

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Juuli Nõges

**Lähedaste retseptor-anioon
seondumisafiinsuste eristamine TMR
meetodil**

Magistritöö

Keemia

30 EAP

Juhendajad:

Kristjan Haav, MSc

Prof. Ivo Leito

Tartu 2016

Sisukord

Kasutatud lühendid	3
1. Sissejuhatus	4
2. Kirjanduse ülevaade	5
2.1 Supramolekulaarne keemia.....	5
2.2 Mittekovalentsed vastasmõjud.....	6
2.2.1 Vesinikside.....	7
2.2.2 Solvofoobne efekt	8
2.3 Karboksülaatioonid	9
2.4 Anioone siduvad retseptormolekulid.....	10
2.5 Solvendiefektid anioon-retseptor seondumisel	13
2.5.1 Solvendi valik	13
2.6 Seondumiskonstandid.....	14
2.7 Seondumiskonstantide määramise meetodid	16
2.7.1 Tuumamagnetresonantspektromeetria (TMR)	16
2.7.2 UV-Vis spektrofotomeetria	18
3. Eksperimentaalne osa	20
3.1 Aparatuur ja töövahendid	20
3.1.1 Ainete alglahuste valmistamiseks kasutatavad töövahendid	20
3.1.2 UV-Vis spektrofotomeeter.....	20
3.1.3 Tuumamagnetresonants-spektromeeter	20
3.2 Kasutatud lahustid ja kemikaalid	21
3.2.1 Uuritud retseptorid	22
3.3 Suhteliste seondumiskonstantide mõõtmine.....	23
3.4 Absoluutsete seondumiskonstantide mõõtmine	24
3.4.1 UV-Vis spektrofotomeetiline tiitrimine	24
3.4.2 Tuumamagnetresonants-spektromeetiline tiitrimine	25
4. Tulemused ja arutelu	26
4.1 Retseptorite afiinsusskaalade koostamine	26
4.1.1 Üksikute $\log K_{ass}$ väärtuste määramatuse hindamine.....	30
4.2 Anioonide aluselise mõju seondumisaafiinsusele	31
4.3 Retseptorite ja anioonide struktuuri mõju seondumisaafiinsusele.....	31
5. Kokkuvõte	36
6. Summary	37
7. Kasutatud kirjandus	38
8. Lisad	41

Kasutatud lühendid

a	aktiivsus
α	dissotsiatsioonimäär
A	neelduvus
A	vesiniksideme aktseptor
A^-	anioon
β	assotsiatsioonimäär
β	vesiniksideme-aktseptorsust iseloomustav parameeter
$CHCl_3$	triklormetaan
δ	keemiline nihe
$\Delta \log K_{ass}$	assotsiatsioonikonstantide logaritmide erinevus
D	vesiniksideme doonor
DNA	desoksüribonukleiinhape
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DMSO- d_6	deutereeritud dimetüülsulfoksiid
ϵ	dielektriline konstant
γ	aktiivsuskoeffitsient
K_{ass}	assotsiatsiooni- ehk seondumiskonstant
$\log K_{ass}$	assotsiatsioonikonstandi logaritm
$\log P_{o-w}$	oktanool-vesi jaotuskoeffitsiendi logaritm
MeCN	atsetonitriil
PCA	peakomponentide analüüs
pK_a	happe dissotsiatsioonikonstandi negatiivne logaritm
RH	retseptor
RHA^-	retseptor-anioon kompleks
RM	retseptormolekul
s	standardhälve (kooskõlalisusparameeter)
TMR	tuumamagnetresonants
UV	ultraviolet
Vis	nähtav

1. Sissejuhatus

Üks kiiremini arenevaid valdkondi supramolekulaarses keemias on anioone siduvate sünteetiliste retseptormolekulide disain ja uurimine. Selektiivseid ja tundlikke retseptoreid saab kasutada anioonide määramiseks erinevates keskkondades, või anioonide eraldamiseks ja transpordiks. Lisaks anioonide võimalikult tugevale sidumisele on retseptormolekulide väljatöötamise üks peamisi eesmärke nende võime anioone eristada ning selleks peab seondumine toimuma võimalikult selektiivselt. Anioonide supramolekulaarses keemias põhineb molekulaarne äratundmine enamasti vesiniksidemetel, mistõttu kasutatakse retseptorites laialdaselt vesiniksideme-donoorseid uurea, indooli, pürrooli, karbasooli ja indolo[2,3-a]karbasooli fragmente. Ainuüksi vesiniksidemetest aga ei piisa selektiivse seondumise saavutamiseks ning kaasata tuleb ka teisi mittekovalentseid vastasmõjusid.

Retseptori ja aniooni vahelise seondumise tugevust väljendatakse seondumiskonstandi K_{ass} või selle logaritmi $\log K_{\text{ass}}$ kaudu. Retseptori selektiivsust eri anioonide suhtes iseloomustab retseptori $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste suhe anioonide suhtes. Kuna seondumisasiinsuste erinevused on kohati väga väikesed, on täpsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramine väga oluline.

Bioloogilistes süsteemides üheks olulisimaks anioonide klassiks on karboksülaatioonid, mida leidub kehas nii aminohapete, rasvhapete kui arvukate metaboliitide näol. Samuti on mitmed levinud ravimid ning säilitusained karboksülaadid. Laialdase leviku ja oluliste funktsioonide tõttu on karboksülaatide seondumise uurimine ja sisalduse määramine väga vajalik.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida kolme erineva karboksülaatiooni: sorbaadi, heksanoaadi ja naprokseeni aniooni seondumist 23 erinevale retseptormolekulile. Kuna seondumisasiinsused on kohati väga lähedased, on seondumise uurimiseks vaja kasutada väga kõrget täpsust võimaldavaid mõõtemetodeid, mille abil on ka väikesed afiinsuste erinevused tuvastatavad. Seondumisasiinsused mõõdetakse suhtelise mõõtmismeetodiga tuumamagnetresonants-spektromeetriselt ning koostatakse kooskõlalised seondumisasiinsuste skaalad iga aniooni jaoks. Skaala väärtuste ankurdamiseks teostatakse absoluutsed seondumiskonstantide määramised tuumamagnetresonants- ja UV-Vis spektromeetriselt. Saadud skaalade alusel on võimalik leida seoseid retseptormolekulide ja anioonide struktuuri ja seondumiskonstantide vahel. Saadud tulemuste põhjal on võimalik näha, millised struktuurifragmendid selektiivset seondumist soodustavad ja seeläbi ennustada, milliseid retseptormolekule tulevikus sünteesida.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Supramolekulaarne keemia

Supramolekulaarne keemia on valdkond, mis ühendab omavahel molekulide ja nanoosakeste maailma.¹ Jean-Marie Lehn, kellele 1987. aastal selles valdkonnas Nobeli preemia omistati, defineeris supramolekulaarse keemia kui “mittekovalentse sideme keemia”.² Supramolekulaarne keemia uurib molekulide või ioonide agregate, mis on omavahel seotud mittekovalentsete vastasmõjudega. Mittekovalentseteks vastasmõjudeks loetakse vesiniksidemeid, π -vastasmõjusid, elektrostaatilisi ja Van der Waals'i jõude ning hüdrofoobset (solvofoobset) efekti.³ Tekkinud agregaadil võib olla omadusi ja/või supramolekulaarseid funktsioone, mis agregaati moodustavatel üksikutel osakestel ei ilmne.¹

Kui molekulide agregeerumine toimub spontaanselt nimetatakse seda ise-organiseerumiseks. Mitmed levinud bioloogilised protsessid nagu ensüüm-substraat seondumine, DNA topeltheeliksi moodustavate ahelate põimumine ning ensüümide, viiruste ja rakumembraanide teke põhinevad just sellisel protsessil. Kuigi inimese poolt arendatud mudelsüsteemid on palju lihtsakoelisemad kui looduslikud supramolekulaarsed protsessid, on nende kaudu võimalik paremini mõista selliste mehhanismide põhimõtet ja seeläbi arendada tulevikus komplekssemaid süsteeme.¹

Supramolekulaarse keemia põhirakendusteks on luua ja arendada erinevaid molekulaarsel äratundmisel põhinevaid sensoreid, katalüsaatoreid, ravimisisestussüsteeme, biomimeetikuid ja nanosuurusel elektroonilisi ja mehaanilisi seadmeid.³

Anioonide koordinatsiooni keemia kontekstis põhineb agregaatide teke molekulaarsel äratundmisel, kus substraat (anioon) seondub komplementaarse retseptor- (peremees-) molekuliga moodustades retseptor-anioon kompleksi. Retseptor- ehk peremeesmolekul on üldiselt suur molekul, mis omab anioonile komplementaarset seondumistaskut. Substraat ehk anioon seondub mittekovalentsete vastasmõjude kaudu peremeesmolekuli seondumistaskuga. Komplementaarsus tähendab vastastikust sobivust, ehk seda, et retseptori ja aniooni vahelised tõmbejõud on maksimaalsed ja tõukejõud minimaalsed.⁴ Selle saavutamiseks peab retseptori seondumistasku olema aniooni jaoks optimaalse suuruse ja kujuga ning vastasmõjus osalevad molekulide fragmendid peavad olema sobiva paigutusega. Molekulaarse äratundmise jaoks ei piisa ainult seondumisest, vaid sellele lisaks peab retseptor olema selektiivne, st huvipakkuv anioon peab seonduma tugevamini kui võimalikud konkureerivad substraadid.⁵

2.2 Mittekovalentsed vastasmõjud

Supramolekulaarses keemias mängivad suurt rolli mittekovalentsed vastasmõjud, mis panevad aluse molekulide ja ionide agregaatide koospüsimisele. Mittekovalentsete vastasmõjude energiad on üldjoontes oluliselt madalamad kui kovalentse sideme energia, jäädes vahemikku 2 kJ/mol (dispersioonijõud) kuni 300 kJ/mol (ioon-ioon vastasmõjud).⁶ Kovalentse sideme energia jääb vahemikku 150 kJ/mol kuni 450 kJ/mol.⁶ Vaatamata mittekovalentsete vastasmõjude madalale energiale on neid omavahel kombineerides võimalik moodustada püsivaid supramolekulaarseid komplekse.

Mittekovalentsete vastasmõjude üheks oluliseks omaduseks on pöördumus: olenevalt olukorrast saavad need tekkida ja katkeda. Seeläbi on võimalik saavutada süsteemide dünaamilisus ja uue olukorraga kohastumine (nt retseptor-anioon kompleks tekib või laguneb olenevalt kontsentratsioonist). Kuigi ka kovalentsete sidemetega on see võimalik (nt happe-alus tasakaalud), on enamik kovalentseid sidemeid siiski kineetiliselt sedavõrd inaktiivsed, et selline dünaamilisus pole võimalik.

Mittekovalentsetest vastasmõjudest tugevaim on kovalentse sidemega energeetiliselt võrreldav ioon-ioon vastasmõju. See tekib kahe või enama püsivalt laetud osakese ehkiooni omavaheliste tõmbe- või tõukejõudude tõttu. Ioon-ioon vastasmõju energia jääb vahemikku 200 kuni 300 kJ/mol ning see sõltub osakeste laengust ja omavahelisest kauguses.⁶ Tegemist on mittesuunalise vastasmõjuga, seega ühtlase laengutiheduse korral ei sõltu vastasmõju energia osakeste orientatsioonist üksteise suhtes. Ioon-ioon vastasmõju võib seega panustada küll seondumise tugevusse, kuid mitte selektiivsusesse, kuna tegemist on täiesti mitteselektiivse vastasmõjuga.

Ioon-dipool vastasmõju tekib iooni ja püsivat dipoolmomenti omava neutraalse molekuli vahel. See on ioon-ioon vastasmõjust nõrgem, omades energiat vahemikus 50 kuni 200 kJ/mol.⁷ Madalam energia tuleneb sellest, et laengutihedus on polaarses neutraalses molekulis madalam kui ioonilises ühendis. Tegemist on suunalise vastasmõjuga, sest vastasmõju energia sõltub polaarsete molekuli orientatsioonist iooni suhtes. Dipool-dipool vastasmõju tekib kahe püsivat dipoolmomenti omava neutraalse molekuli vahel ning on neist kolmest kõige madalama energiaga (5 kuni 50 kJ/mol).⁷ Sarnaselt ioon-dipool vastasmõjuga sõltub ka dipool-dipool vastasmõju molekulide orientatsioonist üksteise suhtes.

2.2.1 Vesiniksidade

Laialdase leviku, piisava tugevuse ja range suunalisuse tõttu on supramolekulaarse keemia seisukohalt vesiniksidade näol tegemist kõige olulisema mittekovalentse vastasmõjuga.⁸ Tegemist on vesiniksidade doonori (D–H) vastasmõjuga vesiniksidade aktseptoriga (A) ning seda tähistatakse kujul D–H···A. Vesiniksidade doonoriks on molekulid või ioonid, milles vesinikust elektronegiivsemad elemendid (põhiliselt lämmastik, hapnik ja fluor) on kovalentselt seotud vesinikuaatomiga. Kuna selline side on väga polaarne, siis on vesinikuaatomil tugev positiivne osalaeng. Vesiniksidade aktseptoriks on negatiivse osalaenguga elektronegiivne aatom, millel on üks või mitu vaba elektronpaari, mis on võimelised tugevalt positiivse osalaenguga vesinikuga interakteeruma ja moodustama vesiniksidade. Kõige levinumad vesiniksidade aktseptorid on hapnikuaatomid alkoholides, eetrites ja karboksüülhapetes ning lämmastikuaatomid amiinides ja N-heterotsüklikes. Vesiniksidade doonoritena on levinuimad hüdroksüül-, amiid- ja karboksüülrühmad, samuti NH tsentrid heterotsüklikes.⁹

Vesiniksidade võib olla väga erineva tugevusega (4 kuni 120 kJ/mol) olenevalt vesiniksidade doonori ja aktseptori elektronegiivsusest ning sidade geomeetriast.⁶ Sõltuvalt nende tugevusest jaotatakse vesiniksidademed kolme rühma: tugevad, keskmise tugevusega ja nõrgad vesiniksidademed (Tabel 1).⁶

Tabel 1. Vesiniksidade tüübid ja nende omadused. D – vesiniksidade doonor; A – vesiniksidade aktseptor.⁶

Omadus	Tugev	Keskmine	Nõrk
Sideme iseloom	Põhiliselt kovalentne	Põhiliselt elektrostaatiline	Elektrostaatiline
Sideme energia (kJ/mol)	60 – 120	16 – 60	< 12
H···A Sideme pikkus (Å)	1,2 – 1,5	1,5 – 2,2	2,2 – 3,2
D···A Sideme pikkus (Å)	2,2 – 2,5	2,5 – 3,2	3,2 – 4,0
Sideme nurk (°)	175 – 180	130 – 180	90 – 150
Näited	HF ₂ ⁻ , H ₅ O ₂ ⁺	Karboksüülhapped, alkoholid, DNA	C—H···A D—H···π

Tugev vesiniksidade on oma olemuselt sarnane kovalentse sidadega. Vesinikuaatom asub kahe elektronegiivse aatomi keskpunkti lähedal ning vesiniksidade geomeetria on lähedane lineaarsele. Keskmise tugevusega vesiniksidade on oma olemuselt pigem elektrostaatiline vastasmõju ning side pole lineaarne, mistõttu on vesiniksidademed võimalik moodustada

rohkemates suundades. Nõrgal vesiniksidemel praktiliselt puudub kovalentne iseloom ning tegemist on elektrostaatilise vastasmõjuga. Side võib olla kuni 90° nurga all ning seega on võimalike vesiniksidemete arv veelgi suurem. Tugevaimad vesiniksidemed moodustuvad paarides $O-H\cdots O$, $O-H\cdots N$ ja $N-H\cdots O$. Nõrgemad vesiniksidemed on $N-H\cdots N$ vahel ning veelgi nõrgemad $Cl_2C-H\cdots O$ ja $Cl_2C-H\cdots N$ vahel.⁹

Molekulaarse äratundmise seisukohalt on oluline, et molekulidevahelised vastasmõjud võimaldaksid võimalikult tugevat kuid samas selektiivset seondumist. Ioon-ioon vastasmõju korral on tegemist küll tugeva vastasmõjuga, kuid mittesuunalisuse tõttu on vastasmõju liiga mittespetsiifiline ja erinevate anioonide seondumine sõltub eeskätt vaid laengust ja selle tihedusest anioonsel tsentril. Vesiniksideme korral on seevastu tegemist küllaltki spetsiifilise interaktsiooniga, sest sideme tugevus sõltub suurel määral doonorsete ja aktseptoorsete osade omavahelisest paigutusest.¹⁰ Seetõttu saavad agregate moodustada vaid omavahel komplementaarse (sobiva) geomeetriaga ühendid. Vesiniksidemetel põhinev molekulaarne äratundmine on väga oluline mitmetes biokeemilistes protsessides nagu näiteks DNA topeltheeliksi moodustumine, ensüüm-substraat seondumine ja valkude struktuuri moodustumine.⁴ Vesiniksidemete suunalisuse tõttu on neil väga oluline roll ka anioonide koordinatsiooni keemias võimaldades anioonide selektiivset seondumist sünteetiliste retseptoritega.¹⁰

2.2.2 Solvofoobne efekt

Polaarsetel ja mittepolaarsetel molekulidel on soodne teineteisest eralduda, sest polaarsed molekulid, eriti veemolekulid, saavad omavahel anda stabiliseerivaid vastasmõjusid (vesiniksidemed, dipool-dipool vastasmõjud), kuid mittepolaarsete molekulidega kokkupuutel stabiliseerivate vastasmõjude hulk väheneb. Seega on lahuses energeetiliselt kasulik hoida polaarsete ja mittepolaarsete molekulide summaarne omavaheline kokkupuutepind minimaalsena. Seda ülaltoodud vastasmõjude toimel tekkivat fenomeni nimetatakse solvofoobseks efektiks ning see iseloomustab keskkonna mõju supramolekulaarsetele protsessidele. Hüdrofoobseks efektiks¹¹ nimetatakse solvofoobset efekti juhul kui lahustiks on vesi. Solvofoobsel efektil on sageli oluline mõju retseptor-substraat seondumisele ning eriti markantselt väljendub see hüdrofoobse efekti korral. Kõige soodsamal juhul on enne substraadi seondumist retseptori seondumistasku täidetud veemolekulidega, millel on teistest veemolekulidest eraldatuse tõttu kõrge energia. Sellisel juhul on substraadi seondumine energeetiliselt (vabaenergia mõttes) eriti kasulik, kuna selle käigus vabanevad eelnevalt

korrastatult paigutatud, kuid kõrge energiaga veemolekulid seondumistaskust ning see toob kaasa nii entalpia vähenemise kui ka entroopia suurenemise. Entroopia kasvu põhjustab sellisel juhul süsteemi korrapärase suurenemine kui eelnevalt korrapäraselt paigutatud veemolekulid vabanevad seondumistaskust. Entalpia kahaneb tänu retseptori ja substraadi vahel tekkivatele vastasmõjudele ning samuti tänu vabanenud veemolekulide võimele moodustada vesiniksidemeid ümbritsevate veemolekulidega.¹¹ Mida kõrgema energiaga on seondumistaskus olevad veemolekulid, seda energeetiliselt soodustatum on substraadi seondumine. Seega on kõrge seondumisafiinsusega retseptorite disainimisel oluline silmas pidada teatud seondumistasku parameetreid nagu kuju, läbimõõt ja seal olevad funktsionaalrühmad, mis kõik mõjutavad seondumistaskus olevate veemolekulide stabiilsust.

2.3 Karboksülaatioonid

Erinevad anioonide poolt vahendatud protsessid on looduses laialt levinud. Anioonsel kujul on näiteks meie kehas olev geneetilise informatsiooni kandja DNA, samuti erinevad ensüümide substraadid ja kofaktorid.¹² Anioonide sisaldusel kehas on suur mõju inimese tervisele. Anioonide ebapiisavat või liigset sisaldust on seostatud erinevate haiguste tekkega, paljud ravimid on anioonsel kujul ning vesinikkarbonaatioon mängib suurt rolli vere pH regulatsioonil. Seetõttu on anioonide sisalduse usaldusväärne määramine väga oluline.^{12,13} Lisaks inimkehale mõjutab anioonide tase olulisel määral ka looduslikke protsesse. Näiteks väetisteks kasutatavad nitraadid ja fosfaadid toovad liigse kasutusega kaasa veekogude eutrofeerumise.¹⁴

Üks olulisemaid anioonsete ühendite klasse bioloogilistes süsteemides on karboksülaatioonid ehk karboksüülhapete anioonid. Karboksüülhapped mängivad kehas väga olulist rolli – neid leidub nii rasvhapete, aminohapete kui ka erinevate metaboliitide kujul. Samuti on karboksüülhapped olulised ühendid farmaatsiatööstuses, sest nende hulka kuuluvad mitmed tuntud ravimid, sealhulgas aspiriin, ibuprofeen ja naprokseen. Samasse aineklassi kuuluvad ka toiduainetööstuses laialt kasutatavad säilitusained nagu bensoehape, piimhape ja sorbiinhape. Karboksüülhapete laialdase leviku ja tähtsate funktsioonide tõttu on nende seondumise uurimine ja sisalduse määramine väga vajalik.

Karboksüülhapete näol on tegemist happeliste ühenditega ning tavaliste karboksüülhapete pK_a vees jääb vahemikku 2 kuni 5.¹⁵ Kuna füsioloogiline pH on ligikaudu 7,4, siis on karboksüülhapped inimese kehas põhiliselt anioonsel kujul. Karboksülaatrühmal on

selgepiiriline geomeetria, kus C-O sidemete pikkus on ühesugune (atsetaadi korral 1,24 Å)¹⁶ ning sidemete vaheline nurk on ligikaudu 120° (atsetaadi korral 127,5°).¹⁶

Karboksülaatrühma stabiliseerivad kaks efekti: induktsioon- ja resonantsefekt. Resonantsefekt põhjustab elektronide delokalisatsiooni kaudu negatiivse laengu võrdse jaotumise mõlema hapniku aatomi vahel. Tänu hapniku aatomi elektronegatiivsusele ja seeläbi tugevale induktsioonefektile on karboksülaatrühma negatiivne laeng koondunud eeskätt hapniku aatomite peale. Kui resonantsefekti tugevus on erinevatel karboksülaatidel ühesugune, siis induktsioonefekti tugevus sõltub karboksülaatrühmaga seotud rühma struktuurist. Mida tugevamini see rühm elektrone enda poole tõmbab, seda stabiliseeritum on karboksülaatrühm ja seda tugevam on vastav karboksüülhape.¹⁷

Negatiivse osalaenguga hapnikuaatomid on head vesiniksideme aktseptorid, mistõttu sobivad nende tugevaks sidumiseks komplementaarse geomeetriaga vesiniksideme doonoreid sisaldavad retseptorid.

2.4 Anioone siduvad retseptormolekulid

Vaatamata anioonide suurele tähtsusele on neid siduvate retseptormolekulide disain vähem arenenud võrreldes metallikatioone siduvate retseptoritega (kompleksimoodustajatega). Selle peamiseks põhjuseks on mõningad anioonidele omased parameetrid, mis teevad neid siduvate retseptorite disainimise keerukaks. Esiteks on anioonid üldjuhul suurema raadiusega kui sama elektronide arvuga katioonid ning seetõttu on retseptoriga seandumisel laeng-laeng vastasmõju anioonide korral nõrgem. Lisaks sellele vajavad anioonid oma suuruse tõttu ka suuremaid seandumistaskuid. Teiseks leidub ka lihtsa struktuuriga anioonide korral hulk erinevad geomeetriaid – näiteks Cl⁻ on sfääriline, CN⁻ on lineaarne, SO₄²⁻ on tetraeedriline ja NO₃⁻ on trigonaalne planaarne. Seega on komplementaarsete seandumistaskutega retseptorite disainimine anioonidele keerukam kui katioonidele, mis on enamasti sfäärilised. Kolmandaks on anioonid tundlikumad pH muutustele – ühendi anioonsel kujul olemiseks vajalik pH vahemik on kitsam võrreldes katioonidega.

Kuigi nende erinevuste tõttu on anioon-selektiivsete retseptorite ja nendel põhinevate sensorite arendamine mõnevõrra maha jäänud katioon-selektiivsetest sensoritest, on neid siiski kirjanduses aina rohkem kirjeldatud. Esimese anioon-selektiivse sensori mehhanismi kirjeldasid 1966. aastal Frant ja Ross¹⁸ ning neile järgnesid peagi Park ja Simmons¹⁹, kes 1968. aastal sünteesisid esimese anioon-selektiivse (Cl⁻ ioone siduva) retseptori. Tegemist oli

makrotsüklilise retseptoriga, mis koosnes kahest, aniooniga vesiniksidemeid andvast, protoneeritud amiinrühmast. Kuna vesiniksidemed on suunalised, siis sõltub nende tugevus suurel määral vesiniksideme-doonorsete osade paigutusest aniooni suhtes. Seega võimaldavad vesiniksidemetel põhinevad vastasmõjud saavutada head selektiivsust erineva suuruse ja kujuga anioonide suhtes. Suurem osa anioone siduvaid retseptoreid põhinevad eeskätt vesiniksideme moodustamisel anioonidega ning koosnevad vesiniksideme doonoreid sisaldavatest rühmadest. Põhilisteks vesiniksideme-doonorseteks rühmadeks anioone siduvates retseptorites on amiidid (sh urea, tiourea) ning pürrool ja selle derivaadid (indool, karbasool). Üksikult ei võimalda need fragmendid piisavat tundlikkust ega selektiivsust, mistõttu kasutatakse anioonide efektiivseks sidumiseks erinevaid hübriidmolekule (indolo[2,3-a]karbasool, biskarbasoolüüluurea jne), mis sisaldavad arvukalt sobiva orientatsiooniga vesiniksideme doonoreid. Nende vesiniksideme-doonorsete fragmentide erineva hulga ja paigutuse sobitamisega on võimalik konstrueerida kindlale anioonile selektiivseid sidumistaskuid. Amiidid on olulised vesiniksideme doonorid ka bioloogilistes süsteemides, kus oksüaanioonide seondumine valkudega toimub põhiliselt peptiidahelas olevate –NH rühmade kaudu.²⁰

Vesiniksideme-doonorsete rühmi on mitmeid, kuid anioone siduvate retseptorite sünteesil leiavad enim kasutust amiidide ja heterotsüklite –NH rühmad. Tegemist on mõõdukalt tugeva, kuid mitte väga happelise doonoriga, mis võimaldab aniooni suhtes piisavat tundlikkust ja selektiivsust. Sellest nõrgemate doonorite korral nagu –CH on side liiga vähe polariseeritud ning interaktsioon aniooniga on enamasti liiga nõrk. Tugevamad doonorid nagu –OH on seevastu liiga tugevalt polariseeritud ning vesiniksideme moodustumise asemel võib toimuda deprotoneerumine, mille tulemusena kaob selektiivsus. Kõrgema tundlikkuse saavutamiseks on seega ühe tugeva –OH doonori asemel otstarbekas kasutada mitut nõrgemat –NH doonorit. Tundlikkust saab samuti suurendada tõstes –NH rühma vesiniksideme doonorsust. Üks võimalus on kasutada erinevaid N-H sideme polaarsust suurendavaid elektronaktseptoorseid asendusrühmi, kuid ka siin tuleb silmas pidada deprotoneerumise ohtu. Teine võimalus on kasutada N-heterotsükleid nagu pürrool, indool ja karbasool, kuid ka need tõstavad –NH rühma happelisust. Kolmas võimalus on kasutada positiivse laenguga rühmi, mis seonduks negatiivselt laetud anioonidega. Selline tugev interaktsioon aga vähendaks selektiivsust, kuna seondumine põhineks peamiselt mittesuunalisel laeng-laeng vastasmõjul ning erinevad anioonid seonduks sarnase tugevusega. Samuti lisandub katioonsele retseptorile vastasioon, mis konkureerib uuritava aniooniga.⁶

Lisaks doonorsete rühmade tugevusele mõjutab vesiniksidemete tugevust ka nende paigutus. Vesinikside on tugevaim, kui selles osalevad aatomid on paigutatud ligikaudu lineaarselt. Samuti on seondumisafiinsus seda suurem, mida rohkem on vesiniksidemeid retseptori ja aniooni vahel. Samas peaksid rühmad olema paigutatud selliselt, et vaba retseptor moodustaks võimalikult vähe sisemolekulaarseid vesiniksidemeid. Sisemolekulaarsete vesiniksidemete probleem kerkib juhul kui retseptor sisaldab lisaks vesiniksideme doonoritele ka – aktseptoreid, mis saavad omavahel vesiniksidemeid moodustada. Need sidemed stabiliseerivad vaba retseptorit ja vähendavad seeläbi seondumisafiinsust. Lähedikkude asetsevate doonorrühmade vahel võib tekkida samanimeliste laengute tõukumine.

Olukorras, kus retseptor-anioon interaktsioon põhineb peamiselt ainult vesiniksidemetel, määrab seondumisafiinsuse suurel määral aniooni aluselisisus. Sellisel juhul omab retseptor kõige kõrgemat seondumisafiinsust kõige aluselisema aniooni suhtes. Sarnase aluselisusega anioonid seonduvad ühtemoodi, tuues kaasa madala selektiivsuse. Eristamisvõime tõstmiseks on oluline kaasata seondumisse mitmeid vastasmõjusid. Sõltuvalt aniooni struktuurist saab konstrueerida sellele komplementaarse seondumistasku, mis annab aniooniga lisaks vesiniksidemetele veel ka teisi stabiliseerivaid vastasmõjusid. Sellisteks vastasmõjudeks võivad olla näiteksioon-dipool ja π -vastasmõjud, samuti mängib rolli solvofoobne efekt ja seondumistasku steerika.

Kõrge selektiivsuse saavutamiseks peaks retseptori seondumistasku olema piisavalt suur, et sisaldada erinevaid stabiliseerivaid vastasmõjusid andvaid fragmente, kuid teisalt piisavalt väike, et soodustada nn kõrge energiaga veemolekulide teket, mis suurendab hüdrofoobse efekti positiivset mõju seondumisafiinsusele¹¹. Kõrge energiaga veemolekulide teket soodustavad põhiliselt kolm parameetrit: seondumistasku kuju, läbimõõt ja funktsionaalrühmad. Kujult on eelistatud üsna suletud, näiteks vaadikujulised seondumistaskud. Seal asuvad veemolekulid on ümbritsevast solvendist eraldatud, mistõttu on nende vaheline vesiniksidemete moodustamine takistatud. Seondumistasku läbimõõt peaks olema piisavalt suur, et mahutada sisse veemolekule, kuid piisavalt väike, et veemolekulide omavaheline vesiniksidemete hulk oleks minimaalne. Seondumistaskus olevad funktsionaalrühmad ei tohiks veemolekule oluliselt stabiliseerida, seega peaks vältima liigsete vesiniksideme-doonorsete ja aktseptoorsete rühmade paiknemist seondumistasku sisemuses.¹¹

2.5 Solvendiefektid anioon-retseptor seondumisel

Anioon-retseptor seondumist uuritakse eelkõige lahustikeskkonnas. Lahusti valik on määrava tähtsusega, kuna lahusti omadused mõjutavad oluliselt nii seondumisafiinsust kui selektiivsust. Vesi kui kõige levinum lahusti, on anioonide uurimiseks väga huvipakkuv: enamiku praktikas uuritavate proovide, näiteks keskkonna- ja meditsiiniproovide, analüüsimiseks on vajalik, et anioonide sisaldust oleks võimalik määrata vesikeskkonnas. Kui anioonide solvatatsioon aprotoonses lahustis toimub peamiselt läbi elektrostaatiliste vastasmõjude aniooni ja solvendi molekulide vahel, siis protoonsed lahustid nagu vesi, solvateerivad anioone spetsiifiliselt, moodustades nendega vesiniksidemed. Kui aniooni seondumine retseptoriga põhineb samuti vesiniksidemete moodustumisel, mis on väga tavaline, siis käitub vesi, olles nii tugev vesiniksidemete doonor kui ka aktseptor, väga konkureeriva solvendina.^{10,12} Sellele vaatamata on viimasel kümnendil arendatud anioone siduvaid neutraalseid retseptoreid, mis on võimelised töötama ka vesikeskkonnas.²¹ Näiteks tsüklopeptiididel põhinevad retseptorid on võimelised 1:1 vesi:orgaanika segus siduma anioone aafiinsusega $\log K_{\text{ass}} \approx 5$.²² Siiski on seondumise uurimine vesikeskkonnas suur väljakutse. Lisaks solvendi konkureerimisele aniooni ja retseptoriga on sageli probleemiks ka retseptormolekulide lahustuvus vees, kuna paljud sünteetilised retseptorid vees ei lahustu. Seetõttu tehakse baasuuringud enamasti mittevesilahustes või vee ja orgaanilise lahusti segudes.

2.5.1 Solvendi valik

Kuigi vesikeskkond on anioonide seondumise uurimiseks kõige huvipakkuvam keskkond, siis arendustöö alguses faasis on seondumist parem uurida väikese veelisandiga aprotoonses lahustis, kus solvendi konkureerimine seondumistaskule on väiksem. Samuti lahustuvad retseptormolekulid orgaanilistest solventides paremini. Seejärel saab kõige paljulubavamaid retseptoreid uurida edasi vesikeskkonnas.

Levinuimad orgaanilised lahustid anioon-retseptor seondumise uurimisel on atsetonitril (MeCN), dimetüülsulfoksiid (DMSO) ja triklormetaan (CHCl₃). Üldjuhul, mida kõrgem on lahusti polaarsus, seda nõrgem on anioon-retseptor seondumine, seega seondumisafiinsus kasvab reas H₂O < DMSO < MeCN < CHCl₃.⁴ DMSO on kõrge polaarsusega ja ionide teket soodustav lahusti ($\epsilon = 46,45$). DMSO on polaarsete lahustite hulgast üks kõige universaalsema lahustava võimega lahusti ning selles lahustuvad hästi nii polaarsed kui paljud

mittepolaarsed ühendid. Tegemist on tugeva vesiniksideme aktseptoriga ($\beta = 0.76$)²³, kuid vesiniksideme-donoorsed omadused puuduvad. Vesiniksideme-aktseptoorsete omaduste tõttu konkureerib DMSO aniooniga, kuid see efekt pole liiga suur takistamaks anioon-retseptor seondumise uurimist. Kõrge polaarsus ja head lahustavad omadused on DMSO kasutamise peamised eelised seondumise uurimisel.

2.6 Seondumiskonstandid

Aniooni (A^-) ja retseptori (RH) vahelise seondumise tugevust saab kvantitatiivselt väljendada seondumis- ehk assotsiatsioonikonstandi (K_{ass}) kaudu. Anioon-retseptor kompleksi (RHA^-) moodustumine on tasakaaluline reaktsioon ja tekkiva kompleksi termodünaamilist stabiilsust iseloomustab reaktsiooni tasakaalukonstant K_{ass} . Aniooni ja retseptori 1:1 seondumis-stöhiomeetria korral moodustuvat retseptor-anioon kompleksi teket näitab järgmine tasakaalureaktsioon:



Seondumiskonstant avaldub järgmisel kujul, kus a_{RHA^-} , a_{RH} ja a_{A^-} on vastavate osakeste aktiivsus lahuses.

$$K_{\text{ass}} = \frac{a_{RHA^-}}{a_{RH}a_{A^-}} \quad (2)$$

Mida suurem on K_{ass} , seda tugevam on aniooni seondumine retseptoriga ja seda stabiilsem on vastav kompleks. Seondumiskonstandi täpne määramine on väga oluline, kuna see võimaldab hinnata ja võrrelda erinevate anioon-retseptor komplekside stabiilsust ning seeläbi ka ennustada uute retseptorite seondumisafiinsust. Seondumise selektiivsus, mis iseloomustab retseptori suutlikkust eristada omavahel erinevaid anioone, on üks olulisimaid aniooni koordinatsiooni keemia parameetreid. Kvantitatiivselt saab selektiivsust hinnata vastavate komplekside seondumiskonstantide suhtega.⁷

Seondumiskonstandi leidmiseks võrrandi (2) abil on vajalik teada aniooni aktiivsust ning vaba ja seondunud retseptori aktiivsuste suhet. Viimast on lihtne määrata, kuid aniooni aktiivsuse usaldusväärne määramine on keeruline. Selle põhjuseks on erinevad süstemaatilised efektid

nagu ioonpaardumine²⁴ ja homokonjugatsioon²⁵, mis vähendavad aniooni aktiivsust lahuses. Ioonpaardumiseks nimetatakse aniooni ja vastaskatiooni vahelise ioonpaari moodustumist. Homokonjugatsiooniks nimetatakse aniooni ja selle konjugeeritud happe vahelise kompleksi moodustumist. Mõlemad protsessid kulgevad intensiivsemalt madala polaarsusega lahustites. Seetõttu on anioon-retseptor seondumistasakaalude uurimises eelistatud kõrgema polaarsusega lahustid, kus homokonjugatsiooni ja ioonpaardumise mõju on väike. Lisaks nendele protsessidele, mõjutab aniooni aktiivsust lahuses ka erinevate lisandite sisaldus solvendis. Ka puhtas orgaanilises lahustis leidub alati vähesel määral vett, mis läbi vesiniksideme doonorite ja aktseptorite selektiivse solvatatsiooni muudab oluliselt nii aniooni kui retseptori aktiivsust lahuses.

Vastavatest efektidest ülesaamiseks ja kõrgema täpsuse saavutamiseks töötati meie töörühmas välja alternatiivne meetod seondumiskonstantide määramiseks, mis põhineb kahe erineva retseptori (R_1H ja R_2H) seondumisafiinsuste erinevuse määramisel samas lahuses ühe ja sama aniooni suhtes.

See meetod on tööpõhimõtte poolest analoogne suhtelise happelisuse/aluselise määramise meetodiga, mida kasutatakse pK_a väärtuste leidmiseks mittevsesikeskkonnas.^{26,27} Käesoleva meetodi kohandas retseptor-anioon suhtelise seondumise mõõtmiseks K. Haav.²⁸ Seondumiskonstandi määramine põhineb järgneval tasakaalul:



Suhteline seondumisafiinsus $\Delta \log K_{ass}$ avaldub järgneval kujul:

$$\Delta \log K_{ass} = \log K_{ass}(R_1HA^-) - \log K_{ass}(R_2HA^-) = \log \frac{a_{R_1HA^-} a_{R_2H}}{a_{R_2HA^-} a_{R_1H}} \quad (4)$$

Võrranditest (3) ja (4) järeldub, et selle meetodi kasutamisel ei ole vaba aniooni aktiivsuse määramine vajalik. Seega taanduvad välja erinevad aniooni aktiivsust mõjutavad tegurid (sh ioon-paardumine ja homokonjugatsioon), kuna antud kõrvalprotsessid mõjutavad võrdselt mõlema retseptoriga seondumist. Võrrandis (4) avalduvad vaba ja seotud retseptori aktiivsused suhtena, mistõttu taanduvad osaliselt või täielikult välja ka retseptoreid mõjutavad tegurid (sh solvendi veesisaldus). Lisaks sellele on mõistlik eeldada, et aktiivsuskoeffitsientide suhted $\frac{\gamma_{R_x}}{\gamma_{R_x A^-}}$ on erinevate retseptori jaoks sarnased. Seega võib võrrandis (4) olevad aktiivsused asendada kontsentratsioonidega:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log K_{\text{ass}}(\text{R}_1\text{HA}^-) - \log K_{\text{ass}}(\text{R}_2\text{HA}^-) = \log \frac{[\text{R}_1\text{HA}^-][\text{R}_2\text{H}]}{[\text{R}_2\text{HA}^-][\text{R}_1\text{H}]} \quad (5)$$

Kuna suhtelise seondumiskonstandi määramisega taanduvad välja mitmed määramatust suurendavad süstemaatilised efektid, siis võimaldab kirjeldatud meetod määrata seondumiskonstante kõrge täpsusega.²⁸

2.7 Seondumiskonstantide määramise meetodid

Supramolekulaarses keemias on anioon-retseptor seondumiskonstantide määramiseks mitmeid erinevaid meetodeid, sh UV-Vis spektrofotomeetria, TMR spektromeetria, massispektromeetria, fluorestsentspektromeetria ja isotermilise tiitrimise kalorimeetria.⁷ Seondumiskonstandi leidmiseks peab meetod võimaldama määrata seondunud ja seondumata retseptori tasakaaluliste kontsentratsioonide suhet. Selleks on oluline, et mõõdetav omadus oleks vaba ja seotud retseptori korral erinev. Meetodi valik sõltub seega nii uuritavate ühendite omadustest, kui ka sellest, millist ja kui täpset informatsiooni on vaja saada. Seondumiskonstantide vahemik, mida eksperimentaalselt on võimalik määrata, sõltub kasutatava instrumentaalse meetodi tundlikkusest.

2.7.1 Tuumamagnetresonantsspektromeetria (TMR)

TMR spektromeetria on laialdaselt kasutatav meetod erinevate keemiliste protsesside uurimiseks ja ühendite struktuuri määramiseks. Tegemist on ühe levinuima meetodiga seondumisafiinsuste määramiseks.³ Anioon-retseptor seondumise uurimiseks tiitritakse vaba retseptorit sisaldavat lahust uuritavat aniooni sisaldava titrandiga ja jälgitakse ühe või mitme vesiniksidemest osa võtva prootoni keemilise nihke (δ) muutust. Tiitrimise käigus retseptor-anioon kompleksi hulk lahuses suureneb ning igas tiitrimise etapis registreeritakse ¹H TMR spekter. Retseptor-anioon kompleksi kontsentratsioon igas tiitrimise punktis on leitav vastavalt võrrandile:⁷

$$[\text{RHA}^-] = \beta \cdot c(\text{RH})_0 \quad (6)$$

, kus β on retseptor-anioon assotsiatsioonimäär ja $c(\text{RH})_0$ on summaarne retseptori kontsentratsioon lahuses. Keemiliste nihete kaudu on assotsiatsioonimäär leitav järgneva võrrandi abil:⁷

$$\beta = \frac{\delta - \delta_{RH}}{\delta_{RHA^-} - \delta_{RH}} \quad (7)$$

, kus δ on prootoni(te) keemiline nihe vastavas tiitrimise punktis ning δ_{RH} ja δ_{RHA^-} on vastavalt vaba retseptori ja retseptor-anioon kompleksi prootoni(te) keemilised nihked. Vaba retseptori prootoni(te) keemiline nihe leitakse enne tiitrimise algust registreeritud TMR spektrist ning kompleksi prootoni(te) keemiline nihe tiitrimise küllastuspunktile vastavast TMR spektrist, kus aniooni on lisatud liias ja kõik retseptormolekulid on aniooniga komplekseerunud.

TMR spektromeetria võimaldab seondumiskonstante määrata kahel juhul: retseptor-anioon tasakaalu korral toimub aniooni vahetumine väga kiiresti või väga aeglaselt võrreldes TMR mõõtmise ajaskaalaga. Kui aniooni vahetumise kiirus on võrreldav TMR mõõtmise ajaskaalaga, siis seondumiskonstante pole võimalik määrata, sest piigid TMR spektris laienevad või kaovad ära.^{4,7} Retseptor-anioon seandumisel vesi või vesi-organika keskkonnas toimub aniooni vahetumine võrreldes TMR ajaskaalaga väga kiiresti. See tähendab, et vaba retseptori ja retseptor-anioon kompleksi signaale pole võimalik eristada ning TMR spektris on korruga näha ühte piiki. Selle piigi keemiline nihe vastab mõlema signaali keemiliste nihete kaalutud keskmisele.

Lisaks absoluutsete seondumiskonstantide määramisele on TMR meetodiga võimalik leida ka suhtelisi seondumiskonstante. Esmakordselt demonstreeris TMR meetodi sobivust suhteliste seondumiskonstantide määramiseks S. A. Kadam meie töörühmast.²⁹ Kahe retseptori seandumisafiinsuste erinevus leitakse valemiga:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log \frac{\beta_1(1-\beta_2)}{\beta_2(1-\beta_1)} \quad (8)$$

, kus β_1 ja β_2 on vastavalt retseptorite R_1H ja R_2H assotsiatsioonimäärad, mille väärtused on leitavad valemi (7) kaudu.

TMR meetodi kõrge eraldusvõime võimaldab mõõta suhtelisi seondumiskonstante korruga rohkem kui kahele retseptorile. Suurim seni saavutatud retseptorite arv ühes mõõtmises oli kuus,³⁰ mis tähendab, et ühe mõõtmisega oli võimalik leida kuni 15 suhtelist seondumiskonstanti. Lisaks mitme seondumiskonstandi koosmääramise võimalusele on suhteliste seondumiskonstantide mõõtmine ka väga kõrge täpsusega. Samuti on TMR spektritelt võimalik saada infot võimalike kõrvalprotsesside (nt retseptori deprotoneerumine) ja retseptor-anioon interaktsiooni kohta (nt millised prootonid võtavad seandumisest osa). Seega on ühest TMR mõõtmisest saadav informatsiooni hulk suurem võrreldes enamiku teiste

meetoditega. Lisaks sellele on keemiliste nihete mõõtmine palju täpsem võrreldes näiteks signaali intensiivsuse mõõtmisega UV-Vis spektromeetrias.

TMR spektromeetria põhiline puudus on madalam tundlikkus võrreldes UV-Vis spektromeetriaga. See tähendab, et mõõtmisteks on vaja kasutada kõrgemat retseptori ja aniooni kontsentratsiooni. Sellest tulenevalt ei ole võimalik määrata absoluutseid seondumiskonstante, mis on kõrgemad kui 10^4 .⁴ Kõrge kontsentratsiooniga lahuste kasutamine suurendab ka erinevate soovimatute kõrvalprotsesside, naguioon-paarumine ja homokonjugatsioon, toimumist, mis mõjutavad vaba aniooni aktiivsust lahuses. Suhteliste seondumiskonstantide mõõtmine võimaldab need takistused ületada, kuna aniooni aktiivsust pole vaja määrata. Seega on suhteliste seondumiskonstantide mõõtmise kaudu võimalik määrata K_{ass} väärtuseid kuni 10^6 .³¹

2.7.2 UV-Vis spektrofotomeetria

Lihtsa, täpse ja robustse meetodina on UV-Vis spektrofotomeetria samuti laialdaselt kasutatav meetod seondumiskonstantide määramiseks. Seondumiskonstantide määramine põhineb retseptori lahuse tiitrimisel aniooniga, kus lahuse neelduvuse intensiivsus mõõdetakse erinevate aniooni kontsentratsioonide juures. Seejuures on oluline, et retseptor neelaks UV või nähtava valguse piirkonnas ning aniooniga komplekseerudes neelduvuse intensiivsus piisavalt muutuks. Selleks valitakse mõõtmiseks lainepikkus, kus vaba retseptori ja kompleksi neeldumisintensiivsused oleksid võimalikult erinevad. Retseptor-anioon kompleksi kontsentratsioon igas tiitrimise punktis on 1:1 stöhhomeetria ja aniooni neeldumise puudumisel leitav vastavalt võrrandile:⁷

$$[RHA^-] = \frac{A_{\text{eksp}} - A_{\text{RH}}}{A_{\text{RHA}^-} - A_{\text{RH}}} \cdot c(\text{RH})_0 \quad (9)$$

, kus A_{eksp} on mõõdetud neelduvus kindlas tiitrimispunktis ning A_{RH} ja A_{RHA^-} on vastavalt vaba ja seotud retseptori neelduvused.

Lisaks absoluutsete seondumiskonstantide määramisele on UV-Vis spektromeetria abil võimalik leida ka suhtelisi seondumiskonstante. UV-Vis spektromeetrilise meetodi sobivust suhteliste seondumiskonstantide määramiseks demonstreeris K. Haav meie töörühmast.²⁸ Antud meetodi korral viiakse läbi aniooniga tiitrimine nii kahe puhta retseptorilahusega kui ka nende seguga ning registreeritakse lahuste neelduvusspektrid igas tiitrimise punktis.

Multilineaarse regressiooni alusel arvutatakse mõlema retseptor-anioon kompleksi dissotsiatsioonimäärad vastavalt valemile:

$$\alpha = \frac{[\text{RH}]}{[\text{RH}] + [\text{RHA}^-]} = \frac{A^\lambda - A_{\text{RHA}^-}^\lambda}{A_{\text{RH}}^\lambda - A_{\text{RHA}^-}^\lambda} \quad (10)$$

, kus A^λ on neelduvus kindlas tiitrimispunktis ning A_{RH}^λ ja $A_{\text{RHA}^-}^\lambda$ on vastavalt vaba ja seotud retseptori neelduvused. Kahe retseptori seondumisafiinsuste erinevus leitakse valemiga:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log \frac{\alpha_2(1-\alpha_1)}{\alpha_1(1-\alpha_2)} \quad (11)$$

, kus α_1 ja α_2 on vastavalt retseptorite R_1H ja R_2H dissotsiatsioonimäärad.

Vaatamata kõrgemale tundlikkusele võrreldes TMR spektromeetriaga, võimaldades määrata K_{ass} väärtuseid kuni $10^{7,7}$ on UV-Vis spektromeetrial ka teatud puudused. Esiteks on vajalik, et retseptor neelaks UV või nähtavas alas valgust, mis eeldab kromofoori olemasolu. Teiseks peab aniooni seondumisel toimuma piisavalt suur neelduvuse muutus, et seda oleks võimalik registreerida. Kolmandaks peab uuritava anioonil puuduma mõõdetavas alas neeldumisspekter. Samuti on oluline, et solvent ise mõõdetaval lainepikkusel valgust ei neelaks. Lisaks sellele on neelduvuse mõõtmine vähem täpne võrreldes sageduste mõõtmisega TMR spektromeetria korral. UV-Vis spektrist saadav informatsiooni hulk on samuti väiksem võrreldes TMR spektriga, näiteks puudub võimalus saada infot erinevate kõrvalprotsesside ja seondumistasku asukoha kohta. Suhtelise seondumiskonstandi määramise korral on puuduseks ka asjaolu, et korraga on võimalik mõõta vaid kahte retseptorit ning ka $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste leidmiseks vajalik arvutuskäik on keerukam võrreldes TMR spektromeetriaga.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja töövahendid

3.1.1 Ainete alglahuste valmistamiseks kasutatavad töövahendid

Ainete alglahused valmistati 4 ml boorsilikaatklaasist viaalidesse. Tahked ained lisati spaatliga otse viaalidesse ning lahustid lisati kasutades automaatpipette. Titrantide alglahuste valmistamiseks kasutatavad tetrabutüülammoonium-soolasid hoiustati inertgaasi keskkonnas Mbraun UNILab kuivkapis. Titrandi soolad lisati viaalidesse kuivkapis. Kõik ained ja lahused kaaluti Sartorius CPA225D-0CE analüütilise kaaluga, mille lahutusvõime on 0,00001 g.

3.1.2 UV-Vis spektrofotomeeter

UV-Vis spektrofotomeetriteliseks mõõtmisteks kasutati kahekiirelist termostateeritud küvetihoidjaga Thermo Nicolet Evolution 300 spektrofotomeetrit. Spektrid registreeriti "intelliscan" režiimis. Selle režiimi korral muudab spektrofotomeeter skaneerimise kiirust vahemikus 120 nm/min kuni 1200 nm/min vastavalt sellele, kui tugevasti sõltub neelduvus lainepikkusest. Seega aeglustub skaneerimise kiirus automaatselt piigi alguse või lõpu juures, kus toimub neelduvuse järsk muutus. Spektrofotomeetri pilulaius oli 1,5 nm ja andmete kogumise samm oli 1 nm. Mõõtmised teostati 25 °C juures. Spektrofotomeetri tööd juhiti arvutist programmi VisionPro 2.03 abil. Proovi- ja võrdlusküvetidena kasutati kvartsist küvette, mille optiline teepikkus oli 1 cm. Prooviküveti sees asetses tefloniga kaetud magnetsegaja ja see oli suletud keeratava korgiga, milles oli tefloniga kaetud silikoonist septum. Retseptori lahuse lisamiseks kasutati Hamilton Gastight 100 µl süstalt ning titrandi lisamiseks automaatdosaatoriga varustatud Hamilton Gastight 100 µl süstlaid, mis võimaldavad lisada titranti 2 µl sammuga.

3.1.3 Tuumamagnetresonants-spektromeeter

Tuumamagnetresonants (TMR) –spektromeetriteliseks mõõtmisteks kasutati Bruker Ascend 700 TMR spektromeetrit. ¹H-spektrid mõõdeti sagedusel 700 MHz. TMR-spektromeetri tööd juhiti arvutist programmi TopSpin 3.2 abil ning spektrite töötlemiseks teostati antud programmiga automaatne Fourier' teisendus ning faasi- ja baasijoone korrektsioon. Vastavalt vajadusele varieeriti ühe spektri registreerimiseks kasutatavat skaneerimiste arvu vahemikus 16 kuni 40. TopSpin 3.2 programmiga leiti huvipakkuvate piikide maksimumid keemiliste nihete (ppm) skaalas. Kõik mõõtmised teostati 25 °C juures. Retseptorid viidi tahkel kujul

spaatliga otse 5 mm läbimõõduga boorsilikaadist tuubidesse. Automaatpipetiga lisati tuubidesse 700 µl solventi ning lahuste segamiseks kasutati mehaanilist segamist ning vajadusel ka ultraheli. Titranti lisamiseks kasutati automaatdosaatoriga varustatud Hamilton Gastight 100 µl süstlaid, mis võimaldavad lisada titranti 2 µl sammuga.

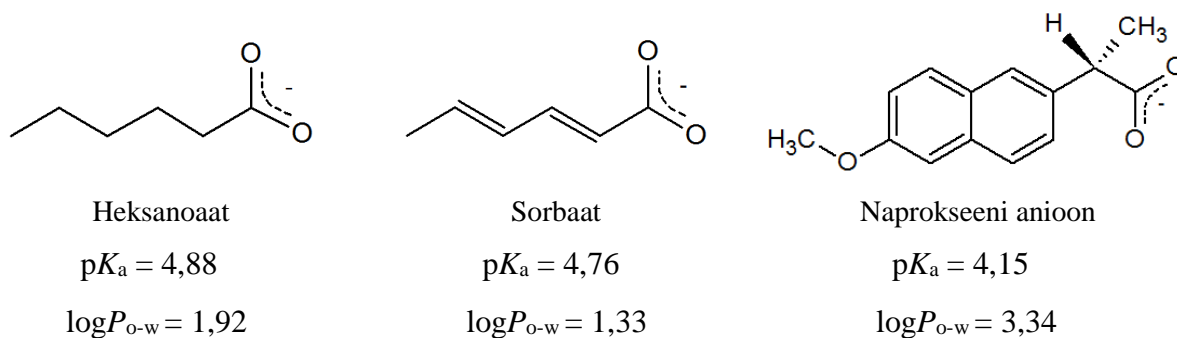
3.2 Kasutatud lahustid ja kemikaalid

Seondumiskonstantide mõõtmisel kasutati lahustina 0,5% veesisaldusega (m/m) dimetüülsulfoksiidi. DMSO valiti lahustiks kõrge polaarsuse ja suurepärase lahustavate omaduste tõttu. Kuigi vesikeskkond alandab seondumisafiinsust, siis väikese koguse vee lisamine orgaanilisele lahustile võimaldab parandada mõõtmiste korratavust, tagades hästi määratletud vee sisalduse solvendis.

UV-Vis spektromeetria korral kasutati lahusti valmistamiseks veevaba dimetüülsulfoksiidi (Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$) ning TMR mõõtmiste korral deutereeritud DMSO- d_6 (Sigma-Aldrich, 99,8%). Lahustid valmistati gravimeetriselt lisades dimetüülsulfoksiidile MilliQ Advantage A10 veepuhastist saadud kõrge (Type I) puhtusega vett. Lahustite täpne veesisaldus määrati kulonomeetrisel Karl Fisheri tiitrimisel (veesisalduse määramised viis läbi Rudolf Aro).

Titrantidena kasutati heksaanhapest (Reakhim „tshisty“), sorbiinhapest (*trans,trans*-2,4-heksadieenhape, Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$) ja naprokseenist ((+)-(*S*)-2-(6-metoksünaftaleen-2-üül)propanaat, Sigma-Aldrich, 98%) (Joonis 1) valmistatud tetrabutüülammoonium-soolaid. Soolade valmistamiseks segati kokku vastav karboksüülhape ja tetrabutüülammooniumhüdrosiid (1 M lahus metanoolis) 1:1 moolsuhtes. Seejärel eemaldati lahusti rotatsioonaurustiga.

Joonis 1. Uuritud anioonide struktuurid koos vastavate hapete pK_a ³²⁻³⁴ ja $\log P_{o-w}$ ³⁵ väärtustega.

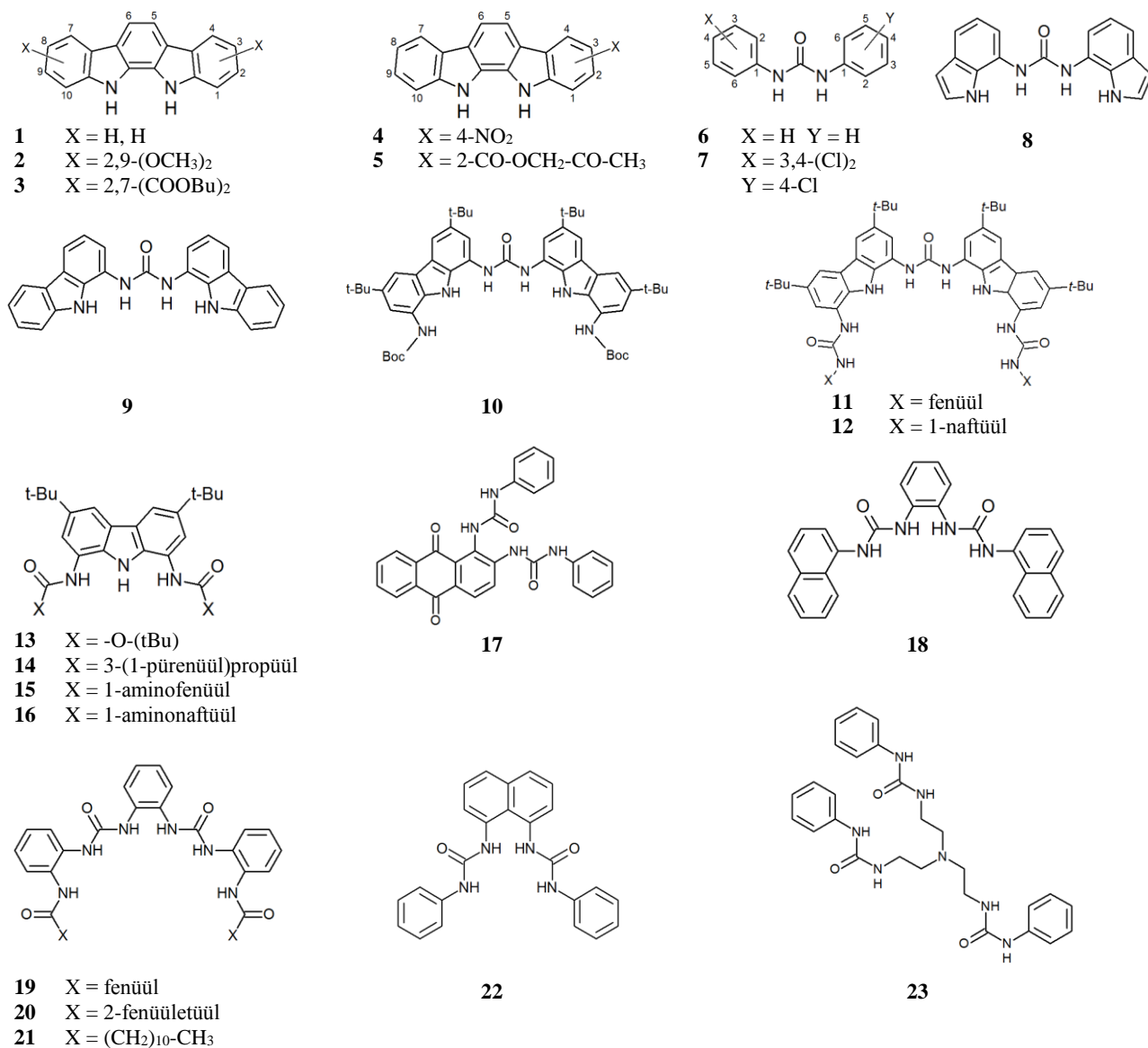


Titrandide korral oli oluline nende hea lahustuvus dimetüülsulfoksiidis ning UV-Vis mõõtmiste jaoks ka neelduvuse puudumine lainepikkuste vahemikus 240 kuni 600 nm. Tetrabutüülammoonium valiti vastaskatiooniks, kuna tegemist on suure katiooniga, mis ei anna tugevat vastasmõju karboksülaatiooniga ning seega avaldab minimaalset mõju karboksülaatiooni seondumisele retseptoritega. Tetrabutüülammooniumi on ka varasemalt anioonide seondumise uurimisel ulatuslikult vastaskatioonina kasutatud.^{36–39}

3.2.1 Uuritud retseptorid

Käesolevas töös uuriti 23 erinevat sünteetilist retseptorit (Joonis 2), mille struktuurid põhinesid urea-, indooli-, karbasooli- ja indolo[2,3-a]karbasooli (edaspidi lihtsalt indolokarbasool) fragmentidel.

Joonis 2. Käesolevas töös uuritud retseptorite struktuurid.



Retseptorid valiti lähtuvalt mitmest aspektist: varasemates mõõtmistes saadud tulemustest, huvipakkuvast struktuurist, lahustuvusest, spektraalomadustest ja kättesaadavusest. Retseptorid **1** kuni **7** ei võimalda oma lihtsa struktuuri tõttu märkimisväärselt selektiivsust anioonide suhtes ning need valiti eeskätt seondumisskaalade koostamise abistamiseks. Kuna need retseptorid annavad TMR spektris maksimaalselt kaks piiki, siis lihtsustab nende ühendite kaasamine seondumiskonstantide suhtelist mõõtmist.

Uuritud retseptoritest olid kaubanduslikult kättesaadavad 1,3-difenüüluurea (**6**) (Sigma-Aldrich, 98%) ja 3,4,4'-(Cl)₃-difenüüluurea (**7**) (Sigma-Aldrich, 99%). Philip Gale'i töörühmas Southamptoni ülikoolis sünteesiti retseptorid 1,3-bisindolüüluurea (**8**) ja 1,3-biskarbasolüüluurea (**9**).⁴⁰ Kõik järgnevad retseptormolekulid sünteesis Sandip A. Kadam meie töörühmast: indolokarbasool (**1**),²⁸ 2,9-dimetoksüindolokarbasool (**2**),²⁸ 2,7-(COOBu)₂-indolokarbasool (**3**),²⁸ 4-nitroindolokarbasool (**4**),²⁸ 2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasool (**5**),³⁰ RM-10 (**10**),³⁰ RM-11 (**11**),⁴¹ RM-12 (**12**),⁴¹ RM-13 (**13**),³⁰ RM-14 (**14**),³⁰ RM-15 (**15**) (seni avaldamata), RM-16 (**16**),³⁰ RM-17 (**17**),³⁰ RM-18 (**18**),³⁰ RM-19 (**19**),³⁰ RM-20 (**20**),³⁰ RM-21 (**21**),³⁰ RM-22 (**22**), RM-23 (**23**) (seni avaldamata).

3.3 Suhteliste seondumiskonstantide mõõtmine

Suhteliste seondumiskonstantide mõõtmiseks kasutati ¹H TMR-spektromeetrilist tiitrimist, kus titrandiks oli vastava aniooni tetrabutüülammooniumsoola lahus ja tiitritavas lahuses oli kolme kuni nelja erineva retseptori segu. Seega oli ühe mõõtmisega võimalik määrata suhtelised seondumiskonstandid kolme kuni nelja erineva retseptori vahel ning tulemuseks saadi vastavalt kolm või kuus $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust. Koos mõõdetavad retseptorid valiti selliselt, et nende -NH rühmade ¹H piigid enne aniooni lisamist ei kattuks ning piikide keemilise nihke muutuse kiirus ja ulatus tiitrimise käigus oleks sarnane, sest sellisel juhul väheneb piikide kattumise tõenäosus tiitrimise käigus. Retseptorite segu valmistati selliselt, et erinevate retseptorite kontsentratsioonid lahuses oleksid samas suurusjärgus (enamasti vahemikus 0,004 kuni 0,024 M). Selleks kaaluti TMR tuubi 1 kuni 6 mg iga retseptorit ning lisati 700 µl 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud DMSO-d₆. Titrandina kasutati vastava karboksülaatiooni (sorbaat, heksanoaat või naprokseeniooni) tetrabutüülammooniumsoola lahust. Valmistati kahe erineva kontsentratsiooniga titrandid: lahja titrant (0,4 kuni 0,6 M) ja kontsentreeritud titrant (0,9 kuni 1,3 M). Lahja titrandi lahuse valmistamiseks kaaluti viaali 0,16 kuni 0,28 g karboksülaadi soola ja sellele lisati 1,1 kuni 1,3 ml deutereeritud solventi. Kontsentreeritud

titrandi lahuse valmistamiseks kaaluti viaali 0,41 kuni 0,71 g karboksülaadi soola ja sellele lisati 0,7 kuni 1,2 ml deutereeritud solventi.

Esimene ^1H spekter registreeriti retseptorite segust enne titrandi lisamist. Sealjuures kontrolliti, et NH prootonite piigid oleksid piisava intensiivsusega neile iseloomulike keemiliste nihete väärtuste juures ning nad ei kattuks omavahel. Seejärel alustati lahja titrandi lisamisega ning pärast iga lisamist registreeriti ^1H spekter. Kui uuritavad retseptormolekulid olid ligemale 90% ulatuses komplekseerunud alustati kontsentreeritud titrandi lisamist ning sellega jätkati kuni praktiliselt kõik retseptormolekulid olid aniooniga kompleksi moodustanud. Kokku registreeriti 13 kuni 21 TMR spektrit. Seejärel leiti keemiliste nihete kaudu retseptor-anioon komplekside assotsiatsioonimäärad (β) igas etapis vastavalt valemile (7) ning neid kasutati valemis (8) $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtuste leidmiseks.

Sellisel segus mõõtmisel võib põhimõtteliselt esineda oht, et aniooni sidumise kõrval hakkavad lahuses olevad retseptormolekulid ka omavahel vastasmõjusid andma. Käesolevas töös võib selle ohu lugeda ebaoluliseks, sest uuritud anioonid on väga palju tugevamad vesiniksideme aktseptorid kui mistahes vesiniksideme-aktseptorsed tsentrid uuritud retseptorites ning ka solvent ise on tugev vesiniksideme aktseptor ja konkureerib tänu oma väga kõrgele kontsentratsioonile edukalt retseptormolekulidega.

3.4 Absoluutsete seondumiskonstantide mõõtmine

3.4.1 UV-Vis spektrofotomeetriline tiitrimine

Kõigepealt valmistati retseptori alglahus (6,3 kuni 8,5 mM), milleks kaaluti viaali 20 kuni 50 mg retseptorit ja lisati 1,0 kuni 2,8 ml 0,5% veesisaldusega (m/m) dimetüülsulfoksiidi. Saadud alglahusest tehti lahjendus (lõppkontsentratsiooniga vahemikus 0,8 kuni 2,4 mM) lisades viaali 0,1 kuni 0,5 g retseptori alglahust ja 0,5 kuni 2,2 ml solventi. Titrandina kasutati sarnaselt TMR spektromeetrilise tiitrimisega kahe erineva kontsentratsiooniga vastava karboksülaadi tetrabutüülammooniumsoola lahust. Kontsentreeritud titrandi lahuse (80 kuni 150 mM) valmistamiseks kaaluti viaali 0,10 kuni 0,34 g karboksülaadi soola ja sellele lisati 1,0 kuni 2,2 ml solventi. Lahja titrandi lahuse (9,3 kuni 25 mM) valmistamiseks kaaluti viaali 0,05 kuni 0,11 g kontsentreeritud titrandi lahust ja sellele lisati 0,6 kuni 1,5 ml solventi.

UV-Vis spektrofotomeetriline tiitrimine viidi läbi ($25,0 \pm 0,3$) °C juures. Võrdlusküvetis oli kogu mõõtmise ajal puhas lahusti. Mõõteküveti lisati esmalt 1,75 ml lahustit ja registreeriti

spekter, et veenduda, et lahusti ei neela analüütilises lainepikkuste vahemikus. Seejärel korrigeeriti lahusti baasijoon. Kuvetti lisati 60 kuni 160 μl lahjendatud retseptori lahust ning retseptori kontsentratsioon küvetis jäi vahemikku $3 \cdot 10^{-5}$ M kuni $11 \cdot 10^{-5}$ M. Registreeriti vaba retseptorimolekuli spekter ja seejärel alustati lahja titrandi lisamisega. Pärast iga lisamist küvett kaaluti ning registreeriti spekter. Tiitrimise lõppfaasis alustati kontsentreeritud titrandi lisamisega kuni praktiliselt kogu lahuses olev retseptor oli komplekseerunud ning viimasena registreeriti retseptor-anioon kompleksi spekter. Kokku registreeriti ühe tiitrimise käigus 19 kuni 21 spektrit. Täpne lisatud titrandi kogus arvutati kaalumisanalüüsist ning kompleksi dissotsiatsioonimäärad arvutati spektritelt leitud neelduvuste abil valemiga (10).

Retseptori absoluutne seondumiskonstant leiti vähemalt kahe kordusmõõtmise keskmisest, kusjuures iga üksiku mõõtmise tulemus leiti kahe erineva meetodiga arvutatud $\log K_{\text{ass}}$ väärtustest (lisa 1).

3.4.2 Tuumamagnetresonants-spektromeetriline tiitrimine

Ka absoluutsete seondumiskonstantide mõõtmiseks kasutati ^1H TMR-spektromeetrilist tiitrimist. Titrandiks oli vastava aniooni tetrabutüülammooniumsoola lahus, kuid erinevalt suhtelistest mõõtmistest tiitriti vaid ühe retseptori lahust. Selleks kaaluti TMR tuubi 2 kuni 3 mg retseptorit ning lisati 700 μl 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud DMSO- d_6 . Titrandina kasutati vastava karboksülaatiooni (heksanoaat või naprokseeni aniooni) tetrabutüülammooniumsoola lahust. Valmistati kahe erineva kontsentratsiooniga titrandid: lahja titrant (0,1 kuni 0,3 M) ja kontsentreeritud titrant (0,3 kuni 1,1 M).

Esimene ^1H spekter registreeriti retseptorilahusest enne titrandi lisamist ning kontrolliti, et NH prootonite piigid oleksid piisava intensiivsusega neile iseloomulike keemiliste nihete väärtuste juures. Seejärel alustati lahja titrandi lisamisega ning pärast iga lisamist registreeriti ^1H spekter. Kui uuritav retseptor oli ligemale 90% ulatuses komplekseerunud alustati kontsentreeritud titrandi lisamist ning sellega jätkati kuni praktiliselt kõik retseptormolekulid olid aniooniga kompleksi moodustanud. Kokku registreeriti 13 kuni 14 TMR spektrit. Seejärel leiti keemiliste nihete kaudu retseptor-anioon kompleksi assotsiatsioonimäärad (β) igas etapis vastavalt valemile (7). Retseptori absoluutne seondumiskonstant leiti vähemalt kahe kordusmõõtmise keskmisest, kusjuures iga üksiku mõõtmise tulemus leiti kahe erineva meetodiga arvutatud $\log K_{\text{ass}}$ väärtustest.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Retseptorite afiinsusskaalade koostamine

Käesolevas töös mõõdeti kokku 145 $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust 23 erineva retseptoriga ning kolme aniooniga: sorbaat-, heksanoaat- ja naprokseeniooniga. Kõik suhtelise seondumisafiinsuse mõõtmised viidi läbi ^1H TMR spektromeetrilise tiitrimise meetodiga kasutades lahustina 0,5% veesisaldusega deutereeritud DMSO- d_6 lahust. Veendumaks saadud tulemuste omavahelises kooskõlas koostati iga aniooni jaoks retseptorite afiinsuste skaala, mis sisaldab arvukalt ülekattuvaid (ring-valideerivaid) mõõtmisi (tabelid 2, 3 ja 4). Skaala iga nool vastab ühele suhtelise seondumisafiinsuse mõõtmise tulemusele ehk $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtusele kahe retseptori vahel. Iga retseptorit on mõõdetud vähemalt kahe muu retseptori vastu, mis tähendab, et iga ühend on skaalasse seotud vähemalt kahe erineva $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtuse kaudu. Iga lisanduv mõõtmine täiendab skaalat vähemalt kolme noolega ning panustab skaala ring-valideerimisse.⁴²

Ühendite absoluutsete seondumiskonstantide leidmiseks oli vajalik skaalad ankurdada ning selleks viidi läbi absoluutmõõtmised nelja erineva ankur-retseptori, indolokarbasooli (**1**), 4-nitroindolokarbasooli (**4**), 2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasooli (**5**) ja 1,3-biskarbasolüüluureaga (**9**). Iga ankur-retseptori absoluutsete seondumiskonstantide leidmiseks teostati vähemalt kaks mõõtmist ning vajadusel ka eri meetoditega ning leiti saadud tulemuste aritmeetiline keskmine ning selle usaldusvahemikud (tabel 5).

Ülejäänud skaalat moodustavate retseptorite absoluutsed seondumiskonstandid leiti minimeerides järgneva valemiga leitavat väärtust SS , mis vastab eksperimentaalselt mõõdetud $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtuste ja määratud $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste erinevuste ruutude summale.⁴³

$$SS = \sum_{i=1}^{n_m} \left\{ \Delta\log K_{\text{ass}}^i - \left[\log K_{\text{ass}}(\text{R}_2\text{HA}^-) - \log K_{\text{ass}}(\text{R}_1\text{HA}^-) \right] \right\}^2 \quad (12)$$

, kus SS on leitud summana üle kõigi n_m mõõtmiste ning $\Delta\log K_{\text{ass}}^i$ on i -ndas mõõtmises leitud suhteline seondumiskonstant kahe retseptori R_1H ja R_2H vahel. SS minimeerimiseks varieeritakse kõikide kaasatud retseptorite, välja arvatud ankurdamiseks kasutatud retseptorid, jaoks määratud absoluutsete seondumiskonstantide $\log K_{\text{ass}}(\text{R}_j\text{HA}^-)$ väärtuseid. Eelnevalt kirjeldatud vähimruutude meetodiga leitud absoluutsete ja eksperimentaalselt mõõdetud suhteliste seondumiskonstantide omavahelise sobivust ehk kooskõllalisust saab hinnata nn

kooskõlalise standardhälbe (kooskõlalispärametri) s kaudu, mis on leitav järgneva valemiga:

$$s = \sqrt{\frac{SS}{n_m - n_c}} \quad (13)$$

, kus n_m on $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste arv ja n_c on leitud absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste arv. Kooskõlalise standardhälvet saab käsitleda kui $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste keskmist standardhälvet.

Heksanoaadi seondumisskaala koostamiseks mõõdeti kokku 48 $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtust 23 erineva retseptori vahel. Skaala ulatus on 2,59 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut. Kooskõlalispärametri s väärtuseks on 0,006 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut, mis näitab saadud tulemuste väga head kooskõla.

Tabel 2. Heksanoaadi seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	$\Delta \log K_{\text{ass}}$	
12	5.22	0.01	0.04		
11	5.20	0.01	0.04		
16	5.08	0.01	0.04		
10	4.92	0.01	0.04	-0.41	
1,3-biskarbasooliüluurea 9	4.83	0.01	0.04	0.40	
	15	4.83	0.01	0.04	0.25
	8	4.81	0.01	0.04	0.28
	23	4.27	0.01	0.04	0.12
	7	4.15	0.02	0.04	0.04
	22	4.12	0.01	0.04	-0.02
	21	4.08	0.01	0.04	-0.03
	18	4.00	0.01	0.04	-0.03
	20	3.96	0.01	0.04	0.77
	4-NO ₂ -indolokarbasool 4	3.83	0.01	0.04	0.04
3	3.81	0.01	0.04	0.02	
19	3.70	0.01	0.04	0.76	
14	3.62	0.01	0.04	0.85	
5	3.57	0.01	0.04	0.15	
6	3.31	0.01	0.04	0.74	
indolokarbasool 1	3.24	0.01	0.04	0.81	
	17	3.23	0.01	0.04	0.86
2	3.19	0.01	0.04	0.99	
13	2.63	0.01	0.04	0.98	

^a Lahusti: TMR spektromeetrite mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud DMSO-d₆ lahus. UV-Vis spektrofotomeetrite mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) DMSO lahus. Skaala ankurdamiseks viidi läbi absoluutmõõtmised kursiivis märgitud retseptormolekulidega.

^b Esimese arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud.

^c Teise arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud.

Sorbaadi seondumisskaala koostamiseks mõõdeti 45 $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust 23 erineva retseptori vahel. Skaala ulatus on 2,57 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalisusparameeter $s = 0,005 \log K_{\text{ass}}$ ühikut. Seega on ka sorbaatiooniga mõõdetud $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtuste vahel väga hea kooskõla.

Tabel 3. Sorbaadi seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	$\Delta\log K_{\text{ass}}$
12	5.02	0.01	0.05	
11	4.89	0.01	0.05	
16	4.78	0.01	0.05	0.39 0.39 0.40 0.27
8	4.63	0.01	0.05	0.15 0.17
15	4.62	0.01	0.05	0.00 0.01 0.02 0.00 0.19
<i>1,3-biskarbasolüüluurea 9</i>	4.62	0.01	0.05	-0.19
10	4.44	0.01	0.05	1.25 1.12 0.79
7	4.07	0.01	0.05	0.65 0.78 0.86 0.86
23	4.06	0.01	0.05	0.10
21	3.98	0.01	0.05	0.24
22	3.95	0.01	0.05	1.13
18	3.84	0.01	0.05	0.56 0.55
20	3.82	0.01	0.05	0.47 0.44 0.86
<i>4-NO₂-indolokarbasool 4</i>	3.77	0.01	0.05	0.03 0.76
3	3.74	0.02	0.06	-0.31
19	3.55	0.01	0.05	0.56 0.07
5	3.51	0.01	0.05	0.54 0.65 0.35
14	3.48	0.01	0.05	-0.24 0.32 0.32 0.62 0.28
6	3.28	0.01	0.05	0.08 0.28
<i>indolokarbasool 1</i>	3.20	0.01	0.05	0.05 0.28
2	3.15	0.03	0.06	0.09 0.72
17	3.08	0.01	0.05	-0.66
13	2.45	0.01	0.05	

^a Lahusti: TMR spektromeetriseliste mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud DMSO-d₆ lahuse. UV-Vis spektrofotomeetriseliste mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) DMSO lahuse. Skaala ankurdamiseks viidi läbi absoluutmõõtmised kastikesega kursiivis märgitud retseptormolekulidega.

^b Esimese arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud.

^c Teise arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud.

Naprokseeni anooni seondumisskaala koostamiseks mõõdeti 52 $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust 23 erineva retseptori vahel. Skaala ulatus on 2,23 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalisusparameeter $s = 0,005 \log K_{\text{ass}}$ ühikut. Seega on ka naprokseeni aniooniga mõõdetud $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtuste vahel väga hea kooskõla.

Tabel 4. Naprokseeni aniooni seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	$\Delta \log K_{\text{ass}}$
9	4.79	0.01	0.04	
12	4.78	0.01	0.04	
11	4.74	0.01	0.04	0.09 0.10 0.09 -0.16 0.18
8	4.69	0.01	0.04	0.07 0.09
15	4.63	0.01	0.04	
16	4.61	0.01	0.04	0.96
10	4.46	0.01	0.04	1.12
22	3.99	0.01	0.04	1.21-1.19 1.18
7	3.98	0.01	0.04	
23	3.97	0.01	0.04	1.09 -0.02 1.36 1.08 1.14
21	3.84	0.02	0.04	1.27
18	3.73	0.01	0.04	0.32
20	3.68	0.01	0.04	1.03 0.56 -0.25
4-NO ₂ -indolokarbasool 4	3.67	0.01	0.04	1.33 0.54 0.08 0.86 0.80 0.86 0.84 0.29
3	3.60	0.01	0.04	
14	3.59	0.01	0.04	
19	3.48	0.01	0.04	0.34 0.49 0.60
RM-5	3.43	0.01	0.04	0.18 0.46 0.35 0.44 0.30 0.31 0.12 0.06
6	3.25	0.01	0.04	-0.13 -0.12 0.31 0.31
17	3.19	0.01	0.04	0.10 0.10 0.58 0.12 0.06
indolokarbasool 1	3.13	0.01	0.04	
2	3.04	0.01	0.04	0.49
13	2.56	0.01	0.04	

^a Lahusti: TMR spektromeetriliste mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud DMSO-d₆ lahus. UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste korral 0,5% veesisaldusega (m/m) DMSO lahus. Skaala ankurdamiseks viidi läbi absoluutmõõtmised kursiivis märgitud retseptormolekulidega. ^b Esimese arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud. ^c Teise arvutusmeetodiga leitud standardmääramatuse hinnangud.

Tabel 5. Ankur-retseptorite – indolokarbasooli, 4-nitroindolokarbasooli, 1,3-biskarbasooli ja RM-5 $\log K_{\text{ass}}$ väärtused.

Anioon	Indolokarbasool					
	Abs $\log K_{\text{ass}}^a$	s^b	n^b	CI (95%) ^b	Abs $\log K_{\text{ass}}$ skaalalt ^c	Erinevus ^c
<i>Heksanoaat</i>	3,27	0,02	3	0,05	3,24	-0,03
<i>Sorbaat</i>	3,14	0,01	2	0,07	3,20	0,06
<i>Naprokseeni anioon</i>	3,15	0,07	4	0,10	3,14	-0,01
	4-nitroindolokarbasool					
<i>Heksanoaat</i>	3,81	0,04	2	0,36	3,83	0,02
<i>Sorbaat</i>	3,79	0,01	2	0,05	3,77	-0,02
<i>Naprokseeni anioon</i>	3,66	0,01	2	0,09	3,68	0,02
	1,3-biskarbasooliüluurea					
<i>Heksanoaat</i>	4,82	0,01	2	0,10	4,83	0,01
<i>Sorbaat</i>	4,67	0,02	2	0,15	4,62	-0,05
	RM-5					
<i>Naprokseeni anioon</i>	3,43	0,01	2	0,09	3,44	0,01

^a $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on sõltumatute mõõtmiste aritmeetilised keskmised. ^b Kordusmõõtmiste standardhälbed, mõõtmiste arvud ja keskmiste väärtuste usaldusvahemikud 95% tõenäosusega. ^c Vähimruutude meetodil skaalalt leitud $\log K_{\text{ass}}$ väärtused sama retseptori jaoks ning eksperimentaalselt ja vähimruutude meetodil leitud $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste erinevus.

Võrreldes varasemates töödes suhteliste UV-Vis mõõtmistega saadud tulemustega ($s = 0,02\text{--}0,03 \log K_{\text{ass}}$ ühikut) on TMR suhteliste mõõtmiste kooskõlalispärametrid ligikaudu ühe suurusjärgu võrra madalamad ($s = 0,005\text{--}0,006 \log K_{\text{ass}}$ ühikut). Tänu antud töös saadud tulemuste heale kooskõlale on võimalik omavahel eristada retseptoreid, mille seondumistugevuse erinevus on vaid $0,05 \log K_{\text{ass}}$ ühikut, mis on tunduvalt parem eristusvõime võrreldes absoluutmõõtmistega.

4.1.1 Üksikute $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramatuse hindamine

Kuigi kooskõlalispärametri s kaudu saab hinnata $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste keskmist standardhälvet ning seega iseloomustada kogu seondumisskaalat, ei ole antud pärametri kaudu võimalik hinnata üksikute $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramatust. Kuna erinevaid määramatust põhjustavaid tegureid (kõrvalreaktsioonid, ebapuhtus, aktiivsuskoeffitsientide määramine) on keeruline kvantiseerida,²⁷ siis on klassikalisel ISO GUM meetodil määramatuse hindamine raskendatud. Seega on antud töös üksikute $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramatuse leidmiseks kasutatud järgnevat valemit:

$$u_c(\log K_{\text{ass}}) = \sqrt{u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})^2 + u(\text{ankurdamine})^2 + u(\text{süsteem})^2} \quad (14)$$

, kus $u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})$ iseloomustab suhteliste mõõtmiste juhuslikke efekte, $u(\text{ankurdamine})$ iseloomustab skaala ankurdamisest tekkivaid juhuslikke efekte ja $u(\text{süsteem})$ väljendab ankurühendite absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmisel esinevaid süstemaatilisi efekte. Määramatuse komponendi $u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})$ väärtuseks võetakse üksiku retseptormolekuli $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmiste aritmeetilise keskmise standardhälve. $u(\text{ankurdamine})$ väärtuseks võetakse ankurainete eri päevadel ja eri meetoditega leitud absoluutsete K_{ass} väärtuste standardhälve. Arvestades meie töögrupi pikaajalist kogemust sarnaste mõõtmistega võeti $u(\text{süsteem})$ väärtuseks $0,03 \log K_{\text{ass}}$ ühikut.

Absoluutsete seondumiskonstantide mõõtemääramatuseid arvatati kahel viisil. Esimese korral võeti võrrandi (14) teine ja kolmas liige võrdseks nulliga ning määramatus arvatati vaid esimese liikme ehk $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmiste standardhälbe kaudu. Selliselt arvatatud mõõtemääramatused kirjeldavad kui täpselt on suhtelise mõõtmismeetodiga võimalik $\log K_{\text{ass}}$ väärtusi mõõta ning sobivad samal skaalal olevate $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste võrdlemiseks. Teisel juhul võeti määramatuse arvutamisel arvesse ka ankurdamisest tulenevaid juhuslikke efekte ning ankurühendite $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmisest tekkinud süstemaatilisi efekte. Selliselt leitud mõõtemääramatused kirjeldavad kui täpselt on antud lahustis võimalik $\log K_{\text{ass}}$ väärtusi mõõta

ning sobivad erinevates töögruppides mõõdetud $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste võrdlemiseks. Mõlema arvutusmeetodiga saadud määramatuse hinnangud on toodud tabelites 2, 3 ja 4.

4.2 Anioonide aluselise mõju seondumisafiinsusele

Olukorras, kus vesiniksidemete moodustumine karboksülaatrühmaga on peamine aniooni ja retseptori vaheline vastasmõju, määrab seondumisafiinsuste erinevuse eelkõige aniooni aluselise. Mida aluselisem on anioon (mida kõrgem on vastava happe pK_a), seda tugevama vesiniksideme aktseptoriga on üldiselt tegemist ja seda kõrgem on seondumisafiinsus ($\log K_{\text{ass}}$). Seega alaneb seondumisafiinsus reas heksanoaat > sorbaat > naprokseeni anioon. Lihtsama struktuuriga retseptorite korral (**1** kuni **7**) põhinebki selektiivsus peamiselt ainult aniooni aluselisel. Selleks, et seondumisafiinsuse tugevus sõltuks lisaks aluselisele ka aniooni struktuurist, on vajalik täiendavate vastasmõjude teke retseptori ja aniooni teiste struktuurifragmentide vahel.

Kuigi heksanoaadi ja sorbaadi pK_a väärtused on üsna lähedased (vastavalt 4,88 ja 4,76), on nende seondumisafiinsuste erinevus retseptoritele suurem kui võiks pK_a väärtuste järgi eeldada. Sorbaat ja heksanoaat erinevad teineteisest kaksiksidemete poolest, mistõttu on sorbaat kui konjugeeritud süsteemiga molekul oluliselt polariseeritavam kui heksanoaat. Võimalik seletus sorbaadi madalamale seondumisafiinsusele on see, et sorbaadi ja DMSO kui kõrgelt polariseeritava lahusti vahel on tugevamad dispersioonijõud kui heksanoaadiga. Täiendavate stabiliseerivate vastasmõjude tõttu on sorbaat paremini lahusti molekulide poolt solvateeritud ning seondumine retseptoritele nõrgem.⁴⁴ See seletab ka, miks sorbaadi ja heksanoaadi seondumise erinevus on suurim just mahukate kõrvalahelatega retseptorite korral nagu **10**, **11**, **12** ja **16**. COSMO-RS geomeetriatest selgub, et sorbaadi ahel paigutub üsnagi seondumistasku sisemuses, mistõttu lahustil pole võimalik piisvalt stabiliseerivaid vastasmõjusid anda. Lihtsama struktuuriga retseptorite korral nagu **8**, **9** ja **15** on sorbaadi ahel lahusti molekulide poolt ümbritsetud ning seega ka vastav retseptor-anioon kompleks rohkem stabiliseeritud.

4.3 Retseptorite ja anioonide struktuuri mõju seondumisafiinsusele

Retseptori seondumisafiinsust anioonile mõjutab eelkõige $-NH$ rühmade arv, paigutus ja happelisus. Mida rohkem $-NH$ rühmi aniooniga vesiniksidemeid moodustab, seda tugevam on retseptor-anioon seondumine. Jooniselt 3 on näha, et nelja kuni kaheksa $-NH$ rühmaga retseptorid (**8-12**, **15**, **16** jne) seovad anioone üldjuhul kõrgema afiinsusega kui kahe kuni kolme $-NH$ rühmaga retseptorid (**1**, **2**, **13**, **14** jne). Samas pole mõtet molekulis $-NH$ rühmade

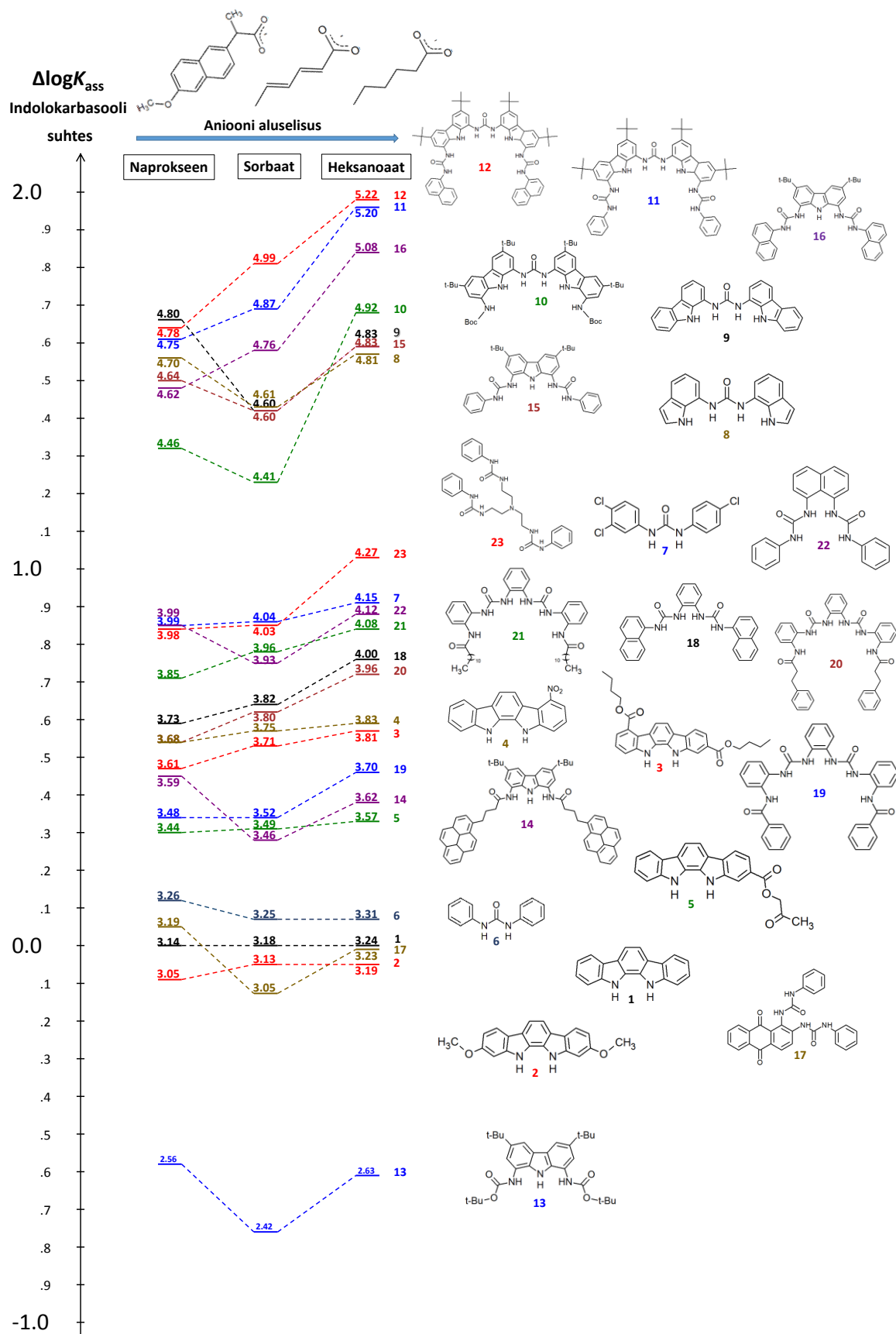
arvu üle mõistlikkuse piiri suurendada, kuna nad kõik ei saa osaleda vesiniksideme moodustamises. Lisaks suurendaks see samanimeliste laengute omavahelist tõukumist seondumistaskus ning ka kahe aniooni seondumise tõenäosust ühe retseptori seondumistaskusse.

Tugevat seondumist anioonidega soodustavad seondumistaskud, mis põhinevad karbasooli või indooli kombinatsioonil uurearühmaga (**8-12**, **15** ja **16**). Lisaks suurele –NH rühmade arvule on seondumistaskus vesiniksideme doonorite paigutus karboksülaatide seondumiseks soodne, kuna jäiga struktuuri tõttu paiknevad –NH rühmad ühel tasandil. Seevastu benseeni ja uurearühmade kombinatsioonil põhinevad retseptorid (**18-21**) ei ole nii jäiga struktuuriga ning –NH rühmad ei paikne ühel tasandil, sest pööravad sisemolekulaarsete vesiniksidemete moodustamiseks end seondumistaskust väljapoole. Lisaks sellele on vähem jäiga struktuuriga vabadel retseptoritel rohkem võimalikke konformeere, kuid kompleksil on võimalike konformeeride arv piiratum. Sellest tuleneb seondumisel suurem kadu entroopiaefektis ning kompleksi moodustumine on vabaenergia skaalas ebasoodsam. Ebasoodsa paigutuse tõttu on tekkivad vesiniksidemed nõrgemad ning seega on anioonide seondumisafiinsused madalamad võrreldes retseptoritega **8-12**, **15** ja **16**.

–NH rühmade happelisust mõjutavad erinevad elektronaktseptorsed ja/või elektronegatiivsed rühmad. Näiteks elektronegatiivsed klororühmad 3,4,4'-(Cl)₃-difenüüluureal (**7**) muudavad –NH rühmad happelisemaks ning retseptor seob anioone keskmiselt 0,8 log K_{ass} ühiku võrra tugevamini kui 1,3-difenüüluurea (**6**). Vastupidine efekt on 2,9-dimetoksüindolokarbasoolil (**2**), kus elektrondonorsed metoksürühmad muudavad ühendi vähem happeliseks ning seondumisafiinsus on keskmiselt 0,05 log K_{ass} ühiku võrra madalam võrreldes indolokarbasooliga (**1**).

Lisaks –NH rühmadele mõjutab seondumisafiinsust ka retseptori kõrvalahelate struktuur. Külgahelatega retseptorid, mis moodustavad aniooni ümber seondumistasku (näiteks retseptorid **10-12**), võimaldavad täiendavate vastasmõjude teket. Sellisel juhul ilmnevad erinevused seondumisafiinsuse reas, mida iseloomustavad joonte ristumised joonisel 3. Kuna kõik uuritud retseptorid on siiski küllaltki lihtsa struktuuriga, siis on need log K_{ass} väärtuste erinevused küllaltki väikesed, kuid on tuvastatavad tänu suhteliste TMR mõõtmiste väga kõrgele täpsusele.

Joonis 3. Naprokseeni aniooni, sorbaadi ja heksanoaadi seondumisafiinsuste võrdlus 23 sünteetilise retseptoriga. Indolokarbasooli (**1**) $\log K_{\text{ass}}$ väärtus on iga aniooni jaoks võetud nullpunktiks ja joonte asukohad on leitud selle suhtes. Joontel olevad $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on seondumisskaaladelt leitud absoluutsed seondumiskonstandid.



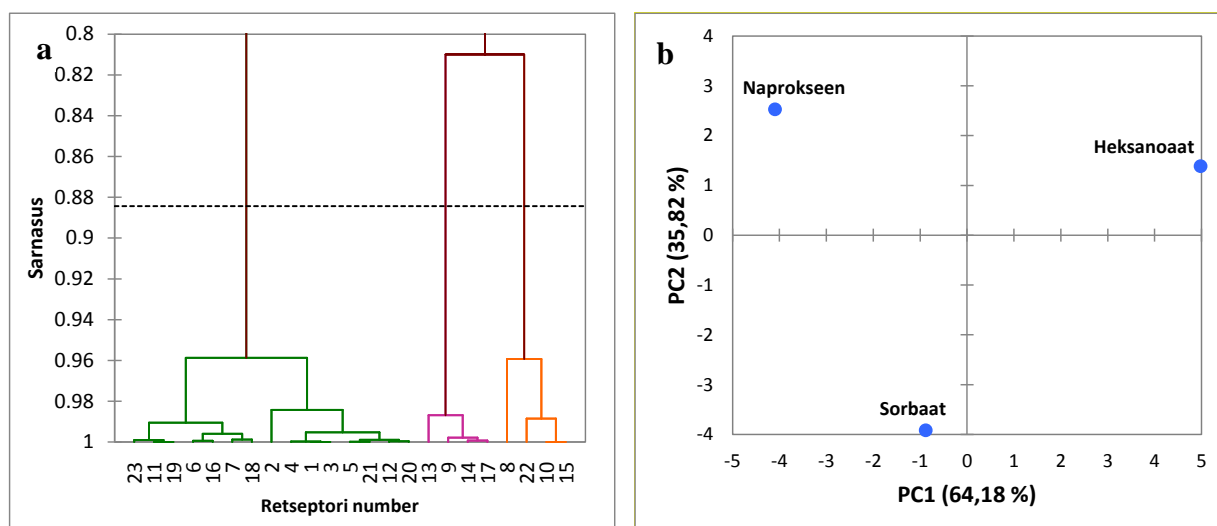
Et paremini illustreerida retseptorite ja anioonide struktuurist tulenevaid seondumisafiinsuste erinevusi on joonis 3 koostatud suhtelisel skaalal. Iga aniooni $\log K_{\text{ass}}$ väärtus indolokarbasooli (**1**) suhtes on võetud selle aniooni nullpunktiks ning joonte asukohad joonisel viitavad $\log K_{\text{ass}}$ väärtustele indolokarbasooli suhtes. Sellisel moel nivelleerub aniooni aluselise mõju seondumisafiinsusele kõigi kolme aniooni korral samale tasemele ning seeläbi on võimalik paremini visualiseerida ülejäänud tegurite mõju.

Jooniselt 3 on näha, et sarnase struktuuriga retseptorid võivad seondumisel erinevalt käituda. Näiteks retseptorid **11** ja **12** seovad anioone üsna sarnaselt. Mõlemad retseptorid moodustavad pikkade π -vastasmõjusid andvate kõrvalrühmade tõttu tsüklilise struktuuri, kuhu anioonid sisse ei mahu ning seundumine toimub retseptorite tasapinnaga risti. Steeriline takistus on mõlema retseptori korral sarnane, mistõttu seob kõiki anioone tugevamalt retseptor **12**, kus fenüülrühmadest elektronegatiivsemad naftüülrühmad muudavad $-\text{NH}$ rühmad happelisemaks. Seevastu retseptorite **15** ja **16** korral ilmneb erinevus naprokseeni sidumisel. COSMO-RS geomeetria arvutustest (lisa 2) selgub, et retseptori **15** fenüülrühmad on teineteisest piisavalt kaugel, et naprokseeni anioon saab $-\text{NH}$ rühmadega moodustada viis küllaltki lineaarse geomeetriaga vesiniksidet. Retseptori **16** korral paigutuvad naftüülrühmad üksteisele tunduvalt lähemal ning steerilise takistuse tõttu pöördub naprokseeni anioon selliselt, et tekib viis vähem lineaarse geomeetriaga vesiniksidet.

Lisaks retseptorile **15** eristuvad kõrge seondumisafiinsusega retseptorite hulgast ka retseptorid **8**, **9** ja **10**, kuna nad seovad naprokseeni aniooni tugevamalt kui sorbaati. Retseptoritel **8** ja **9** pole mahukaid kõrvalahelaid, mistõttu on steeriline takistus madal. Retseptor **10** sarnaneb retseptoriga **13**, kuna mõlemad sisaldavad kõrvalahelates *tert*-butüüloksükarbonüülrühma (boc). Kuigi retseptori **13** seondumisafiinsus on $-\text{NH}$ rühmade vähesuse ja ebasoodsa paigutuse tõttu kõigist käesolevas töös uuritud retseptoritest madalaim, seob see sarnaselt retseptorile **10** naprokseeni aniooni tugevamalt kui sorbaati. COSMO-RS meetodil arvutatud geomeetriaest selgub, et boc-rühmade tõttu ei mahu anioonid seondumistaskusse ning peavad paigutama selliselt, et anioonide „sabad“ paiknevad retseptorite tasapinnaga risti. Sorbaadi ja heksanoaadi korral tähendab see, et nurk, mille all anioonid annavad vesiniksidemeid, ei ole optimaalne ning sidemete tugevus pole maksimaalne. Seevastu naprokseeni aniooni naftüülrühm paikneb karboksüülrühma suhtes sellise nurga all, et lineaarse geomeetriaga vesiniksidemete korral paikneb see retseptori tasapinnaga ligikaudu risti. Seega võimaldab naprokseeni aniooni struktuur anda lineaarse geomeetriaga vesiniksidemeid ka steeriliselt mõnevõrra koormatud seondumistasku korral.

Retseptorite omavahelist sarnasust illustreerib klasteranalüüsi tulemusel saadud joonis 4a, kus retseptorid on jaotatud gruppidesse sõltuvalt sellest, kuidas nad seovad eri anioone. Suures plaanis on retseptorid jaotatud kolme klastrisse, millest suurimasse (vasakpoolsesse) kuuluvad retseptorid, mis seovad anioone eelkõige sõltuvalt nende aluselisusest. Sellesse gruppi kuuluvad retseptorid, millel kas puuduvad kõrvalahelad (**1-5, 7**) või ei võimalda kõrvalahelad anda selektiivseid vastasmõjusid anioonidega (**11, 12, 18-21, 23**). Kahte ülejäänud klastrisse kuuluvad retseptorid, mis seovad naprokseeni tugevamalt kui sorbaati, kusjuures keskmises klastris olevad retseptorid (**9, 13, 14, 17**) seovad indolokarbasooli suhtes nivelleeritud skaalal naprokseeni aniooni ka heksanoaadist tugevamalt.

Joonis 4. Retseptorite klaster- ja peakomponentide analüüs.



a: absoluutsetel seondumiskonstatidel põhinev 23 retseptori klasteranalüüs **b:** peakomponentide analüüs (PCA), mille sisendiks on indolokarbasooli suhtes nivelleeritud anioonide seondumiskonstandid 23 retseptoriga.

Joonisel 4b on toodud suhteliste seondumisafiinsuste andmete põhjal koostatud peakomponentide analüüs (PCA). Peakomponent 1 (PC1) kirjeldab 64,18% ja peakomponent 2 (PC2) kirjeldab 35,82% kogu variatiivsusest. Anioonide paigutust analüüsidest võib järeldada, et peakomponent 1 (PC1) iseloomustab aniooni aluselisust, kus kõige aluselise anioon, heksanoaat, asub graafiku paremas servas. Peakomponent 2 (PC2) iseloomustab aniooni hüdrofiilsuse kasvu, kus naprokseen kui kõige hüdrofoobsem anioon asub üleval ja hüdrofiilsem anioon, sorbaat, asub graafiku all osas.

Lähedaste retseptor-anioon seondumisafiinsuste eristamine TMR meetodil

Juuli Nõges

5. Kokkuvõte

Käesolevas töös mõõdeti sorbaadi, heksanoaadi ja naprokseeni aniooni seondumisafiinsused ($\log K_{\text{ass}}$) 23 uurea, indooli, karbasooli ja indolokarbasooli fragmentidel põhinevatele sünteetilistele retseptoritele. Kokku määrati 69 absoluutset seondumiskonstanti. Esmalt mõõdeti tuumamagnetresonants (TMR)-spektromeetrilise tiitrimise meetodil seondumisafiinsuste erinevused ($\Delta \log K_{\text{ass}}$) retseptorite vahel ning koostati saadud tulemustest igale anioonile kooskõlaline seondumisskaala. Absoluutsete seondumisafiinsuste ($\log K_{\text{ass}}$) määramiseks mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetrilise või TMR-spektromeetrilise tiitrimise meetoditega absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused kolme erineva ankur-retseptoriga ning saadud tulemusi kasutati seondumisskaala ankurdamiseks. UV-Vis spektrofotomeetrilised ja TMR-spektromeetrilised mõõtmised viidi läbi vastavalt 0,5% veesisaldusega dimetüülsulfoksiidis või deutereeritud dimetüülsulfoksiidis.

Heksanoaadi, sorbaadi ja naprokseeni aniooni seondumisskaalade ulatus on vastavalt 2,59, 2,57 ja 2,23 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalisusparameetri s väärtused on vahemikus 0,005-0,006 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut. Saadud tulemused näitavad väga head kooskõla erinevate $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste vahel, mis on saavutatud tänu TMR-meetodi väga kõrgele täpsusele. Seetõttu on käesolevas töös võimalik eristada seondumisafiinsusi, mis erinevad teineteisest vaid 0,05 $\log K_{\text{ass}}$ ühiku võrra.

Seondumisskaaladelt leitud $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste põhjal koostati kõiki mõõdetud anioone ja retseptoreid sisaldav seondumisafiinsuste trendide skeem. Skeemi alusel on võimalik teha järeldusi retseptorite ja anioonide struktuuri ja seondumisafiinsuste vahelistest seostest. Seondumiskonstantide põhjal teostati ka peakomponentide analüüs, kus on näha, et kasutatud retseptorid suudavad anioone eristada nende aluselise ja hüdrofoobsuse/hüdrofiilsuse põhjal.

Differentiation of similar receptor-anion binding affinities using an NMR based method

Juuli Nõges

6. Summary

In the current thesis, the binding affinities ($\log K_{\text{ass}}$) of sorbate, hexanoate and naproxen anion were measured towards 23 urea, indole, carbazole and indolocarbazole based synthetic receptors, resulting in 69 absolute binding constant values. Two different methods were used to study binding affinities: relative method, where the differences in binding constants between receptors ($\Delta \log K_{\text{ass}}$) were measured using nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry and absolute method where the absolute binding affinity ($\log K_{\text{ass}}$) of a receptor was measured using either UV-Vis spectrophotometry or NMR spectrometry. UV-Vis spectrophotometric and NMR spectrometric measurements were carried out in dimethyl sulfoxide and deuterated dimethyl sulfoxide respectively, with 0,5% water content in both cases.

A self-consistent binding scale was constructed for each carboxylate anion combining the results from both relative and absolute measurement methods. Absolute binding affinities of three anchor-receptors were measured for each anion. These values were used to anchor the binding scales constructed from relative binding measurements. The scales of hexanoate, sorbate and naproxen anion cover a range of 2,59, 2,57 and 2,23 $\log K_{\text{ass}}$ units with the consistency parameter, s ranging between 0,005 and 0,006 $\log K_{\text{ass}}$ units. These results demonstrate an excellent consistency between different $\Delta \log K_{\text{ass}}$ measurements, that is achieved due to very high accuracy of the NMR method. This measurement accuracy makes it possible to distinguish binding affinities that differ by just 0,05 $\log K_{\text{ass}}$ units.

The three binding scales were combined to construct a binding scheme containing all studied anions and receptors. Using this scheme, it is possible to determine how different structural features influence binding of different anions. A principal component analysis was carried out using the obtained $\log K_{\text{ass}}$ values, which shows that the receptors studied in this work are capable of distinguishing the studied anions based on their basicity and hydrophobicity/hydrophilicity.

7. Kasutatud kirjandus

- (1) Albrecht, M. Supramolecular Chemistry - General Principles and Selected Examples from Anion Recognition and Metallosupramolecular Chemistry. *Naturwissenschaften* **2007**, *94* (12), 951–966.
- (2) Lehn, J. Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules and Molecular Devices. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27* (1), 89–112.
- (3) Pastor, A.; Martínez-Viviente, E. NMR Spectroscopy in Coordination Supramolecular Chemistry: A Unique and Powerful Methodology. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (21–22), 2314–2345.
- (4) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2009.
- (5) Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687–699.
- (6) Steed, J.; Turner, D.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2008.
- (7) Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; Wiley-VCH, Weinheim: 2012.
- (8) *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry Volume 1*; Atwood, J. L., Steed, J. W., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel, 2004.
- (9) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3rd ed.; VCH: Weinheim, Germany, 2002.
- (10) Beer, P. D.; Gale, P. A. Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (3), 486–516.
- (11) Biedermann, F.; Nau, W. M.; Schneider, H. J. The Hydrophobic Effect Revisited-Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 2–16.
- (12) Evans, N. H.; Beer, P. D. Advances in Anion Supramolecular Chemistry: From Recognition to Chemical Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11716–11754.
- (13) Sánchez, G.; Curiel, D.; Tárraga, A.; Molina, P. Anion Binding Studies on Receptors Derived from the Indolo[2,3-A]carbazole Scaffold Having Different Binding Cavity Sizes. *Sensors* **2014**, *14* (8), 14038–14049.
- (14) Moss, B. Water Pollution by Agriculture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2008**, *363* (1491), 659–666.
- (15) *Handbook of Chemistry and Physics*, 75th ed.; Lide, D. R., Ed.; CRC Press, 1994.
- (16) Wang, L. Y.; Zhang, Y. H.; Zhao, L. J. Raman Spectroscopic Studies on Single Supersaturated Droplets of Sodium and Magnesium Acetate. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (4), 609–614.
- (17) Carey, F. A.; Giuliano, R. M. *Organic Chemistry*; McGraw-Hill: New York, 2011.
- (18) Frant, M. S.; Ross, J. W. Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution. *Science* **1966**, *154* (September), 1553–1555.

- (19) Park, C. H.; Simmons, H. E. Macrobicyclic Amines. III. Encapsulation of Halide Ions by In,*n*-1,*k* + 2)-Diazabicyclo[*k.l.m*]alkane Ammonium Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (9), 2431–2432.
- (20) Chakrabarti, P. Anion Binding Sites in Protein Structures. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234* (2), 463–482.
- (21) Langton, M. J.; Serpell, C. J.; Beer, P. D. Anion Recognition in Water: Recent Advances from a Supramolecular and Macromolecular Perspective. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, 1974–1987.
- (22) Kubik, S.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J. A Molecular Oyster: A Neutral Anion Receptor Containing Two Cyclopeptide Subunits with a Remarkable Sulfate Affinity in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752–12760.
- (23) Katritzky, A. R.; Tamm, T.; Wang, Y.; Karelson, M. A Unified Treatment of Solvent Properties. *J. Chem. Inf. Model.* **1999**, *39* (4), 692–698.
- (24) Sessler, J. L.; Gross, D. E.; Cho, W.-S.; Lynch, V. M.; Schmidtchen, F. P.; Bates, G. W.; Light, M. E.; Gale, P. a. Calix[4]pyrrole as a Chloride Anion Receptor: Solvent and Counteraction Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (37), 12281–12288.
- (25) Dorazco-González, A.; Höpfl, H.; Medrano, F.; Yatsimirsky, A. K. Recognition of Anions and Neutral Guests by Dicationic Pyridine-2,6- Dicarboxamide Receptors. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (7), 2259–2273.
- (26) Kütt, A.; Leito, I.; Kaljurand, I.; Sooväli, L.; Vlasov, V. M.; Yagupolskii, L. M.; Koppel, I. A. A Comprehensive Self-Consistent Spectrophotometric Acidity Scale of Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (7), 2829–2838.
- (27) Sooväli, L.; Kaljurand, I.; Kütt, A.; Leito, I. Uncertainty Estimation in Measurement of pK_a Values in Nonaqueous Media: A Case Study on Basicity Scale in Acetonitrile Medium. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566* (2), 290–303.
- (28) Haav, K.; Kadam, S. A.; Toom, L.; Gale, P. A.; Busschaert, N.; Wenzel, M.; Hiscock, J. R.; Kirby, I. L.; Haljasorg, T.; Lõkov, M.; Leito, I. Accurate Method to Quantify Binding in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (16), 7796–7808.
- (29) Kadam, S. A.; Haav, K.; Toom, L.; Haljasorg, T.; Leito, I. NMR Method for Simultaneous Host-Guest Binding Constant Measurement. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2501–2513.
- (30) Kadam, S. A.; Martin, K.; Haav, K.; Toom, L.; Mayeux, C.; Pung, A.; Gale, P. A.; Hiscock, J. R.; Brooks, S. J.; Kirby, I. L.; Busschaert, N.; Leito, I. Towards the Discrimination of Carboxylates by Hydrogen-Bond Donor Anion Receptors. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (13), 5145–5160.
- (31) Kadam, S. A.; Haav, K.; Toom, L.; Haljasorg, T.; Leito, I. NMR Method for Simultaneous Host-Guest Binding Constant Measurement. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (6), 2501–2513.
- (32) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID=156391; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391> viimati alla laetud 22.05.2016.

- (33) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Gerhartz, W., Exec. Ed.; Wiley-VCH: New York, 1986; 5th ed.
- (34) Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K. *Techniques of Chemistry*, 4th ed.; John Wiley and Sons: New York, NY, 1985.
- (35) Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. *Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*; American Chemical Society: Washington, DC, 1995.
- (36) Blažek Bregović, V.; Basarić, N.; Mlinarić-Majerski, K. Anion Binding with Urea and Thiourea Derivatives. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *295*, 80–124.
- (37) Bates, G. W.; Triyanti, M. E.; Light, M. E.; Albrecht, M.; Gale, P. A. 2,7-Functionalized Indoles as Receptors for Anions. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (23), 8921–8927.
- (38) Havel, V.; Yawer, M. A.; Sindelar, V. Real-Time Analysis of Multiple Anion Mixtures in Aqueous Media Using a Single Receptor. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4666–4669.
- (39) Duke, R. M.; McCabe, T.; Schmitt, W.; Gunnlaugsson, T. Recognition and Sensing of Biologically Relevant Anions in Alcohol and Mixed Alcohol-Aqueous Solutions Using Charge Neutral Cleft-like Glycol-Derived Pyridyl-Amidothiourea Receptors. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (7), 3115–3126.
- (40) Edwards, P. R.; Hiscock, J. R.; Gale, P. A. Stabilisation of Alkylcarbamate Anions Using Neutral Hydrogen Bond Donors. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (34), 4922–4924.
- (41) Kadam, S. A.; Haav, K.; Toom, L.; Pung, A.; Mayeux, C.; Leito, I. Receptors of diverse structures for glyphosate. *Org. Lett.* Avaldamiseks vastu võetud 09.05.2016.
- (42) Leito, I.; Herodes, K.; Huopolainen, M.; Virro, K.; Ku, A.; Kruve, A.; Tanner, R. Towards the Electrospray Ionization Mass Spectrometry Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 379–384.
- (43) Leito, I.; Kaljurand, I.; Koppel, I. A.; Yagupolskii, L. M. Spectrophotometric Acidity Scale of Strong Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **1998**, *17* (c), 7868–7874.
- (44) Trummal, A.; Lipping, L.; Kaljurand, I.; Koppel, I. A.; Leito, I. Acidity of Strong Acids in Water and Dimethyl Sulfoxide. *J. Phys. Chem. A.* Avaldamiseks vastu võetud, alates 26.04.2016 saadaval veebist, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02253>.
- (45) Manov, G. G.; Roger, B. G.; Walter, H. J.; Acree, S. F. Values of the Constants in the Debye–Hückel Equation for Activity Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65* (9), 1765–1767.
- (46) Klamt, A. *COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*; Elsevier Science Ltd: Amsterdam, The Netherlands, 2005.
- (47) Steffen, C.; Thomas, K.; Huniar, U.; Hellweg, A.; Rubner, O.; Schroer, A. TmoleX-a Graphical User Interface for TURBOMOLE. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (16), 2967–2970. Saadaval veebist, <http://www.cosmologic.de>.
- (48) Eckert, F.; Klamt, A. *COSMOthermX*. COSMOlogic GmbH&CoKG: Leverkusen, Germany 2014. Saadaval veebist, <http://www.cosmologic.de>.

8. Lisad

Lisa 1. Arvutusmeetodid $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste leidmiseks UV-Vis spektrofotomeetriga.

Arvutus iga individuaalse tiitrimispunkti järgi

Täpne lisatud aniooni kogus ning vaba aniooni kontsentratsioon leiti tiitrimisandmetest ning valemi (2) modifitseerimisel saadi järgnev valem $\log K_{\text{ass}}$ leidmiseks:

$$\log K_{\text{ass}} = \log \frac{(1-\alpha) \cdot \gamma_{\text{RHA}^-}}{\alpha \cdot [\text{A}^-] \cdot \gamma_{\text{A}^-}} \quad (15)$$

, kus α on kompleksi dissotsiatsioonimäär ning γ_{RHA^-} ja γ_{A^-} on vastavalt retseptor-anioon kompleksi ja vaba aniooni aktiivsuskoeffitsiendid lahuses. Aktiivsuskoeffitsiendid leiti Debye-Hückeli võrrandi järgi, mis dimetüülsulfoksiidi korral on järgmine⁴⁵:

$$\log \gamma = - \frac{1.12z^2 \sqrt{I}}{1 + 0.43a\sqrt{I}} \quad (16)$$

, kus z on iooni laeng, I on ioonne jõud ja a on iooni efektiivne raadius lahuses.

Arvestades, et käesolevas töös kasutatud dimetüülsulfoksiidi lahus sisaldab arvestatavat kogust vett ning uuritavad ioonid pole sfäärilised, on Debye-Hückeli võrrandi näol on tegemist üsna suure lähendusega. Sellele vaatamata on see lähendus antud töös piisav, sest esiteks on tegemist väga lahja lahusega ning teiseks on valemis (15) aktiivsuskoeffitsientide jagatis, mistõttu nad suuresti taanduvad välja.

Mittelineaarne isotermi kohandamine vähimruutude meetodil

Kasutades valemeid (2) ja (10) on võimalik leida seondumise isotermi võrrand:

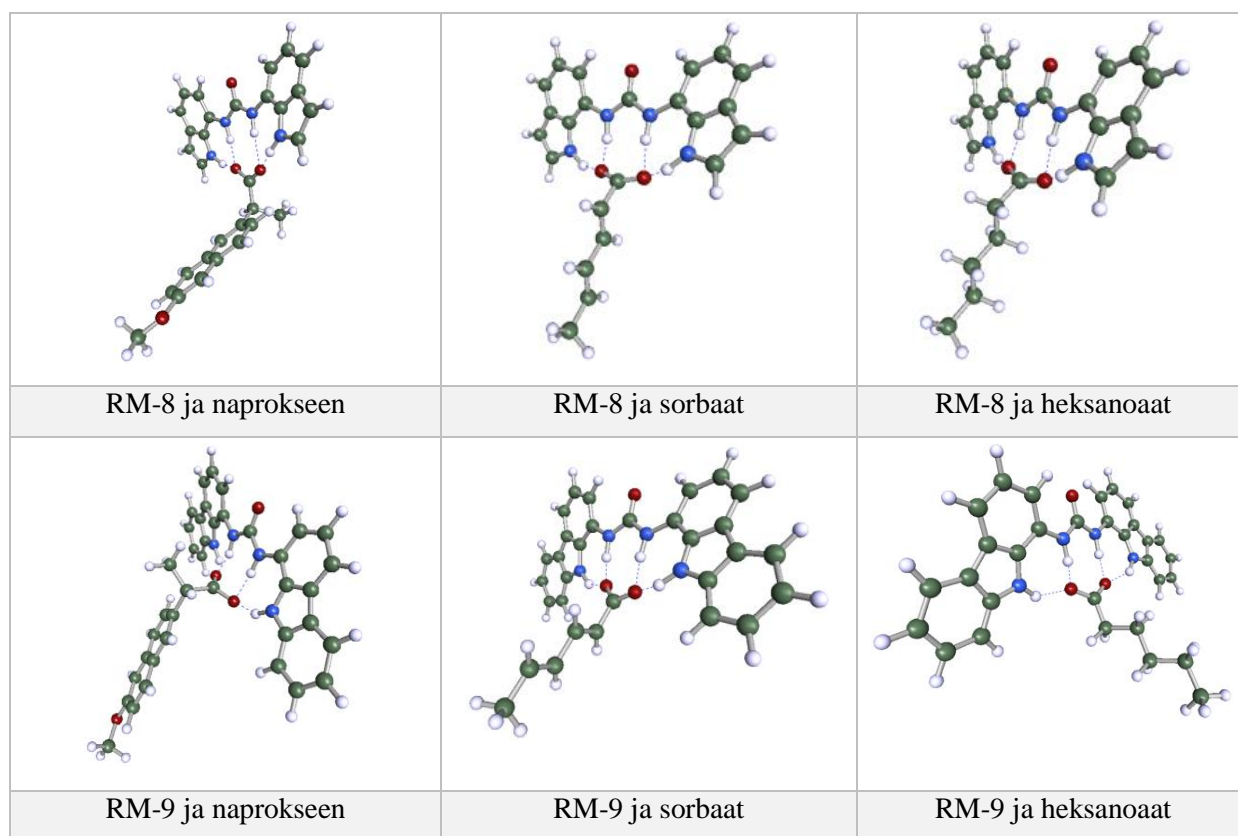
$$\Delta A = \Delta A_{\text{max}} \frac{K_{\text{ass}} \cdot \frac{[\text{A}^-] \gamma_{\text{A}^-}}{\gamma_{\text{RHA}^-}}}{1 + K_{\text{ass}} \cdot \frac{[\text{A}^-] \gamma_{\text{A}^-}}{\gamma_{\text{RHA}^-}}} \quad (17)$$

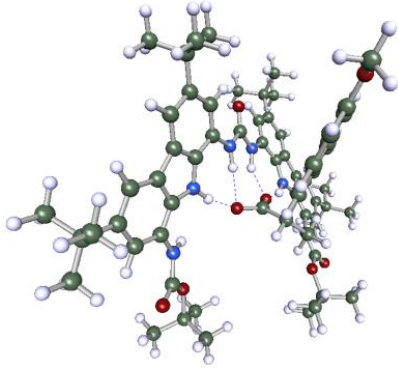
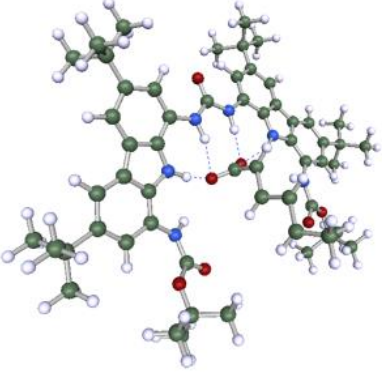
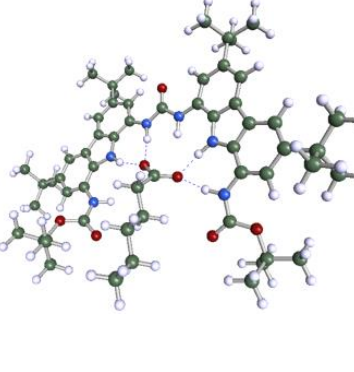
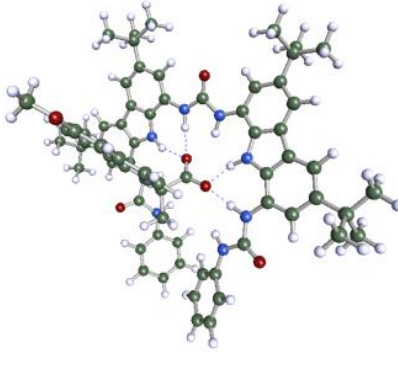
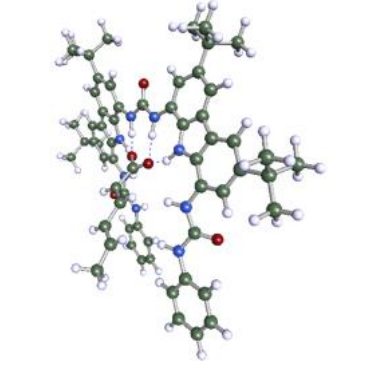
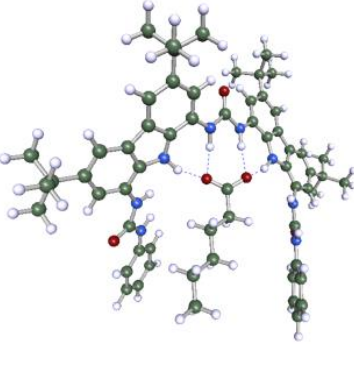
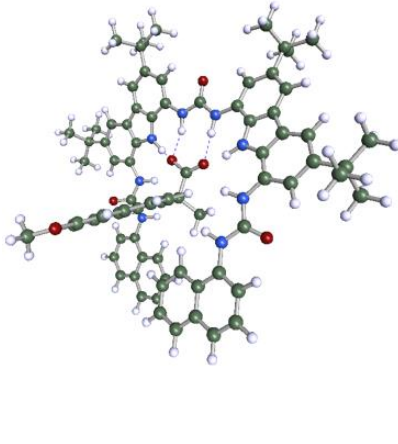
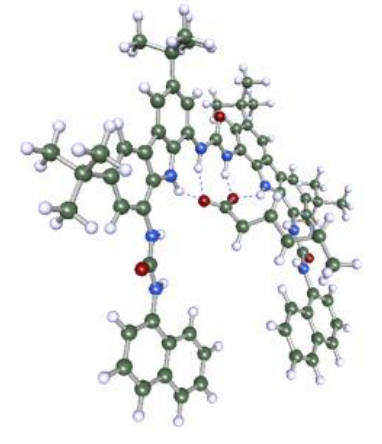
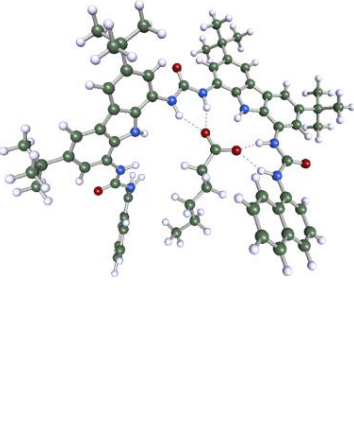
, kus ΔA võrdub $A^\lambda - A_{\text{RH}}^\lambda$. Seondumiskonstandi K_{ass} leidmiseks kohandati eksperimentaalsed andmed vähimruutude meetodil seondumise isotermit, muutes ΔA_{max} (võrdub $A_{\text{RHA}^-}^\lambda - A_{\text{RH}}^\lambda$) ja K_{ass} väärtuseid.

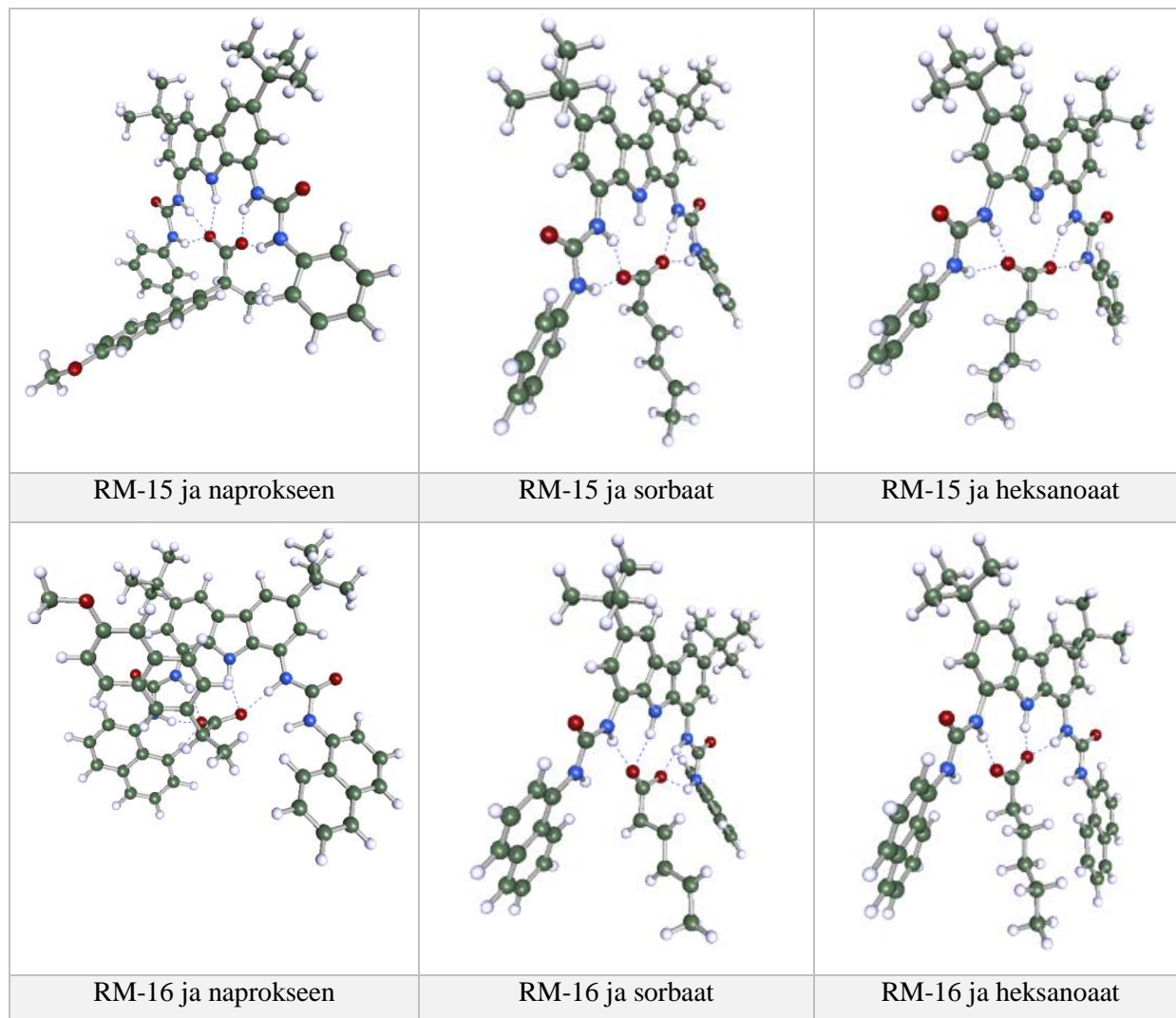
Lisa 2. COSMO-RS arvutused madalaima energiaga konformeeride leidmiseks.

Retseptor-anioon komplekside madalaima energiaga konformeeride geomeetriad leiti COSMO-RS (*Conductor-Like Screening Model for Real Solvents*) arvutusmeetodiga,⁴⁶ kasutades TmoleX Client versiooni 4.1⁴⁷ ja COSMOthermX versiooni C30 parametrisatsiooniga 1401.⁴⁸ Tegemist on kombineeritud meetodiga, kus esimese sammuna optimeeritakse geomeetria DFT (*Density Functional Theory*)-COSMO meetodil BP (Becke-Perdew DFT) funktsionaaliga ja TZVP (*Triple Zeta Valence plus Polarisation*) baasiga. Tulemuseks saadakse kompleksi nn “COSMO olek” ehk geomeetria, elektrone koguenergia ning laengutiheduse jaotus ideaalses juhises ($\epsilon = \infty$). Teise sammuna viiakse läbi COSMO-RS arvutused, kus kõik stabiilsed kompleksi konformeerid paigutatakse ideaalsest juhise reaalsesse vedelikku, milleks oli 0,5% veesisaldusega (m/m) DMSO. Meetod põhineb statistilisel termodünaamilal, kus osakeste pinnad jagatakse pinnasegmentideks ning erinevad elektrostaatiliselt vastasmõjud (sh vesiniksidemed) leitakse pinnasegmentide statistiliselt keskmistatud vastasmõjude kaudu. Iga konformeeeri kohta leitakse selle koguenergia ning selle järgi osakaal lahustis. Suurima osakaaluga (madalaima energiaga) konformeerid tugevaimalt seonduvate retseptorite kompleksidele eri anioonidega on toodud tabelis 6.

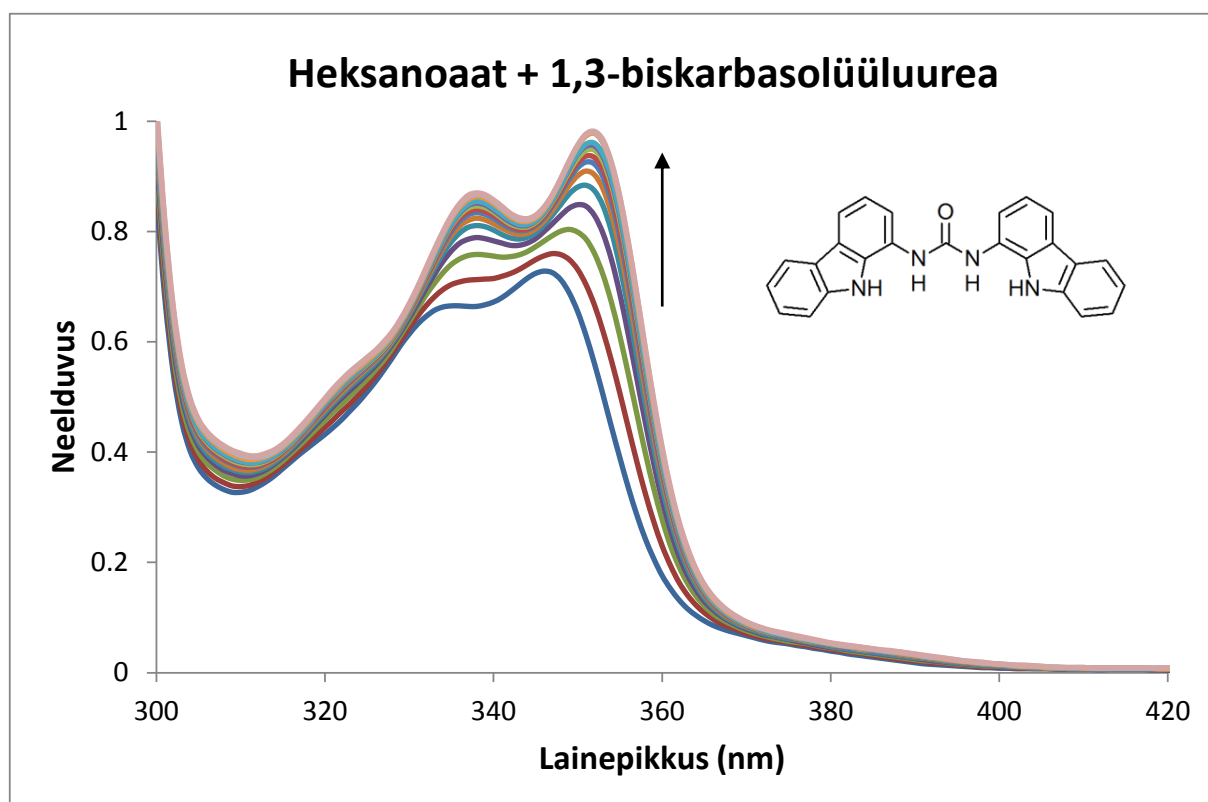
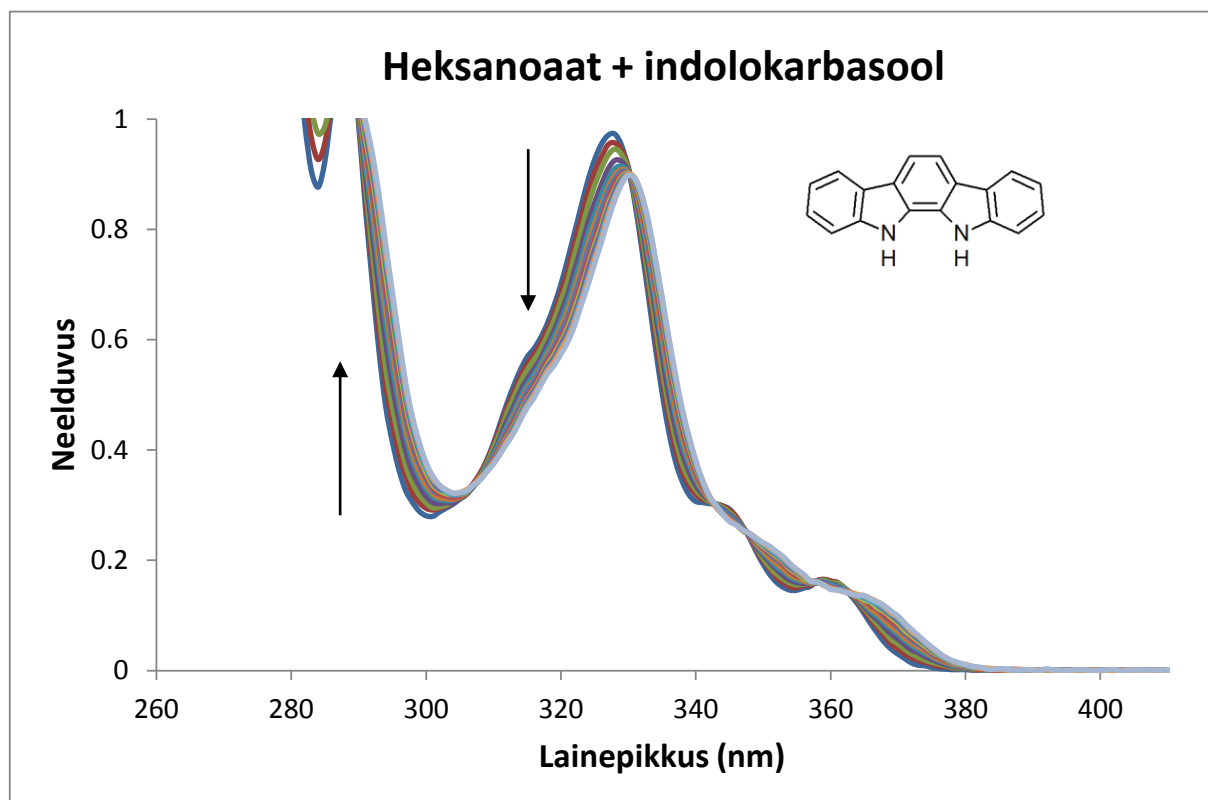
Tabel 6. COSMO-RS arvutustega leitud madalaima energiaga retseptori-anioon komplekside konformeerid.

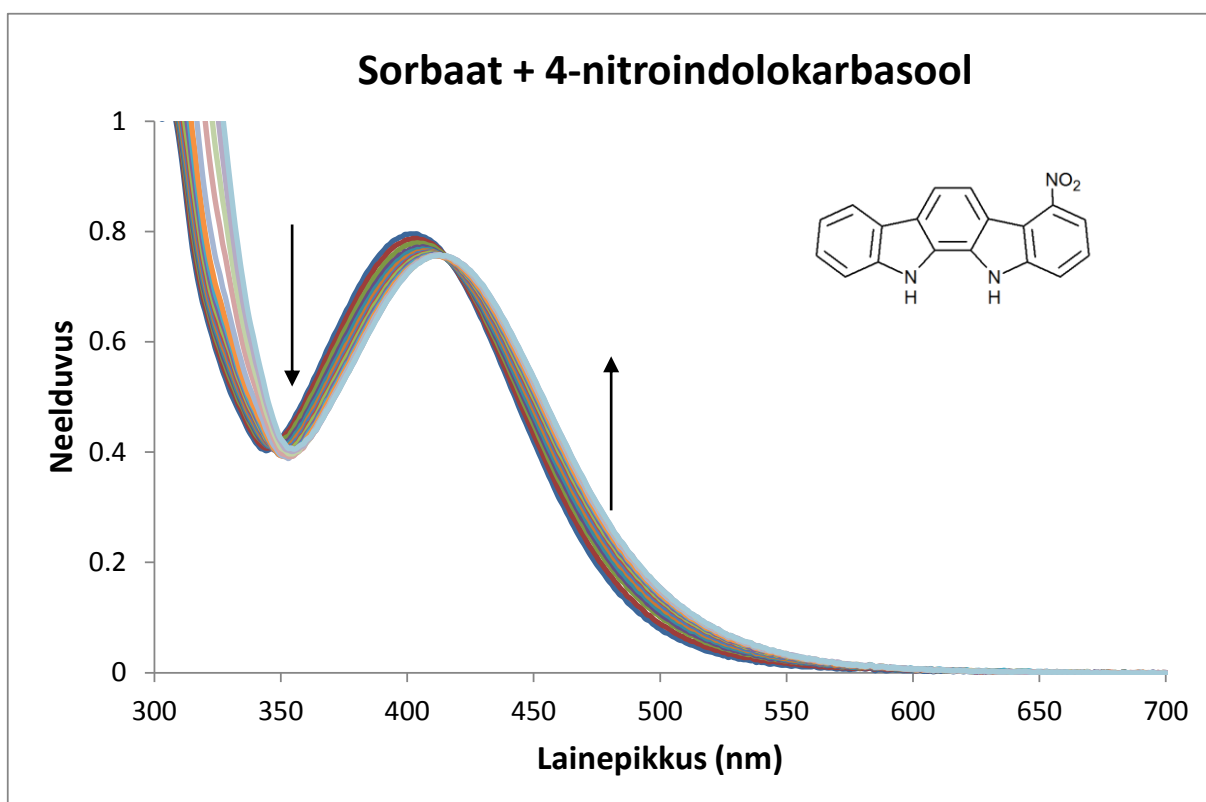
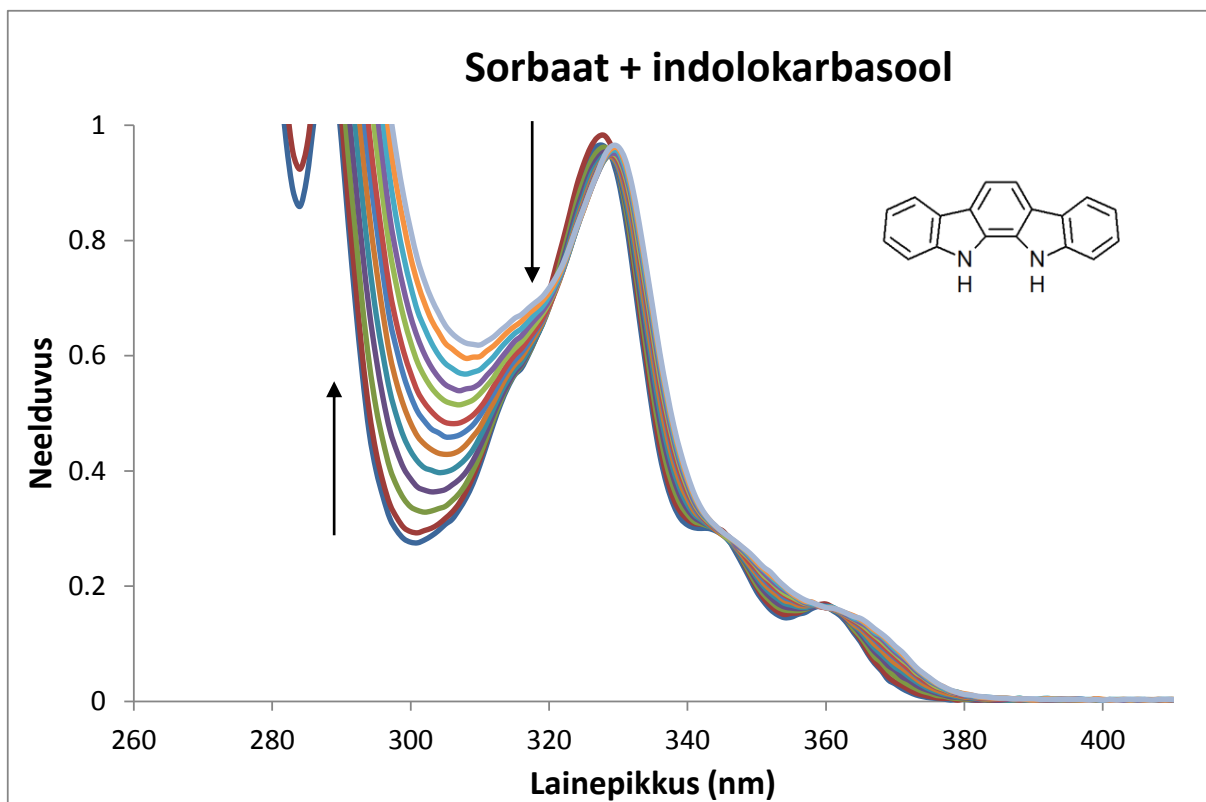


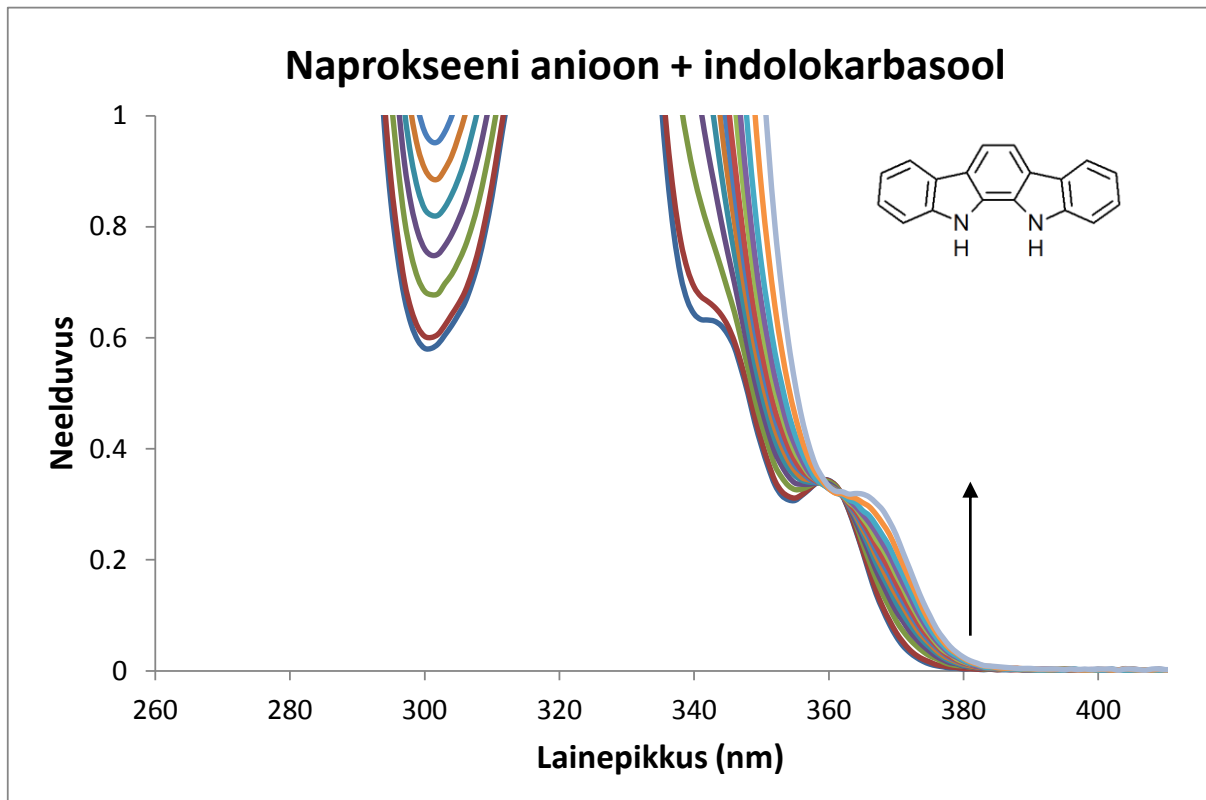
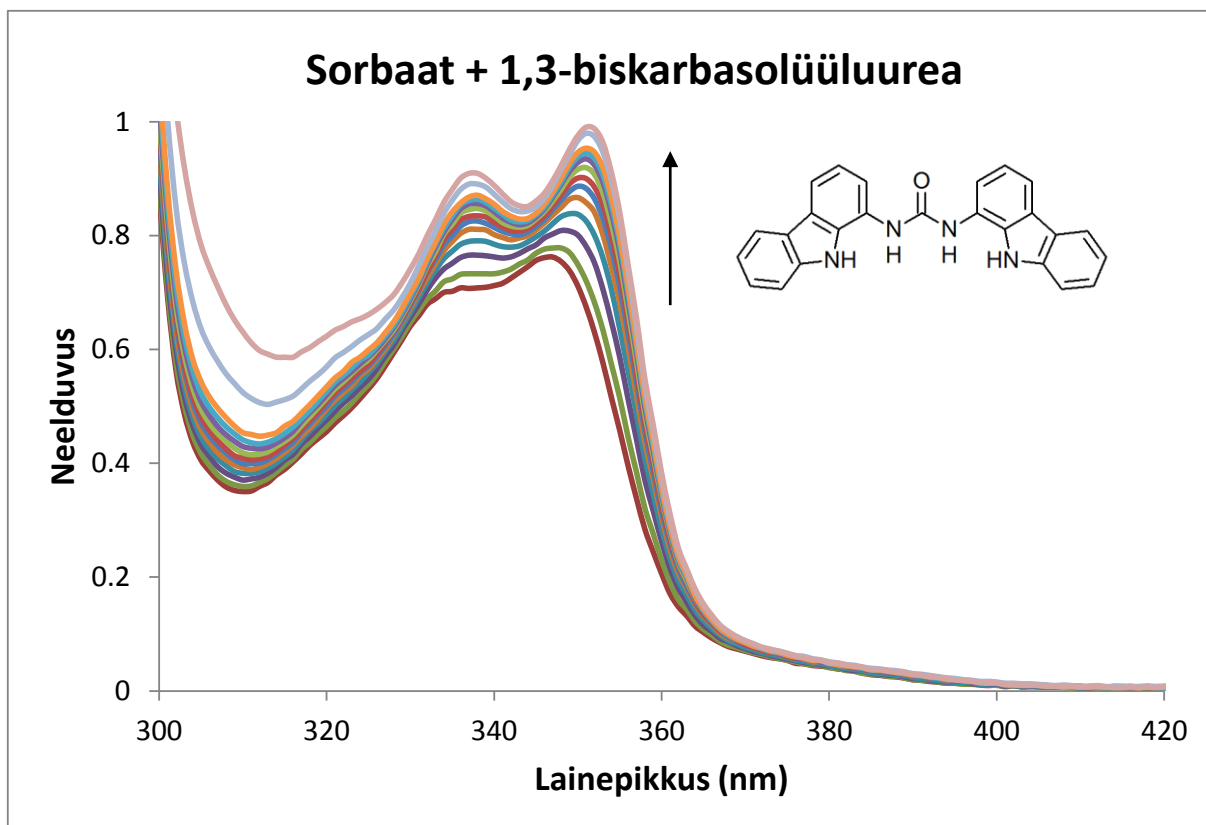
		
<p>RM-10 ja naprokseen</p>	<p>RM-10 ja sorbaat</p>	<p>RM-10 ja heksanoaat</p>
		
<p>RM-11 ja naprokseen</p>	<p>RM-11 ja sorbaat</p>	<p>RM-11 ja heksanoaat</p>
		
<p>RM-12 ja naprokseen</p>	<p>RM-12 ja sorbaat</p>	<p>RM-12 ja heksanoaat</p>

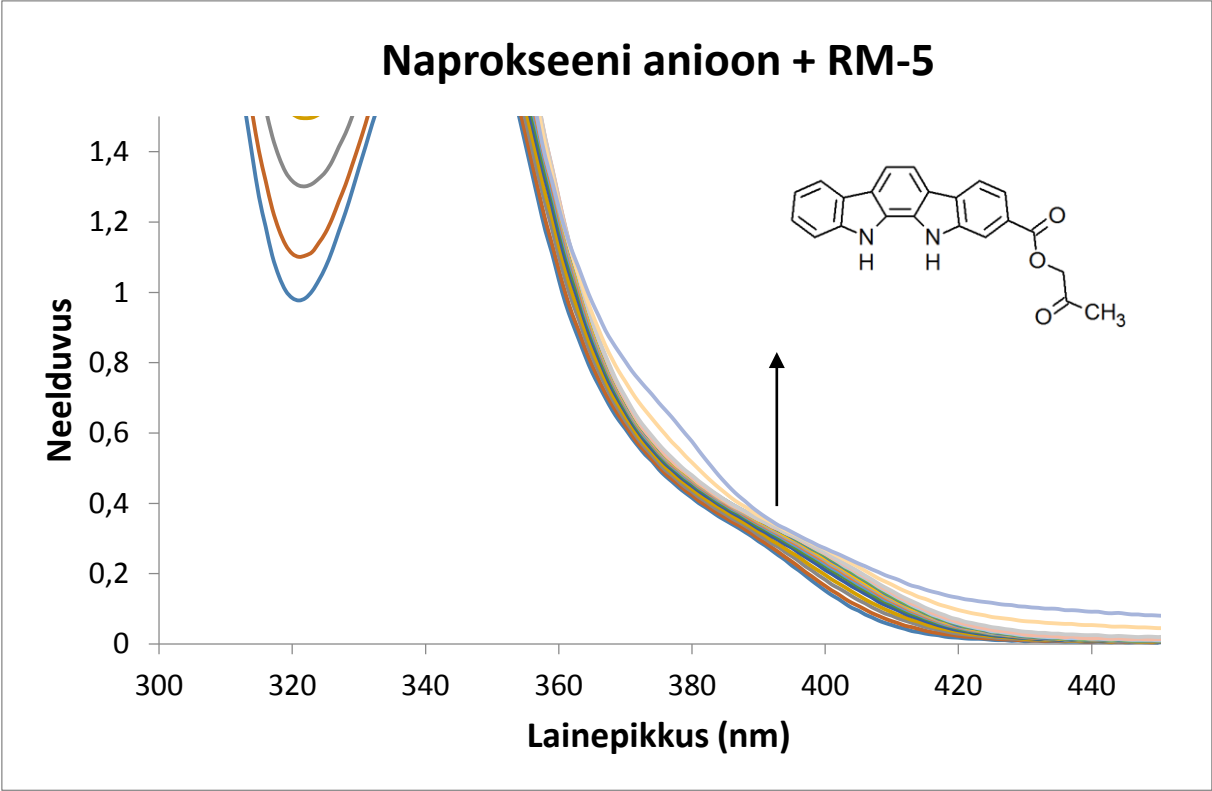


Lisa 3. Ühendite UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise spektrid



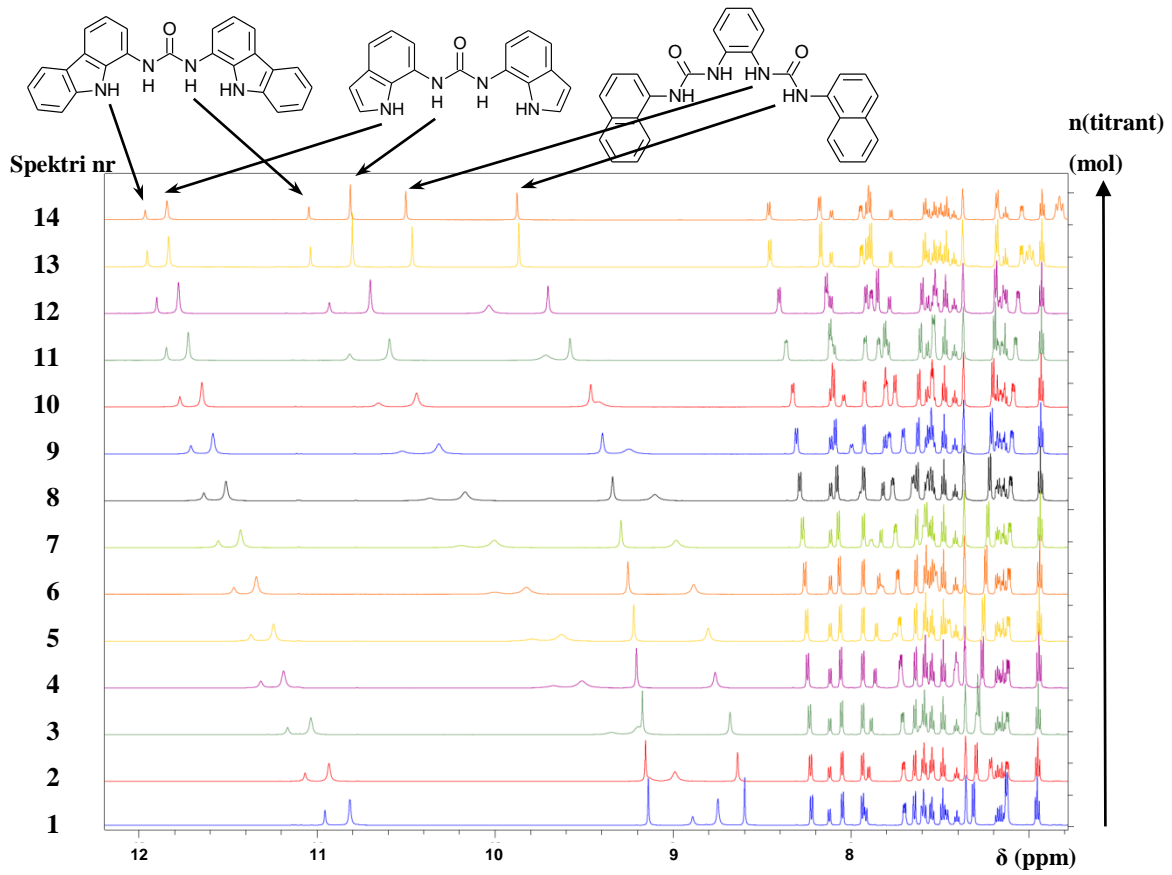




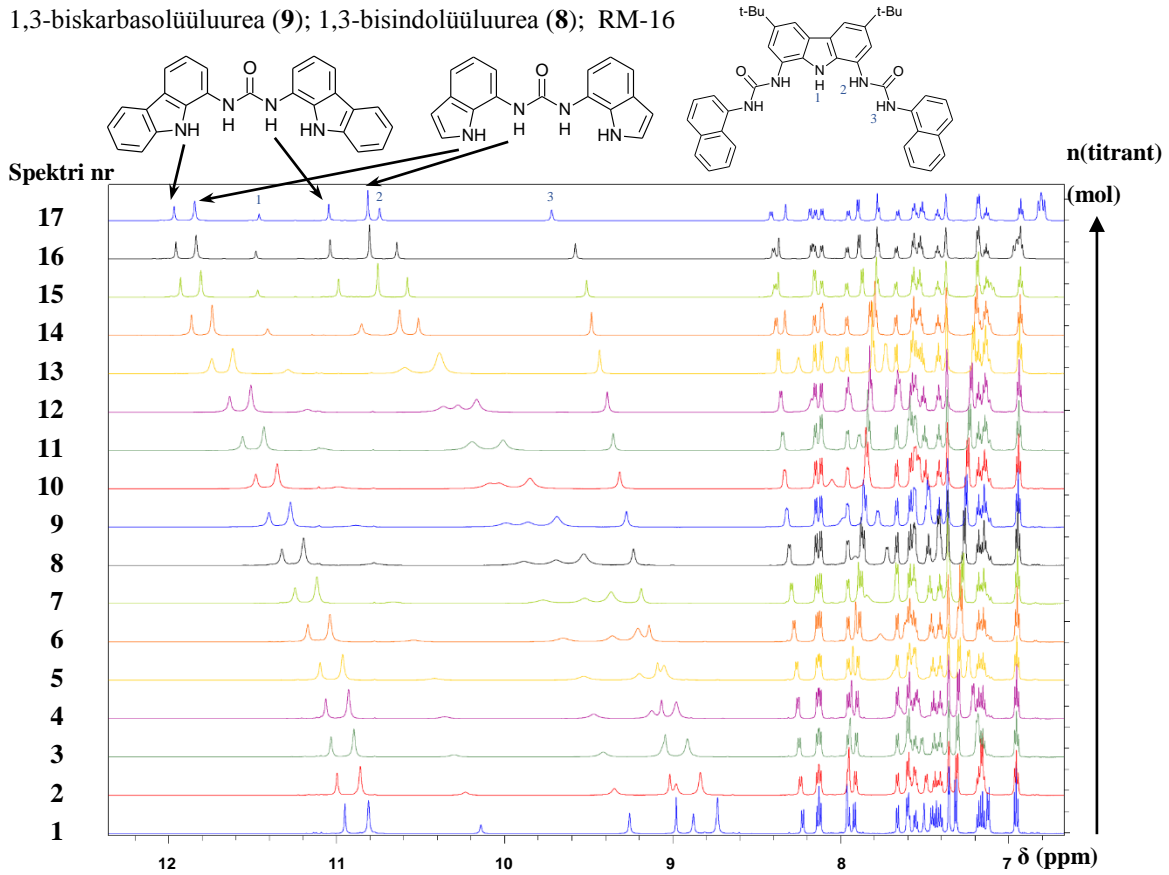


Lisa 4a. Sorbaadi TMR tiitrimise spektrid

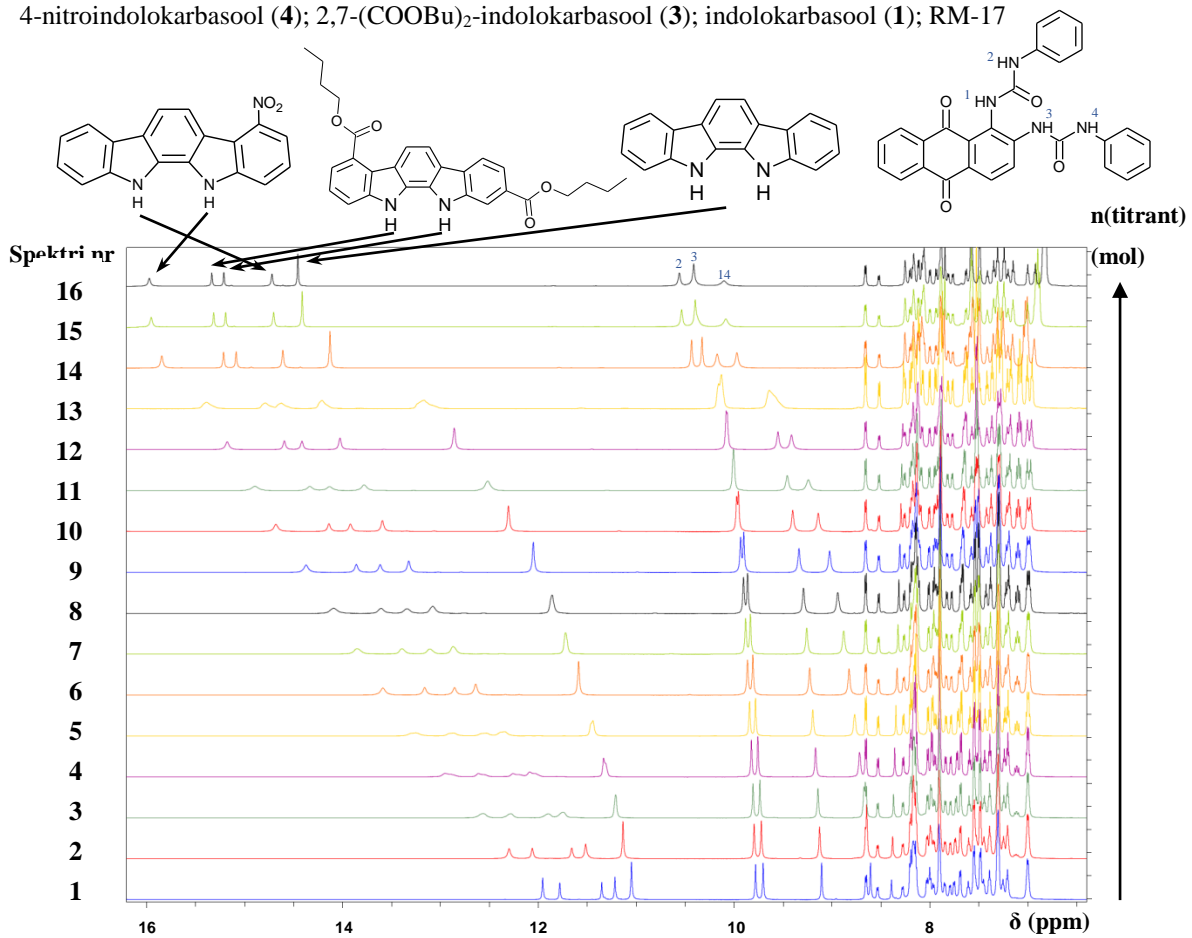
1,3-biskarbasolüüluurea (**9**); 1,3-bisindolüüluurea (**8**); RM-18



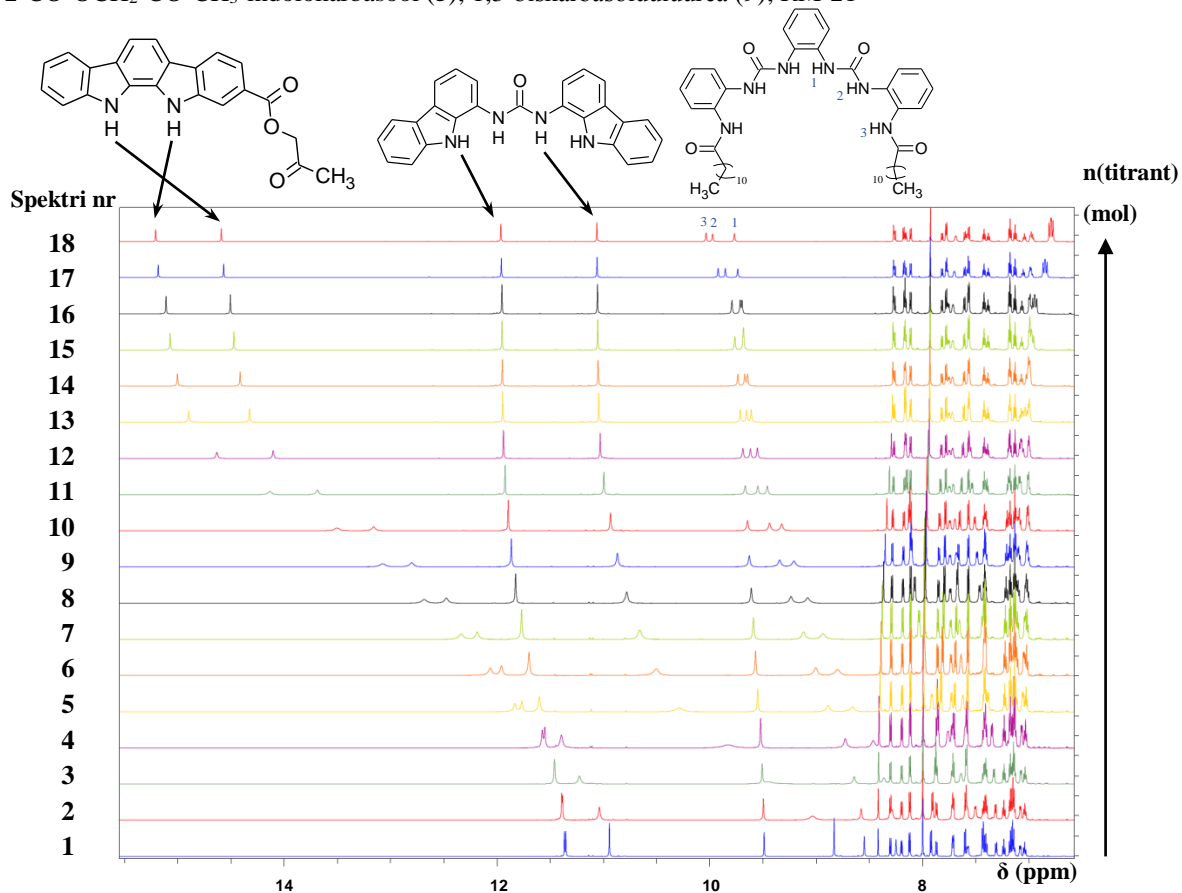
1,3-biskarbasolüüluurea (9); 1,3-bisindolüüluurea (8); RM-16



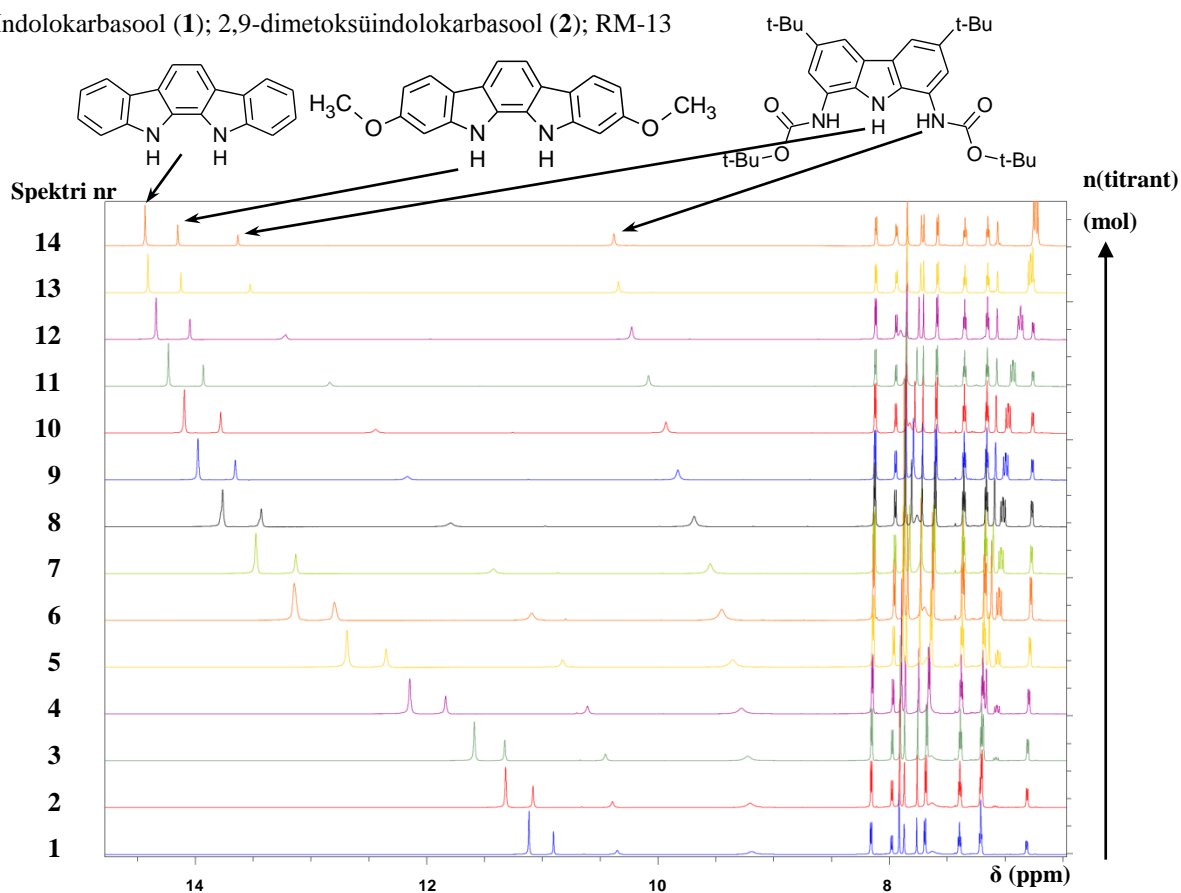
4-nitroindolokarbasool (4); 2,7-(COOBu)₂-indolokarbasool (3); indolokarbasool (1); RM-17



2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasool (5); 1,3-biskarbasolüüluurea (9); RM-21

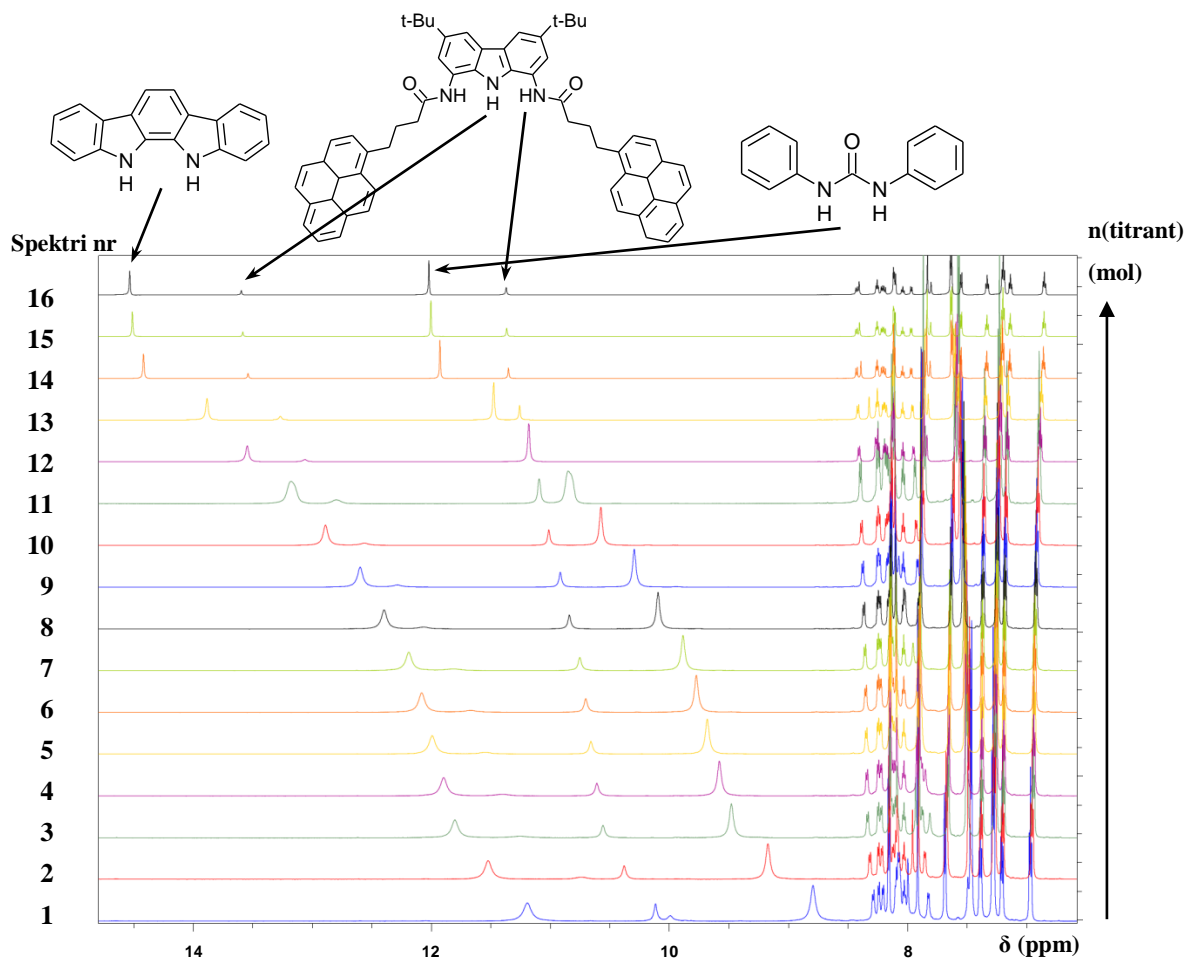


Indolokarbasool (1); 2,9-dimetoksüindolokarbasool (2); RM-13

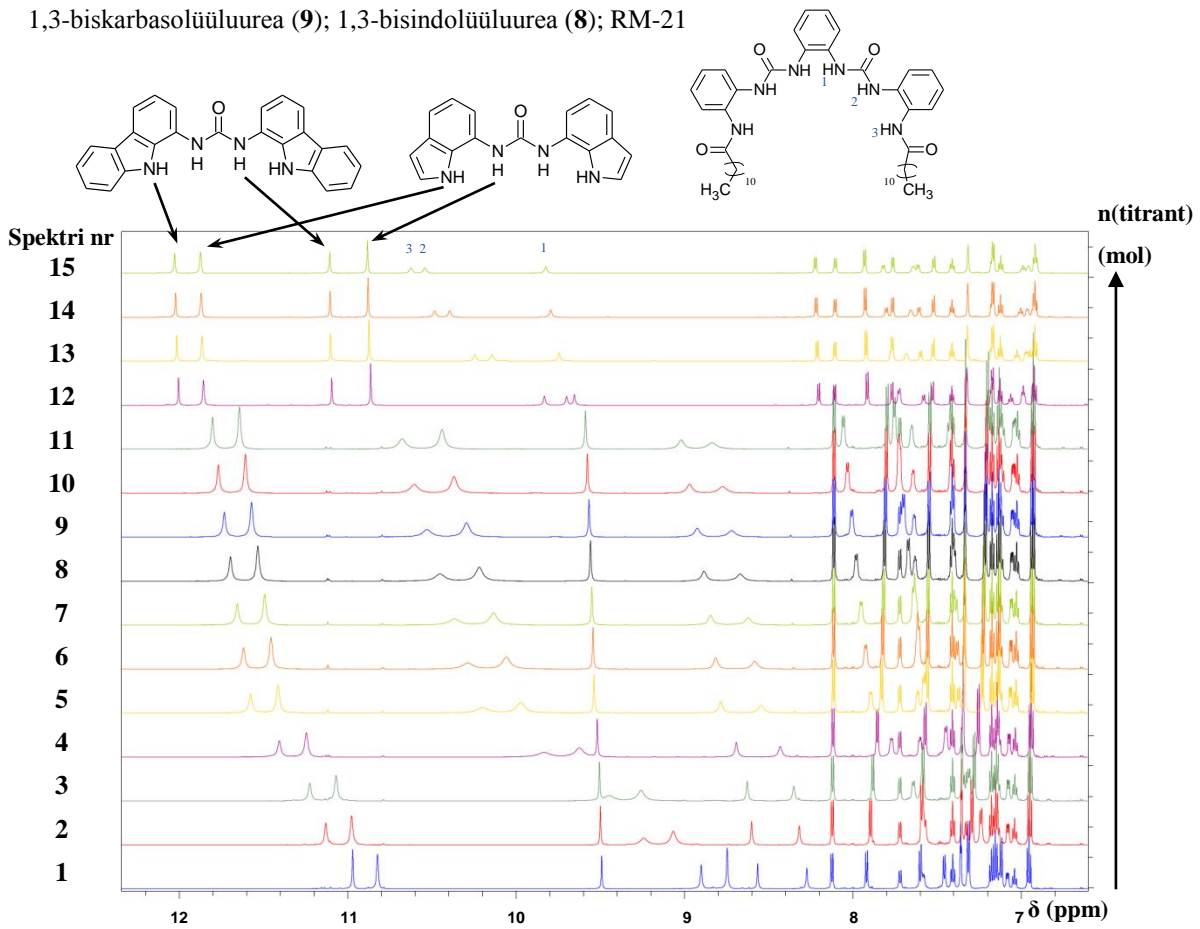


Lisa 4b. Heksanoaadi TMR tiitrimise spektrid

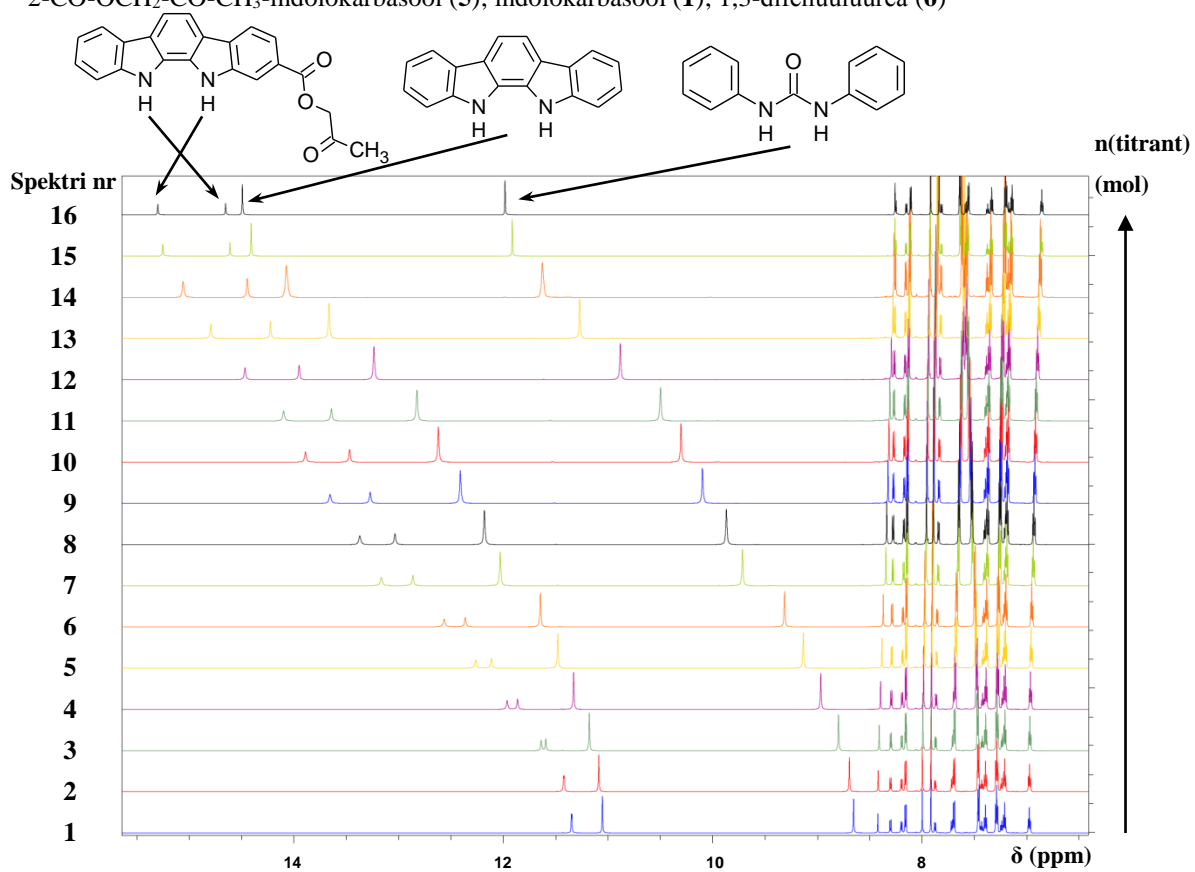
Indolokarbasool (1); RM-14; 1,3-difenüüluurea (6)



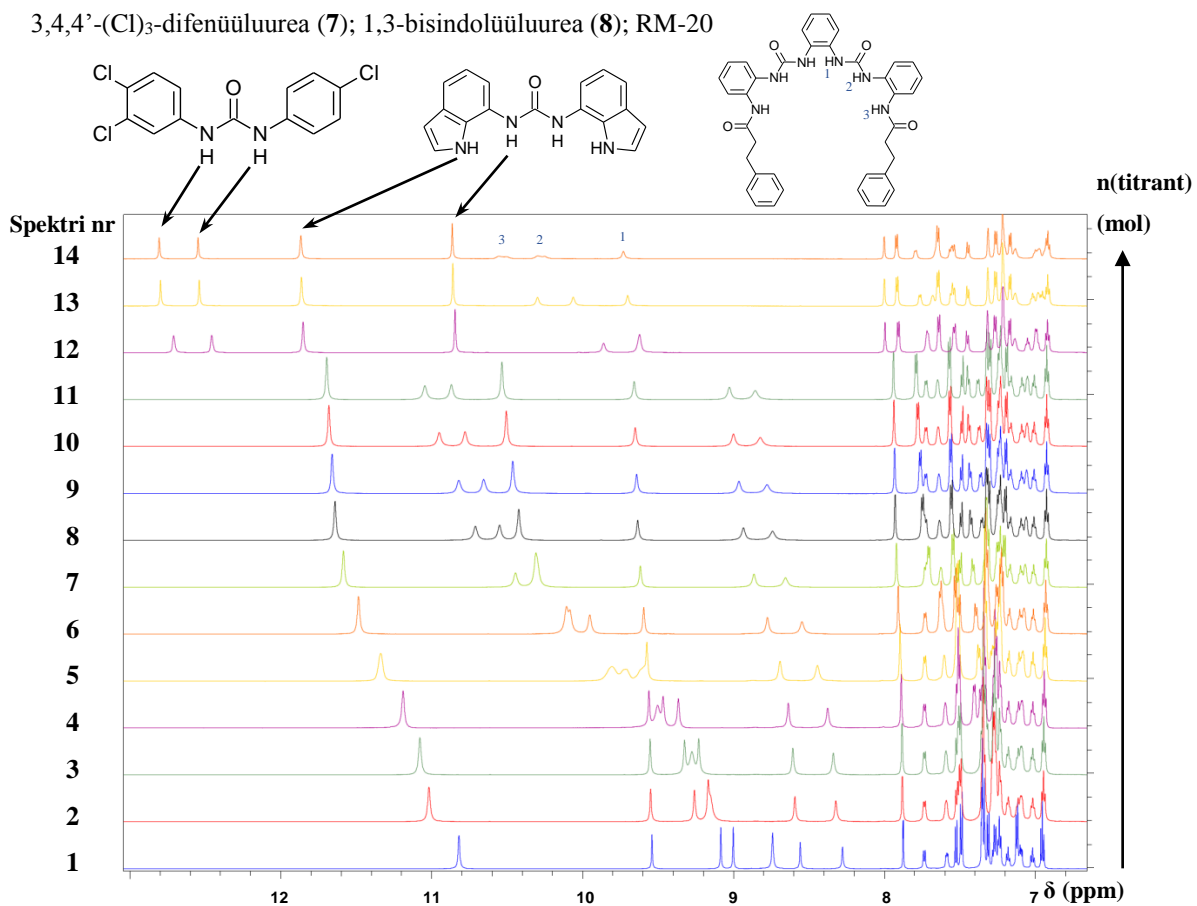
1,3-biskarbasolüüluurea (**9**); 1,3-bisindolüüluurea (**8**); RM-21



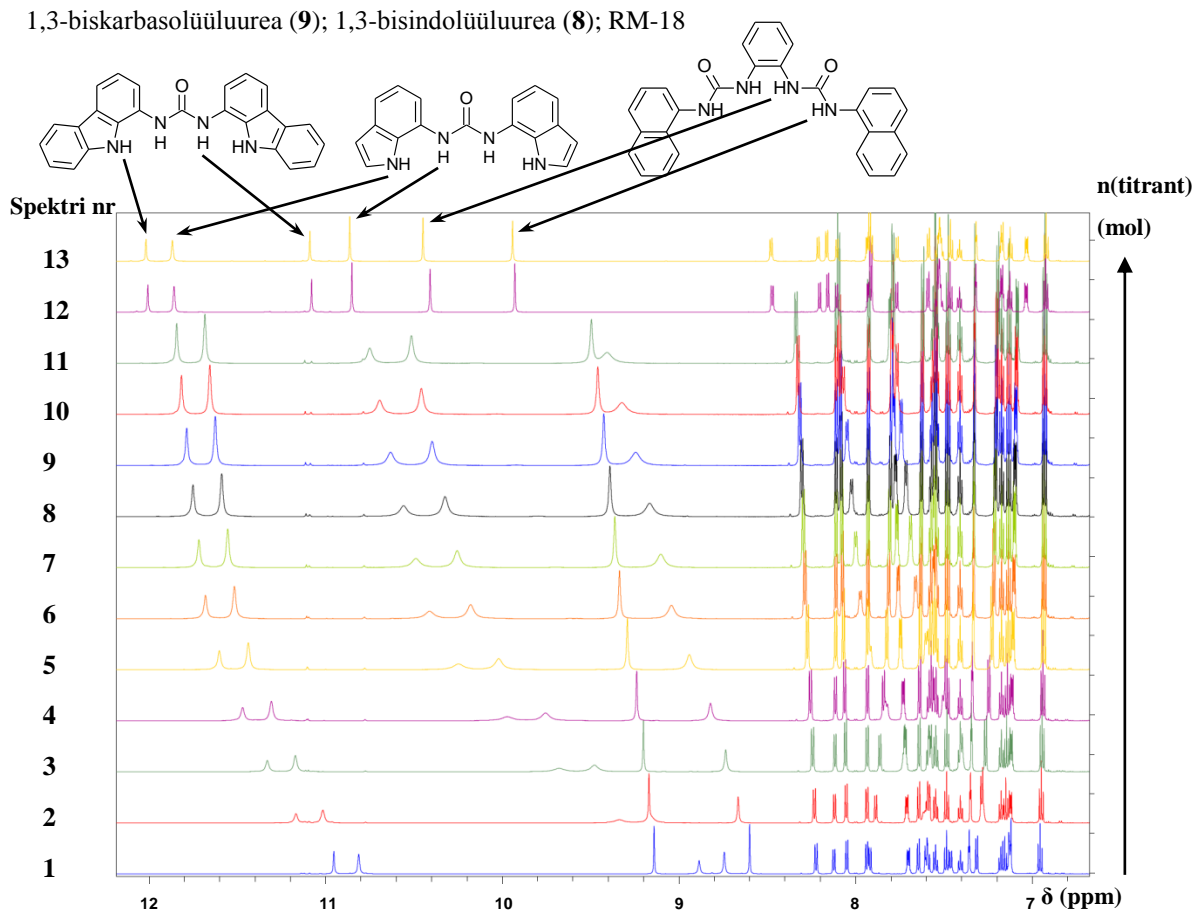
2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasool (**5**); indolokarbasool (**1**); 1,3-difenüüluurea (**6**)



3,4,4'-Cl₃-difenüülüurea (7); 1,3-bisindolüülüurea (8); RM-20

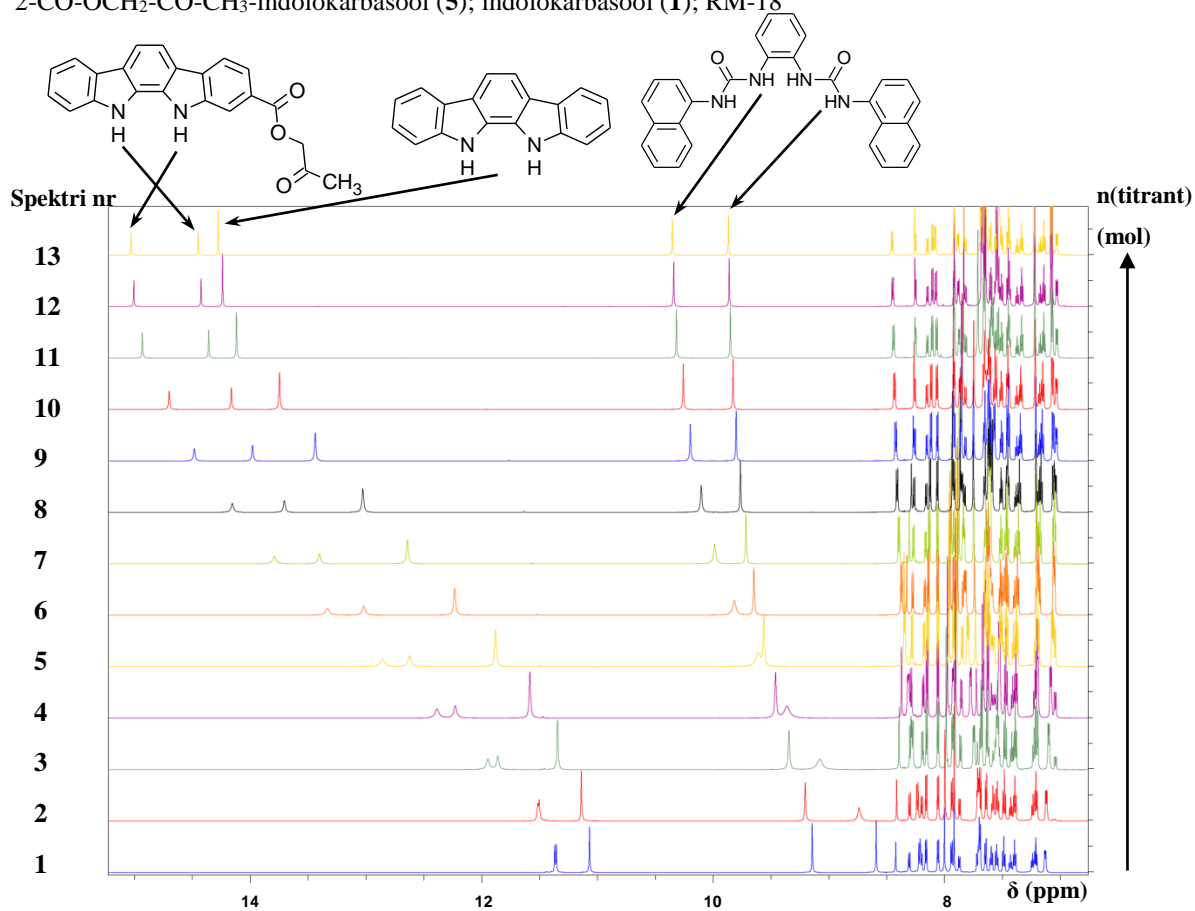


1,3-biskarbasolüülüurea (9); 1,3-bisindolüülüurea (8); RM-18

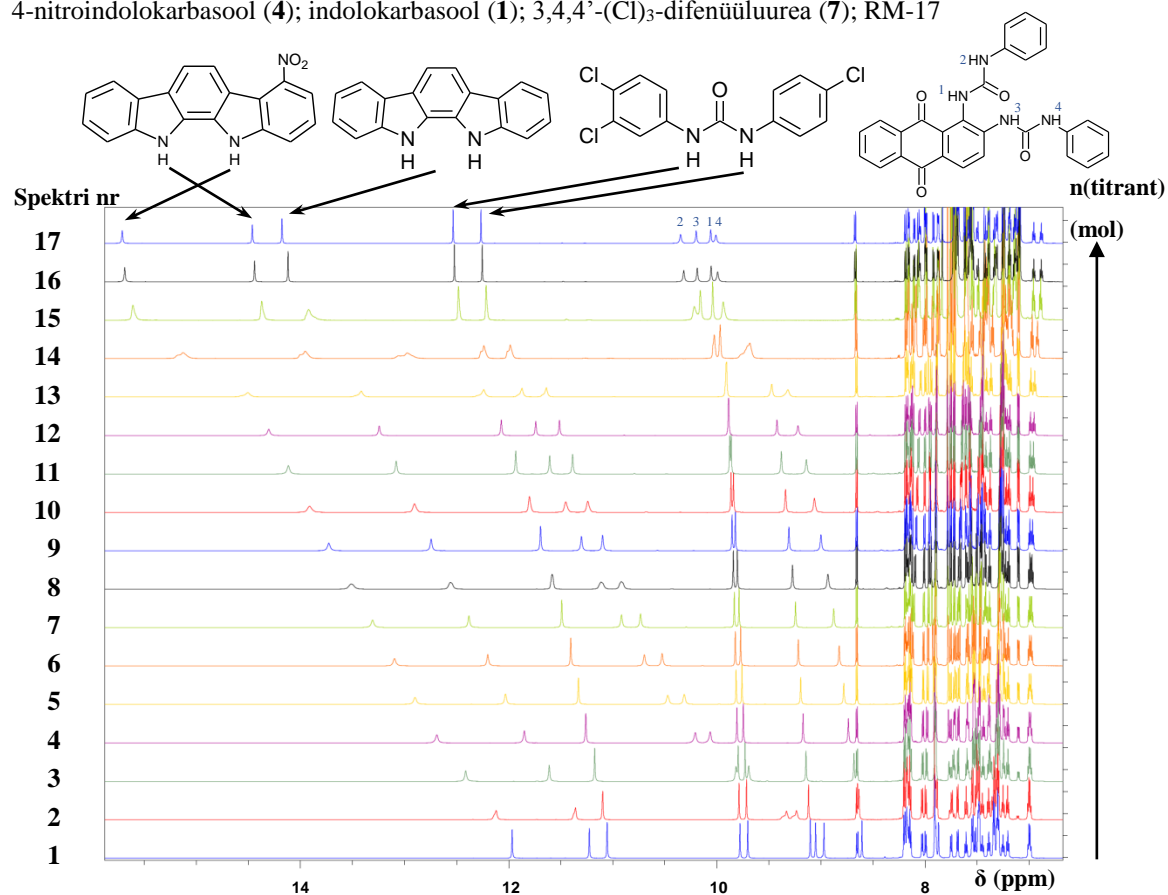


Lisa 4c. Naprokseeni aniooni TMR tiitrimise spektrid

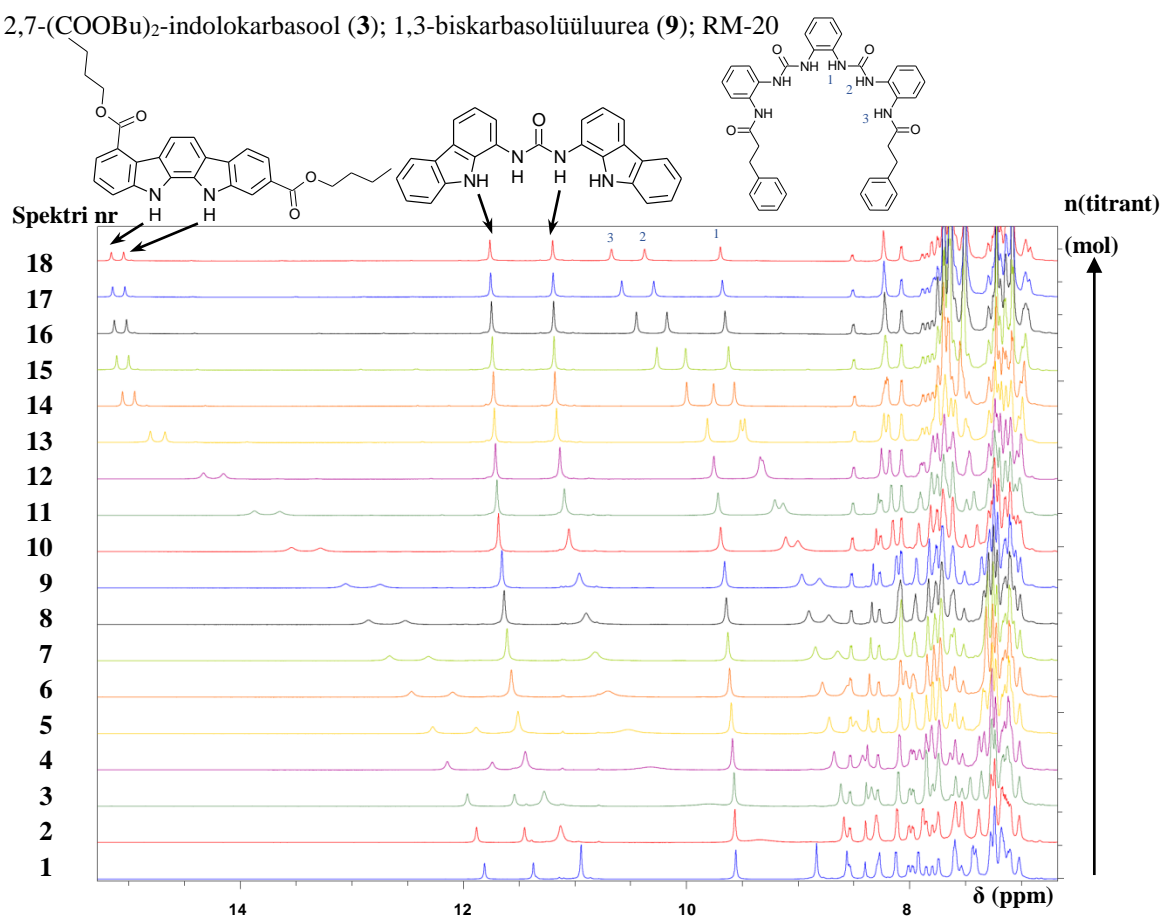
2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasool (5); indolokarbasool (1); RM-18



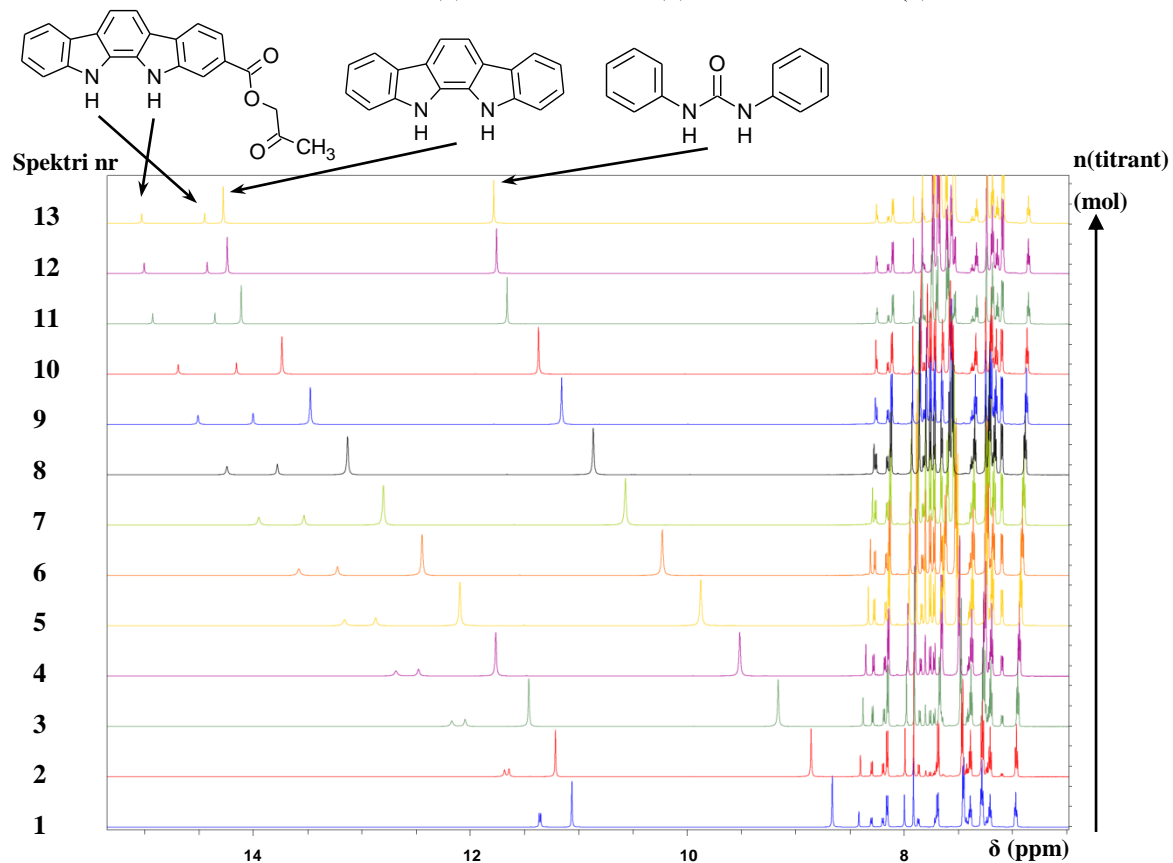
4-nitroindolokarbasool (4); indolokarbasool (1); 3,4,4'-(Cl)₃-difenüüluurea (7); RM-17



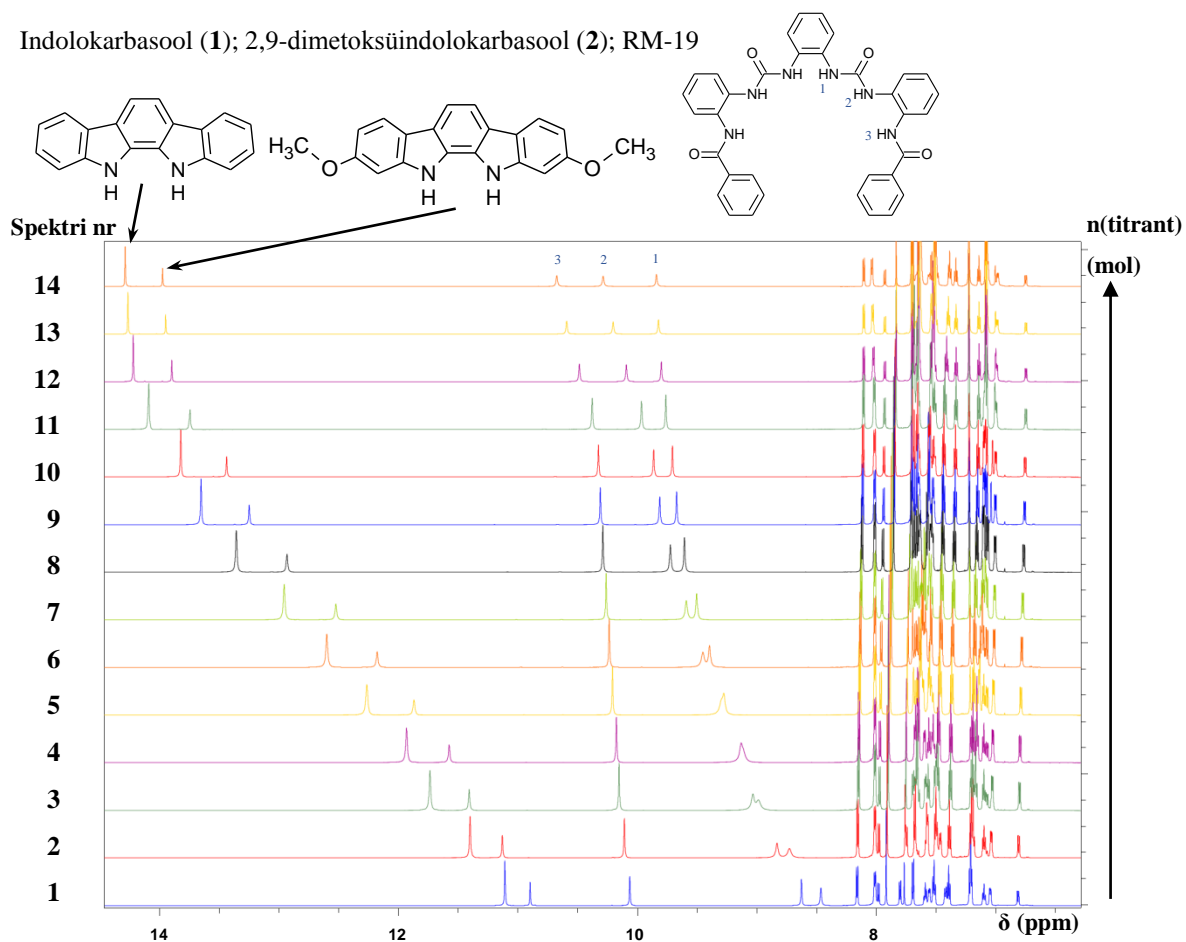
2,7-(COOBu)₂-indolokarbasool (3); 1,3-biskarbasoolüüluurea (9); RM-20



2-CO-OCH₂-CO-CH₃-indolokarbasool (5); indolokarbasool (1); 1,3-difenüüluurea (6)



Indolokarbasool (1); 2,9-dimetoküindolokarbasool (2); RM-19



Infoleht

Lähedaste retseptor-anioon seondumisafiinsuste eristamine TMR meetodil

Käesolevas töös mõõdeti sorbaadi, heksanoaadi ja naprokseeni aniooni seondumisafiinsused ($\log K_{\text{ass}}$) 23 urea, indooli, karbasooli ja indolokarbasooli fragmentidel põhinevatele sünteetilistele retseptoritele. Kokku määrati 69 absoluutset seondumiskonstanti. Igale anioonile koostati kooskõlalised seondumisskaalad, mis kombineeriti tuumamagnetresonants (TMR) spektromeetrilise tiitrimise teel mõõdetud suhtelistest seondumiskonstandidest ($\Delta \log K_{\text{ass}}$) ja UV-Vis spektrofotomeetrisel või TMR spektromeetrisel tiitrimisel saadud absoluutsetest seondumiskonstandidest. Saadud tulemused näitavad väga head kooskõla erinevate $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste vahel, mis on saavutatud tänu TMR meetodi väga kõrgele täpsusele. Seetõttu on käesolevas töös võimalik eristada seondumisafiinsusi, mis erinevad teineteisest vaid 0,05 $\log K_{\text{ass}}$ ühiku võrra.

Märksõnad: karboksülaadid, supramolekulaarne keemia, molekulaarne äratundmine, peremees-külaline seondumine, sünteetilised retseptorid.

Differentiation of similar receptor-anion binding affinities using an NMR based method

In the current thesis, the binding affinities ($\log K_{\text{ass}}$) of sorbate, hexanoate and naproxen anion were measured towards 23 urea, indole, carbazole and indolocarbazole based synthetic receptors, resulting in 69 absolute binding constant values. A self-consistent binding scale was constructed for each carboxylate anion combining the relative binding affinities ($\Delta \log K_{\text{ass}}$) measured using nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometric and absolute binding affinities measured using UV-Vis spectrophotometric or NMR spectrometric titration methods. The obtained results demonstrate an excellent consistency between different $\Delta \log K_{\text{ass}}$ measurements, which is achieved due to very high accuracy of the NMR method. This measurement accuracy makes it possible to distinguish binding affinities that differ by only 0,05 $\log K_{\text{ass}}$ units.

Keywords: carboxylates, supramolecular chemistry, molecular recognition, host-guest binding, synthetic receptors.

CERCS kood: P300 Analüütiline keemia

Litsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Juuli Nõges,

(sünnikuupäev: 28.07.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Lähedaste retseptor-anioon seondumisafiinsuste eristamine TMR meetodil“, mille juhendajad on Ivo Leito ja Kristjan Haav,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **23.05.2016**