijske ćelije 1,42 cm³. Eksperimenti su provedeni na način da se otopina titransa postupno dodavala u otopinu titranda automatskom biretom pri temperaturi od 25 °C. Izmjerene topline korigirane su za topline razrjeđenja titransa. Dobiveni mikrokalorimetrijski podaci obrađeni su pomoću programa Microcal Origin 7.0 ili HypDH.⁹⁷ Prosječne vrijednosti termodinamičkih parametara kompleksiranja dobivene su iz najmanje tri ponovljena mjerenja.

3.2.3. Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrijska mjerenja provedena su pomoću spektrofluorimetra Cary Eclipse tvrtke Agilent. Eksperimenti su izvedeni na način da se otopina titransa postupno dodavala u kvarcnu kivetu s otopinom titranda pri 25 °C. Spektri su snimani s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 0,4 s. Dobiveni podaci obrađeni su pomoću programa HypSpec.^{103,104} Prosječne vrijednosti konstanti stabilnosti dobivene su iz tri ponovljena mjerenja.

3.2.4. Cirkularni dikroizam (CD)

Mjerenja cirkularnog dikroizma provedena su uz pomoć JASCO J815 spektrofotometra (Halifax, NS, Canada) Eksperimenti su izvedeni na način da se otopina titransa postupno dodavala u kvarcnu kivetu koja je sadržavala otopinu titranda pri 25°C. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina 200 – 300 nm s korakom od 0,2 nm i brzinom snimanja 200 nm/min pri čemu su tri snimanja akumulirana za svaki spektar. Dobiveni podaci obrađeni su pomoću programa HypSpec.^{103,104}

3.2.5. Simulacije molekulske dinamike (MD simulacije)

Simulacije molekulske dinamike provedene su uz pomoć programskog paketa GROMACS (verzija 2021.7, University of Groningen, Royal Institute of Technology, Uppsala University).^{107,125–129} Za opis intramolekulskih i neveznih međumolekulskih interakcija slobodnih peptida i njihovih anionskih kompleksa korišteno je OPLS-AA (Optimized Potential for Liquid Simulations—All Atom) polje sila,¹¹⁵ dok je u slučaju kationskih kompleksa korišteno CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) polje sila.¹³⁰ Početne strukture anionskih, odnosno kationskih kompleksa peptida pripremljene su na način da je ion postavljen u blizinu amidnih protona, odnosno karbonilnih atoma kisika nakon čega je uslijedila *NVT* simulacija u vakuumu. Konačne strukture dobivene tim simulacijama solvatirane su u uravnoteženoj kubičnoj kutiji eksplicitnih molekula otapala duljine stranice 6,5 nm s periodičkim rubnim uvjetima pri čemu su peptidni receptori i njihovi kompleksi bili smješteni u središtu kutije. Koncentracija peptida u tako pripremljenim kutijama bila je otprilike 0,01 mol dm⁻³. Prije same simulacije peptida i njihovih anionskih kompleksa uz rub sustava dodan je tetrametilamonijev kation (TMA⁺) čije je kretanje bilo ograničeno tijekom simulacije. Prije svake simulacije provedena je optimizacija sustava nakon koje je uslijedila *NpT* simulacija u trajanju od 50,5 ns, pri čemu prvih 0,5 ns nije uzeto u obzir u daljnjoj analizi. Integrator korišten za vremensku propagaciju sustava i kontrolu temperature bio je *stochastic dynamic* algoritam¹³¹ s vremenskim korakom od 1 fs. Tijekom simulacije temperatura je održavana na 298 K, a tlak na prosječnoj vrijednosti od 1 bar pomoću Parinello-Rahman barostata.^{122,123} *Cut-off* radijus za nevezne Van der Waalove i Coulombove interakcije kratkog dometa bio je 15 Å, dok su Coulombove interakcije dugog dometa računane pomoću Ewaldove metode implementirane u Particle Mesh Ewald (PME) postupku.¹³² Reprerzentativne strukture slobodnih peptida dobivene su analizom glavnih komponenata (engl. PCA, *Principal*

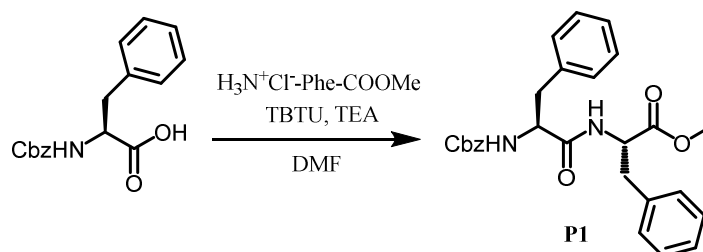
component analysis) na koordinacijskoj matrici čiji su redovi sadržavali intramolekularne udaljenosti između amidnih (ili aaminskih) protona i karbonilnih atoma kisika te kutove između karbonilnih atoma kisika, amidnih (ili aaminskih) protona i pripadajućih atoma dušika. U slučaju kompleksa, redovi koordinacijske matrice sadržavali su udaljenosti i kutove koji opisuju koordinacijsku sferu vezanog iona gdje su kutovi bili definirani preko amidnih dušika i pripadajućih protona u slučaju koordinacije aniona ili karbonilnog dijela amidnih skupina u slučaju vezanja kationa. Strukture najbliže centroidima klastera s najvećom populacijom u prostoru definiranom prvim dvjema glavnim komponentama proglašene su reprezentativnim. Slike molekulskih struktura izrađene su pomoću programa VMD (verzija 1.9.2, University of Illinois).¹³³

3.2.6. Određivanje kristalnih struktura

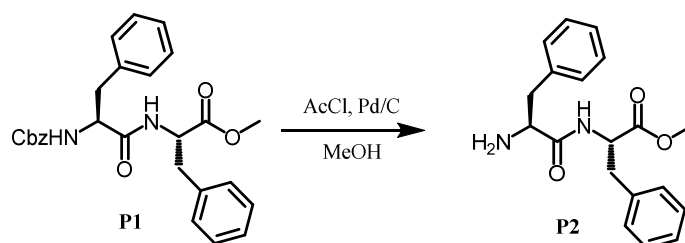
Kristalnu strukturu kompleksa ciklopeptida i kloridnog aniona odredio je prof. dr. sc. Vladimir Stilinović.

3.3. Sinteza spojeva

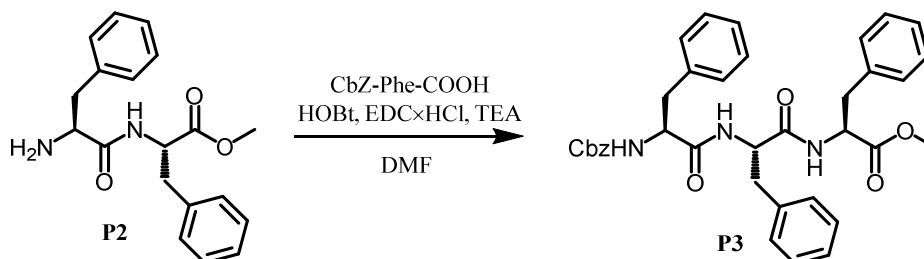
3.3.1. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P1**)



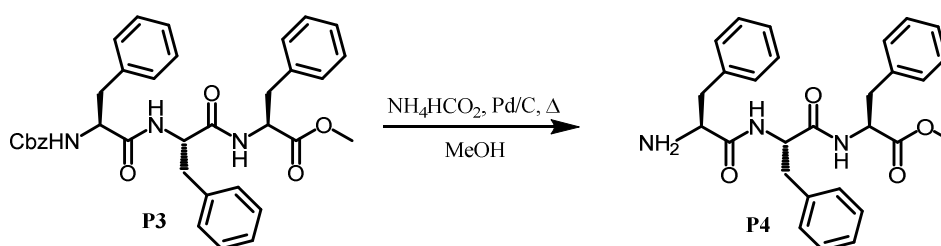
N-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanin (3,50 g, 11,7 mmol) i *L*-fenilalanin metilni ester hidroklorid (2,78 g, 12,9 mmol) otopljeni su u 120 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je TBTU (4,14 g, 12,9 mmol) i TEA (3,26 mL, 23,4 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku, a zatim je pročišćen kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH/DCM (5:95) kao eluensom. Dobiveno je 5,01 g (93 %) spoja **P1**. ¹H NMR spektar (slika D1) poklapa se s literaturno navedenim.¹³⁴

3.3.2. Sinteza *L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P2**)

U tikvicu od 100 mL dodano je 50 mL MeOH nakon čega je tikвица ohlađena na 0 °C, a zatim je dodan AcCl (2 mL, 28,1 mmol), spoj **P1** (1 g, 2,2 mmol) te na kraju Pd/C. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 24 h pod protokom H₂. Nakon toga smjesa profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Dobiveno je 787 mg (kvantitativno) produkta **P2** u obliku hidroklorida. ¹H NMR spektar (slika D2) poklapa se s literaturno navedenim.¹³⁵

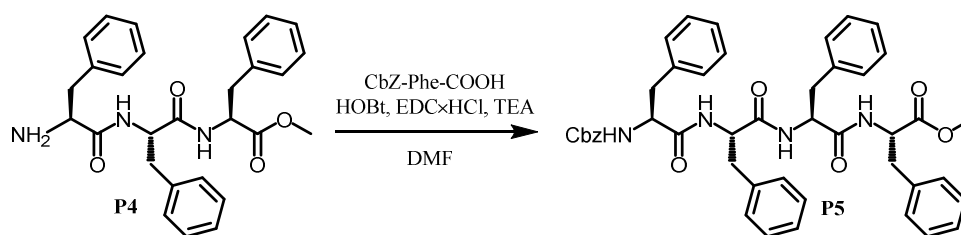
3.3.3. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P3**)

N-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil (4,38 g, 14,3 mmol) i HOBt (2,64 g, 19,6 mmol) otopljeni su u 130 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **P2** (4,25 g, 13,0 mmol), EDCxHCl (3,75 g, 19,6 mmol) i TEA (9,10 mL, 65,2 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 7,25 g (92 %) spoja **P3** korištenog bez daljnjeg pročišćavanja. ¹H NMR spektar (slika D3) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.4. Sinteza *L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P4**)

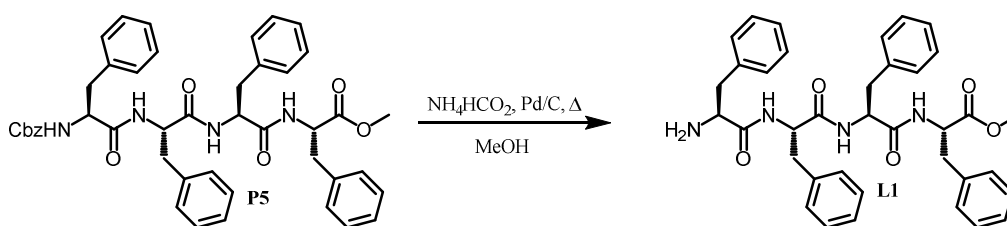
Spoj **P3** (2,00 g, 3,3 mmol) suspendiran je u 150 mL MeOH, a zatim su dodani NH_4HCO_2 (2,08 g, 33,0 mmol) i Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je 3 h uz refluks nakon čega je ohlađena i profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Sirova smjesa pročišćena je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu TEA:MeOH:DCM (0,3:5:94,7) kao eluensom. Dobiveno je 1,55 g (99 %) spoja **P4**. ^1H NMR spektar (slika D4) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.5. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanin metilnog estera (**P5**)



N-benziloksikarbonil-L-fenilalanil (2,03 g, 6,78 mmol) i HOBt (1,25 g, 9,25 mmol) otopljeni su u 70 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **P4** (2,92 g, 6,16 mmol), EDC·HCl (1,77 g, 9,25 mmol) i TEA (4,30 mL, 30,8 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 4,33 g (85 %) spoja **P5** korištenog bez daljnjeg pročišćavanja. ^1H NMR spektar (slika D5) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.6. Sinteza *L*-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanin metilnog estera (**L1**)



Spoj **P5** (4,33 g, 5,7 mmol) suspendiran je u 250 mL MeOH, a zatim su dodani NH_4HCO_2 (3,62 g, 57,4 mmol) i Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je 3 h uz refluks nakon čega je ohlađena i profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Sirova smjesa pročišćena je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu TEA:MeOH:DCM (0,3:5:94,7) kao eluensom. Dobiveno je 3,50 g (99 %) spoja **L1**.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ / ppm: 8,54 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 8,24 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,42 – 6,94 (m, 20H), 4,73 – 4,38 (m, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,31 (dd, $J = 8,7, 4,3$ Hz, 1H), 3,12 – 2,94 (m, 3H), 2,91 (dd, $J = 13,8, 4,6$ Hz, 1H), 2,85 – 2,71 (m, 3H), 2,48 – 2,37 (m, 1H).

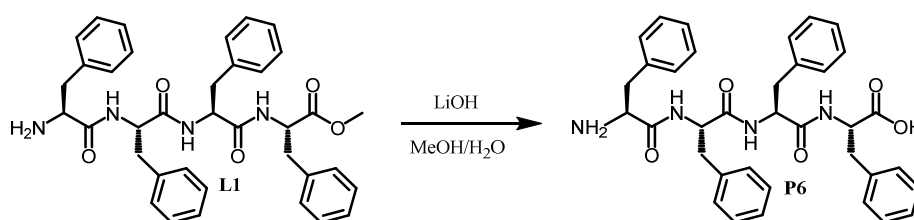
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ / ppm: 174,2, 172,1, 171,6, 171,0, 139,1, 138,1, 137,8, 137,5, 129,9, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 128,8, 128,6, 128,5, 128,3, 127,1, 126,8, 126,7, 126,6, 56,5, 54,1, 54,0, 53,3, 52,3, 41,0, 38,4, 38,1, 37,1.

HRMS (ESI⁺) m/z : $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$] izračunano: 621,3077, nađeno: 621,3065.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3286, 3062, 3026, 2952, 2925, 1737, 1634, 1537, 1496, 1453, 1436, 1389, 1279, 1244, 1216, 1112, 1079, 1028, 951, 916, 893, 844, 826, 786, 746, 697, 621, 563, 492, 415, 404.

α / °C: 158,2 – 158,6; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -22,2^\circ$ (c 0,496, MeOH).

3.3.7. Sinteza *L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanina (**P6**)



Spoj **L1** (470 mg, 0,76 mmol) otopljen je u 6 mL MeOH, a zatim je dodan $\text{LiOH}\times\text{H}_2\text{O}$ (64 mg, 1,52 mmol) otopljen u 2 mL mili-Q H_2O . Reakcijska smjesa miješana je 4 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a sirovoj smjesi dodano je 5 mL HCl (1 mol dm^{-3}) i ekstrahirana je s 3×5 mL EtOAc. Organski slojevi su spojeni, profiltrirani preko vate, a otapalo je upareno. Dobiveno je 386 mg (79 %) spoja **P6** u obliku hidrokloridne soli.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ / ppm: 12,79 (s, $J = 7,7$ Hz, 1H), 8,69 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,41 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,38 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 5,3$ Hz, 3H), 7,33 – 7,10 (m, 20H), 4,67 – 4,55 (m, 2H), 4,49 (dt, $J = 8,1, 5,0$ Hz, 1H), 3,97 (bs, 1H), 3,13 – 2,91 (m, 5H), 2,89 – 2,72 (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 173,1, 171,4, 170,8, 168,2, 138,1, 137,9, 135,2, 130,1, 129,8, 129,8, 129,6, 128,9, 128,7, 128,5, 128,5, 127,5, 126,9, 126,8, 126,7, 54,6, 54,3, 54,0, 53,5, 38,1, 37,3, 37,1.

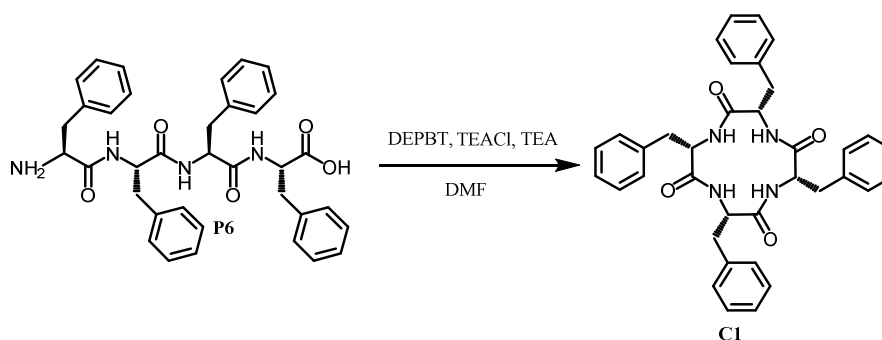
HRMS (ESI⁺) m/z : $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5^+$ [M+H⁺] izračunano: 607,2939, nađeno: 607,2941.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3301

3062, 3029, 2924, 1718, 1693, 1642, 1604, 1525, 1496, 1455, 1444, 1418, 1356, 1217, 1116, 1079, 1030, 975, 917, 800, 746, 699, 605, 564, 530, 493, 474, 461, 454, 449, 437, 420, 405.

α / °C: 141 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 0^\circ$ (c 0,488, MeOH).

3.3.8. Sinteza ciklo-(L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina) (C1)



Spoj **P6** (386 mg, 0,60 mmol) i DEPBT (197 mg, 0,66 mmol) otopljeni su u 300 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (1,49 g, 9,0 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (10:90) kao eluensom. Dobiveno je 46 mg (13 %) spoja **C1**.

Spoj **C1** u obliku kloridnog kompleksa:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 8,65 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,30 – 7,18 (m, 3H), 7,14 – 7,05 (m, 2H), 4,35 – 4,18 (m, 1H), 3,02 – 2,91 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 171,5, 137,3, 129,5, 128,8, 127,0, 57,5, 37,3.

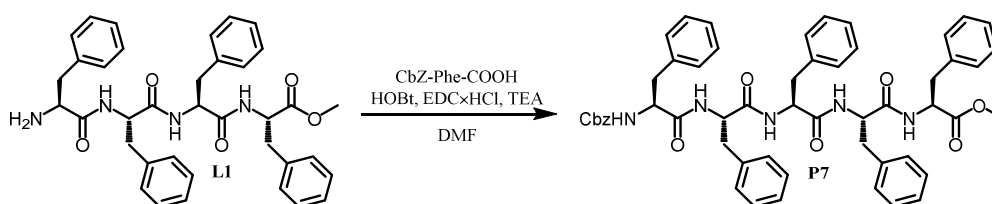
HRMS (ESI⁻) m/z : $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}^-$ [M+Cl⁻] izračunano: 623,2430, nađeno: 623,2380.

Spoj **C1** u slobodnoj formi:

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3384, 3294, 3062, 3028, 2925, 2853, 1669, 1649, 1604, 1529, 1496, 1453, 1382, 1345, 1312, 1262, 1243, 1225, 1124, 1080, 1031, 990, 950, 915, 891, 873, 843, 806, 776, 749, 732, 695, 670, 613, 584, 549, 498, 477, 417.

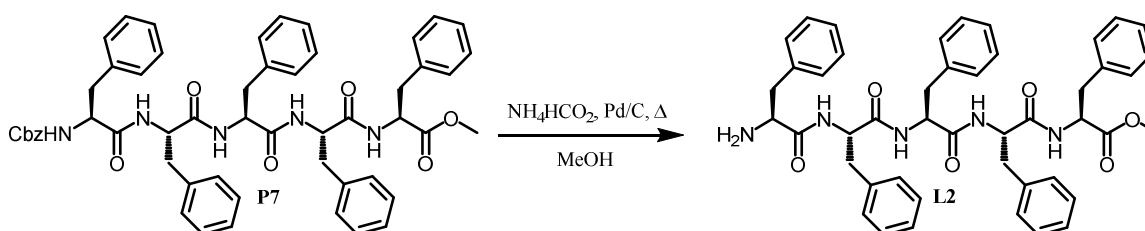
α / °C: 244 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -135,5^\circ$ (c 0,502, DMSO).

3.3.9. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P7**)



N-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil (1,06 g, 3,54 mmol) i HOBt (653 mg, 4,83 mmol) otopljeni su u 32 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **L1** (2,00 g, 3,22 mmol), EDC·HCl (926 mg, 4,83 mmol) i TEA (3,1 mL, 22,0 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 2,68 g spoja **P7** korištenog bez daljnjeg pročišćavanja. ^1H NMR spektar (slika D17) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.10. Sinteza *L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**L2**)



Spoj **P7** (3,00 g, 3,33 mmol) suspendiran je u 250 mL MeOH, a zatim su dodani NH_4HCO_2 (2,10 g, 33,3 mmol) i Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je 3 h uz reflux nakon čega je ohlađena i profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Sirova smjesa pročišćena je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu TEA:MeOH:DCM (0,3:7,5:92,2) kao eluensom. Dobiveno je 2,25 g (kvantitativno) spoja **L2**.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,52 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,93 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,43 – 6,84 (m, 25H), 4,62 (dd, *J* = 8,4, 5,1 Hz, 1H), 4,57 – 4,44 (m, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,30 (dd, *J* = 8,8, 4,4 Hz, 1H), 3,13 – 2,65 (m, 9H), 2,49 – 2,39 (m, 1H).

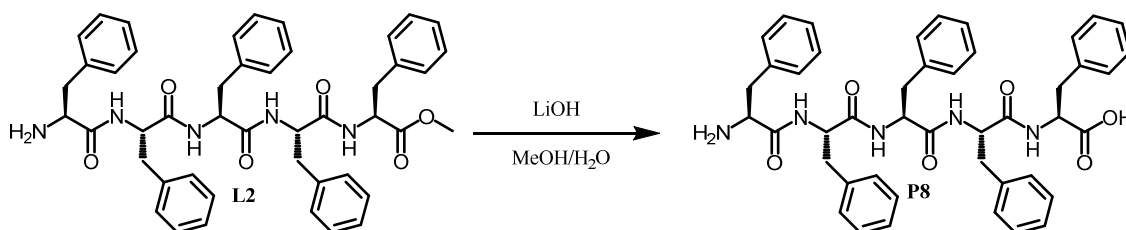
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 174,2, 172,1, 171,4, 171,2, 171,0, 139,1, 138,1, 137,9, 137,8, 137,5, 129,9, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 128,8, 128,6, 128,5, 128,5, 128,3, 128,0, 127,0, 126,8, 126,7, 126,6, 126,6, 56,5, 54,1, 54,0, 53,3, 52,3, 41,0, 38,3, 38,1, 38,1, 37,1.

HRMS (ESI⁺) *m/z*: C₄₆H₅₀N₅O₆⁺ [M+H⁺] izračunano: 768,3761, nađeno: 768,3764.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3275, 3062, 3028, 2922, 2855, 1743, 1634, 1538, 1495, 1454, 1440, 1393, 1350, 1285, 1216, 1117, 1079, 1030, 965, 916, 880, 844, 818, 793, 743, 696, 586, 562, 495, 422, 407.

α / °C: 200 - raspad; $[\alpha]_D^{22} = -30,3^\circ$ (c 0,495, MeOH).

3.3.11. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**P8**)



Spoj **L2** (500 mg, 0,65 mmol) otopljen je u 15 mL MeOH, a zatim je dodan LiOH×H₂O (62 mg, 1,48 mmol) otopljen u 5 mL mili-Q H₂O. Reakcijska smjesa miješana je 6 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a sirovoj smjesi dodano je 15 mL HCl (1 mol dm⁻³). Nastali talog profiltriran je preko sintera, ispran s 15 mL HCl (1 mol dm⁻³) i 50 mL mili-Q H₂O. Dobiveno je 463 mg (90 %) spoja **P8** u obliku hidrokloridne soli.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,83 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,40 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,36 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,28 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H), 7,41 – 7,10 (m, 25H), 4,68 – 4,39 (m, 5H), 3,25 – 2,65 (m, 10H).

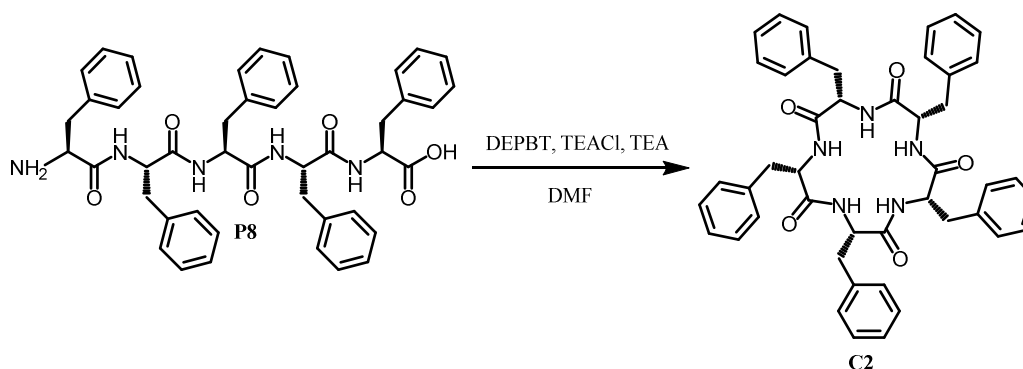
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 173,1, 171,6, 171,2, 170,8, 168,11, 138,2, 138,0, 137,9, 135,2, 130,2, 129,8, 129,7, 129,6, 129,6, 128,8, 128,7, 128,5, 128,4, 127,4, 126,9, 126,7, 126,6, 54,9, 54,6, 54,5, 54,1, 53,7, 38,0, 37,9, 37,1.

HRMS (ESI⁺) m/z : C₄₅H₄₈N₅O₆⁺ [M+H⁺] izračunano: 754,3605, nađeno: 754,3611.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3301, 3062, 3029, 2924, 1718, 1693, 1642, 1604, 1525, 1496, 1455, 1444, 1418, 1356, 1217, 1116, 1079, 1030, 975, 917, 800, 746, 699, 605, 564, 530, 493, 474, 461, 454, 449, 437, 420, 405.

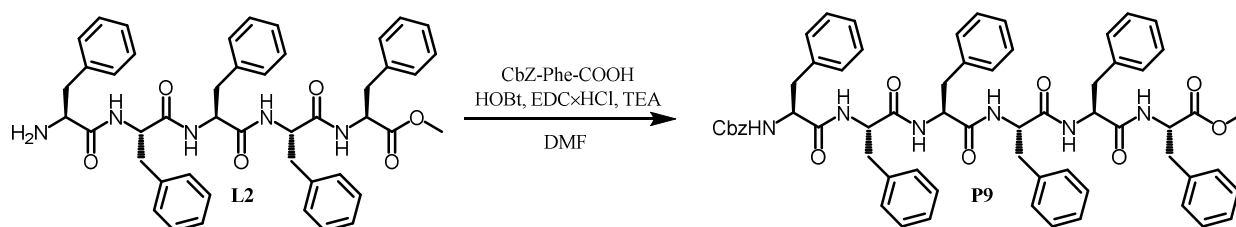
α / °C: 195 - raspad; $[\alpha]_D^{22} = -22,0^\circ$ (c 0,501, MeOH).

3.3.12. Sinteza ciklo-(*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanila) (**C2**)



Spoj **P8** (480 mg, 0,61 mmol) i DEPBT (449 mg, 1,5 mmol) otopljeni su u 500 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (1,01 g, 6,1 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (10:90) kao eluensom. Dobiveno je 302 mg (67 %) spoja **C2**. ¹H NMR spektar (slika D24) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.13. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**P9**)



N-benziloksikarbonil-*L*-fenilalanil (485 mg, 1,62 mmol) i HOBt (300 mg, 2,22 mmol) otopljeni su u 15 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **L2** (1,00 g, 1,30 mmol), EDCxHCl (426 mg, 2,22 mmol) i TEA (1,0 mL, 7,39 mmol).

Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 1,30 g spoja **P9** korištenog bez daljnjeg pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,51 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,34 – 6,85 (m, 35H), 5,13 – 4,81 (m, 2H), 4,69 – 4,40 (m, 5H), 4,19 (ddd, *J* = 10,9, 8,8, 3,8 Hz, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,11 – 2,88 (m, 6H), 2,87 – 2,65 (m, 5H), 2,59 (dd, *J* = 14,0, 10,9 Hz, 1H).

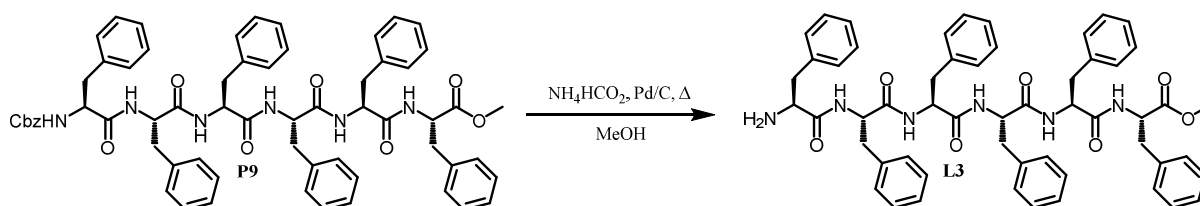
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 172,1, 171,6, 171,4, 171,1, 171,03, 156,1, 138,6, 138,0, 138,0, 137,9, 137,5, 129,7, 129,7, 129,6, 129,5, 128,8, 128,5, 128,4, 128,4, 128,1, 127,8, 127,0, 126,7, 126,6, 65,6, 56,5, 54,1, 54,1, 54,0, 53,9, 52,3, 38,1, 38,1, 37,9, 37,1.

HRMS (ESI⁺) *m/z*: C₆₃H₆₄N₆O₉Na⁺ [*M*+Na⁺] izračunano: 1071,4627, nađeno: 1071,4612.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3268, 3063, 3029, 2925, 2855, 1744, 1699, 1635, 1532, 1496, 1454, 1440, 1396, 1286, 1253, 1221, 1135, 1115, 1081, 1044, 1029, 915, 844, 794, 769, 742, 695, 622, 590, 560, 487, 432.

***n*_D²⁰ / °C:** 215 - raspad; [α]_D²² = 0° (c 0,499, DMSO).

3.3.14. Sinteza *L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanil-*L*-fenilalanin metilnog estera (**L3**)



Spoj **P9** (1,40 g, 1,33 mmol) suspendiran je u 100 mL MeOH, a zatim su dodani NH₄HCO₂ (839 mg, 13,3 mmol) i Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je 3 h uz refluks nakon čega je ohlađena i profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Sirova smjesa pročišćena je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu TEA:MeOH:DCM (0,3:10:89,7) kao eluensom. Dobiveno je 1,20 g (kvantitativno) spoja **L3**.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ / ppm: 8,51 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 8,08 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,66 – 6,82 (m, 30H), 4,78 – 4,28 (m, 5H), 3,57 (s, 3H), 3,30 (dd, $J = 8,7, 4,3$ Hz, 1H), 3,15 – 2,62 (m, 11H), 2,41 (dd, $J = 13,5, 8,8$ Hz, 1H).

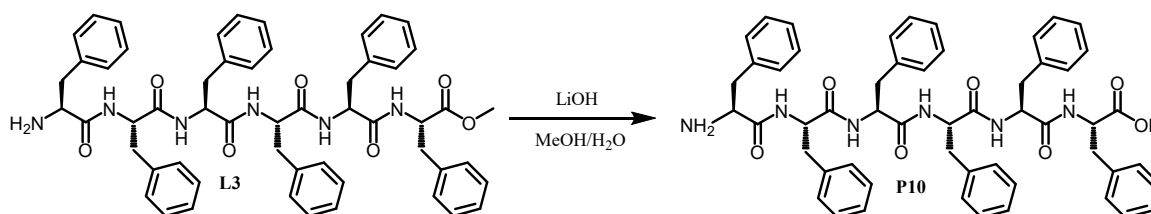
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ / ppm: 174,1, 172,1, 171,4, 171,2, 171,1, 171,0, 139,0, 138,2, 138,0, 137,9, 137,8, 137,4, 129,8, 129,8, 129,7, 129,5, 128,8, 128,6, 128,5, 128,5, 128,3, 127,0, 126,7, 126,7, 126,6, 56,5, 54,2, 54,1, 54,0, 53,3, 52,3, 40,9, 38,3, 38,1, 38,1, 38,0, 37,1.

HRMS (ESI⁺) m/z : $\text{C}_{55}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_7^+$ [M+H⁺] izračunano: 915,4440, nađeno: 915,4421.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3272, 3062, 3029, 2925, 2857, 1949, 1881, 1741, 1635, 1585, 1539, 1496, 1454, 1439, 1394, 1279, 1240, 1218, 1199, 1115, 1080, 1030, 956, 916, 875, 845, 792, 742, 696, 622, 589, 561, 488, 434.

α / °C: 198 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +10,2^\circ$ (c 0,488, DMSO).

3.3.15. Sinteza L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (**P10**)



Spoj **L3** (500 mg, 0,65 mmol) otopljen je u 15 mL MeOH, a zatim je dodan $\text{LiOH}\times\text{H}_2\text{O}$ (62 mg, 1,48 mmol) otopljen u 5 mL mili-Q H_2O . Reakcijska smjesa miješana je 6 h na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a sirovoj smjesi dodano je 15 mL HCl (1 mol dm^{-3}). Nastali talog profiltriran je preko sintera, ispran s 15 mL HCl (1 mol dm^{-3}) i 50 mL mili-Q H_2O . Dobiveno je 463 mg (90 %) spoja **P10**.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ / ppm: 8,53 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 8,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,29 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 8,24 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,42 – 6,93 (m, 30H), 4,66 – 4,49 (m, 4H), 4,45 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,73 (dd, $J = 8,3, 4,5$ Hz, 1H), 3,09 (td, $J = 12,6, 5,0$ Hz, 2H), 3,04 – 2,88 (m, 5H), 2,89 – 2,62 (m, 5H).

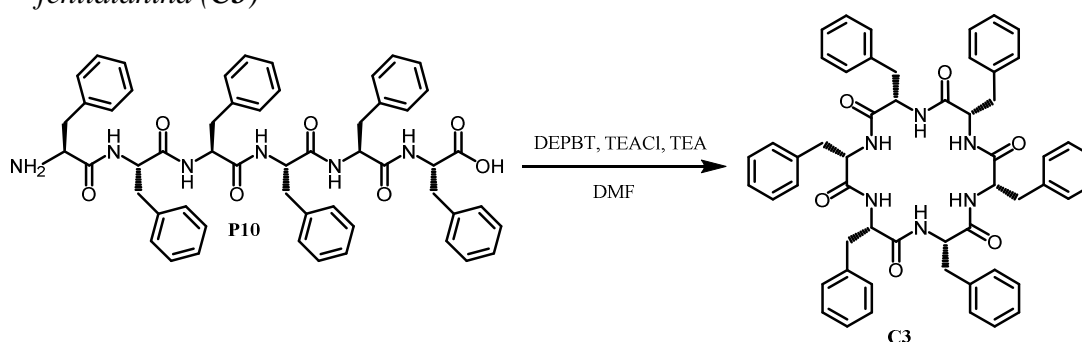
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 173,3, 171,2, 171,1, 171,1, 170,9, 170,4, 138,2, 138,1, 138,0, 136,7, 130,0, 129,8, 129,7, 128,8, 128,6, 128,5, 128,4, 127,2, 126,8, 126,7, 126,6, 54,7, 54,3, 54,2, 38,7, 38,2, 38,1, 38,0, 37,3.

HRMS (ESI⁺) m/z : $\text{C}_{54}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7^+$ [M+H⁺] izračunano: 901,4284, nađeno: 901,4314.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3281, 3061, 3027, 1694, 1630, 1509, 1494, 1453, 1442, 1396, 1355, 1279, 1224, 1078, 1030, 914, 825, 744, 696, 594, 564, 496, 437, 408.

ρ / °C: 202 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +6,0^\circ$ (c 0,499, DMSO).

3.3.16. Sinteza ciklo-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (C3)



Spoj **P10** (613 mg, 0,65 mmol) i DEPBT (305 mg, 1,0 mmol) otopljeni su u 340 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (1,69 g, 10,2 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (10:90) kao eluensom. Dobiveno je 136 mg (13 %) spoja **C3**.

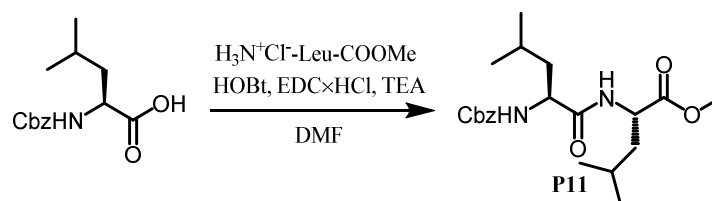
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 8,23 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,35 – 7,01 (m, 5H), 4,13 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,13 – 2,80 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 171,3, 138,6, 129,5, 128,7, 126,7, 56,3, 36,6.

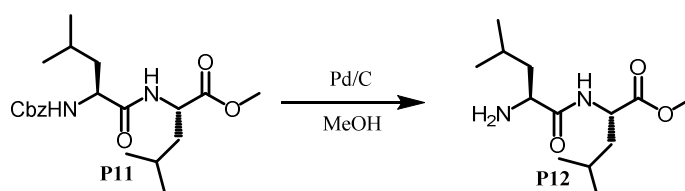
HRMS (ESI⁺) m/z : $\text{C}_{54}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_6^+$ [M+H⁺] izračunano: 883,4178, nađeno: 883,4213.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3284, 3061, 3028, 2924, 1645, 1584, 1515, 1495, 1454, 1441, 1333, 1231, 1156, 1113, 1080, 1030, 916, 846, 743, 697, 621, 560, 487.

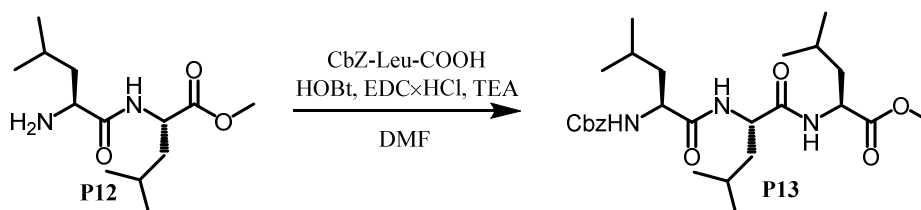
ρ / °C: 121 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -137,7^\circ$ (c 0,501, MeOH).

3.3.17. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P11**)

N-benziloksikarbonil-*L*-leucin (5,084 g, 19,16 mmol) i HOBt (3,884 g, 28,74 mmol) otopljeni su u 200 mL DMF-a. Smjesa je ohlađena na 0 °C nakon čega je dodan *L*-leucin metilni ester hidroklorid (5,222 g, 28,74 mmol), EDC·HCl (5,509 g, 28,74 mmol) te nakon 5 minuta TEA (10,7 ml, 76,65 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je ona ukoncentrirana *in vacuo*, ohlađena na 0 °C te je zatim dokapavana ohlađena voda uz jako miješanje pri čemu produkt taloži. Talog je profiltriran, posušen i pročišćen kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu EtOAc:DCM (1:3) kao eluens. Dobiveno je 3,366 g (45 %) produkta **P11**. ¹H NMR spektar (slika D37) poklapa se s literaturno navedenim.¹³⁶

3.3.18. Sinteza *L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P12**)

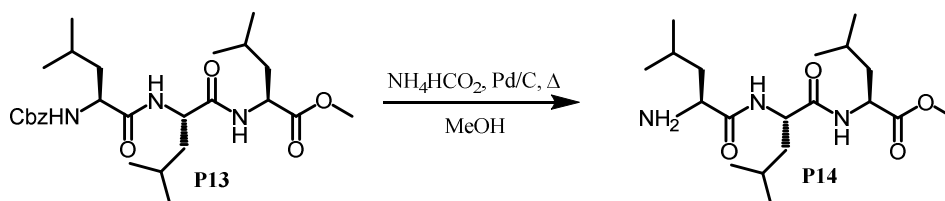
U tikvicu od 500 mL dodano je 200 mL MeOH nakon čega je ona ohlađena na 0 °C. Zatim je dodano 5,97 mL AcCl (84,1 mmol), a nakon toga spoj **P11** (3,30 g, 8,41 mmol) i 5% Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je 24 h na sobnoj temperaturi uz stalan protok H₂, a zatim je profiltrirana preko celita, a otapalo je upareno. Dobiveno je 2,454 g (99 %) produkta **P12** u obliku hidroklorida korištenog u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja. ¹H NMR spektar (slika D38) poklapa se s literaturno navedenim.¹³⁷

3.3.19. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P13**)

N-benziloksikarbonil-*L*-leucin (2,433 g, 9,17 mmol) i HOBt (1,690 g, 12,51 mmol) otopljeni su u 100 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj

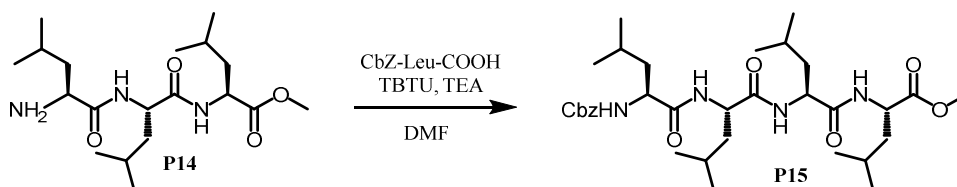
P12 (2,156 g, 8,34 mmol), EDC×HCl (2,398 g, 12,51 mmol) i TEA (5,8 ml, 41,7 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom, osušen na zraku i pročišćen kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (5:95) kao eluens. Dobiveno je 2,649 g (63 %) produkta **P13**. ¹H NMR spektar (slika D39) poklapa se s literaturno navedenim.

3.3.20. Sinteza *L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P14**)



Spoj **P13** (2,649 g, 5,24 mmol) otopljen je u 125 mL MeOH nakon čega su dodani NH₄HCO₂ (1,322 g, 20,96 mmol) te 5% Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je uz refluks 2 sata nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu i profiltrirana preko celita, a otapalo upareno. Dobiveno je 1,881 g (97 %) produkta **P14** korištenog u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja. ¹H NMR spektar (slika D40) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.21. Sinteza *N*-benziloksikarbonil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P15**)



N-benziloksikarbonil-*L*-leucin (2,029 g, 6,78 mmol) i spoj **P14** (1,88 g, 5,06 mmol) otopljeni su u 70 mL DMF-a. Smjesa je ohlađena na 0 °C nakon čega je dodan TEA (1,4 mL, 10,12 mmol) i, u malim obrocima, TBTU (1,79 g, 5,57 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je ona ukoncentrirana *in vacuo*, ohlađena na 0 °C te je zatim dokapavana ohlađena voda uz jako miješanje pri čemu produkt taloži. Dobiveno je 2,872 g (92 %) čistog produkta **P15** korištenog dalje bez pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,15 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,93 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,43 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,40 – 7,20 (m, 5H), 5,03 (s, 2H), 4,39 – 4,20 (m, 3H), 4,10 – 3,97 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 1,70 – 1,52 (m, 5H), 1,52 – 1,32 (m, 7H), 0,96 – 0,76 (m, 24H).

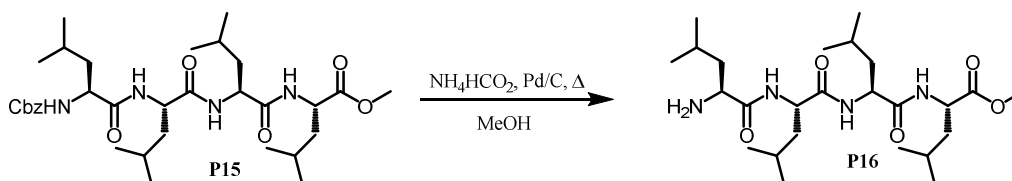
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 173,2, 172,6, 172,4, 171,9, 156,4, 137,6, 128,8, 128,2, 128,1, 65,8, 53,6, 52,3, 51,3, 51,1, 50,5, 41,3, 41,2, 40,1, 24,6, 24,6, 24,5, 24,5, 23,5, 23,3, 22,3, 22,2, 22,0, 21,6.

HRMS (ESI⁺) *m/z*: C₃₃H₅₅N₄O₇⁺ [M+H⁺] izračunano: 619,4065, nađeno: 619,4072.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3267, 3072, 2955, 2933, 2871, 1746, 1705, 1667, 1638, 1533, 1468, 1454, 1438, 1387, 1368, 1340, 1259, 1231, 1209, 1158, 1121, 1081, 1045, 1028, 978, 923, 872, 826, 778, 735, 696, 608, 481.

α / °C: 194,8 – 195,5; [α]_D²² = -58,1° (c 0,499, MeOH).

3.3.22. Sinteza *L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucin metilnog estera (**P16**)



Spoj **P15** (1,238 g, 2,00 mmol) otopljen je u 50 mL MeOH nakon čega su dodani NH₄HCO₂ (504 mg, 7,99 mmol) te 5% Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je uz refluks 2 sata nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu i profiltrirana preko celita, a otapalo upareno. Dobiveno je 969 mg (kvantitativno iskorištenje) produkta **P16** korištenog u sljedećem koraku bez dodatnog pročišćavanja.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,18 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,39 – 4,31 (m, 2H), 4,31 – 4,22 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,17 (dd, *J* = 8,8, 5,3 Hz, 1H), 1,75 – 1,67 (m, 1H), 1,66 – 1,52 (m, 4H), 1,52 – 1,34 (m, 6H), 1,24 – 1,14 (m, 1H), 0,95 – 0,76 (m, 24H).

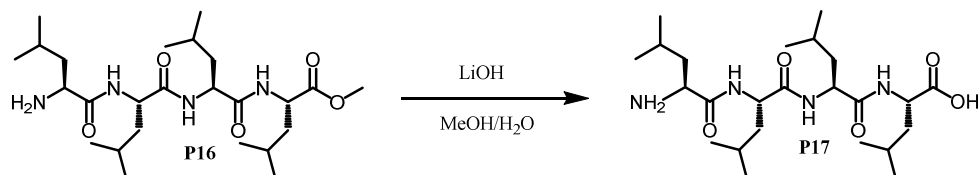
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 175,9, 173,2, 172,4, 172,1, 53,5, 52,2, 51,0, 50,9, 50,6, 44,8, 41,7, 41,2, 40,1, 24,6, 24,6, 24,5, 23,7, 23,5, 23,4, 23,3, 22,4, 22,3, 21,6.

HRMS (ESI⁺) m/z : C₂₅H₄₉N₄O₅⁺ [M+H⁺] izračunano: 485,3697, nađeno: 485,3727.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3277, 3075, 2955, 2934, 2871, 1748, 1635, 1544, 1467, 1450, 1437, 1386, 1368, 1277, 1256, 1203, 1158, 1101, 1024, 983, 922, 871, 823, 783, 693, 593, 480.

α / °C: 171,2 – 171,5; [α]_D²² = -57,9° (c 0,501, MeOH).

3.3.23. Sinteza L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucina (**P17**)



Spoj **P16** (502 mg, 1,04 mmol) otopljen je u 9 mL MeOH, a zatim je dodan LiOH×H₂O (87 mg, 2,08 mmol) otopljen u 3 mL mili-Q H₂O. Reakcijska smjesa miješana je 6 h na sobnoj temperaturi. Metanol je uparen, a sirovoj smjesi dodano je 15 mL HCl (1 mol dm⁻³). Talog je profiltriran preko sintera, ispran s 15 mL HCl (1 mol dm⁻³) i 50 mL mili-Q H₂O. Dobiveno je 527 mg (kvantitativno) spoja **P17** u obliku hidrokloridne soli.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 12,49 (s, 1H), 8,58 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,12 (bs, 3H), 8,01 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,49 – 4,40 (m, 1H), 4,40 – 4,30 (m, 1H), 4,26 – 4,17 (m, 1H), 3,77 (bs, 1H), 1,73 – 1,55 (m, 4H), 1,55 – 1,40 (m, 8H), 0,96 – 0,74 (m, 24H).

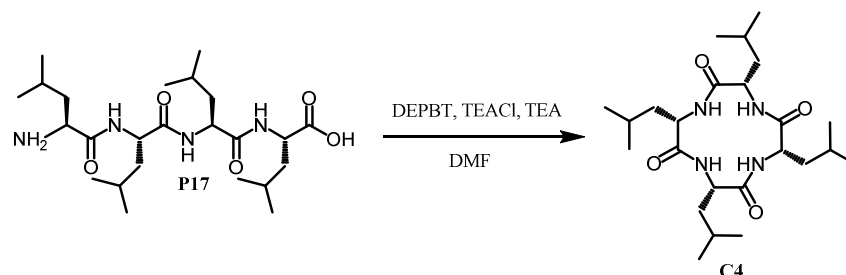
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 174,3, 172,2, 171,5, 169,0, 51,5, 51,1, 50,5, 41,4, 41,2, 40,8, 24,7, 24,5, 24,4, 24,0, 23,6, 23,4, 23,4, 23,0, 22,8, 22,4, 22,0, 21,7.

HRMS (ESI⁺) m/z : C₂₄H₄₇N₄O₅⁺ [M+H⁺] izračunano: 471,3541, nađeno: 471,3545.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3325, 3272, 3063, 2957, 2934, 2912, 2872, 2665, 1717, 1688, 1670, 1638, 1554, 1510, 1467, 1439, 1413, 1387, 1368, 1326, 1311, 1268, 1237, 1216, 1200, 1171, 1154, 1089, 1030, 1007, 946, 861, 826, 780, 714, 668, 642, 594, 565, 528, 513, 487, 474, 460, 438, 420, 410, 405.

α / °C: 198 - raspad; [α]_D²² = -44,6° (c 0,493, MeOH).

3.3.24. Sinteza ciklo-(L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucina) (C4)



Spoj **P17** (659 mg, 1,30 mmol) i DEPBT (428 mg, 1,43 mmol) otopljeni su u 700 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (4,143 g, 25 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 4 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (5:95) kao eluensom. Dobiveno je 118 mg (20 %) spoja **C4**.

Spoj **C4** u obliku kloridnog kompleksa:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 8,26 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 4,43 – 4,06 (m, 1H), 1,79 – 1,39 (m, 3H), 0,90 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H), 0,85 (d, $J = 5,9$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 172,58, 54,45, 40,09, 25,29, 22,72, 22,38.

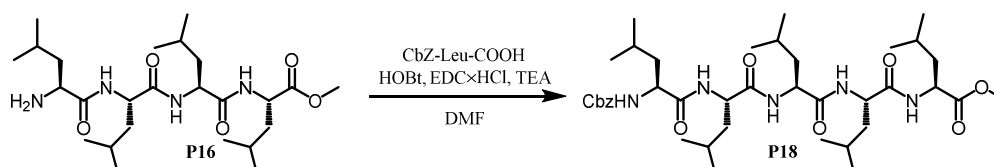
HRMS (ESI⁺) m/z : C₂₄H₄₅N₄O₄⁺ [M+H⁺] izračunano: 453,3435, nađeno: 453,3451.

Spoj **C4** u slobodnoj formi:

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3311, 2957, 2932, 2871, 1667, 1655, 1519, 1468, 1387, 1367, 1323, 1309, 1289, 1256, 1218, 1171, 1154, 1127, 1086, 978, 942, 923, 872, 820, 778, 643, 559, 452.

α / °C: > 300; $[\alpha]_D^{22} = -155,9^\circ$ (c 0,494, MeOH).

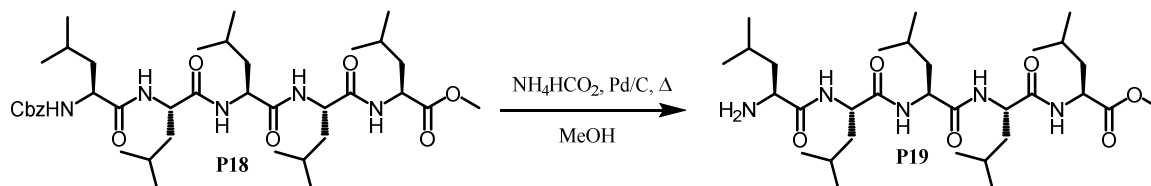
3.3.25. Sinteza N-benziloksikarbonil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucin metilnog estera (P18)



N-benziloksikarbonil-L-leucin (584 mg, 2,20 mmol) i HOBt (405 mg, 3,00 mmol) otopljeni su u 25 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **P16**

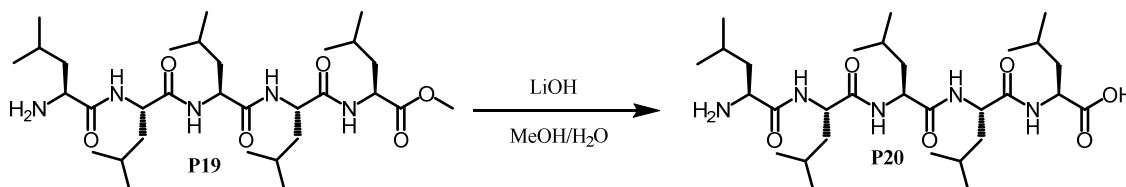
(969 mg, 2,00 mmol), EDC×HCl (575 mg, 3,00 mmol) i TEA (1,4 mL, 10,00 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 1,354 g (92 %) produkta **P18** korištenog dalje bez pročišćavanja. ¹H NMR spektar (slika D55) poklapa se s literaturno navedenim.

3.3.26. Sinteza L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucin metilnog estera (**P19**)



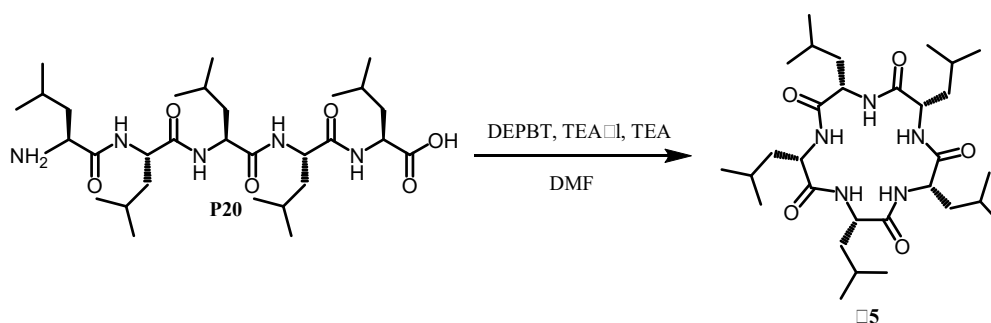
Spoj **P18** (3,000 g, 3,33 mmol) otopljen je u 250 mL MeOH nakon čega su dodani NH₄HCO₂ (2,097 g, 33,26 mmol) te 5% Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je uz refluks 3 sata nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu i profiltrirana preko celita, a otapalo upareno. Smjesa je pročišćena kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu TEA:MeOH:DCM (0,3:7,5:92,2) kao eluensom. Dobiveno je 2,252 g (89 %) produkta **P19**. ¹H NMR spektar (slika D56) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.27. Sinteza L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucina (**P20**)



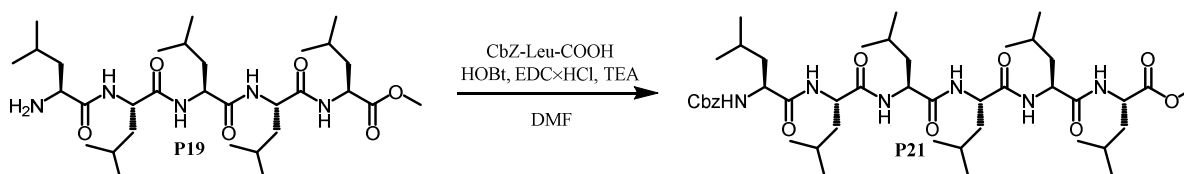
Spoj **P19** (426 mg, 0,71 mmol) otopljen je u 9 mL MeOH, a zatim je dodan LiOH×H₂O (60 mg, 1,44 mmol) otopljen u 3 mL mili-Q H₂O. Reakcijska smjesa miješana je 3 h na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa zakiseljena je s 1 mL HCl (5 mol L⁻¹), a nastali litijev klorid uklonjen je filtracijom preko sintera i ispran s 10 mL MeOH. Filtrat je uparen te je dobiveno 413 mg (kvantitativno) spoja **P20**. ¹H NMR spektar (slika D57) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.28. Sinteza ciklo-(L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucina) (C5)



Spoj **P20** (413 mg, 0,71 mmol) i DEPBT (233 mg, 0,78 mmol) otopljeni su u 500 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (1,176 g, 7,1 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (10:90) kao eluensom. Dobiveno je 102 mg (28 %) spoja **C5**. ^1H NMR spektar (slika D58) poklapa se s literaturno navedenim.⁴⁸

3.3.29. Sinteza N-benziloksikarbonil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucin metilnog estera (P21)



N-benziloksikarbonil-L-leucin (541 mg, 2,04 mmol) i HOBt (376 mg, 2,78 mmol) otopljeni su u 20 mL DMF-a nakon čega je smjesa ohlađena na 0 °C. U ohlađenu smjesu dodan je spoj **P19** (1,106 g, 1,85 mmol), EDC·HCl (533 mg, 2,78 mmol) i TEA (1,3 mL, 9,25 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 24 h na sobnoj temperaturi, a zatim je dokapavana voda ohlađena na 0 °C prilikom čega taloži produkt. Talog je profiltriran preko sintera, ispran vodom i osušen na zraku. Dobiveno je 1,446 g (92 %) produkta **P21** korištenog dalje bez pročišćavanja.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 8,13 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,83 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,41 – 7,24 (m, 5H), 5,03 (s, 2H), 4,41 – 4,18 (m, 5H), 4,12 – 3,98 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 1,76 – 1,30 (m, 18H), 0,99 – 0,62 (m, 36H).

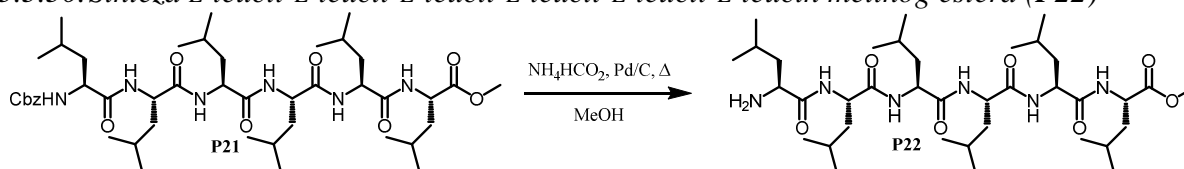
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 173,2, 172,7, 172,4, 172,2, 172,0, 171,8, 156,4, 137,5, 128,8, 128,2, 128,1, 65,8, 53,7, 52,3, 51,4, 51,3, 51,0, 50,6, 41,3, 41,1, 41,1, 24,6, 24,6, 24,5, 24,5, 23,5, 23,5, 23,3, 22,2, 22,1, 22,0, 21,7.

HRMS (ESI⁺) m/z : C₄₅H₇₇N₆O₉⁺ [M+H⁺] izračunano: 845,5747, nađeno: 845,5760.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3264, 3087, 2955, 2931, 2871, 1745, 1705, 1674, 1628, 1539, 1467, 1455, 1438, 1405, 1387, 1368, 1277, 1259, 1234, 1214, 1156, 1123, 1082, 1049, 1028, 922, 871, 826, 785, 697, 640, 610, 484, 417.

α / °C: 252 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -44,6^\circ$ (c 0,493, MeOH).

3.3.30. Sinteza L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucin meilnog estera (P22)



Spoj **P21** (1,045 g, 1,23 mmol) otopljen je u 50 mL MeOH nakon čega su dodani NH₄HCO₂ (252 mg, 4,00 mmol) te 5% Pd/C. Reakcijska smjesa miješana je uz refluks 4 sata nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu prilikom čega nastaje talog koji je otopljen dodatkom 0,5 mL HCl (5 mol dm⁻³). Otopina je profiltrirana preko celita, a otapalo upareno. Talog je zatim ispran s 2 × 10 mL NaHCO₃ (zas.) i 5 × 10 mL mili-Q H₂O pa osušen na zraku. Dobiveno je 0,874 g (kvantitativno) produkta **P22** korištenog dalje bez pročišćavanja.

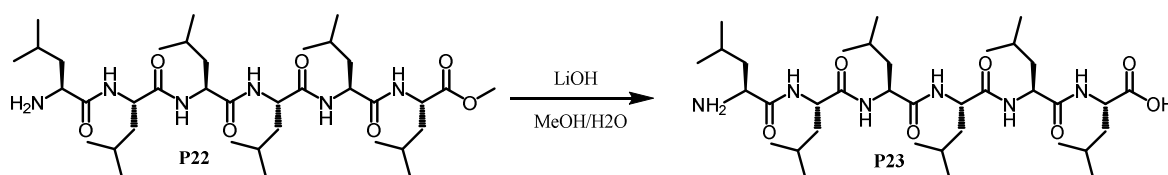
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 8,46 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,56 – 4,16 (m, 5H), 3,67 – 3,62 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 1,78 – 1,33 (m, 18H), 0,98 – 0,76 (m, 36H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 173,2, 172,4, 171,9, 171,8, 171,7, 170,2, 52,3, 51,5, 51,4, 51,3, 51,0, 50,6, 41,5, 41,4, 41,2, 41,0, 24,6, 24,5, 24,5, 24,5, 24,1, 23,5, 23,5, 23,5, 23,3, 23,2, 22,6, 22,4, 22,2, 22,2, 22,0, 21,7.

HRMS (ESI⁺) m/z : C₃₇H₇₁N₆O₇⁺ [M+H⁺] izračunano: 711,5379, nađeno: 711,5387.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3265, 3084, 2954, 2931, 2870, 1744, 1688, 1627, 1544, 1467, 1437, 1403, 1387, 1368, 1277, 1258, 1240, 1211, 1156, 1027, 921, 870, 826, 785, 709, 600, 565, 550, 511, 487, 474, 461, 449, 444, 437, 420, 410, 405.

α / °C: 202 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -45,9^\circ$ (c 0,501, DMSO).

3.3.31. Sinteza *L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucil-*L*-leucina (**P23**)

Spoj **P22** (402 mg, 0,54 mmol) otopljen je u 150 mL MeOH, a zatim je dodan LiOH×H₂O (116 mg, 2,76 mmol) otopljen u 50 mL mili-Q H₂O. Reakcijska smjesa miješana je 8 h na 50 °C nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu, a zatim je dodano 700 μL HCl (5 mol dm⁻³) za neutralizaciju reakcijske smjese i prevođenje produkta u hidrokloridnu sol. Otapala su uparena, talog prebačen na sinter i ispran s 5×10 mL mili-Q H₂O i osušen na zraku. Dobiveno je 377 mg (95 %) spoja **P23** u obliku hidrokloridne soli.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 8,63 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,25 (d, *J* = 5,3 Hz, 3H), 8,19 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,87 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,47 – 4,38 (m, 1H), 4,37 – 4,26 (m, 3H), 4,24 – 4,16 (m, 1H), 3,83 – 3,73 (m, 1H), 1,78 – 1,32 (m, 18H), 0,96 – 0,75 (m, 36H).

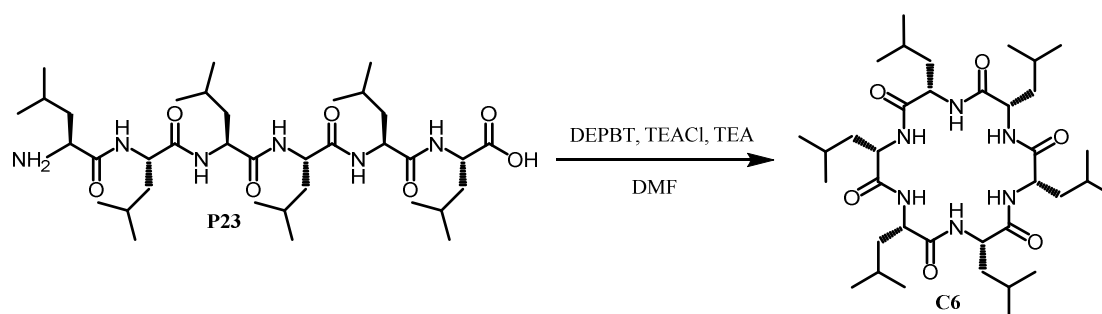
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm: 174,3, 172,2, 171,9, 171,8, 171,6, 169,0, 51,5, 51,3, 51,1, 51,1, 50,5, 41,4, 41,2, 41,0, 40,8, 24,6, 24,5, 24,4, 24,0, 23,6, 23,5, 23,5, 23,4, 23,0, 22,7, 22,4, 22,2, 22,0, 21,7.

HRMS (ESI⁺) *m/z*: C₃₆H₆₉N₆O₇⁺ [M+H⁺] izračunano: 697,5223, nađeno: 697,5264.

ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 3266, 3086, 2956, 2931, 2871, 1721, 1690, 1629, 1544, 1467, 1439, 1387, 1368, 1278, 1259, 1239, 1215, 1154, 1000, 921, 871, 826, 785, 708, 600, 482, 414.

α / °C: 145 - raspad; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -65,7^{\circ}$ (c 0,502, MeOH).

3.3.32. Sinteza ciklo-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucil-L-leucina (C6)



Spoj **P23** (367 mg, 0,50 mmol) i DEPBT (197 mg, 0,66 mmol) otopljeni su u 500 mL DMF-a, a zatim su dodani TEACl (829 mg, 5,00 mmol) i TEA do pH 8. Reakcijska smjesa miješana je 3 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ukoncentrirana na rotacijskom uparivaču nakon čega je dokapavana voda do pojave taloga. Talog je profiltriran, ispran vodom i osušen na zraku. Pročišćen je kromatografijom na koloni sa silikagelom uz smjesu MeOH:DCM (10:90) kao eluensom. Dobiveno je 112 mg (33 %) spoja **C6**.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 7,89 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 4,21 – 3,97 (m, 1H), 1,83 – 1,40 (m, 3H), 0,90 (d, $J = 5,7$ Hz, 3H), 0,86 (d, $J = 5,7$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ / ppm: 171,8, 52,8, 40,2, 24,8, 23,5, 22,0.

HRMS (ESI $^+$) m/z : $\text{C}_{36}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_6^+$ [M+H $^+$] izračunano: 679,5117, nađeno: 679,5161.

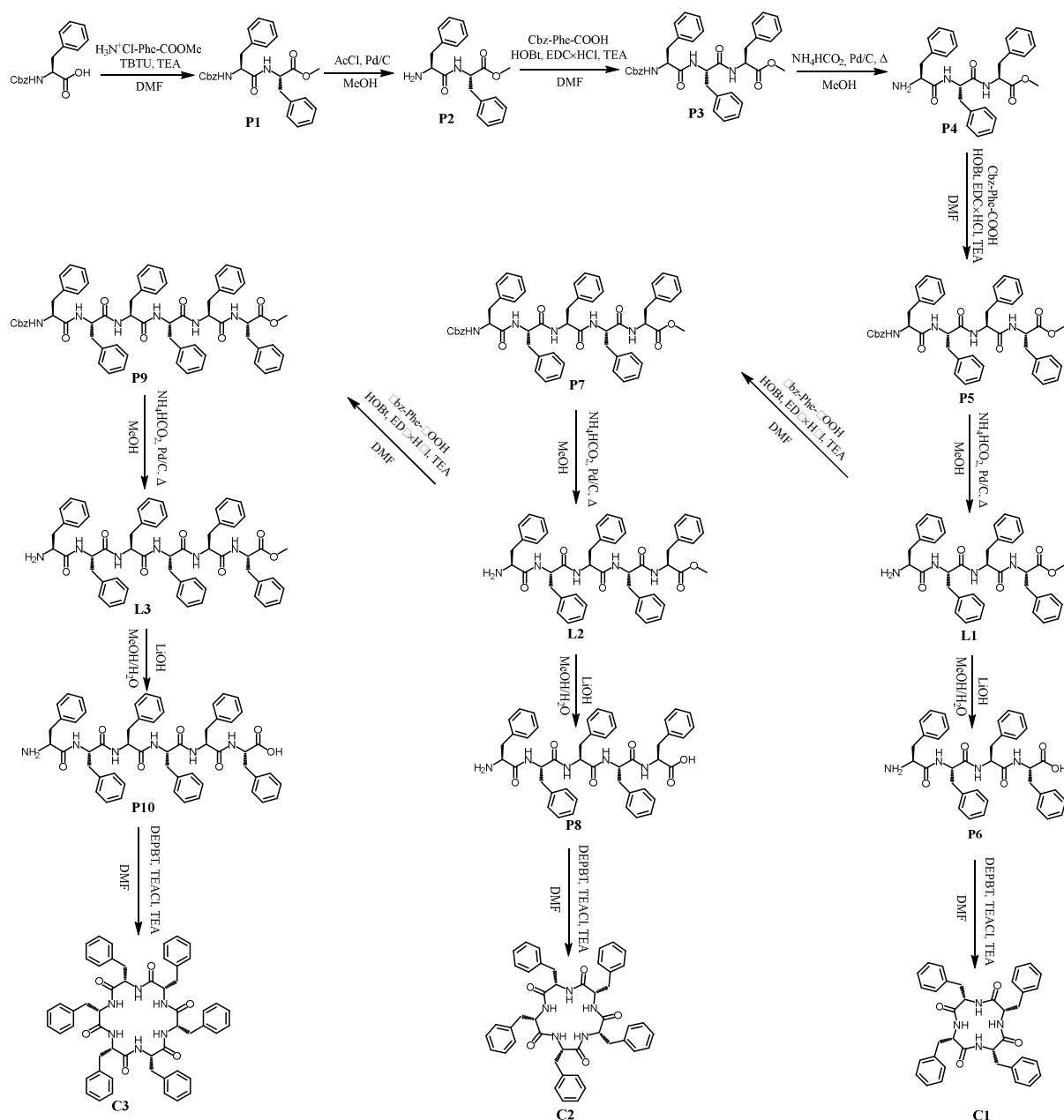
ATR-IR $\tilde{\nu}$ / cm^{-1} : 3289, 3073, 2956, 2932, 2871, 1643, 1526, 1468, 1386, 1368, 1331, 1259, 1218, 1170, 1126, 922, 869, 827, 666, 575, 473, 404.

α / $^\circ\text{C}$: 107,5–108,4; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -65,2^\circ$ (c 0,414, MeOH).

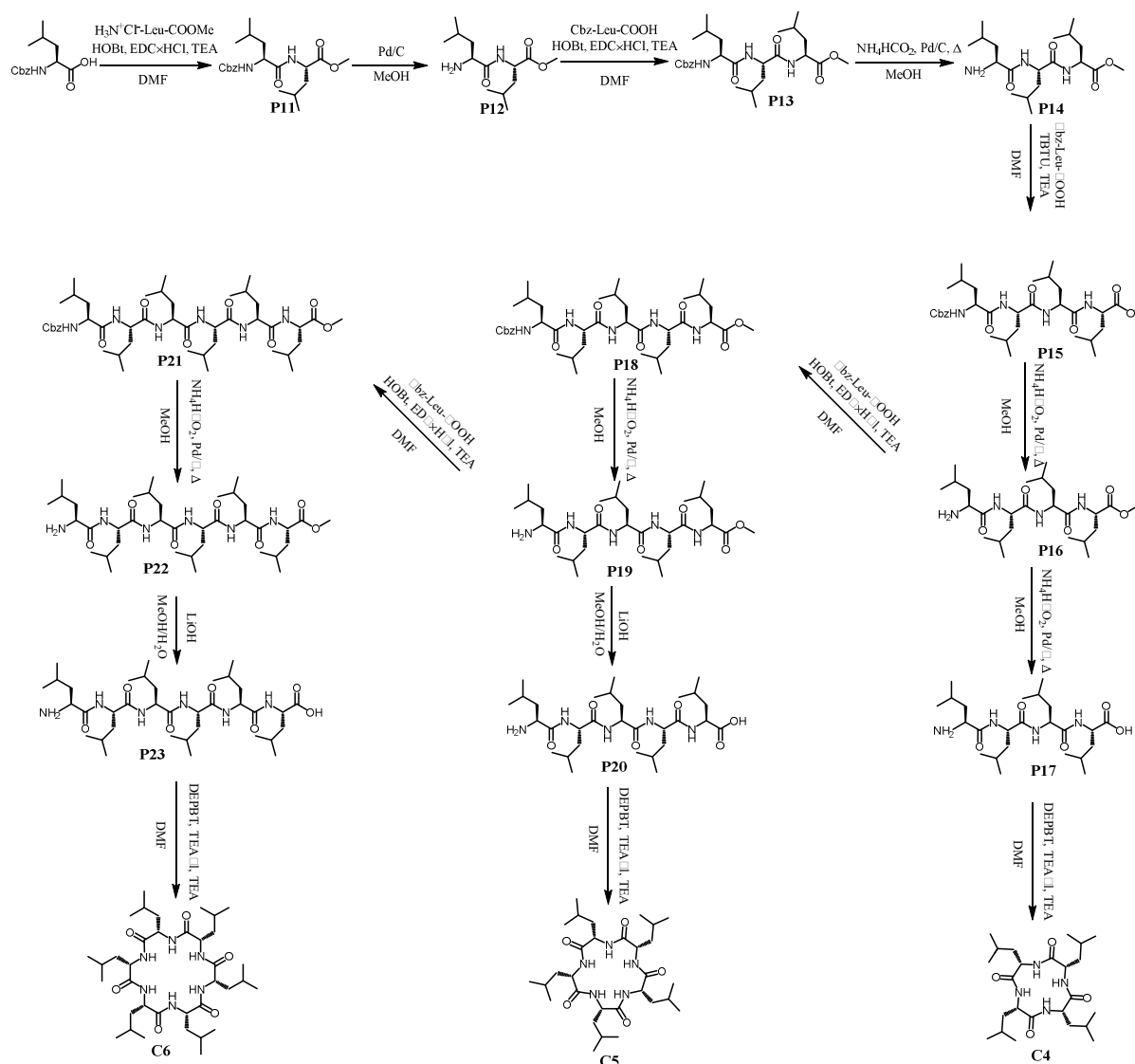
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza linearnih i cikličkih homopeptida

Sintetski putevi dobivanja linearnih i cikličkih homopeptida prikazani su na shemama 1 i 2.



Shema 1. Sintetski put dobivanja linearnih peptida L1-L3 i ciklopeptida C1-C3.



Shema 2. Sintetski put dobivanja ciklopeptida C4–C6.

Sinteza je krenula od *coupling* reakcije između aminokiseline zaštićene *N*-benziloksikarbonil skupinom na *N*- kraju i metilnog estera iste aminokiseline. Kao *coupling* reagensi korišteni su HOBt/EDCxHCl ili TBTU, no kako su oba sustava najčešće davala iskorištenje < 90 % većinom je zbog provjerene pouzdanosti koraka korišten prvi. Nakon dobivanja dipeptida zaštićenog s obje strane uslijedilo je uklanjanje *N*-benziloksikarbonil zaštitne skupine hidrogeniranjem čije je iskorištenje gotovo uvijek bilo < 95 %. U slučaju peptida koji su dobro topljivi u metanolu, ta reakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz stalan protok H₂, dok je u slučaju duljih, slabije topljivih peptida u metanolu korišteno transfer hidrogeniranje na refluxu uz pomoć NH₄HCO₂. Upravo je zbog topljivosti potpuno zaštićenog peptida odabran pristup C- prema N- sintezi. Drugi pristup, N- prema C- zahtijeva hidrolizu metilnog estera

koja, ako se provodi pri višim temperaturama, dovodi do raspada peptida. Reakcija makrociklizacije provedena je uz DEPBT kao *coupling* reagens koji se u literaturi pokazao kao najbolji reagens za makrociklizaciju na sličnim sustavima.⁴⁸ U ovoj reakciji korišten je TEACl kao izvor kloridnih iona koji se mogu vezati na peptid i na taj način potaknuti reorganizaciju i približavanje krajeva peptida kako bi intramolekulska reakcija bila povoljnija od intermolekulske. Iz istog je razloga reakcija dodatno provedena u velikom razrjeđenju. Iskorištenje makrociklizacije je, zbog nusprocesa epimerizacije i oligomerizacije bilo nisko, pogotovo u slučaju ciklotetrapeptida gdje mora doći do nastanka prstena od samo četiri aminokiselinska ostatka.

Osim klasičnog produljenja peptida za jednu aminokiselinu isprobane su još i *coupling* reakcije nastajanja tetrapeptida iz dva dipeptida, sinteze pentapeptida iz tripeptida i dipeptida te heksapeptida iz dva tripeptida. Ove su reakcije bile nižih iskorištenja ($\approx 60\%$) zbog visokog stupnja epimerizacije i nastanka drugih stereoizomera.

Priprava ciklotetrapeptida **C1** i **C4** bila je vrlo zahtjevna, ne samo zbog malih iskorištenja makrociklizacije, nego i zbog karakterizacije spojeva. Naime, u ¹H NMR spektru tih spojeva u DMSO-u bilo je prisutno nekoliko skupova signala (slike D12 i D50) što čini interpretaciju spektra kompleksnom. Dodatkom 1,7 ekvivalenta TEACl signali u NMR spektru konvergiraju u jedan skup (slike D14 i D52), što je pokazatelj prisutnosti samo jedne vrste nakon dodatka soli. Na temelju tog opažanja može se zaključiti da je uzrok pojave više skupova signala ravnoteža među geometrijskim izomerima pripremljenih peptida u otopini. Geometrijska izomerizacija peptidne veze moguća je u slučaju ciklopeptida s malim brojem aminokiselina zbog napetosti prstena,¹³⁸ što je pokazano i MD simulacijama.¹³⁹ Prilikom nastanka kloridnog kompleksa sve peptidne veze prelaze u jedan geometrijski izomer koji je prikladniji za koordinaciju aniona, stoga je u ¹H NMR spektru prisutan samo jedan skup signala.

4.2. Ion-receptorska svojstva linearnih homofenilalaninskih peptida

4.2.1. Kompleksi peptida L1, L2 i L3 s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu

Istraživanje kompleksiranja linearnih fenilalaninskih peptida **L1**, **L2** i **L3** s anorganskim anionima u acetonitrilu pomoću spektroskopskih metoda provele su Lucija Glazer i Lucija Otmačić pod neposrednim voditeljstvom Matije Modrušana. Rezultati fizikalno-kemijskih mjerenja su objavljeni¹⁴⁰ i objedinjeni u tablici 1.

Tablica 1. Sukcesivne konstante stabilnosti nastajanja kompleksa L-anion u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.¹⁴⁰

Anion	L:A ⁻	log $K \pm$ SE		
		L1	L2	L3
Cl ⁻	1:1	2,24 ^a	2,60 ^a	2,59 ^a
		2,23 ^b	2,79 ^b	1,82 ^b
		2,49 ^c	2,21 ^c	2,55 ^c
Br ⁻	1:1	1,51 ^a	1,76 ^a	1,90 ^a
		1,59 ^b	1,83 ^b	1,92 ^b
		1,67 ^c	0,95 ^c	2,30 ^c
HSO ₄ ⁻	1:1	3,71 ^a	3,77 ^a	4,13 ^a
		3,39 ^b	3,65 ^b	4,13 ^b
		3,71 ^c	3,77 ^c	4,13 ^c
	1:2	2,45 ^a	2,48 ^a	2,65 ^a
		2,27 ^b	2,90 ^b	3,02 ^b
2,07 ^c	2,82 ^c	3,01 ^c		
H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	4,39 ^a	4,39 ^a	4,48 ^a
		4,45 ^a	4,08 ^b	5,48 ^b
		4,32 ^c	5,16 ^c	4,54 ^c
	1:2	3,86 ^a	3,86 ^a	4,11 ^a
		3,13 ^c	3,98 ^b	4,28 ^b
3,27 ^c	3,74 ^c			
NO ₃ ⁻	1:1	0,73 ^a	1,02 ^a	1,14 ^a
		1,28 ^b	1,40 ^b	1,56 ^b

Određeno: ^a ¹H NMR, ^b spektrofluorimetrija, ^c cirkularni dikroizam.
SE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$).

Rezultati pokazuju da u nizu halogenidnih aniona sva tri peptida najbolje vežu kloridni anion, dok vezanje jodidnog aniona nije primijećeno. Oksoanioni, poput hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog vežu se jače nego halogenidni anioni s pripadajućim konstantama stabilnosti za nastajanje 1:1 kompleksa koje su za približno dva reda veličine veće. Osim kompleksa tipa 1:1 opaženo je i nastajanje 1:2 (peptid:anion) kompleksa, što u slučaju H_2PO_4^- nije neuobičajeno jer je poznato da taj ion u slobodnoj formi dimerizira u organskim otapalima,^{91,92} a prilikom vezanja na cikličke peptide može stvarati dimere,⁹⁵ trimere¹⁴¹ pa čak i tetramere.⁹⁴ S druge strane, HSO_4^- anion ne stvara dimere u otopini, ali se može vezati na već kompleksirani hidrogensulfatni ion.^{142–144} Afinitet peptida prema nitratnom anionu je najmanji od svih. Iz tablice 1 može se primijetiti da u većini slučajeva afinitet linearnih peptida ne ovisi znatno o duljini lanca što znači da su anioni termodinamički kompatibilni s veznim mjestom tetra-, penta- i heksafenilalaninskog peptida. S obzirom na to da dulji peptidi imaju na raspolaganju veći broj skupina za interakciju s anionima, najvjerojatnije je da dolazi do entalpijsko-entropijske kompenzacije, odnosno entalpijski je povoljnije što peptid ima veći broj skupina kojima može interagirati, no to znači i da dolazi do većeg nepovoljnog doprinosa prilikom reorganizacije duljih peptida oko aniona. Kako bi se potvrdila navedena pretpostavka, napravljene su ITC titracije koje su pružile uvid u entalpijski i entropijski doprinos standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja.

Na slici 25 prikazan je rezultat mikrokalorimetrijske titracija peptida **L1** s Cl^- ionom dok su rezultati titracija s H_2PO_4^- i HSO_4^- , kao i rezultati titracija peptida **L2** i **L3** s navedenim solima prikazane na slikama D71–D78.. ITC titracije peptida s TBABr i TBANO₃ nisu mogle biti pouzdano obrađene zbog niskih konstanti stabilnosti i velikih toplina razrjeđenja titransa. Rezultati dobiveni obradom ITC titracija prikazani su u tablici 2.

Iz tablice je vidljivo da je nastajanje kloridnog kompleksa popraćeno entalpijski povoljnim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja u slučaju svih triju peptida. Standardne reakcijske entalpije nastajanja L1Cl^- i L2Cl^- su slične iako peptid **L2** ima jednu amidnu grupu više u okosnici peptida. Entropijski doprinos je povoljniji u slučaju duljeg peptida **L2** što je, uz sličan entalpijski doprinos, neočekivano. Takav odnos termodinamičkih reakcijskih veličina upućuje na moguće razlike u strukturama i jačini intramolekulskih interakcija slobodnih peptida, te utjecaju otapala, odnosno procesa i stupnja desolvatacije peptida i aniona prilikom kompleksiranja. S druge strane, izrazito povoljan entalpijski, a

nepovoljan entropijski doprinos nastajanja $\mathbf{L3Cl}^-$ vjerojatno je posljedica dodatne amidne skupine i većeg gubitka stupnjeva slobode prilikom reorganizacije duljeg peptida $\mathbf{L3}$.

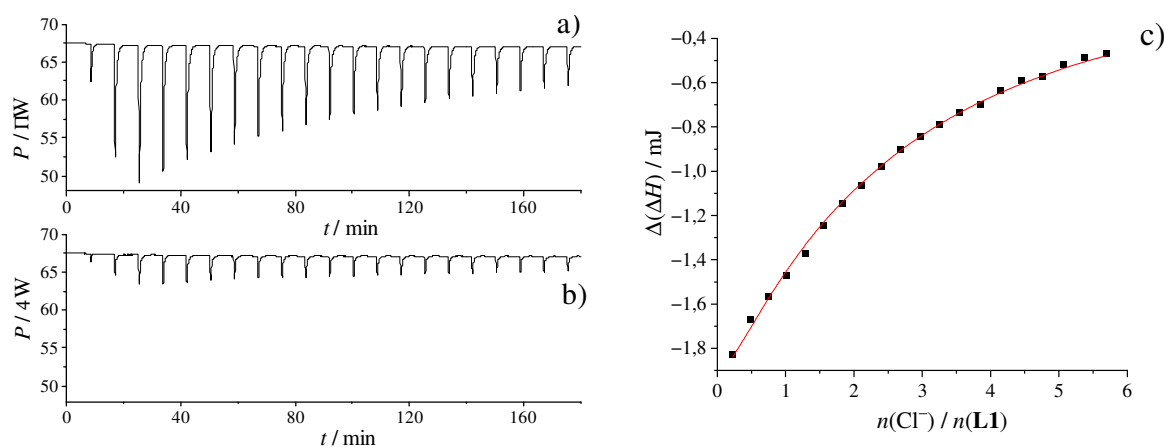
Tablica 2. Sukcesivni termodinamički parametri vezanja aniona na peptide $\mathbf{L1}$, $\mathbf{L2}$ i $\mathbf{L3}$ u acetonitrilu pri 25 °C dobiveni obradom ITC titracija.

Peptid	Anion	L:A ⁻	log $K \pm$ SE	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
L1	Cl ⁻	1:1	2,35 ± 0,03	-13,4 ± 0,2	-10,4 ± 0,8	10 ± 3
		1:2	3,71 ± 0,01	-21,17 ± 0,05	-11,42 ± 0,02	32,7 ± 0,2
	HSO ₄ ⁻	1:1	2,56 ± 0,01	-14,63 ± 0,02	-40,1 ± 0,7	-85 ± 2
		1:2	3,77 ± 0,02	-21,5 ± 0,1	-25,2 ± 0,3	-12 ± 1
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	3,36 ± 0,03	-19,2 ± 0,2	-21,8 ± 0,4	-9 ± 2
		1:2	2,65 ± 0,04	-15,1 ± 0,2	-9,5 ± 0,6	19 ± 3
L2	Cl ⁻	1:1	3,77 ± 0,05	-21,5 ± 0,3	-30 ± 1	-30 ± 3
		1:2	2,78 ± 0,03	-15,9 ± 0,2	-20 ± 2	-15 ± 7
	HSO ₄ ⁻	1:1	4,11 ± 0,01	-23,43 ± 0,05	-31,9 ± 0,4	-28 ± 1
		1:2	3,477 ± 0,004	-18,84 ± 0,02	-23,3 ± 0,2	-12 ± 1
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	2,23 ± 0,05	-12,7 ± 0,3	-24 ± 3	-39 ± 12
		1:2	4,13 ± 0,02	-23,6 ± 0,1	-25,1 ± 0,3	-5 ± 1
L3	HSO ₄ ⁻	1:1	3,05 ± 0,01	-17,40 ± 0,04	-36,2 ± 0,6	-63 ± 2
		1:2	4,62 ± 0,05	-26,4 ± 0,3	-27 ± 1	-3 ± 4
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	3,90 ± 0,02	-22,2 ± 0,1	-30,7 ± 0,5	-28 ± 2
		1:2				

SE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$)

Iako su konstante stabilnosti kompleksa \mathbf{LHSO}_4^- i $\mathbf{L(HSO}_4)_2^-$ slične za sve peptide, entalpijski i entropijski doprinosi se razlikuju. Nastajanje oba tipa kompleksa su entalpijski kontrolirani procesi za sve peptide, s time da je nastajanje kompleksa tipa 1:1 entalpijski najpovoljnije u slučaju pentapeptida $\mathbf{L2}$, a isti efekt je zapažen kod 1:2 tipa u slučaju heksapeptida $\mathbf{L3}$. Entropijski doprinos za nastajanje kompleksa tipa 1:1 varira među peptidima, što je vjerojatno posljedica istih efekata kao i u slučaju kloridnih kompleksa. Vezanje drugog hidrogensulfata popraćeno je entalpijski povoljnim i entropijski vrlo nepovoljnim doprinosom standardnoj

Gibbsovoj energiji kompleksiranja što se barem djelomično može pripisati gubitku translacijskih stupnjeva slobode aniona.



Slika 25. a) Mikrokolorimetrijska titracija **L1** ($c = 1,03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokolorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Rezultati ITC titracija pokazuju da je stabilnost 1:1 kompleksa peptida i DHP aniona slična u usporedbi s hidrogensulfatnim anionom, dok je vezanje drugog DHP aniona povoljnije nego u slučaju HSO_4^- . Umjerena preferencija prema DHP anionu u slučaju duljih peptida vidljiva je u porastu konstante stabilnosti za oba tipa kompleksa. Iako su sve reakcije entalpijski kontrolirane, termodinamički parametri nastajanja 1:1 tipa kompleksa s DHP ionom ne mogu se korelirati s duljinom peptida. Reakcija kompleksiranja je najegzotermnija u slučaju peptida **L2** (kao i kod hidrogensulfatnog aniona), dok reakcijska entropija najviše doprinosi stabilnosti **L3HSO₄⁻** kompleksa. S druge strane, reakcijska entalpija vezanja dodatnog DHP aniona raste s duljinom lanca, a entropijski doprinos postaje nepovoljniji.

U MD simulacijama slobodnog peptida u acetonitrilu uočeno je stvaranje intramolekulskih vodikovih veza pri čemu je u simulaciji s **L1** zapaženo 0,9 veza u prosjeku, 1,5 u slučaju peptida **L2** i 2,3 u slučaju peptida **L3**. Njihova prisutnost znatno utječe na termodinamiku kompleksiranja i to na dva načina: entalpijski jer se te vodikove veze moraju prekinuti prilikom vezanja aniona i entropijski zbog strukturiranja slobodnog peptida u odnosu na onog u kompleksu. Što se tiče anionskih kompleksa liganada **L1**, **L2** i **L3**, provedena je strukturna analiza dobivenih trajektorija čiji su rezultati dani u tablici 3. Kontakti između peptida i aniona ostvaruju se preko amidnih iaminskih skupina okosnice koje interagiraju s kisikovim atomima

oksoaniona. U svim kompleksima prosječno jedan aaminski vodik interagira s anionom, dok broj amidnih vodikovih veza varira ovisno o duljini peptida. Vidljivo je da nema značajne razlike između ukupnog broja kontakata s anionima u pojedinom ligandu što znači da intramolekulske vodikove veze i desolvatacija uvelike određuju stabilnost nastalih kompleksa te da se linearni peptidi mogu prilagoditi raznim veličinama i oblicima aniona koje vežu.

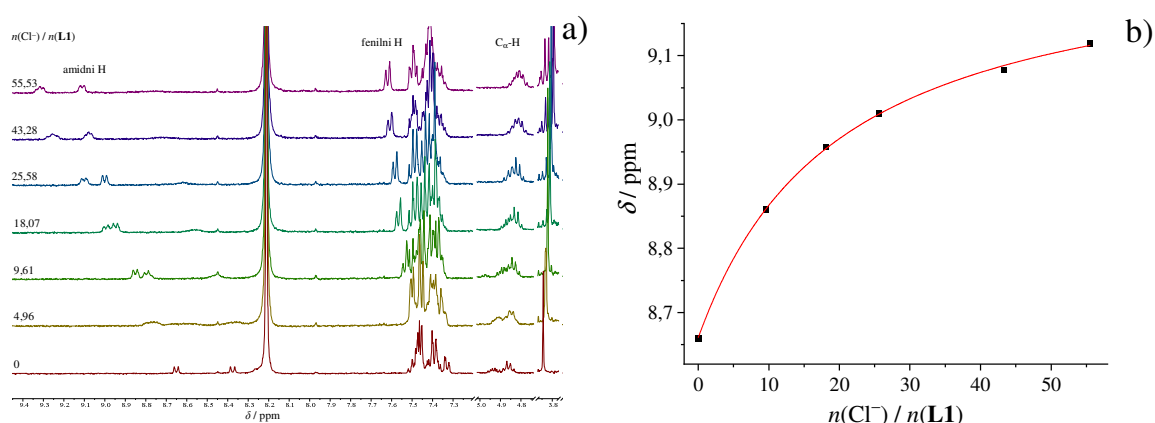
Tablica 3. Prosječni broj kontakata između NH skupina peptida i aniona u kompleksima linearnih peptida **L1**, **L2** i **L3** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.¹⁴⁰

Peptid	Anion	N(koordinirano)		
		N(-H) _{ukupno}	N(-H) _{amin}	N(-H) _{amid}
L1	Cl ⁻	3,9	1,0	2,9
	Br ⁻	3,8	1,0	2,9
	H ₂ PO ₄ ⁻	3,6	0,7	2,8
	NO ₃ ⁻	3,6	0,8	2,8
L2	Cl ⁻	4,7	0,9	3,8
	Br ⁻	4,5	0,8	3,7
	HSO ₄ ⁻	4,8	1,4	3,3
	H ₂ PO ₄ ⁻	5,0	1,1	4,1
	NO ₃ ⁻	6,8	1,3	5,4
L3	Cl ⁻	5,7	0,9	4,8
	Br ⁻	5,0	0,8	4,1
	HSO ₄ ⁻	6,0	1,1	5,0
	H ₂ PO ₄ ⁻	5,3	1,1	4,1
	NO ₃ ⁻	7,3	1,2	6,1

Svi kompleksu su stehiometrije 1:1

4.2.2. Kompleksi peptida **L1**, **L2** i **L3** s jednostavnim anorganskim anionima u DMF-u

Proučavanje vezanja iona na linearne peptide u DMF-u vrlo je značajno zbog toga što se makrociklizacija peptidnog lanca kojom se dobiva ciklopeptid provodi upravo u tom otapalu. Zbog preklapanja apsorpcijskog spektra DMF-a i emisijskog spektra fenilalanina afinitet peptida prema anionima nije bilo moguće odrediti spektrofotometrijom. Stoga je vezanje bilo praćeno ^1H NMR spektroskopijom i izotermnom titracijskom kalorimetrijom. Na slici 26 prikazani su rezultati ^1H NMR titracije peptida **L1** s TEACl u DMF-u, dok su ostali prikazani na slikama D79–D82, D86–D90 i D94–D98. Najznačajnija promjena u prikupljenim NMR spektrima je u dijelu spektra koji odgovara amidnim protonima što ukazuje na njihovo direktno sudjelovanje u interakciji s kloridnim anionom putem vodikovih veza. Sve su titracije uspješno obrađene korištenjem samo 1:1 modela kompleksiranja (tablica 4), osim za DHP anion gdje zbog širokih, slabo razlučivih NMR signala tijekom titracije, konstante stabilnosti nisu mogle biti pouzdano određene (slike D81, D89 i D97).



Slika 26. a) ^1H NMR titracija **L1** ($c = 5,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0825 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L1** pri 8,65 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

U DMF-u su provedene i mikrokolorimetrijske titracije receptora **L1**, **L2** i **L3** s proučavanjem anionima (slike D83–D85, D91–D93 i D99–D101, tablica 4). Mikrokolorimetrijskim titracijama bilo je moguće odrediti afinitet linearnih peptida prema većini oksoaniona (tablica 4), iznimka je bio nitratni ion koji tvori komplekse nedovoljne stabilnosti za pouzdanu termodinamičku karakterizaciju.

Tablica 4. Sukcesivni termodinamički parametri vezanja aniona na peptide **L1**, **L2** i **L3** u DMF-u pri 25 °C.

Peptid	anion	L:A ⁻	log <i>K</i> ± SE	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$	
L1	Cl ⁻	1:1	1,98 ^a	-11,30 ^a			
			1,53 ^b	-8,73 ^b	1,73 ^b	35 ^b	
	Br ⁻	1:1	1,02 ^a	-5,82 ^a			
			1,19 ^a	-6,79 ^a			
	HSO ₄ ⁻	1:1	1,40 ^b	-7,99 ^b	-32,87 ^b	-83 ^b	
			2:1	3,8 ± 0,1 ^b	-21,6 ± 0,7 ^b	1,6 ± 0,4 ^b	79 ± 2 ^b
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	4,8 ± 0,2 ^b	-27 ± 1 ^b	-19,0 ± 0,2 ^b	27 ± 3 ^b	
			1:2	3,14 ± 0,05 ^b	-17,9 ± 0,3 ^b	-35 ± 3 ^b	-58 ± 10 ^b
	NO ₃ ⁻	1:1	0,30 ^a	-1,71 ^a			
			2,04 ^a	-11,64 ^a			
L2	Cl ⁻	1:1	2,17 ^b	-12,39 ^b	1,88 ^b	48 ^b	
			1,06 ^a	-6,05 ^a			
	HSO ₄ ⁻	1:1	1,80 ^a	-10,27 ^a			
			1,963 ± 0,008 ^b	-11,20 ± 0,05 ^b	-40 ± 2 ^b	-95 ± 5 ^b	
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	4,28 ± 0,02 ^b	-24,4 ± 0,1 ^b	-0,3 ± 0,2 ^b	83,1 ± 0,4 ^b	
			1:2	3,17 ± 0,03 ^b	-18,1 ± 0,2 ^b	-36 ± 1 ^b	-61 ± 4 ^b
	NO ₃ ⁻	1:1	0,50 ^a	-2,85 ^a			
			2,20 ^a	-12,56 ^a			
	L3	Cl ⁻	1:1	1,67 ^b	-9,5 ^b	17,0 ^b	88,9 ^b
				1,14 ^a	-6,51 ^a		
HSO ₄ ⁻		1:1	2,37 ^a	-13,53 ^a			
			2,46 ± 0,02 ^b	-14,0 ± 0,1 ^b	-32 ± 2 ^b	-60 ± 8 ^b	
H ₂ PO ₄ ⁻		1:1	5,7 ± 0,1 ^b	-32,7 ± 0,8 ^b	4,4 ± 0,9 ^b	124 ± 6 ^b	
			1:2	3,80 ± 0,08 ^b	-21,7 ± 0,5 ^b	-47 ± 1 ^b	-84 ± 6 ^b
NO ₃ ⁻		1:1	0,52 ^a	-2,97 ^a			

^a određeno ¹H NMR titracijama^b određeno ITC titracijamaSE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3)

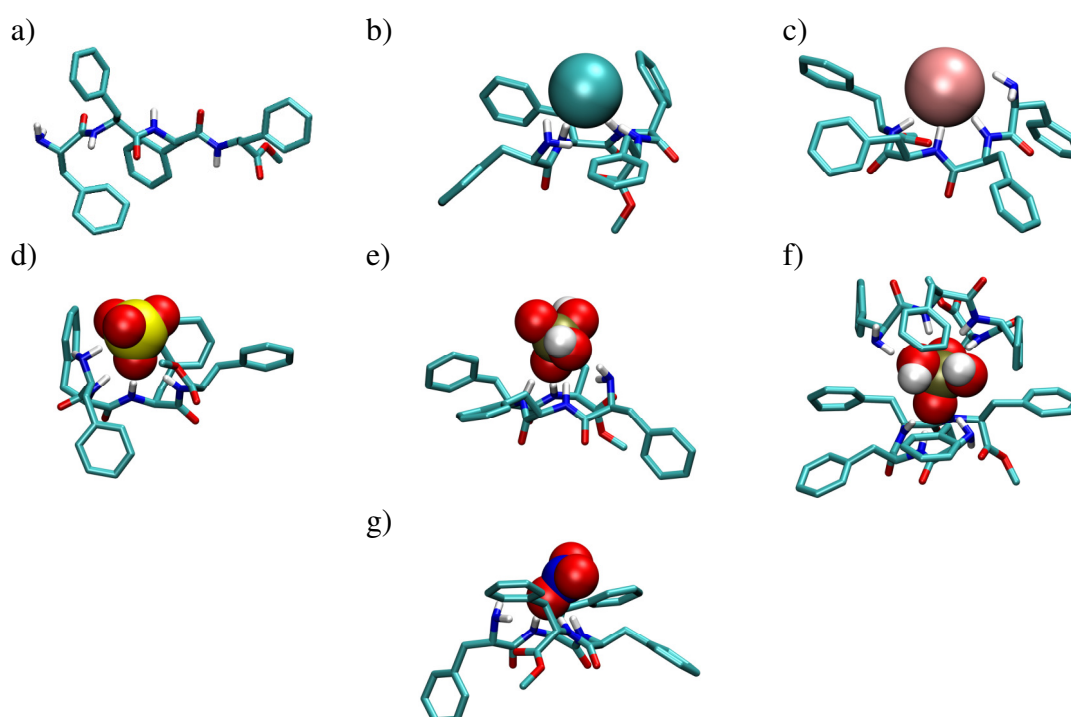
Afinitet linearnih peptida prema halogenidnim anionima i nitratu nešto je niži u DMF-u nego u acetonitrilu (tablice 1 i 4). Standardna Gibbsova energija transfera kloridnog i bromidnog aniona iz acetonitrila u DMF iznosi redom 5 kJ mol^{-1} , odnosno 6 kJ mol^{-1} što bi odgovaralo povećanju konstante stabilnosti pripadajućih kompleksa za oko jedan red veličine.¹⁴⁵ To znači da solvatacija i konformacijske promjene peptida i kompleksa određuju termodinamiku reakcije. Rezultati MD simulacija slobodnih peptida te kloridnih i bromidnih kompleksa u DMF-u vrlo su slični onima dobivenim simulacijama u acetonitrilu s obzirom na broj intramolekulskih vodikovih veza u slobodnim peptidima (prosječan broj vodikovih veza je 0,9 u **L1**, 2,5 u **L2** i 2,3 u **L3** peptidu), a isto vrijedi i za prosječni broj kontakata peptida i aniona u kompleksima (tablica 5, slike 27–29). Sve navedeno upućuje na to da je razlika u solvataciji kompleksa u ovim otapalima dominantan doprinos razlici u stabilnosti tih kompleksa. Nadalje, u DMF-u je primijećeno nastajanje samo 1:1 kompleksa peptida s hidrogensulfatom čija je konstanta stabilnosti za oko dva reda manja nego u acetonitrilu. Konstanta stabilnosti LHSO_4^- kompleksa raste s povećanjem duljine lanca peptida, pri čemu je ona za jedan red veličine veća u slučaju peptida **L3** u usporedbi s **L1**.

Rezultati mikrokolorimetrijskih titracija su u vrlo dobrom slaganju s rezultatima ^1H NMR titracija. Od halogenidnih aniona, samo u slučaju vezanja kloridnog aniona nastaje kompleks koji je dovoljno stabilan za kalorimetrijsko određivanje ionskog afiniteta. Zbog vrlo malih toplina reakcije, vezanje kloridnog aniona proučavano je na način da se otopina peptida dodavala u otopinu soli što zahtijeva veći utrošak liganda. Stoga te titracije nisu ponavljane. Iz rezultata titracija kloridnog aniona s ligandima **L1–L3** (slike D83, D91 i D99) vidljivo je da je standardna reakcijska entalpija kompleksiranja nepovoljna, što je u suprotnosti s reakcijom u acetonitrilu. S obzirom na to da entalpija transfera kloridnog iona iz acetonitrila u DMF iznosi samo -2 kJ mol^{-1} , razlika u reakcijskoj entalpiji ne može se u cijelosti pripisati transferu aniona.¹⁴⁵ Ta činjenica upućuje na zaključak da solvatacija slobodnih peptida i kompleksa uvelike određuje termodinamiku reakcije.

Vezanje hidrogensulfatnog aniona je u potpunosti entalpijski kontrolirano. Standardna reakcijska entalpija je povoljnija nego u acetonitrilu, stoga je razlika u konstanti stabilnosti u potpunosti posljedica jako nepovoljnog entropijskog doprinosa.

Za obradu mikrokolorimetrijske titracije peptida **L1**, **L2** i **L3** s dihidrogenfosfatom bilo je potrebno u model dodati još dvije ravnoteže: 1:2 u kojoj peptid veže dimer DHP-a i 2:1 u kojoj se DHP anion nalazi u sendviču između dva peptida. Opaženo je da konstante stabilnosti rastu

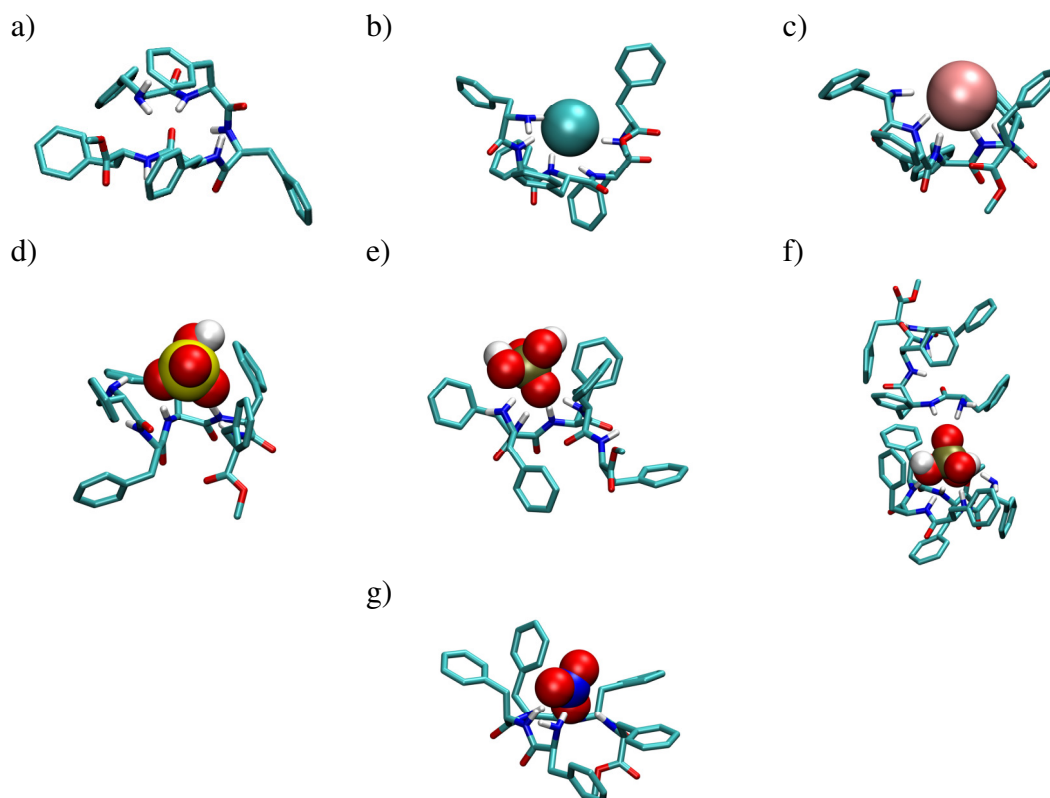
s povećanjem duljine lanca peptida za sva tri tipa peptidnih kompleksa (tablica 4). Što se tiče kompleksa tipa 1:1, reakcijska entalpija nastajanja je povoljnija što je lanac dulji, a entropijski doprinos je najpovoljniji u slučaju pentapeptida **L2**. Vezanje dodatnog peptida na 1:1 kompleks je u potpunosti entropijski kontrolirano s nepovoljnim (**L1** i **L3**) te blago povoljnim (**L2**) entalpijskim doprinosom standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja. Treba naglasiti da je nastanak kompleksa **L2DHP** izoentalpijski. S druge strane, vezanje dodatnog DHP-a na 1:1 kompleks je entalpijski kontroliran proces s vrlo nepovoljnim entropijskim doprinosom. Standardna reakcijska entalpija tog koraka je povoljnija nego za nastajanje 1:1 tipa kompleksa i negativnija je u slučaju duljih peptida. Razlog tome može biti što se dulji lanci mogu bolje prilagoditi anionu s većim brojem akceptora vodikove veze, dok u slučaju monoatomnih aniona i kraći lanci mogu stvarati optimalne interakcije. Entropijski doprinos standardnoj Gibbsovoj energiji vezanja dodatnog DHP-a je nepovoljan, ponajviše zbog gubitka translacijskih stupnjeva slobode prilikom nastajanja dimera aniona. No, za dulje peptide taj doprinos je sve nepovoljniji što znači da i konformacijske promjene peptida znatno utječu na termodinamiku ovog procesa.



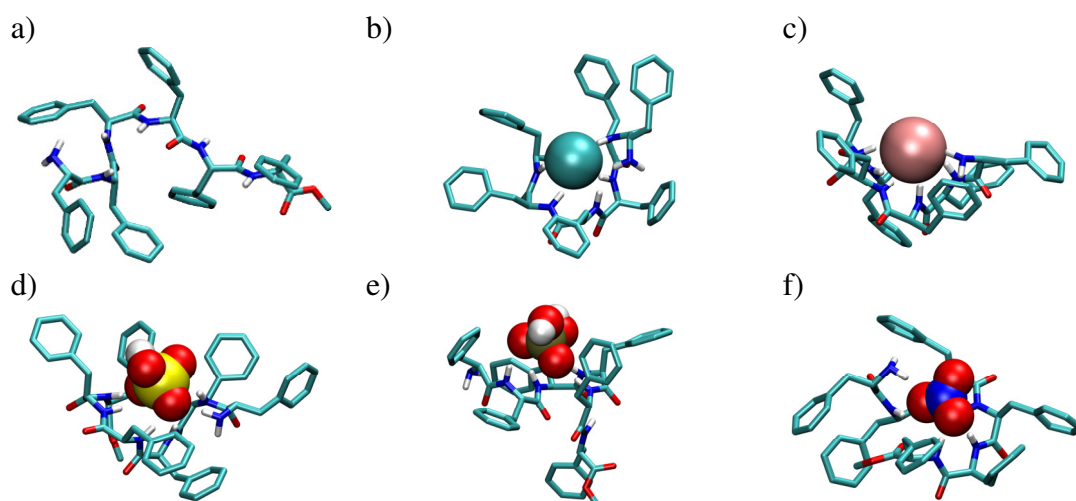
Slika 27. Reprezentativne strukture a) slobodnog peptida **L1** i njegovih kompleksa s b) Cl^- , c) Br^- , d) HSO_4^- , e) H_2PO_4^- , f) sendvič kompleksa s H_2PO_4^- i g) NO_3^- dobivene MD simulacijama u DMF-u. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Tablica 5. Prosječni broj kontakata između NH skupina peptida i aniona u kompleksima **L1**, **L2** i **L3** dobiven MD simulacijama u DMF-u.

Peptid	Anion	L:A ⁻	N(koordinirano)		
			N(-H) _{ukupno}	N(-H) _{amin}	N(-H) _{amid}
L1	Cl ⁻	1:1	3,8	1,0	2,9
	Br ⁻	1:1	3,7	0,9	2,8
	HSO ₄ ⁻	1:1	4,9	1,3	3,5
	H ₂ PO ₄ ⁻	2:1	11,6	4,6	7,1
		1:1	4,9	1,3	3,6
	NO ₃ ⁻	1:1	5,6	1,5	4,2
L2	Cl ⁻	1:1	4,5	0,9	3,7
	Br ⁻	1:1	4,3	0,7	3,6
	HSO ₄ ⁻	1:1	4,2	0,6	3,5
	H ₂ PO ₄ ⁻	2:1	7,6	3,6	4,0
		1:1	4,9	1,3	3,6
	NO ₃ ⁻	1:1	7,0	1,3	5,7
L3	Cl ⁻	1:1	5,5	0,8	4,7
	Br ⁻	1:1	5,1	0,8	4,4
	HSO ₄ ⁻	1:1	7,8	1,1	6,7
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	6,8	1,2	5,6
	NO ₃ ⁻	1:1	7,5	1,2	6,3



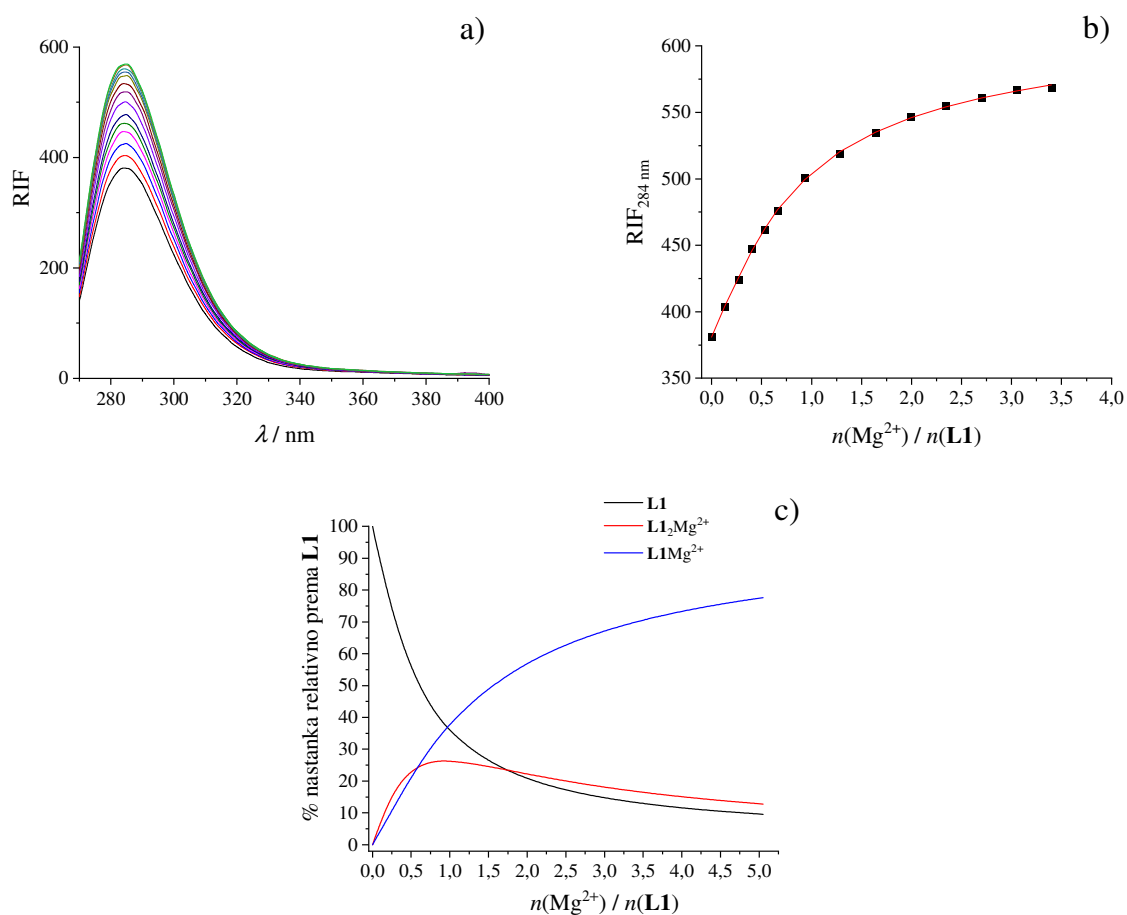
Slika 28. Reprezentativne strukture a) slobodnog peptida **L2** i njegovih kompleksa s b) Cl⁻, c) Br⁻, d) HSO₄⁻, e) H₂PO₄⁻, f) sendvič kompleksa s H₂PO₄⁻ i g) NO₃⁻ dobivene MD simulacijama u DMF-u. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 29. Reprezentativne strukture a) slobodnog peptida **L3** i njegovih kompleksa s b) Cl⁻, c) Br⁻, d) HSO₄⁻, e) H₂PO₄⁻ i f) NO₃⁻ dobivene MD simulacijama u DMF-u. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

4.2.3. Kompleksi peptida **L1**, **L2** i **L3** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu

Afinitet linearnih peptida **L1–L3** prema kationima zemnoalkalijskih metala u acetonitrilu proučavan je mikrokolorimetrijski i spektrofluorimetrijski. Primjer rezultata spektrofluorimetrijske titracije peptida **L1** s Mg^{2+} ionom prikazan je na slici 30, dok su primjeri rezultata ostalih titracija dani na slikama D106–D108, D113–116 i D121–D124, a rezultati obrade objedinjeni su u tablici 6. U svim slučajevima dolazi do pojačanja fluorescencije uslijed nastajanja kompleksa, što je opaženo i prilikom kompleksiranja većine aniona.¹⁴⁰



Slika 30. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L1** ($c = 1,06 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Tablica 6. Sukcesivni termodinamički parametri vezanja zemnoalkalijskih kationa na peptide **L1** i **L2** u acetonitrilu pri 25 °C.

Peptid	anion	L:M ²⁺	log <i>K</i> ± SE	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
L1	Mg ²⁺	1:1	4,40 ± 0,04 ^a	-25,11 ± 0,2 ^a		
		2:1	3,95 ± 0,03 ^a	-22,6 ± 0,2 ^a		
	Sr ²⁺	1:1	3,266 ± 0,006 ^a	-28,64 ± 0,03 ^a		
			3,78 ± 0,05 ^b	-21,6 ± 0,3 ^b	-8,8 ± 0,6 ^b	43 ± 3 ^b
	Ba ²⁺	1:1	2,61 ± 0,02 ^a	-14,9 ± 0,1 ^a		
L2	Mg ²⁺	1:1	4,52 ± 0,03 ^b	-25,8 ± 0,2 ^b	-2 ± 2 ^b	79 ± 8 ^b
		2:1	3,49 ± 0,03 ^b	-19,9 ± 0,2 ^b	-55 ± 2 ^b	-119 ± 7 ^b

^a određeno spektrofotometrijskim titracijama

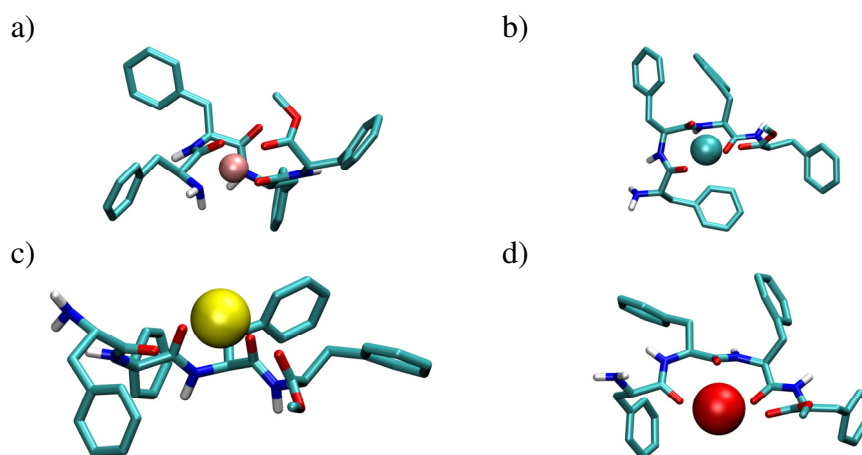
^b određeno ITC titracijama

SE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3)

Kvantitativna termodinamička karakterizacija nastajanja kompleksa zemnoalkalijskih kationa s linearnim peptidima **L1**, **L2** i **L3** uspješno je provedena za samo nekoliko kompleksa (tablica 6). Kod proučavanja nastanka ostalih kompleksa titracije nisu bile reproducibilne ili je dolazilo do nastanka više vrsta kompleksa od kojih je barem jedan bio zastupljen s nedovoljno velikim stupnjem nastanka za pouzdano određivanje termodinamičkih parametara. Ono što još utječe na reproducibilnost rezultata je forma soli, koja je u slučaju zemnoalkalijskih perklorata najčešće hidrat. Dodatak otopine takve soli uzrokuje veliku promjenu entalpije zbog povećanog udjela vode u odnosu na titrand. Ono što se na temelju provedenih mikrokalorimetrijskih titracija (slike D102–D105, D109–D112 i D117–D120) može reći gotovo sa sigurnošću je da je nastanak 1:1 i „sendvič“ kompleksa egzoterman proces, osim u slučaju vezanja Mg²⁺ na **L3**. Spektrofotometrijske titracije (slika 30, slike D106–D108, D113–D116 i D121–D124) nisu bile od velike pomoći u identifikaciji nastalih kompleksa jer se većina dobivenih podataka mogla pouzdano obraditi modelima i s jednom i s dvije ravnoteže. S obzirom na omjer titransa i titranda kod kojeg titracijske krivulje dosežu ili se približavaju ustaljenim vrijednostima mjerenog svojstva u univarijatnom prikazu podataka može se reći da je vezanje relativno jako.

Iako nije bilo moguće provesti pouzdanu analizu mikrokalorimetrijskih i spektrofotometrijskih titracija, očito je da dolazi do vezanja svih kationa. Stoga su provedene MD simulacije 1:1 tipa kompleksa u svrhu dobivanja strukturnih karakteristika tih kompleksa (tablica 7, slike 31–33). Iz dobivenih reprezentativnih struktura kompleksa vidljivo je da

prilikom vezanja dolazi do reorganizacije peptida oko kationa. Uočena su tri tipa donora elektronskog para koji sudjeluju u interakciji s kationom: karbonilni kisikov atom iz okosnice peptida, karbonilni kisikov atom iz esterske skupine koja se nalazi na C-kraju peptida i dušikov atom iz amino skupine na N-kraju koji s nepodijeljenim elektronskim parom također sudjeluje u vezanju. Prvi tip donora tvori gotovo jednaki prosječni broj kontakata s kationima u svim kompleksima peptida **L1**, **L2** i **L3**, osim u kompleksima **L1Mg²⁺** i **L2Mg²⁺** gdje je taj broj za oko 0,9 manji, te u kompleksu **L3Sr²⁺** gdje je za oko 1,7 veći. Nadalje, karbonilni kisikov atom iz esterske skupine je tijekom svih simulacija koordiniran na vezani kation. Interakcija posljednjeg tipa donora, dušikovog atoma iz amino skupine, pokazuje pravilnost s obzirom na duljinu peptida i veličinu kationa. Naime, za sve peptide vrijedi da je taj atom tijekom cijele simulacije u interakciji s Mg²⁺, dok je u kompleksima Sr²⁺ i Ba²⁺ uočen vrlo mali ili nikakav postotak simulacije u kojem dolazi do kontakta. Kompleksi s kalcijevim kationom pokazuju pravilnost s obzirom na veličinu peptida. U slučaju kompleksa **L1Ca²⁺** ne dolazi do interakcije između dušika amino skupine i kalcijevog kationa, u simulacijama **L2Ca²⁺** kompleksa dušikov atom je u interakciji s vezanim kationom tijekom 50 % vremena, dok je u kompleksu **L3Ca²⁺** dušikov atom koordiniran na metalni kation tijekom cijele simulacije (tablica 7).

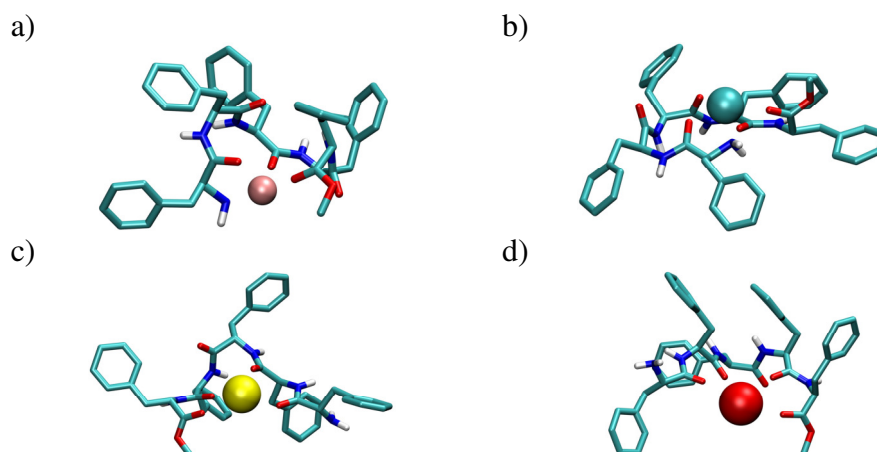


Slika 31. Repräsentative strukture kompleksa peptida **L1** s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

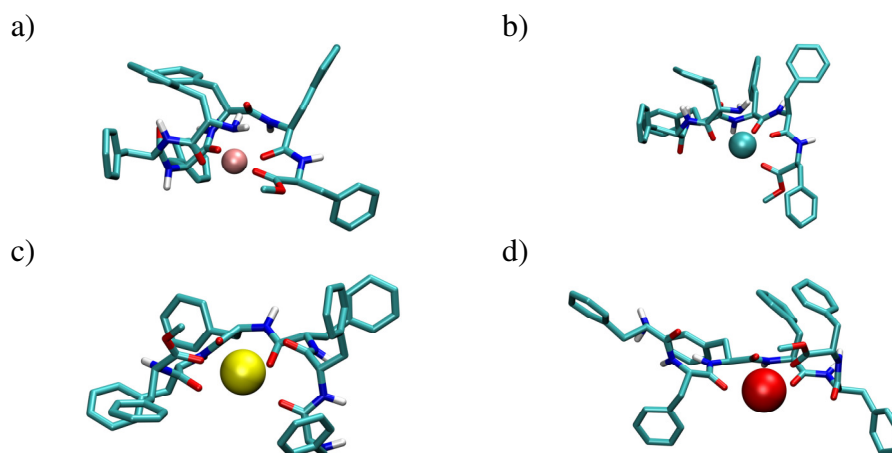
Tablica 7. Prosječni broj kontakata između karbonilnih skupina peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima linearnih peptida **L1**, **L2** i **L3** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.

Peptid	Anion	<i>N</i> (koordinirano)			
		<i>N</i> _{ukupno}	<i>N</i> (O) _{karbonil}	<i>N</i> (O) _{ester}	<i>N</i> _{amin}
L1	Mg ²⁺	4,0	2,0	1,0	1,0
	Ca ²⁺	3,9	2,9	1,0	0
	Sr ²⁺	3,4	2,4	0,8	0,2
	Ba ²⁺	3,9	2,9	1,0	0
L2	Mg ²⁺	4,0	2,0	1,0	1,0
	Ca ²⁺	4,3	2,9	0,9	0,5
	Sr ²⁺	4,0	2,9	1,0	0,1
	Ba ²⁺	4,1	2,9	1,0	0,2
L3	Mg ²⁺	5,0	3,0	1,0	1,0
	Ca ²⁺	5,3	3,3	1,0	1,0
	Sr ²⁺	5,9	4,7	1,0	0,2
	Ba ²⁺	4,4	3,4	1,0	0

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



Slika 32. Reprezentativne strukture kompleksa peptida **L2** s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 33. Reprezentativne strukture kompleksa peptida **L3** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

4.2.4. Kompleksi peptida **L1**, **L2** i **L3** sa zemnoalkalijskim kationima u DMF-u

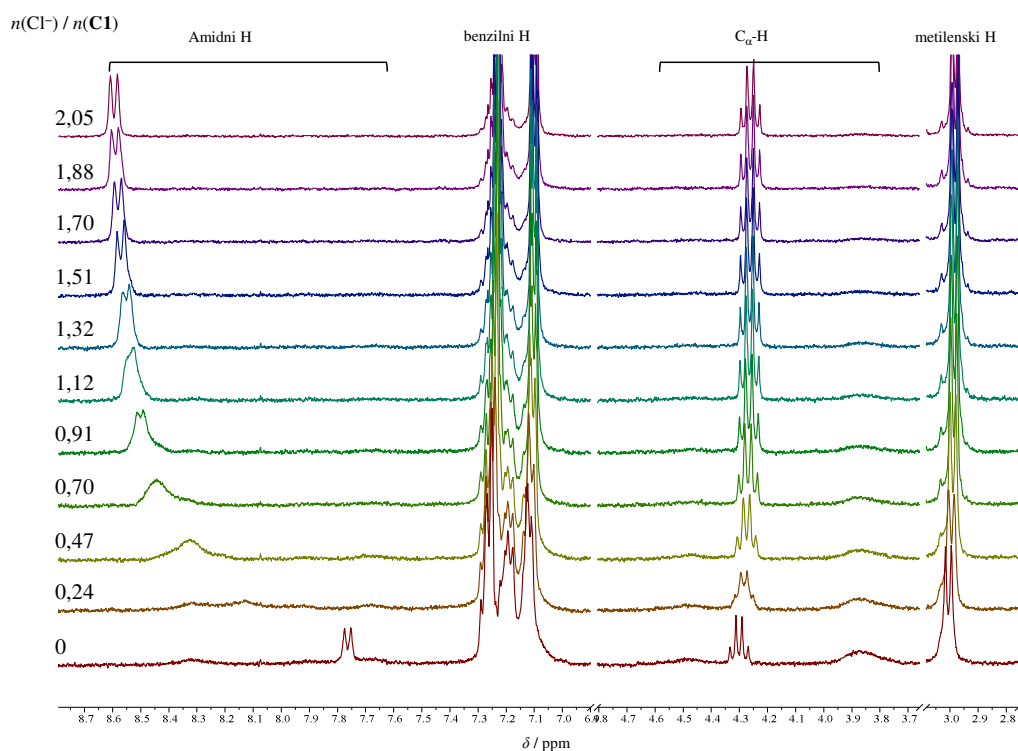
Vežanje zemnoalkalijskih kationa na linearne peptide u DMF-u praćeno je ^1H NMR spektroskopijom. Tijekom titracija nisu primijećene značajne spektralne promjene uslijed dodatka otopine kationa (slike D125–D136) što upućuje da do vežanja ne dolazi ili je ono izrazito slabo. Razlika u afinitetu spojeva **L1**, **L2** i **L3** prema zemnoalkalijskim kationima u DMF-u i acetonitrilu, otapalu u kojem su nastajali stabilni kompleksi, može se objasniti izrazito povoljnim transferom kationa iz MeCN-a u DMF. Standardna Gibbsova energija transfera u slučaju barijeva kationa iznosi -75 kJ mol^{-1} što odgovara smanjenju konstante stabilnosti za više od 10 redova veličine.¹⁴⁵ Naravno, kod takvih razmatranja treba uzeti u obzir i transfere liganda i kompleksa, no zasigurno se može reći da je transfer kationa taj koji najviše doprinosi smanjenju stabilnosti kompleksa.

S obzirom na ove rezultate, zemnoalkalijski kationi nisu adekvatne templatne vrste za provedbu reakcije makrociklizacije ukoliko se ona provodi u DMF-u. Uspoređujući s dobivenim rezultatima vežanja aniona u DMF-u očito je da su anioni mnogo logičniji odabir za povećanje iskorištenja i kontrolu ishoda makrociklizacijskog sintetskog koraka.

4.3. Ion-receptorska svojstva homociklofenilalaninskih peptida

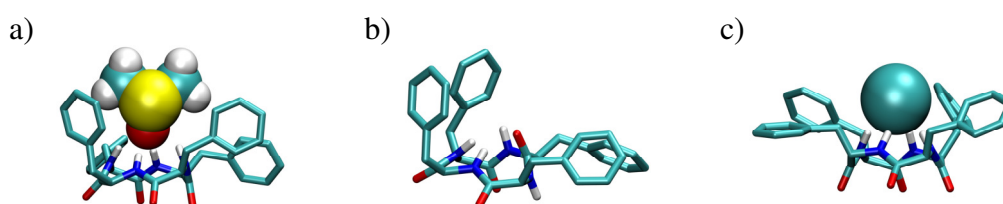
4.3.1. Kompleksi ciklopeptida **C1** s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu, metanolu i DMSO-u

Ciklotetrafenilalanin (**C1**) nije topljiv u acetonitrilu niti metanolu, a kao što je navedeno prije, spektar spoja u DMSO-u ima nekoliko skupova signala koji dodatkom TEACl-a prelaze u jedan. Radi detaljnijeg opisa tog efekta napravljena je ^1H NMR titracija s navedenom soli u DMSO-u (slika 34) iz koje se može dobiti kvalitativna procjena afiniteta **C1** prema kloridnom anionu. Iz prikupljenih spektara vidljivo je da već pri 1,70 ekvivalenata preostaje samo jedan skup signala što upućuje na visoku konstantu stabilnosti C1Cl^- kompleksa u DMSO-u ($\log K^\circ > 4$). S obzirom na prijašnja istraživanja vezanja kloridnog aniona na ciklopeptidne receptore^{95,141} gdje je konstanta stabilnosti nekoliko redova veličine manja u DMSO-u u odnosu na acetonitril, za očekivati je da spoj **C1** posjeduje vrlo visoki afinitet prema kloridnom anionu u acetonitrilu.



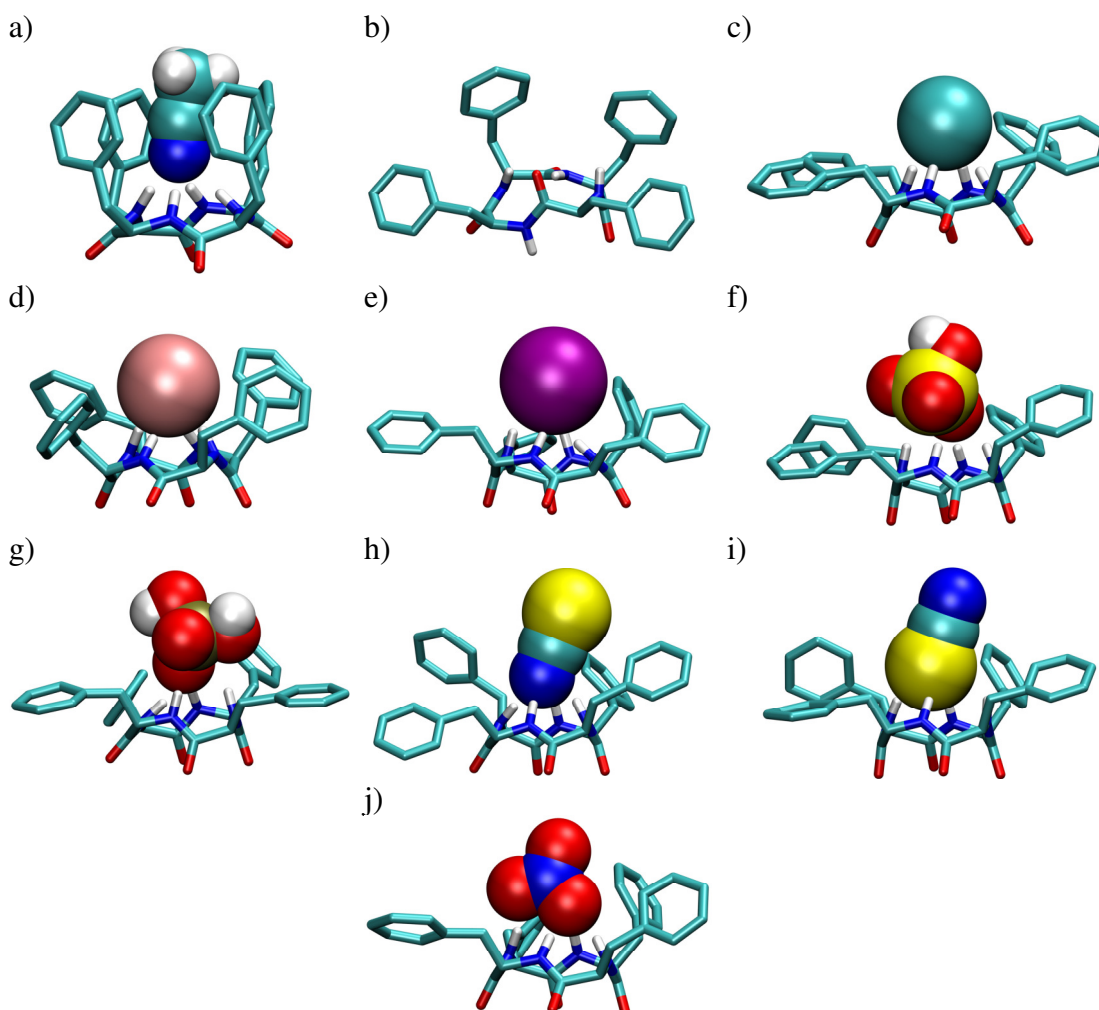
Slika 34. ^1H NMR titracija liganda **C1** ($c = 9,41 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0116 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMSO-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.

U MD simulacijama ciklopeptida **C1** provedenim u DMSO-u prosječan broj intramolekulskih vodikovih veza koje **C1** stvara iznosi 0,24 što je posljedica nastanka adukta s molekulom DMSO-a (slika 35 a). U nastalom aduktu, koji je prisutan tijekom gotovo cijele simulacije (87 %), dolazi do stvaranja vodikovih veza između kisikovog atoma DMSO-a i amidnih skupina ciklopeptida što otežava stvaranje intramolekulskih vodikovih veza. U slučaju kompleksa s kloridnim anionom primijećeno je stvaranje prosječno 3,95 vodikovih veza tijekom simulacije. Reprezentativna struktura kompleksa upućuje na nastajanje pravilne tetragonske piramide s anionom u vrhu i s vodikovim atomima iz okosnice peptida u bazi piramide (slika 35 c).



Slika 35. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C1** a) u obliku dimetil sulfoksidnog adukta (87 %), b) slobodnom obliku (13 %), te u kompleksu s c) Cl⁻. Strukture su dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

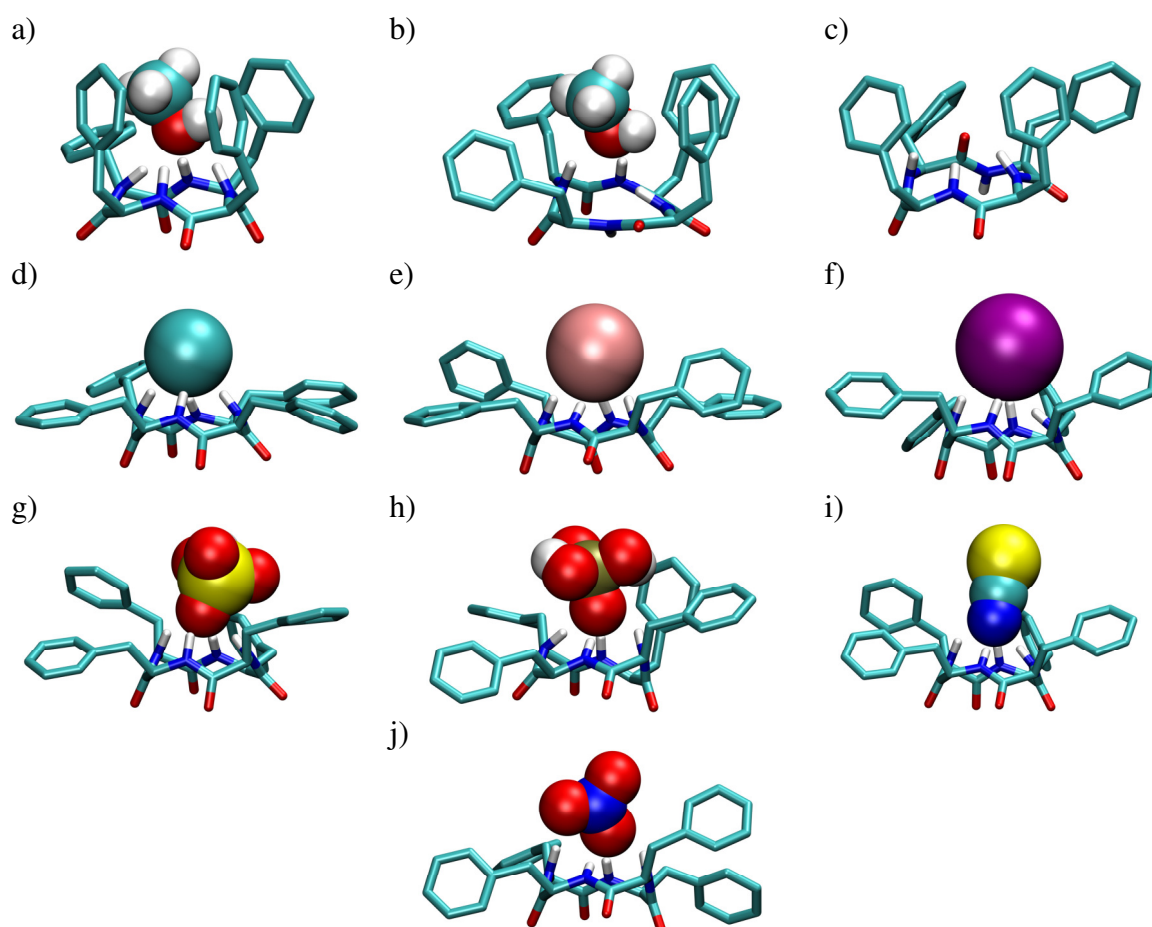
Kako bi se barem djelomično nadomjestila nemogućnost eksperimentalnog istraživanja anionskih kompleksa spoja **C1** u acetonitrilu i metanolu, provedena su komputacijska strukturalna istraživanja korištenjem MD simulacija u tim otapalima. U slobodnom ciklopeptidu gotovo da i nisu primijećene intramolekulske vodikove veze (prosječno 0,05 vodikovih veza tijekom simulacije). Uzrok tome je vezanje molekule acetonitrila (slika 36 a) na način da dušik nitrilne skupine tvori vodikove veze s amidnim skupinama ciklopeptidnog prstena tijekom gotovo cijele simulacije (96 % vremena). Rezultati prikazani u tablici 8 pokazuju da su anioni u kompleksima receptora **C1** koordinirani gotovo svim amidnim protonima. Reprezentativne strukture kompleksa upućuju na nastajanje vrlo slične geometrije kompleksa kao u slučaju kloridnog kompleksa u DMSO-u (slika 36 c–j) pri čemu su svi anioni vezani na *endo* strani ciklopeptida. Zanimljivo je da tiocijanatni anion tvori dvije vrste kompleksa s obzirom na njegovu orijentaciju, u jednoj ostvaruje interakcije preko dušikovog atoma, a u drugoj preko atoma sumpora (slika 36 g i h). Prva vrsta kompleksa dominira sa zastupljenošću od 84 %, dok je druga prisutna u ostalih 16 % vremena simulacije. Usporedba rezultata dobivenih računalnim metodama također upućuje na usporediv ili čak veći afinitet **C1** prema anionima u acetonitrilu nego u DMSO-u.



Slika 36. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C1** a) u obliku acetonitrilnog adukta (96 %), b) slobodnom obliku (4 %), te u kompleksu s c) Cl^- , d) Br^- , e) I^- , f) HSO_4^- , g) H_2PO_4^- , h) SCN^- (84 %), i) SCN^- (16 %) te j) NO_3^- . Strukture su dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Rezultati MD simulacija anionskih kompleksa ciklopeptida **C1** u metanolu također upućuju na vezanje molekule otapala u slobodni ciklopeptid pri čemu je takav adukt prisutan kroz većinu simulacije (98 % vremena). Od toga, tijekom 88 % vremena peptid je u kontaktu s kisikovim atomom molekule metanola sa sva četiri amidna protona (slika 37 a), u 10 % simulacije s tri amidna protona dok je četvrti paralelan s ravninom okosnice (slika 37 b). Tek je u 2% simulacije prisutan slobodan oblik peptida u kojem nema inkluzije metanola (slika 37 c). Zbog toga je prosječan broj intramolekulskih veza opaženih tijekom simulacije svega 0,04. Iz simulacija kompleksa može se zaključiti da peptid stvara maksimalan broj kontakata s anionima. Za

razliku od C1SCN^- kompleksa u acetonitrilu, u metanolu je uočen isključivo tip kompleksa u kojem je peptid u interakciji s dušikovim atomom tiocijanatnog aniona (slika 37 i).



Slika 37. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C1** a) i b) u obliku metanolnog adukta (98 %), c) u slobodnom obliku (2 %), te u obliku kompleksa s d) Cl^- , e) Br^- , f) I^- , g) HSO_4^- , h) H_2PO_4^- , i) SCN^- te j) NO_3^- . Strukture su dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Tablica 8. Prosječni broj kontakata između amidnih skupina peptida i aniona u kompleksima **C1** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu i metanolu.

Otapalo	Cl^-	Br^-	I^-	HSO_4^-	H_2PO_4^-	SCN^-	NO_3^-
MeCN	3,9	4,0	3,9	4,2	4,2	4,0 ^a 4,0 ^b	4,6
MeOH	4,0	4,0	3,9	4,1	4,2	3,9 ^a	4,5

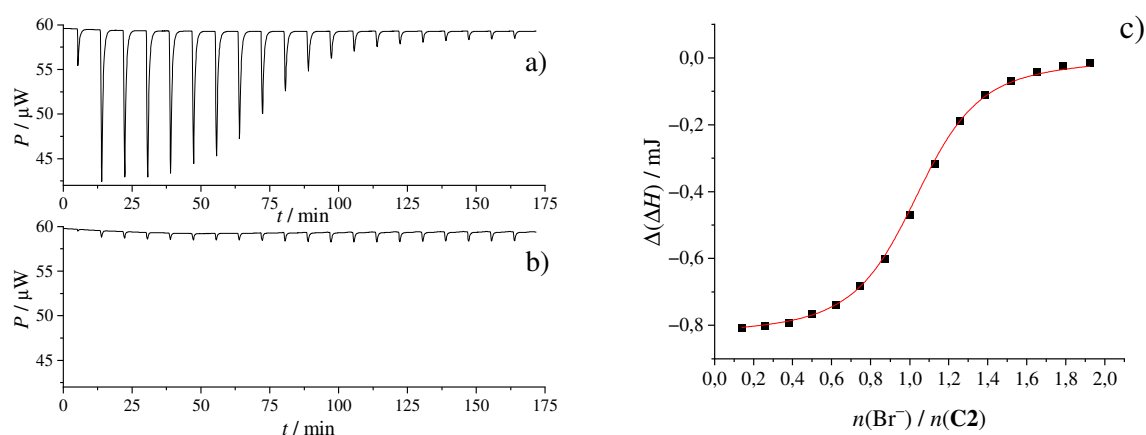
^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

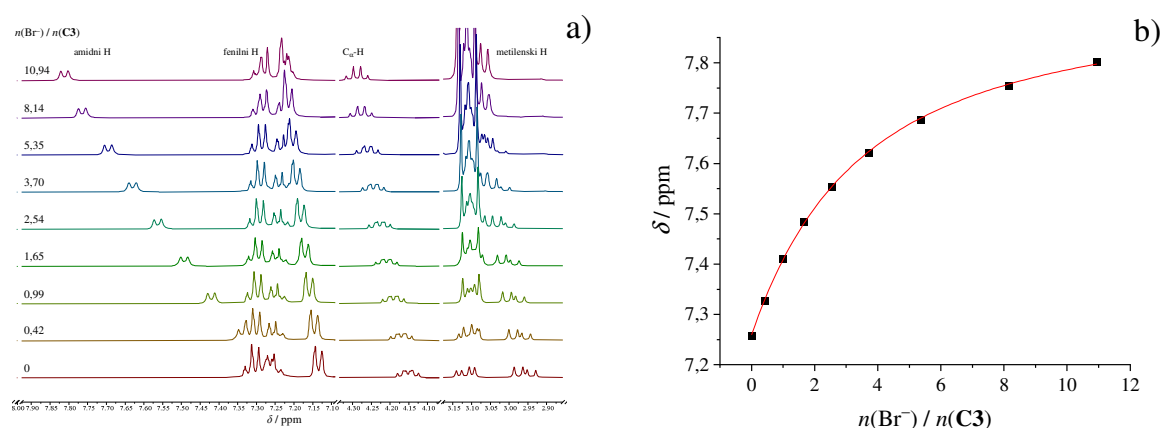
4.3.2. Kompleksi ciklopeptida **C2** i **C3** s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu

Vežanje aniona na ciklopenta- (**C2**) i cikloheksafenilalanin (**C3**) u acetonitrilu i metanolu proučavano je ^1H NMR spektroskopijom i izotermnom titracijskom mikrokalorimetrijom, dok je uvid u strukturu slobodnih ciklopeptida i njihovih anionskih kompleksa dobiven MD simulacijama. Pritom su ^1H NMR titracije spoja **C2** s anionima i ITC titracija s kloridnim anionom provedene u sklopu diplomskog rada Ivana Pettersa. Primjer rezultata ITC titracije spoja **C2** s TBABr u acetonitrilu prikazan je na slici 38. Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru titransa i titranda upućuje na nastajanje 1:1 kompleksa visoke stabilnosti. Rezultati titracija koje uključuju ostale anione s ligandima **C2** i **C3** prikazane su na slikama D137–D141 i D148–D151. Termodinamički parametri dobiveni obradom tih titracija dani su u tablici 9.



Slika 38. a) Mikrokalorimetrijska titracija **C2** ($c = 4,45 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBABr ($c = 5,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBABr ($c = 5,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

Primjer rezultata ^1H NMR titracije ciklopeptida **C3** s TBABr u acetonitrilu prikazan je na slici 39 dok su rezultati titracija s ostalim solima dane na slikama D142–D147, a rezultati dobiveni obradom tih titracija prikazani su u tablici 9. Vidljivo je da u ^1H NMR spektrima dolazi do promjene kemijskog pomaka svih protona ciklopeptida, no najveće promjene primijećene su u slučaju amidnih protona što upućuje na njihovu direktno sudjelovanje u interakciji s anionom. Neke komplekse (**C2Cl⁻**, **C2Br⁻**, **C2HSO₄⁻**) nije bilo moguće termodinamički okarakterizirati NMR spektroskopijom zbog nedovoljne osjetljivosti te metode.



Slika 39. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 9,92 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,0299 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C3** na 7,25 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C3})$.

Rezultati dobiveni pomoću obje titracijske metode su u vrlo dobrom slaganju. Konstante stabilnosti kompleksa peptida **C2** s halogenidnim anionima smanjuju se od kloridnog prema jodidnom anionu. Reakcije su popraćene entalpijski i entropijski povoljnim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji vezanja, pri čemu je entalpijski doprinos za vezanje kloridnog aniona povoljniji za 10 kJ mol^{-1} nego za vezanje jodidnog aniona. S obzirom na to da entalpija desolvatacije aniona u acetonitrilu raste od jodidnog prema kloridnom anionu ($\Delta_{\text{sol}}H^\circ(\text{I}^-) = -298,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta_{\text{sol}}H^\circ(\text{Br}^-) = -328 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta_{\text{sol}}H^\circ(\text{Cl}^-) = -347,7 \text{ kJ mol}^{-1}$)¹⁴⁵ razlog smanjenja entalpijskog doprinosa je posljedica slabljenja vodikovih veza ostvarenih između aniona i ciklopeptida. Najvjerojatniji uzrok tome je smanjenje gustoće naboja halogenidnih aniona s povećanjem ionskog radijusa. Vrijednost reakcijske entropije slična je za vezanje kloridnog i bromidnog aniona, dok je za vezanje jodidnog niža, vjerojatno zbog slabije izražene desolvatacije velikih aniona. Gotovo identičan odnos reakcijskih entropija uočen je i u slučaju drugih istraživanih ciklopentapeptida.^{95,146} Zanimljivo je da udio entropijskog doprinosa u Gibbsovoj energiji kompleksiranja raste u nizu Cl^- , Br^- , I^- što znači da je utjecaj slabljenja vodikovih veza na stabilnost kompleksa značajniji u odnosu na smanjenje stupnja desolvatacije.

Entalpijski i entropijski doprinos za vezanje oksoaniona i tiocijanata je također povoljan, međutim, te su reakcije pretežno entalpijski kontrolirane. Reakcijska entalpija vezanja NO_3^- usporediva je s onom za vezanje Cl^- , a SCN^- s onom za vezanje i Br^- , dok je za vezanje HSO_4^- entalpijski doprinos povoljniji od svih istraživanih aniona. Vezanje oksoaniona je entalpijski povoljnije nego reakcija sa SCN^- , dok se kod reakcijskih entropija ne vidi takva pravilnost.

Tablica 9. Sukcesivni termodinamički parametri vezanja aniona na ciklopeptide **C2** i **C3** u acetonitrilu pri 25 °C.

Peptid	Anion	C:A ⁻	log <i>K</i> ± SE	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
C2 ¹⁴⁶	Cl ⁻	1:1	6,06 ± 0,04 ^b	-34,6 ± 0,2 ^b	-15,1 ± 0,3 ^b	65 ± 2 ^b
	Br ⁻	1:1	5,00 ± 0,01 ^b	-28,53 ± 0,05 ^b	-10,96 ± 0,01 ^b	58,9 ± 0,2 ^b
	I ⁻	1:1	3,39 ^a	-19,3 ^a		
			3,20 ± 0,06 ^b	-18,3 ± 0,3 ^b	-5,0 ± 0,4 ^b	44 ± 2 ^b
	HSO ₄ ⁻	1:1	4,67 ± 0,01 ^b	-26,68 ± 0,04 ^b	-23,6 ± 0,2 ^b	10 ± 1 ^b
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	c			
	SCN ⁻	1:1	2,92 ^a	-16,67 ^a		
			2,86 ± 0,03 ^b	-16,3 ± 0,2 ^b	-10,1 ± 0,7 ^b	21 ± 3 ^b
	NO ₃ ⁻	1:1	3,43 ^a	-19,58 ^a		
			3,33 ± 0,02 ^b	-19,0 ± 0,1 ^b	-13,0 ± 0,5 ^b	20 ± 2 ^b
C3	Cl ⁻	1:1	4,03 ^a	-23,00 ^a		
			3,57 ± 0,04 ^b	-20,4 ± 0,2 ^b	-12,4 ± 0,6 ^b	27 ± 3 ^b
	Br ⁻	1:1	2,55 ^a	-14,55 ^a		
			2,48 ± 0,03 ^b	-14,1 ± 0,2 ^b	-7,1 ± 0,3 ^b	24 ± 1 ^b
	I ⁻	1:1	1,16 ^a	-6,62 ^a		
	HSO ₄ ⁻	1:1	1,86 ^a	-10,62 ^a		
			2,77 ± 0,01 ^b	-15,82 ± 0,05 ^b	-14,2 ± 0,3 ^b	5 ± 1 ^b
		1:1				
			4,02 ± 0,03 ^b	-23,0 ± 0,2 ^b	-20,8 ± 0,2 ^b	7 ± 1 ^b
H ₂ PO ₄ ⁻	1:2					
		4,51 ± 0,02 ^b	-25,7 ± 0,1 ^b	-35,9 ± 0,2 ^b	-34 ± 1 ^b	
	1:3					
		3,48 ± 0,03 ^b	-19,8 ± 0,1 ^b	-3,4 ± 0,4 ^b	55 ± 2 ^b	
SCN ⁻	1:1	1,31 ^a	-7,48 ^a			
NO ₃ ⁻	1:1	1,65 ^a	-9,42 ^a			

^a određeno ¹H NMR titracijama^b određeno ITC titracijama^c ITC titracija nedvojbeno upućuje na nastajanje kompleksa viših stehiometrija, no nisu se mogle pouzdano obraditi
SE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3).

Vezanje aniona na heksaciklopeptid **C3** u acetonitrilu puno je slabije u usporedbi s **C2**, gdje su opaženi kompleksi receptora **C3** čije su konstante stabilnosti i do tri reda veličine manje u odnosu na odgovarajuće komplekse spoja **C2**. Pravilnost u smanjenju konstante stabilnosti u nizu Cl⁻, Br⁻, I⁻ vidljiva je i u slučaju **C3**. Rezultati ITC titracije **C3** s TEACl i TBABr pokazuju da, iako je reakcijska entalpija manje povoljna, značajno smanjenje Gibbsove energije kompleksiranja u usporedbi s kompleksima **C2** posljedica je razlike u entropijskim doprinosima. MD simulacije donekle mogu objasniti razlike u reakcijskim entalpijama i entropijama kompleksiranja. Naime, u slučaju spoja **C2** pokazano je da slobodni ciklopeptid

prosječno ostvaruje 1,3 intramolekulske veze¹⁴⁶ naspram 2,8 koliko je dobiveno za **C3**. Takvo značajno povećanje može biti uzrok veće entalpijske kazne prilikom vezanja iona. Rezultati MD simulacija pokazuju signifikantno smanjenje prosječnog broja ion-receptor kontakata u slučaju spoja **C3** naspram spoja **C2** (tablica 10) što također može biti uzrok energetski manje povoljnom vezanju (slika 40). Nadalje, nemogućnost peptida da ostvari maksimalan mogući broj kontakata s anionom dovodi do nižeg stupnja desolvatacije skupina u veznom mjestu što je povezano s entropijskim doprinosom reakcije kompleksiranja.

Vezanje hidrogensulfatnog aniona je gotovo u potpunosti entalpijski kontroliran proces s izuzetno blago povoljnim entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja. U usporedbi s ciklopeptidom **C2**, vezanje HSO_4^- aniona na receptor **C3** je popraćeno manje povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosima, što također može biti povezano s manjim prosječnim brojem kontakata i nepravilnom strukturom ciklopeptida u kompleksu što podupiru rezultati MD simulacija u acetonitrilu (tablica 10, slika 40).

Rezultati ^1H NMR titracije **C3** s DHP (slika D145) upućuju na nastajanje nekoliko tipova kompleksa. Naime, iz prikupljenih spektara vidljivo je da u početku dolazi do ravnoteže u (umjereno) brzom izmjeni na NMR vremenskoj skali. Nakon dodatka 0,3 ekvivalenta DHP aniona pojavljuje se signal na 9,7 ppm čiji se položaj ne mijenja, a integral raste, što odgovara ravnoteži u sporom izmjeni. Obradom podataka dobivenih ITC titracijom dobiveni su termodinamički parametri za nastajanje tri vrste kompleksa stehiometrija 1:1, 1:2 i 1:3 (**C3**:DHP). Slično ponašanje uočeno je i za Boc-zaštićeni cikloheksalizin¹⁴¹ gdje je, uz pomoć QM/MM MD simulacija predviđena struktura tog kompleksa. Reakcijska entalpija nastajanja sva tri tipa **C3**-DHP kompleksa je povoljna pri čemu je entropijski doprinos za vezanje prvog DHP-a povoljan, vezanje drugog na postojeći kompleks nepovoljan, a zanimljivo da je reakcijska entropija vezanja trećega vrlo povoljna, toliko da je taj doprinos dominantan u Gibbsovoj energiji kompleksiranja. Povoljna reakcijska entropija nastajanja 1:1 kompleksa najvjerojatnije proizlazi iz desolvatacije peptida i kompleksa dok je entropijski doprinos vezanja drugog dihidrogenfosfatnog aniona nepovoljno vjerojatno zbog gubitka translacijskih stupnjeva slobode gosta. MD simulacije u ovom slučaju nisu bile od velike pomoći. Uspješno su provedene samo simulacije 1:1 kompleksa, dok je u ostalim slučajevima došlo do disocijacije kompleksa pri čemu je samo jedan DHP anion ostao vezan na ciklopeptid.

Afinitet **C3** prema nitratnom i tiocijanatnom anionu je po jakosti između afiniteta za I^- i Br^- anione što nije bilo dostatno za pouzdano određivanje ostalih termodinamičkih parametara

kompleksiranja pomoću ITC titracija zbog velikih toplina razrjeđenja. Kao i u slučaju ciklopeptida **C1**, primijećeno je nastajanje dva tipa kompleksa s tiocijanatnim anionom u sličnim relativnim vremenskim zastupljenostima (slika 40 g i h), za razliku od ciklopeptida **C2** gdje je opaženo nastajanje samo onog tipa u kojem ciklopeptid interagira s anionom preko dušikova atoma.¹⁴⁶

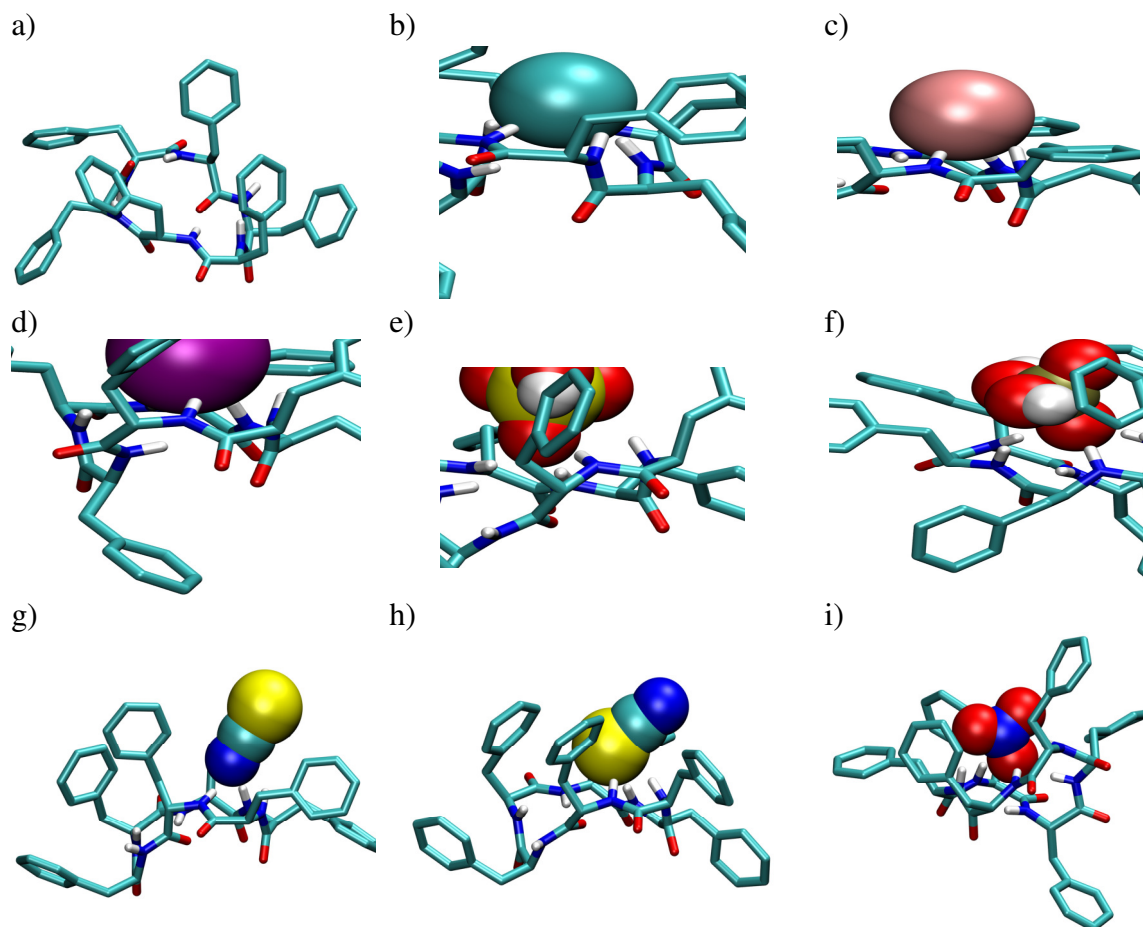
Uspoređujući rezultate vezanja aniona na linearne (**L2** i **L3**) i cikličke peptide (**C2** i **C3**) u acetonitrilu može se primijetiti velika razlika u konstantama stabilnosti, ponajviše u slučaju kompleksa s halogenidnim anionima (tablice 1 i 9). Entalpijski doprinos reakcijama kompleksiranja povoljniji je u slučaju linearnih peptida (iznimka je nastajanje **L2Cl⁻**) što je najvjerojatnije posljedica stvaranja slabijih vodikovih veza kod cikličkih peptida. Najvjerojatniji uzrok tome je manja fleksibilnosti peptidne okosnice u odnosu na linearne analoge te bolja prilagodba linearnog lanca gostima. Entropijski doprinos nastajanja kompleksa linearnih peptida s anionima je nepovoljan, za razliku od kompleksa ciklopeptida gdje je taj doprinos vrlo povoljan. Iznimka je opet nastajanje kompleksa **L2Cl⁻** čija je standardna reakcijska entropija povoljna, ali manje od one za nastajanje vrste **C2Cl⁻**. Ovo je odličan primjer makrocikličkog efekta uslijed kojeg dolazi do drastičnog povećanja stabilnosti kompleksa, čak i ako se pritom smanjuje povoljnost entalpijskog doprinosa.

Tablica 10. Prosječni broj kontakata između amidnih skupina peptida i aniona u kompleksima **C2** i **C3** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.

Anion	C2 ¹⁴⁶	C3
Cl ⁻	5,0	3,4
Br ⁻	5,0	3,8
I ⁻	4,9	3,0
HSO ₄ ⁻	4,3	3,2
H ₂ PO ₄ ⁻	4,9	5,8
SCN ⁻	4,9	2,9 ^a 2,7 ^b
NO ₃ ⁻	4,9	6,0

^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona
Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



Slika 40. Reprezentativne strukture a) slobodnog peptida **C3** i njegovih kompleksa s b) Cl⁻, c) Br⁻, d) I⁻, e) HSO₄⁻, f) H₂PO₄⁻, g) SCN⁻ (86 %), g) SCN⁻ (14 %) te h) NO₃⁻ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

4.3.3. Kompleksi ciklopeptida **C2** i **C3** s jednostavnim anorganskim anionima u metanolu

Rezultati dobiveni obradom $^1\text{H NMR}$ i ITC titracija ciklopeptida **C2** i **C3** s anionima u metanolu (slike D152–D164) prikazani su u tablici 11. Zbog puno bolje solvatacije slobodnih aniona u tom otapalu (tablica 13), konstante stabilnosti kompleksa su i do 4,5 reda veličine niže nego u acetonitrilu. Stoga, rezultati ITC titracija nisu mogli biti pouzdano obrađeni u većini slučajeva.

Tablica 11. Termodinamički parametri vezanja aniona na ciklopeptide **C2** i **C3** u metanolu pri 25 °C.

Peptid	Anion	$\log K \pm \text{SE}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm \text{SE}}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
C2	Cl^-	1,64 ^{a,147}	-9,36 ^a		
	Br^-	1,60 ^a	-9,13 ^a		
	I^-	1,24 ^a	-7,08 ^a		
	HSO_4^-	2,46 ^{a,147}	-14,04 ^a		
		$2,58 \pm 0,03^b$	$-14,7 \pm 0,2^b$	$-10,41 \pm 0,07^b$	$14,4 \pm 0,5^b$
	H_2PO_4^-	3,32 ^{a,147}	-18,95 ^a		
		$3,364 \pm 0,005^b$	$-19,20 \pm 0,03^b$	$-11,8 \pm 0,1^b$	$24,8 \pm 0,3^b$
SCN^-	0,69 ^a	-3,94 ^a			
NO_3^-	1,11 ^a	-6,34 ^a			
C3	HSO_4^-	1,25 ^a	-7,13 ^a		

^a određeno $^1\text{H NMR}$ titracijama

^b određeno ITC titracijama

SE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$).

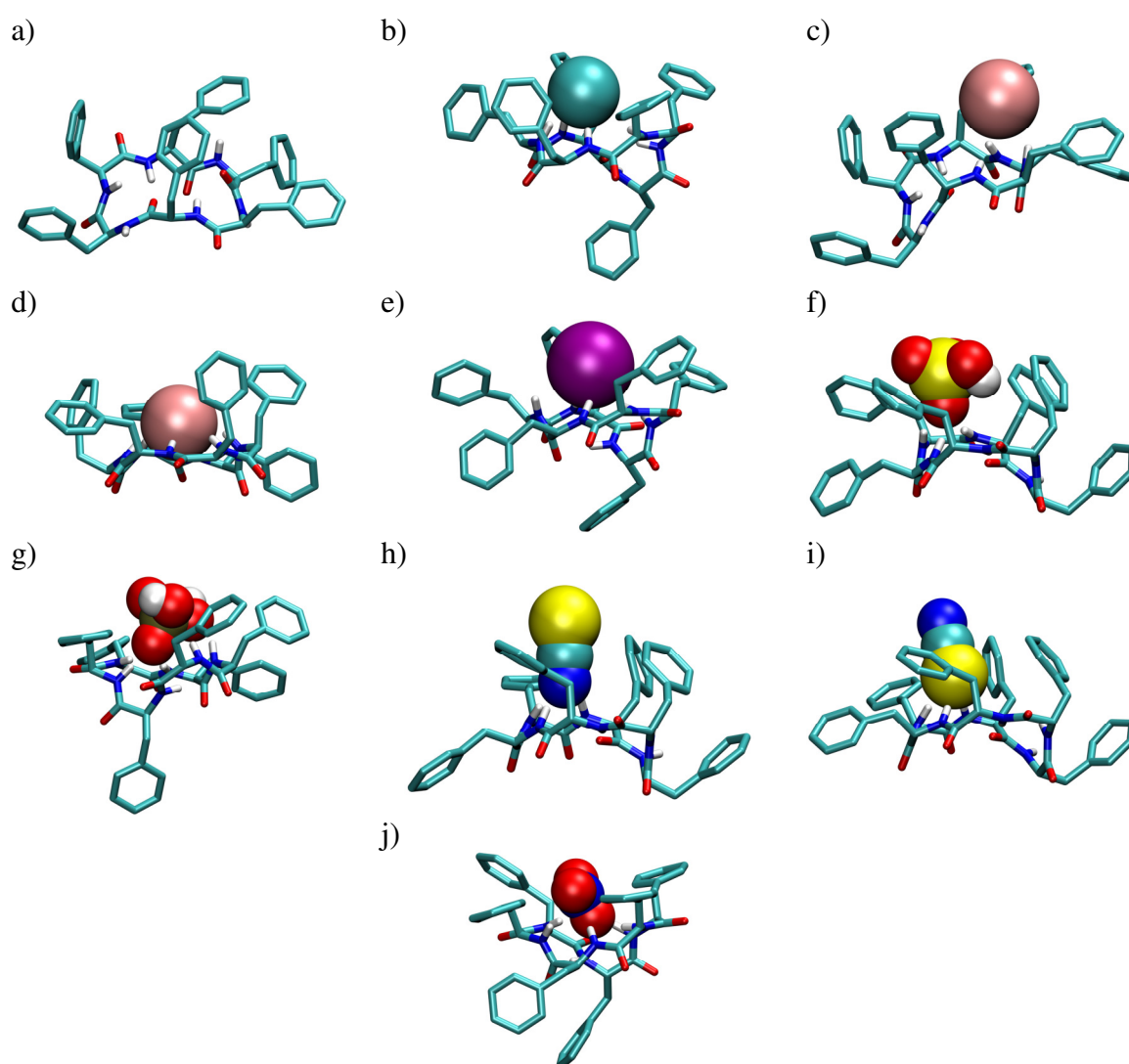
Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

Afinitet ciklopeptida **C2** prema hidrogensulfatnom anionu također je manji u metanolu u odnosu na acetonitril pri čemu je opaženo smanjenje konstante stabilnosti kompleksa za dva reda veličine. Iako je entropijski doprinos nastanka kompleksa u metanolu nešto povoljniji nego u acetonitrilu, ta je razlika posljedica smanjenja povoljnosti entalpijskog doprinosa. Vezanje DHP i HSO_4^- na receptor **C2** popraćeno je povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja. Potonji doprinos, zbog sličnih vrijednosti reakcijskih entalpija rezultira time da je konstanta stabilnosti kompleksa C2DHP^- za oko red veličine veća nego u slučaju kompleksa C2HSO_4^- u istom otapalu.

Manji anionski afinitet ciklopeptida **C3** naspram **C2** vidljiv je i u metanolu. U $^1\text{H NMR}$ titracijama spoja **C3** nisu primijećene gotovo nikakve promjene u spektru receptora s dodatkom

otopine soli (slike D158–D160 i D162–D164), osim u slučaju titracije s HSO_4^- iz koje je bilo moguće dobiti pouzdanu vrijednost konstante stabilnosti nastalog kompleksa (tablica 11).

Rezultati MD simulacija slobodnog liganda **C3** i njegovih anionskih kompleksa u metanolu slični su onima provedenim u acetonitrilu. Prosječan broj intramolekulskih vodikovih veza tijekom simulacije slobodnog liganda iznosi 3,0 (u acetonitrilu 2,8), dok je prosječan broj kontakata peptida i aniona u većini slučajeva između 2,9 i 3,1 (tablica 12) te u oba slučaja dolazi do vezanja aniona na *endo* stranu ciklopeptida. Jedino odstupanje od tog ponašanja je opaženo u slučaju kompleksa s DHP i NO_3^- , no isti efekt vidljiv je i u acetonitrilu (tablica 12). Posljedica malog broja kontakata ponovno je nepravilna (asimetrična) struktura (slika 41).



Slika 41. Reprezentativne strukture a) slobodnog peptida **C3** i njegovih kompleksa s b) Cl^- , c) Br^- (83 %), d) Br^- (17 %), e) I^- , f) HSO_4^- , g) H_2PO_4^- , h) SCN^- (43 %), i) SCN^- (57 %) te j) NO_3^- dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Tablica 12. Prosječni broj kontakata između amidnih skupina peptida i aniona u kompleksima **C2** i **C3** dobiven MD simulacijama u metanolu.

Anion	C2 ¹⁴⁷	C3
Cl ⁻	4,9	2,6
Br ⁻	4,9	3,1
I ⁻	4,8	3,1
HSO ₄ ⁻	4,3	3,0
H ₂ PO ₄ ⁻	5,0	5,4
SCN ⁻	5,0	2,7 ^a 2,9 ^b
NO ₃ ⁻	4,8	5,6

^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona

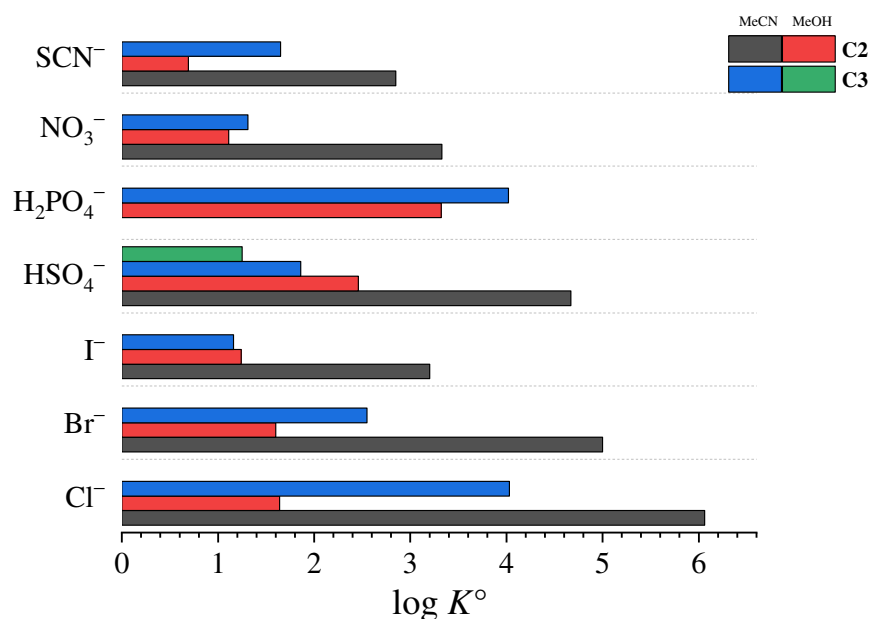
Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

Usporedba vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa cikličkih peptida **C2** i **C3** s anionima u acetonitrilu i metanolu prikazana je na slici 42. Vidljivo je da je u većini slučajeva utjecaj otapala mnogo veći nego utjecaj veličine ciklopeptida, iako ni on nije zanemariv. Razlog smanjenja konstanti stabilnosti pojedinih kompleksa za do pet redova veličine posljedica je bolje solvatacije aniona (a vjerojatno i peptida) u metanolu. Standardne Gibbsove energije transfera aniona iz acetonitrila u metanol, zajedno s razlikom u standardnim Gibbsovim energijama kompleksiranja ciklopeptida **C2** u acetonitrilu i metanolu dane su u tablici 13. U većini slučajeva transfer aniona gotovo u potpunosti objašnjava razliku između Gibbsovih energija kompleksiranja, a u slučaju jodidnog aniona čak i premašuje tu razliku.

Tablica 13. Standardna Gibbsova energija transfera aniona iz metanola u acetonitril i razlika standardnih reakcijskih Gibbsovih energija za vezanje aniona na ciklopeptid **C2** u metanolu i acetonitrilu pri 25 °C.

A ⁻	$\frac{\Delta_t G^\circ (A^-)}{\text{kJ mol}^{-1}}$ ¹⁴⁵	$\frac{\Delta\Delta_r G^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$ ^a
Cl ⁻	-29	25,24
Br ⁻	-20	19,40
I ⁻	-10	11,22
SCN ⁻	-8	12,36
NO ₃ ⁻	-8	12,66

^a $\Delta\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ (\text{C2A}^-, \text{MeOH}) - \Delta_r G^\circ (\text{C2A}^-, \text{MeCN})$



Slika 42. Konstante stabilnosti kompleksa ciklopeptida **C2** i **C3** a anionima u acetonitrilu i metanolu pri 25 °C.

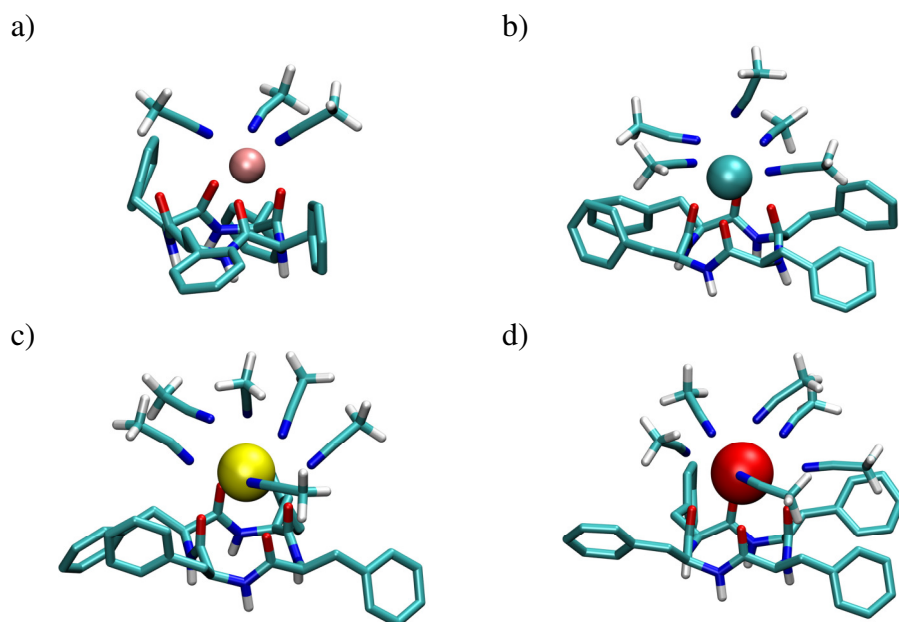
4.3.4. Kompleksi ciklopeptida **C1** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu i metanolu

Uvid u strukturne karakteristike kompleksa ciklopeptida **C1** s kationima zemnoalkalijskih metala u acetonitrilu i metanolu dobiven je MD simulacijama pri 25 °C (slike 43 i 44). U slučaju kationa također dolazi do vezanja s *endo* strane ciklopeptida, a prosječni broj kontakata peptida i kationa povećava se s radijusom kationa u oba otapala (tablica 14). Razlog zbog kojega manji kationi ne ostvaruju maksimalan broj kontakata je sterički nepovoljna konformacija u kojoj su koordinirani karbonilni kisikovi atomi međusobno blizu zbog položaja manjih kationa koji se smještaju bliže ravnini peptidne okosnice. Također, MD simulacije ukazuju na djelomičnu desolvataciju kationa prilikom kompleksiranja što rezultira s 3–6 molekula otapala u primarnoj solvatacijskoj sferi kompleksa oko kationa.

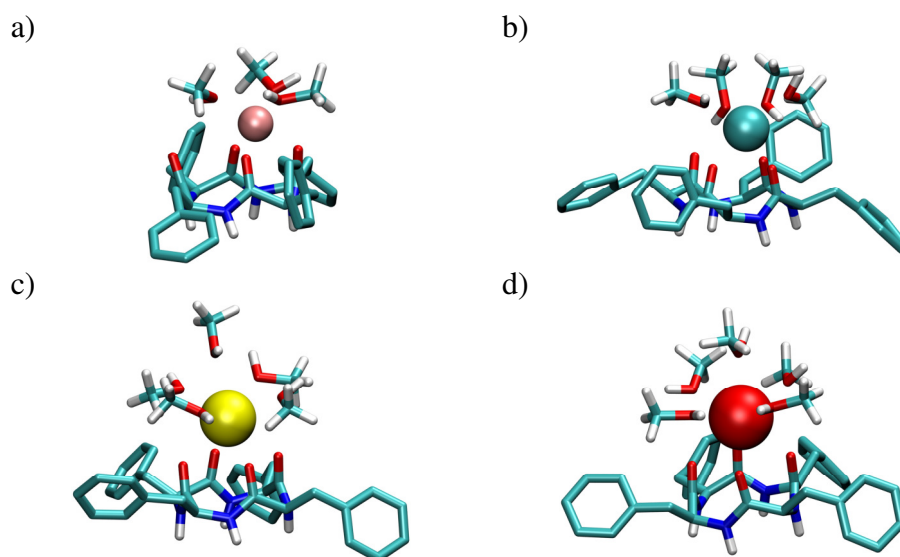
Tablica 14. Prosječni broj kontakata između karbonilnih skupina peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima **C1** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu i metanolu pri 25°C.

Otapalo	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
MeCN	2,9	3,1	3,3	3,7
MeOH	2,7	2,1	3,0	3,4

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



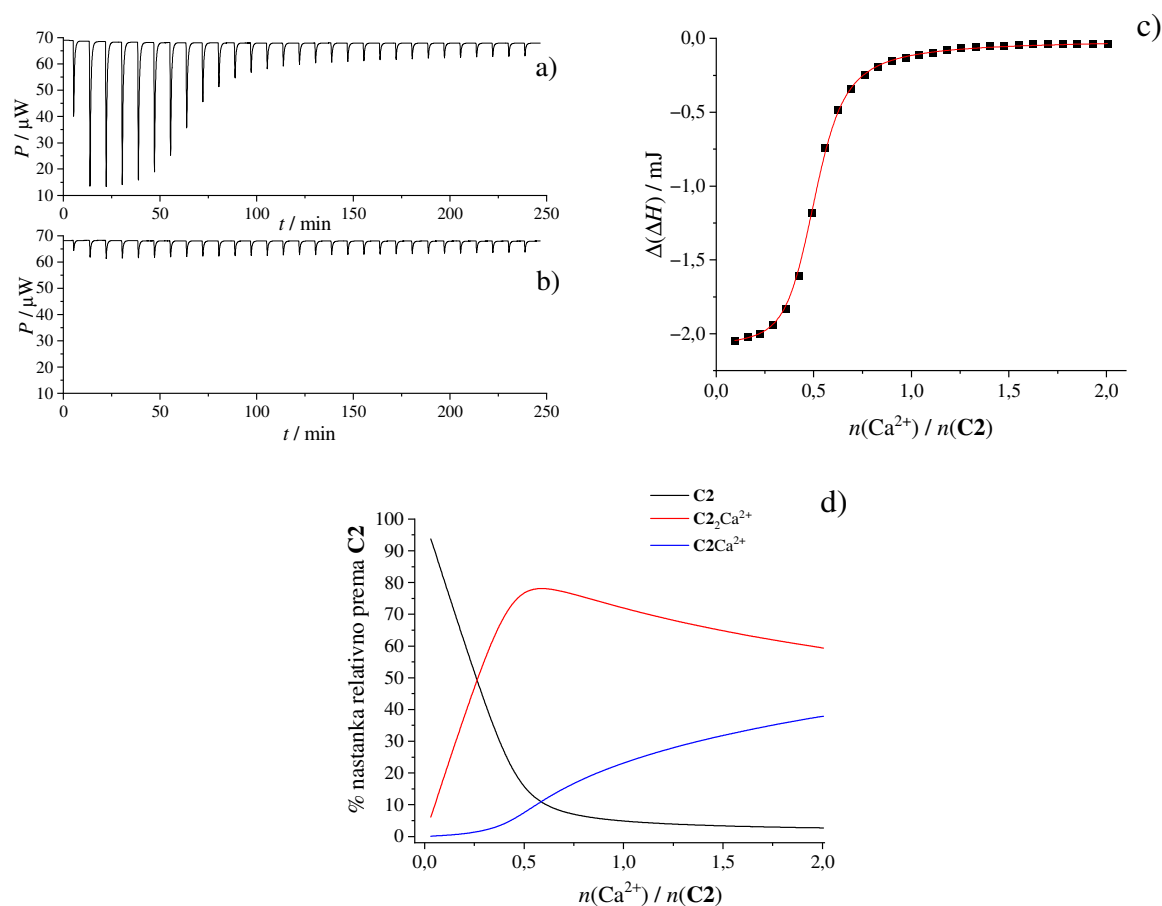
Slika 43. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C1** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} zajedno s primarnom solvacijskom sferom kationa dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 44. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C1** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} zajedno s primarnom solvacijskom sferom kationa dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

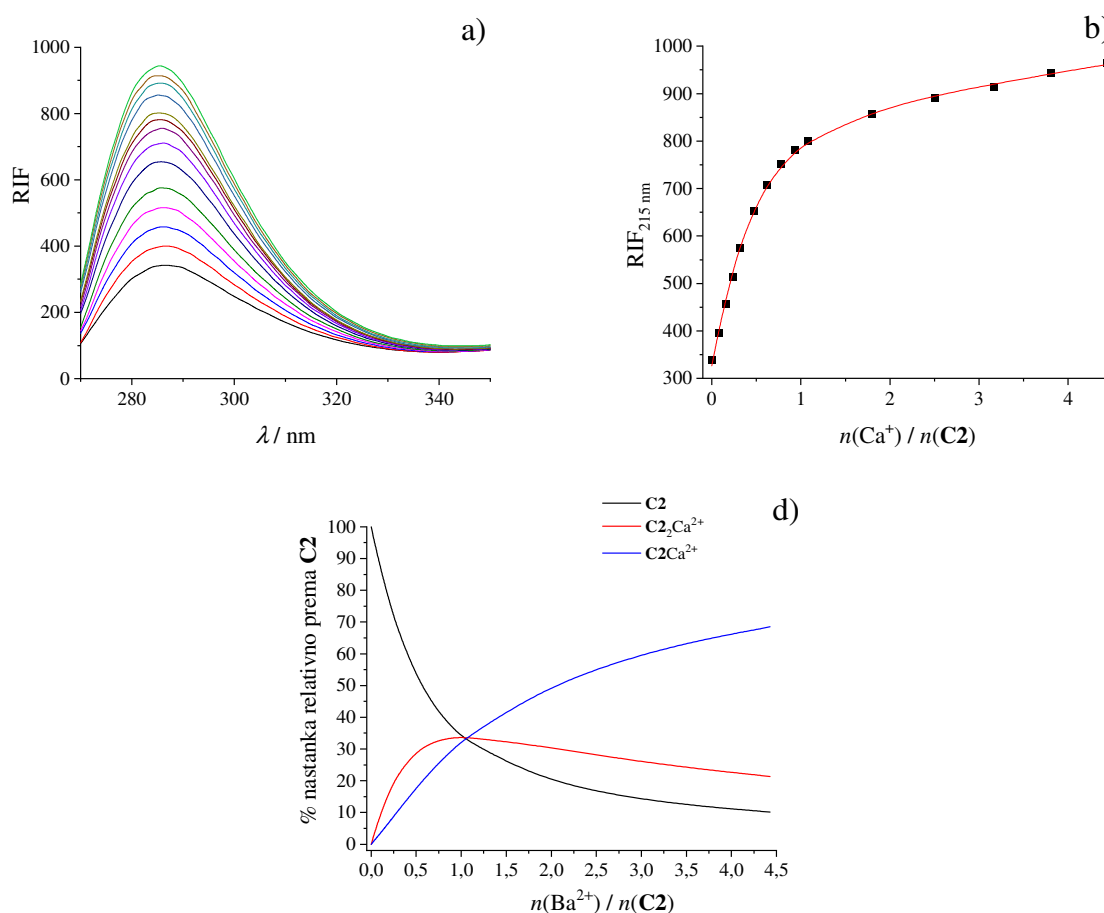
4.3.5. Kompleksi ciklopeptida **C2** i **C3** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu

Vežanje kationa zemnoalkalijskih metala na ciklopeptide **C2** i **C3** praćeno je mikrokalorimetrijski i spektrofluorimetrijski. Primjer rezultata ITC titracije ciklopentapeptida **C2** s Ca^{2+} prikazan je na slici 45, dok su rezultati titracija tog ciklopeptida i cikloheksapeptida **C3** s ostalim kationima prikazane na slikama D165–D167 i D171–D174. Termodinamički parametri dobiveni obradom tih titracija dani su u tablici 15. Točka infleksije u sigmoidalnoj ovisnosti sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru reaktanata upućuje na nastajanje „sendvič“ kompleksa. No, zadovoljavajuće podudaranje eksperimentalnih i izračunanih vrijednosti postignuto je tek nakon što je u model uvedena dodatna ravnoteža, ona za nastajanje kompleksa stehiometrije 1:1.



Slika 45. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,74 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,74 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+})/n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Na slici 46 prikazan je rezultat spektrofotometrijske titracije ciklopeptida **C2** s kalcijevim kationom, dok su rezultati ostalih spektrofotometrijskih titracija **C2** i **C3** dani na slikama D168–D170 i D175–D178. Podaci su pouzdano opisani modelom s dvije ravnoteže koji uključuje „sendvič“ i 1:1 komplekse, kao i u slučaju ITC titracija. U titracijskim je spektrima vidljivo da s vezanjem kationa na ciklopeptide **C2** i **C3** dolazi do vrlo snažnog pojačanja fluorescencije. U usporedbi s anionskim kompleksima receptora **C2**, jedino dihidrogenfosfatni anion ima sličan utjecaj na emisijski intenzitet tog ciklopeptida.¹⁴⁶



Slika 46. a) Spektrofotometrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,82 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 10 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Tablica 15. Termodinamički parametri vezanja zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide **C2** i **C3** u acetonitrilu pri 25 °C.

Peptid	Anion	C:M ²⁺	log <i>K</i> ± SE	$\Delta_r G^\circ \pm SE$ kJ mol ⁻¹	$\Delta_r H^\circ \pm SE$ kJ mol ⁻¹	$\Delta_r S^\circ \pm SE$ J K ⁻¹ mol ⁻¹
C2	Ca ²⁺	1:1	4,503 ± 0,003 ^b 4,50 ^{a,c}	-25,70 ± 0,02 ^b -25,68 ^{a,c}	-34,3 ± 0,5 ^b	-29 ± 2 ^b
		2:1	4,97 ± 0,02 ^b 4,31 ± 0,07 ^c	-28,4 ± 0,1 ^b -24,60 ± 0,4 ^c	-23 ± 1 ^b	18 ± 4 ^b
	Sr ²⁺	1:1	5,11 ± 0,05 ^b 5,11 ^{a,c}	-29,2 ± 0,3 ^b -29,17 ^{a,c}	-32 ± 1 ^b	-11 ± 6 ^b
		2:1	4,70 ± 0,04 ^b 5,61 ± 0,03 ^c	-26,8 ± 0,2 ^b -32,02 ± 0,2 ^c	-27,3 ± 0,7 ^b	-2 ± 3 ^b
	Ba ²⁺	1:1	4,66 ± 0,05 ^b 4,66 ^{a,c}	-26,6 ± 0,3 ^b -26,60 ^{a,c}	-34 ± 1 ^b	-25 ± 6 ^b
		2:1	4,30 ± 0,03 ^b 4,29 ± 0,06 ^c	-24,5 ± 0,2 ^b -24,49 ± 0,3 ^c	-27 ± 2 ^b	-7 ± 9 ^b
C3	Mg ²⁺	1:1	5,68 ± 0,02 ^b 5,68 ^{a,c}	-32,4 ± 0,2 ^b -32,42 ^{a,c}	-10,1 ± 0,2 ^b	75 ± 1 ^b
		2:1	4,03 ± 0,02 ^b 3,87 ± 0,04 ^c	-23,0 ± 0,1 ^b -22,09 ± 0,2 ^c	-6,98 ± 0,09 ^b	53,6 ± 0,7 ^b
	Ca ²⁺	1:1	6,95 ± 0,02 ^b 6,95 ^{a,c}	-39,7 ± 0,1 ^b -39,67 ^{a,c}	-39,76 ± 0,07 ^b	≈0 ^b
		2:1	5,501 ± 0,004 ^b 5,24 ± 0,02 ^c	-31,40 ± 0,01 ^b -29,91 ± 0,1 ^c	-43,7 ± 0,01 ^b	-41,3 ± 0,3 ^b
	Sr ²⁺	1:1	5,55 ^{a,b} 5,55 ± 0,03 ^c	-31,68 ^{a,b} -31,7 ± 0,2 ^b	-27 ± 1 ^b	15 ± 3 ^b
		2:1	4,04 ± 0,05 ^b 4,50 ± 0,02 ^c	-23,1 ± 0,3 ^b -25,68 ± 0,1 ^c	-11,6 ± 0,9 ^b	38 ± 2 ^b
Ba ²⁺	1:1	5,06 ± 0,02 ^b 5,06 ^{a,c}	-28,87 ± 0,09 ^b -28,88 ^{a,c}	-30,8 ± 0,2 ^b	-6,3 ± 0,3 ^b	
	2:1	3,998 ± 0,005 ^b 3,75 ± 0,1 ^c	-22,82 ± 0,03 ^b -21,40 ± 0,6 ^c	-18 ± 1 ^b	15 ± 3 ^b	

^a fiksirane vrijednosti tijekom obrade (određene ostalim metodama)^b određeno ITC titracijama^c određeno spektrofotometrijskim titracijamaSE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3).

Rezultati titracija u acetonitrilu pokazuju da je afinitet ciklopentapeptida **C2** prema kationima zemnoalkalijskih metala vrlo visok, pri čemu ciklopeptid ne pokazuje selektivnost prema određenom kationu. Nastajanje svih 1:1 i 2:1 (peptid:kation) „sendvič“ kompleksa entalpijski je kontroliran proces koji je povoljniji za stvaranje kompleksa tipa 1:1 nego za vezanje dodatnog ciklopeptida. Standardna reakcijska entropija za nastajanje 1:1 kompleksa ne korelira s radijusom kationa, no za nastajanje „sendvič“ kompleksa iz kompleksa tipa 1:1 njezina se vrijednost smanjuje se s povećanjem radijusa kationa. Uzrok tome vjerojatno je potpuna

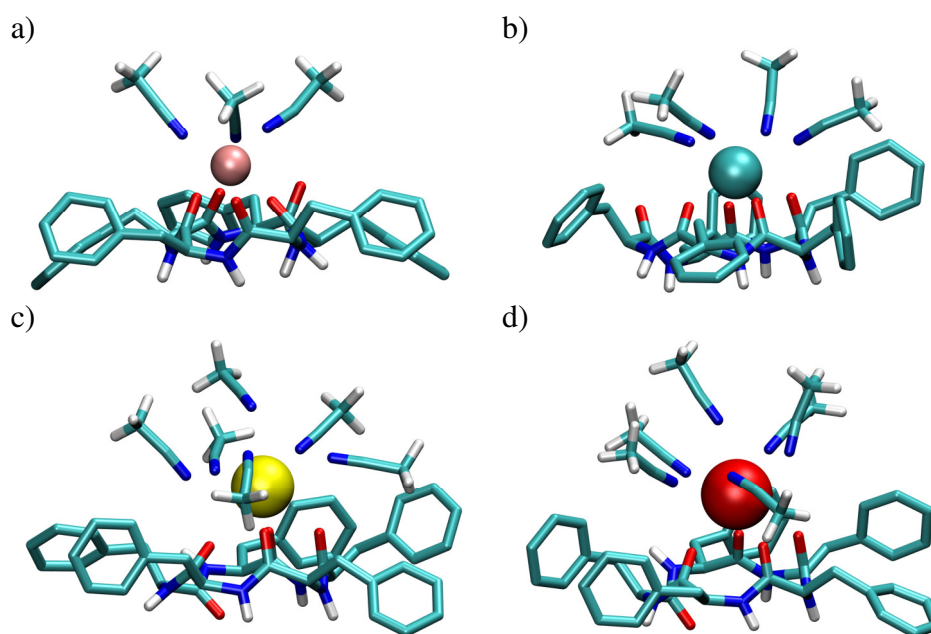
desolvatacija kationa koji su u 1:1 tipu kompleksa parcijalno solvatirani, što je uočeno u MD simulacijama (slika 47 i 48). Povoljni entropijski efekt gubitka solvacijske sfere može nadomjestiti nepovoljni gubitak translacijskih stupnjeva slobode ciklopeptida koji se veže na postojeći kompleks. Vežanje magnezijevog kationa, zbog nereproducibilnosti (slika D165 i D168) titracija nije se moglo kvantitativno okarakterizirati. Razlog tome može biti utjecaj vode koja dolazi iz soli (hidrat) ili iz acetonitrila. Naime, solvacijska sfera magnezijeva kationa u acetonitrilu značajno ovisi o količini vode koja može, čak i pri malom množinskom udjelu, istisnuti molekule acetonitrila koordinirane na Mg^{2+} .¹⁴⁸ Stoga mjerenja, pogotovo kalorimetrijska, mogu značajno ovisiti o starosti otopine, acetonitrila ili čak vremenu vaganja (magnezijev perklorat je higroskopan).

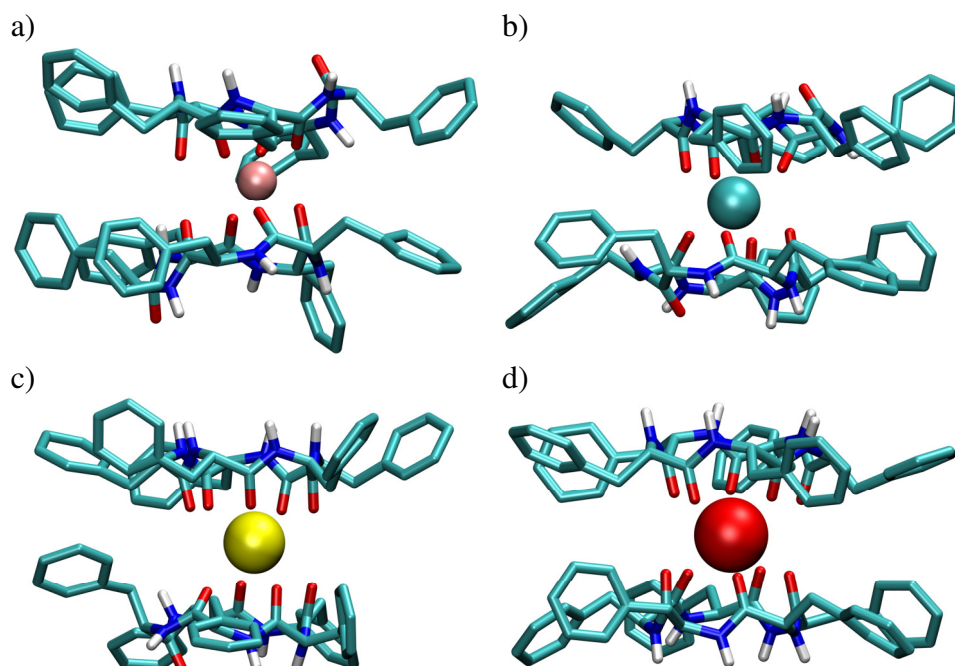
Za razliku od ciklopeptida **C2**, cikloheksapeptid **C3** pokazuje blagu selektivnost prema kalcijevom kationu, s konstantom stabilnosti $C3Ca^{2+}$ kompleksa koja je za dva reda veličine veća nego u slučaju ostalih zemnoalkalijskih kompleksa. Većina reakcija je entalpijski kontrolirana, dok se entropijski doprinos znatno razlikuje među kationima i ne uočava se sustavna ovisnost. Najveće odstupanje vidljivo je u slučaju magnezijeva kationa gdje je nastajanje oba tipa kompleksa entropijski kontrolirano. Uzrok tome ponovno može biti prisutnost vode, koja može ne samo utjecati na prije spomenutu reproducibilnost mjerenja, već i na odstupanja u pravilnosti termodinamičkih parametara kompleksiranja u nizu zemnoalkalijskih metala.

Rezultati MD simulacija u acetonitrilu prikazani su u tablici 16. Kao što je to bio slučaj i kod ciklotrapeptida **C1**, ciklopeptidi **C2** i **C3** ne ostvaruju maksimalan mogući broj kontakata s kationom, a u svim kompleksima je uvijek prisutna jedna slobodna karbonilna skupina koja je orijentirana od kationa (slike 47 i 49). Najveća razlika u strukturi kationskih kompleksa ciklopeptida **C2** i **C3** uočena je u slučaju magnezijevog kompleksa. Prsten cikloheksapeptida **C3** je dovoljno velik da se mali Mg^{2+} kation smjesti u njegovu ravninu i na taj način bude u kontaktu s većim brojem karbonilnih skupina, tri s jedne strane ravnine i dva s druge strane (slika 49 a). I u slučaju ciklopeptida **C3** primijećena je djelomična desolvatacija kationa (osim u slučaju magnezijeva kationa) u procesu vezanja na ciklopeptid, pri čemu se broj molekula koje okružuje kation u kompleksu povećava s radijusom kationa (slika 49). Nastajanje „sendvič“ kompleksa popraćeno je otpuštanjem preostalih molekula otapala koje solvatiraju kation u kompleksima tipa 1:1 (slika 50).

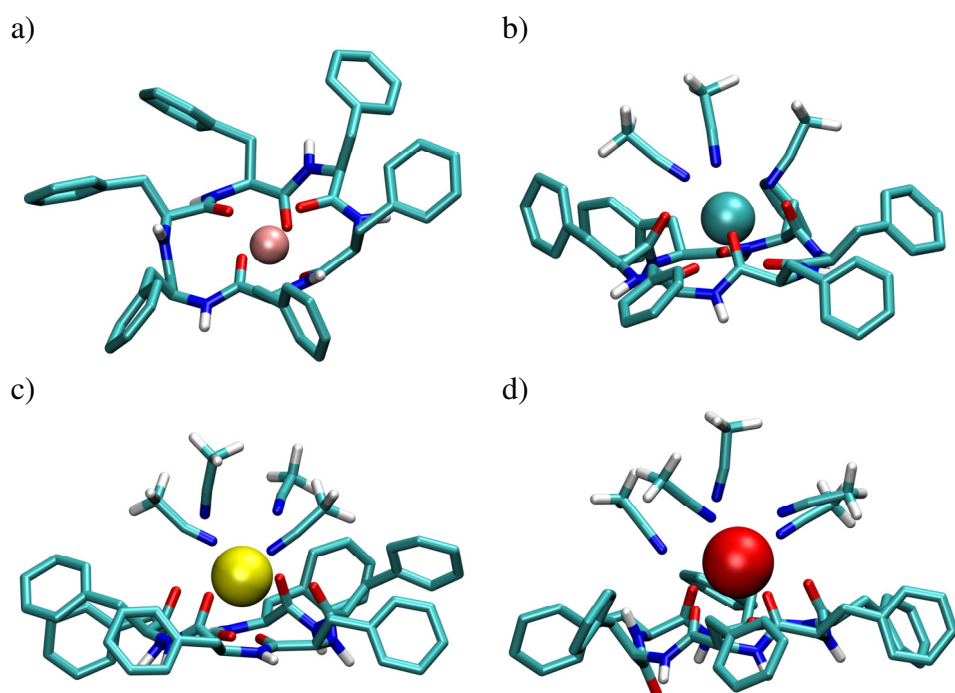
Tablica 16. Prosječni broj kontakata između karbonilnih skupina peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima **C2** i **C3** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.

Kation	C:M ²⁺	C2	C3
Mg ²⁺	1:1	3,0	4,7
	2:1	5,7	6,0
Ca ²⁺	1:1	3,8	4,4
	2:1	7,4	7,0
Sr ²⁺	1:1	3,6	4,9
	2:1	5,8	6,0
Ba ²⁺	1:1	3,9	4,8
	2:1	7,0	8,1

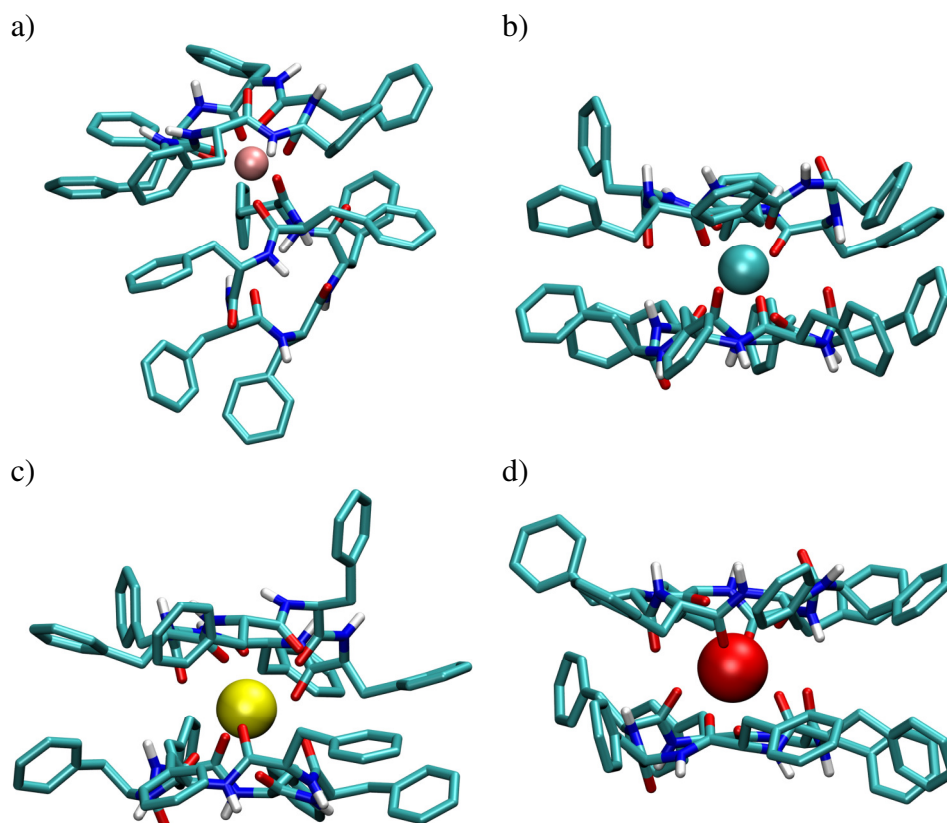
Slika 47. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C2** s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu pri. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 48. Reprezentativne strukture „sendvič“ kompleksa ciklopeptida C2 s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu pri Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 49. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida C3 s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 50. Reprezentativne strukture „sendvič“ kompleksa ciklopeptida **C3** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

Uspoređujući termodinamičke parametre kompleksiranja aniona i zemnoalkalijskih kationa u acetonitrilu (tablice 9 i 15) vidljivo je da je afinitet ciklopentapeptida **C2** prema kationima usporediv s onim za Br^- i HSO_4^- , no entalpijski i entropijski doprinosi posve su različiti. Osim razlike u solvataciji iona i energiji interakcije ciklopeptid-ion, razlog tome može biti drugačija orijentacija amidnih skupina i njihova dodatna polarizacija uslijed vezanja iona. Naime, interakcija karbonilnih skupina ciklopeptida s kationima polarizira amidnu skupinu na način da NH dio postaje parcijalno pozitivniji, što rezultira boljom interakcijom tog dijela s proton-akceptorskim otapalima (npr. acetonitril). S druge strane, interakcijom NH dijela amidne skupine i aniona u kompleksima karbonilni dio postaje parcijalno negativniji i rezultira boljom interakcijom tih skupina s proton-donorskim otapalima (npr. metanol). Na taj način naboj kompleksa može utjecati na njegova solvatacijska svojstva u pojedinim otapalima. U slučaju cikloheksafenilalanina vidljiv je značajno veći afinitet prema kationima zemnoalkalijskih metala u odnosu na afinitet prema anionima što je posljedica izuzetno povoljnije reakcijske

entalpije što isto može biti posljedica spomenute dodatne polarizacije amidne skupine. Za razliku od ciklopeptida **C2**, čiji je afinitet prema kationima usporediv s onim prema anionima, cikloheksapeptid **C3** bolje veže katione u acetonitrilu s konstantama stabilnosti nastajanja kompleksa stehiometrije 1:1 za 1–2 reda veličine većim. Posljedica je to puno povoljnije reakcijske entalpije, osim u slučaju vezanja magnezijeva kationa, gdje više dolazi do izražaja entropijski doprinos kompleksiranju. Također, treba još jednom napomenuti snažno pojačanje intenziteta fluorescencije vezanjem kationa u usporedbi s vezanjem aniona. Ovaj rezultat pokazuje da se ciklopeptidi mogu koristiti kao fluorescentni kationski senzori, ne samo zbog visoke stabilnosti kompleksa, nego i zbog snažne promjene u emisijskim spektrima receptora prilikom nastanka kompleksa.

Što se tiče makrocikličkog efekta u nastajanju kationskih kompleksa ciklopeptida, nije moguće provesti kvantitativnu usporedbu afiniteta linearnih i cikličkih analoga iz dobivenih rezultata (tablice 6 i 15), ali se kvalitativno može procijeniti da je njihov afinitet usporediv. Nažalost, zbog malog broja kvantitativno određenih termodinamičkih parametara vezanja kationa na linearne peptide, niti jedan podatak se ne može direktno usporediti. Ipak, vidljivo je da su entropijski doprinosi nastajanja kationskih kompleksa linearnih peptida vrlo visoki, čak i viši od većine ciklopeptidnih kompleksa. To dovodi u pitanje postojanje makrocikličkog efekta u slučaju kationa, za razliku od aniona gdje je utjecaj ciklizacije na afinitet receptora itekako vidljiv. Razlog tome može biti relativno visok stupanj parcijalne solvatacije kationa u kompleksima s ciklopeptidima, kao što je uočeno u MD simulacijama, za razliku od linearnih peptida gdje je peptid fleksibilniji i lakše se prilagođava veličini kationa. Dodatno, sam kation se nalazi u ravnini okosnice pseudocikličke strukture linearnog peptida, što smanjuje dostupnost vezanog kationa molekulama otapala i rezultira s povoljnijim entropijskim doprinosom desolvatacije.

4.3.6. Kompleksi ciklopeptida **C2** i **C3** sa zemnoalkalijskim kationima u metanolu

Afinitet ciklopeptida **C2** i **C3** prema kationima zemnoalkalijskih metala u metanolu proučavan je mikrokalorimetrijski i spektrofluorimetrijski (slike D179–D188), a rezultati dobiveni obradom tih podataka dani su u tablici 17.

Tablica 17. Termodinamički parametri vezanja zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide **C2** i **C3** u metanolu pri 25 °C.

Peptid	Anion	$\log K \pm SE$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
C2	Ca ²⁺	2,30 ± 0,03 ^b	-13,1 ± 0,2 ^b		
	Sr ²⁺	2,41 ± 0,08 ^a	-13,8 ± 0,5 ^a	-13,8 ± 2 ^a	≈ 0 ^a
		2,66 ± 0,02 ^b	-15,2 ± 0,1 ^b		
	Ba ²⁺	2,80 ± 0,01 ^a	-15,99 ± 0,06 ^a	-14,4 ± 0,5 ^a	5 ± 2 ^a
2,95 ± 0,03 ^b		-16,8 ± 0,2 ^b			
C3	Ba ²⁺	1,87 ± 0,04 ^b	-10,7 ± 0,2 ^b		

^a određeno ITC titracijama

^b određeno spektrofluorimetrijskim titracijama

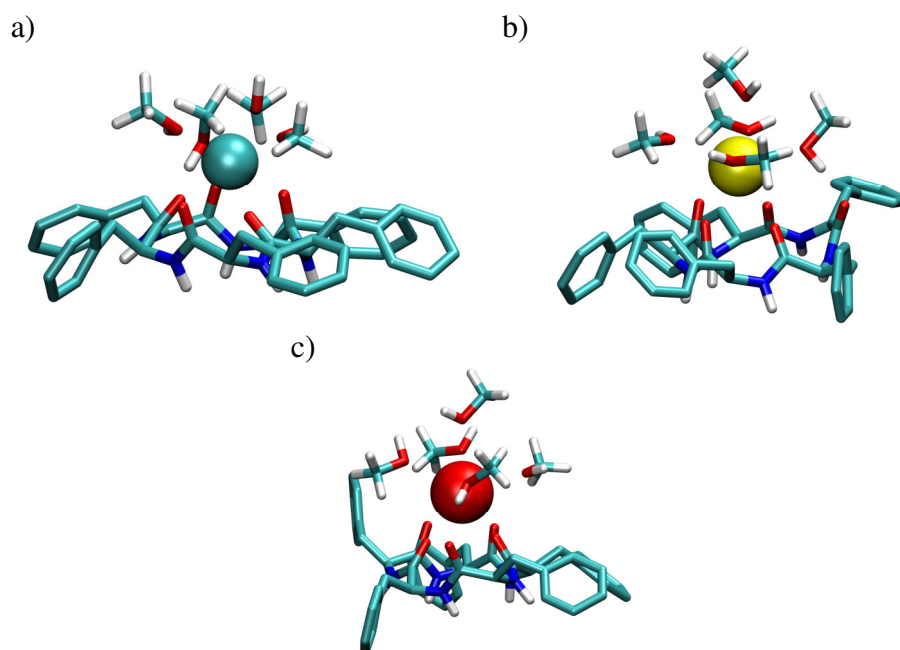
SE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$).

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

Vezanje magnezijeva kationa na ciklopeptid **C2** nije detektirano (slika D181), dok je u slučaju ostalih kationa uspješno određena konstanta stabilnosti nastalih kompleksa čija vrijednost blago raste s povećanjem radijusa kationa. Mikrokalorimetrijskim titracijama pokazano je da je vezanje stroncijeva i barijeva kationa egzoterman proces, dok je standardna reakcijska entropija bliska nuli. U titracijama cikloheksapeptida **C3** sa zemnoalkalijskim kationima opažena je promjena u intenzitetu fluorescencije s dodatkom otopine titransa (slike D185–D188) no većinu konstanti stabilnosti nije bilo moguće pouzdano odrediti zbog vrlo slabog vezanja na taj ligand. Kao i kod ciklopeptida **C2**, barijev kation tvori najstabilniji kompleks s ciklopeptidom **C3** te je jedino tom kompleksu bilo moguće pouzdano odrediti stabilnost. Zbog nereproducibilnosti ponovljenih mjerenja stabilnost kompleksa **C3** sa stroncijevim i kalcijevim kationom smatra se procjenom, a vrijednosti konstanti stabilnosti iznose redom 20 dm³ mol⁻¹ i 10 dm³ mol⁻¹ (slike D186 i D187). Vezanje magnezijeva kationa je najslabije od svih proučavanih kationa. Iako se vide male promjene u spektrofluorimetrijskim spektrima dodatkom otopine magnezijevog perklorata (slika D185) one su premale za procjenu konstante stabilnosti.

Rezultati MD simulacija ciklopeptida **C2** i **C3** u metanolu dani su u tablici 18, dok su reprezentativne strukture nastalih kompleksa prikazane na slici 51 i 52. Prosječni broj kontakata

između karbonilnih skupina ciklopeptida **C2** i **C3** i kationa manji je u metanolu u usporedbi s acetonitrilom, no takvo blago smanjenje nije dovoljno da bi objasnilo značajnu razliku u stabilnosti nastalih kompleksa. Nadalje, rezultati pokazuju značajnu parcijalnu solvataciju kationa u kompleksima s 3–5 molekula metanola u primarnoj solvatacijskoj sferi.



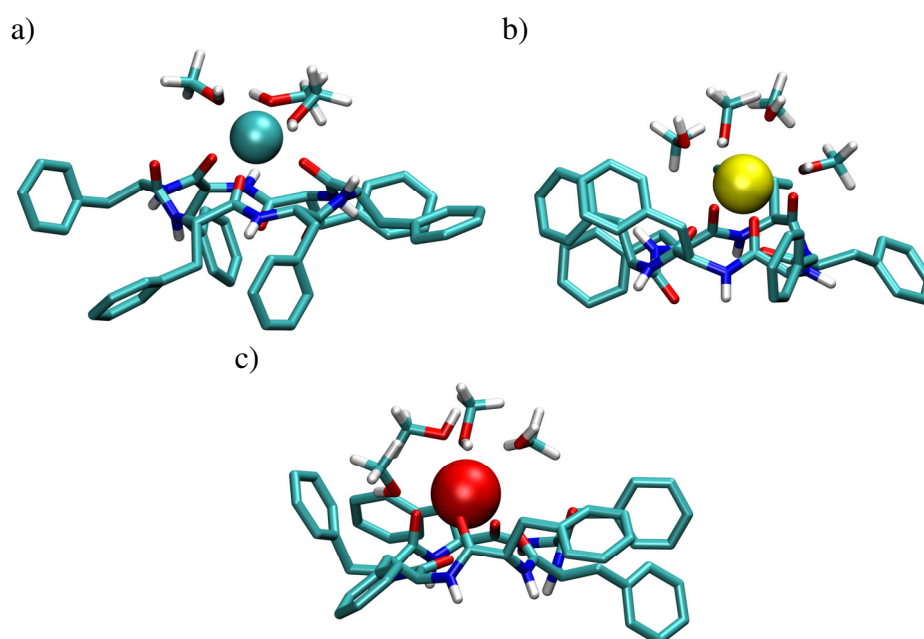
Slika 51. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C2** s a) Ca^{2+} , b) Sr^{2+} i c) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u metanolu pri 25 °C. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

Na slici 53 prikazana je usporedba stabilnosti 1:1 tipa kompleksa ciklopeptida **C2** i **C3** s kationima u acetonitrilu i metanolu. Veći ciklopeptid **C3** uspješnije veže katione u odnosu na **C2** u acetonitrilu, a najveća je razlika opažena kod kompleksiranja kalcijeva kationa. S druge strane, u metanolu veći afinitet prema kationima pokazuje ciklopeptid **C2**. Vidljiv je i značajan utjecaj otapala na stabilnosti nastalih kompleksa pri čemu su sve konstante stabilnosti veće u acetonitrilu što je zasigurno posljedica slabije solvatacije slobodnih kationa u acetonitrilu u odnosu na metanol. Podaci o transferu kationa iz metanola u acetonitril dostupni su samo za kalcijev ($\Delta_r G^\circ(\text{MeOH} \rightarrow \text{MeCN}) = -42 \text{ kJ mol}^{-1}$) i barijev kation ($\Delta_r G^\circ(\text{MeOH} \rightarrow \text{MeCN}) = -40$ i -20 kJ mol^{-1}).^{145,149} Ove vrijednosti odgovaraju promjeni konstante stabilnosti za 3–7 redova veličine. Razlika u konstantama stabilnosti u acetonitrilu i metanolu nije toliko visoka što znači da transfer ciklopeptida ili kompleksa povoljno utječe na vezanje u metanolu, no zasigurno je transfer kationa glavni faktor smanjenju afiniteta ciklopeptida prema zemnoalkalijskim kationima u tom otapalu.

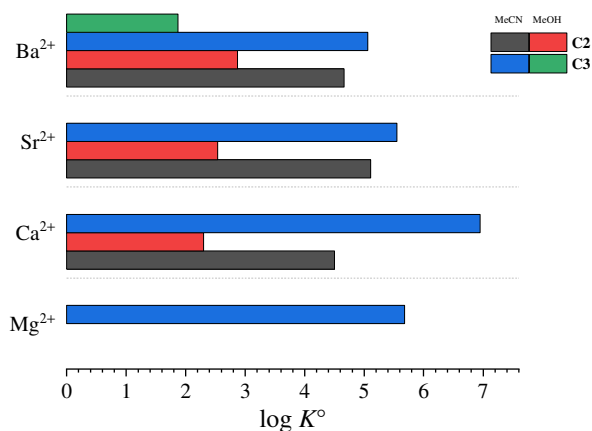
Tablica 18. Prosječni broj kontakata između karbonilnih skupina peptida i kationa u kompleksima **C2** dobiven MD simulacijama u metanolu pri 25°C.

Kation	C2	C3
Ca ²⁺	3,4	3,5
Sr ²⁺	3,4	4,4
Ba ²⁺	3,8	5,1

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



Slika 52. Reprzentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C3** s a) Ca²⁺, b) Sr²⁺ i c) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u metanolu pri 25 °C. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

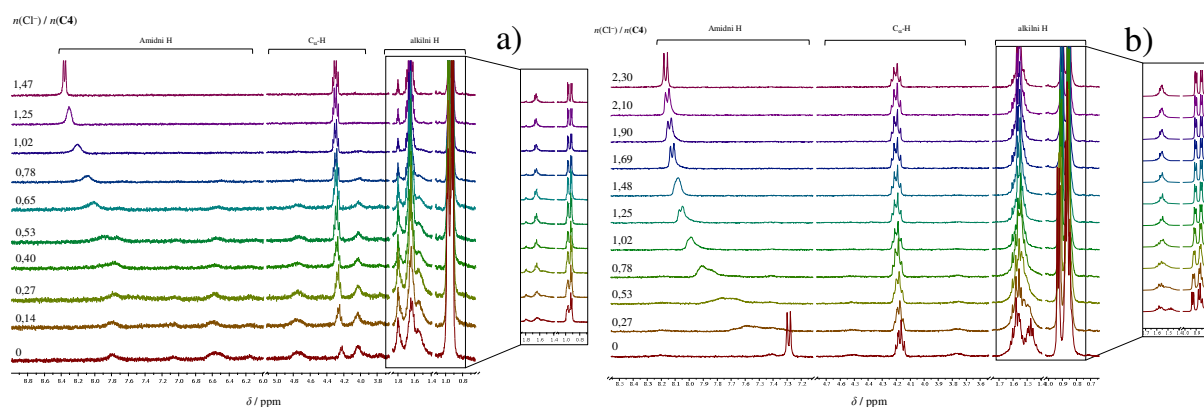


Slika 53. Konstante stabilnosti 1:1 tipa kompleksa ciklopeptida **C2** i **C3** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu i metanolu pri 25 °C.

4.4. Ion-receptorska svojstva homocikloleucinskih peptida

4.4.1. Kompleksi ciklopeptida **C4** s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu, metanolu i DMSO-u

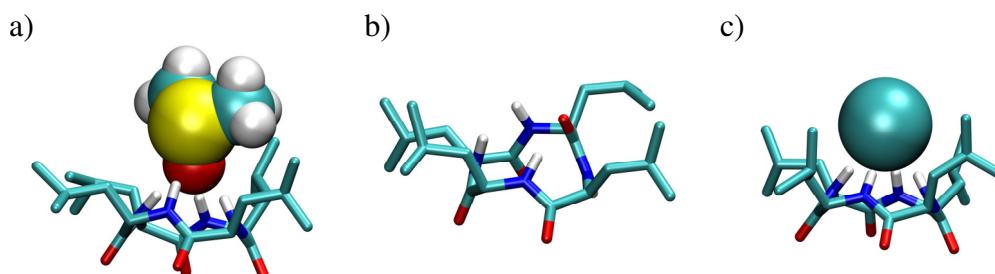
Ciklotetraleucin (**C4**), za razliku od ciklotetrafenilalanina (**C1**), umjereno je topljiv u acetonitrilu što je omogućilo eksperimentalnu termodinamičku karakterizaciju njegovih ion-receptorskih svojstava. U ^1H NMR spektru **C4**, kao i u slučaju spoja **C1**, dolazi do pojave više signala za pojedine protone koji konvergiraju u jedan skup prilikom dodatka TEACl-a već pri 1,5 ekvivalenta aniona u acetonitrilu, odnosno pri 2,3 ekvivalenta u DMSO-u (slika 54). Iz tih rezultata može se zaključiti da spoj **C4** relativno jako veže kloridni anion u oba otapala. Osim s kloridnim anionom, napravljene su titracije i s ostalim proučavanim anionima u acetonitrilu (slike D189–D194) iz kojih je vidljivo da je afinitet **C4** prema ostalim anionima također relativno visok, a i u tim slučajevima se može vidjeti da dodatkom aniona dolazi do postupnog prijelaza iz spektra s nekoliko skupova protona u spektar s jednim skupom. Kao i u slučaju ciklopeptida **C1**, ta se pojava može pripisati geometrijskoj izomerizaciji peptidne veze.



Slika 54. a) ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,28 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 7,24 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 9,86 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0136 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMSO-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.

Rezultati MD simulacija slobodnog ciklopeptida **C4** i njegovog kloridnog kompleksa u DMSO-u gotovo su identični onima u slučaju **C1**. Slobodni ciklopeptid je tijekom 93 % vremena simulacije u aduktu s molekulom DMSO-a (slika 55 a). Zbog toga prosječan broj intramolekulskih veza opaženih tijekom simulacije iznosi samo 0,1. U kloridnom kompleksu sve su četiri amidne skupine u interakciji s anionom i tvore pravilnu tetragonsku piramidu u

kojoj je vrh piramide anion, a bazu čine vodikovi atomi amidne skupine (slika 55 c). Prosječan broj kontakata peptida i aniona iznosi 3,95 što ukazuje na jake interakcije i stabilnu strukturu kompleksa.



Slika 55. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C4** a) u obliku dimetil sulfoksidnog adukta (93 %), b) slobodnom obliku (7 %), te c) u kompleksu s Cl^- . Strukture su dobivene MD simulacijama u DMSO-u. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Osim u DMSO-u, MD simulacije provedene su u acetonitrilu i metanolu. U acetonitrilu je slobodni ciklopeptid tijekom gotovo cijele simulacije (99 %) u obliku adukta s acetonitrilom. Od toga, tijekom 98 % vremena **C4** je u interakciji s molekulom acetonitrila preko sva četiri amidna protona (slika 56 a), dok je u samo 1 % simulacijskog vremena ta interakcija ostvarena preko tri amidna protona (slika 56 b). U preostalim 1 % vremena ukupne simulacije nije primijećeno nastajanje adukta (slika 56 c). Posljedica toga je da peptid u prosjeku tvori svega 0,03 intramolekulske vodikove veze tijekom simulacije. Rezultati MD simulacija anionskih kompleksa (tablica 19, slika 56) pokazuju da **C4** tvori maksimalan broj interakcija s anionima tijekom cijele simulacije. Anioni su vezani na *endo* stranu ciklopeptida i zajedno tvore pravilnu tetragonsku piramidalnu geometriju u veznom mjestu. Tiocijanatni anion, kao što je to viđeno i u slučaju ciklofenilalaninskih peptida, tvori dva tipa kompleksa s obzirom na njegovu orijentaciju. Tip kompleksa u kojem peptid interagira s dušikovim atomom tiocijanatnog aniona dominira sa zastupljenošću od 77 % (slika 56 i), dok preostalim 23 % (slika 56 j) vremena simulacije otpada na onaj u kojem dolazi do interakcije ciklopeptida s atomom sumpora.

Rezultati MD simulacija slobodnog **C4** u metanolu također upućuju na nastajanje adukta s molekulom otapala (slika 57 a i b). Ta je vrsta prisutna tijekom 98 % vremena simulacije što je uzrok malom prosječnom broju intramolekulskih vodikovih veza i u ovom otapalu. Rezultati istraživanja provedenih na anionskim kompleksima u metanolu vrlo su slični onima dobivenim u acetonitrilu. Anioni su vezani na *endo* stranu ciklopeptida i ostvaruju maksimalan mogući

broj interakcija s ciklopeptidom tijekom cijele simulacije (slika 57). Najveća razlika je u slučaju tiocijanatnog kompleksa gdje nije primijećeno nastajanje tipa kompleksa u kojem **C4** interagira s atomom sumpora iz tiocijanatnog aniona.

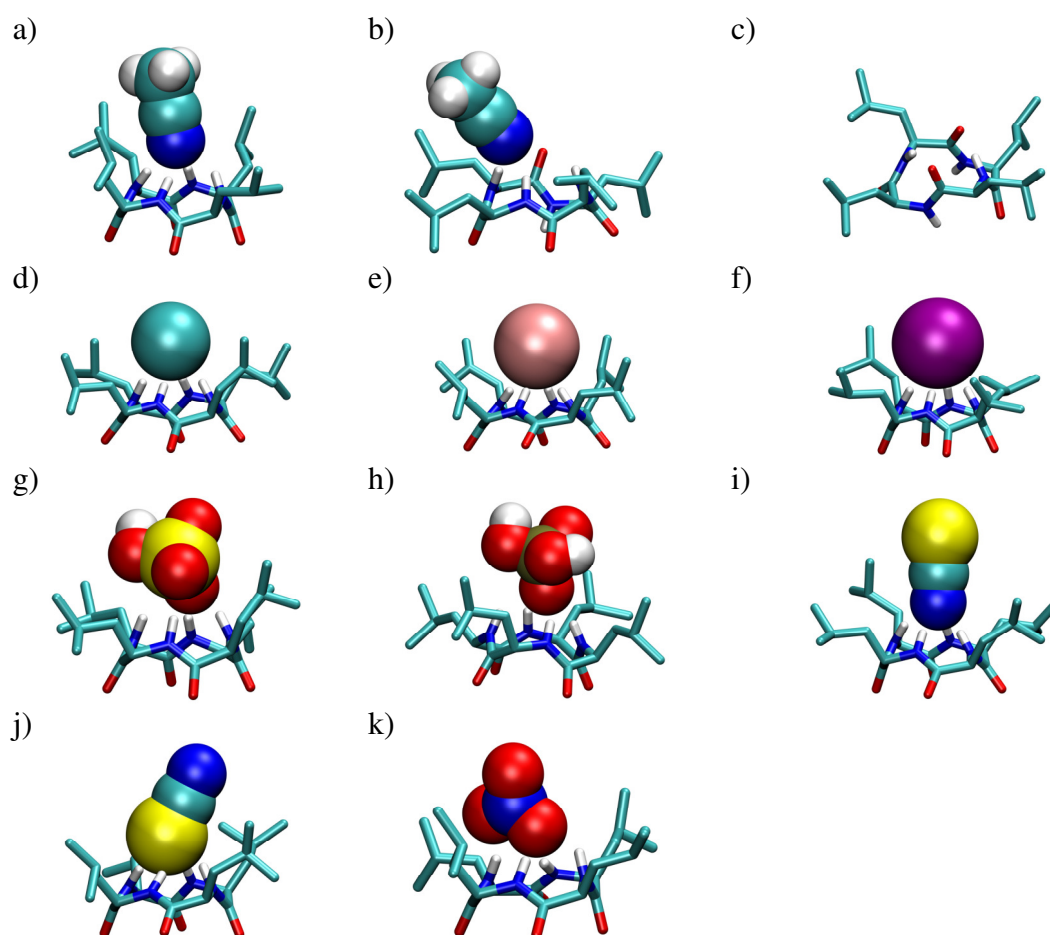
Tablica 19. Prosječni broj kontakata između amidnih skupina peptida i aniona u kompleksima spoja **C4** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu i metanolu.

Otapalo	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	HSO ₄ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SCN ⁻	NO ₃ ⁻
MeCN	3,9	4,0	4,0	4,1	4,1	4,0 ^a 3,9 ^b	4,1
MeOH	4,0	4,0	4,0	3,7	4,0	4,0 ^a	4,1

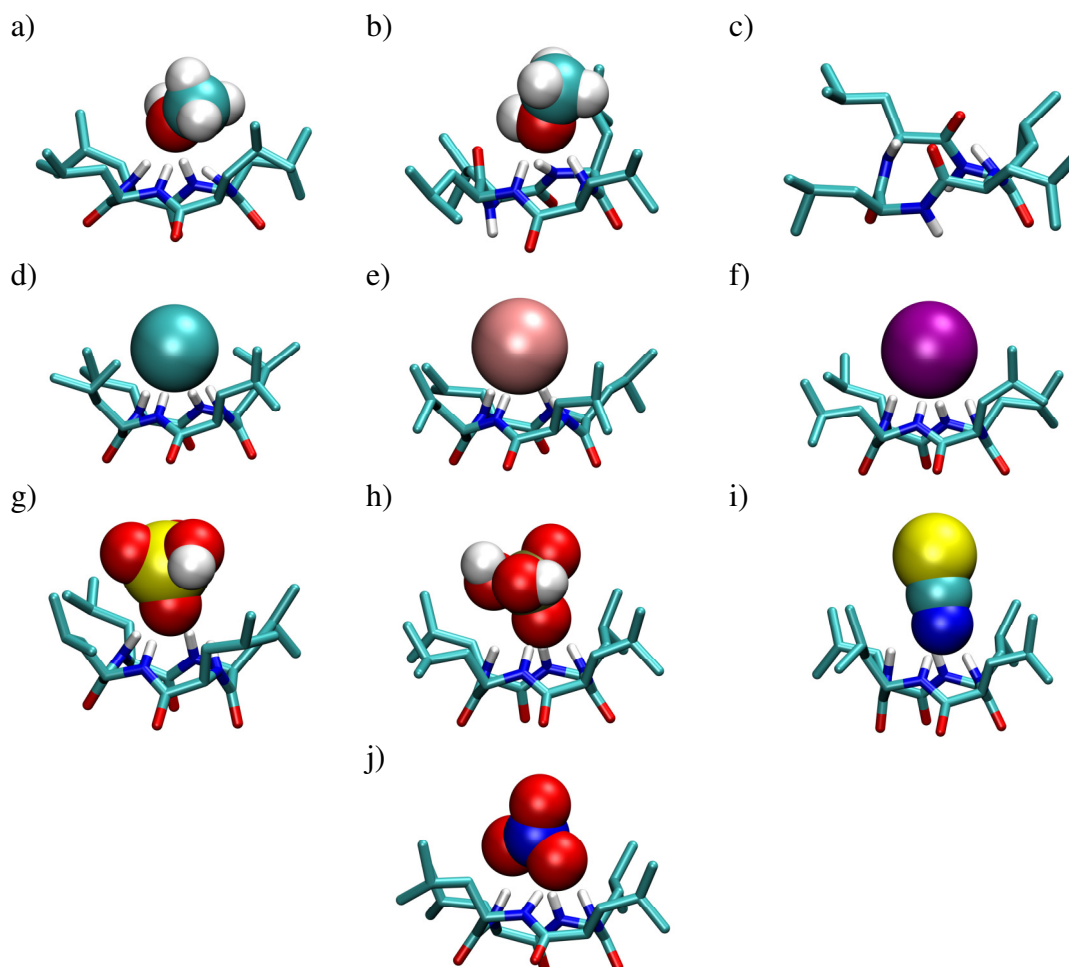
^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

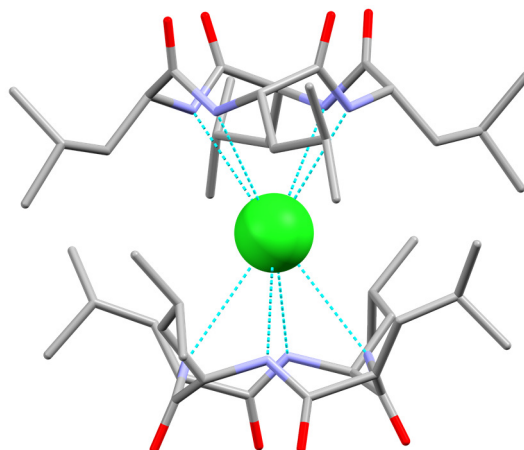


Slika 56. Reprzentativne strukture slobodnog ciklopeptida **C4** a) i b) u obliku acetonitrilnog adukta (99 %), c) slobodnom obliku (1 %) i u kompleksu s d) Cl⁻, e) Br⁻, f) I⁻, g) HSO₄⁻, h) H₂PO₄⁻, i) SCN⁻ (77 %), j) SCN⁻ (23 %) te k) NO₃⁻. Strukture su dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.



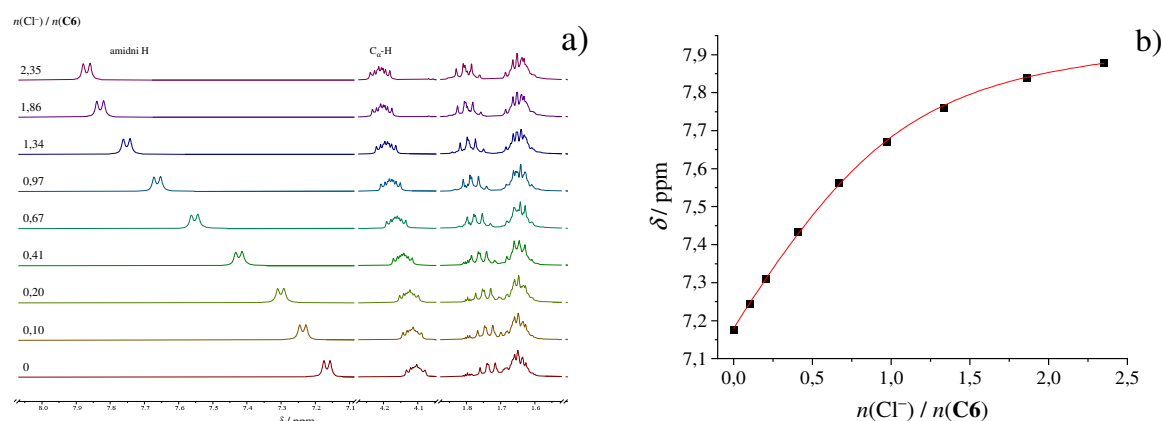
Slika 57. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C4** a) i b) u obliku metanolnog adukta (98 %) i c) slobodnom obliku (2 %) i u kompleksu s d) Cl^- , e) Br^- , f) I^- , g) HSO_4^- , h) H_2PO_4^- , i) SCN^- te j) NO_3^- . Strukture su dobivene MD simulacijama. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Kristali kompleksa ciklopeptida **C4** i kloridnog aniona dobiveni su postupnim isparavanjem otapala iz acetonitrilne otopine CsCl i ciklopeptida. Preliminarno dobivena struktura sadržava „sendvič“ kompleks u kojemu se anion nalazi između dva peptida (slika 58). Svih osam amidnih protona su u interakciji s kloridnim anionom s kojim tvore geometriju kvadratne antiprizme. Iz ovih je rezultata moguće dobiti prilično dobar nagovještaj strukture kompleksa u otopini, osobito kada se usporede s MD strukturama.

Slika 58. Struktura $C_{42}Cl^-$ „sendvič“ kompleksa u kristalu.

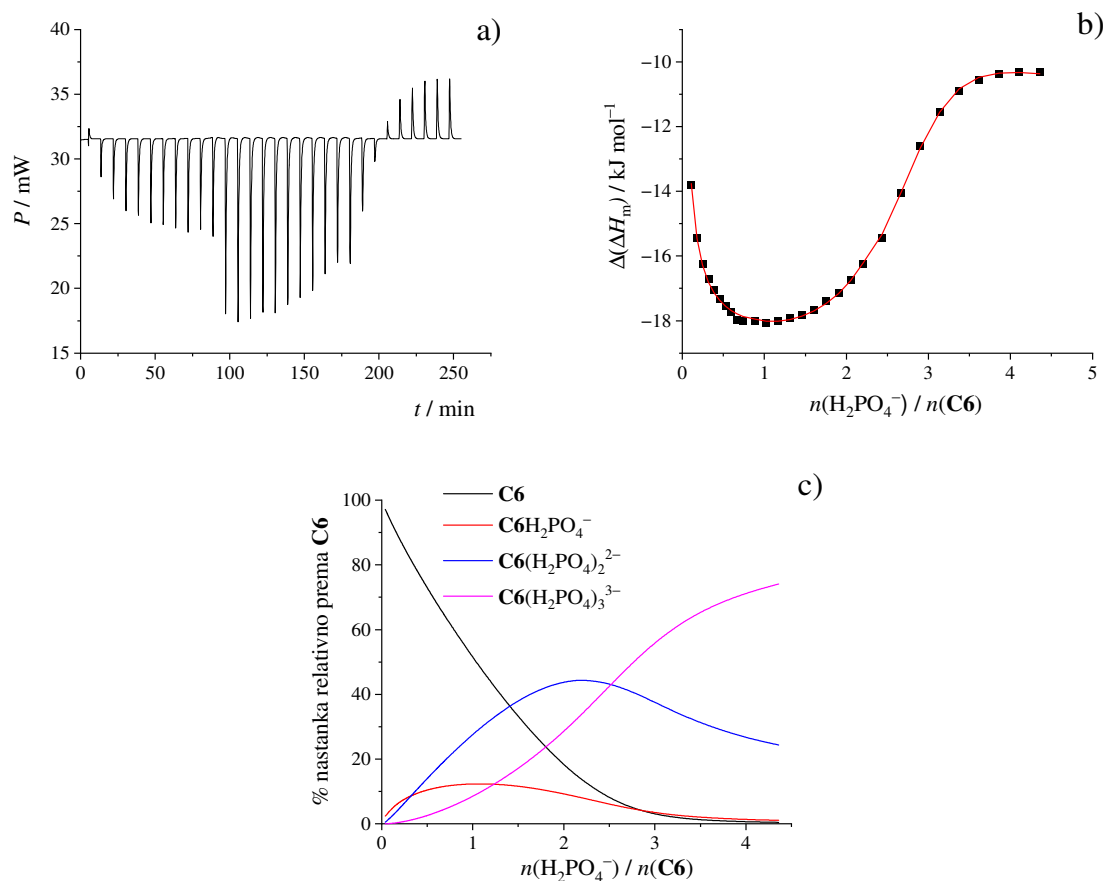
4.4.2. Kompleksi ciklopeptida **C5** i **C6** s jednostavnim anorganskim anionima u acetonitrilu

Vežanje aniona na cikloheksaleucin (**C6**) u acetonitrilu i metanolu i na ciklopentaleucin (**C5**) u metanolu istraženo je 1H NMR i ITC titracijama (tablica 20), a MD simulacije su omogućile uvid u strukturu slobodnih ciklopeptida i njihovih anionskih kompleksa. Kompleksiranje ciklopeptida **C5** s anionima u acetonitrilu već je proučeno u radu Horvata i sur.⁹⁵ Primjer rezultata 1H NMR titracije spoja **C6** s TEACl u acetonitrilu prikazan je na slici 59, dok su primjeri rezultata titracija receptora **C6** s ostalim anionima prikazani na slikama D195–D200. Najznačajnija promjena kemijskog pomaka u svim 1H NMR titracijama je ona amidnih protona ciklopeptida **C6** što ukazuje na mjesto vežanja kloridnog aniona.



Slika 59. a) 1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 6,84 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** o omjeru $n(Cl^-) / n(\text{C6})$.

Primjer rezultata ITC titracije spoja **C6** s TBAH_2PO_4 prikazan je na slici 60, a rezultati titracija s ostalim anionima u acetonitrilu dane su na slikama D201–D203. Termodinamički parametri dobiveni obradom tih titracija objedinjeni su u tablici 20.



Slika 60. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 5,067 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0100 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Tablica 20. Sukcesivni termodinamički parametri vezanja aniona na ciklopeptide **C5** i **C6** u acetonitrilu pri 25 °C.

Peptid	Anion	C:A ⁻	log <i>K</i> ± SE	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
C5 ⁹⁵	Cl ⁻	1:1	5,84 ^b	-33,33 ^b	-10,68 ^b	75,9 ^b
	Br ⁻	1:1	4,70 ^b	-26,82 ^b	-4,84 ^b	73,7 ^b
	I ⁻	1:1	3,12 ^a	-7,08 ^a	1,91 ^b	67,7 ^b
			3,20 ^b	-18,27 ^b		
	HSO ₄ ⁻	1:1	4,38 ^b	-25,1 ^b	-16,0 ^b	30,2 ^b
		2:1	2,96 ^b	-16,9 ^b	0,4 ^b	58 ^b
	H ₂ PO ₄ ⁻	1:1	4,56 ^b	-26,0 ^b	-12,6 ^b	45 ^b
		1:2	4,18 ^b	-23,8 ^b	-79,7 ^b	-187 ^b
	SCN ⁻	1:1	2,77 ^a	-9,85 ^a	-4,72 ^b	39,7 ^b
			2,90 ^b	-16,5 ^b		
NO ₃ ⁻	1:1	3,29 ^a	-7,31 ^a	-6,08 ^b	40,5 ^b	
		3,18 ^b	-18,16 ^b			
C6	Cl ⁻	1:1	3,64 ^a	-20,8 ^a	-3,6 ± 0,2 ^b	55 ± 1 ^b
			3,49 ± 0,03 ^b	-19,9 ± 0,1 ^b		
	Br ⁻	1:1	2,40 ^a	-13,7 ^a	-6,0 ± 0,2 ^b	21,0 ± 0,6 ^b
			2,151 ± 0,003 ^b	-12,28 ± 0,02 ^b		
	I ⁻	1:1	1,24 ^a	-7,08 ^a	-9,7 ± 0,9 ^b	14 ± 2 ^b
			1,72 ^a	-9,82 ^a		
	HSO ₄ ⁻	1:1	2,44 ± 0,03 ^b	-13,9 ± 0,2 ^b	-7,2 ± 0,1 ^b	50,2 ± 0,1 ^b
			3,88 ± 0,02 ^b	-22,2 ± 0,1 ^b		
H ₂ PO ₄ ⁻	1:2	4,94 ± 0,5 ^b	-28,2 ± 0,3 ^b	-32,7 ± 0,5 ^b	-15 ± 2 ^b	
	1:3	4,04 ± 0,1 ^b	-23,1 ± 0,7 ^b	-14,4 ± 0,5 ^b	29 ± 2 ^b	
SCN ⁻	1:1	1,28 ^a	-7,31 ^a			
NO ₃ ⁻	1:1	1,55 ^a	-10,00 ^a			

^a određeno ¹H NMR titracijama^b određeno ITC titracijamaSE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3).

Vežanje halogenidnih aniona na cikloheksapeptid **C6** u acetonitrilu slabije je od vežanja na ciklopentapeptid **C5**, kao što je to bio slučaj i kod ciklofenilalaninskih peptida **C2** i **C3** (tablica 9). Rezultati dobiveni ITC titracijama u dobrom su slaganju s onima dobivenim ¹H NMR spektroskopijom i jasno pokazuju da je smanjenje konstante stabilnosti kloridnog i bromidnog kompleksa peptida **C6** u odnosu na **C5** posljedica manje povoljne reakcijske entalpije i entropije. MD simulacije daju naslutiti uzrok takvog odnosa termodinamičkih

reakcijskih veličina. U slobodnom ciklopeptidu **C5** tijekom simulacije je u prosjeku prisutno 0,35 intramolekulskih vodikovih veza, pri čemu tijekom većine simulacije dominira adukt ciklopeptida i otapala u kojem ciklopeptid interagira s molekulom otapala preko četiri amidna protona iz okosnice.⁹⁵ S druge strane, tijekom simulacije slobodnog ciklopeptida **C6** formira se prosječno 2,05 intramolekulskih vodikovih veza, što znači da je samo dio amidnih skupina u direktnom kontaktu s molekulama otapala, ali u obliku inkluzijskog kompleksa. To za posljedicu ima reorganizaciju heksapeptida uslijed vezanja aniona i posljedično nepovoljan entropijski doprinos standardnoj Gibbsovoj energiji tog procesa. S druge strane, vezanje aniona na adukt spoja **C5** s otapalom je neka vrsta kompeticijske reakcije u kojoj je ciklopeptid preorganiziran za kompleksiranje. Rezultati MD simulacija pokazuju da je prosječni broj kontakata između peptida i halogenidnih aniona u kompleksu s **C5** manji nego u slučaju kompleksa spoja **C3** (tablice 10 i 21) što bi moglo objasniti manje povoljnu reakcijsku entalpiju.

Afinitet ciklopeptida **C6** prema hidrogensulfatnom anionu je između onog za kloridni i bromidni anion, pri čemu je reakcijska entalpija vezanja HSO_4^- povoljnija nego u slučaju vezanja halogenidnih aniona, dok je entropijski doprinos manje povoljan (tablica 20).

^1H NMR titracija **C6** s dihidrogenfosfatnim anionom upućuje na nastajanje nekoliko tipova kompleksa (slika D198). Naime, signal amidnog protona pri 7,2 ppm je u sporijem izmjeni tijekom cijele titracije, a nakon dodanih 0,5 ekvivalenata DHP-a pojavljuje se signal u brzom izmjeni pri 9,4 ppm koji je i jedini signal na kraju titracije. To upućuje na nastajanje barem dva tipa kompleksa. Puna karakterizacija kompleksiranja receptora **C6** s DHP dobivena je ITC titracijama. Rezultati tih mjerenja pokazuju da dolazi do nastanka tri tipa kompleksa kao i u slučaju heksafenilalaninskog ciklopeptida **C3** i cikloheksalizinskog peptida s Boc zaštitom,¹⁴¹ točnije kompleksa stehiometrije 1:1, 1:2 i 1:3 (**C6**:DHP). Vezanje prvog DHP popraćeno je povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja, dok je vezanje drugog entropijski nepovoljno, ali entalpijski vrlo povoljno što rezultira većom konstantom ravnoteže za ovaj proces naspram prethodnog koraka u kompleksiranju. Entalpijski i entropijski doprinos vezanja trećeg DHP-a je povoljan, no reakcijska entalpija je manja u odnosu na proces vezanja drugog DHP-a. Uspoređujući vezanje DHP-a na **C6** i **C3** (tablice 9 i 20) može se reći da su procesi kvalitativno slični što se tiče (ne)povoljnosti, no kvantitativno drugačiji. U oba procesa je entalpijski doprinos vezanja drugog DHP-a najpovoljniji, dok je reakcijska entropija negativna, no vidljiva je razlika u termodinamici prvog i trećeg procesa. U slučaju spoja **C6** prvi proces je entalpijski manje

povoljan, a entropijski povoljniji, dok je u slučaju **C3** situacija obrnuta. U MD simulacijama kompleksa tipa 1:2 i 1:3 dolazi do disocijacije kompleksa što je onemogućilo njihovu obradu.

Afinitet **C6** prema tiocijanatnom i nitratnom anionu je, kao i u slučaju fenilalaninskog cikloheksapeptida **C3**, između afiniteta za jodidni i bromidni anion. MD simulacije s tiocijanatnim ionom pokazuju nastajanje dva tipa kompleksa, ovisno o tome koji atom aniona je akceptor vodikove veze. Kompleks u kojem je tiocijanatni anion vezan preko atoma sumpora ima veću zastupljenost u simulaciji (slika 61), dok je prosječni broj kontakata tijekom simulacije za oba tipa kompleksa sličan.

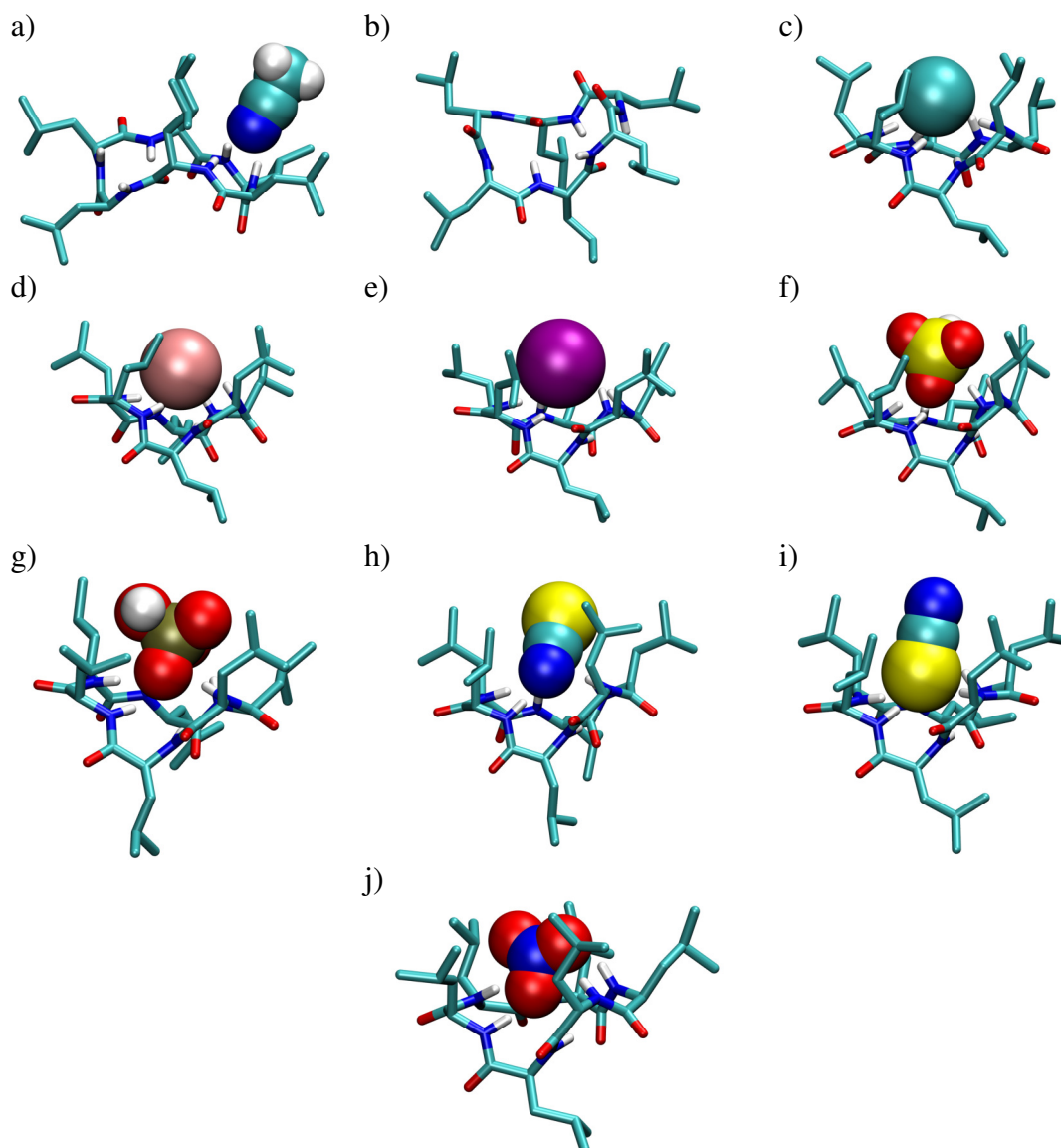
Tablica 21. Prosječni broj kontakata između amidnih skupina peptida i aniona u kompleksima **C5** i **C6** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.

Anion	C5 ⁹⁵	C6
Cl ⁻	5,0	4,1
Br ⁻	5,0	3,8
I ⁻	4,9	3,5
HSO ₄ ⁻	4,8	5,4
H ₂ PO ₄ ⁻	5,0	3,4
SCN ⁻	4,8	3,7 ^a 3,8 ^b
NO ₃ ⁻	5,0	6,2

^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



Slika 61. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C6** a) u obliku acetonitrilnog adukta (50 %), b) slobodnom obliku (50 %) i u kompleksu s c) Cl^- , d) Br^- , e) I^- , f) HSO_4^- , g) H_2PO_4^- , h) SCN^- (32 %), i) SCN^- (68 %) te j) NO_3^- . Strukture su dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Relativni odnos konstanti stabilnosti kompleksa između ciklopenta- i cikloheksapetidnih spojeva s istim aminokiselinskim ostacima **C2-C3** i **C5-C6** vrlo je sličan za komplekse s anionima koji tvore samo 1:1 tip kompleksa, no uzrok razlike nije isti u svim slučajevima (tablica 22). ITC rezultati titracija s kloridnim i bromidnim anionom pokazuju da u slučaju fenilalaninskih ciklopeptida **C2** i **C3** pad afiniteta je gotovo u potpunosti posljedica razlike u reakcijskoj entropiji. U slučaju leucinskih ciklopeptida **C5** i **C6** razlika u konstantama

stabilnosti kloridnih kompleksa podjednako je posljedica razlika u entalpijskom i entropijskom doprinosu, osim u slučaju bromidnih aniona gdje je bitan isključivo entropijski doprinos standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja.

Tablica 22. Razlika termodinamičkih parametara vezanja aniona u acetonitrilu pri 25 °C za parove ciklopeptida **C2–C3** i **C5–C6**.

A ⁻	$\Delta(\mathbf{C2-C3})^a$				$\Delta(\mathbf{C5-C6})^b$			
	$\Delta \log K$	$\frac{\Delta \Delta_r G^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta \Delta_r H^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{-T \Delta \Delta_r S^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\Delta \log K$	$\frac{\Delta \Delta_r G^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta \Delta_r H^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{-T \Delta \Delta_r S^\circ}{\text{kJ mol}^{-1}}$
Cl ⁻	2,03	-14,2	-2,7	-11,33	2,35	-13,43	-7,08	-6,23
Br ⁻	2,53	-14,43	-3,76	-10,70	2,55	-14,54	1,16	-15,71
I ⁻	2,04	-11,64			1,96	-11,91		
SCN ⁻	1,55	-8,85			1,62	-9,25		
NO ₃ ⁻	1,68	-9,59			1,63	-9,30		

^a $\Delta \log K^\circ = \log K^\circ(\mathbf{C2A}^-) - \log K^\circ(\mathbf{C3A}^-)$; $\Delta \Delta_r X^\circ = \Delta_r X^\circ(\mathbf{C2A}^-) - \Delta_r X^\circ(\mathbf{C3A}^-)$; X = G, H, S
^b $\Delta \log K^\circ = \log K^\circ(\mathbf{C5A}^-) - \log K^\circ(\mathbf{C6A}^-)$; $\Delta \Delta_r X^\circ = \Delta_r X^\circ(\mathbf{C5A}^-) - \Delta_r X^\circ(\mathbf{C6A}^-)$; X = G, H, S

4.4.3. Kompleksi ciklopeptida **C5** i **C6** s jednostavnim anorganskim anionima u metanolu

Rezultati ¹H NMR i ITC titracija ciklopeptida **C5** i **C6** s anionima u metanolu (slike D204–D219) prikazani su u tablici 23. U slučaju oba peptida konstante stabilnosti nastalih kompleksa manje su za nekoliko redova veličine nego u acetonitrilu, što ukazuje na snažan utjecaj metanola kao vrlo dobro solvatirajućeg otapala slobodnih aniona. Potpuni kvantitativni termodinamički opis vezanja uspješno je proveden samo u slučaju hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog aniona (tablica 23, slike D204 i D205). Oba procesa popraćena su povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji, pri čemu je reakcijska entalpija vezanja H₂PO₄⁻ povoljnija što dovodi i do veće stabilnosti kompleksa s tim anionom. S druge strane, vezanje DHP aniona na **C6** u metanolu, zbog vrlo malih promjena u ¹H NMR spektru, nije se moglo kvantitativno okarakterizirati.

Tablica 23. Termodinamički parametri vezanja aniona na ciklopeptide **C5** i **C6** u metanolu pri 25 °C.

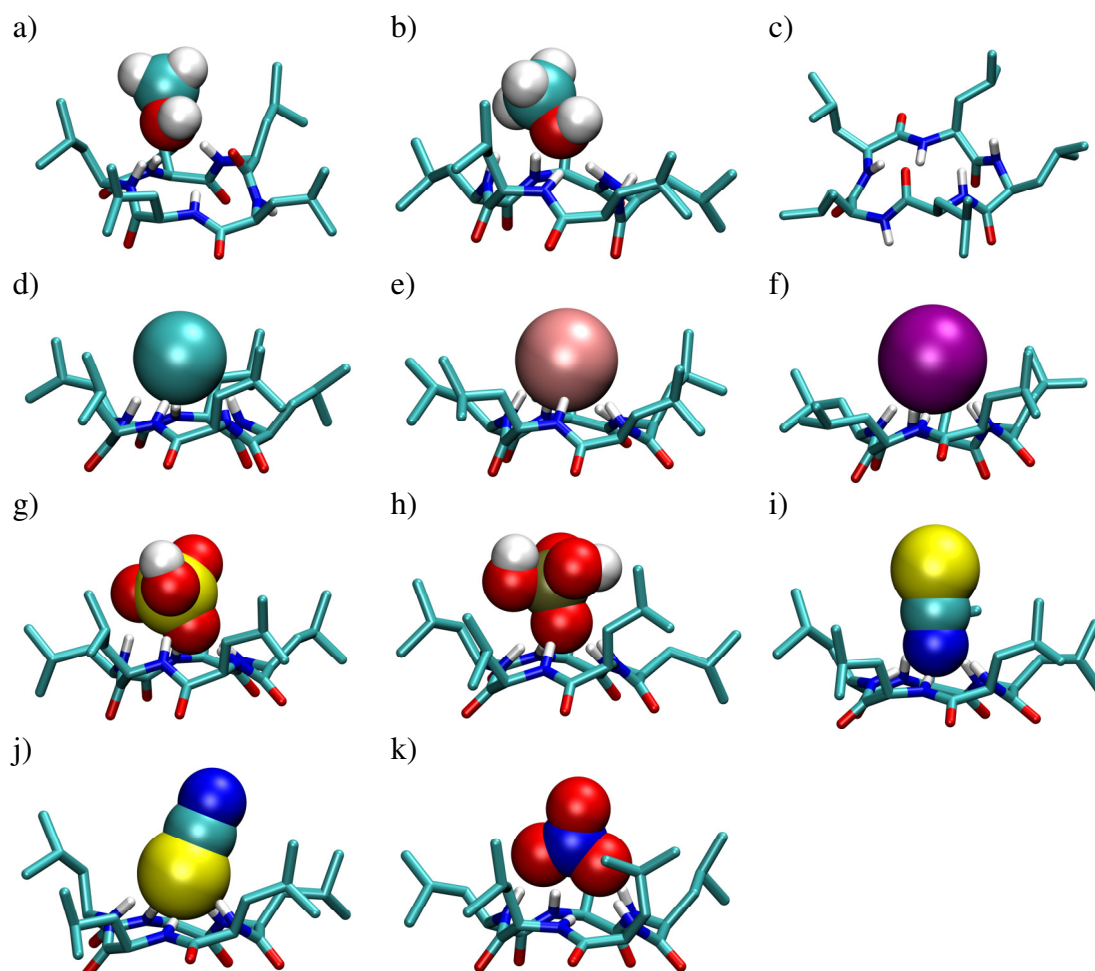
Peptid	Anion	$\log K \pm SE$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
C5	Cl ⁻	1,75 ^a	-9,99 ^a		
	Br ⁻	1,33 ^a	-7,59 ^a		
	I ⁻	0,92 ^a	-5,25 ^a		
	HSO ₄ ⁻	2,49 ^a	-14,21 ^a		
		2,55 ± 0,04 ^b	-14,5 ± 0,2 ^b	-4,6 ± 0,2 ^b	33 ± 1 ^b
	H ₂ PO ₄ ⁻	3,29 ^a	-18,78 ^a		
		3,144 ± 0,006 ^b	-17,94 ± 0,03 ^b	-11,64 ± 0,04 ^b	21,1 ± 0,2 ^b
	SCN ⁻	0,84 ^a	-4,79 ^a		
NO ₃ ⁻	1,33 ^a	-7,59 ^a			
C6	Cl ⁻	0,56 ^a	-3,20 ^a		
	Br ⁻	0,62 ^a	-3,54 ^a		
	I ⁻	0,65 ^a	-3,71 ^a		
	HSO ₄ ⁻	0,94 ^a	-5,37 ^a		
	SCN ⁻	0,63 ^a	-3,57 ^a		
	NO ₃ ⁻	0,80 ^a	-4,57 ^a		

^a određeno ¹H NMR titracijama^b određeno ITC titracijamaSE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$).

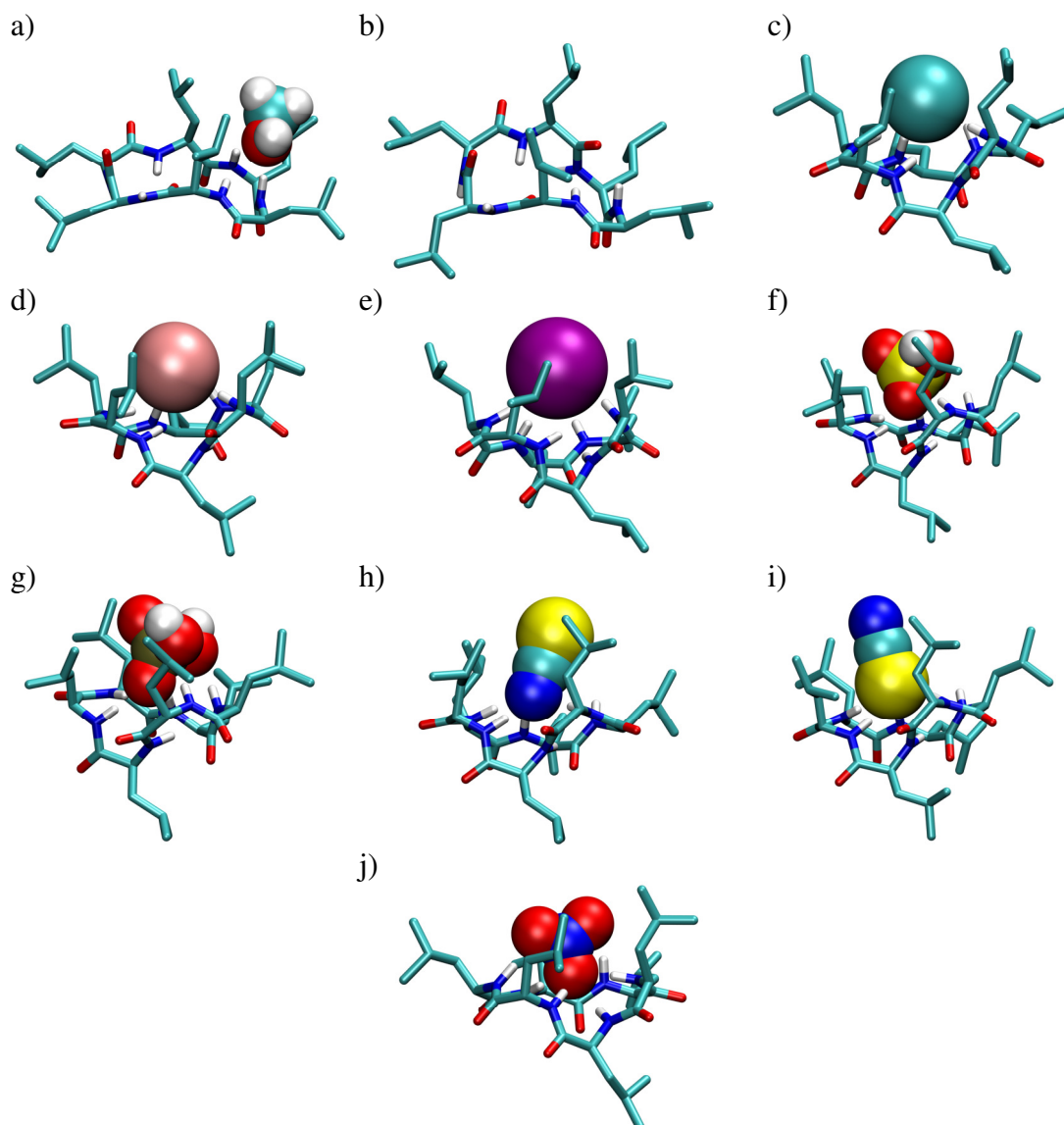
Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

U MD simulacijama slobodnog ciklopeptida **C5** u metanolu opaženo je vezanje molekula otapala na ciklopeptidni prsten tijekom 64 % vremena simulacije (tablica 24, slika 62). Od toga, 19 % simulacijskog vremena otpada na kompleks u kojem ciklopeptid interagira s hidroksilnom skupinom metanola preko triju amidnih protona i jedne karbonilne skupine (slika 62 a), dok su u ostalih 45 % vremena na molekulu metanola vezana samo tri amidna protona (slika 62 b). Prosječan broj intramolekulskih vodikovih veza tijekom cijele simulacije je 1,3. Vezanjem aniona na receptor **C5** dolazi do blagog restrukturiranja ciklopeptida, pri čemu nastaju kompleksi kod kojih amidni protoni s anionom tvore pravilnu pentagonsku piramidu u kojoj je ostvaren maksimalan broj kontakata. U slučaju kompleksa s tiocijanatnim anionom primijećena su dva tipa kompleksa, onaj u kojemu je anion vezan na peptid preko dušikova atoma i onaj u kojemu je vezan preko sumporova atoma. Prvi tip kompleksa dominira i prisutan je tijekom 98 % vremena simulacije.

Slobodni ciklopeptid **C6** stvara inkluzijski kompleks s molekulom metanola tijekom 51 % simulacijskog vremena. U tom kompleksu je hidroksilna skupina metanola koordinirana s tri amidna protona (slika 63), dok u ostalih 49 % simulacije ne nastaje inkluzijski kompleks. Prosječni broj intramolekulskih vodikovih veza tijekom ukupne simulacije iznosi 2,7. Vezanje aniona na spoj **C6** zahtijeva prekid tih interakcija što može dovesti do manje povoljne reakcijske entalpije i manje stabilnosti takvih kompleksa. Dodatno, rezultati MD simulacije ukazuju na mali prosječni broj kontakata ciklopeptid-anion (tablica 24) što dovodi do formiranja nesimetrične strukture veznog mjesta u kompleksu (slika 63) i do pada stabilnosti u odnosu na ciklopentapeptidni analog.



Slika 62. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C5** a) i b) u obliku metanolnog adukta (64 %), c) u slobodnom obliku (36 %) i u kompleksu s d) Cl⁻, e) Br⁻, f) I⁻, g) HSO₄⁻, h) H₂PO₄⁻, i) SCN⁻ (98 %), j) SCN⁻ (2 %) te k) NO₃⁻. Strukture su dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 63. Reprezentativne strukture slobodnog peptida **C6** a) u obliku metanolnog adukta (51 %), b) slobodnom obliku (49 %) i u kompleksu s c) Cl^- , d) Br^- , e) I^- , f) HSO_4^- , g) H_2PO_4^- , h) SCN^- (53 %), i) SCN^- (47 %) te j) NO_3^- . Strukture su dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka izostavljeni su zbog jasnoće.

Tablica 24. Prosječan broj kontakata između NH skupine okosnice peptida i aniona u kompleksima peptida **C5** i **C6** dobiven MD simulacijama u metanolu.

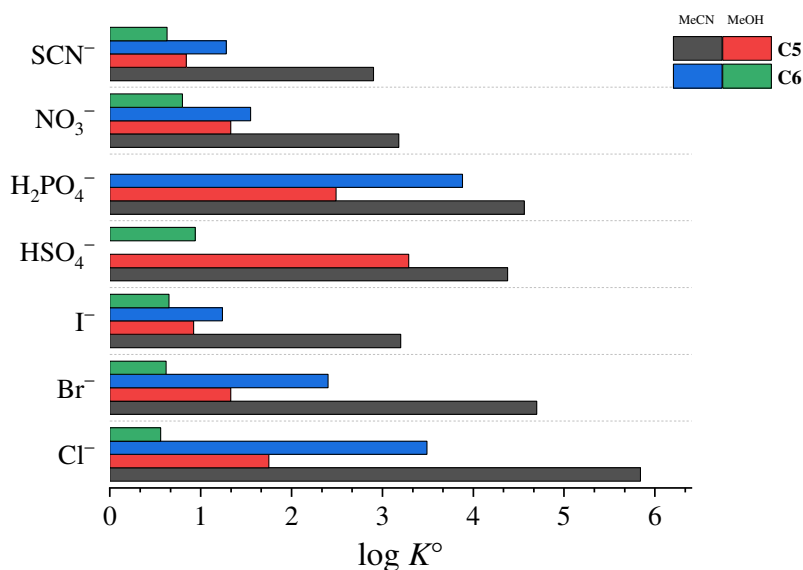
Anion	C5	C6
Cl ⁻	4,7	3,4
Br ⁻	4,8	3,7
I ⁻	4,8	3,4
HSO ₄ ⁻	5,1	5,2
H ₂ PO ₄ ⁻	4,9	5,9
SCN ⁻	4,8	3,7
NO ₃ ⁻	5,8	5,7

^a koordinacija preko atoma dušika iz tiocijanatnog aniona

^b koordinacija preko atoma sumpora iz tiocijanatnog aniona

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

Uspoređujući konstante stabilnosti ciklopeptida **C5** i **C6** u acetonitrilu i metanolu (slika 64) vidljivo je da je utjecaj otapala na stabilnost anionskih kompleksa veći nego utjecaj dodatne aminokiseline u ciklopeptidu, što je bio slučaj i kod fenilalaninskih ciklopeptida (slika 42). Podaci prikazani u tablici 25 pokazuju da transfer aniona iz acetonitrila u metanol može gotovo u potpunosti objasniti razliku u anionskom afinitetu ciklopentapeptida **C5** između ta dva otapala, te samo djelomično u slučaju **C6**. To znači da solvatacija liganda ili kompleksa igra značajnu ulogu u određivanju sposobnosti vezanja aniona tim receptorom.



Slika 64. Konstante stabilnosti kompleksa ciklopeptida **C5** i **C6** s anionima u acetonitrilu i metanolu pri 25 °C.

Tablica 25. Standardna Gibbsova energija transfera aniona iz acetonitrila u metanol i razlika standardnih reakcijskih Gibbsovih energija za vezanje aniona na ciklopeptide **C5** i **C6** u acetonitrilu i metanolu pri 25 °C.

A ⁻	$\frac{\Delta_t G^\circ (A^-)}{\text{kJ mol}^{-1}}$ ¹⁴⁵	$\frac{\Delta \Delta_r G^\circ (\mathbf{C5})}{\text{kJ mol}^{-1}}$ ^a	$\frac{\Delta \Delta_r G^\circ (\mathbf{C6})}{\text{kJ mol}^{-1}}$ ^b
Cl ⁻	-29	25,34	16,72
Br ⁻	-20	19,23	10,16
I ⁻	-10	13,01	3,37
SCN ⁻	-8	11,76	3,71
NO ₃ ⁻	-8	10,56	4,28

^a $\Delta \Delta_r G(\mathbf{C5})^\circ = \Delta_r G^\circ (\mathbf{C5A}^-, \text{MeOH}) - \Delta_r G^\circ (\mathbf{C5A}^-, \text{MeCN})$
^b $\Delta \Delta_r G(\mathbf{C6})^\circ = \Delta_r G^\circ (\mathbf{C6A}^-, \text{MeOH}) - \Delta_r G^\circ (\mathbf{C6A}^-, \text{MeCN})$

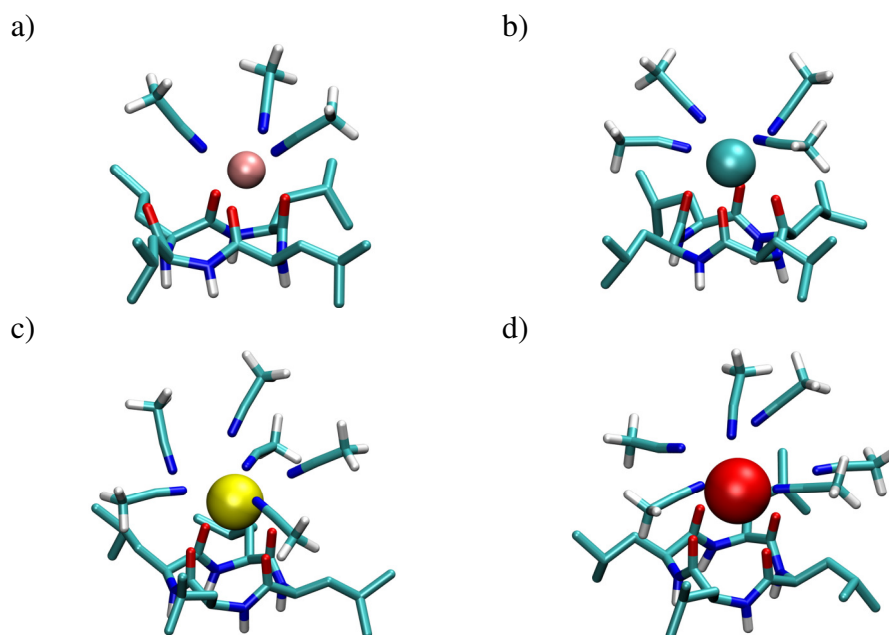
4.4.4. Kompleksi ciklopeptida **C4** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu i metanolu

Uvid u strukturne karakteristike kompleksa ciklopeptida **C4** s kationima zemnoalkalijskih metala u acetonitrilu i metanolu dobivene su MD simulacijama pri 25 °C (slike 65 i 66). Kao i u slučaju ciklopeptida **C1** prosječni broj kontakata peptida i kationa povećava se s radijusom kationa u oba otapala (tablica 26). Razlog tome je ponovno sterički nepovoljna konformacija u kojoj su koordinirani karbonilni kisikovi atomi međusobno blizu. Nadalje, MD simulacije pokazuju da je kation u kompleksu djelomično solvatiran s 3–6 molekula otapala u primarnoj solvatacijskoj sferi.

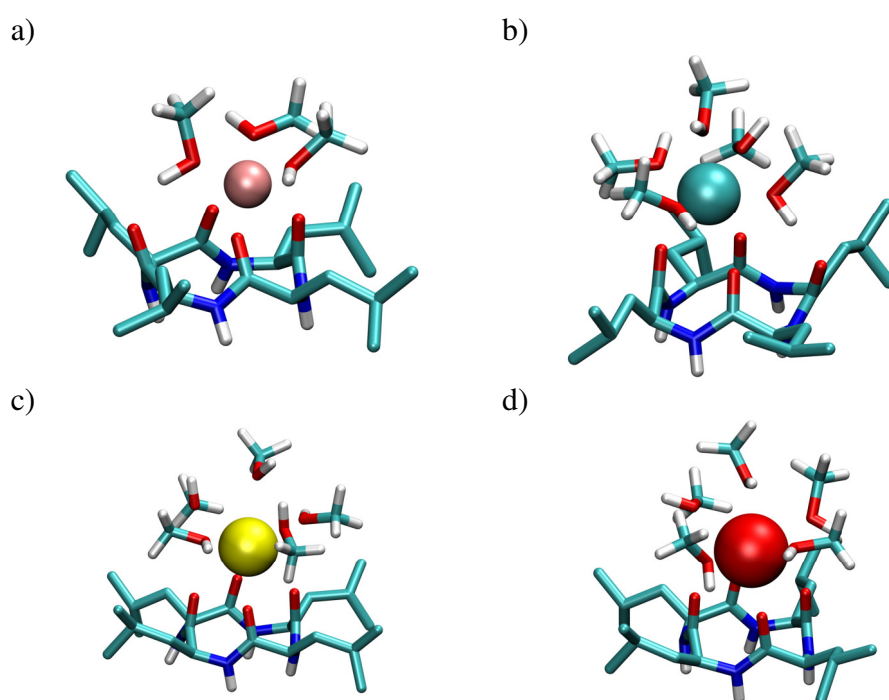
Tablica 26. Prosječni broj kontakata između karbonilnih skupina peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima **C4** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu i metanolu.

Otapalo	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
MeCN	2,9	3,2	3,4	3,7
MeOH	2,8	2,0	3,1	3,5

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1



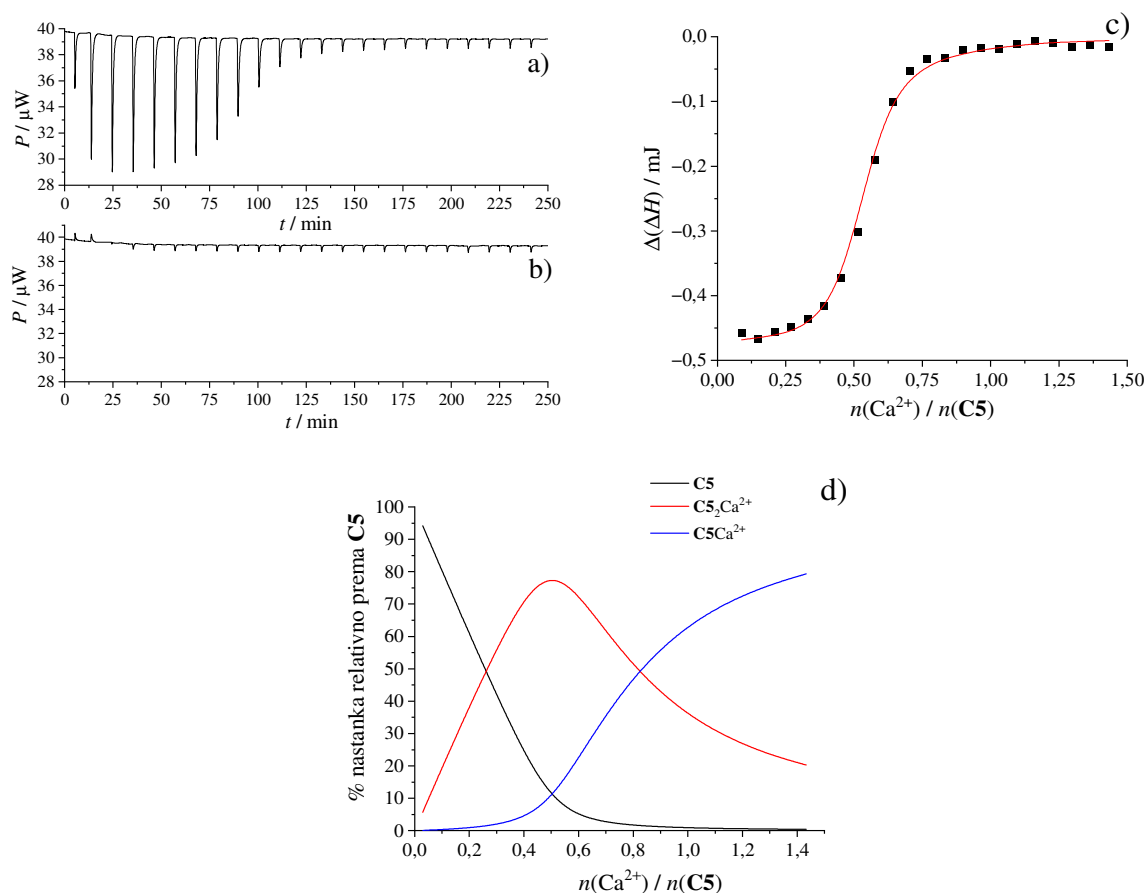
Slika 65. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C4** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 66. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C4** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

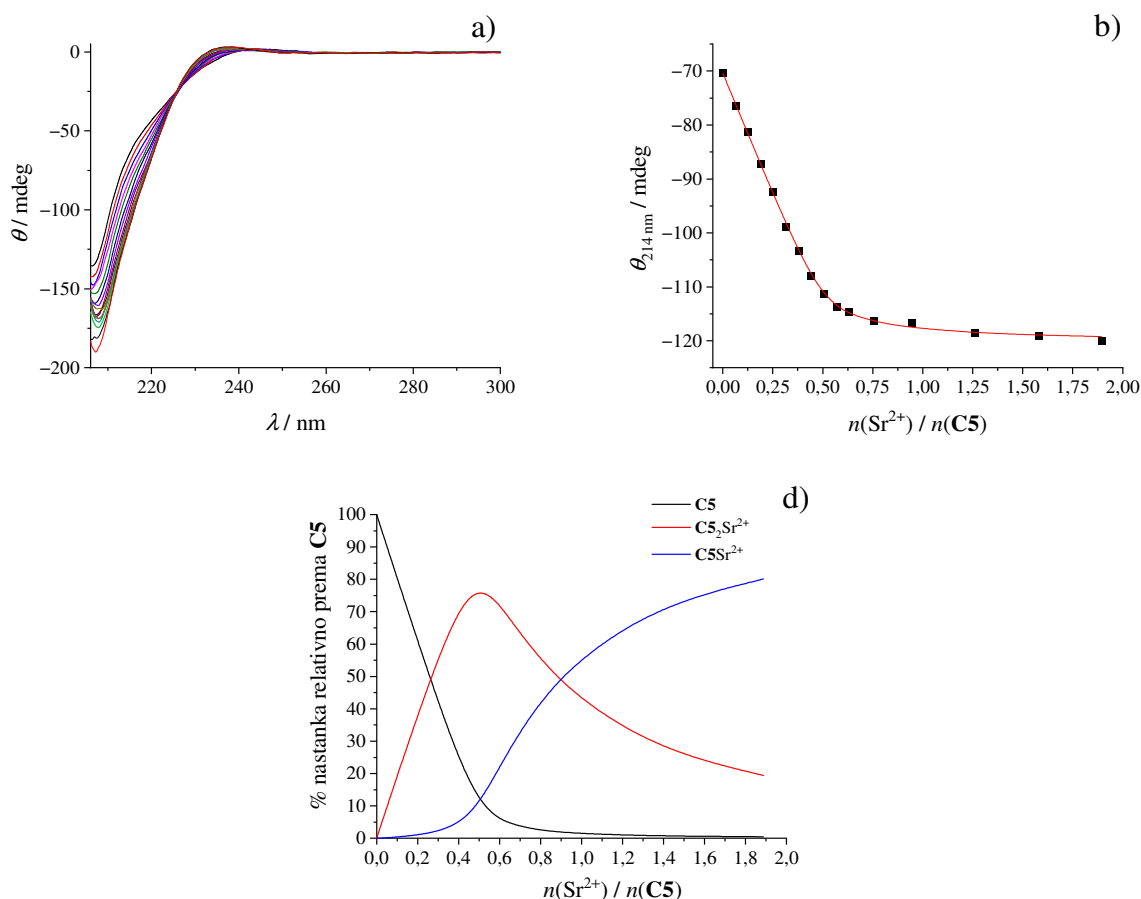
4.4.5. Kompleksi ciklopeptida **C5** i **C6** sa zemnoalkalijskim kationima u acetonitrilu

Vežanje kationa na ciklopeptide **C5** i **C6** proučavano je mikrokalorimetrijski i spektroskopijom cirkularnog dikroizma. Primjeri rezultata ITC titracija spojeva **C5** i **C6** sa zemnoalkalijskim kationima prikazane su na slici 67 i slikama D220–D222 i D226–D229, a rezultati dobiveni obradom prikupljenih podataka dani su u tablici 27. U obradi podataka korišten je model u kojem je pretpostavljeno nastajanje 1:1 i 2:1 (peptid:kation) kompleksi. Dobiveni rezultati pokazuju da je stabilnost nastalih kompleksa vrlo visoka (tablica 27). Titracije koje uključuju ciklopeptid **C6** su zbog nereproducibilnosti direktnih titracija receptora s otopinama kationa napravljene u obrnutoj izvedbi u kojoj su otopine kationa titrirane otopinom ciklopeptida.



Slika 67. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 9,76 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,17 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,17 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Afinitet ciklopeptida **C5** i **C6** uspješno je određen CD titracijama. Prikupljeni spektri i obrada podataka CD titracije ciklopeptida **C5** sa Sr^{2+} kationom prikazani su na slici 68 dok su rezultati titracija s ostalim kationima, ali i one koje uključuju ciklopeptid **C6** prikazane na slikama D223–D225 i D230–D233. Rezultati dobiveni obradom podataka dani su u tablici 27.



Slika 68. a) CD titracija liganda **C5** ($c = 9,72 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,00 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 214 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+})/n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.

Tablica 27. Termodinamički parametri vezanja zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide **C5** i **C6** u acetonitrilu pri 25 °C.

Peptid	Kation	C:M ²⁺	log <i>K</i> ± SE	$\Delta_r G^\circ \pm SE$ kJ mol ⁻¹	$\Delta_r H^\circ \pm SE$ kJ mol ⁻¹	$\Delta_r S^\circ \pm SE$ J K ⁻¹ mol ⁻¹	
C5	Mg ²⁺	1:1	5,74 ± 0,03 ^a 5,74 ^{b,c}	-32,8 ± 0,2 ^a -32,76 ^{b,c}	-13,2 ± 0,9 ^a	66 ± 3 ^a	
		2:1	4,87 ± 0,01 ^a 4,7 ± 0,1 ^b	-27,81 ± 0,07 ^a -26,8 ± 0,6	-13,5 ± 0,8 ^a	48 ± 3 ^a	
	Ca ²⁺	1:1	6,65 ± 0,05 ^a 6,65 ^{b,c}	-38,0 ± 0,3 ^a -37,96 ^{b,c}	-31,9 ± 0,9 ^a	20 ± 4 ^a	
		2:1	5,64 ± 0,05 ^a 5,78 ± 0,08 ^b	-32,2 ± 0,3 ^a -33,0 ± 0,5 ^b	-25,9 ± 0,6 ^a	21 ± 3 ^a	
	Sr ²⁺	1:1	6,30 ± 0,04 ^a 6,30 ^{b,c}	-36,0 ± 0,2 ^a -35,96 ^{b,c}	-26,0 ± 0,4 ^a	33 ± 1 ^a	
		2:1	5,16 ± 0,02 ^a 5,38 ± 0,06 ^b	-29,5 ± 0,1 ^a -30,7 ± 0,3 ^b	-29,1 ± 0,6 ^a	1 ± 2 ^a	
	Ba ²⁺	1:1	5,65 ^{a,c} 5,65 ± 0,05 ^b	-32,25 ^{a,c} -32,3 ± 0,3 ^b	-26,1 ± 0,3 ^a	20,7 ± 0,8 ^a	
		2:1	5,35 ± 0,05 ^a 5,63 ± 0,1 ^b	-30,6 ± 0,3 ^a -32,1 ± 0,6 ^b	-34,1 ± 0,8 ^a	-12 ± 2 ^a	
		3:1	5,18 ± 0,02 ^a 5,36 ± 0,1 ^b	-29,6 ± 0,1 ^a -30,6 ± 0,6 ^b	-26,3 ± 0,9 ^a	11 ± 3 ^a	
	C6	Mg ²⁺	1:1	4,68 ± 0,06 ^a 4,68 ^{b,c}	-26,7 ± 0,3 ^a -26,71 ^{b,c}	-7,5 ± 0,7 ^a	64 ± 3 ^a
			2:1	3,65 ± 0,05 ^a 3,65 ^{b,c}	-20,8 ± 0,3 ^a -20,83 ^{b,c}	-22 ± 2 ^a	-6 ± 8 ^a
			1:1:1 ^e	2,23 ± 0,04 ^b	-12,7 ± 0,2 ^b		
Ca ²⁺		1:1	5,16 ± 0,03 ^a 5,16 ^{b,c}	-29,5 ± 0,2 ^a -29,45 ^{b,c}	-38,9 ± 0,2 ^a	-32 ± 1 ^a	
		2:1	4,26 ± 0,01 ^a 4,26 ^{b,c}	-24,33 ± 0,06 ^a -24,31 ^{b,c}	-15,2 ± 0,7 ^a	31 ± 2 ^a	
		1:1:1 ^e	2,78 ± 0,02 ^b	-15,9 ± 0,1 ^b			
Ba ²⁺		1:1	6,45 ± 0,01 ^a 6,48 ^{b,c}	-36,80 ± 0,08 ^a -36,99 ^{b,c}	-31,3 ± 0,3 ^a	19 ± 1 ^a	
		2:1	5,08 ± 0,05 ^a 5,08 ^{b,c}	-29,0 ± 0,2 ^a -29,00 ^{b,c}	-8,3 ± 0,9 ^a	69 ± 3 ^a	
		1:1:1 ^e	1,09 ± 0,03 ^b	-6,2 ± 0,2 ^b			

^a određeno ITC titracijama^b određeno CD titracijama^c fiksirane vrijednosti tijekom obrade (određene ostalim metodama)^d ternarni kompleks s perkloratnim anionomSE = standardna pogreška srednje vrijednosti (*N* = 3).

Ciklopeptid **C5** sa svim kationima zemnoalkalijskih metala tvori komplekse 1:1 i 2:1 (peptid:kation) tipa. U slučaju barijevog kationa, položaj točke infleksije u ITC titraciji (slika 222 b) ukazuje na nastajanje još jedne vrste koja sadrži više od dva ciklopeptida. Jedina vrsta čijim se uvođenjem u model dobiva vrlo dobro slaganje rezultata obrade ITC i CD titracija je 3:1 (peptid:kation) kompleks. Preliminarna MD istraživanja u vakuumu upućuju na takvu strukturu u kojoj se dodatni ciklopeptid nalazi točno iznad jednog od ciklopeptida u „sendvič“ kompleksu s kationom (slika D242). Konstanta stabilnosti nastajanja 1:1 tipa kompleksa najveća je u slučaju kalcijeva kationa, nešto manja u slučaju stroncijeva kationa, a zatim slijede kompleksi s Mg^{2+} i Ba^{2+} . Proces vezanja dodatnog ciklopeptida pokazuje negativnu kooperativnost uslijed koje je konstanta ravnoteže za taj korak za red veličine manja od one za prethodni, osim u slučaju barijeva kationa gdje su sve tri konstante ravnoteže vrlo slične.

Gotovo sve reakcije su entalpijski kontrolirane, osim u slučaju nastanka $C5Mg^{2+}$ kompleksa u kojem entropijski doprinos ima znatan udio u standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja, dok je reakcijska entalpija najmanja među proučavanim kationima. Najvjerojatniji razlog je veći stupanj desolvatacije tog najmanjeg kationa, ali i prisutnost vode u reakciji koja utječe na sastav solvatacijske sfere.¹⁴⁸ Entalpijski doprinosi za nastajanje 1:1 tipa kompleksa i vezanje dodatnog ciklopeptida **C5** vrlo su slični. Osim toga, nije primijećena korelacija reakcijske entalpije s veličinom vezanog kationa, osim u slučaju magnezijeva kationa gdje je reakcijska entalpija znatno manja. MD simulacije pokazuju da vrlo mali magnezijev kation u 1:1 kompleksu s **C5** ostvaruje manji prosječni broj kontakata s karbonilnim skupinama ciklopeptida u usporedbi s ostalim kationima kod kojih je taj broj vrlo sličan (tablica 28, slika 69). To donekle objašnjava razlike u reakcijskim entalpijama među pojedinim kationima. Iako su vrijednosti reakcijskih entropija za nastajanje 1:1 tipa kompleksa različite za pojedine katione one ne pokazuju pravilnost s povećanjem veličine kationa. S druge strane, reakcijska entropija vezanja dodatnog ciklopeptida pada od magnezijeva prema barijevom kationu. Iako je za očekivati da će standardna reakcijska entropija te reakcije biti pozitivna kod svih kompleksa zbog gubitka translacijskih stupnjeva slobode, rezultati pokazuju da je entropijski doprinos nepovoljan samo u slučaju vezanja barijeva kationa (tablica 27). Najvjerojatniji uzrok toga je povoljnija desolvatacija manjih kationa koji su u 1:1 kompleksima samo djelomično desolvatirani, što pokazuju i rezultati MD simulacija (tablica 28, slike 69 i 71).

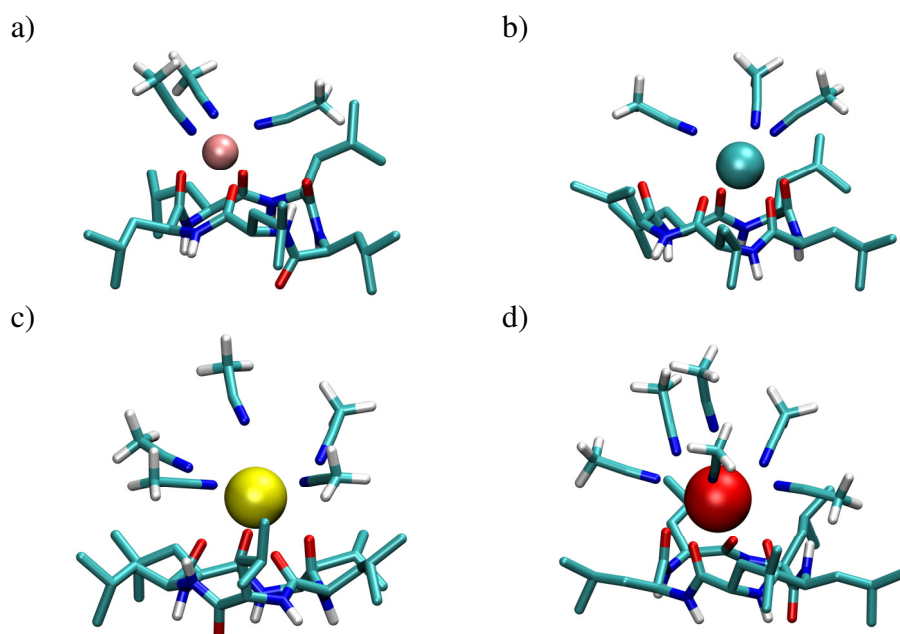
Termodinamičke karakteristike vezanja zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptid **C6** vrlo su zanimljive. ITC titracije pokazuju nastajanje dva tipa kompleksa, kao i u slučaju ciklopeptida

C5. S druge strane, rezultate CD titracija bilo je moguće obraditi tek uvođenjem dodatne vrste, ternarnog kompleksa ciklopeptida, kationa i perkloratnog aniona. Nastajanje tri tipa kompleksa uočeno je i kod cikloheksapeptida ciklo-(D-Ala-Pro-Gly)₂ te ciklo-(Pro-Gly)₃, no u tim radovima su autori pretpostavili nastajanje kompleksa 1:2 (peptid:kation) umjesto ternarnog s perkloratnim anionom, što je upitno uzimajući u obzir naboje i udaljenost tih dvaju kationa u kompleksu.^{51,150} Konstanta vezanja perkloratnog aniona na 1:1 kompleks izrazito je mala (tablica 27), stoga ta vrsta nije nastajala tijekom ITC titracija. Korištenjem više otopina titransa različitih koncentracija izmjereni su spektri otopina pri manjim množinskim omjerima reaktanata gdje primarno nastaju kompleksi tipa 1:1 i 2:1 i pri većim omjerima gdje je značajnije nastajanje ternarnog kompleksa (slike D230–D233). Zbog nereproducibilnosti ITC titracija termodinamički parametri vezanja stroncijeva kationa na **C6** nisu određeni, no titracijska krivulja (slika D228) i promjene u CD spektru prilikom dodatka stroncijevog perklorata (slika D232) upućuju na nastanak kompleksa istih stehiometrija kao i u slučaju ostalih kationa. Za razliku od ciklopeptida **C5**, cikloheksaleucin ima najveći afinitet prema barijevom kationu gdje su konstante stabilnosti 1:1 i 2:1 kompleksa za više od reda veličine veće nego u slučaju ostalih kationa. Proces vezanja dodatnog ciklopeptida ima nešto nižu konstantu ravnoteže, dok je stabilnost ternarnih kompleksa vrlo mala. MD simulacije pokazuju da se za 1:1 i 2:1 tip kompleksa prosječan broj kontakata kationa i **C6** povećava u nizu Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ i Ba²⁺ što je u direktnoj korelaciji s povećanjem konstante stabilnosti u navedenom nizu (tablica 28, slike 69 i 72).

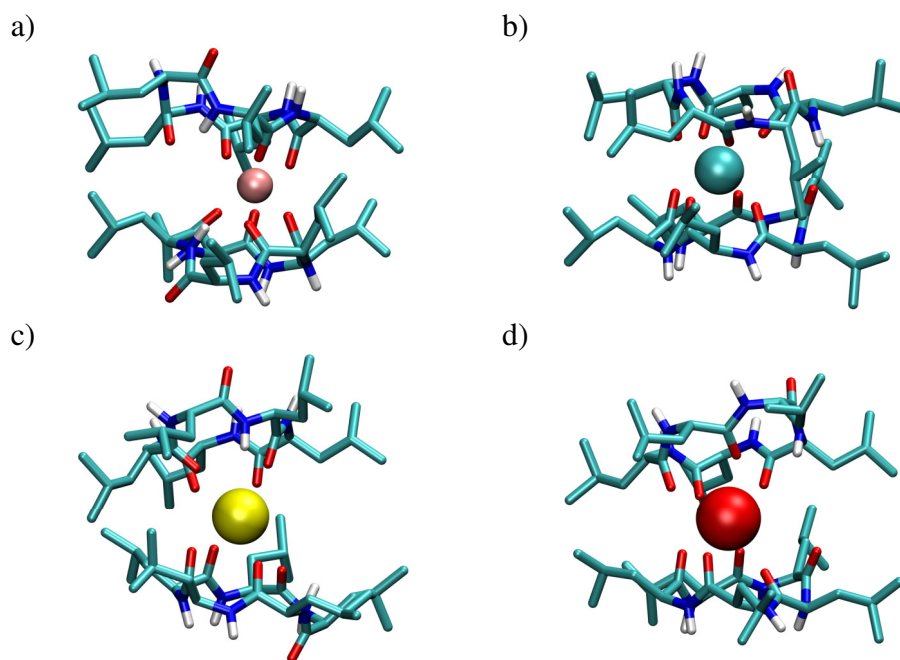
Nastajanje 1:1 kompleksa je popraćeno je povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja, osim u slučaju kalcijeva kationa za čije je vezanje na **C6** entropijski doprinos nepovoljan. Kao i u slučaju ciklopeptida **C5**, vezanje kalcijeva kationa je entalpijski najpovoljnije što upućuje na optimalnu kombinaciju parcijalne desolvatacije kationa i interakcije s ciklopeptidom. Reakcijska entalpija vezanja dodatnog ciklopeptida smanjuje se u nizu Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, dok entropijski doprinos raste. Razlog povećanja reakcijske entropije može biti povoljna potpuna desolvatacija kationa što nadomješta entropijski nepovoljno smanjenje translacijskih stupnjeva slobode u procesu nastanka „sendvič“ kompleksa. MD simulacijama pokazano je da prilikom nastajanja 1:1 kompleksa stupanj parcijalne solvatacije kationa u kompleksu raste s porastom njegovog radijusa (slika 71), stoga bi bilo za očekivati da je vezanje dodatnog ciklopeptida za veće katione entropijski povoljnije.

Tablica 28. Prosječan broj kontakata između karbonilne skupine okosnice peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima ciklopeptida **C5** i **C6** dobiven MD simulacijama u acetonitrilu.

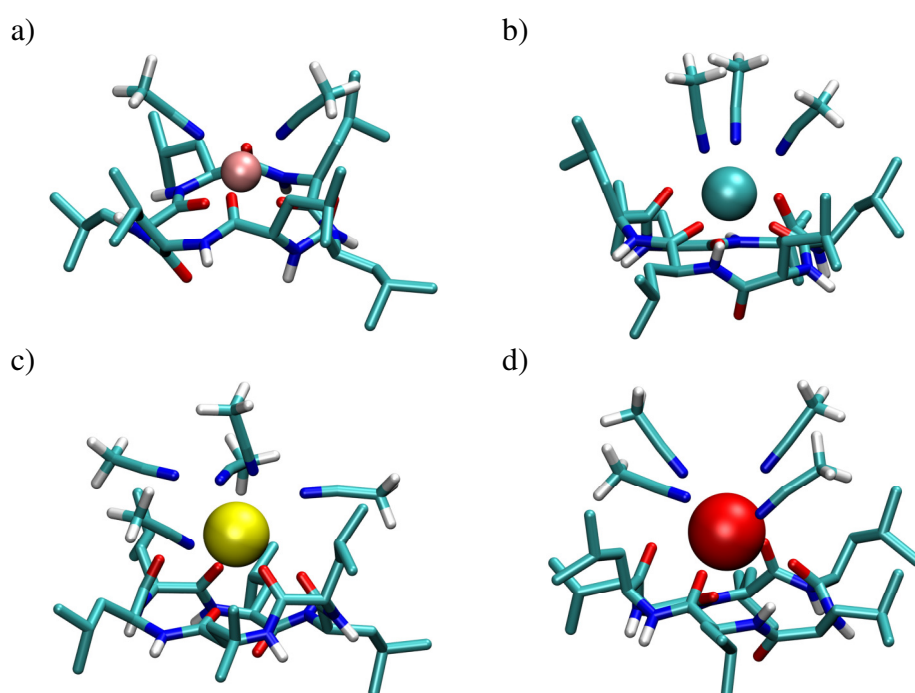
Kation	C:M ²⁺	C5	C6
Mg ²⁺	1:1	3,0	3,9
	2:1	6,0	6,0
Ca ²⁺	1:1	3,7	4,5
	2:1	7,5	6,8
Sr ²⁺	1:1	3,6	4,9
	2:1	5,4	6,4
Ba ²⁺	1:1	3,8	5,1
	2:1	7,2	8,5



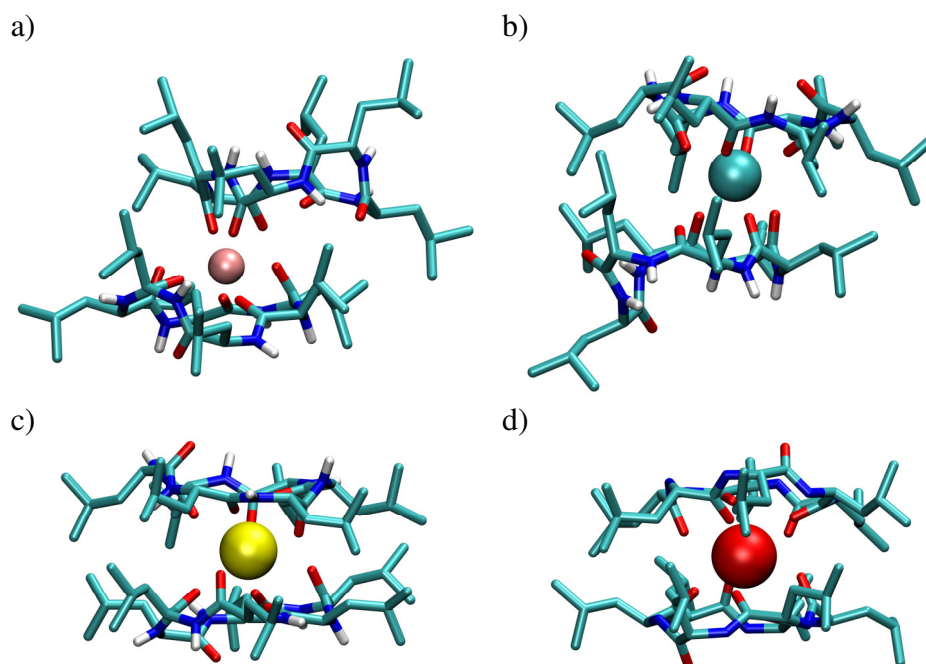
Slika 69. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C5** s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 70. Reprezentativne strukture „sendvič“ kompleksa ciklopeptida C5 s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 71. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida C6 s a) Mg²⁺, b) Ca²⁺, c) Sr²⁺ i d) Ba²⁺ dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



Slika 72. Reprezentativne strukture „sendvič“ kompleksa ciklopeptida **C6** s a) Mg^{2+} , b) Ca^{2+} , c) Sr^{2+} i d) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u acetonitrilu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

Uspoređujući termodinamičke parametre vezanja aniona i kationa na leucinske ciklopeptide (tablice 20 i 27) u acetonitrilu vidljivo je da oba ciklopeptida imaju veći afinitet prema kationima. Razlog tome je izrazito povoljnija reakcijska entalpija kompleksiranja koja nadomješta manje povoljan entropijski doprinos standardnoj Gibbsovoj energiji procesa vezanja kationa. Izuzetak je nastajanje kompleksa **C5Mg²⁺** čije je nastajanje popraćeno malom reakcijskom entalpijom, što rezultira usporedivim afinitetom ciklopeptida **C5** prema tom kationu i kloridnom anionu. S druge strane, fenilalaninski ciklopeptid s manjim brojem aminokiselinskih ostataka ima usporediv afinitet prema kationima kao prema bromidnom i hidrogensulfatnom anionu, dok veći, **C3** tvori stabilnije komplekse s kationima. Može se reći da vrsta aminokiseline ima značajan utjecaj na receptorska svojstva ciklopeptida prema naboju gosta, a taj je utjecaj izraženiji za one s manjim brojem aminokiselinskih ostataka.

4.4.6. Kompleksi ciklopeptida **C5** i **C6** sa zemnoalkalijskim kationima u metanolu

Vežanje zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide **C5** i **C6** u metanolu praćeno je mikrokalorimetrijski i spektroskopijom cirkularnog dikroizma. Rezultati dobiveni obradom navedenih titracija (slike D234–D241) dani su u tablici 29.

Tablica 29. Termodinamički parametri vežanja kationa na ciklopeptide **C5** i **C6** u metanolu pri 25 °C.

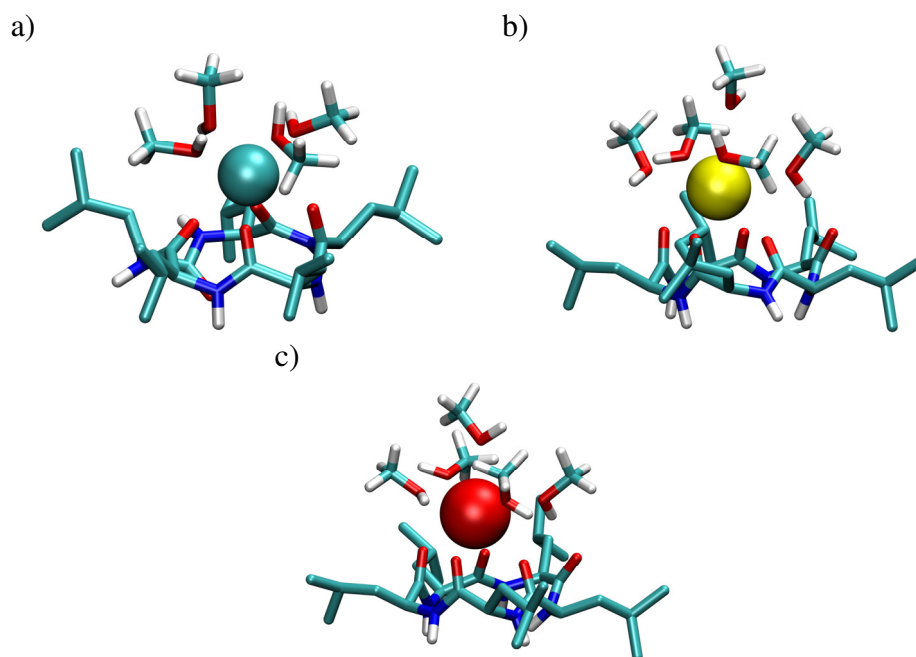
Peptid	Kation	$\log K \pm SE$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}}$
C5	Ca ²⁺	2,50 ± 0,02 ^a	-14,28 ± 0,09 ^a	-5,42 ± 0,08 ^a	29,7 ± 0,4 ^a
	Sr ²⁺	2,36 ± 0,01 ^a	-13,48 ± 0,07 ^a	-9,1 ± 0,1 ^a	14,6 ± 0,7 ^a
	Ba ²⁺	3,23 ± 0,02 ^a	-18,7 ± 0,1 ^a	-7,1 ± 0,2 ^a	38,8 ± 0,9 ^a
C6	Ca ²⁺	2,04 ± 0,02 ^b	-11,6 ± 0,1 ^b		
	Sr ²⁺	2,54 ± 0,03 ^b	-14,5 ± 0,2 ^b		
	Ba ²⁺	2,60 ± 0,01 ^b	-14,8 ± 0,1 ^b		

^a određeno ITC titracijama
^b određeno CD titracijama
SE = standardna pogreška srednje vrijednosti ($N = 3$).
Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

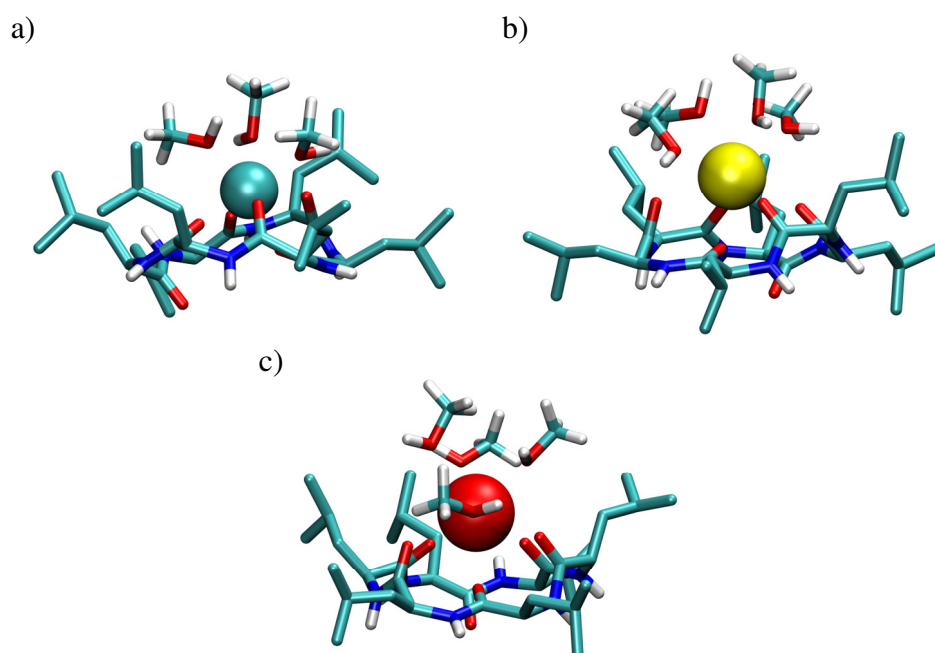
Konstante stabilnosti određene su za komplekse ciklopeptida **C5** i kationa Ca²⁺, Sr²⁺ i Ba²⁺, dok vežanje Mg²⁺ kationa nije uočeno. Ciklopeptid ima najveći afinitet prema barijevom kationu, a za ostale katione je donekle sličan. Doprinos standardne reakcijske entalpije i entropije Gibbsovoj energiji vežanja je povoljan bez jasne ovisnosti parametara o veličini kationa.

Afinitet cikloheksapeptida **C6** prema zemnoalkalijskim kationima u metanolu vrlo je sličan afinitetu ciklopentapeptida **C5**. I u ovom slučaju određene su konstante stabilnosti kalcijeva, stroncijeva i barijeva kompleksa s **C6**. Iako dolazi do promjene u CD spektru dodatkom otopine magnezijeve soli (slika D238), promjene su premale da bi se vežanje moglo kvantitativno okarakterizirati.

MD simulacije pokazuju da u kompleksima ciklopeptida **C5** i **C6** sa zemnoalkalijskim kationima u metanolu barem jedan karbonilni kisik nije u direktnom kontaktu s kationom (tablica 30, slike 73 i 74). Uzrok toga je mala veličina kationa u odnosu na vezno mjesto ciklopeptida što sterički onemogućava orijentaciju svih karbonilnih skupina prema kationu. Također, kao i u slučaju acetonitrila, vidljiva je parcijalna desolvatacija kationa prilikom vežanja na ciklopeptid. Broj molekula otapala koje okružuju kation u kompleksu sličan je za oba proučavana otapala.



Slika 73. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C5** s a) Ca^{2+} , b) Sr^{2+} i c) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.



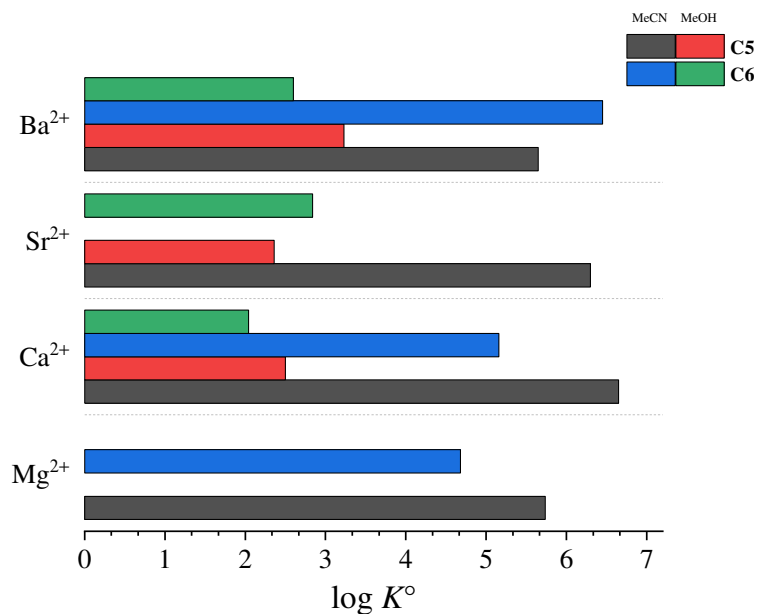
Slika 74. Reprezentativne strukture kompleksa ciklopeptida **C6** s a) Ca^{2+} , b) Sr^{2+} i c) Ba^{2+} dobivene MD simulacijama u metanolu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

Tablica 30. Prosječan broj kontakata između karbonilne skupine okosnice peptida i zemnoalkalijskih kationa u kompleksima ciklopeptida **C5** i **C6** dobiven MD simulacijama u metanolu.

Kation	C5	C6
Ca ²⁺	3,3	4,0
Sr ²⁺	3,5	4,5
Ba ²⁺	3,8	4,8

Svi kompleksi su stehiometrije 1:1

Uspoređujući afinitet leucinskih ciklopeptida u acetonitrilu i metanolu može se zapaziti značajan utjecaj otapala, ne samo na stabilnost kompleksa nego i na stehiometriju nastalih kompleksa. Konstante stabilnosti kompleksa tipa 1:1 su za oba ciklopeptida za više od dva reda veličine veće u acetonitrilu nego u metanolu (slika 75). Značajno veći afiniteti prema kationima u acetonitrilu su, kao i u slučaju fenilalaninskih ciklopeptida, najvećim dijelom posljedica povoljnije solvatacije kationa u metanolu.



Slika 75. Konstante stabilnosti 1:1 tipa kompleksa ciklopeptida **C5** i **C6** s kationima u acetonitrilu i metanolu pri 25 °C.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražen je utjecaj veličine prstena i vrste aminokiselinskih ostataka homociklopeptidnih liganada na termodinamiku reakcija kompleksiranja sa zemnoalkalijskim kationima i jednostavnim anorganskim anionima u više organskih otapala. Osim toga, s ciljem daljnjeg istraživanja templatnog efekta iona u reakciji makrociklizacije proučeno je i vezanje navedenih iona na linearne peptide. U tu svrhu sintetizirana su tri linearna homeopeptida **L1**, **L2** i **L3** s četiri do šest fenilalaninskih ostataka, tri pripadajuća ciklička fenilalaninska homeopeptida **C1**, **C2** i **C3** i tri ciklička leucinska homeopeptida **C4**, **C5** i **C6** s četiri do šest aminokiselinskih ostataka. Linearnim je peptidima određen afinitet prema kationima i anionima u acetonitrilu, otapalu koje vrlo slabo solvatira slobodne anione, te u DMF-u kao otapalu koje se koristi u reakciji makrociklizacije. Cikličkim je peptidima afinitet proučavan u acetonitrilu te u metanolu koji je odabran kao polarno protično otapalo slično vodi. Vezanje iona praćeno je pomoću nekoliko eksperimentalnih metoda (ITC, spektroskopija NMR, spektrofluorimetrija i CD), te računalno pomoću klasičnih MD simulacija s eksplicitnim molekulama otapala.

Afinitet linearnih peptida prema anionima u acetonitrilu smanjuje se u nizu H_2PO_4^- , HSO_4^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- pri čemu prva dva aniona tvore 1:1 i 1:2 (peptid:anion) komplekse, dok ostali tvore samo prvi tip kompleksa. Reakcije kompleksiranja su entalpijski kontrolirane s nepovoljnom reakcijskom entropijom. Duljina lanca ne utječe značajno na afinitet peptida prema anionima čak ni uslijed povećanja broja aminokiselinskih ostataka s četiri na šest. U DMF-u su konstante nešto niže, a najznačajniji pad afiniteta je u slučaju hidrogensulfatnog aniona. U tom otapalu gotovo svi anioni tvore 1:1 tip komplekse, osim dihidrogenfosfatnog koji tvori 2:1, 1:1 i 1:2 komplekse sa svim peptidima. Vezanje kloridnog aniona je u ovom otapalu endotermno, dok je vezanje HSO_4^- i H_2PO_4^- aniona egzoterman proces. Konstante stabilnosti linearnih peptida s anionima blago rastu s povećanjem duljine peptida u gotovo svim slučajevima. MD simulacije u oba otapala pokazuju da s povećanjem duljine lanca raste i prosječni broj kontakata peptida i aniona što ukazuje na sposobnost linearnih peptida da se oblikom prilagode anionima različitih veličina. Iz usporedbe afiniteta linearnih peptida prema anionima može se zaključiti da su najbolji templatni anioni kloridni i dihidrogenfosfatni. No, iako H_2PO_4^- anion tvori najstabilniji kompleks, nastajanje kompleksa viših stehiometrija s tim ionom mogla bi uzrokovati neželjene intramolekulske reakcije prilikom makrociklizacije.

Afinitet linearnih peptida prema kationima u acetonitrilu veći je nego prema anionima. Spektrofluorimetrijski i mikrokolorimetrijski eksperimenti pokazuju da u slučaju nekih kationa nastaju dva tipa kompleksa: 1:1 i 2:1 „sendvič“ kompleks, pri čemu su reakcije kompleksiranja većinom egzotermne. U DMF-u su reakcije vezanja kationa na peptide **L1–L3** proučavane samo ^1H NMR titracijama kojima nije uočeno nastajanje kompleksa. Ovi rezultati su jasni dokaz da zemnoalkalijski kationi ne sudjeluju kao templatni agensi u reakciji makrociklizacije peptidnog prstena u DMF-u te da njihove kloridne soli eventualno mogu poslužiti kao izvor klorida za tu reakciju.

Ciklotetrafenilalanin **C1** nije topljiv u acetonitrilu i metanolu u dovoljnoj mjeri za fizikalno-kemijska mjerenja, a u ^1H spektru tog spoja u DMSO-u prisutno je više skupova signala koji konvergiraju u jedan dodatkom otopine TEACl-a. Ta pojava upućuje na postojanje više izomera slobodnog spoja najvjerojatnije povezanih s geometrijskom izomerizacijom peptidne veze. Iz titracije je vidljivo da spoj **C1** veže kloridni ion te da nastaje stabilni kompleks. Ciklopentapeptid **C2** u acetonitrilu jače veže anione nego cikloheksapeptid **C3**, s konstantama stabilnosti kompleksa koje su u nekim slučajevima i do nekoliko redova veličine veće. Receptor **C2** tvori samo 1:1 tip kompleksa, dok **C3** s dihidrogenfosfatnim anionom tvori i komplekse viših stehiometrija. Afinitet prema halogenidnim anionima se u oba slučaja smanjuje u nizu Cl^- , Br^- , I^- što je pokazatelj utjecaja gustoće naboja na stabilnost kompleksa. Afinitet prema ostalim anionima pada u nizu H_2PO_4^- , HSO_4^- , NO_3^- , SCN^- . Sve su reakcije popraćene povoljnim entalpijskim i entropijskim doprinosom standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja, a smanjenje stabilnosti kompleksa u slučaju **C3** uzrokovan je manje povoljnom reakcijskom entropijom. Vrlo značajan utjecaj otapala vidljiv je uspoređujući termodinamičke parametre kompleksiranja u acetonitrilu i metanolu. U metanolu dolazi do izrazitog smanjenja afiniteta ciklopeptida prema anionima pri čemu vezanje na **C3** u većini slučajeva nije detektirano korištenim metodama. MD simulacije u oba otapala pokazuju da se veći ciklopeptid ne može prilagoditi anionima te da dolazi do pada broja kontakata u anionskim kompleksima spoja **C3** u odnosu na komplekse s **C2**. Vrlo je bitno spomenuti pozitivan makrociklički efekt koji je vidljiv u usporedbi vezanja iona na linearne i cikličke peptide. Povećanje afiniteta ciklopeptida prema anionima u odnosu na ishodne linearne oblike gotovo je u potpunosti posljedica vrlo povoljnog entropijskog doprinosa koji je u slučaju linearnih peptida nepovoljan.

Vezanje kationa zemnoalkalijskih metala na ciklopeptide **C2** i **C3** u acetonitrilu vrlo je snažno, pri čemu su kompleksi većeg ciklopeptida **C3** nešto stabilniji. Najveće konstante

stabilnosti kompleksa oba ciklopeptida uočene su u slučaju vezanja kalcijeva kationa, dok su najmanje za kompleks s barijevim kationom. Vezanje Mg^{2+} nije se moglo kvantitativno okarakterizirati zbog nereproducibilnosti titracija. Sve proučavane reakcije su egzotermne dok je entropijski doprinos za nastajanje nekih kompleksa povoljan, a drugih nepovoljan. U fluorimetrijskim titracijama opaženo je vrlo naglašeno pojačanje fluorescencije vezanjem zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide **C2** i **C3**, izraženije nego što je to u slučaju vezanja većine aniona na te spojeve što otvara mogućnost korištenja ciklopeptida kao fluorimetrijskih detektora tih kationa. U metanolu nastaju samo kompleksi tipa 1:1, a njihova stabilnost je za nekoliko redova veličine manja nego u acetonitrilu. Sve reakcije kompleksiranja zemnoalkalijskih kationa na spojeve **C2** i **C3** su egzotermne te ih odlikuje pozitivna standardna reakcijska entropija.

Uspoređujući vezanje aniona i zemnoalkalijskih kationa na linearne, odnosno cikličke peptide može se zaključiti da je fleksibilnost liganada i stupanj desolvatacije iona u kompleksima značajno utječe na makrociklički efekt. Taj je efekt vrlo izražen u slučaju aniona, dok su u slučaju kationa uočene razlike u konstantama stabilnosti kompleksa linearnih i cikličkih peptida, ali ne kao posljedica razlike u entropijskom doprinosu.

Znatno veća topljivost ciklotetrapeptida **C4**, u odnosu na **C1**, u acetonitrilu omogućila je provođenje fizikalno-kemijskih istraživanja. I u 1H NMR spektru ovog spoja opaženi su signali koji upućuju na geometrijsku izomerizaciju peptidne veze u otopini. Ta pojava je onemogućila kvantitativno određivanje afiniteta tog spoja prema anionima što je uspješno provedeno za njegove veće analoge, ciklopenta- i cikloheksaleucinske receptore **C5** i **C6**. Ciklopentapeptid **C5** posjeduje veći afinitet u odnosu na cikloheksapeptid **C6**, a proces vezanja aniona na oba ciklopeptida je entalpijski i entropijski povoljan. U metanolu je afinitet tih receptora prema anionima izrazito malen, kao što je to slučaj i kod fenilalaninskih ciklopeptida. MD simulacije ponovno pokazuju smanjenje broja kontakata u kompleksima cikloheksapeptida **C6** u odnosu na ciklopentapeptid **C5** uslijed nemogućnosti prilagodbe prstena sa šest aminokiselinskih ostataka veličini i obliku aniona.

Ciklopeptidi **C5** i **C6** sa zemnoalkalijskim kationima tvore komplekse stehiometrije 1:1 i 2:1 (peptid:kation), a u slučaju **C6** dodatno je uočeno nastajanje ternarnih kompleksa s perkloratnim anionom ($C6MClO_4^+$). Spoj **C5** tvori najstabilnije komplekse s kalcijevim kationom, dok receptor **C6** najveći afinitet pokazuje prema barijevom kationu. Sve su reakcije

egzotermne, kao i u slučaju ciklopeptida **C2** i **C3**, a povoljnost entropijskih doprinosa za kompleksiranje kationa razlikuje se među pojedinim sustavima.

Uspoređujući ciklopentapeptide **C2** i **C5**, cikloheksapeptide **C3** i **C6** s ciklopenta- i cikloheksalizinskim peptidima koji na bočnim ograncima imaju Boc zaštitu¹⁴¹ može se zaključiti da vrsta aminokiseline (nepolarna, aromatska, proton-donorska) ne utječe značajno na njihov afinitet prema anionima u acetonitrilu iako pojedini doprinosi standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji značajno ovise o vrsti aminokiselinskih ostataka. Suprotno tome, vezanje zemnoalkalijskih kationa na ciklopeptide u istom otapalu signifikantno ovisi o vrsti aminokiselinskih ostataka. Afinitet fenilalaninskih ciklopeptida prema zemnoalkalijskim kationima je veći u slučaju većeg broja ostataka, dok leucinski ciklopeptidi bolje vežu navedene katione u slučaju manjih ciklopeptida. Navedena razlika je gotovo u svim slučajevima posljedica razlike u entropijskim doprinosima kompleksiranja. U metanolu vrsta aminokiseline ne utječe značajno na afinitet ciklopeptida prema kationima.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji jasno potvrđuju da su mali ciklopeptidi vrlo dobri receptori za anorganske katione i anione u otopini. Posljedica je to sposobnosti sekundarnog amida kao skupine da bude potencijalni donor vodikove veze ili elektronskog para u interakciji s ionima. Navedeno svojstvo omogućuje korištenje ciklopeptida kao transportera jednostavnih kationskih i anionskih vrsta preko membrane. Također, sposobnost vezanja aniona različitih strukturnih karakteristika otvara mogućnost korištenja ciklopeptida kao receptora organskih aniona sa sulfonatnim i fosfonatnim skupinama.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AcCl	acetyl-klorid
ADP	adenozin difosfat
Ala	alanin
ATP	adenozin trifosfat
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonilna zaštitna skupina
Cbz	benziloksikarbonilna zaštitna skupina
CD	cirkularni dikroizam
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
DAPCO	1,4-diazabiciklo[2,2,2]oktan
DCM	diklormetan
DEPBT	dietil-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il-fosfat
DFT	teorija funkcionala gustoće
DHP	dihidrogenfosfatni anion
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDC×HCl	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
EtOAc	etil-acetat
Gly	glicin
HOBt	1-hidroksi-benzotriazol
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HRMS	spektrometrija masa visoke razlučivosti
ITC	iztotermska titracijska kalorimetrija
KOH	kalijev hidroksid
Leu	leucin
MD	molekulska dinamika
MeCN	acetonitril

MeOH	metanol
Met	metionin
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OMe	metilni ester
OPLS-AA	Optimized Potential for Liquid Simulations—All Atom
PCA	analiza glavnih komponenti
Phe	fenilalanin
PME	Particle Mesh Ewald metoda
ppm	dijelovi na milijun
Pro	prolin
QM/MM	kvantna mehanika/molekulska mehanika
RIF	relativni intenzitet fluorescencije
SE	standardna pogreška srednje vrijednosti
TBA	tetrabutilamonijev kation
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat
TEA	tetraetilamonijev kation
TEA	triethylamin
TMA	tetrametilamonijev kation
TMS	tetrametilsilan
TPB	tetrafenilboratni anion
Val	valin
VMD	Visual Molecular Dynamics program

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. Zakharova, R. Kashapov, R. Kushnazarova, Y. Razuvaeva, E. Zhiltsova, A. Mirgorodskaya, O. Sinyashin, *Biophys. Rev.* (2025).
2. Y. Yang, P. Li, H. Feng, R. Zeng, S. Li, Q. Zhang, *Molecules* **29** (2024) 3828.
3. J. T. Davis, P. A. Gale, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **49** (2020) 6056–6086.
4. S. Zheng, L. Huang, Z. Sun, M. Barboiu, *Angew. Chemie Int. Ed.* **60** (2021) 566–597.
5. F. . Dickert, R. Sikorski, *Mater. Sci. Eng. C* **10** (1999) 39–46.
6. M. R. Ganjali, P. Norouzi, M. Rezapour, F. Faridbod, M. R. Pourjavid, *Sensors* **6** (2006) 1018–1086.
7. C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **427** (2021) 213560.
8. T. Minami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **94** (2021) 24–33.
9. C. Wynne, R. B. P. Elmes, *Sensors & Diagnostics* **3** (2024) 987–1013.
10. P. W. N. M. van Leeuwen (ed.), *Supramolecular Catalysis* Wiley, Weinheim, 2008.
11. R. Ning, Q.-Q. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **54** (2025) 11105–11140.
12. F. Arnaud-Neu, R. Delgado, S. Chaves, *Pure Appl. Chem.* **75** (2003) 71–102.
13. J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 6700–6707.
14. A. F. Danil de Namor, R. M. Cleverley, M. L. Zapata-Ormachea, *Chem. Rev.* **98** (1998) 2495–2526.
15. A.-F. Li, J.-H. Wang, F. Wang, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3729–3745.
16. M. Wenzel, J. R. Hiscock, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 480–520.
17. P. A. Gale, N. Busschaert, C. J. E. Haynes, L. E. Karagiannidis, I. L. Kirby, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 205–241.
18. Y. Inoue, Y. Liu, L. H. Tong, B. J. Shen, D. Sen Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 10637–10644.
19. Y. Inoue, T. Hakushi, Y. Liu, L.-H. Tong, B.-J. Shen, D.-S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 475–481.
20. S. J. Barrow, S. Kasera, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman, *Chem. Rev.* **115** (2015) 12320–12406.
21. S. K. Kim, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3784–3809.
22. C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 7017–7036.
23. M. A. Bush, M. R. Truter, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* (1970) 1439.
24. D. Bright, M. R. Truter, *Nature* **225** (1970) 176–177.

25. C. H. Park, H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 2431–2432.
26. H. E. Simmons, C. H. Park, R. T. Uyeda, M. F. Habibi, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **32** (1970) 521–534.
27. S. B. Larson, N. K. Dalley, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **38** (1982) 1309–1312.
28. K. A. Jolliffe, *Acc. Chem. Res.* **50** (2017) 2254–2263.
29. P. J. Garratt, A. J. Ibbett, J. E. Ladbury, R. O'Brien, M. B. Hursthouse, K. M. Abdul Malik, *Tetrahedron* **54** (1998) 949–968.
30. C. D. Swor, D. R. Tyler, *Coord. Chem. Rev.* **255** (2011) 2860–2881.
31. S. Ibáñez, M. Poyatos, E. Peris, *Acc. Chem. Res.* **53** (2020) 1401–1413.
32. G. Horvat, V. Stilinović, T. Hrenar, B. Kaitner, L. Frkanec, V. Tomišić, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 6264–6278.
33. G. Horvat, L. Frkanec, N. Cindro, V. Tomišić, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19** (2017) 24316–24329.
34. S. A. Wagay, L. Khan, R. Ali, *Chem. – An Asian J.* **18** (2023) e202201080.
35. M. Zaleskaya-Hernik, R. Salam, M. J. González, M. Wilczek, Ł. Dobrzycki, N. Busschaert, J. Romański, *Chem. Sci.* **16** (2025) 6982–6990.
36. K. Murayama, K. Aoki, *Inorganica Chim. Acta* **281** (1998) 36–42.
37. A. de Bettencourt-Dias, R. M. Beeler, J. R. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 15102–15110.
38. F. Arnaud-Neu, S. Barbosa, F. Berny, A. Casnati, N. Muzet, A. Pinalli, R. Ungaro, M.-J. Schwing-Weill, G. Wipff, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1999) 1727–1738.
39. G. Horvat, V. Stilinović, B. Kaitner, L. Frkanec, V. Tomišić, *Inorg. Chem.* **52** (2013) 12702–12712.
40. C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **3** (2011) 509–524.
41. K. J. Jensen, *Peptide and Protein Design for Biopharmaceutical Applications* Wiley, 2009.
42. I. Daidone, H. Neuweiler, S. Doose, M. Sauer, J. C. Smith, *PLoS Comput. Biol.* **6** (2010) e1000645.
43. M. Duvnjak, N. Vidović, K. Užarević, G. Horvat, V. Tomišić, G. Speranza, N. Cindro, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **13** (2025) 30–35.
44. D. H. Busch, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **12** (1992) 389–395.
45. S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **26** (1993) 469–475.
46. C. J. Pedersen, *Org. Synth.* **52** (1972) 66.
47. M. Liu, Y. -C. Tang, K. -. Fan, X. Jiang, L. -. Lai, Y. -. Ye, *J. Pept. Res.* **65** (2005) 55–64.
48. N. Vidović, G. Horvat, D. Riva, T. Rinkovec, N. Cindro, V. Tomišić, G. Speranza, *Org. Lett.*

- 22 (2020) 2129–2134.
49. D. A. Torchia, A. Di Corato, S. C. K. Wong, C. M. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 609–615.
50. C. M. Deber, E. T. Fossel, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 4015–4017.
51. V. Madison, M. Atreyi, C. M. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 6725–6734.
52. V. Madison, C. M. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 4788–4798.
53. C. M. Deber, D. A. Torchia, S. C. K. Wong, E. R. Blout, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69** (1972) 1825–1829.
54. M. A. Bednarek, B. E. Campbell, K. R. K. Easwaran, E. R. Blout, *Biopolymers* **26** (1987) S11–S23.
55. K. D. Kopple, M. Ohnishi, A. Go, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 4264–4272.
56. K. D. Kopple, M. Ohnishi, A. Go, *Biochemistry* **8** (1969) 4087–4095.
57. K. D. Kopple, *Biopolymers* **10** (1971) 1139–1152.
58. K. D. Kopple, A. Go, R. H. Logan, J. Savrda, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 973–981.
59. K. D. Kopple, A. Go, T. J. Schamper, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 4289–4295.
60. S. L. Portnova, T. A. Balashova, V. F. Bystrov, V. V. Shilin, Y. Bernat, V. T. Ivanov, Y. A. Ovchinnikov, *Chem. Nat. Compd.* **7** (1971) 307–318.
61. V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, V. F. Bystrov, V. V. Shilin, Y. Bernat, Y. A. Ovchinnikov, *Chem. Nat. Compd.* **7** (1971) 319–324.
62. V. T. Ivanov, I. A. Lavrinovich, G. A. Kogan, E. A. Meshcheryakova, S. L. Portnova, M. D. Isabaev, P. V. Kostetskii, Y. A. Ovchinnikov, *Chem. Nat. Compd.* **11** (1975) 209–216.
63. M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2870–2871.
64. G. N. Ramachandran, R. Chandrasekaran, K. D. Kopple, *Biopolymers* **10** (1971) 2113–2131.
65. M. C. Rose, R. W. Henkens, *Biochim. Biophys. Acta* **372** (1974) 426–435.
66. H. Huang, L. Mu, J. He, J.-P. Cheng, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 7605–7611.
67. J. S. Rybka, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **19** (1980) 2784–2790.
68. J. Brasun, C. Gabbiani, M. Ginanneschi, L. Messori, M. Orfei, J. Swiatek-Kozłowska, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 2016–2021.
69. J. Brasun, A. Matera-Witkiewicz, E. Kamysz, W. Kamysz, S. Ołdziej, *Polyhedron* **29** (2010) 1535–1542.
70. D. W. Margerum, K. L. Chellappa, F. P. Bossu, G. L. Burce, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 6894–6896.
71. J. S. Rybka, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **20** (1981) 1453–1458.
72. G. Haberhauer, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 2421–2424.
73. H. Ngyen, M. Orlamuender, D. Pretzel, I. Agricola, U. Sternberg, S. Reissmann, *J. Pept. Sci.*

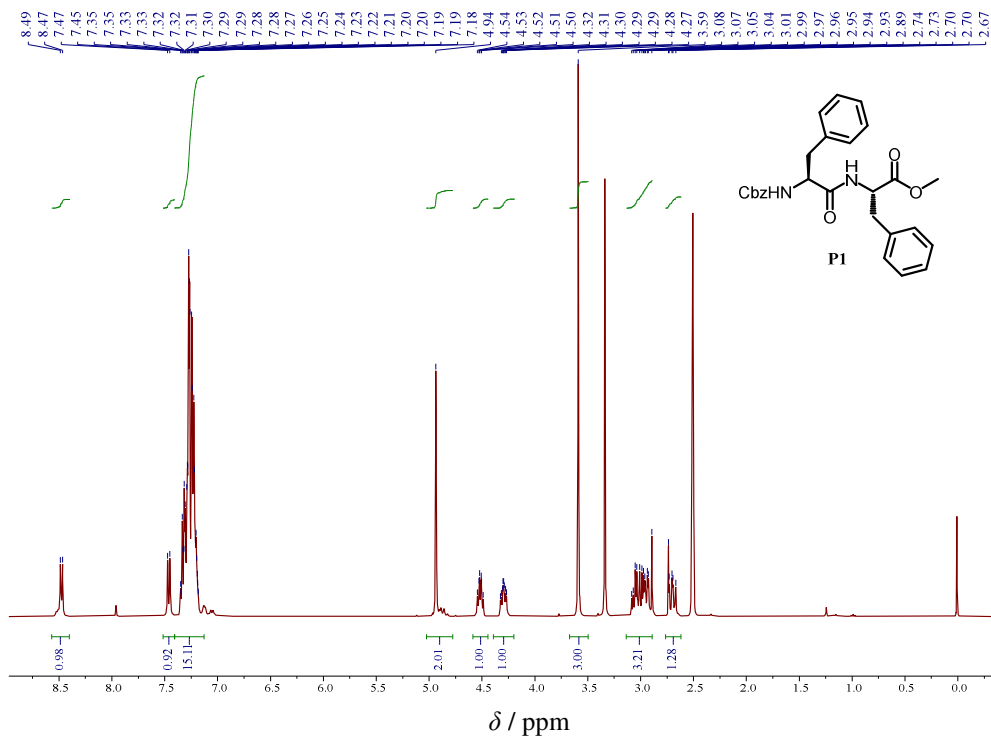
- 14 (2008) 1010–1021.
74. M. Ngu-Schwemlein, P. Butko, B. Cook, T. Whigham, *J. Pept. Res.* **66** (2005) 72–81.
75. M. Ngu-Schwemlein, W. Gilbert, K. Askew, S. Schwemlein, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 5778–5787.
76. P. Wipf, S. Venkatraman, C. P. Miller, S. J. Geib, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **33** (1994) 1516–1518.
77. T. Okada, K. Tanaka, M. Shiro, M. Shionoya, *Chem. Commun.* **3** (2005) 1484–1486.
78. S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40** (2001) 2648–2651.
79. S. Kubik, R. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (2002) 5127–5132.
80. S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 12752–12760.
81. C. Reyheller, B. P. Hay, S. Kubik, *New J. Chem.* **31** (2007) 2095.
82. T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel, S. Kubik, *Chem. – A Eur. J.* **16** (2010) 7241–7255.
83. F. Sommer, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **12** (2014) 8851–8860.
84. J. Bartl, S. Kubik, *Chempluschem* **85** (2020) 963–969.
85. P. G. Young, K. A. Jolliffe, *Org. Biomol. Chem.* **10** (2012) 2664.
86. V. J. Dungan, H. T. Ngo, P. G. Young, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **49** (2013) 264–266.
87. P. G. Young, J. K. Clegg, M. Bhadbhade, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **47** (2011) 463–465.
88. P. G. Young, J. K. Clegg, K. A. Jolliffe, *Supramol. Chem.* **24** (2012) 77–87.
89. N. Busschaert, L. E. Karagiannidis, M. Wenzel, C. J. E. Haynes, N. J. Wells, P. G. Young, D. Makuc, J. Plavec, K. A. Jolliffe, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **5** (2014) 1118.
90. M. K. Cerreta, K. A. Berglund, *J. Cryst. Growth* **84** (1987) 577–588.
91. N. Bregović, N. Cindro, L. Frkanec, K. Užarević, V. Tomišić, *Chem. – A Eur. J.* **20** (2014) 15863–15871.
92. D. Barišić, V. Tomišić, N. Bregović, *Anal. Chim. Acta* **1046** (2019) 77–92.
93. D. Mungalpara, H. Kelm, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Keller, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **15** (2017) 102–113.
94. D. Mungalpara, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Kubik, *Chem. Sci.* **8** (2017) 6005–6013.
95. G. Horvat, S. Tarana, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, *J. Mol. Liq.* **340** (2021) 116848.
96. Origin 7.5, OriginLab Corp., Northhampton, MA. <http://www.originlab.com>, n.d. .
97. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Solution Chem.* **37** (2008) 467–476.
98. J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, P. Schuck, *Protein Sci.* **16** (2007) 30–42.
99. A. Usenik, Termodinamika inkluzijskih reakcija amfifilnih spojeva s ciklodekstrinima i

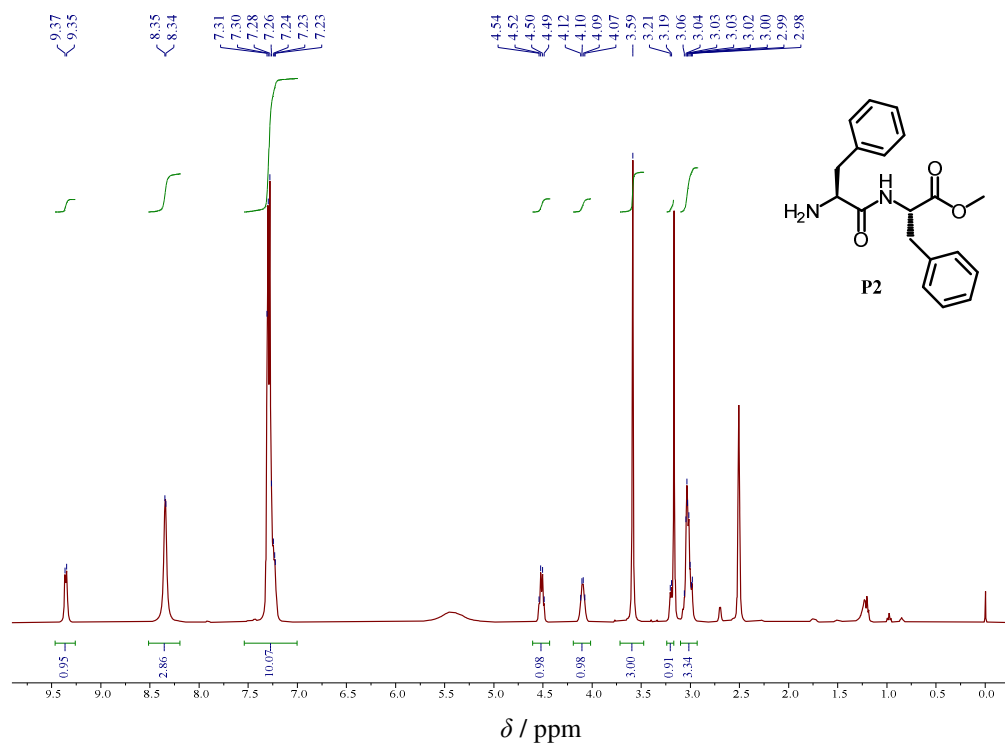
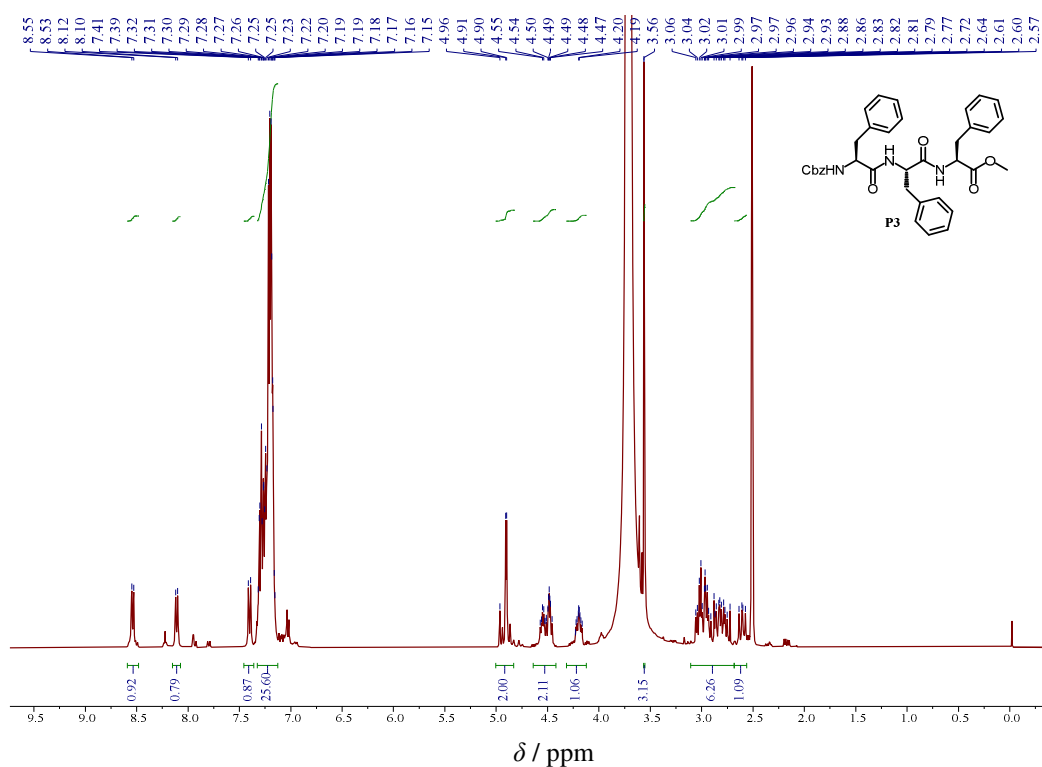
- kukurbiturilima, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023., str. 42.
100. C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi, A. Vacca, *Anal. Biochem.* **231** (1995) 374–382.
101. TopSpin, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany.
<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr-software/topspin.html>.
102. MestReNova, Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain. <https://mestrelab.com>.
103. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
104. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Ann. Chim.* **89** (1999) 45–49.
105. H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **32** (1985) 257–264.
106. A. N. Meshkov, G. A. Gamov, *Talanta* **198** (2019) 200–205.
107. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1701–1718.
108. D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1668–1688.
109. J. C. Phillips, D. J. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Hénin, W. Jiang, R. McGreevy, M. C. R. Melo, B. K. Radak, R. D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kalé, K. Schulten, C. Chipot, E. Tajkhorshid, *J. Chem. Phys.* **153** (2020).
110. B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **4** (1983) 187–217.
111. B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, et al., *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 1545–1614.
112. W. Hwang, S. L. Austin, A. Blondel, E. D. Boittier, S. Boresch, M. Buck, J. Buckner, A. Caflisch, H.-T. Chang, X. Cheng, Y. K. Choi, J.-W. Chu, M. F. Crowley, Q. Cui, A. Damjanovic, Y. Deng, M. Devereux, X. Ding, M. F. Feig, J. Gao, D. R. Glowacki, J. E. Gonzales, M. B. Hamaneh, E. D. Harder, R. L. Hayes, J. Huang, Y. Huang, P. S. Hudson, W. Im, S. M. Islam, et al., *J. Phys. Chem. B* **128** (2024) 9976–10042.
113. P. Eastman, V. Pande, *Comput. Sci. Eng.* **12** (2010) 34–39.
114. P. Eastman, R. Galvelis, R. P. Peláez, C. R. A. Abreu, S. E. Farr, E. Gallicchio, A. Gorenko, M. M. Henry, F. Hu, J. Huang, A. Krämer, J. Michel, J. A. Mitchell, V. S. Pande, J. P. Rodrigues, J. Rodriguez-Guerra, A. C. Simmonett, S. Singh, J. Swails, P. Turner, Y. Wang, I.

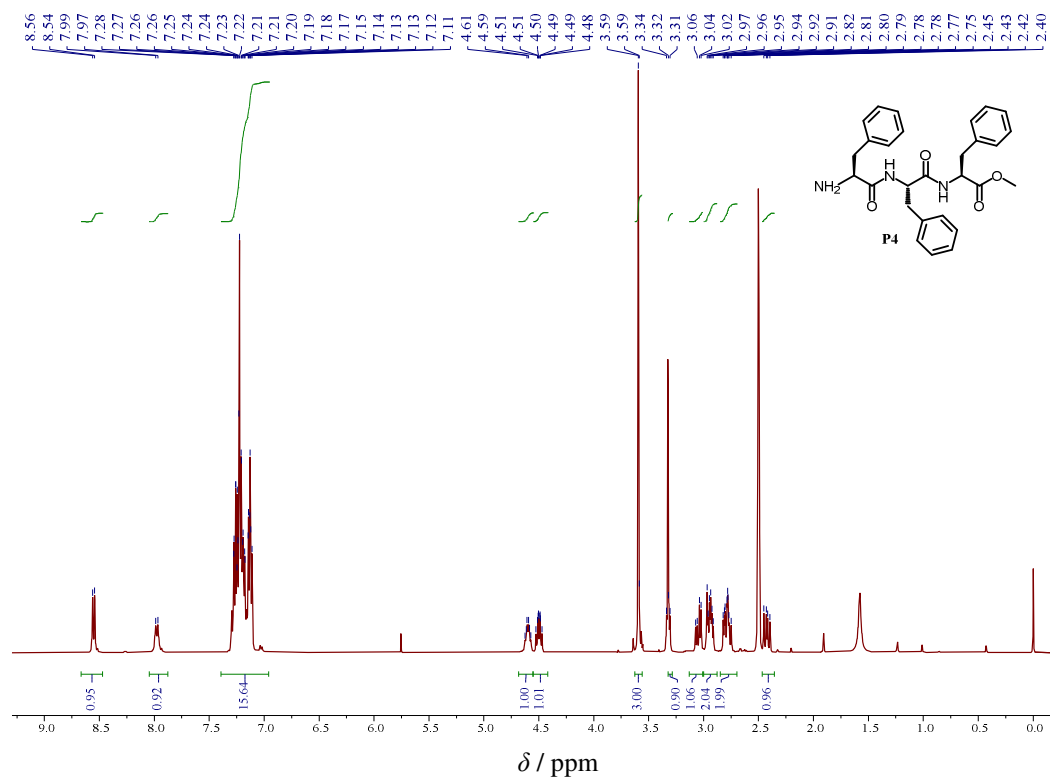
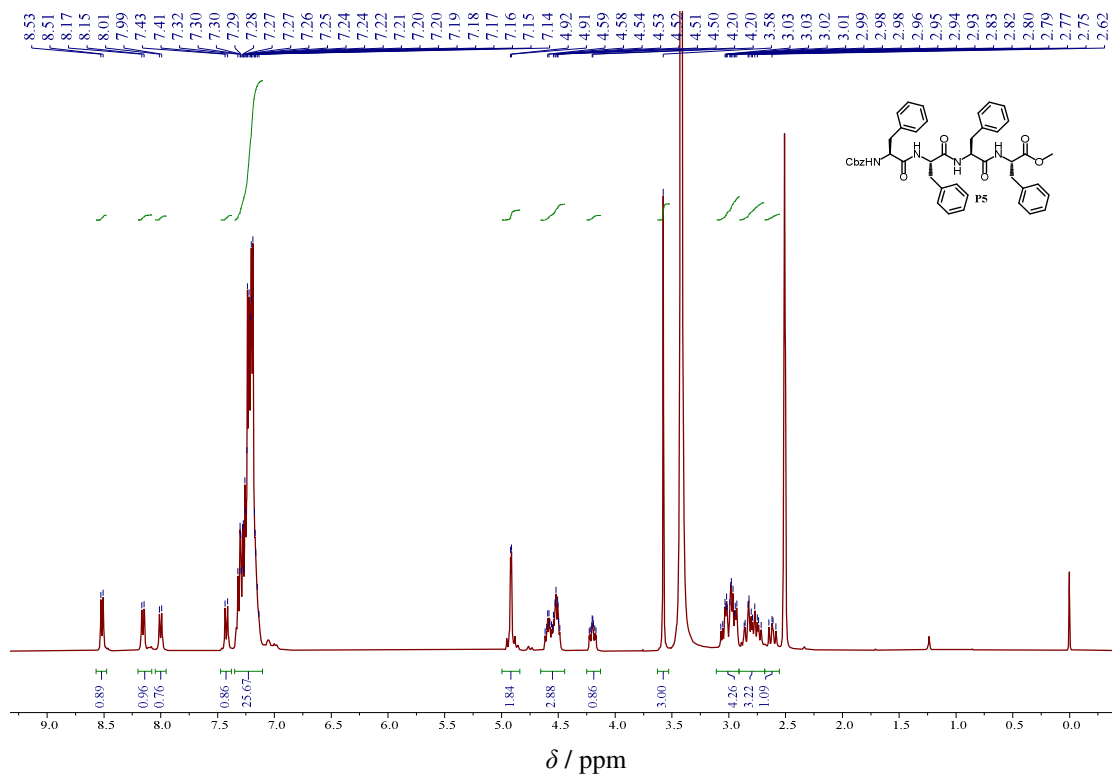
- Zhang, J. D. Chodera, G. De Fabritiis, T. E. Markland, *J. Phys. Chem. B* **128** (2024) 109–116.
115. W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 11225–11236.
116. B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, et al., *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 1545–1614.
117. M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *J. Cheminform.* **4** (2012) 17.
118. GaussView, Version 6.1.1, Roy Dennington, Todd Keith, and John Millam, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2019.
119. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684–3690.
120. S. Nosé, *Mol. Phys.* **52** (1984) 255–268.
121. W. G. Hoover, *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.
122. M. Parrinello, A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **52** (1981) 7182–7190.
123. S. Nosé, M. L. Klein, *Mol. Phys.* **50** (1983) 1055–1076.
124. G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, M. L. Klein, *Mol. Phys.* **87** (1996) 1117–1157.
125. H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.* **91** (1995) 43–56.
126. E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* **7** (2001) 306–317.
127. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* **4** (2008) 435–447.
128. 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* **29** (2013) 845–854.
129. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* **1–2** (2015) 19–25.
130. R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, P. E. M. Lopes, J. Mittal, M. Feig, A. D. MacKerell, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3257–3273.
131. N. Goga, A. J. Rzepiela, A. H. de Vries, S. J. Marrink, H. J. C. Berendsen, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3637–3649.
132. T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089–10092.
133. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.
134. Q. Sun, B. Xu, Y. Niu, F. Xu, L. Liang, C. Wang, J. Yu, G. Yan, W. Wang, H. Jin, P. Xu, *ChemMedChem* **10** (2015) 498–510.

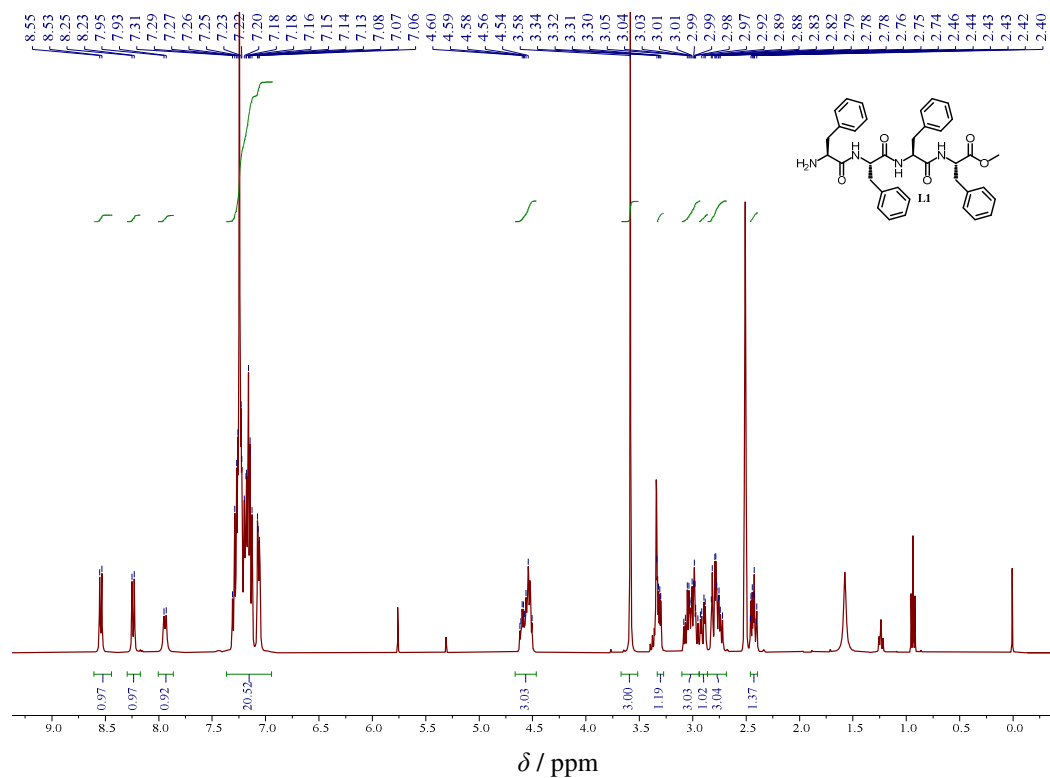
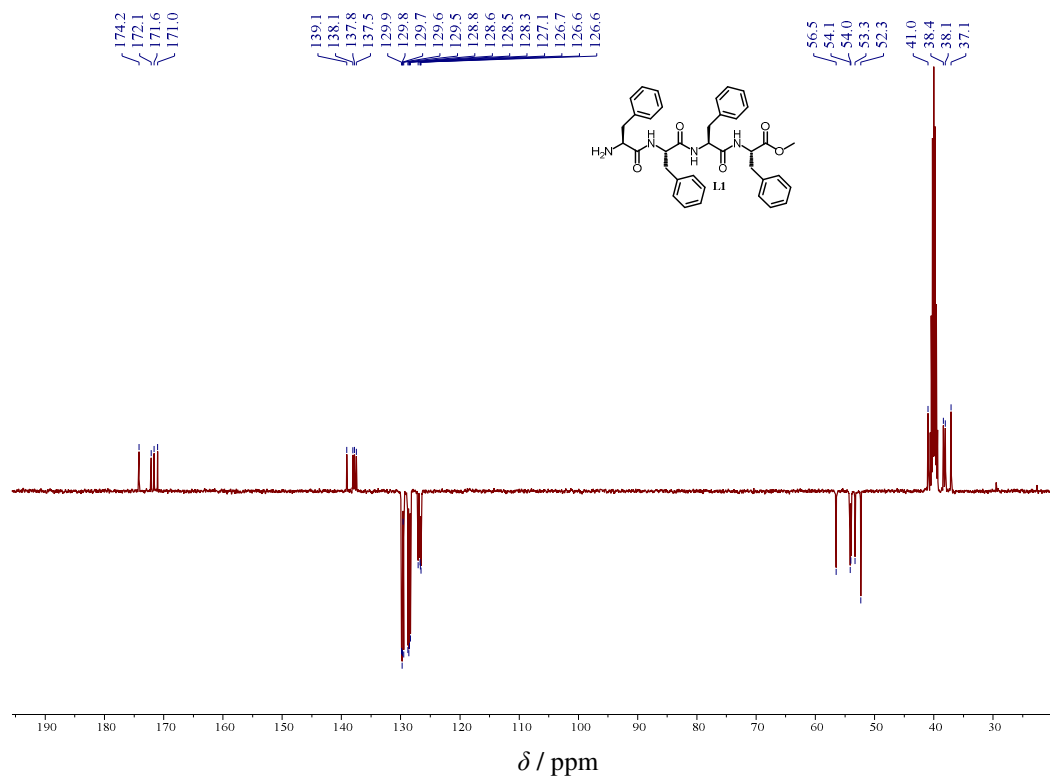
135. Y. Liu, Y. Zhang, Z. Wang, J. Wang, K. Wei, G. Chen, M. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016) 12387–12394.
136. N. Herrero Alvarez, H. van de Langemheen, A. J. Brouwer, R. M. J. Liskamp, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 5055–5063.
137. A. Biela, N. N. Nasief, M. Betz, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe, *Angew. Chemie Int. Ed.* **52** (2013) 1822–1828.
138. O. Demmer, A. O. Frank, H. Kessler, Design of Cyclic Peptides, in *Pept. Protein Des. Biopharm. Appl.* Wiley, 2009, str. 133–176.
139. M. T. Oakley, R. L. Johnston, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 650–657.
140. M. Modrušan, L. Glazer, L. Otmačić, I. Crnolatac, N. Cindro, N. Vidović, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Int. J. Mol. Sci.* **25** (2024) 5235.
141. T. Rinkovec, S. Tarana, M. Modrušan, N. Vidović, A. Tomić, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *J. Mol. Liq.* **433** (2025) 127837.
142. E. M. Fatila, E. B. Twum, A. Sengupta, M. Pink, J. A. Karty, K. Raghavachari, A. H. Flood, *Angew. Chemie Int. Ed.* **55** (2016) 14057–14062.
143. M. N. Hoque, U. Manna, G. Das, *Supramol. Chem.* **28** (2016) 284–292.
144. E. M. Fatila, E. B. Twum, J. A. Karty, A. H. Flood, *Chem. – A Eur. J.* **23** (2017) 10652–10662.
145. Y. Marcus, *Ion Properties* M. Dekker, New York, 1997.
146. I. Petters, M. Modrušan, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Molecules* **27** (2022) 3918.
147. I. Petters, Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja ciklopentafenilalanina s anionima u otopini, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022.
148. J.-N. Cha, B.-S. Cheong, H.-G. Cho, *J. Phys. Chem. A* **105** (2001) 1789–1796.
149. M. Chaudhry, Y. Kinjo, I. Persson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **90** (1994) 2683.
150. C. Niu, V. Madison, L. G. Pease, E. R. Blout, *Biopolymers* **17** (1978) 2747–2751.

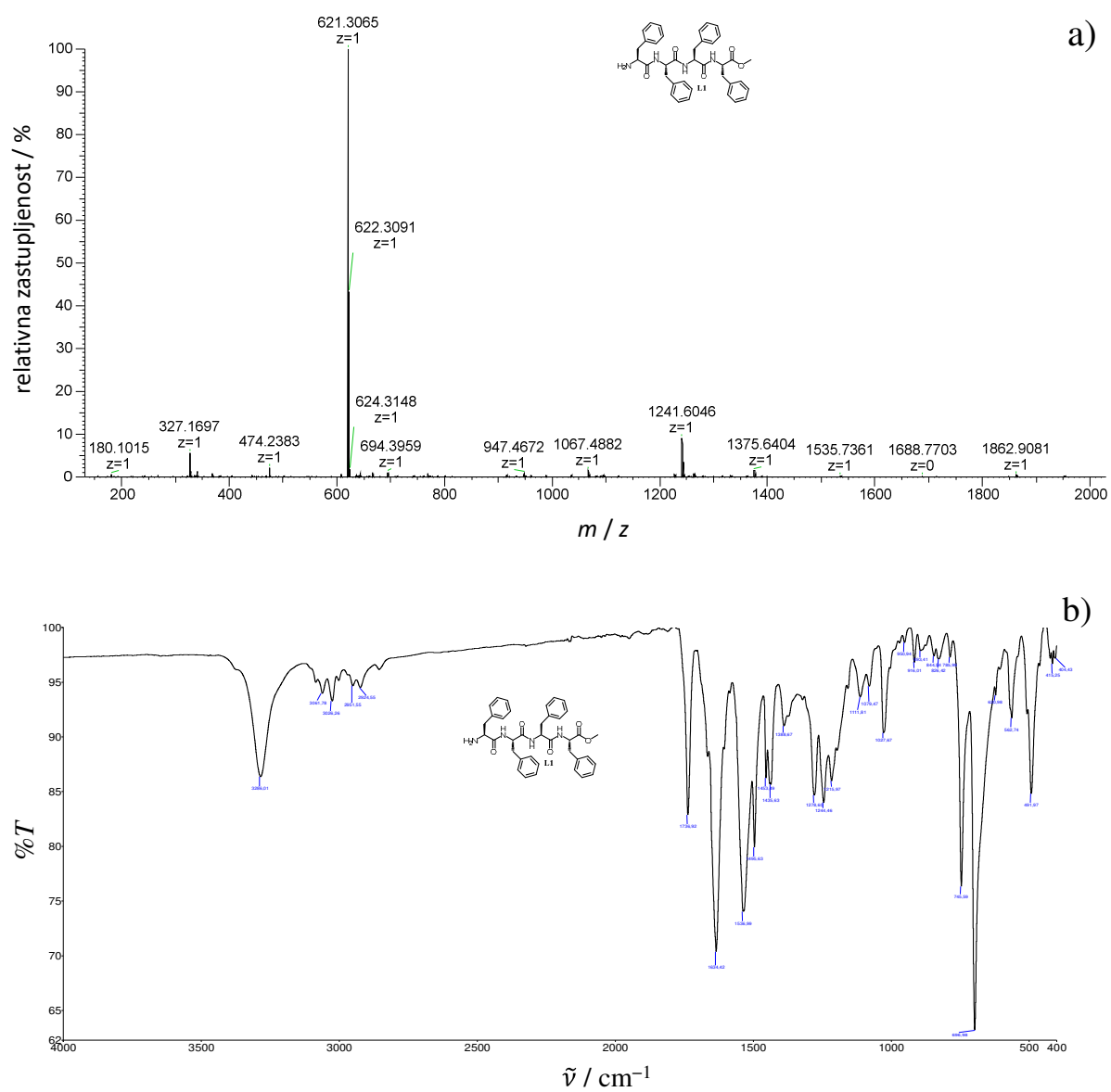
§ 8. DODATAK

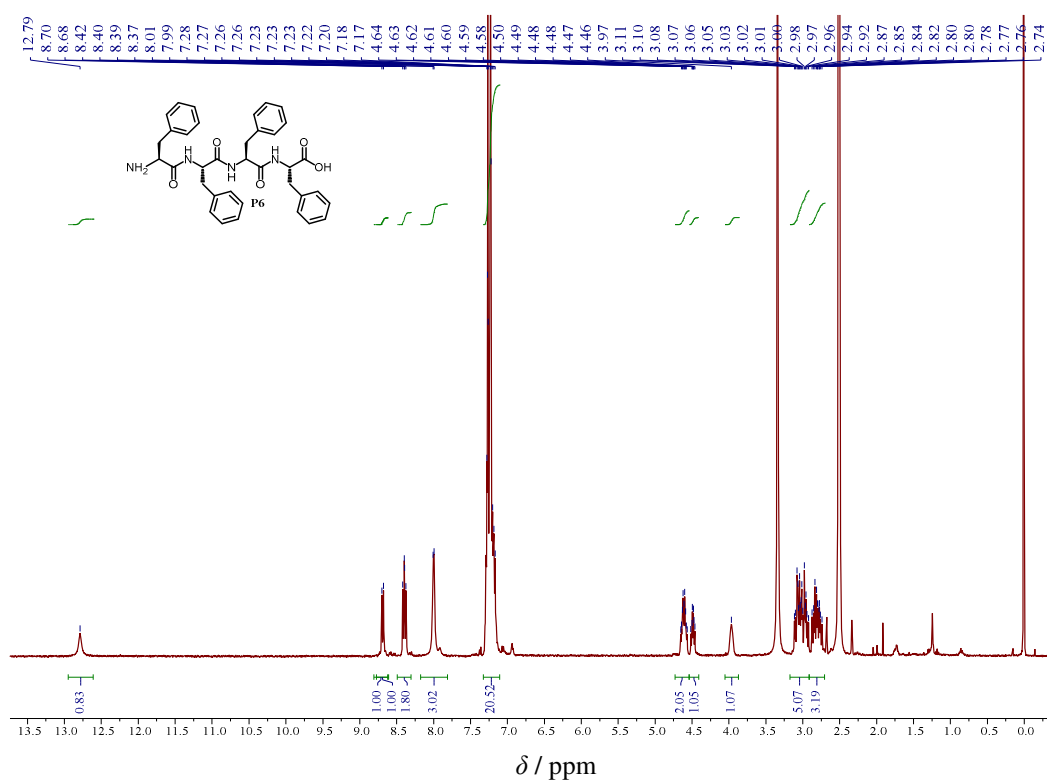
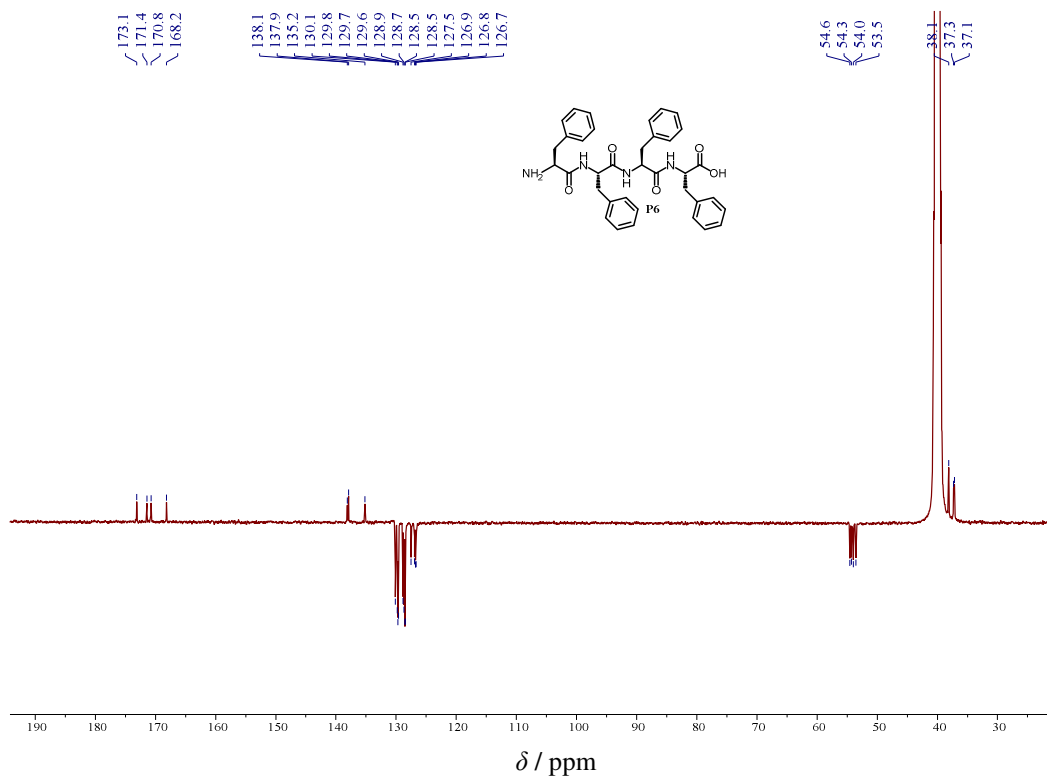
Slika D1. ¹H NMR spektar spoja P1 u DMSO-d₆.

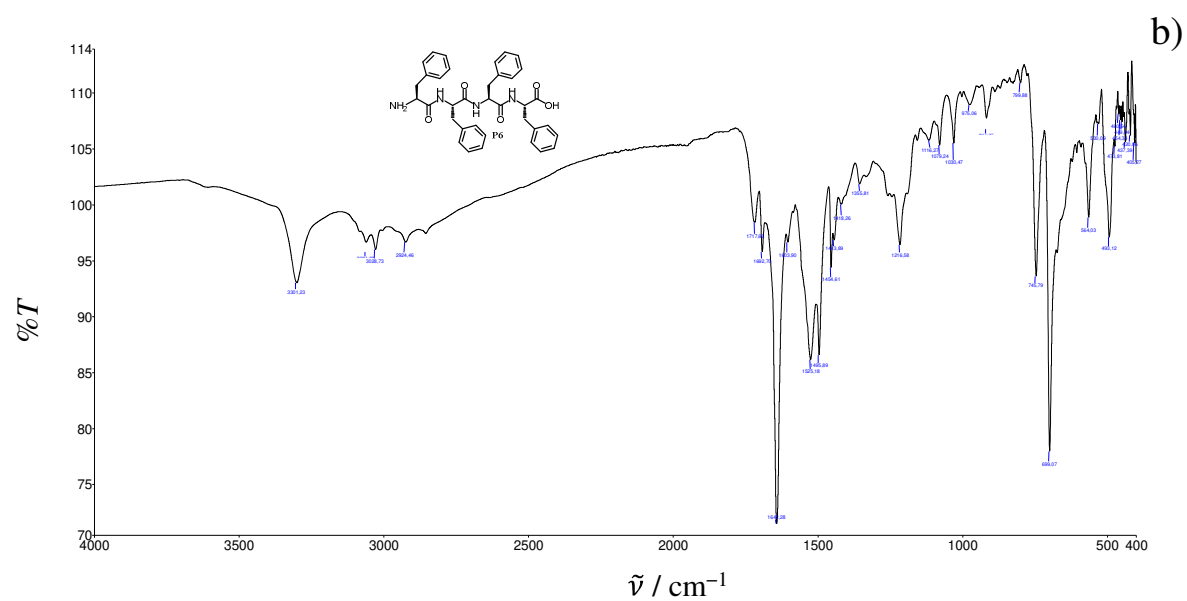
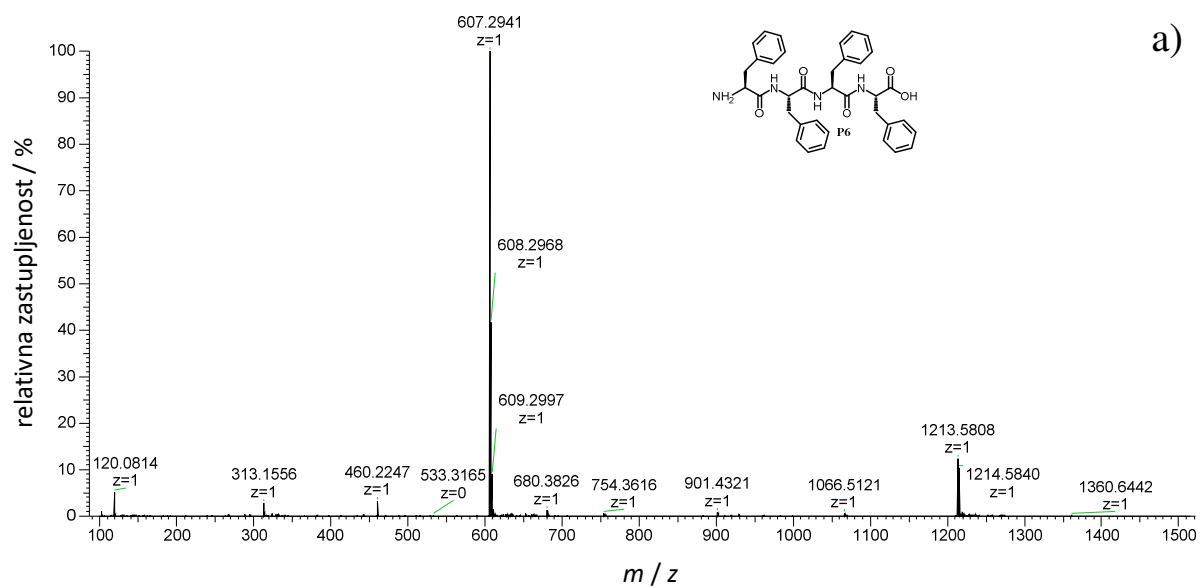
Slika D2. ^1H NMR spektar spoja **P2** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D3. ^1H NMR spektar spoja **P3** u $\text{DMSO-}d_6$.

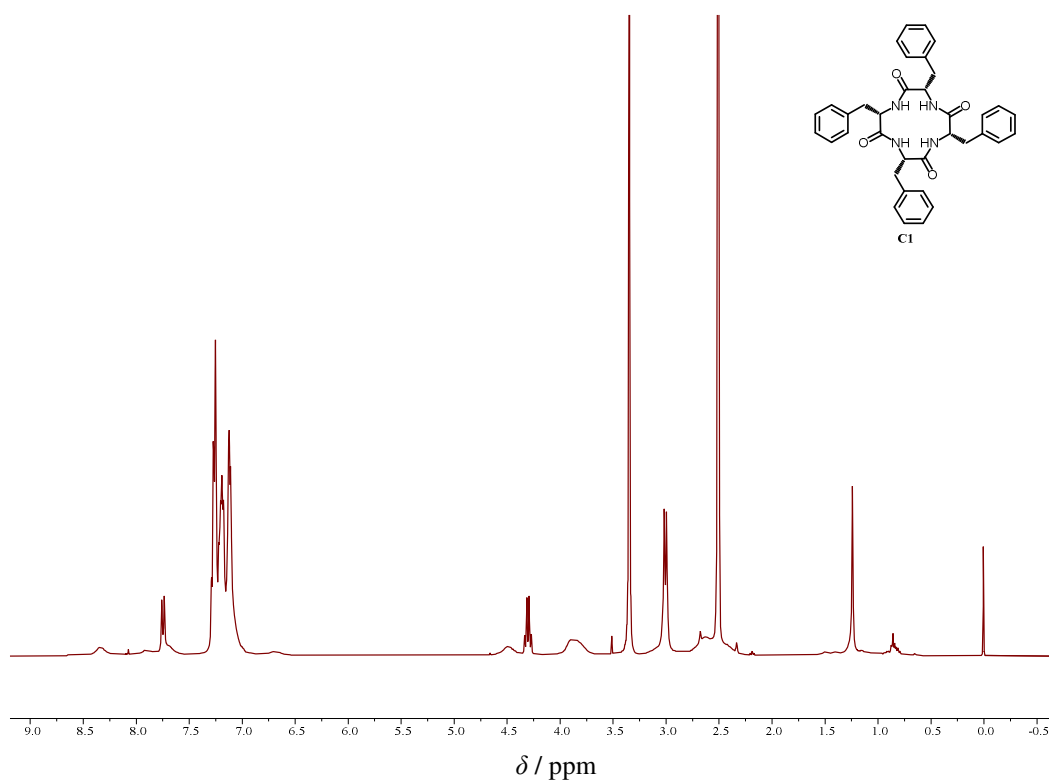
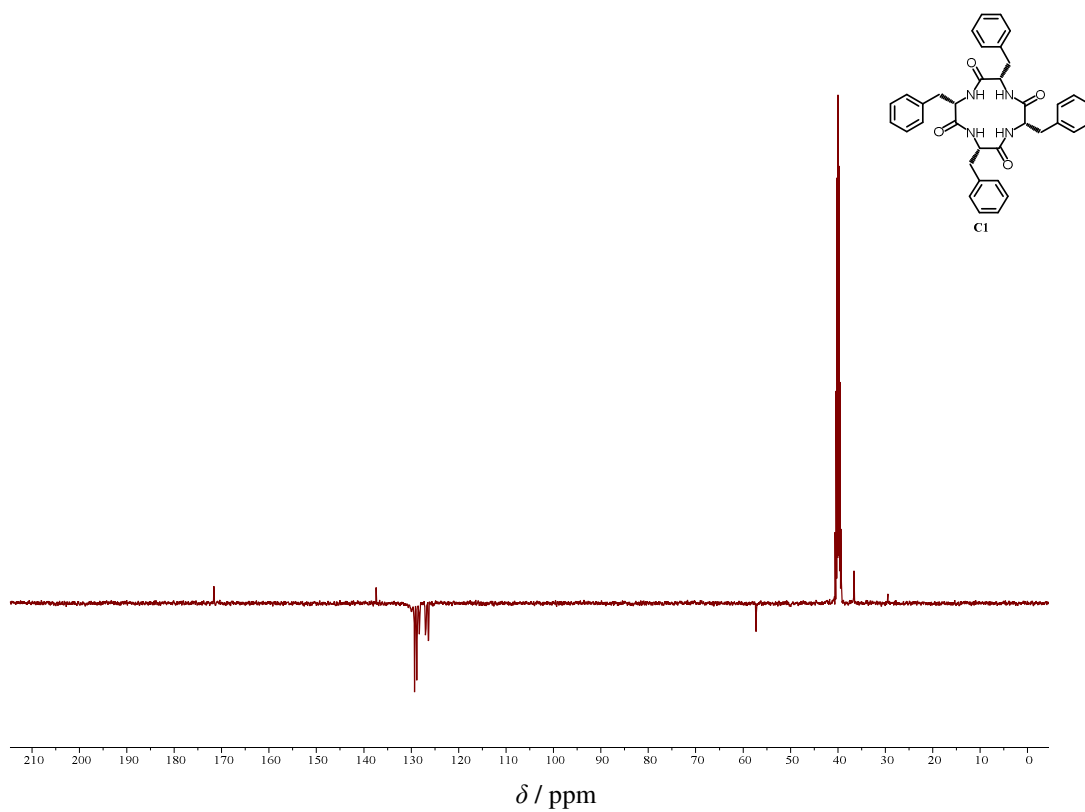
Slika D4. ^1H NMR spektar spoja **P4** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D5. ^1H NMR spektar spoja **P5** u $\text{DMSO-}d_6$.

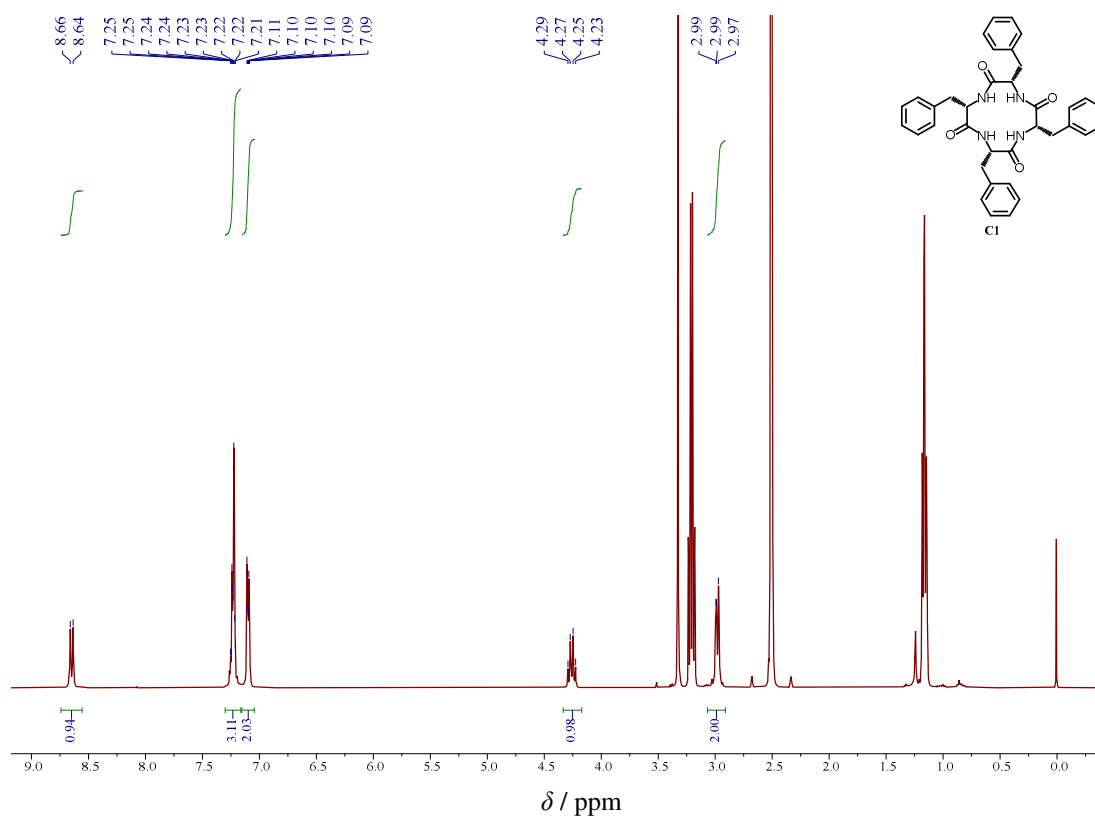
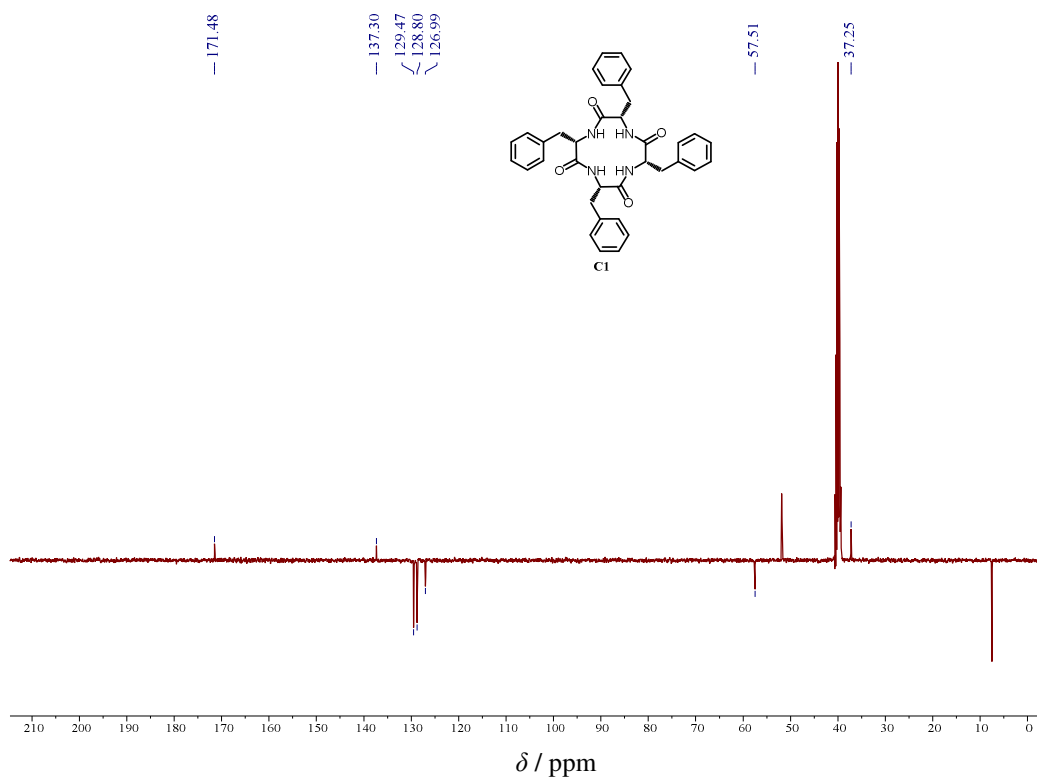
Slika D6. ^1H NMR spektar spoja **L1** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D7. ^{13}C NMR spektar spoja **L1** u $\text{DMSO-}d_6$.

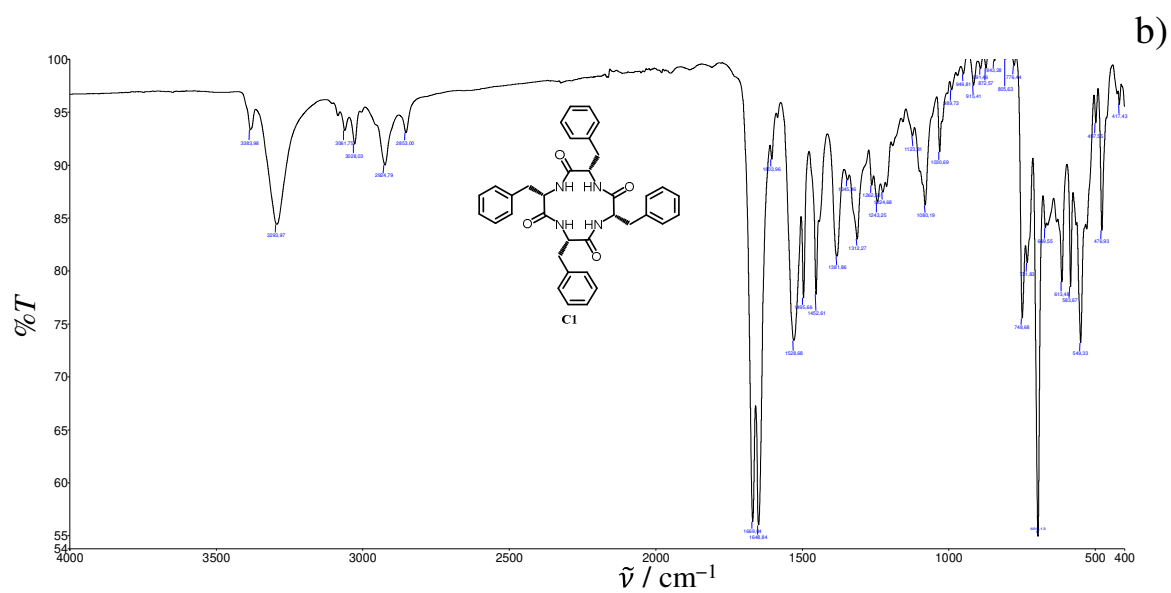
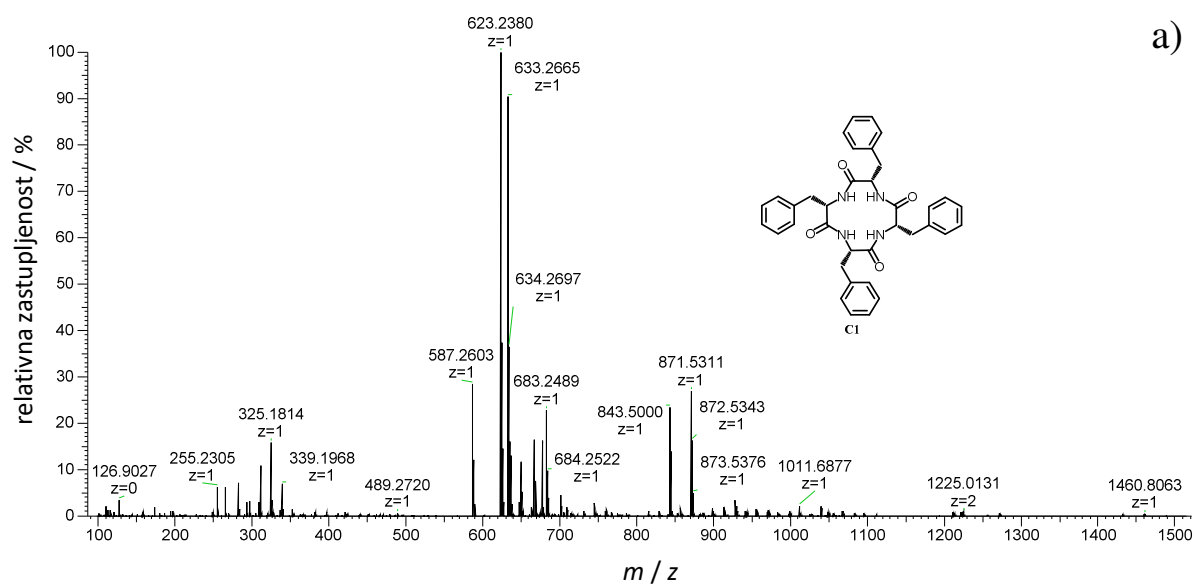
Slika D8. a) HRMS i b) IR spektar spoja **L1**.

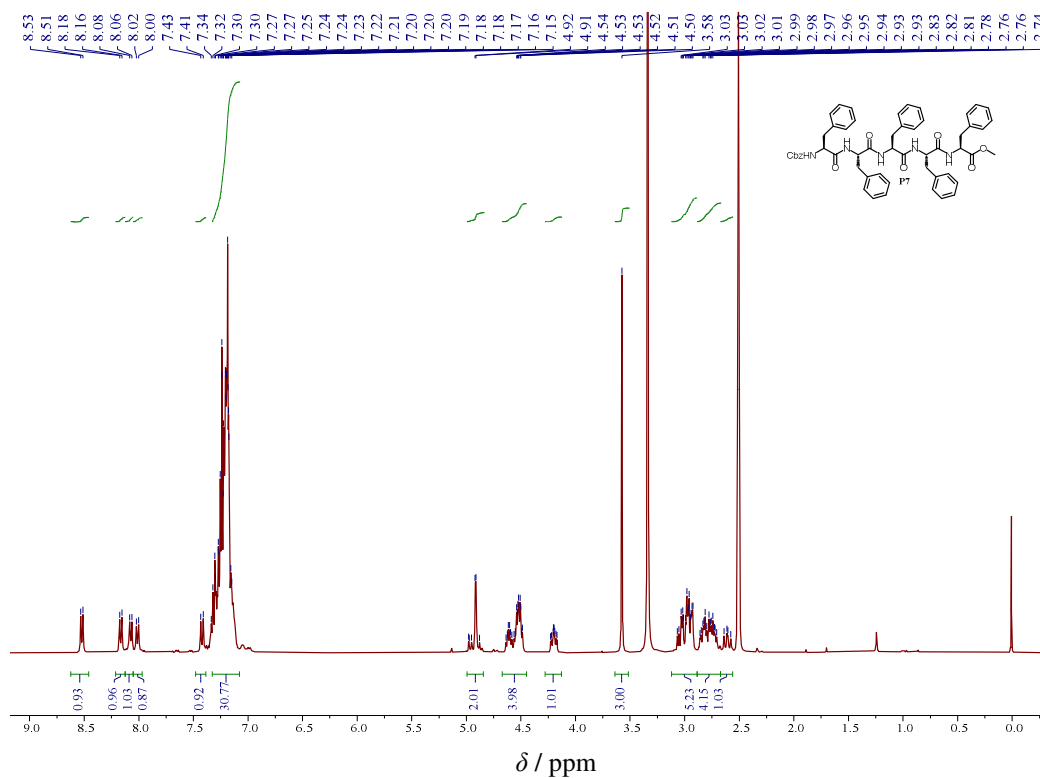
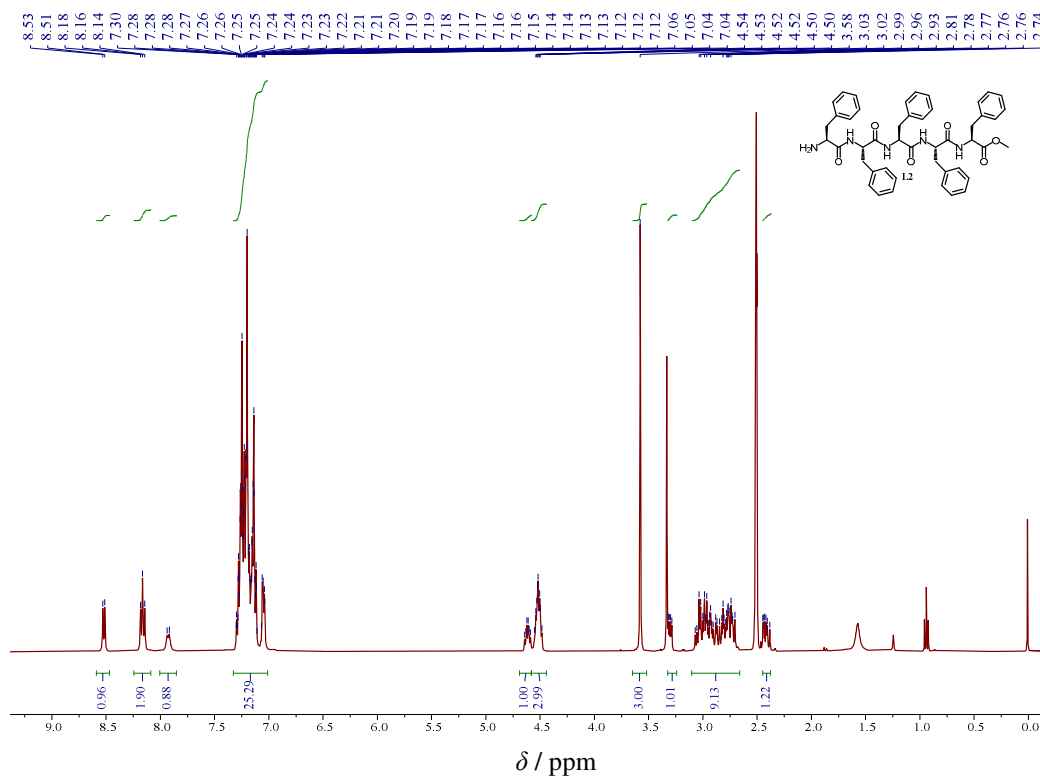
Slika D9. ^1H NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P6** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D10. ^{13}C NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P6** u $\text{DMSO-}d_6$.

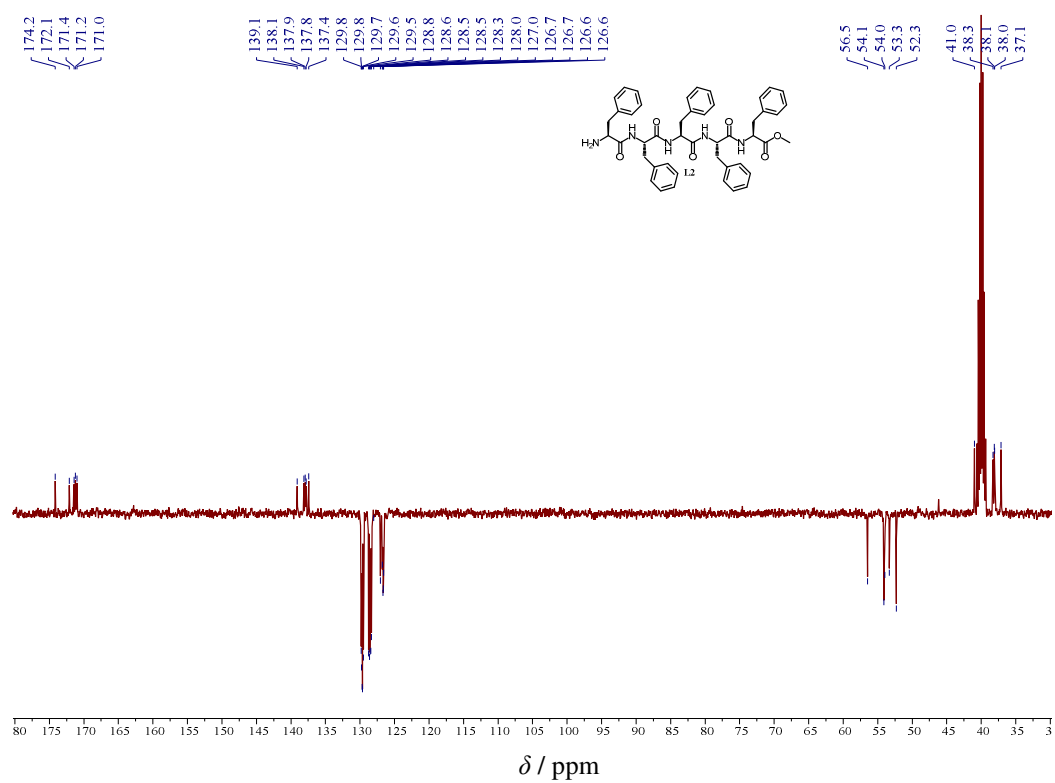
Slika D11. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P6**.

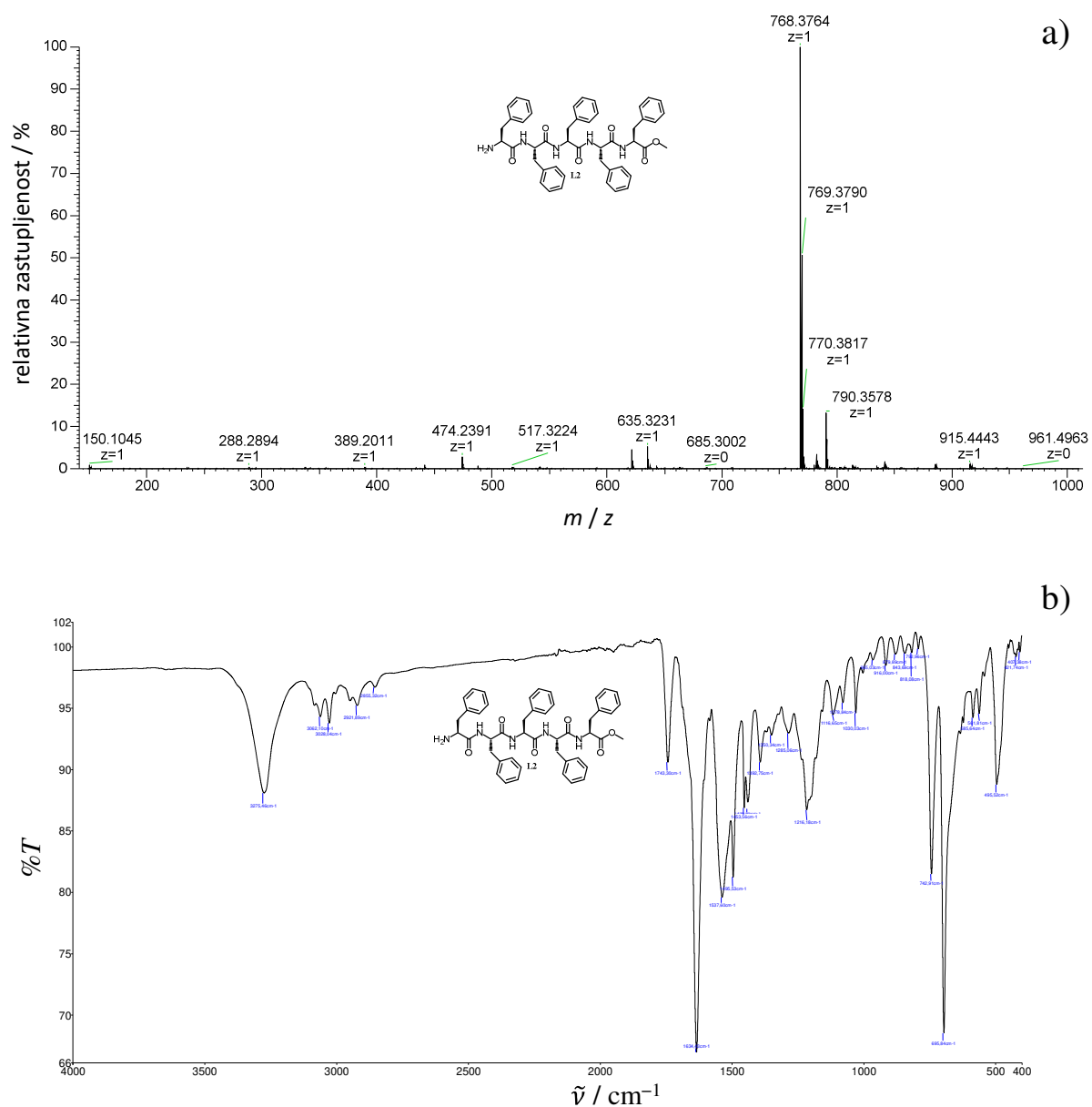
Slika D12. ^1H NMR spektar spoja C1 u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D13. ^{13}C NMR spektar spoja C1 u $\text{DMSO-}d_6$.

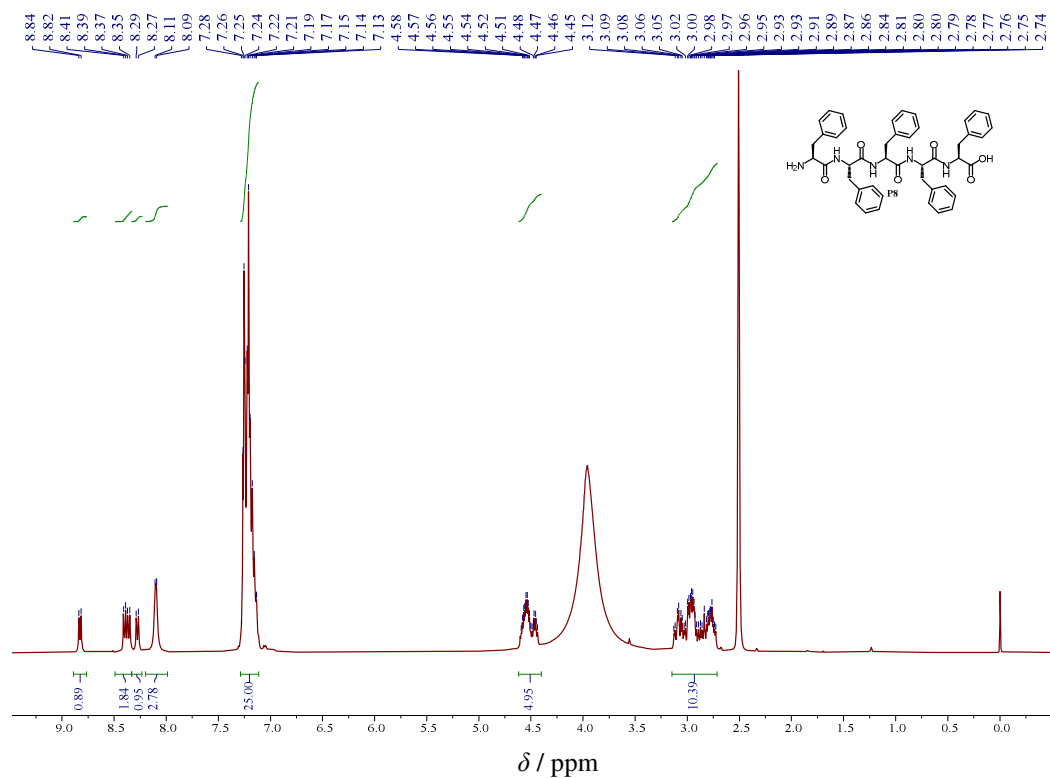
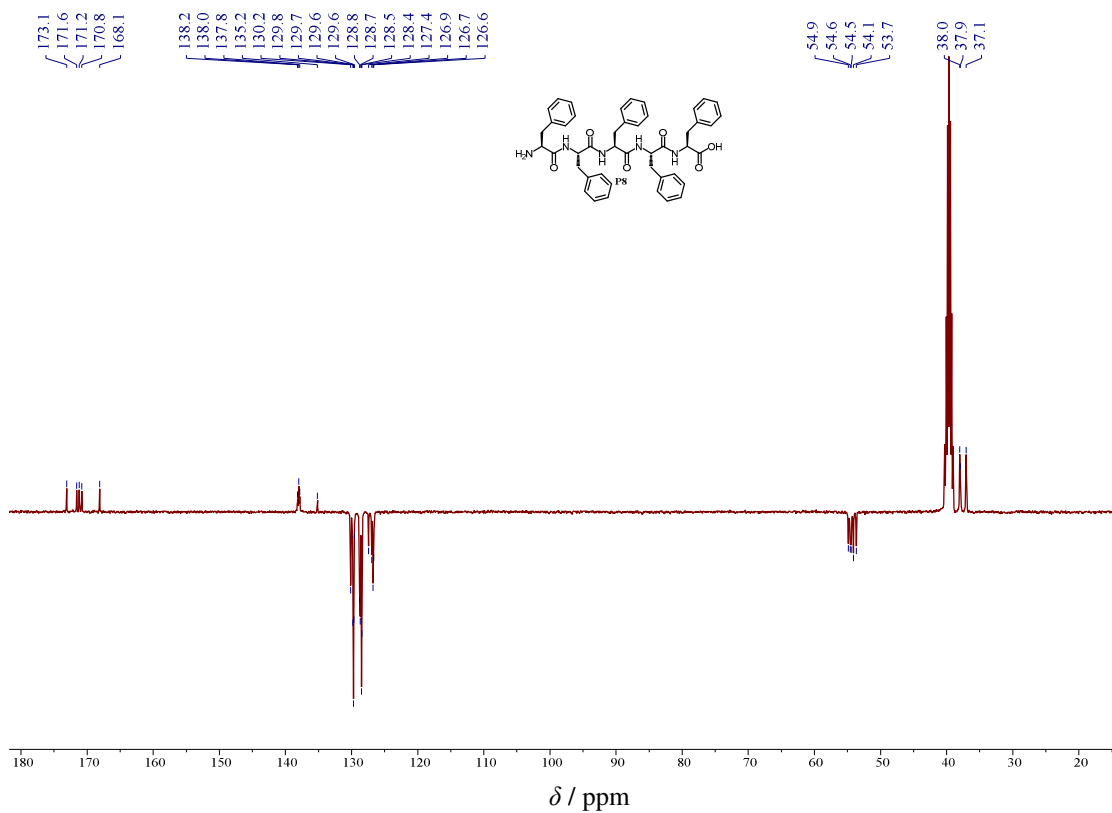
Slika D14. ^1H NMR spektar kompleksa C1Cl^- u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D15. ^{13}C NMR spektar kompleksa C1Cl^- u $\text{DMSO-}d_6$.

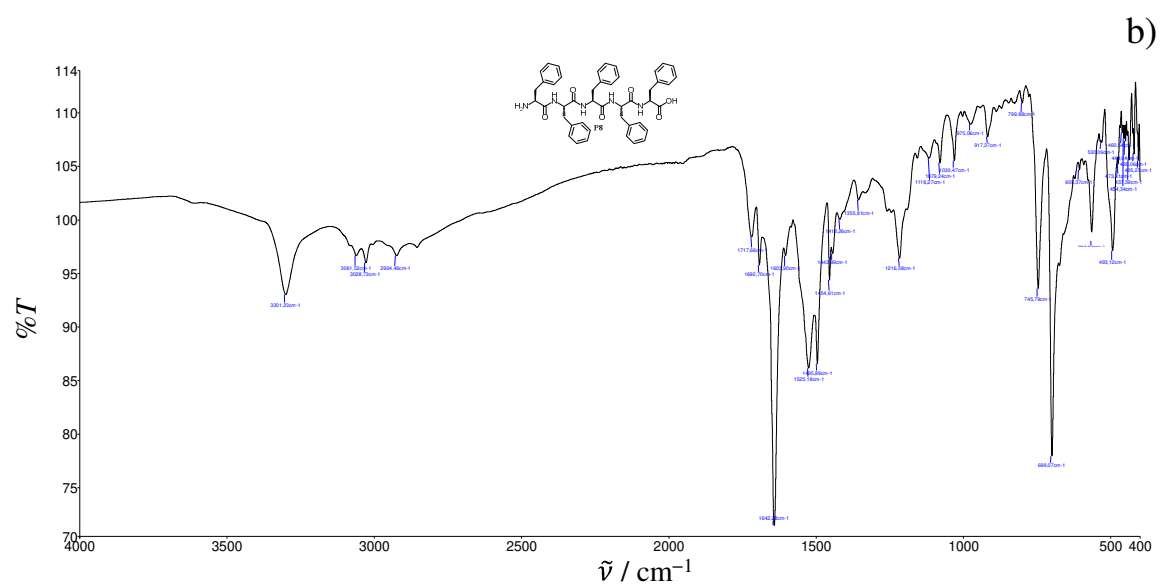
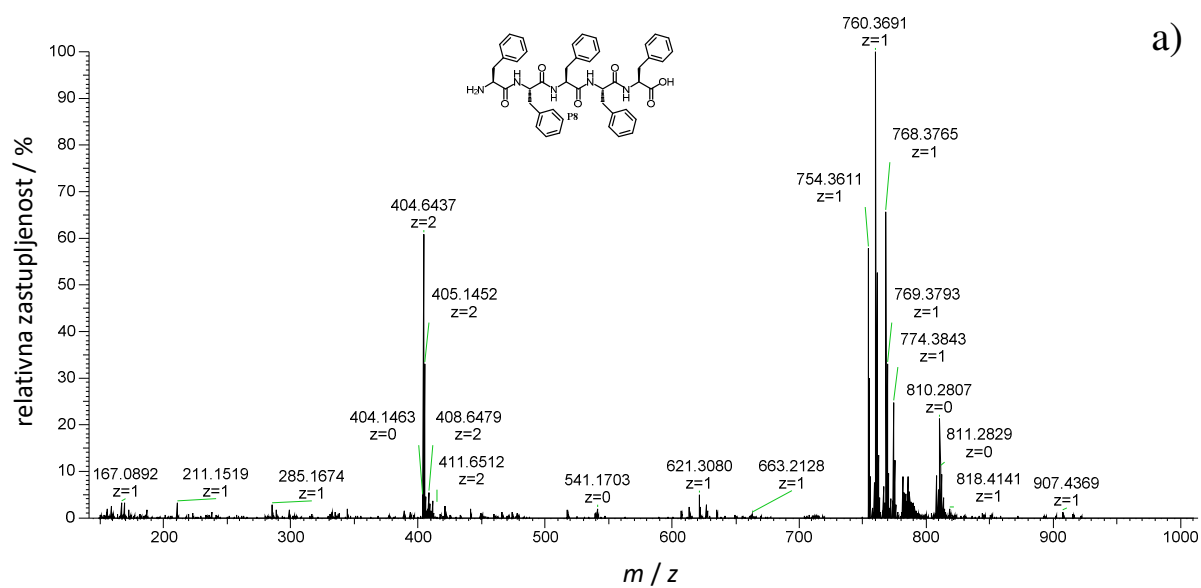
Slika D16. a) HRMS i b) IR spektar spoja **C1**.

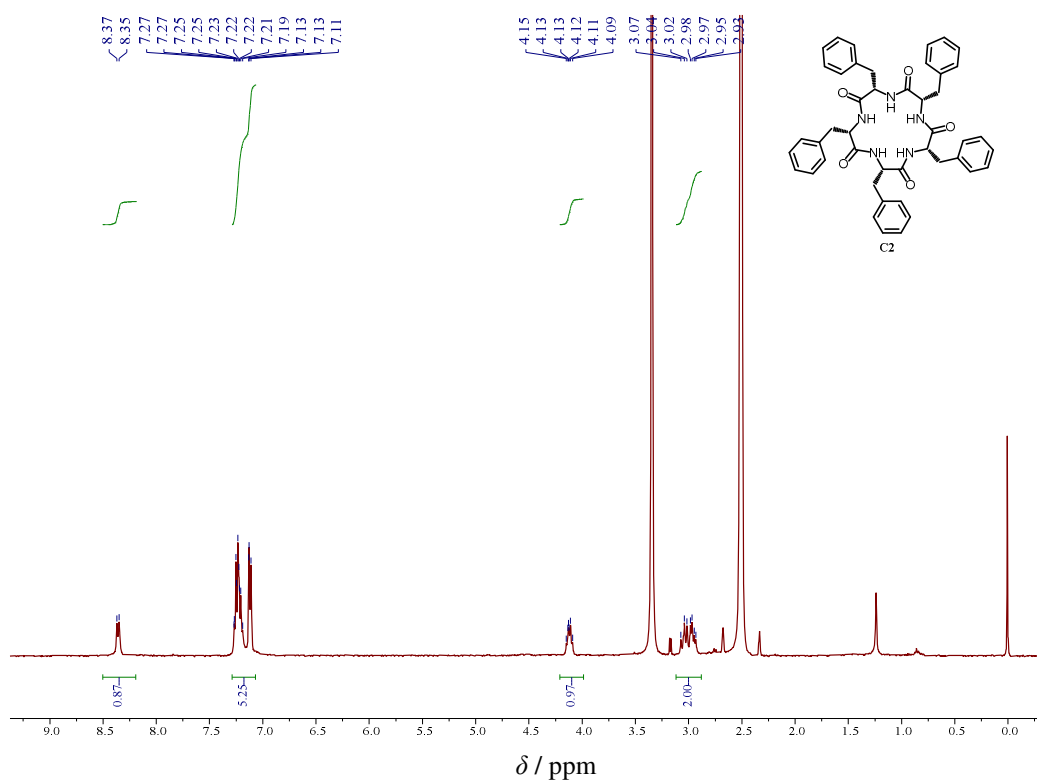
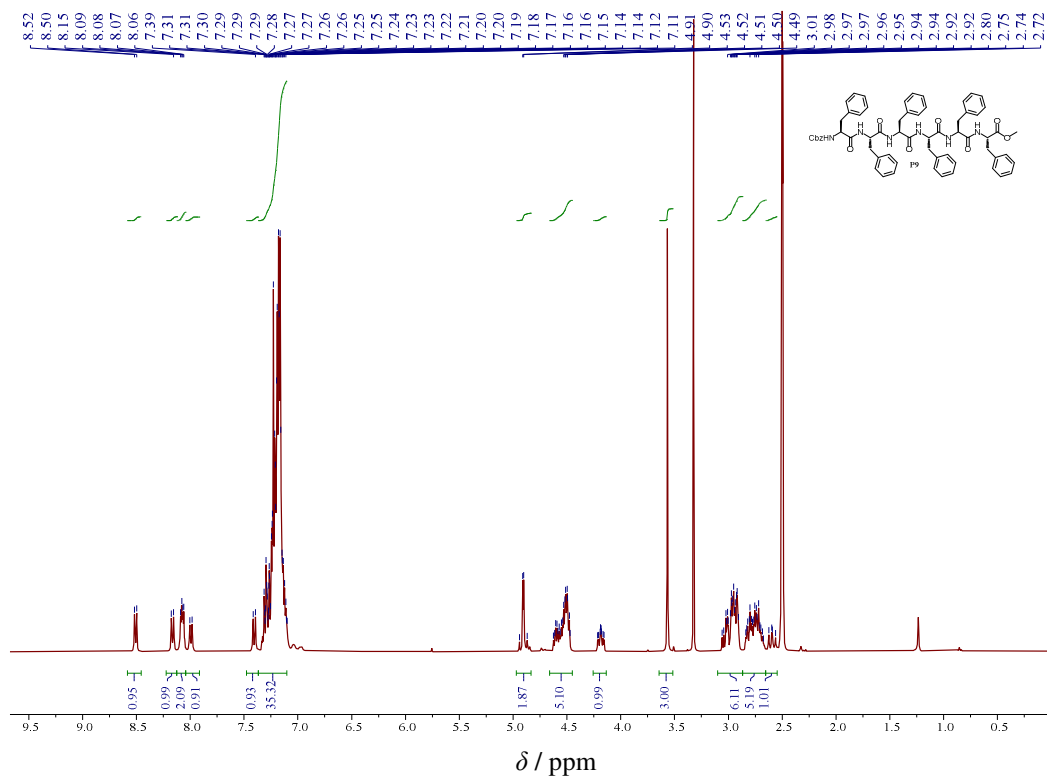
Slika D17. ^1H NMR spektar spoja **P7** u $\text{DMSO}-d_6$.Slika D18. ^1H NMR spektar spoja **L2** u $\text{DMSO}-d_6$.

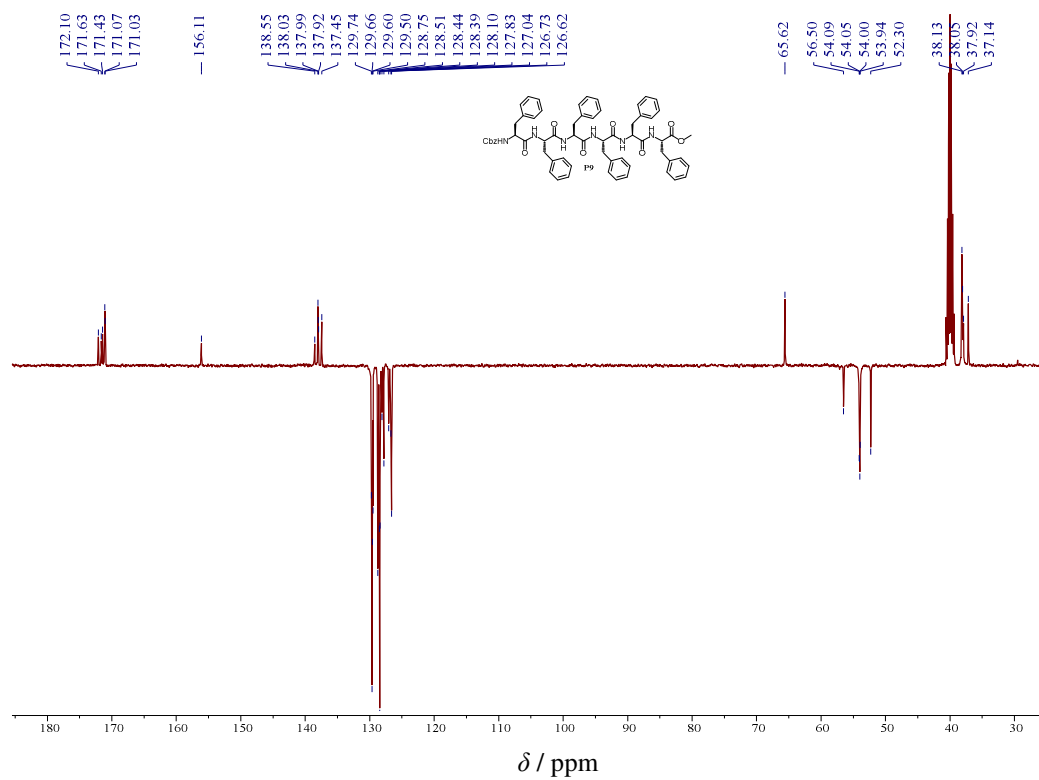
Slika D19. ^{13}C NMR spektar spoja **L2** u $\text{DMSO-}d_6$.

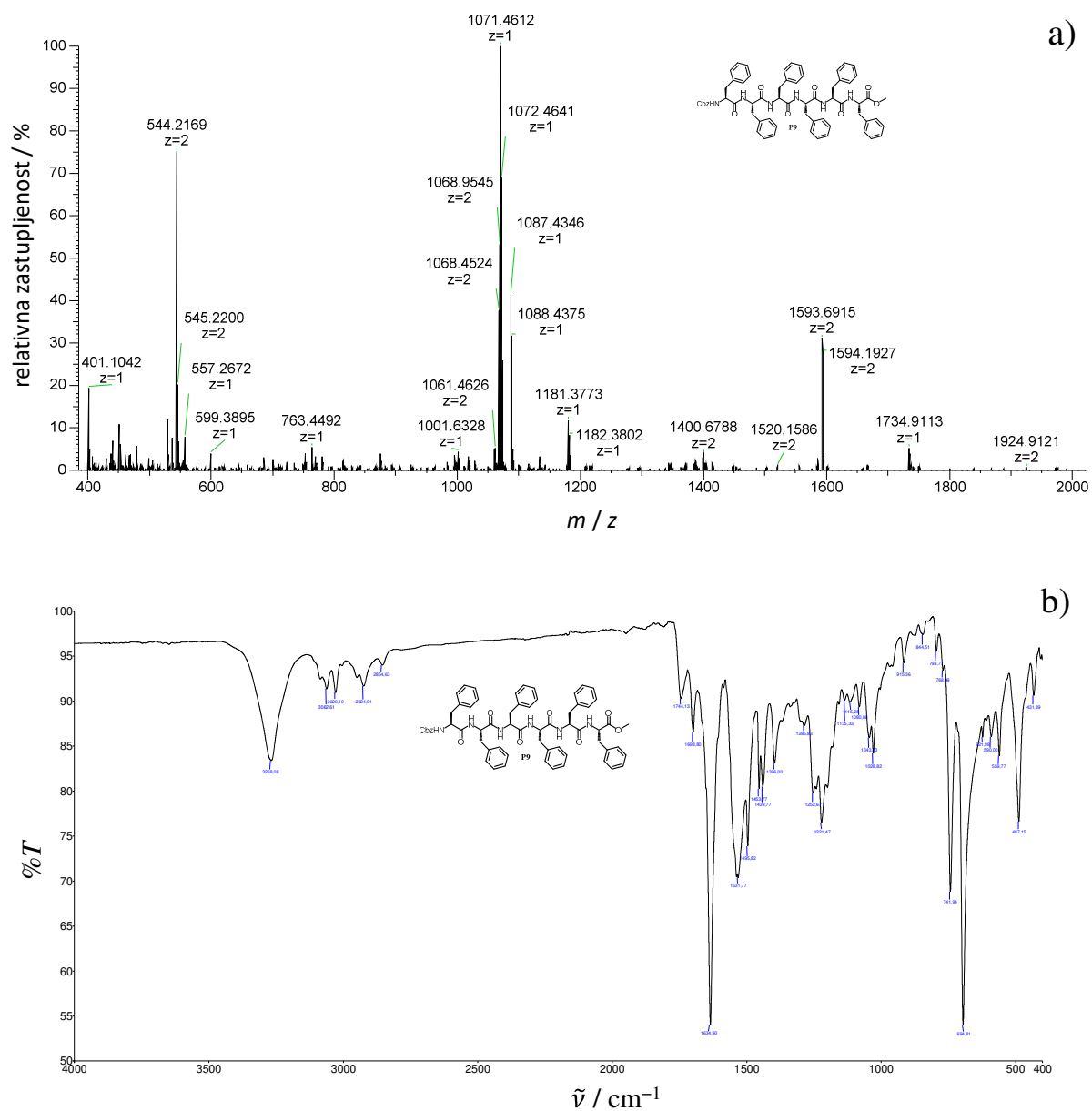


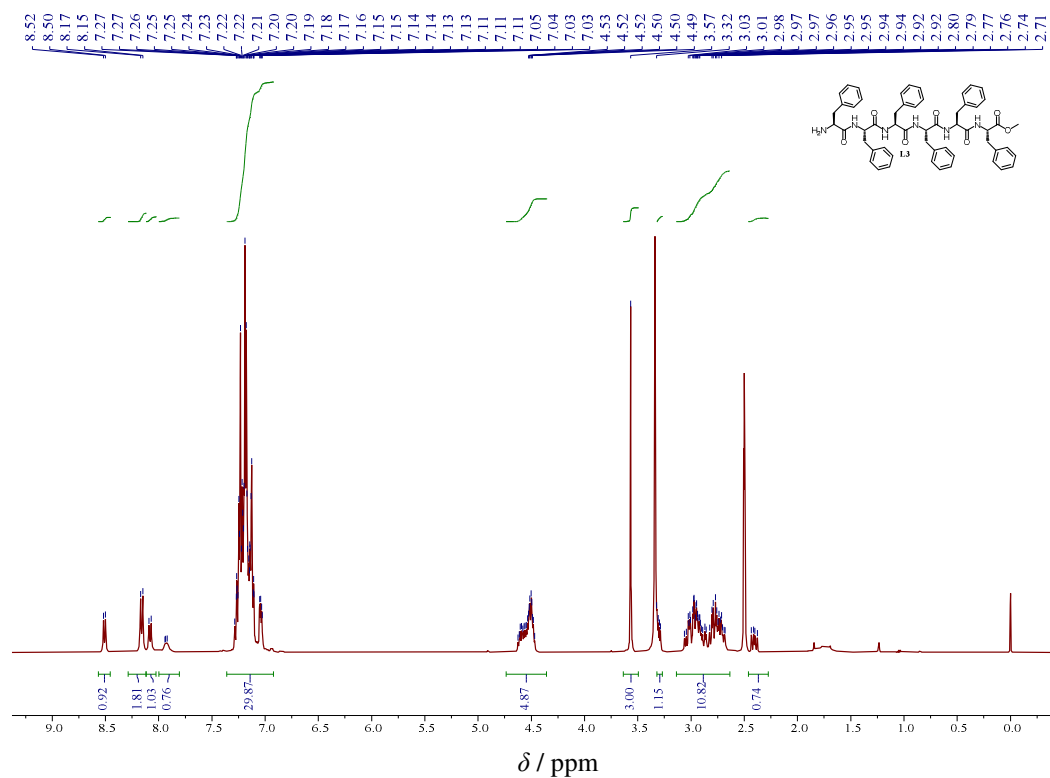
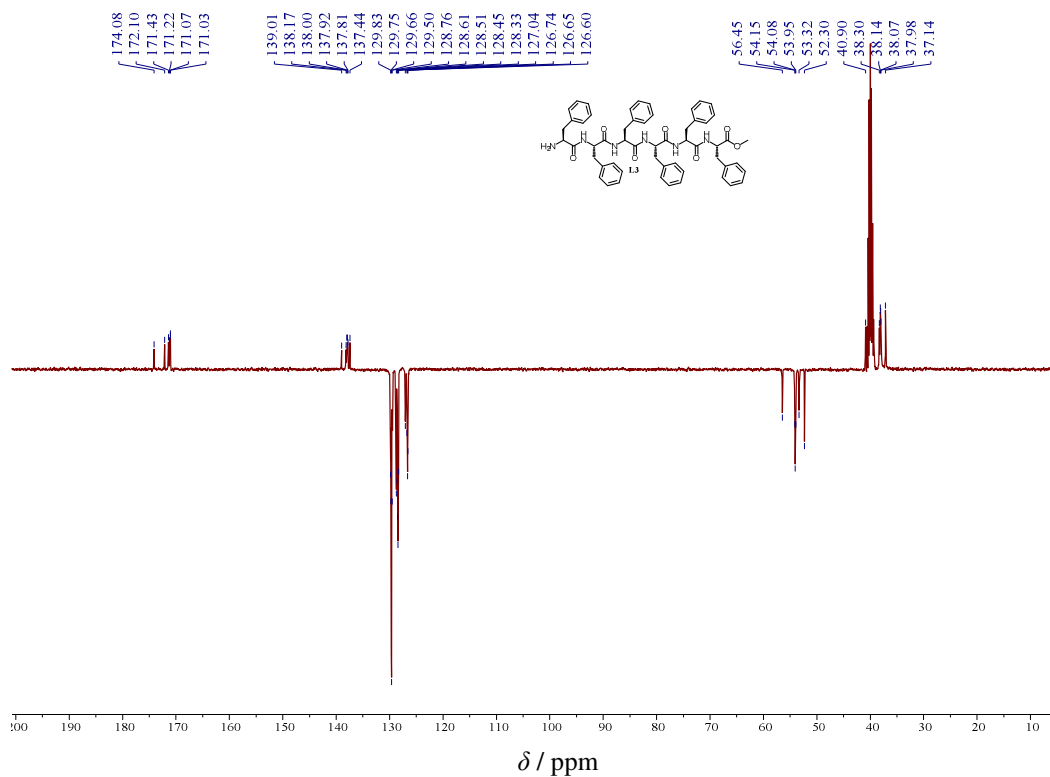
Slika D21. ^1H NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P8** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D22. ^{13}C NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P8** u $\text{DMSO-}d_6$.

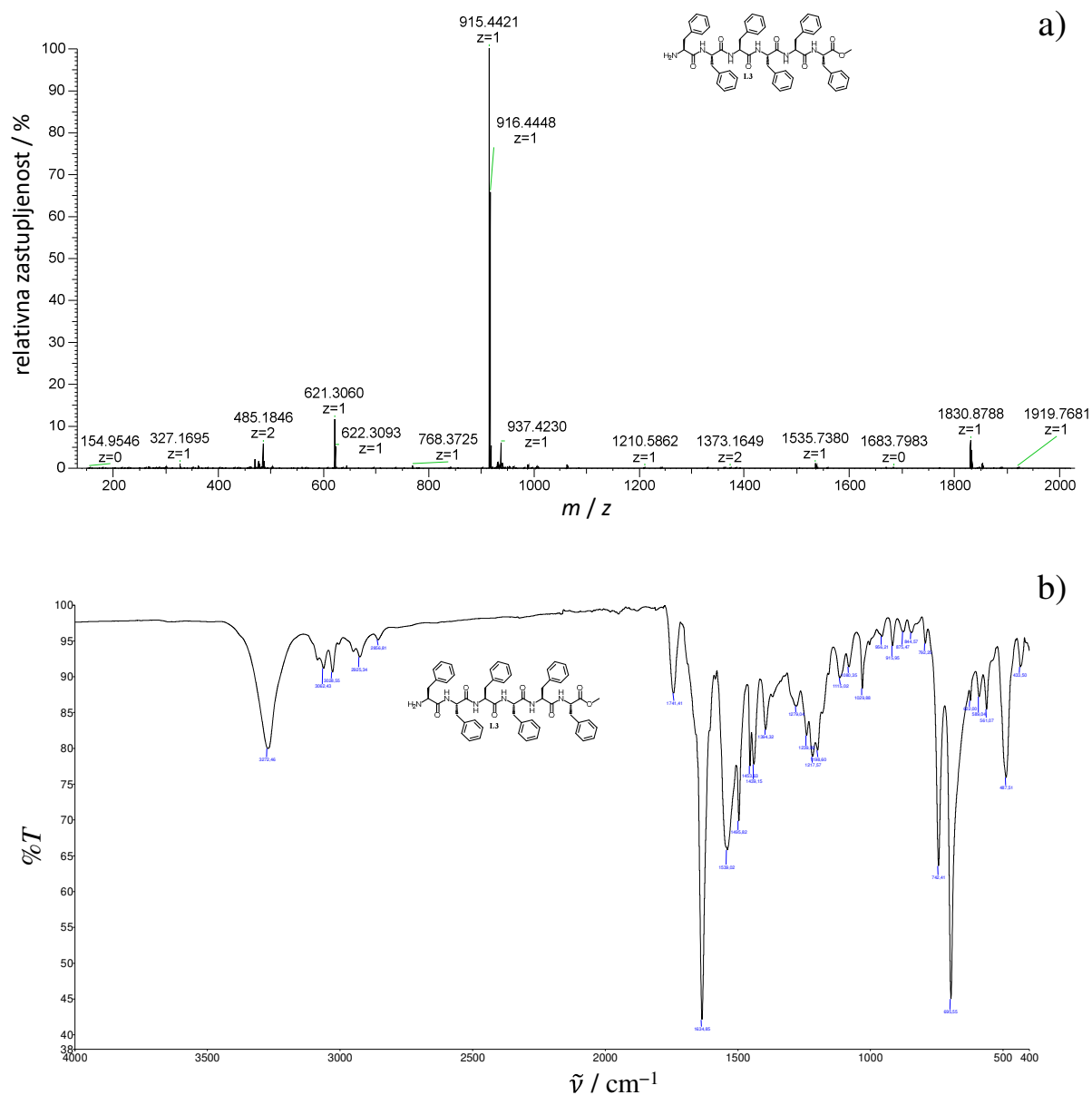
Slika D23. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P8**.

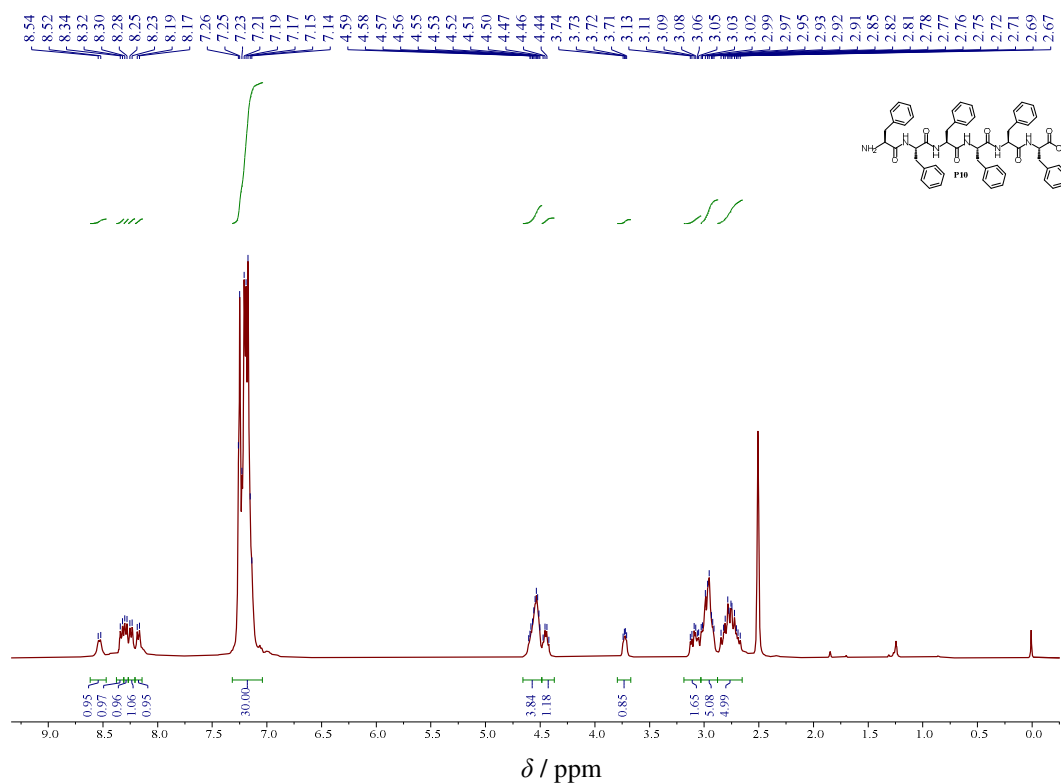
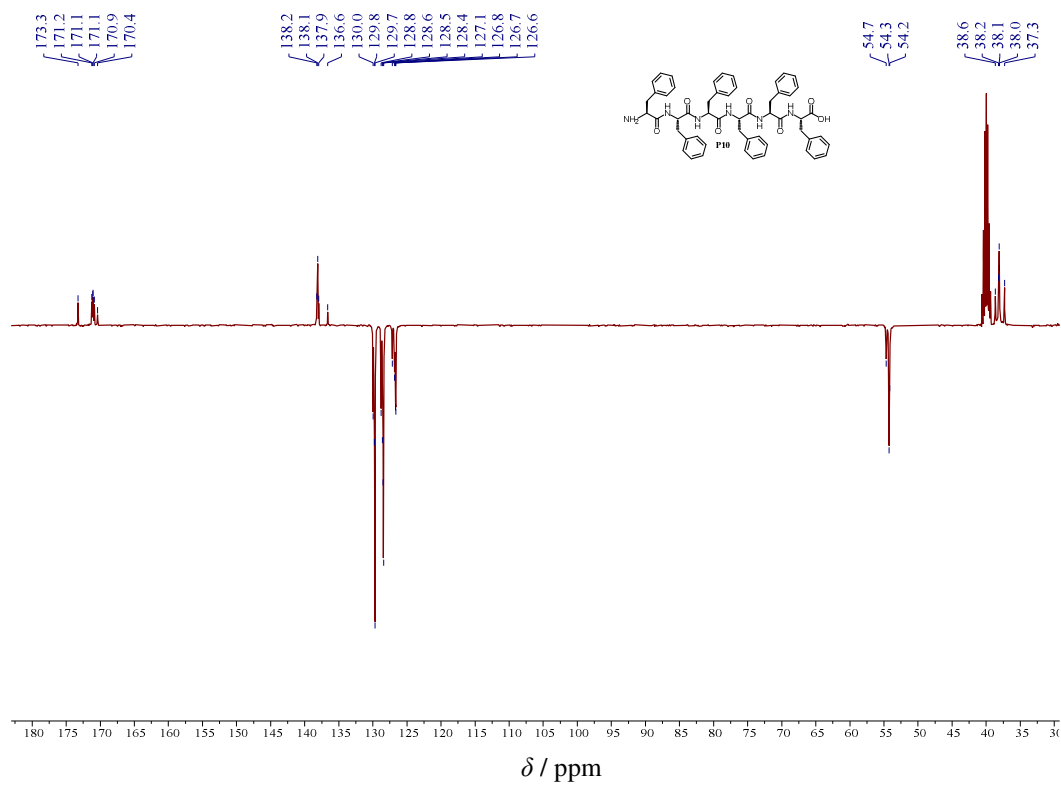
Slika D24. ^1H NMR spektar spoja **C2** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D25. ^1H NMR spektar spoja **P9** u $\text{DMSO-}d_6$.

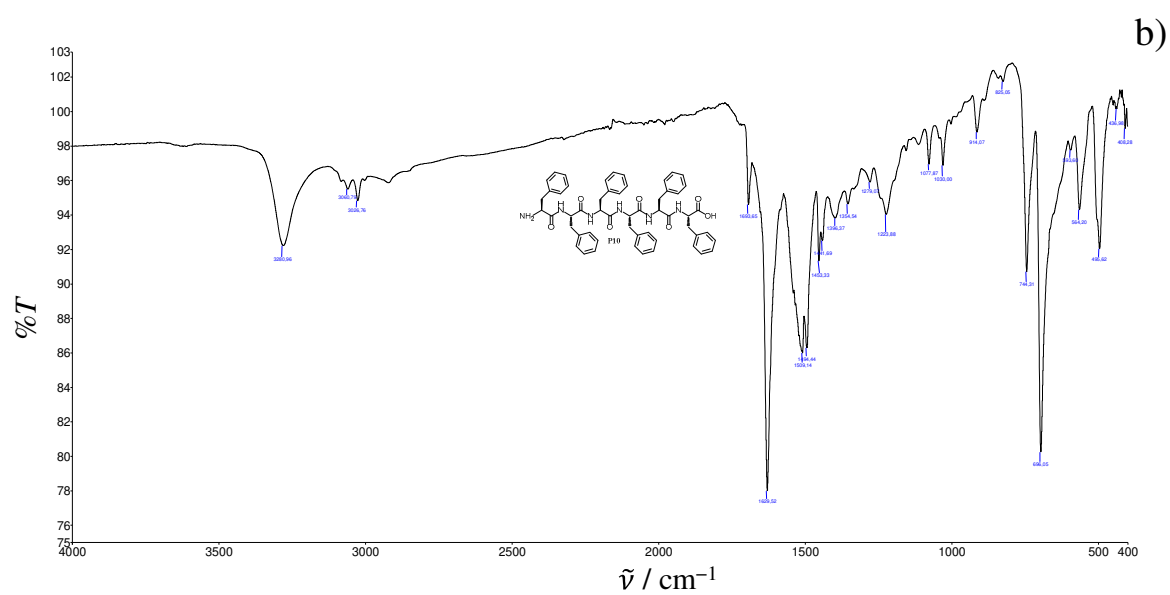
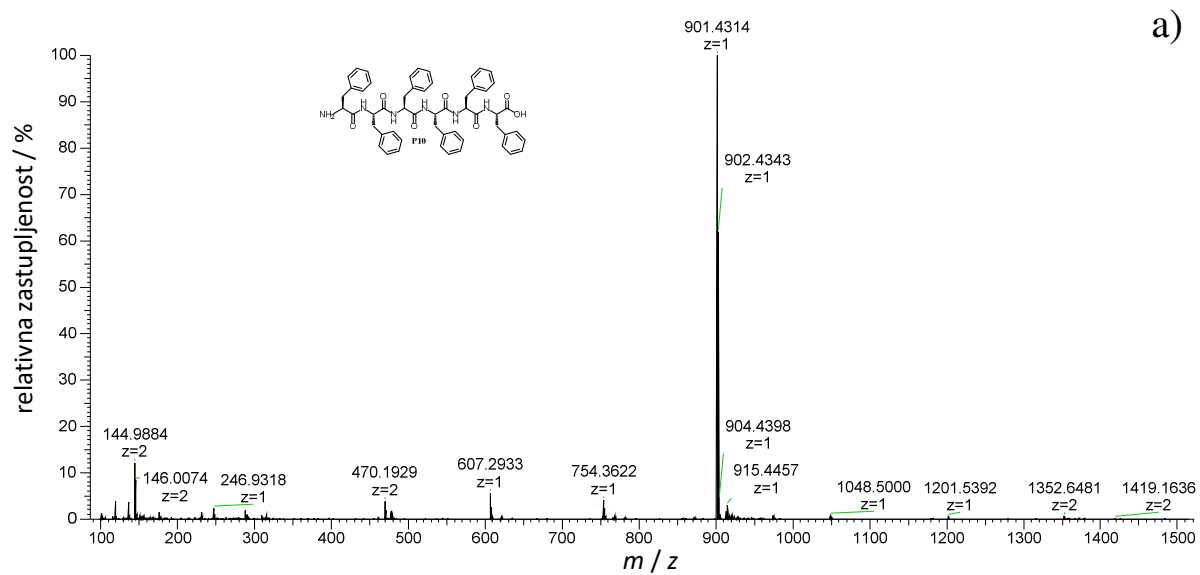
Slika D26. ^1H NMR spektar spoja **P9** u $\text{DMSO-}d_6$.

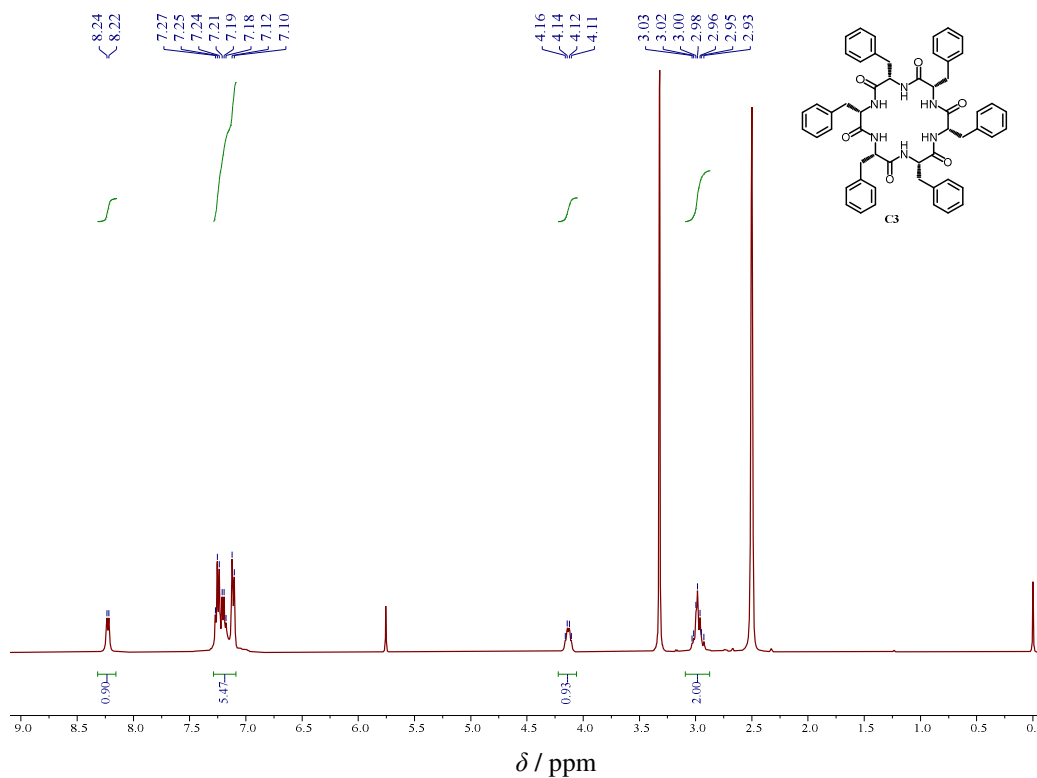
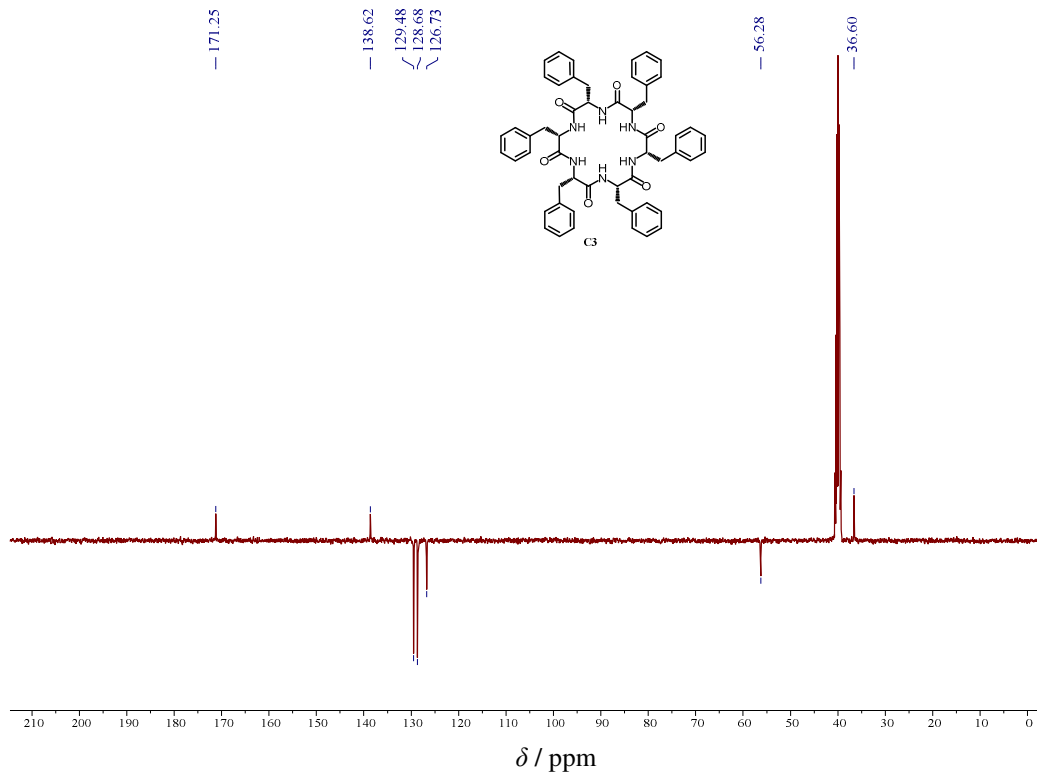
Slika D27. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P9**.

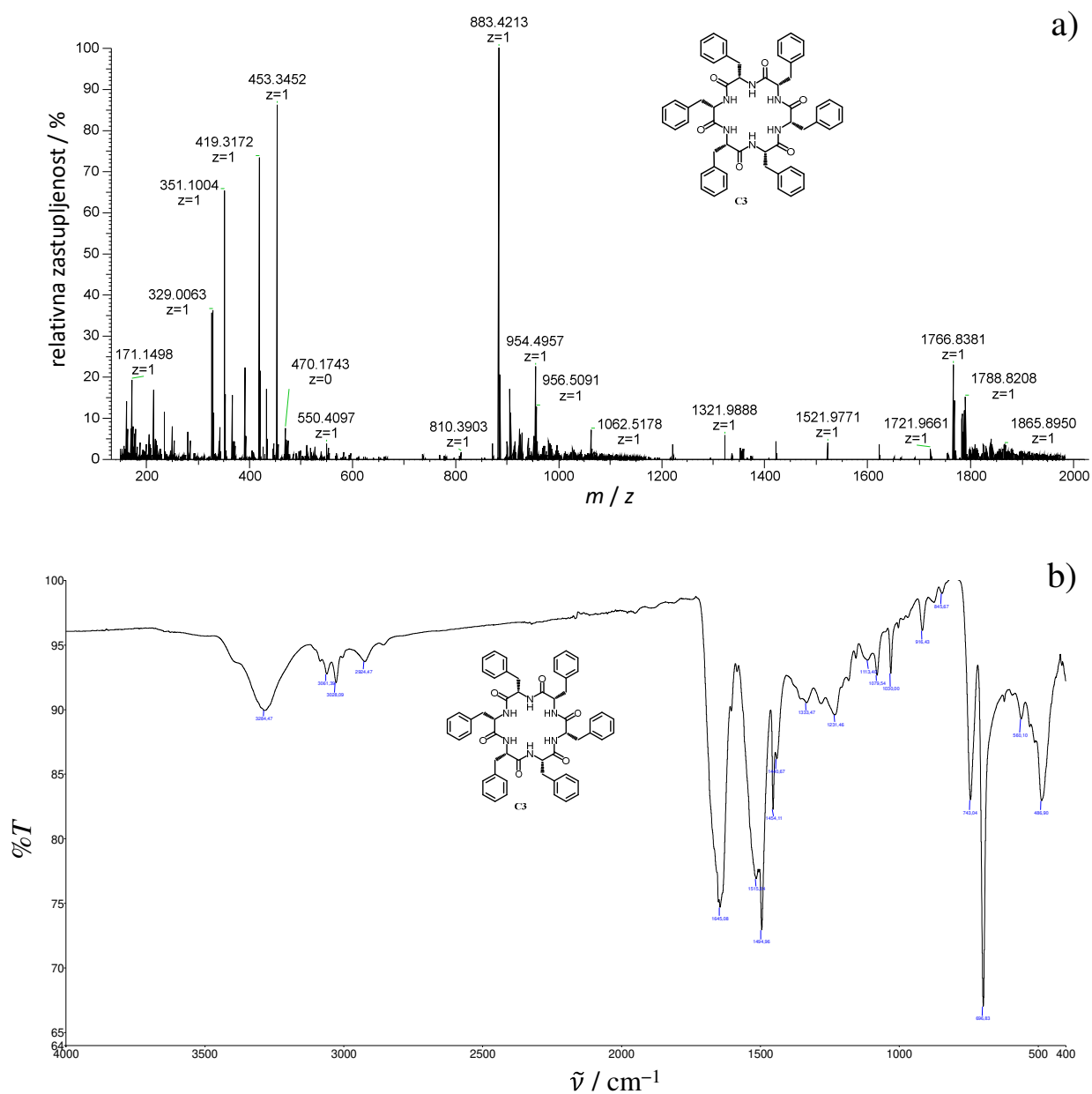
Slika D28. ^1H NMR spektar spoja **L3** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D29. ^{13}C NMR spektar spoja **L3** u $\text{DMSO-}d_6$.

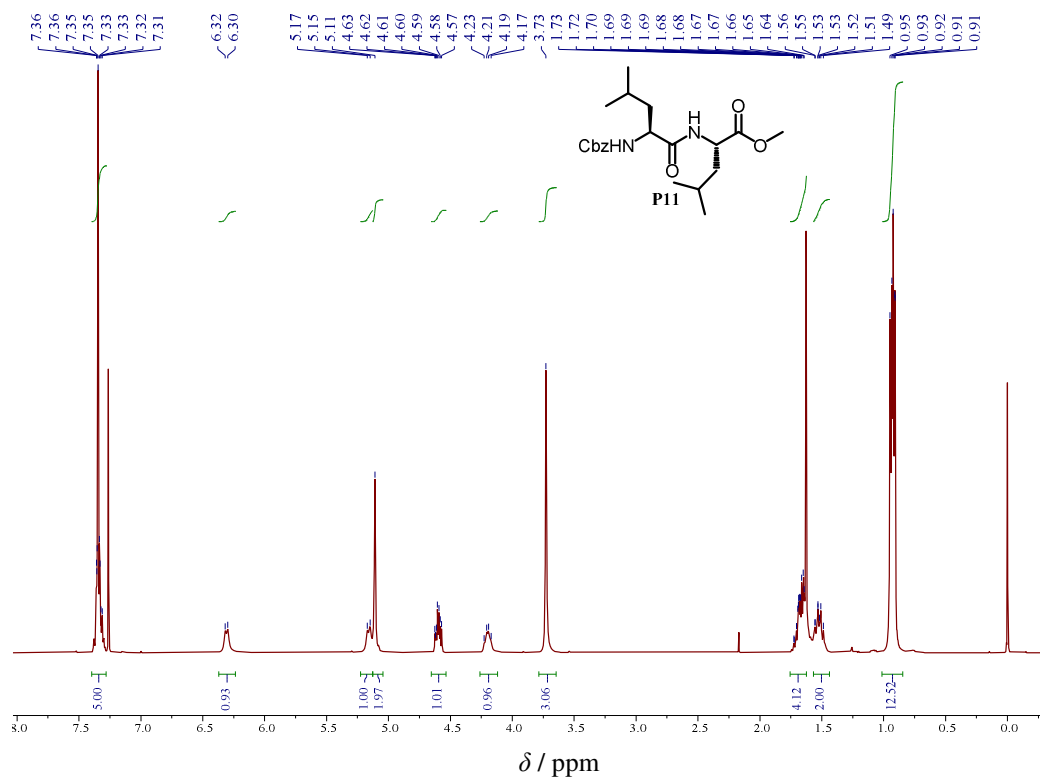
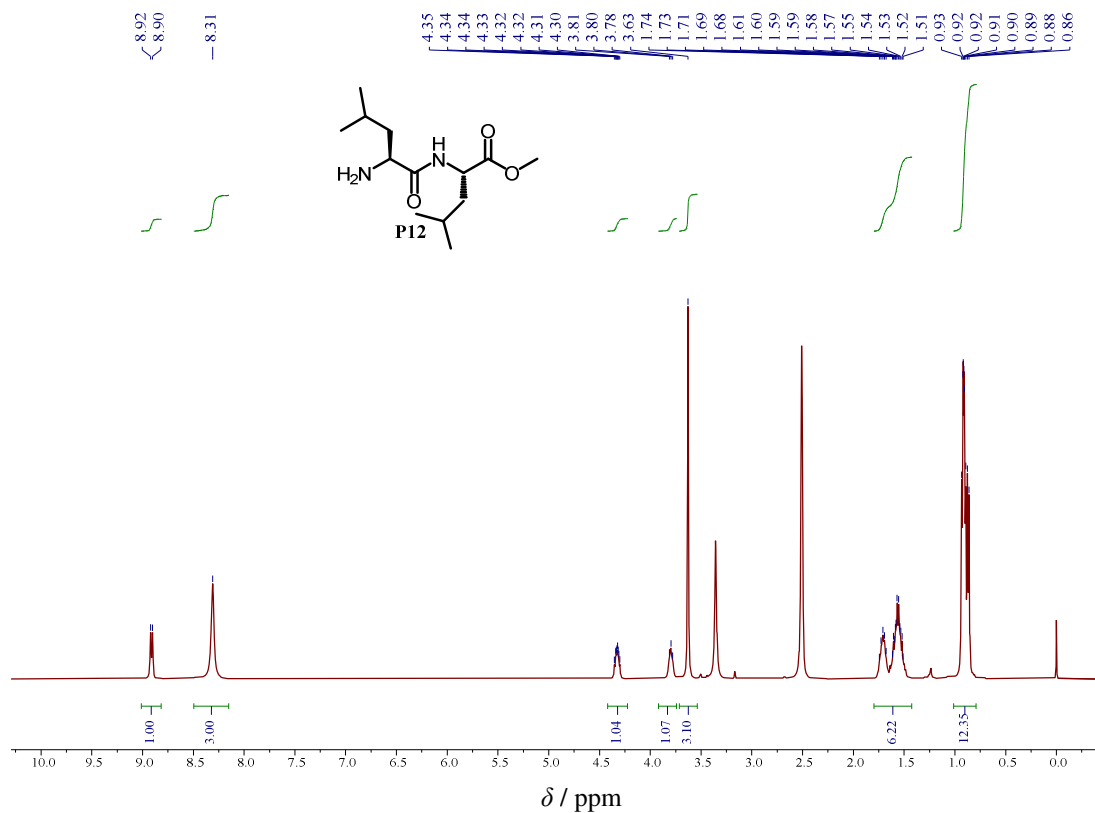


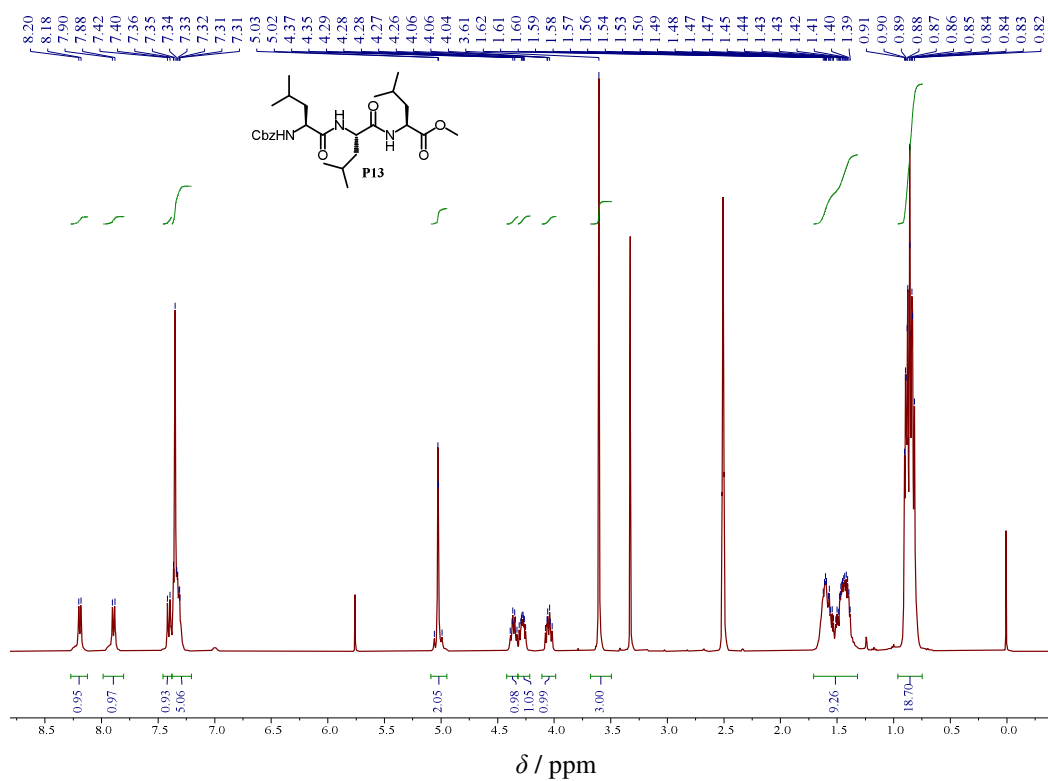
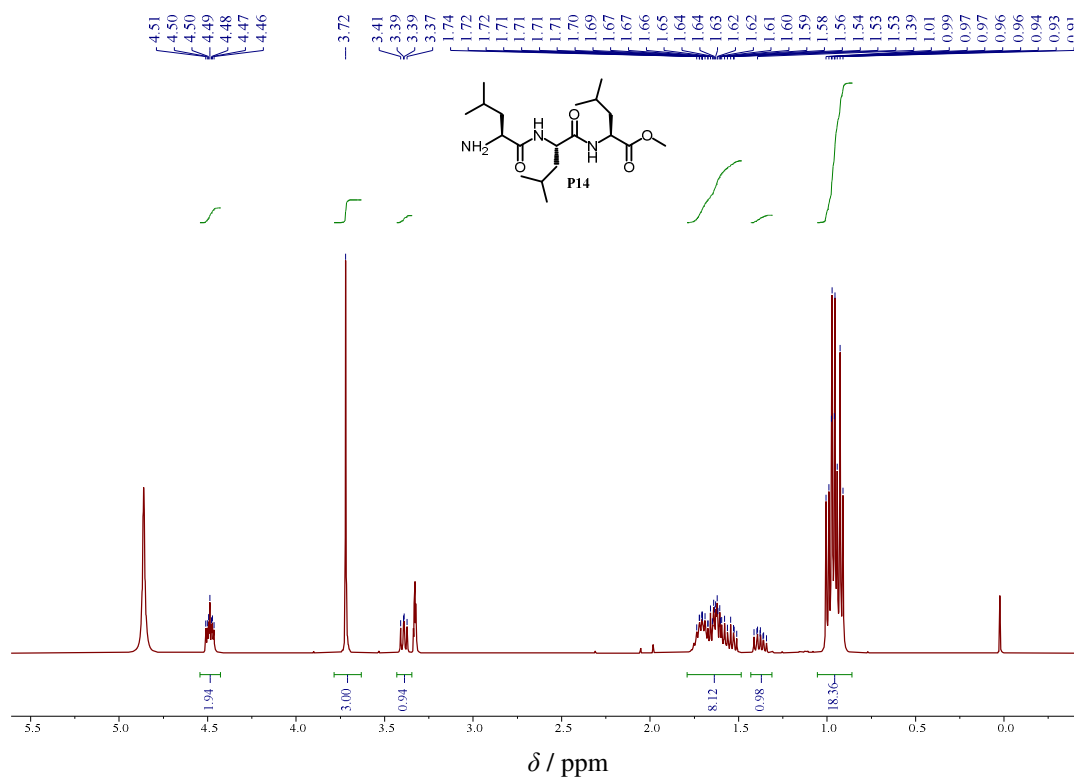
Slika D31. ^1H NMR spektar spoja **P10** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D32. ^{13}C NMR spektar spoja **P10** u $\text{DMSO-}d_6$.

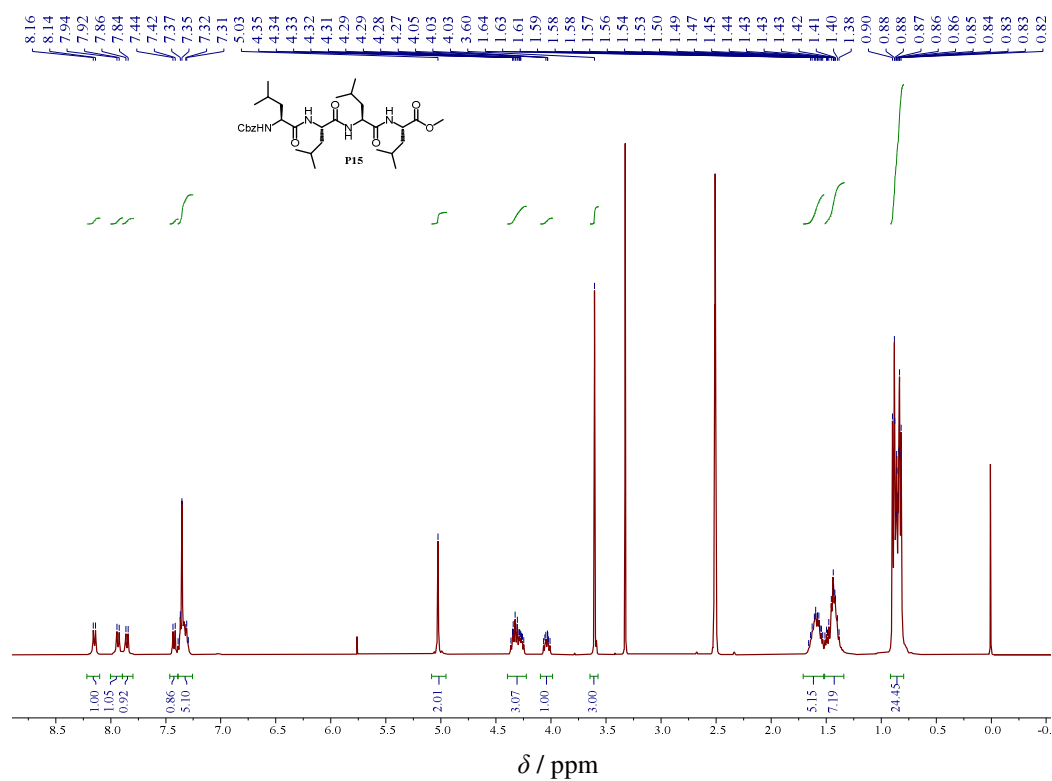
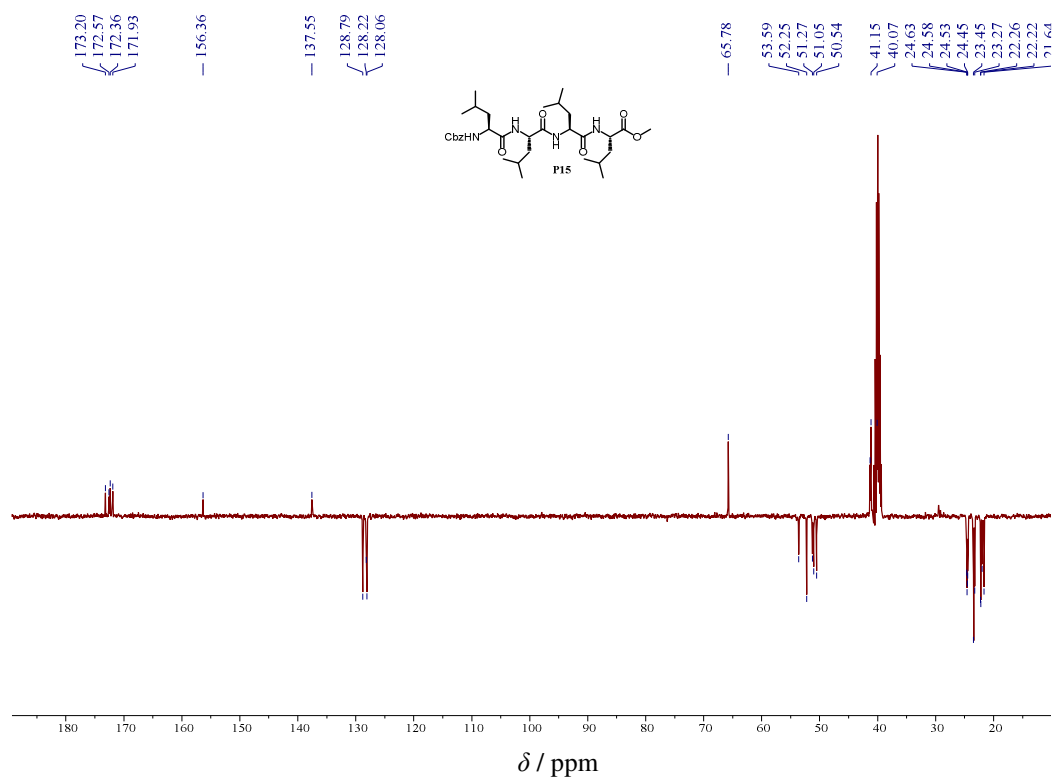
Slika D33. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P10**.

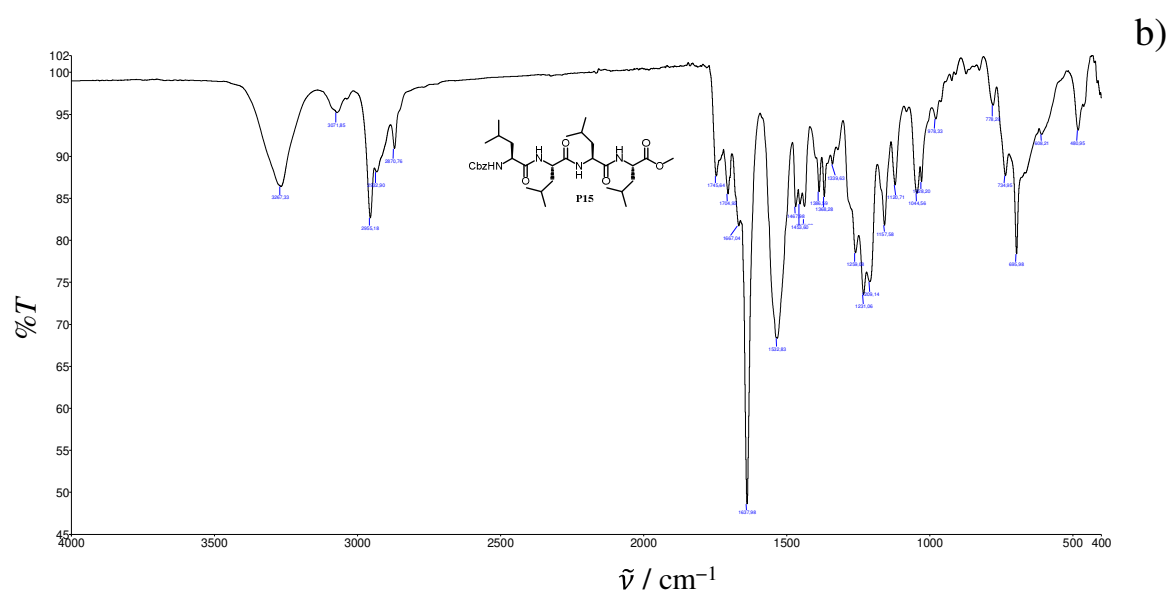
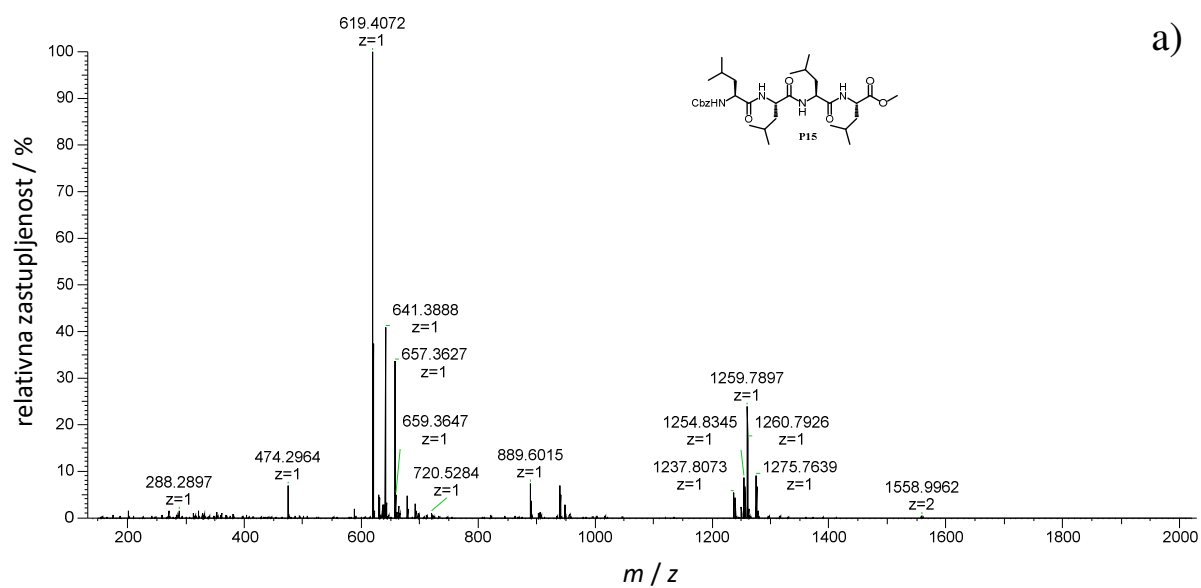
Slika D34. ¹H NMR spektar spoja **C3** u DMSO-*d*₆.Slika D35. ¹³C NMR spektar spoja **C3** u DMSO-*d*₆.

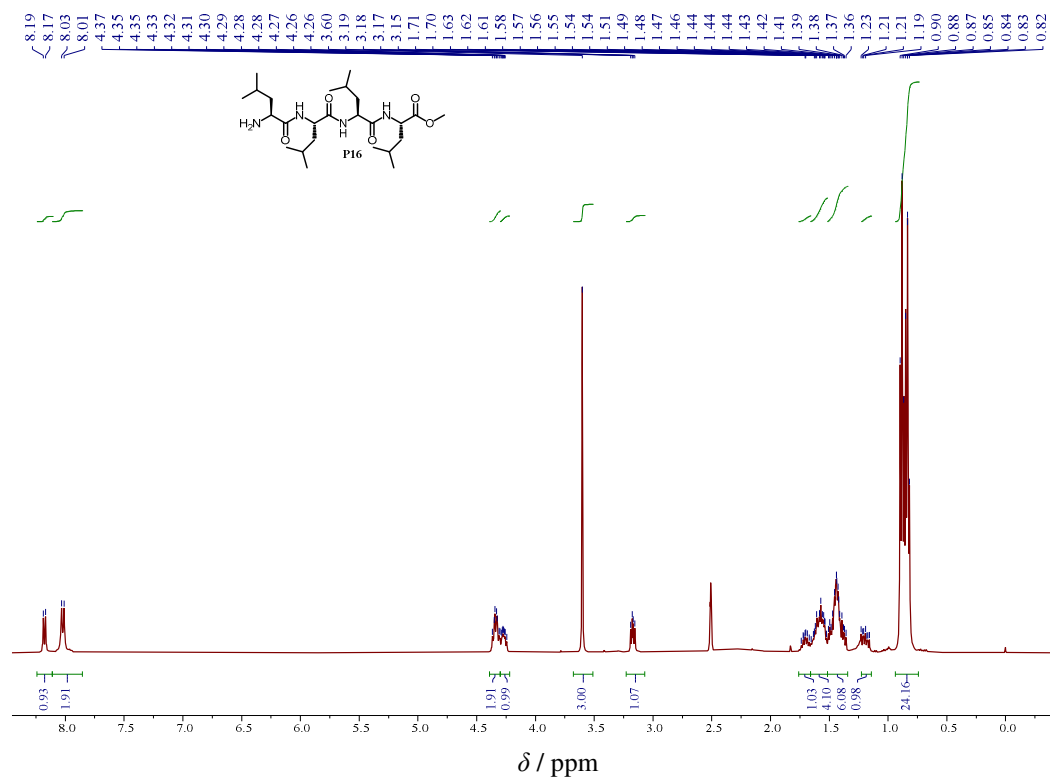
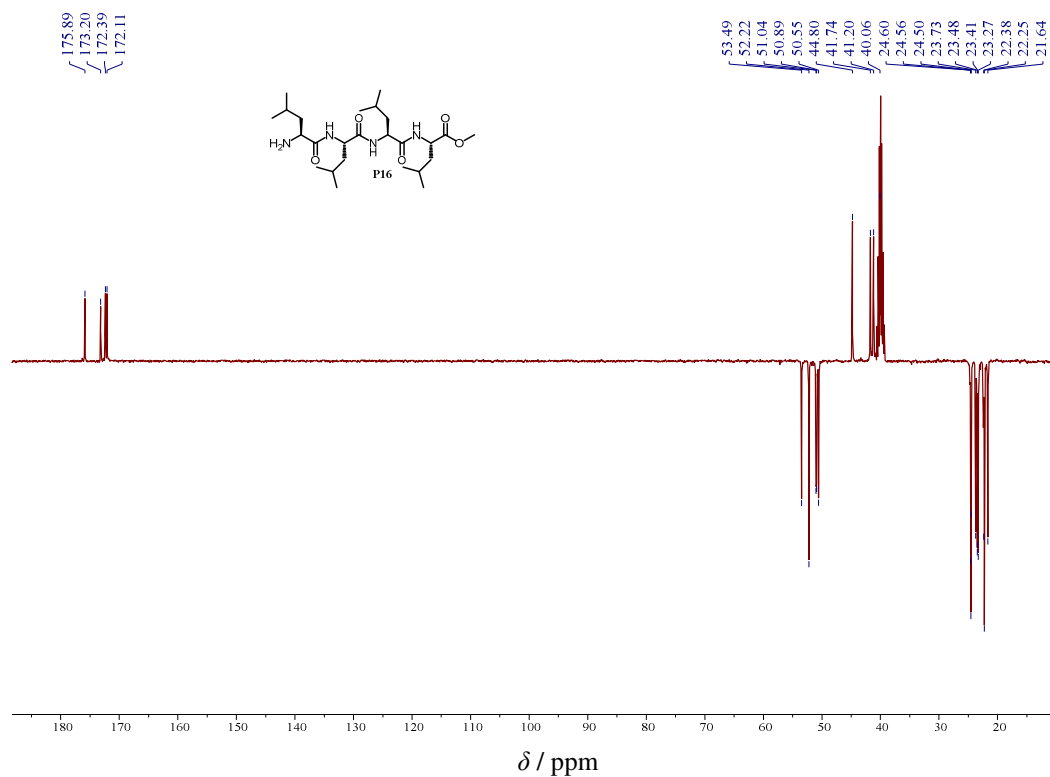
Slika D36. a) HRMS i b) IR spektar spoja **C3**.

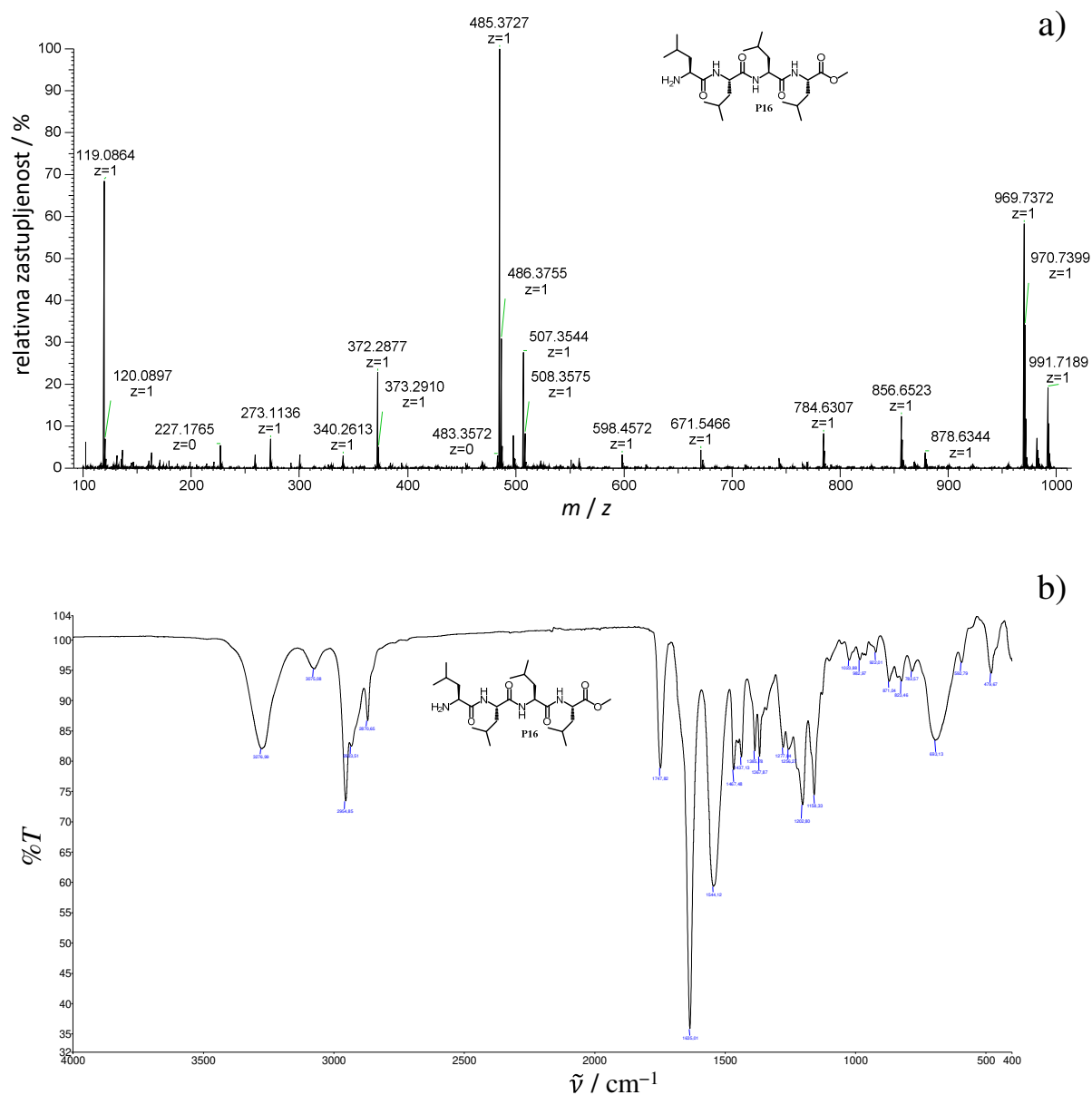
Slika D37. ^1H NMR spektar spoja **P11** u CDCl_3-d_1 .Slika D38. ^1H NMR spektar spoja **P12** u $\text{DMSO}-d_6$.

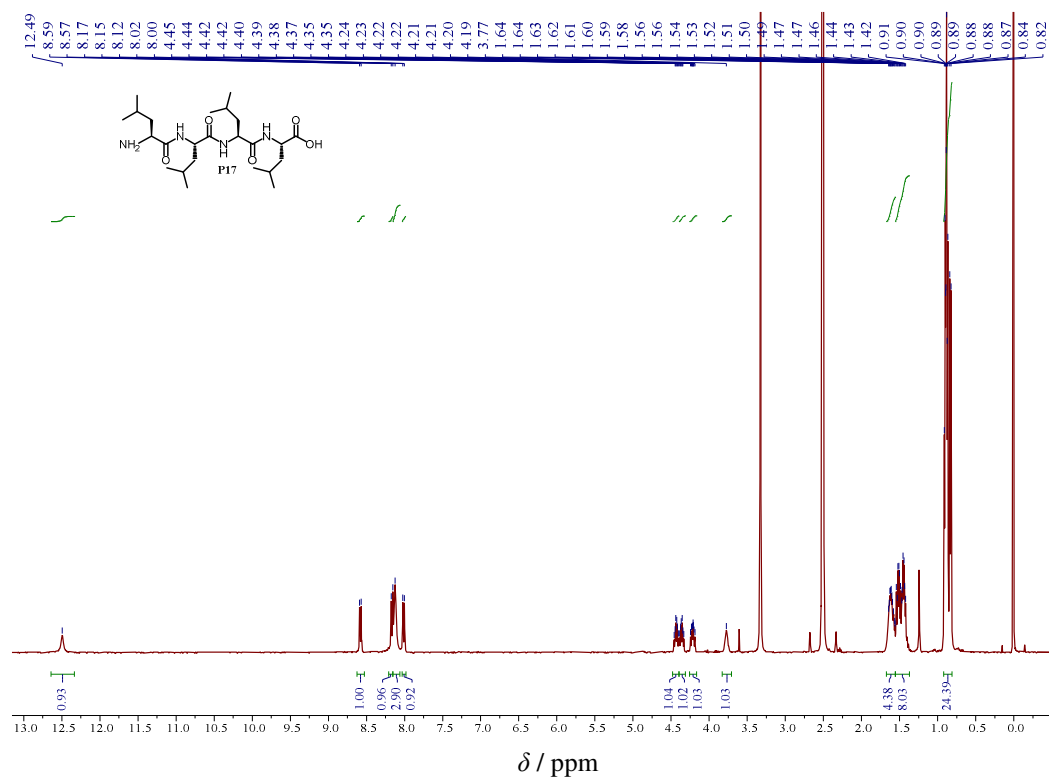
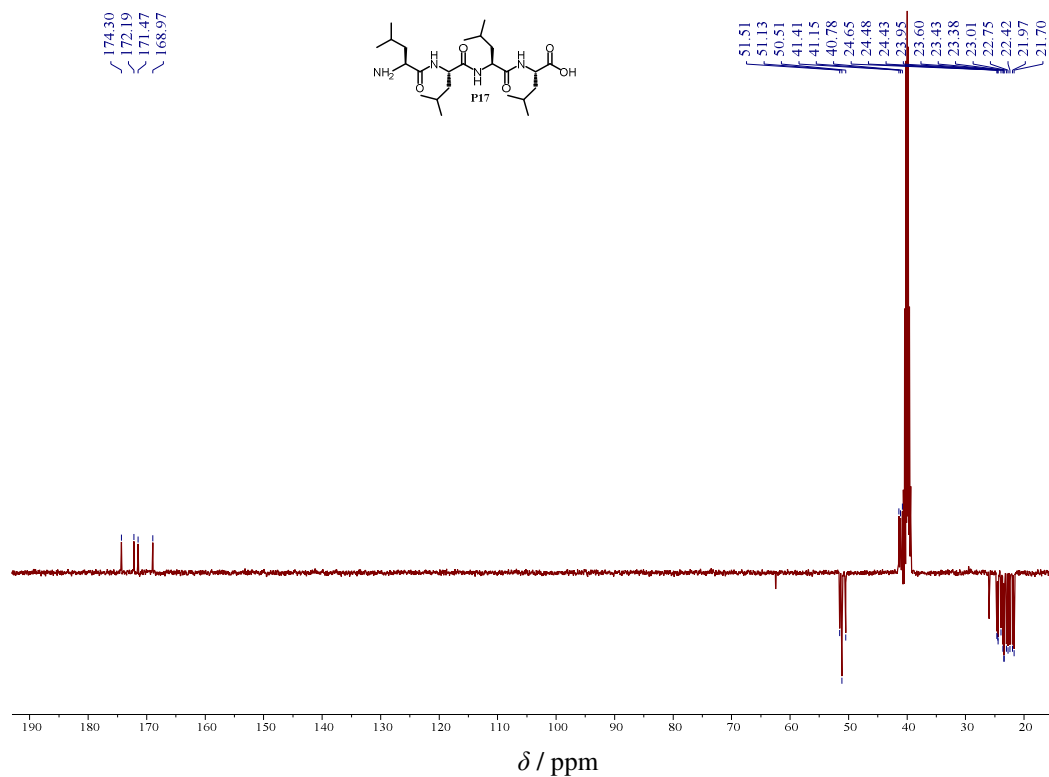
Slika D39. ^1H NMR spektar spoja P13 u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D40. ^1H NMR spektar spoja P14 u $\text{MeOD-}d_4$.

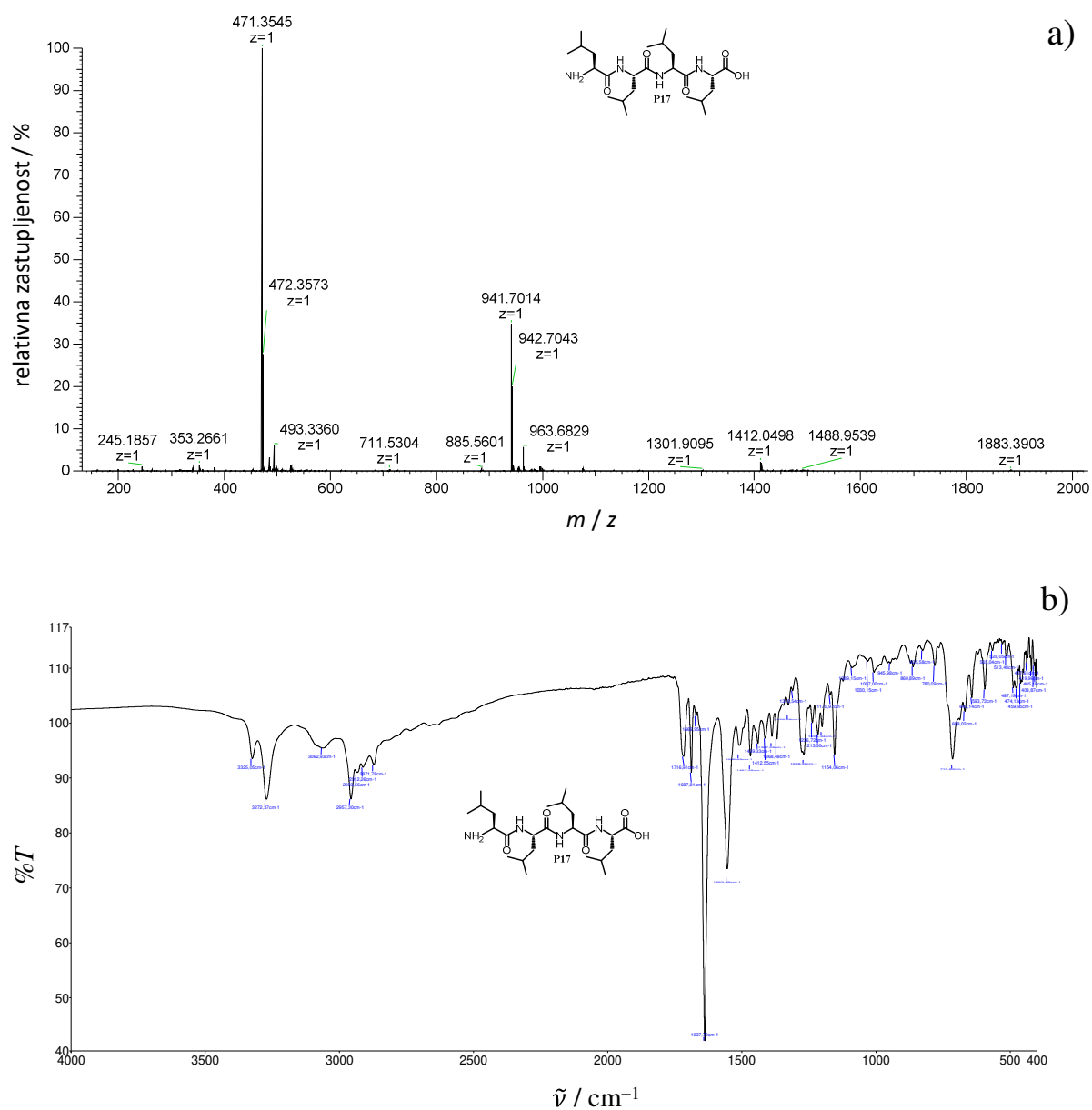
Slika D41. ^1H NMR spektar spoja **P15** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D42. ^{13}C NMR spektar spoja **P15** u $\text{DMSO-}d_6$.

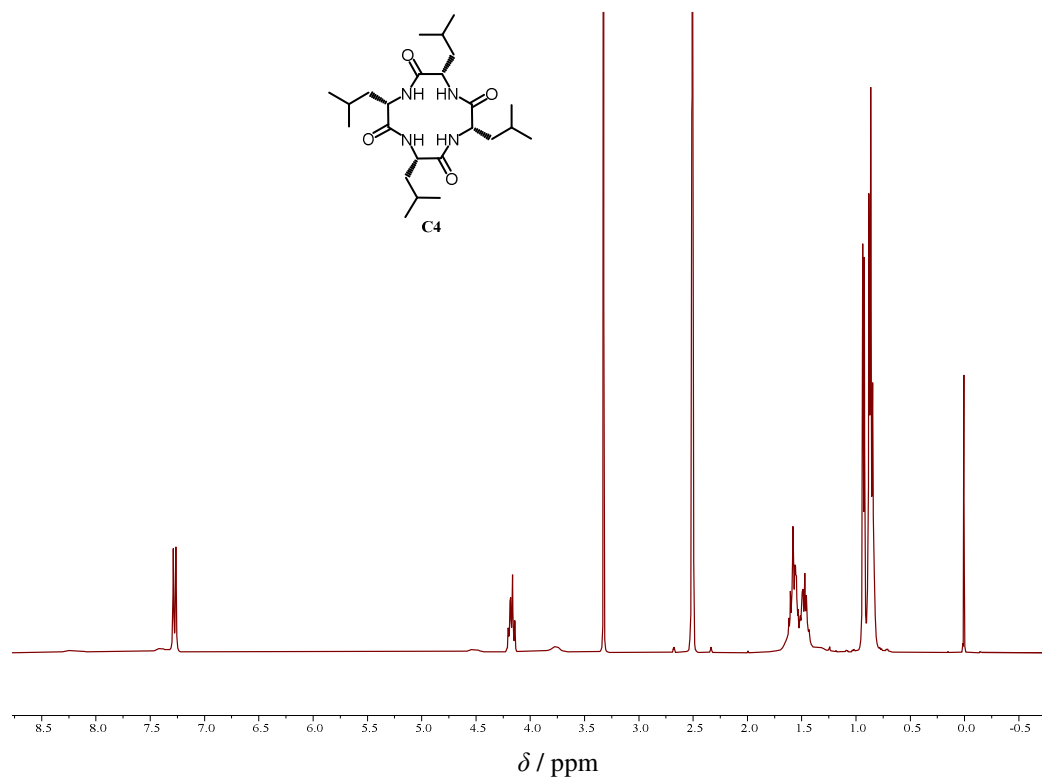
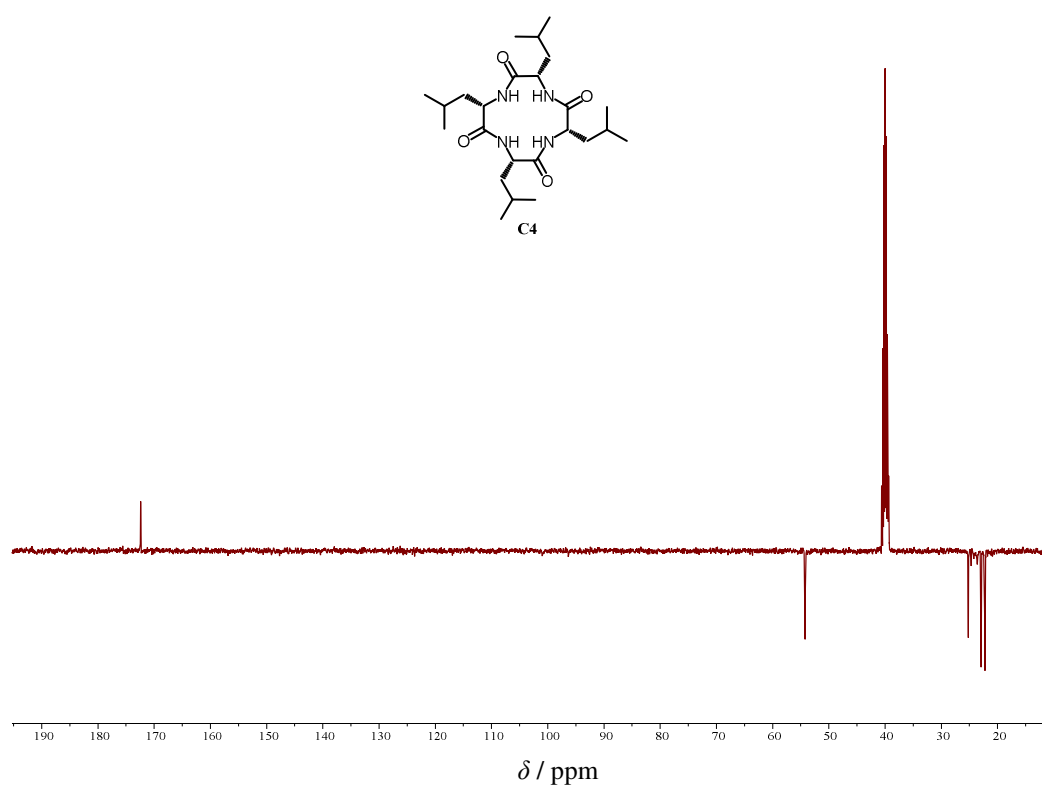
Slika D43. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P15**.

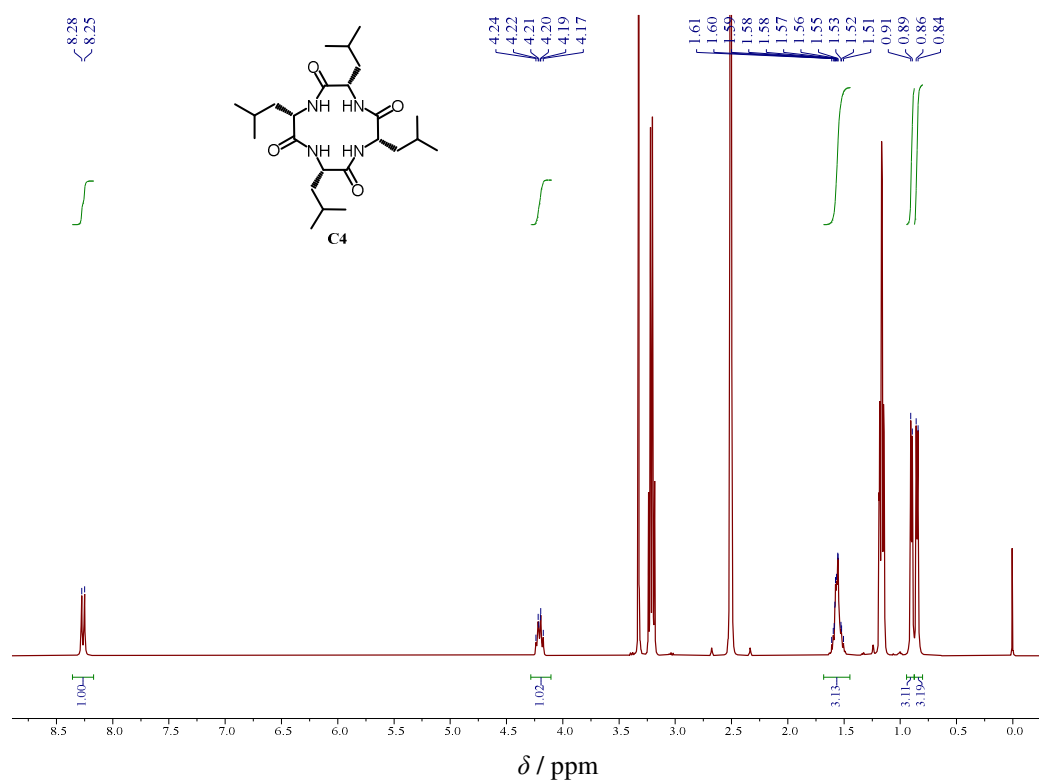
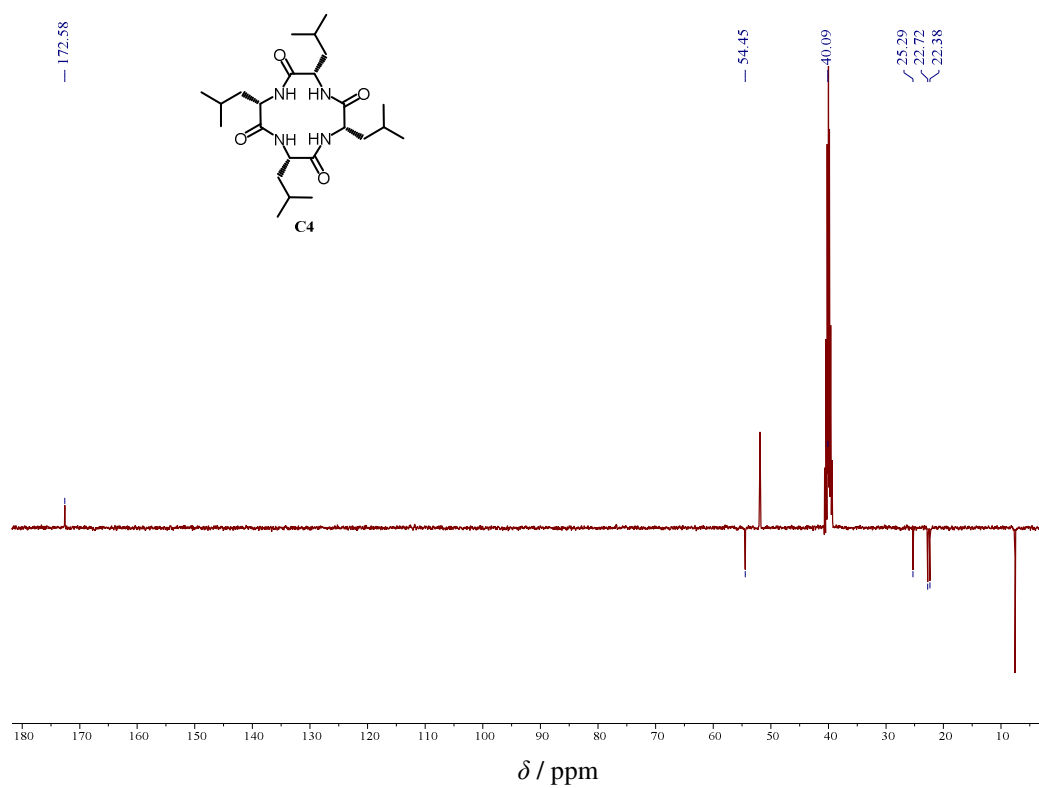
Slika D44. ¹H NMR spektar spoja P16 u DMSO-d₆.Slika D45. ¹³C NMR spektar spoja P16 u DMSO-d₆.

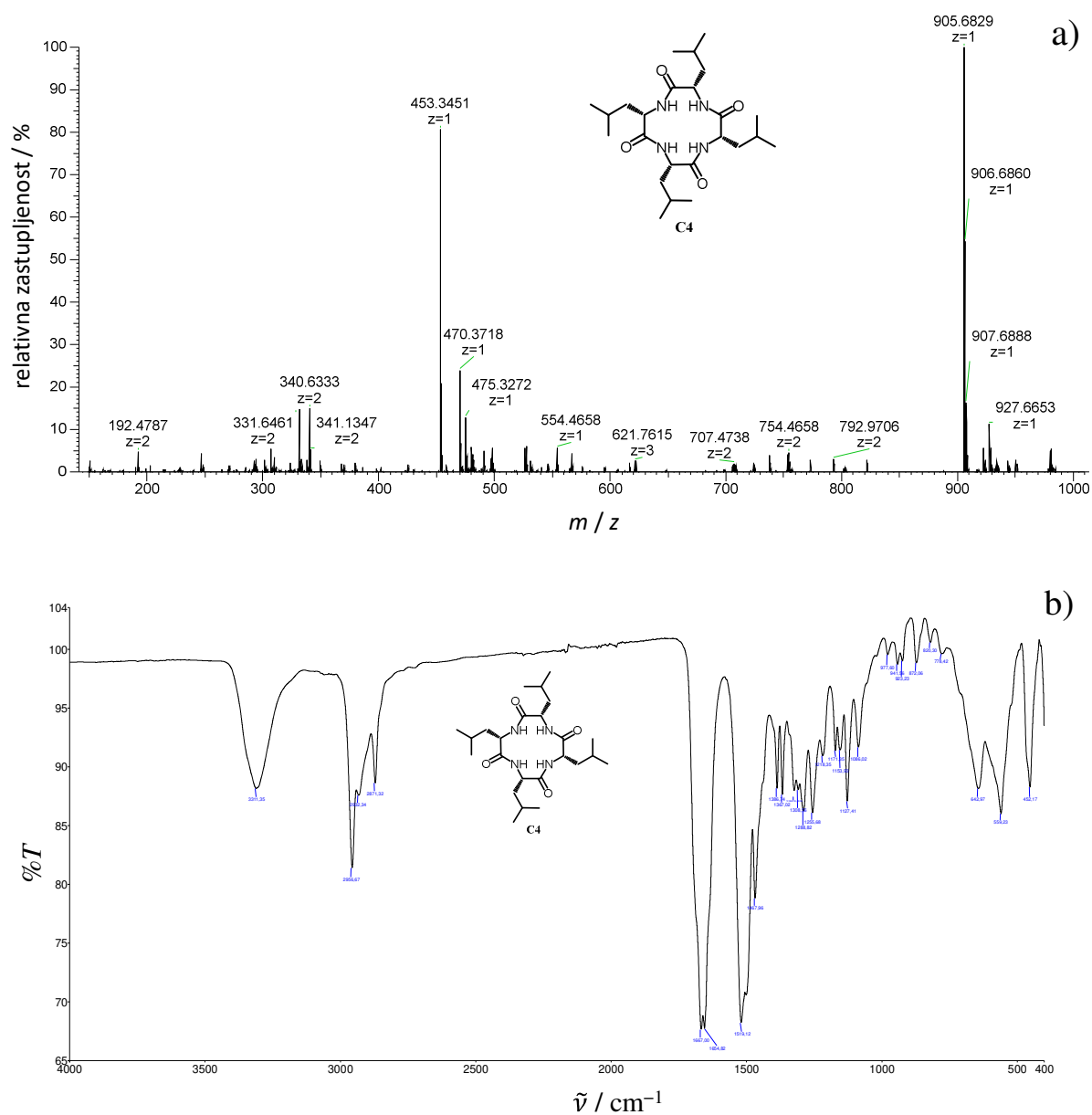
Slika D46. a) HRMS i b) IR spektar spoja **P16**.

Slika D47. ¹H NMR spektar hidrokloridne soli spoja P17 u DMSO-*d*₆.Slika D48. ¹³C NMR spektar hidrokloridne soli spoja P17 u DMSO-*d*₆.

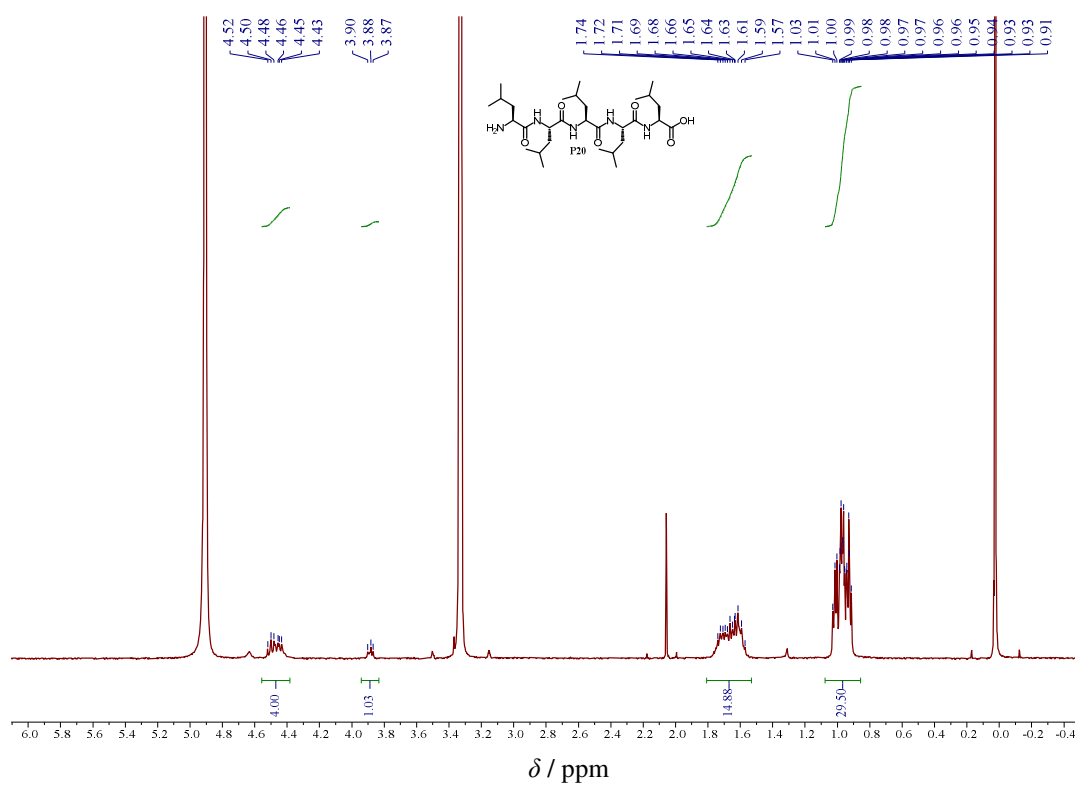
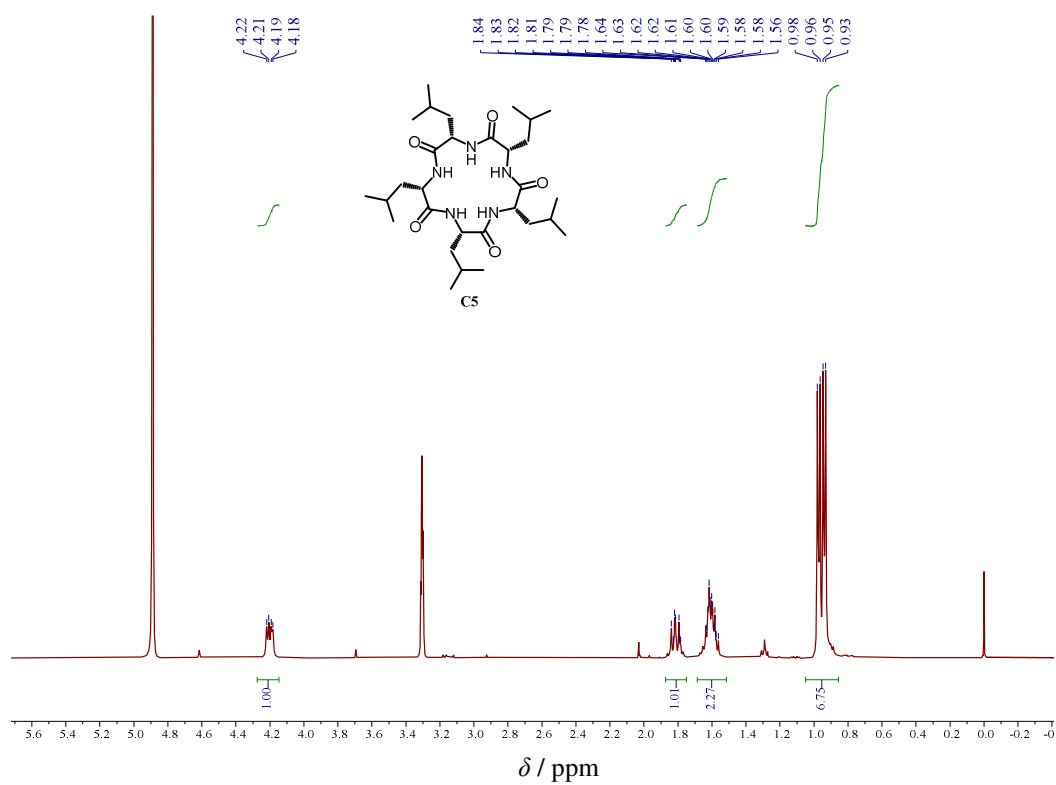


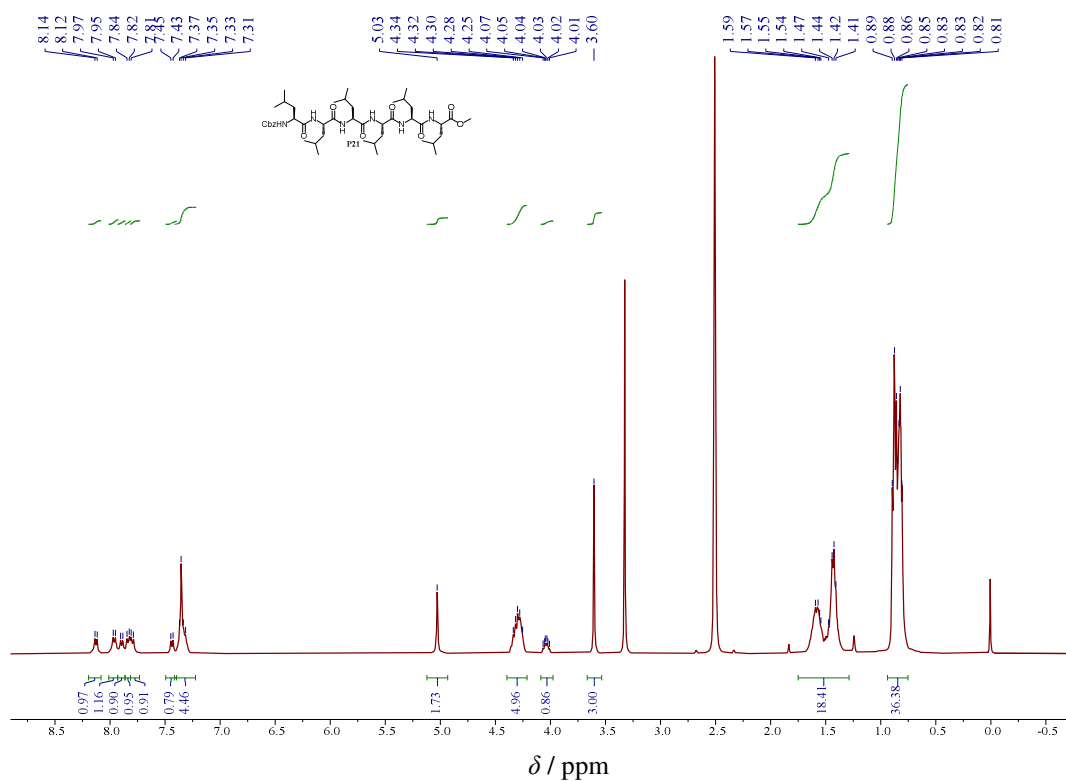
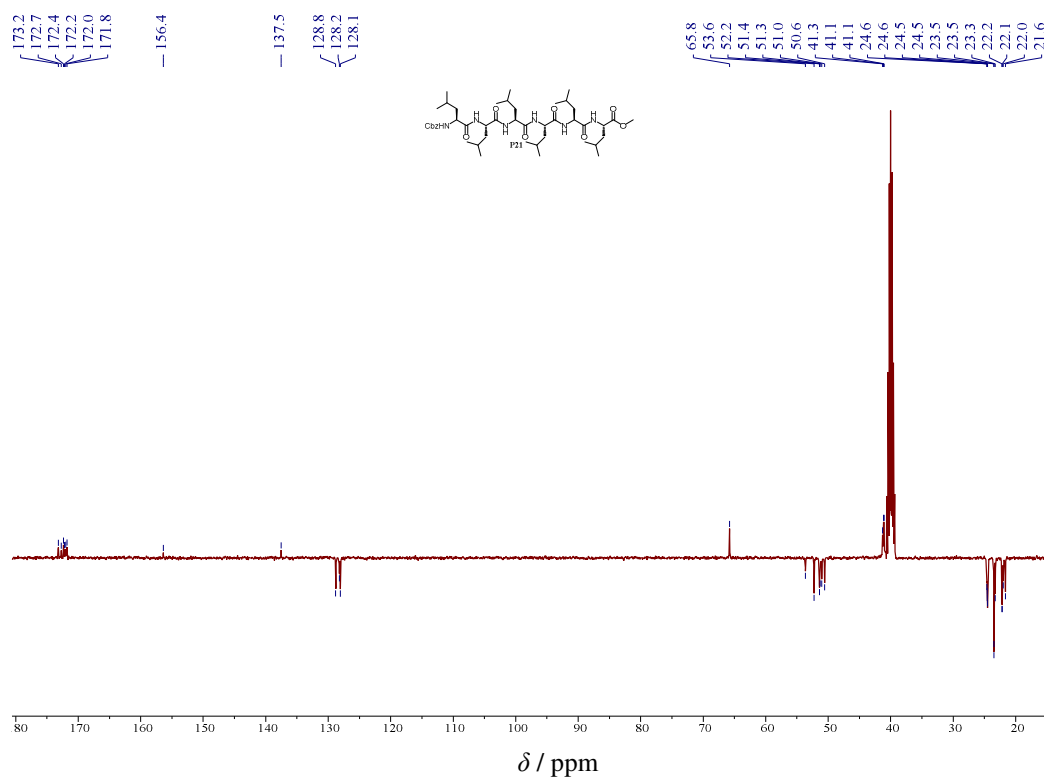
Slika D50. ^1H NMR spektar spoja **C4** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D51. ^{13}C NMR spektar spoja **C4** u $\text{DMSO-}d_6$.

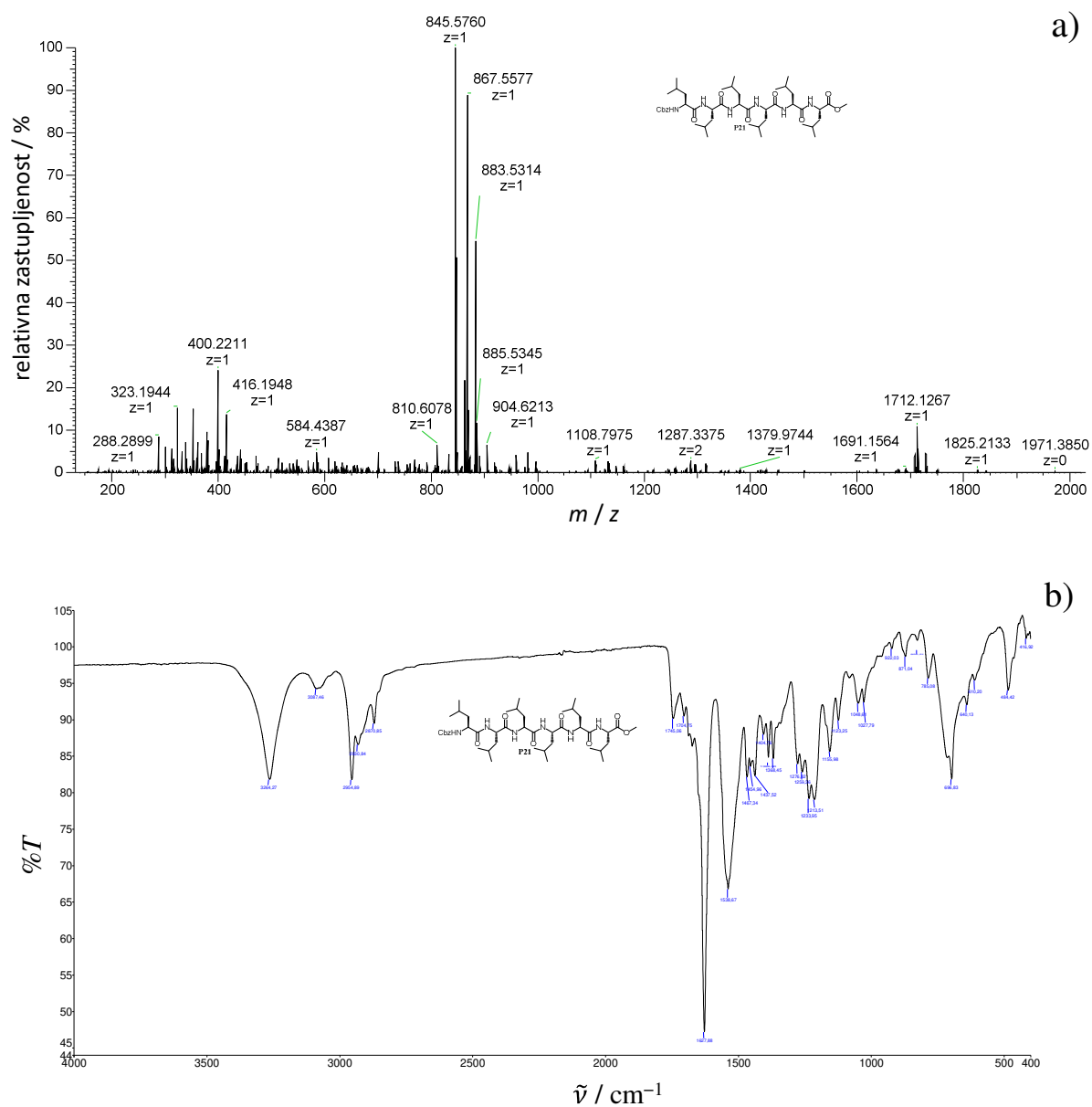
Slika D52. ^1H NMR spektar kompleksa C4Cl^- u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D53. ^{13}C NMR spektar kompleksa C4Cl^- u $\text{DMSO-}d_6$.

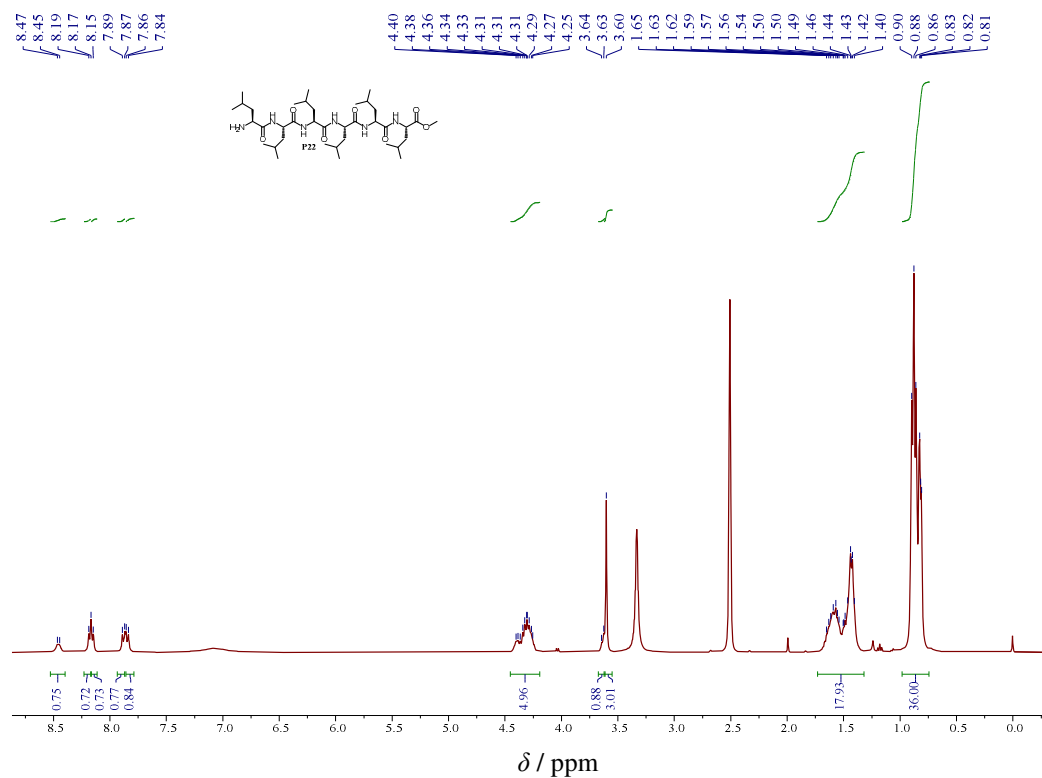
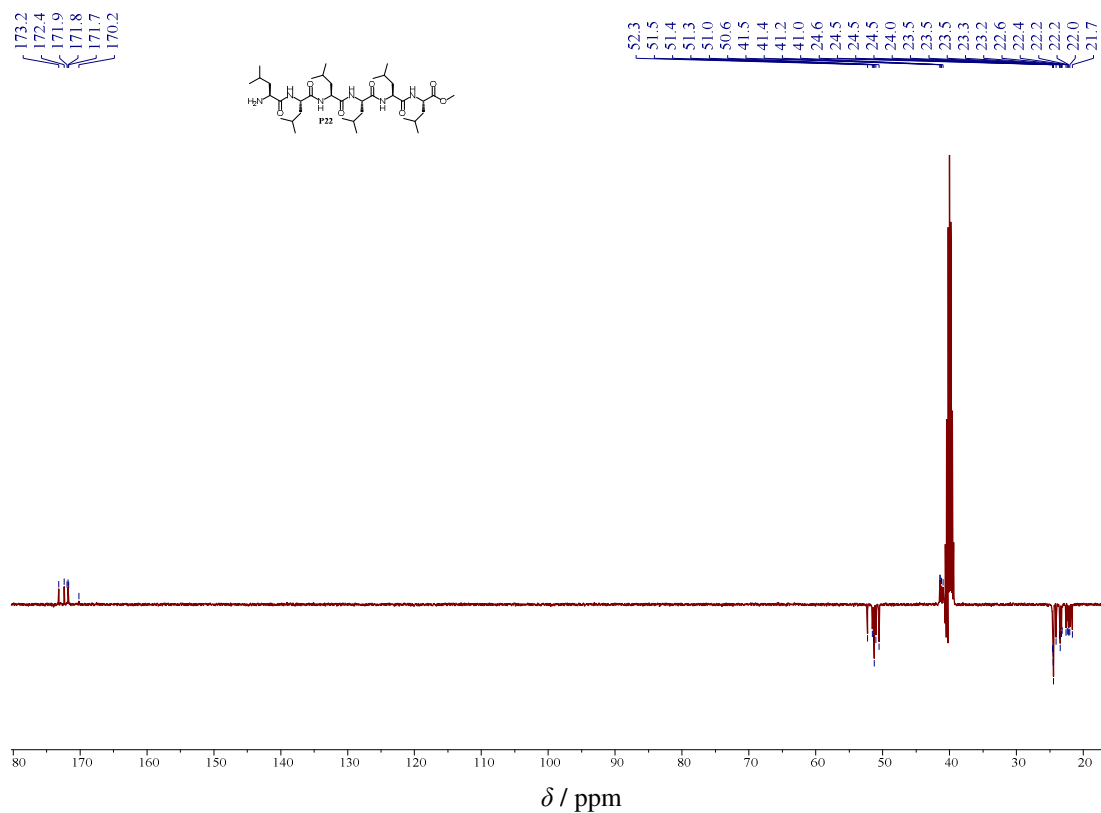


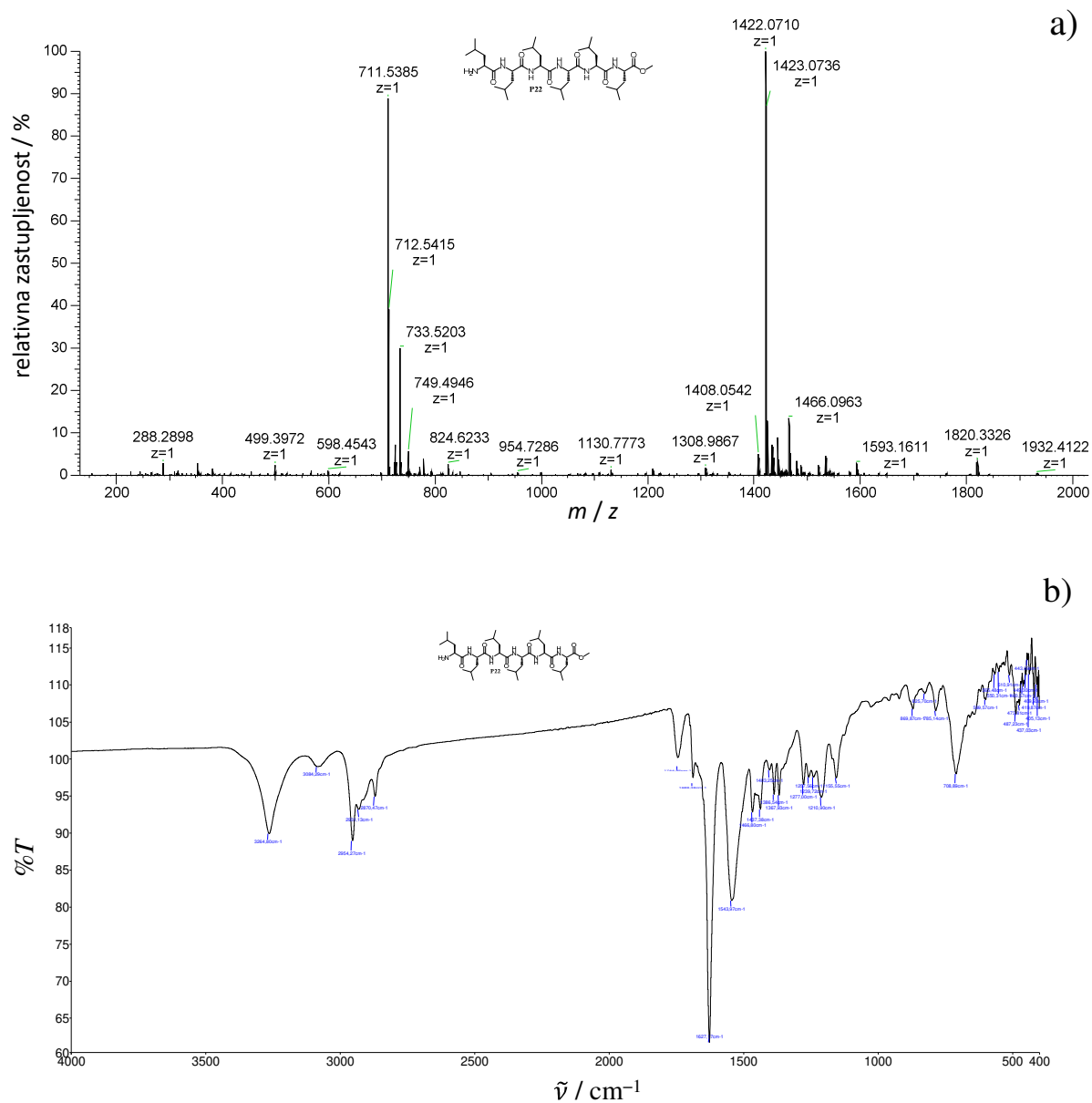
Slika D54. a) HRMS i b) IR spektar spoja C4.

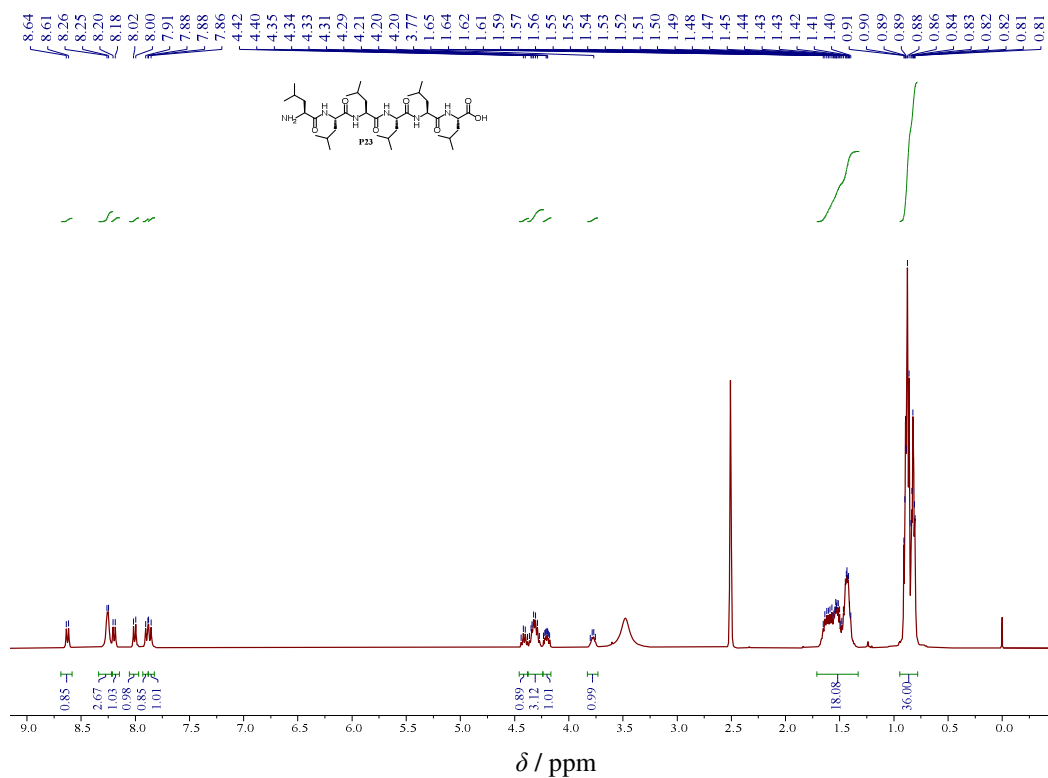
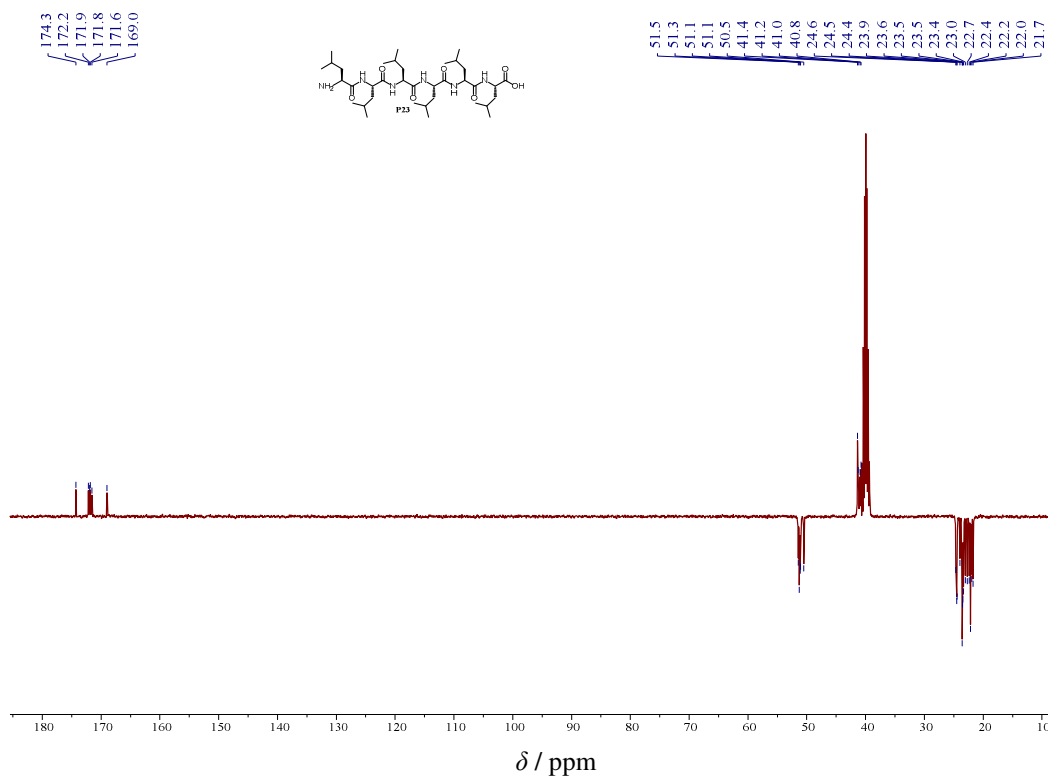
Slika D57. ^1H NMR spektar spoja **P20** u $\text{MeOD-}d_4$.Slika D58. ^1H NMR spektar spoja **C5** u $\text{MeOD-}d_4$.

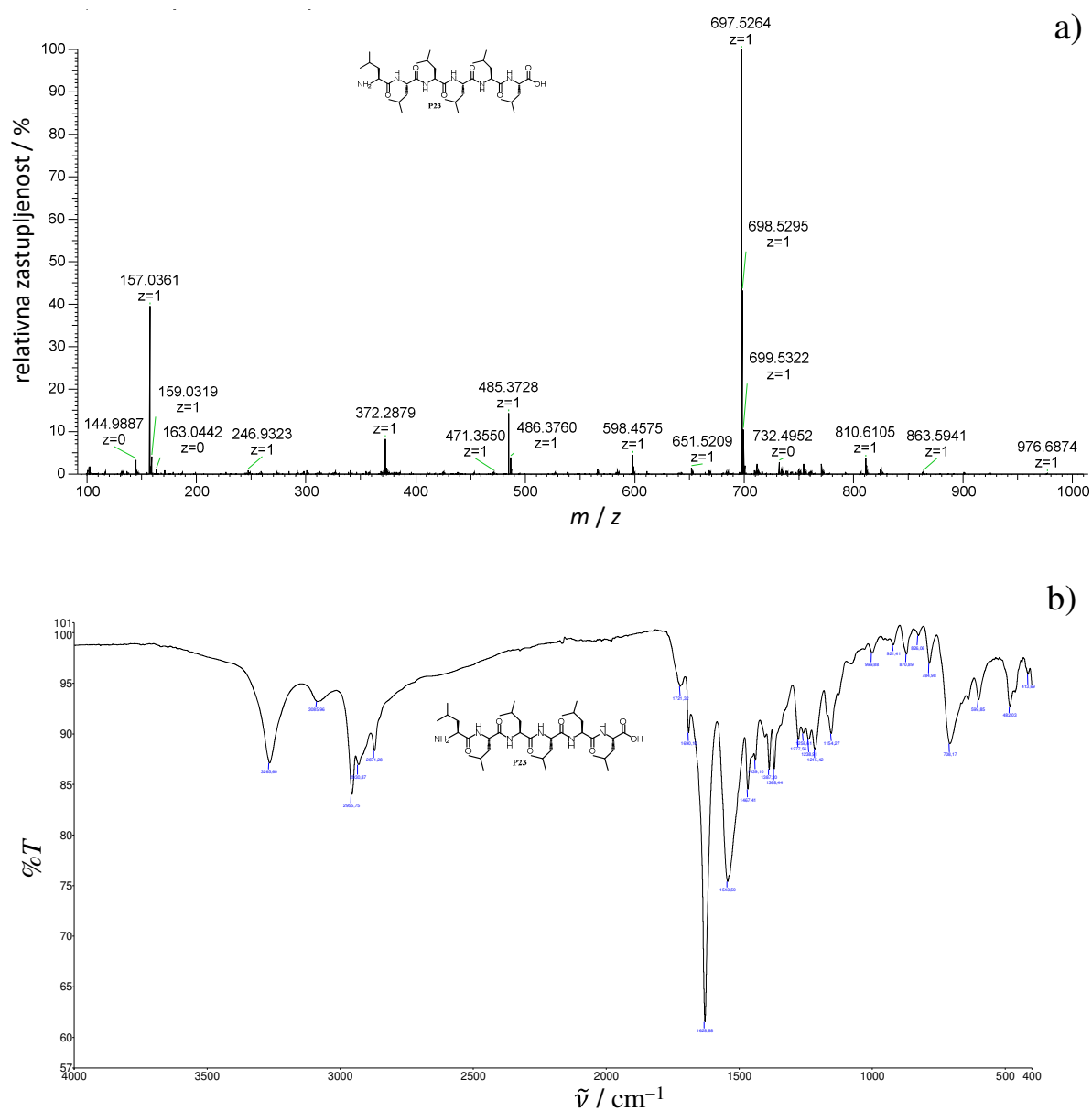
Slika D59. ^1H NMR spektar spoja P21 u DMSO- d_6 .Slika D60. ^{13}C NMR spektar spoja P21 u DMSO- d_6 .

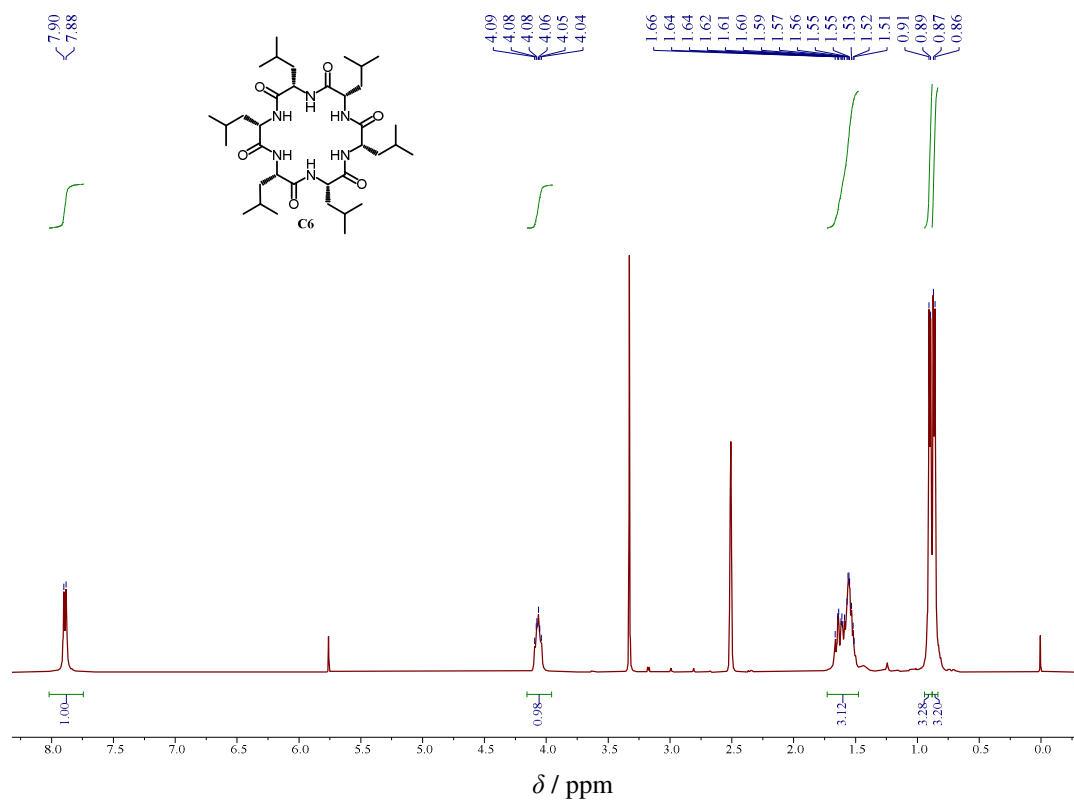
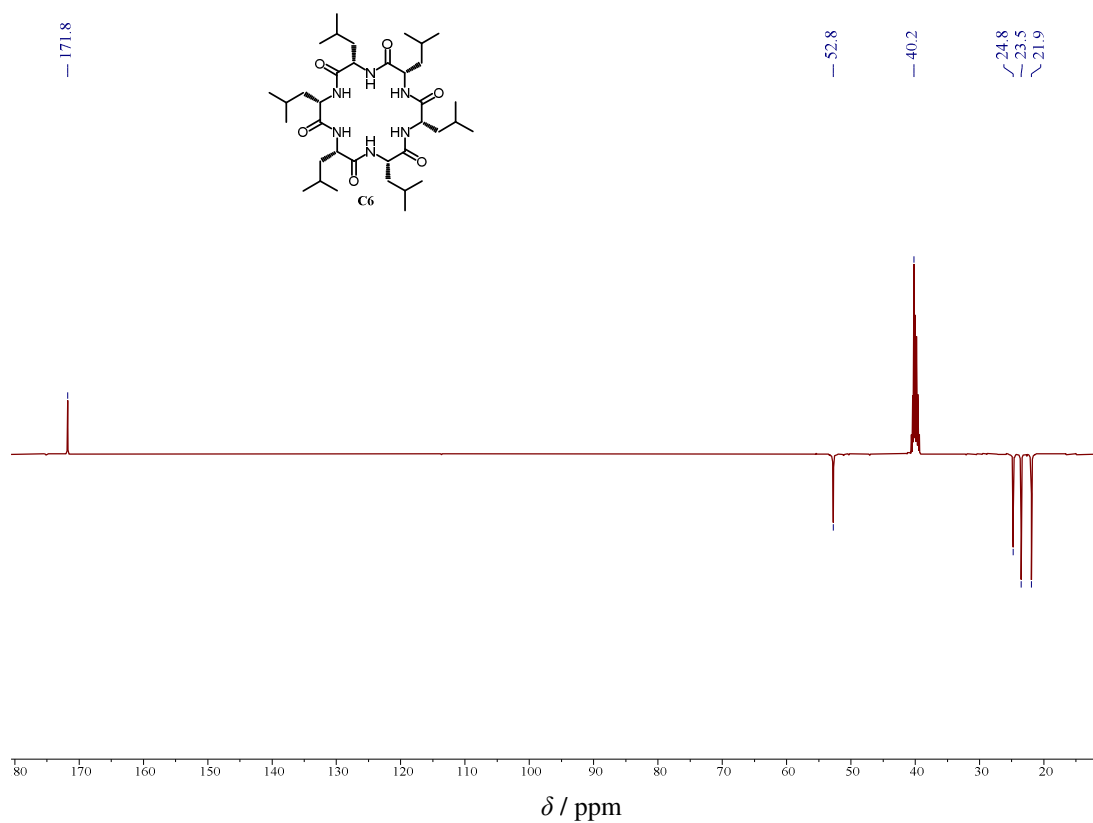


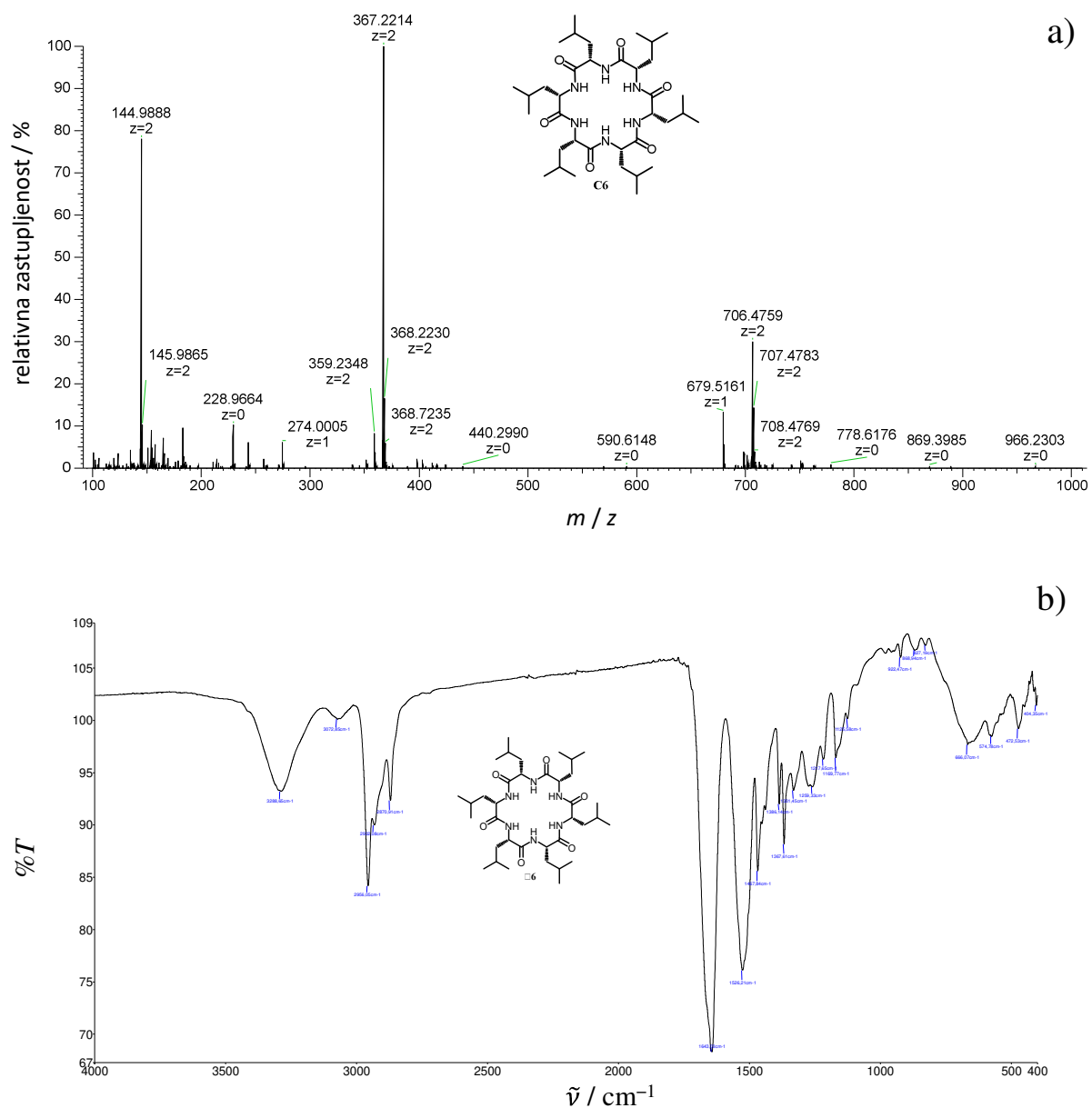
Slika D62. ¹H NMR spektar spoja P22 u DMSO-*d*₆.Slika D63. ¹³C NMR spektar spoja P22 u DMSO-*d*₆.

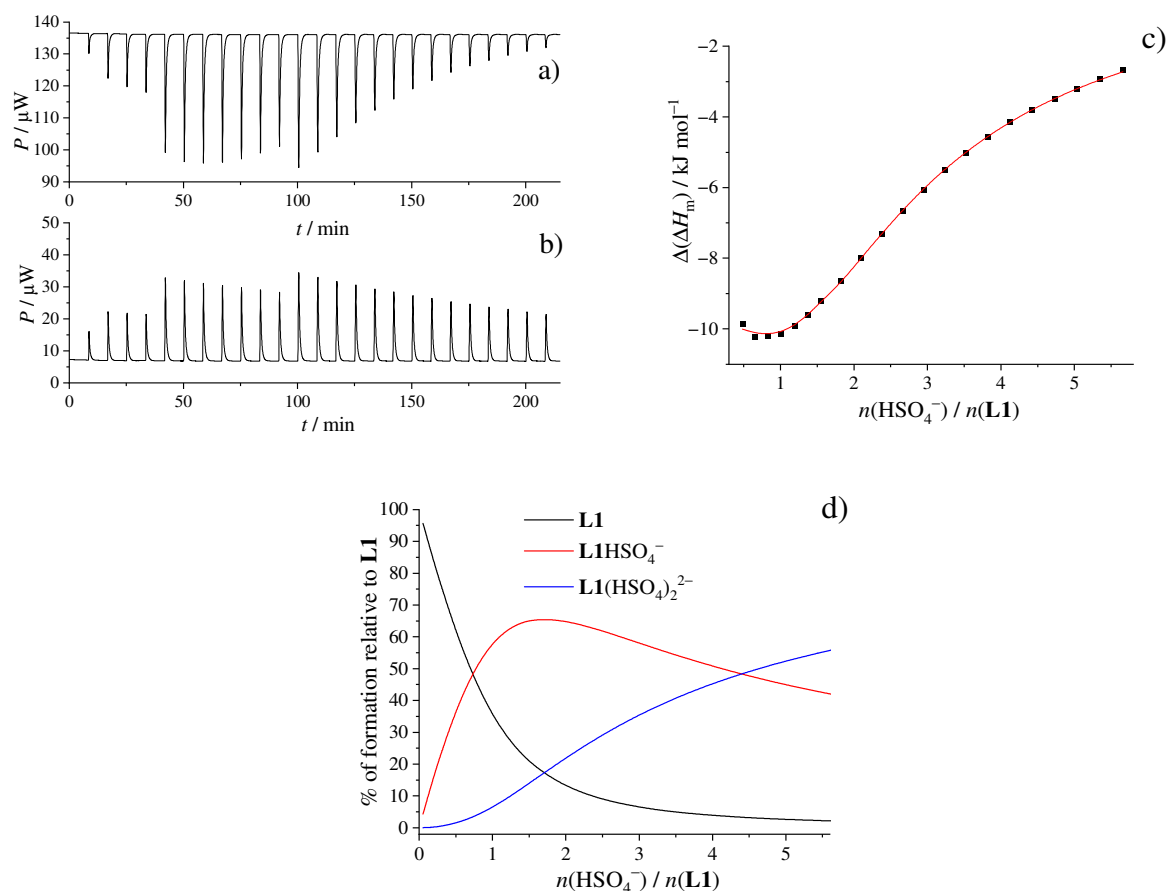


Slika D65. ^1H NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P23** u DMSO- d_6 .Slika D66. ^{13}C NMR spektar hidrokloridne soli spoja **P23** u DMSO- d_6 .

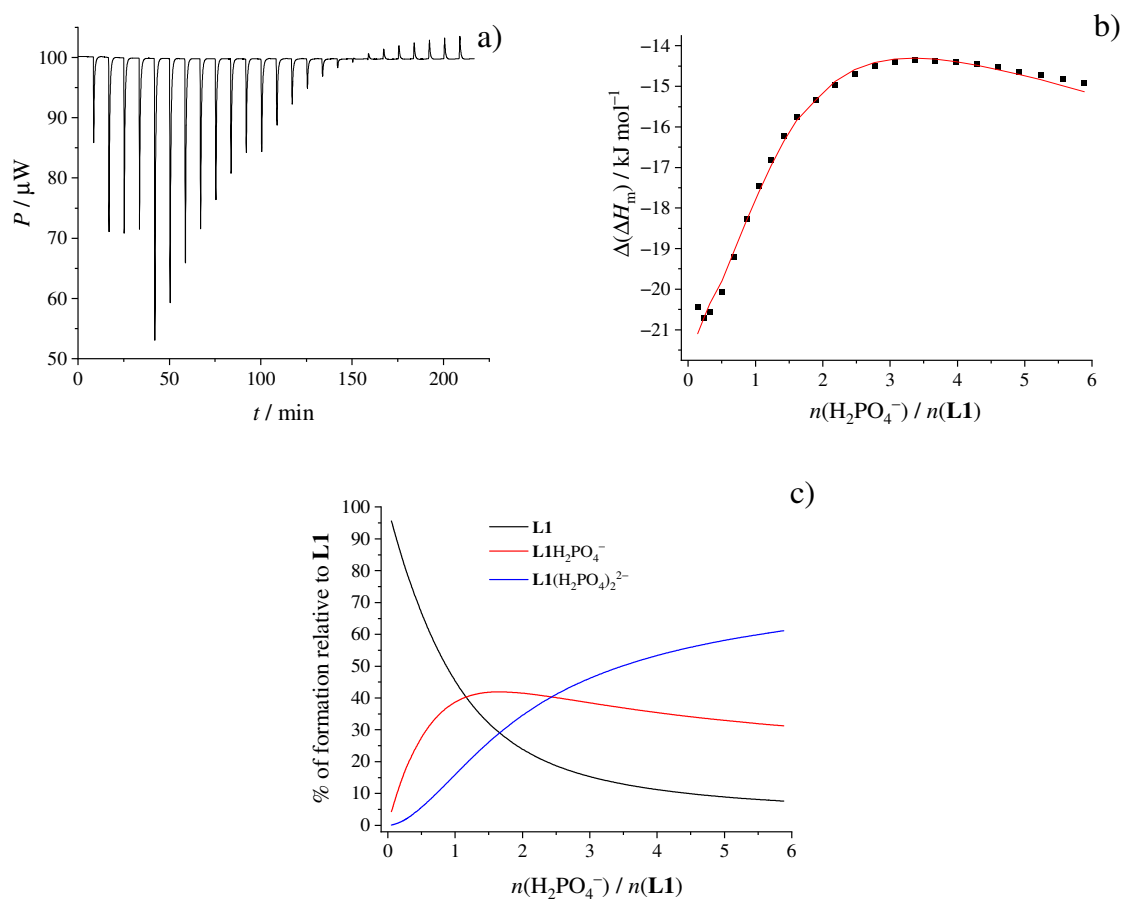


Slika D68. ^1H NMR spektar spoja **C6** u $\text{DMSO-}d_6$.Slika D69. ^{13}C NMR spektar spoja **C6** u $\text{DMSO-}d_6$.

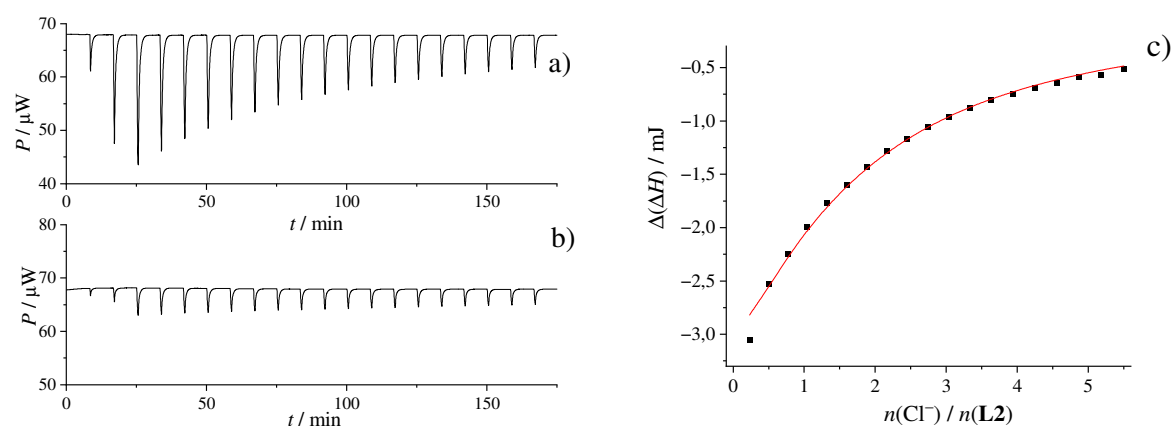




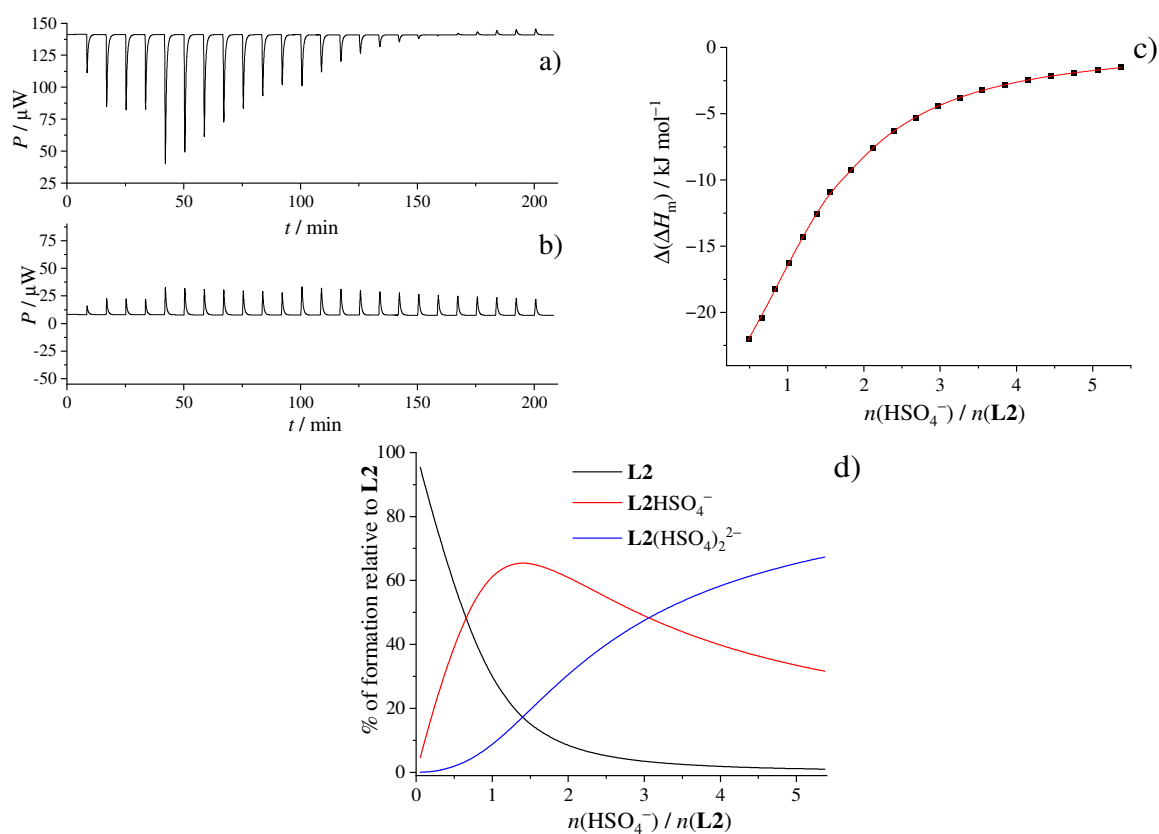
Slika D71. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 1,03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0249 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 0,0249 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



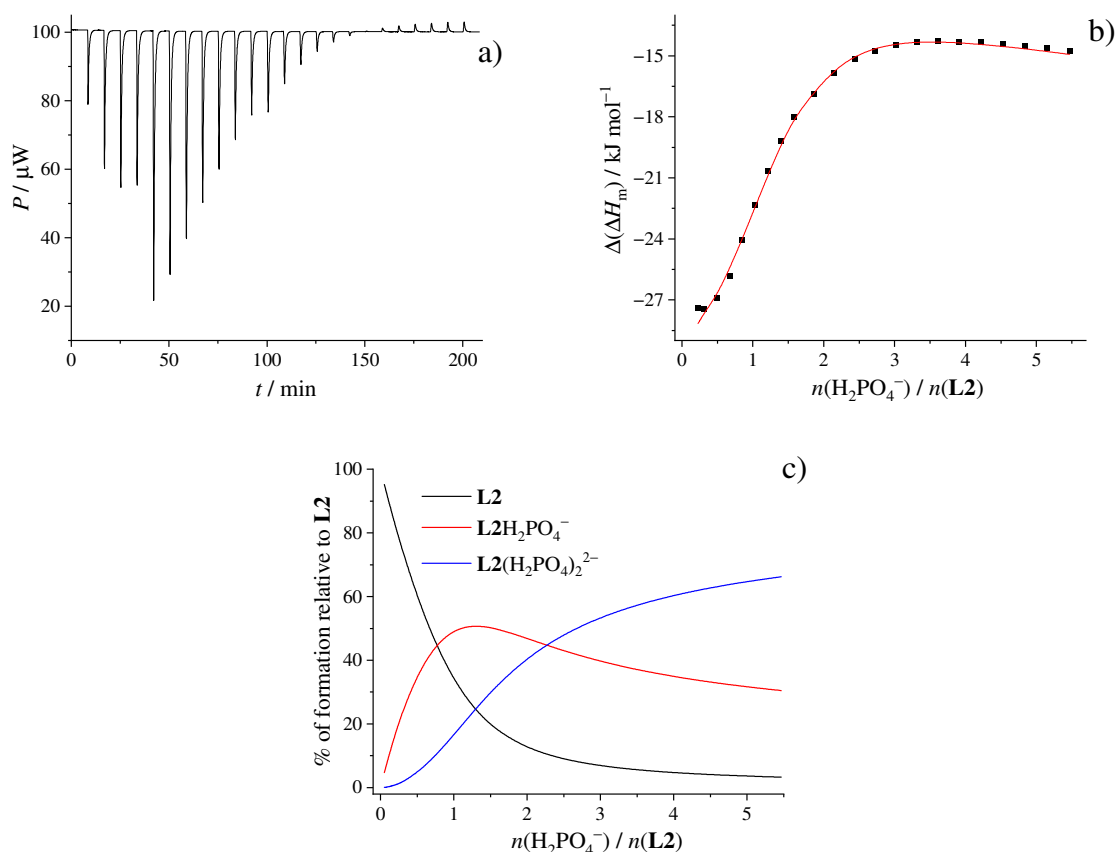
Slika D72. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 9,91 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH₂PO₄ ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



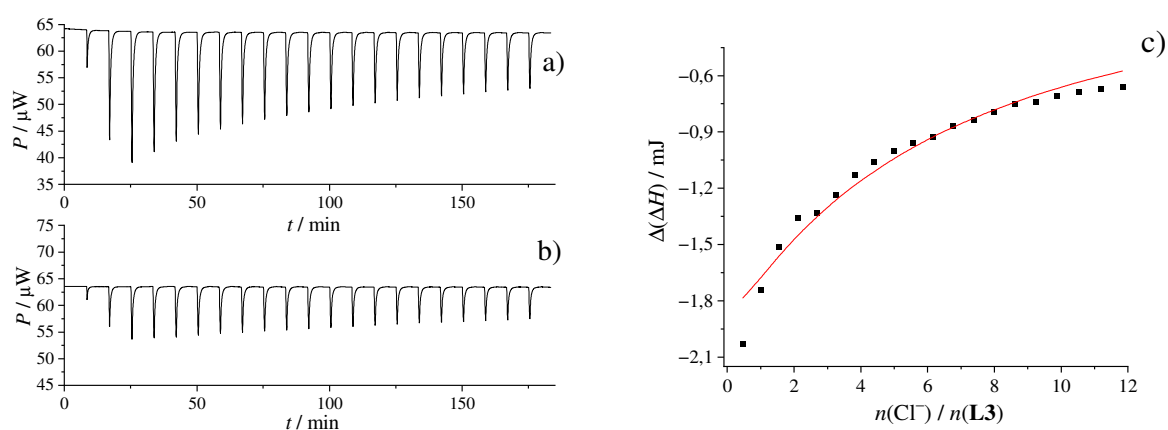
Slika D73. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



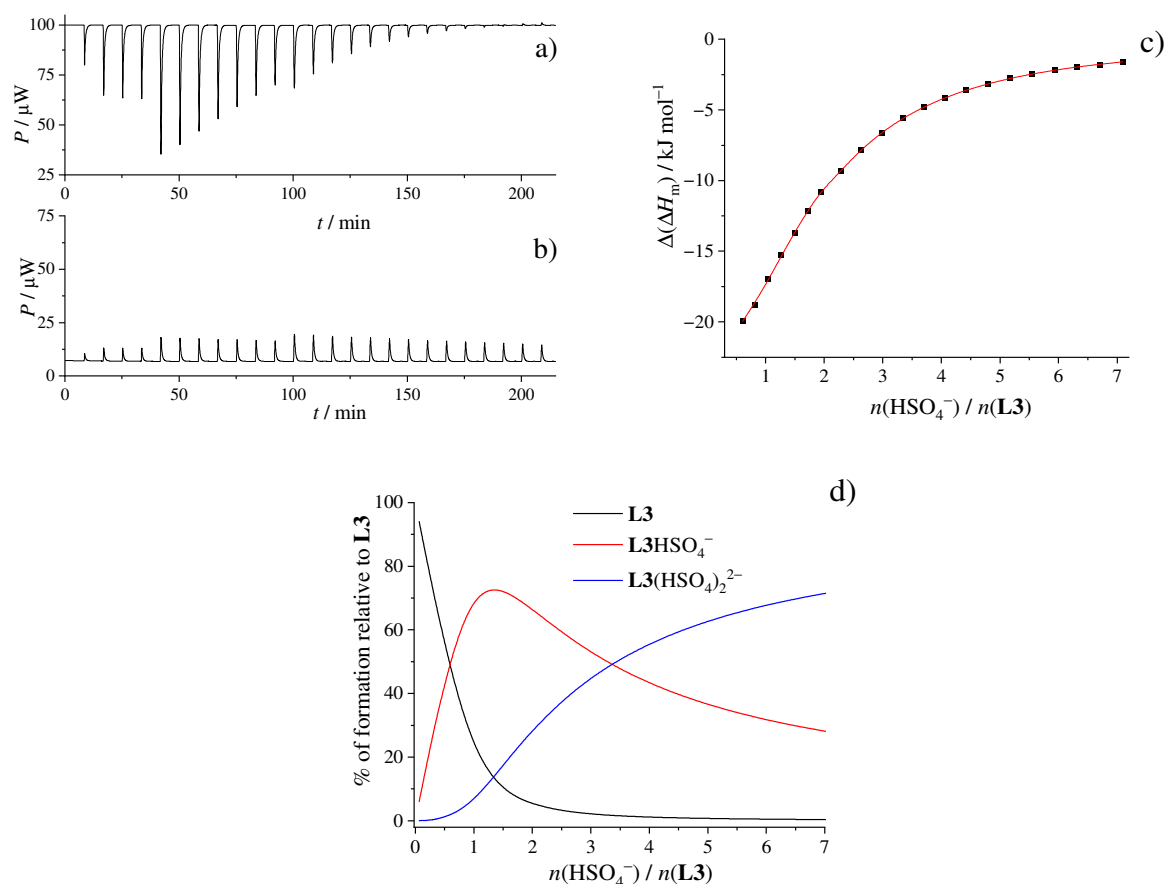
Slika D74. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0249 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 0,0249 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



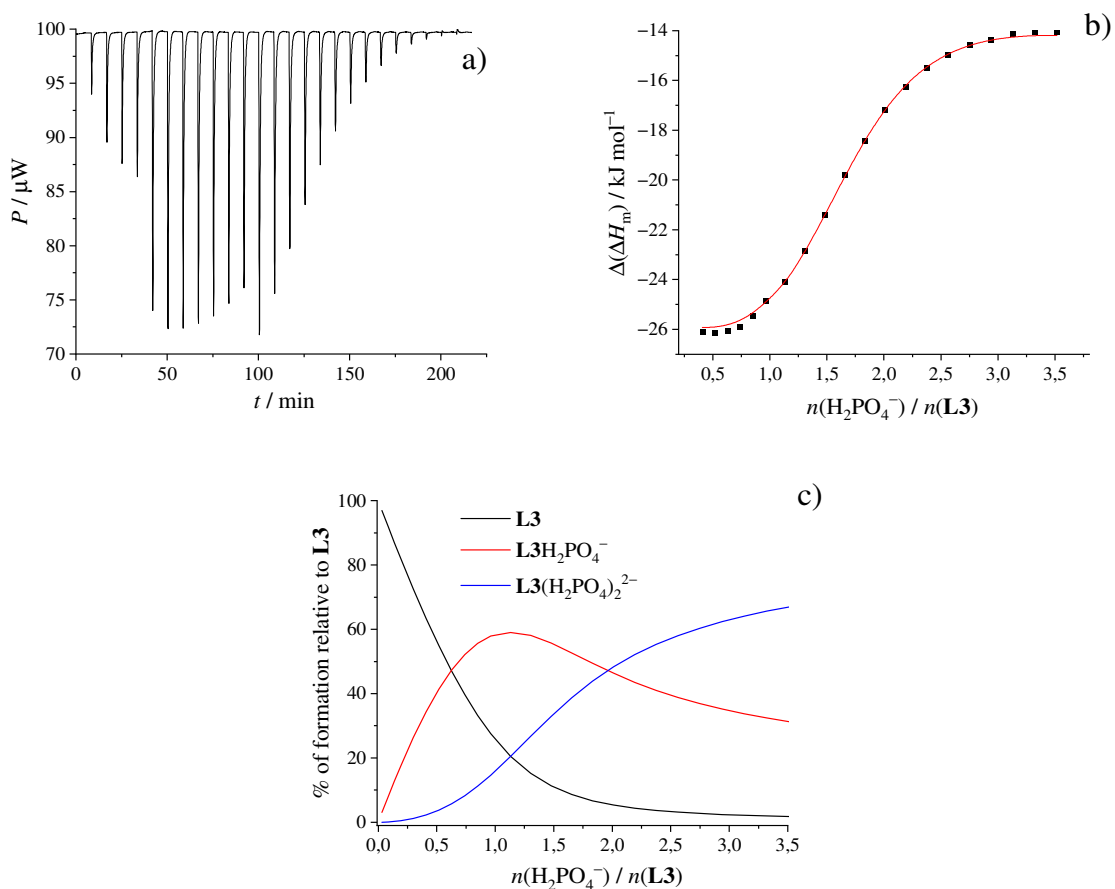
Slika D75. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



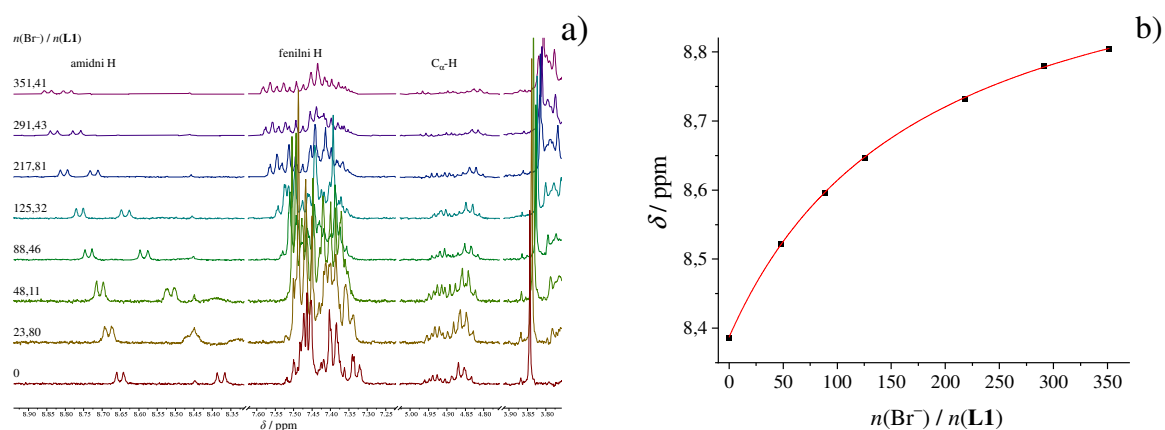
Slika D76. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 4,92 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



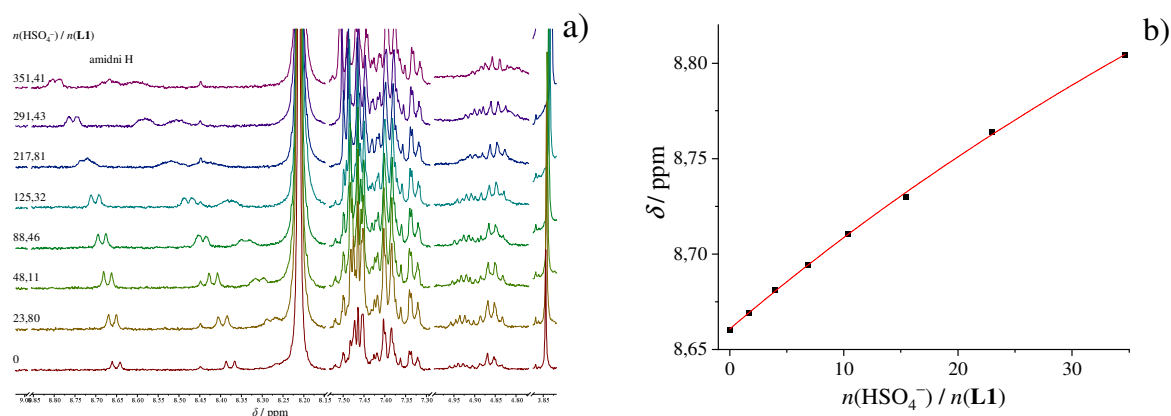
Slika D77. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 4,92 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0150 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 0,0150 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



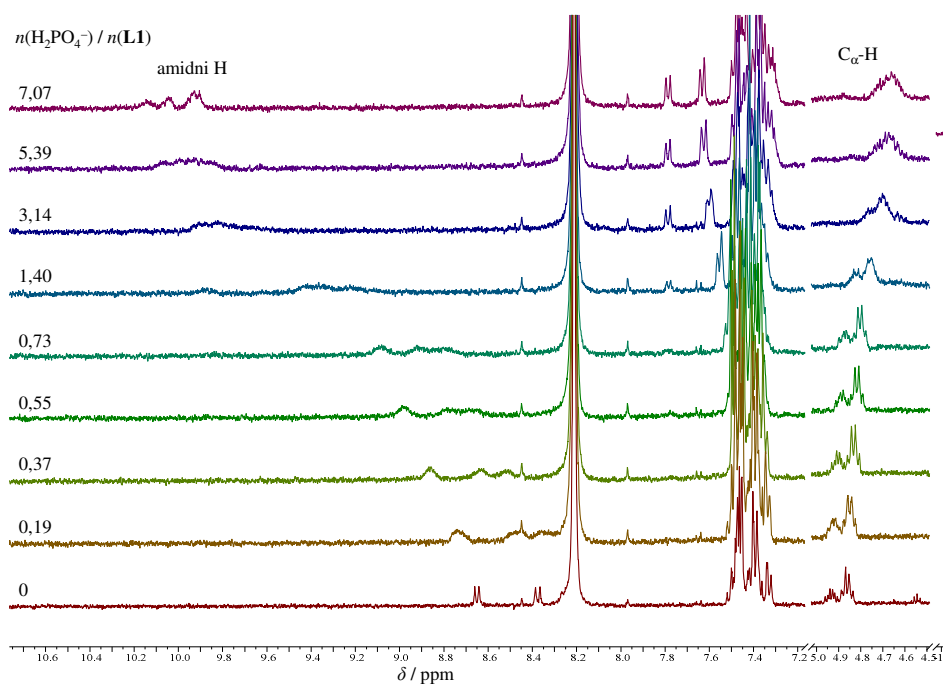
Slika D78. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 4,87 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 7,36 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



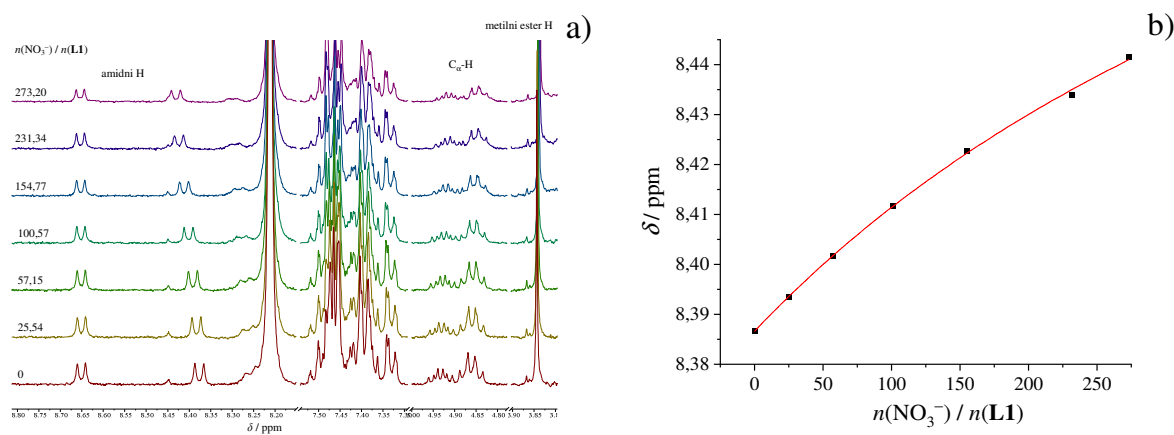
Slika D79. a) ¹H NMR titracija **L1** ($c = 5,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,513 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L1** pri 8,40 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



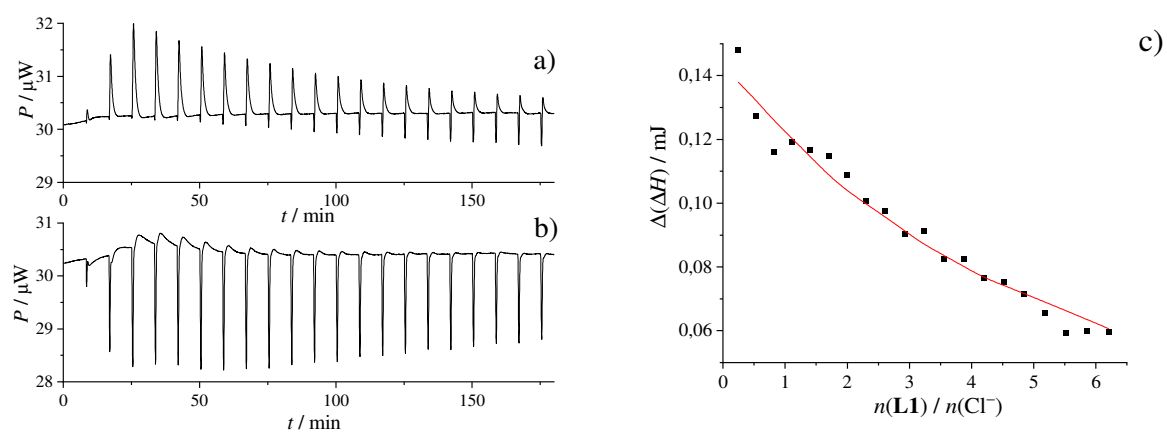
Slika D80. a) ¹H NMR titracija **L1** ($c = 4,36 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0406 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L1** pri 8,65 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



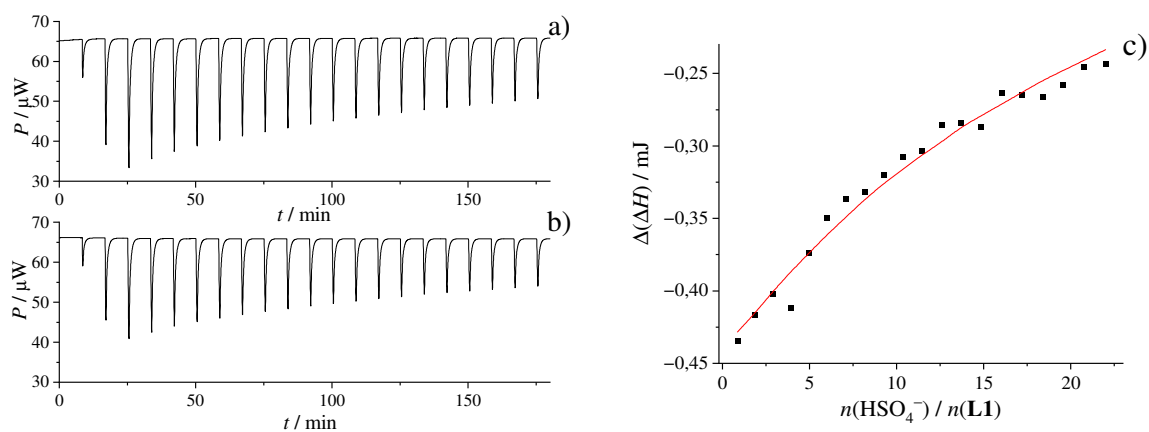
Slika D81. a) ^1H NMR titracija **L1** ($c = 4,36 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 8,15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



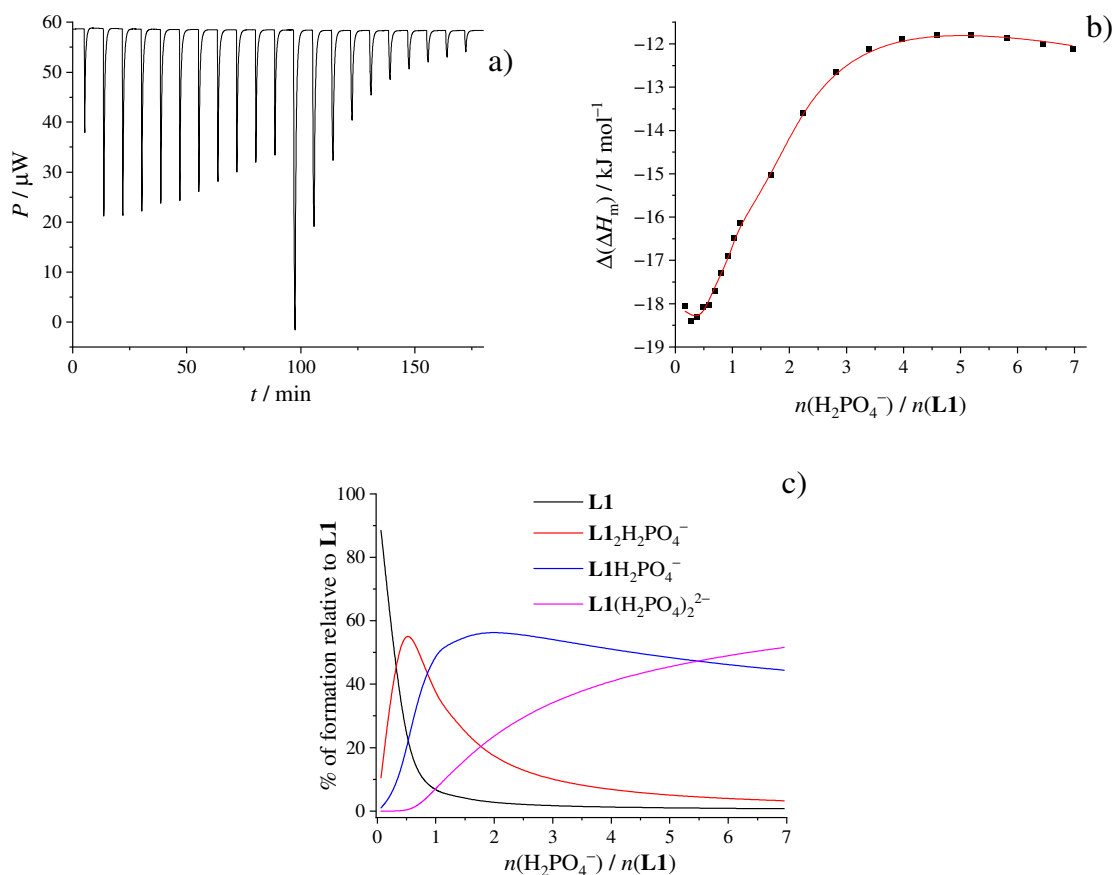
Slika D82. a) ^1H NMR titracija **L1** ($c = 4,36 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,299 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L1** pri 8,38 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



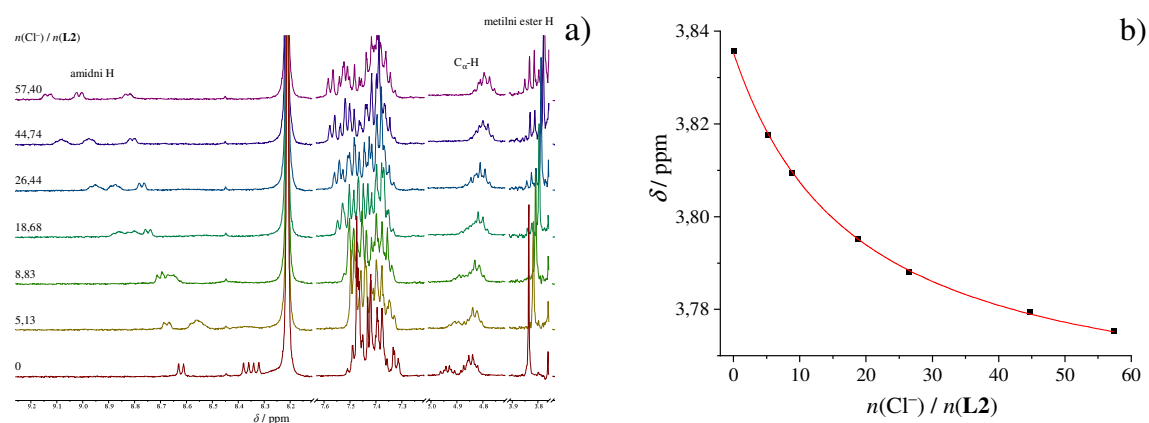
Slika D83. a) Mikrokalorimetrijska titracija TEACl ($c = 2,63 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s **L1** ($c = 0,07 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija DMF-a s **L1** ($c = 0,07 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\mathbf{L1}) / n(\text{Cl}^-)$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



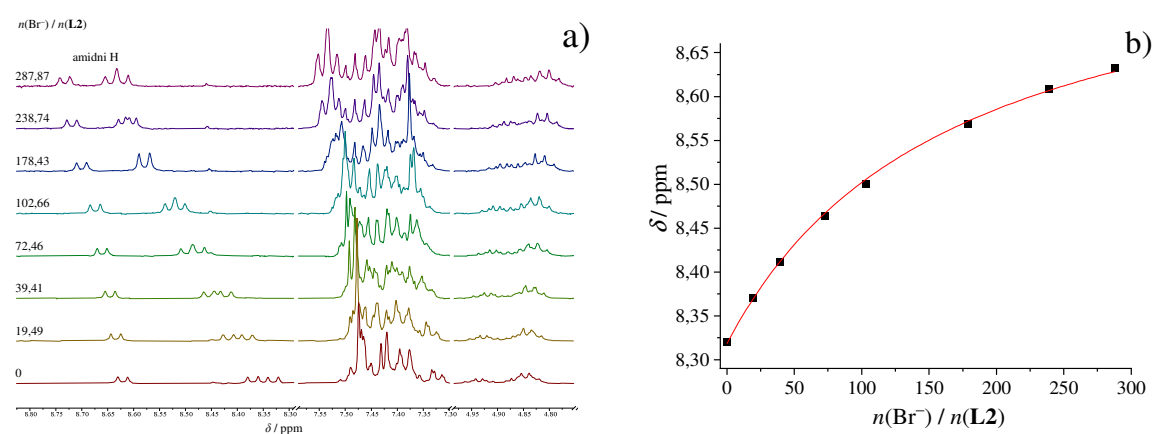
Slika D84. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 5,30 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija DMF-a s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\mathbf{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



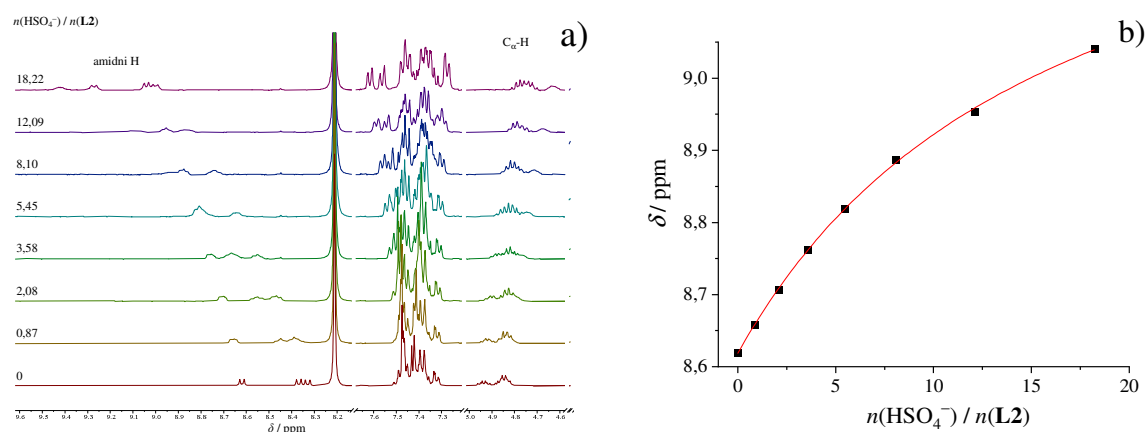
Slika D85. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0299 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



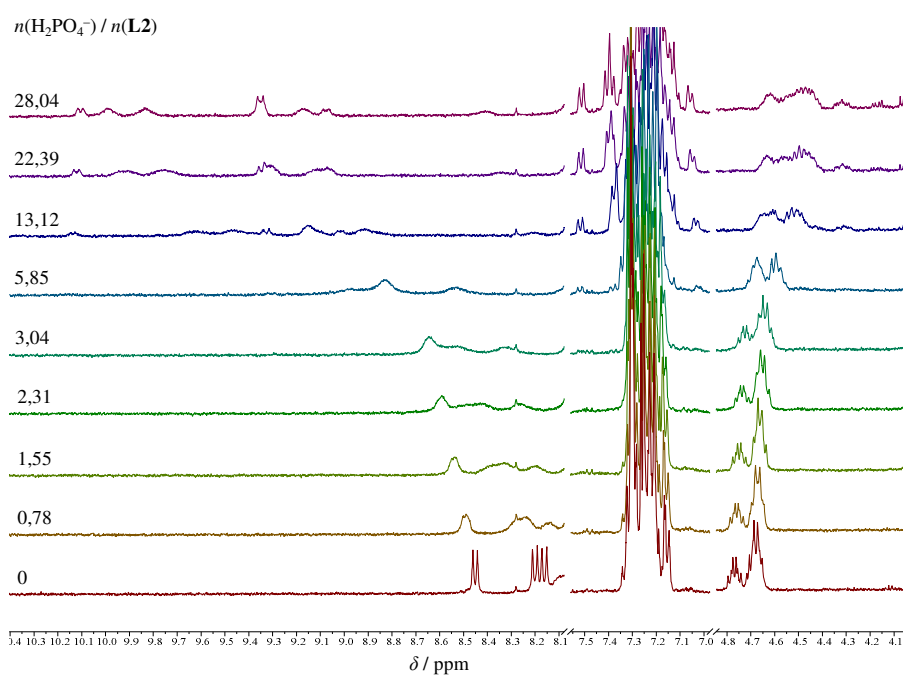
Slika D86. a) ¹H NMR titracija **L2** ($c = 5,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0813 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona metilnog estera **L2** pri 3,84 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



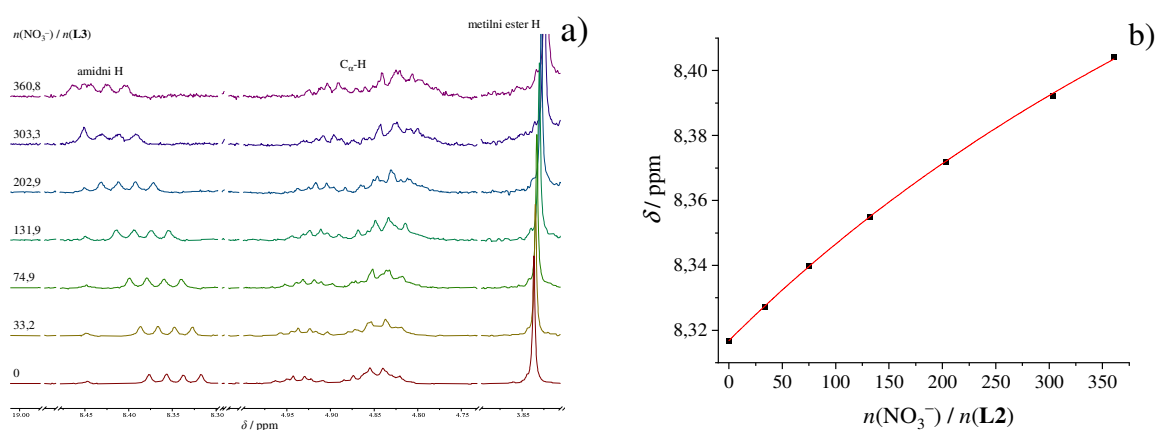
Slika D87. a) ¹H NMR titracija **L2** ($c = 5,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,401 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L2** pri 8,30 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



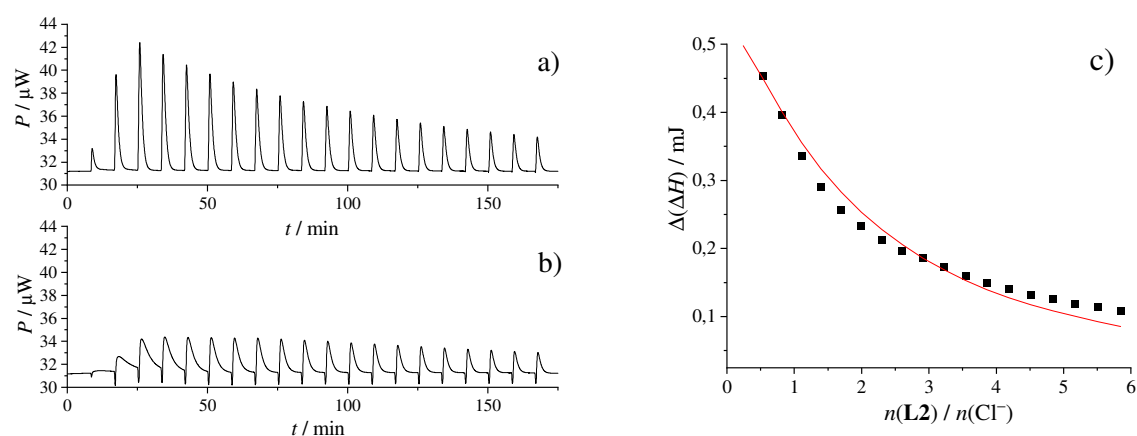
Slika D88. a) ^1H NMR titracija **L2** ($c = 1,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0516 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona metilnog estera **L2** pri 8,60 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



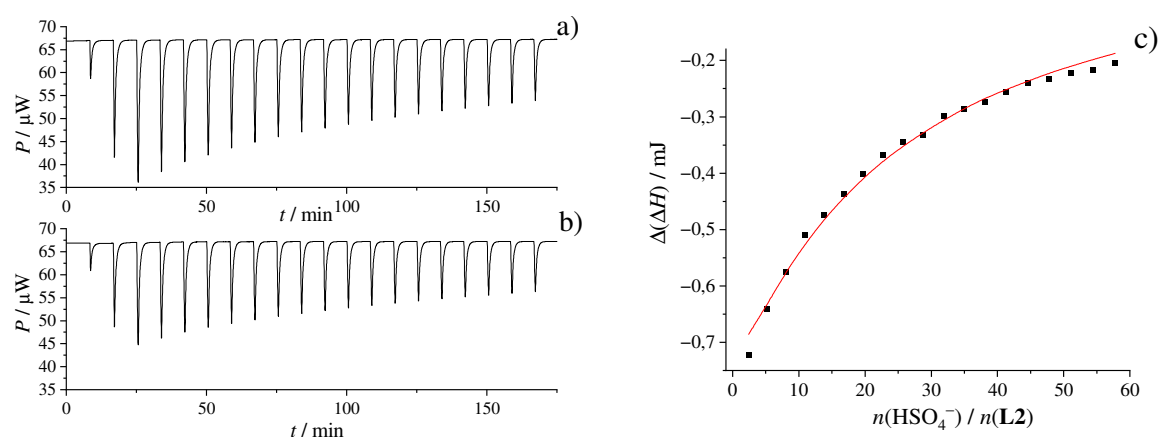
Slika D89. a) ^1H NMR titracija **L2** ($c = 1,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0795 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



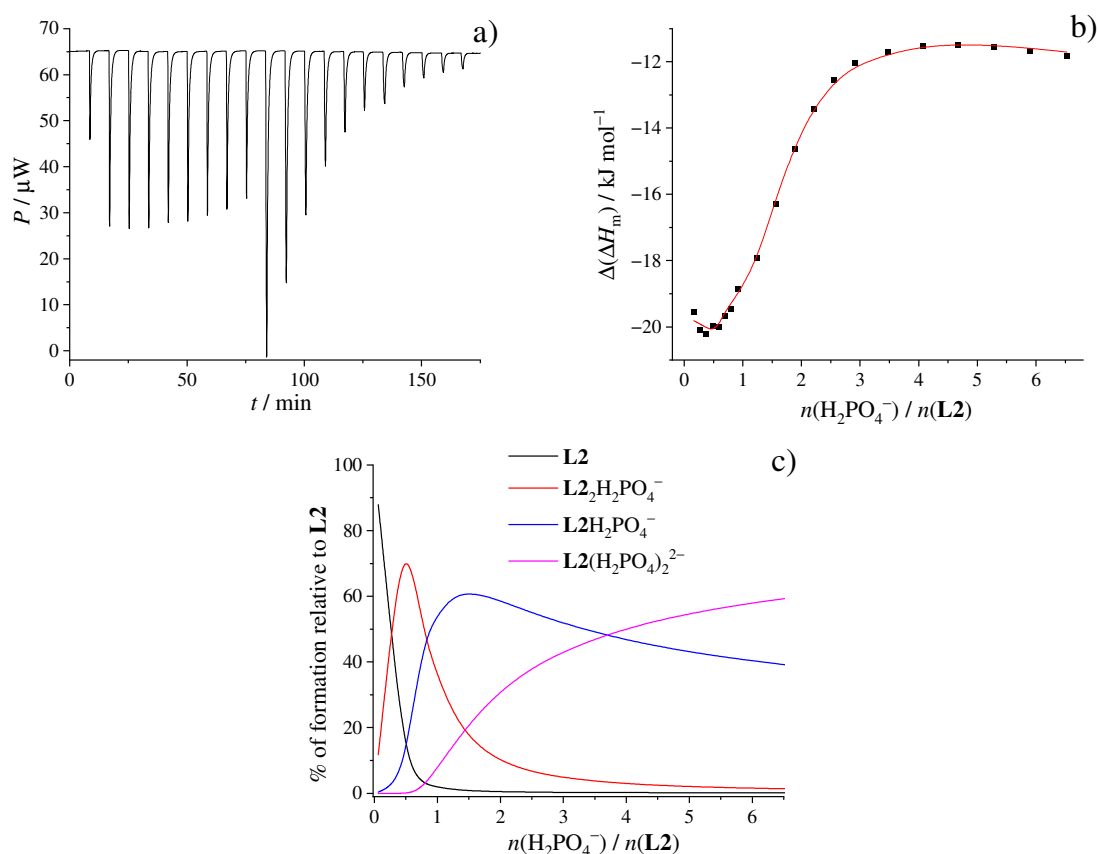
Slika D90. a) ^1H NMR titracija **L2** ($c = 4,98 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,452 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona metilnog estera **L2** pri 8,32 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



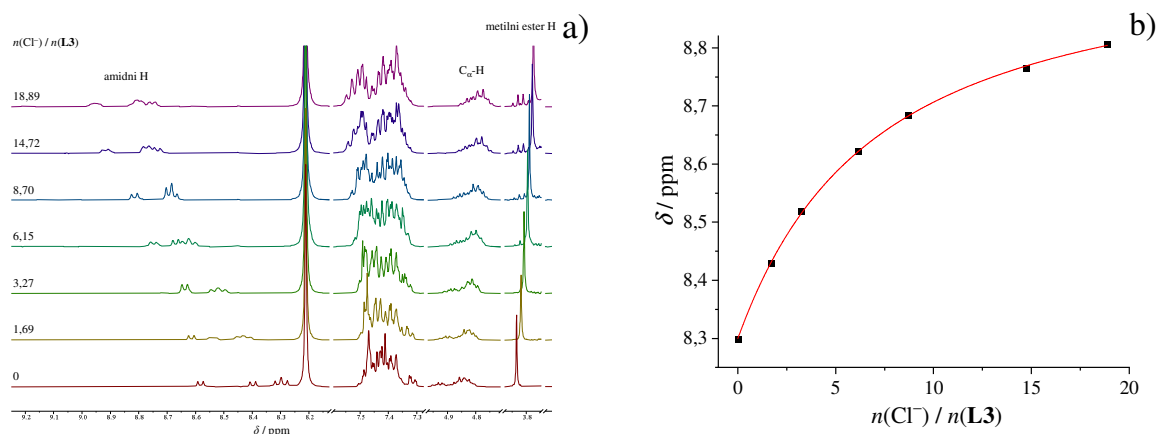
Slika D91. a) Mikrokalorimetrijska titracija TEACl ($c = 2,63 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s **L2** ($c = 0,0701 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija DMF-a s **L2** ($c = 0,0701 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{L2}) / n(\text{Cl}^-)$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



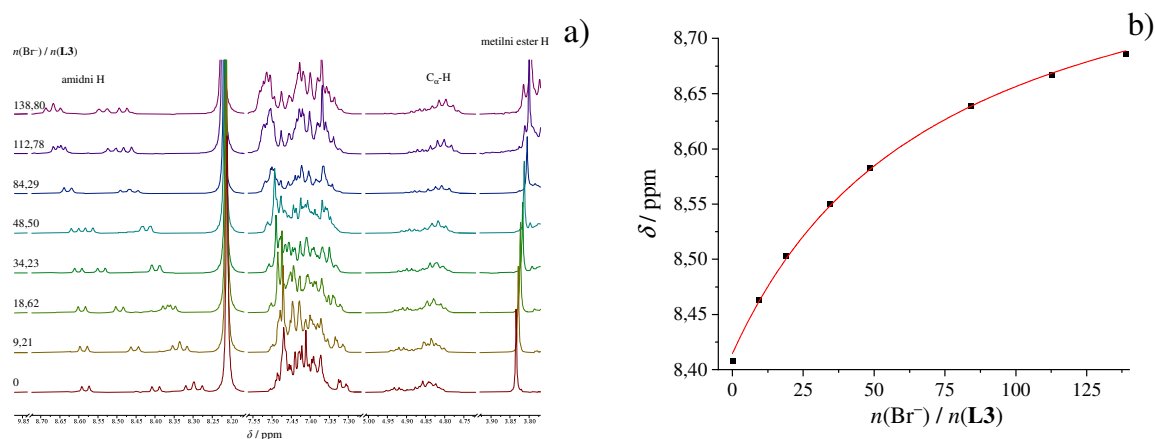
Slika D92. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 1,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija DMF-a s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



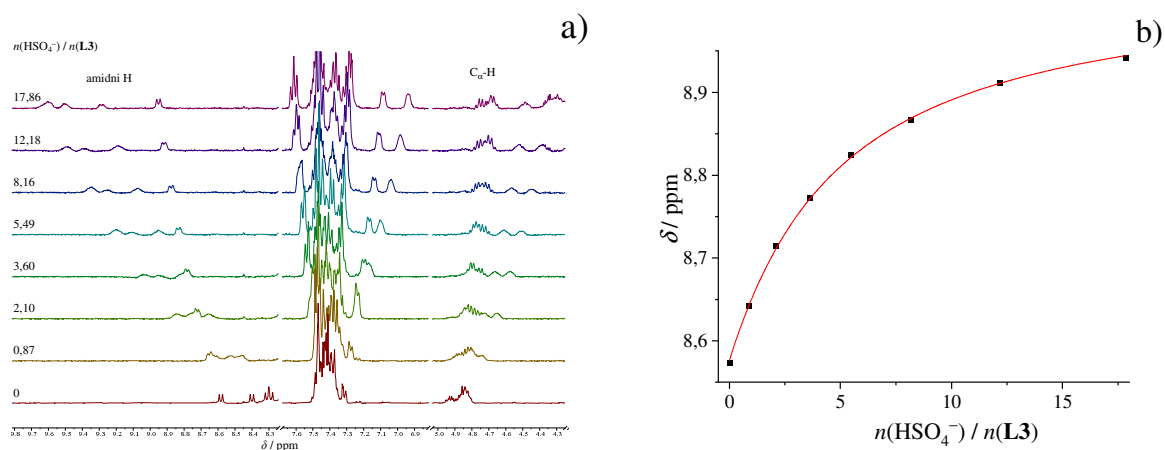
Slika D93. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH₂PO₄ ($c = 0,0302 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



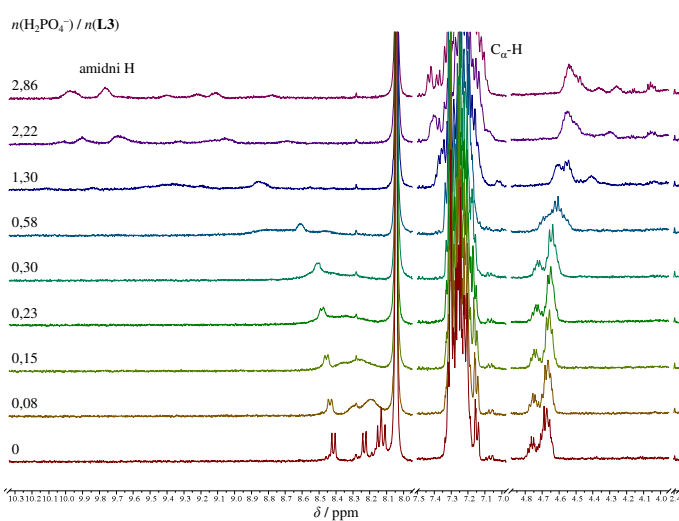
Slika D94. a) ^1H NMR titracija **L3** ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,515 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L3** pri 8,30 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



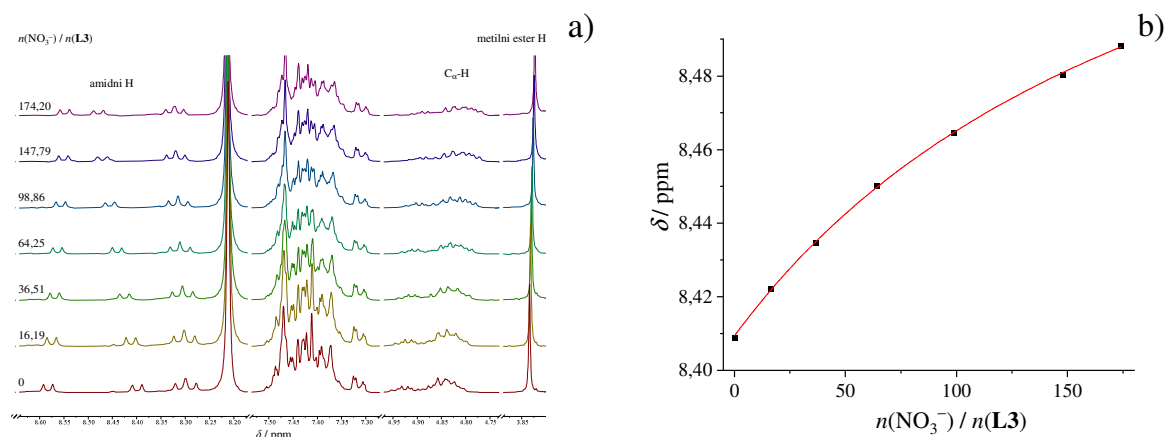
Slika D95. a) ^1H NMR titracija **L3** ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,365 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L3** pri 8,40 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



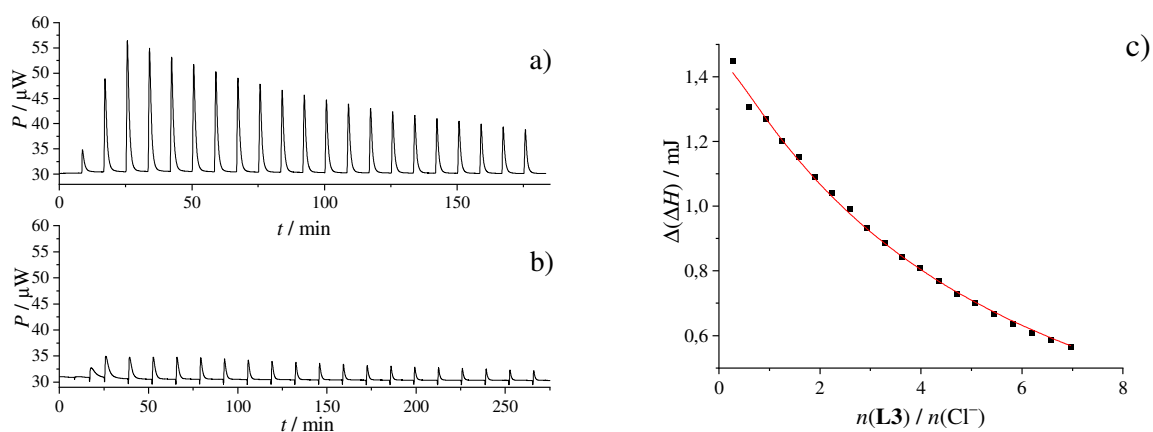
Slika D96. a) ^1H NMR titracija **L3** ($c = 9,77 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0486 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L3** pri 8,55 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



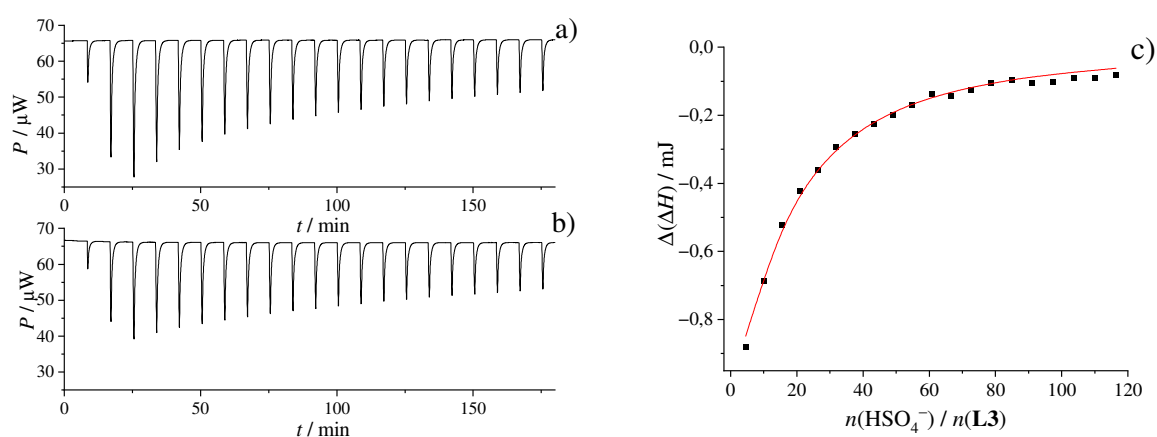
Slika D97. a) ^1H NMR titracija **L3** ($c = 9,77 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 7,60 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



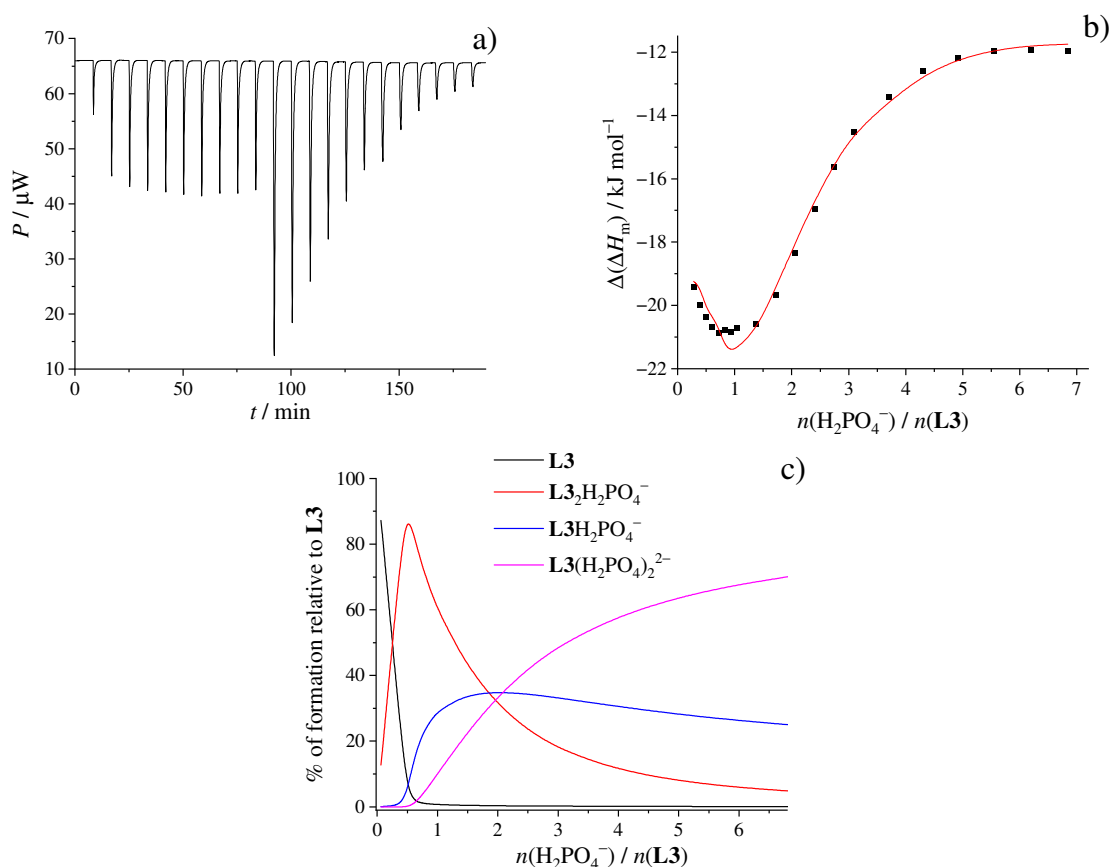
Slika D98. a) ^1H NMR titracija **L3** ($c = 9,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,441 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **L3** pri 8,41 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



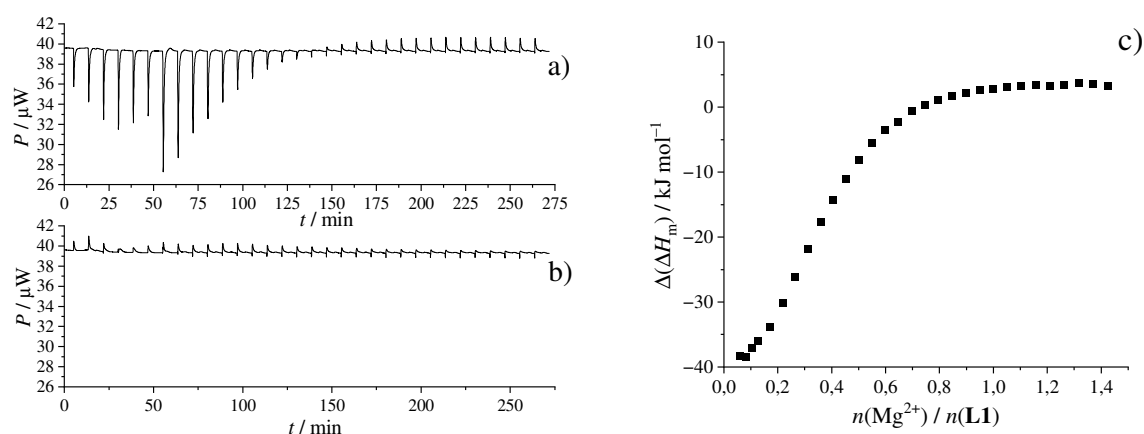
Slika D99. a) Mikrokolorimetrijska titracija TEACl ($c = 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s **L3** ($c = 0,0601 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokolorimetrijska titracija DMF-a s **L3** ($c = 0,0601 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{L3}) / n(\text{Cl}^-)$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



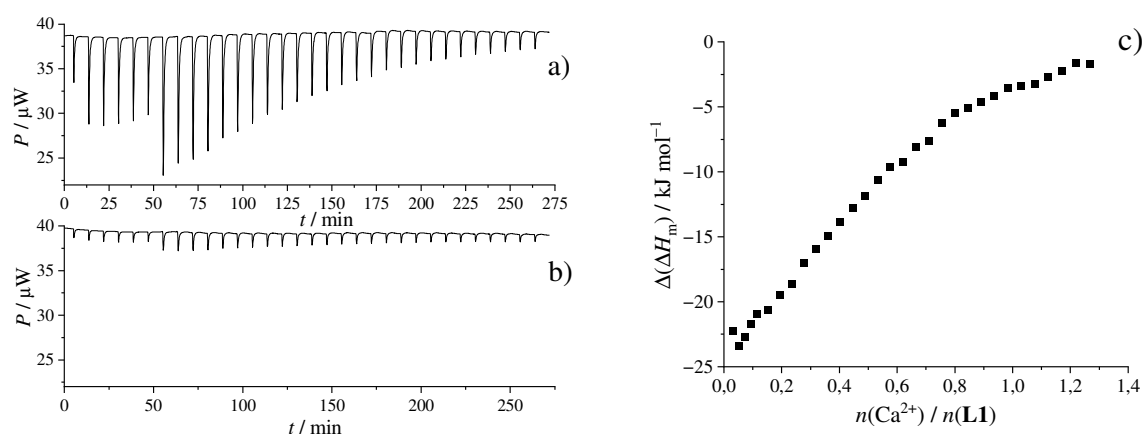
Slika D100. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 1,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija DMF-a s TBAHSO₄ ($c = 0,050 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



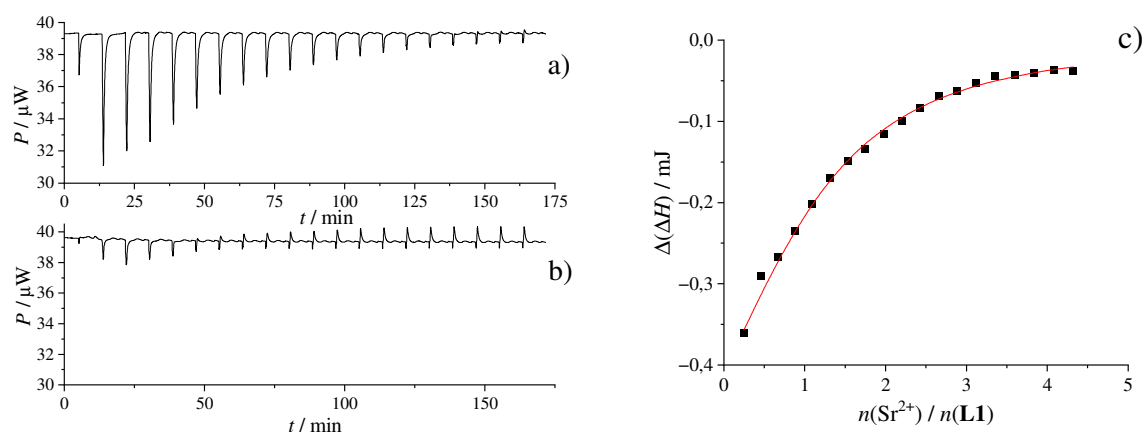
Slika D101. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 5,02 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAH₂PO₄ ($c = 0,0153 \text{ mol dm}^{-3}$) u DMF-u; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



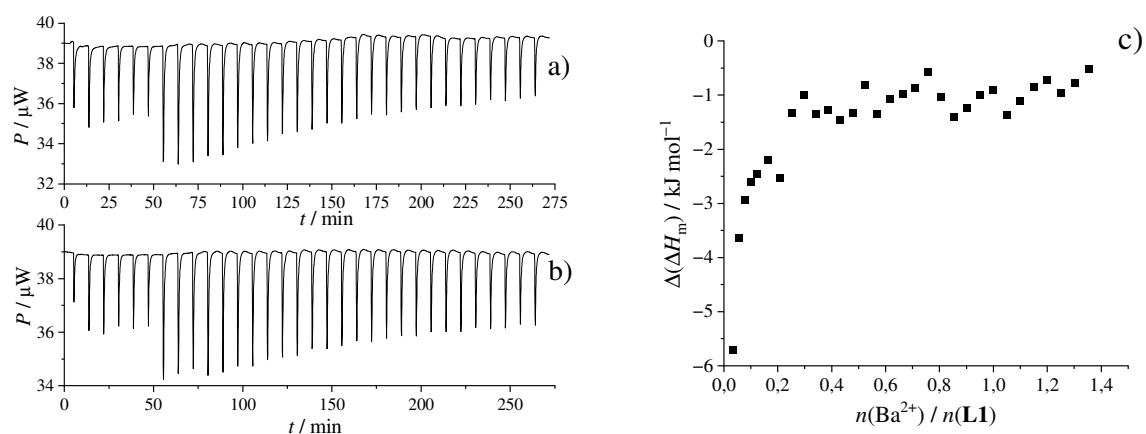
Slika D102. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 2,35 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L1})$.



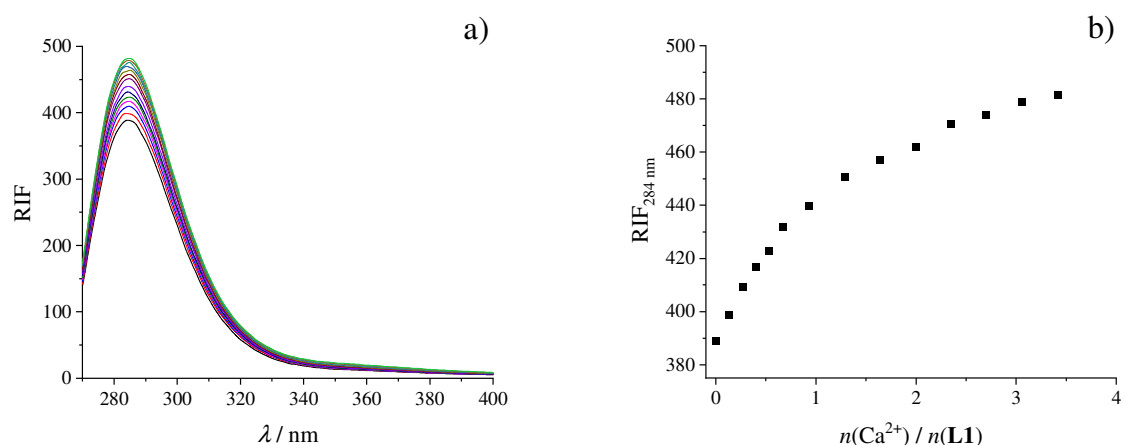
Slika D103. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 5,14 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,97 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,97 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{L1})$.



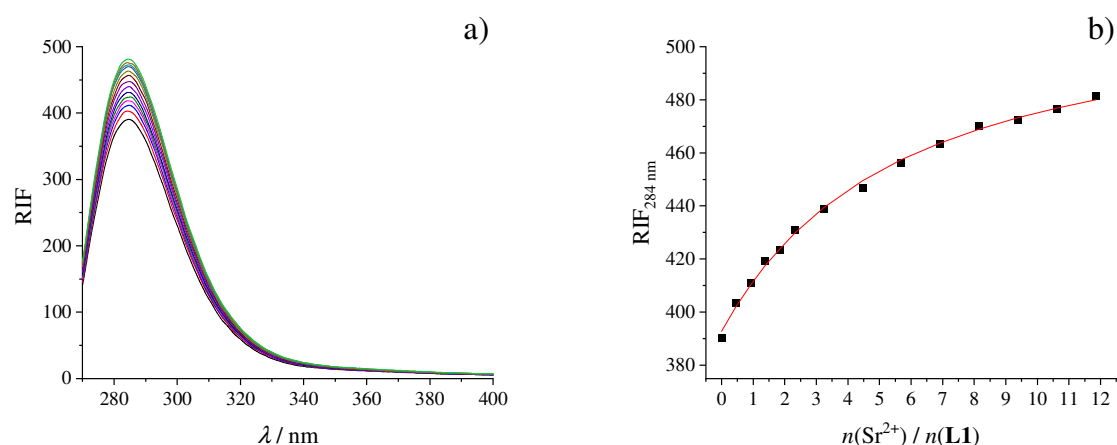
Slika D104. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 2,57 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 5,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 5,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



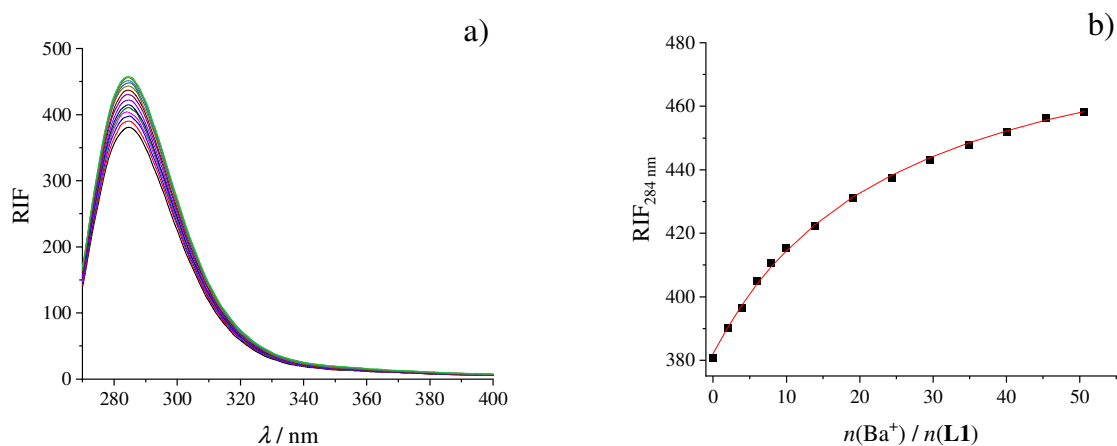
Slika D105. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L1** ($c = 4,89 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L1})$.



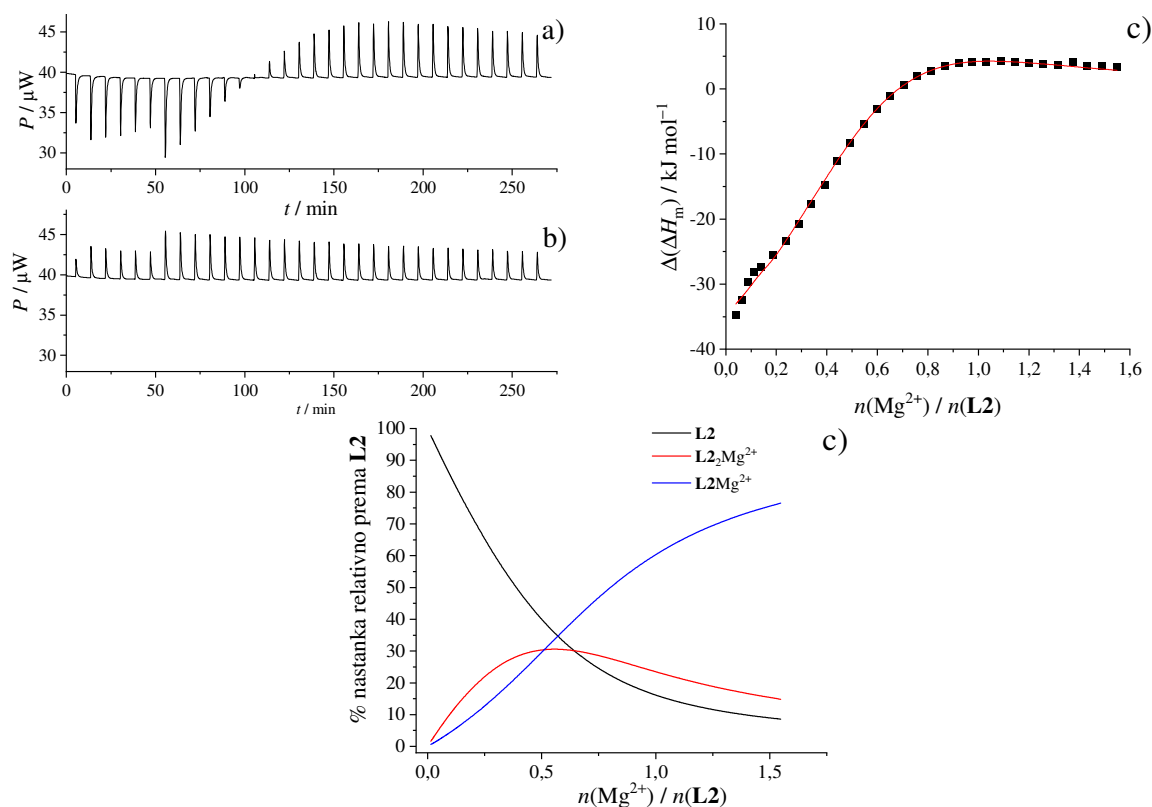
Slika D106. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L1** ($c = 1,06 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,06 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{L1})$.



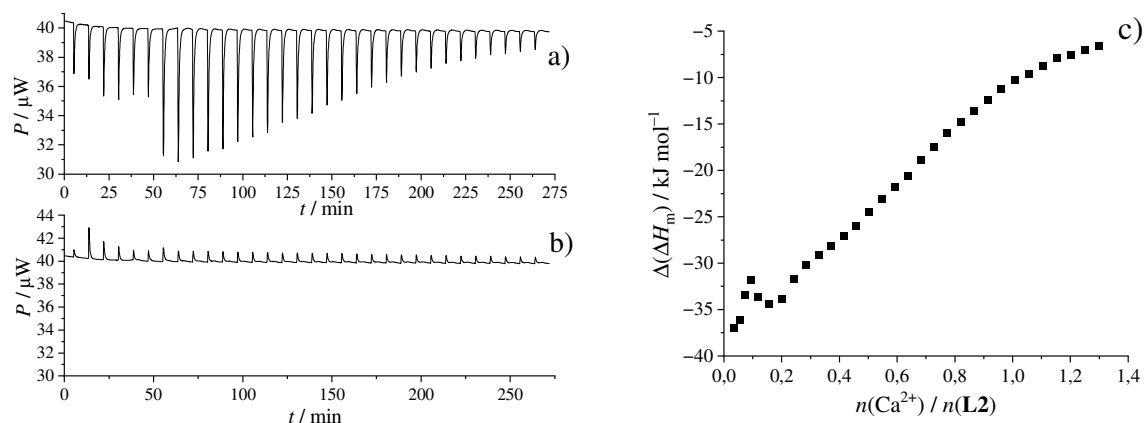
Slika D107. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L1** ($c = 1,06 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,14 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



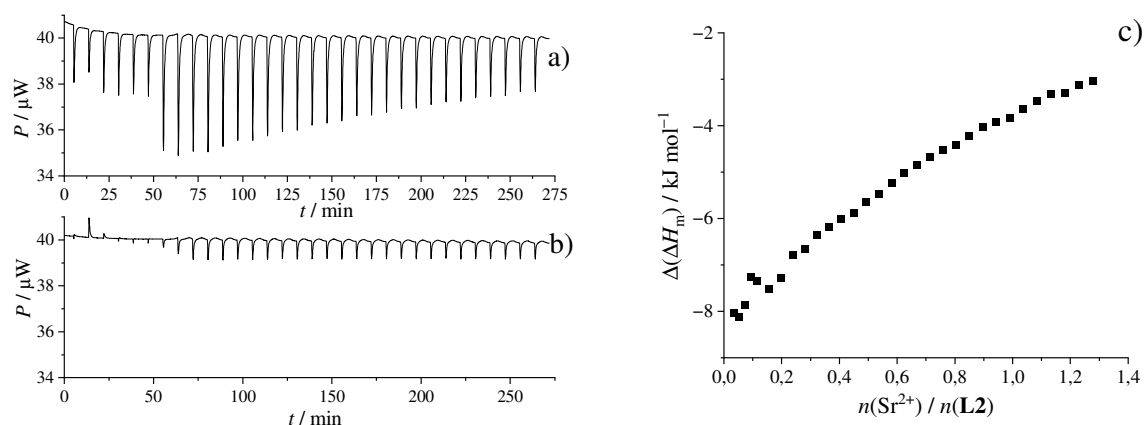
Slika D108. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L1** ($c = 1,04 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L1})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



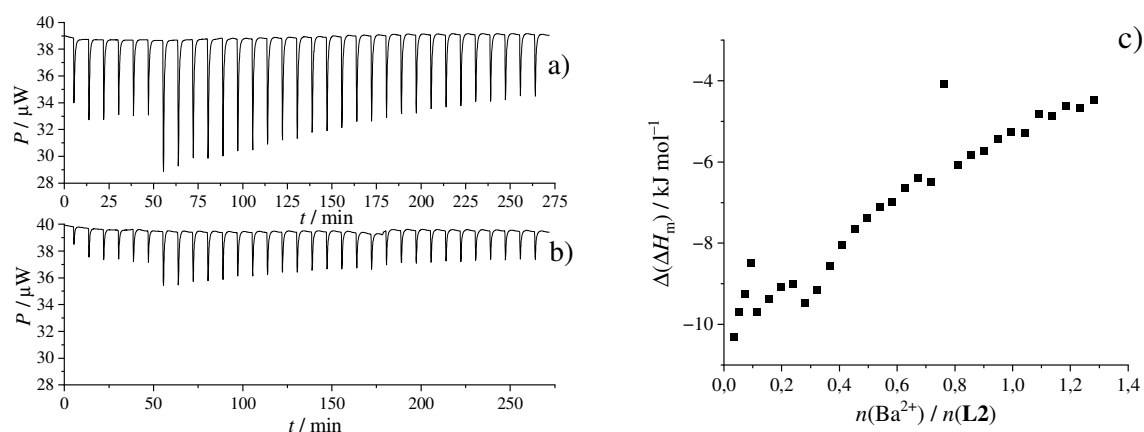
Slika D109. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 5,03 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



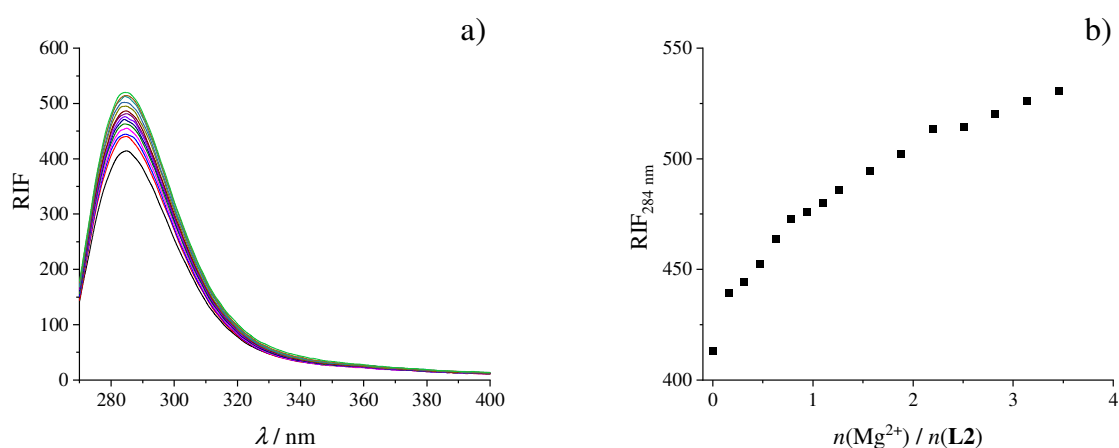
Slika D110. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 2,51 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,49 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,49 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\mathbf{L2})$.



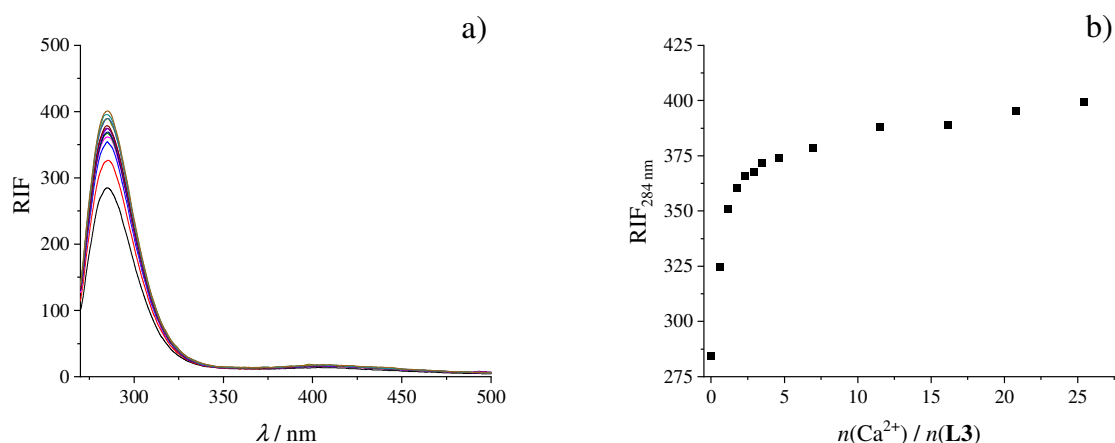
Slika D111. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\mathbf{L2})$.



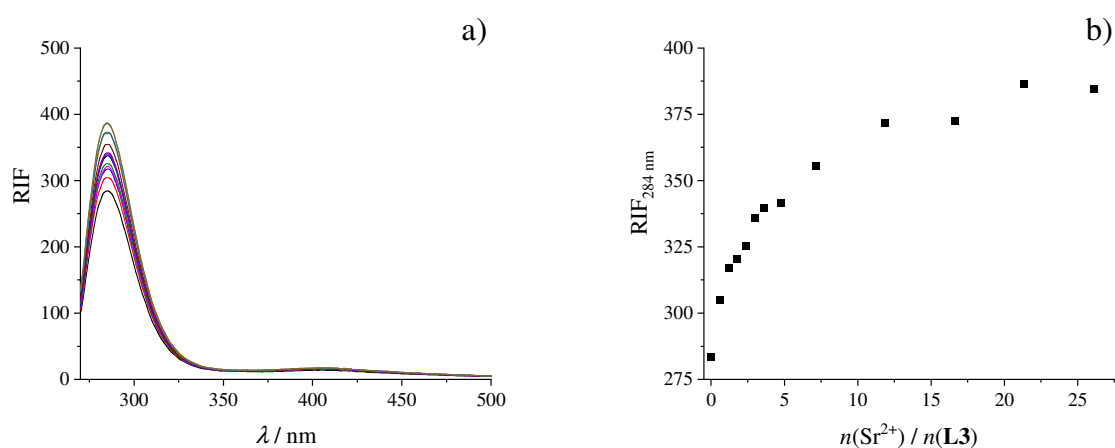
Slika D112. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L2** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L2})$.



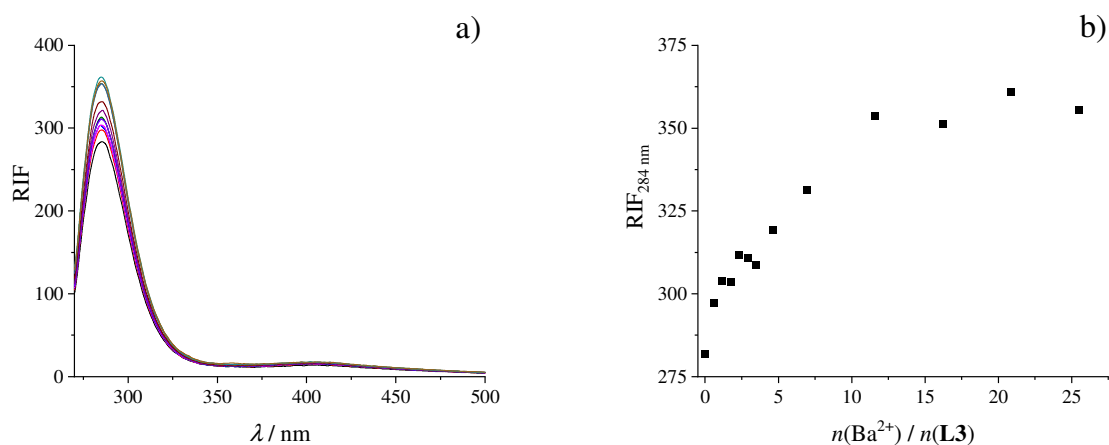
Slika D113. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L2** ($c = 5,31 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 4,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm , izlazna 10 nm . Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L2})$.



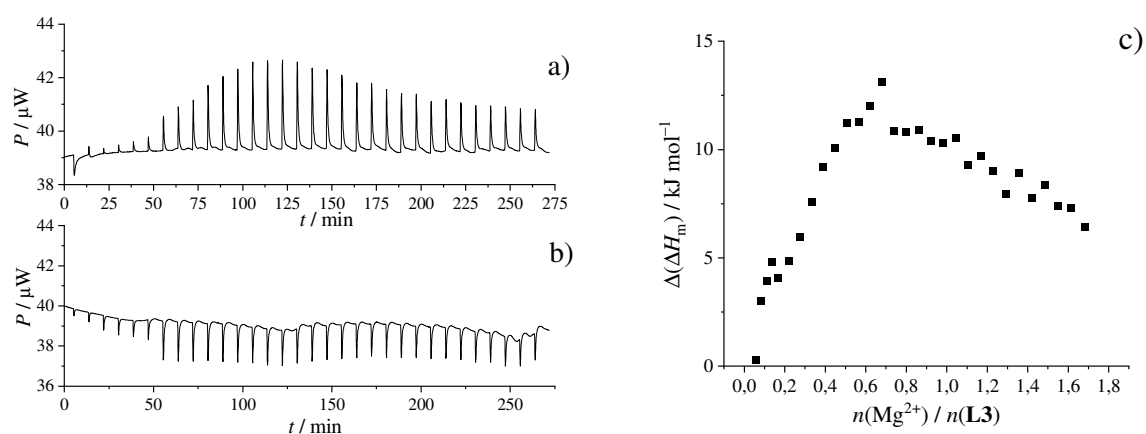
Slika D114. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L2** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,97 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{L2})$.



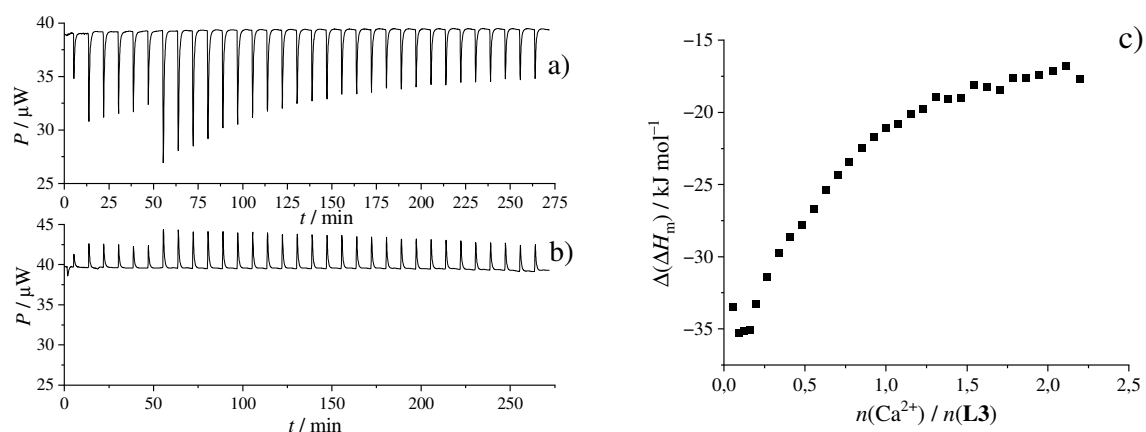
Slika D115. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L2** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,06 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{L2})$.



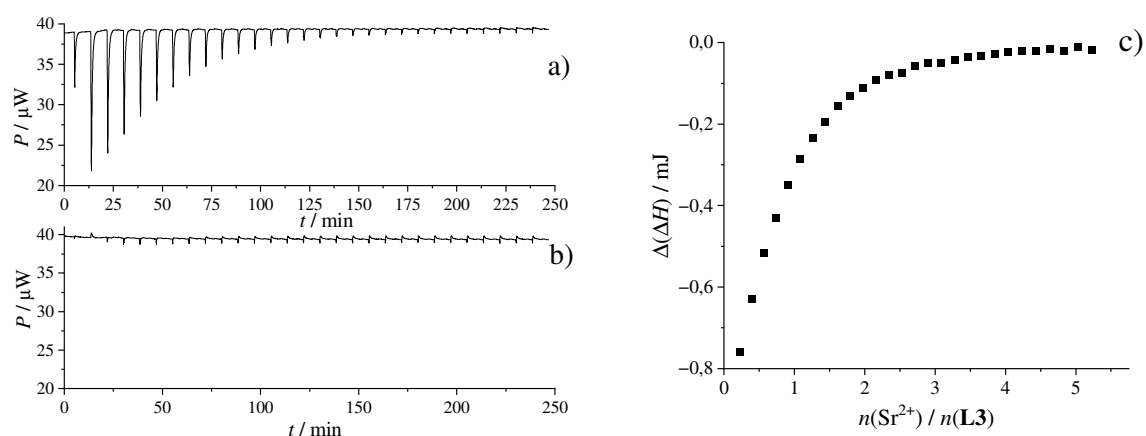
Slika D116. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L2** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,99 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L2})$.



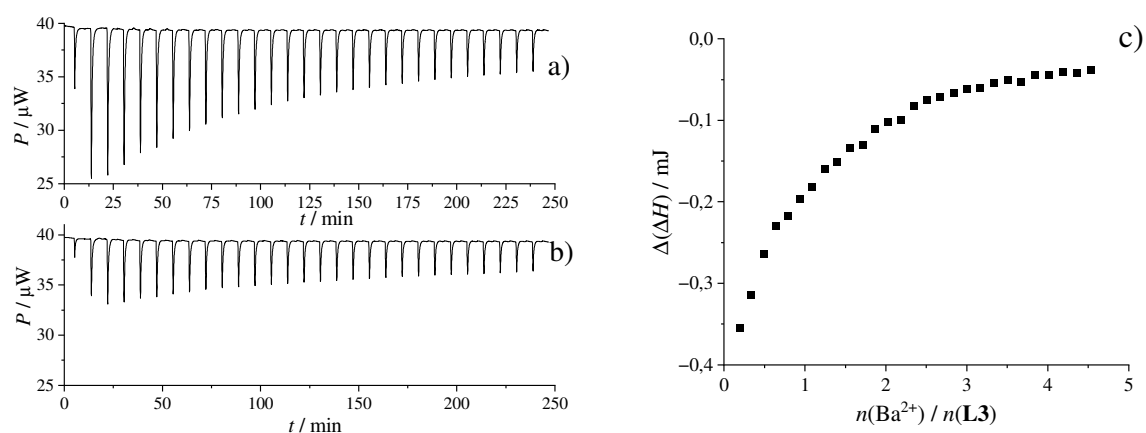
Slika D117. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 2,55 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L3})$.



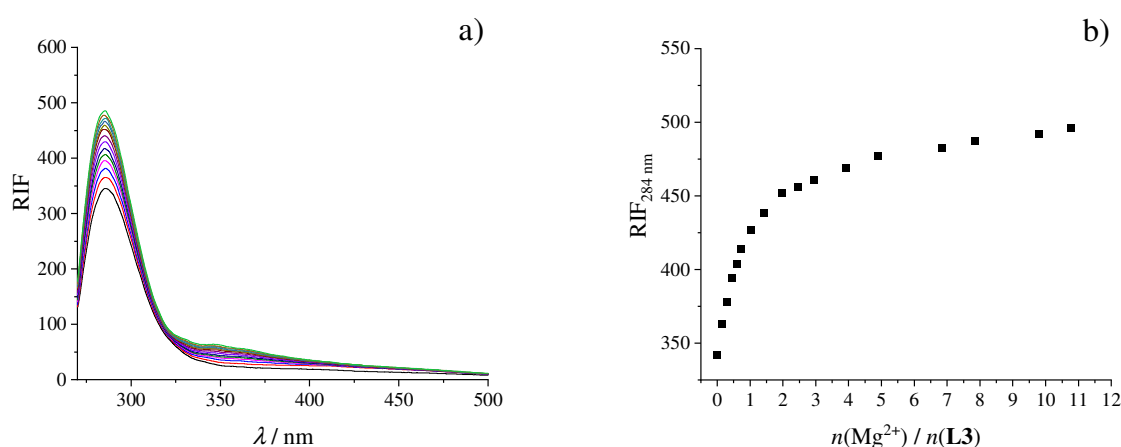
Slika D118. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 2,50 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,51 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,51 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{L3})$.



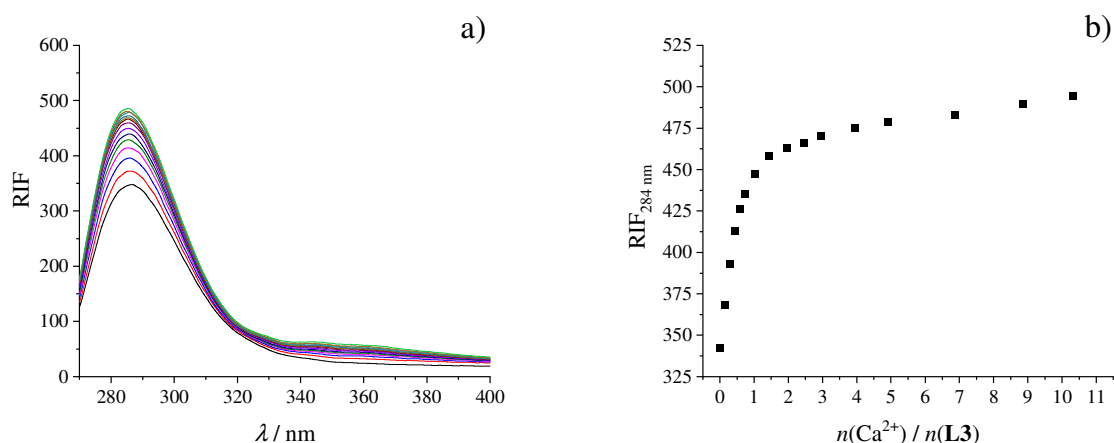
Slika D119. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 1,95 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 4,66 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 4,66 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{L3})$.



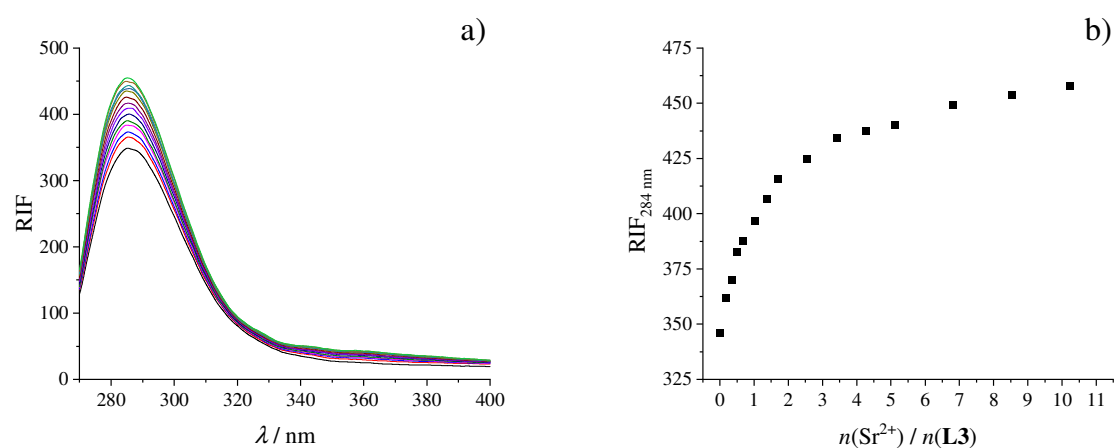
Slika D120. a) Mikrokalorimetrijska titracija **L3** ($c = 1,95 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 4,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 4,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L3})$.



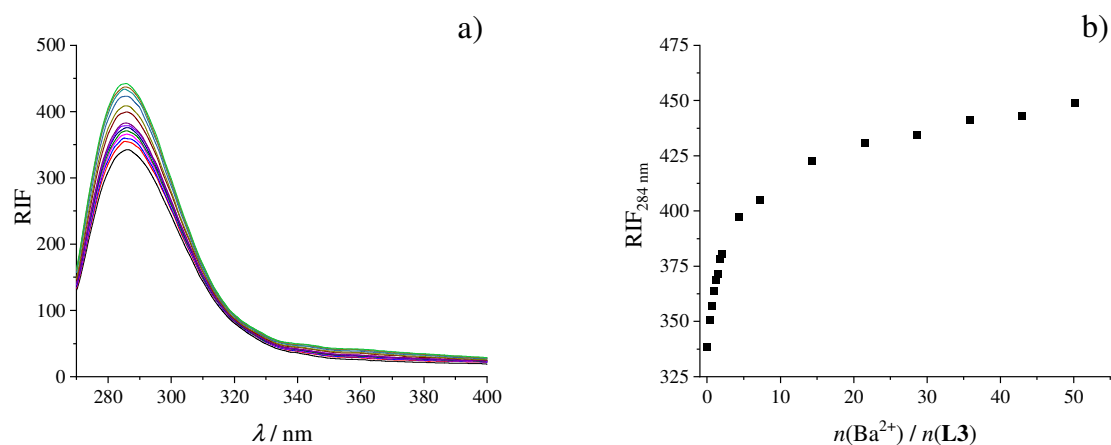
Slika D121. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L3** ($c = 9,53 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{L3})$.



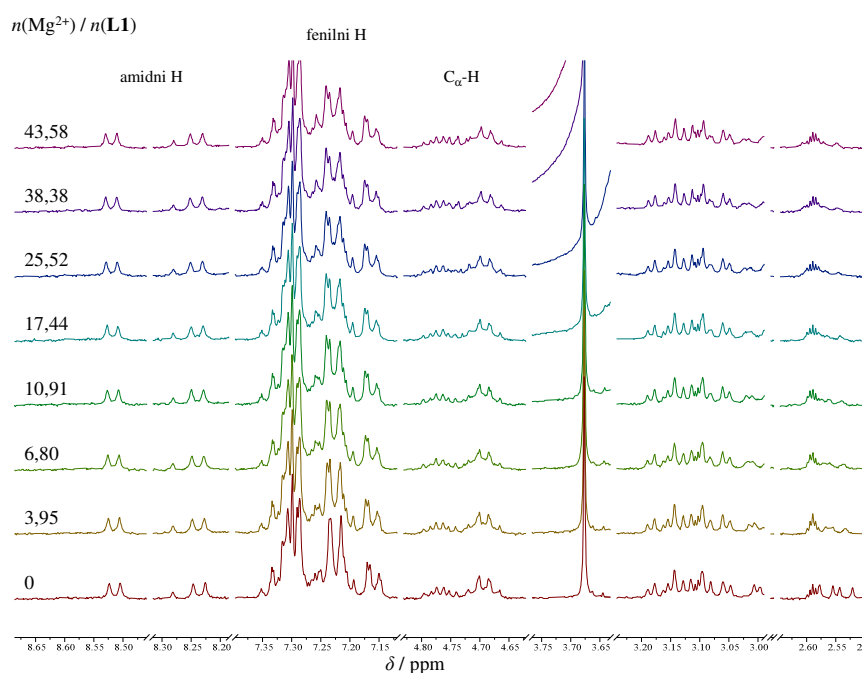
Slika D122. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L3** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,06 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{L2})$.



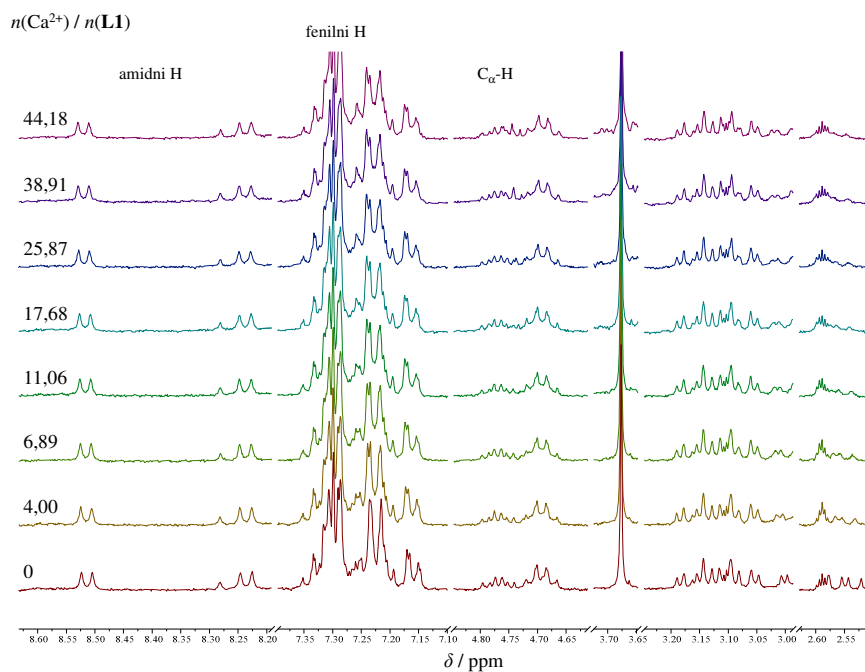
Slika D123. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L3** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,14 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{L3})$.



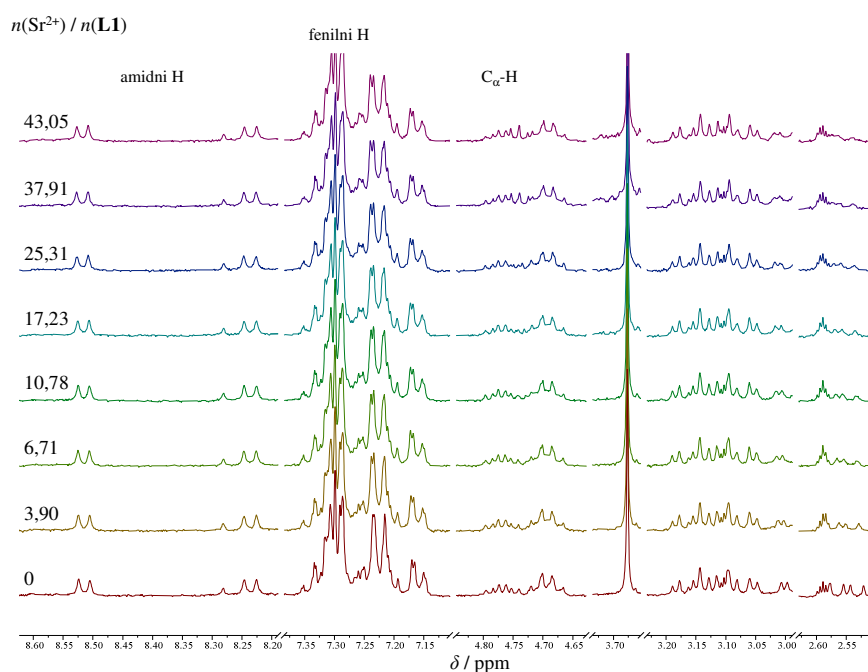
Slika D124. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **L3** ($c = 5,86 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 284 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{L3})$.



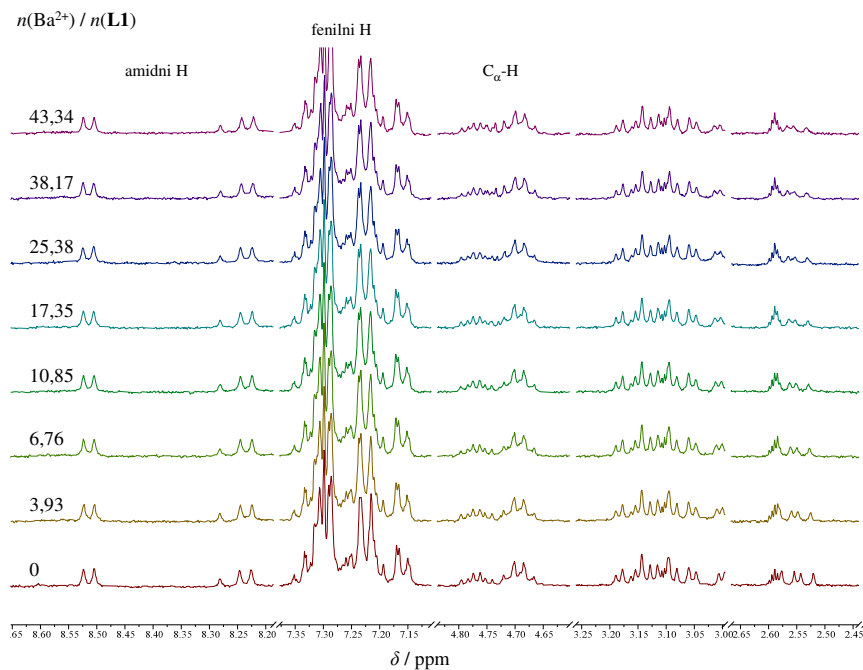
Slika D125. a) ^1H NMR titracija liganda **L1** ($c = 4,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0505 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



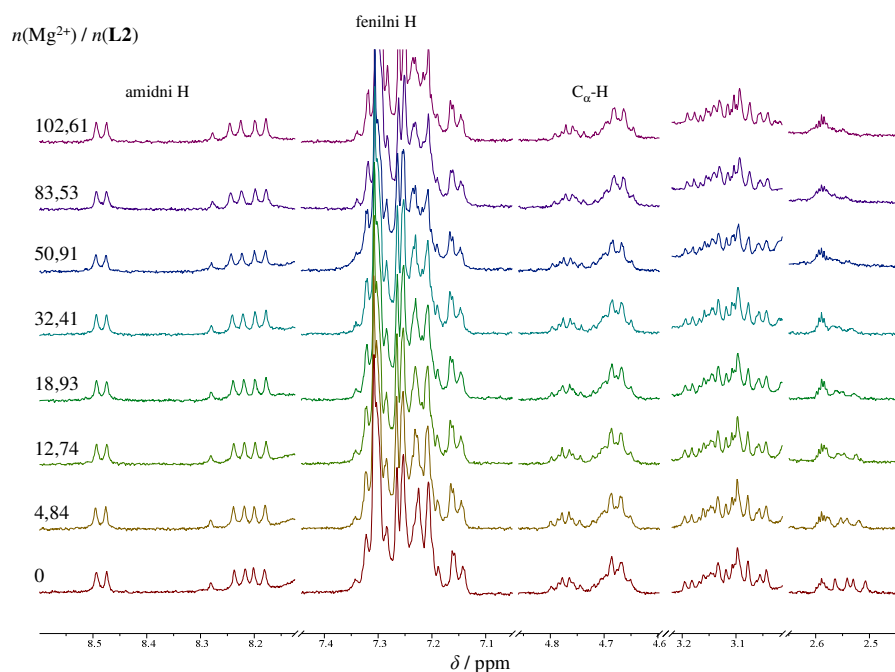
Slika D126. a) ^1H NMR titracija liganda **L1** ($c = 4,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0512 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



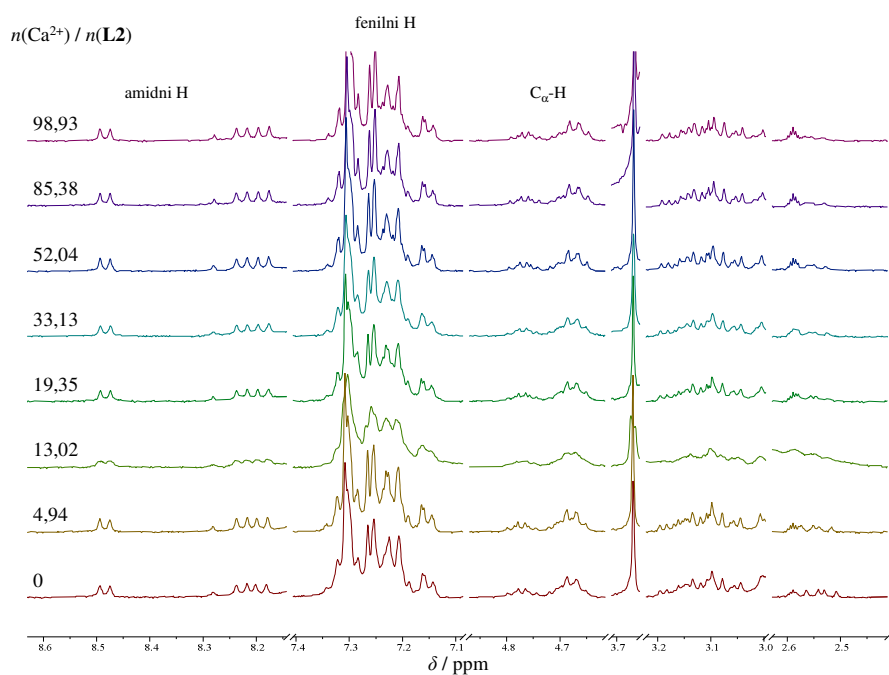
Slika D127. a) ^1H NMR titracija liganda **L1** ($c = 4,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0499 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



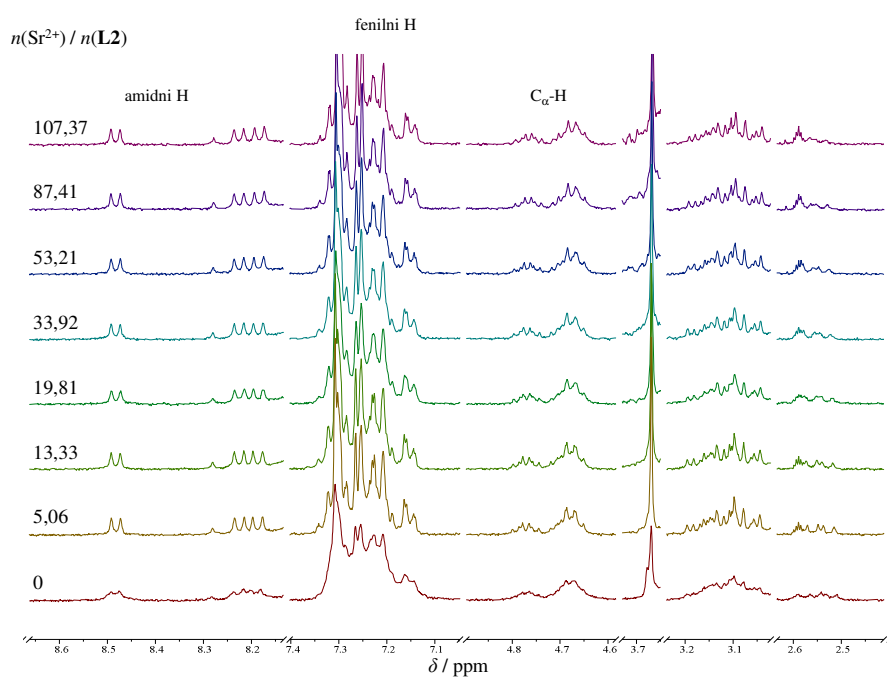
Slika D128. a) ^1H NMR titracija liganda **L1** ($c = 4,21 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0503 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L1}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



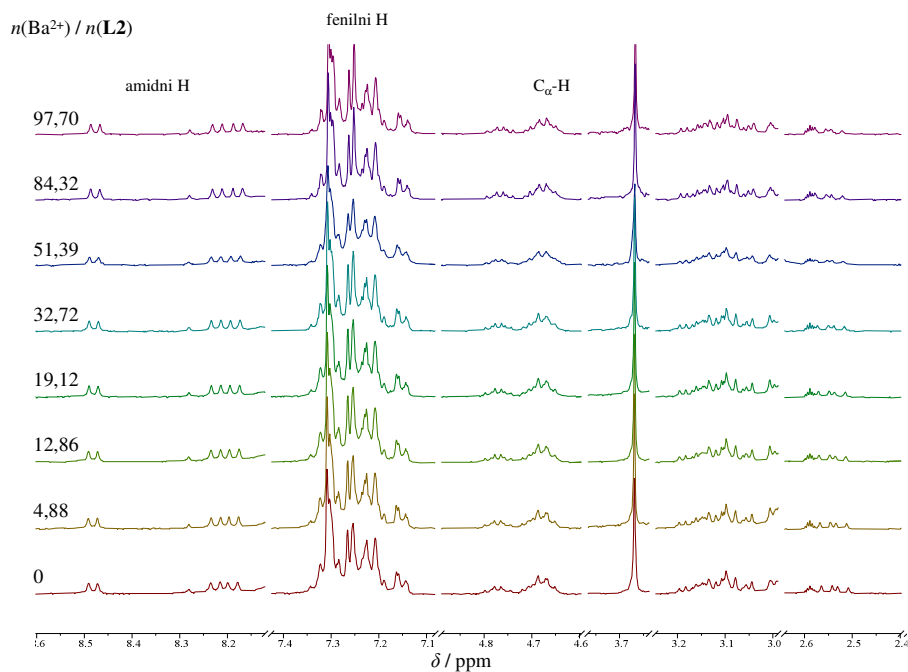
Slika D129. a) ^1H NMR titracija liganda **L2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,330 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



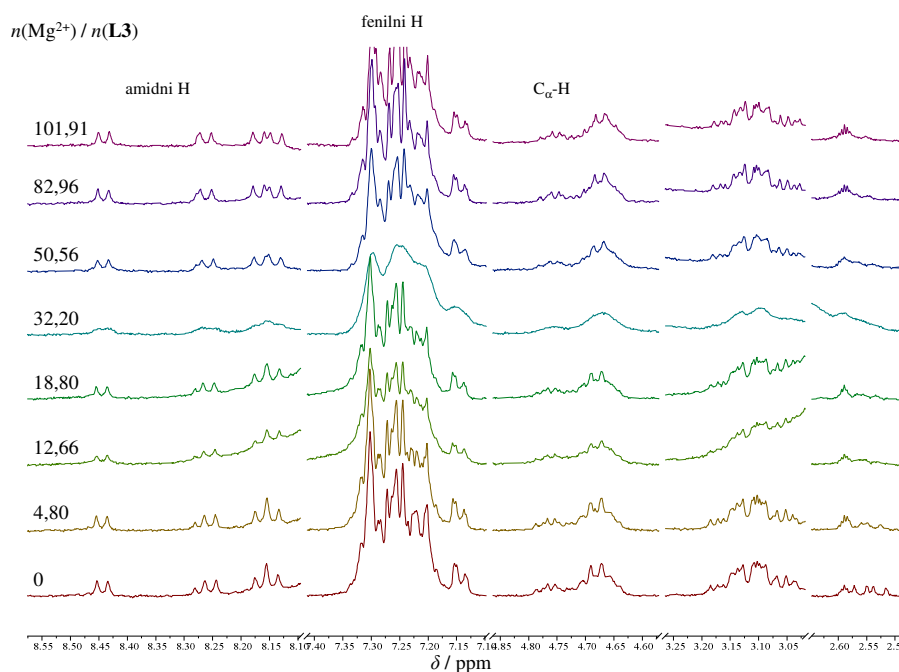
Slika D130. a) ^1H NMR titracija liganda **L2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,337 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



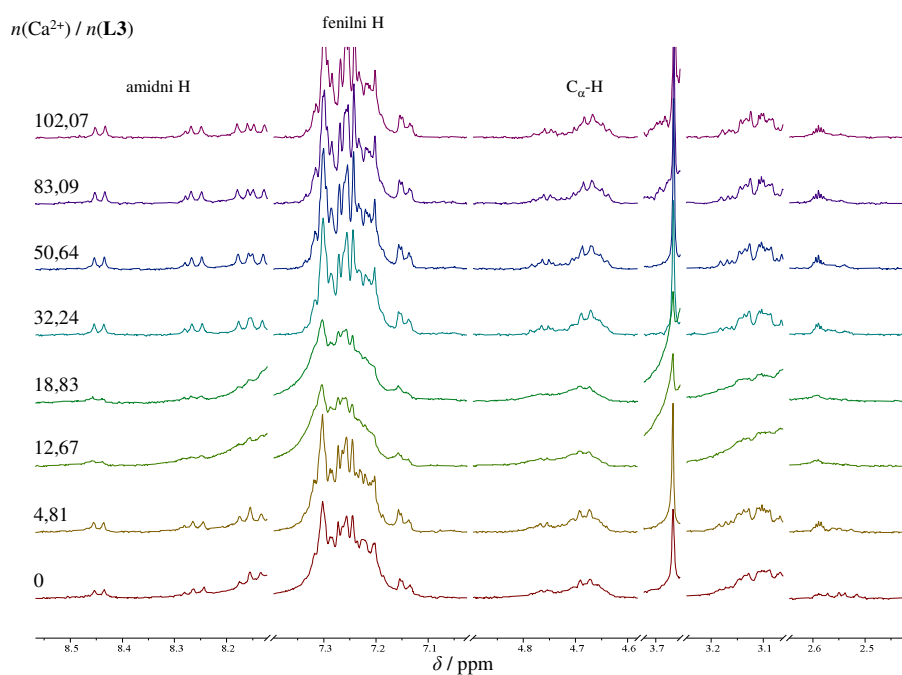
Slika D131. a) ^1H NMR titracija liganda **L2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,345 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



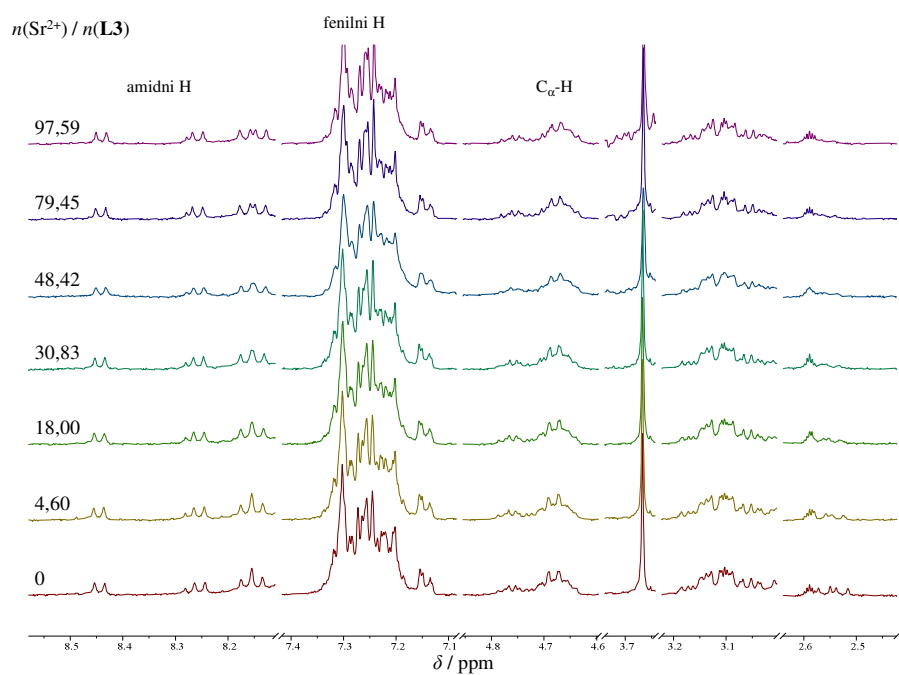
Slika D132. a) ^1H NMR titracija liganda **L2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,333 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L2}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



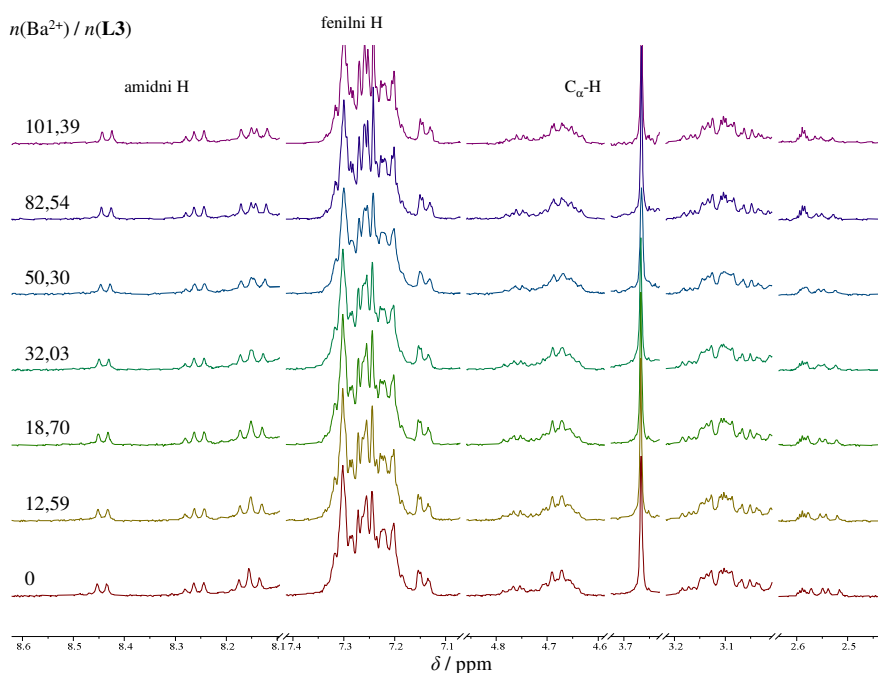
Slika D133. a) ^1H NMR titracija liganda **L3** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,330 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



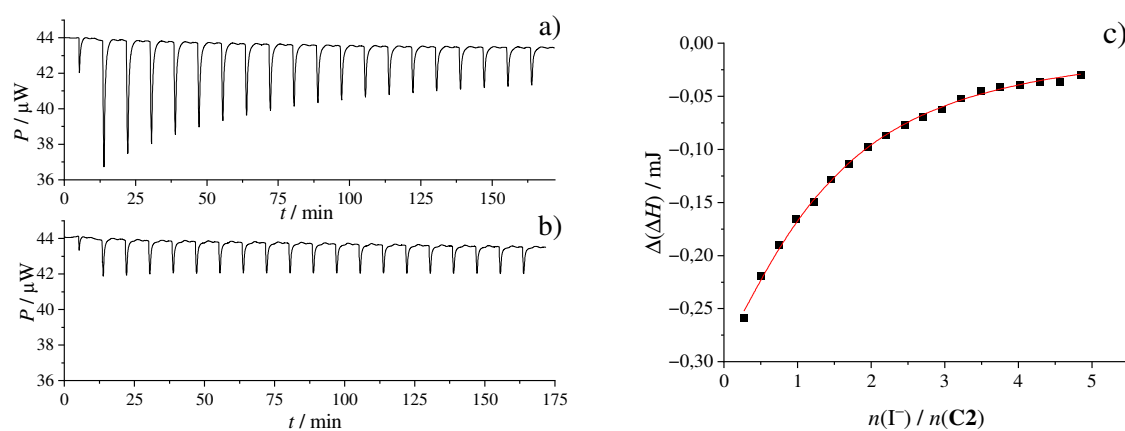
Slika D134. a) ^1H NMR titracija liganda **L3** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,331 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



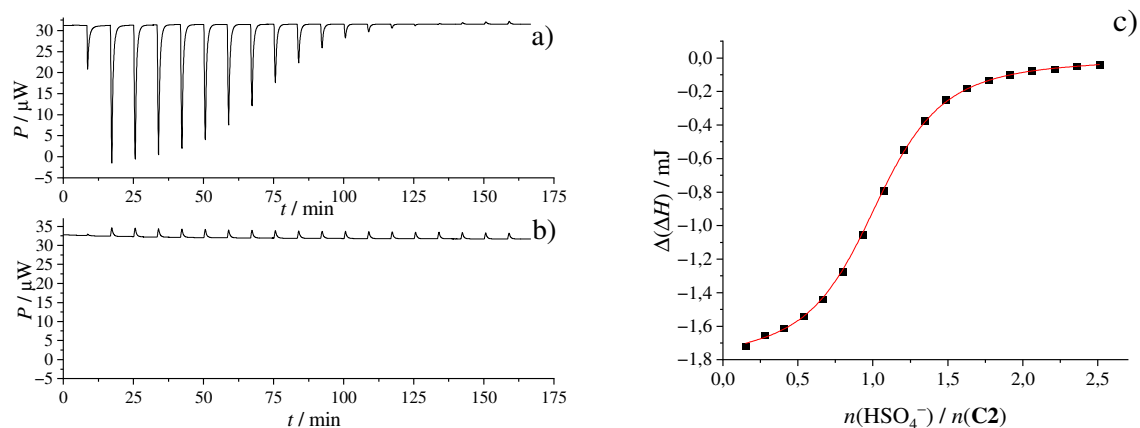
Slika D135. a) ^1H NMR titracija liganda **L3** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,316 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



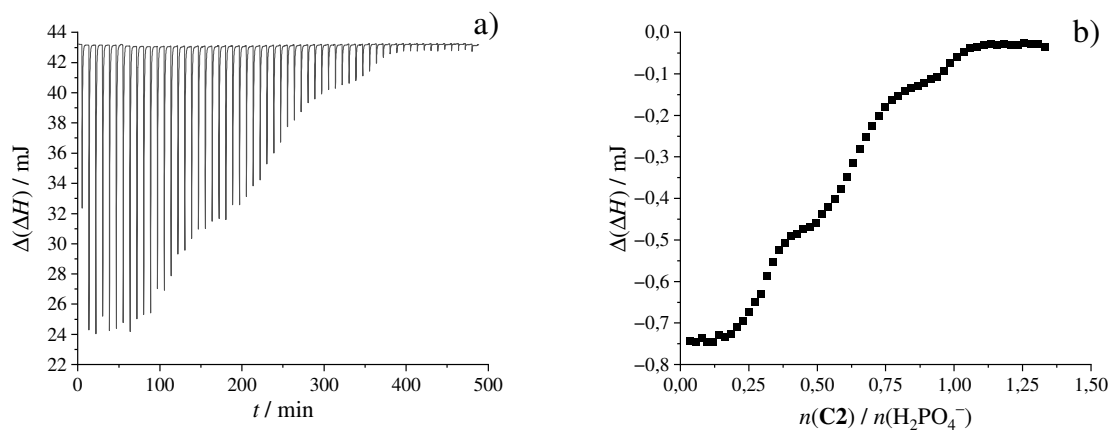
Slika D136. a) ^1H NMR titracija liganda **L3** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,329 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom DMF-u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{L3}) = 0,40 \text{ cm}^3$.



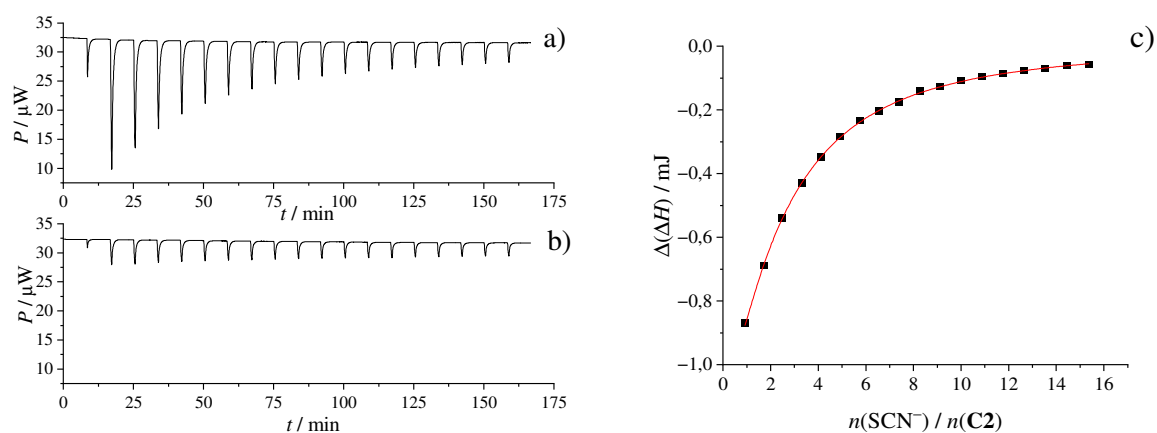
Slika D137. a) Mikrokalorimetrijska titracija **C2** ($c = 4,20 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAI ($c = 9,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAI ($c = 9,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



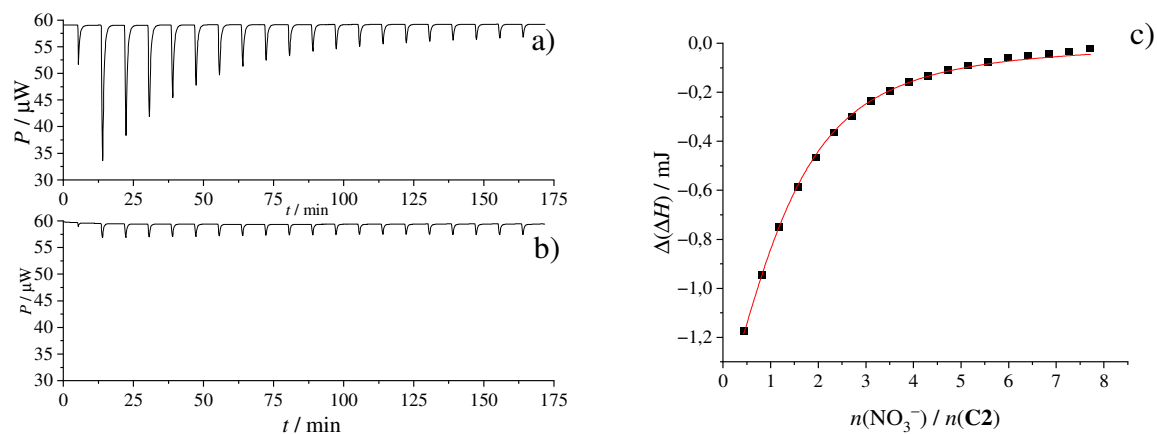
Slika D138. a) Mikrokalorimetrijska titracija **C2** ($c = 4,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 5,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 5,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



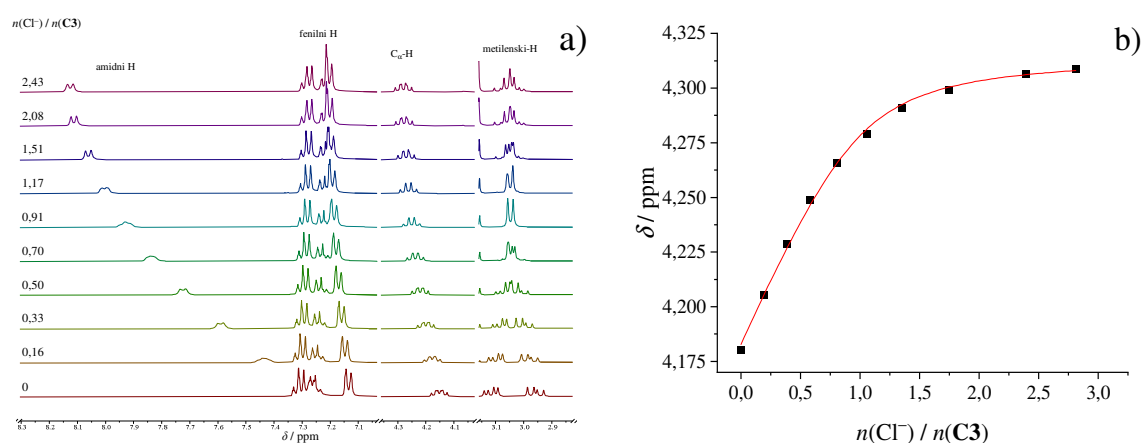
Slika D139. a) Mikrokalorimetrijska titracija TBAH₂PO₄ ($c = 4,92 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s **C2** ($c = 3,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{C2}) / n(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$.



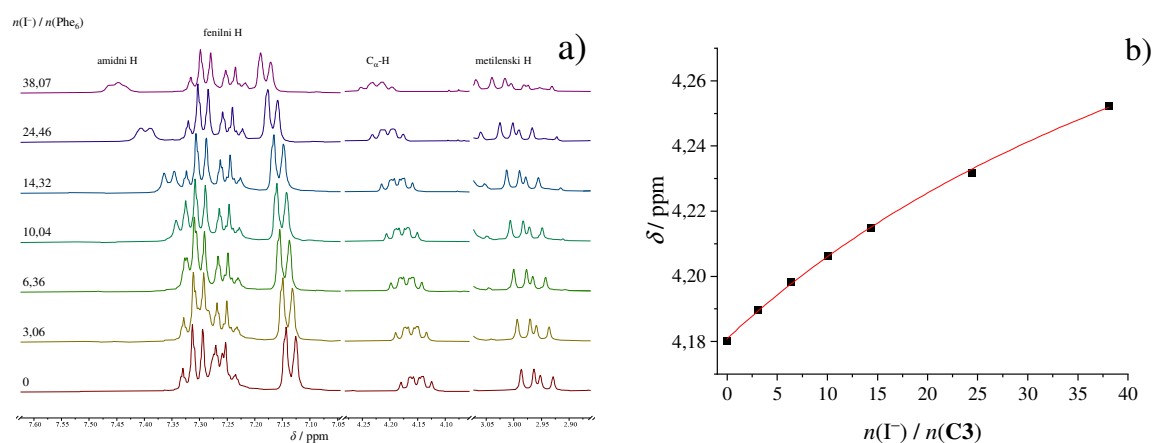
Slika D140. a) Mikrokalorimetrijska titracija **C2** ($c = 4,11 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBASCN ($c = 0,0299 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBASCN ($c = 0,0299 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



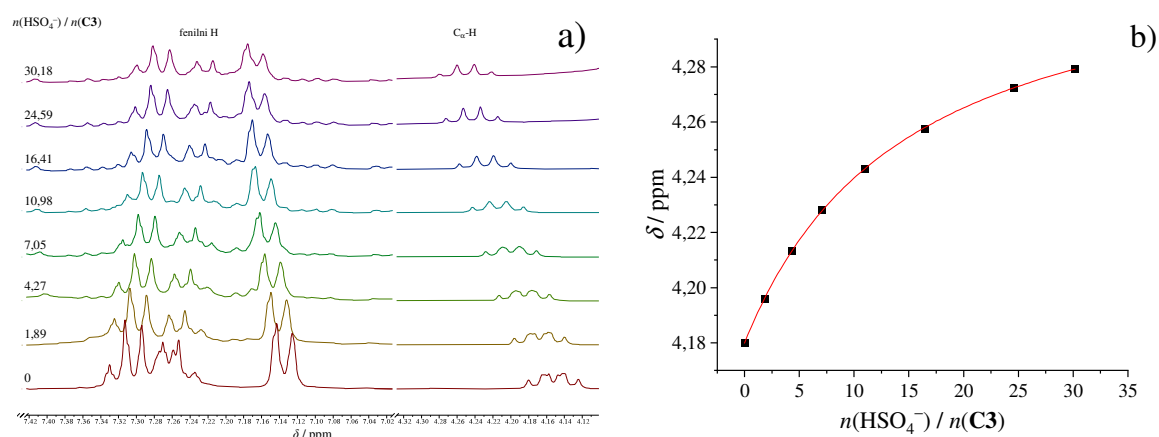
Slika D141. a) Mikrokalorimetrijska titracija **C2** ($c = 4,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBANO₃ ($c = 0,0151 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBANO₃ ($c = 0,0151 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



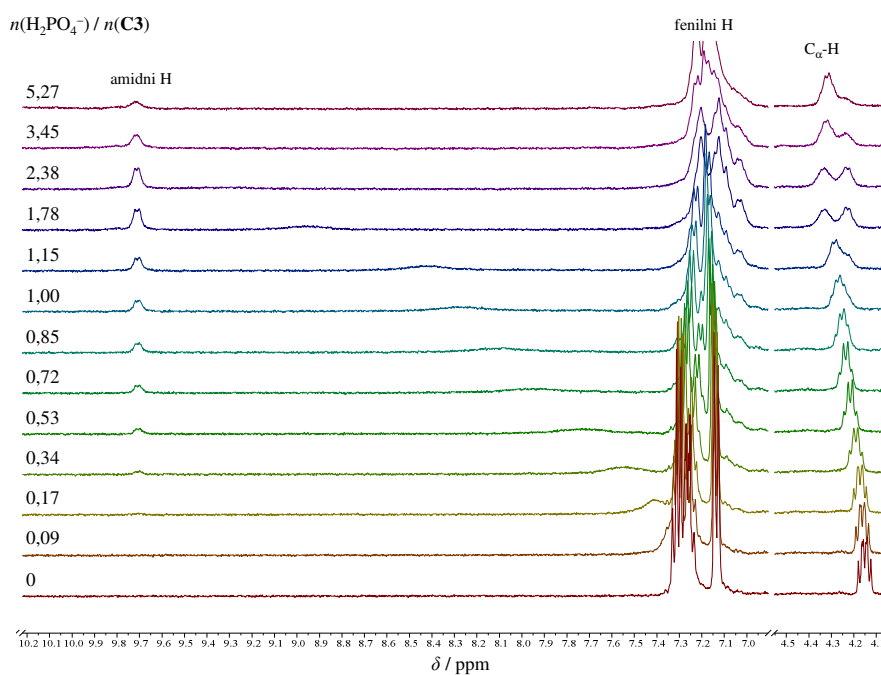
Slika D142. a) ¹H NMR titracija liganda **C3** ($c = 8,588 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 6,437 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C3** na 4,18 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{C3})$.



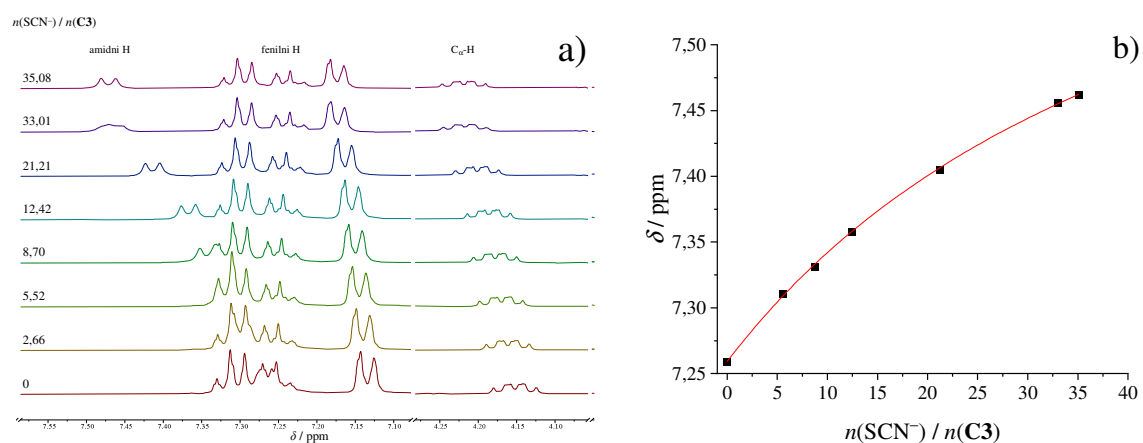
Slika D143. a) ¹H NMR titracija liganda **C3** ($c = 9,917 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,112 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C3** na 4,18 ppm o omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{C3})$.



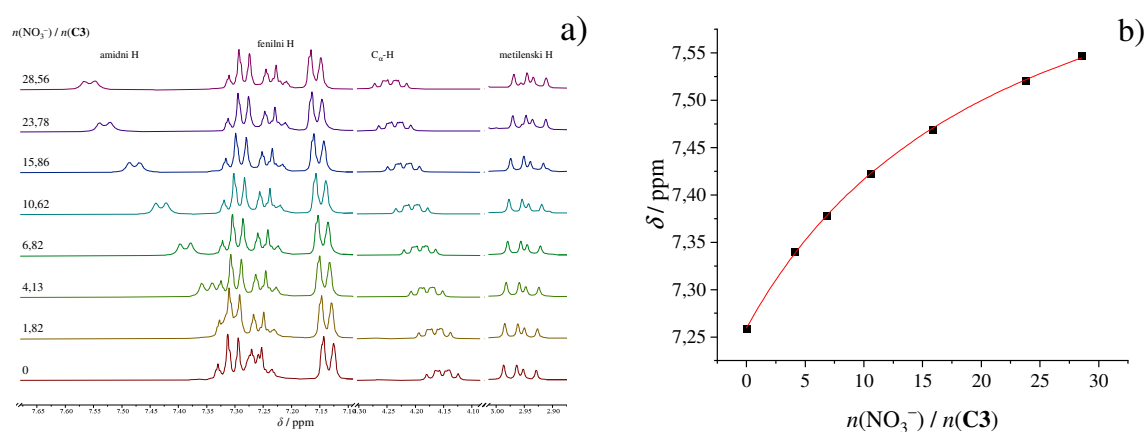
Slika D144. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 9,917 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0798 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C3** na 4,18 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C3})$.



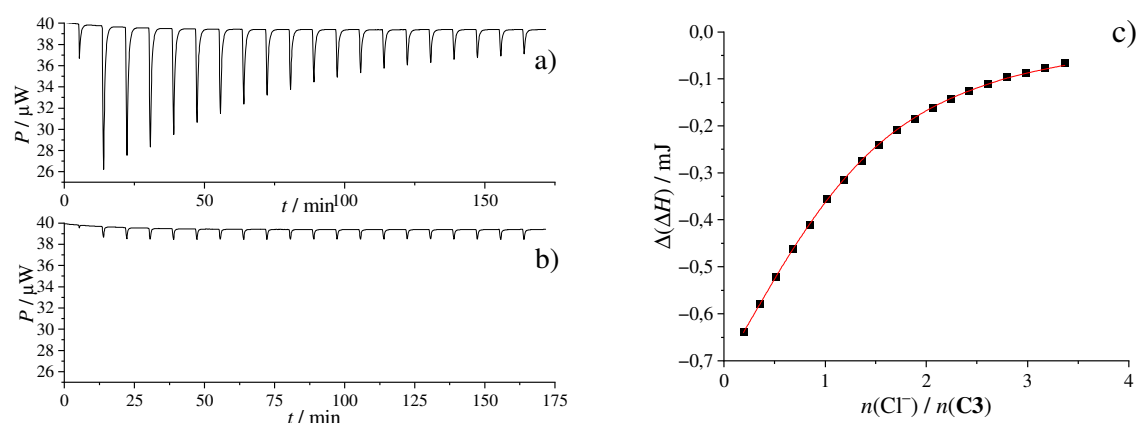
Slika D145. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



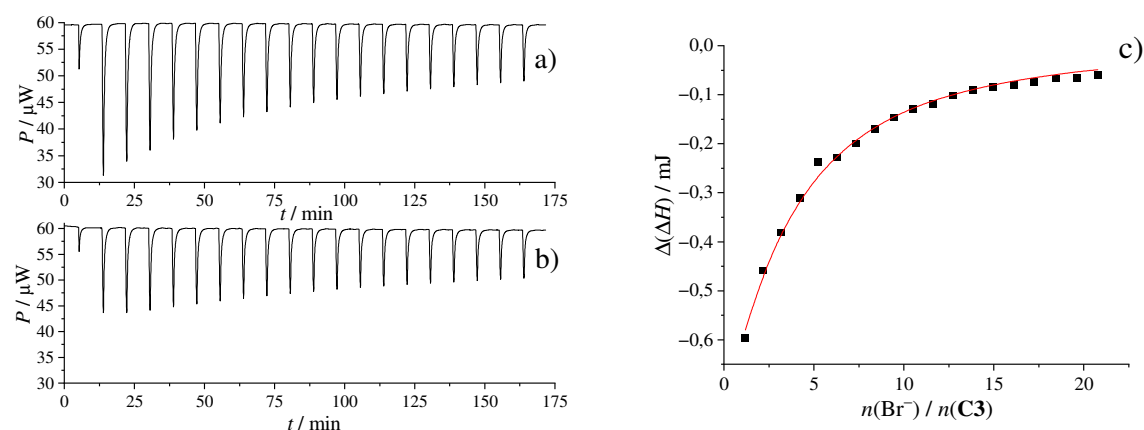
Slika D146. a) ¹H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,101 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C3** na 7,25 ppm o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C3})$.



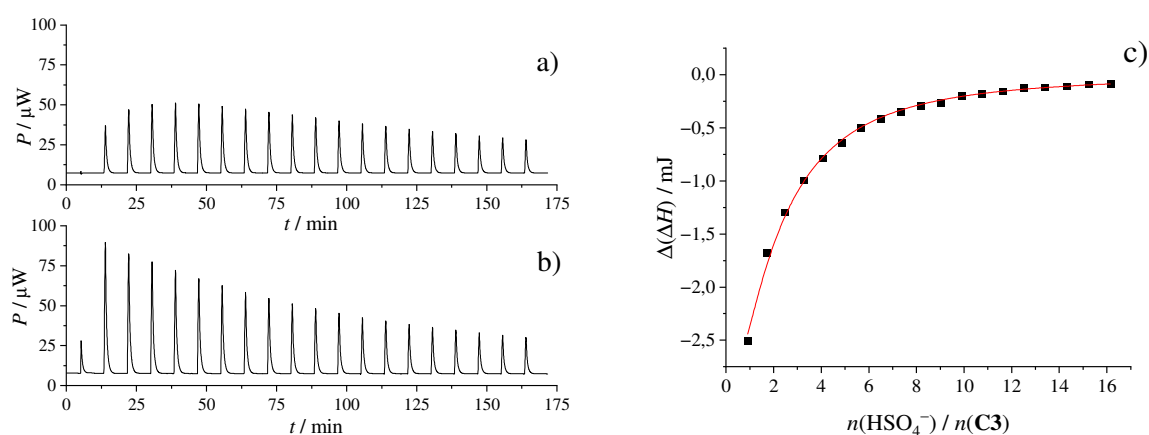
Slika D147. a) ¹H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO₃ ($c = 0,0807 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C3** na 7,25 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C3})$.



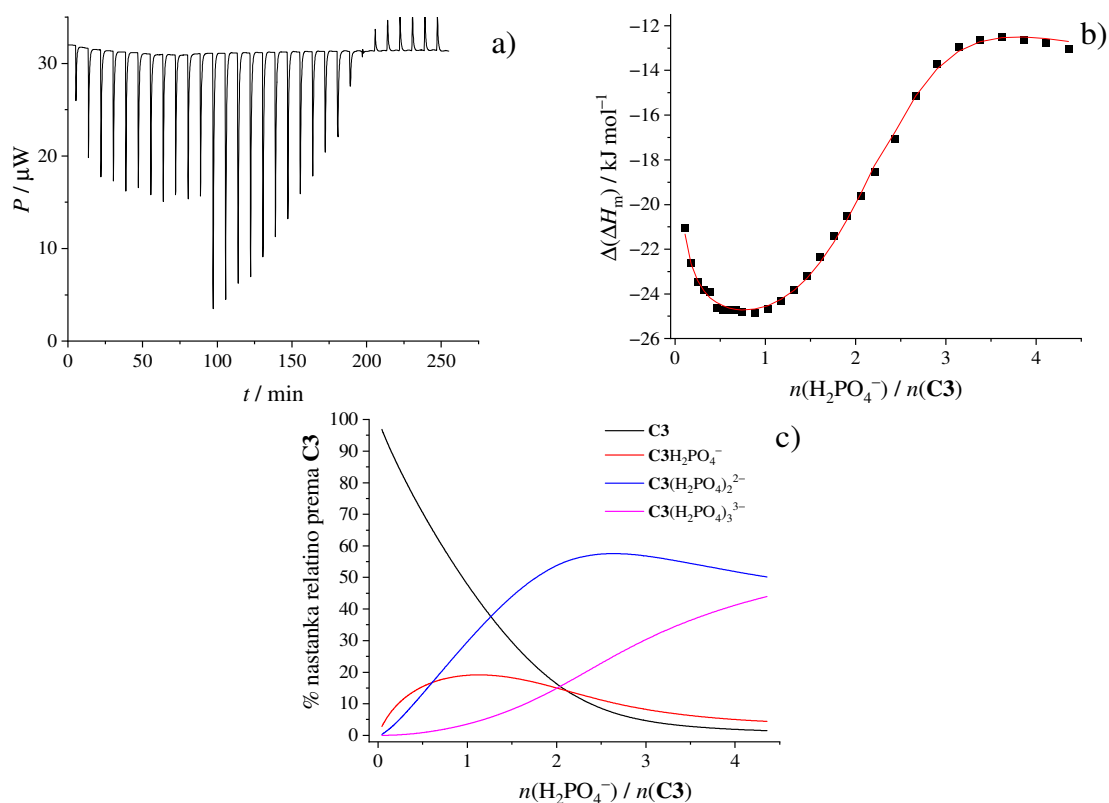
Slika D148. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 4,654 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TEACl ($c = 6,059 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 6,059 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



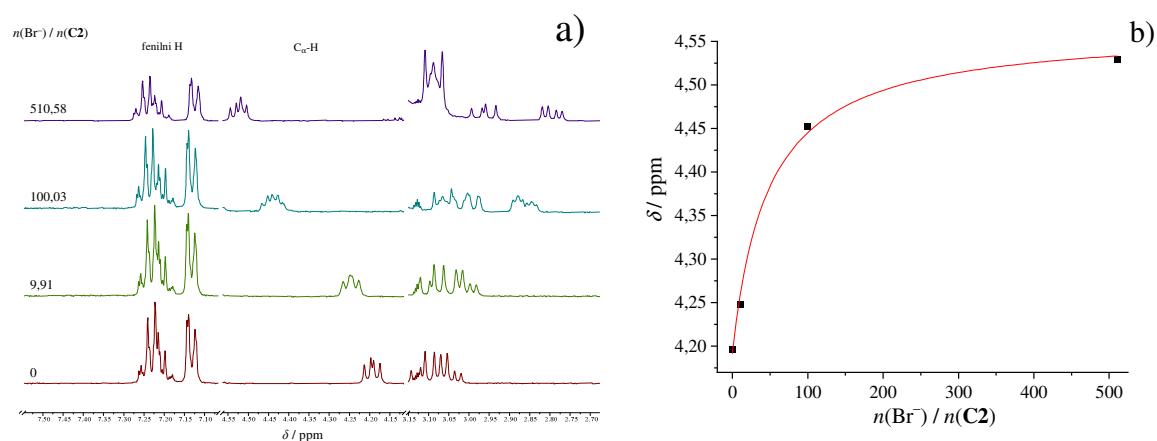
Slika D149. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 5,39 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBABr ($c = 0,0498 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBABr ($c = 0,0498 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



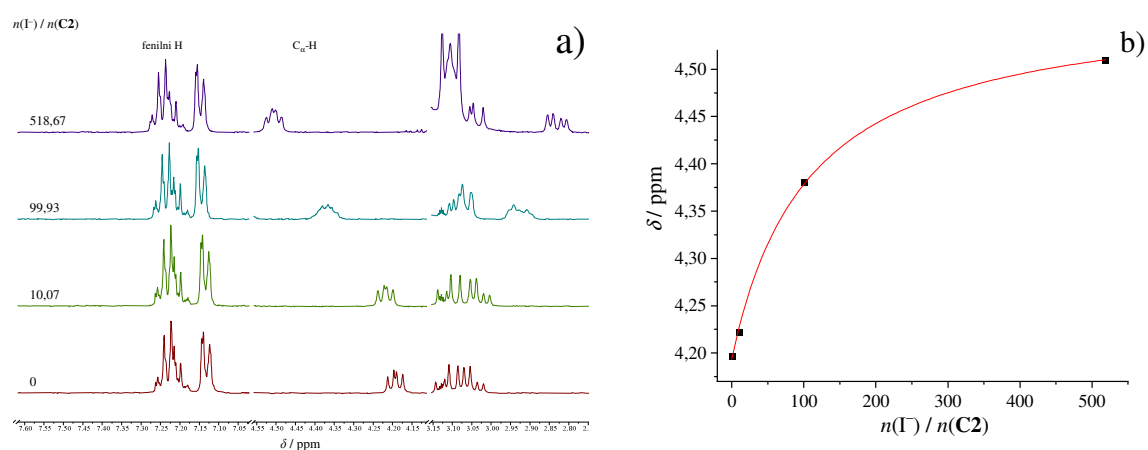
Slika D150. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 6,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0500 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 0,0500 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



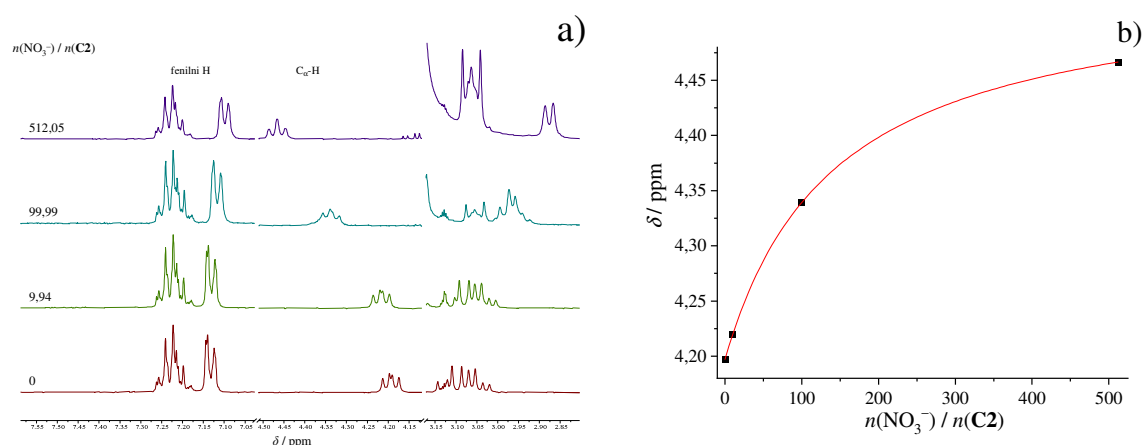
Slika D151. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 4,97 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAH₂PO₄ ($c = 9,89 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost molarne sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



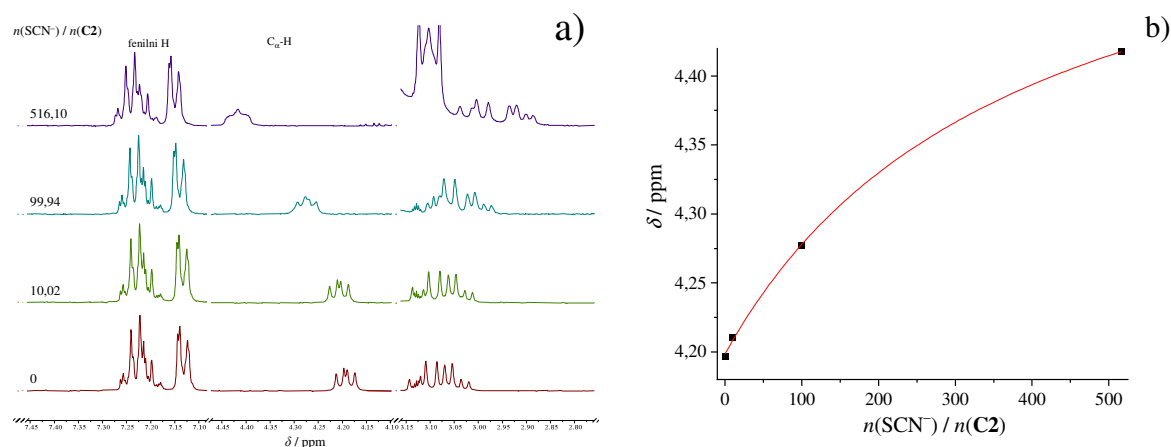
Slika D152. a) ^1H NMR titracija liganda **C2** ($c = 5,44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,555 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C2** na 4,20 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C2})$.



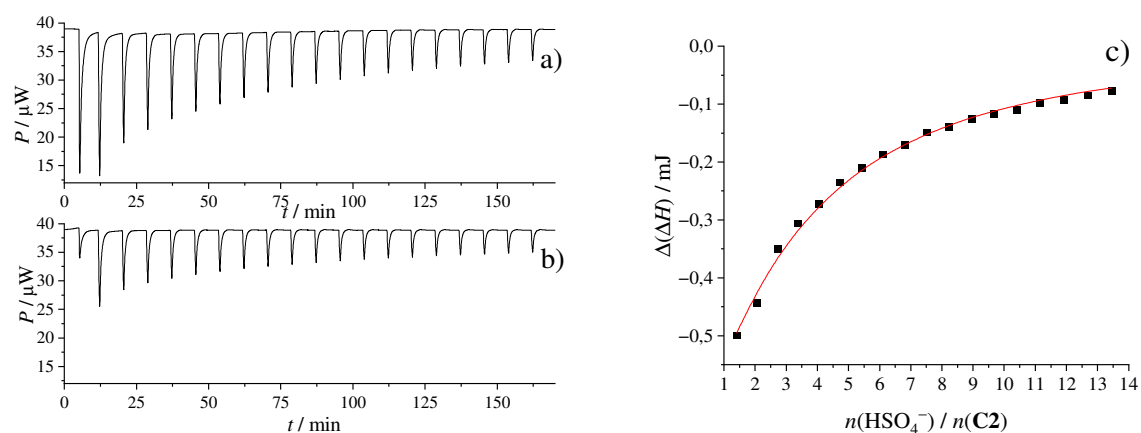
Slika D153. a) ^1H NMR titracija liganda **C2** ($c = 5,44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,564 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C2** na 4,20 ppm o omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{C2})$.



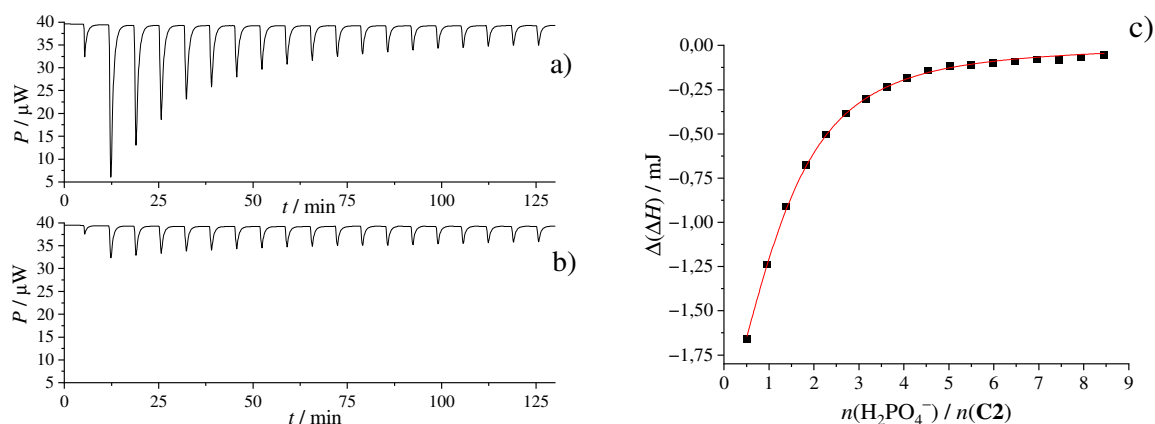
Slika D154. a) ¹H NMR titracija liganda **C2** ($c = 5,44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO₃ ($c = 0,557 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C2** na 4,20 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C2})$.



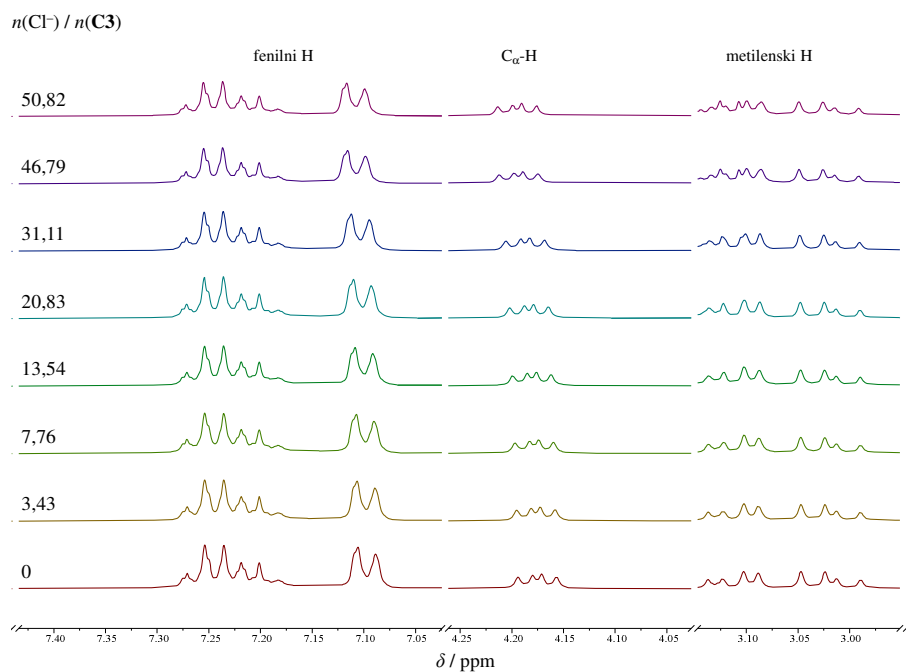
Slika D155. a) ¹H NMR titracija liganda **C2** ($c = 5,44 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,561 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C2}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C2** na 4,20 ppm o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C2})$.



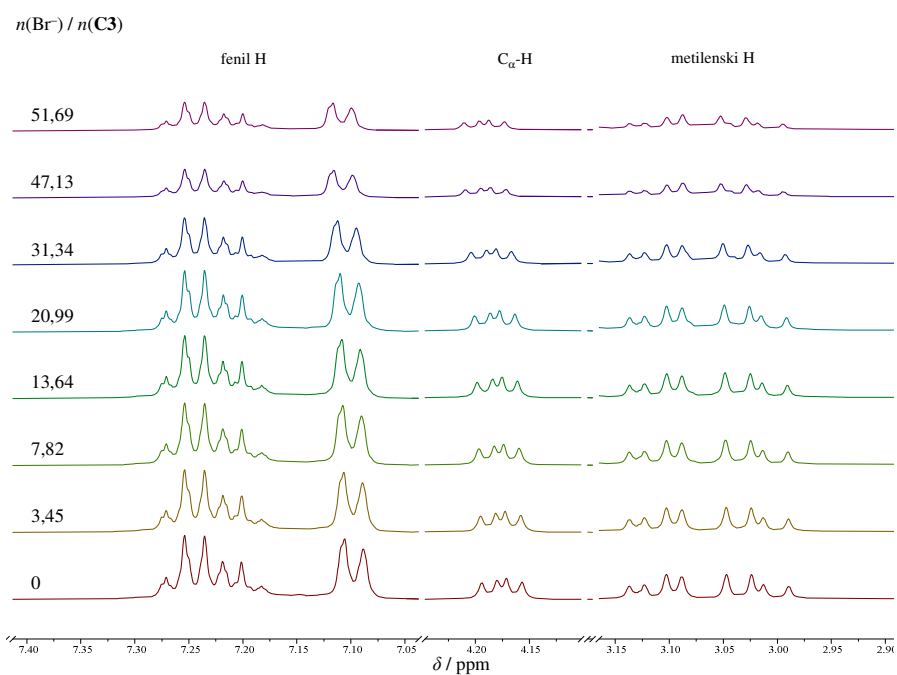
Slika D156. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,03 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0300 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s TBAHSO_4 ($c = 0,0300 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



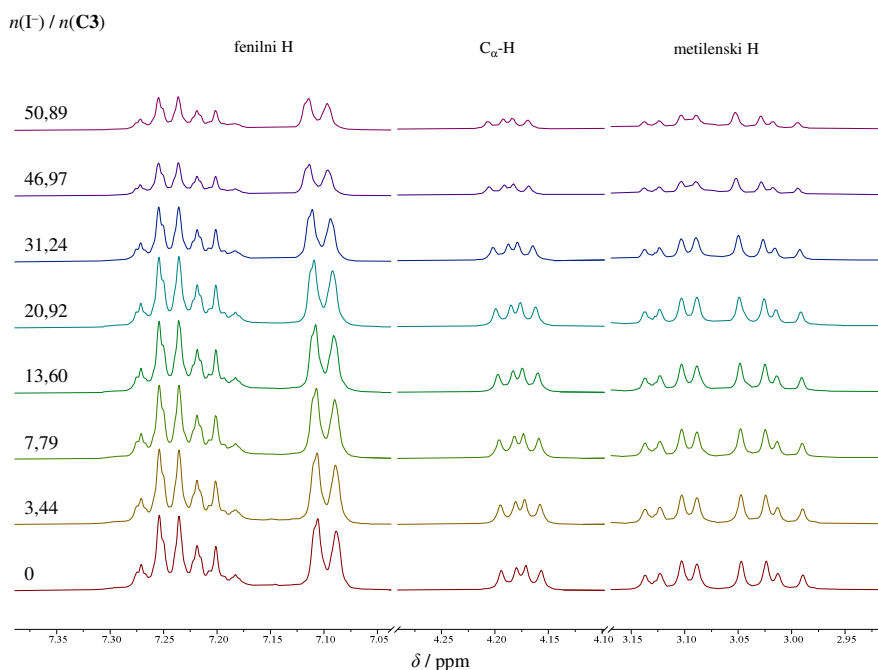
Slika D157. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,92 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0200 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0200 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



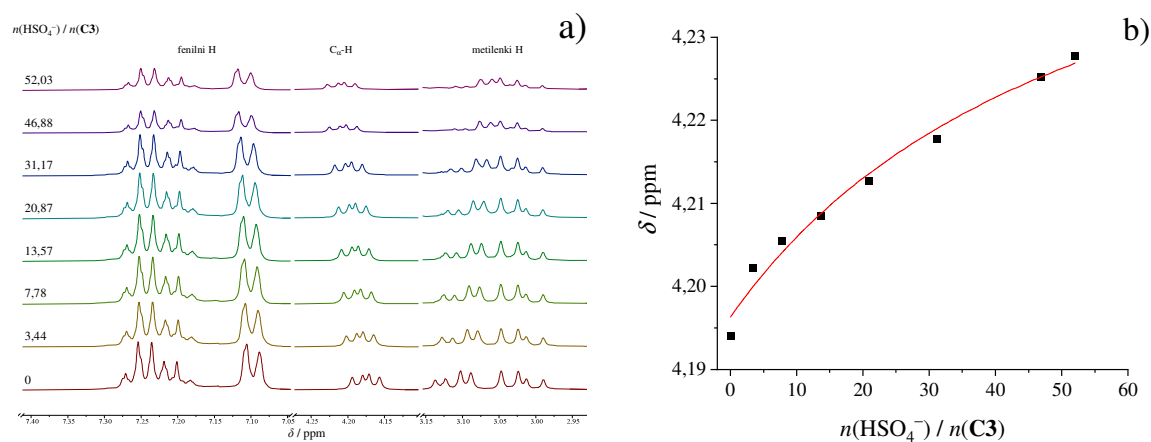
Slika D158. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



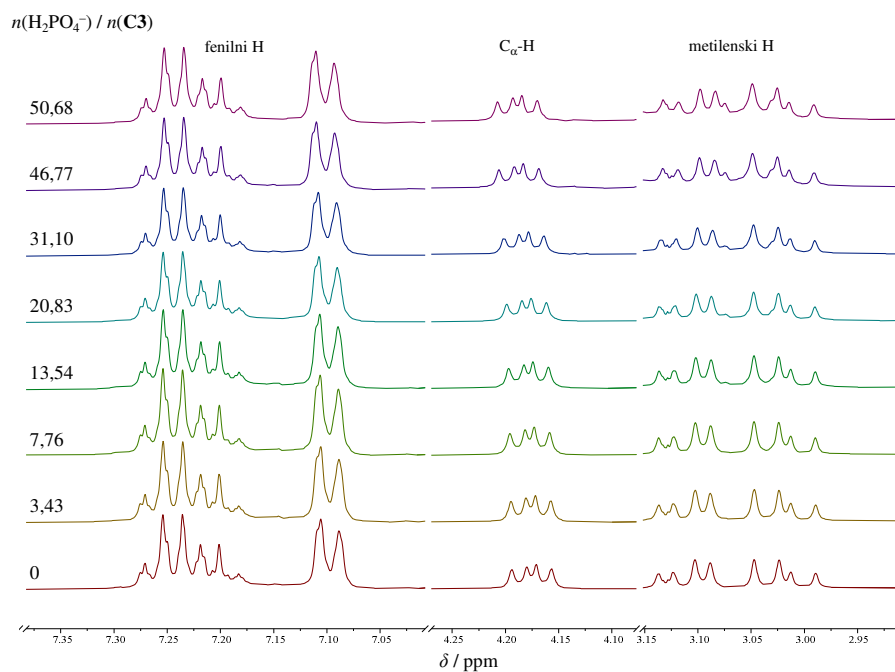
Slika D159. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



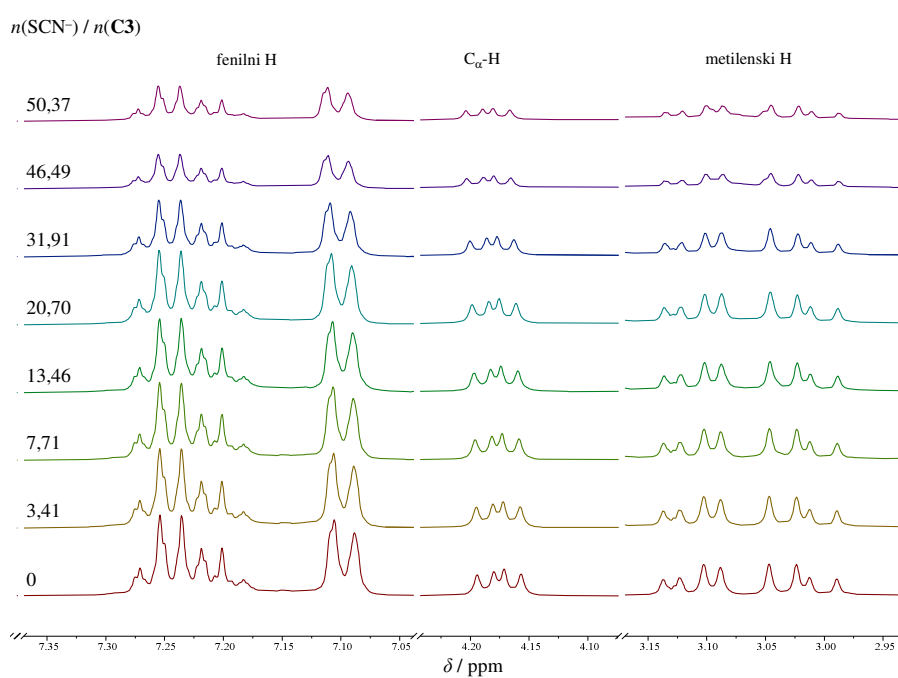
Slika D160. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



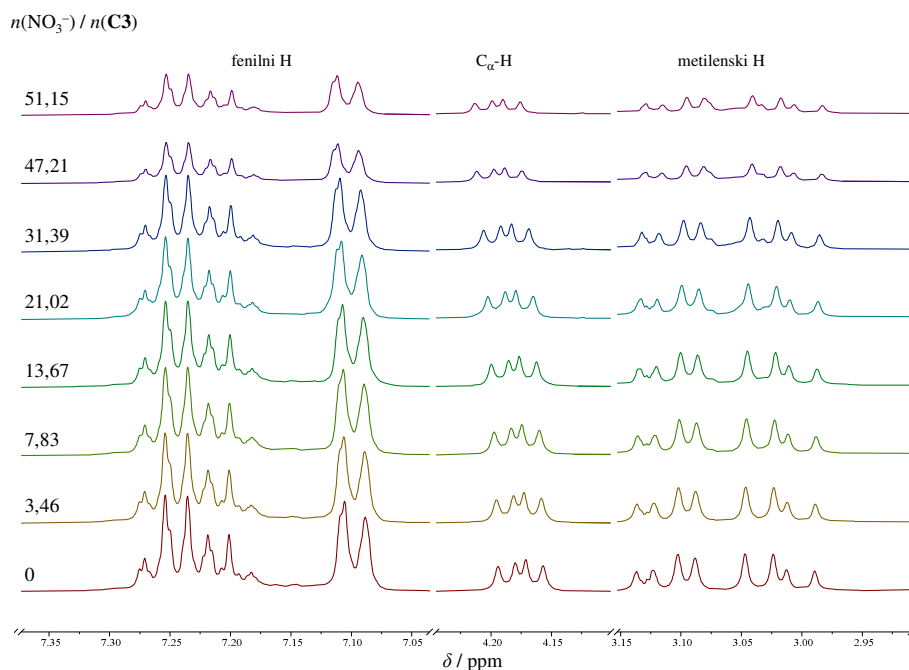
Slika D161. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C3** na 4,19 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C3})$.



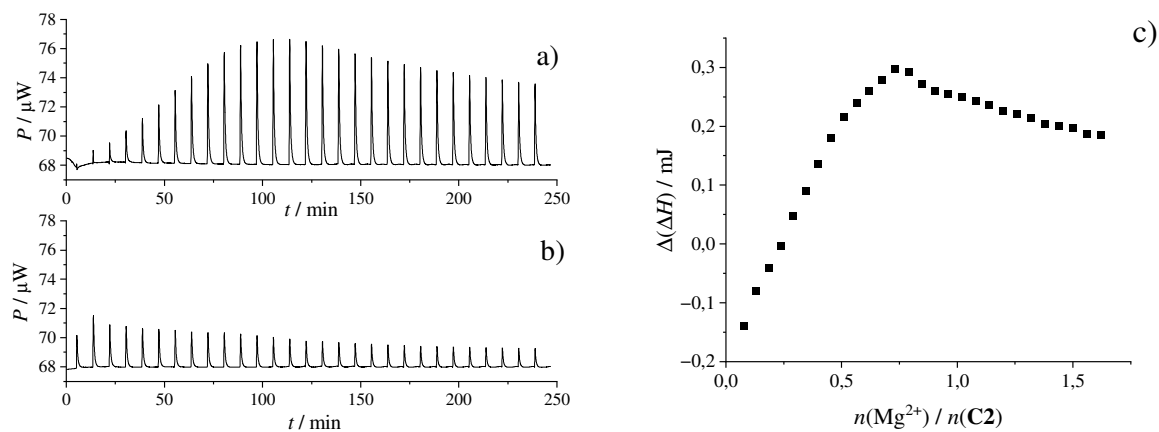
Slika D162. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



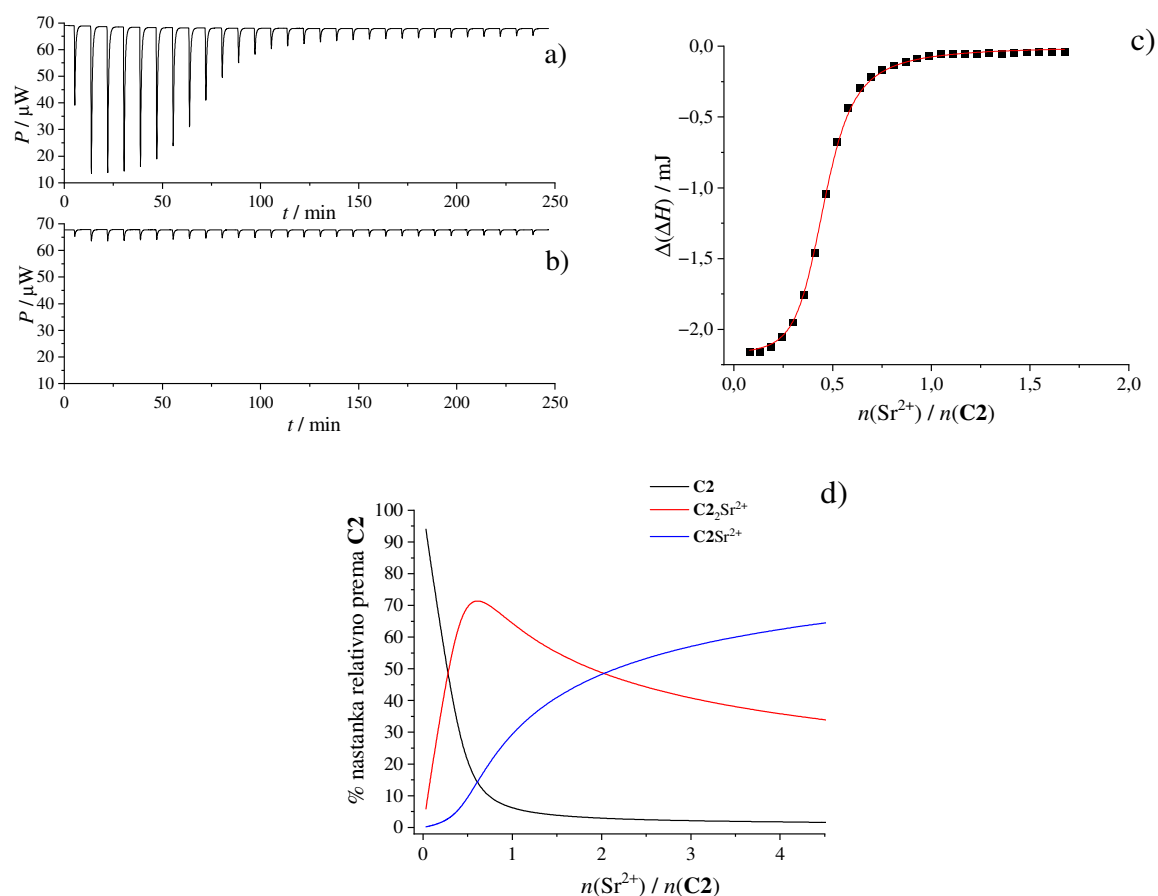
Slika D163. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,149 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



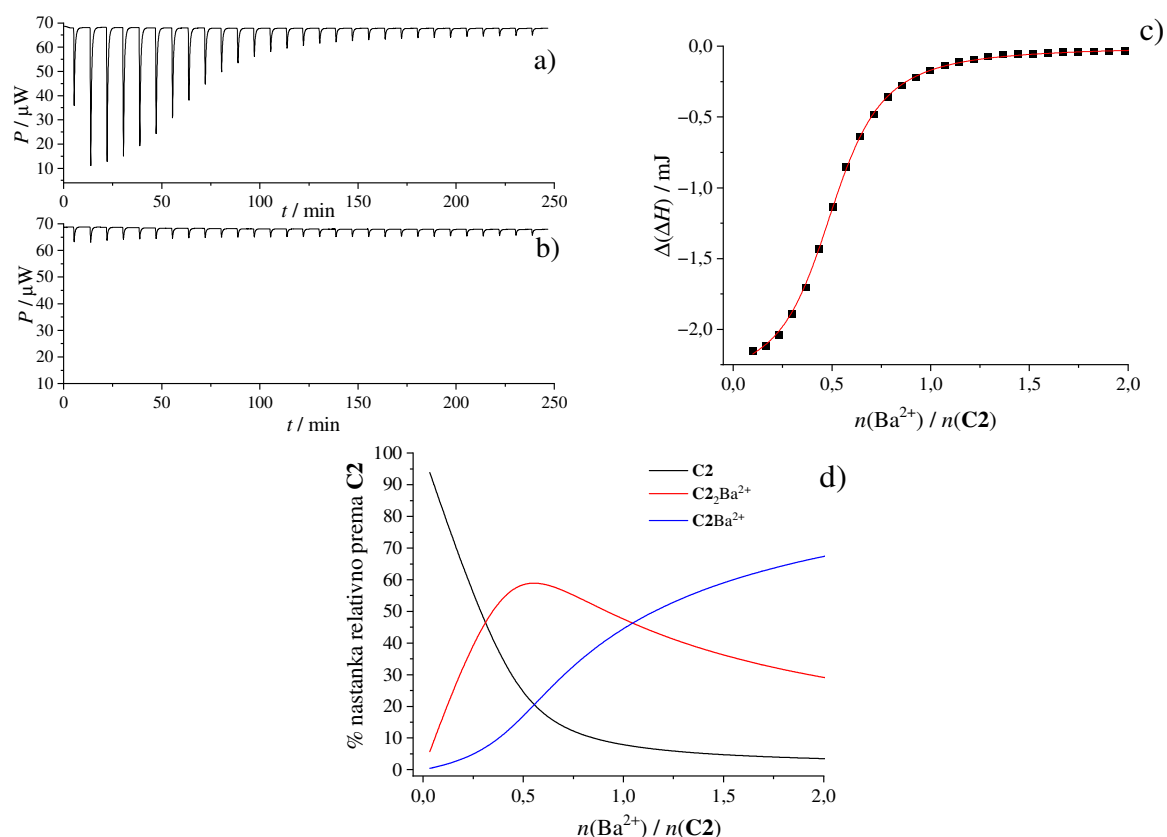
Slika D164. a) ^1H NMR titracija liganda **C3** ($c = 1,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C3}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



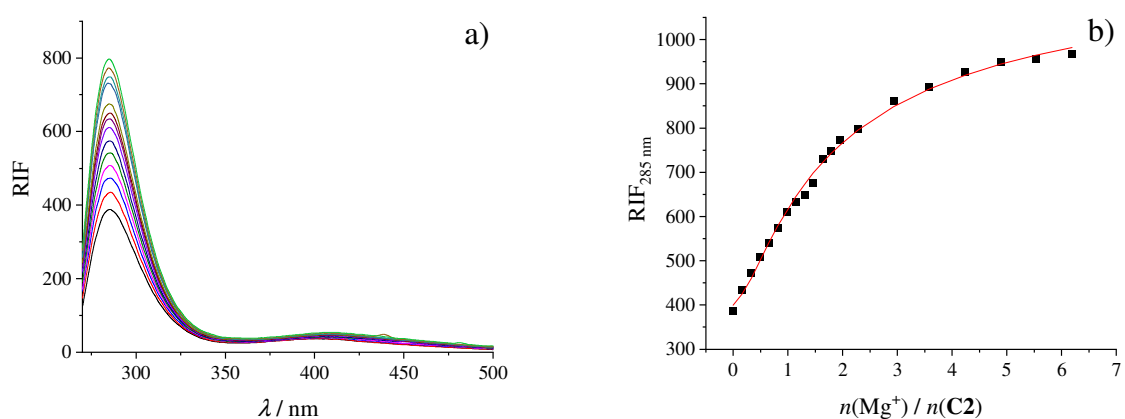
Slika D165. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,15 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,82 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,85 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C2})$.



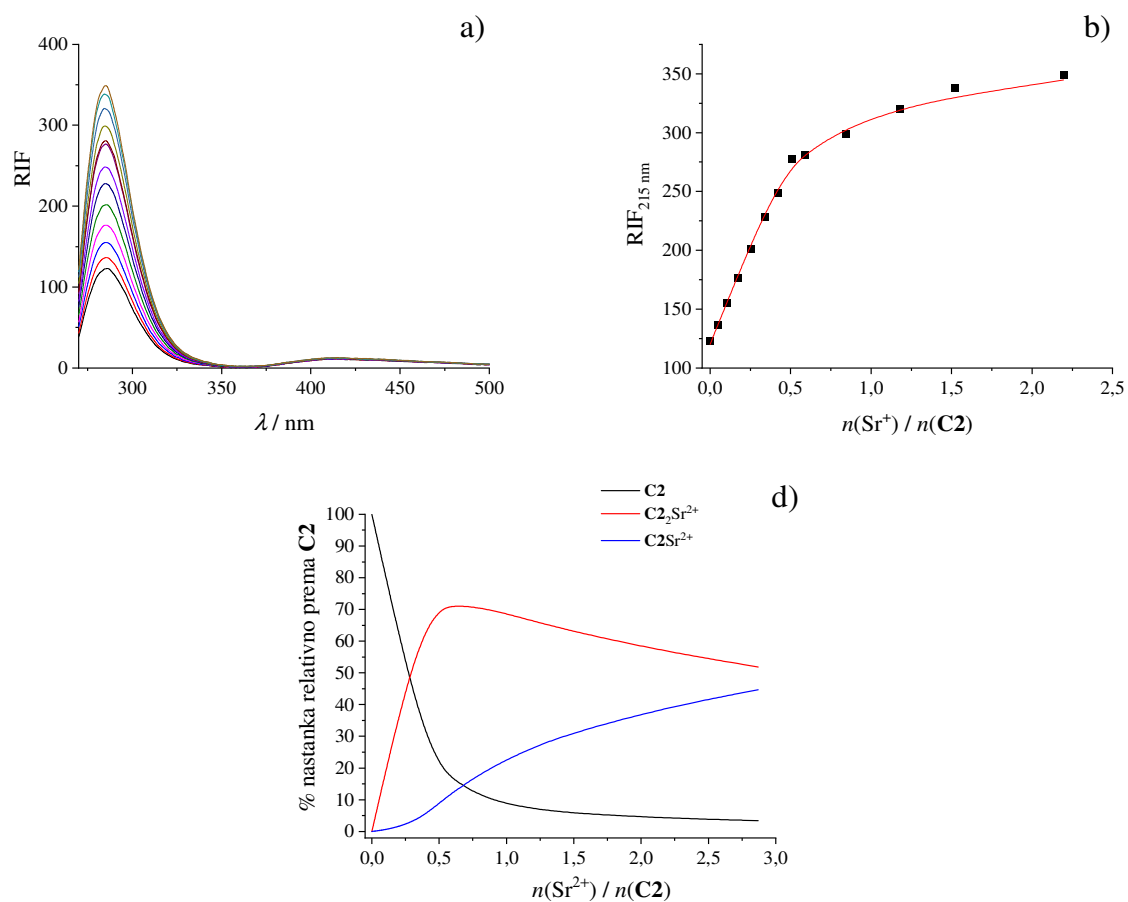
Slika D166. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,14 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



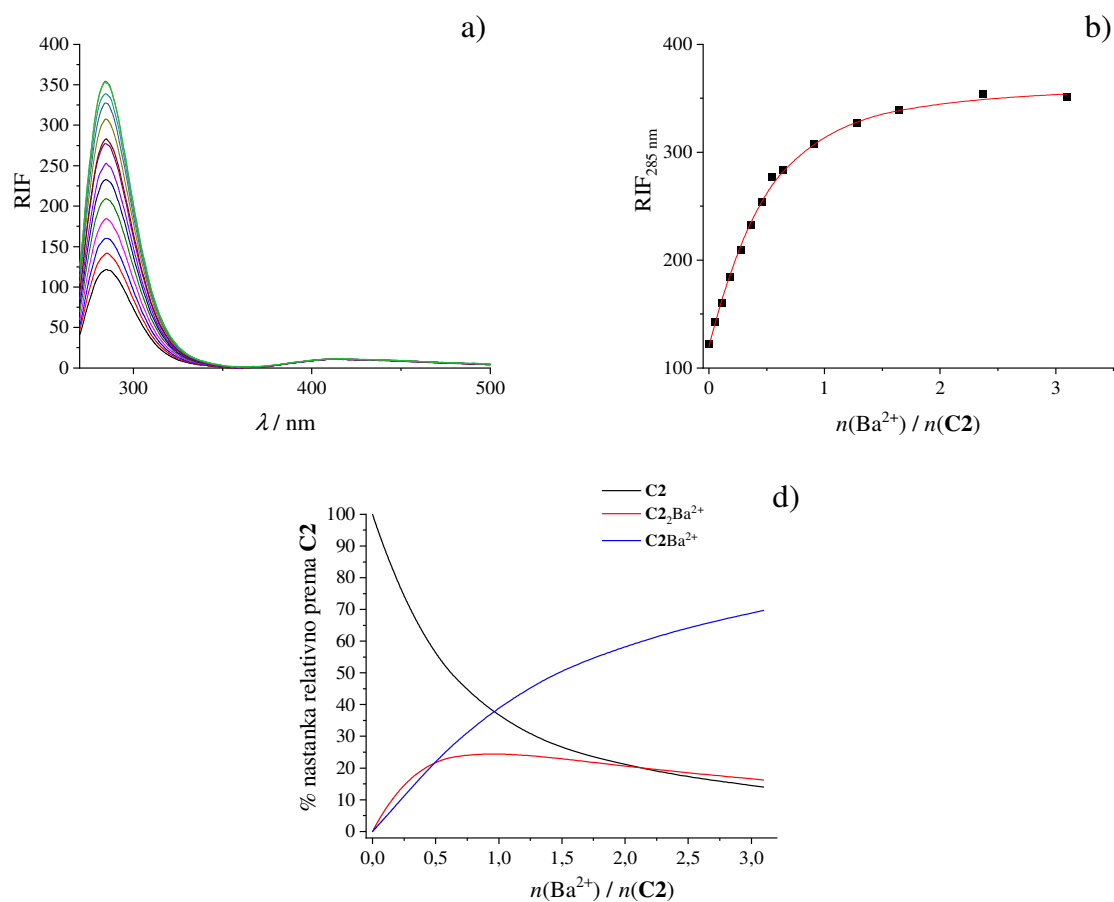
Slika D167. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,96 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43\text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,84 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,84 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



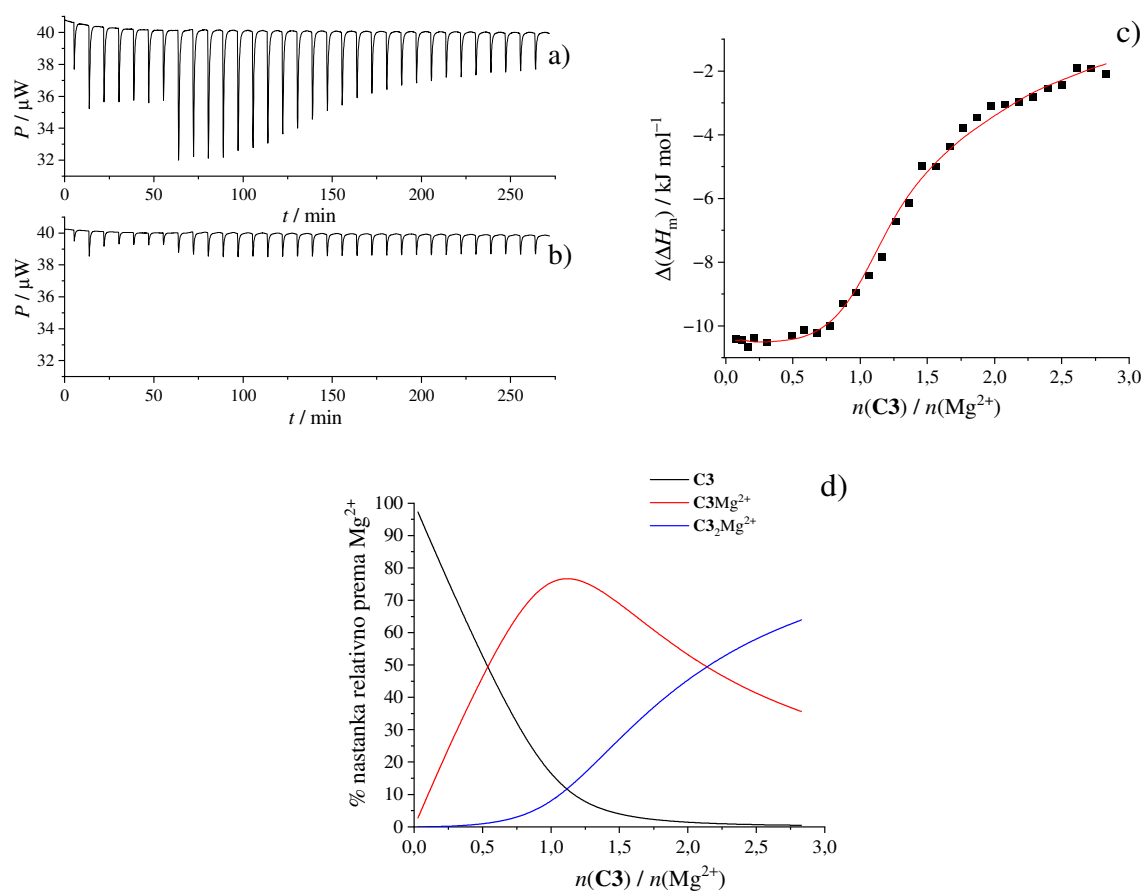
Slika D168. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,68 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20\text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,03 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260\text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 10 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C2})$.



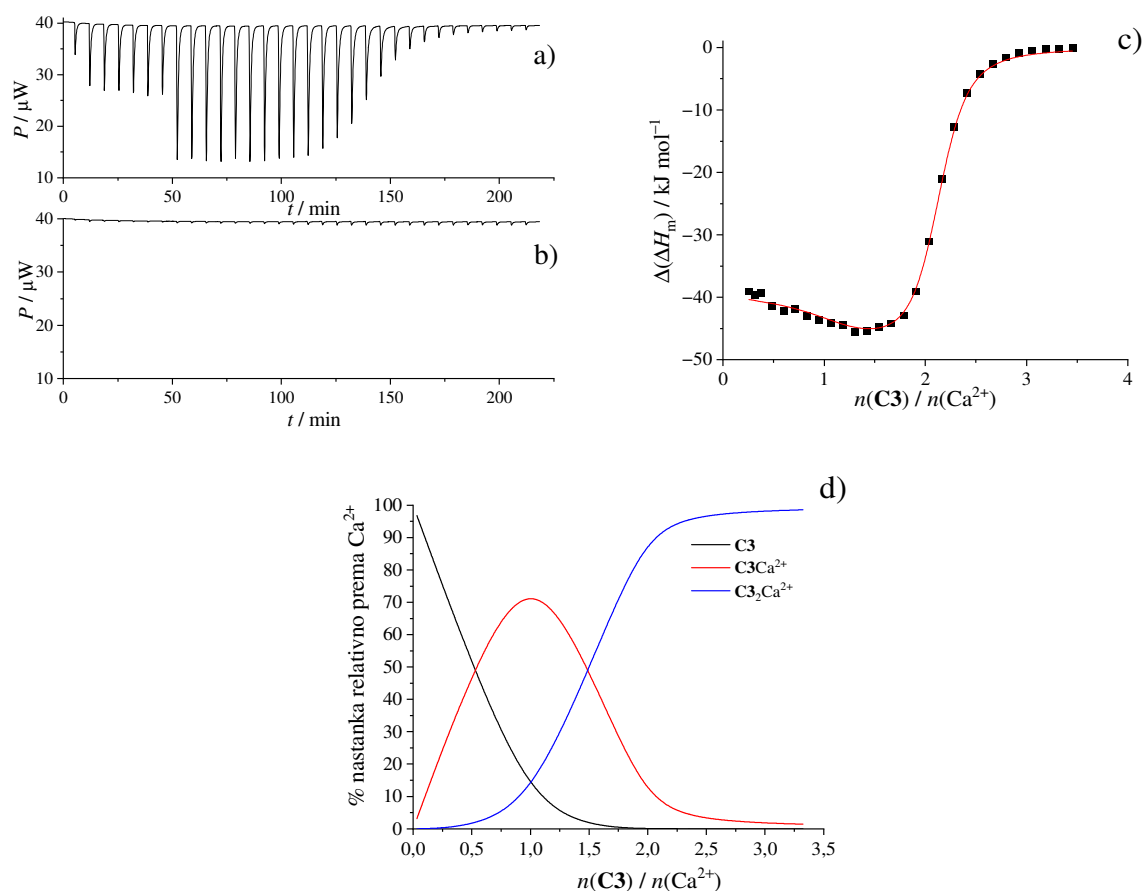
Slika D169. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,04 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,87 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



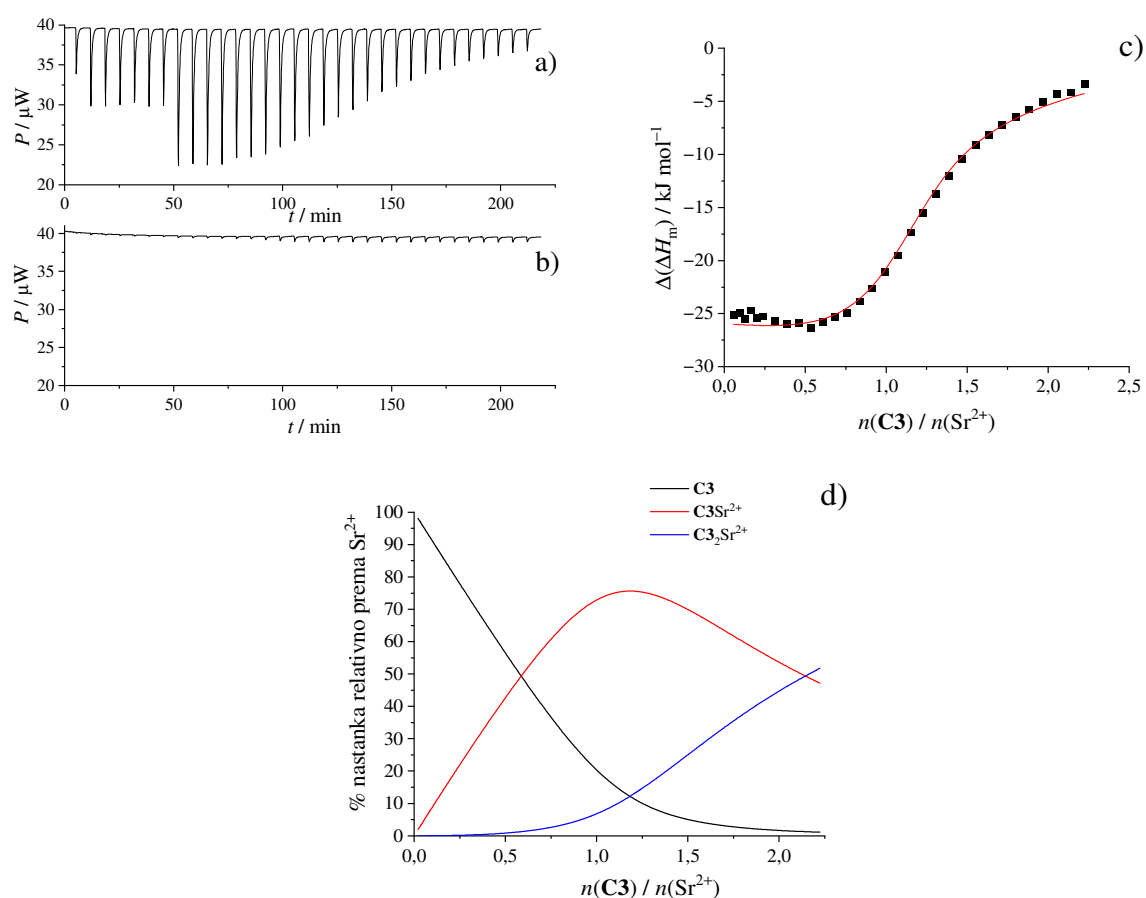
Slika D170. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,04 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



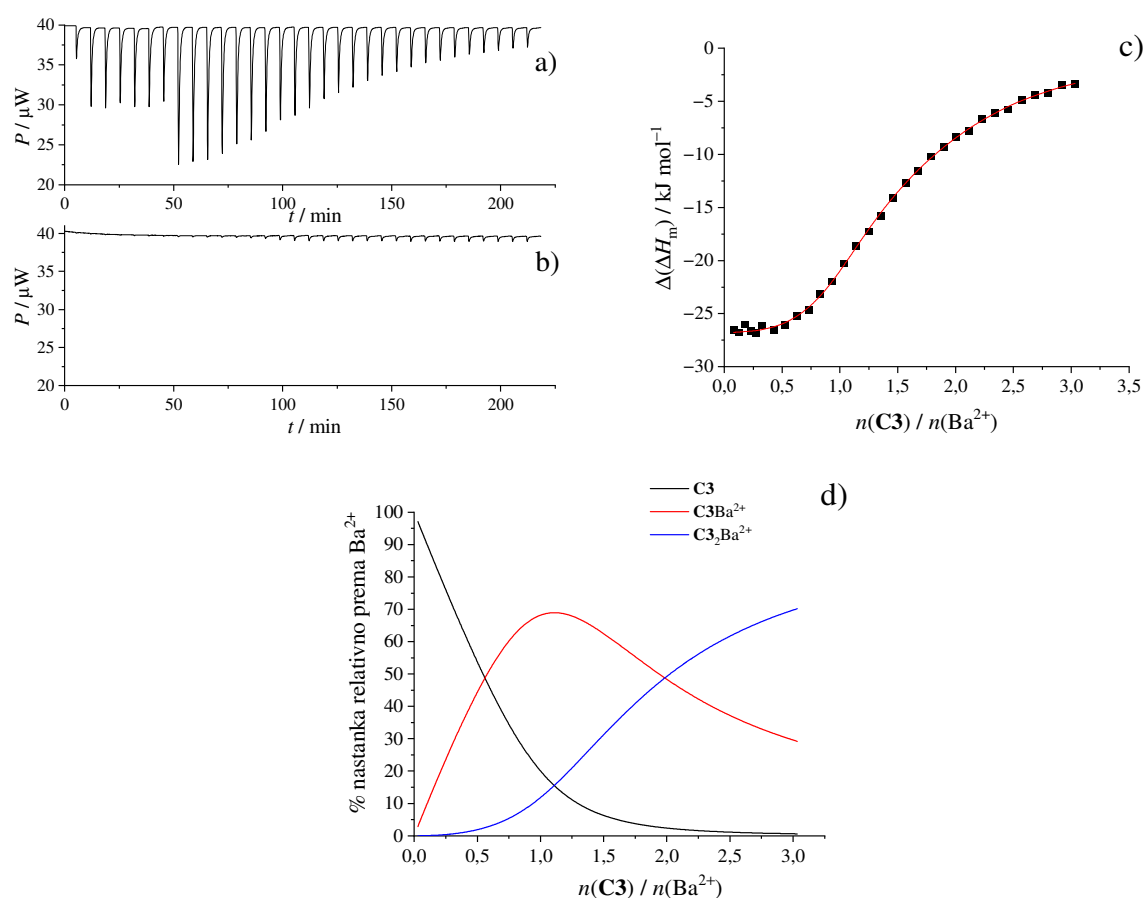
Slika D171. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,33 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s ligandom **C3** ($c = 3,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,33 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitriplom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C3}) / n(\text{Mg}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



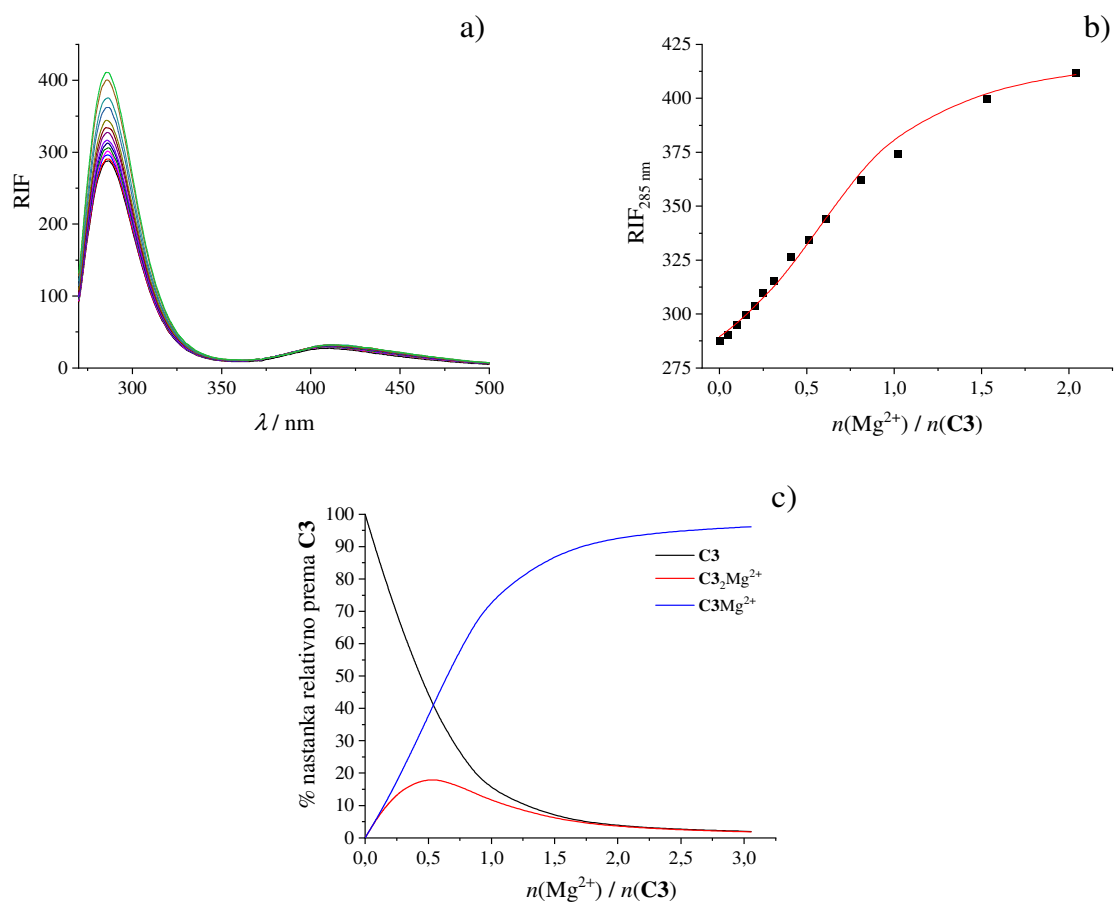
Slika D172. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,89 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s ligandom **C3** ($c = 3,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,89 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitrilom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C3}) / n(\text{Ca}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



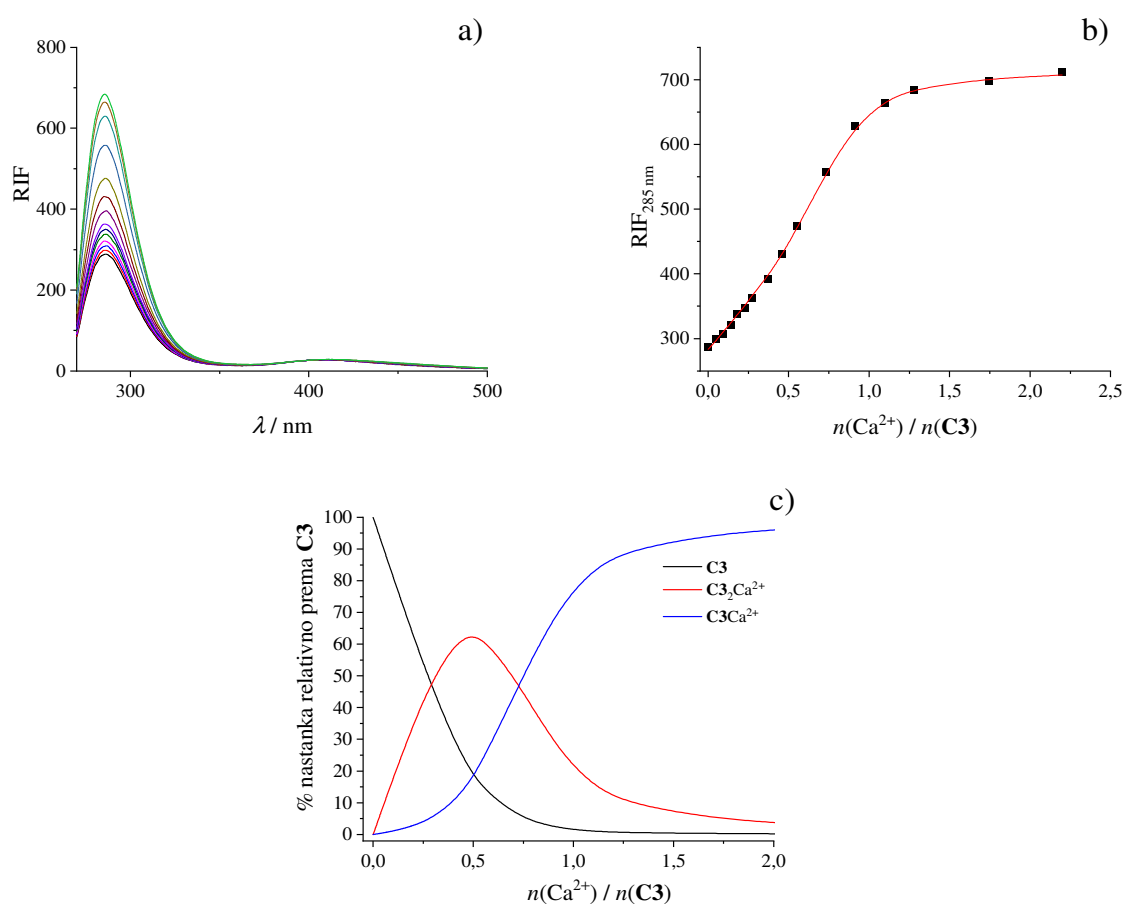
Slika D173. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,94 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s ligandom **C3** ($c = 3,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,98 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitrilom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C3}) / n(\text{Sr}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



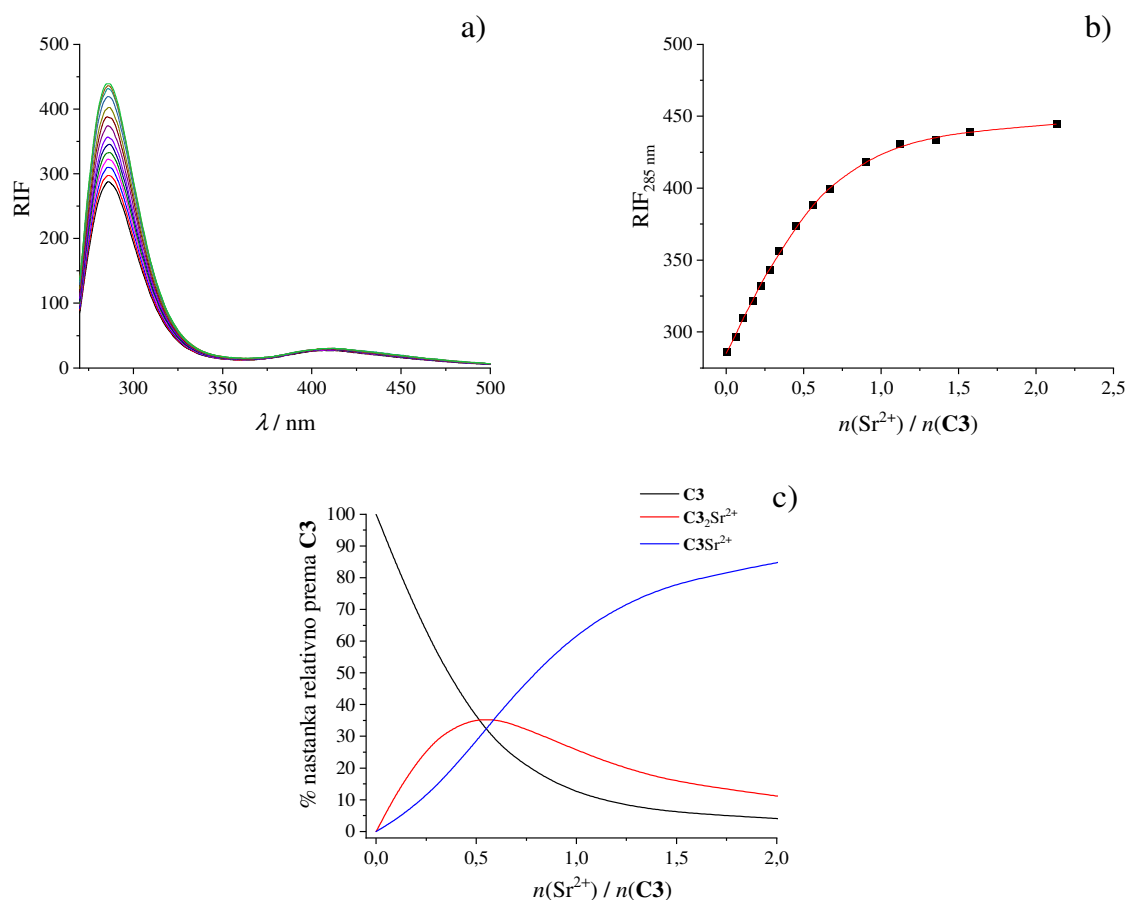
Slika D174. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,18 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s ligandom **C3** ($c = 3,08 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,18 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitrilom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C3}) / n(\text{Ba}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



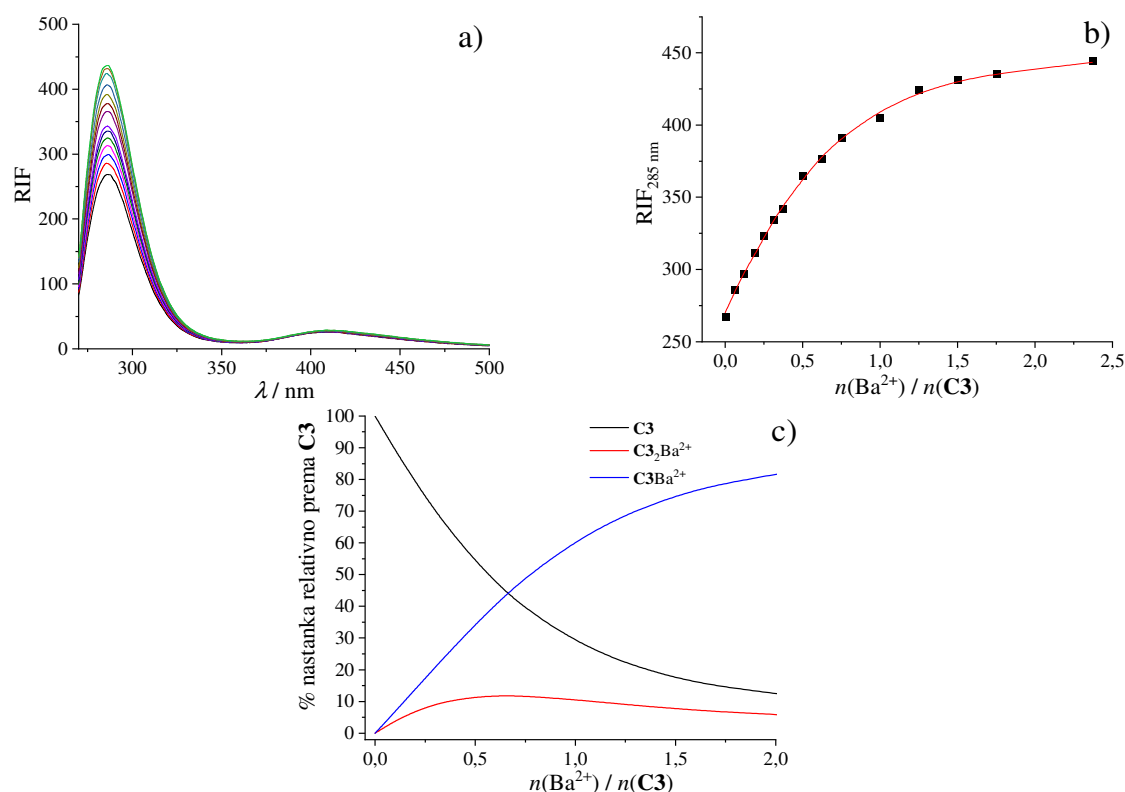
Slika D175. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 5,53 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,24 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



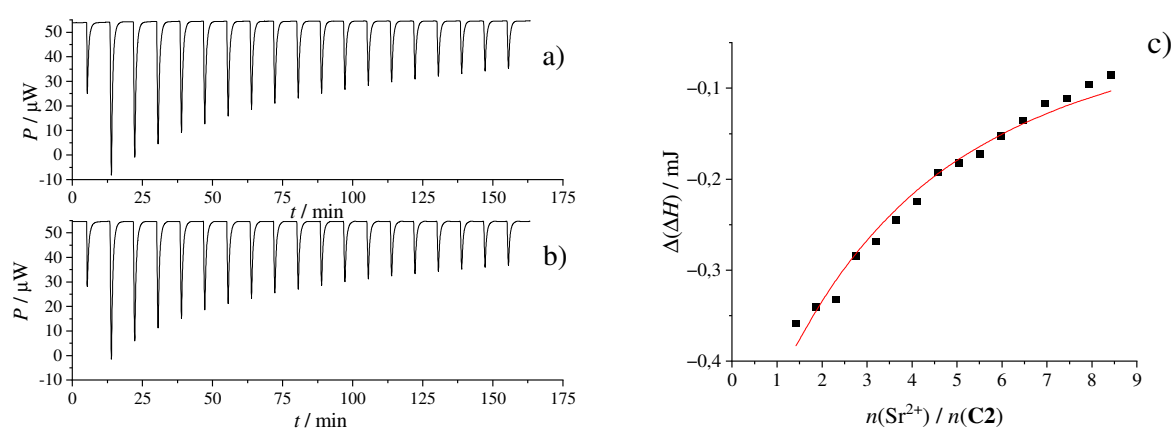
Slika D176. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 5,53 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,11 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



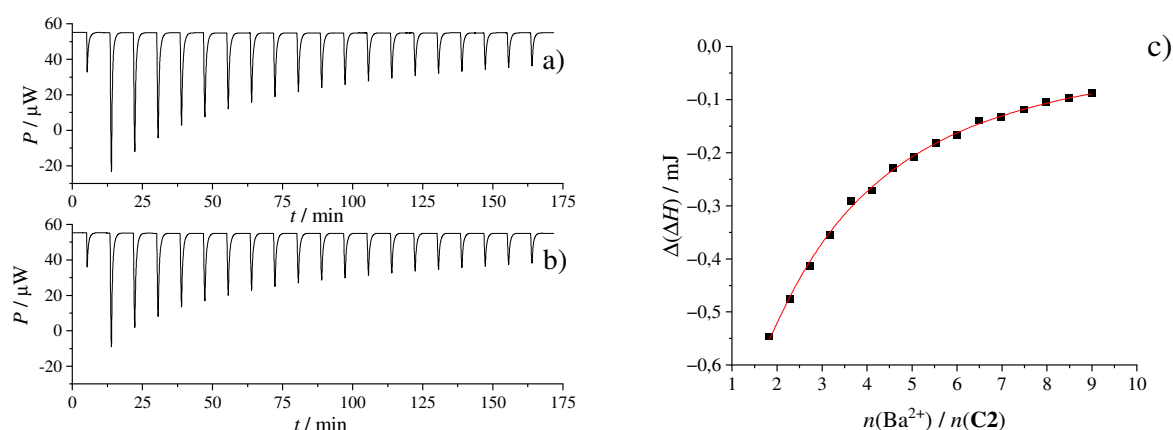
Slika D177. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 5,53 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,36 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



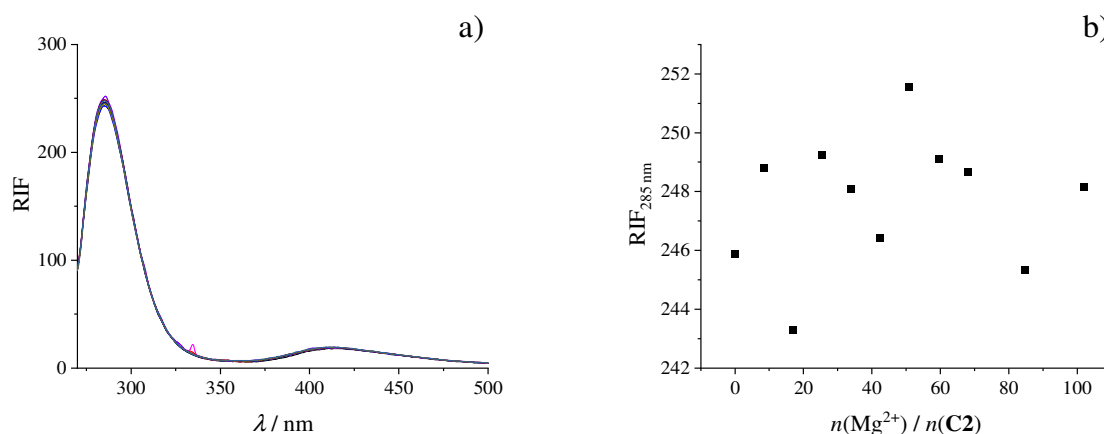
Slika D178. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 5,55 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,52 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



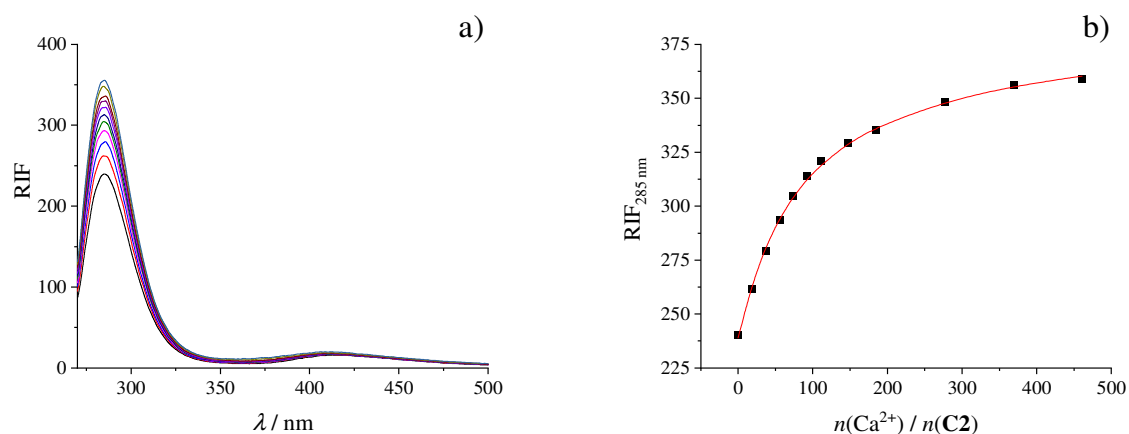
Slika D179. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0203 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0203 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



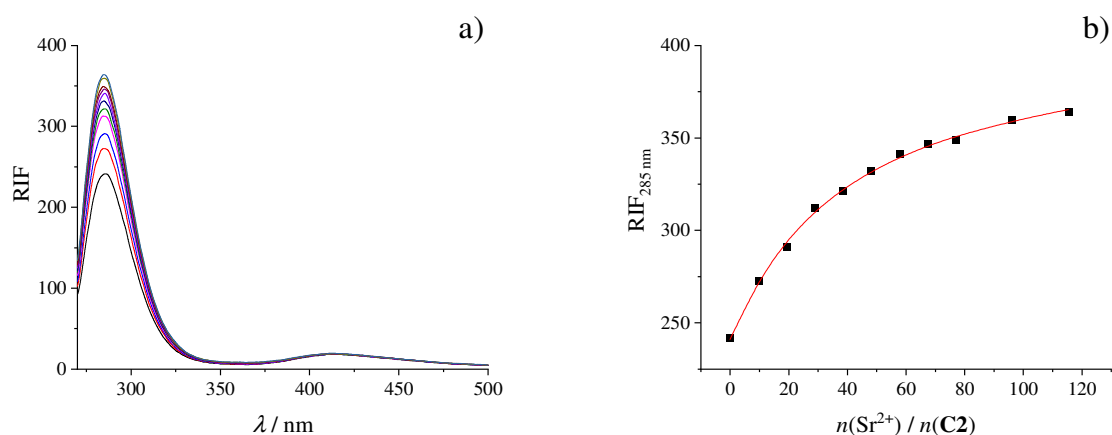
Slika D180. a) Mikrokolorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 5,07 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0205 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokolorimetrijska titracija metanola s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0205 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



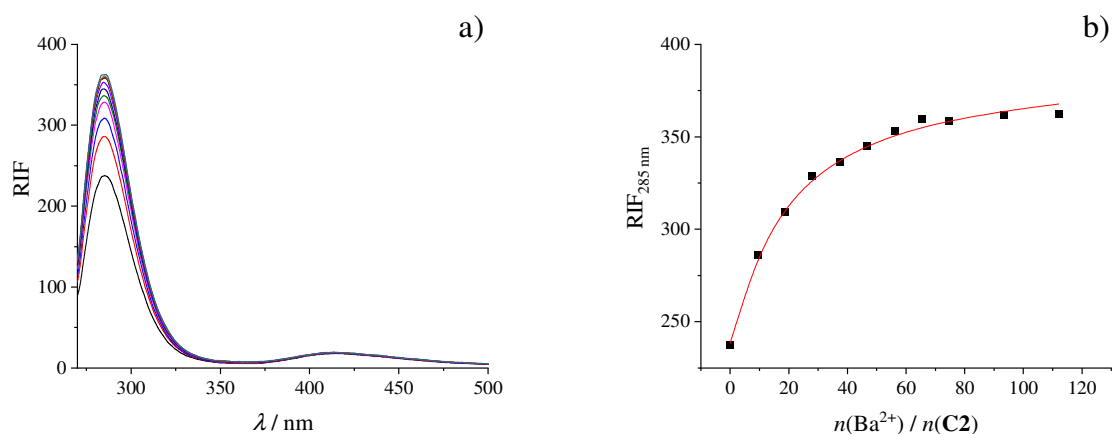
Slika D181. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,185 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C2})$.



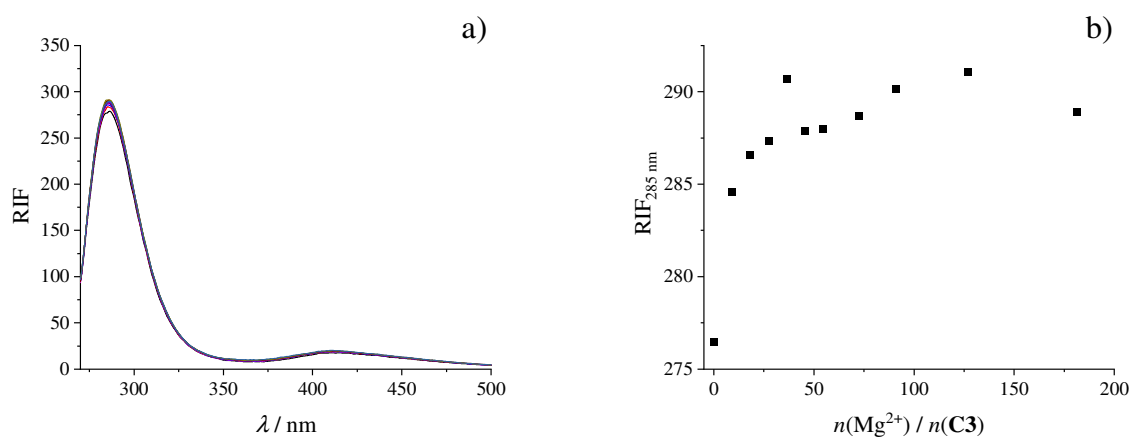
Slika D182. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,201 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



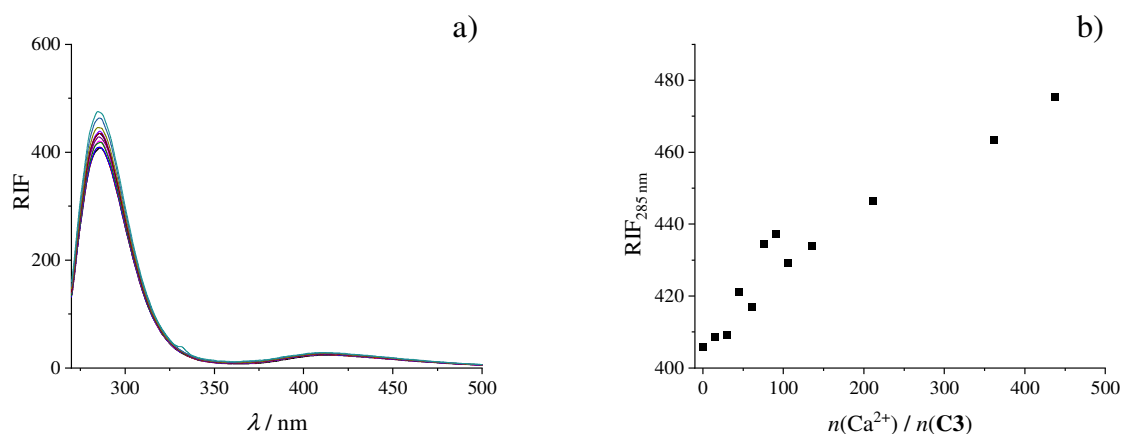
Slika D183. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,209 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



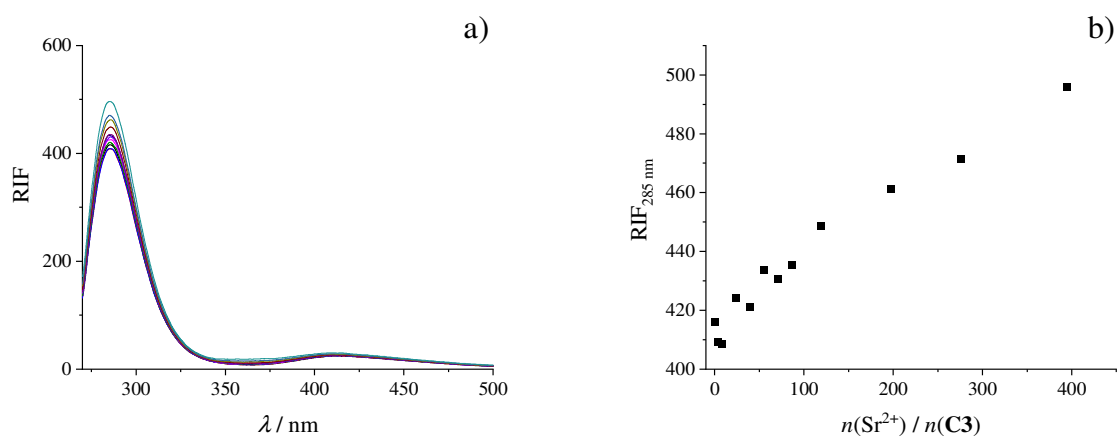
Slika D184. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C2** ($c = 4,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,203 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C2})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



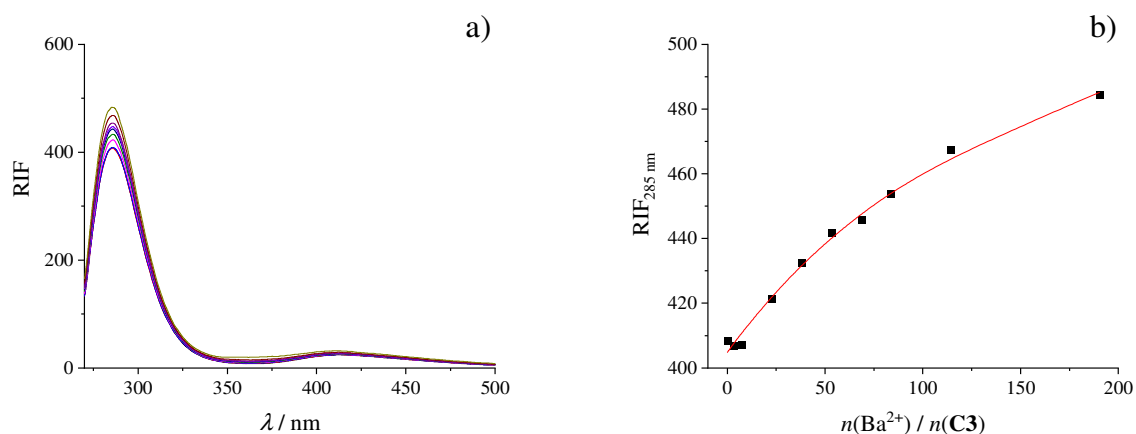
Slika D185. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 4,98 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,199 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C3})$.



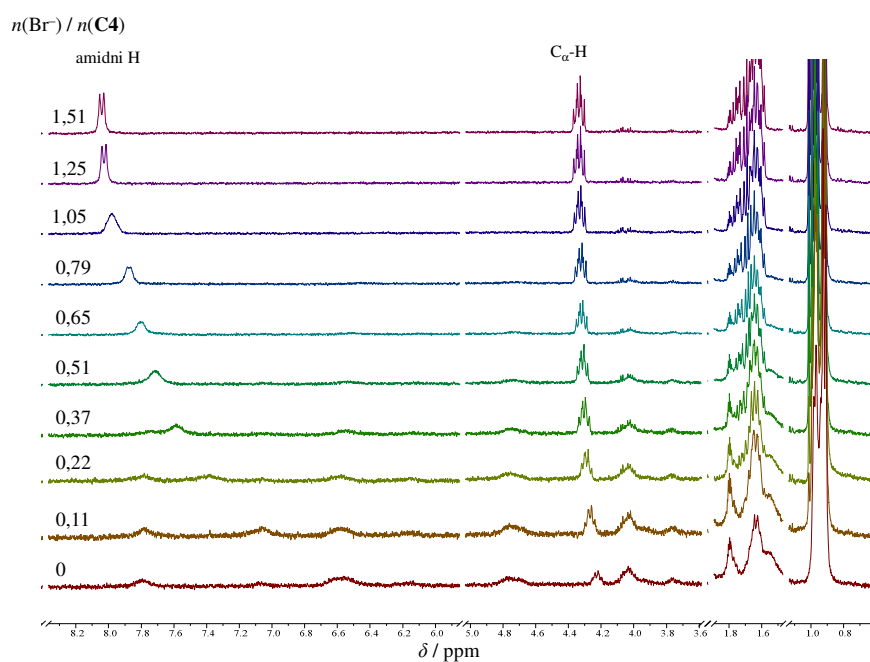
Slika D186. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 6,07 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,201 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C3})$.



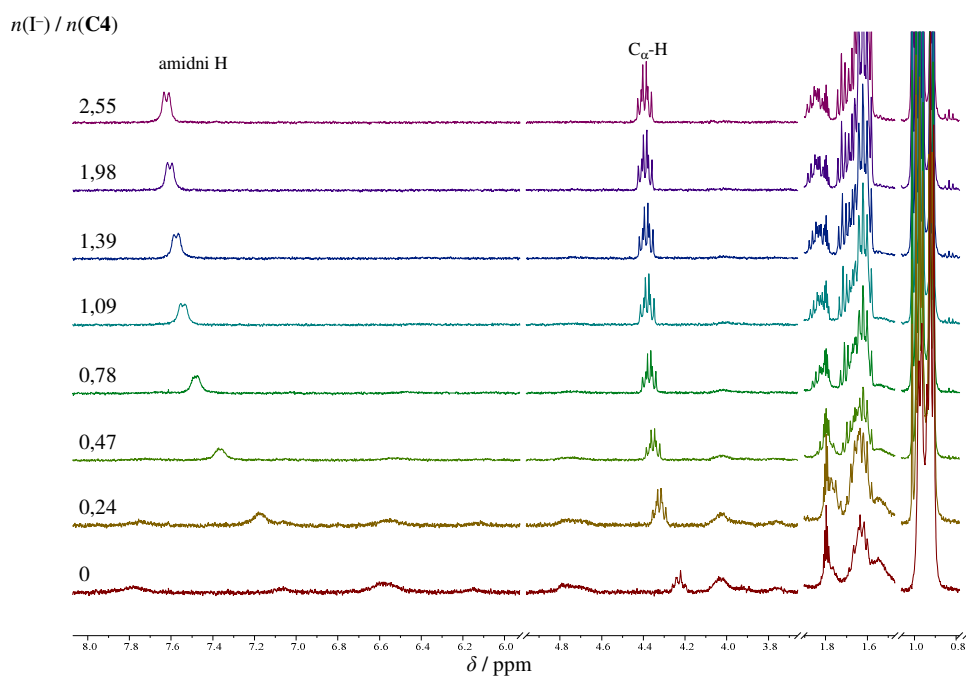
Slika D187. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 6,07 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,211 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C3})$.



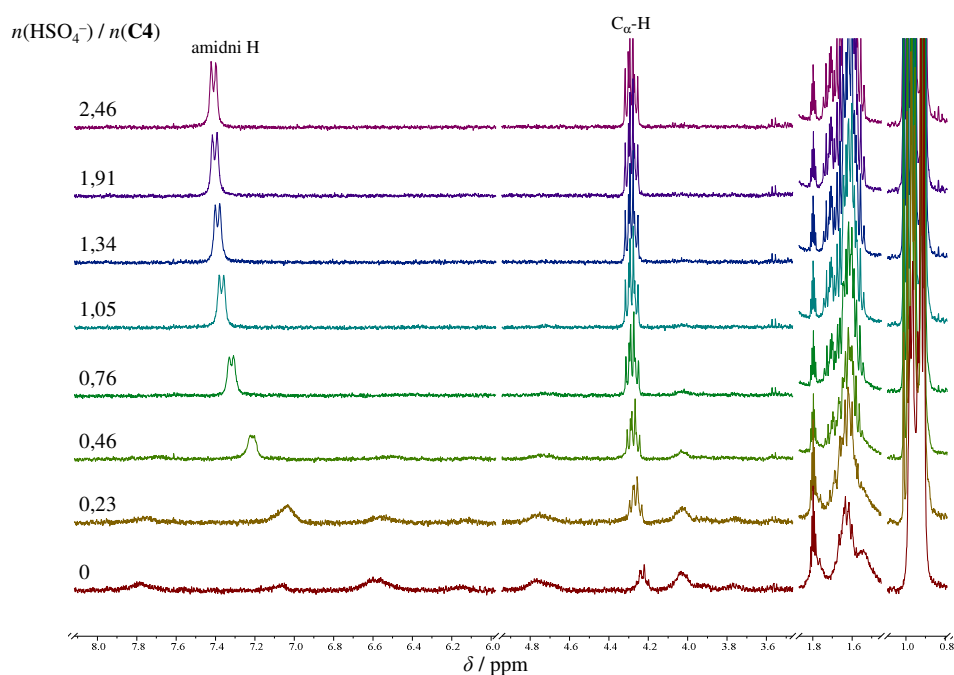
Slika D188. a) Spektrofluorimetrijska titracija liganda **C3** ($c = 6,07 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,20 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,203 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$; širine pukotina: ulazna 5 nm, izlazna 10 nm. b) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 285 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C3})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



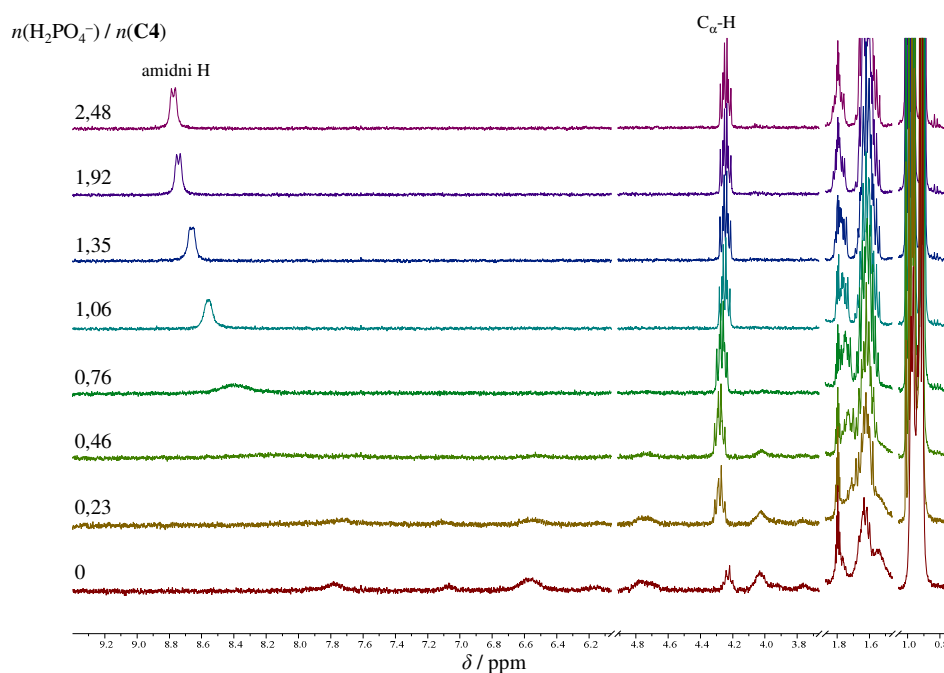
Slika D189. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,73 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,0107 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



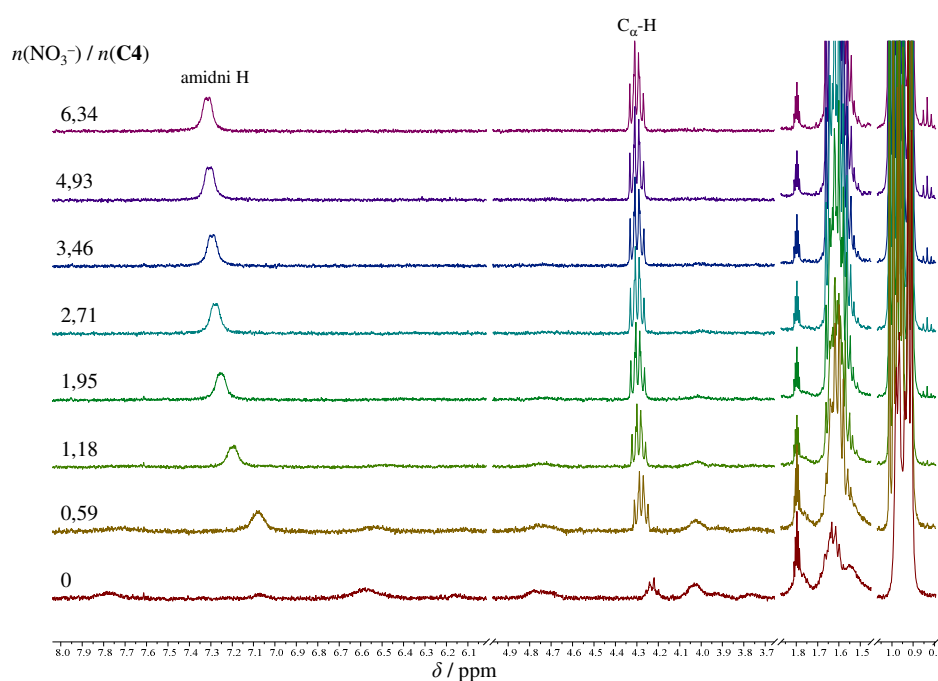
Slika D190. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,30 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,0212 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



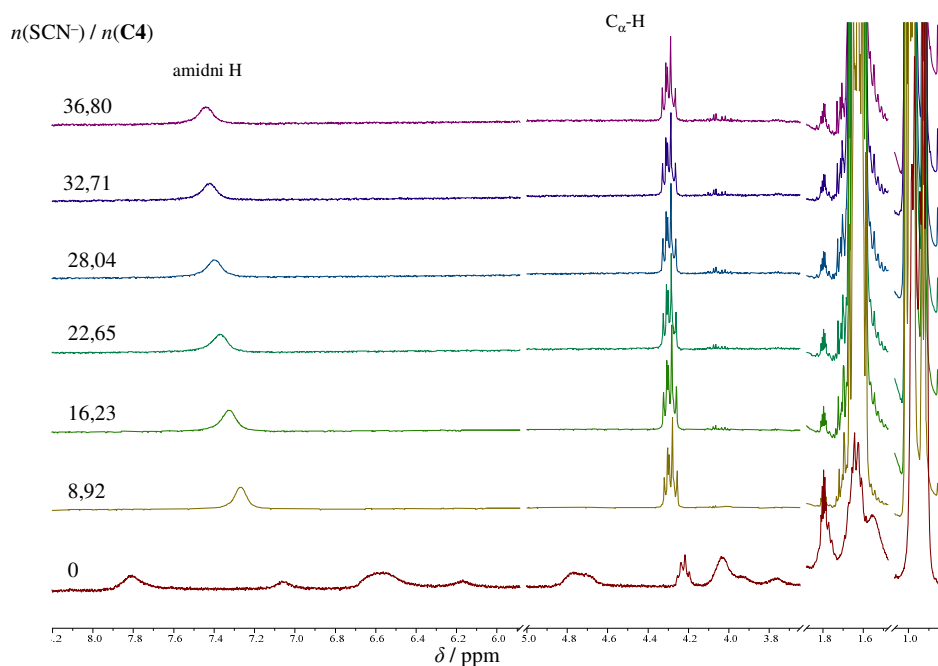
Slika D191. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,30 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0205 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



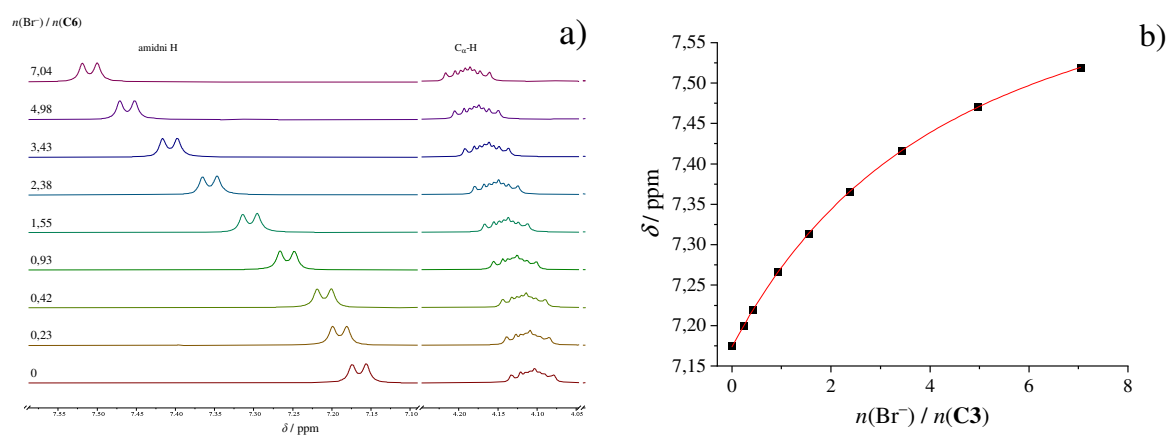
Slika D192. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,30 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0206 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



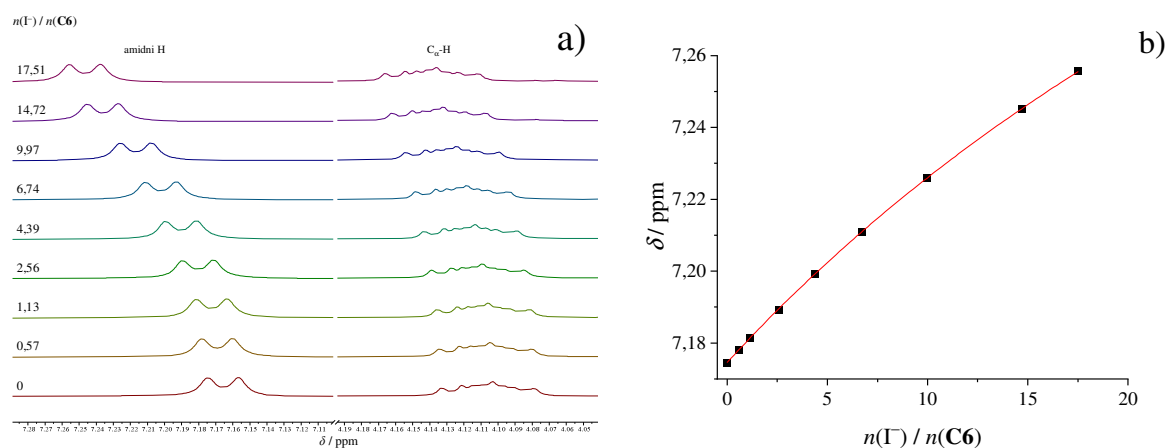
Slika D193. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 5,30 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,0501 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



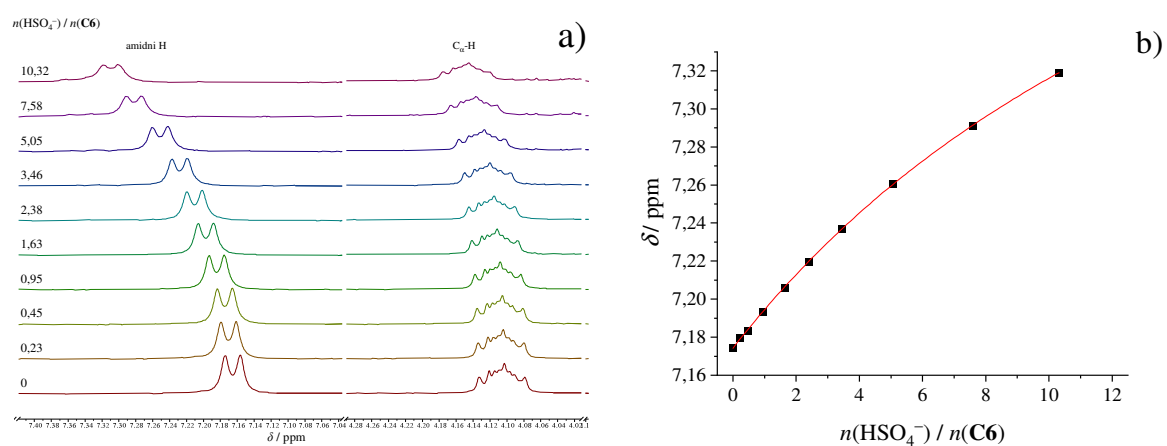
Slika D194. ^1H NMR titracija liganda **C4** ($c = 6,85 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,0672 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C4}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



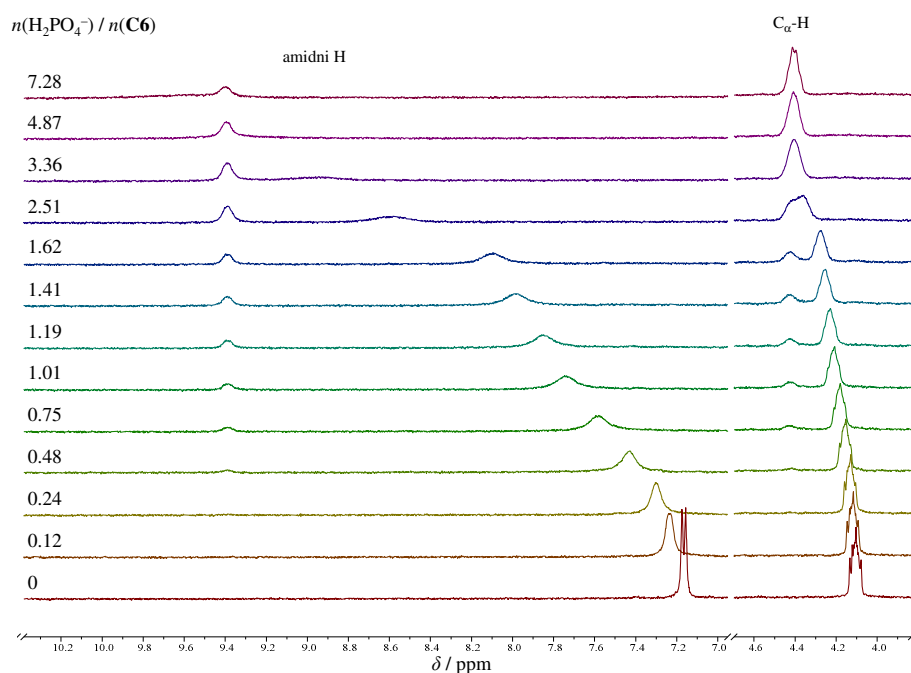
Slika D195. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,021 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** na 7,17 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C6})$.



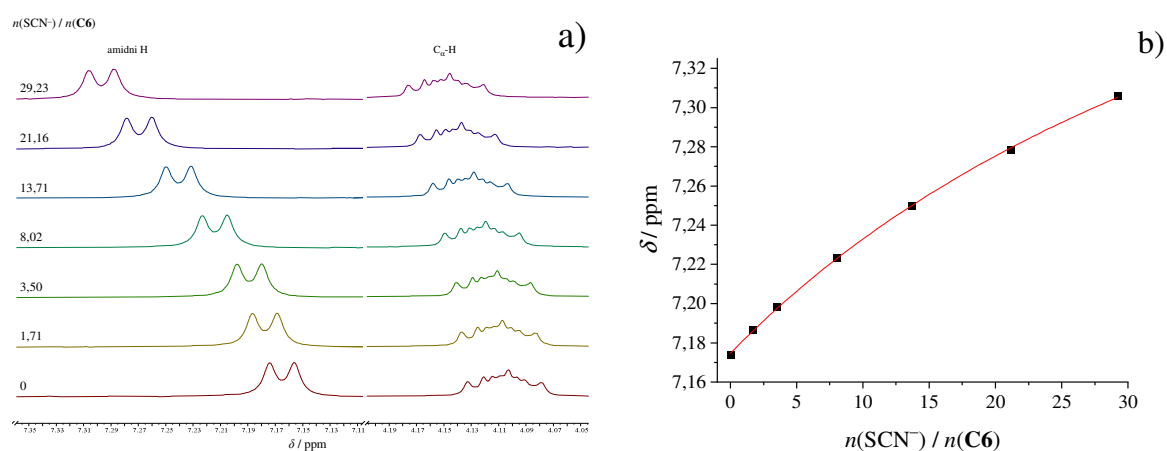
Slika D196. a) ¹H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,051 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** na 7,17 ppm o omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{C6})$.



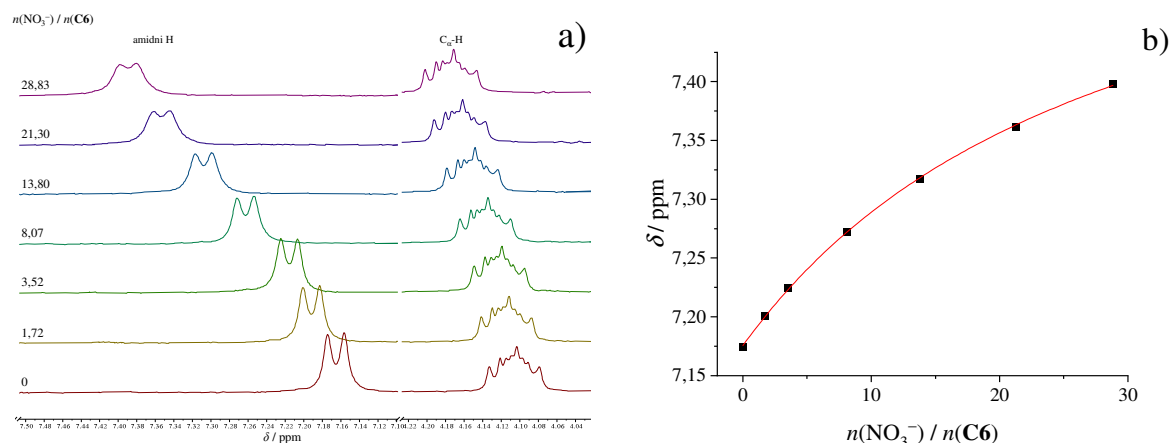
Slika D197. a) ¹H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,030 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** na 7,17 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C6})$.



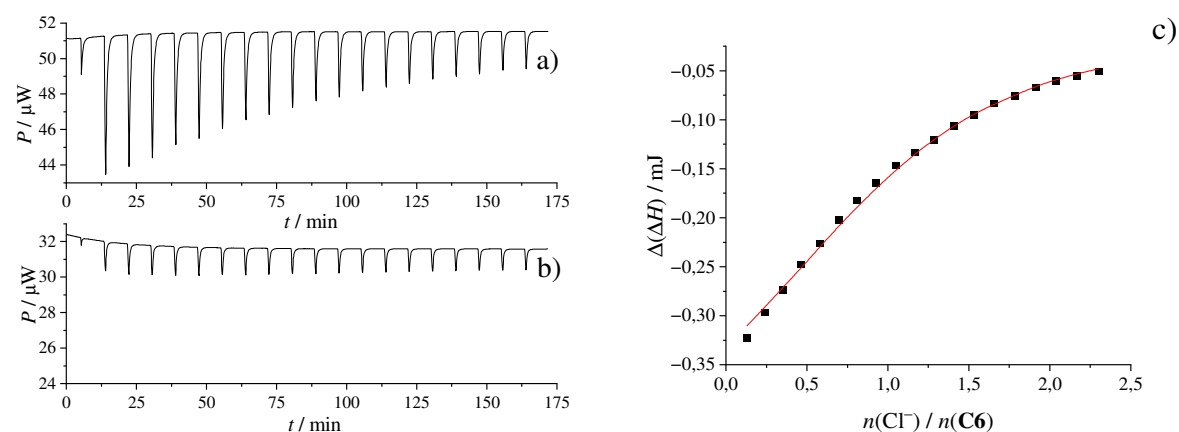
Slika D198. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,021 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



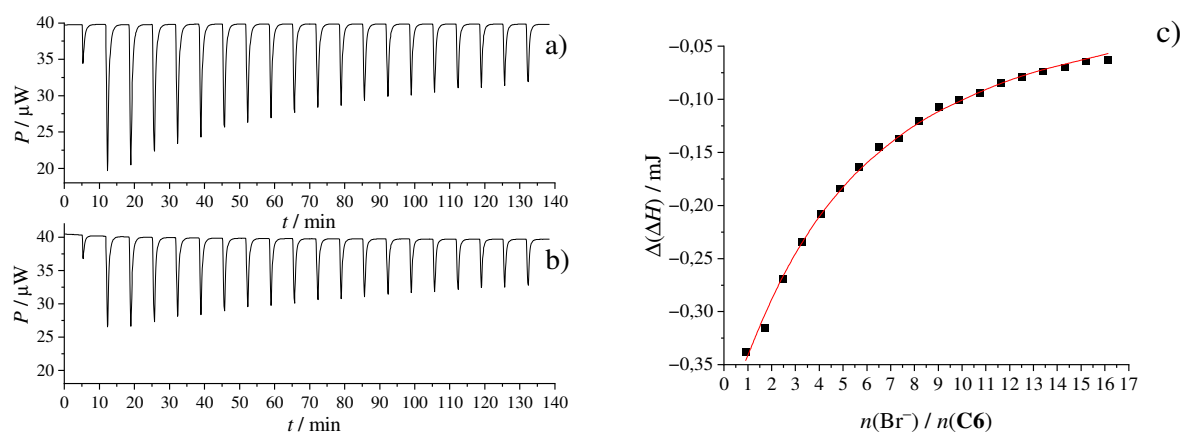
Slika D199. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,080 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** na 7,17 ppm o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C6})$.



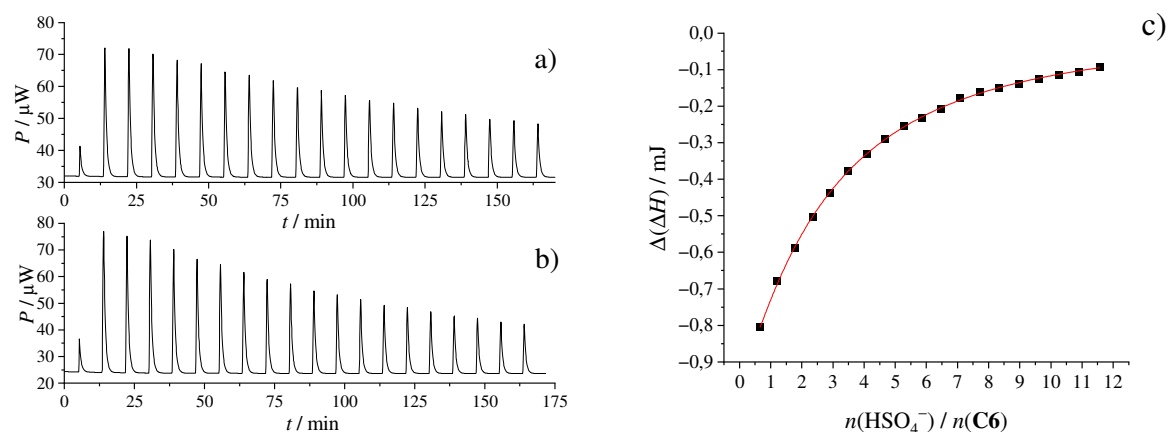
Slika D200. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,081 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka amidnih protona **C6** na 7,17 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C6})$.



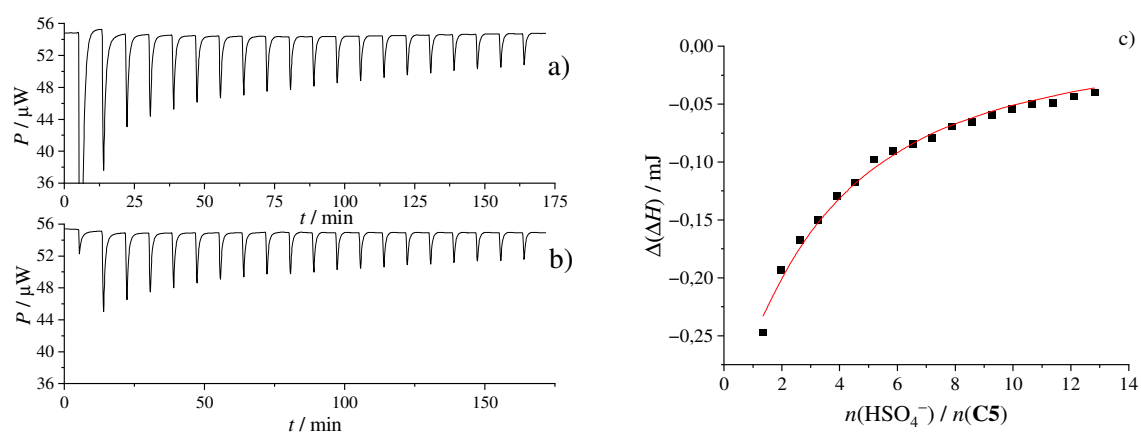
Slika D201. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 7,703 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TEACl ($c = 8,051 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 8,051 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



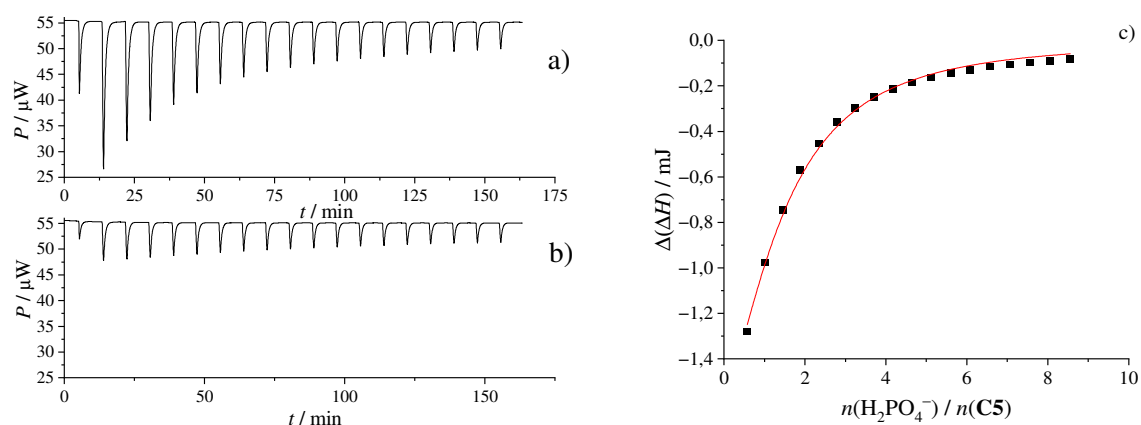
Slika D202. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 6,82 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBABr ($c = 0,0500 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBABr ($c = 0,0500 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



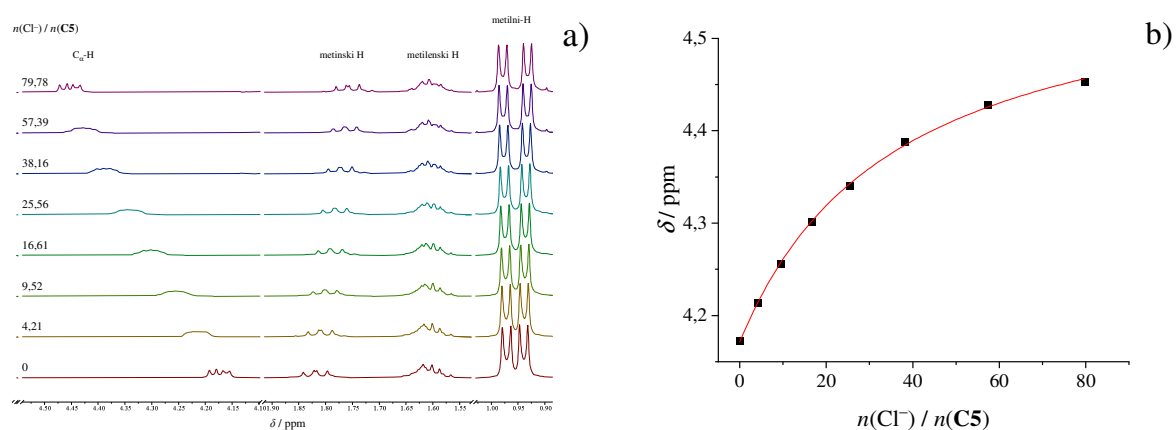
Slika D203. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 7,703 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAHSO₄ ($c = 0,0405 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 0,0405 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



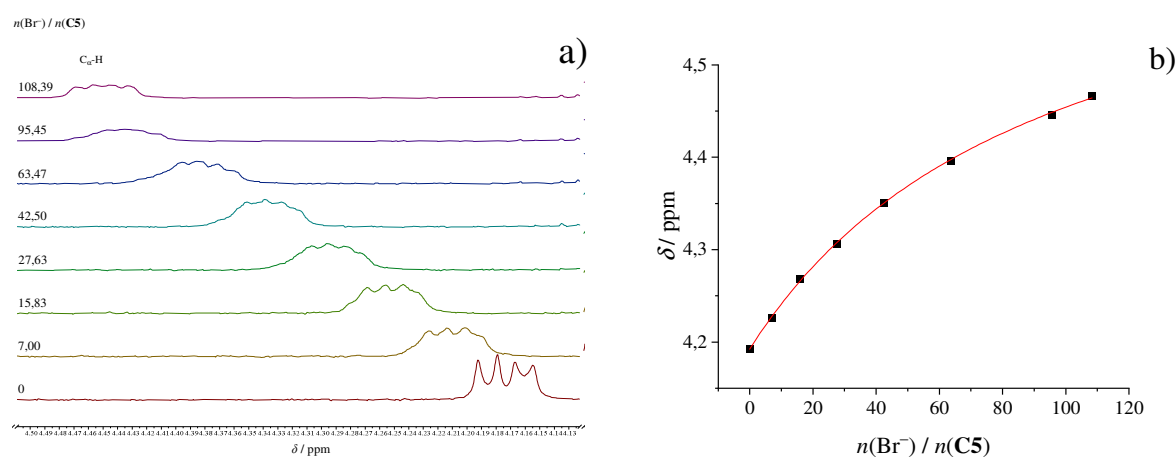
Slika D204. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAHSO_4 ($c = 0,0302 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s TBAHSO_4 ($c = 0,0302 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



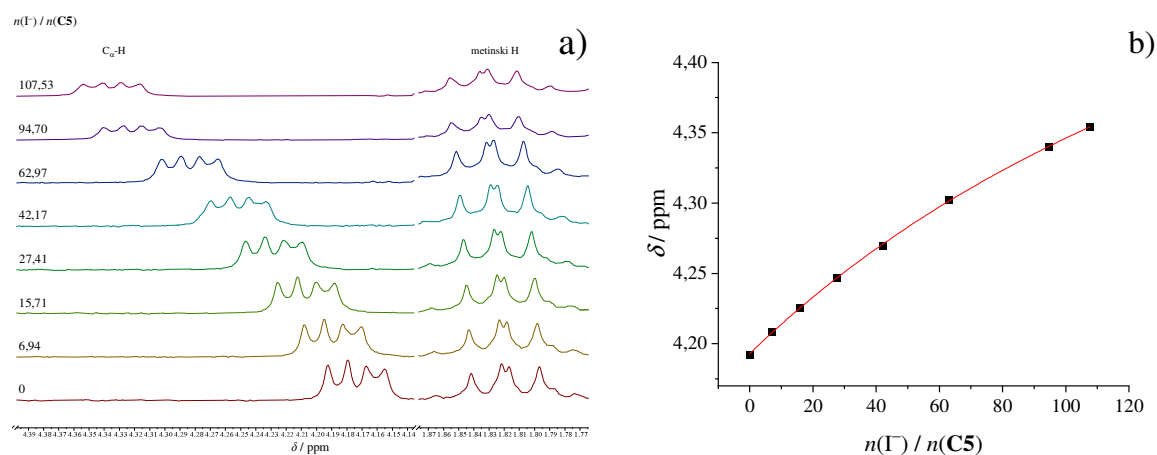
Slika D205. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,09 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0207 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s TBAH_2PO_4 ($c = 0,0207 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



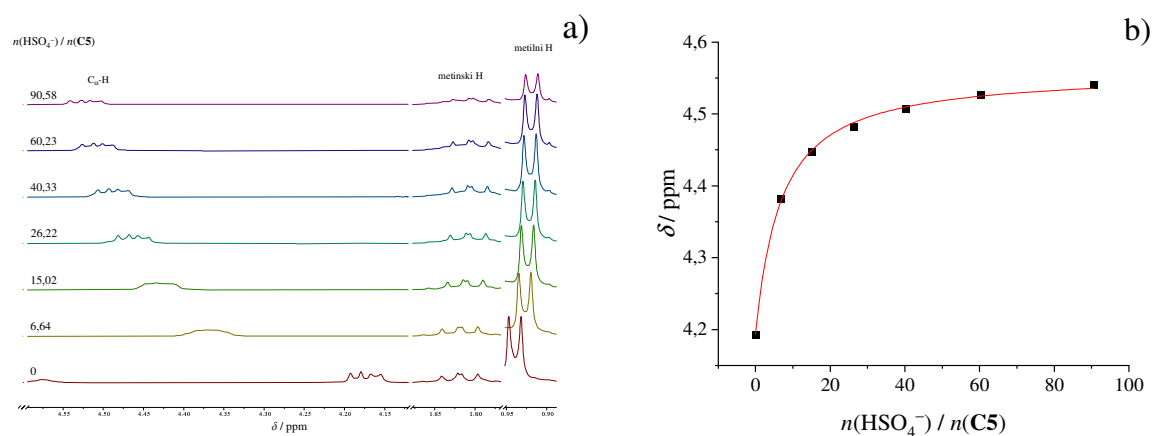
Slika D206. a) ¹H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,088 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0913 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,17 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{C5})$.



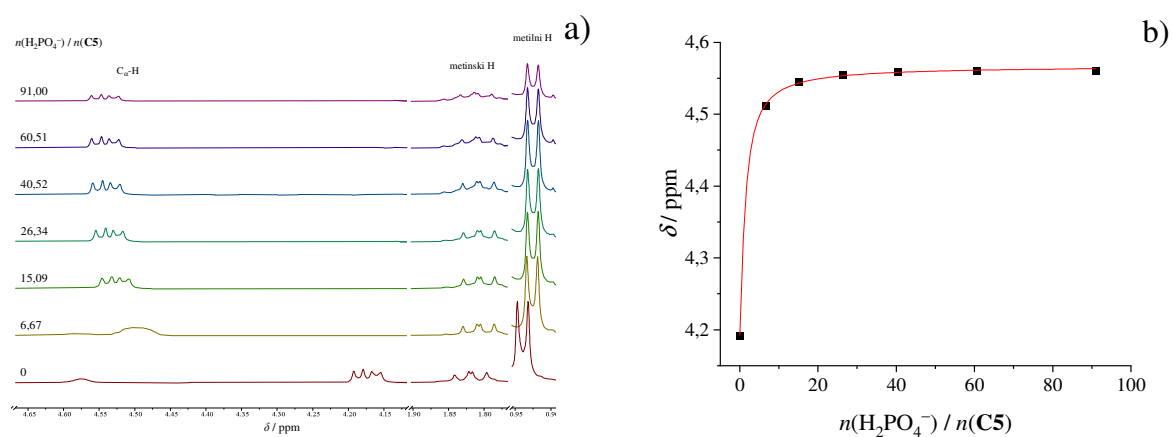
Slika D207. a) ¹H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,088 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,152 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,17 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C5})$.



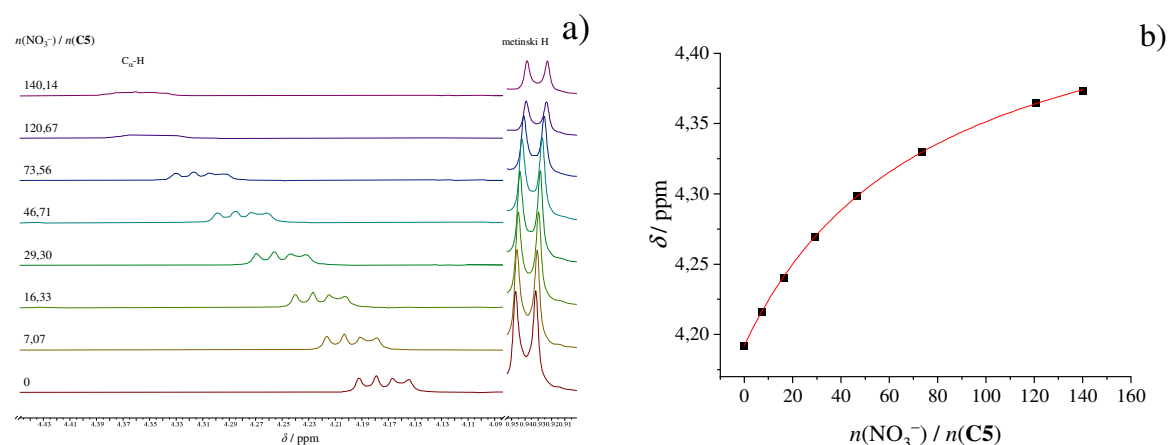
Slika D208. a) ¹H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,088 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\mathbf{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,17 ppm o omjeru $n(\Gamma^-) / n(\mathbf{C5})$.



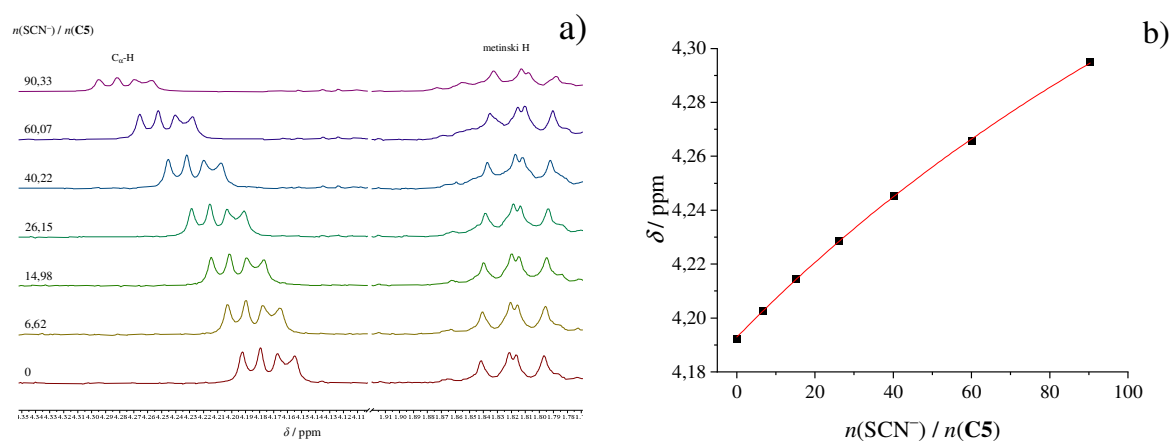
Slika D209. a) ¹H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,302 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\mathbf{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,19 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\mathbf{C5})$.



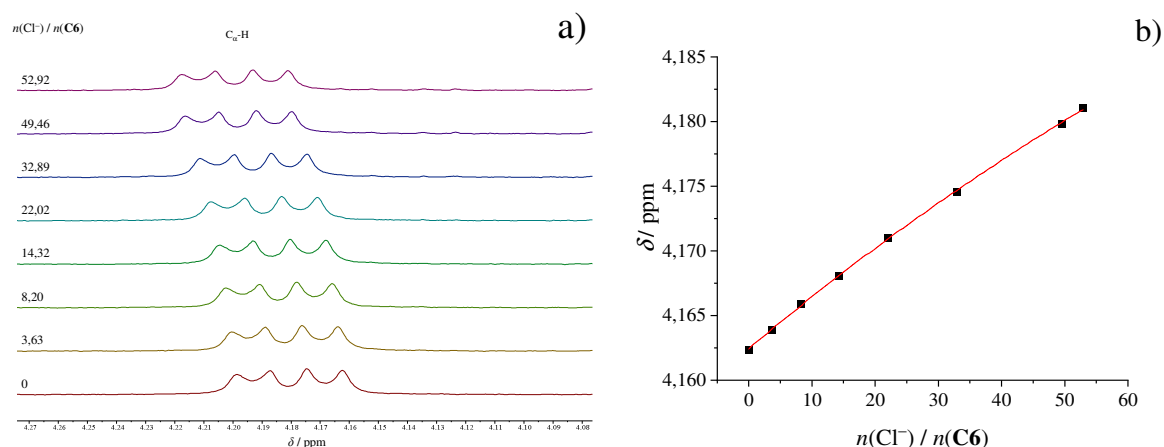
Slika D210. a) ^1H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,302 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,19 ppm o omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{C5})$.



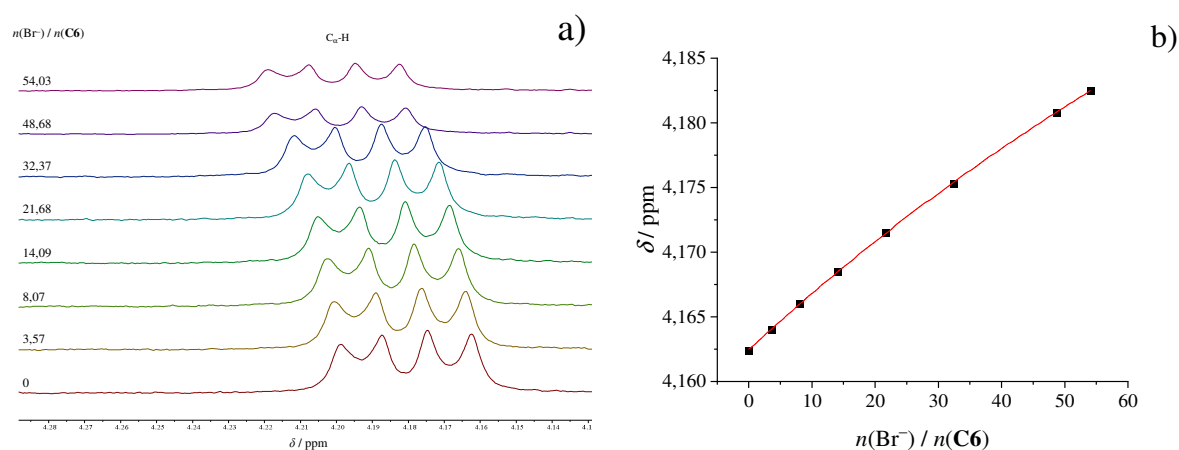
Slika D211. a) ^1H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,088 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,19 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C5})$.



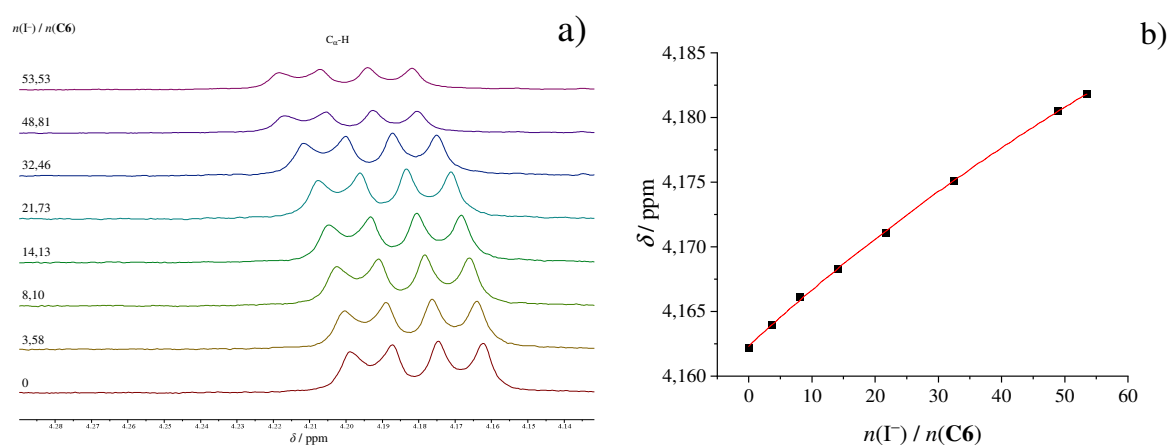
Slika D212. a) ^1H NMR titracija liganda **C5** ($c = 5,032 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C5}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C5** na 4,19 ppm o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C5})$.



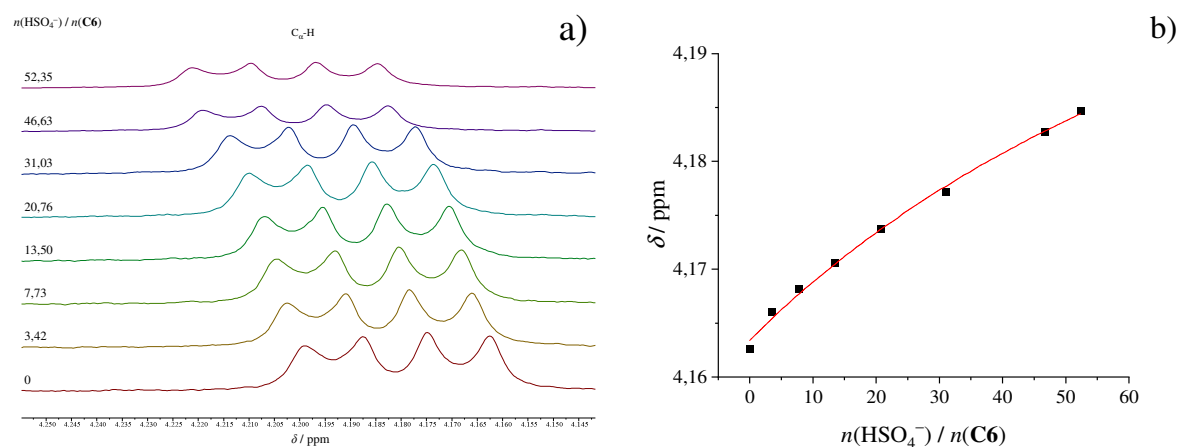
Slika D213. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 9,49 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,152 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{C6})$.



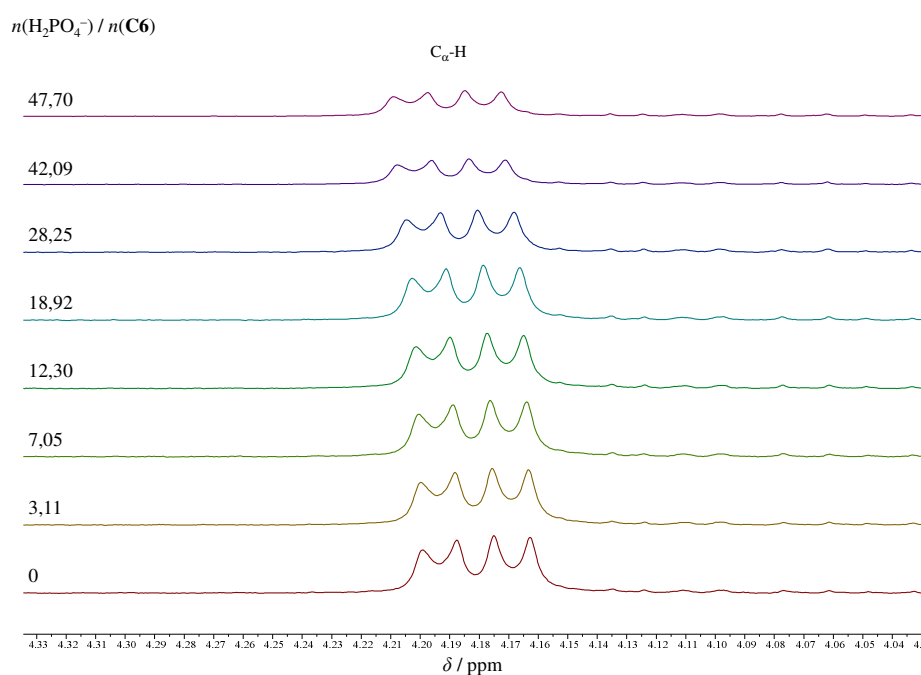
Slika D214. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 9,49 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{C6})$.



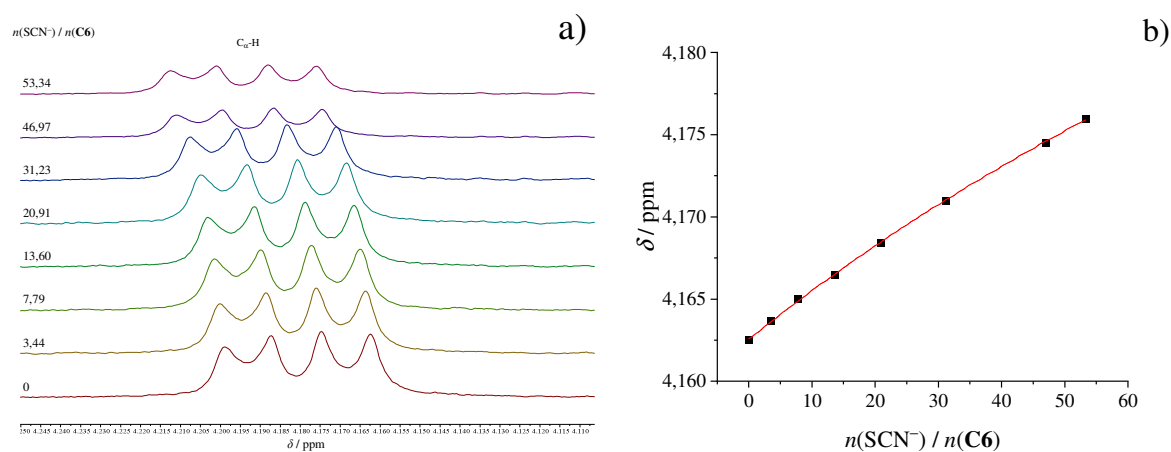
Slika D215. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 9,49 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{C6})$.



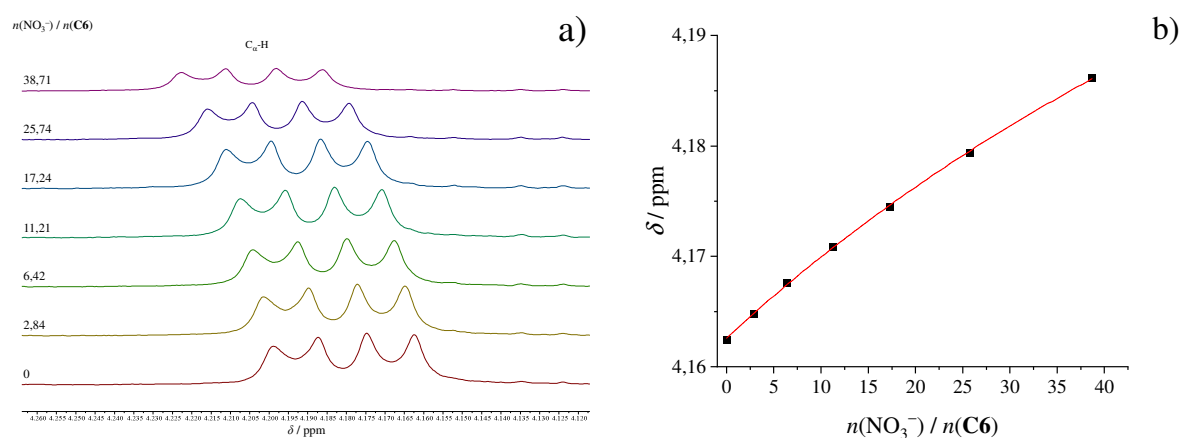
Slika D216. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,019 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO_4 ($c = 0,149 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{C6})$.



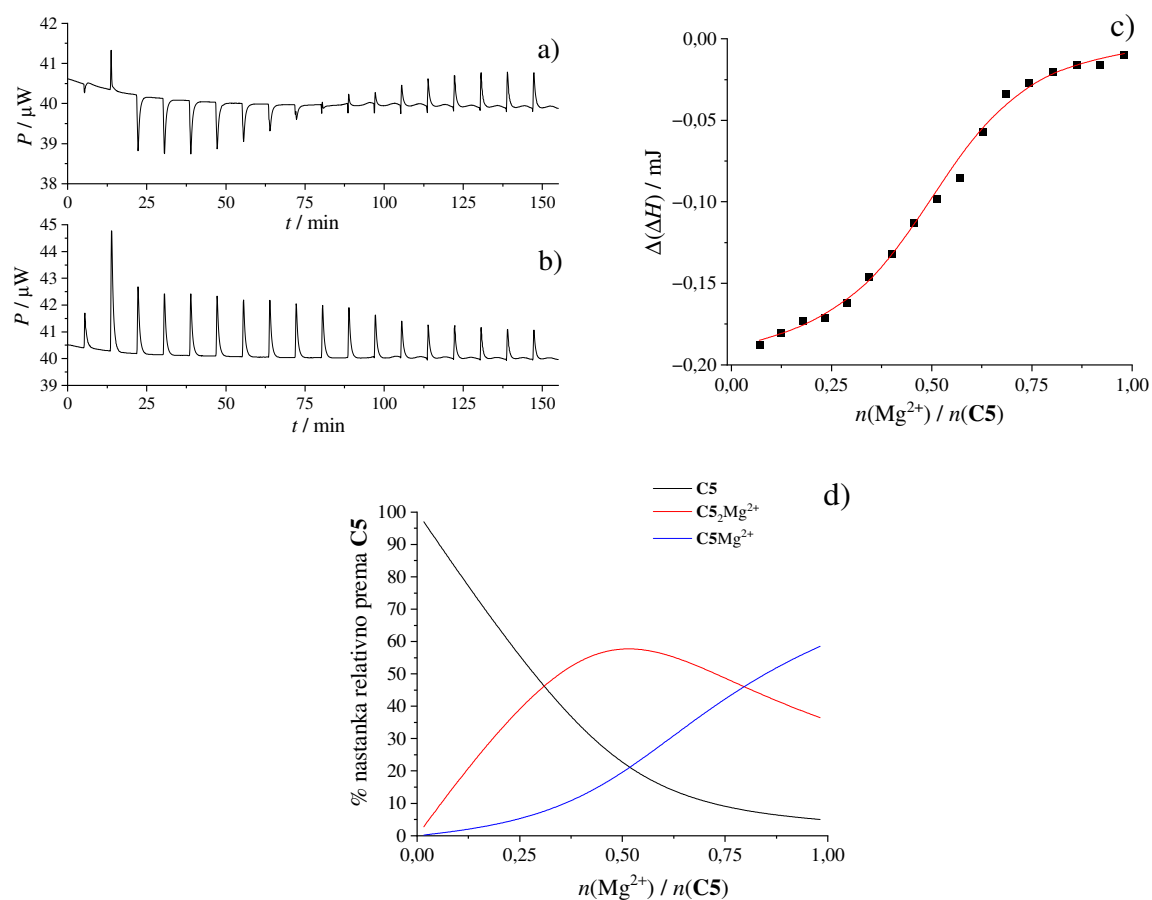
Slika D217. a) ^1H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,113 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$.



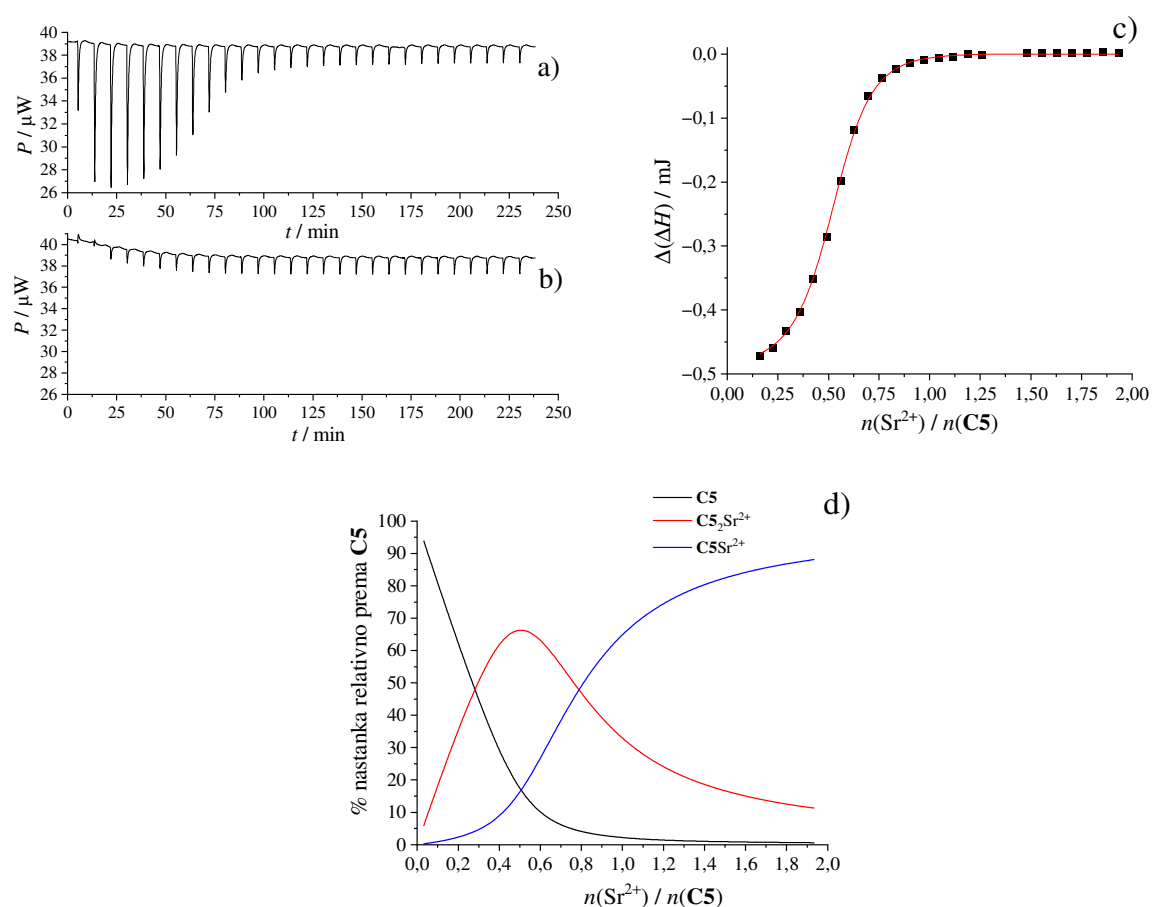
Slika D218. a) ¹H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,019 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 0,150 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{C6})$.



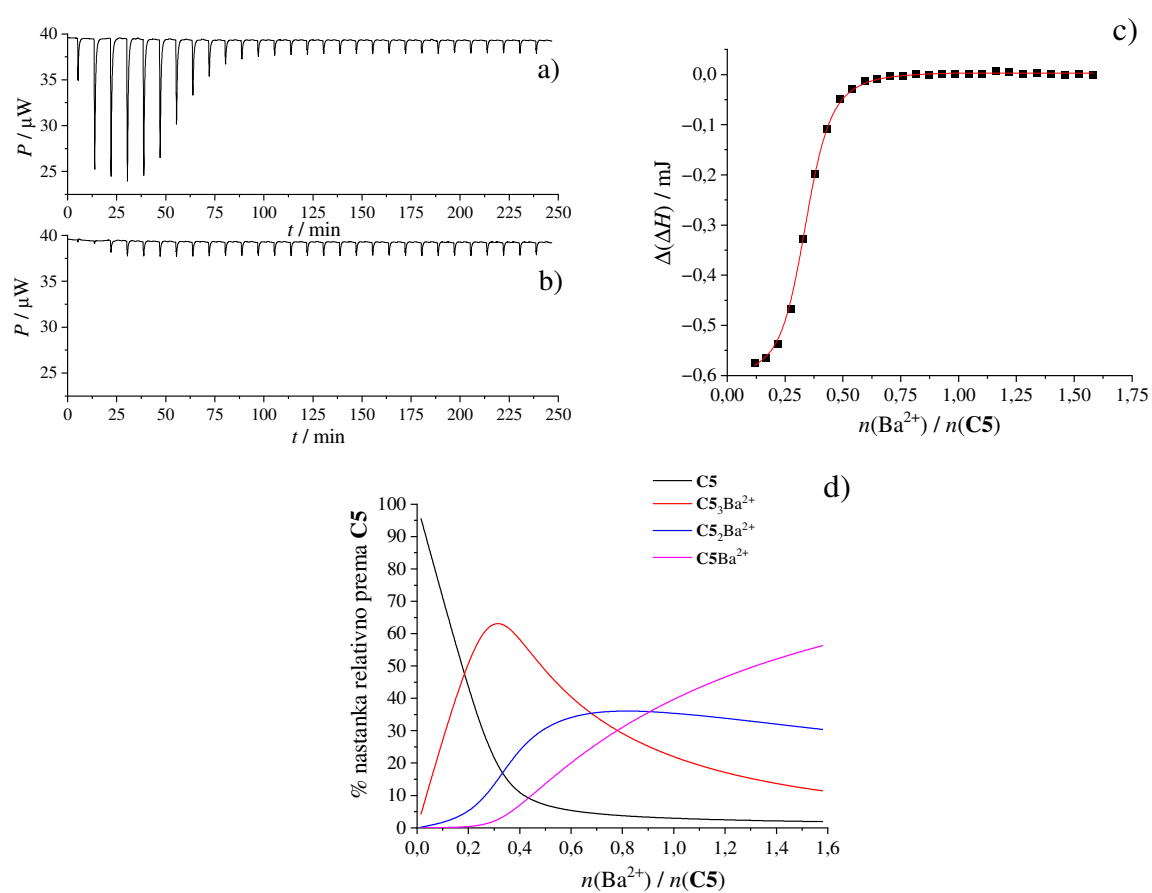
Slika D219. a) ¹H NMR titracija liganda **C6** ($c = 1,244 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO₃ ($c = 0,151 \text{ mol dm}^{-3}$) u deuteriranom metanolu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V_0(\text{C6}) = 0,50 \text{ cm}^3$. b) Ovisnost kemijskog pomaka α -protona **C6** na 4,16 ppm o omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{C6})$.



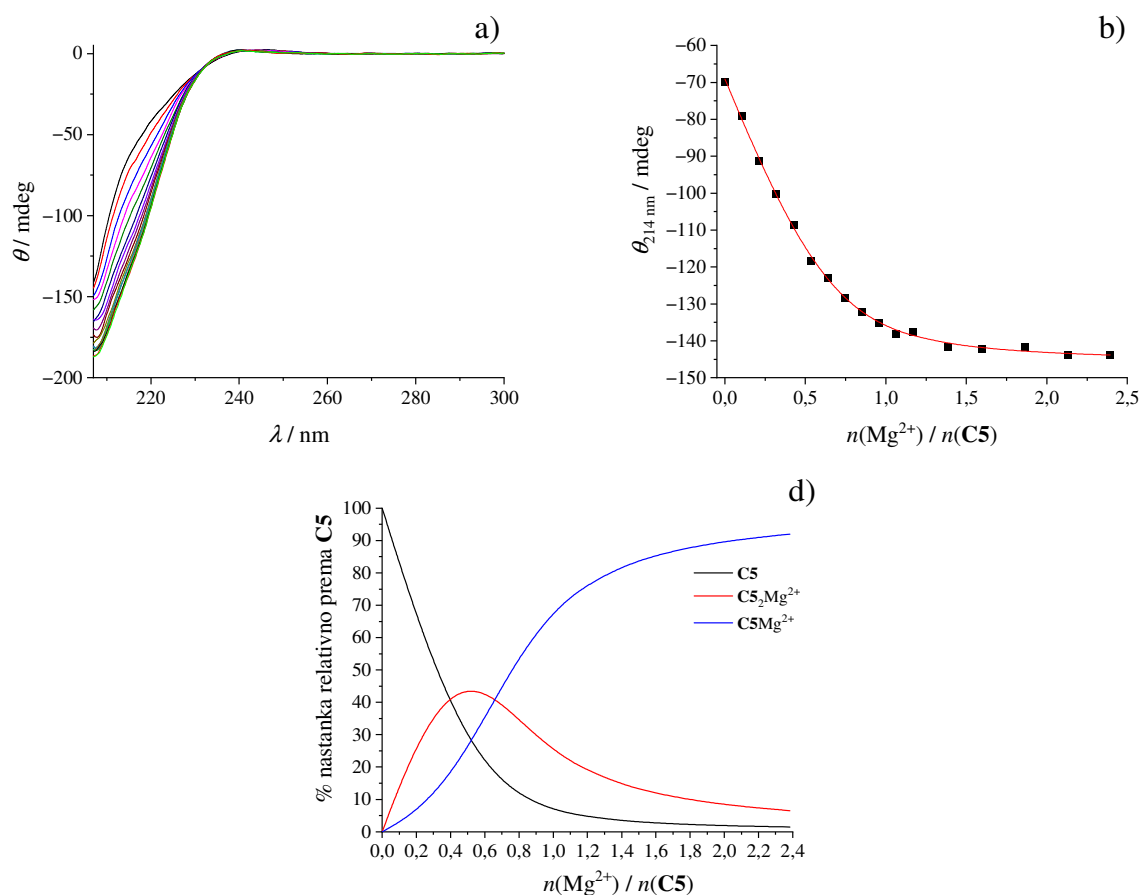
Slika D220. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 9,76 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,55 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,55 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



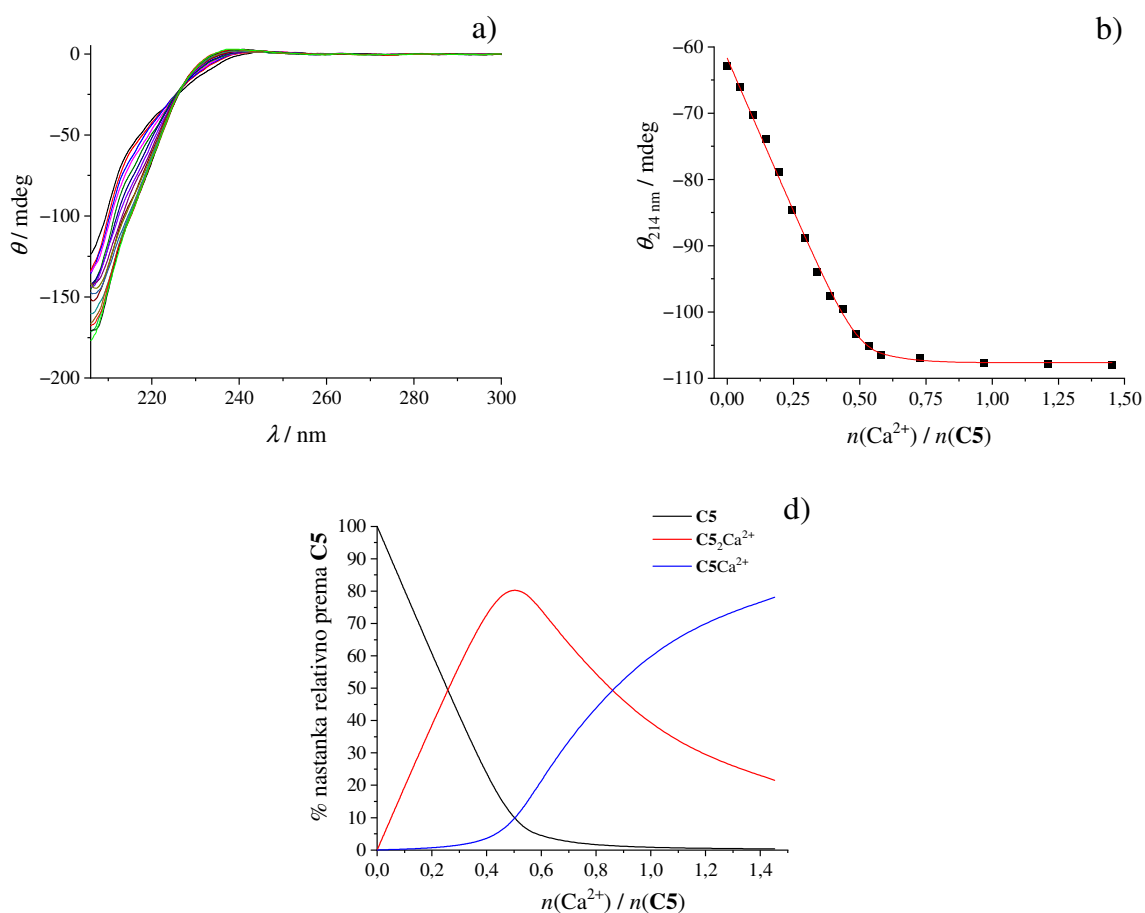
Slika D221. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 9,76 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,87 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,87 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



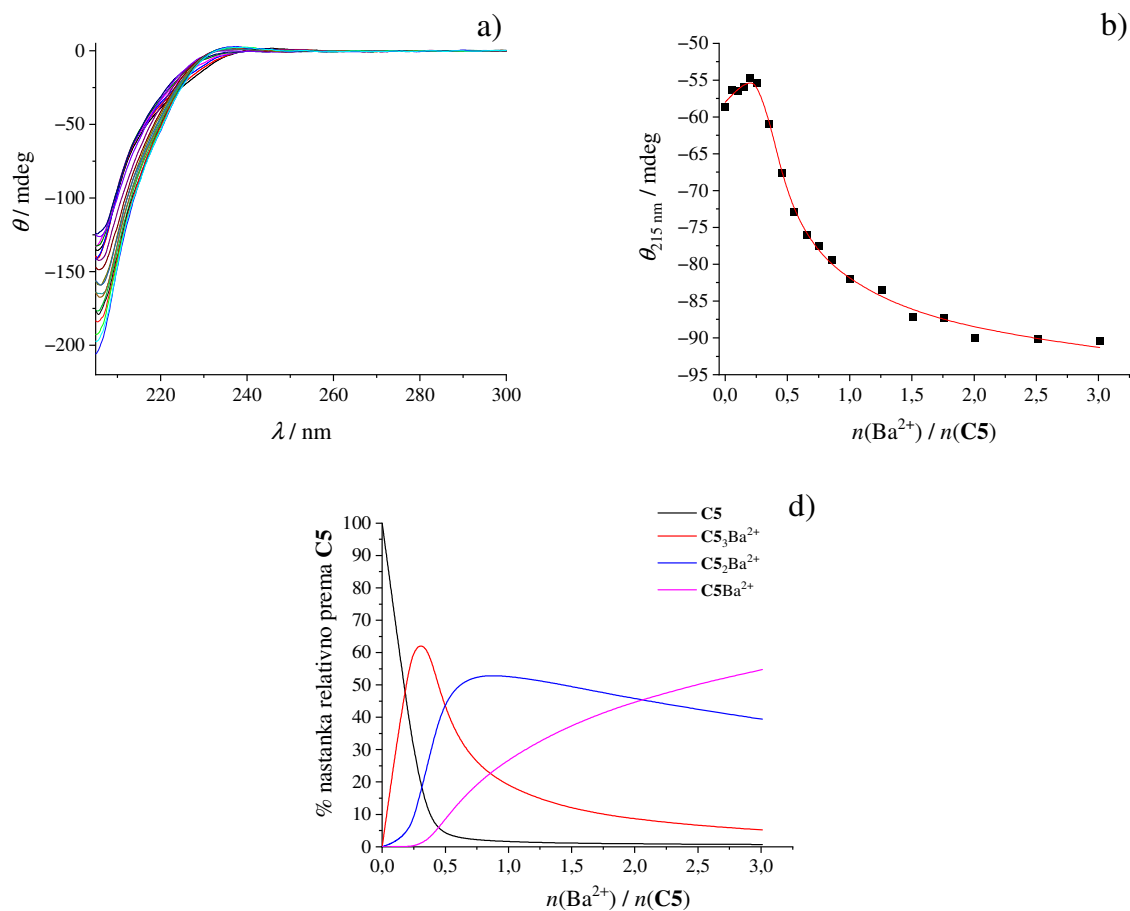
Slika D222. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 9,76 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 6,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 6,96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



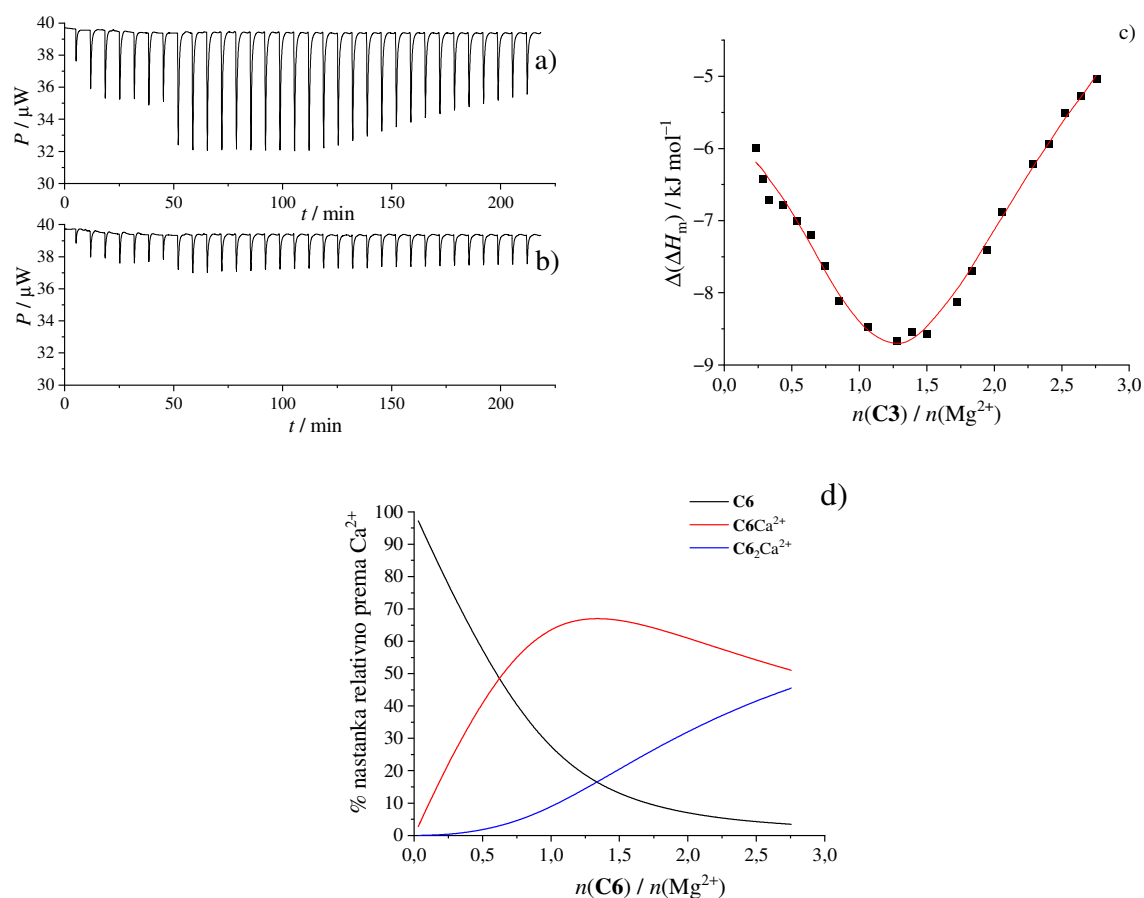
Slika D223. a) CD titracija liganda **C5** ($c = 9,72 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,00 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 214 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+})/n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



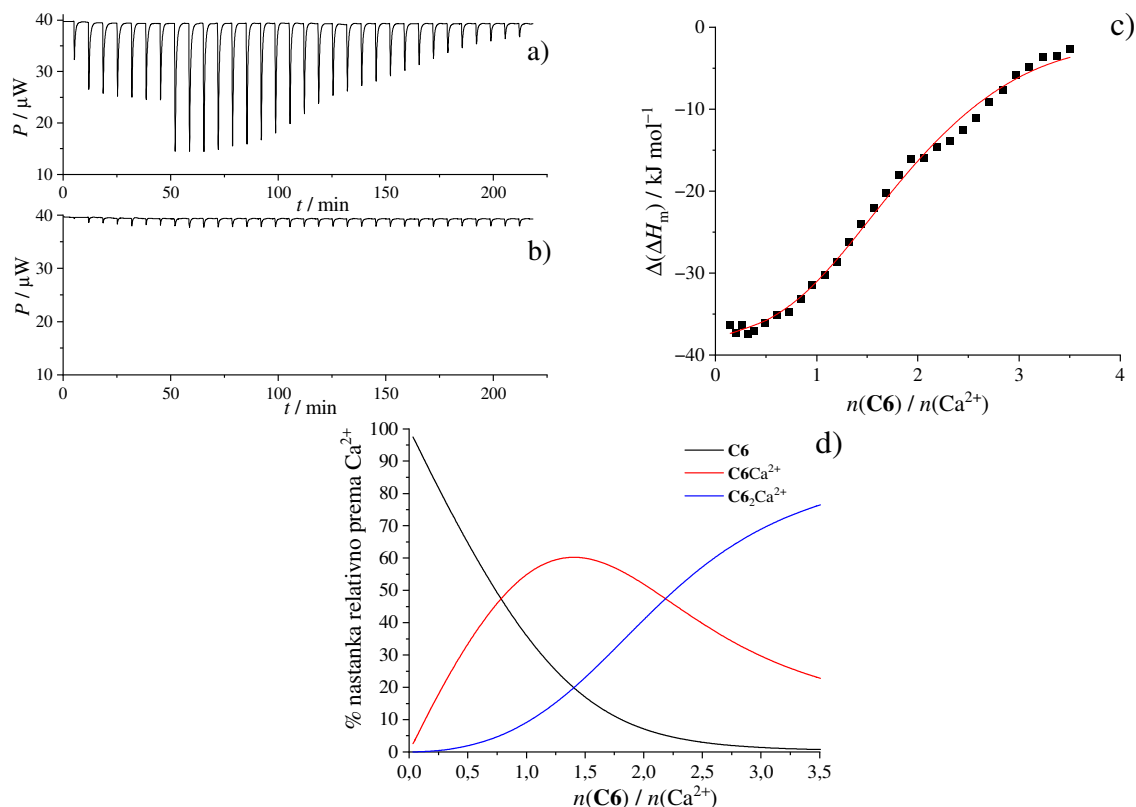
Slika D224. a) CD titracija liganda **C5** ($c = 1,04 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,00 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 214 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



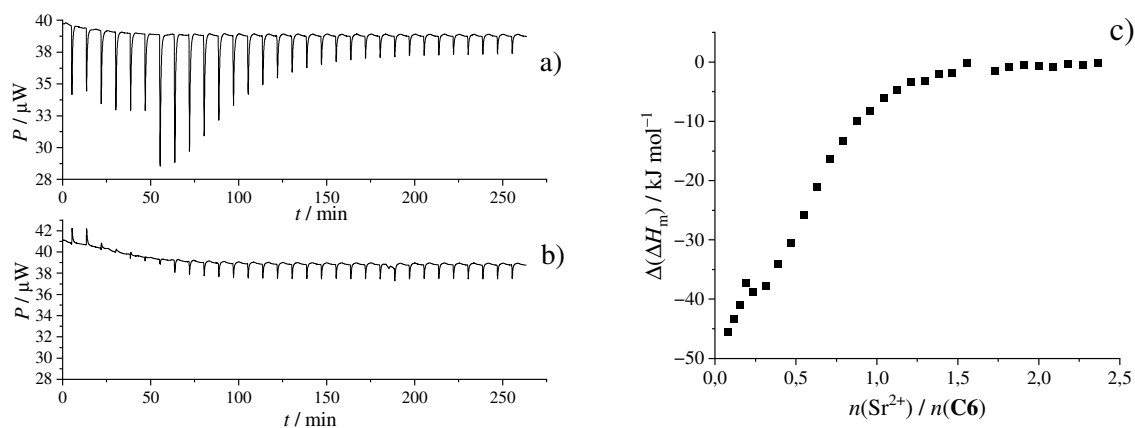
Slika D225. a) CD titracija liganda **C5** ($c = 1,04 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,96 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 9,93 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 214 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



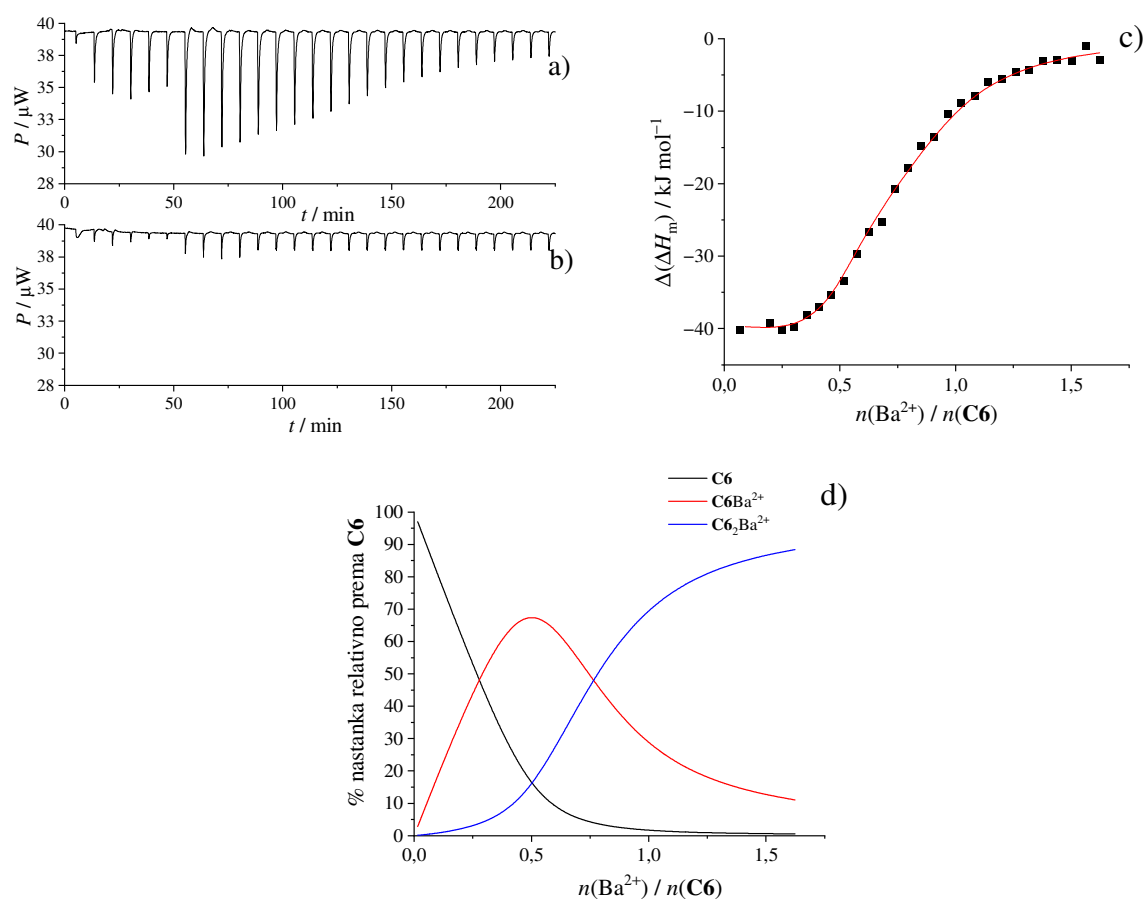
Slika D226. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,10 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s ligandom **C6** ($c = 2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 2,10 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitrilom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C6}) / n(\text{Mg}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



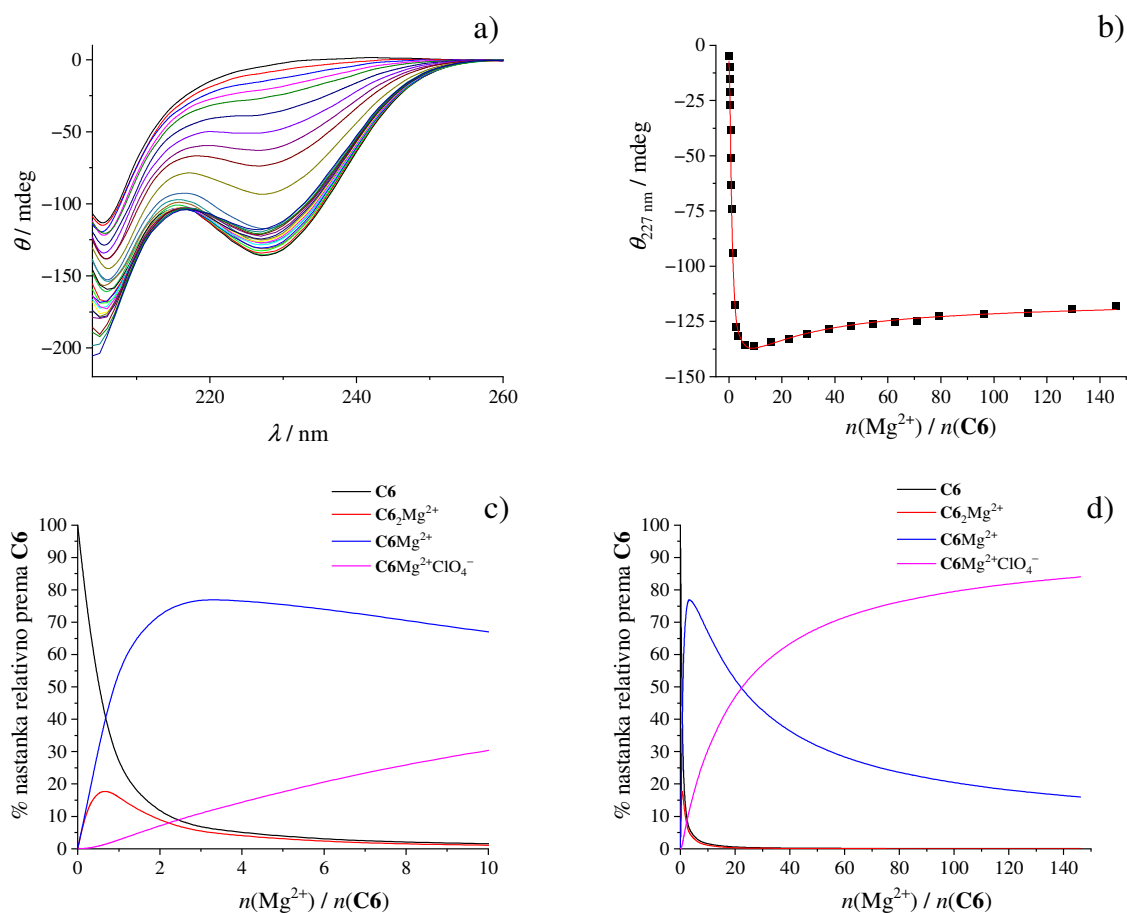
Slika D227. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,89 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s ligandom **C6** ($c = 3,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,89 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s acetonitrilom; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{C6}) / n(\text{Ca}^{2+})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



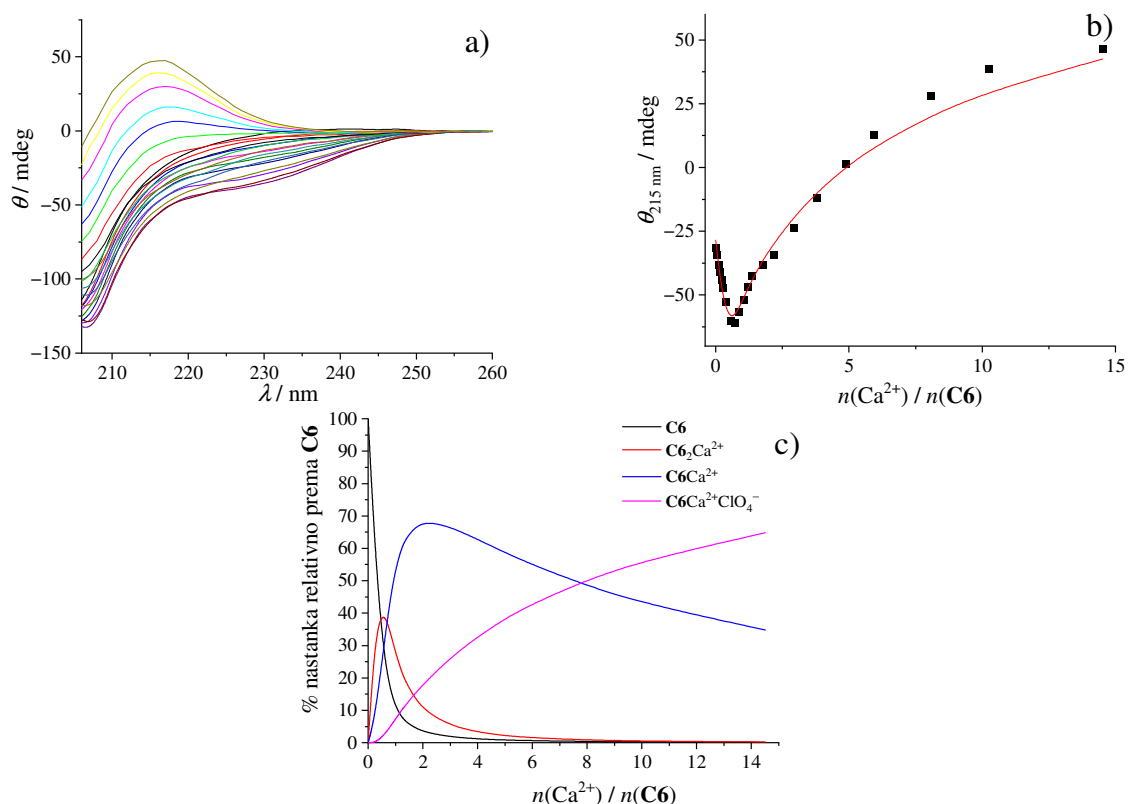
Slika D228. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 1,05 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 1,15 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C6})$.



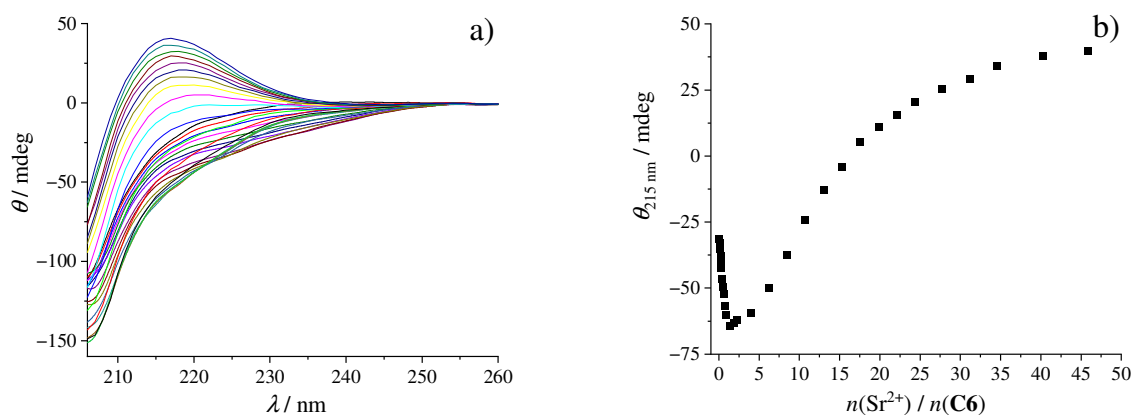
Slika D229. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C6** ($c = 1,05 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,43 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,62 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,62 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



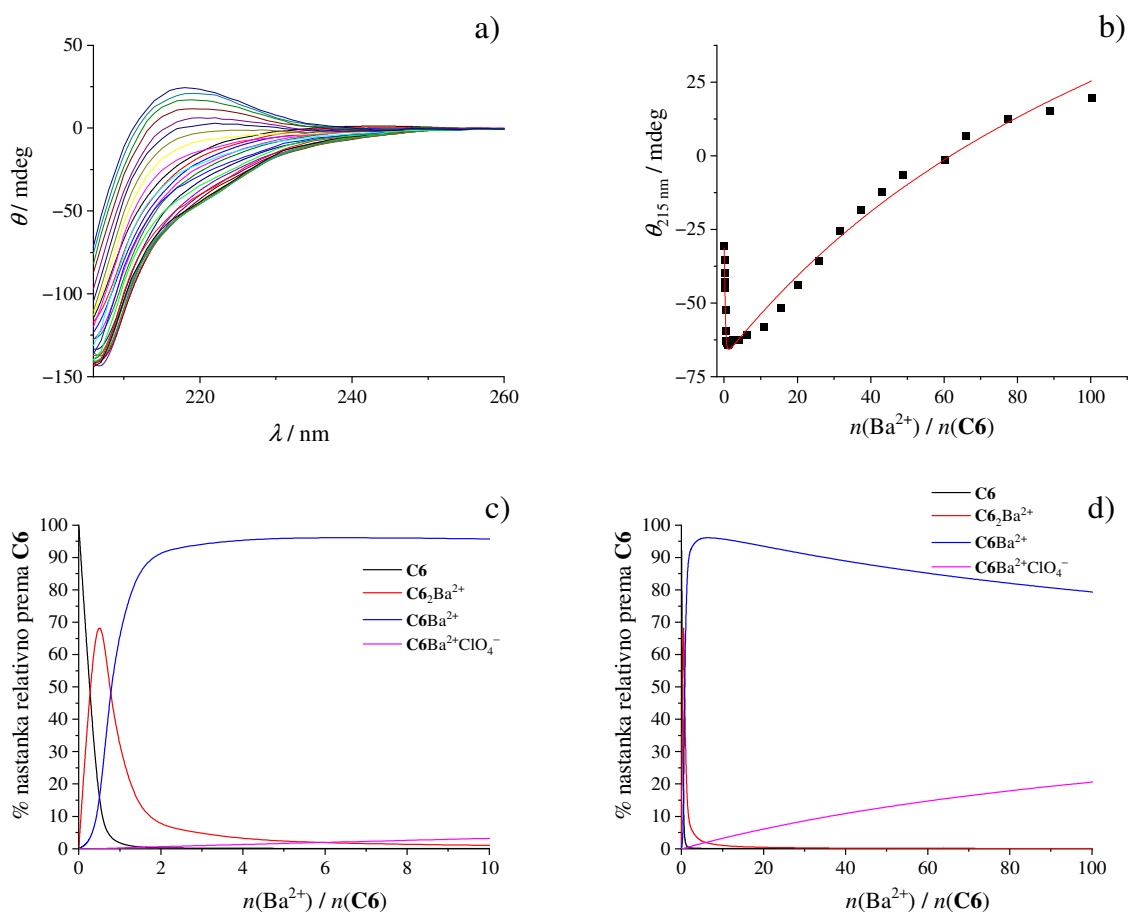
Slika D230. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,41 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $3,38 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 227 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) i d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije do omjera titransa i titranda 10, donosno 150.



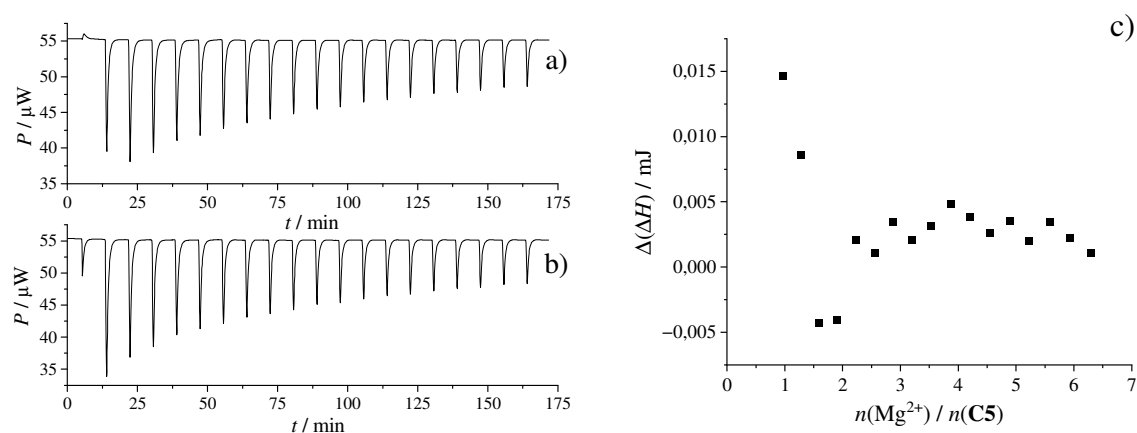
Slika D231. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,32 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,47 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $3,39 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 215 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije.



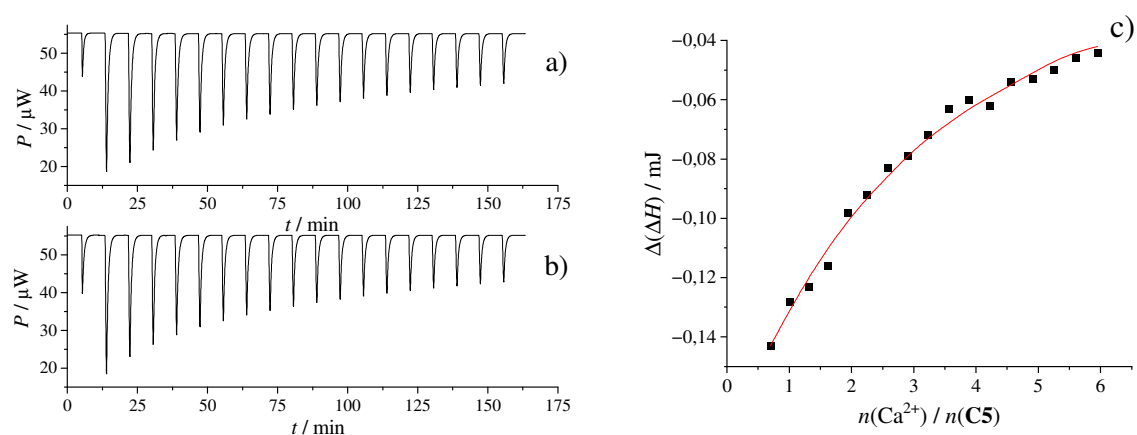
Slika D232. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,39 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $3,40 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 215 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C6})$.



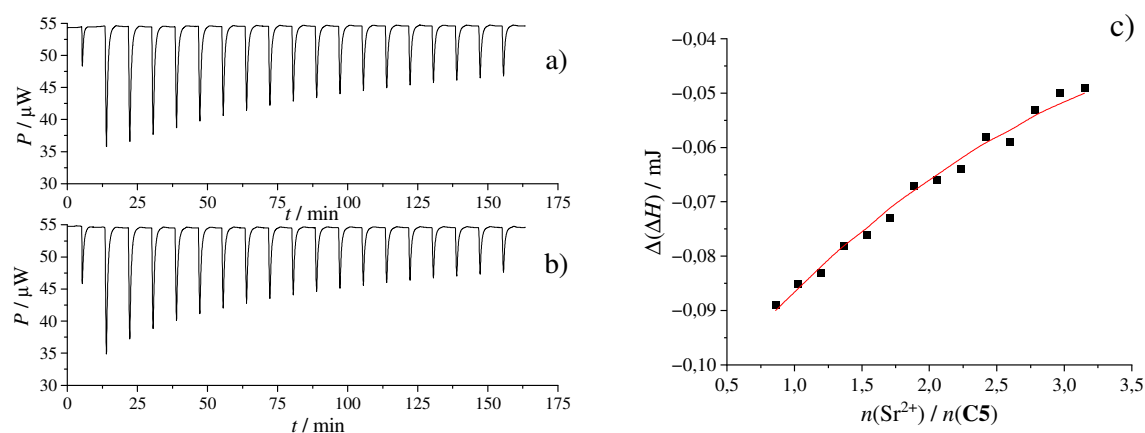
Slika D233. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 3,38 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $3,44 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 215 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti. c) i d) Distribucijski dijagram vrsta u otopini tijekom titracije do omjera titransa i titranda 10, donosno 100.



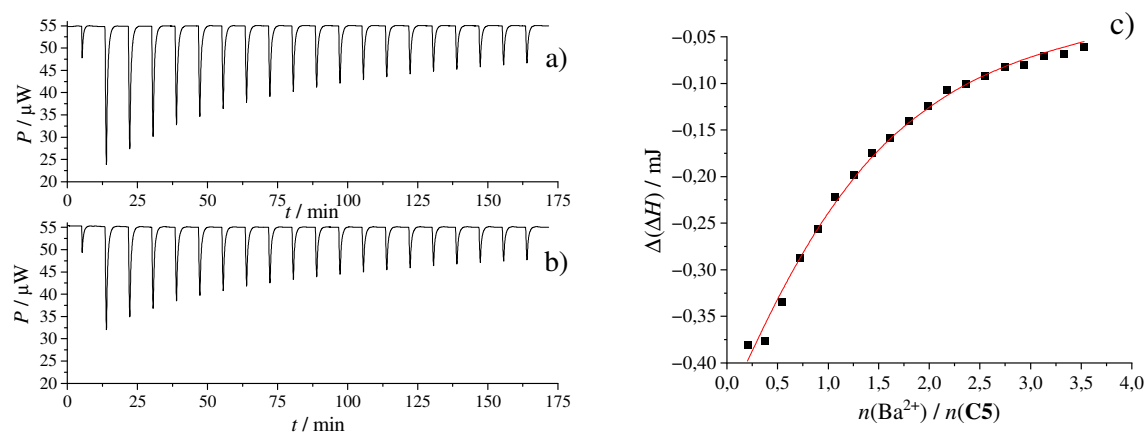
Slika D234. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0148 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0148 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Mg}^{2+})/n(\text{C5})$.



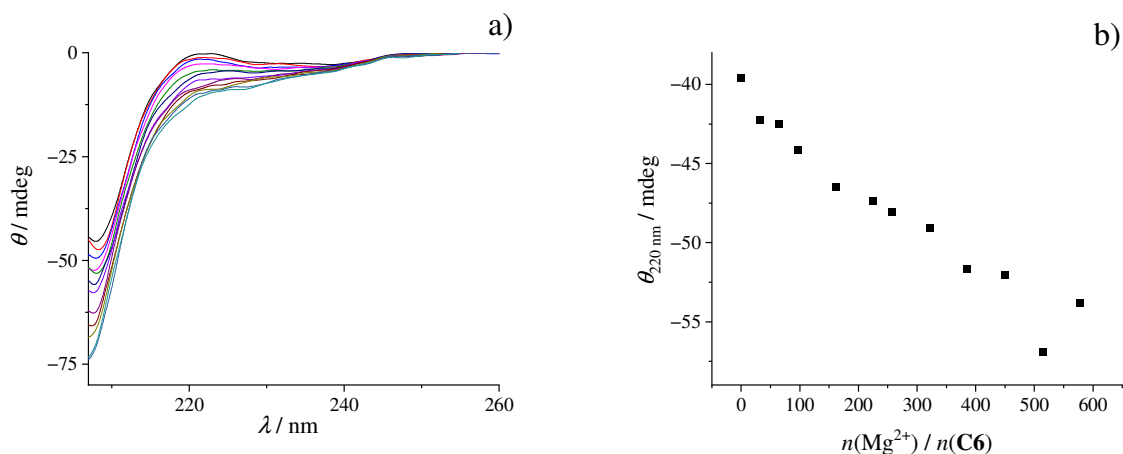
Slika D235. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0144 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0144 \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ca}^{2+})/n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



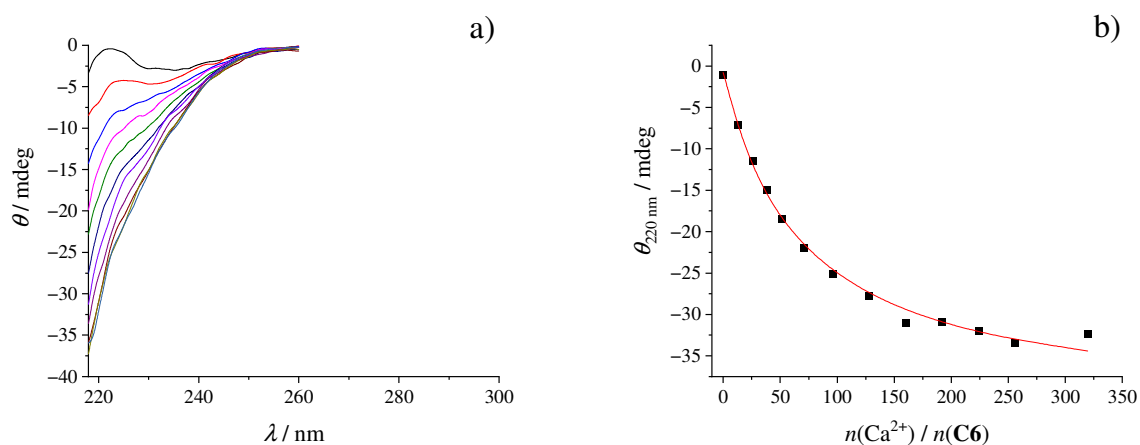
Slika D236. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 7,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



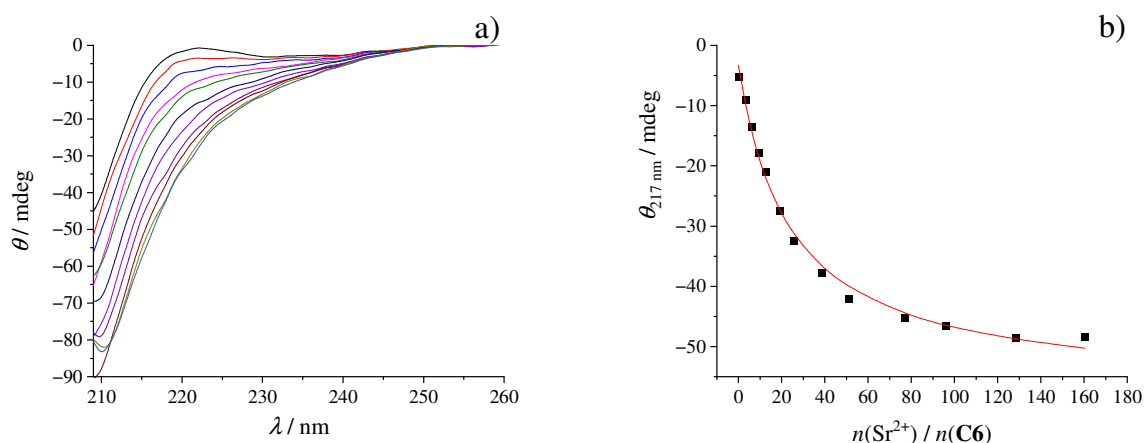
Slika D237. a) Mikrokalorimetrijska titracija liganda **C5** ($c = 5,12 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 1,45 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija metanola s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 8,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$); $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene molarne entalpije o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C5})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



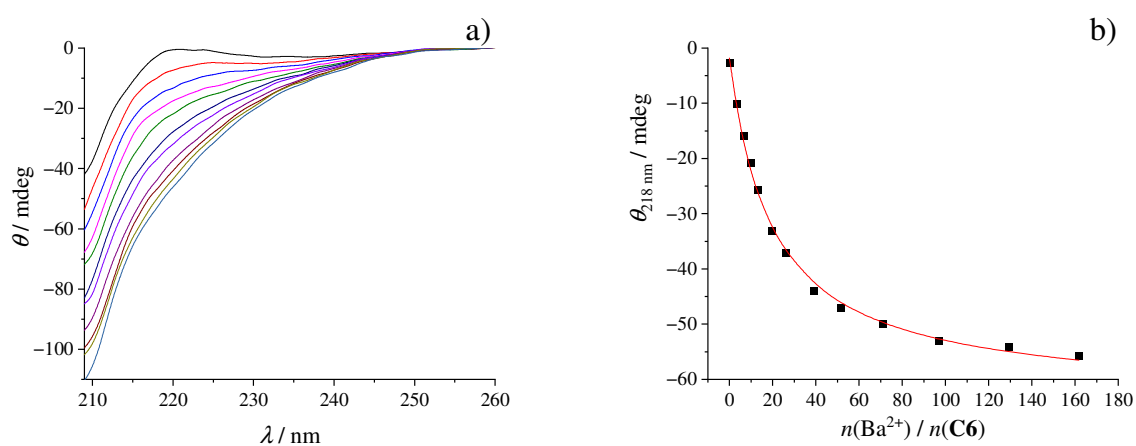
Slika D238. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,202 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 210 nm o omjeru $n(\text{Mg}^{2+}) / n(\text{C6})$.



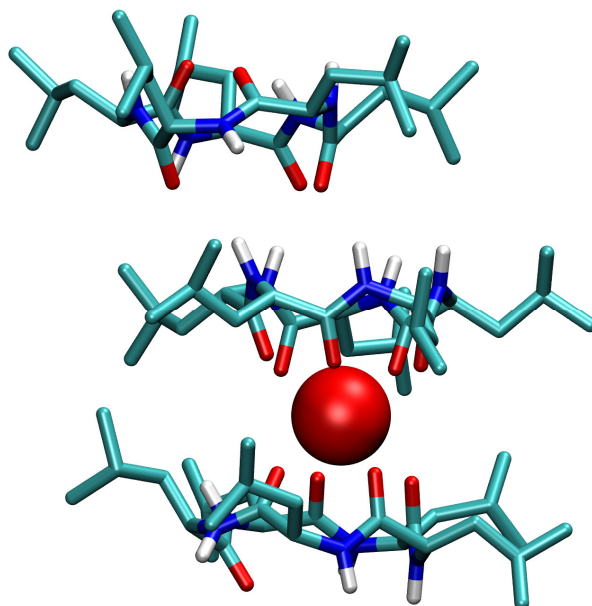
Slika D239. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,201 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 220 nm o omjeru $n(\text{Ca}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



Slika D240. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,31 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,101 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 217 nm o omjeru $n(\text{Sr}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



Slika D241. a) CD titracija liganda **C6** ($c = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V = 2,40 \text{ cm}^3$) s $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($c = 0,0994 \text{ mol dm}^{-3}$) u metanolu; $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1,0 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. b) Ovisnost elipticiteta pri 218 nm o omjeru $n(\text{Ba}^{2+}) / n(\text{C6})$. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.



Slika D242. Struktura kompleksa $C5_3Ba^{2+}$ dobivena MD simulacijama u vakuumu. Vodikovi atomi bočnih ogranaka peptida izostavljeni su zbog jasnoće.

§ 9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Matija Modrušan
Datum i mjesto rođenja: 9. listopada 1996. Rijeka, Republika Hrvatska
E-mail: mmodrusan.chem@pmf.hr

OBRAZOVANJE

- 2021.– Doktorski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2018.–2020. Sveučilišni diplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
magistar kemije, mag. chem.
Naslov rada: *Sinteza fenantridinskog glikokonjugata kaliks[4]arena i fizikalno-kemijska karakterizacija njegovih reakcija kompleksiranja kationa alkalijskih metala*
Mentori: izv. prof. dr. sc. Nikola Cindro, prof. dr. sc. Vladislav Tomišić
Neposredni voditelj: dr. sc. Katarina Leko
- 2015.–2018. Sveučilišni prijediplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Sveučilišni prvostupnik kemije, univ. bacc. chem.
Naslov rada: *Određivanje termodinamičkih i kinetičkih reakcijskih veličina u otopini iz eksperimentalnih podataka*
Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
- 2011.–2015. Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile Pazin
Opća gimnazija
- 2003.–2011. Osnovna škola Petra Studenca Kanfanar

ZAPOSLLENJE

- 2021.– Asistent, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Kemijski odsjek , Zavod za fizikalnu kemiju
- 2020.–2021. Stručni suradnik, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
Kemijski odsjek , Zavod za fizikalnu kemiju

ZNANSTVENE AKTIVNOSTI

- 2025.– Suradnik na HRZZ projektu *Kompleksi ciklopeptida s funkcionalnim ionima* (CpepFunxIon, IP-2025-02-8238), voditelj: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
- 2024.– Suradnik na HRZZ projektu *Termodinamički, spektroskopski i strukturni aspekti koordinacijskih reakcija kaliksarena* (CalixCORE, IP-2024-05-3012), voditelj: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić
- 2021.–2024. Suradnik na HRZZ projektu *Koordinacijske reakcije makrocikličkih liganada u otopini* (MacroSol, IP-2019-04-9560), voditelj: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM RADIONICAMA

2026. Workshop on BioExcel Software Tools, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia. (2 dana)
2025. Znanstveno usavršavanje, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija. (21 dan)
2023. Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija. (2 dana)
2022. BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations 2022, Science and Technology Park of Sardinia, Pula, Italija. (5 dana)

NASTAVNE AKTIVNOSTI

- 2020.– Praktikum fizikalne kemije 1, asistent
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
- 2020.– Praktikum fizikalne kemije 2, asistent
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
- 2020.– Viši praktikum fizikalne kemije 1, asistent
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
- 2020.– Viši praktikum fizikalne kemije 2, asistent
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
2023. Osnove fizikalne kemije, asistent
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
- 2018.–2020. Praktikum fizikalne kemije 1, demonstrator
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu
- 2018.–2020. Praktikum fizikalne kemije 2, demonstrator
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu

NEPOSREDNO VODITELJSTVO

1. Emilija Petrović Hađar, *Ion-receptorska svojstva cikloheksapeptida Phe₄Gly₂ u acetonitrilu*, Rektorova nagrada, 2024. Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
2. Lucija Otmačić, *Termodinamička i strukturna karakterizacija kompleksa ciklopeptida s kolorimetrijskim i fluorescentnim anionskim bojama*, Diplomski rad, 2024. Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat
3. Lucija Otmačić, *Kompleksiranje aniona metilnim esterom pentafenilalanina u acetonitrilu*, Rektorova nagrada, 2023. Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat

4. Lucija Glazer, *Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja metilnih estera tetra i heksafenilalanina s anionima u acetonitrilu*, Diplomski rad, 2023.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat

NAGRADE

2025. Nagrada za najbolji poster, *Computational study of cation binding by tetra-o-2-oxopropyl-substituted calix[4]arene isomers*, VII Symposium on Supramolecular Chemistry, 2025., Zagreb, Hrvatska.
2020. Rektorova nagrada za individualni istraživački rad
Naslov rada: *Termodinamika kompleksiranja alkalijskih i zemnoalkalijskih kationa s ketonskim derivatom kaliksarena*
Mentor: prof. dr. sc. Josip Požar
2020. Medalja Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh u studiju

ČLANSTVA

- 2016.– Hrvatsko kemijsko društvo

ORGANIZACIJA ZNANSTVENIH SKUPOVA

2019. 6. Simpozij studenata kemičara, Član organizacijskog odbora

POPULARIZACIJA ZNANOSTI

- 2016.–2025. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)
2023. Smotra Sveučilišta u Zagrebu, kao jedan od voditelja
- 2019.–2020. Smotra Sveučilišta u Zagrebu, kao student

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. **M. Modrušan**, N. Cindro, M. Cvetnić, A. Usenik, S. Petrović, J. Borovec, K. Leko, K. Kukina Gradečak, V. Stilinović, G. Horvat, T. Hrenar, J. Požar, V. Tomišić, *ACS Org. Inorg. Au* **6** (2026) 88–103.
2. T. Rinkovec, S. Tarana, **M. Modrušan**, N. Vidović, A. Tomić, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *J. Mol. Liq* **433** (2025) 127837.
3. A. Usenik, **M. Modrušan**, K. Leko, J. Borovec, S. Marinac, L. Hok, N. Cindro, R. Vianello, G. Horvat, J. Požar, T. Hrenar, V. Tomišić, *Int. J. Mol. Sci.* **26** (2025) 1264.
4. **M. Modrušan**, L. Glazer, L. Otmačić, I. Crnolatac, N. Cindro, N. Vidović, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Int. J. Mol. Sci.* **25** (2024) 5235.
5. **M. Modrušan**, N. Cindro, A. Usenik, K. Leko, L. Glazer, R. Tomaš, G. Horvat, J. Požar, V. Tomišić, *Croat. Chem. Acta* **97** (2024) 189–203.
6. K. Leko, A. Usenik, N. Cindro, **M. Modrušan**, J. Požar, G. Horvat, V. Stilinović, T. Hrenar, V. Tomišić, *ACS Omega* **8** (2023) 43074–43087.
7. I. Petters, **M. Modrušan**, N. Vidović, I. Crnolatac, N. Cindro, I. Piantanida, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Molecules* **27** (2022) 3918.
8. J. Požar, M. Cvetnić, A. Usenik, N. Cindro, G. Horvat, K. Leko, M. Modrušan, V. Tomišić, *Molecules* **27** (2022) 470.

SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

Usmena izlaganja

1. **M. Modrušan**, *Anion binding by phenylalanine and leucine cyclopeptides: thermodynamic and structural study*, 29th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 7th Symposium Vladimir Prelog, 2025., Split, Hrvatska.
2. **M. Modrušan**, *Peptides as versatile ion-binding receptors*, *Adriatic NMR Conference 2023*, 2023., Mali Ston, Hrvatska.
3. **M. Modrušan**, *Effect of chain length on the affinities of the short linear homopeptides towards ions in solution*, VI. simpozij supramolekulske kemije, 2023., Zagreb, Hrvatska.

Posterska izlaganja

1. **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, P. Jukić, A. Jurčević, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Alkaline earth metal cation binding by leucine and phenylalanine penta and hexa cyclopeptides in acetonitrile*, VII Symposium on Supramolecular Chemistry, 2025., Zagreb, Hrvatska.

2. **M. Modrušan**, J. Borovec, A. Usenik, G. Horvat, J. Požar, T. Hrenar, V. Tomišić, *Computational study of cation binding by tetra-o-2-oxopropyl-substituted calix[4]arene isomers*, VII Symposium on Supramolecular Chemistry, 2025., Zagreb, Hrvatska.
3. **S. Marinac**, A. Usenik, **M. Modrušan**, J. Borovec, K. Pičuljan, K. Leko, G. Horvat, J. Požar, N. Cindro, T. Hrenar, V. Tomišić, *Experimental and computational studies of solvent molecule inclusion within a calix[4]arene hydrophobic cavity*, Summer conference of Croatian chemical society Rijeka – pula 2025, 2025., Rijeka, Hrvatska.
4. **S. Marinac**, A. Usenik, **M. Modrušan**, J. Borovec, K. Pičuljan, K. Leko, G. Horvat, J. Požar, N. Cindro, T. Hrenar, V. Tomišić, *Calorimetric, spectroscopic, and computational studies of calixarene-solvent adducts formation*, 29th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 7th Symposium Vladimir Prelog, 2025., Split, Hrvatska.
5. **S. Marinac**, A. Usenik, **M. Modrušan**, J. Borovec, K. Pičuljan, K. Leko, G. Horvat, J. Požar, N. Cindro, T. Hrenar, V. Tomišić, *Calixarene-solvent adducts formation: a comprehensive thermodynamic and computational study*, 10th Symposium of Chemistry Students, 2025., Zagreb, Hrvatska.
6. **M. Modrušan**, N. Cindro, N. Vidović, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Thermodynamics of alkaline earth metal cation binding by small linear homoepptides*, Peptide Chemistry Day 2025, 2025., Zagreb, Hrvatska.
7. **J. Požar**, **M. Modrušan**, N. Cindro, M. Cvetnić, A. Usenik, K. Leko, S. Petrović, J. Borovec, G. Horvat, V. Stilinović, T. Hrenar, V. Tomišić, *Thermodynamic insights into the chelate effect; the calix[4]arene conformation influence on cation complexation*, 29th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 7th Symposium Vladimir Prelog 2025., Split, Hrvatska.
8. **J. Požar**, M. Cvetnić, A. Usenik, N. Cindro, G. Horvat, K. Leko, **M. Modrušan**, V. Tomišić, *Alkali metal cation complexation by lower-rim tertiary-amide calix[4]arenes*, Solutions in Chemistry 2024, 2024., Sveti Martin na Muri, Hrvatska.
9. **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *The effect of ring size and amino acid type on cyclopeptide anion binding affinities*, Solutions in Chemistry 2024, 2024., Sveti Martin na Muri, Hrvatska.
10. **S. Marinac**, **M. Modrušan**, A. Usenik, J. Borovec, K. Pičuljan, K. Leko, J. Požar, G. Horvat, N. Cindro, T. Hrenar, V. Tomišić, *Inclusion of acetonitrile and methanol molecules in calix[4]arene hydrophobic cavity*, Solutions in Chemistry 2024, 2024., Sveti Martin na Muri, Hrvatska.
11. **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Anion binding affinity of penta- and hexaleucine cyclopeptides*, Summer Conference of Croatian Chemical Society Rijeka - Pula 2024, 2024., Rijeka, Hrvatska.

12. E. Petrović Hađar, **M. Modrušan**, M. Duvnjak, N. Cindro, V. Tomišić, G. Horvat, *Thermodynamic and structural characterization of cyclopeptide complexes with different ions in acetonitrile*, Peptide Chemistry Day 2023, 2023., Zagreb, Hrvatska.
13. **M. Modrušan**, L. Otmačić, L. Glazer, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Thermodynamic and structural characterization of linear peptide complexes with simple ions in solution*, Peptide Chemistry Day 2023, 2023., Zagreb, Hrvatska.
14. G. Horvat, L. Otmačić, **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, *Thermodynamic and structural characterization of cyclopeptide complexes with colorimetric and fluorescent anionic dyes*, Peptide Chemistry Day 2023, 2023., Zagreb, Hrvatska.
15. **M. Modrušan**, E. Petrović Hađar, L. Glazer, M. Duvnjak, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Affinity of linear and cyclic peptides towards bivalent cations*, 28th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 6th Symposium Vladimir Prelog, 2023., Rovinj, Hrvatska.
16. **M. Modrušan**, L. Otmačić, N. Vidović, N. Cindro, I. Crnolatac, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Thermodynamics of anion binding by pentaphenylalanine in acetonitrile*, Solutions in Chemistry 2022, 2022., Sveti Martin na Muri, Hrvatska.
17. **M. Modrušan**, *The binding of anions on linear and cyclic homopeptides*, BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations, 2022., Pula, Italija.
18. L. Glazer, **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Thermodynamic and structural studies on the complexation of methyl ester of penta-*isoleucine* with anions in acetonitrile*, V Symposium on Supramolecular Chemistry, 2022., Zagreb, Hrvatska.
19. **M. Modrušan**, L. Otmačić, L. Glazer, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Anion binding by linear penta-homopeptides comprised of amino acids with nonpolar side chains*, Magnetic Moments in Central Europe 2022, 2022., Primošten, Hrvatska.
20. L. Otmačić, **M. Modrušan**, N. Vidović, N. Cindro, I. Crnolatac, G. Speranza, V. Tomišić, G. Horvat, *Kompleksiranje aniona s metilnim esterom pentafenilalanina u acetonitrilu*, 7. Simpozij studenata kemičara, 2022., Zagreb, Hrvatska.
21. M. Duvnjak, G. Talajić, **M. Modrušan**, E. Petrović Hađar, G. Horvat, N. Cindro, V. Tomišić, *Synthesis of glycine and phenylalanine containing cyclopeptides and their anion binding properties in acetonitrile*, V Symposium on Supramolecular Chemistry, 2022., Zagreb, Hrvatska.

22. **M. Modrušan**, T. Divjak, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Anion binding affinities of linear penta- homopeptides in solution*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, 2021., Veli Lošinj, Hrvatska.
23. **M. Modrušan**, T. Divjak, N. Vidović, N. Cindro, G. Speranza, G. Horvat, V. Tomišić, *Thermodynamic and structural studies of anion binding by linear penta-homopeptides*, Adriatic NMR Conference, 2021., Primošten, Hrvatska.
24. **M. Modrušan**, R. Tomaš, L. Glazer, N. Cindro, K. Leko, V. Tomišić, *Thermodynamics of complexation of alkali and alkaline earth metal cations by a phenanthridine- based calix[4]arene glycoconjugate*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, 2021., Veli Lošinj, Hrvatska.
25. **T. Babić**, K. Leko, A. Usenik, **M. Modrušan**, N. Jakupec, E. Uran, V. Tomišić, *Thermodynamic and structural studies of complexation reactions of phenanthridine-based calix[4]arene derivative with alkaline earth metal cations*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog, 2021., Veli Lošinj, Hrvatska.
26. **I. Petters**, **M. Modrušan**, N. Vidović, G. Speranza, N. Cindro, G. Horvat, V. Tomišić, *Cyclopentaphenylalanine as a fluorescent anion sensor in solution*, IV Symposium on Supramolecular Chemistry, 2021., Zagreb, Hrvatska.
27. **J. Požar**, M. Cvetnić, N. Cindro, A. Usenik, K. Leko, **M. Modrušan**, V. Tomišić, *Alkali-metal cation coordination to calix[4]arenes containing triazole functionalities*, 6th Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry & 15th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis, 2021., Split, Hrvatska.
28. **M. Modrušan**, N. Cindro, K. Leko, V. Tomišić, *Synthesis of phenanthridine-based calix[4]arene glycoconjugate and physicochemical characterization of its complexation reactions with alkali metal cations*, Adriatic NMR Conference, 2020., Peroj, Hrvatska.
29. **K. Leko**, A. Usenik, N. Cindro, **M. Modrušan**, V. Tomišić, *Complexation properties of phenanthridine-based calix[4]arene derivatives*, 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 4th Symposium Vladimir Prelog, 2019., Šibenik, Hrvatska.
30. **K. Leko**, A. Usenik, N. Cindro, **M. Modrušan**, V. Tomišić, *Dizajn, priprava i kompleksacijska svojstva kaliks[4]arena s fenantridinskim podjedinicama*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 2019., Zagreb, Hrvatska.