

Tittamaria Ursin

Uusien lääkeainemolekyylien rakennemääritystä NMR-spektrometrillä

Automaattisen rakenneverifioinnin parantaminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

5.8.2014

Alkulause

Tämä opinnäytetyö tehtiin Orionilla Rakennekemian ja Bioanalytiikan osastolla. Työn tekeminen oli monipuolista ja palkitsevaa. Haluan kiittää Rakennekemian ja Bioanalytiikan osastoa sekä Medicinal Chemistry -osastoa mahdollisuudesta opinnäytetyön tekemiseen. Kiitän koko NMR-tiimiä, erityisesti opinnäytetyöni ohjaajaa tutkija Mattias Roslundia, asiantuntevasta opastuksesta työn kaikissa vaiheissa. Erityiskiitokset kuuluvat rakkaalle perheelleni tuesta ja kannustuksesta opintojeni aikana.

Espoo 5.8.2014

Tittamaria Ursin

Tekijä Otsikko	Tittamaria Ursin Uusien lääkeainemolekyylien rakennemääritystä NMR-spektrometrillä
Sivumäärä Aika	38 sivua + 3 liitettä 5.8.2014
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Senior Research Scientist Mattias Roslund Yliopettaja Jukka Niiranen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Orion Pharman Rakennekemian ja Bioanalytiikan osastolla Espoossa. Osasto on osa Orionin tutkimus- ja tuotekehitysyksikköä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä kahteen automaattiseen NMR-verifiointiohjelmaan opetustietokannat erään non-kliinisen lääketutkimuksen molekyyliperheen molekyyleistä. Tavoitteena oli parantaa ohjelmistojen kykyä verifioida Orionin non-kliinisen tutkimuksen uusia tutkimusmolekyyliä, joita ei löydy verifiointiohjelmiston omasta tietokannasta. Lisäksi opetustietokantojen rakentamisen oletettiin parantavan ^1H-, ^{13}C-, ^{15}N-, ^{19}F- ja ^{31}P- ytimien kemiallisia siirtymiä ja kytkentävakioita ennustavan ohjelman suorituskykyä.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin kolmessa vaiheessa. Tietokantoihin valittujen opetusjoukkojen kaikki lääkeainemolekyylit mitattiin NMR-spektrometrillä. Mittausten jälkeen NMR-aineisto käsiteltiin ja tulkittiin. Jokaiselle molekyylille tehtiin täydellinen rakennemääritys hyödyntäen sekä 1D- että 2D-spektrejä. Opetusjoukkojen molekyyliarakenteista luotiin tietokannat kahteen eri NMR-verifiointiohjelmaan (ACD/Spectrus Processor ja Perch NMR Software). Opetusjoukkoihin valittiin eniten NMR-henkilökuntaa työllistäviä lääkeainemolekyylien rakenteita. Opinnäytetyö rajattiin yhteen tutkimusprojektiin. Tutkimusprojektin molekyylien rakenteita ja spektrejä ei ole liitetty opinnäytetyöhön. Työn etenemistä havainnollistetaan esimerkkimolekyylinä olevan tunnetun lääkeaineen, apomorfiinin, avulla.</p> <p>Opetustietokantojen rakentaminen osoittautui vaativaksi projektiksi. Uudet ohjelmistot ja molekyylien monimutkaiset rakenteet toivat haasteita tutkimukseen eikä opetustietokantoja päästy testaamaan tässä opinnäytetyössä. Opetustietokantojen rakentaminen jatkuu ja automaattista verifiointia kehitetään Rakennekemian ja Bioanalytiikan osastolla.</p>	
Avainsanat	NMR, ydinmagneettinen resonanssi, rakenneverifiointi, automaattinen verifiointi, lääkeainemolekyylit

Author Title	Tittamaria Ursin Structure verification of novel drug molecules with NMR spectrometer
Number of Pages Date	38 pages + 3 appendices 5 August 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Program	Laboratory Sciences
Instructors	Senior Research Scientist Mattias Roslund Senior Lecturer Jukka Niiranen
<p>The thesis work was carried out in the NMR group at Structural Chemistry and Bioanalytics department at Orion Pharma in Espoo Finland. Department is part of the Research and development organization. The purpose of this graduate study was to develop training databases for automated NMR verification software solutions. The databases were built up from novel drug molecules of one research project of non-clinical research. The goal was to improve the software's ability to verify the structures of Orion's novel drug molecules which are not available in the database of the verification software. In addition, new databases assumed to improve the performance of the predictor. The predictor predicts NMR spectra, chemical shifts, and coupling constants for ^1H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P nuclei.</p> <p>The thesis was executed in three phases. After the molecules for the training set were chosen, all molecule structures were measured with NMR spectrometer. All NMR data were processed and interpreted. Complete structure verification was made for every molecule utilizing both 1D- and 2D-spectra. The training databases of molecules were created for two NMR verification programs (ACD/Spectrus Processor and Perch NMR Software). The molecules chosen for the training set were the most challenging for the NMR staff to verify. This study focused on one research project. The molecule structures and the spectra related to the project were not attached to the thesis. However, a known drug molecule apomorfine was used to illustrate the methods used in this thesis to verify the actual molecules.</p> <p>Building up the training databases proved to be a very challenging project. New verification programs and complicated molecule structures brought challenges to this research. The training databases were not able to be fully tested in this study. Building up the training databases and developing the automatic verification will be continued in Structural Chemistry and Bioanalytics department.</p>	
Keywords	NMR, nuclear magnetic resonance, structure verification, automated verification, drug molecule

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	NMR-spektroskopia	2
2.1	NMR-laitteisto	2
2.2	Spin	3
2.3	Kemiallinen siirtymä	5
2.4	Integraalit	6
2.5	Spin-spin -kytkentä	7
2.6	NMR-näyte	12
2.7	NMR-tekniikat	12
2.7.1	Yksi- ja kaksiulotteinen NMR-spektroskopia	12
2.7.2	1D ^1H NMR -spektroskopia	13
2.7.3	1D ^{13}C NMR -spektroskopia	13
2.7.4	1D ^{15}N NMR -spektroskopia	14
2.7.5	2D ^1H , ^1H -COSY	14
2.7.6	2D ^1H , ^{13}C -HSQC	14
2.7.7	2D ^1H , ^{13}C -HMBC	15
2.7.8	2D ^1H , ^1H -NOESY	15
3	Toteutus	15
3.1	NMR-näytteen valmistus ja mittaus	15
3.2	Apomorfiinin NMR-spektrien tulkinta	16
3.2.1	^1H	16
3.2.2	^{13}C	18
3.2.3	^1H , ^1H -COSY	19
3.2.4	^1H , ^{13}C -HSQC	21
3.2.5	^1H , ^{13}C -HMBC	23
3.2.6	^1H , ^{15}N -HMBC	24
3.2.7	^1H , ^1H -NOESY	25
4	Tietokantojen luominen	26
4.1	Automaattiset verifiointiohjelmistot	26
4.1.1	ACD/Spectrus Processor	27
4.1.2	Perch NMR Software	30
4.2	Opetusjoukot	31

5	Tietokantojen testaus	31
6	Tulokset	33
6.1	Perch	33
6.2	ACD/Spectrus Processor	33
7	Yhteenveto	37
	Lähteet	39
	Liitteet	

Liite 1. ACD/Spectrus Processor -verifoinnin parametritaulukko

Liite 2. Apomorfiinin ^1H NMR -verifointi ACD/Spectrus Processor
-verifiointiohjelmistolla

Liite 3. Apomorfiinin yhdistetty $^1\text{H}/\text{HSQC}$ -verifointi ACD/Spectrus Processor
-verifiointiohjelmistolla

Lyhenteet

δ	Kemiallinen siirtymä
^1H	NMR-spektroskopiolla mitattava protoniydin (vedyn isotooppi)
^2H	Deuteriumatomi (vedyn isotooppi)
^{13}C	NMR-spektroskopiolla mitattava hiili-13 -ydin
^{15}N	NMR-spektroskopiolla mitattava typpi-15 -ydin
CDCl_3	Deuteroitu kloroformi
COSY	COrrrelation SpectroscopY
D_2O	Deuteroitu H_2O
$\text{DMSO-}d_6$	Deuteroitu dimetyylisulfoksidi
FT	Fourier Transform
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy
J	Spin-spin-kytkentävakio
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (ydinmagneettinen resonanssi)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
RF-pulssi	<i>Radiofrequency pulse</i> (radiotaajuksinen pulssi)
TMS	Tetrametyylisilaani

1 Johdanto

Uusien lääkeainemolekyylien tarkka rakennemääritys voi olla työlästä ja hidasta tehokkaista analyysilaitteista ja ammattitaitoisesta henkilökunnasta huolimatta. Molekyylien rakenneanalyysissä hyödynnetään rinnakkain useita analyysitekniikoita, joista yksi on ydinmagneettiseen resonanssiin perustuva spektroskopia, NMR (*Nuclear magnetic resonance*). Ydinmagneettinen resonanssi löydettiin vuonna 1938, minkä jälkeen NMR-spektroskopiasta on kehittynyt tehokas ja monipuolinen työkalu orgaanisessa kemiasa. NMR-spektroskopia mahdollistaa nykyaikaisen orgaanisten yhdisteiden rakennetutkimuksen. Atomin ytimen magneettisten ominaisuuksien ja ydintä ympäröivien elektronien avulla saadaan tietoa molekyylin rakenteesta. [1, s. 8.] Spektrometrian lisäksi ydinmagneettista resonanssia käytetään lääketieteellisissä kuvantamistekniikoissa (MRI, NMRI, MRT) ihmisen anatomian ja fysiologian tutkimukseen.

Orion on suomalainen lääkkeiden ja diagnostisten testien kehittäjä. Yritys kehittää, valmistaa ja markkinoi ihmis- ja eläinlääkkeitä, lääkkeiden vaikuttavia aineita sekä diagnostisia testejä. Orionin oman tutkimus- ja kehitystyön painopiste on alkuvaiheen lääkekehityksessä. Uuden lääkeainekandidaatin non-kliininen tutkimus on pitkä prosessi, jossa suunnitellaan, valmistetaan ja identifioidaan tavoiteprofiililtaan parhaita molekyyliä. Optimoinnin lopputuloksena on usein yksi lääkeainekandidaatti, joka viedään kliinisiin tutkimuksiin, joissa lopullisesti todetaan lääkkeen käyttökelpoisuus. [2.]

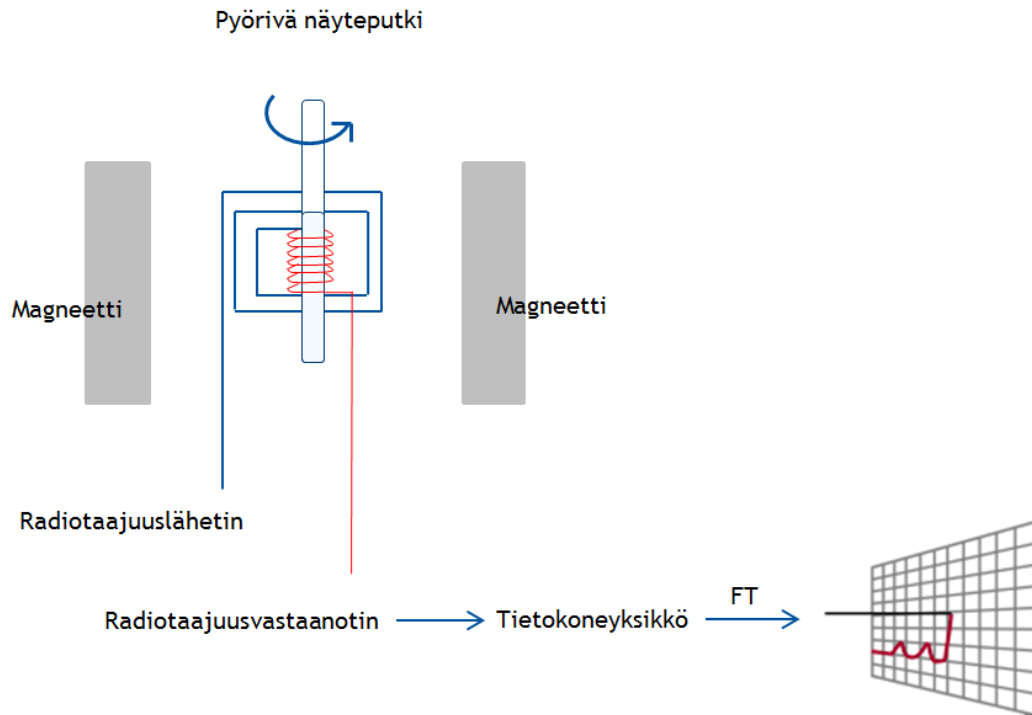
Molekyylin huolellisen valinnan ja rakennesuunnittelun jälkeen lääkeainemolekyyliä syntetisoidaan laboratoriossa. Syntetisoitujen molekyylien rakenteiden määrittäminen on tärkeä osa lääkeaineen tutkimus- ja kehitysvaihetta. NMR-spektroskopiolla varmistetaan synteesituotteen oikea rakenne. Väärien molekyylien joutuminen jatkotesteihin aiheuttaa lyhyt- ja pitkäkestoisia vaikutuksia kustannuksiin. Tieto tarkasta molekyyli-rakenteesta on tärkeää jo lääketutkimuksen alkuvaiheessa, jotta estetään väärien molekyylien pääsy jatkotutkimuksiin. Tutkijoiden työtaakan vähentämiseksi molekyylien rakenteen määrittämiseen on kehitelty automaattisia verifiointiohjelmia. Verifiointiohjelmat vertaavat mitattua spektriä ja molekyylin rakennetta oman tietokantansa yhdisteisiin ja antavat tuloksen mitatun ja ohjelman laskeman spektrin yhteensopivuudesta. Uusia molekyyliä syntetisoitaessa automaattisten verifiointiohjelmien antamat tulokset eivät aina ole luotettavia vertailuaineiden puuttuessa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on parantaa Orion Pharman non-kliinisen tutkimuksen uusien lääkeainemolekyylien automaattista NMR-rakenneverifiointia opetusjoukon avulla. Tavoitteena on kehittää kahteen automaattiseen NMR-verifiointiohjelmistoon opetustietokannat, joiden avulla verifiointiohjelma pystyy luotettavasti ennustamaan ja verifioimaan yhden tutkimusprojektin lääkeainemolekyylin rakenteita. Projektin molekyylien samankaltaiset rakenteet mahdollistavat edustavan opetusjoukon rakentamisen pienestä määrästä molekyylijä. Opetusjoukot koostuivat erään non-kliinisen lääketutkimuksen molekyyliperheen molekyyleistä. Opinnäytetyö rajattiin yhteen tutkimusprojektiin. Autoverifiointin parantaminen jatkuu muille lääketutkimuksen projekteille. Tutkijoiden verifiointityömäärän vähenemisen lisäksi työn mahdollisena hyötynä on nopean ja luotettavan automaattisen verifiointin myötä tuottavuuden kasvu.

2 NMR-spektroskopia

2.1 NMR-laitteisto

NMR-spektrometri koostuu neljästä tärkeästä komponentista, jotka ovat tehokas magneetti, radiotaajuuslähetin ja -vastaanotin (probe), konsoli ja tietokoneyksikkö. Kuvassa 1 on nähtävillä NMR-spektrometrin kaavakuva.

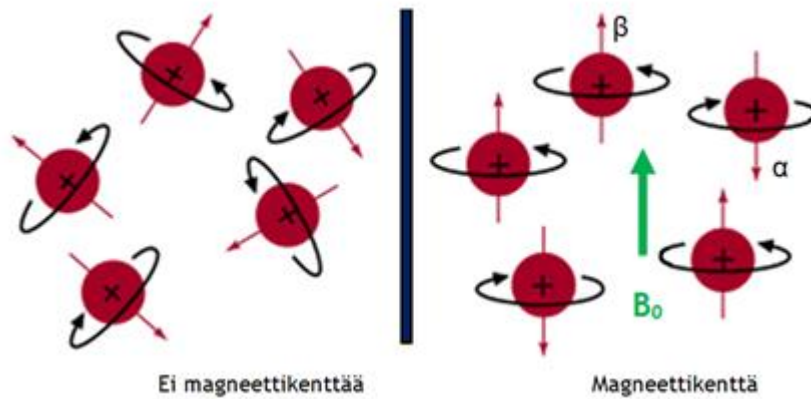


Kuva 1. NMR-spektrometrin kaavakuva.

NMR-spektrometriassa tarvitaan tehokas ja tasainen magneettikenttä, joka tuotetaan suprajohdavalla magneetilla. Magneettikentän voimakkuus voi olla 4,7 - 23,5 teslaa (200 MHz - 1 GHz). Radiotaajuuslähetin aikaansaa pulssin, joka ohjataan magneetin sisällä pyörivään näytteeseen. Atomit alkavat resonoida tietyllä omalla taajuudellaan, mikä aiheuttaa sähkövirran radiotaajuusvastaanotimessa. Tietokoneyksikössä tapahtuva Fourier-muunnos (Fourier Transform, FT) muuttaa sähkövirran signaaliksi.

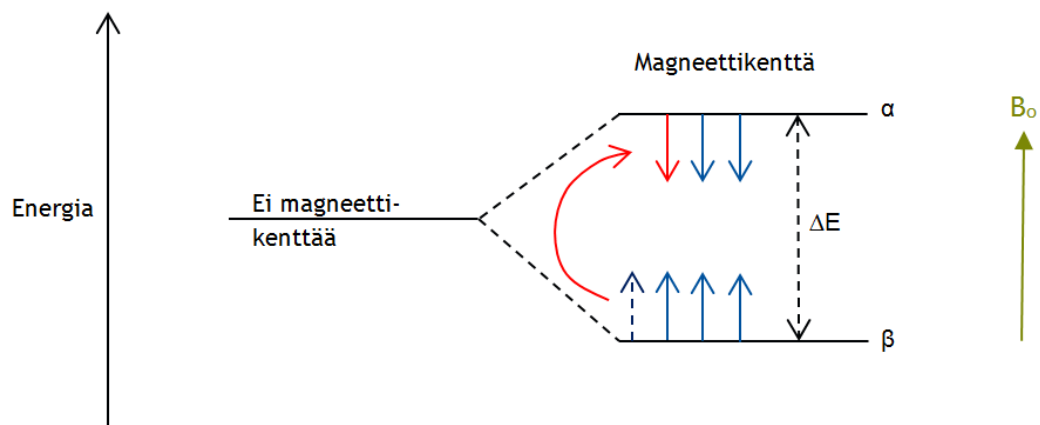
2.2 Spin

Atomit koostuvat elektroneista ja ytimeistä, jonka tärkein ominaisuus NMR-spektroskopiassa on sen magneettinen ominaisuus eli spin. Ydin on sähköisesti varautunut partikkeli, joka pyörii akselinsa ympäri. Pyöriminen aiheuttaa pienen magneettisen momentin, joka on yhteydessä ulkoiseen magneettikenttään (B_0). Magneettikentän avulla spinit suunnataan vastaamaan energiatasoja, joita kaikkein yksinkertaisimmassa tapauksessa on kaksi (α ja β). Tällöin ytimet asettuvat joko magneettikentän suuntaisesti (β) tai magneettikentän vastaisesti (α). Kuvassa 2 on havainnollistettu magneettikentän vaikutusta spinien suuntiin.



Kuva 2. Atomytimien asettuminen magneettikentässä [3 mukaillen].

Lämpötila ja magneettikentän suuruus määräävät spinien lukumäärän energiatasolla. Magneettikentässä spin-ytimet voivat resonoida eli absorboida sähkömagneettista säteilyä tietyllä taajuudella radiotaajuusalueella, jolloin virittävä energia on ns. RF-pulssi. Kun virittävä energia on yhtä suuri kuin energiatasojen välinen ero, spinit siirtyvät alemmalta tasolta ylemmälle tasolle, jolloin ytimet ovat magneettikentän vastaisesti. Spintilojen α ja β energiaeroja magneettikentässä on havainnollistettu kuvassa 3. Spinsysteemi palautuu aikaisempaan tasapainotilaansa, jolloin ydin emittoi energiaa resonanssitaajuudella. Taajuus riippuu ulkoisen magneettikentän voimakkuudesta ja ytimen ympäristön koostumuksesta. Jokainen ydin resonoi hieman eri taajuudella. [4, s. 2-3.]



Kuva 3. Magneettikentässä ydinten spin-tilojen energiat eroavat hieman toisistaan [4 s. 3 mukaillen].

Magneettista resonanssia esiintyy ytimillä, joiden spin-quanttiluvut ovat $\text{spin} \neq 0$. Jos sekä protonien että neutronien spin on nolla, ydin ei ole NMR-aktiivinen (^{12}C , ^{16}O). Jos ytimellä on pariton määrä sekä protoneita että neutroneita, spin on kokonaisluku (^2H , ^{14}N). Ytimillä, joilla on pariton määrä protoneita tai neutroneita, spinit ovat ei-kokonaislukuja ($1/2$, $3/2$, $5/2$ jne.). Tärkeimmät ytimet, joiden ydin-spin-arvo on $1/2$, ovat ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P ja ^{15}N .

2.3 Kemiallinen siirtymä

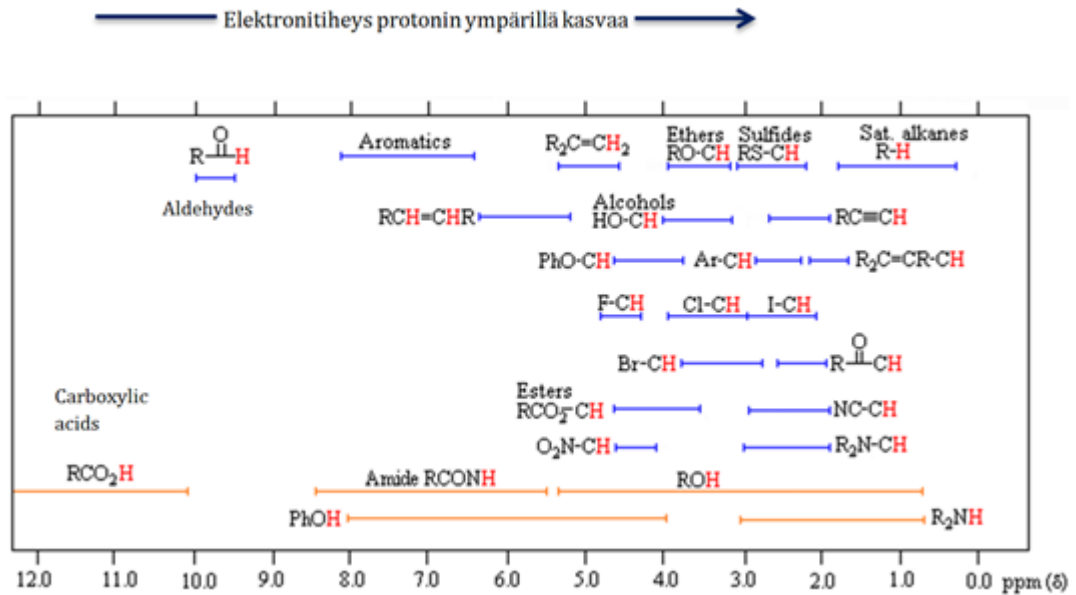
NMR-spektri kuvaa molekyylin rakennetta ja ympäristöä. Spektrissä resonanssi nähdään signaalina ytimelle ominaisella resonanssitaajuudella. Avaruudellisella atomien välisellä vuorovaikutuksella on pieni vaikutus ytimen resonanssitaajuuteen. Ytimen resonanssitaajuuteen merkittävästi vaikuttavat ytimeen sitoutuneet muut atomit. Sidoselektronien luoma pieni magneettikenttä vaikuttaa ytimen ympärillä olevaan paikalliseen magneettikenttään ja muuttaa ytimen kokemaa ulkoista magneettikenttää. Ytimen kokeman ulkoisen magneettikentän muutoksien vaikuttaessa ytimen resonanssitaajuuksiin voimakkuuksiltaan erilaisten magneettikenttien mittaustulokset eivät ole vertailukelpoisia [5, s. 3]. Taajuuden tilalla mitta-asteikkona käytetään *kemiallista siirtymää* δ , joka on riippumaton magneettikentästä. Kemiallinen siirtymä voidaan laskea kaavalla 1.

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{v(\text{Hz}) - v_{\text{referenssi}}(\text{Hz})}{\text{Spektrometrin taajuus}(\text{MHz})} \quad (1)$$

jossa v on ytimen resonanssitaajuus ja $v_{\text{referenssi}}$ on referenssiyhdisteen taajuus [6, s. 68].

Kemiallinen siirtymä antaa yksityiskohtaista tietoa molekyylin rakenteesta. Käytännössä spektrissä nähdään resonanssisignaaleja, jotka vastaavat kemiallisesti erilaisia spin-aktiivisia ytimiä. Absoluuttisten taajuuksien mittaaminen on haastavaa, joten NMR-spektroskopiassa mitataan resonanssien taajuuseroja. Usein referenssiyhdisteenä käytetään tetrametyylisilaania (TMS), joka toimii sisäisenä standardina tarkkojen kemiallisten siirtymien laskemiseksi. Tetrametyylisilaanin ^1H - ja ^{13}C -ytimet ovat hyvin suojatut ja TMS on yleensä määritetty spektrin nollakohdaksi. Muiden resonanssien kemialliset siirtymät saadaan vertaamalla niiden taajuuksia referenssin kemialliseen siirtymään. [4, s. 12.]

Funktionaaliset ryhmät esiintyvät yleensä niille ominaisella kemiallisella siirtymäalueella. Kuvassa 4 on esitetty funktionaalisten ryhmien tyypillisiä kemiallisia siirtymäalueita protonispektrissä.



Kuva 4. Funktionaalisten ryhmien tyypilliset kemialliset siirtymät protonispektrissä [7].

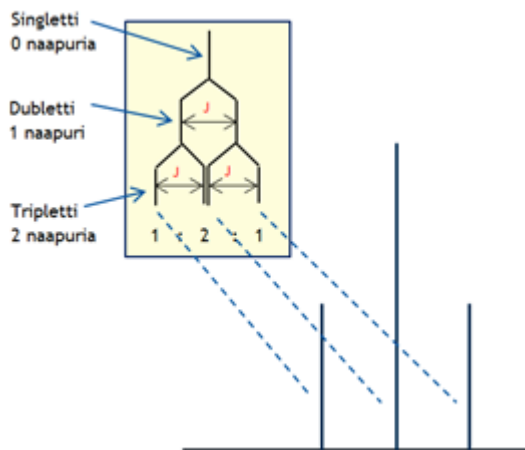
Ydintä ympäröivien elektronien muodostaman suojaavan magneettikentän koko riippuu atomin ytimen elektronitiheydestä. Mitä enemmän protonin ympärillä on suojaavia elektroneita, sitä paremmin protonit ovat suojassa ulkoiselta magneettikentältä, jolloin 1H NMR -spektrissä signaali nähdään pienellä kemiallisen siirtymän arvolla (oikealla). Jos protonin ympärillä on elektronegatiivisia atomeja tai elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä, elektronitiheys protonin ympärillä vähenee ja ydin resonoi eri taajuudella. Tällöin signaali havaitaan spektrissä suurella siirtymäarvoalueella (vasemmalla).

2.4 Integraalit

Protonispektrissä nähtävän signaalin pinta-ala esitetään signaalin intensiteettinä tai signaalin integraalina. Signaalin pinta-ala on verrannollinen detektoitujen protonien määrään. Integraaliarvot kertovat molekyylissä olevien protonien suhteellisen määrän. Integrointi mahdollistaa seosten kvantitatiivisen analyysin. Yleensä ^{13}C -ydintä ei mitata kvantitatiivisena eikä hiilispektrejä integroida.





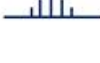
2.5 Spin-spin-kytkentä

Ulkoisen magneettikentän lisäksi ytimen kokemaan magneettikentän voimakkuuteen vaikuttavat sen ympärillä olevien naapuriatomien energiatilat. Tästä vuorovaikutuksesta käytetään nimitystä spin-spin -kytkentä. [8, s. 86.] Spinien kytkeytyminen muovaa energiatasoja siten, että toisen ytimen spin-tila muuttuu. Ydinten spinien välinen kytkeytyminen aiheuttaa resonanssien pilkkoutumisen, mikä havaitaan spektrissä signaalien hienorakenteena. Yksinkertaisimmassa tapauksessa signaali jakautuu kahdeksi intensiteeteiltään samanvahvuiseksi signaaleiksi. Kun useampi naapuriydin vaikuttaa ytimen kokemaan magneettikenttään, signaalit jakautuvat edelleen kahtia ja syntyy ns. multipletteja. [4, s. 25 - 26.] Ilmiötä on havainnollistettu kuvassa 5.



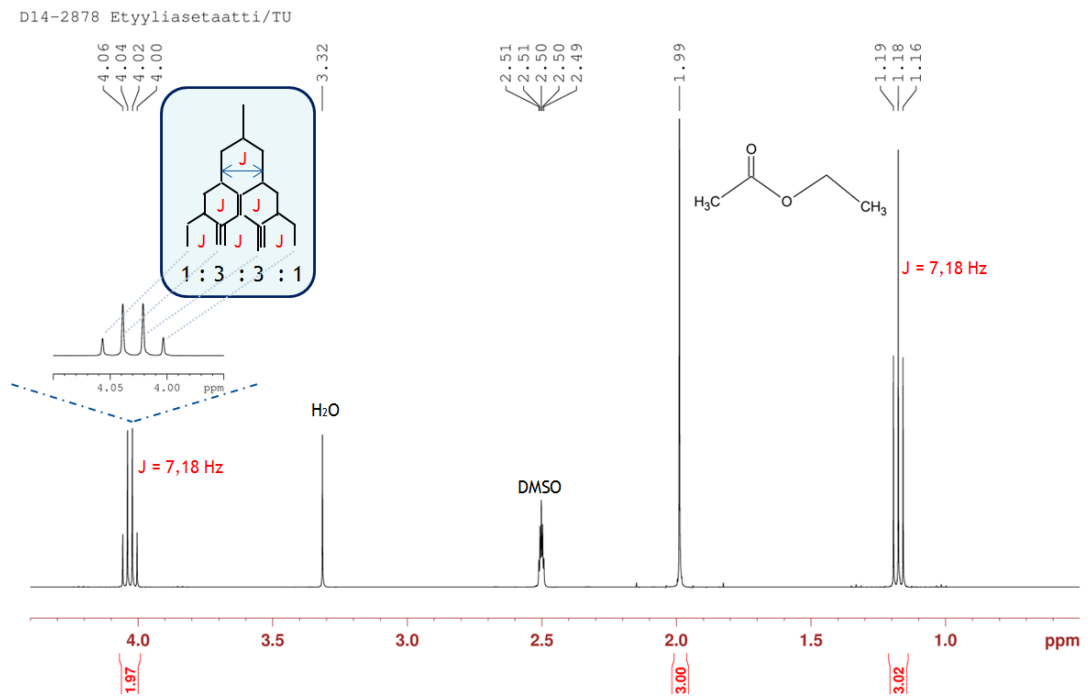
Kuva 5. Jakautumisen seurauksena syntynyt tripletti, jonka signaalien intensiteettisuhde on 1:2:1.

Lähiympäristön vaikutuksesta syntyvät multipletit on nimetty piikkien lukumäärän mukaan. Multiplisiteetti (M) voidaan laskea kaavalla $n + 1$, jossa n kuvaa naapuriydinten lukumäärää. Naapuriatomien määrän vaikutus signaalin multiplisiteettiin on esitetty kuvassa 6.

Naapuriatomien lkm (n)	Multiplisiteetti	
0	Singletti	
1	Dubletti	
2	Tripletti	
3	Kvartetti	
4	Kvintetti	

Kuva 6. Ydinten lähiympäristössä olevat atomit vaikuttavat signaalin muotoon.

Kuvassa 7 on etyyliasetaatin ^1H NMR -spektri. Etyyliasetaatin asetaattiryhmän CH_3 -ryhmällä ei ole yhtään naapuriprotonia, jolloin spin-spin-kytkeytymistä ei tapahdu ja signaali on singletti kemiallisella siirtymäarvolla 1,99 ppm. Etyyliasetaatin metyleeniryhmän (CH_3CH_2 -ryhmä) CH_3 -ryhmässä on kolme ympäristöönsä nähden ekvivalenttia protonia, joiden resonanssien tulisi näkyä yhtenä viivana spektrissä. CH_3 -ryhmän protonit kuitenkin "näkevät" kolmen sidoksen päässä olevat kaksi CH_2 -ryhmän naapuriprotonia. Tämän kytkeytymisen vaikutuksesta metyylin signaali jakautuu ja tuloksena on tripletti, joka nähdään kemiallisen siirtymän arvolla 1,18 ppm. Asetaattiryhmän CH_3 -ryhmän protonit nähdään suuremmalla kemiallisen siirtymän alueella (1,99 ppm) kuin metyleeniryhmän CH_3 -ryhmän protonit (1,18 ppm) asetattiryhmän lähellä olevien elektroneja puoleensa vetävien atomien ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$) vaikutuksesta. Etyyli-ryhmän CH_2 -ryhmän protonien signaali jakautuu CH_3 -ryhmän vaikutuksesta, jolloin syntyvä signaali on kvartetti siirtymäarvolla 4,03 ppm. Liuottimena olleen DMSO:n signaali havaitaan siirtymäarvolla 2,50 ppm. Liuottimen sisältämän veden signaali on singletti, ja se nähdään siirtymällä 3,33 ppm.



Kuva 7. Etyyliasettaatin ^1H NMR -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Signaalien intensiteetit noudattavat Pascalin kolmiota, joka on esitetty kuvassa 8. Kolmiosta voidaan helposti nähdä kuvan 7 spektrissä nähtävän kvartetin (4,03 ppm) piikkien intensiteettien suhde, joka on 1:3:3:1.

			1			
			1		1	
			1	2	1	
		1	3	3	1	
	1	4	6	4	1	
1	5	10	10	5	1	

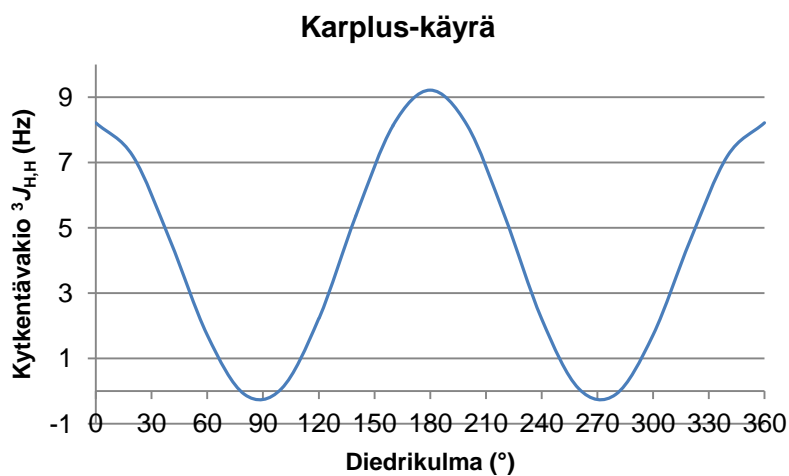
Kuva 8. Signaalien intensiteettien suhteet määräytyvät Pascalin kolmion mukaisesti [5, s. 5].

Etyyliasettaatin CH_3 - ja CH_2 -ryhmien protonit kytkeytyvät toisiinsa samalla voimakkuudella. Protonien välisen kytkennän voimakkuudesta kertoo ydinten välillä oleva kytkentävakio J , joka ilmoitetaan herzeinä (Hz). Kytkentävakio etyyliasettaatin CH_3 - ja CH_2 -ryhmien välillä on 7,18 Hz. Kuvassa 9 on esitetty erilaisten rakenteiden tyypillisiä kytkentävakioita.

Rakenne	J (Hz)	Rakenne	J (Hz)
	0		12 - 18
	6 - 8		7 - 12
	5 - 7		0,5 - 3
	2 - 12		3 - 11
	Riippuen kulmasta ja X- ja Y- atomeiden ominaisuuksista		Riippuen kulmasta
	0,5 - 3		2 - 3
	12 - 15		
	Diastereotooppiset molekyylit		o 6 - 9 m 1 - 3 p 0 - 1

Kuva 9. Tyypillisiä kytkentävakioita [9 mukailen].

Magneettikentän voimakkuus ei vaikuta kytkennän voimakkuuteen, jolloin kytkentäväkio on samansuuruinen tyypillisille funktionaalisille ryhmille [10, s. 10]. Atomien välisiä kytkentöjä nähdään yleensä kahden tai kolmen sidoksen yli. Diedrikulmat (kahden tason väliset kulmat) vaikuttavat kolmen sidoksen päähän ylettyviin kytkentöihin (3J), jolloin kytkentävakiot antavat tietoa molekyylin konformaatiosta. Kuvassa 10 on nähtävillä Karplus-käyrä, josta nähdään protonien välisen diedrikulman ja kytkentävaktion 3J suhde.



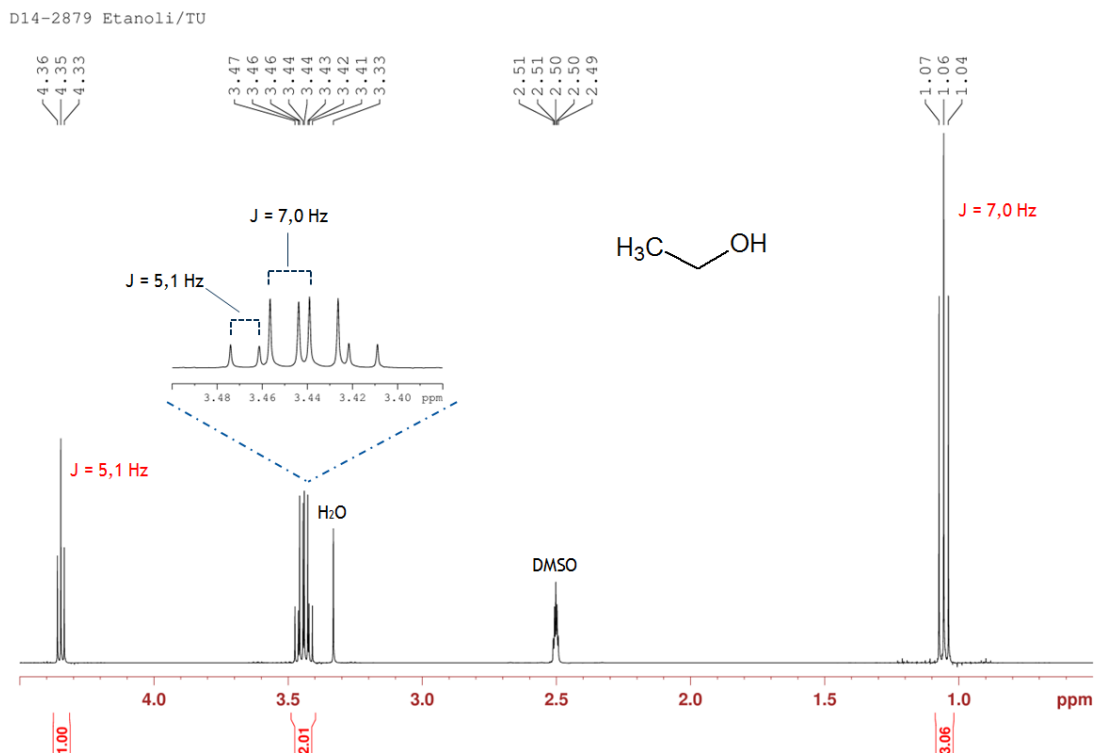
Kuva 10. Karplus-käyrä [11 mukailen].

Karplus-käyrä on piirretty kaavan 2 mukaan.

$${}^3J_{H,H} = A + B * \cos\phi + C * \cos2\phi \quad (2)$$

jossa $A = 4,5$; $B = -0,5$ ja $C = 4,22$ [11].

Kuvassa 11 nähdään etanolin ${}^1\text{H}$ NMR -spektri, josta voidaan havaita kahden erisuuruisen kytkennän aiheuttama monimutkaisempi multipletti. Metyyliryhmän kolmen protonin signaali nähdään kemiallisen siirtymän arvolla 1,06 ppm naapurina olevan CH_2 -ryhmän protonien vaikutuksesta. CH_3 - ja CH_2 -ryhmien välisen kytkennän voimakkuus on 7,0 Hz. Etanolin hydroksyyli ryhmän (OH) signaali havaitaan siirtymäarvolla 4,35 ppm. OH-ryhmä on kytkeytynyt CH_2 -ryhmän protonien kanssa, jolloin signaali on tripletti. CH_2 -ryhmällä on kaksi erilaista kytkentää. CH_2 -ryhmän protonit ovat kytkeytyneet CH_3 -ryhmän protoneihin kytkentävakiolla 7,0 Hz. Lisäksi CH_2 -ryhmä kytkeytyy OH-ryhmän protoniin kytkentävakiolla 5,1 Hz. Kahdella eri voimakkuudella kytkeytyneiden CH_2 -ryhmän protonien signaali jakautuu monimutkaiseksi multipletiksi, dubletinkvartetiksi (dq), joka nähdään siirtymäarvolla 3,44 ppm.



Kuva 11. Etanolin ${}^1\text{H}$ NMR -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Edellä käsiteltiin yksinkertaista symmetristä spin-spin-kytkentämallia, jossa kemiallisesti ekvivalenteilla ytimillä on sama kytkentävakio mihin tahansa muuhun ytimeen. Jos toisiinsa kytkeytyneiden protonien lähiympäristöt ovat erilaisia, protoniparin sanotaan olevan magneettisesti ei-ekvivalentti. Yleensä tällöin tuloksena on korkeamman kertaluvun spektri, jossa havaitaan monimutkaisia hienorakenteita.

2.6 NMR-näyte

NMR-mittaus voidaan tehdä kiinteästä näytteestä, luoksesta tai kaasusta. Opinnäytetyö keskittyy liuos-NMR -tekniikkaan ja molekyylien liuoskonformaatioiden tutkimiseen.

Mittausta varten näyte liuotetaan deuteroituun liuottimeen, jossa vetyatomit on korvattu deuteriumatomeilla (^2H -isotooppi). Deuteroitujen liuottimien käytöllä varmistetaan, että spektriin ei tule liuottimen resonanssista aiheutuvaa signaalia. Lisäksi spektrometri tarvitsee deuterium-signaalin lukittaakseen magneettikentän mittauksen aikana. Tyypillinen liuotin lipofiilisille orgaanisille yhdisteille on deuteroitu kloroformi (CDCl_3). Hydrofiilisille molekyylielle ideaalinen liuotin on D_2O . Molekyylielle, joilla on polaarisia ja poolittomia alueita, suositeltava liuotin on $\text{DMSO-}d_6$ ($\text{CD}_3\text{-SO-CD}_3$). [5.] Deuteroidut liuottimet ovat melko kalliita, joten näytteen liukoisuutta voidaan tutkia deuterioimattomilla liuottimilla. Näytteen tulee olla täysin liuenneena liuottimeen. Kiinteät partikkelit tulee poistaa ennen mittausta suodattamalla. Toisin kuin monissa muissa analyysimenetelmissä NMR-mittauksen jälkeen näyte saadaan takaisin sellaisenaan. Näyte valmistetaan lasiseen NMR-putkeen. Näyteputki puhdistetaan rasvasta ja muista epäpuhtauksista sopivalla paperilla ja liuottimella.

2.7 NMR-tekniikat

2.7.1 Yksi- ja kaksiulotteinen NMR-spektroskopia

Erilaisia NMR-tekniikoita on useita, ja niistä yleisimmät perustuvat yksi-, kaksi- tai kolmeulotteisiin (1D, 2D ja 3D) NMR-menetelmiin. Monimutkaisemmat menetelmät (4D, 5D...) vaativat vahvoja näytteitä sekä vaativat paljon mittausaikaa ja kovalevytilaa. Opinnäytetyössä keskitytään yksi- ja kaksiulotteisiin NMR-menetelmiin. 1D NMR -mittauksissa molekyylien rakenteita karakterisoidaan perinteisesti kemiallisten siirtymien ja kytkentävakioiden avulla. 2D NMR -mittauksissa ydinten magneettisia vuorovai-

kutuksia tutkitaan sekä ydinten rakenteellisen kytkeytymisen että avaruudellisen sijainnin kautta. 2D NMR -spektri on kaksiulotteinen spektri, jossa kaksi taajuusasteikkoa on muutettu kemiallisiksi siirtymiksi, kuten 1D-spektrissä. Kolmantena alhaalta päin tulevana akselina on intensiteetti. [5, s. 353.] Signaalit nähdään piikkien sijaan korrelaatiopisteinä, joiden sisällä olevat renkaat kuvaavat signaalin intensiteettiä [1, s. 117].

2.7.2 1D ^1H NMR -spektroskopia

^1H -ydin on yleisin havaittu ydin NMR-spektroskopiassa. Kaikesta vedystä lähes 100 % on ^1H -isotooppia, ja sitä löytyy useimmista orgaanisista molekyyleistä. Herkästi havaittava ^1H -ydin antaa yleensä terävät, selkeät signaalit, joiden tuloksena ^1H -spektri on informatiivinen huolimatta protonin kapeasta kemiallisen siirtymän alueesta (15 ppm). ^1H NMR -spektroskopian avulla voidaan identifioida ja kvantitoida yhdisteitä lyhyellä mittausajalla. Yksiulotteinen protonispektri, joka antaa rakenteellista tietoa funktionaalisten ryhmien kemiallisten siirtymien ja kytkentävakioiden kautta, on ensiaskel useimmille rakennemäärityksille. Protonispektristä nähdään atomien kemiallisten siirtymien (horisontaalinen akseli) lisäksi signaalien intensiteetit (vertikaalinen akseli) ja pinta-alat, jotka antavat tietoa samanlaisten ytimien lukumääristä näytteessä. Signaalin hienorakenteesta saadaan tietoa naapuriatomeista. Lisäksi ^1H NMR -spektrin signaalien leveydestä voidaan päätellä molekyylissä mahdollisesti olevien vaihtuvien protonien (-OH, -NH) signaalien kemialliset siirtymät. ^1H NMR -spektrissä näytteestä tulevia signaaleja verrataan liuottimeen lisättyyn sisäiseen standardiin, tetrametyylisilaaniin (TMS), jonka tuottama signaali on spektrin nollakohdassa.

2.7.3 1D ^{13}C NMR -spektroskopia

Toinen tärkeä NMR-spektroskopialla mitattava ydin on ^{13}C -isotooppi, joka on kaikkien orgaanisten molekyyliden rakennuspalikka. ^{13}C NMR -mittauksen avulla voidaan karakterisoida molekyylin hiilirunkoa. NMR-spektroskopia tarkastelee NMR-aktiivista ^{13}C -ydintä. ^{13}C -ytimellä on matala luontainen herkkyys ja sitä esiintyy luonnossa vain 1,1 % [5, s. 135]. Tämän vuoksi suoraa ^{13}C - ^{13}C -kytkentää ei pystytä suoraan osoittamaan, vaan ^{13}C -mittaus tapahtuu ns. protonien irtikytkennän avulla. Jokainen hiili voi olla kytkeytyneenä protoneihin yhden, kahden tai kolmen sidoksen yli, minkä tuloksena saadaan monimutkainen multiplettejä sisältävä ^{13}C NMR -spektri. Tämän vuoksi spektriä mitattaessa näytettä pulssitetaan koko taajuusalueella, jolla protonit resonovat. Tällöin

protonit vaihtavat paikkaa nopeasti useita kertoja mittauksen aikana. Jokainen hiiliatomi näkee vain lähellä olevien protonien keskimääräisen paikan, minkä vuoksi signaali ei jakaudu, vaan antaa yhden ”terävän” piikin. Tätä mittauksessa tapahtuvaa ilmiötä kutsutaan protonien irtikytkennäksi. [6, s. 77.] ^{13}C NMR -spektrissä näkyvien signaalien lukumäärä on yleensä näytteessä olevien hiilten lukumäärä. ^{13}C -spektrin kemiallisen siirtymän alue on noin 0 - 200 ppm ja nollakohta määritetään tetrametyylisilaanin (TMS) avulla.

2.7.4 1D ^{15}N NMR -spektroskopia

Opinnäytetyössä käsiteltävinä olevien molekyylien kolmas mitattava ydin on ^{15}N -isotooppi. Luonnossa vain 0,37 % esiintyvän ^{15}N -ytimen mittaus on vaativaa, sillä se ei ole yhtä herkkä kuin ^1H - ja ^{13}C -isotoopit. Usein ^{15}N -ydin mitataan protonin kautta (2D NMR), jolloin mittauksessa hyödynnetään protonin hyvä herkkyys. ^{15}N NMR -spektrissä kemiallisen siirtymän alue on laaja (900 ppm). ^{15}N NMR -mittauksille ei ole olemassa yleisesti hyväksyttyä sisäistä standardia. Referenssiaineena ^{15}N NMR -mittauksissa suositellaan käytettävän nitrometaania (CH_3NO_2). Tällöin suurimmalla osalla yhdisteistä on negatiivinen siirtymäarvo. Muita ^{15}N NMR -spektroskopian ulkoisia standardeja ovat nestemäinen ammoniakki (NH_3), ammoniumnitraatti (NH_4NO_3) ja ammoniumkloridi (NH_4Cl). [8, s. 112.]

2.7.5 2D ^1H , ^1H -COSY

Yksinkertaisin 2D NMR -tekniikka on ^1H , ^1H -COSY, joka identifioi toisiinsa kytkeytyneet kahden tai kolmen (harvoin neljän) sidoksen päässä olevat spin-aktiiviset protoniytimet. COSY-mittauksen tuloksena on kaksiulotteinen spektri, jossa sekä vertikaalisella että horisontaalisella akselilla ovat protonien kemialliset siirtymät. Yksiulotteisten ^1H NMR -spektrien signaalit näkyvät 2D-spektrissä diagonaalina, jonka ylä- ja alapuolella symmetrisesti esiintyvät signaalit (*cross-peaks*) antavat spin-spin-kytkeytyneiden protonien kemialliset siirtymät koordinaatteina. [6, s.120.]

2.7.6 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

Heteroytimien korrelaatioita mittaavat spektroskooppiset tekniikat antavat tietoa erityyppisten ytimien välisistä kytkennöistä. 2D HSQC -tekniikalla havaitaan yhdellä si-

doksella erotetut heteroatomien ytimet. ^1H , ^{13}C HSQC -mittauksessa tutkitaan protoni- ja hiiliytimien välisiä kytcentöjä. Spektrin vertikaalisella akselilla nähdään protonien kemialliset siirtymät ja horisontaalisella akselilla hiilten kemialliset siirtymät. Spektrissä havaitaan jokaista kytkeytynyttä paria kohden yksi signaali, jonka kaksi koordinaattia ovat kahden kytkeytyneen atomin kemialliset siirtymät. Protoniin kytkeytyvä heteroatomi voi olla ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si , ^{19}F tai ^{31}P [1, s. 132.]

2.7.7 2D ^1H , ^{13}C -HMBC

Heteroytimien kytcentöjä pitkän matkan yli havaitaan 2D HMBC -tekniikalla. ^1H , ^{13}C HMBC -mittauksella saadaan tietoa toisiinsa kytkeytyneistä ^1H - ja ^{13}C -ytimistä, joita eristää 2 - 4 kemiallista sidosta. ^{13}C -ytimen lisäksi protoniin korreloiva heteroatomi voi olla ^{15}N , ^{29}Si , ^{19}F tai ^{31}P .

2.7.8 2D ^1H , ^1H -NOESY

Fyysisesti toisiaan lähellä olevien samantyyppisten atomien välistä kytkeytymistä mitataan 2D NOESY -spektroskopia. NOESY-mittauksessa kahden protoniytimen välinen kytkeytyminen havaitaan avaruuden yli, mikä mahdollistaa molekyylin stereokemian tutkimisen. Kuten COSY-spektrissä diagonaalien ylä- ja alapuolella olevat signaalit (*cross peaks*) ovat korrelaatioita lähekkäin olevien protonien resonansseista. NOESY-spektrissä nähdään avaruudellisesti lähekkäin olevien ytimien korrelaatioiden signaalit, kun taas COSY-spektrissä korrelaatiot syntyvät sidosten välisistä kytkeytymisistä.

3 Toteutus

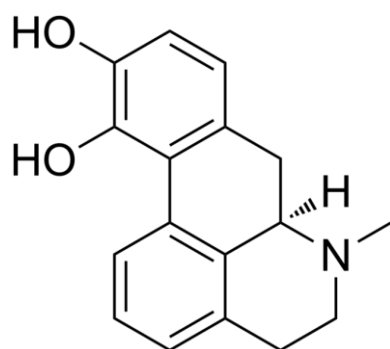
3.1 NMR-näytteen valmistus ja mittaus

Näyte valmistettiin pienessä lasisessa vialissa, josta se siirrettiin NMR-putkeen. Lääkeainetta punnittiin 1 mg ja lisättiin 40 μl sopivaa deuteroitua liuotinta. Näytettä sekoitettiin voimakkaasti homogeenisuuden varmistamiseksi. Sitä siirrettiin lasiseen NMR-putkeen. Näyteputki puhdistettiin etanolilla rasvan ja muiden epäpuhtauksien poistamiseksi. NMR-aineiston keräykseen käytettiin Bruker Avance III 600 MHz NMR -

laitteistoa, jossa oli jäädytetty probe (cryoprobe) hyvän detektointiherkkyyden saavuttamiseksi. Laitteistossa oli 1,7 mm mikrokapillaarinäyteyksikkö (TCI-probe). Probessa ja näytekarusellissa näytteen lämpötila oli valmiiksi määritetty (27 °C) mutta sitä voitiin muuttaa tarvittaessa.

3.2 Apomorfiinin NMR-spektrien tulkinta

Esimerkkilääkeaineena käytettiin apomorfiinia, joka on dopamiinin lailla vaikuttava morfiinin johdannainen. Sitä käytetään Parkinsonin taudin hoidossa, impotenssin hoidossa ja oksennusaineena. [12.] Kuvassa 12 on nähtävillä apomorfiinin rakenne.



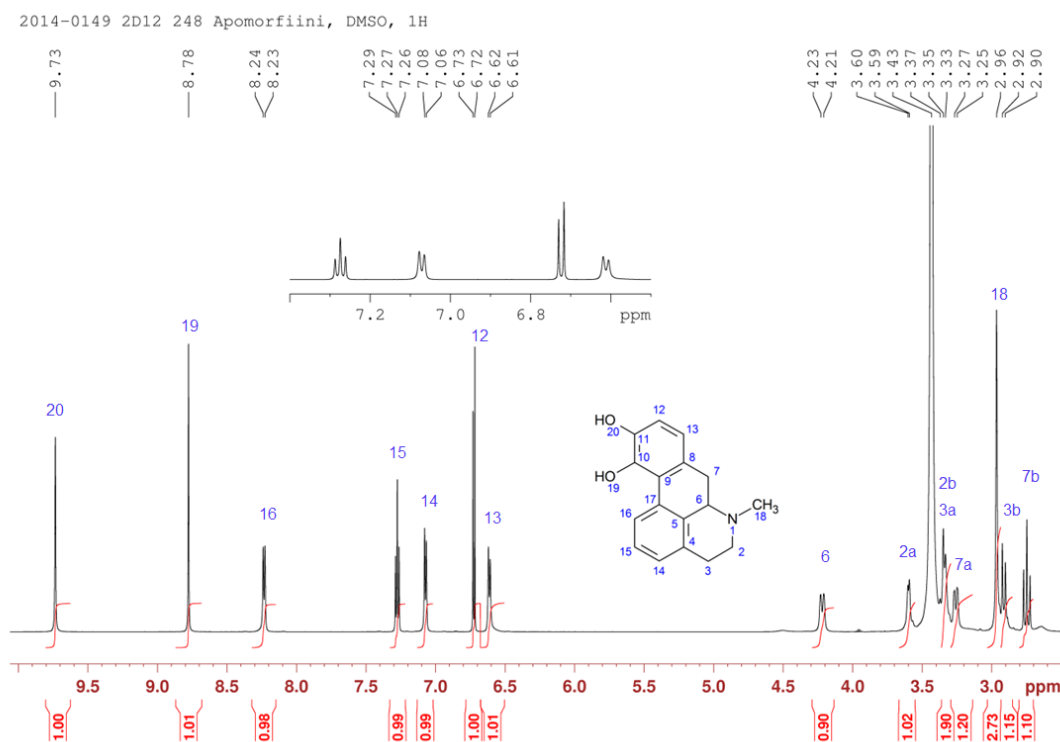
Kuva 12. Apomorfiinin kemiallinen rakenne.

Spektrien tulkintaa läpikäydään apomorfiinista mitattujen spektrien avulla. Apomorfiinista mitattiin ¹H-, ¹³C-, COSY-, HSQC-, ¹³C HMBC-, ¹⁵N HMBC- sekä NOESY-spektrit, kuten opetusjoukkojen lääkeainemolekyyleistä. Näyte ajettiin DMSO:ssa 27 °C:ssa. Spektrien avulla apomorfiinille tehtiin täydellinen rakennemääritys, kuten jokaiselle opetusjoukon molekyylille. Lisäksi apomorfiinille tehtiin autoverifiointi molemmilla käytössä olevilla autoverifiointiohjelmistoilla, jotka esitellään kappaleessa 4.

3.2.1 ¹H

Apomorfiinin ¹H NMR -spektri nähdään kuvassa 13. Protonispektrin karakterisoinnissa apuna käytettiin 2D-spektrejä. Molekyylissä olevien protoneiden kemialliset siirtymät voivat olla hyvin lähellä toisiaan, eikä protonien signaalien paikkaa spektrissä pystytä osoittamaan pelkän ¹H NMR -spektrin avulla.

Molekyylin protonit on numeroitu yhdestä kahteenkymmeneen (1 - 20). Spektrissä signaalit on numeroitu molekyylin protoneja vastaavilla numeroilla. Apomorfiinissa olevien protonien signaalit tulevat kemiallisen siirtymän alueelle 2,5 - 10 ppm. Pienimmät ja suurimmat siirtymäarvot on jätetty spektristä pois, jotta molekyylin protonien signaalit näkyvät selkeästi. Liuottimesta (DMSO) aiheutuvaa signaalia, joka tulee kemialliselle siirtymäarvolle ~ 2,5 ppm, ei nähdä spektrissä. Liuotimessa olevasta vedestä aiheutuu suuri signaali siirtymäarvolle 3,4 ppm.



Kuva 13. Apomorfiinin ^1H NMR -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Verrataan spektrin signaalien kemiallisia siirtymiä kuvan 4 tyypillisiin funktionaalisten ryhmien kemiallisiin siirtymiin. Signaalit kemiallisen siirtymän alueella 2,7 - 3,7 ppm on alueella, jolla typen naapureina olevien CH-ryhmien protoneiden odotetaan olevan. Aloitetaan apomorfiinin ainoasta metyyliryhmästä (CH_3). Signaalin 18 integraali, joka nähdään punaisena lukuarvona signaalin alapuolella, on saanut arvon 2,7. Integaraaliarvo on lähellä arvoa 3, joka kertoo samanlaisten protonien lukumäärän. Tällöin saadaan osoitettua apomorfiinissa olevan CH_3 -ryhmän protoneiden paikka spektrissä. Apomorfiinissa olevien kolmen CH_2 -ryhmän (2, 3 ja 7) protoneiden signaalit esiintyvät niille ominaisella kemiallisen siirtymän alueella, joka on noin 2,6 - 3,7 ppm. CH_2 -ryhmien lähellä sijaitsevat aromaattiset renkaat sekä typpi aiheuttavat signaalien jakau-

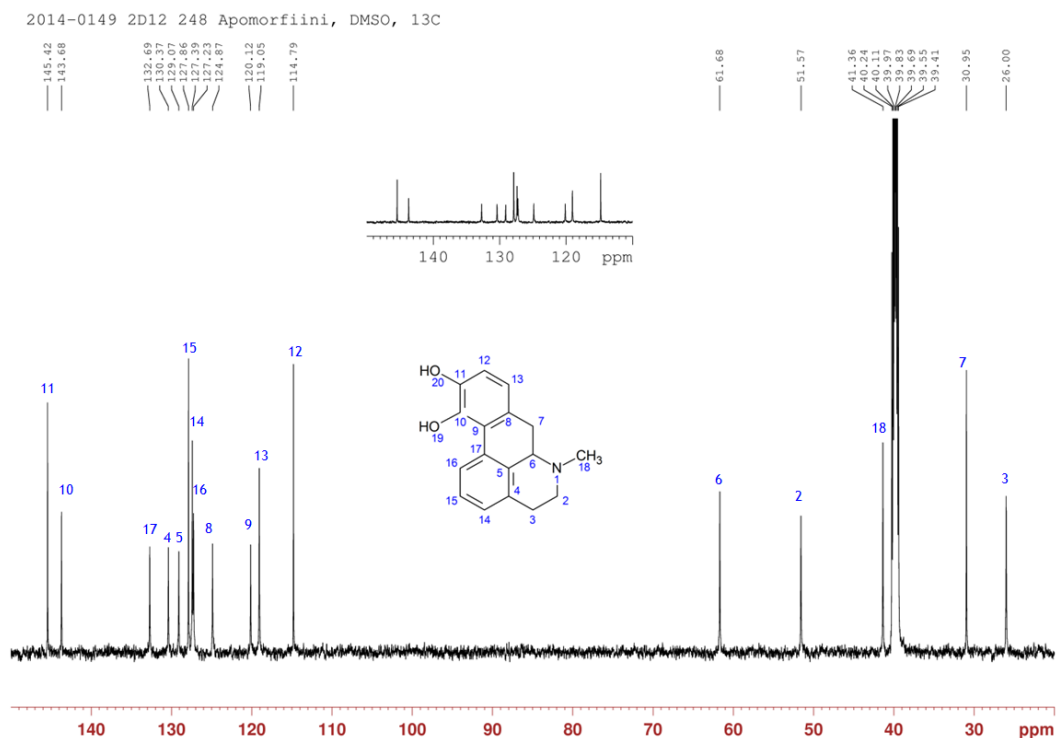
tumisen hieman tyypillisiä siirtymiä korkeammille siirtymäalueille (vasemmalle). CH₂-ryhmien molempien protonien signaalien integraaliarvot ovat lähellä arvoa 1, lukuunottamatta protoneja 2b ja 3a, joiden signaalien kemialliset siirtymät ovat lähes samat. Signaalit 2b ja 3a on integroitu yhdessä, jolloin integraaliarvoksi tulee noin 2.

Apomorfiinissa on yksi CH-ryhmä, joka on merkitty molekyyliin numerolla 6. CH-ryhmän protoni nähdään spektrissä aromaattisten renkaiden ja typpiatomien vaikutuksista hieman tavallista suuremmalla siirtymäarvolla, joka on noin 4,2 ppm. Aromaattisista renkaista peräisin olevien protoneiden signaalit tulevat siirtymäalueelle 6,5 - 8,5 ppm.

Spektrissä näkyvästä suurennoksesta näemme signaalien hienorakenteet. Protoneilla 12, 13 ja 14 ja 16 on kolmen sidoksen päässä yhdet kemiallisesti ei-ekvivalentit protonit naapuriatomeina, jolloin signaalit ovat muodoltaan dubletteja. Protonin 15 signaali on muodoltaan tripletti ollessaan kahden kemiallisesti ei-ekvivalentin naapuriprotonin välissä. Jokaisen aromaattisessa renkaassa olevan protonisignaalin integraaliarvo on noin yksi. OH-ryhmien protoneiden signaalit nähdään siirtymäarvoilla 8,78 ppm ja 9,73 ppm.

3.2.2 ¹³C

Hiilispektrissä, joka nähdään kuvassa 14, on ainoastaan siglettejä ¹³C NMR -mittauksessa tapahtuvan protonien irtikytkennän seurauksena. Numeroidut signaalit vastaavat molekyylin numeroituja ¹³C-signaaleja.



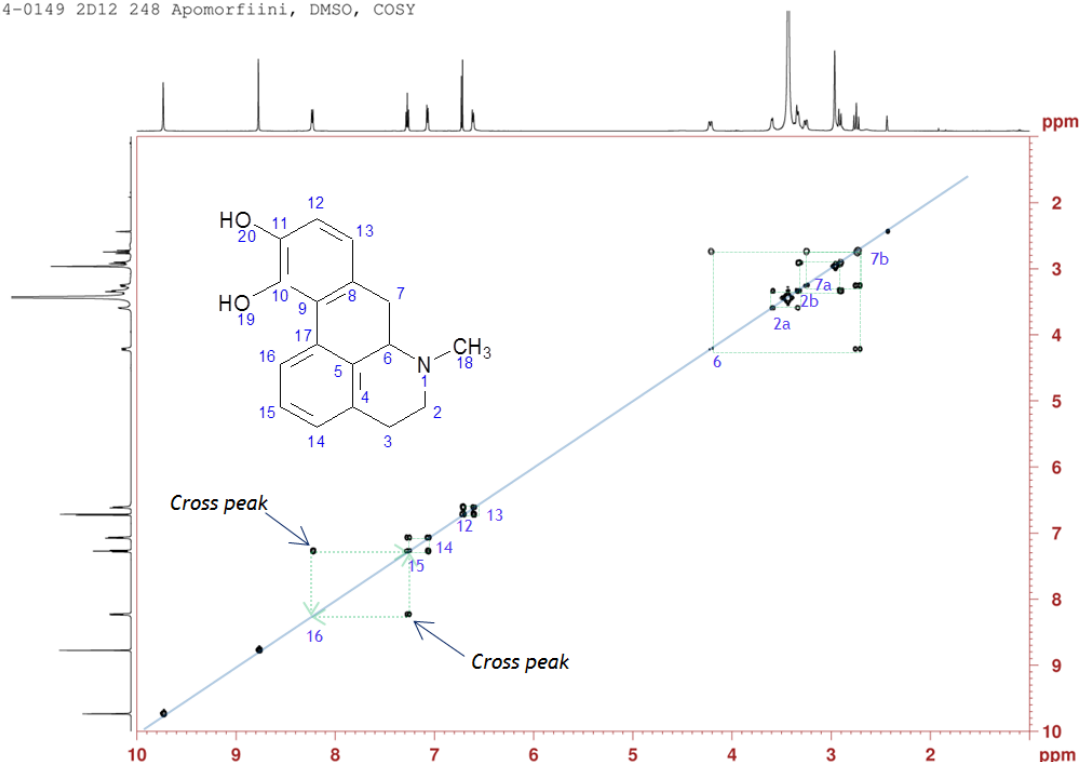
Kuva 14. Apomorfiinin ^{13}C NMR -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Hienorakenteen puuttuessa pelkkää hiilispektriä on vaikea tulkita. ^{13}C -ytimen naapuriatomit vaikuttavat kemialliseen siirtymään, jolloin tietyntyyppiset ^{13}C -ytimet antavat signaalin tyypilliselle siirtymäalueelle. Oikeaa molekyyliä rakennetta varmistaessa voidaan hiilispektristä laskea ^{13}C -ydinten lukumäärä. Hiilispektrin pienet signaalit voivat kuitenkin olla vaikeasti havaittavissa, jolloin spektrissä nähtävien signaalien lukumäärä ei vastaa molekyyliä olevien hiiliatomien lukumäärää. Apomorfiinissa ^{13}C -ytimiä on 17 kpl, joka vastaa spektrissä olevien signaalien lukumäärää. Kemiallisella siirtymäarvoalueella 39,4 - 40,2 ppm havaitaan liuotimessa olevan veden signaali. Tarkkaan ^{13}C -ydinten määrittämiseen käytetään apuna 2D-spektrejä.

3.2.3 ^1H , ^1H -COSY

Tietoa kahden tai kolmen sidoksen yli kytkeytyvistä protoneista saadaan ^1H , ^1H COSY -mittauksella. Apomorfiinista ajettu COSY-spektri on kuvassa 15.

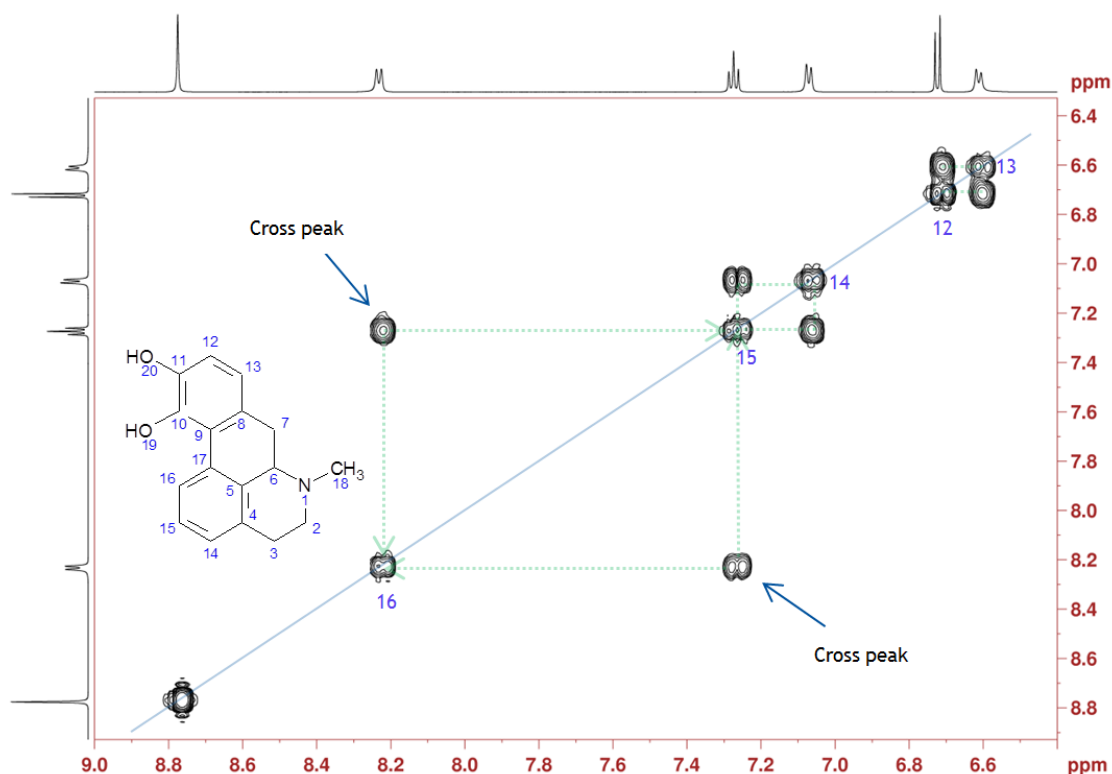
2014-0149 2D12 248 Apomorfiini, DMSO, COSY



Kuva 15. Apomorfiinin 2D COSY -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Diagonaalien signaalit vastaavat yhdisteen protonien signaaleja. Helppo tapa määrittää kytkeytyvät protonit on etsiä kaksi signaalia (*cross peak*), joiden ylä- ja alapuolella sekä vasemmalla ja oikealla puolella olevat signaalit ovat diagonaalissa. Ytimet, jotka edustavat näitä diagonaalipiikkejä, ovat kytkeytyneinä toisiinsa. Kuvassa 16 nähdään apomorfiinin COSY-spektrin suurennos, jossa voidaan havaita aromaattiset korrelaatiot.

2014-0149 2D12 248 Apomorfiini, DMSO, COSY



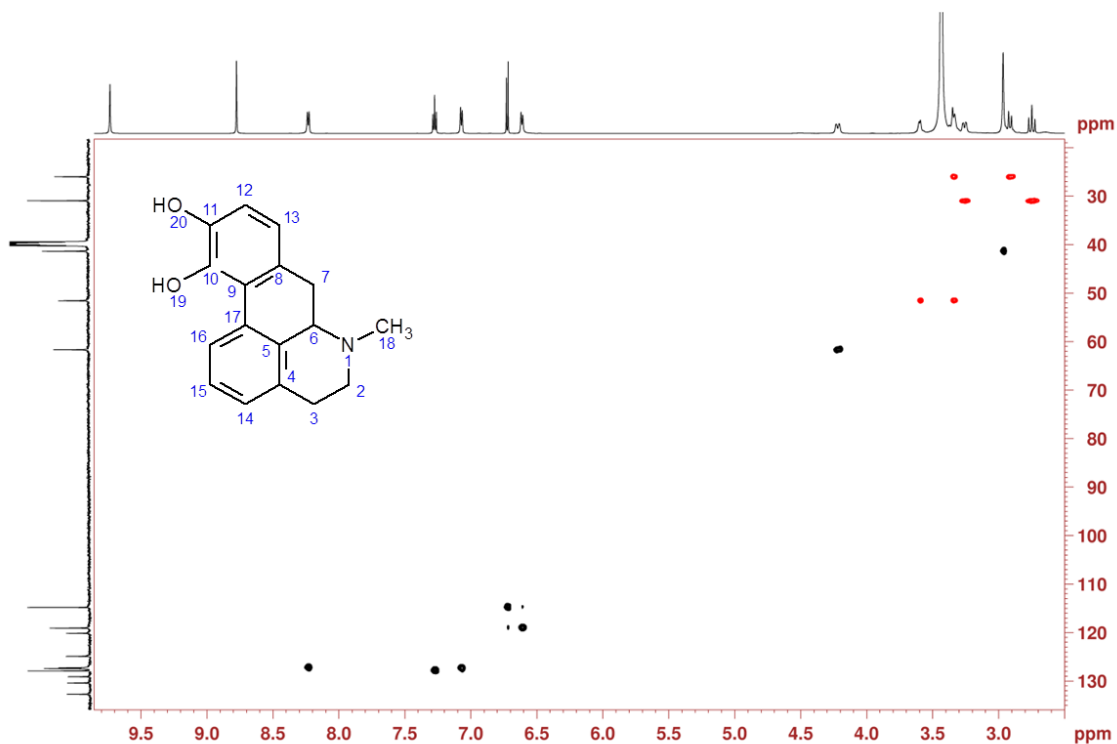
Kuva 16. Apomorfiinin suurennettu 2D COSY -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Diagonaalien signaaleilla numeroilla 15 ja 16 on yhteinen korrelaatio (*cross peak*), jolloin protonit 15 ja 16 korreloivat keskenään kolmen sidoksen yli. Spektristä huomataan, että aromaattiset protonit 14 ja 15 sekä 12 ja 13 ovat kytkeytyneinä toisiinsa kolmen sidoksen yli. Kuvassa 15 nähtävistä alifaattisista protoneista ytimien 6 ja 7b välillä nähdään korrelaatio. Kahden sidoksen yli tapahtuneet kytkennät nähdään protonien 2a ja 2b sekä 7a ja 7b välillä.

3.2.4 ¹H, ¹³C -HSQC

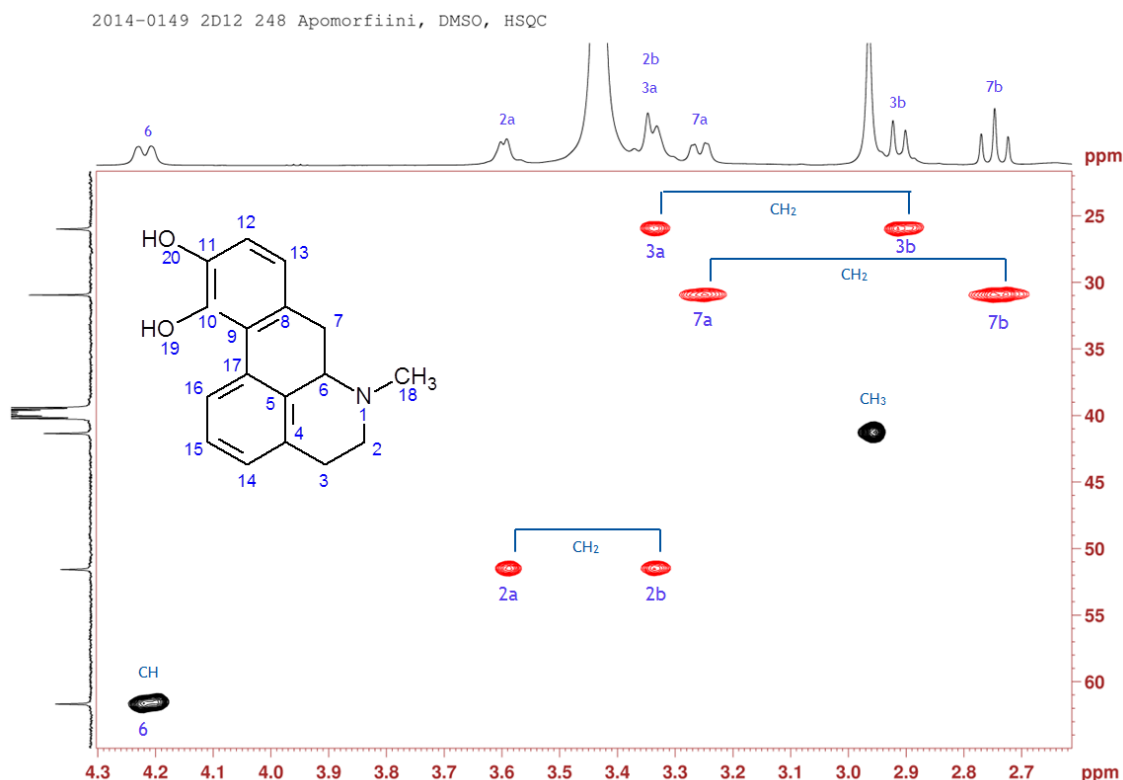
Protonoidut ¹³C-ytimet voidaan osoittaa ¹H, ¹³C -HSQC -mittauksen avulla. Kuvassa 17 nähdään apomorfiinin HSQC -spektri.

2014-0149 2D12 248 Apomorfiini, DMSO, HSQC



Kuva 17. Apomorfiinin 2D HSQC -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

^1H , ^{13}C -HSQC -mittauksen avulla voidaan yhdistää protonit ja hiilet, jotka ovat yhdellä sidoksella kiinni toisissaan. Apomorfiinista ajettiin editoitu HSQC, jossa CH_2 -ryhmien signaalit ovat negatiivisia ja näkyvät punaisina signaaleina. CH - ja CH_3 -ryhmien signaalit ovat positiivisia, ja ne havaitaan mustina signaaleina. Kuvassa 18 on esitetty apomorfiinin suurennettu HSQC-spektri, josta nähdään tarkasti alifaattisten atomeiden korrelaatiot.

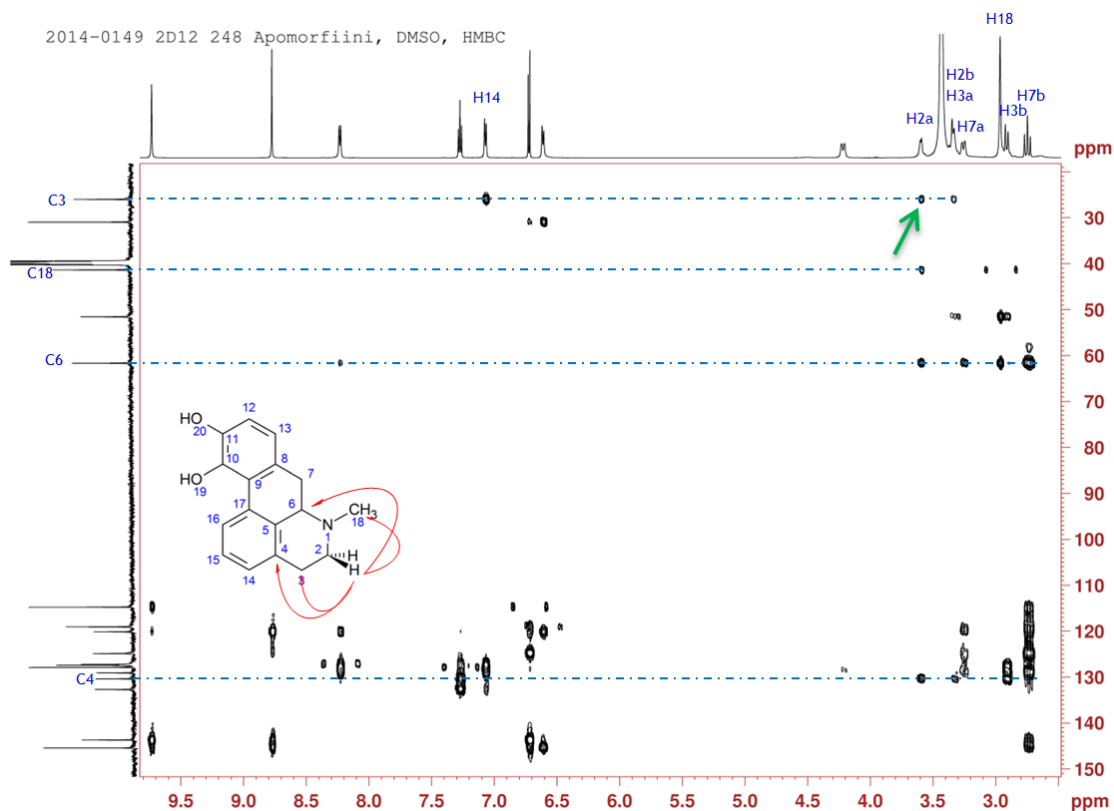


Kuva 18. Apomorfiinin suurennettu HSQC-spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Atomeiden 2, 3 ja 7 signaalit nähdään punaisina, mikä kertoo signaalien kuuluvan CH_2 -ryhmille. Spektristä nähdään, että hiilisignaali kemiallisen siirtymän arvolla 26,00 ppm on kytkeytyneenä protoneihin 3a ja 3b. Hiilisignaali siirtymäarvolla 30,95 ppm korreloi yhden sidoksen päähän protoneihin 7a ja 7b. Protonit 2a ja 2b ovat sitoutuneena hiileen, jonka kemiallinen siirtymä on 51,57 ppm. CH_3 -ryhmän hiilen signaali nähdään kemiallisella siirtymällä 41,36 ppm, ja molekyylin kiraliakeskuksen (6) hiilen kemiallinen siirtymä on 61,68 ppm.

3.2.5 ^1H , ^{13}C -HMBC

^1H , ^{13}C -HMBC -spektristä saadaan tarkempaa tietoa lähellä olevista C-H-kytkennöistä (2 - 4 sidoksen yli). Apomorfiinin HMBC-spektri on esitetty kuvassa 19.



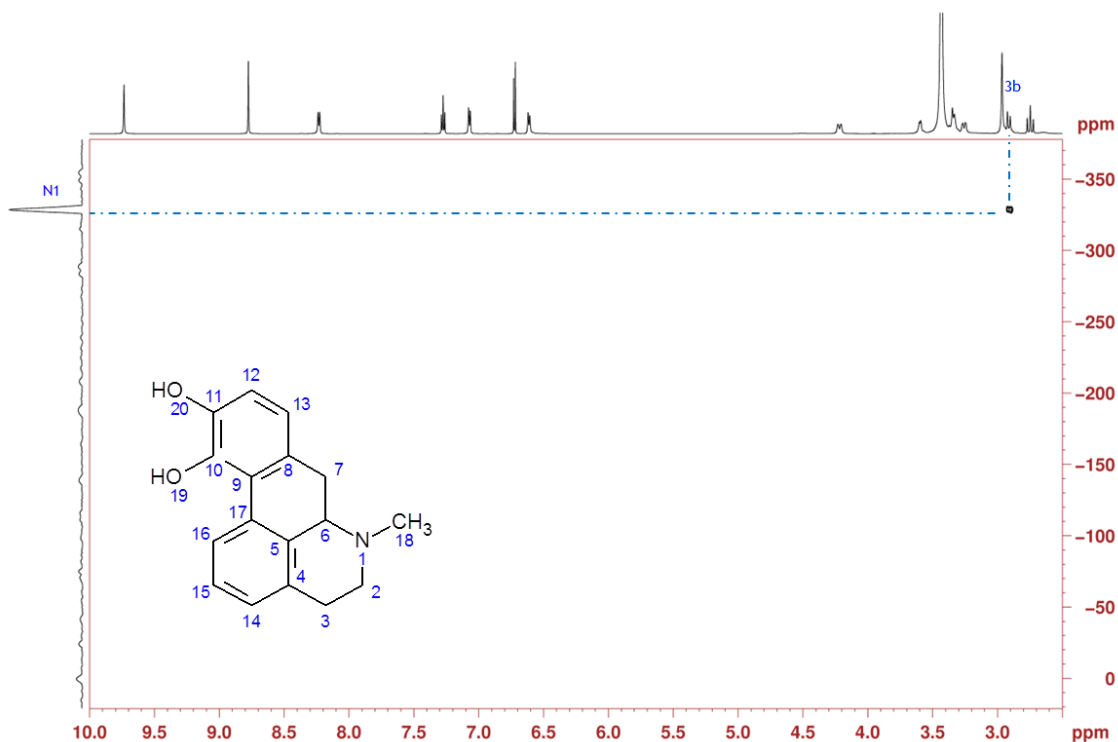
Kuva 19. Apomorfiinin HMBC-spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Toisiinsa kytkeytyneiden protonien ja hiilien havaitsemisessa voidaan käyttää apuna spektrissä näkyviä sinisiä katkoviivoja. Protonin 2a (H2a) korrelaatio kahden sidoksen yli hiileen 3 (C3) on merkitty spektriin vihreällä nuolella. Kolmen sidoksen päähän yltävät protonin 2a kytkennot ovat hiiliin 4, 6 ja 18. Vaikka vahvimmat korrelaatiot havaitaan toisistaan kolmen sidoksen päässä olevista atomien kytkennoistä, kahden ja kolmen sidoksen yli kytkeytyvien ytimien signaalit näyttävät olevan intensiteetiltään yhtä vahvoja. Protonin 2a kytkennot on merkitty punaisilla nuolilla apomorfiinin rakenteeseen. Muut spektrissä havaittavat hiilen 3 korrelaatiot ovat peräisin kytkennoistä protonihin 2b ja 14. Protonin 2a lisäksi protonista 3b nähdään korrelaatio hiileen 4. Hiileen 6 kytkeytyvät protonin 2a lisäksi protonit 7a ja b sekä protoni 18.

3.2.6 ^1H , ^{15}N -HMBC

Typeä sisältävien yhdisteiden rakennetta tutkitaan usein myös ^1H , ^{15}N -HMBC -mittauksella. Apomorfiinin ^{15}N HMBC -spektri nähdään kuvassa 20.

2014-0149 2D12 248 Apomorfiini, DMSO, 15N HMBC

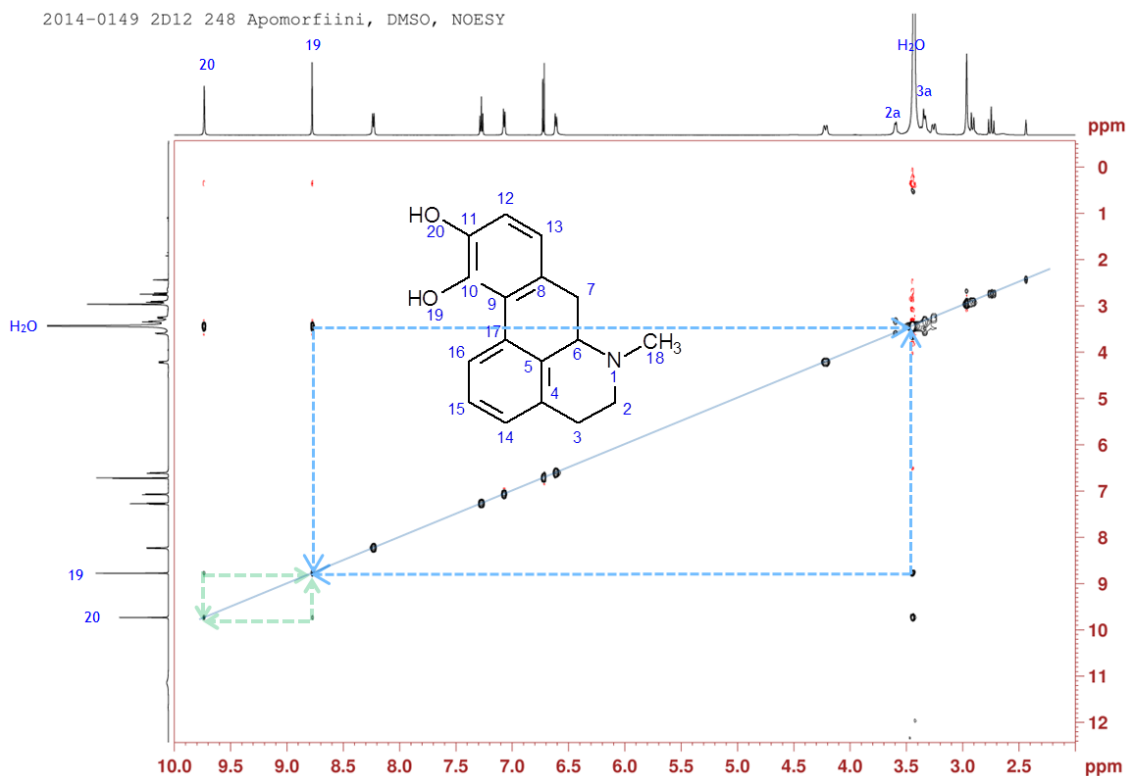


Kuva 20. Apomorfiinin ^{15}N HMBC -spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Vahvin N-H-korrelaatio syntyy kolmen sidoksen yli kytkeytyneistä atomeista. Apomorfiinissa tyyppi on kolmen sidoksen päässä protoneista 3a ja 3b sekä 7a ja 7b. Koska sidoskulmat vaikuttavat kolmen sidoksen päässä oleviin kytkentöihin, tyyppi ei kytkeydy yhtä voimakkaasti jokaiseen kolmen sidoksen päässä olevaan protoniin. Spektrissä nähdään korrelaatio tyypeen vain protonista 3b.

3.2.7 ^1H , ^1H -NOESY

^1H , ^1H -NOESY -mittaus antaa tietoa molekyylin stereokemiasta ja konformaatiosta. NOESY-spektrissä nähdään korrelaatioita avaruudellisesti lähellä olevista protoneista. Kuvassa 21 on apomorfiinista ajettu NOESY-spektri.



Kuva 21. Apomorfiinin NOESY-spektri. Mitattu DMSO:ssa 27 °C:ssa.

Spektrissä nähdään heikko korrelaatio OH-ryhmien protonien 19 ja 20 välillä. Hydroksyyliyhdyntien protonit vaihtuvat veden protonien kanssa, jolloin protonit 19 ja 20 korreloivat veden (H_2O) protonien kanssa. Spektristä voidaan havaita myös korrelaatio protonien 2a ja 3a välillä.

4 Tietokantojen luominen

4.1 Automaattiset verifiointiohjelmistot

Monimutkaisten uusien molekyylien rakenteiden määrittäminen on työlästä ja haastavaa. Tutkijoiden työtaakan vähentämiseksi on kehitetty tietokoneavusteisia automaattisia rakenneverifiointiohjelmistoja. Automaattisten verifiointiohjelmistot vertaavat mitattuja spektrejä ja ehdotettua molekyyliä oman tietokantansa molekyyliin ja antavat tuloksen molekyyliä rakenteiden yhteensopivuudesta. Ohjelmistot hyödyntävät kemiallisia siirtymiä, integraaliarvoja ja 2D-korrelaatioita sopivan molekyyliä rakenteen ennus-

tamisessa. Ne keräävät automaattisesti tarvitsemansa spektrit ja molekyyliarakenteet määrätystä kansiosta, ja verifiointi tapahtuu täysin automaattisesti. Molekyylien rakennemäärityksen luotettavuuden varmistamiseksi verifiointiohjelmat hyödyntävät useampia spektrejä, yleensä ^1H -spektriä ja HSQC-spektriä. Epäpuhtaudet ja liuotinjäämät sekä vaihtuvat protonit (O-H, N-H) ja pH:n vaikutukset asettavat rajoituksia yhdisteen vertailussa ennustettuun protonispektriin. Hiilen kemialliset siirtymät ovat helpommin ennustettavissa kuin protonin siirtymät, koska ne ovat vähemmän riippuvaisia liuottimesta, lämpötilasta ja pH:sta kuin protonin siirtymät. [13.] Opinnäytetyössä tehdyissä automaattisissa verifiointeissa pyrittiin hyödyntämään eri ohjelmistojen vahvuuksia. Tavoitteena oli luoda opetustietokannat kahteen ohjelmistoon, jotka olivat ACD/Spectrus Processor sekä Perch NMR Software.

4.1.1 ACD/Spectrus Processor

Kemian ohjelmistoyrityksen ACD/Labsin kehittämä ACD/Spectrus Processor sisältää NMR-autoverifiointityökalun, joka on suunniteltu tehostamaan lääkeaineiden tutkimusta ja tuotekehitystä [14]. Ohjelmisto voi hyödyntää pelkkää ^1H -spektriä tai usean spektrin yhdistelmiä ($^1\text{H} + \text{COSY}$, $^1\text{H} + ^{13}\text{C}$, $^1\text{H} + \text{HSQC}$ jne.). Se hyödyntää molekyylien rakennemäärityksessä molekyylin kemiallisia siirtymiä ja integraaliarvoja. Ohjelmisto ei hyödynnä verifiointissa kytkentävakioita eikä molekyylin rakenteen kolmiulotteisuutta, mikä vuoksi protonien kemiallisten siirtymien ennustettavuus on heikko. Ohjelmiston vahvuutena voidaan pitää tarkkaa ^{13}C -siirtymien ennustettavuutta. Se hyödyntää ^1H -spektrin lisäksi 2D HSQC-spektriä, mikä lisää verifiointin luotettavuutta. Saatavilla olevat lisätoiminnot tekevät molekyylien rakennemäärityksestä helpompaa ja tehokkaampaa. Lisätoiminto, jota käytettiin tukena opetusjoukon rakenneanalyysissä, oli *NMR-predictor*, joka ennustaa annetun molekyyliarakenteen kemialliset siirtymät.

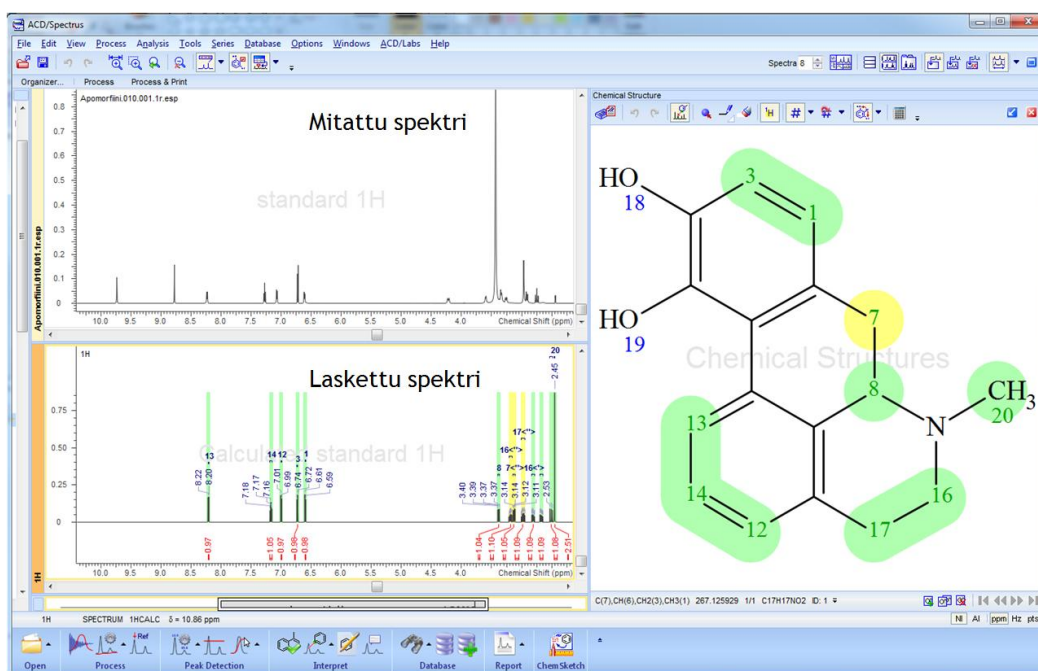
Tulosten havainnollistamiseksi ACD/Spectrus Processor -verifiointiohjelmisto käyttää värikoodeja mitattujen siirtymien ja molekyylin rakenteen sekä ohjelmiston laskemien siirtymien yhteensopivuudesta. Luotettavasta siirtymästä kertoo vihreä väri, jolloin ohjelmiston laskennalliset kemialliset siirtymät vastaavat mitattuja siirtymiä. Keltainen väri kertoo epämääräisestä tuloksesta, jolloin molekyyli kaipaa syvempää tarkastelua. Punaisella värillä merkitty siirtymä ei ole läpäissyt verifiointia, jolloin lisätutkimus on tarpeen. Värit määräytyvät mitatun spektrin ja lasketun spektrin kemiallisten siirtymäarvojen eroavaisuuksien mukaan. Taulukossa 1 on esitetty mitattujen ja ohjelmiston laske-

mien ^1H -, ^{13}C - ja ^{15}N -ytimien kemiallisten siirtymien erojen raja-arvot, joiden perusteella värit määräytyvät.

Taulukko 1. Värit määräytyvät kemiallisten siirtymäarvojen erotusten mukaan.

Ydin	Hyvä	Epämääräinen	Huono
^1H	<0,3 ppm	0,3 – 0,9 ppm	>0,9 ppm
^{13}C	<3 ppm	3,8 – 15,2 ppm	>15 ppm
^{15}N	<7ppm	7 – 30 ppm	>30 ppm

Kuvassa 22 nähdään apomorfiinista tehty automaattinen verifiointi. Ohjelma on verrannut kuvassa vasemmalla yläalaidassa nähtävää mitattua spektriä rakenteen perusteella laskemaansa spektriin, joka nähdään kuvassa vasemmalla alalaidassa. Kemiallisten siirtymien yhteensopivuutta ohjelma havainnollistaa lasketun spektrin signaaleissa ja rakenteessa nähtävillä olevilla vihreillä ja keltaisilla väreillä.

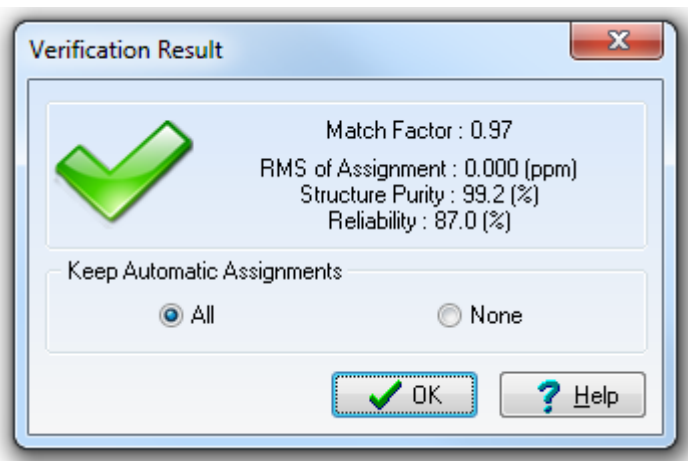


Kuva 22. Apomorfiinin ^1H -verifiointi ACD/Spectrus Processorin autoverifiointiohjelmalla.

Apomorfiinin aromaattisten protonien 1, 3 ja 12 - 14 kemialliset siirtymät vastaavat 0,3 ppm:n tarkkuudella ohjelmiston ennustamia tuloksia. Apomorfinissa on kaksi CH_2 -ryhmää (16 ja 17), joissa toisen protonin kemiallinen siirtymä vastaa 0,3 ppm:n tark-

kuudella ohjelmiston ennustamaa siirtymää. CH₂-ryhmän toisen protonin signaali vastaa verifiointiohjelman ennustamaa signaalia 0,3 - 0,9 ppm:n tarkkuudella. Rakenteessa protonit nähdään vihreänä. Lasketusta spektristä kuitenkin havaitaan, että ryhmien toisten protonien signaalit ovat saaneet keltaisen värin. Protoneiden 7 kemiallinen siirtymä vastaa verifiointiohjelman ennustamia tuloksia 0,3 - 0,9 ppm:n tarkkuudella. Vaikka kiraliakeskusten protoneiden kemiallisten siirtymien ennustaminen on haastavaa, apomorfiinissa olevan kiraliakeskuksen protonin (8) siirtymän ohjelma on verifioinut hyvin. OH-ryhmien protoneiden kemiallisia siirtymiä verifiointiohjelma ei ole huomionnut, sillä vaihtuvien protonien vuoksi hydroksyyliyhdyntien siirtymiä on erittäin vaikea ennustaa.

ACD/Spectrus Processorin NMR-verifiointiohjelma antaa kokonaistuloksen mitattujen ja laskettujen kemiallisten siirtymien sekä molekyylin rakenteen yhteensopivuudesta lukuarvona (*Match Factor*), joka on välillä 0 - 1. Apomorfiinin verifiointin tulostaulukko on nähtävillä kuvassa 23.



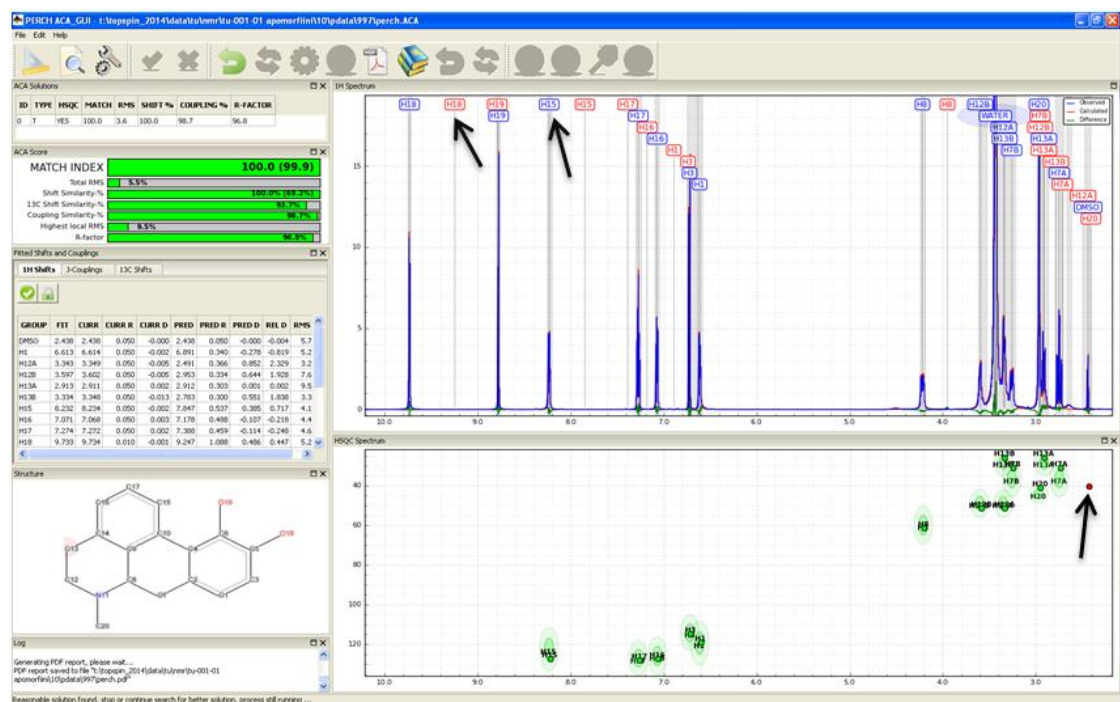
Kuva 23. ACD/Spectrus Processorin automaattisen verifiointin tulokset näkyvät tulostaulukossa.

Apomorfiinille tehdyn rakenneverifiointin tulos oli 0,97. Apomorfiinin ollessa tunnettu kaupallinen lääkeaine, ohjelma onnistui verifioimaan sen rakenteen hyvin. Lisäksi tulostaulukosta nähdään rakenteen puhtaus ja tulosten luotettavuus prosentteina (%).

4.1.2 Perch NMR Software

Bruker Biospinin PERCH Solutions Ltd -ohjelmistoyrityksen tarjoama Perch NMR Software on ^1H NMR -spektrien analyysiin tarkoitettu työkalu. Protonien kemiallisten siirtymien hyödyntämisen lisäksi Perch NMR -verifiointiohjelma optimoi molekyylin kolmiulotteisen rakenteen. Se antaa tietoa molekyylin stereokemiasta, konformaatiosta sekä kytkentävakioista. Ohjelma ennustaa luotettavasti protonien siirtymiä. Perch NMR -verifiointiohjelmiston heikkoutena on heikompi hiili siirtymien ennustettavuus kuin ACD/Spectrus Processor -ohjelmalla.

Kuten ACD/Spectrus Processor -verifiointiohjelma myös Perch NMR -ohjelmisto havainnollistaa tuloksia väreinä. Verifiointiohjelma antaa kokonaisarvion (*Match index*) mitattujen ja laskettujen kemiallisten siirtymien sekä rakenteen yhteensopivuudesta lukuarvona, joka on 0 - 100. Kuvassa 24 on nähtävillä Perch NMR -verifiointiohjelmalla tehty apomorfiinin rakennemääritys.



Kuva 24. Apomorfiinin automaattinen verifiointi Perch NMR Software -autoverifiointiohjelmalla.

Ohjelma on verrannut mitattuja ^1H -, ^{13}C - ja HSQC-spektrejä sekä rakennetta oman tietokantansa yhdisteiden rakenteisiin ja sen perusteella antanut yhteensopivuudesta tuloksen, joka on esitetty tulostaulukossa prosentteina vasemmassa yläkulmassa.

Apomorfiini on läpäissyt ohjelmiston tekemän verifiointin, mikä on havaittavissa tulostaulukon vihreästä väristä. Kokonaisarvion lisäksi tulostaulukosta nähdään sekä ^1H -että ^{13}C -ytimien mitattujen kemiallisten siirtymien ja laskettujen kemiallisten siirtymien samankaltaisuus prosentteina. Ohjelma vertaa myös mitatusta spektristä havaitsemiin kytkevävakioita rakenteen perusteella laskemiinsa kytkevävakioihin. Kuvassa vasemmalla keskellä näkyvässä taulukossa on nähtävillä yksityiskohtaista tietoa tuloksista. Taulukossa on lueteltu tarkat mitatut ja lasketut ^1H - ja ^{13}C -ytimien kemialliset siirtymäarvot sekä ohjelmiston havaitsemat ja rakenteen perusteella ennustetut kytkevävakiot. Kuvassa näkyvässä apomorfiinin ^1H NMR -spektrissä siniset signaalit ovat yhdisteen mitattuja kemiallisten siirtymien signaaleja ja punaiset signaalit ovat yhdisteelle ennustettuja laskennallisia kemiallisten siirtymien signaaleja. ^1H -spektrin alapuolella nähdään apomorfiinin HSQC-spektri. Punaisena signaalina nähtävä korrelaatio on ohjelman ennustama kytkevä, jota ohjelma ei ole havainnut mitatussa spektrissä. Signaali on mahdollisesti DMSO:sta aiheutuva korrelaatio.

4.2 Opetusjoukot

Tavoitteena oli luoda karakterisoiduista molekyyleistä opetustietokannat kahteen ohjelmistoon (ACD/Spectrus Processor ja Perch NMR Software). Opetusjoukot koostuivat erään alkuvaiheen lääkekehityksen tutkimusprojektin molekyylien rakenteista. Jokaisesta lääkeainemolekyylistä mitattiin ^1H -, ^{13}C -, COSY-, HSQC-, ^{13}C HMBC-, ^{15}N HMBC- ja NOESY-spektrit, joiden avulla molekyyleille tehtiin täydellinen rakennemääritys. ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston opetustietokantaan syötettiin yhdeksän karakterisoidun opetusmolekyylin tarkat ^1H -, ^{13}C - ja ^{15}N -ytimien kemialliset siirtymät. Tietokantaan syötettiin myös mahdollisesti tiedossa olevat kytkevävakiot. Perch NMR-ohjelmiston opetustietokannan molekyyliarakenteiden tarkkojen konformaatioiden ja stereokemioiden tuli olla tiedossa, mikä viivästytti tietokannan valmistumista. Opetustietokannan molekyyleiksi valittiin uudet rakenteet, joiden stereokemia oli tiedossa. Optimaalisten konformaatioiden mallitus aloitettiin ja verifiointityötä jatketaan.

5 Tietokantojen testaus

ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston ja Perch NMR -verifiointiohjelmiston automaattisia verifiointiohjelmiä ryhdyttiin testaamaan 12 yhdisteen testijoukolla, joka koostui sa-

man tutkimusprojektin molekyyleistä kuin opetusjoukko. Testijoukon molekyyleiksi valittiin rakenteita, joiden stereokemia oli tiedossa. Rakenteita, joiden absoluuttinen stereokemia tiedettiin tarkasti, oli vähän. Tämän vuoksi testijoukon koko oli pieni. Jokaisesta testijoukon molekyylistä ajettiin ^1H NMR -spektri sekä HSQC-spektri, jota ei ollut mitattu aikaisemmin. Lisäksi molekyyleistä mitattiin NOESY-spektrit konformaatioiden optimointia ja stereokemian varmistamista varten. Automaattisten verifiointiohjelmistojen testauksessa oli tarkoitus tutkia kahta eri ryhmää, jotka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Automaattisessa verifiointissa tutkittavat ryhmät.

Verifiointi	Ryhmä 1: HSQC-spektrin vaikutus	Ryhmä 2: Opetusjoukon vaikutus
1.	^1H NMR -verifiointi ilman opetusjoukkoa	^1H NMR -verifiointi ilman opetusjoukkoa
2.	Yhdistetty ^1H /HSQC-verifiointi ilman opetusjoukkoa	Yhdistetty ^1H /HSQC-verifiointi ilman opetusjoukkoa
3.	-	^1H NMR -verifiointi opetusjoukon kanssa
4.	-	Yhdistetty ^1H /HSQC-verifiointi opetusjoukon kanssa

Ensimmäisessä ryhmässä (ryhmä 1) testattiin HSQC-spektrin hyödyntämisen vaikutusta autoverifiointiin. Käytännössä testaus tapahtui tekemällä kaksi verifiointia ilman opetusjoukkoa. Ensimmäisessä verifiointissa hyödynnettiin pelkkää ^1H NMR -spektriä. Toisessa verifiointissa ohjelmisto hyödynsi sekä ^1H NMR -spektriä että HSQC-spektriä. Tulosten käsittelyssä verrattiin näistä kahdesta autoverifiointista saatuja aineistoja.

Toisen ryhmän (ryhmä 2) testauksessa tavoitteena oli tutkia opetusjoukon vaikutusta automaattiseen verifiointiin sekä ^1H NMR -verifiointissa että yhdistetyssä ^1H /HSQC-verifiointissa. Tulosten käsittelyssä oli tarkoitus verrata kahden ensimmäisen verifiointin tuloksia (verifiointit 1 ja 2) verifiointeihin, joissa käytettiin opetustietokantaa (verifiointit 3 ja 4).

6 Tulokset

6.1 Perch

Perch NMR -verifiointiohjelmiston opetustietokantojen teko osoittautui haastavaksi, eikä automaattisia verifiointeja ehditty tekemään opetustietokantojen läpi. Ongelmana oli tutkimusprojektin molekyyliarakenteiden konformaatioiden tasapaino. Jokaisella molekyyllillä oli paljon mahdollisia konformaatioita, jolloin ohjelmisto ei toiminut toivotulla tavalla. Konformaatioiden optimointia aloitettiin mutta opetustietokanta ei valmistunut oppinäytetyöhön. Myös testijoukon 12 molekyylin konformaatiot tuli tietää tarkasti Perch NMR -ohjelmiston verifiointia varten, joten HSQC-spektrin vaikutusta verifiointiin ilman opetusjoukkoa ei ehditty tutkia.

6.2 ACD/Spectrus Processor

Opetusjoukon vaikutusta ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston automaattiseen verifiointiin ei pystytty testaamaan opetustietokannan käyttöönotossa ilmentyvien ohjelmiston ongelmien vuoksi. Ohjelmisto oli osastolla uusi eikä molekyylien ja NMR-aineiston automaattiseen noutamiseen ja opetustietokannan käyttöönottoon tarvittavaa komentosarjaa ollut vielä saatavilla toimittajalta. Yhdistetyn $^1\text{H}/\text{HSQC}$ -verifioinnin vaikutusta ohjelmiston luotettavaan rakenneverifiointiin tutkittiin ilman opetustietokantaa.

Oikea molekyyli rakenne, joka syötettiin ACD/Spectrus processor -ohjelmistoon, ei aina saanut korkeinta Match Factor -arvoa. Pelkkää ^1H -spektriä hyödyntävässä verifiointissa molekyylin 3 rakenne pääsi sijalle 3 ja molekyylien 10 ja 11 rakenteet saivat sijan 2. Taulukosta 3 nähdään verifioitujen molekyylien Match Factor -arvot ja sijat, joille rakenteet pääsivät molemmissa verifiointeissa. Sarakkeen vihreä väri kertoo rakenteen läpäisseen verifiointin. Jos molekyylin Match Factor -arvo on liian alhainen tai rakenne ei ole päässyt ensimmäiselle sijalle, sarake on punainen.

Taulukko 3. 12 testimolekyylin rakenneverifioinnin tulokset.

Molekyyli	¹ H Match Factor	Sija	Yhdistetty ¹ H/HSQC Match Factor	Sija
1	0,12	1	0,13	1
2	0,24	1	0,87	1
3	0,29	3	0,27	1
4	0,93	1	0,89	1
5	0,47	1	0,23	1
6	0,26	1	0,25	1
7	0,92	1	0,88	1
8	0,91	1	0,22	1
9	0,13	1	0,13	1
10	0,73	2	0	1
11	0,89	2	0,88	1
12	0,91	1	0,94	1

Autoverifioinnin läpäisseen molekyylin Match Factor -arvon tuli olla yli 0,75 ja Match Factor -arvon tuli olla suurin arvo ohjelmiston ehdottamien muiden sopivien rakenteiden arvoista. Vaikka Match Factor -arvo oli joissain molekyyleissä yli 0,75, molekyylin ei katsottu läpäisevän verifiointia, jos Match Factor -arvo ei päässyt ensimmäiselle sijalle. Match Factor -raja-arvo oli määritetty autoverifiointiparametritaulukkaan, joka nähdään liitteessä 1. Kuten taulukosta 3 voidaan nähdä, yhdistetyssä ¹H/HSQC-verifioinnissa testijoukon kaikki 12 rakennetta pääsivät ensimmäiselle sijalle. Vaikka Match Factor -arvo on suurimmassa osassa molekyylejä alhainen, ohjelmisto on HSQC-spektrin avulla laittanut oikean molekyylikrakenteen ensimmäiselle sijalle.

Kun ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston suorittamat verifiointitarkistukset ja todettiin, että ohjelmiston tekemät karakterisoinnit jokaisen rakenteen kohdalla eivät olleet oikein, verifioinnin läpäisseiden molekyylien määrä väheni. Taulukosta 4 voidaan havaita todellinen läpäisseiden molekyylien määrä. Automaattisen verifioinnin läpäisseistä molekyyleistä ohjelmisto oli karakterisoinut oikein 50 %, kun ohjelmisto hyödynsi pelkkää ¹H NMR -spektriä. Yhdistetyssä ¹H/HSQC-verifioinnissa ohjelmisto oli karakterisoinut automaattisen verifioinnin läpäisseistä rakenteista 80 % oikein.

Taulukko 4. 12 testimolekyylin rakenneverifioinnin tulokset tarkistuksen jälkeen.

Molekyyli	¹ H Match Factor	Sija	Yhdistetty ¹ H/HSQC Match Factor	Sija
1	0,12	1	0,13	1
2	0,24	1	0,87	1
3	0,29	3	0,27	1
4	0,93	1	0,89	1
5	0,47	1	0,23	1
6	0,26	1	0,25	1
7	0,92	1	0,88	1
8	0,91	1	0,22	1
9	0,13	1	0,13	1
10	0,73	2	0	1
11	0,89	2	0,88	1
12	0,91	1	0,94	1

Liitteessä 1 olevasta parametritaulukosta nähdään, että ohjelmisto oli määritetty hyödyntämään yli 3,5 Hz:n suuruisia kytkentävakiota toimiakseen optimaalisesti. Molekyyleillä, joilla oli paljon aromaattisia pitkän matkan kytkentöjä, kytkentävakiot olivat alle 3,5 Hz. Tällöin ohjelmisto ei löytänyt oikeita multiplisiteetteja, eikä yhdiste välttämättä läpäissyt verifiointia. Esimerkiksi apomorfiini aromaattisessa renkaassa olevien atomien kytkennät ovat hankalia verifioida pienten kytkentävakioiden vuoksi.

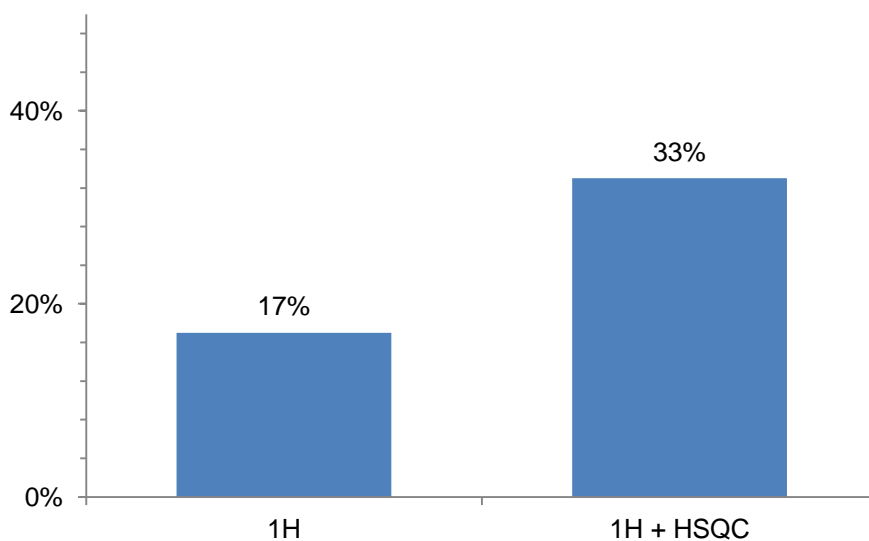
Apomorfiinille tehdyissä verifioinnissa tulokset olivat samankaltaisia. Apomorfiini ei läpäissyt ¹H NMR -verifiointia. Oikea rakenne sai Match Factor -arvon 0,80 mutta rakenne pääsi vasta sijalle 2. Yhdistetyssä ¹H/HSQC-verifioinnissa Match Factor nousi arvoon 0,84 ja rakenne pääsi sijalle 1. Apomorfiinin automaattisten verifiointien tulostaulukot ovat liitteissä 2 ja 3.

Taulukossa 5 nähdään ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston ¹H NMR -verifioinnissa ja yhdistetyssä ¹H/HSQC-verifioinnissa läpäisseiden molekyyliden määrät.

Taulukko 5. 12 molekyylin testijoukosta verifiointin läpäisseiden molekyylien määrät.

Testityyppi	¹ H NMR - verifiointi ilman opetusjoukkoa	¹ H NMR - verifiointi ope- tusjoukon kanssa	Yhdistetty ¹ H/HSQC - verifiointi ilman opetusjoukkoa	Yhdistetty ¹ H/ HSQC -verifiointi opetus- joukon kanssa
ACD/Spectrus Processor	2/12	-	4/12	-
Perch NMR Software	-	-	-	-

Automaattisten verifiointiohjelmistojen hyödyntäessä ¹H NMR -spektrin lisäksi HSQC-spektriä, ACD/Spectrus Processor -ohjelmiston tekemä rakenneverifiointi parani. Kuvassa 25 nähdään yhdistetyn ¹H/HSQC-verifiointin hyödyntämisen vaikutus verifiointeihin prosentteina (%).



Kuva 25. HSQC-spektrin vaikutus automaattiseen verifiointiin prosentteina.

Ilman opetustietokantaa pelkkää ¹H-spektriä hyödyntävästä automaattisesta rakenneverifiointista pääsi läpi 17 %. Kun ohjelmisto hyödynsi verifiointissa sekä ¹H-spektriä että HSQC-spektriä, läpäisyprosentti oli 33.

7 Yhteenveto

Luotettava automaattinen rakenneverifiointi vähentää tutkijan työmäärää yksinkertaisten molekyylien parissa, ja työaika jää monimutkaisten, ohjelman hylkäämien rakenteiden ratkaisemiseen. Tutkimusprojekteissa työskentelevillä tutkijoilla on tietoa samankaltaisten molekyylien rakenteista, jolloin he kykenevät ratkaisemaan molekyyliarakenteita automaattisia verifiointiohjelmia paremmin. Kattavalla opetustietokannalla varustettujen verifiointiohjelmistojen oletetaan korvaavan tutkijoiden työtä ainakin rutiininomaisten molekyyliarakenteiden ratkaisemisessa. Tutkimuksen tavoitteena oli rakentaa yhden tutkimusprojektin lääkeainemolekyyleistä opetustietokannat kahteen NMR-verifiointiohjelmistoon ja tutkia, miten opetusjoukko parantaa haastavien uusien lääkeainemolekyylien automaattista rakenneverifiointia. Opetustietokantojen odotettiin lisäävän verifiointin läpäisseiden molekyyliarakenteiden määrää.

Opetustietokantojen teko osoittautui vaativaksi. Ohjelmistot olivat uusia, ja niihin perehtyminen oli aikaavievää. Lisäksi lääkeainemolekyylien monimutkaiset rakenteet ja vaikeasti ennustettavat siirtymät toivat haasteita tietokantojen luomisessa. Perch NMR-verifiointiohjelmisto hyväksyi opetustietokantaan vain molekyyliarakenteita, joiden konformaatio tiedettiin tarkasti. Myös testimolekyylien rakenteiden konformaatiot tuli tietää tarkasti. Vaikka tutkimusprojektin molekyyliarakenteiden konformaatioiden haastavuus oli tiedossa, Perch NMR-verifiointiohjelmiston vaatimukset oikeasta stereokemiasta ja optimaalisista konformaatioista olivat yllättäviä. Perch NMR-ohjelmiston automaattisesta verifiointista on enemmän apua tutkimusprojekteissa, joissa molekyyliarakenteet ovat stabiileja.

ACD/Spectrus Processor -verifiointiohjelmiston opetustietokanta saatiin rakennettua. Opetustietokannan käyttöönotto ohjelmistossa toi kuitenkin tutkimukseen haasteita, eikä autoverifiointia saatu tehtyä opetusjoukon kanssa. ACD/Spectrus processor-ohjelmiston yhdistetty $^1\text{H}/\text{HSQC}$ -verifiointi osoitti, että HSQC-spektriä kannattaa hyödyntää verifioidessa uusia molekyyliä. Kuten tutkimus osoitti, ohjelman antamiin tuloksiin ei tule kuitenkaan luottaa sokeasti. Automaattisia verifiointiohjelmistoja käytettäessä on varauduttava väärin positiivisiin tuloksiin. ACD/Spectrus Processor-ohjelmiston verifiointissa ohjelmisto karakterisoi rakenteita paljon väärin, koska ohjelmisto ei huomionnut kemiallisten siirtymien lisäksi kytkentävakioita eikä vaihtuvia protoneja. Väärät karakterisoinnit verifiointeissa pitäisi saada eliminoitua, jotta väärä rakenteita ei pääsisi jatkotutkimuksiin. Ohjelmisto teki väärä karakterisointeja enemmän, kun käytössä oli

pelkkä ^1H NMR -spektri. Yhdistetyn $^1\text{H}/\text{HSQC}$ -verifioinnin huomattiin parantavan automaattista verifiointia. Tutkijoille annettiin suositus mitata jokaisesta puhtaasta lopputuotteesta ^1H NMR -spektrin lisäksi HSQC -spektri.

Tutkimuksen tulokset eivät ole täysin luotettavia pienen testimolekyylijoukon vuoksi. Suuremman testimolekyylijoukon käyttö olisi ollut mahdollista stabiilien molekyyliarakenteiden automaattisen verifioinnin tutkimuksessa, jolloin rakenteiden stereokemiat ja hankalat konformaatiot eivät olisi rajoittaneet testimolekyylien määrää. Opetustietokantojen rakentaminen aloitettiin kuitenkin molekyyliarakenteista, jotka työllistivät NMR-henkilökuntaa eniten. Vaikka HSQC-spektrin hyödyntäminen automaattisessa verifioinnissa paransi verifiointia, läpäisseiden molekyyliarakenteiden määrä oli pieni. Opetustietokantojen toivotaan parantavan verifiointia ja niiden rakentamista jatketaan NMR-autoverifioinnin kehittämiseksi Rakennekemian ja Bioanalytiikan osastolla.

Lähteet

- 1 Lambert J.B., Shurvell H.F., Lightner D.A. & Cooks G.R., Organic structural spectroscopy. 1998, 1, New Jersey, Prentice Hall.
- 2 Orion. Tutkimus ja tuotekehitys. Verkkodokumentti. Päivitetty 23.3.2014. Viitattu 23.5.2014. Saatavissa: <http://orion.fi/Tutkimus-ja-tuotekehitys/Alkuperalaakkeiden-kehitys/Nonkliininen-tutkimus/>
- 3 MC Graw Hill Education, Online Learning center. Verkkodokumentti. 2000, The McGraw-Hill Companies. Viitattu 12.5.2014. Saatavissa: www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/ch13nmr.html.
- 4 Williams D.A.R., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Analytical Chemistry by Open Learning. 1986, 1, ACOL .
- 5 Jacobsen N.E., NMR spectroscopy explained. 2007, 1, New Jersey, John Wiley & Sons Ltd.
- 6 Williams D.H. & Fleming I., Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. 1995, 5, Berkshire, New York, McGraw-Hill Publishing Company.
- 7 Michigan State University. Department of chemistry. Verkkodokumentti. Viitattu 12.5.2014. Saatavissa: <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/nmr.htm>.
- 8 Berger S., Braun S. & Kalinowski H.A., NMR spectroscopy of the non-metallic elements. 1996, New Jersey, John Wiley & Sons Ltd.
- 9 Michigan State University. Department of chemistry. Verkkodokumentti. Viitattu 16.5.2014. Saatavissa: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>.
- 10 Keeler J., Understanding NMR Spectroscopy, 2005, New Jersey, John Wiley & Sons Ltd.
- 11 Karplus M., Journal of the American Chemical Society 1963 s. 2870 - 2871.
- 12 Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. 2014 Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 1.5.2014. Saatavissa: <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti>.
- 13 Keyes P., Hernandez G., Cianchetta G., Robinson J. & Lefebvre B., Magn. Reson. Chem., 2009, 47, 38 - 52.
- 14 Advanced Chemistry Development, Inc., (ACD/Labs). Verkkodokumentti. Päivitetty 25.1.2013. Viitattu 21.5.2014. Saatavissa: <http://www.acdlabs.com/company/aboutus/>.

ACD/Spectrus Processor -verifiointin parametritaulukko

Auto Assignment Advanced Parameters

Multiplicity

Use Proton Multiplicity to Determine Possible Assignments

Minimum J in Proton Spectrum to Take Into Account (hz):
3.5

Use Carbon Multiplicity to Determine Possible Assignments

Connectivity

Match Factor Calculation

Threshold Value: 0.75

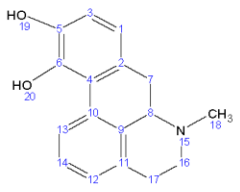
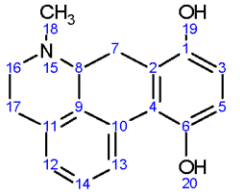
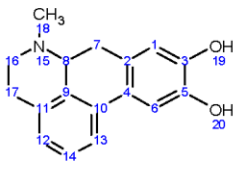
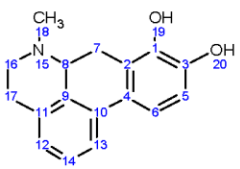
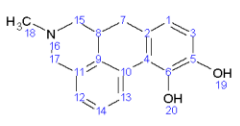
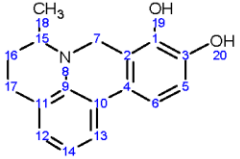
Use Exchangeable

Show Full Diagnostic

Run Auto Assignment Restore Default Settings Close

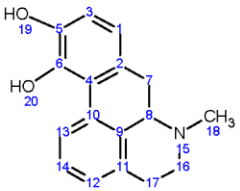
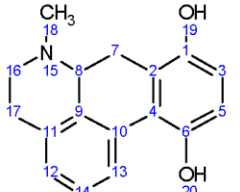
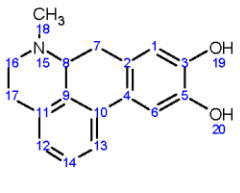
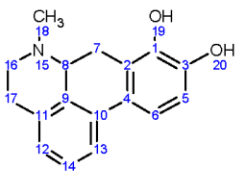
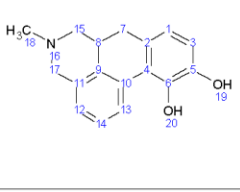
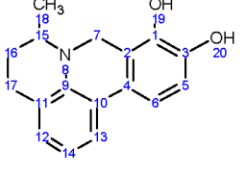
Apomorfiinin ¹H NMR -verifiointi ACD/Spectrus Processor - verifiointihjelmistolla

02/Jul/2014 14:56:46 - Proposed Structures Page: 1(1)

...	#	Structure	MF (Mult...	Diagnostics
+	1		0.80	
+	2		0.84	
+	3		0.12	Atoms 1, 6 are unassigned. 1: Peaks 6.61, 6.72, 7.07, 7.27 have inappropriate multiplicities 6: Peaks 6.61, 6.72, 7.07, 7.27, 8.23 have inappropriate multiplicities
+	4		0.85	
+	5		0.87	
+	6		0.24	Atom 18 is unassigned. 18: No peaks around 1.30 ppm

Apomorfiinin yhdistetty ¹H/HSQC-verifiointi ACD/Spectrus Processor - verifiointiohjelmistolla

02/Jul/2014 15:02:45 Apomorfiini.spectrus_1H+HSQC - Proposed Structures Page: 1(1)

...	#	Structure	MF (Mult...	Diagnostics
↓	1		0.84	
□	2		0.83	
□	3		0.07	Atoms 1, 6 are unassigned. 1: Peaks [6.61; 119.05], [6.72; 114.79] have inappropriate multiplicities 6: Peaks [6.61; 119.05], [6.72; 114.79] have inappropriate multiplicities
□	4		0.81	
↓	5		0.77	
□	6		0.07	Atoms 16, 18 are unassigned. 16: Peaks [2.44; 40.07], [2.96; 41.36] have inappropriate XHn types 18: No peaks around [1.30; 20.20] ppm