

На правах рукописи



ЛАРИОНОВ
Радик Анатольевич

Термические и супрамолекулярные свойства олигопептидов:
Gly-Gly, Ile-Ala, Ala-Ile, Leu-Val, Leu-Phe, Phe-Leu, Leu-Leu-Leu

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2024

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Зиганшин Марат Ахмедович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Селектор София Львовна,
главный научный сотрудник, заведующая лабораторией физической химии супрамолекулярных систем Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

доктор химических наук, доцент
Князев Андрей Александрович,
заведующий кафедрой технологии косметических средств Казанского национального исследовательского технологического университета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет»

Защита диссертации состоится 15 мая 2024 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Акад. Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН и на сайте www.iopc.ru.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим присылать по адресу: 420088, г. Казань, ул. Акад. Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова, ученому секретарю совета, e-mail: toropchina@iopc.ru

Автореферат разослан «22» марта 2024 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



А.В. Торопчина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Изучение термических и супрамолекулярных свойств короткоцепных олигопептидов является актуальным направлением современной физической химии, в рамках которого решаются задачи по получению новых наноматериалов для электроники, оптики, биомедицины и других областей практического применения. Линейные и циклические олигопептиды, способные к самосборке с образованием высокоорганизованных структур, рассматриваются в качестве привлекательных строительных блоков для получения биосовместимых наноструктур, таких как наностержни, нановолокна, нанотрубки, наносферы и т.д. При самосборке из растворов линейные дипептиды также могут формировать кристаллы, содержащие наноразмерные поры, и способные разделять газовые смеси, селективно связывать и хранить летучие соединения. Некоторые из таких кристаллов, как было показано совсем недавно, могут проявлять необычные супрамолекулярные свойства, обнаруживаемые с помощью методов термического анализа. Тем не менее, на сегодняшний день эти свойства остаются практически неизученными.

Термическая обработка порошков или пленок линейных олигопептидов является одним из популярных методов формирования наноструктур на их основе, однако при этом необходимо учитывать возможность протекания твердофазных реакций, приводящих к образованию других соединений, например, циклических дипептидов, обладающих иными свойствами. Поэтому для корректного применения такого способа получения наноструктур необходима информация о температурах начала циклизации используемых дипептидов. С другой стороны, реакция циклизации дипептидов в твердой фазе соответствует принципам зеленой химии и представляет собой экономически выгодный и простой способ получения циклических дипептидов, являющихся перспективным классом низкомолекулярных лекарственных препаратов. Такие молекулы проявляют антибактериальную, противораковую и нейропротекторную активности. Подобно линейным аналогам циклические олигопептиды способны к самосборке с формированием упорядоченных структур, но при этом обладают большей протеолитической и термической стабильностью. Внутримолекулярная циклизация линейных дипептидов в твердой фазе является хорошей альтернативной существующим методам получения циклических дипептидов: синтез в растворе и на поверхности полимерной подложки, выделение из микроорганизмов, поскольку позволяет получать целевой продукт в одну стадию и без образования побочных продуктов.

Таким образом, изучение термических свойств кристаллов и пленок линейных олигопептидов, с одной стороны, позволит выявить их ранее неизвестные супрамолекулярные свойства, а с другой, разработать методы твердофазного синтеза для получения биологически активных циклических дипептидов.

Степень разработанности. Твердофазный метод синтеза циклических дипептидов, несмотря на перспективность, на сегодняшний день остается малоизученным. В литературе имеются примеры циклизации аминокислот в твердой фазе с образованием циклических дипептидов и большого числа побочных продуктов, затрудняющих выделение целевых молекул. Известен способ получения *цикло*(глицил-глицила) путем термической обработки олигопептидов на основе глицина, при этом фиксируется термическая деструкция дипептида, а выход конечного продукта не превышает 60%. При изучении твердофазной циклизации фенилаланил-фенилаланина и лейцил-лейцина были определены значения кинетических параметров этих реакций и показано, что лучшей кинетической моделью для этих процессов является уравнение, соответствующее реакции с автокатализом. Показано, что соответствующий циклический дипептид является единственным продуктом реакции. При исследовании твердофазной циклизации аланил-фенилаланина с помощью расчётных методов было сделано предположение, что в качестве катализатора таких реакции может выступать выделяющаяся в ходе реакции вода. Вместе с тем, исследователи указывают на то, что твердофазная циклизация

дипептидов представляет собой сложный процесс, требующий дополнительного исследования. До сих пор остаются открытыми ряд вопросов. Нет информации о влиянии структуры дипептида на кинетические параметры таких реакции, отсутствуют какие-либо подходы для предсказания этих параметров. Нет прямых экспериментальных подтверждений предположения о возможном каталитическом действии выделяющейся в ходе реакции воды. Отсутствует информация об энантиочистоте образовавшихся в ходе реакции циклических дипептидов и неизвестно зависит ли она от строения исходного дипептида. Сложности изучения твердофазных реакций с участием дипептидов обусловлены тем, что такие реакции могут сопровождаться рядом побочных процессов, таких как: термическая деструкция реагента, сублимация реагента или продукта, испарение воды. Эти процессы затрудняют определение кинетических параметров и установление механизма реакции циклизации. Следует также учитывать тот факт, что твердофазная реакция протекает в условиях ограничений кристаллической решётки, в которой молекулы дипептидов находятся в цвиттер-ионной форме.

При изучении термических свойств олигопептидов, в том числе для определения температурных интервалов стабильности и получения циклических продуктов, а также при изучении термических свойств клатратов олигопептидов с органическими соединениями, было установлено, что некоторые кристаллы олигопептидов демонстрируют необычные супрамолекулярные свойства: «память» о ранее связанном «госте», «антицеолитные» свойства, проявляющиеся в виде увеличения сорбционной емкости кристаллов олигопептида с увеличением размера молекулы сорбата. Вместе с тем, следует отметить, что систематических исследований супрамолекулярных свойств олигопептидов к настоящему времени не проводилось, вопрос об их природе остается открытым.

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в рамках гранта Министерства науки и высшего образования РФ №14.Y26.31.0019, программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», субсидии, предоставленной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, №FZSM-2023-0020 и при финансовой поддержке Российского научного фонда – грант №24-23-00473.

Цель и задачи работы: цель настоящей работы состояла в разработке подходов к получению циклических дипептидов из их линейных аналогов в твердой фазе и изучение супрамолекулярных свойств линейных и циклических олигопептидов. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определение кинетических параметров реакций циклизации ряда дипептидов в твердой фазе.
2. Выявление взаимосвязи между химическим строением дипептида и кинетическими параметрами процесса циклизации.
3. Выяснение особенностей самосборки линейных и циклических дипептидов в зависимости от структуры их молекул.
4. Установление особенностей термических свойств соединений включения олигопептида с органическими «гостями» в зависимости от структуры «гостя».

Научная новизна исследования заключается в следующем:

В ходе проведенного исследования были впервые изучены термические свойства ряда олигопептидов. Установлены интервалы их термической стабильности и температуры начала реакций циклизации в твердой фазе. Обнаружена взаимосвязь между размерами боковых заместителей аминокислотных остатков, входящих в состав дипептида, и температурой начала твердофазной циклизации. Методами изоконверсионной кинетики впервые определены кинетические параметры реакции

циклизации и кинетические модели, описывающие эти процессы. Обнаружена общая зависимость энергии активации реакции циклизации дипептидов в твердой фазе от строения их молекул.

Впервые выдвинуто предположение о том, что лимитирующей стадией циклизации дипептидов в твердой фазе является переход от цвиттер-ионной к молекулярной форме.

Методом атомно-силовой микроскопии продемонстрировано различие в способности к самосборке между линейными и циклическими дипептидами, визуализировано влияние термической обработки на морфологию плёнок дипептидов лейцил-фенилаланин и фенилаланил-лейцин. Впервые продемонстрированы люминесцентные свойства наноструктур на основе *цикло*(фенилаланил-лейцила).

Обнаружена способность кристаллов лейцил-лейцил-лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола. «Память» трипептида проявляется в виде последовательных тепловых эффектов на ДСК кривой. Демонстрирована возможность количественной оценки содержания бензола в его смесях с тетрахлорметаном.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в разработке способа получения циклических дипептидов, путем циклизации линейных дипептидов в твёрдой фазе при нагревании. Кинетический анализ изученных реакций позволил установить, что такие процессы хорошо описываются уравнениями автокаталитических реакций. Определенные кинетические параметры, а также детали механизма циклизации дипептидов в твердой фазе будут полезны для масштабирования реакций этого типа.

Выявленные в настоящей работе особенности самосборки линейных и циклических дипептидов могут быть использованы для создания новых материалов на их основе, в том числе с нелинейными оптическими свойствами.

Обнаруженная способность трипептида на основе лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола может быть использована для количественной оценки содержания этого соединения в смесях с другими органическими соединениями.

Положения, выносимые на защиту:

- Способ синтеза циклических дипептидов в твердой фазе.
- Кинетические параметры и модели, описывающие реакции циклизации линейных дипептидов в твердой фазе.
- Зависимость температуры начала твердофазной реакции от строения молекул дипептидов.
- Представление о лимитирующей стадии твердофазной реакции циклизации дипептидов.
- Самоорганизация линейных и циклических дипептидов из разных растворителей.
- Люминесцентные свойства циклического дипептида *цикло*(фенилаланил-лейцил).
- Способность кристаллов лейцил-лейцил-лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола.

Личный вклад автора заключается в получении и обработке экспериментальных данных, представленных в работе, анализе литературных источников, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации.

Достоверность результатов обусловлена воспроизводимостью большого набора экспериментальных данных, полученных с применением современного, прецизионного оборудования, а также согласованностью полученных результатов с имеющимися литературными данными и их интерпретацией на основе современных теоретических представлений. Достоверность результатов подтверждается публикациями в рецензируемых ведущих российских и зарубежных научных журналах по тематике исследований с высоким импакт-фактором, представлением результатов на конференциях.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на 9 конференциях и семинарах: на IX научной международной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы – 2018» (Москва, 2018 г.), на III

Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018 г.), на 2-ом и 3-ем международном семинаре «International Seminar on Advanced Calorimetry» (Казань, 2018 и 2019 г.), на 2-ой и 3-ей школе-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2020 и 2021 г.), на международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2020» (Москва, 2020 г.), на XXIII международной конференции «International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia» (Казань, 2022 г.), на 4-ом международном семинаре «Современные нанотехнологии – IWMN 2022» (Екатеринбург, 2022 г.).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых международных и российских изданиях, рекомендованных ВАК РФ, входящих в библиографические базы данных Web of Science и Scopus, а также в 9 тезисах докладов на конференциях российского и международного уровня. Статьи по теме диссертационной работы написаны в соавторстве с д.х.н., профессором Зиганшиным М.А., осуществлявшим руководство исследованием, к.х.н. Зиганшиной С.А. и к.х.н., м.н.с. Морозовой А.С., принимавшими участие в обсуждении результатов атомно-силовой микроскопии, д.х.н., профессором Горбачуком В.В., принимавшим участие в обсуждении результатов и написании статей, к.ф.-м.н., доцентом Климовицким А.Е., принимавшим участие в обсуждении результатов ИК-спектроскопии, к.х.н., доцентом Герасимовым А.В., принимавшим участие в обсуждении данных термического анализа, к.х.н., доцентом Мухаметзяновым Т.А., принимавшим участие в обсуждении результатов спектроскопии кругового дихроизма, к.х.н. Бабаевой О.Б., принимавшей участие в обсуждении результатов масс-спектрометрических методов исследования, инженером-проектировщиком Хаяровым Х.Р., принимавшем участие в обсуждении данных спектроскопии ЯМР, студентами Миргазиевой Э.Р., Ахметшиным Ш.Р. и Перовым И.А., выполнявших под руководством автора научно-исследовательскую работу.

Объем и структура диссертации. Представленная работа состоит из введения, трёх глав, заключения, списка сокращений, списка использованных источников, содержащего 153 источника. Работа представлена на 146 страницах и включает 12 таблиц и 75 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен литературный обзор, обобщающий имеющуюся информацию о свойствах линейных и циклических дипептидов. Большое внимание уделено современным способам получения циклических дипептидов, рассмотрены преимущества и недостатки существующих методов. Критически проанализированы современные представления о возможных механизмах реакции циклизации линейных дипептидов. Описаны основные типы межмолекулярных взаимодействий, обеспечивающих самосборку олигопептидов, проанализированы влияющие на неё факторы. Рассмотрено практическое применение наноструктур и кристаллов на их основе. Во второй главе описаны материалы и методы исследования, применявшиеся в настоящей работе. Третья глава посвящена анализу полученных экспериментальных данных. В ней обсуждаются результаты термического анализа, анализируется зависимость температуры начала реакции циклизации от размеров боковых заместителей аминокислотных остатков в составе дипептида. Детально обсуждаются данные, полученные спектроскопическими и масс-спектрометрическими методами. Обсуждаются кинетические параметры реакций циклизации дипептидов в твердой фазе, рассчитанные в рамках подходов неизотермической кинетики, а также представление о лимитирующей стадии этих реакций. Анализируются особенности самосборки линейных и циклических дипептидов. Обсуждается природа эффекта «памяти» лейцил-лейцил-лейцина по отношению к бензолу.

В качестве объектов исследования были выбраны глицил-глицин (**Gly-Gly**) и L-изомеры следующих олигопептидов: изолейцил-аланин (**Ile-Ala**), аланил-изолейцин (**Ala-Ile**), лейцил-валин (**Leu-Val**), лейцил-фенилаланин (**Leu-Phe**), фенилаланил-лейцин (**Phe-Leu**), лейцил-лейцил-лейцин (**Leu-Leu-Leu**).

Термический анализ дипептидов. В результате изучения термических свойств дипептидов методом совмещенной термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с масс-спектрометрическим (МС) определением летучих продуктов разложения было установлено, что при их нагревании имеет место химическое превращение, рис. 1. Для дипептидов **Gly-Gly** и **Ile-Ala** реакции соответствует первая ступень потери массы, в случае дипептидов **Ala-Ile**, **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** реакции предшествует процесс десорбции воды.

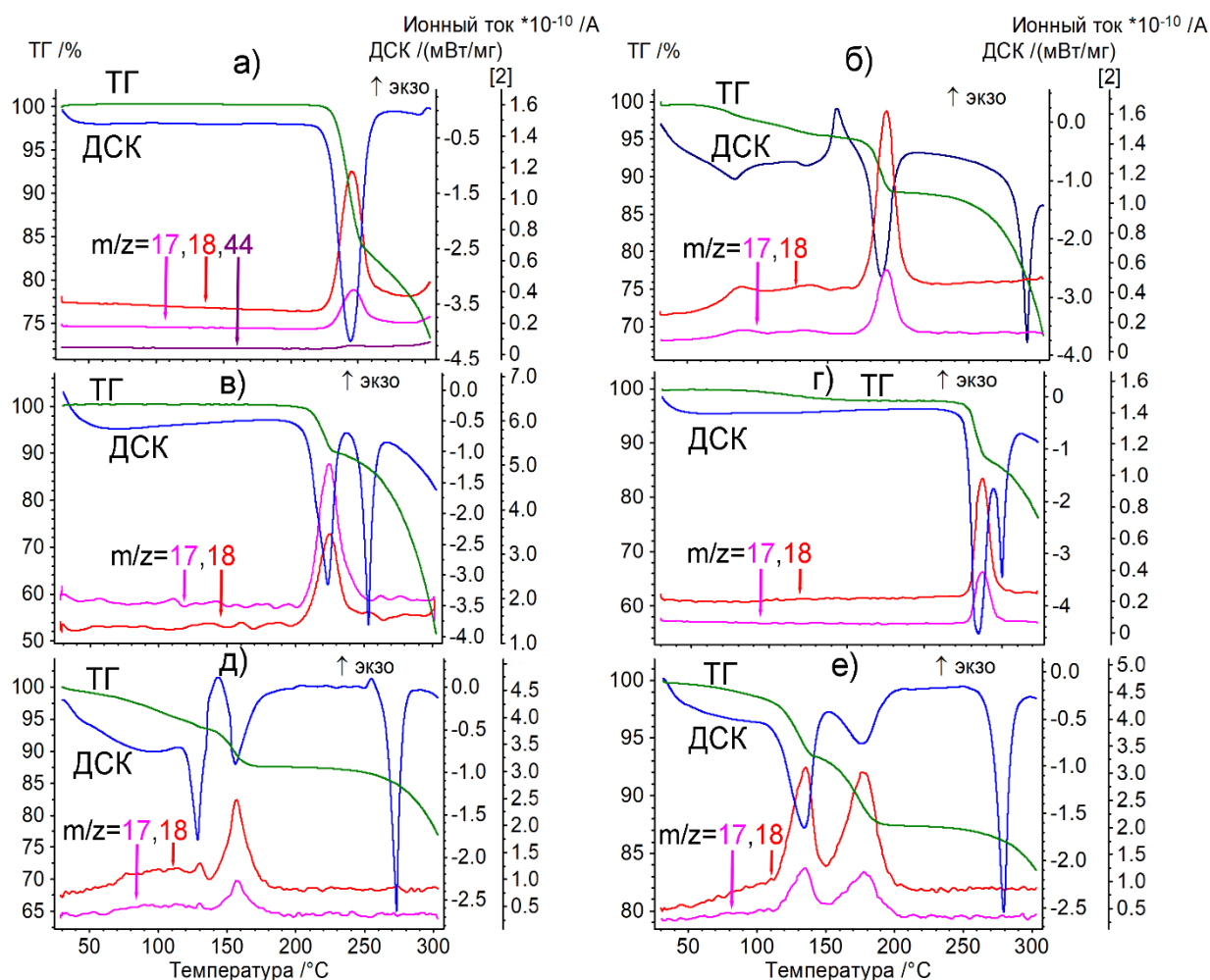


Рисунок 1. Результаты термического анализа в динамической атмосфере аргона (75 мл/мин) порошков а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val** в) **Ile-Ala**, г) **Ala-Ile** д) **Leu-Phe** и е) **Phe-Leu**. Скорость нагрева 10 К/мин, ионные термограммы $m/z=17$ и 18 соответствуют воде.

Методом ДСК было установлено, что продукты нагревания **Ile-Ala** и **Ala-Ile** имеют одинаковую температуру начала плавления, что свидетельствует об образовании одинакового продукта, рис. 2а, в то время как ДСК кривые продуктов нагревания **Leu-Phe** и **Phe-Leu** различны, что может быть следствием эпитимеризации.

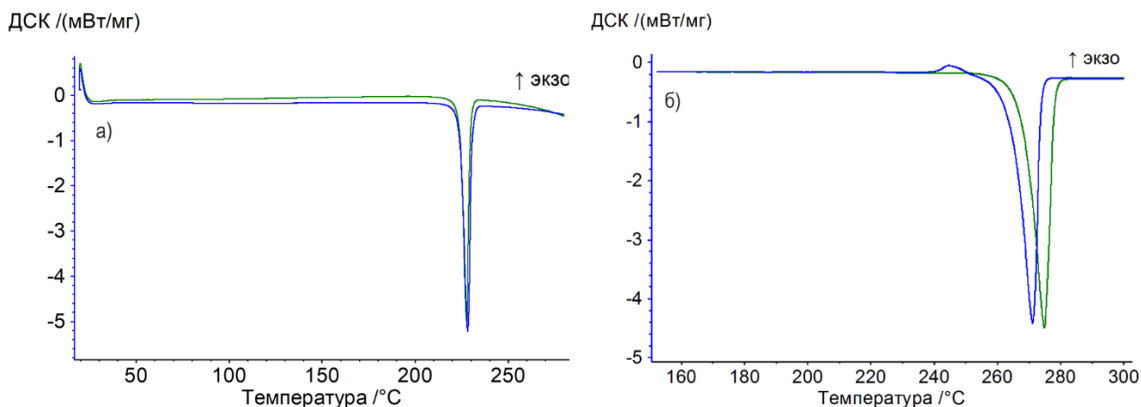


Рисунок 2. ДСК кривые а) продуктов нагревания **Ile-Ala** (синяя) и **Ala-Ile** (зеленая) и б) продуктов нагревания **Leu-Phe** (синяя) и **Phe-Leu** (зеленая). Скорость нагрева 10 К/мин.

Структура продуктов реакции. Для доказательства структуры продуктов твердофазной реакции были использованы ИК и ^1H , ^{13}C ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрические методы анализа. Полученные результаты свидетельствуют об образовании во всех случаях единственного продукта: соответствующего производного 2,5-дикетопиперазина, рис. 3. Для удобства изложения в дальнейшем продукты реакции будут именоваться “циклический дипептид”, например, продукт реакции **Ile-Ala** – *цикло(Ile-Ala)*. Исключение составил **Gly-Gly** для которого выход продукта не превышает 60% [Smith, A.J. et al. CrystEngComm., 2014, 16, 7196].

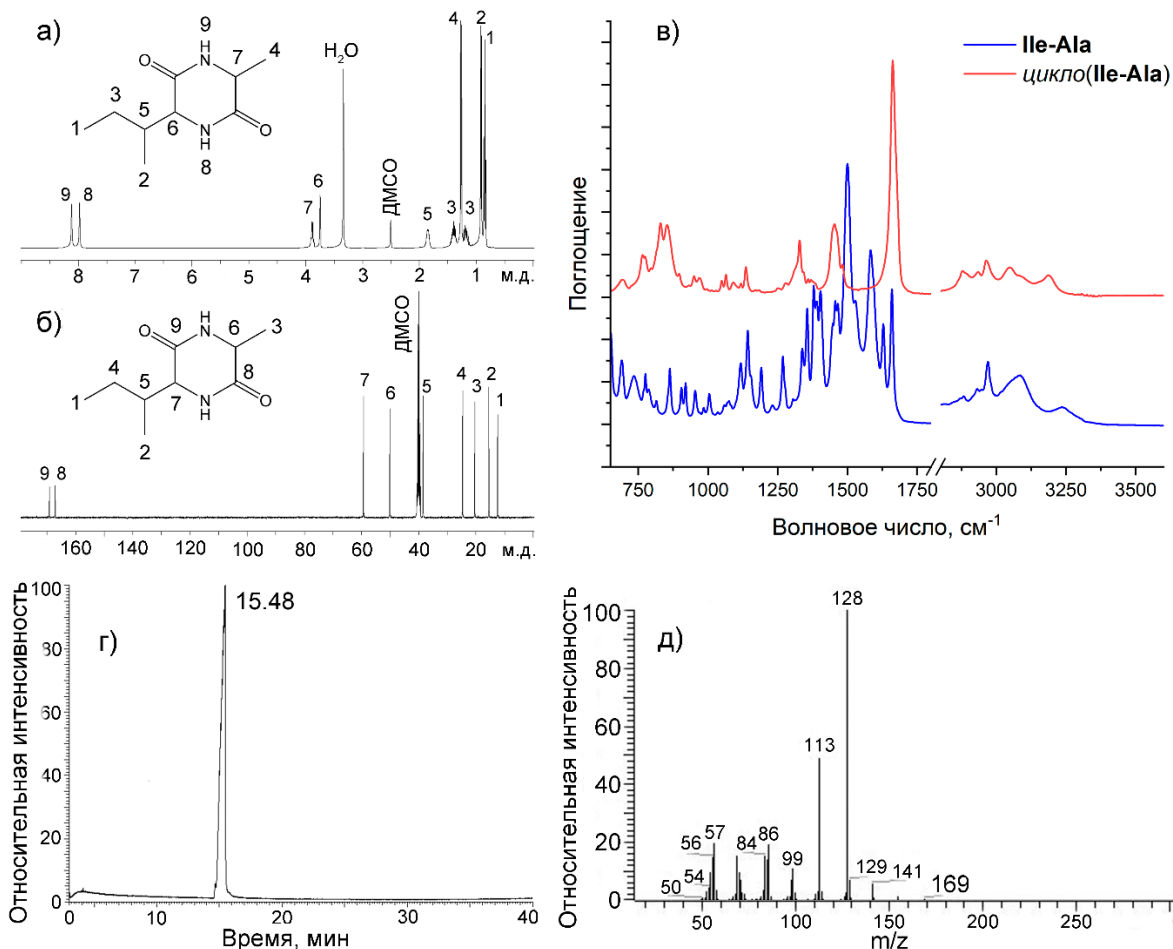


Рисунок 3. ЯМР-спектры *цикло(Ile-Ala)* а) ^1H , б) ^{13}C , в) ИК-спектры **Ile-Ala** и *цикло(Ile-Ala)*, г) данные газовой хроматографии *цикло(Ile-Ala)*, д) масс-спектр *цикло(Ile-Ala)*.

Анализ ЯМР-спектров, полученных для *цикло(Leu-Phe)* и *цикло(Phe-Leu)*, показал, что в случае *цикло(Leu-Phe)* в области химических сдвигов, соответствующих бензольному кольцу и NH-группам, имеется различие, связанное с расщеплением сигналов, что может быть следствием частичной эпитеримизации **Leu-Phe**, рис. 4.

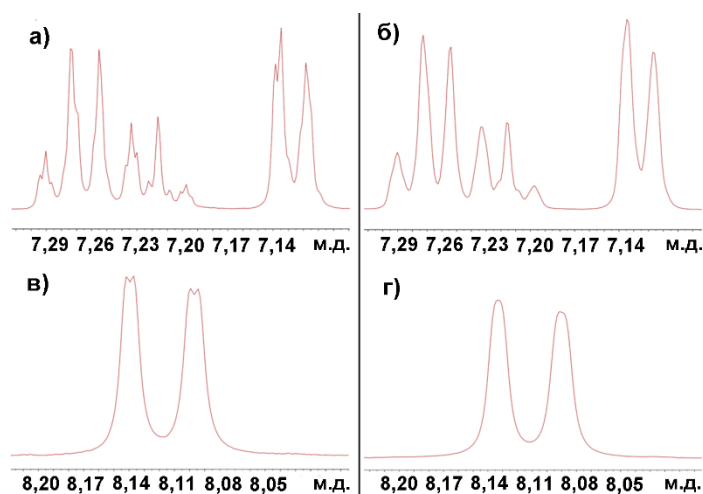


Рисунок 4. Фрагменты ^1H ЯМР спектров растворов (а, в) *цикло(Leu-Phe)*, (б, г) *цикло(Phe-Leu)*.

Для подтверждения предположения об эпитеримизации продукта циклизации **Leu-Phe** в твердой фазе были получены КД-спектры растворов *цикло(Leu-Phe)* и *цикло(Phe-Leu)* в гексафторизопропаноле (ГФИП), а также проведен анализ методом энантиоселективной высокоэффективной жидкостной хроматографии, рис. 5. Было обнаружено, что КД-спектры различаются по интенсивности положительного сигнала, несмотря на одинаковую концентрацию растворов циклических дипептидов, рис. 5а, а

на хроматограмме *цикло(Leu-Phe)*, рис. 5б, присутствует дополнительный сигнал. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о частичной эпитеримизации *цикло(Leu-Phe)*.

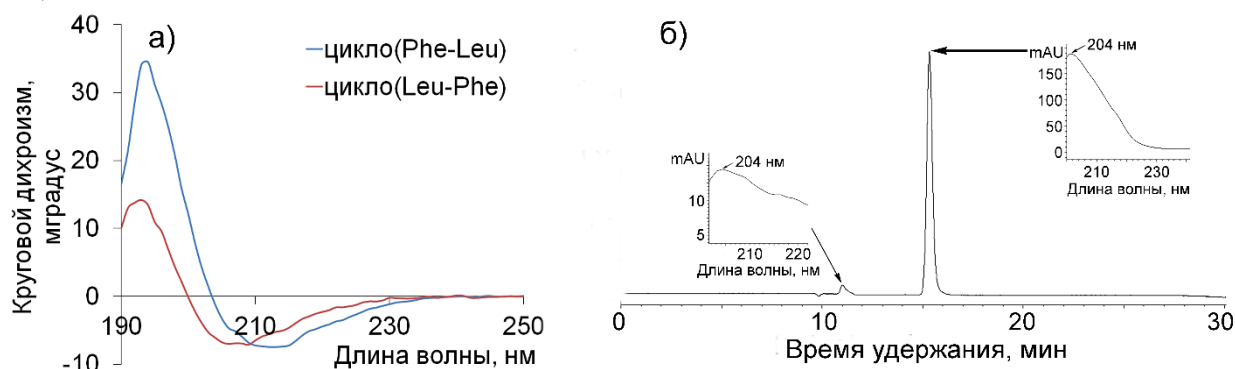


Рисунок 5. а) КД-спектры растворов *цикло(Phe-Leu)* и *цикло(Leu-Phe)*, б) результаты энантиоселективной высокоэффективной жидкостной хроматографии продуктов циклизации **Leu-Phe** (на вставках показаны спектры).

Для изучения особенностей протекания циклизации дипептидов в твердой фазе были получены ИК-спектры аморфной и кристаллической пленок дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** при различных температурах, рис. 6. Аморфные пленки получали при быстром удалении растворителя из растворов дипептидов, а кристаллические – путем насыщения аморфных пленок парами воды. Состояние пленок было охарактеризовано методом рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно полученным данным, в ИК-спектрах аморфных пленок наблюдаются полосы поглощения Амид I при $1630\text{-}1632\text{ см}^{-1}$ и Амид II при 1563 см^{-1} , в спектрах кристаллических пленок дополнительно присутствуют полосы поглощения групп COO^- при 1678 и 1435 см^{-1} и NH_3^+ при 1529 см^{-1} , рис. 6 а,б. Таким образом, в аморфной пленке дипептид находится в молекулярной форме, а в кристаллической пленке – в цвиттер-ионной. В результате нагрева кристаллической пленки **Leu-Phe** снижается интенсивность полос, соответствующих колебаниям групп NH_3^+ и COO^- , рис. 6 в,г. Что свидетельствует о переходе дипептида из цвиттер-ионной формы в молекулярную. Нагревание пленок **Leu-Phe** до $120\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к исчезновению

полос Амида I и Амида II в спектре кристаллической пленки, тогда как в спектре аморфной пленки полоса Амида I сохраняется. По-видимому, это связано с тем, что нейтральная форма дипептида, образующаяся при нагревании кристаллической пленки, сразу превращается в циклический продукт. Таким образом, можно предположить, что переход дипептида из цвиттер-ионной в молекулярную форму является лимитирующей стадией реакции циклизации дипептидов, находящихся в кристаллической фазе.

Нагревание аморфных и кристаллических пленок **Leu-Phe** до 140 °С и **Phe-Leu** до 150 °С приводит к завершению реакции циклизации и образованию идентичных продуктов, рис. 6 д,е.

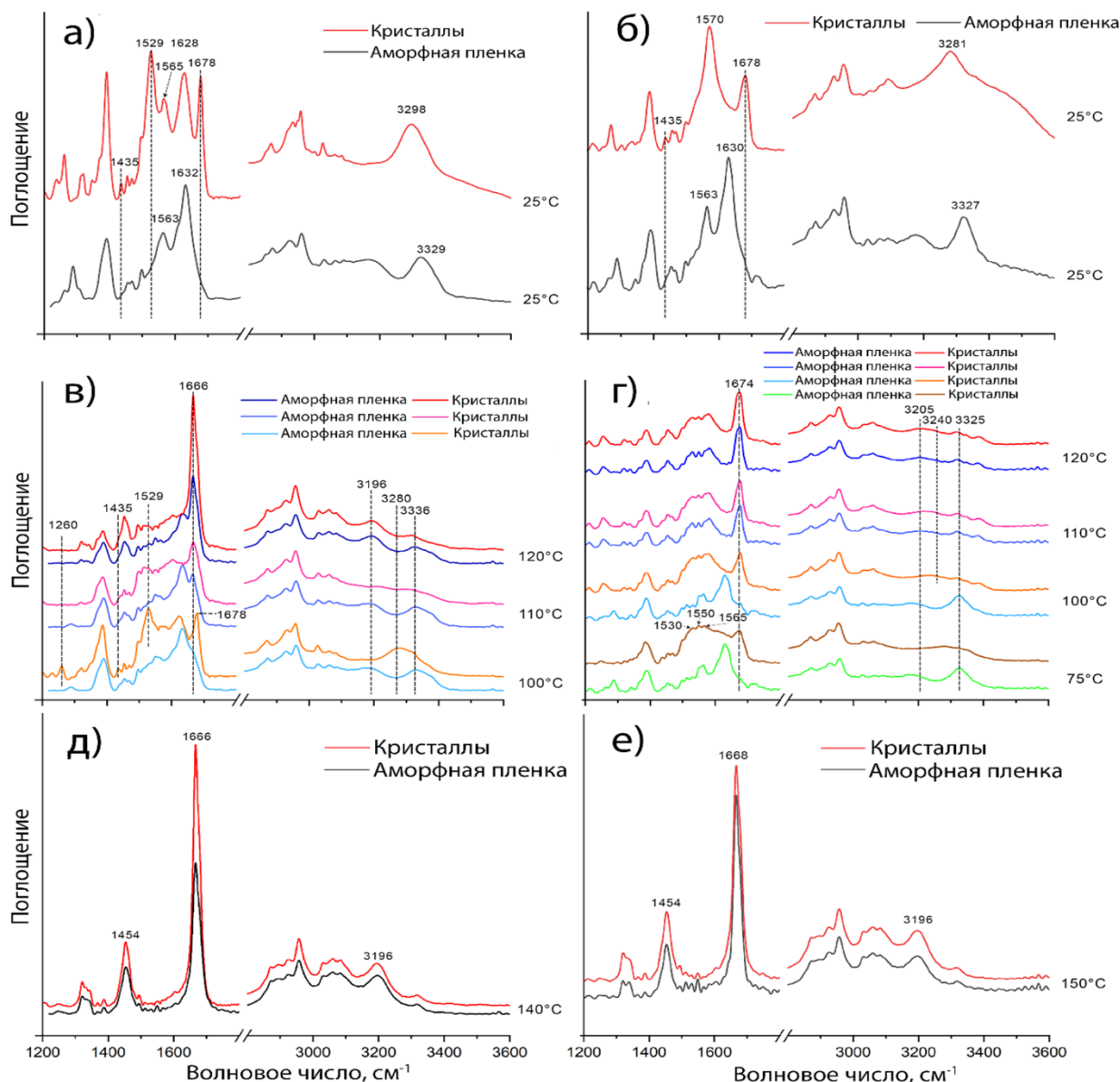


Рисунок 6. ИК-спектры аморфных и кристаллических пленок дипептидов при 25 °С а) **Leu-Phe** и б) **Phe-Leu**; после нагревания до 75 (только **Phe-Leu**), 100, 110 и 120 °С в) **Leu-Phe** и г) **Phe-Leu**; после нагревания до 140 °С д) **Leu-Phe** и до 150 °С е) **Phe-Leu**.

Зависимость температуры начала циклизации от размера боковых заместителей дипептидов. В качестве параметра, характеризующего размер боковых групп, была использована величина молекулярной рефракции MR_D . Для этого были рассчитаны MR_D боковых заместителей дипептидов R_1 и R_2 , рис. 7, по аддитивной схеме:

$$MR_D^R = \sum_i \delta_i \quad (1)$$

где δ_i – рефракция атома или группы, входящих в состав соответствующего заместителя.

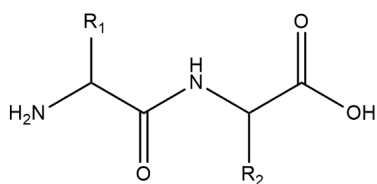


Рисунок 7. Общая формула дипептидов

Структура заместителей R_1 и R_2 , их молекулярные рефракции MR_D^{R1} и MR_D^{R2} , суммарная молекулярная рефракция двух заместителей ΣMR_D^R и температуры начала твердофазной циклизации T_{onset} приведены в табл. 1. Корреляция между температурами начала реакции и рассчитанными значениями ΣMR_D^R показана на рис. 8.

Таблица 1. Структура и молекулярная рефракция заместителей в дипептидах и температуры начала их циклизации в твердой фазе.

Дипептид	R_1	R_2	MR_D^{R1} , см ³ /моль	MR_D^{R2} , см ³ /моль	ΣMR_D^R , см ³ /моль	T_{onset} , °C
Gly-Gly	H-	H-	1,1	1,1	2,2	228
Ile-Ala	втор-C ₄ H ₉ -	CH ₃ -	19,572	5,718	25,29	206
Ala-Ile	CH ₃ -	втор-C ₄ H ₉ -	5,718	19,572	25,29	228
Leu-Val	изо-C ₄ H ₉ -	изо-C ₃ H ₇ -	19,572	14,954	34,526	180
Leu-Leu	изо-C ₄ H ₉ -	изо-C ₄ H ₉ -	19,572	19,572	39,144	177
Leu-Phe	изо-C ₄ H ₉ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	19,572	29,825	49,397	134
Phe-Leu	C ₆ H ₅ CH ₂ -	изо-C ₄ H ₉ -	29,825	19,572	49,397	152
Phe-Phe	C ₆ H ₅ CH ₂ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	29,825	29,825	59,65	147

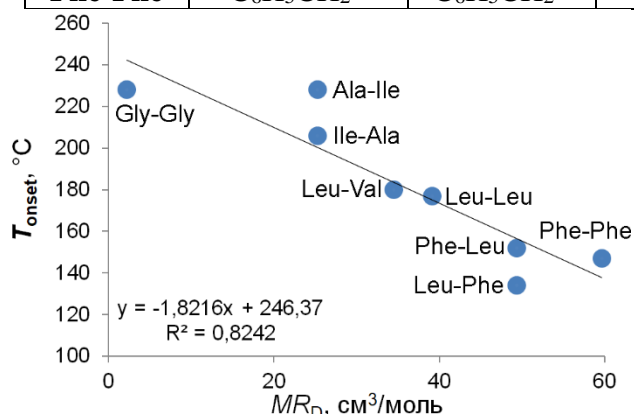


Рисунок 8. Корреляция между температурами начала циклизации дипептидов и молекулярной рефракцией заместителей в их молекулах.

Согласно полученной зависимости температуру начала циклизации дипептидов в твердом состоянии можно приблизительно оценить по уравнению (2):

$$T_{onset} = a \Sigma MR_D^R + b \quad (2)$$

где $a = -1,8216$, $b = 246,37$.

Отклонение температуры начала циклизации **Leu-Phe** может быть связано с эимеризацией продукта реакции в процессе твердофазной циклизации. Также следует учесть тот факт, что согласно литературным данным [Görbitz, С. Н.

et al. Chem. Eur. J., 2007, 13, 1022] размер пор в кристаллах дипептидов **Phe-Leu** и **Ala-Ile** больше, чем у **Leu-Phe** и **Ile-Ala** соответственно. Стенки пор большего размера могут выступать в качестве своеобразных радиаторов охлаждения при нагревании, что может привести к более высокой температуре начала реакции в случае **Phe-Leu** и **Ala-Ile**.

Результаты кинетического анализа циклизации дипептидов. Для определения кинетических параметров процесса твердофазной циклизации дипептидов в работе использовались методы неизотермической кинетики. Кинетические параметры рассчитывались в рамках изоконверсионного подхода с помощью программных пакетов NETZSCH Thermokinetics 3.1 и NETZSCH Kinetics Neo 2.1.2.2.

На рис. 9 представлена зависимость логарифма скорости конверсии от обратной температуры, полученная с использованием метода Фридмана. Большой наклон экспериментальных кривых по сравнению с изоконверсионными линиями в начале реакции указывает на автокаталитический характер процесса.

Для расчета кинетических параметров реакций, табл. 2, были использованы безмодельные методы Фридмана, Озавы-Флинна-Уолла (ОФУ) и Киссинджера-Акахиры-Сунозы (КАС).

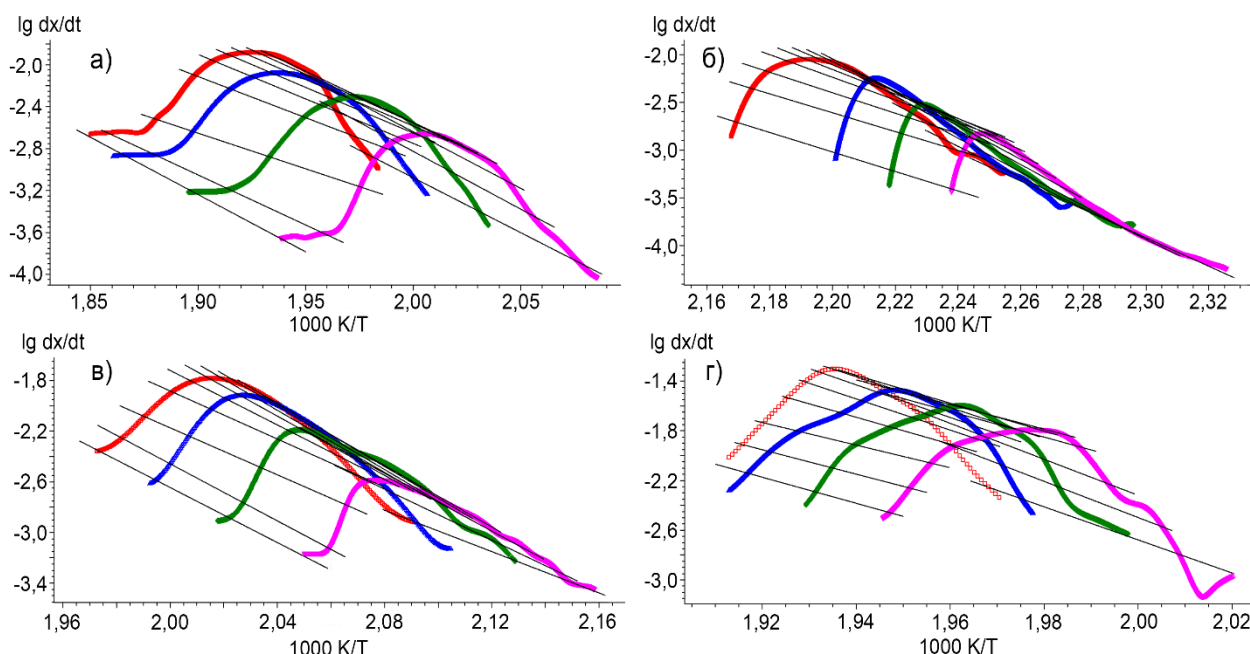


Рисунок 9. Зависимость логарифма скорости конверсии от обратной температуры, определенная по методу Фридмана для а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Пе-Ala**, г) **Ala-Пе**.

Таблица 2. Значения кинетических параметров, рассчитанные с использованием безмодельных методов.

Дипептид	Метод Фридмана		Методы Озавы-Флинна-Уолла и *Киссинджера-Акахиры-Сунозы	
	E_a , кДж/ моль	$\lg A$, A / c^{-1}	E_a , кДж/ моль	$\lg A$, A / c^{-1}
Gly-Gly	172±12	15,7	186±5	16,8
Пе-Ala	223±9	22,0	223±5	21,8
Ala-Пе	204±23	19,5	210±6	19,8
Leu-Val	291±23	31,7	318±9	34,5
Leu-Phe	135±5	14,9	*147±5	*16,4
Phe-Leu	118±4	12,0	*114±4	*11,4

Для поиска кинетических моделей, описывающих процессы циклизации изученных дипептидов, был использован метод множественной линейной регрессии. Проведенный анализ позволил установить, что в соответствии с F -критерием лучшим топохимическим уравнением для описания циклизации изученных дипептидов является уравнение CnB (3), которое используется для описания реакции n -го порядка с автокатализом:

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n (1 + k_{cat}\alpha) \quad (3)$$

где α – степень конверсии, n – порядок реакции, k_{cat} – автокаталитический множитель.

Процесс циклизации **Gly-Gly** хорошо описывается уравнением Bna (4) (расширенное уравнение Праута-Томпкинса):

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n \alpha^m \quad (4)$$

где α – степень конверсии, n – порядок реакции по реагенту, m – порядок реакции по продукту.

Кинетические параметры, рассчитанные с использованием указанных моделей для дипептидов, изученных в настоящей работе и литературе, а также статистические параметры качества применения моделей, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Кинетические параметры реакции циклизации дипептидов, рассчитанные с использованием модельных методов.

Дипептид	E_a , кДж/моль	lgA	Порядок реакции	k_{cat}	Коэффициент корреляции
Gly-Gly	185	17,4	1,49	0,62	0,999
Pe-Ala	218	21,0	1,07	0,68	0,999
Ala-Pe	217	20,0	1,2	1,35	0,998
Leu-Val	313	33,7	0,71	0,71	0,999
Leu-Leu^a	434	48,0	1,46	-	0,999
Leu-Phe	147	16,4	1,32	0,01	0,996
Phe-Leu	111	11,0	1,18	0,26	0,999
Phe-Phe^b	148	15,4	0,46	-	0,998

^a Ziganshin M.A. et al. J. Phys. Chem. B., 2017, 121, 8603. ^b Ziganshin M.A. et al. J. Therm. Anal. Calorim., 2016, 125, 905.

Было обнаружено, что кинетические параметры реакций циклизации дипептидов в твердой фазе зависят от последовательности аминокислотных остатков в **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, в то время как для **Pe-Ala** и **Ala-Pe** определённые значения оказались близки. Разница в энергии активации циклизации **Leu-Phe** и **Phe-Leu** может быть обусловлена несколькими причинами, в том числе разницей в энергии исходных состояний. В обоих случаях наблюдаемый переход от цвиттер-ионной формы к молекулярной приводит к увеличению энергии системы. Но общий уровень энергии молекулярных форм **Phe-Leu** и **Leu-Phe** различны из-за особенностей их кристаллической структуры. По данным рентгеноструктурного анализа [Gorbitz, C.H. et al. Chem. Eur. J., 2001, 7, 5153] **Phe-Leu** в цвиттер-ионной форме может образовывать больше межмолекулярных связей в кристалле, чем **Leu-Phe** в цвиттер-ионной форме в его кристалле. Для инициирования реакции циклизации необходим разрыв межмолекулярных контактов и увеличение подвижности молекул. Можно предположить, что в случае дипептида **Phe-Leu** требуется затратить больше энергии, что и является причиной более высокой температуры начала реакции. Соответственно, уровень энергии исходного состояния дипептида **Phe-Leu** выше, чем уровень **Leu-Phe**. Если предположить, что переходные состояния этих реакций близки по энергии, то энергия активации реакции циклизации **Phe-Leu** должна быть ниже, что и наблюдается экспериментально, табл. 3.

С увеличением размеров боковых заместителей в алифатических аминокислотных остатках в ряду дипептидов **Gly-Gly** > **Pe-Ala (Ala-Pe)** > **Leu-Val** > **Leu-Leu** наблюдается увеличение энергии активации их циклизации, табл. 3. По-видимому, это связано с меньшей подвижностью более крупных фрагментов дипептидов в кристаллической фазе.

Самосборка линейных и циклических дипептидов по данным атомно-силовой микроскопии. Поскольку линейные и циклические дипептиды активно используются для получения разнообразных по форме и типу наноструктур в настоящей работе было проведено исследование результатов самосборки и самоорганизации **Gly-Gly**, **Leu-Val**, **Pe-Ala**, **Ala-Pe**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** и их циклических аналогов на поверхности высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) методом атомно-силовой микроскопии, рис. 10-13.

Было установлено, что линейные дипептиды в этих условиях образуют гладкую аморфную плёнку, рис. 10 а,г,ж. В результате самосборки циклических дипептидов сформировались пластинчатые структуры длиной 200 нм - 10 мкм и шириной 90 нм - 1 мкм, рис. 10 б,в,д,е,з,и.

Обнаружено, что изученные циклические дипептиды более чувствительны к условиям самосборки. В результате замены растворителя с ГФИП на метанол **Pe-Ala** и **Ala-Pe** формируют аморфную плёнку, рис. 11а,г, также как и из раствора в ГФИП, рис. 10ж. В тех же условиях *цикло(Pe-Ala)* и *цикло(Ala-Pe)* формируют волокнистые

переплетенные структуры длиной 500-700 нм, похожие на структуру ксерогеля, рис. 11б,в,д. При использовании метанола в качестве растворителя в результате самосборки *цикло(Leu-Val)* сформировались отдельные волокна длиной 600 нм - 3 мкм и более, рис. 11е.

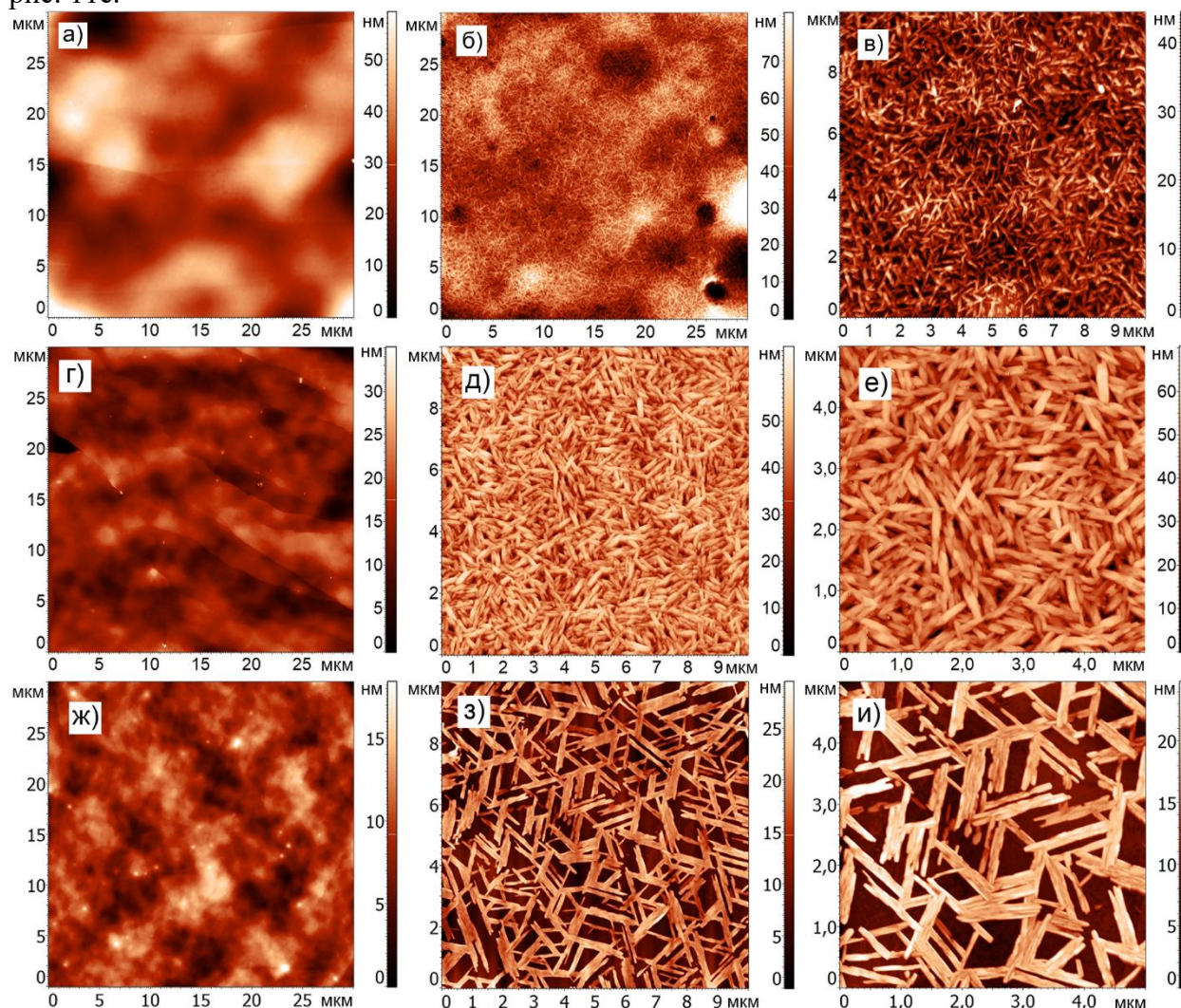


Рисунок 10. АСМ изображения пленок а) **Gly-Gly**, б,в) *цикло(Gly-Gly)*, г) **Leu-Val**, д,е) *цикло(Leu-Val)*, ж) **Пе-Ala**, з,и) *цикло(Пе-Ala)*, полученных из растворов дипептидов в ГФИП на поверхности ВОПГ.

Метод АСМ был использован для визуализации влияния нагрева на морфологию поверхности пленок дипептидов. Для этого были получены АСМ изображения пленок **Phe-Leu** и **Leu-Phe** до и после нагревания, рис. 12. Нагрев пленок до 110°C для удаления сорбционной воды приводит к изменению их морфологии. Гладкая аморфная пленка **Phe-Leu**, рис. 12а, разрушается, появляются заметные впадины высотой 1-5 нм, рис. 12б. В случае пленки **Leu-Phe** исходная ворсистая структура, рис. 12 г, исчезает, и пленка становится более гладкой, рис. 12д.

Нагрев пленки **Phe-Leu** до 150°C приводит к появлению на поверхности множества волокнистых структур, соединенных в агломераты длиной 1,5-3 мкм и плоских пластин шириной до 40 нм, толщиной 1-2 нм и длиной 150-400 нм, рис. 12в. Пластины расположены преимущественно под углом 60° друг к другу. В результате нагрева пленки **Leu-Phe** до 150°C на ее поверхности формируются хорошо различимые волокна длиной 300-1000 нм и толщиной 40-80 нм, рис. 12е.

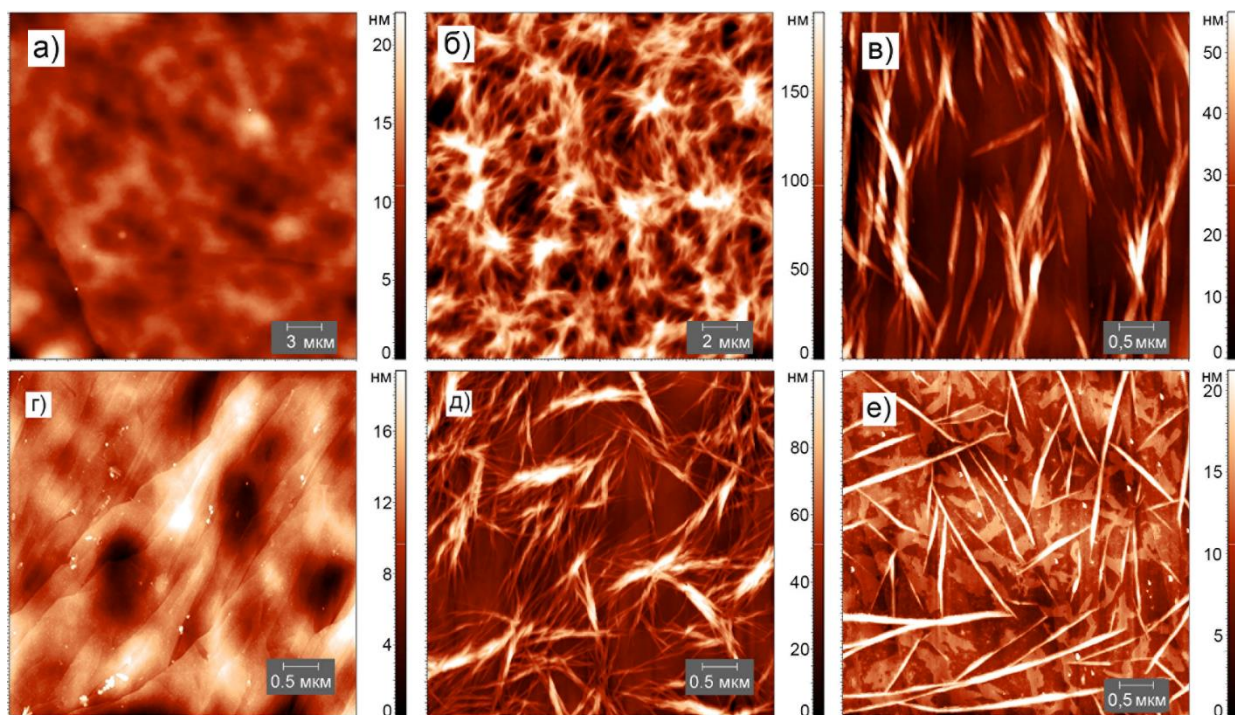


Рисунок 11. АСМ изображения морфологии поверхности пленок а) **Pe-Ala**, б), в) *цикло(Pe-Ala)*, г) **Ala-Pe**, д) *цикло(Ala-Pe)*, е) *цикло(Leu-Val)* из раствора метанола на ВОПГ.

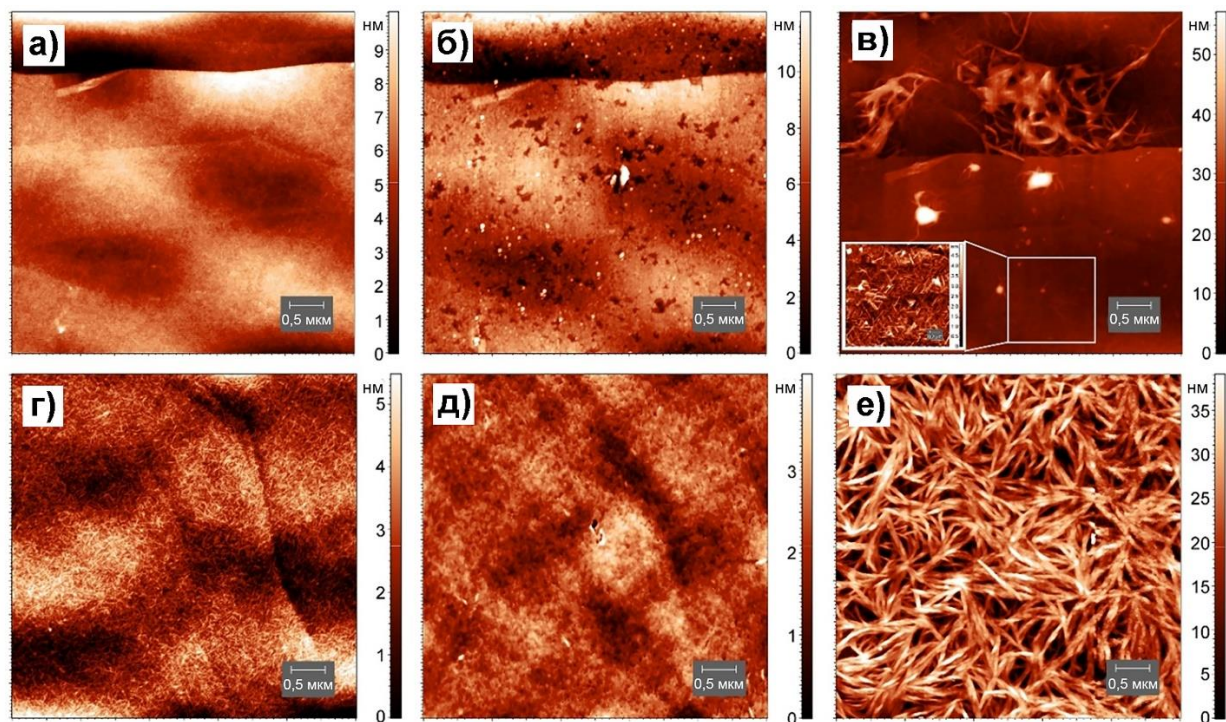


Рисунок 12. АСМ изображения одного и того же места пленки на ВОПГ а) **Phe-Leu** и г) **Leu-Phe**, после нагрева до 110°C б) **Phe-Leu** и д) **Leu-Phe**, после нагрева до 150°C в) **Phe-Leu** и д) **Leu-Phe**. На вставке (в) показано увеличенное изображение выделенной области.

Таким образом, была продемонстрирована возможность управления самосборкой полученных в настоящей работе циклических дипептидов путем подбора растворителя с целью формирования различных микро- и наноструктур. Визуализировано влияние нагрева на состояние пленок линейных дипептидов и результат самоорганизации продуктов химической реакции, протекающей в твердой фазе.

Люминесцентная микроскопия. Для оценки возможности практического применения дипептидов **Leu-Phe**, **Phe-Leu** и их циклического аналога были изучены их оптические свойства. Согласно изображениям, полученным методом люминесцентной микроскопии, было установлено, что структуры на основе линейных дипептидов не обладают люминесцентными свойствами, в отличие от структур на основе их циклических аналогов, рис. 13. Для дальнейшего изучения оптических свойств циклического дипептида был использован метод люминесцентной спектроскопии.

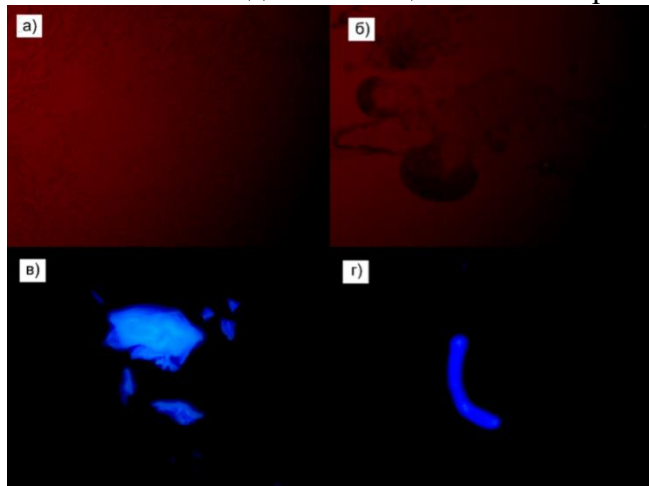


Рисунок 13. Изображения, полученные методом люминесцентной микроскопии, структур на основе а) **Leu-Phe**, б) **Phe-Leu**, в) **цикло(Leu-Phe)** и г) **цикло(Phe-Leu)**.

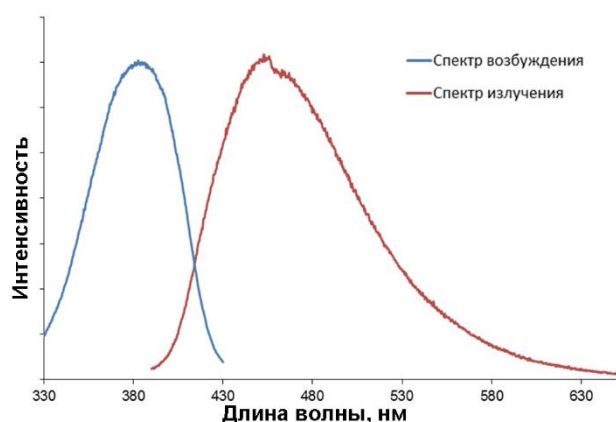


Рисунок 14. Спектр люминесценции порошка **цикло(Phe-Leu)**.

Leu-Leu были обнаружены необычные сорбционные свойства по отношению к ряду алифатических спиртов, в настоящей работе были изучены сорбционные свойства **LLL**. С этой целью порошок **LLL** был насыщен парами органических соединений с термодинамической активностью $P/P_0 = 1$. Было установлено, что **LLL**, насыщенный парами бензола или CCl_4 , формирует нестабильные клатраты, рис 15б,в. При нагревании до $130^\circ C$ клатрат **LLL** с бензолом теряет 4,6% массы, а на масс-спектрометрических кривых наблюдаются сигналы, соответствующие воде ($m/z=18$) и бензолу ($m/z=78$), рис. 15б. В интервале температур $30-120^\circ C$ клатрат **LLL** с CCl_4 теряет 2,2% массы, рис. 15в.

Люминесцентная спектроскопия.

Спектры возбуждения и излучения, полученные для структур на основе **цикло(Phe-Leu)** приведены на рис. 14. Было установлено, что максимум возбуждения приходится на 383 нм, а максимум излучения на 455 нм. Это соответствует Стоксову сдвигу в 72 нм. Таким образом, полученный в настоящей работе **цикло(Phe-Leu)** обладает люминесцентными свойствами, с максимум излучения в видимой области спектра, что открывает возможность его применения в биомедицинских исследованиях, бионанотехнологии и при создании светоизлучающих устройств.

Термический анализ клатратов LLL.

Дальнейшим развитием исследований в области термических свойств олигопептидов стало изучение свойств трипептида **LLL**, рис. 15а. Было установлено, что в отличие от изученных дипептидов при нагревании трипептида выше $200^\circ C$ происходит его разложение. Об этом свидетельствует масс-спектрометрический сигнал, соответствующий CO_2 , рис. 15а. Согласно кривой ДСК при $183^\circ C$ происходит плавление образца, а до температуры $163^\circ C$ наблюдается ступень потери массы, связанная с уходом гидратной воды $\Delta m = 3,5\%$.

Поскольку ранее для дипептида

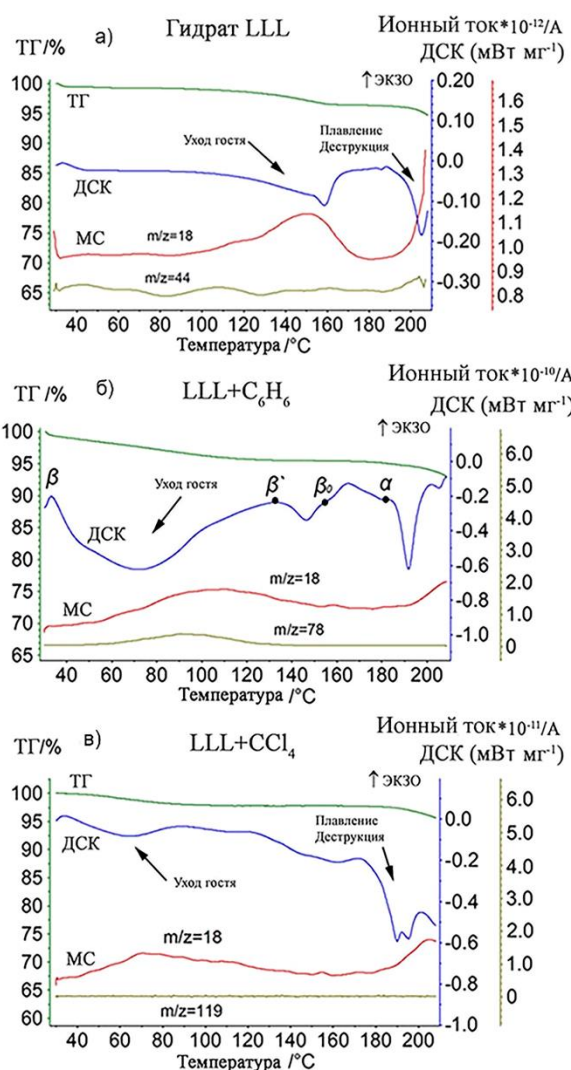


Рисунок 15. Термический анализ а) порошка **LLL** и продуктов насыщения осушенного **LLL** парами б) бензола и в) CCl_4 .

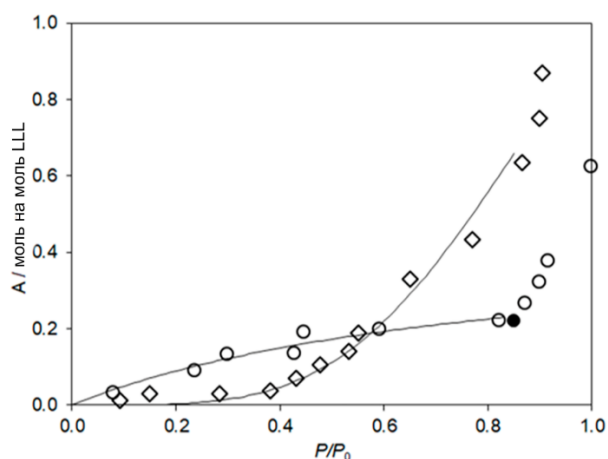


Рисунок 16. Изотермы сорбции (○) бензола и (◇) тетрахлорметана на осушенном образце **LLL** при 25°C. (●) – данные из работы Ziganshin M.A. et al. J. Pept. Sci., 2012, 18, 209.

Отсутствие масс-спектрометрического сигнала с $m/z=119$, соответствующего CCl_4 , свидетельствует о том, что убыль массы образца связана с уходом воды. Можно предположить, что CCl_4 уходит из клатрата в процессе уравнивания термовесов в потоке аргона до начала термического анализа.

Если при связывании паров CCl_4 **LLL** связывает воду в количестве 2,2%, то можно предположить, что такое же количество воды связывается и в процессе взаимодействия с парами бензола. В таком случае количество бензола в клатрате можно оценить по разнице между потерями массы Δm клатрата **LLL** с C_6H_6 и клатрата с CCl_4 . Полученное значение 2,4% в пересчете на величину сорбции A составляет 0,11 моль бензола на моль **LLL**.

Сорбционные свойства LLL были изучены методом статического парофазного газохроматографического анализа. Полученные изотермы сорбции паров бензола или тетрахлорметана, рис. 16, представляют собой зависимости количества связавшегося «гостя» A (моль «гостя» на 1 моль **LLL**) от его термодинамической активности P/P_0 . Резкий подъем на изотермах, наблюдаемый при активностях $P/P_0 > 0,88$, связан с конденсацией паров органических соединений и образованием жидкой фазы. Форма полученных изотерм сорбции двух «гостей» отличается друг от друга. Связывание паров бензола начинается при более низких значениях термодинамической активности «гостя», а на изотерме отсутствует порог по связыванию. Образование насыщенного клатрата **LLL** с бензолом происходит при термодинамической активности «гостя» $P/P_0 = 0,82$.

Изотерма сорбции паров CCl_4 имеет вогнутую форму, заметное связывание «гостя» начинается при его термодинамических активностях $P/P_0 > 0,4$. В отличие от изотермы сорбции паров бензола на изотерме сорбции CCl_4 отсутствует четко определяемый участок насыщения, соответствующий образованию клатратов **LLL** с CCl_4 . Этот факт указывает на частичное растворение

кристаллов **LLL** в тетрахлорметане.

Применение LLL для количественной оценки содержания бензола в смесях. Особенностью клатрата **LLL** с бензолом при нагревании являются тепловые эффекты, наблюдаемые на кривой ДСК, рис. 15б. При нагревании продукта насыщения **LLL** парами бензола на кривой ДСК присутствуют эндо- и экзо-эффекты, температура начала которых выше, чем температура ухода бензола из клатрата. Подобные эффекты, наблюдаемые в твердой фазе рецептора выше температуры ухода «гостя», являются следствием изменения упаковки рецептора. Полиморфные переходы, наблюдаемые в фазе **LLL**, были охарактеризованы методом рентгеновской порошковой дифрактометрии и будут детально проанализированы далее.

Данные термического анализа позволяют охарактеризовать фазовые переходы в веществе **LLL** при нагревании. Продукт насыщения **LLL** парами бензола, представляет собой клатрат, упаковка которого обозначена на рис. 15б как β -фаза. При нагревании образца до температуры 130°C бензол полностью уходит из фазы олигопептида и образуется первая полиморфная модификация **LLL** – β' -фаза. При температуре 138°C происходит следующий полиморфный переход с образованием метастабильной β_0 -фазы с неплотной упаковкой. Данному переходу соответствует эндотермический пик на кривой ДСК. Дальнейший нагрев образца до 158°C приводит к коллапсу метастабильной β_0 -фазы с образованием термодинамически стабильной α -фазы с плотной упаковкой. Этот процесс проявляется на кривой ДСК в виде экзотермического пика.

Способность **LLL** к образованию полиморфных модификаций после ухода бензола может быть использована для решения практических задач по определению этого «гостя» в смесях с другими органическими соединениями, не запоминаемых **LLL**. В настоящей работе был проведен анализ влияния состава смеси бензола (запоминаемый «гость») с тетрахлорметаном (не запоминаемый «гость»), на величину наблюдаемых тепловых эффектов. Были приготовлены 6 образцов клатратов **LLL**, полученные насыщением осушенного порошка **LLL** парами чистого бензола и парами смеси бензола и CCl_4 с мольным содержанием бензола 80, 70, 60, 40 и 20 процентов. На рис. 17 приведены результаты термического анализа полученных клатратов **LLL**.

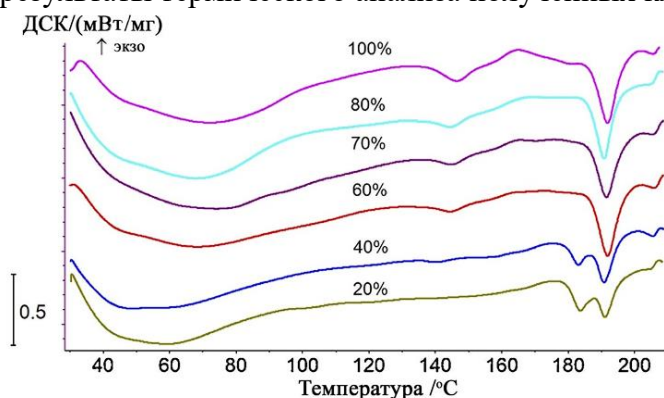


Рисунок 17. ДСК кривые клатратов **LLL**, полученных насыщением порошка трипептида парами бензола и бинарной смеси C_6H_6/CCl_4 с различным соотношением компонентов.

($\Delta H_{\text{эндо}}$, $\Delta H_{\text{экзо}}$) а также температуры начала обоих процессов ($T_{\text{эндо}}$, $T_{\text{экзо}}$) приведены в таблице 4. При анализе полученных данных была обнаружена зависимость между величинами тепловых эффектов и содержанием бензола в смеси, которой насыщали **LLL**, рис. 18. Для эндо-эффекта линейная зависимость проявляется в большем диапазоне содержания бензола. В каждом из проведенных экспериментов тепловые эффекты начинались при одной и той же температуре $T_{\text{экзо}}=158\pm 1^\circ\text{C}$ и $T_{\text{эндо}}=138\pm 1^\circ\text{C}$. При содержании бензола меньше 40 мол. % исчезает экзо-эффект, а величина эндо-эффекта становится слишком мала для ее точного определения.

На кривых ДСК, соответствующих продуктам насыщения **LLL** парами смесей с содержанием бензола 100-60 мол. %, наблюдаются эндо- и экзотермические эффекты при температурах 138°C и 158°C соответственно. Уменьшение содержания бензола в смеси, использованной для насыщения **LLL**, ведет к уменьшению величины энтальпий обоих тепловых эффектов. При содержании бензола в смеси 20 мол.% оба эффекта исчезают. Величины эндо- и экзо- эффектов

Таблица 4. Величины тепловых эффектов, наблюдаемых при нагревании продуктов насыщения **LLL** парами чистого бензола и его смесями с CCl_4 , после ухода связанных «гостей» из клатратов.

$C_{\text{бензол}}$, мол. %	$\Delta H_{\text{экзо}}$, Дж/г	$\Delta H_{\text{эндо}}$, Дж/г	$T_{\text{экзо}}$, °С	$T_{\text{эндо}}$, °С
100	6,5	-6,7	138,2	158,7
80	4,5	-3,0	138,5	158,3
70	3,6	-1,6	138,0	158,2
60	3,3	-1,1	138,1	157,6
40	0,5	0	135,2	-
20	0	0	-	-

продуктов насыщения α -фазы парами воды, бензола, тетрахлорметана и их смесями с различным соотношением компонентов, а также образцы **LLL**, насыщенные парами бензола и нагретые до 130°C (β' -фаза) и 146°C (β_0 -фаза), рис. 19.

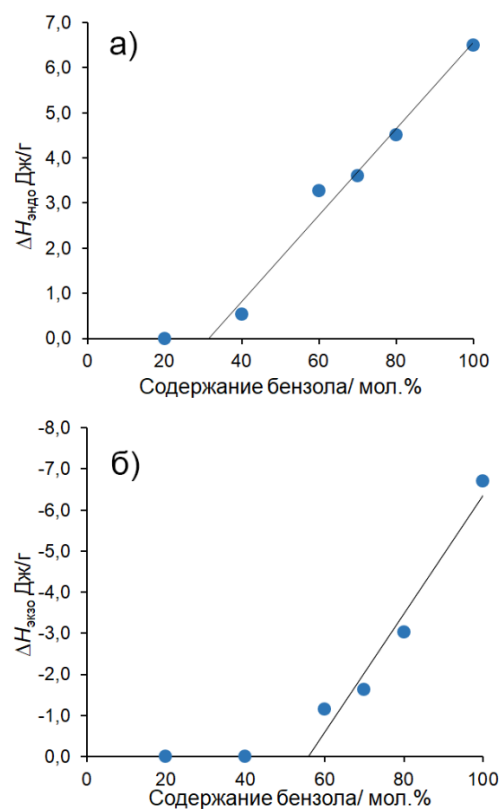


Рисунок 18. Зависимость величин а) эндо- и б) экзо- эффектов от содержания бензола в смеси.

При нагревании клатрата **LLL** с C_6H_6 до 130°C бензол и вода уходят из твердой фазы, рис. 15б, и образуется новая полиморфная модификация β' -фаза, рис. 19д. Дальнейший нагрев до 146°C ведет к полиморфному переходу с образованием метастабильной β_0 -фазы, рис. 19е, который сопровождается эндотермическим эффектом на кривой ДСК, рис. 15б. Следует отметить, что кратковременный нагрев β_0 -фазы до 146°C не приводит к коллапсу пористой упаковки, а образование α -фазы происходит в результате продолжительного нагрева при 150°C.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения **LLL** для качественного и количественного определения бензола в смеси с тетрахлорметаном.

Результаты рентгеновской порошковой дифрактометрии **LLL** и его клатратов.

Для установления природы «памяти» кристаллов **LLL** к ранее связанному бензолу методом рентгеновской порошковой дифрактометрии были проанализированы образцы исходного гидратированного порошка **LLL**, осушенного порошка **LLL** (α -фаза),

Упаковка кристаллов **LLL** зависит от присутствия в фазе трипептида воды и термического воздействия. Упаковка гидратированного порошка **LLL**, рис. 19а, отличается от упаковки α -фазы, полученной нагреванием гидратированного порошка до 150°C, рис. 19б. На дифрактограмме осушенного порошка наблюдается появление узкого пика при $2\theta = 7,0^\circ$, а два пика при $6,5^\circ$ и $7,5^\circ$, являющихся характеристическими для гидрата **LLL**, исчезают. Помимо этого, изменяется число, расположение и интенсивность пиков в интервале $2\theta=10-28^\circ$. Насыщение осушенного порошка **LLL** парами воды ведет к восстановлению исходной упаковки кристаллов, рис. 19в. При взаимодействии осушенного порошка **LLL** с парами бензола (в присутствии паров воды из атмосферы), образуется новая фаза с характеристическими пиками при 2θ равном $7,9^\circ$ и $17,4^\circ$, рис. 19г. При этом, на дифрактограмме клатрата **LLL** с бензолом наблюдаются также и пики, характерные для гидрата **LLL**, рис. 19а. Этот факт хорошо согласуется с данными термического анализа, согласно которым, при нагревании клатрата **LLL** с C_6H_6 помимо ухода бензола также наблюдается и уход воды, рис. 15б. Можно предположить, что бензол и вода связываются кристаллами **LLL** одновременно.

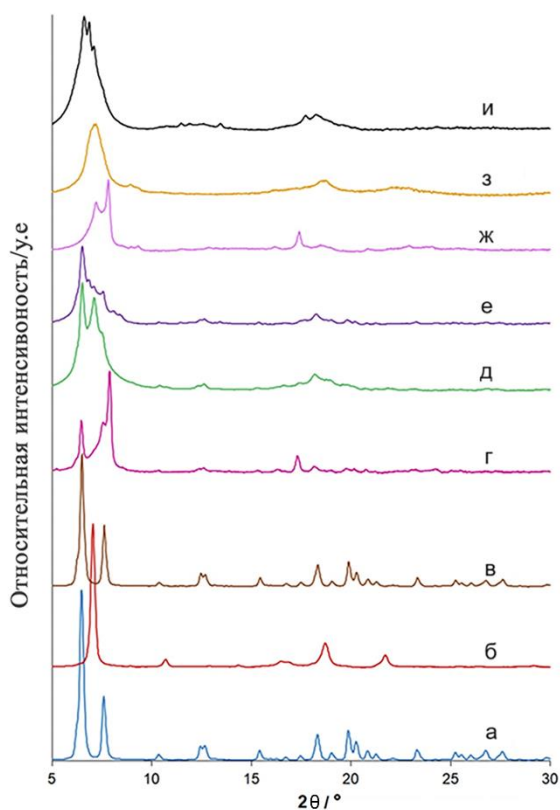


Рисунок 19. Порошковые дифрактограммы а) гидратированного порошка **LLL**, б) осушенного порошка **LLL** (α -фаза), продуктов насыщения α -фазы парами в) воды, г) бензола (в присутствии паров воды), порошка **LLL**, насыщенного парами бензола после нагрева до д) 130°C (β' -фаза) и е) 146°C (β_0 -фаза), продуктов насыщения α -фазы парами смесей $\text{C}_6\text{H}_6:\text{CCl}_4$ ж) 80:20, з) 40:60, а также и) парами CCl_4 (в присутствии паров воды).

использован метод АСМ. На рис. 20 и 21 представлены АСМ изображения кристаллов **LLL** до и после взаимодействия с парами бензола и тетрахлорметана. Взаимодействие кристалла **LLL**, рис. 20а, с парами бензола не приводит к существенному изменению его формы, рис. 20б. На микроуровне кристаллографические ступени на гранях кристалла, рис. 20в, деформируются и сливаются друг с другом, рис. 20г.

Взаимодействие кристалла **LLL** с тетрахлорметаном приводит к его разрушению, рис. 21. Вокруг остатков кристалла формируются сферические объекты диаметром 40-70 нм, образованные молекулами трипептида, ранее входившими в состав фазы кристалла. Результаты АСМ хорошо согласуются с данными рентгеновской порошковой дифрактометрии, согласно которым продукт взаимодействия порошка **LLL** с парами бензола имеет кристаллическую структуру, рис. 19г, но с иной упаковкой, отличающейся от упаковки гидрата **LLL**, рис. 19а. Взаимодействие же **LLL** с парами тетрахлорметана приводит к аморфизации образца, рис. 19и, 21в.

Дифрактограмма продукта насыщения **LLL** парами смеси бензола и тетрахлорметана с мольным соотношением 80:20, рис. 19ж, является практически идентичной той, которая соответствует продукту насыщения **LLL** парами чистого бензола, рис. 19г, за исключением нового широкого пика при $7,1^{\circ}$. Увеличение содержания тетрахлорметана в смеси, используемой для насыщения, до 60 мольных процентов приводит к появлению двух новых широких пиков при 2θ равном $7,0^{\circ}$ и $18,5^{\circ}$, рис. 19з. Похожая дифрактограмма наблюдается для продукта насыщения **LLL** парами чистого тетрахлорметана, рис. 19и. При этом близость расположения узких пиков у осушенного порошка **LLL**, рис. 19б, и широких пиков у продукта насыщения кристаллов **LLL** парами тетрахлорметана, рис. 19и, может быть связана с переходом кристаллов **LLL** в аморфное состояние после взаимодействия с парами тетрахлорметана.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности кристаллов **LLL** к составу смесей, используемых для насыщения. Увеличение содержания тетрахлорметана в смеси с бензолом приводит к стиранию «памяти рецептора» по отношению к бензолу. Этот эффект проявляется в виде уменьшения величины энтальпий процессов полиморфных переходов, рис. 17.

Для более детального изучения влияния паров органических соединений на упаковку **LLL** в твердой фазе был

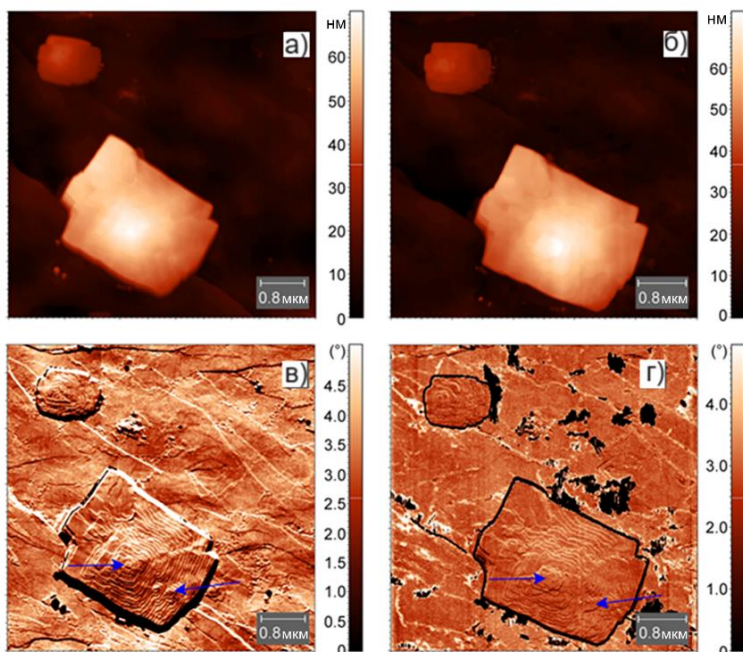


Рисунок 20. АСМ изображения, полученные до (а, в) и после (б, г) взаимодействия кристалла **LLL** с парами бензола. Изображения а) и б) получены в режиме топографии, в) и г) – в режиме фазового контраста. Стрелки указывают на изменения в микроструктуре кристалла.

Наблюдаемое влияние паров органических соединений на упаковку **LLL** в твердой фазе может быть следствием лучшей растворимости **LLL** в тетрахлорметане, по сравнению с бензолом. В молекуле трипептида присутствуют три объемных алкильных заместителя. CH_x -фрагменты этих заместителей формируют грани кристаллов трипептида и могут непосредственно взаимодействовать с парами органических растворителей, конденсирующихся на поверхностях кристаллов.

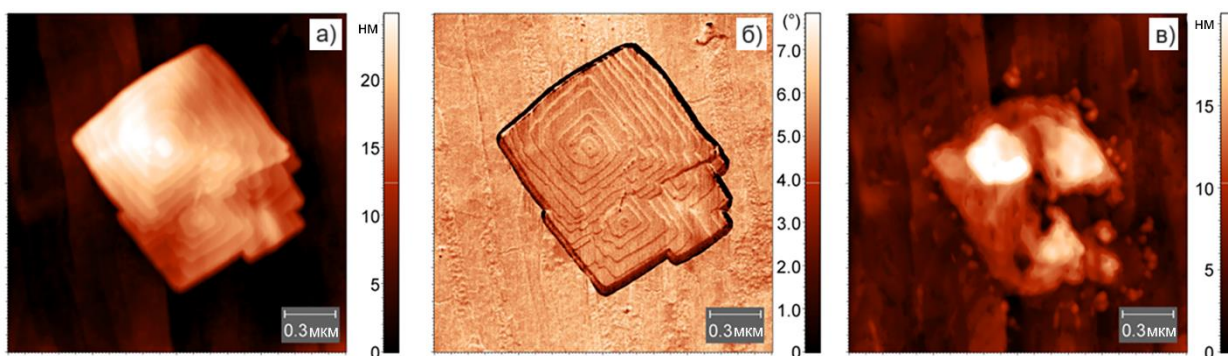


Рисунок 21. АСМ изображения, полученные до (а, б) и после в) взаимодействия кристалла **LLL** с парами тетрахлорметана. Изображения а) и в) получены в режиме топографии, б) в режиме фазового контраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые изучены реакции циклизации дипептидов глицил-глицин, изолейцил-аланин, аланил-изолейцин, лейцил-валин, лейцил-фенилаланин и фенилаланил-лейцин в твердой фазе при нагревании. Определены температуры начала реакций: 228°C для Gly-Gly, 206°C для Ile-Ala, 228°C для Ala-Ile, 180°C для Leu-Val, 134°C для Leu-Phe и 152°C для Phe-Leu. В рамках подходов изоконверсионной кинетики впервые рассчитаны кинетические параметры этих реакций и установлено, что изученные реакции хорошо описываются автокаталитическими моделями. Значения энергии активации реакции и логарифма константы Аррениуса составили 185 кДж/моль и 17,4 для Gly-Gly, 218 кДж/моль и 21,0 для Ile-Ala, 217 кДж/моль и 20,0 для Ala-Ile, 313 кДж/моль и 33,7 для Leu-Val, 147 кДж/моль и 16,4 для Leu-Phe, 111 кДж/моль и 11,0 для Phe-Leu.
2. Впервые установлено, что с увеличением размера боковых заместителей аминокислотных остатков в изученных дипептидах в общем происходит снижение

температуры начала их циклизации в твёрдой фазе. В ряду алифатических дипептидов Gly-Gly, Ile-Ala, Ala-Ile, Leu-Val, Leu-Leu с увеличением размера боковых заместителей происходит увеличение энергии активации реакции циклизации. Замена остатка алифатической аминокислоты в дипептиде на ароматическую приводит к значительному снижению энергии активации твердофазной циклизации.

3. Высказано предположение о том, что при циклизации дипептидов в кристаллической фазе лимитирующей стадией является переход молекулы из цвиттер-ионной формы в молекулярную форму.

4. Показано, что изученные линейные дипептиды в результате самосборки из различных растворителей формируют гладкую аморфную пленку, в тех же условиях циклические дипептиды в зависимости от типа используемого растворителя способны образовывать микро- и нанопластины или фибриллярные структуры. При этом микроструктуры на основе циклического фенилаланил-лейцина проявляют люминесцентными свойствами в отличие от его линейных аналогов.

5. Установлено, что лейцил-лейцил-лейцин способен «запоминать» связанный бензол. «Память» олигопептида проявляется в виде тепловых эффектов на кривой ДСК в области температур после ухода связанного «гостя». Обнаружено, что величина тепловых эффектов зависит от содержания бензола в используемой для насыщения смеси органических соединений.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Установленные в настоящей работе соотношения между структурой дипептида и температурой начала его циклизации, определенные значения кинетических параметров этого процесса позволят продвинуться в разработке экономически выгодных методов получения производных 2,5-дикетопиперазинов, обладающих практически значимыми свойствами, с выходами близкими к 100 процентам. Обнаруженные в настоящей работе особенности самосборки циклических дипептидов могут быть использованы для получения на их основе упорядоченных структур, обладающих, в том числе, люминесцентными свойствами, которые могут быть использованы для производства светоизлучающих устройств.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях (статьи):

1. Ziganshin, M.A. Thermally induced cyclization of L-isoleucyl-L-alanine in solid state: Effect of dipeptide structure on reaction temperature and self-assembly / M.A. Ziganshin, **R.A. Larionov**, A.V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, A.E. Klimovitskii, K.R. Khayarov, T.A. Mukhametzhanov, V.V. Gorbachuk // *Journal of Peptide Science*. – 2019. – V.25. – ArticleID e3177.

2. Perov, I.A. Smart thermal behavior of tripeptide leucyl-leucyl-leucine towards vapors of binary mixture of benzene and tetrachloromethane / I.A. Perov, S.A. Ziganshina, **R.A. Larionov**, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin // *Thermochimica Acta*. – 2021. – V.700. – ArticleID 178937.

3. **Ларионов, Р.А.** Кинетика циклизации дипептида глицил-глицин в твердой фазе / Р.А. Ларионов, Ш.Р. Ахметшин, А.В. Герасимов, А.С. Морозова, С.А. Зиганшина, Х.Р. Хаяров, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // *ЖОрХ* – 2022. – Т.58. – С.787-795.

4. **Ларионов, Р.А.** Циклизация дипептида L-лейцил-L-валин в кристаллической фазе в неизотермических условиях / Р.А. Ларионов, С.А. Зиганшина, А.Е. Климовицкий, Х.Р. Хаяров, О.Б. Бабаева, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // *Журнал общей химии* – 2023. – Т.93. – С.1711-1721.

5. **Larionov, R.A.** A new insight into the mechanism of solid-state cyclization of dipeptides: the effect of the sequence of amino acid residues in phenylalanyl-leucine and leucyl-phenylalanine / R.A. Larionov, S.A. Ziganshina, K.R. Khayarov, A.E. Klimovitskii, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk, N.V. Lantsova, M.A. Ziganshin // *Thermochimica Acta*. – 2024. – V.731. – ArticleID 179645.

6. Миргазиева, Э.Р. Циклизация дипептида L-аланил-L-изолейцин в твердой фазе: влияние последовательности аминокислотных остатков на кинетику реакции [Текст] / Э.Р. Миргазиева, **Р.А. Ларионов**, С.А. Зиганшина, Х.Р. Хаяров, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // Изв. Акад. наук. сер. хим. – 2024. – Т.73. – С.514-523.

Тезисы докладов:

1. **Ларионов Р.А.** Термически индуцируемая циклизация L-изолейцил-L-аланина и самосборка линейного и циклического дипептидов в твердой фазе / Р.А. Ларионов // Тез. докл. IX научной международной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы – 2018». – Москва, 9-13 апреля 2018.
2. **Ларионов Р.А.** Термически индуцируемая циклизация L-изолейцил-L-аланина и самосборка линейного и циклического дипептидов в твердой фазе / Р.А. Ларионов // Тез. докл. III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» – Казань, 29-31 октября 2018. – С.212.
3. **Larionov R.A.** Thermally induced reaction of cyclization of l-isoleucil-l-alanine dipeptide in the solid state / R.A. Larionov, M.A. Ziganshin, A.V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, V.V. Gorbachuk // Abstracts of the 2nd International Seminar on Advanced Calorimetry (ISAC-2018). – Kazan, Russia, October 10-12, 2018. – P.40.
4. **Larionov R.A.** Effect of the sequence of amino acid residues in dipeptides on the kinetics of solid-state cyclization / R.A. Larionov, M.A. Ziganshin, A.V. Gerasimov // Abstracts of the 3rd International Seminar on Advanced Calorimetry - ISAC 2019, Kazan, Russia, October 15-18, 2019. – P.38.
5. **Ларионов Р.А.** Циклизация дипептидов в твердой фазе, самосборка линейных и циклических молекул / Р.А. Ларионов, М.А. Зиганшин, С.А. Зиганшина, А.В. Герасимов, В.В. Горбачук // II школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» – Казань, 19-21 октября 2020. – С.30.
6. **Ларионов Р.А.** Циклизация дипептидов в твердой фазе, самосборка линейных и циклических молекул / Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020». – Москва, 10-27 ноября 2020.
7. **Ларионов Р.А.** Термические и супрамолекулярные свойства олигопептидов / Р.А. Ларионов, М.А. Зиганшин, С.А. Зиганшина, А.В. Герасимов, В.В. Горбачук // III школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» – Казань, 25-28 октября 2021. – С.102.
8. **Larionov R.A.** Thermal and supramolecular properties of oligopeptides / R.A. Larionov, A.V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin // Abstracts of the XXIII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia. – Kazan, Russia, August 22-27, 2022. – P.101.
9. **Ларионов Р.А.** Микро- и наноструктуры на основе линейных и циклических дипептидов / Р.А. Ларионов, М.А. Зиганшин, С.А. Зиганшина // IV семинар современные нанотехнологии – IWMN 2022 – Екатеринбург, 24-27 августа 2022. – С.71.