

KIRJALLISUUSKATSAUS:

**KONVENTIONAALINEN RAMAN-SPEKTROSKOPIA JA AIKA-EROTTEINEN  
RAMAN-SPEKTROSKOPIA LÄÄKEAINEIDEN JA BIOMOLEKYYLIEN  
TUTKIMUKSESSA**

KOKEELLINEN OSUUS:

**KONVENTIONAALINEN RAMAN-SPEKTROSKOPIA JA AIKA-EROTTEINEN  
RAMAN-SPEKTROSKOPIA EI-FLUORESOIVIEN JA FLUORESOIVIEN  
LÄÄKEAINEIDEN TUTKIMUKSESSA**

Tatu Rojalin

Helsingin yliopisto

Farmasian tiedekunta

Farmaseuttisten biotieteiden osasto

Elokuu 2014

**KONVENTIONAALINEN RAMAN-SPEKTROSKOPIA JA AIKA-EROTTEINEN  
RAMAN-SPEKTROSKOPIA LÄÄKEAINEIDEN JA BIOMOLEKYYLIEN  
TUTKIMUKSESSA**

Tatu Rojalin

Helsingin yliopisto

Farmasian tiedekunta

Farmaseuttisten biotieteiden osasto

Elokuu 2014

# SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO .....	1
2	VIBRAATIOTILOIHIN PERUSTUVA SPEKTROSKOPIA .....	4
2.1.	Yleistä .....	4
2.2.	Vibraatiotiloihin perustuvan spektroskopian teoreettinen tausta.....	6
2.3.	Vibraatiotiloihin perustuvan spektroskopian soveltaminen lääketutkimuksessa .....	12
2.3.1	IR-spektroskopia .....	18
2.3.2	Raman-spektroskopia .....	20
2.3.3.	Raman-spektroskopian tekniikkaa ja peruskäsitteitä.....	25
2.3.4.	Aika-erotteinen Raman-spektroskopia .....	34
2.3.5.	Aika-erotteisen Ramanin tekninen toteutus ja hyödyt.....	38
2.3.6.	Raman-spektrin muodostaminen käyttäen aika-erottelua .....	43
2.3.6.	IR-spektroskopian ja Raman-spektroskopian vertailua.....	46
2.3.7.	CARS-spektroskopia.....	51
3	RAMAN-SPEKTROSKOPIAN EDELITYKSIÄ JA TUTKIMUSTEN TAUSTAA KÄYTÄNNÖSSÄ.....	54
3.1.	Yleistä .....	54
3.2.	Raman-signaalin parantaminen .....	57
3.3.	Raman-spektroskopian käytäntöjä ja edellytyksiä .....	60
3.4.	Spektri vs. molekyylin ominaisuudet Raman-spektroskopiassa.....	62
4	RAMAN-SPEKTROSKOPIAN SOVELLUSALUEET LÄÄKETUTKIMUKSESSA JA IHMISLÄÄKINNÄSSÄ SEKÄ BIOLOGISIA SOVELLUKSIA .....	65
4.1	Raman lääkeainetutkimuksessa ja biologisia sovelluksia.....	65
4.1.1.	Pienmolekyyliset lääkeaineet .....	68
4.1.2.	Peptidit, proteiinit ja vasta-aineet .....	71
4.1.3.	Lipidit ja hiilihydraatit .....	75
4.1.4.	Nukleiinihapot ja DNA.....	76
4.2	Lääkevalmisteiden fysikaalis-kemiallinen karakterisointi Raman-spektroskopiaa hyödyntäen ja sovellukset teollisuudessa.....	78
4.3	Raman-spektroskopian hyödyntäminen solututkimuksissa ja biologisissa määrittelyissä sekä permeaatiotutkimuksissa ja kineettisissä määrittelyissä .....	81
4.3.1.	Solututkimukset ja biologiset sovellukset.....	81
4.3.2.	Permeaatiotutkimukset ja kineettiset määrittelykset .....	86
4.4.	Raman in vivo .....	94

5	RAMAN-SPEKTROSKOPIAN SOVELLUSALUEET MUUALLA.....	96
6	YHTEENVETO .....	98
7	LÄHTEET .....	99
8	LIITTEET.....	107
3.4.	Spektri vs. molekyylin ominaisuudet Raman-spektroskopiassa.....	107

## 1 JOHDANTO

Lääkeaineiden molekyylirakenne, sekä niiden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ohjaavat uusien lääkeainekandidaattien etsimistä ja toisaalta olemassa olevien muokkausta. Löytyneiden, vaikuttaviksi aineiksi havaittujen molekyyliden muokkaukseen ja jatkotutkimukseen liittyy usein paremman lääkevasteen aikaansaaminen, farmakokineettisten ominaisuuksien parantaminen sekä formulaatiokehitys (Sinko 2011). Lääkeaineet jaotellaan usein karkeasti pienlääkkeisiin ja suurimolekyylisiin lääkkeisiin. Konventionaaliset, tavallisesti suun kautta tabletteina annosteltavat lääkevalmisteet ovat tyypillisiä pienimolekyylisiä valmisteita. Suurimolekyylisistä valmisteista esimerkkinä voidaan mainita proteiinirakenteiset vasta-aineet, jotka annostellaan usein injektioina.

Nykyään tunnetaan laaja joukko erilaisia lääkeaineiden vaikutuskohtia. Lääkeainemolekyylin rakenteiden ja toisaalta sen kohderakenteiden tuntemus on ensiarvoisen tärkeää arvioitaessa aineen sopivuutta annosteltavaan lääkevalmisteeseen. Useissa tapauksissa vaikutuskohdat ovat elimistön omien solujen pinnalla olevia reseptoreja tai esimerkiksi biokemiallisiin reaktioireitteihin vaikuttavia erityyppisiä entsyymejä (Nelson ja Cox 2005). Kemialliselta rakenteeltaan vaikutuskohdat ovat monilta osin sadoista tai useista tuhansista aminohapoista koostuvia proteiinirakenteita. Jotta lääkeainemolekyylisi saisi aikaan haluttuja vasteita elimistön toiminnassa, sen pitää päästä kulkeutumaan vaikutuspaikkaansa, vuorovaikuttaa kohderakenteidensa kanssa ja toisaalta myös poistua elimistöstä toivotulla tavalla. Näitä kaikkia määrittää pitkälti lääkeainemolekyylin rakenne ja ominaisuudet annosteltavassa lääkevalmisteessa.

Lääkeaineet voidaan annostella esimerkiksi tavallisina tabletteina suun kautta, laskimonsisäisinä injektioina, ihon pintakerrosten läpi, injektioina lihakseen tai inhalaatioina keuhkoihin. Annostelun jälkeen lääkeainemolekyylit pyritään kuljettamaan vaikutuspaikalleen mahdollisimman muuttumattomina, eli stabiileina. Tavallisesti lääkeainemolekyylisi formuloidaan erilaisten apuaineiden avulla sellaiseen muotoon, että kulkeutuminen vaikutuspaikalle riittävän suurella

pitoisuudella saavutetaan. Tällaisia keinoja voivat olla erilaiset lääkeaineen vesi- ja rasvaliukoisuutta muuttavat toimenpiteet, erilaisten kantaja-aineiden käyttö tai lääkeaineen vapautumisnopeutta säätelevien tekniikoiden soveltaminen. Jotta haluttu vaste saadaan aikaan, lääkeainemolekyylien pitoisuuden vaikutuspaikalla täytyy olla riittävä. Annosta ei voida kuitenkaan kasvattaa määrättömästi, koska yleensä lääkeaineilla on elimistössä myös haitalliset sivuvaikutuksensa. Tilanne täytyy tasapainottaa siten, että vaste saadaan aikaan mahdollisimman vähin sivu- ja haittavaikutuksin.

Lääkeaineet ovat käytännössä aina elimistölle vieraita aineita lukuun ottamatta erityyppisiä endogeenisiä, eli sisäsyntyisiä yhdisteitä, joita elimistön omat rakenteet tuottavat (Nelson ja Cox 2005). Vieraita aineita käsitellään aineenvaihdunnassa siten, että niiden vesiliukoisuutta pyritään kasvattamaan erilaisten entsyymien katalysoimien aineenvaihduntareaktioiden avulla. Kemiallisesti tämä tarkoittaa usein vierasaineen vesiliukoisuuden lisäämistä, jolloin sen kulku elimistön omien solukalvojen läpi heikkenee. Tällöin aine on sellaisessa muodossa, että se erittyminen muun muassa virtsaan paranee ja elimistö pääsee eroon vieraasta molekyylistä. Näin ollen onkin luonnollista, että lääkeaineista pyritään rakentamaan valmisteita, jotka olisivat sopivissa määrin rasvaliukoisia, jotta niiden kulku elimistön solukalvorakenteiden läpi olisi optimaalista. Toisaalta on turvattava riittävä vesiliukoisuus, jotta aine myös poistuu riittävällä nopeudella.

Kaikkien yllä kuvattujen molekyylien ominaisuuksien tutkimukseen on olemassa lukemattomia eri keinoja. Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan ja esitellään erityyppisiä spektroskopiamenetelmiä. Lääkeainemolekyylit koostuvat useiden (satojen) atomien muodostamista ryhmistä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa eri tavoin. Atomien ja molekyylien tutkimuksessa hyödynnetään eri tekniikoita sen mukaisesti, mitä aineiden ominaisuuksia halutaan tarkastella. Klassinen mekaniikka täydennettynä kvanttimekaniikan ja -fysiikan teoreettisella tiedolla antaa perustan näiden tekniikoiden hyödyntämiselle. Atomien ja niistä muodostuvien molekyylien vuorovaikutusvoimat voidaan jakaa atomien ja molekyylien välisiin voimiin, sekä atomien ja molekyylien sisäisiin vuorovaikutusvoimiin. Näihin vuorovaikutusvoimiin liittyvät tietyt, tarkasti määräytyneet elektronien energiatilat. Elektronirakenteiden

energiatilat noudattavat järjestäytymistä ohjaavia fysiikan lainalaisuuksia. Atomeilla on yksinään omat ominaisuutensa elektronirakenteessaan ja sitoutuessaan toisiin atomeihin, niiden muodostama kokonaisuus (esimerkiksi molekyyli tai hilarakenne) on tavallisesti hyvin erilainen useiden keskenään värähtelevien osien muodostama systeemi verrattuna yksinään esiintyvään atomiin.

Tämän katsauksen tarkasteluissa painotutaan ennen kaikkea atomien ja molekyylien värähtelytiloja ja -energioita kuvaaviin menetelmiin eli niin kutsuttuun vibrationaaliseen spektroskopiaan. Katsauksessa esiteltävät vibraatiotiloihin perustuvan spektroskopian ydintekniikat ovat IR-, Raman ja CARS-spektroskopia. Nämä tekniikat ovat toisilleen komplementaarisia ja sopivimman tekniikan valitseminen on hyvin paljon riippuvaa siitä, millainen aine on tutkittavana ja toisaalta, millaisia ominaisuuksia halutaan selvittää. Pääpaino kirjallisuuskatsauksessa on teoreettisen taustan muodostaminen värähtelytiloihin perustuvan spektroskopian ilmiöiden ymmärtämiseksi ja kolmen mainitun tekniikan esittely keskittyen Raman-spektroskopiaan ja sen sovelluksiin lääkeainetutkimuksissa in vitro sekä in vivo. Lopussa on siirtymäkatsaus, jossa on yhteenvetona Raman-tekniikan rajoitteita ja etuja, uusia teknisiä ratkaisuja sekä mahdollisia uusia sovellusalueita. Kokeellinen osio käsittelee Raman-spektroskopian käyttöä kiinteiden aineiden ja liuosten analysoinnissa. Vertailussa on konventionaalinen Raman-laitteisto ja uutta tekniikkaa edustava aika-erotteinen (engl. time-gated) hyödyntävä Raman-laitteisto. Aika-erotteisella laitteistolla on mahdollista vähentää huomattavasti muun muassa biofarmaseuttisissa sovelluksissa voimakkaasti esiintyvää, signaaleja häiritsevää fluoresenssi-ilmiötä. Kokeellinen osuus on jaettu kiinteillä aineilla ja liuoksilla tehtyihin analyysiin. Järjestys noudattaa protokollaa, jossa tutkitaan aluksi lääkeaineiden fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, mitataan tavallisella Raman-tekniikalla kiinteitä aineita ja valitaan mittausten perusteella muutamia aineita edelleen mitattavaksi aika-erotteisella Raman-tekniikalla. Lisäksi alkututkimusten pohjalta on valittu kaksi ainetta (ranitidiini ja kofeiini), joiden liuoksista tehdään konventionaalinen ja aika-erotteinen Raman-analyysi. Näin pyritään osoittamaan aika-erotteisen Raman-tekniikan edut muun muassa

fluoresenssin vähentämisessä verrattuna konventionaaliseen tekniikkaan. Kokeellisen osuuden tulosten pohdinnan jälkeen esitellään menetelmäkehitystä. Katsauksessa käsitellään muutamia tutkimussuunnitelmia, joita olisi mahdollista toteuttaa myöhemmin aika-erotteista Raman-spektroskopiaa hyödyntäen.

## 2 VIBRAATIOILOIHIN PERUSTUVA SPEKTROSKOPIA

### 2.1. Yleistä

Aineet eri olomuodoissaan koostuvat atomeista ja molekyyleistä. Lääkeainetutkimuksen kannalta relevantit olomuodot ovat kiinteä, neste ja kaasumainen olotila (plasma, Bosen-Einsteinin kondensaatti ja fermioninen kondensaatti eivät ole lääkeainetutkimuksen ja –spektroskopian kannalta erityisen merkittäviä). Useimmiten luonnossa ei esiinny atomeja vapaina yksikköinä, eli ilman mitään vuorovaikutusta ympäröivän maailman kanssa. Atomeilla on ympärillään atomiytimen protonirakenteesta riippuen tietynlainen elektronirakenne, eli sähköisesti positiivisesti varautunutta ydintä ympäröi negatiivisesti varautunut elektronien pilvi (Zumdahl 2002).

Yksinkertaisina esimerkkeinä aineiden muodostumisesta voidaan mainita hiiliatomeista koostuvat timantit, jotka ovat erityyppisiä hilarakenteita ja ruokasuola, natriumkloridi, joka on natrium- ja klooriatomien muodostama hilarakenne. Edelleen, atomit voivat liittyä toisiinsa myös muodostaen molekyyliä. Molekyylit koostuvat yksinkertaisimmillaan muutamista atomeista ja voivat toisaalta olla useiden tuhansien atomien muodostamia makromolekyyliä, jotka ovat tyypillisiä esimerkkejä orgaanisista biomolekyyleistä (Nelson ja Cox 2005). Tällaisia makromolekyyliä edustavat esimerkiksi suuret tärkkelysmolekyylit, solukalvojen kaksoiskalvorakenteiden molekyylit ja erilaiset proteiinit. Molekyylien atomit ovat tavallisesti sitoutuneet toisiinsa kovalenttisiin sidoksiin, kun taas esimerkiksi natriumkloridissa atomien välillä vallitsee ionisidokset.



Sidosten luokitus perustuu karkeasti yleistettynä niiden muodostavien atomien elektronegatiivisuuteen; määritelmän mukaisesti vahvemmin elektronegatiivinen atomi vetää puoleensa heikomman elektronegatiivisuuden atomin elektroneja (Zumdahl 2002). Elektronien sijainnin perusteella voidaan päätellä, onko muodostuva yhdiste ionisidoksellinen vai pikemminkin kovalenttisin sidoksin muodostunut. Lisäksi tunnetaan erilaisia heikkoja vuorovaikutuksia, jotka johtuvat mm. molekyylien hetkellisistä sähköisten varausjakaumien heilahteluista. Tällöin muodostuu hetkellisiä dipoleja, jolloin osassa rakennetta vallitsee hetkellinen positiivinen osittainen sähkövaraus ja osassa rakennetta puolestaan negatiivinen osittainen sähkövaraus.

Elektronit kiertävät atomiydintä atomiorbitaaleilla ja niillä on sekä hiukkas-, että aaltoluonne (Young ja Freedman 2000). Tämä tarkoittaa käytännössä sitä, että elektronien liikkeitä ja sijoittumista tutkittaessa on huomioitava niiden massaominaisuudet ja toisaalta aalto-ominaisuudet. Klassisen mekaniikan mukaan hiukkanen on paikallistunut tiettyyn pisteeseen tietyllä hetkellä. Kvanttimekaanisessa ajatustavassa hiukkanen ei esiinny paikallistuneena tiettyyn pisteeseen, vaan sen paikan ja liikemäärän määrittämisessä on aina tietty epävarmuus (Heisenbergin epätarkkuusperiaate). Kvanttifysiikan avulla elektroneille voidaan määrittää kvantittuneet energiatilat. Tiivistettynä kvantittuminen tarkoittaa sitä, että jokaisella atomiydintä kiertävällä elektronilla on tarkasti määrätty energia (Young ja Freedman 2000). Schrödingerin aaltoyhtälö on eräs kvanttimekaniikan perusyhtälöistä. Kun elektronien energioiden kvantittuminen huomioidaan, Schrödingerin aaltoyhtälön ratkaisuna saadaan aaltofunktioita. Käytännössä aaltofunktiot ovat todennäköisyysfunktioita ja 3-ulotteisessa avaruudessa esitettyinä ne edustavat erilaisia orbitaaleja. Atomeilla puhutaan atomiorbitaaleista ja molekyyliellä molekyyliorbitaaleista.

## 2.2. Vibraatioiloihin perustuvan spektroskopian teoreettinen tausta

Atomit muodostuvat sähköisesti positiivisesti varautuneiden protonien muodostamasta ytimestä ja sen ympärillä sijaitsevasta negatiivisen sähkövarauksen elektronijoukosta (paitsi vetyatomin tapauksessa elektroneja on vain yksi). Ulospäin neutraalisti varautuneen atomin ytimen positiiviset varaukset ja elektronien negatiiviset varaukset kumoavat toisensa.

Aikanaan havaittiin, että atomien ja molekyylien ominaisuuksia ei voida selittää pelkän klassisen mekaniikan avulla. Tarvittiin kvanttiteorian määrittämiä, jotka muodostuivat Max Planckin vuonna 1900 kehittämästä teoriasta, jota Albert Einstein edelleen kehitti vuonna 1905 (Young ja Freedman 2000). Teorian mukaan sähkömagneettiset aallot esiintyvät tietyn kokoisina, tarkasti määriteltävissä olevina paketteina, kvantteina eli fotoneina. Yhden fotonin energia riippuu aallon taajuudesta seuraavasti:

$$E = hf, \text{ jossa}$$

$E$  = hiukkasen energia

$h$  = Planckin vakio

$f$  = värähtelyn taajuus

Voidaan todeta, että sähkömagneettisella säteilyllä on sekä aalto- että hiukkasluonne. Vuonna 1924 Louis de Broglie esittämän aine-aaltohypoteesin mukaisesti myös ainehiukkasilla, kuten elektroneilla, on aalto-ominaisuuksia (Young ja Freedman 2000). Niille on voimassa edellä esitetty yhtälö, minkä lisäksi elektroneille voidaan määrittää aallonpituus alla olevan yhtälön avulla:

$$\lambda = \frac{h}{p}, \text{ jossa}$$

$\lambda$  = aallonpituus

$h$  = Planckin vakio

$p$  = hiukkasen liikemäärä

Atomien ja molekyylien elektronien energiatiloja määriteltäessä tärkeiksi muodostuu muutama kvanttiteorian sovellus; Schrödingerin aaltoyhtälö sekä atomi- ja molekyyliorbitaalit (Zumdahl 2002). Atomiorbitaali on kvanttimekaanisen atomimallin mukaan ratkaisu elektronin aaltoyhtälölle. Toisin sanoen se on Schrödingerin aaltoyhtälön ratkaisuna saatu todennäköisyysfunktio (aaltofunktio). Se kuvaa atomin ydintä kiertävien elektronien todennäköiset radat. Tässä yhteydessä on tärkeää huomioida, että absoluuttista elektronien sijaintia ei voida määrittää, koska Werner Heisenbergin vuonna 1927 esittämän peruseriaatteen (Heisenbergin epätarkkuuseriaate) tiettyjen havaintoparien arvoja ei voida määrittää samanaikaisesti äärettömän tarkasti. Tällaisia pareja ovat esimerkiksi hiukkasen paikka ja liikemäärä. Klassinen esimerkki on tilanne, jossa elektroni pommitetaan kulkemaan kuvitteellisesti lähes äärettömän pienestä aukosta. Tällöin saadaan tietoa elektronin paikasta. Mitä kapeammaksi aukko käy, sitä tarkemmaksi saadaan todennäköinen paikan estimaatti. Ongelmaksi loputtoman tarkalle estimaatille muodostuu se, että aine (tässä siis elektroni) on myös aalto, ja elektroni alkaa käyttäytyä aaltoluonteen mukaisesti. Elektroni diffraktoituu kapeassa aukossa, jolloin liikkeelle ja liikemäärälle tulee komponentti aukon tasoon. Mitä tarkemmin tiedetään elektronin paikka, josta elektroni kulki, sitä enemmän liikemäärä hajoo aukon tasossa. Ja toisaalta, aukon suurentaminen saa aikaan paremman tarkkuuden diffraktoitumiseen, mutta paikkatiedon tarkkuus vähenee.

Yhdelle atomiorbitaalille mahtuu 2 elektronia, joille voidaan määrittää kvanttimekaniikan Paulin kieltoäännön mukaan vastakkaiset spinit (Bruice 2007). Edelleen, atomilla on kvanttimekaanisen mallin mukaan useita elektronikuoria, jotka jaetaan edellä mainittuihin atomiorbitaaleihin. Elektronikuoren atomiorbitaalit jaetaan energiatasoiltaan 4 pääluokkaan; s-, p-, d- ja f-luokkaan. s-orbitaalille mahtuu 2 elektronia, p-orbitaaleille (3 mahdollista) 6 elektronia, d-orbitaaleille 10 elektronia ja f-orbitaaleille 14 elektronia. Atomiorbitaalit täyttyvät säännönmukaisesti atomien ytimien protonien ja näin ollen elektronien määrän kasvaessa (ja tästä muodostuu myös alkuaineiden jaksollinen järjestelmä).

Poikkeukset atomiorbitaalien täyttymiseen muodostuvat siitä, että puolitäysi tai täysi alakuori ovat symmetrisempiä atomin keskuksen suhteen ja tällä tavoin energeettisesti matalammalla tasolla kuin säännönmukaisen täyttymisjärjestyksen määräämänä tapahtuisi.

Kemiallisten yhdisteiden ominaisuudet määräytyvät pitkälti niiden muodostavien alkuaineiden s- ja p-orbitaalien elektronien määrästä. Yhdisteessä orbitaalit asettuvat uudelleen ja muodostavat kemiallisen sidoksen ja puhutaan molekyyli- tai sidosorbitaalista. Toisinaan myös d- ja f-orbitaalit osallistuvat sidosten muodostumiseen, vaikka ne ovat yleensä inaktiivisempia sidosten muodostamisessa kuin s- ja p-orbitaalit.

Molekyyliorbitaali on molekyylin elektronien sijaintipaikka. Alkuaineiden atomiorbitaalit ovat hyvin poikkeavia keskenään, ja myös molekyyliorbitaalien muoto vaihtelee suuresti. Kuten edellä on esitetty, elektronit voidaan käsittää hiukkasiksi ja toisaalta aaltoliikkeeksi, jota voidaan kuvata matemaattisella aaltoyhtälöllä. Aaltoyhtälöllä kuvataan hiukkasen, esimerkiksi elektronin, aaltoluonnetta. Kvanttimekaniikassa aaltoyhtälö määrittelee elektronien energian ja sen alueen, jolta elektroni on löydettävissä suurimman osan ajasta. Edellä mainittu Schrödingerin yhtälö on Erwin Schrödingerin vuonna 1926 kehittämä kvanttimekaniikan yhtälö (Young ja Freedman 2000). Se osoittaa, millainen aaltofunktio hiukkaseen liittyy silloin, kun sillä on tietty energia ja se on tietyssä potentiaalissa. Schrödingerin yhtälö on erityisen keskeinen osa kvanttimekaniikan teoriaa. Sen vastineena voidaan pitää Newtonin II lakia klassisessa mekaniikassa. Kummatkin yhtälöt kuvaavat liikettä. Schrödingerin yhtälön yleinen muoto on:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\vec{x}, t) = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(\vec{x}, t) + V(\vec{x}) \Psi(\vec{x}, t)$$

missä  $\Psi(\vec{x}, t)$  on paikasta  $\vec{x}$  ja ajasta  $t$  riippuva aaltofunktio,  $\hbar$  redusoitu Planckin vakio,  $m$  hiukkasen massa,  $V$  sen paikasta riippuva potentiaalienergia ja  $i$  on imaginääriyksikkö.

Näin ollen, Schrödingerin aaltoyhtälön ratkaisuina saadaan aaltofunktioita, jotka kuvaavat hiukkasten todennäköisyysjakaumaa. Aaltofunktioiden, eli todennäköisyysjakaumaa kuvaavien yhtälöiden, ratkaisut puolestaan edustavat orbitaaleja, jotka kuvaavat elektronien tiloja atomiytimien ympärillä. Elektroni voi olla ytimen ympärillä vain tietyillä orbitaaleilla, jotka vastaavat tiettyjen kvanttilukujen yhdistelmiä ja kvanttilukujen on oltava kokonaislukuja. Tämä voidaan ymmärtää siten, että kun atomin tai molekyylin jokaiseen elektroniin liittyviin aaltoyhtälöihin sijoitetaan kaikki kvantittuneiden energiatilojen puitteissa sallitut arvot x-, y- ja z-koordinaatistossa, saadaan tiettyjen muotojen (rajapintojen) rajaamia alueita. Nämä alueet ovat orbitaaleja. Näillä tiloilla elektronit sijaitsevat 90-95 % ajastaan. Molekyylin muodostuessa atomiorbitaalit yhdistyvät. Yhdistymistä seuraa uudelleenjärjestyminen, jolloin muodostuu uusia avaruudellisesti eri tavoin suuntautuneita molekyyliorbitaaleja. Muutosta kutsutaan hybridisaatioksi, jolla tarkoitetaan atomiorbitaalien uudelleenjärjestymistä.

Schrödingerin aaltoyhtälöstä voidaan erottaa Hamiltonin operaattori (Zumdahl 2002). Se kuvaa systeemin kokonaisenergiaa. Todettiin, että klassisessa mekaniikassa Newtonin II laki voidaan rinnastaa Schrödingerin yhtälöön kvanttimekaniikassa. Voima määritellään Newtonin II laissa, mutta sen tarkkaa muotoa ei laissa määritellä. Yhtäläisyyksiä on nähtävissä Schrödingerin yhtälön kanssa. Schrödingerin yhtälöstä ei saada hiukkasen liikkeen tarkkaa muotoa, vaan se pitää muodostaa erikseen systeemin fysikaalisten ominaisuuksien perusteella. Aaltofunktion amplitudia  $\psi$  sanotaan todennäköisyysamplitudiksi. Sen neliö osoittaa todennäköisyyden sille, että hiukkanen on tietyllä alueella. Monissa yhteyksissä tila oletetaan stationaariseksi. Tällä tarkoitetaan, että systeemi on energian (eli Hamiltonin operaattorin) ominaistilassa. Hamiltonin operaattori

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V(\vec{x})$$

määrää systeemin aikakehityksen, joten stationaarisessa tilassa olevan hiukkasen aaltofunktio ei riipu ajasta. Yleisemmin kaikkien mitattavissa olevien suureiden

odotusarvot ovat ajasta riippumattomia stationaarisessa tilassa. Käytetään klassisen mekaniikan yleistä aaltoyhtälöä

$$\frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} = \nabla^2 \psi, \text{ missä}$$

$\psi$  = aallon muotoa esittävä aaltofunktio

$v$  = aallon vaihenopeus eli sen taajuuden ( $f$ ) ja aallonpituuden ( $\lambda$ ) tulo

ja de Broglien kaavoja. Lopputuloksena saadaan Schrödingerin yhtälö, joka on ajasta riippumaton kolmiulotteisessa potentiaalissa olevalle hiukkaselle:

$$\left[ \frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + U(\vec{r}) \right] \Psi(\vec{r}) = E \Psi(\vec{r}), \text{ missä}$$

$\nabla^2$  on gradientin divergenssi ja  $U(\vec{r})$  on systeemin potentiaalienergiaa vastaava operaattori. Yhtälö voidaan kirjoittaa myös muodossa

$$\hat{H} \Psi(\vec{r}) = E \Psi(\vec{r})$$

On huomioitavaa, että klassisen fysiikan mukaisessa aalto-opissa funktio  $\psi$  vastaa sitä suuretta, jonka vaihteluista aaltoliike muodostuu. Tällaisia ovat esimerkiksi sähkökentän voimakkuus sähkömagneettisissa aalloissa, veden pinnankorkeus vesiaalloissa tai paine ääniaalloissa. Hiukkasiin liittyvää aaltoliikettä ei aluksi yhdistetty kyseiseen funktioon. Vasta myöhemmin kehitettiin todennäköisyyslaskenta, jolloin funktiolle  $\psi$  saatiin klassista fysiikan aalto-oppia vastaava merkitys kvanttifysiikassa. Tämän määrittelyn mukaan aaltofunktion amplitudin neliöstä saadaan todennäköisyys sille, että hiukkanen löytyy tietyistä paikasta.

Klassisen mekaniikan lainalaisuuksia käyttäen on osoitettu, että osa molekyylien liikkeisiin liittyvistä tekijöistä voidaan johtaa matemaattisten massakeskipisteiden kesken tapahtuviin värähdyksiin perustuen (Colthup ym. 1990). Puhutaan sisäisistä vapausasteista, joihin eivät sisälly koko molekyylille määritetyn massakeskipisteen translaatioliike, eivätkä rotaatiot (nämä liikkeet eivät muuta varsinaisesti molekyylin

omaa rakennetta mitenkään). Epälineaarille molekyyille näitä sisäisiä vapausasteita voidaan määrittää  $3N - 6$  kappaletta ja lineaarisille  $3N - 5$  kappaletta, joissa  $N$  on molekyyllissä olevien atomiydinten lukumäärä. Molekyylin rotaatioihin ja translaatioon liittyvät energiatilat (eli toisin sanoen kyseisiin liiketyyppeihin liittyvät taajuudet, jotka saavat aikaan liikkeitä molekyyllissä) pitää määrittellä erikseen. Klassisen fysiikan mallit massakeskipisteiden värähtelyistä voidaan yhdistää edellä esitettyihin kvanttifysiikan malleihin aaltofunktioista ( $\Psi$ ) sekä todennäköisyysfunktioista ( $\Psi^2$ ). Lisäksi voidaan käyttää kvanttimekaaniseen harmoniseen oskillaattoriin liittyviä lainalaisuuksia. Edelleen, huomioimalla Boltzmannin jakaumafunktio, joka määrittelee eri lämpötilan vaikutuksen molekyylien jakaumaan perustilan ja ylempien energiatilojen välillä, sekä huomioimalla molekyylin todennäköisin muoto (engl. linear, spherical top, symmetric top (engl. oblate/prolate), asymmetric top), saadaan muodostettua pääpiirteet vibraatio-rotaatiospektroskopian ilmiöille. Harmonisen oskillaattorin mallia voidaan käyttää sekä klassisen fysiikan että kvanttifysiikan määrittelyissä. Usein harmonisen värähtelijän malli on riittävä kuvaamaan molekyylin rakenteiden ja niiden värähtelyjen seurauksena määritetyn spektrin välisiä yhteyksiä (Colthup ym. 1990). Jotkin spektrien yksityiskohdat, kuten ylävireisten taajuuksien muodostuminen, osoittavat, että todellisuudessa molekyyilleillä on myös ei-harmonisia potentiaalifunktioita. Käytännössä tämän erona harmoniseen (kvanttimekaaniseen) värähtelijään on se, että ei-harmonisen värähtelijän värähdystaajuudet eivät enää ole perustaajuuden monikertoja eli värähdysten välillä ei ole yhtä suurta eroa keskenään.

Atomit vuorovaikuttavat keskenään erilaisten kemiallisten sidosten välityksellä. Sidokset luokitellaan muun muassa niiden vahvuuden (sidosenergia) ja dimensioiden (sidosten pituus) avulla (Sinko 2011). Alla olevassa taulukossa 1 on lueteltuna yleisimmät sidostyyppit ja niiden välillä vallitsevat likimääräiset sidosenergiat.





molekyylien muodostumista sekä ominaisuuksia voidaan mitata käyttämällä ulkoista energiaa niiden altistamiseen. Toisinaan puhutaan myös 'heräte-energiasta'.

Lääkeainetutkimuksessa spektroskopiaa ja molekyyliarakenteiden tutkimusta hyödynnetään erittäin laajalla skaalalla. Kun molekyylien fysikaaliset ominaisuudet yhdistetään jo tunnettujen samankaltaisten rakenteiden kemiallisiin ominaisuuksiin, on mahdollista tehdä erityyppisiä perusmääryksiä. Esimerkiksi kuvata molekyylien atomien paikkajärjestystä, saada todisteita molekyylin fysikaalisesta tai kemiallisesta käyttäytymisestä tai kehittää menetelmiä tietyn lääkeainemolekyylin kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin (Sinko 2011). Näistä ensinnä ja toisena mainitut johtavat yleensä päätelmiin kemiallisesta luonteesta ja potentiaalisesta toimintamekanismista, jotka ovat tarpeellisia ennen kaikkea uusien lääkeainekandidaattien, joilla on selektiivistä farmakologista tehoa, löytämiselle. Viimeisenä mainittu puolestaan mahdollistaa työkaluja ennen kaikkea lääkekehitykseen ja -tuotantoon. Edelleen, tästä on hyötyä myös analytiikassa muun muassa lääkevalmisteiden laadunvalvonnassa.

Kuten edellä on esitetty, molekyylin energia koostuu sen muodostavien atomien ja niiden välisten sidosten energioista. Jokaista näistä energioista voidaan käsitellä erikseen (Colthup ym. 1990). Molekyylin energia muodostuu osin translaatioenergiasta, osin rotaatioenergiasta, osin vibraatio- eli värähtelyenergiasta sekä osin elektronisesta energiasta. Alla olevassa taulukossa 2 on keskimääräiset energia-alueet kullekin edellä mainituista.

**TAULUKKO 2:** Erialaisten värähtelyjen keskimääräisiä energioita.

Energiatila	Keskimääräinen energia-alue
Elektroniset siirtymät	$\sim 10^{-18}$ J (UV- ja näkyvän valon aallonpituusalue)
Vibraatiosiertymät	$\sim 10^{-19} - 20^{-20}$ J (IR-alueen aallonpituusalue)
Rotaatiosiertymät	$\sim 10^{-21}$ J
Translaatiosiertymät	$\sim 10^{-35}$ J

Kun tarkastellaan koko elektromagneettista spektriä, elektronisten energiatilojen väliset siirtymät toimivat yleensä lähteenä absorptiolle tai emissiolle UV- ja näkyvän valon aallonpituusalueella. Puhtaat rotaatiot aiheuttavat absorptiota mikroaaltoalueella tai kaukaisella infrapuna-alueella. Molekulaariset vibraatiot puolestaan aiheuttavat absorptiospektrejä lähes koko spektrin infrapuna-alueelle. Tämän katsauksen tarkastelujen keskeisenä alueena ovat sähkömagneettisen säteilyn aiheuttamat interaktiot molekyylien rotaatio- ja vibraatiotiloissa.

Näytteitä voidaan tutkia hyvin laajalla fysikaalisten olomuotojen alueella; kiinteässä, liuoksina tai kaasuina. Edelleen, kuumassa tai kylmässä, jauheena, mikropartikkeleina tai kerrostuneina pintarakenteina (Smith ja Dent 2005).

Säteily karakterisoidaan usein sen aallonpituuden ( $\lambda$ ) avulla. Spektroskopiassa kiinnostuksenkohteena ovat kuitenkin yleensä säteilyn interaktiot tutkittavan molekyylin energiatilojen kanssa. Näin ollen onkin käytännöllisempää puhua energioista ja käyttää taajuutta (merkintätavoista riippuen  $f$  tai  $\nu$ ) tai aaltolukua  $\omega$  energian kuvaamisessa. Nämä ovat lineaarisesti yhteydessä energiaan ( $E$ ). Alla on esitettyinä nämä yhteydet:

$$\lambda = c/f \quad (1)$$

$$f = \Delta E / h \quad (2)$$

$$\omega = f/c = 1/\lambda \quad (3), \text{ joissa}$$

$\lambda$  = aallonpituus

$c$  = valon nopeus tyhjiössä  $\sim 3.0 \cdot 10^8$  m/s

$f$  = värähtelyn taajuus

$E$  = energia

$h$  = Planckin vakio  $\sim 6.63 \cdot 10^{-34}$  J\*s

$\omega$  = aaltoluku = aallonpituuden käänteisluku

Yhtälöiden perusteella voidaan todeta, että energia on käänteisesti verrannollinen aallonpituuteen ja näin ollen korkeimman energian alue on pienimmän aallonpituuden alueella. Edelleen, korkeimman energian alue on toisaalta korkeimman värähtelytaajuuden alueella, toisin sanoen korkean taajuuden värähtely on energialtaan korkeampaa kuin matalamman taajuuden värähtely. Edelleen, yllä esitettyjen yhtälöiden (1)-(3) perusteella tässä tekstissä käytetään energian ilmaisuna sekä energiaa että aallonpituutta ja aaltolukua – kuhunkin tilanteeseen parhaiten sopivasti. Taulukossa 3 esitetään tämän tutkimuksen kannalta relevantti osa sähkömagneettisesta spektristä ilmaistuna aallonpituuden ( $\lambda$ ), aaltoluvun ( $\nu$ ) ja taajuuden ( $f$ ) avulla.

**TAULUKKO 3:** Osa sähkömagneettisen säteilyn spektristä eri suureiden avulla ilmoitettuna (Mukaiituna Colthup ym. 1990).

Säteilyn alue	$\lambda$ (cm)	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	f (Hz)
<b>Ultravioletti</b>			
(kauko)	$1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^6 - 50\,000$	$3 \times 10^{16} - 1.5 \times 10^{15}$
(lähi)	$2 \times 10^{-5} - 3.8 \times 10^{-5}$	$50\,000 - 26\,300$	$1.5 \times 10^{15} - 7.9 \times 10^{14}$
Näkyvä valo	$3.8 \times 10^{-5} - 7.8 \times 10^{-5}$	$26\,300 - 12\,800$	$7.9 \times 10^{14} - 3.8 \times 10^{14}$
<b>Infrapuna</b>			
(lähi)	$7.8 \times 10^{-5} - 2.5 \times 10^{-4}$	$12\,800 - 4000$	$3.8 \times 10^{14} - 1.2 \times 10^{14}$
(keski)	$2.5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$	$4000 - 200$	$1.2 \times 10^{14} - 6 \times 10^{12}$
(kauko)	$5 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-1}$	$200 - 10$	$6 \times 10^{12} - 3 \times 10^{11}$
<b>Mikroaallot</b>	$1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^2$	$10 - 0.01$	$1 \times 10^{12} - 3 \times 10^8$

Energiaerot, joita värähtelytiloihin perustuvassa spektroskopiassa hyödynnetään, vaativat molekyylien atomien ydinten värähtelyä (Smith ja Dent 2005). Jos ainoastaan molekyylin elektronipilven häirintää tapahtuu, siroavien fotonien energiaerot verrattuna heräte-energiaan ovat erittäin pieniä. Tällaista sirontaa kutsutaan elastiseksi sironnaksi ja se on vallitseva prosessi tapahtumissa. Molekyylien tapauksessa puhutaan Rayleigh-sironnasta. Jos atomiydinten liikettä saadaan aikaan, energiaa siirtyy heräte-energian fotoneina molekyylille tai molekyyliltä sironneille fotoneille. Näissä tapauksissa prosessi on epäelastista sirontaa, jota kutsutaan Raman-sironnaksi. On huomioitava, että tällainen sirontaprosessi on

erittäin heikko ja ainoastaan yksi foton  $10^6$ - $10^8$  sironneesta fotonista on Raman-sironnut.

Huoneenlämmössä useimmat molekyylit ovat energieettisesti perustilallaan, alimmalla värähtelyenergian tilalla (Smith ja Dent 2005). Kun molekyyliin kohdistetaan säteilyenergiaa, vallitsevana on Rayleigh-sironta. Mukana ei ole energianmuutoksia ja säteilyn fotonit palaavat samalle energiatilalle kuin lähtötilanteessa. Raman-sirontaprosessi perustilalta m johtaa molekyyliin absorboimaan energiaa ja näin ollen sen siirtymisen korkeammalle värähtelytilalle n. Tätä kutsutaan Stokes-sironnaksi. Molekyylien sisäisen termisen energian johdosta osa näytteen molekyyleistä voi olla jo valmiiksi korkeammalla virittyneellä tilalla n. Sironta näiltä tiloilta perustilalle aikaansaa energian siirtymisen molekyylin rakenteista sironneille fotoneille. Tätä kutsutaan anti-Stokes-sironnaksi. Tyypillisesti ainoastaan Raman-sirontaa detektoidaan, mutta toisinaan anti-Stokes-sirontaa halutaan hyödyntää. Esimerkiksi mikäli näytteen analysointia häiritsee vibrationaaliselle spektroskopialle tyypillinen voimakas fluoresenssi-ilmiö molekyylin rakenteista, anti-Stokes-sirontan aiheuttamia fotoneja voidaan hyödyntää detektiossa.

Molekyylin totaalienergia on summa sen elektronisesta, vibrationaalisesta, rotationaalisesta ja translationalisesta energiasta (Sinko 2011). Näin ollen on luonnollista, että kohdistettaessa molekyyliin ulkoista heräte-energiaa (esimerkiksi laser-valoa), siinä voi tapahtua kaikkien näiden energiatilojen muutoksia samanaikaisesti. Molekyylien spektreissä elektronisten siirtymien spektriä esimerkiksi 'häiritsee' samanaikaisesti tapahtuvat siirtymät vibraatiotiloissa ja rotationaalisisä energiatiloissa. Näillä energia-alueilla (UV-valo, näkyvä valo), jotka ovat suhteellisen suurienergisiä alueita, spektrien piikeistä muodostuu leveitä vöitä. Toisaalta esimerkiksi infrapuna-alueella, jolla vaikutetaan pääasiassa vibrationaalisiin ja rotationaalisiin siirtymiin, spektriin muodostuu terävämpiä piikkejä. Tämä toimii perustana oikean heräte-energia-alueen tuntemukselle ja valinnalle etenkin tutkittaessa tiettyjä molekyylien hienorakenteita. Näin ollen usein on erittäin hyödyllistä tuntea ainakin joitakin tutkittavan molekyylin fysikaalis-kemiallisia suureita.

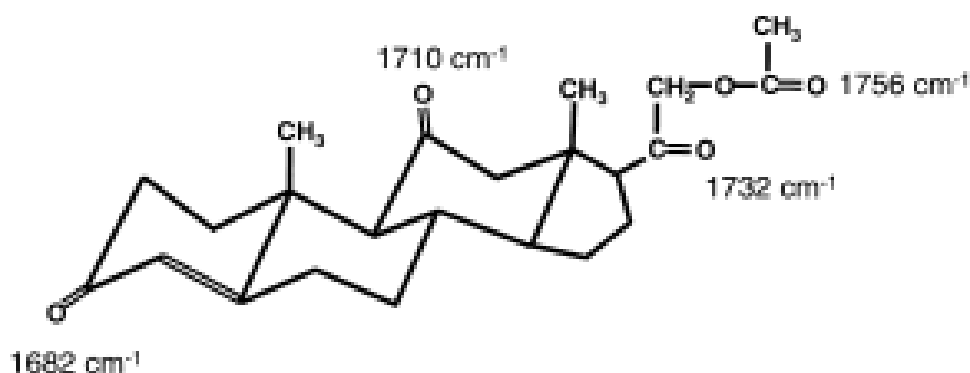
Kun näytteen molekyylit absorboivat heräte-energian fotoneja, osa absorboituneiden fotonien energiasta kuluu muun muassa molekyylin vibraatioihin, rotaatioihin ja translaatioihin. Värähtelytiloihin perustuvan spektroskopian ydinajatuksena on näiden värähtelyenergiatilojen muutosten detektio. Kaikkia edellä mainittuja voi tapahtua ja usein tapahtuukin samanaikaisesti kun heräte-energia aktivoi molekyylin rakenteita. Jos viritystilalta perustilalle siirryttäessä tapahtuu energian vapautumista sisäsiirtymin tai vibrationaalisten tilojen muutoksilla, molekyylissä ei esiinny luminesenssiä (Davidson 2009). Fotoluminesenssi on pääotsikko valon aikaansaamien atomien ja/tai molekyylien elektronisten viritystilojen purkautumiselle. Useat kemialliset yhdisteet emittoivat säteilyä palatessaan perustilalle – tämä tapahtuu joko fluoresenssin tai fosforesenssin (fotoluminesenssin alaotsikot) kautta riippuen reitistä, jolla paluu perustilalle tapahtuu. Näistä ilmiöistä usein seuraa vibrationaalista spektroskopiaa hyödynnettäessä spektrien päällekkäisyyden ilmenemistä (engl. spectral overlapping) (Davidson 2009). Fluoresenssin aiheuttamat fotonit siis häiritsevät värähtelytilojen detektioon vaadittavia alueita spektrissä ja spektrien tulkinta sekä piikkien löytäminen spektreistä mutkistuu. Tämä perustuu vaikeuteen erottaa, mitkä fotonit ovat fluoresenssin aiheuttamia, ja mitkä fotonit molekyylin sidosten värähdystilojen muutosten aiheuttamia.

Kun molekyylien värähtelyjä ja niiden normaalivärähdysten vapausasteita tutkitaan karteesisissa koordinaatistoissa (eli tavallisissa koordinaatistoissa), tehdään yleensä muutamia yleistyksiä. Ensinnä, molekyylien translaatioliikettä ei lasketa värähtelytaajuuksiin aidosti kuuluvaksi. Toiseksi, molekyylien rotaatioliike vähennetään niiden normaalivärähdysten vapausasteista. Näin ollen epälineaarisen  $N$  atomia sisältävän molekyylin normaalivärähdysten vapausasteiden määräksi saadaan  $3N-6$  ja lineaarisen molekyylin  $3N-5$  (Woodward 1972).

### 2.3.1 IR-spektroskopia

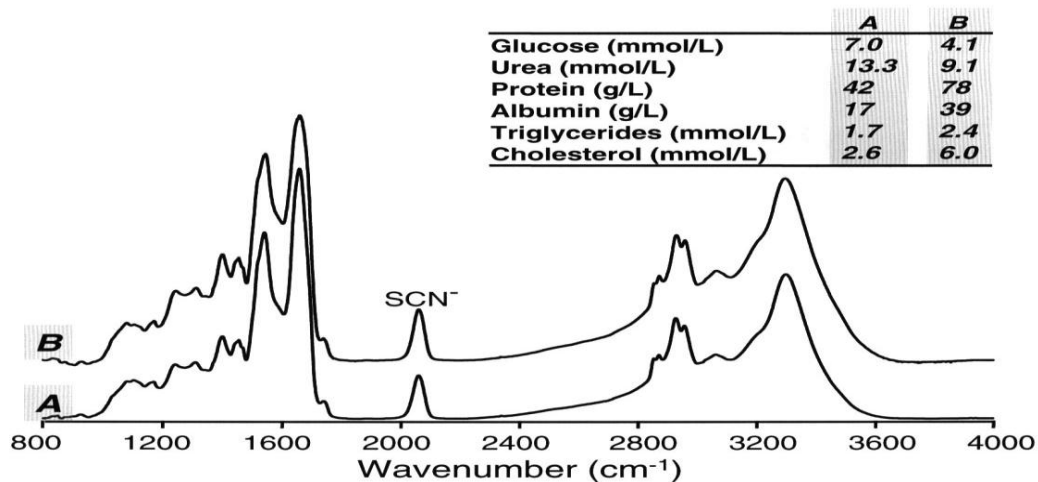
Molekyyleillä on niille ominaiset luonnolliset vibraatiotaajuudet (Colthup ym. 1990). Nämä molekyylille ominaiset taajuudet määräytyvät muun muassa atomien välisten etäisyyksien ja niiden massojen, sidosvahvuuksien ja molekyylin sähköisen varausjakauman sekä symmetrian määrääminä. Jotta molekyyli voisi olla IR-aktiivinen, sen sähköisen dipolimomentin täytyy muuttua ulkoisen häirintätaajuuden, eli siihen kohdistetun energian fotonien, johdosta. Tarvitaan klassista mekaniikkaa ja kvanttifysikan lainalaisuuksia molekyylin atomien välisten voimavaikutuksien kuvaamiseen, värähtely- ja pyörimisliikkeiden kuvaamiseen sekä näihin liittyviin energia-määrityksiin. Tällöin saadaan laskennallisesti selville valintasäännön mukaiset taajuusalueet, joilla molekyyli osoittaa IR-aktiivisuutta, kun siihen kohdistetaan heräte-energiaa. Kun kyseisen energian taajuus käy yhteen molekyylin luonnollisten vibraatiotaajuuksien kanssa, se voidaan havaita IR-spektroskopiassa käytettävillä detektoreilla. On luonnollista, että laskennalliset määritykset ovat suhteellisen selkeitä pienemmille molekyyleille, mutta moniatomiset suuret molekyylit sisältävät matemaattisesti tällä tavoin tarkasteltuina hyvin mutkikkaita ratkaisuja (Colthup ym. 1990). Empiirisesti on havaittu, että tietyt molekyyleissä olevat rakenteet, atomien väliset sidokset ja funktionaaliset ryhmät tuottavat vibraatiospektreihin niille ominaisia piirteitä tietyille taajuusalueille. Määritelmässä on varsinkin suomennettaessa oltava tarkkana; vibraatiospektroskopiaa kuvaavassa kirjallisuudessa *ryhmävärähtelyllä* ei varsinaisesti tarkoiteta jonkin tietyn funktionaalisen ryhmän värähtelyjä. Määritelmän mukaan ryhmävärähtelyn tarkastelu tarkoittaa tilannetta, jossa tutkitaan kahta hyvin samantyyppistä molekyylin atomien välistä sidosta (energialtaan ja sijainniltaan). Tällaisten sidosten värähtelyjä täytyy tutkia yhtenäisen *ryhmän* aiheuttamina värähtelyinä enemmän kuin vastaavien yksittäisten sidosten aiheuttamia. Esimerkiksi  $-\text{CH}_2-$  ryhmällä sanotaan esiintyvän symmetristä ja epäsymmetristä venytysvärähtelyä enemmän kuin kahden erillisen  $\text{CH}-$  sidoksen aiheuttamaa venytysvärähtelyä. Toisaalta taas esimerkiksi  $\text{CH}_3\text{Br}$  -molekyylissä  $\text{C}-\text{H}$  -sidoksia täytyy tarkastella  $\text{CH}_3$  : n osalta yhtenäisenä ryhmänä,

mutta C-Br – värähtelyä puolestaan erillisenä värähtelynä. Näin ollen määritelmä *ryhmävärähtely* voidaan tarkkuutta noudattaen laajentaa koskemaan myös funktionaalisia ryhmiä ja myös tämän tekstin yhteydessä kyseisellä termillä viitataan jonkin tietyn funktionaalisen ryhmän värähtelytiloihin, ellei muuta ole erikseen mainittu. Värähtelytilojen tunnusomaisia piirteitä voidaan hyödyntää laajasti sekä IR- että Raman-spektroskopiassa. Tulkinnot molekyylin rakenteesta ja spektrissä näkyvien piikkien ja tunnusalueiden välisistä yhteyksistä pohjautuvat aiemmin määritettyihin spektreihin vertaamiseen ja/tai laskennallisiin arvioihin. Kuvassa 1 on yksinkertainen esimerkki kortisonimolekyylistä, jonka tärkeimpien IR-aktiivisten ryhmien kohdalle on merkitty spektrissä näkyvät värähtelytaajuuudet, eli energia-alueet, joilla kyseisen molekyylin kyseiset funktionaaliset ryhmät värähtelevät, kun niihin kohdistetaan IR-laitteiston heräte-energiaa (Shaw ja Mantsch 1999).



**KUVA 1:** Kortisoni-molekyylin rakenne ja tärkeimmät IR-aktiiviset rakenteet (Shaw RA ja Mantsch HH 1999).

Muutamia yleisiä kemiallisia biokemiallisia analyysejä IR-spektroskopiolla tehtyinä ovat esimerkiksi erilaiset seerumimääritykset sekä virtsan kreatiniini ja ureapitoisuus (Shaw ja Mantsch 1999). Alla olevassa kuvassa 2 on selvitetty kuuden eri analyytin pitoisuuksia seerumissa IR-määrityksellä tehtyinä.



**KUVA 2:** Kuuden eri analyytin (glukoosi, urea, proteiinit, albumiini, triglyseridit, kolesteroli) pitoisuusmääritykset seerumista IR-spektroskopiaa hyödyntäen (Shaw RA ja Mantsch HH 1999).

Jotta spektridata saataisiin tulkittua luotettavasti ja etenkin kvantitatiivissa määrittelyissä toistettavasti, spektrien silmämääräinen tutkiminen ei yleensä ole vaihtoehto. Spektrien tulkintaan ja niiden sisältämän informaation vertailuun käytetään muun muassa tietokoneohjelmia ja -laskentaa. Matemaattinen käsittely voi koostua esimerkiksi lineaarisen regression, pienimmän neliösumman (engl. partial least squares) tai lineaarisen diskriminanttianalyysin hyödyntämisestä (Shaw ja Mantsch 1999).

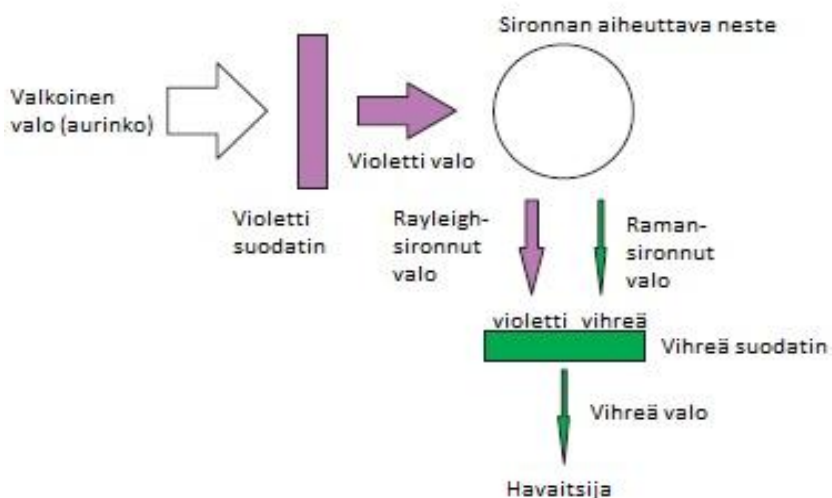
### 2.3.2 Raman-spektroskopia

Raman-sironnan havainnointi ja käyttö on vähemmän laajasti käytetty ilmiö vibraatiospektroskopiassa kun infrapuna-absorptio (Smith ja Dent 2005). Suurimpana ongelmana on ollut näytteiden kuluminen ja hajoaminen sekä fluoresenssi. Instrumentoinnin paraneminen on kuitenkin yksinkertaistanut laitteistoja ja vähentänyt ongelmia huomattavasti. Raman-spektroskopiaa voidaan hyödyntää tutkittaessa vesipitoisia näytteitä, näytteitä suoraan lasiastioissa ja ilman erityistä preparointia. Nämä edistysaskeleet ovat johtaneet tekniikan hyödyntämisen nopeaan kasvuun. Moderni Raman-spektroskopia on yksinkertaista; vaihtelevien instrumenttiparametrien määrä on vähäinen, spektrien



manipuloinnin tarve minimaalista sekä datan tulkinta on suhteellisen helppoa. Seuraavassa käsitellään Raman-spektroskopiaan liittyvä teoreettinen tausta ja joitakin käytännön huomioita, jotta tekniikan monipuolisia sovelluksia muun muassa lääketutkimuksessa voidaan paremmin havainnollistaa.

Raman-sironna ja sen hyödyntäminen on vieläkin 'alikehitettyä' tekniikkaa – hyvin paljon ilmiön tarjoamaa tärkeää informaatiota jätetään huomioitta tai jopa tunnistamatta (Smith ja Dent 2005). Tiettyjen minimilainalaisuuksien tunteminen antaa keinoja pintaa syvemältä tapahtuvan ymmärryksen muodostamiselle. Tällöin mittauksilla saatavaa dataa voidaan hyödyntää entistä tehokkaammin ja toisaalta kehittää sekä tulkita edistyneisempääkin tekniikkaa, mikä mahdollistaa spesifisiä etuja tietyille sovellusalueille. Raman-spektroskopia perustuu valon epäelastiseen sironnaan molekyyleistä. Ilmiön esitti alun perin Smekal vuonna 1923. Ensimmäisenä ilmiö havaittiin kokeellisesti Ramanin ja Krishnan (1928) tutkimuksissa. Alkuperäisessä koejärjestelyssä auringonvalo fokusoitiin teleskoopin avulla näytteeseen ja toinen linssi asetettiin näytteen viereen keräämään sironnutta säteilyä. Optisten suodattimien avulla osoitettiin, että sironnutta säteilyä, jolla on alkuperäisen valonlähteen taajuuteen nähden erilainen energia, todella tapahtuu. Tämä muodostaa modernin Raman-spektroskopian pohjan. Kuvassa 3 on esitettyä 1928 tehdyn kokeellisen järjestelyn ja Raman-sironnan havaitsemisen perusajatus.



**KUVA 3:** Raman-sironnan alkuperäinen havainnointi

Ilmiön keksimisestä lähtien aiheesta on julkaistu lukuisia tutkimuksia, jotka pitkään keskittyivät käsittelemään ilmiötä yleisellä tasolla. Raman-spektroskopiaan liittyi paljon teknisiä ongelmia, kuten heikko intensiteetti, häiritsevä fluoresenssi ja riittämätön valon keräys ja detektointi. Tekniset ongelmat estivät Raman-spektroskopian hyödyntämisen käytännön analytiikassa. Vasta 1980-luvulla ilmestyi tutkimuksia, joissa tekniikka yhdistettiin kemiallisiin analyysiin. 1980-luvun lopulla esiteltiin Raman-spektroskopia, jossa hyödynnettiin Fourier-muunnosta (engl. Fourier-transform, FT), CCD-detektoria (engl. Charge-Coupled Device), lähi-infarapuna laseria (NIR) ja tietokoneita (Pitt ym. 2005). Tietokoneiden ja laskentatehon parantuessa Snyder ja Schachtschneider (1963) julkaisivat tärkeitä tutkimustuloksia koskien yksityiskohtaisia määrittämiä sarjalle hiilivetyjä. Määrittämissä on kuvattu vibrationaaliset voimakentät ulottuen  $C_{19}H_{40}$  asti. Tämä mahdollisti ensimmäisiä kertoja sen, että päästiin vähitellen analysoimaan myös suuria biomolekyylejä vibrationaalisen spektroskopian keinoin.

Kun valo vuorovaikuttaa aineen kanssa, fotonit, joista valo koostuu, voivat absorboitua tai sirota aineesta (Smith ja Dent 2005). Yksi vaihtoehto on, että interaktiota materiaalin kanssa ei tapahdu ollenkaan, vaan valo kulkee suoraan läpi. Jos aineeseen tulevan fotonin energia vastaa energiaeroa molekyylin perustilan ja jonkin virittyneen energiatilan välillä, fotoni voi absorboitua ja molekyyli siirtyä korkeammalle energiselle viritystilalle. Tätä muutosta tutkitaan absorptiospektroskopiassa (esimerkiksi infrapuna-spektroskopia) mittaamalla energiahäviötä, verrattuna alkuperäisen valonlähteen energiaan. On myös mahdollista, että fotoni siroaa molekyylistä. Tässä tapauksessa ei ole oleellista, onko fotonilla sopivaa energiaa, joka vastaa kahden viritystilan välistä energiaeroa. Siroavat fotonit voidaan detektoida keräämällä valoa tietyssä kulmassa valonlähteen säteeseen nähden. Kerätyn signaalin voimakkuus kasvaa neljännessä potenssissa valonlähteen taajuuden suhteen ( $v^4$ ). Arkipäiväisenä esimerkkinä taivaan sininen sävy; ilmakehässä olevista molekyyleistä ja partikkeleista siroaa korkeampienerginen sininen valo paljon tehokkaammin kuin matalamman energian punainen valo. Siroamistekniikoita hyödynnettäessä on tärkeää varmistua, että sellaista absorptiota, jolla on valonlähteen energian

kanssa vastaavat energiatilat, ei tapahdu tai se on ainakin huomioitu määrittelyssä. Tämä sen vuoksi, että mikäli kyseistä absorptiota tapahtuu, näytteeseen ohjattavasta herätevalosta ei tällä energia-alueella saada signaalia. Raman-ilmiön havaitseminen perustuu sirontaan, ja jos näyte absorboi sinne kohdistetun energian, sirontaa ei tapahdu.

Sirontaan perustuvia määrittelyksiä voidaan hyödyntää erittäin laajasti nykyisen kehittyneen instrumentoinnin ansiosta. Esimerkiksi partikkelien koon ja kokojakauman määrittelyt aina alle 1  $\mu\text{m}$  kokoluokkaan ovat hyviä sovelluskohteita (Smith ja Dent 2005). Niin ikään absorptioon perustuvat määrittelyt ovat useissa spektroskopiatekniikoissa erittäin laajasti käytettyjä. Esimerkkeinä tällaisista akustinen spektroskopia, jossa absorptioenergia rakenteen perustilan ja viritystilan välillä on hyvin pieni ja toisaalta röntgen-säteiden absorptioon perustuva spektroskopia, missä havaitaan hyvin suuria energiaeroja. Näiden kahden ääripään välille mahtuu useita yleisiä tekniikoita, kuten NMR (nuclear magnetic resonance eli ydinmagneettinen resonanssi), EPR (electronic paramagnetic resonance eli elektroninen paramagneettinen resonanssi), infrapuna-absorptio, elektroninen absorptio, fluoresenssiemissio ja UV-spektroskopia (ultra violet eli ultraviolettivalo).

Alla kuvataan lyhyesti Raman-ilmiön teoreettinen pohja. Ilmiön tarkastelu voidaan aloittaa lähtien ulkoisen sähkömagneettisen säteilyn (valo) indusoimasta polaroituvuuden muutoksesta  $\mu = \alpha \cdot E$  molekyylissä (Colthup ym. 1990) ja jatkamalla edelleen:

Stokes- ja anti-Stokes-spektriviivojen syntyminen voidaan selittää klassisen fysiikan avulla. Sähkökentän voimakkuus  $E$  muuttuu ajan myötä seuraavasti:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t,$$

missä  $E_0$  on sähkökentän amplitudi ja  $\nu_0$  on käytetyn valon taajuus. Jos tätä valoa ohjataan kaksiatomiseen molekyyliin, molekyyliin syntyy dipolimomentti  $\mu$ :

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t,$$

missä verrannollisuuskerroin  $a$  on polaroituvuus. Jos molekyyli värähtelee tai pyörii taajuudella  $\nu_m$ , liikkeeseen liittyvä poikkeama  $q$  on

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_m t,$$

missä  $q_0$  on liikkeen amplitudi. Pienillä amplitudeilla polaroituvuus riippuu lineaarisesti  $q$ :sta:

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q + \dots$$

Lausekkeessa  $\alpha_0$  on polaroituvuus tasapainoasemassa ja derivaatta kuvaa polaroituvuuden muuttumista  $q$ :n muuttuessa, tasapainoasemasta laskettuna. Yhtälöt yhdistämällä saadaan dipolimomentiksi

$$\begin{aligned} \mu &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q_0 \cos 2\pi\nu_m t \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t. \end{aligned}$$

Käyttämällä trigonometrista kaavaa  $2 \cos x \cos y = \cos(x + y) + \cos(x - y)$  saadaan lopulta tulokseksi

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q=0} q_0 \alpha E_0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_m)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_m)t].$$

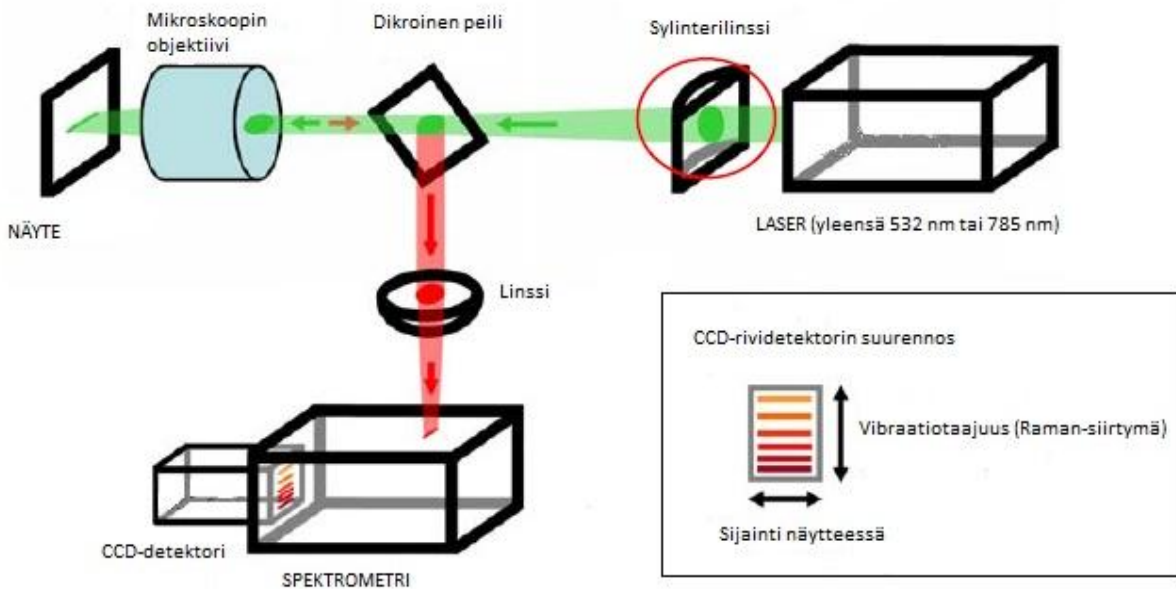
Ensimmäinen termi kuvaa Rayleigh-sirontaa (taajuus  $\nu_0$ ), ja jälkimmäiset termit kuvaavat anti-Stokes-sirontaa ( $\nu_0 + \nu_m$ ) ja Stokes-sirontaa ( $\nu_0 - \nu_m$ ). Jos derivaatta on nolla eli jos polaroituvuus ei muutu, molekyylin liike ei synnytä Raman-sirontaa. Voidaan siis todeta, että IR-spektroskopiassa aiheutetaan molekyylien dipolimomentin muutos, Raman-spektroskopiassa sitä vastoin saadaan aikaan molekyylin elektronipilven polaroituvuuden muutos, jonka seurauksena molekyylistä takaisin sironneilla fotoneilla havaitaan muuttuneita energioita. Kaiken kaikkiaan Raman-sirontaa voi muodostua värähtely- ja pyörimissiirtymien yhteydessä sekä elektronisten siirtymien yhteydessä. Franco Rasetti (1929) esitti, että Raman-ilmiö voi

tapahtua myös elektronisten siirtymätilojen lähellä. Tämä toimii käytännössä pohjateorianä nykyiselle resonanssi-Raman-tekniikalle. Raman ei siis ole sidottu pelkästään vibraatioenergioissa tapahtuviin muutoksiin, vaan sitä voi tapahtua liittyen lähes mihin tahansa molekyylin energiatilan siirtymään, kunhan siirtymiä määrittelevät kvanttifysiikan valintasäännöt pitävät paikkansa. Edellä esitetyt tarkastelut ovat Raman-ilmiöiden teoreettiseksi taustaksi, mutta niiden perusteellisempi johtaminen ja perustelu ovat tämän katsauksen käsittelyn ulkopuolella.

### **2.3.3. Raman-spektroskopian tekniikkaa ja peruskäsitteitä**

Raman-laitteisto koostuu käytännössä kolmesta erillisestä osasta; heräte-energian tuottavasta (monokromaattisesta) valonlähteestä, spektrometrinä (johon voi olla liitettynä mikroskopiatekniikkaa) ja detektorista. Spektrometriin luetaan kuuluviksi yleensä spektrografi, informaation prosessointiyksiköt (tietokoneet ja ohjelmat) sekä näyttölaitteet (Pitt ym. 2005). Dispersio-Ramanissa detektorille ohjattava sirontavalo hajotetaan spektriin, eli erotellaan eri aallonpituuksiin dispersiivalla elementillä, kuten hilalla. Fourier-muunnos-Ramanissa tämä aallonpituuksien erottelu suoritetaan Fourier-muunnoksen suorittavilla elementeillä ja ohjelmallisesti, esimerkiksi interferometrillä ja tietokonelaskennalla. Alla olevassa kuvassa 4 on nykyaikaisen Raman-laitteiston malli. Kuvassa esitetty laitteisto kohdistaa valonlähteenä toimivan laser-valon (vihreä) viivaksi näytteeseen. Viiva voidaan korvata fokuksipisteellä (engl. focus spot) poistamalla sylinterilinssi laserin edestä. Kun näytettä valaistaan, Raman-siirtynyttä eli Raman-sironnutta valoa (punainen) saadaan suodatettua muun takaisinsironneen valon joukosta dikroisen peilin avulla. Tällä tavoin esisuodatettu sirontavalo ohjataan spektrometrille. Spektrometrin spektrografi vastaa spektrin muodostamisesta. Käytännössä siis näytteestä sironneet fotonit (joilla on useita eri energioita, koska ne ovat sironneet eri kohdista näytemolekyylin rakenteita) ohjataan esisuodatuksen jälkeen optisia kuituja pitkin spektrografille. Spektrografilla aallonpituuksien (aaltolukujen) erotteluun käytetään hilaa tai Fourier-muunnosta (engl. Fourier-transform). Kuvan

mukaisesti sironneen valon fotonit ohjataan edelleen 2-ulotteiselle CCD-riividetektorille. Esitettyssä rakoskannauksessa (engl. slit-scanning) näytteestä saadaan useita spektrejä samanaikaisesti. Viiva muodostuu useista pisteistä, eli pikseleistä. Jokainen piste puolestaan vastaa yhtä spektriä, jonka näytteestä Raman-sironnut valo saa aikaan. Rakoskannaus yleensä lyhentää kuvausaikaa tunneista minuutteihin. Tämä on hyödyllistä etenkin biologisten näytteiden ja elävien kohteiden tutkimuksissa (Downes ja Elfick 2010). CCD-detektorissa näytepisteiden muodostama viiva, eli spektrien sarja, saadaan talteen omalle kolumnilleen. Tällä tavoin on mahdollista myös muodostaa kuva saaduista spektreistä, jolloin spektrien informaatio käännetään pikselien tummuuseroiksi detektoitujen fotonien intensiteettien mukaan.



**KUVA 4:** Raman-laitteiston kaavakuva (Mukaiituna Pitt ym. 2005).

Raman-ilmiön havaitsemisesta kului muutamia vuosikymmeniä, ennen kuin riittävän intensiiviset valonlähteet (laserit) ja herkemmat detektorit (valomonistimet) tulivat 1960-luvulla käyttöön (Pitt ym. 2005). Ongelmana olivat kuitenkin suurikokoiset ja kalliit laitteet sekä liian suuritehoiset (tavallisesti 1W) laserit, jotta kaikenlaisia näytteitä olisi ollut mahdollista analysoida. Lähes sopimattomaksi todettu tekniikka sai uuden nosteen 1990-luvulla. Suurimmat edistysaskeleet olivat uudet monikerroksiset dielektriset suodattimet, jotka olivat 'avaruuslasista', eli dichroic-

lasista valmistettuja sekä erittäin herkäät CCD-detektorit. Lisäksi samanaikaisesti saatiin kehitettyä matalatehoisia (1-10 mW) ja suhteellisen edullisia lasereita heräte-energiaa tuottamaan. Suodatinpohjaisilla järjestelmillä voitiin vähitellen päästä suodattamaan Raman-ilmiön havaitsemisen kannalta tarpeetonta Rayleigh-sirontaa pois. Pystyttiin detektoimaan Raman-aaltolukualuetta, joka oli lähellä laserin omaa ominaisaallonpituutta (näkyvän valon aallonpituusalueen lasereille  $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$  ja UV-aallonpituusalueen lasereille  $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ ). Muita edistysaskelia olivat PC-tietokoneiden laskentatehon ja hinnan aleneminen. Muiden tekniikoiden kytkeminen Raman-laitteistoon on laajentanut käyttöalueita entisestään, esimerkiksi SEM-mikroskooppien (engl. Scanning Electron Microscopy) ja konfokaalimikroskooppien käyttö yhdessä Raman-spektrometrien kanssa. Raman-pohjaisissa kuvantamismenetelmissä paikkaresoluutiot sekä 2-ulotteinen Raman-kuvantaminen ovat parantuneet huomattavasti. Lisäksi Raman-spektrikirjastot ovat laajentuneet ja helpottaneet spektritulkintaa, koska referenssidatan avulla tehtävät spektrimääritykset ovat suhteellisen suoraviivaisia.

Raman-spektroskopiassa voidaan tehdä karkea jako kahteen erityyppiseen tekniikkaan: FT-Raman-tekniikkaan (engl. Fourier-Transform Raman) ja dispersio-Raman-tekniikkaan (Pitt ym. 2005). Kun heräte-laserin aallonpituus muuttuu lähelle infrapuna-alueetta, Raman-sironnan intensiteetti laskee verrannollisena taajuuden neljänteen potenssiin,  $v^4$ , jossa  $v$  on herätevärähtelyn taajuus. Esimerkiksi argonlaser 514 nm aallonpituudella saa aikaan 16-kertaa voimakkaamman sirontaintensiteetin kuin 1028 nm aallonpituuden Nd-YAG-laser (oletuksena, että lasereiden tuottamat intensiteetit ja sirontamäärät näytteessä ovat samat). FT-Raman-systeemit ovat herkkydeltään 2-3-kertaisesti heikompia kuin dispersiosysteemit. Näin ollen dispersio-Raman-systeemit ovat nopeampia, ja matalampitehoiset laserit ovat sopivampia kaikentyyppisille näytteille ilman vaaraa näytteen vaurioitumisesta. FT-Raman-tekniikan suurimpina ongelmina ovat sironneiden fotonien detektoinnin vaikeus, vettä sisältävissä näytteissä veden aiheuttama signaali sekä suuritehoiset heräte-laserit. Alla olevassa yhteenvetotaulukossa 1 on vertailtuna dispersio-Raman-tekniikan ja FT-Raman-tekniikan ja tärkeimpiä eroja.

**YHTEENVETOTAULUKKO 1:** Dispersio-Raman-tekniikan ja FT-Raman-tekniikan vertailua (Mukaiituna Pitt ym. 2005).

Ominaisuus	Dispersio-Raman	FT-Raman
Käytetty heräte-laser	244 – 830 nm (UV – NIR)	1064 nm Nd-YAG
Heräte-laserin teho	0.2 mW – 1 kW, ilmajäähdytteinen	> 1 kW tyypillisesti, vesijäähdytteinen
Detektori	2D silikoni-detektori	Piste- tai lineaarinen IR-detektori
Detektorin herkkyys	Erinomainen. CCD-detektori tarjoaa erittäin joustavat mahdollisuudet signaalinkäsittelyyn	2-3 kertaluokkaa huonompi (kuin dispersio-Raman). Vähän signaalinkäsittelymahdollisuuksia
Kohinan rajoite	Herätteen kohinan rajoittamaa	Detektorin kohinan rajoittamaa
Aaltolukualueen kattavuus	~ 10 cm <sup>-1</sup> – 9000 cm <sup>-1</sup>	50 cm <sup>-1</sup> – 3650 cm <sup>-1</sup> , vakioitu
Vesipohjaiset näytteet	Veden tai liuottimien kanssa ei ongelmia	Oma-absorptio, laserin absorptio
Mikroskoopin spatiaaliresoluutio	< 1 µm	> 5 µm
Spektrisuunnan resoluutio	1 cm <sup>-1</sup> (standardi), 0.1 cm <sup>-1</sup> (spesiaali)	0.5 cm <sup>-1</sup>
Fluoresenssisuppressio	Hyvä alueella 730 – 830 nm (diodilaserit); UV-alueen herätteellä fluoresenssia vältetään tehokkaammin	Parempi 1064 nm herätteellä. Ei UV-optioita resonanttiparannuksille
Resonanssi-Raman ja SERS	Molemmat mahdollisia, mahdollista erittäin suuren herkkyyden	Resonanssi-Raman ainoastaan muutamille materiaaleille 1064 nm:llä
Raman-kuvantaminen	Suora kuvantaminen ja kartoitus (pistekartoitus, linja-fokusointi-kuvantaminen, todellinen Raman-kuvantaminen)	Suora kuvantaminen ei ole mahdollista
v <sup>4</sup> sironnan parantaminen	X 3.5	X 1
Kohonneet lämpötilat	Ei ongelmia. Mittauksia suoritettu yli 1500 °C:ssa	Rajoittunut < 250 °C:n
Mustat näytteet	Ei ongelmia	Termaalista emissiota havaitaan usein



Perinteinen dispersiosysteemin spektrometri koostuu hiloista, säteen kohdistusoptiikasta, sulkiaraoista ja/tai suodattimista (Pitt ym. 2005). Lisäksi spektrometriin kuuluu olennaisena osana detektorit, joilla käytännössä havaitaan ja lasketaan niille saapuvia sironta-fotoneja. Kokonaisuuteen voi olla myös liitettynä mikroskooppitekniikkaa. Yhteenvetotaulukossa 2 on muutamia spektrometrin suunnittelussa huomioitavia tärkeitä tekijöitä.

**YHTENVETOTAULUKKO 2:** Raman-spektrometrin suunnittelun tärkeitä parametreja (Mukailtuna Pitt ym. 2005).

Ominaisuus	Tavoitearvo
Paikkaresoluutio	< 1 $\mu\text{m}$
Spektriresoluutio	< 1 $\text{cm}^{-1}$
Korkea optinen tuottoteho detektorille	> 30 %
Laserin oman aallonpituusalueen lähistöllä tapahtuva mittaus	< 50 $\text{cm}^{-1}$
Joustava suunnittelu myöhempien sovellusten liittämiseksi	
Käytön helppous	
Vakaus, korkea automaatioaste	

Alun perin Raman-ilmiön havaitsemiseksi tarvittiin melko vahvan sironnan tuottavia näytteitä ja näin ollen ilmiön hyödyntäminen oli rajoittunutta (Denson ym. 2007). Vähitellen parantunut detektointitekniikka mahdollisti kuitenkin menetelmän herkkyyden ja sovellettavuuden nopean laajenemisen. On tarpeen kuvata tärkeimpiä detektoreihin liittyviä edistysaskelia. Jotta detektoreihin liittyviä ominaisuuksia voitaisiin paremmin ymmärtää, yhteenvetotaulukossa 3 on muutamia tärkeitä termejä, jotka liittyvät Raman-signaalin detektointiin. Taulukon termit ovat englanniksi, koska tarkkaa suomenkielistä termiä ei ole välttämättä olemassa ja on epätarkoituksenmukaista suomentaa termejä, mikäli niiden alkuperäinen merkitys jää epäselväksi.

**YHTEENVETOTAULUKKO 3:** Detektointiin liittyviä tärkeitä parametreja (Mukaiilu Denson ym. 2007).

Ominaisuus	Tarkoitus
Quantum Efficiency (QE)	Prosenttiosuus fotoneista, jotka saapuvat detektorille, ja jotka edelleen muunnetaan sähkövaraukseksi detektorilla. Kun fotonien aallonpituus (energia) muuttuu, myös detektorin vaste muuttuu. Detektorin komponentit ja kokoonpano määräävät sen, kuinka hyvin aallonpituuksien muutokset näkyvät detektorin vasteessa. QE-parametri on hyvin tärkeä päätettäessä, sopiiko jokin tietty detektori juuri käsiteltävänä olevaan tutkimukseen ja näytteisiin.
Full Well Capacity (FWC)	FWC-parametri liittyy ainoastaan integrointiin kykeneviin detektoreihin; maksimisähkövaraus, jonka detektorielementti pystyy varastoimaan yhden integrointisyklin aikana. Integroiva detektori kerää sähkövarausta niin kauan, kun se altistuu saapuville fotoneille, kunnes saavutaan FWC:n ylärajalle.
Charge-transfer Efficiency (CTE)	Kuvaa, kuinka hyvin varauspaketit saadaan siirretyksi paikasta toiseen detektorin toiminnan aikana (CCD-detektoreille halutaan yleensä $\geq 99.99\%$ )
Dark Current	Signaali, jonka detektori saa aikaan spontaanisti. Aiheutuu pääosin lämpöenergiasta (muun muassa detektorin ja muun elektronikan elektronisesta kohinasta), näin ollen 'Dark Current'-signaali putoaa noin 2-kertaisesti / 7-8 °C lämpötilan madallus. Viilennystä ei kuitenkaan voida suorittaa loputtomasti detektorin muiden ominaisuuksien kärsimättä. On huomattava, että merkittävä 'Dark Current' mittauksessa voi rajoittaa yksinään näytteeseen kohdistettavaa

	kokonaisaltistusajaa niin paljon, että FWC-kapasiteetti ylitetään (signaalin saturoituminen).
Shot Noise	Detektorille saapuvien satunnaisten (ei-sironta) fotonien summa = $\sqrt{KOKONAISIGNAALI}$ . Voi johtua esimerkiksi näytteestä tai taustalta tulevista fotoneista.
Read Noise	Ominainen elektronisille laitteille, jotka vahvistavat ja käsittelevät detektorien signaaleja. Tämä parametri laajennetaan usein koskemaan koko detektointilaitteistoa (ei ainoastaan detektoreja). Riippumaton integrointiajasta tai signaalin amplitudista. Jos signaalin amplitudi on korkea, 'Read Noise' ei ole yleensä merkityksellinen, mutta signaali-kohina-suhde voi olla heikentynyt, kun signaalin intensiteetti on matala. Yleisesti signaali-kohina-suhteen tulisi olla = 3. Tämä tarkoittaa, että signaalin tulisi olla 3-kertaisesti suurempi, kuin kohinan keskihajonta.

Detektorien kehitys voidaan jakaa kahden eri detektorityypin kehitykseen (Denson ym. 2007). Alkuun käytettiin yksikanava-detektoreja ja tämän jälkeen rividetektorit alkoivat yleistyä. Valomonistinputket olivat käytössä ennen rividetektoritekniikan kehitystä. Valomonistinputkia kutsutaan yksikanava-detektoreiksi, koska niissä on ainoastaan yksi fotoneja havaitseva alue. Valomonistinputkien avulla spektrien määrittäminen on kuitenkin hyvin hidasta, ja muun muassa detektointin herkkyys on heikko. Yksinkertaiset ja pienikokoiset silikoniset fotodiodit ovat toinen esimerkki yksikanavaisesta detektoinnista. Ne ovat huomattavasti valomonistinputkia käyttökelpoisempia. Hyviä ominaisuuksia ovat lineaarisuus, yleinen soveltuvuus spektroskopiaan sekä käyttökelpoisuus kokeisiin, joissa valon määrä on korkea. Lisäksi fotodiodeja voidaan pienen kokonsa vuoksi järjestellä riveihin, jolloin saadaan rakennettua rividetektorit.

Rividetektori (tai monikanavadetektor) koostuu useista fotoneille herkistä elementeistä (Denson ym. 2007). Elementit voivat olla rivissä tai kaksiulotteisesti järjestettyinä, eli spektrisuunnan riveistä, joita on aseteltu allekkain spatiaalisuunnassa. Esimerkiksi tämän tutkimuksen kokeellisessa osiossa käytetty CCD-detektor oli 1024 spektrisuunnan pikselistä x 256 spatiaalisuunnan pikselistä koostuva 2-ulotteinen detektor. Rividetektoreja käytetään lähes aina dispersiospektrometrien yhteydessä. Kun näytteestä siroaa säteilyä, se tapahtuu usealla eri aallonpituudella – myös Raman-sirontaa tapahtuu useilla eri aallonpituuksilla samanaikaisesti. Spektrografin dispersiohila puolestaan hajottaa eri aallonpituudet ympäri detektorin aluetta, ja saadaan havainnoitua eri aallonpituuksia samanaikaisesti. Tähän perustuu mahdollisuus määrittää nopeasti tutkittavan molekyylin spektri kokonaisuudessaan laajalla aaltolukualueella Raman-sirontaan perustuen. Heräte-energiana voidaan käyttää koko ajan samaa energiaa (eli laserin aallonpituutta). Rividetektoreista mainitut fotodiodidetektorit muodostuvat useisiin riveihin silikonialustalle kootuista fotodiodielementeistä. Lineaariset fotodiodidetektorit ovat yleensä 256-4096 elementin pituisia. Varsinainen läpimurto detektoriteknikassa saavutettiin kuitenkin 1970-luvulla, kun CCD-detektorit tulivat kaupallisiin sovelluksiin saataville. CCD-detektorit muodostuvat yksi- tai kaksiulotteisesti kootuista resoluutioelementeistä, eli pikseleistä. Jokaista pikseliä kohden on useita metallioksidipuolijohde-elektrodeja, joita kutsutaan porteiksi (engl. gate). Elementille saapuvat fotonit saavat aikaan varauksen muodostumisen ja varausta siirretään askel kerrallaan pikselien välillä. Varaus siirtyy CCD-detektorissa yhdensuuntaisia rivejä kerrallaan eteenpäin kohti fotoneille inaktiivista ylimääräistä riviä, rekisteriä. Rekisteristä varauselektronit siirretään kokonainen rivi kerrallaan spektrometrin lukuyksiköille, kunnes koko detektorin varaus on käyty läpi. Ulostulona saadaan jännitteiden sarja (jännitevaihtelut), joka vastaa yksittäisten pikselien keräämien elektronien määrää. Alun perin siis molekyylin värähteleviä rakenteita 'pommitettiin' monokromaattisella valolla. Tämän seurauksena rakenteista tapahtui valon epäelastista sirontaa ja muodostui epäelastisesti emittoituneita fotoneja, eri määriä eri aallonpituuksilla (energioilla). Nämä fotonit kerättiin talteen Raman-laitteiston detektorille. Spektrometrilla ja detektorilla fotonit jaoteltiin energian ja määrän

mukaan ja ne saivat aikaan detektorilla erisuuruisia jännitteitä perustuen detektorien elementeillä aiheuttamansa sähkövarauksen (elektronien) määrään. Spektrometrin lukuelektroniikka muuttaa lopuksi jännitteiden suuruudet vastaamaan intensiteettejä spektreissä ja jaottelee, millä aaltolukualueella (energialla) kukin jännite sijaitsee – eli mikä on kyseisen intensiteetin aiheuttamien, epäelastisesti sironneiden fotonien energia.

CCD-detektorien osalta lähes kaikki yhteenvetotaulukossa 3 mainitut parametrit ovat parempia kuin muissa ratkaisuissa (Denson ym. 2007). Ei-silikonipohjaisia detektoreja käytetään myös, esimerkiksi germanium (Ge)-detektoreja, indium-gallium-arsenidi (InGaAs)-detektoreja ja platiniumpii (PtSi)-detektoreja. Nämä soveltuvat etenkin pidempien aallonpituusalueiden heräte-energioilla (800-1600 nm) aikaansaatavan Raman-sironnan detektointiin. Etuna on ennen kaikkea mahdollisuus vähentää fluoresenssia. Ei-silikonipohjaisilla detektoreilla on kuitenkin matalammat QE-arvot, niiden hinnat ovat melko korkeita ja taustalta tuleva infrapuna-alueen säteily saattaa haitata mittausta huomattavasti.

Viime vuosina tapahtuneita edistysaskelia rividetektoreissa ovat muun muassa signaalin vahvistumiseen tähtäävät monistin-CCD:t (engl. multiplier CCDs) sekä niin kutsuttu HIT-teknologia (engl. Hybrid Imaging Technology) (Denson ym. 2007). Viimeksi mainitussa ovat yhdistyneinä CMOS- (engl. Complementary Metal Oxide Semiconductor) ja CCD-teknologian edut. CMOS-teknologian vahvuutena on erittäin tehokas signaalinkäsittely ja näin ollen korkea saanto käsiteltävästä signaalista. CMOS-mikroprosessoriydinten käyttö mahdollistaa CCD:n jakamisen useisiin sektoreihin. Lopputuloksena HIT-teknologiaa hyödyntävissä ratkaisuissa on korkea nopeus, matala kohina, herkkyys, laaja dynaaminen alue ja matala tehon tarve.

Kaiken kaikkiaan detektoriteknikan kehitys on mahdollistanut Raman-spektroskopiassa samanaikaisen spektrien keruun useista eri näytteistä, fluoresenssin vähentämisen, kuvantamismenetelmien parantumisen sekä mittausaikojen lyhenemisen.

### 2.3.4. Aika-erotteinen Raman-spektroskopia

Raman-spektroskopia perustuu näytteestä epäelastisesti sironneiden fotonien intensiteettijakauman mittaamiseen (Kostamovaara ym. 2013). Valonlähteenä on aina käytännössä jatkuvan aallonpituuden monokromaattinen valonlähde, eli laser-valo. Se voi toimia näkyvän valon, lähi-infrapuna-alueen tai lähiultraviolettialueen aallonpituuksilla (Hanlon ym. 2000). Molekyylin tietyille vibraatio- tai rotaatiotilalle ominainen Raman-siirtymä ei riipu mitenkään heräte-energian (eli esim. laserpulssin) suuruudesta. Tämä säännönmukaisuus liittyy siihen, että energiatilat ovat edellä kuvattuja kvantittuneita energiapaketteja, jotka toimivat määrättyjen sääntöjen mukaan. Energiasiirtymät eivät siis ole sattumanvaraisia tapahtumia molekyyliissä/hiukkasissa.

Heräte saa molekyylin/hiukkasen rakenteet ja elektronipilven värähtelemään ja näin ollen muuttamaan energiatilojaan (Kostamovaara ym. 2013). Kun nämä virittyneet tilat edelleen purkautuvat, molekyylin emittoima fotonenergia voi olla täysin sama kuin heräte-energia (Rayleigh-sironta). Joskus harvoin emittoituva energia on pienempi kuin alkuperäinen (Stokes-siirtymä) ja joskus se on puolestaan suurempi (anti-Stokes-siirtymä). Nämä ovat Raman-ilmiöitä. Herätteen jälkeen molekyylin/hiukkasen viritystilat lähtevät purkautumaan eri tavoin. Toisin sanoen herätteen jälkeen molekyyli ja sen elektronit purkavat virityksiä useita eri reittejä pitkin. Tämän vuoksi spektriin saadaan piikkejä useisiin eri kohtiin eli useiden energiaerojen (heräte miinus palaava energia) kohdille. Jokainen Raman-siirtymän, eli taajuuden/aallonpituuden/energian/aaltoluvun – riippuen miten asia halutaan ilmaista, piikin kohta on ominainen kyseiselle molekyylille ja sen rakenteille. Edelleen, piikin korkeus ja pinta-ala (eli intensiteetti) liittyvät molekyylin rakenteissa olevien spesifisten rakenteiden määrään ja sijaintiin. Ja edelleen tätä kautta, piikin korkeus (sekä pinta-ala) liittyvät detektoitujen fotonien määrään. Tässä kohden ratkaisevassa osassa on käytettävän Raman-laitteiston detektoritekniikka.

Monissa potentiaalisissa käyttökohteissa Raman-spektroskopian haitaksi muodostuu voimakas fluoresenssi, joka tapahtuu heräte-energian aikaansaamana mitattavissa molekyyeissä (Kostamovaara ym. 2013). Voimakkaalla fluoresenssitaustalla on kaksi merkittävää haittaa; ensinnä, se vaikuttaa kohina-signaalisuhteeseen (engl. SNR = Signal-to-Noise Ratio) saamalla aikaan kohinaa spektreissä ja vaikeuttamalla relevanttien signaalipiikkien havainnointia. Toiseksi, vaikka fluoresenssin profiili olisikin suhteellisen tunnistettava ja pehmeä tausta spektrissä ja Raman-signaalin piikit puolestaan tunnistettavia ja teräviä, taustan (ohjelmallinen) vähentäminen spektristä johtaa epätarkkuuteen määrittämissä. Ongelmaa lisää se, että fluoresenssin voimakkuuden kasvaessa myös epätarkkuus laskennallisissa vähennyksissä kasvaa ja muun muassa konsentraatiomääritykset käyvät hankaliksi. Tähän mennessä vakiintunut tapa päästä eroon fluoresenssin haitoista on ollut fotonivalkaisutekniikka (engl. photo-bleaching) (Golcuk ym. 2006). Tällä tavoin tutkittavaa näytettä valaistaan laserilla tavallista pidemmän ajanjakson ajan, minkä tarkoituksena on tuhota näytteessä fluoresenssia aiheuttavat kromofori-ryhmät. Menetelmä on kuitenkin hidas ja se saattaa aiheuttaa näytteeseen fysikaalisia muutoksia, jotka häiritsevät luotettavan lopputuloksen saamista. Valkaisu ei myöskään sovellu eläville organismeille, esimerkiksi soluapplikaatioihin.

Fluoresenssia on myös tehokkaasti estetty tähän asti käyttämällä lähi-infrapuna-alueen laseria, esim. 1064 nm laseria perinteisten lyhyemmän aallonpituusalueen lasereiden sijaan (400 nm-830 nm) (Kostamovaara ym. 2013). Ongelmaksi muodostuu kuitenkin tässä tapauksessa detektorit; ne tuottavat niin kutsuttua pimeää virtaa ja melutasoja, jotka ovat useita kertaluokkia suurempia kuin Si CCD-detektorien (engl. Charge-Coupled Device) havaitsemat signaalit. Kyseisiä detektoreja käytetään vallitsevasti perinteisten lyhyemmän aallonpituusalueen lasereiden kanssa. Tämä johtaa kohonneeseen kohinan määrään ja tarpeeseen käyttää voimakkaampaa herätettä (> 1000 mW vs. tyypillisesti muutaman kymmenen tai sadan mW:n tehot CCD-pohjaisilla systeemeillä) sekä pidentyneisiin integraatioaikoihin (30 min-useita tunteja vs. muutamista sekunneista muutama minuutteihin CCD-pohjaisilla systeemeillä). Eräs mahdollisuus fluoresenssin

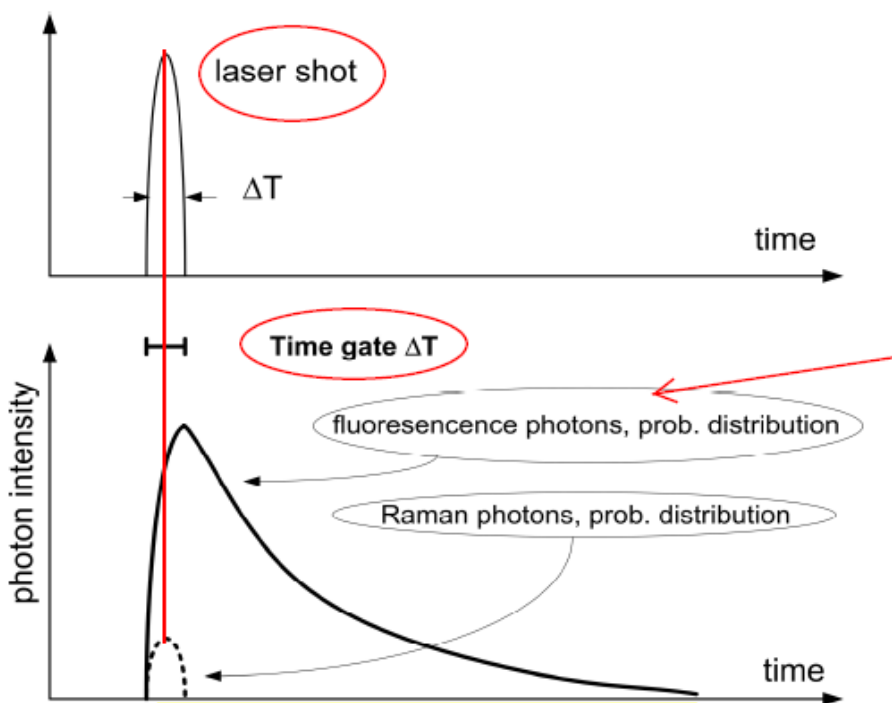
vähentämiseen olisi UV-aallonpituusalueen heräte-energian käyttö. UV-aallonpituusalueella Raman-spektroskopiassa kiinnostava ja oleellinen alue on ~ 20 nm leveä. Suuri osa fluoresenssiemissiosta tapahtuu aallonpituusalueella  $\geq 260$  nm. Näin ollen heräte-laser, joka toimisi aallonpituudella  $\leq 240$  nm olisi erinomainen lähde fluoresenssivapaan Raman-ilmiön havainnointiin. Ongelmaksi muodostuvat kuitenkin detektorit, joista hyvin harvoilla voidaan detektoida UV-aluetta riittävän tehokkaasti (Denson ym. 2007). UV-alueen laser-lähteet ovat myös suhteellisen harvinaisia ja kalliita.

Raman-sironnan elinaika on paljon vähemmän kuin pikosekunnin suuruusluokka ja fluoresenssin elinaika vaihtelee tyypillisesti muutamista tuhansista pikosekunneista kymmeneen nanosekunteihin. Näin ollen fluoresenssitaustaa voidaan vähentää uudelleenlaisilla laitteistoratkaisuilla suuressa määrin (Kostamovaara ym. 2013). Tekniikoiden perustana toimii lyhyiden, intensiivisten laserpulssien käyttö. Näillä lyhyillä pulsseilla valaistetaan näytettä jatkuvan aallonpituuden (engl. CW=Continuous Wave) heräte-energian sijaan. Edelleen, näytteen responsi tallennetaan ainoastaan näiden lyhyiden pulssien aikana. Näin ollen, aika-portittamalla (engl. time-gating) mittaukset laserpulssin vaiheen (engl. period) mittaisiksi, fluoresenssin kokonaisintensiteettiä saadaan huomattavasti vähennettyä. Käytännössä spektrometrin detektorille saapuu vähemmän fluoresenssin aiheuttamia fotoneja, koska ne ikään kuin suljetaan pois detektoinnista - vain nopeammin detektorille saapuvia Raman-sironnan fotoneja detektoidaan. Tämä puolestaan johtaa parantuneeseen signaali-kohinasuhteeseen ja/tai lyhyempiin mittausaikoihin (fotonimelu tallennetusta fluoresenssiemissiosta on verrannollinen fluoresenssin perustason (engl. baseline) intensiteetin neliöjuureen). Seurauksena Raman-spektrin perustaso paranee, joka myös johtaa parempaan tarkkuuteen sekä materiaalien identifioinnissa, että kvantitatiivisessa analytiikassa. Aika-portittamisen terminä tämän työn määrityksissä käytetään termiä "aika-erotteinen", joka siis tarkoittaa näissä määrityksissä edellä kuvattua tekniikkaa. Joissakin yhteyksissä puhutaan myös aika-erottelusta.

Ennen tässä työssä tehtyjä aika-eroteltuun Raman-spektroskopiaan perustuvia määrityksiä on tehty mittauksia muun muassa korkeanopeuksisella optisella Kerr-



sulkijatekniikalla todentamaan aika-erottelun toimivuutta (Matousek ym. 2001). Tällä tavoin päästiin ~ 25 pikosekunnin porttiaikoihin. Vieläkin lyhyempiä aika-portituksen resoluutioaikoja, ~10 pikosekuntia, saatiin Taharan ja Hamaguchin (1993) mittauksissa, joissa hyödynnettiin välähdyskameratekniikkaa (engl. streak camera) detektoinnissa. Pitkästi samaan lopputulokseen päästään myös käyttämällä valomonistinta ja aika-porttia (Van Dyne ym. 1974). Usein näissä sovelluksissa ja määrittelyissä ongelmana ovat erittäin pitkälle kehitetyt, suurikokoiset laitteistot, joilla voidaan mitata vain yhtä aallonpituusaluetta kerrallaan. Mittaukset ovat tällaisilla järjestelyillä erittäin aikaa vieviä ja sopimattomia laboratorio-olosuhteiden ulkopuoliseen käyttöön. Yhteenvetona alla olevassa kuvassa 5 on kaavakuvana aika-erottelutekniikan perusajatus (Kostamovaara ym. 2013). Kuvasta nähdään eräänlainen 'AUC'-tilanne (engl. Area Under the Curve): Häiritsevien fluoresenssifotonien määrä (distributio) on aikaikkunan  $\Delta T$  aikana hyvin vähäinen verrattuna Raman-fotonien määrään.



**KUVA 5:** Aika-erottelutekniikan perusajatus (Mukailtuna Kostamovaara ym. 2013).

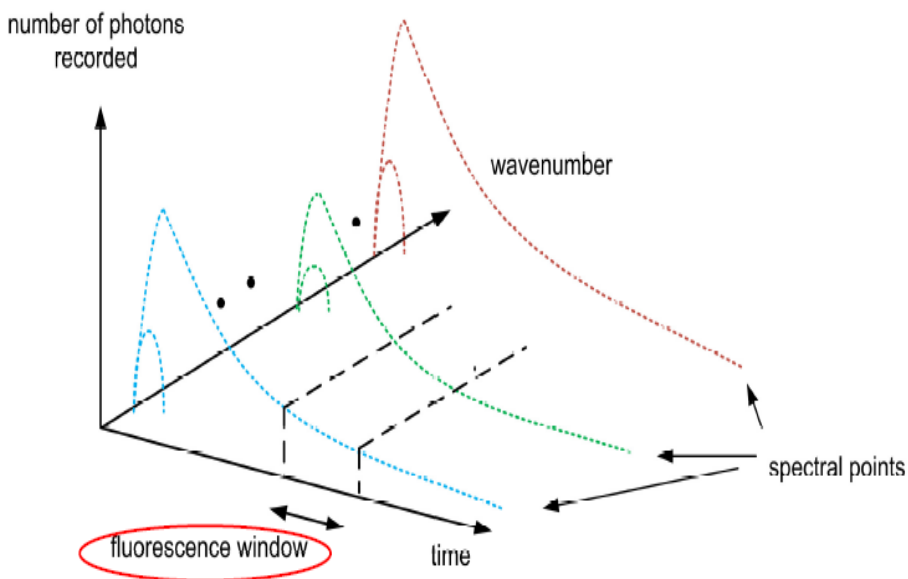
Uudella, aika-erottelua hyödyntävällä CMOS-SPAD (engl. Single Photon Avalanche Diode) detektiotekniikalla voidaan määrittää Raman-sironneiden fotonien ajasta riippuva positio suhteutettuna laser-pulssiin (Kostamovaara ym. 2013). Aikaikkunan leveys voi olla 100 pikosekunnin luokkaa, joka mahdollistaa tehokkaan fluoresenssin vähentämisen. Tämän työn kokeellisessa osiossa pyritään selvittämään CMOS-SPAD-detektioinnin fluoresenssin vähentämisen tehokkuutta lääkeainemittauksissa. Vertailua suoritetaan konventionaaliseen Raman-tekniikkaan, jossa käytetään perinteistä CCD-detektoria. Fluoresenssin vähentämisen tehokkuus on suuruusluokaltaan ~ verrannollinen fluoresenssiemission aikavakion ja aika-portin leveyden suhteeseen. Etuna CMOS-SPAD-detektoreissa on myös mahdollisuus valmistaa 2-ulotteisia detektoreja. Jokainen detektoririvi voidaan asettaa vastaamaan tiettyä Raman-siirtymän aallonpituusaluetta. Vastaavia tutkimuksia fotonien aika-position määrittämiseksi CMOS-SPAD-detektoreita käyttämällä on tehty aiemmissa fluoresenssitutkimuksissa (Schwartz ym. 2008). Kyseisen detektiotekniikan käyttöä ja hyödyntämistä on esitelty myös Nissisen ym. (2011) toimesta. 2-ulotteinen CMOS-SPAD-detektoritekniikka ~ 100 pikosekunnin aika-portilla on esitetty niin ikään Nissisen ym. (2013) määrittelyksissä.

### **2.3.5. Aika-erotteisen Ramanin tekninen toteutus ja hyödyt**

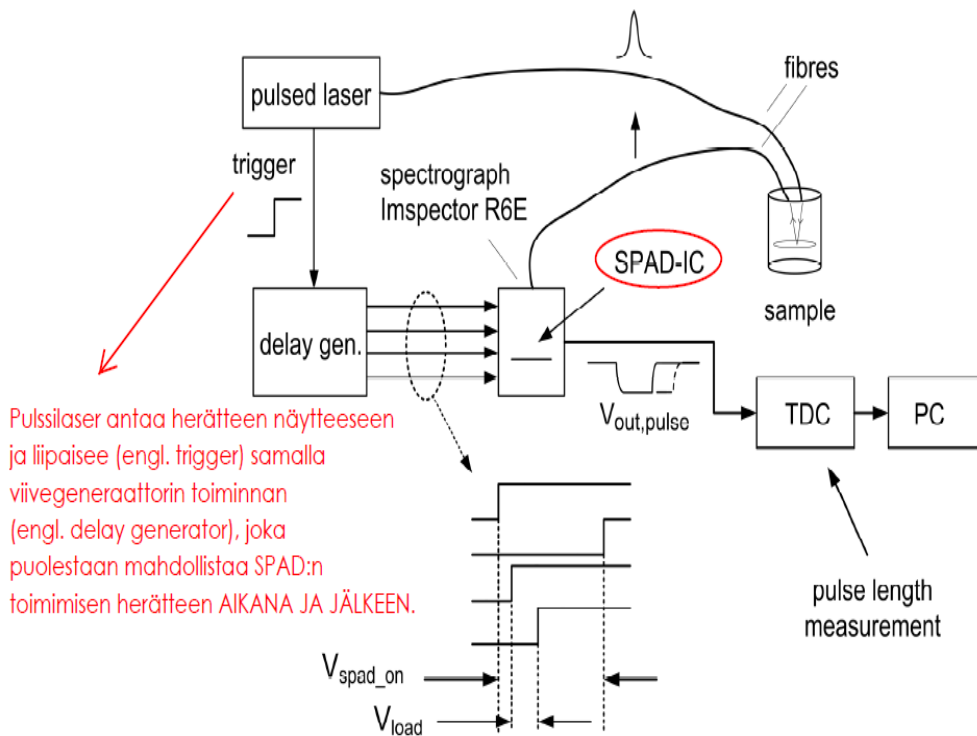
Vanhemman polven detektoreilla jouduttiin suorittamaan sironneiden fotonien detektio aaltoluku kerrallaan, eli säätämään detektori halutulle aaltolukualueelle asteittain (Kostamovaara ym. 2013). Uusilla CMOS-SPAD-detektoreilla tämä onnistuu yhdellä ja samalla mittauskerralla. Kyseisellä detektoritekniikalla varustettu spektrometri tekee tämän automaattisesti. Tämän tutkimuksen kokeellisissa mittauksissa käytetty SPAD-detektori on luonteeltaan digitaalinen detektori (Geiger-detektori). Jotta tämänkaltaisella detektorilla saataisiin lineaarinen vaste (tässä tapauksessa siis Raman-spektri), yksittäisen laser-pulssin aikaansaaman fotonin detektio todennäköisyys pitäisi olla huomattavasti  $< 1$ . Tämä sopii juuri Raman-ilmiöiden havainnointiin erinomaisesti, koska Raman-sironnan

todennäköisyys herätepommituksella (laserilla) on erittäin pieni. Kuva 7 esittää CMOS-SPAD-detektorin rakenteen ja toiminnan laatikkokaaviona.

Kokonaisuudessaan käytetty CMOS-SPAD-detektor mahdollistaa laserin indusoimien fotonien tarkan aikaposition määrittämisen aallonpituuden funktiona (mikäli detektointi toteutetaan 2-ulotteisena kuvan 6 tapaan, eli tasomaisessa koordinaatistossa fotonille saadaan tarkka paikka aallonpituuden ja ajan avulla) (Kostamovaara ym. 2013). Edelleen, koska detektoitujen fotonien aikapositiontallennetaan tarkasti, tarvittaessa tulosten monipuolinen jälkiprosessointi on hyvin mahdollista ja se voidaan tehdä ohjelmallisesti. Muun muassa fluoresenssi-osan 'korjaus'/poistaminen/käsittely spektristä onnistuu ohjelmallisesti perustuen estimaattiin detektoitujen fotonien määrästä ajan funktiona tai päinvastoin, eli perustuen fluoresenssi-osaan, toisin sanoen detektoituihin fotoneihin laser-pulssin jälkeen. CMOS-SPAD-detektorin tehokas signaalinkäsittely ja äärimmäinen herkkyys mahdollistavat Raman-sironneiden fotonien tehokkaan detektion. Toisaalta myös fotonien muodostumisen ajankohta saadaan näin ollen tarkasti selville. Tästä on puolestaan hyötyä mittausinformaation jälkikäsittelyssä; fluoresenssi-fotonien vaikutusta molekyylin kokonaisspektriin voidaan jälkiprosessoinnilla vähentää.

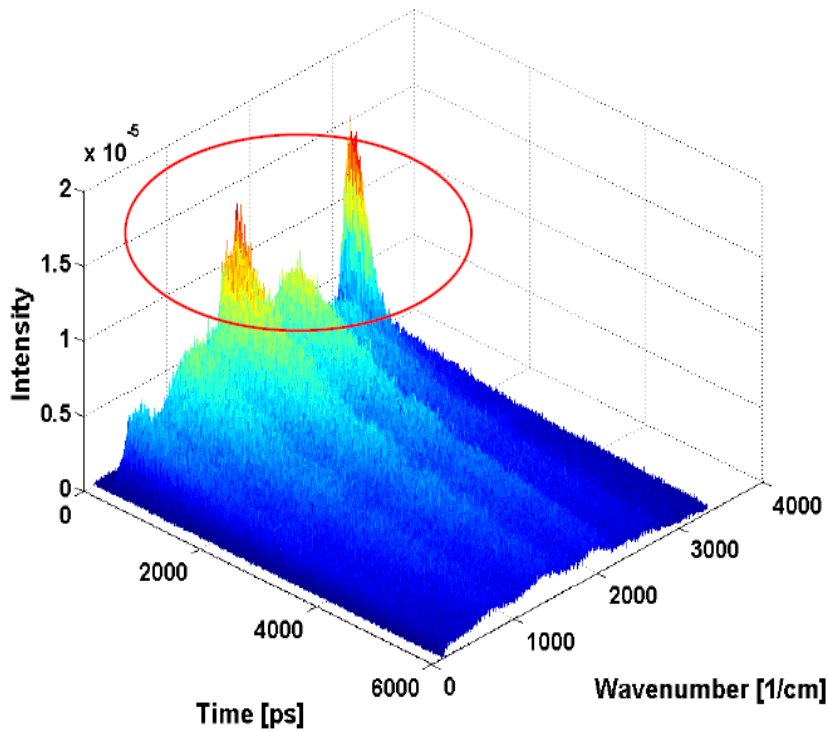


**KUVA 6:** Raman- ja fluoresenssispektri aallonpituuden ja ajan funktiona



**KUVA 7:** Aika-erotteisen Raman-spektroskopiaalitteiston toimintaperiaate laatikkokaaviona. Viivegeneraattori käytännössä tahdistaa SPAD-detektorilla havaittavien fotonien detektiota siten, että fotoneja kerätään ennakkoon piirilevyllä säädettyjen aikaikkunoiden ajoituksen mukaan (esim. aikaikkuna<sub>1</sub> = bin<sub>1</sub>, aikaikkuna<sub>2</sub> = bin<sub>2</sub>, ... aikaikkuna<sub>n</sub> = bin<sub>n</sub>) (Mukaiituna Kostamovaara ym. 2013).

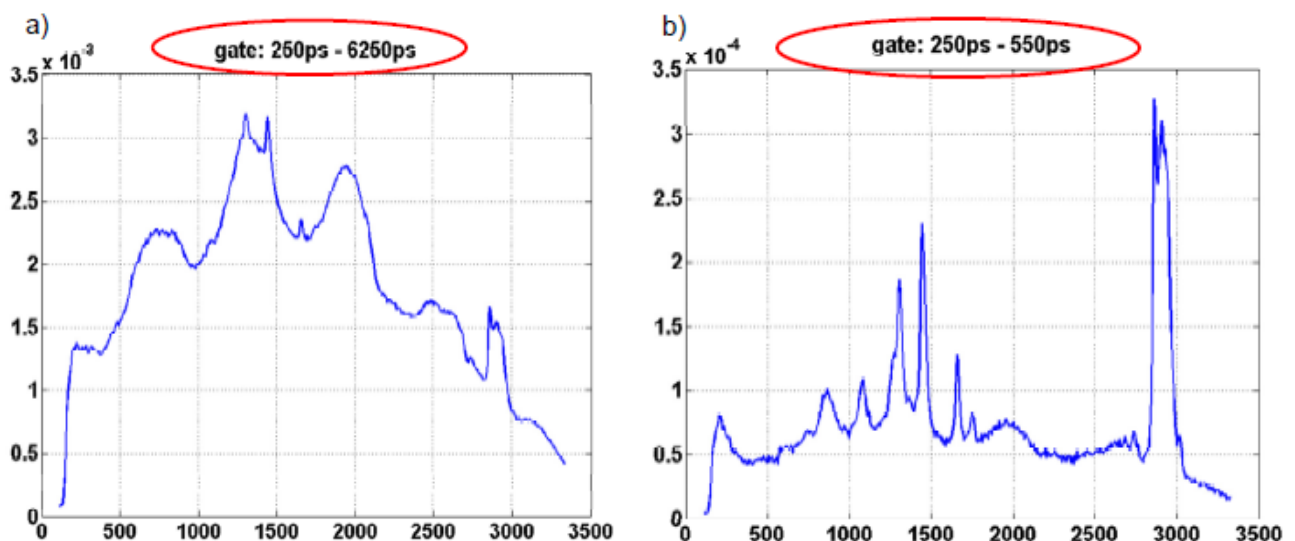
Aika-erotteisen Raman-spektrometrin toimintaa havainnollistaa hyvin seuraavat kaksi esimerkkiä kuvissa 8-9. Oliiviöljy tiedetään melko vahvasti fluoresoivaksi (Kostamovaara ym. 2013). Oliiviöljyllä suoritetuissa mittauksissa aika-erotteisuuden edut fluoresenssisuppressiossa tulevat hyvin esille. Kuvassa 9 näkyy oliiviöljyllä tehdyistä mittauksista fotonien määrä aaltoluvun ja laserpulssin funktiona. Kun jokaiselle detektoidulle fotonille annetaan aika-paikkakoordinaatti tasossa ja vielä kolmantena ulottuvuutena on intensiteetti, nähdään, että Raman-sironnasta muodostuneet fotonit todellakin detektoidaan aivan alkuajanhetkillä. Toisaalta, koska viritystilat purkautuvat molekyylin eri rakenteista hieman eri tavoin, alkuajanhetkien kohdalle muodostuu useille eri aaltoluvuille (engl. wavenumber) piikkejä. Tässä kuvassa 8 vahvimmin esimerkiksi  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 2000 \text{ cm}^{-1}$  ja  $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ .



**KUVA 8:** Aika-erottelun vaikutus detektoitujen fotonien määrään ajan ja aaltoluvun funktiona oliiviöljynäytteestä.

Yleisemmin, mikäli näytteen fluoresenssin elinajasta on jokin käsitys, voidaan välittömästi päätellä, millainen osa (painotetusti) kullekin energia-alueelle (eli spektrin aaltolukualueelle) saapuvasta kokonaisfotonimäärästä tulee vähentää, jotta jäljelle jäisi ainoastaan Raman-sironnan aiheuttaneet fotonit. Toisaalta fluoresenssin elinajan tunteminen ei ole välttämätöntä, koska yllä olevan kaltaisesta grafiikasta voidaan tehdä samat päätelmät. Esimerkiksi kuvassa on detektoitu runsaasti fotoneja  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  ja  $3500 \text{ cm}^{-1}$  aaltoluvuilla. Raman-sironnan aiheuttavat fotonit sijoittuvat suurella todennäköisyydellä aikavälille 0 – 500 ps, kun taas fluoresenssin voidaan ajatella alkavan vasta  $\sim 500 \text{ ps}$  kohdalta. Näin ollen voidaan suorittaa painotettu fluoresenssin vähennys kyseiseltä ajanhetkeltä eteenpäin ja jäljelle jää Raman-sironnan aiheuttaneiden fotonien intensiteetit (Mukaiituna Kostamovaara ym. 2013).

Kun aika-erottelun avulla kavennetaan detektoitavaa aika-ikkunaa (ikkunan leveyttä) nanosekuntiluokasta selvästi alle nanosekuntiluokkaan ( $\sim 6$  ns  $\rightarrow$  250 ps), voimakkaasta fluoresenssista huolimatta Raman-spektrin piikit erottuvat spektreissä ja myös signaali-kohinasuhde paranee (Kostamovaara ym. 2013). Tätä on havainnollistettu kuvan 9 spektreissä a) ja b). Mitä kapeampi aika-ikkuna on käytössä, sitä tarkempi spektri saadaan, toisin sanoen spektrin hienorakenne tulee paremmin esille ja tutkittavien rakenteiden tunnistus on huomattavasti tarkempaa.



**KUVA 9:** Kahdella eri aika-ikkunalla suoritettu Raman-mittaus oliiviöljynäytteestä (Mukailtuna Kostamovaara ym. 2013).

Aika-erotteisen Raman-laitteiston spektri saadaan siis siten, että aikaikkunan aikana detektoidaan fotoneja. Tämä tarkoittaa, että kasvatetaan Raman-fotonien havaitsemisen todennäköisyyttä huomattavasti jaksottamalla laitteiston toimintaa siten, että tallentamisen aika-ikkuna menee päällekkäin (engl. overlap) herätepulssin kanssa, jolloin todennäköisemmin suurin osa detektoitavista fotoneista on juuri Raman-sironnan fotoneja. Edelleen, spektrin jokainen piste saadaan tallentamalla (laskemalla) fotoneja aika-ikkunan puitteissa (intensiteetti). x-akselille pisteet sijoittuvat luonnollisesti sitä kautta, että heräte-energian aktivoimat, virtuaaliselta viritystilalta alemmalle viritystilalle palaavat fotonit ovat energioiltaan erilaisia (heräte aktivoi molekyylin elektroniverhoa, mutta fotoneja detektoidaan). Raman-siirtymä (engl. Raman shift) on näin ollen tämän

energiaeron suuruinen. Mittausten kokonaisaikaa voidaan edelleenkin lyhentää käyttämällä korkeampitehoista laser-herätettä (muutetaan huipputehoa ja/tai pulssitaajuutta) ja SPAD-detektorin efektiivistä pinta-alaa kasvattamalla (enemmän detektoreja spektripistettä kohden).

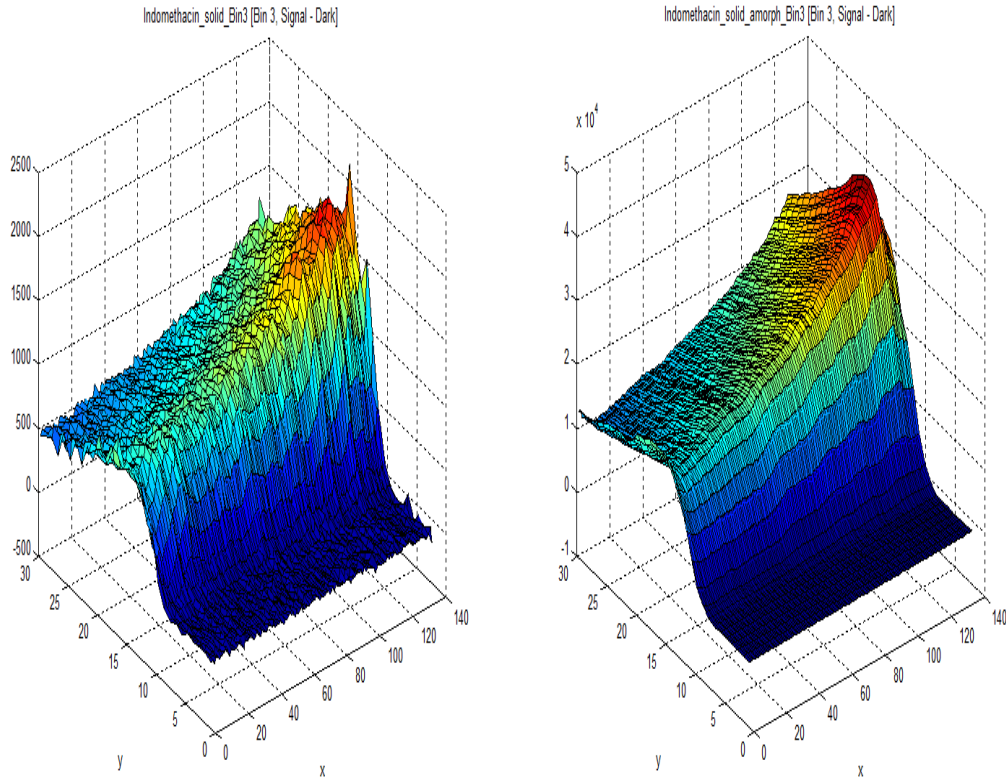
Kokonaisuudessaan aika-portteja käyttävän Raman-laitteiston rakenteesta ja toiminnasta on tärkeää huomioida muutamia asioita. Ensinnä, laitteiston osia pitää toisaalta ajatella erillisinä yksiköinä, toisaalta yhdessä synkronisesti toimimaan pyrkivänä kokonaisuutena. Tämä tarkoittaa sitä, että esimerkiksi laitteiston laser voidaan rakentaa erikseen, ja hankkia spektrografi (ja siihen liitetty detektori) puolestaan erikseen. Toiseksi, Raman-mittausten pääasialliset kohinan lähteet ovat fluoresenssitausta ja DCR (engl. Dark Count Rate). Pikosekuntiluokan laserin ajoittaminen toimimaan tarkasti sopivassa syklissä äärimmäisen herkän CMOS-SPAD-detektorin kanssa mahdollistaa tehokkaan fluoresenssin vähentämisen ja signaali-kohina-suhteen parantamisen. Itse asiassa CMOS-SPAD-detektorilla on mahdollista mitata yhden fotonin aikaansaama jännite (Nissinen ym. 2011). Ilmiö perustuu detektorin elektroniikan mahdollistamaan kaskadi-tyyppiseen signaalinvahvistumiseen.

### **2.3.6. Raman-spektrin muodostaminen käyttäen aika-erottelua**

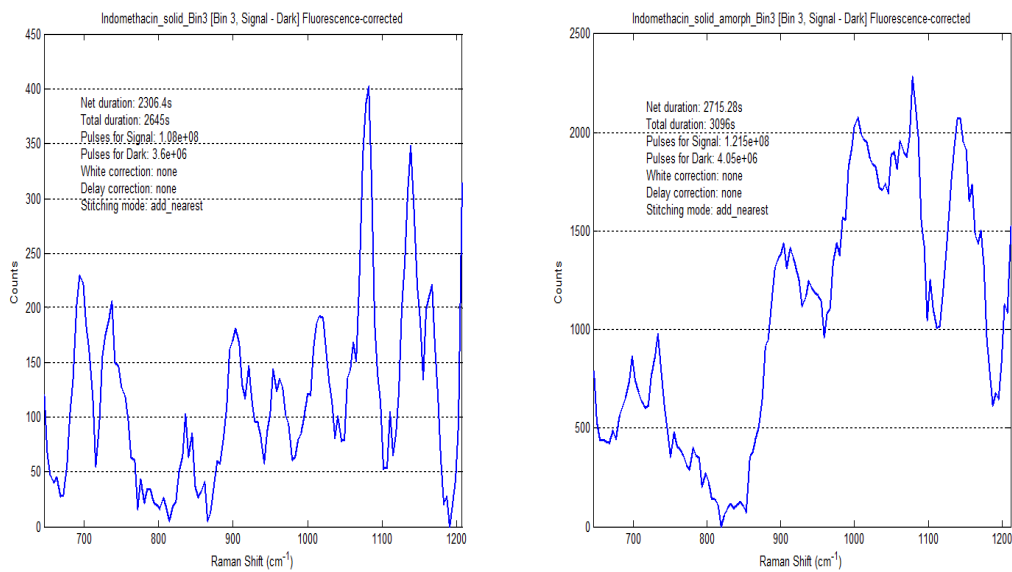
CMOS-SPAD-detektorilla mitataan käytännössä samanaikaisesti kolmea tekijää. Määritetään aikajakaumaa, eli millä ajanhetkillä fotoneja saapuu detektorille. Esimerkiksi tässä tutkimuksessa käytetyn CMOS-SPAD-2-rividetektorin piirilevyllä oli 4 aika-ikkunan säätöön ja ajoittamiseen mahdollisuus. Molemmilla riveillä oli 128 pikseliä ja yhden rivin fyysinen pituus oli ~ 4mm. Aika-ikkunoita kutsutaan bineiksi (Bin1, Bin2, Bin3 ja Bin4). Ne säädetään toimimaan sellaisella ajoituksella, että osa ikkunoista detektoi lähes välittömästi laser-herätteen jälkeen näytteestä sironneita emissiofotoneja ja osa puolestaan sopivalla jaksotuksella hieman myöhempinä ajanhetkiä. Tutkimuksen laitteisto mahdollisti tällä hetkellä noin 50 pikosekunnin aikaskaalan lyhyimmän ajanjakson binille. Huomionarvoista on myös se, että laitteen ohjausohjelman avulla jokaisen aika-ikkunan vastefunktioita päästiin

tarkastelemaan erikseen. Näin ollen voitiin esimerkiksi suorittaa lyhyt testimittaus ja tutkia aika-ikkunoiden vastefunktioiden avulla, mille aika-ikkunalle saapuu eniten fotoneja varhaisina ajanhetkinä laser-herätteen jälkeen ja mille puolestaan eniten myöhemmillä aika-akselin hetkillä. Aikasemmin detektoituja fotoneja (tai ainakin suurta osaa niistä) voidaan pitää Raman-sironnan aiheuttamina fotoneina ja myöhemmin detektoituja fotoneja suurella todennäköisyydellä fluoresenssin aiheuttamina fotoneina. Kun kaikkien aika-ikkunoiden vastefunktiot yhdistettiin ja vähennettiin niistä eniten fluoresenssi-fotoneja detektoineen aika-ikkunan vastefunktio, päästiin fluoresenssivähennettyyn Raman-spektriin. Aikaresoluution pienentäminen, eli aikatarkkuuden kasvattaminen, eli aika-ikkunan kaventaminen parantaa Raman-sironnan signaalia entisestään. Binien vastefunktioita käsiteltiin Matlab-ohjelmalla ja siihen ohjelmoidulla rutiinilla (engl. script) pystyttiin piirtämään myös 3-ulotteisia esityksiä aika-ikkunoiden vasteista. Kuvissa 10-11 nähdään esimerkkinä indometasiinin kiteisen ja amorfisen muodon mittauksen vastefunktio 3-ulotteisessa koordinaatistossa aika-ikkunan Bin3 osalta sekä vähennyksen tuloksena saatu erotusspektri, eli mahdollisimman paljon Raman-sirontaa sisältävä spektri. Lisäksi aika-erotteisella laitteistolla mitataan detektorille saapuvien fotonien määriä, eli sironnan intensiteettiä (yleensä Raman-spektrikuvien intensiteetti, eli y-askeli). Kolmantena tekijänä on detektorille saapuvien fotonien energia, eli tutkittavan näytteen rakenteista sironneiden fotonien energia. Sironneet fotonit (joiden joukkoon kuuluvat muun muassa Raman-fotonit ja fluoresenssi-fotonit) muodostavat siten spektrien x-akselin, joka kertoo herätteen ja sironneen fotonin välisen energiaeron. Kuvassa 12 on fluoresoivan liuosnäytteen mittaus kvartsikyvetissä kuvatulla aika-erotteisella laitteistolla käyttäen 532 m heräte-laseria.

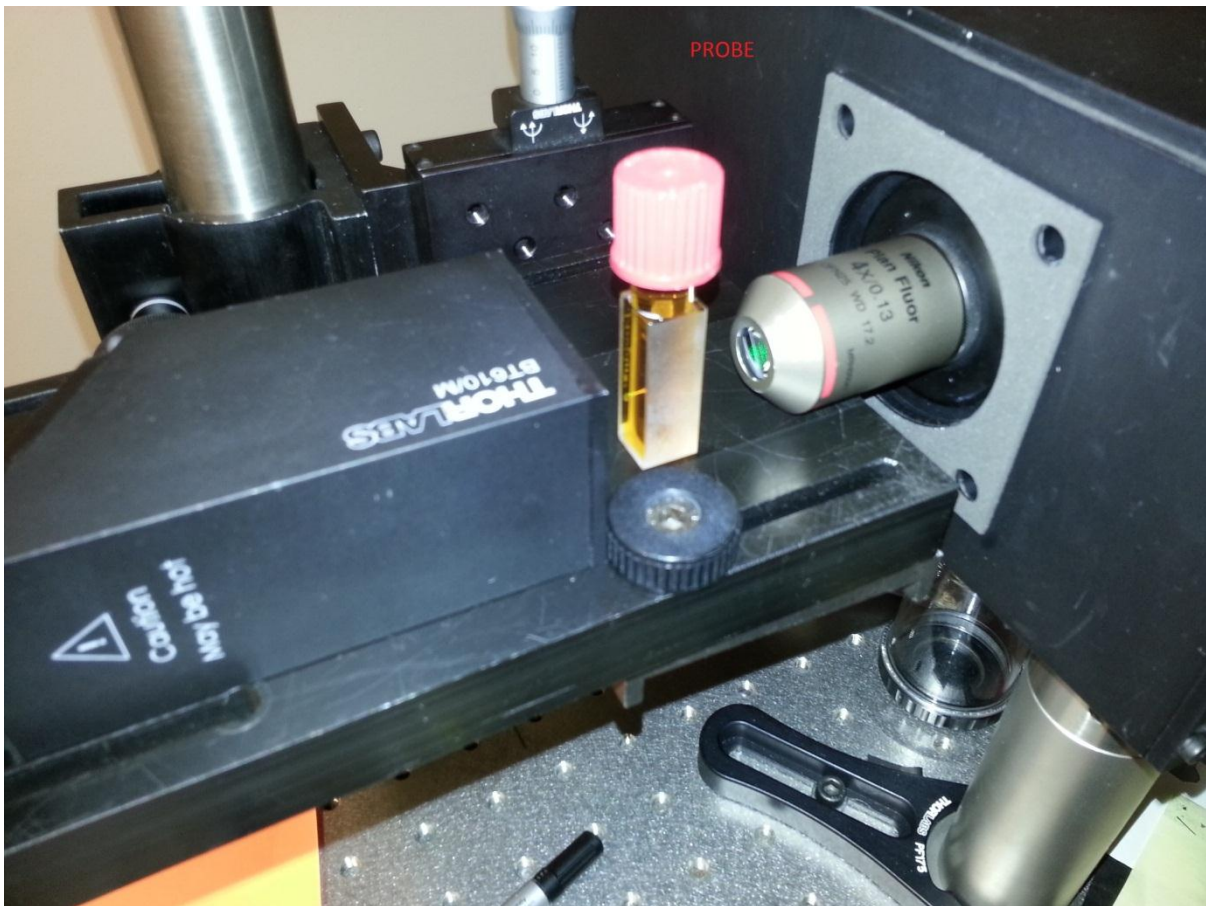




**KUVA 10:** 3-ulotteinen esitys kiteisen ja amorfisen indometasiinin mittauksesta aikaikkunan Bin3 osalta (eniten alku-ajanhetken sirontaa eli todennäköisimpiä Raman-fotoneja).



**KUVA 11:** Fluoresenssi-vähennyksen tuloksena saadut kiteisen ja amorfisen indometasiinin Raman-spektrit.



**KUVA 12:** Liuosmittaus kvartsikyvetissä aika-erotteisella laitteistolla.

### 2.3.6. IR-spektroskopian ja Raman-spektroskopian vertailua

Tapa, jolla molekyylin rakenteita aktivoivaa säteilyä hyödynnetään IR-spektroskopiassa ja Raman-spektroskopiassa, on erilainen (Smith ja Dent 2005). Infrapunatekniikassa infrapuna-alueelle kuuluvan energian useita eri taajuuksia kohdistetaan näytteeseen. Näyte absorboi energiaa, kun kyseisen heräte-energian taajuus sopii näytteen molekyylien vibraatiotilojen kanssa yhteen. Näin ollen molekyyli nousee korkeammalle vibrationaaliselle viritystilalle. Kun näytteen läpi kulkeneen säteen värähtelyä (taajuutta) detektoidaan, absorboituneen taajuuden häviäminen alkuperäisestä herätetaajuuksien skaalasta havaitaan. Tätä vastoin Raman-spektroskopiassa käytetään vain yhtä taajuutta, eli yhtä energia-alueita molekyylien heräte-energiana. Näytteen molekyyleistä siroaa fotoneja takaisin. Niillä voi olla joko täysin sama, hieman pienempi tai hieman suurempi

energia, joka Raman-laitteiston detektoreilla havaitaan. Kaksi viimeksi mainittua tapausta muodostavat koko Raman-mittausten perustan – muuttuneella energialla takaisin sironneet fotonit. Raman ei vaadi sitä, että herätesäteilyn energian pitäisi olla molekyylin perustilan ja ylempien värähtelytilojen kanssa yhteen sovitettu, kuten IR-spektroskopiassa. Raman-sironnassa valo vuorovaikuttaa molekyylin kanssa sillä tavoin, että se häiritsee (polaroi) molekyylin atomiydinten ympäristössä sijaitsevaa elektronipilveä ja muodostaa lyhytaikaisen tilan, jota kutsutaan virtuaalitulaksi. Tämä tila ei ole stabiili ja se purkautuu säteilynä (fotoneina) nopeasti uudelleen.

Yleisesti, niin kutsutut molekyyliarakenteiden symmetriset vibraatiot aiheuttavat polaroituvuuden suurimmat muutokset ja näin ollen intensiivisimmät Raman-sironnat (Smith ja Dent 2005). Infrapunaspektroskopiassa puolestaan intensiivisin absorptio tapahtuu molekyylin dipolimomentin muutoksen vuoksi. Asymmetriset vibraatiot aiheuttavat tätä ilmiötä eniten ja ovat näin ollen IR-spektroskopiassa intensiivisimpiä absorption aiheuttajia. Molekyylin vibraatiot eivät käytännössä ole IR- ja Raman-aktiivisia samanaikaisesti ja yleensä nämä tekniikat antavat hyvin erilaisen intensiteettijakauman. Tuloksena voidaankin todeta, että tekniikat ovat komplementaarisia ja antavat yhdessä käytettyinä laajemman kuvan koko molekyylin rakenteesta. Yksi tärkeä valintasääntö on vielä tarpeen kuvata; niin kutsutuissa sentrosymmetrisissä molekyyleissä (esimerkiksi  $C_2H_4$  on sentrosymmetrinen,  $CH_4$  puolestaan ei) yksikään spektrivyö ei voi olla aktiivinen Raman-sironnan suhteen ja infrapuna-absorption suhteen (Smith ja Dent 2005). Toisiaan tätä kutsutaan poissulkemissäännöksi.

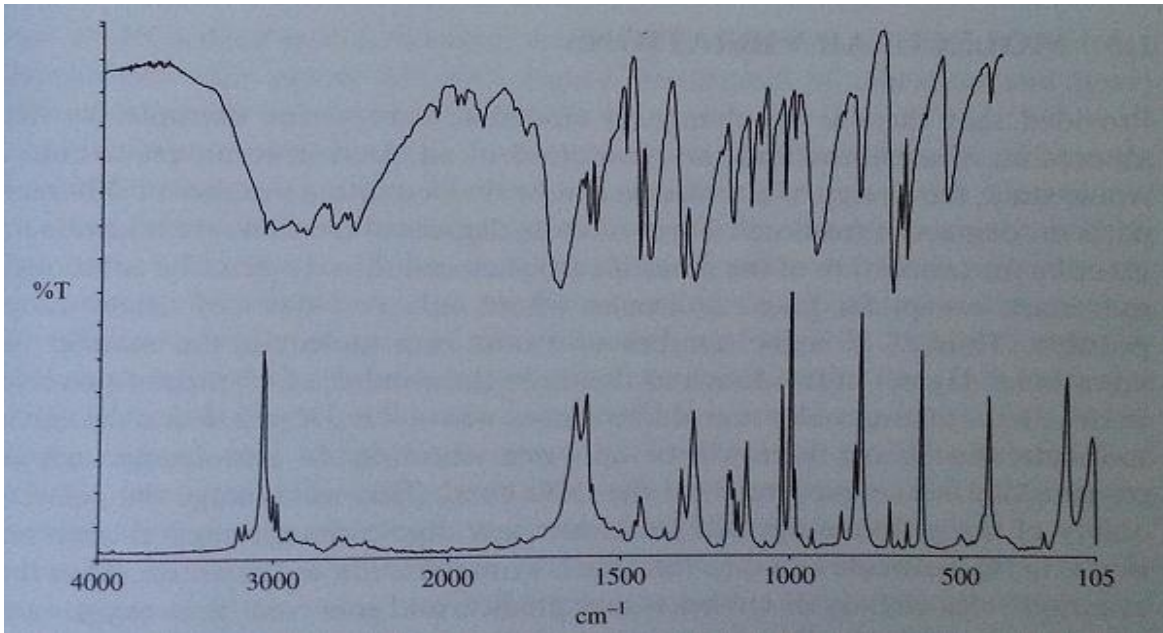
Vaikka erilaiset energia-alueet ovat mahdollisia, infrapuna- ja Raman-spektroskopian tutkimuksissa kiinnostavin informaatio löytyy IR-spektroskopiassa energia-alueelta  $400\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  ja Ramanissa alueelta  $200\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  (Smith ja Dent 2005). Myös tämän työn kokeellisen osuuden spektrien tulkinta ja tarkastelu on skaalattu siten, että Raman-siirtymien tulkinta aloitetaan x-akselilla aaltolukualueelta  $200\text{ cm}^{-1}$  (toisinaan myöhemminkin), ellei jostakin tietystä syystä ole erikseen mainittu matalamman aaltolukualueen tarkastelusta. Mainitut energia-alueet kattavat käytännössä kaikki tilat, jotka ovat molekyyleille tyypillisiä

värähtelyyn perustuvaa spektroskopiaa käytettäessä. On huomioitava, että Raman-spektrien tulkinnessa intensiteetit ovat riippuvia tutkittavasta molekyylin vibraatiofilasta, instrumentoinnista ja näytteenkäsittelystä – vaikka Raman vaatii lähtökohtaisesti hyvin vähäistä näytteenkäsittelyä, käytetyllä laitteistolla voi olla huomattava vaikutus absoluuttisiin intensiteetteihin, spektrien leveyteen ja spektrialueiden (piikkien) sijaintiin.

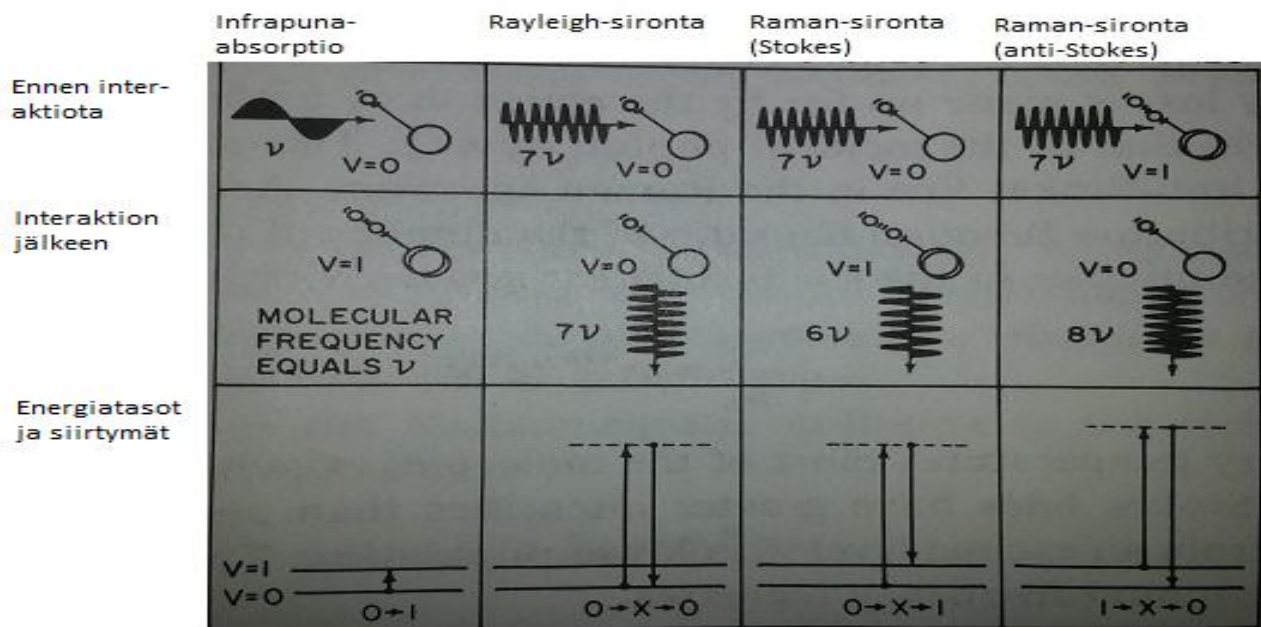
Kuvassa 13 on vertailtuna bentseenihapon IR- ja Raman-spektri. Vaaka-akselin (x-akseli) arvot on ilmaistu aaltolukuina, joille yksikkönä käytetään spektroskopiassa vakiintunutta yksikköä  $\text{cm}^{-1}$ . Infrapuna-absorptiolle jokainen piikki edustaa molekyylin absorboiman säteilyn energiaa (tai toisinaan käytössä on transmittanssi tai suhteellinen transmittanssi T%, joka edustaa käänteistä ilmiötä; matalampi transmissio-arvo kertoo suuremmasta absorptiosta). Pystyakselilla (y-akseli) sijaitsee siis absorboidun valon määrä ja se kuvataan yleensä maksimaalisen absorbanssin kanssa, joka on spektriä pitkin kuljettaessa alin mahdollinen kohta (kuoppa). Useimmiten Raman-sironta kuvataan ainoastaan Stokes-spektrinä ja annetaan energiaerona tai energiasiirtymänä:

Raman-siirtymä (engl. Raman shift) =  $\Delta E$  = Lähteen heräte-energia – sironnut energia [ $\text{cm}^{-1}$ ]

Tällä tavoin siis saadaan kuvattua energiaeroa, joka vallitsee alkuperäisen heräte-energian ja sironneen energian välillä, ja edelleen, tämä on energiaero, jota mitataan suoraan infrapunatekniikassa. Kuvassa 14 ovat puolestaan yhteenvetona eri sirontailmiöt. Kuvassa on esitetty kaaviokuvana Rayleigh- ja Raman-sironta sekä infrapuna-absorptio. Infrapuna-absorptiossa interaktion aiheuttavalla fotonilla on sama taajuus ( $\nu$ ), kuin molekulaarisella värähtelyllä. Rayleigh- ja Raman-sironnassa interaktion aiheuttavalla fotonilla on paljon korkeampi taajuus ( $7\nu$  kuvaajassa). Sironnut fotonit on interaktion aikaansaavan fotonin kanssa vastaava Rayleigh-sironnassa, mutta Raman-sironnassa sironneella fotonilla on matalampi tai korkeampi taajuus ( $7\nu \pm \nu$ ). Fotonin taajuuden ero verrattuna alkuperäiseen on yhtä suuri kuin molekulaarinen värähtelytaajuus.



**KUVA 13:** Bentsoehapon infrapuna- ja Raman-spektri. Ylempi spektri kuvaa infrapuna-absorptiota ilmaistuna transmittassi-arvolla (T%), eli mitä alhaisempi transmissio, sitä voimakkaampaa on absorptio kyseisellä aaltolukualueella. Alempi spektri on puolestaan Raman-sirontaa kuvaava spektri. Korkeampi piikki tarkoittaa voimakkaampaa sirontaa (Mukaiituna Smith ja Dent 2005).



**KUVA 14:** Yhteenvetokuva absorptio- ja sirontailmiöistä infrapuna - lähi-infrapuna-alueella (Mukaiituna Colthup ym. 1990).

NIR (engl. Near-Infrared)-spektroskopia antaa parhaiten informaatiota vain molekyylin funktionaalisista ryhmistä, jotka sisältävät vetyä (esim. -CH, -OH, -NH-ryhmät) (Kostamovaara ym. 2013). Raman-spektri antaa puolestaan informaatiota koko skaalalla molekyylin vibraatio- ja rotaatio-tiloista. Tyypillisesti IR-spektroskopiassa näistä saadaan tietoa vain yhdistämällä MIR (engl. Mid-Infrared)- ja FIR (engl. Far-Infrared)-spektroskopiitekniikat. Toisaalta Raman-spektroskopiassa vältetään useat näytteen käsittelyyn liittyvät ongelmat, jotka ovat tyypillisiä MIR- ja FIR-tekniikoille. Raman-spektroskopian etuna on se, että spektri voidaan mitata pakkausmateriaalien ja esimerkiksi pullojen seinämien läpi. Tällöin on varmistuttava, että herätesäde ja sironnasta kerättävät fotonit eivät mene päällekkäin pakkauksessa, vaan ainoastaan materiaalissa, jota se sisältää. Raman tuottaa myös parempia spektrejä biologisille ja biokemiallisille näytteille, joissa on usein korkea vesipitoisuus. Tämä johtuu Raman-spektroskopian alhaisesta herkkyydestä vedelle. IR-absorptio on voimakkainta polaaristen molekyylien osalta, eli käytännössä sellaisille rakenteille, joissa elektronit ovat muodostaneet jo valmiiksi molekyyliin varausjakauman (tai varausjakaumia). Tämä on loogista myös sen kanssa, että IR-absorptio vaatii molekyylin sähköisen dipolimomentin muutoksen, kun puolestaan Raman-sironna vaatii muutoksen molekyylin elektroniverhon polaroituvuudessa.

IR-menetelmissä absorptio detektointi vaatii lineaaristen detektorien (esimerkiksi Ge, InGaAs tai InSb LN<sub>2</sub> – viilennyksellä) käyttöä. Dispersio-Ramanissa käytetään 2-ulotteisia CCD-detektoreja, jotka jäähdytetään -70 °C:n termoelektrisesti (Pitt ym. 2005). IR:ssä fokusointi on hankalaa < 5 µm, Raman-mikroskopeilla päästään < 1 µm paikkaresoluutioihin (FT-Raman-laitteistoilla hieman heikompiin). Ramanissa näytteen epätasaisuudet keskiarvoistetaan automaattisesti defokusoimalla säde näytteestä. IR-menetelmissä spektrien määrittäminen alle 600 cm<sup>-1</sup> on haastavaa, Raman-spektroskopiassa voidaan spektri määrittää välillä 10-15 000 cm<sup>-1</sup>. Spektrialueen huippu riippuu heräte-energian aallonpituudesta, ja silikonidetektoreista. IR:ssä korkeissa lämpötiloissa tapahtuvia mittauksia haittaa mustan kappaleen säteily-ilmiö, Ramanissa käytettäessä voidaan mitata yli 1500 °C lämpötiloihin. Myös mustia ja opalisoivia näytteitä voidaan mitata. Lisäksi,

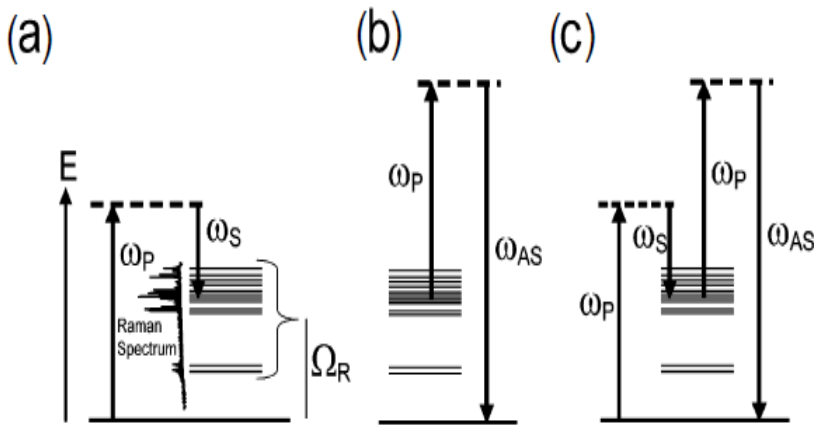
infrapunatekniikoilla on heikko detektiomahdollisuus homopolaarisiin molekyyli-rakenteisiin, Raman-spektroskopiassa tämä onnistuu melko hyvin (esimerkiksi C-C – sidosten tai S-S – sidosten värähtelyn detektio).

### 2.3.7. CARS-spektroskopia

Raman-spektroskopiassa on edustaan huolimatta tiettyjä rajoitteita. Fluoresenssin ohella Raman-signaalien heikko intensiteetti on asettanut haasteita tekniikan laajemmalle käytölle. Tiedonkeruuseen tarvittavat mittausajat ovat suhteellisen pitkiä, koska vain pieni osa sironneista fotoneista on epäelastisesti sironneita Raman-fotoneja (Evans CL ja Xie XS 2008). Mikäli laitteiston yhteydessä käytetään mikroskooppitekniikkaa kuvien tuottamiseen, tarvitaan korkeita laser-energioita ja pitkiä integraatioaikoja (100 ms – 1 s pikseliä kohden). Varsinkin elävien kohteiden kuvantamisessa nämä rajoitukset haittaavat prosesseja. Paljon vahvempia molekyylien vibraatiotilojen signaaleja saadaan aikaan koherentin anti-Stokes Raman-sirontaspektroskopian avulla (engl. CARS = Coherent Anti-Stokes Raman Scattering). Ilmiö havaittiin ensimmäisenä Makerin ja Terhunen (1965) toimesta Ford Motor Companyssä.

CARS-prosessissa molekyylin vibraatiotilojen herätteenä käytetään useampaa laser-sädettä (Evans CL ja Xie XS 2008). Ne vuorovaikuttavat näytteen rakenteiden kanssa niin kutsutussa aaltojen yhdistymisprosessissa (engl. wave-mixing) ja usein puhutaan neljän säteen yhdistämisprosessista. CARS-prosessissa käytetään pumppusädettä taajuudella  $\omega_p$  ja Stokes-sädettä taajuudella  $\omega_s$ . Stokes-säteellä ikään kuin pakotetaan fotonit halutulle virtuaaliselle värähtelytasolle pumppusäteen käytön jälkeen. Tämän jälkeen käytetään uudestaan pumppusädettä, jolloin fotonit saadaan uudelle, korkeammalle virtuaaliselle viritystilalle. Viimeisessä vaiheessa fotonit palaavat takaisin perustilalle. Kolmella säteellä saadaan aikaan viritystilojen muutoksia ja neljäs muodostuu perustilalle palaamisen yhteydessä, neljännen säteen fotonien energiaa detektoidaan. Kun taajuus  $\omega_p - \omega_s$  sopii tutkittavan molekyylin kyseistä taajuutta vastaavalle Raman-aktiiviselle molekulaarisen vibraation taajuusalueelle, resonovat värähtelijät saavat

koherentin ulkoisen värähdysvoiman CARS-prosessin seurauksena. Näin ollen muodostuu vahva (intensiteetiltään paljon tavallista Raman-signaalia vahvempi) anti-Stokes-signaali  $\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s$ . Tilannetta voidaan havainnollistaa alla olevalla kuvalla 15. Kuvassa on spontaani ei-koherentti Raman-sirontaprosessi Stokes-sironnan aiheuttamana (a), spontaani ei-koherentti Raman-sirontaprosessi anti-Stokes-sironnan aiheuttamana (b) ja neljän aallon yhdistelmäprosessissa muodostuva anti-Stokes CARS-sironta (c). Kuvan tulkinnessa on tarpeen huomioida seuraavat yhtäläisyydet:



**KUVA 15:** Raman-sirontaprosessit : (a) Stokes, (b) anti-Stokes, (c) CARS (Mukailtuna Shaw RA ja Mantsch HH 1999).

Stokes-siirtymä ( $\omega_p - \omega_s$ ) ja anti-Stokes-siirtymä ( $\omega_{AS} - \omega_p$ ) liittyvät molekulaariseen vibraatiotaajuuteen  $\Omega_R$  seuraavalla tavalla:

$$\Omega_R = \omega_p - \omega_s = \omega_{AS} - \omega_p$$

Päinvastoin kuin epäkoherentti spontaani Raman-sirontaprosessi (tilanteet (a) ja (b)), CARS-prosessi on kolmannen kertaluvun epälineaarinen prosessi, jossa pumppuna toimiva eksitaatioenergia (heräte) taajuudella  $\omega_p$  ja Stokes-eksitaatioenergia taajuudella  $\omega_s$  yhdistyvät näytteessä tuottaen anti-Stokes-signaalienergian taajuudella:

$$\omega_{AS} = 2\omega_p - \omega_s, \text{ jolloin}$$

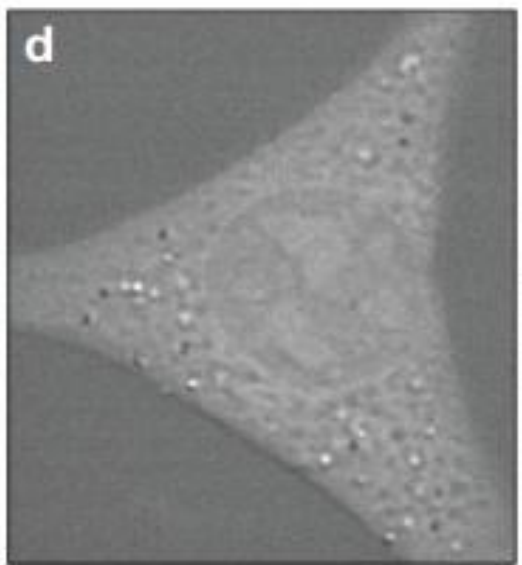


anti-Stokes-signaali saadaan vahvana, kun taajuusero pumpun ja Stokes-säteen välillä vastaa Raman-aktiivista molekulaarista vibraatiota  $\Omega_R = \omega_p - \omega_s$ . Koska CARS on koherentti prosessi, saadaan aikaan vahva signaali. Tämä tekee CARS-mikroskopiasta  $\sim 10^6$  – kertaisesti herkemmän menetelmän kuin Raman-mikroskopia. CARS-mikroskopiaa on käytetty muun muassa elävien solujen kuvaamiseen hyödyntäen niissä esiintyviä erilaisia molekyyliarakenteiden vibraatiotiloja (Evans CL ja Xie XS 2008). Näistä voidaan mainita ainakin fosfaatin venytysvärähtely (DNA), amidi I värähtely (proteiini), OH-ryhmän venytysvärähtely (vesi) ja CH-ryhmän venytysvärähtely (lipidit). Varsinkin lipidien tuottama signaali on niin vahvaa, että jopa yksittäisiä fosfolipidikaksoiskerroksia on saatu kuvattua. Myös kudosten in vivo-kuvaamiseen CARS-mikroskopian on osoitettu olevan hyödyllinen apuväline (Evans ym. 2007).

On huomioitavaa, että CARS-tekniikalla ei varsinaisesti mitata spektrejä, kuten Raman-spektroskopiassa, vaan yleensä jotakin tiettyä aaltolukualuetta. Toisin sanoen, jos halutaan saada informaatiota laajemmalla skaalalla, heräte- ja pumppulaserien suhdetta joudutaan muuttamaan (tosin useimmissa CARS-laitteistossa säädetään vain toista ja toinen säätyy oikeassa suhteessa tämän mukana) joka kerta yhtä aaltolukualuetta varten. Voidaan esimerkiksi mitata aaltoluvulla  $1500 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1800 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2000 \text{ cm}^{-1}$  jne. CARS-tekniikka onkin osoittautunut hyvin soveltuvaksi mikroskoppitekniikoihin.

Usein CARS-laitteisto on rakennettu niin, että sillä voidaan havaita myös fluoresenssia. Kyseessä voi olla tavallisen fluorsenssin havainnointi tai käytössä voi olla konfokaali-laser-skannausmikroskooppi (Evans ym. 2007) (engl. confocal laser scanning microscope). Monesti käytetään CARS:n lisäksi myös muita epälineaarisia kuvantamistekniikoita. Esimerkkinä kaksifotonifluoresenssia (engl. two-photon excitation fluorescence) tai SHG-ilmiöitä (engl. second harmonic generation) voidaan havainnoida. Kuvattava kohde voi olla esimerkiksi solukerros, jota kuvataan x,y-suunnassa viipale kerrallaan ja tämän jälkeen viipaleet yhdistetään (pinotaan) z-tasossa (engl. stacking) (Gordon ja McGoverin 2011). Näin rakenteista saadaan muodostettua 3-ulotteinen kokonainen kuva. Solujen eri rakenteiden erottamiseksi kuva voidaan muodostaa siten, että suurimman

signaalin antavat rakenteet (esim.  $1600\text{ cm}^{-1}$  aaltolukualueelle osuvat värähtelyt) saavat kuvan ohjelmallisessa muodostuksessa kirkkaimman kontrastiarvon. Tällöin nämä rakenteet näkyvät varsinaisessa kuvassa kirkkaimpina. Esimerkkinä mainittakoon solun sisälle diffundoitunut lääkeaine, jolla on  $1600\text{ cm}^{-1}$  aaltolukualueella näkyviä rakenteita. Tällainen aine voidaan erottaa kuvissa solun sisäpuolella sillä edellytyksellä, että samalla alueella ei ole muiden molekyylien samalla aaltolukualueella värähteleviä rakenteita. Kuvassa 16 näkyy CARS-mikroskoopilla otettu kuva 3T3-L1-solusta ja sen sisäpuolella näkyvistä lipididropleteista.



**KUVA 16:** 3T3-L1-solusta otettu CARS-mikroskooppikuva. Kuvaus on tehty  $\text{CH}_2$ -sidosten venytysvärähtelyalueella,  $2845\text{ cm}^{-1}$  (Evans CL ja Xie XS 2008).

### 3 RAMAN-SPEKTROSKOPIAN EDELLYTYKSIÄ JA TUTKIMUSTEN TAUSTAA KÄYTÄNNÖSSÄ

#### 3.1. Yleistä

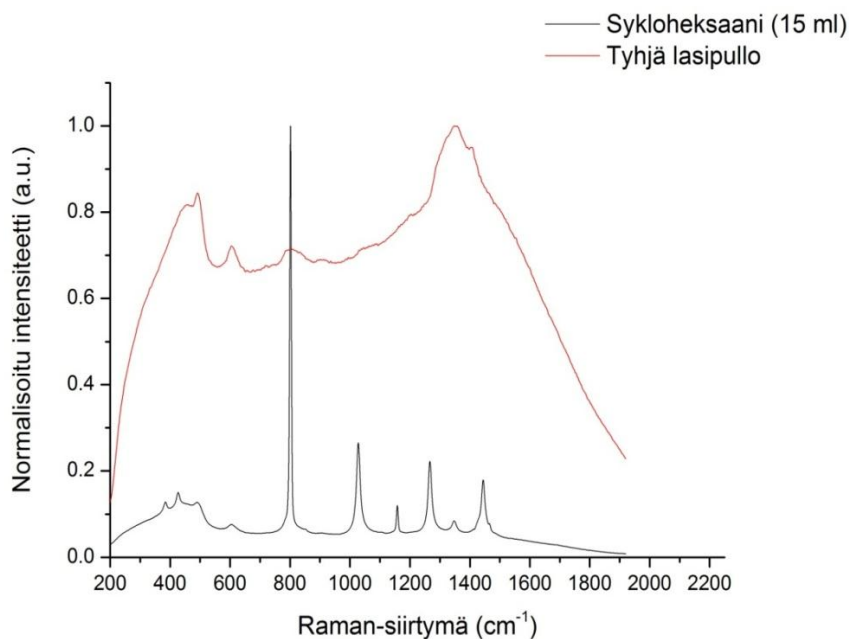
Kun tuntemattomia molekyyliä tai useiden molekyylien näytettä ryhdytään tutkimaan, on helppoa tehdä järjenvastaisia päätelmiä, koska eri molekyylien eri rakenteet tuottavat värähdellössään hyvin erilaisen intensiteetin Raman-sirontaa

(Smith ja Dent 2005). Näin ollen onkin tärkeää pohtia aina spektrejä tulkitessa näytteen fysikokemiallista luonnetta yleisemmin. Esimerkkinä tästä tilanne, jossa mitataan polymeeriasiassa olevaa näytettä. Polymeeri saattaa sisältää rikkiä. Polymeerillä on heikko Raman-sironta ja rikillä puolestaan vahva. Tällöin Raman-spektrissä näkyy hyvin dominoivasti intensiivisiä rikin aiheuttamia värähtelyjä. Ei voida kuitenkaan tehdä johtopäätöstä, että rikki olisi vallitseva komponentti polymeeriasiassa. Esimerkki on triviaali, mutta antaa suuntaa sille, miten Raman-ilmion tuottamaa spektri-informaatiota tulisi tulkita. Toinen merkittävä seikka Raman-spektreissä on se, että ne eivät ole ilmiselvästi riippuvia siitä kemiallisesta ja fysikaalisesta ympäristöstä, jossa näyte sijaitsee. Ei ole itsestään selvää, ovatko molekyylit kaasumaisessa, nestemäisessä vai esimerkiksi kiinteässä olomuodossa. Spektrien terävyydessä ja spektrin muodossa näkyy kuitenkin usein näytteen fysikaalinen tila. Kiteiset kiinteät aineet tuottavat teräviä, vahvoja spektrejä, kun taas nesteet ja kaasut paljon heikompia. Raman-spektrit ovat myös jossakin määrin lämpötilasta riippuvia.

Spektrien muodosta, etenkin niiden levydestä voidaan erottaa joitakin tekijöitä, jotka kertovat näytteen ja näyteastian fysikaalisesta ja kemiallisesta koostumuksesta (Smith ja Dent 2005). Leveät spektrialueet Raman-spektrissä ovat peräisin usein fluoresenssin, palamisen tai heikon resoluution tuottamia. Heikot spektrivyyöt, jotka ovat vahvistuneet esimerkiksi lähekkäin tapahtuvien yhteisten rakenteiden värähtelyjen seurauksena, voivat olla peräisin esimerkiksi vedestä tai lasista. Alla olevassa kuvassa 17 on Pyrex-lasipullon Raman-spektri, jossa on selvästi nähtävissä muutamia leveitä spektrivyyöitä. Ne ovat myös melko vahvoja ja osin teräviä kuvan spektrissä. Mitatun spektrin lasipullo on tilavuudeltaan ~ 20 ml, korkeudeltaan ~ 5 cm ja halkaisijaltaan ~ 2 cm. Mittaukset tehtiin 785 nm laserilla käyttäen 3 peräkkäisen mittauksen keskiarvoa ja detektorin aukioloaikaa 3 s. Vertailuksi kuvassa näkyy laitteiston kalibroinnissa käytetyn sykloheksaanin Raman-spektri (musta) määritettynä ~ 15 ml sykloheksaania. Käytössä oli ns. PhAT-probe, jonka fokuuspiste on suhteellisen suuri pinta-alaltaan ja keruusäteen pituus hyvin pitkä. Tämä saa aikaan sen, että takaisinsironneiden fotonien keruu tapahtuu pitkältä matkalta, mutta ei mistään kohden näytettä kovin suurella fotonivuolla

(keruusäde on lähestulkoon kollimoitu näytteeseen saapuvaan laser-säteeseen nähden). Sykloheksaanille mittauserimetrit olivat 3 peräkkäistä mittausta ja detektorin aukioloaika 1s.

Kemiallinen sitoutuminen, esimerkiksi liuoksessa olevien molekyylien vetysitoutuminen tai pH:n muutokset voivat näkyä Raman-spektrissä. Nämä muutokset ovat kuitenkin enemmän piikkien siirtymiä (engl. peak shifts) kuin muutoksia spektrin muodossa. Edelleen, esimerkiksi alla olevan kuvan 17 tulkinassa tulee noudattaa varovaisuutta, koska siitä ei voida esimerkiksi suoraan tehdä johtopäätöksiä lasin rakenteesta. Spektriin on saattanut vaikuttaa esimerkiksi Raman-laitteiston detektorin ja/tai spektrometrin sopimattomuus kyseiseen mittaukseen tai näytteeseen kohdistettavan laser-säteen epätarkkuus (mikä voi olla mahdollista korjata kaventamalla fyysisesti näytteeseen menevän fokusointipisteen halkaisijaa esimerkiksi mikroskoopeissa käytettävällä rakomenetelmällä). Näin ollen mittauksia suoritettaessa on aina tärkeää tehdä riittävästi referenssi (tausta)mittauksia, muun muassa tyhjästä mittauskammioista, mitta-astioista jne. Seuraavassa kappaleessa käsitellään muutamia keskeisiä seikkoja, joita Raman-spektroskopiaa käytettäessä tulee huomioida.



**KUVA 17:** Tyhjän Pyrex-lasipullon (V ~ 20 ml) Raman-spektri (punainen) ja sykloheksaanin (V ~ 15 ml) Raman-spektri.

### 3.2. Raman-signaalin parantaminen

Raman-sironnan aiheuttama signaali on useimmiten hyvin heikko. Signaalin parantamiseksi voidaan käyttää erityyppisiä ratkaisuja. Näistä SERS-menetelmä (engl. Surface Enhanced Raman Spectroscopy) on ollut jatkuvan kiinnostuksen ja kehityksen kohteena 1970-luvulta lähtien. Alun perin huomattiin hopeaelektrodille liitetyn pyridiinin Raman-signaalin voimakas vahvistuminen (Albrecht ja Creighton, 1977). Vähitellen on päädytty kahteen toisiaan täydentävään teoriaan, joilla SERS-signaalin vahvistuminen on selitettävissä. Elektromagneettinen teoria käsittää paikallisen sähkökentän vahvistumisen metallipinnalla (engl. surface plasmon), jolla tutkittava molekyyli sijaitsee (Valley ym. 2013). Vahvistuminen tapahtuu metallipinnan lokalisoituneiden pintaplasmonien virittymisen seurauksena. Raman-signaalin parantumista  $10^4$ - $10^8$  – kertaiseksi alkuperäiseen nähden on havaittu, mutta jopa  $10^{14}$ - $10^{15}$  – kertaista vahvistumista voi tapahtua. Näin suurista vahvistumiskertoimista ei olla kuitenkaan täysin yksimielisiä, mutta joka tapauksessa SERS-tekniikoita käyttämällä myös yksittäisten molekyylien havainnointi Raman-spektroskopiassa on mahdollista (Nie ja Emory 1997; Le Ru ym. 2007). Kemiallinen signaalin vahvistuminen puolestaan on heikommin ymmärretty ilmiö, mutta sillä nähdään olevan yhteyksiä kolmen erityyppisen mekanismin kanssa. Näihin kuuluvat molekulaaristen viritysresonanssien, varauksensiirtomekanismien, ja epäresonanttien muutosten muodostuminen molekyylin polaroituvuudessa silloin, kun se vuorovaikuttaa metallipinnan kanssa. Kemiallisen vahvistumisen edellytyksenä on todennäköisesti se, että molekyylin täytyy muodostaa kemiallisia sidoksia pinnan kanssa – elektromagneettinen teoria pätee myös silloin, kun molekyyli ainoastaan adsorboituu pinnalle. Molempia lähestymistapoja joudutaan kuitenkin soveltamaan, jotta erilaiset signaalinvahvistumismekanismit olisivat selitettävissä.

Signaalinvahvistuminen tapahtuu nanomittakaavassa karhennetuilla metallipinnoilla. Tyypillisimpiä käytettyjä metalleja ovat kulta ja hopea (Xie ja Schlucker 2013). Pinta voidaan valmistaa esimerkiksi elektrokemiallisella karhennuksella, metallipinnoituksella tai käyttämällä nanosubstraattia. Myös

kolloidimuodossa olevien nano-metallipartikkelin kerrostamista voidaan käyttää. Sopivia SERS-substraatteja on kaupallisesti saatavilla, mutta usein tutkijat kehittävät ja testaavat itse valmistamiaan pintaratkaisuja. Käytännössä ainoa huomioitava seikka on varmistaa, että käytettävän laserin aallonpituus sopii valitun SERS-pinnan ominaisuuksien kanssa yhteen, jotta saadaan järkeviä tuloksia aikaan. SERS-tekniikalla saatu spektri saattaa hieman erota aineen tavallisesta Raman-spektristä, joten joissakin tilanteissa joudutaan harkitsemaan datankäsittelyä ennen johtopäätösten tekemistä. Plasmoneja muodostavien SERS-pintojen tutkimusta tehdään laajasti. Esimerkiksi kvartetti-rakenteita muodostavien kulta-nanosauvojen on todettu sopivan SERS-signaalin vahvistamiseen hyvin (Kumar ym. 2014). Niin ikään hiili-nanoputkista muodostettujen pintojen on todettu sopivan SERS-spektroskopiaan (Andrada ym. 2013). Andrada tutkimusryhmineen määrittivät oktadekylamiinimolekyylien (ODA) kovalenttista sitoutumista nanoputkista koostetulle SERS-pinnalle. Huomattavaa signaalinvahvistumista havaittiin. Samalla saatiin myös viitteitä siitä, että SERS-spektroskopiaan liittyvä, toistaiseksi kiistelty, kemiallinen teoria saattaisi olla pätevä. Tuloksia validoitiin myös suorittamalla DFT-laskelmia.

Raman-signaalin parantamista on tutkittu myös CCD-detektorin toimintaa optimoimalla (Lázaro ym. 2009). Tutkimuksessa säädettiin detektorin aukioloaikaa ja spektrografin aukon mittoja etsien optimaalista yhdistelmää mahdollisimman hyvän signaali-kohinasuhteen aikaansaamiseksi. Lisäksi on ehdotettu elastisen Rayleigh-sironnan hyödyntämistä sen sijaan, että Rayleigh-sironta suodatettaisiin signaalista pois (Hokr ja Yakovlev 2013). Kiinteillä, kiteisillä aineilla Raman-signaalin intensiteetti riippuu myös partikkelikoosta (Pellow-Jarman ym. 1996). Nanotimantit edustavat uuden sukupolven elektronisia materiaaleja (Nigmatullin ym. 2013). Timanttien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet yhdistettyinä nanoteknologian sovelluksiin saattavat avata tien uusille nanolaitteille, jotka toimivat yksilöllisesti ja tehokkaasti. Puhutaan nano-elektromekaanisista systeemeistä (engl. NEMS = Nano Electro Mechanical Systems) ja nanoelektrisistä laitteista. Biologiaan sovellettuna nanotimantit voisivat toimia lääkeaineiden, geenien tai proteiinien kuljetusvälineinä, uusissa kuvantamistekniikoissa, päällysteinä implantoitaville

materiaaleille tai biosensoreina. Tällaiset rakenteet aikaansaavat myös parantuneita Raman-signaaleja. Hiramatsu ja Saito (2014) tutkivat kehittämänsä vertikaalisen virtauslaitteen (engl. VFA = Vertical Flow Apparatus) avulla signaalikohina-suhteen parantamista. Laitteen avulla saatiin kerättyä tehokkaammin Raman-signaalia ja sen todettiin olevan mahdollisesti sopiva esimerkiksi laimennettujen liuosten tutkimiseen.

SERS-tekniikan haittana on useissa sovelluksissa heikko paikkaresoluutio. Näin ollen oleellista topografista informaatiota tutkituista pinnoista on vaikeaa saada (Kurouski ym. 2013). Monesti ongelma ratkaistaan yhdistämällä Raman-spektrometri STM-mikroskooppiin (engl. STM = Scanning Tunneling Microscope) tai AFM-mikroskooppiin (AFM = Atomic Force Microscope). Kun STM:n tai AFM:n kärkeen yhdistetään vielä hopea- tai kultapartikkeli, saavutetaan parempi Raman-signaali kärjen pienellä alueella. Metodista käytetään nimitystä TERS-spektroskopia (engl. TERS = Tip Enhanced Raman Spectroscopy).

Resonanssi Raman-sironnan ja tavallisen Raman-sironnan erona on se, että resonanssi-Ramanissa hyödynnetään heräte-energioita, jotka ovat lähellä molekyylien rakenteiden elektronisten siirtymätilojen energioita (Pitt ym. 2005). Heräte-energia voidaan valita esimerkiksi siten, että se on lähellä jonkin tietyn funktionaalisen ryhmän elektronista siirtymätilaa. Resonanssitekniikkaa hyödynnettäessä Raman-mittauksen sironna voi parantua jopa suuruusluokassa  $10^6$ . Tämä tekee mittauksesta huomattavasti herkemmän ja myös selektiivisemmän; kun ainoastaan kromofori tuottaa hyvin voimakkaan sironnan, kromoforin sisältävä osa molekyylistä saadaan näkymään selvästi spektrissä. Kun resonanssi-ilmiö tapahtuu, on mahdollista saada informaatiota sekä molekyylin elektronisista että vibrationaalisista siirtymätiloista. Resonanssitekniikasta on hyötyä muun muassa erityyppisissä proteiinimäärityksissä, koska useissa tärkeissä entsyymeissä on resonanssi-ilmiön mahdollistavia porfyriinirengasrakenteita.

### 3.3. Raman-spektroskopian käytäntöjä ja edellytyksiä

Näytteen tunteminen on tärkeää, vaikka itse näytteen varsinaisesta sisällöstä (komponentit, vahvuudet jne.) olisikaan tarkkaa tietoa. Pohdittavia tekijöitä ovat muun muassa se, kuinka ja mistä näyte on valmistettu, jos mahdollista, minkälaisia reaktiopolkuja näytteen komponenteilla on ollut tai voi olla sekä mahdollisia sivureaktioita (Smith ja Dent 2005). Mikäli kyse on liuoksesta, on syytä huomioida liuottimen vaikutukset spektriin. Mahdolliset epäpuhtaudet ja näytteen valmistuksessa käytettyjen instrumenttien aiheuttamat muutokset näytteeseen ovat niin ikään tärkeitä tekijöitä. Alla oleva taulukko 4 esittää muutamia eri olomuodossa olevien näytteiden käsittelyssä huomioitavia asioita, sekä kaikille näytetyypeille yhteisiä tekijöitä. Kaiken kaikkiaan täysin uusien ja tuntemattomien näytteiden analysoinnissa tulisi noudattaa erityistä huolellisuutta – jotakin on kuitenkin aina tiedossa heti alussakin, esimerkiksi näytteen olomuoto ja väri.

#### TAULUKKO 4: Raman-spektrin muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä

Näyte	Huomioitavaa
Kiinteä	Kosteus? Kuiva vai tahna? Pesu liuottimella? Uudelleenkitetyt?
Nesteet ja liuokset	Haihtuva? Emäksinen? Neutraali? Hapan? Liuottimen ja siellä olevien molekyylien interaktiot?
Kaasut	Käytetyt lämpötilat ja paineet?
Kaikille yhteistä	Kuinka puhdas näyte on/pitäisi olla? Onko näytteessä typpeä, rikkiä tai halogeeneja? Voivatko nämä esiintyä epäpuhtauksina näytteessä? Onko olemassa todennäköisiä polarisaation, molekyylien orientaation tai lämpötilan aiheuttamia muutoksia?

Raman-spektroskopian etuna on vähäinen näytteen esikäsittelytarve. Kuitenkin, etukäteen on syytä kartoittaa, millaista informaatiota spektristä halutaan saada selville. Tämä saattaa toisinaan määrätä myös suunnan tietyille ennakkovalmisteluille ennen spektrin määrittämistä (Smith ja Dent 2005). Kiinteillä



aineilla tulee huomioida, ovatko ne esimerkiksi puhtaita kiinteitä aineita, levymäisiä tai seoksia. Jos käsitellään seoksia, seoskomponenttien erilliset spektrit tulee määrittää. Jauheilla sironnan orientaatiokulmien muutokset ja partikkelikoon vaikutukset ovat oleellisia tietoja niin ikään. Jos näyte on laimennettu, koska sillä on hyvin vahva väri, ei voida kuitenkaan todeta, että käsitellään väritöntä ainetta. Mikäli näyte on astiassa, astian aiheuttama spektri tulee myös määrittää (esimerkiksi lasin, polyeteenin jne. spektri), Valetuissa näytteissä tai esimerkiksi polymeerifilmeissä voi olla liuotinta jäljellä, mikä on tarpeen selvittää. Nesteitä analysoitaessa on oleellista, käsitelläkö puhtaita nesteitä vai esimerkiksi liuoksia tai suspensioita.

Kun edellä mainituista tekijöistä on selvitetty mahdollisimman paljon informaatiota, päästään arvioimaan, ovatko spektrin piikit ja kokonaismuoto peräisin niistä molekyyliarakenteista, joita halutaan selvittää. Saadaan ainakin osittain poissuljettua, että spektreihin ei tule informaatiota esimerkiksi näytteiden omista fysikaalis-kemiallisista poikkeavuuksista, epäpuhtauksista tai näytteenkäsittelyn tuloksena (Smith ja Dent 2005). Silti, poikkeavuuksia voi aiheutua itse käytetyistä instrumenteista tai tietokoneohjelmista. Tällainen näytteestä ja näytteenkäsittelystä riippumaton ulkopuolinen tekijä voi olla esimerkiksi käytetty laser-valo. Se saattaa aiheuttaa resonanssia tai itse-absorptiota. Itse-absorptiossa molekyylin värähtelevistä rakenteista tapahtunut sironta ei saavu detektoreille sellaisenaan, vaan saattaa absorboitua esimerkiksi molekyylin omiin rakenteisiin sironnan jälkeen tai liuoksessa liuottimen molekyyliin (Ludwig ja Asher 1988).

Muita Raman-analyysin alkuvaiheessa selvitettäviä tekijöitä ovat muun muassa käytetyn spektri- ja analyysiohjelman ominaisuudet. On tarpeen tietää, onko spektrissä todellisuudessa litteä tausta vai onko esimerkiksi ohjelman oma taustakorjaus poistanut molekyylin fluoresenssin tuhoten samalla relevanttia tietoa (Smith ja Dent 2005). Spektrin todellinen vahvuus ja skaala tulee niin ikään selvittää sekä pehmenysfunktioiden mahdollinen vaikutus spektrin hienorakenteen katoamiseen. Toisinaan spektrin leveät vyöt saatetaan tulkita väärin, vaikka ne olisivatkin peräisin fluoresenssista tai näytteen palamisesta johtuvia. Terävät piikit voivat olla taustasäteilyn tai jopa mittaushuoneen valaistuksen aiheuttamia.

Näiden kaikkien käsiteltyjen seikkojen ohella spektroskopistilla tulisi olla Raman-analyysiä suorittaessa joitakin perustietoja aineen molekyylien rakenteesta, niiden vaikutuksista havaittavaan spektriin tai yleisimmistä virheellisistä tulkintamahdollisuuksista.

Usein tutkittava näyte sisältää useita kemiallisia komponentteja, eli useita erilaisia molekyyliä. Näytteen Raman-sironnan jakauma spektrissä on konsentraatiopainotettu lineaarinen kombinaatio 'puhtaista' komponenteista (Hanlon ym. 2000). Tämä tarkoittaa sellaista yhdistelmää, jossa jokaisesta komponentista voitaisiin mitata oma Raman-spektrinsä ja tämän jälkeen niistä tehtäisiin konsentraatiopainotettu lineaarinen kombinaatio. Näytteen kemiallinen koostumus voidaan selvittää käyttämällä ns. kemometrisiä kalibrointimalleja (Smith ja Dent 2005). Esimerkiksi vaarallisten komponenttien ja väärennösten identifiointi on myös mahdollista (Dégardina ym. 2011). Vähäisen näytteen esikäsittelyn vuoksi Raman-spektroskopia soveltuu myös ei-laboratorio-olosuhteissa tapahtuvaan näytteiden identifiointiin (Smith ja Dent 2005).

### **3.4. Spektri vs. molekyylin ominaisuudet Raman-spektroskopiassa**

Jotta Raman-sirontaa voisi tapahtua, molekyylin tiettyyn värähtelytilaan liittyvässä elektronisessa polaroituvuudessa täytyy tapahtua muutos (Colthup ym. 1990). Polaroituvuus voidaan ajatella myös molekyylin elektronipilven elastisuuden määritelmänä eli elektronipilven aiheuttaman varausjakauman herkkyytenä muodostaa dipolisoitumista. Voimakkaat polaroituvuuden muutokset ja näin ollen vahva Raman-sironta liittyvät molekyyliin, joilla on enemmän vapaasti liikkumaan kykeneviä elektroneja rakenteissaan. Aromaattiset konjugoituneita kaksoissidoksia sisältävät molekyylit ovat selkeä esimerkki tästä. Kun kaikki saatavilla oleva informaatio näytteen alkuperään liittyen on saatu kerättyä sekä mahdolliset mittauksista ja saatavista spektreistä muuttavat ongelmatunnistettua, voidaan aloittaa spektrien tulkinta.

Raman-spektrien tulkinta on usein moniulotteinen tehtävä. Esimerkiksi biologisille molekyyleille on mahdollista tehdä resonanssi-Raman-spektroskopian avulla määrittämiä (Warshel 1977). Näitä voivat olla 0-kertaluvun tapahtumat, joissa voidaan pyrkiä määrittämään substraattien sitoutumista aktiivisiin kohtiinsa ja näin ollen molekyyleissä tapahtuvia konformaatiomuutoksia. Tiettyjä pääsääntöjä on kuitenkin olemassa ja ne helpottavat johtopäätösten tekemistä näytteen sisältämistä molekyylirakenteista.

Spektrin ulkoasu kertoo melko paljon; mikäli näytteen fysikaalis-kemiallisesta luonteesta on edes alustavaa tietoa, voidaan spektrin muodosta, piikkien leveydestä ja terävyydestä saada ensikäden tietoa (Smith ja Dent 2005). Myös spektrin tausta on erittäin tärkeä tarkastelun kohde. Spektrin piikit voivat olla vahvan, kumpumaisen taustan päällä lyhyinä kohoumina tai toisaalta tausta voi olla täysin tasainen (x-akselin suuntainen) ja piikit erottuvat selvästi pystysuunnassa. Pintapuolisen tarkastelun jälkeen on huomio kohdistettava Raman-spektrin piikkien sijaintiin ja leveyteen. Liitteen 3.4. Spektri vs. molekyylin ominaisuudet Raman-spektroskopiassa taulukoissa 1-5 on kuvattu tärkeitä spektrialueita Raman-spektreissä ja niihin liittyviä tulkintoja. Taulukot ovat yleisluontoisia, mutta suuntaantava siitä, millaisia tulkintoja Raman-spektrien pohjalta voidaan aineen rakenteesta tehdä. Jos mahdollista, taulukkoon on merkitty myös värähtelyjen vahvuudet värähtelyn lähteen perään merkinnöin H = heikko, K = kohtalainen, V = vahva.

Raman-spektroskopiaan liittyen on olemassa loputon määrä empiirisesti ja laskennallisesti määritettyjä taulukkoarvoja erilaisille rakenteille ja niitä vastaaville aaltolukualueille Raman-spektrissä. Niin ikään tietokoneella tehtävät laskennalliset menetelmät ja kirjastot ovat yleistyneet, vaikkakin Raman-spektroskopia on edelleen pienemmässä mittakaavassa kuin esimerkiksi IR-spektroskopian vastaavat apuvälineet. Tietokoneavusteinen spektritulkinta voidaan käytännössä jakaa kahteen päähaaraan: kirjastopohjaisiin hakuihin ja molekyylin rakenteeseen perustuviin apuvälineisiin. Ensin mainitut pohjautuvat esimerkiksi laitevalmistajien ja -toimittajien tietokantoihin, joissa on valmiita spektrejä ja joihin käyttäjä voi tallentaa omia tuloksiaan. Spektritulkinta perustuu spektrien vertailuun. Molekyylin

rakennetta hyödyntävissä menetelmissä voidaan käyttää esimerkiksi 3-ulotteiseen mallinnukseen ja rakenteeseen liittyviä visuaalisia apuohjelmia. Niiden haittana on kuitenkin rajoittuvuus tiettyihin molekyyliin ja Raman-spektrien vähäisyys. Toinen rakenteisiin perustuva lähestymistapa ovat laskennalliset menetelmät. Menetelmien pohjana on usein DFT-laskenta (engl. Density Functional Theory). Näitä laskentamalleja käytetään tietokoneilla tehtävään kvanttimekaaniseen mallinnukseen fysiikassa, kemiassa ja materiaalitieteissä (Jones ja Gunnarsson 1989). Tällä tavoin voidaan tutkia atomien ja molekyylien elektronirakenteita, pääosin perustilallaan. Vaikka DFT-laskenta on varsinkin nykyään hyvin kehittynyt menetelmä, siinä on edelleen myös hankaluutensa. Muun muassa molekyyllinsäiset interaktiot, varausten siirrosta aiheutuvat viritystilat ja siirtymätilojen tulkinta ovat puutteellisia. Laskennassa käytetään eräänlaisia "paketteja", joilla voidaan ennustaa molekyylin rakenteiden aiheuttamien värähtelyjen vastaavuus spektrissä. Toisin sanoen DFT-laskelmilla voidaan ennustaa spektriipiikkien sijaintia. Molekyyli koostuu usein monien (funktionaalisten)ryhmien muodostamana. DFT-laskennan 'paketit' ennustavat spektrivöiden sijaintia näiden ryhmien perusteella koko molekyyllille. Monissa yhteyksissä mallit ennustavat molekyylien spektrit hyvin lähelle empiiristä vastinettaan, mutta esimerkiksi kiteisille aineille ja liuoksille täytyy huomioida mahdollisuus spektriipiikkien ja  $\nu$ -alueiden siirtymiin molekyylienvälisten interaktioiden vuoksi (yleensä DFT-laskelmien oletuksena on yksimolekyylinen systeemi kaasumaisessa olotilassa).

Raman-spektrien tulkinassa eräänä tärkeänä kokonaisuutena on ryhmäfrekvenssien (engl. group frequencies) tunnistaminen, esimerkiksi molekyylin  $C=O$  - venytysvibraatiot (Shaw ja Mantsch 1999). Tällöin pienemmät siirtymät oletetussa vaihteluvälissä antavat yksityiskohtaista tietoa molekyylin rakenteesta sekä sen lähiympäristöstä. Tämä tarkoittaa käytännössä sitä, että aluksi tunnistetaan molekyylistä näitä 'varmoiksi' tiedettyjä värähtelyrakenteita. Seuraavaksi tutkitaan pieniä siirtymiä kyseisten rakenteiden spektrissä, esimerkiksi yhden  $C=O$  - ryhmän absorptio tapahtuu aaltoluvulla  $1700\text{ cm}^{-1}$  ja toisen samanlaisen ryhmän aaltoluvulla  $1770\text{ cm}^{-1}$ . Pystytään tekemään päätelmiä siitä,

millaisia rakenteita kyseisten C=O - ryhmien lähistöllä on ja toisaalta myös koko molekyylin rakennetta pystytään ennustamaan.

Kaikkiaan Raman-spektrien tulkinta on monimuotoista ja osin haastavaakin. Taulukoiduilla arvoilla, tietokoneavusteisilla laskentamenetelmillä sekä ainakin perustasoisella fysiikan ja kemian tuntemuksella Raman-spektrit antavat paljon tietoa tutkittavan näytteen rakenteista. On tärkeää huomata, että tulkintoja ei voi tehdä koskaan pelkästään arvaamalla funktionaalisten ryhmien perusteella ja/tai purkamalla molekyyli ainoastaan erillisiin osiin. Värähtelyjen laskennallinen määrittäminen jo pelkästään monomeerimuotoisten molekyylien osalta yhdessä puhtaassa kidemuodossaan (aineista voi esiintyä esimerkiksi polymorfeja I, II, III ... n, sekä amorfista muotoa jne.) on melko haastavaa. Edelleen, esimerkiksi liuoksissa kaikentyyppisten yhteisvärähtelyjen, liuotininteraktioiden jne. osalta pitää olla entistäkin enemmän tietoisena tulkintoja tehtäessä.

## **4 RAMAN-SPEKTROSKOPIAN SOVELLUSALUEET LÄÄKETUTKIMUKSESSA JA IHMISLÄÄKINNÄSSÄ SEKÄ BIOLOGISIA SOVELLUKSIA**

### **4.1 Raman lääkeainetutkimuksessa ja biologisia sovelluksia**

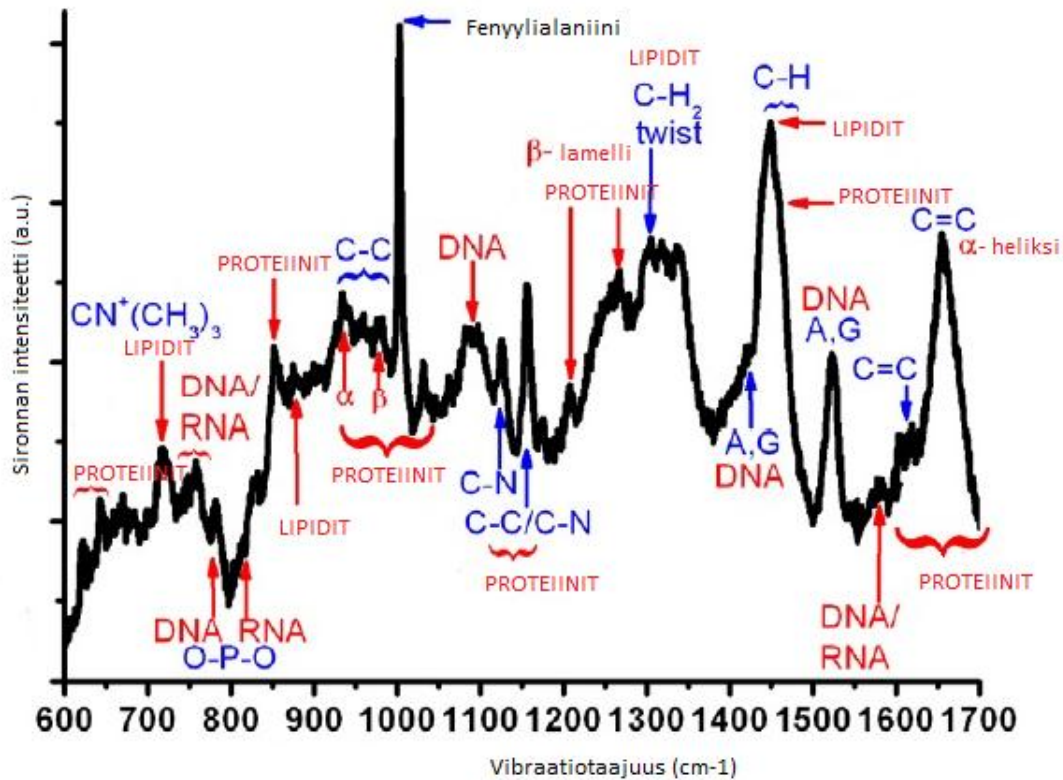
Lääkeaineet ja biologisesti merkitykselliset molekyylit muodostuvat erittäin laajasta ryhmästä hyvin erityyppisiä molekyylejä (Nelson ja Cox 2005). Suun kautta annosteltavat lääkeaineet ovat usein melko pieniä molekyylejä, kun puolestaan esimerkiksi injektioina annettavat suurimolekyyliset proteiinit voivat olla hyvinkin suuria. Biologisesti kiinnostavia ja myös spektroskopiassa paljon tutkittuja molekyylejä ovat proteiinit, lipidit, nukleiinihapot ja DNA sekä erilaiset hiilihydraatit. Näiden kategorioiden alle mahtuu niin ikään laaja joukko rakenteeltaan erilaisia ja erikokoisia aineita.

Suun kautta (esimerkiksi tabletteina) annosteltavia lääkeaineita määrittelemään on kehitetty melko suoraviivainen, mutta toimivaksi havaittu konsepti. Lipinskin 5 kohdan säännön (engl. Lipinski's Rule of Five) mukaan molekyyli voi olla

lääkkeenkaltainen molekyyli, jos sillä on  $\leq 500$  Da,  $\log P \leq 5$ , H-sidoksen (vetysidos) luovuttajia  $\leq 5$ , H-sidoksen vastaanottajia  $\leq 10$  (Lipinski ym. 1997). Nämä fysikaalis-kemialliset parametrit määrittelevät itse asiassa melko hyvin suuren osan (~ 90 %) niistä suun kautta annosteltavista lääkkeistä, jotka pääsevät lääkekehityksessä kliiniseen faasi II:n (Lipinski 2004). Kyseiset parametrit voidaan liittää riittävään vesiliukoisuuteen ja toisaalta suolen limakalvon läpäisyyn – tekijöitä, jotka ovat ratkaisevia suun kautta annosteltavien lääkkeiden biologisessa hyväksikäytettävyydessä. Seuraavassa on esitelty muutaman eri lääkeaineen Raman-spektrejä ja niiden tulkintaa. Tässä yhteydessä esitetään myös katsaus tärkeimpiin biologisiin molekyyliin ja niiden rakenteisiin perustuviin Raman-spektroskopiamäärittämiin.

Biologiset ja farmaseuttiset sovellusalueet ovat Raman-spektroskopiaan sopivia. Eräänä tärkeänä aspektina on mahdollisuus tutkia näytteitä *in situ*, eli 'paikallaan'. Biologisissa sovelluksissa esimerkiksi soluja voidaan tutkia ja farmaseuttisissa käyttökohteissa tablettien koostumusta voidaan arvioida. Raman-spektroskopian hyötynä on myös se, että mittauksia voidaan esimerkiksi tableteista tehdä läpipainopakkausten muovin läpi (Lyndgaard ym. 2013). Veden vähäinen sirontapotentialiaali puolestaan hyödyttää hyvin pitkälti vesipohjaisten biologisten näytteiden tutkimista (Li ym. 2010).

Useiden biologisissa sovelluksissa kiinnostavien molekyylien aiheuttamat Raman-siirtymät sijoittuvat aaltolukualueelle  $\sim 600 \text{ cm}^{-1} - 3000 \text{ cm}^{-1}$  (Downes ja Elfick 2010). Kuvassa 18 on eriteltyinä erilaisia biologisissa molekyyliissä esiintyviä rakenteita ja niiden Raman-spektreissä näkyviä Raman-siirtymiä.



**KUVA 18:** Biologisissa molekyyeissä esiintyviä rakenteita ja niiden Raman-siirtymiä (Mukailtuna Downes ja Elfick 2010).

Nykyään uusien lääkeaineiden kehittämisen tahti lääkevalmisteeksi asti on hidastunut, pääosin pitkän kehitysprosessin ja siitä seuranneiden suurten kustannusten vuoksi. Lääketeollisuutta kiinnostaakin tällä hetkellä jo löydettyjen lääkeaineiden valmistemuotojen parantaminen. Lääkeaineista esiintyy usein erityyppisiä polymorfisia muotoja, jotka saattavat poiketa suuresti fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan. Esimerkiksi tulehduskipulääke indometasiinin amorfinen muoto on liukoisuusominaisuuksiltaan useita kertaluokkia parempi kuin kiteiset muodot samasta aineesta (Lima ym. 2013). Näiden erilaisten polymorfisten muotojen kartoittaminen on Raman-spektroskopian tärkeää sovellusaluetta farmaseuttisissa tieteissä.

Biologisten molekyylien ja organismien tutkimusta on tehty melko paljon Raman-spektroskopiaa hyödyntäen. Esimerkiksi bakteerien identifiointia voidaan suorittaa vibraatiotilojen muutoksiin perustuvien tekniikoiden avulla (Efrima ja Zeiri 2009). Näistä käytetyimmät ovat IR-spektroskopia ja Raman, joista IR-spektroskopian

käytännöllisyys tosin kärsii biologisten näytteiden korkeasta vesipitoisuudesta. Raman-spektroskopiaa käytettäessä tätä ongelmaa ei useinkaan ole, mutta esimerkiksi solututkimuksissa voimakas fluoresenssi ja Raman-sironnan tuottama heikko signaali ovat puolestaan määrittysten häirtä. Fluoresenssisuppressiota on kuitenkin hyvin onnistuneesti pystytty tekemään erilaisin detektoriratkaisuin (Kostamovaara ym. 2013) ja hyödyntämällä toista hyväksi todettua tekniikkaa, Kerr-portitusta (engl. Kerr gating system) (Knorr ym. 2010). Kerr-portituksessa hyödynnetään Raman-sironnan ja fluoresenssin aikaeroa. Suurin osa Raman-sironnasta tapahtuu paljon aikaisemmin kuin fluoresenssi. Käyttämällä kahden laser-säteen eriaikaista toimintaa, dielektrisiltä ominaisuuksiltaan sopivaa Kerr-liuosta (yleensä CS<sub>2</sub>) ja polarisaattoreita detektorille saadaan eroteltua Raman-signaali fluoresenssin joukosta.

#### **4.1.1. Pienmolekyyliset lääkeaineet**

Pienimolekyylisistä oraalista lääkeaineista on tehty lukuisia erityyppisiä määrittämiä Raman-spektroskopiaa käyttäen. Farmaseuttisessa teollisuudessa käytettyjä määrittämiä ovat muun muassa tuntemattomien näytteiden analyysit, sisään tuotavien raaka-aineiden tunnistus, lopullisen tuotteen laadunvalvonta, kvantitatiiviset määrittäykset ja erilaisten polymorfisten muotojen tunnistaminen (Vankeirsbilck ym. 2002).

Lääkeaineiden polymorfinen käyttäytyminen on keskeinen osa lääketeollisuutta. Samalla lääkeainemolekyylillä voi esiintyä useita eri polymorfisia muotoja riippuen siitä, millä tavoin molekyylit järjestäytyvät keskenään esimerkiksi kiteytymisprosessissa (Nolasco ym. 2006). Prosessianalyysin alku-, keski- ja loppuvaiheen määrittäysten ohella Raman-spektroskopia on hyödyllinen tutkimusväline myös lääkekehityksessä. Tämä koskee etenkin lääkekehityksen alkuvaihetta, jolloin tutkittavia molekyylejä voi olla erittäin pieniä määriä saatavilla (Vankeirsbilck ym. 2002).



Lääkemolekyylien koko vibraatiospektrin tuntemus avaa mahdollisuuksia parantaa olemassa olevien molekyylien farmakokineettisiä ja –dynaamisia ominaisuuksia. Siitä voi olla suurta apua myös esimerkiksi lääkevalmisteiden formulaatiokehitykseen tai olemassa olevien lääkeaineiden jatkosynteesiin esimerkiksi paremman vasteen elimistössä tuottaviksi lääkkeiksi. Kofeiinin on tunnettu keskushermostoa, sydämen toimintaa ja hengityselimistöä stimuloiva aine. Teofylliini on puolestaan elimistön tahdosta riippumattoman, sileän lihaskudoksen relaksantti ja keuhkoputkia laajentava lääke, jota käytetään muun muassa astman tukihoidossa. Molemmat aiheuttavat myös diureesia. Molemmilla esiintyy polymorfiaa. Tämä saa aikaan erilaisia liukoisuusprofileja, mikä vaikuttaa muun muassa suun kautta otettaessa biologiseen hyötyosuuteen. Edelleen, molemmat myös kiteytyvät olosuhteista riippuen joko kidevedelliseen tai kidevedettömään muotoon (Nolasco ym. 2006). Seuraavassa kuvataan esimerkkinä pääpiirteittäin teofylliinin vibraatiospektrin laskennallisen määrittämisen pääkohtia. Tähän liittyvät myös hyvin kiinteästi kokeelliset määrittäykset. Usein tietokoneavusteisen mallinnuksen avulla saadaan tehtyä hyvin tarkkoja estimaatteja luonnonilmiöistä, esimerkiksi kofeiinin ja teofylliinin molekyylienvälisistä interaktioista sekä erilaisen kiteytymiskäyttäytymisen mahdollisista vaikutuksista aineiden vibraatiospektriin. Mallinnuksen jälkeen suoritetaan käytännön mittauksia, verrataan tuloksia ja tarkennetaan mahdollisesti mallia. Koko vibraatiospektrin määrittäykset ovat edelleen ongelmallisia jopa yksittäisille molekyyille, etenkin, jos rakenne on mutkikas. Tilanne moninkertaistuu, mikäli laskelmia yritetään tehdä saman aineen useampimolekyyllisille systeemeille, joissa molekyylien keskinäiset interaktiot vaikuttavat välittömästi myös vibraatiospektriin. Kokeellisten ja laskennallisten piikkien sijainneissa voi olla jopa  $35 \text{ cm}^{-1}$  eroja. Mallit ovat kuitenkin osoittautuneet monissa yhteyksissä käyttökelpoisiksi, esimerkiksi aiemmin kuvatut tiheysfunktio-laskelmat (engl. DFT methods) ovat usein käytettyjä.

Teofylliinin kidevedettömälle ja kidevedelliselle (anhydraatille ja hydraatille) on olemassa kiteiset muodot (Nolasco ym. 2006). Teofylliini on hyvä esimerkkiaine, jolla voidaan demonstroida tietokoneavusteisen metodologian soveltamista. Käytännössä siis tehdään tietokoneella laskelmia / ennustuksia aineiden koko

vibraatiospektristä, eli FTIR- ja FT-Raman-spektristä. Tietokonelaskelmat perustuvat usein siihen, että kiteinen muoto 'puretaan' yksittäisiksi molekyyleiksi ja ryhdytään mallittamaan tilannetta ikään kuin takaperin. Ensin etsitään mahdolliset molekyylienväliset todennäköiset ja vahvimmat vuorovaikutuskohdat (tärkeimpänä vetysidokset). Kyseiset paikat ovat myös todennäköisimpiä ja vahvimpia ehdokkaita vibraatiospektrissä näkyville siirtymille molekyylienvälisten vuorovaikutusten tapahtuessa. Tämän jälkeen lasketaan niiden avulla kaksimolekyyliselle systeemille mahdolliset aaltoluvut, jolloin laskelmissa tulee huomioiduksi ja arvioiduksi aaltolukujen siirtymiset (kahden) molekyylin interaktioista johtuen. Lopuksi laajennetaan laskelmia edelleen koskemaan kokonaista kiderakennetta, joka on siis tällaisten kuvattujen rakenteiden muodostama suurempi verkosto. Laskelmissa täytyy huomioida edelleen se, että käsittely siirtyy kaksimolekyylisestä systeemistä useampimolekyyliseen systeemiin. Kaikkiaan tällaiset tietokoneavusteiset FTIR-FT-Raman-spektrien estimaatit voivat perustua taajuuksien ja intensiteettien käyttöön täysin optimoiduissa geometrisissa rakenteissa niin kutsutulla B3LYP/6-31G\*-tasolla. Estimaattilaskelmiin erittäin käyttökelpoisiksi menetelmiksi ovat osoittautuneet DFT-laskelmat, joiden eräästä alalajista B3LYP/6-31G\*-taso on esimerkkinä.

Tietoa monomeerimuotoisten molekyylien vibraatiospektreistä voidaan hyödyntää eri tavoin. Ennustetut ja kokeellisesti todetut spektrialueiden ja piikkien paikat voidaan laajentaa edelleen useampimolekyylisiin systeemeihin (laskentatehon rajoissa kuitenkin toistaiseksi) ja arvioida myös mallien avulla esimerkiksi lääkemolekyylien ja liuotinmolekyylien interaktioita. Esimerkiksi teofylliinillä ja kofeiinilla esiintyy pelkästään monomeerimuodoissaan erilaista vibraatioliikettä rakenteidensa erilaisuuden vuoksi. Edelleen, kun molekyylit järjestäytyvät useamolekyylisiksi systeemeiksi, esimerkiksi kiteiksi, niiden karakteristisiin vibraatiospektreihin voi tulla useitakin muutoksia (Nolasco ym. 2006). Muutokset voivat johtua molekyyleissä sijaitsevien potentiaalisten vetysidoskohtien määrästä ja järjestäytymisestä, molekyylien keskinäisestä järjestäytymisestä sekä erilaisista polymorfisista muodoista. Molekyylienväliset vuorovaikutukset näkyvät usein

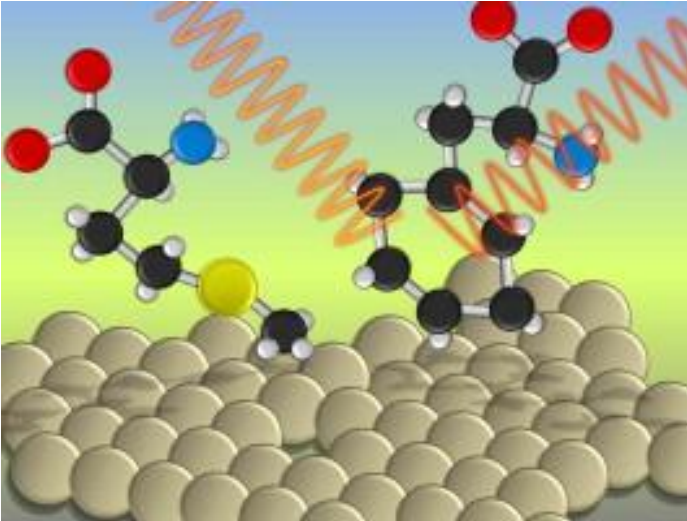
vibraatiospektreissä piikkien siirtyminä sekä niiden muotojen, intensiteettien ja pinta-alojen muutoksina.

#### 4.1.2. Peptidit, proteiinit ja vasta-aineet

Peptidit, proteiinit ja vasta-aineet ovat monella tavalla kiinnostavia rakenteita lääkeainekehityksen ja -tutkimuksen kannalta. Melko suurikokoisina molekyyleinä niiden tutkimukseen liittyy haasteita ja toisaalta etuja. Haasteet liittyvät muun muassa molekyylien kompleksisuuteen, varsinkin laskennallisia arvioita tehtäessä. Lisäksi esimerkiksi proteiinilääkkeiden stabiilisuus voi aiheuttaa ongelmia Ramanmittauksissa (Garfinkel ja Edsall 1958). Garfinkel ja Edsall määrittivät aminohappojen, peptidien ja lysotsyymien Raman-spektrejä. He tekivät alustavia arvioita spektreissä näkyvien tunnusomaisten alueiden ja piikkien sijainneista sekä tutkimiensa aineiden rakenteista. Nykyään aminohappojen ja niistä koostuvien peptidien sekä proteiinien rakenteet ovat melko hyvin tunnettuja. Vibraatiospektristä saatava informaatio voi antaa nopeasti kattavaa tietoa esimerkiksi entsyymien toiminnasta ja konformaatiomuutoksista substraattisitoutumisen yhteydessä (Lagant ym. 1984). Laskostumisella on proteiinien biologisen toiminnan kannalta monia merkittäviä vaikutuksia. Muutamien erilaisten peptidien  $\beta$ -laskostumista on määritetty laskennallisin ja kokeellisin metodein käyttäen Raman-spektroskopiaa kokeellisissa määrittämissä. Kun spektrien määrittäminen, värähtelyihin liittyvä fysiikan teoria ja tietokoneiden laskentateho ovat parantuneet, Raman-spektroskopian sovellukset biologiassa ja farmaseuttisilla aloilla ovat monipuolistuneet (Tuma 2005). Raman-spektroskopia on avannut uusia näkemyksiä liittyen proteiinien laskostumiseen, kokoonpanoon ja aggregaatioon. Entsyymi-substraatti-vuorovaikutussuhteiden ymmärrys on niin ikään laajentunut. Vasta-aineet ovat niin ikään proteiinirakenteita, jotka toimivat elimistössä muun muassa useissa immunologisissa tehtävissä. Vasta-aineita tuotetaan muun muassa rekombinanttitekniikan avulla ja niistä formuloitavat lääkevalmisteet ovat lähes poikkeuksetta injektioina käytettäviä lääkkeitä (Ashton ym. 2013).

Raman-spektroskopian soveltaminen peptidi- ja proteiinitutkimukseen noin kolmen vuosikymmenen ajan on keskittynyt ennen kaikkea spektrivöiden ja piikkien sijainnin määrittämiseen, ja sillä tavoin niiden rakenteiden ymmärtämiseen (Tuma 2005). Myös proteiinien sekundaarirakenteiden ja sivuketjujen Raman-spektriin liittyvien tunnusmerkkien löytämiseen on panostettu merkittävästi. Parantunut herkkyys on myös helpottanut alle mikromolaariluokan proteiiniliuospitoisuuksien detektiota ja ligandien sitoutumisen tutkimusta kiteisissä näytteissä. Perinteisesti Raman-spektroskopian soveltaminen proteiinimääryksiin on liittynyt proteiinien rakenteista löytyvien amidi-sidosten aiheuttamiin spektreihin ja niiden intensiteetteihin. Ne saavat alkunsa polypeptidirungon toisiinsa kytkeytyneistä värähtelymoodeista ja antavat ennen kaikkea tietoa proteiinin sekundaarirakenteesta. Käytännön spektritulkinta on nojautunut leveämpien spektrialueiden 'purkamiseen' pienemmiksi osiksi ja osien vertaamista rakenteeltaan tunnettujen proteiinien kolmiulotteisiin referenssispektreihin.

SERS-spektroskopian avulla on tehty erilaisia aminohappo- ja pienpeptidimääryksiä (Brambilla ym. 2013). Tekniikka perustuu Raman-signaalin parantamiseen siten, että tutkittavia molekyyliä pyritään sitomaan nanomittakaavassa karhennetuille (ja aktiivisille) metallipinnoille, jolloin signaalin vahvistumiseen vaikuttaa fysikaaliset ja kemialliset tekijät. Fysikaaliset sisältävät vuorovaikutuksen pinnalle saapuvan ja siitä siroavan säteilyn sekä pinnan ominaisuuksiin liittyvän fysikaalisen tekijän välillä (engl. SPP = Surface Plasmon Polariton). Kemialliset puolestaan liittyvät varauksensiirtoilmiöön pinnalle applikoidun substraatin ja pinnan välillä. Etenkin signaali-kohinasuhteen paraneminen ja pientenkin pitoisuuksien määrittäminen (liuoksissa jopa mikromolaariluokka) ovat merkittäviä etuja. Kuva 19 osoittaa SERS-Raman-spektroskopian perusajatuksen. Kuvassa on harmaalla 'pohjalla' metallipinta, johon on kiinnittyneenä molekyyliä. Pinnalle saapuu ja siitä siroaa säteilyä.



**KUVA 19:** SERS-Raman-spektroskopiassa käytetään nanokarhennettuja metallipintoja pinnalle saapuvan, siihen applikoidun tutkittavan substraatin ja pinnalta siroavan säteilyn aiheuttaman signaalin parantamiseen (Brambilla ym. 2013).

Vasta-aineita on tutkittu myös hyödyntäen SERS-teknologiaa (Wang ym. 2013). On mahdollista käyttää esimerkiksi kulta-nanopartikkeleja tai nanosauvoja, jotka on päällystetty vasta-ainekappaleilla, ei-fluoresoivilla Raman-aktiivisilla värjäysaineilla ja passiivisilla proteiineilla (SERS-nanopartikkeleiksi). Suurimpana etuna menetelmässä on huomattavasti parantunut Raman-signaali. Muita etuja ovat muun muassa vasta-aineiden kontrolloitu paikalleen kiinnittäminen ja matala fluoresenssi. Kuvatulla immunologisella SERS-Raman-määrityksellä oli mahdollista tehdä toistettava määrittäminen kolmelle eri sytokiinille. Kliinisessä ja diagnostisessa käytössä tällä tavoin voidaan detektoida aikaisessa vaiheessa sairauksien etenemiseen liittyviä tekijöitä, jotka kuvaavat tilan kehittymistä (engl. biomarkers), Myös kvantitatiiviset määritykset ovat täysin mahdollisia esitetyin menetelmin. Ne perustuvat vahvojen ja tunnistettavien Raman-spektrin piikkien sijainteihin ja intensiteetteihin kunkin tutkitun vasta-aineen osalta.

Rekombinantititeknikoilla tuotetaan monentyyppisiä vasta-aineita nisäkässolujen avulla lääkinälliseen käyttöön (Ashton ym. 2013). Prosessianalytiikassa (engl. PAT = Process Analytical Technology) on jatkuva kysyntä vakaille, toistettaville ja luotettaville menetelmille muun muassa soluviljelmien avainkomponenttien

analysoimiseksi. Ashton tutkimusryhmineen määrittä tarkkoja biologisia kontrolleja ja huolellisesti valittuja kemometrisiä menetelmiä käyttäen nisäkässoluviljelmien nestekoostumusta ja vasta-aine konsentraatioita. Mittauksissa käytettiin UV-resonanssi-Raman-spektroskopiaa (engl. UVRR = Ultra Violet Resonance Raman). UV-tekniikan etuna on lyhyen aallonpituuden (180 nm – 260 nm) käytöstä saatava resonanssi-Raman-ilmiö, joka vahvistaa Raman-signaalia  $10^3$  –  $10^5$  – kertaisesti tavalliseen, näkyvän valon aallonpituusalueella operoivaan Raman-spektrometriin nähden. Toinen etu on vähäinen fluoresenssitausta. Resonanssi-Raman-ilmiössä signaali vahvistuu, jos heräte-laserin energia on kromoforien molekulaarisilla absorptioalueilla. Toisaalta, 244 nm herätteellä molekyylin aromaattiset ryhmät saadaan värähtelemään. Menetelmän hyötynä on näin ollen selektiivisyys; valitsemalla sopivan aallonpituusalueen, kompleksisissa näytteissä voidaan tunnistaa tiettyjä yksittäisiä komponentteja. Esimerkiksi käyttämällä aallonpituutta 244 nm näytteen proteiinien ja nukleiinihappojen rakenteiden tuottamia signaaleja saadaan vahvistettua. Raman-spektroskopian voidaan todeta olevan erittäin potentiaalinen tekniikka soluviljelmien vasta-ainetuotannon, glukoosinkulutuksen ja maitohapon tuottamisen havainnointiin.

Usein Raman-spektroskopia voidaan yhdistää muihin tekniikoihin. Chu (1999) ryhmineen määrittä *Corynebacterium diphtheriae*-bakteerin Hmu O-proteiinin aktiivisen kohdan rakennetta. Kyseinen proteiini toimii entsyyminä, joka hajottaa hemoproteiineissa (esimerkiksi hemoglobiinissa) rautaa sitovaa hemimolekyyliä. Ihmisellä tämä tapahtuu luonnostaan hemioksygenaasi-entsyymin, joka on osin vastaava proteiini Hmu O:n kanssa, katalysoimana. Reaktiketjussa hemimolekyylistä tulee biliverdiiniä ja sen jälkeen bilirubiinia. *Corynebacterium diphtheriae*-bakteeri, kuten useat muutkin bakteerit, tarvitsevat rautaa elintoimintojensa yllä pitämiseen. Näin ollen bakteerin hmu O-geenin koodaama Hmu O-proteiini mahdollistaa raudan saannin isäntäeliön rakenteista. Tutkimusryhmä selvitti optista absorptiospektroskopiaa, resonanssi-Raman-spektroskopiaa, EPR:a (elektro-paramagneettinen resonanssi), ja NMR:a (engl. Nuclear Magnetic Resonance) käyttäen entsyymin aktiivisen kohdan rakennetta.

Entsyymeissä oli eroja ihmisen luonnollisen entsyymin ja bakteerien tuottaman entsyymin välillä.

#### 4.1.3. Lipidit ja hiilihydraatit

Lipiditutkimukset Raman-spektroskopiaa käyttäen perustuvat lipidimolekyylien rakenteiden värähtelyspektrien analysointiin, kuten muillakin molekyyileillä. Neutraaleille lipideille, fosfolipideille ja sfingolipideille on tehty Raman-määrittämiä Krafftin (2005) ja hänen työryhmänsä toimesta. Heräte-energiana käytettiin 785 nm toimivaa laseria. Esimerkiksi kolesterolille (neutraali) CH-sidosten muodonmuutokset ja C=C venytysvärähtelyt olivat spektreissä hyvin tunnistettavia. Muita tunnistusalueita olivat muun muassa esterisidosten ja glyserolin aiheuttamat värähtelyt. Fosfatidyylikoliinille (fosfolipidi) tunnistus perustui fosfaattiryhmän aiheuttamiin värähtelyihin, kuten muillakin fosfolipideillä. Sen lisäksi C=C-sidosten värähtelyt sekä symmetriset ja antisymmetriset koliiniryhmän venytysvärähtelyt olivat sopivia, Raman-spektrissä näkyviä värähtelyjä. Sfingomyeliini (sfingolipidi) koostuu keramidirungosta, johon on liittynyt fosfatidyylikoliinitähde. Fosfatidyylikoliinin tapaan koliiniryhmien värähtelyt näkyvät spektrissä  $718\text{ cm}^{-1}$  ja  $875\text{ cm}^{-1}$  alueilla. Tämän lisäksi tunnistettavin ero glyserofosfolipidirungon ja keramidirungon välillä näkyy Raman-spektrissä esterisidoksen aiheuttaman värähtelyn puuttumisena  $1740\text{ cm}^{-1}$  alueella ja sen korvautumisella amidin kaltaisen värähtelyn näkymisenä  $1672\text{ cm}^{-1}$  alueella. Tämän värähtelyn on arveltu johtuvan C=O venytyksen ja N-H – sidoksen taipumisen yhteenliittymisestä. Ihmisen ihon sarveiskerroksen kosteudella on hyvin selvä yhteys ihon pinnan suojaavan vaikutuksen ylläpidossa (Tfayli ym. 2013). Tässä tehtävässä tietyillä lipideillä, keramideilla, on ratkaiseva merkitys. Kolmea erilaista keramidia ja niiden kostuspitoisuutta tutkittiin Raman-spektroskopiaa hyödyntäen. Molekulaarisen tason yhteyksien löytäminen erilaisten elimistön toimintojen ja rakenteiden välille auttaa myös parantamaan hoitotehokkuutta useissa tapauksissa. Tässä tapauksessa saatiin uutta tietoa ihon keramidien kosteuspitoisuuden ja niiden

konformaation välisistä yhteyksistä. Tieto auttaa ymmärryksessä sarveiskerroksen suojaustehtävän toiminnasta ja mahdollisesti tuo uusia ihonhoitomahdollisuuksia.

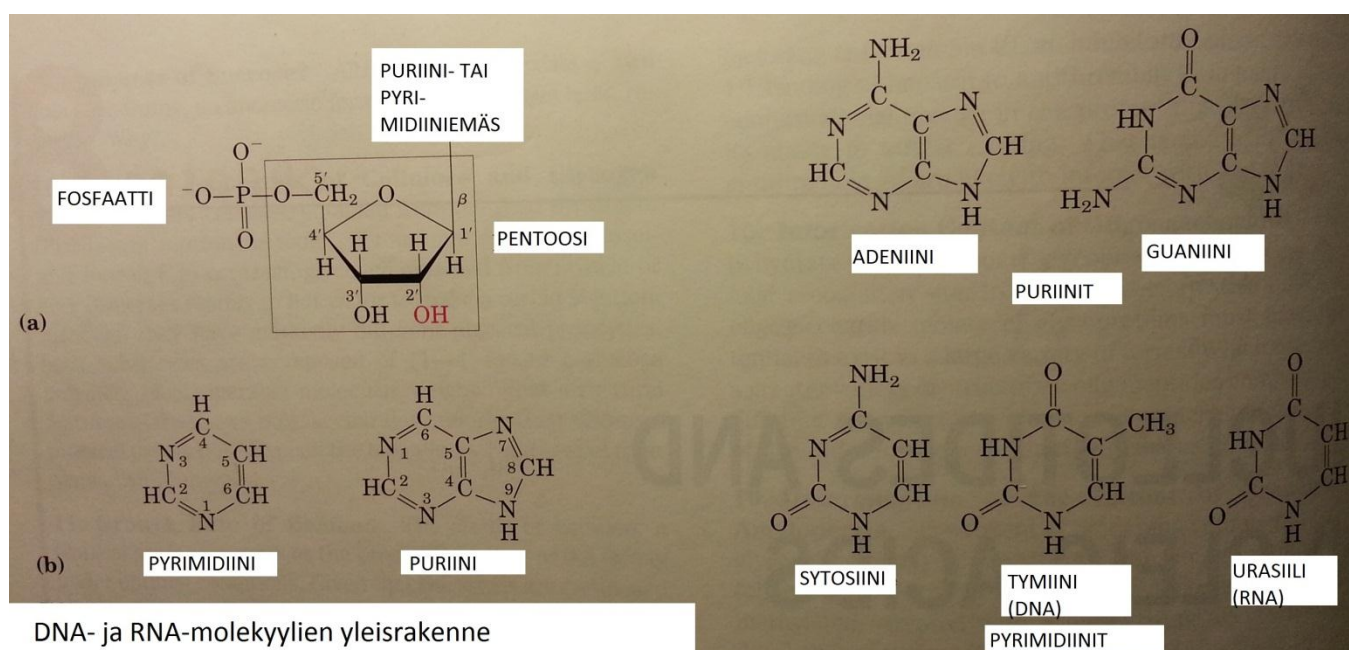
Hiilihydraattien määritykset Raman-spektroskopiaa käyttäen perustuvat muun muassa molekyylien CO- ja CC-sidosten värähtelyiden tutkimiseen (Zhbankov ym. 1997). Suurin osa hiilihydraateista koostuu nimensä mukaisesti hiili-, vety- ja happiatomeista. Esimerkiksi proteiineilla Raman-määritykset pohjautuvat aminohappojen koostumukseen ja paikkaan molekyyliessä. Hiilihydraatit voidaan puolestaan erottaa sen perusteella, miten molekyylien happi- ja vetyatomit sijaitsevat yksittäisten hiiliatomien läheisyydessä. Vaikeuksia toisaalta aiheuttaa nimenomaan vibraatiospektrin herkkyys steerisille tekijöille hiilihydraattien osalta. Tämä tarkoittaa muun muassa erityyppisten molekyylien sisäisten ja molekyylien välisten interaktioiden vaikutusta värähtelyspektreihin. Kvantitatiivinen glykomiikka käsittelee erilaisten hiilihydraattien laatua ja määrää proteiini- tai kudoksenäytteissä (Vangala ym. 2010). Muun muassa glykosylaation vaikutus proteiinisynteesiin on yhdistetty moniin fysiologisiin ja patologisiin tilanteisiin. Hiilihydraattien roolin ymmärrys on sairauksien mekanismien ymmärryksen ja biomarkkerien määrityksen kannalta oleellinen osa kliinistä diagnostiikkaa. SERS-tekniikka on äärimmäisen herkkä määritysmenetelmä monille biomolekyylielle, myös hiilihydraateille. Hiilihydraateista puuttuvat usein esimerkiksi proteiinien ja DNA:n Raman-määrityksiä helpottavat sisäiset kromoforit. Vangala työryhmineen tutki glukoosia, glukuronihappoa ja laktoosia SERS-signaalia parantavien leima-aineiden avulla. Rodamiinilla merkityt hiilihydraatit tuottivat erinomaista SERS-signaalia ja hyvin pieniä pitoisuuksia oli mahdollista havaita. Tästä saattaa olla apua esimerkiksi useita komponentteja sisältävien seosten hiilihydraattien kvantifiointia fluoresenssi- ja/tai Raman-spektroskopian avulla ja seuraavassa vaiheessa tunnistamista massaspektrometriaa käyttäen.

#### **4.1.4. Nukleiinihapot ja DNA**

Nukleotidi on nukleiinihappojen eli DNA:n ja RNA:n rakenneyksikkö (Nelson ja Cox 2005). Nukleotidiin kuuluu kolme osaa, emäs, sokeriosa sekä fosfaatti. DNA:n



sokeriosa on D-deoksiriboosi ja RNA:n D-riboosi. Emäsosa voi olla joko puriini- tai pyrimidiiniemäs. DNA:n emäsosia ovat guaniini, adeniini, sytosiini ja tymiini. RNA:n emäsosat ovat muuten samat, mutta tymiinin tilalla on urasiili. Nukleotidissa fosfaattiosa liittyy fosfodiesterisidoksella pentoosin viidennen hiilen hydroksyyliin, ja ensimmäiseen hiileen liittyy joko puriini- tai pyrimidiiniemäs. Nukleotidit puolestaan liittyvät toisiinsa siten, että toisen nukleotidin fosfaattiosa muodostaa sidoksen toisen nukleotidin pentoosin kolmanteen hiileen liittyneen hydroksyyliin kanssa. Alla olevassa kuvassa 20 on esitelty mainitut rakenneyksiköt sekä DNA- ja RNA-molekyylien yleinen rakenne.



**KUVA 20:** DNA- ja RNA-molekyylien rakenne. (Mukailtuna Nelson ja Cox 2005).

Raman-spektroskopian avulla tehtävissä DNA- ja RNA-tutkimuksissa on oleellista pystyä luotettavasti tunnistamaan nukleotiditähteiden vibraatiotilojen Raman-spektrissä näkyvät tunnusomaiset alueet (Benevides ym. 1993). Toiseksi, myös spektrissä näkyvien piikkien ja alueiden sijainnin ja intensiteetinvastaavuus nukleiinihapon kolmiulotteiseen sekvenssin kanssa on tarpeen tuntea. Tähän on olemassa muun muassa röntgen-kristallografian keinoin tehtyjä määrittämiä referenssiä (Benevides ym. 1988).

SERS-Raman-tekniikan avulla voidaan tutkia DNA:ta hyvin toistettavasti ja pieniäkin pitoisuuksia voidaan havaita (Gao ym. 2013). Gao ryhmään määrittä leima-

ainevapaalla SERS-Raman-tekniikalla DNA:n Raman-spektrejä. Myös kliiniseen käyttöön relevanttia menetelmää testattiin ja todettiin, että jopa  $\sim 10^{-8}$  M DNA pitoisuuksia saatiin määritettyä seeruminäytteestä. Menetelmässä lasilevyille applikoituun peptidi-nukleotidiketjuun liitettiin DNA:ta ja joko sellaisenaan tai kasvattamalla DNA-ketjua. Molemmilla tavoilla liitettiin hopea-ioneja ( $\text{Ag}^+$ ), pelkistettiin ne ja liitettiin pelkistyneeseen hopeaan R6G-SERS-reportterimolekyylejä. Ketjun kasvattaminen ja reportterin lisääminen paransivat signaalin intensiteettiä huomattavasti. DNA-pohjaiset nanomateriaalit, kuten tässä tapauksessa metalli-ionien ja DNA-ketjun avulla kootut ketjut, voivat olla tulevaisuudessa hyvin käyttökelpoisia esimerkiksi nanomittakaavan sovelluksissa ja biosensoreissa.

Lääkeaineiden sitoutumista DNA-molekyyleihin on niin ikään kartoitettu Raman-spektroskopiaa, röntgen-kristallografiaa ja IR-spektroskopiaa käyttäen (Benevides ym. 2008). Muun muassa 1950-luvulta lähtien karjan hoidossa käytetty bromoetaani on sitoutuu DNA:han ja voi muuttaa juosteiden järjestystä. Lääkettä ei ole suoraan luokiteltu mutageeniseksi, mutta etenkin sen aineenvaihduntatuotteet voivat olla mutageeneja. Edelleen, proflaviini ja 9-aminoakridiini ovat DNA:han sitoutuvia molekyylejä. Raman-määritykset perustuvat nukleiinihappojen emästen irtoamiseen ja ketjujen konformaatiomuutosten havainnointiin spektrien avulla.

#### **4.2 Lääkevalmisteiden fysikaalis-kemiallinen karakterisointi Raman-spektroskopiaa hyödyntäen ja sovellukset teollisuudessa**

Farmaseuttisen teollisuuden näkökannasta Raman-spektroskopia soveltuu hyvin myös valmiiden lääkevalmisteiden analysointiin. Vähäinen näytteen käsittelytarve ja mahdollisuus tehdä mittauksia myös pakkausmateriaalien läpi ovat etuja (Smith ja Dent 2005). Mikroskooppien ja kuituoptiikan yhdistäminen Raman-tekniikoihin laajentaa mahdollisuuksia. FT-Raman-tekniikkaa ja dispersiotekniikkaa käytetään, mutta dispersio-Raman on fluoresenssiongelma huolimatta selvästi käytetympää.

Teollisuuden laadunvalvonnassa *in situ* suoritettava laadunvalvonta, epäpuhtauksien tunnistaminen ja polymorfien tunnistaminen ovat muutamia

esimerkkejä, joissa Raman-spektroskopia tarjoaa nopeita ja suhteellisen vaivattomia analyysiratkaisuja (Smith ja Dent 2005). Lääkeaineseosten mittaukset, vaikuttavien lääkeaineiden ja apuaineiden määrien sekä laatujen mittaukset ovat mahdollisia Raman-spektroskopiaa hyödyntäen (Pitt ym. 2005). Myös eri aineiden jakaumia voidaan mitata. Kiteytymiseen, vettymiseen ja suhteelliseen kosteuteen liittyvät määritykset pystytään tekemään laadunvalvonnassa ja tuotannossa paikan päällä. Lisäksi mahdollisen kontaminaatioiden tunnistus Raman-spektroskopian avulla on hyvä sovelluskohde. Monilla farmaseuttisesti aktiivisilla molekyyliellä on  $\pi$ -elektroneja ja ne tuottavat vahvan Raman-sironnan, koska molekyyliessä tapahtuu helposti polaroitumista (Gordon ja McGoverin 2011). Toisaalta taas apuaineissa on usein  $\sigma$ -sitoutuneita elektroneja ja ne ovat heikosti Raman-sirontaa aiheuttavia aineita. Tätä eroa voidaan hyödyntää aktiivisten vaikuttavien aineiden tutkimuksissa.

Lääkevalmisteiden analyysit ja prosessikontrolli hyödyntämällä niin kutsuttua hyperspektrikuvantamista on etenkin lääketeollisuudessa suuren kiinnostuksen kohde (Sacré ym. 2014). Käyttämällä toisiaan täydentäviä vibraatiospektroskopiamenetelmiä (MIR, NIR, Raman) on mahdollista saada erittäin paljon informaatiota mitattavasta kohteesta. Tähän liittyy kuitenkin myös muutamia ongelmakohtia. Analyysia suoritettaessa on usein tarpeen ymmärtää aineiden rakenteisiin ja/tai tutkittavaan ilmiöön liittyvää kemiaa ja fysiikkaa sekä arvioida aina kuhunkin tilanteeseen sopivin spektroskopiatekniikka. Lisäksi suuri datamäärä aiheuttaa myös tarpeen tiedon käsittelylle ennen ja jälkeen mittausten. Valitsemalla tarkasti sopivimman yhdistelmän voidaan suorittaa luotettavasti esimerkiksi aineseosten komponenttien erotusta.

Lääketeollisuudessa esiintyy hyvin yleisesti tilanne, jossa valkoisen jauheen joukosta täytyisi erottaa muut, kemiallisesti erilaiset aineet, jotka ovat myös valkoisia jauheita. Ihmissilmälle tehtävä on käytännössä mahdoton. Kun vibraatiospektroskopiamenetelmiin yhdistetään mikroskoopitekniikat, kokojakaumista pystytään tekemään selkeitä, esimerkiksi näyttölaitteen ruudulla näkyviä kuvia (Sacré ym. 2014). Hyperspektrikuvantamisessa on kolme pääasiallista kuvanmuodostusmahdollisuutta. Parhaan menetelmän valinta riippuu valitusta

spektroskopiitekniikasta (joka puolestaan riippuu alkuperäisestä tutkittavasta ongelmasta). Käytetään pistekartoitusta (engl. line mapping), viivaskannausta (engl. line scanning) ja globaalia kuvantamista (engl. global imaging). Saadulle datalle suoritetaan yleensä esikäsitteilyä, esimerkiksi spektrin relevantin alueen valinta (engl. ROI = Region Of Interest), piikkien korjausta, taustan korjausta, normalisointia ja melun poistoa spektristä. Varsinainen datan käsittely voi koostua yksi- tai monimuuttuja-analyysistä. Raman- ja MIR-spektreissä on usein löydettävissä tutkittavalle aineelle ominaisia selkeitä ja teräviä piikkejä. Kemian kannalta tämä tarkoittaa, että vibraatiospektriä ei häiritse mahdolliset muut samassa näytteessä olevat komponentit. Tällöin yksimuuttuja-analyysit sopivat datan käsittelyyn. Usein (varsinkin biologisissa näytteissä) spektrit muodostuvat leveistä ja toisistaan erottumattomista alueista. Näytteessä on siinä tapauksessa kompleksinen matriisi, jossa on useita eri komponentteja. Näissä tilanteissa suoritetaan yleensä monimuuttuja-analyysejä. Kun sopiva data-analysointi on suoritettu ja halutut ominaisuudet selvitetty, suoritetaan vielä tiedon jälkikäsitteilyä. Lääkevalmisteille tehtäviä ja teollisuudessa suoritettavia analyysejä ovat muun muassa näytteen yhtenäisyyden tutkiminen (Sacré ym. 2014), erilaiset partikkelikokotutkimukset (Doub ym. 2007), vaikuttavien aineiden polymorfiatutkimukset (Furuyamaa ym. 2007) ja lääkevalmisteen koostumuksen yhtenäisyyden tutkimukset (Amigo ja Ravn 2009). Prosessianalyysiteknologiassa (engl. PAT = Process Analytical Technology) käytetään paljon konventionaalisia tekniikoita, kuten nestekromatografiaa. Valmistusprosessin yksityiskohtaiseen ymmärrykseen ja kontrollointiin nämä tekniikat eivät kuitenkaan aina sovi. Kemiallinen kuvantaminen onkin kasvattanut osuuttaan myös prosessianalytiikassa. Esimerkiksi erilaisia aggregaatiomekanismeja voidaan tutkia vibraatiospektroskopiaan perustuvia kemiallisia kuvantamismenetelmiä käyttäen (Kanoa ym. 2014).

### 4.3 Raman-spektroskopian hyödyntäminen solututkimuksissa ja biologisissa määrittämissä sekä permeaatiotutkimuksissa ja kineettisissä määrittämissä

Raman-menetelmien eräs suurimmista eduista on vettä sisältävien näytteen suhteellisen vaivaton analyysi. Suuressa osassa biologisia määrittämiä ja esimerkiksi *in vitro* tehtäviä solututkimuksia tapahtuu korkeassa vesipitoisuudessa. Tämä ei haittaa Raman-signaalia, ja näytteen analysointi helpottuu. Pääsääntöisesti polaariset ryhmät, kuten karbonyylit, amiinit ja amiinit ovat heikosti Raman-sirontaa aiheuttavia (Smith ja Dent 2005). Muun muassa S-S -, -SH -, -CN -, C=C – ryhmät sekä aromaattiset rengasrakenteet puolestaan antavat Raman-spektriin voimakkaan signaalin. Samoin esimerkiksi fosfaatit näkyvät hyvin spektreissä. Tällaisten rakenteiden avulla aineiden tunnistus ja erottaminen yleensä tapahtuu biologisissa tutkimuksissa. Esimerkiksi molekyylien runkorakenteen muutoksia pystytään havaitsemaan Raman-spektroskopian avulla, suorittamaan reseptorisitotumistutkimuksia sekä määrittämään kromoforeja sisältävien proteiinien rakenteita.

#### 4.3.1. Solututkimukset ja biologiset sovellukset

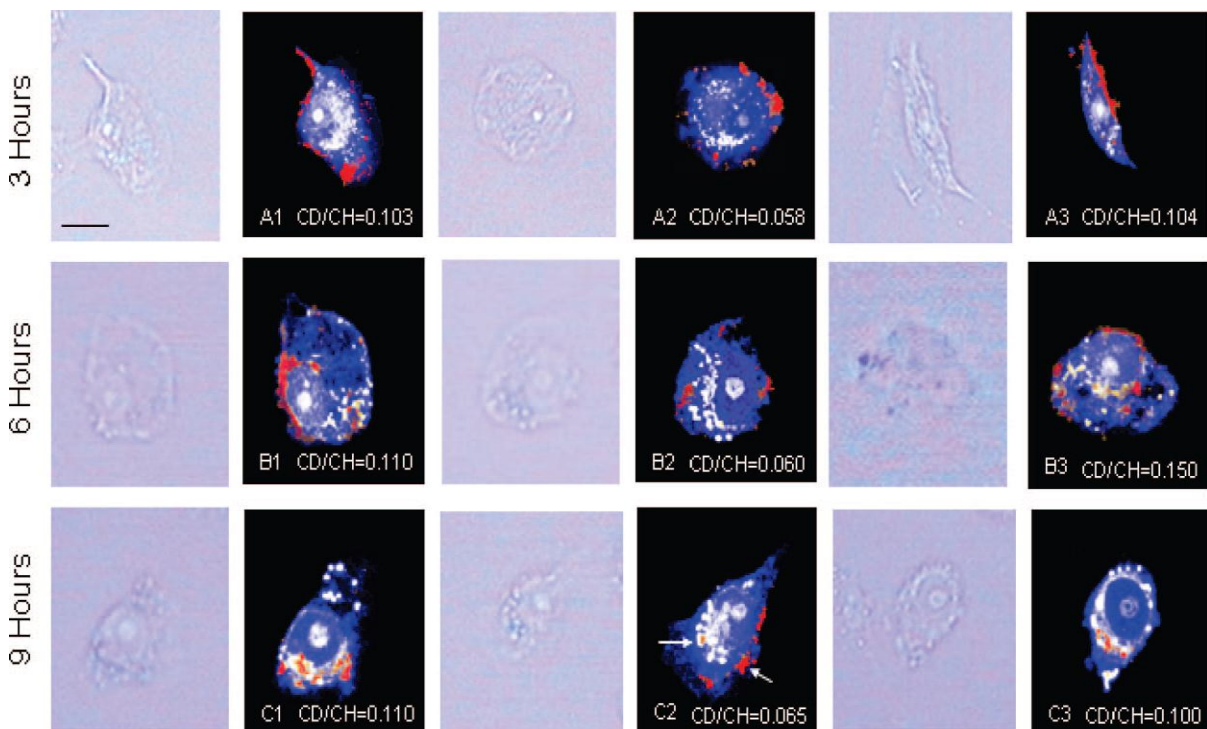
Solukokein *in vitro* tehtävät määrittämit ovat monissa lääkekehityksen prosesseissa keskeisessä asemassa. Solukokeilla voidaan tutkia esimerkiksi alkuvaiheen lääkekehityksessä lääkeaineen soveltuvuutta ihmislääkintään sekä lääkekandidaatin toksisuutta ja tehoa (McGivern ja Ebert 2014). Solumäärittämiä voidaan hyödyntää myös useissa muissa tutkimuskohteissa, kuten erityyppisten syöpäsolujen ekstrasellulaarimatriisin (engl. ECM = Extra Cellular Matrix) koostumusten ja muutosten tutkimuksissa (Seo ym. 2014). Myös esimerkiksi aineiden soluun ottoa voidaan kartoittaa. Maksan vierasainemetabolia tuottaa myös lääkeaineista yleensä erilaisia reaktiotuotteita, metaboliitteja. Niiden arvaamaton toksisuus elimistölle on erittäin keskeisessä osassa lääkeainetutkimusta. Yanoa (2014) ryhmineen esitteli laajan määrittämitmenetelmän, jossa *in vivo* – ja *in vitro* – kokein selvitettiin erilaisten biomarkkereiden avulla mahdollista maksan indusoimaa

lääkeainetoksisuutta. Menetelmässä tutkittiin 30 lääkeainetta ja in vitro – osuudessa käytettiin ihmisen leukemiasolua (muun muassa HL-60 ja K562) tutkittaessa valittujen biomarkkereiden määriä lääkeainealtistuksessa. Määrittämissä on lähes aina apumenetelminä erityyppisiä spektroskopia- ja kuvantamismenetelmiä.

Konfokaali Raman-mikroskopia on havaittu toimivaksi menetelmäksi tutkittaessa lääkeaineiden kulkeutumista erilaisten kalvorakenteiden läpi (Gotter ym. 2010). Mahdollisuus muodostaa spektridatasta relevantteja ja selkeästi vertailtavia kuvia hyödyntää tekniikan käyttöä. Pelkän spektridatan tulkinta on niin ikään mahdollista, mutta visuaalinen kartoitus havainnollistaa yleensä tilannetta paremmin. Tutkimuksissa on käytetty dodekanoli-kolloidimembraania (DDC) jäljittelemään ihmisen ihoa. Tutkimuksessa määritettiin psoriaasislääke ditranolin penetraatiota DDC-membraanin läpi. Konfokaalitekniikka mahdollistaa syvyysuuntaisen kuvantamisen, mutta sillä on myös rajoituksia, etenkin syvyysuuntaisen resoluution tarkkuudessa.

Lääkeaineiden kulku soluihin ja jakautuminen solujen sisätilaan on niin ikään kartoitettavissa konfokaalitekniikalla käyttäen Raman-mikroskopiaa. Liposomitutkimuksen kehittyessä liposomeja on hyödynnetty tutkittaessa solumembraanien läpäisyä. Liposomien kulkua solujen sisään voidaan parantaa muuttamalla niiden rakennetta esimerkiksi erilaisin peptidi-rakentein, kuten TAT-peptidin avulla (Matthäus ym. 2007). Tekniikkaa voidaan käyttää tutkittaessa paikalleen kiinnitettyjä soluja tai eläviä soluorganismeja. Deuteriumia voidaan usein käyttää tutkittaessa aineiden solukalvoläpäisyä ja pääsyä soluihin. Deuterium sitoutuu tutkittaviin aineisiin kovalenttisesti ja sen antamaa Raman-signaalia seuraamalla sekä kuvantamalla on mahdollista saada hyvin havainnollisia kuvia siitä, että aine on todellakin päässyt solun sisään. Kuvassa 21 näkyy MCF-7-solujen sisään diffundoitunut DCPC-d<sub>70</sub> – liposomi, joka on muokattu TAT-peptidillä paremmin kalvorakenteita läpäiseväksi. Kirkaskenttäkuvantamisella otetuissa kuvissa näkyy 9 solun sisäpuolelta tuleva liposomin signaali (punainen). Koejärjestelyssä voitiin käyttää 30 mW lasertehoa, millä pyrittiin välttämään laserin aiheuttamia vaurioita soluille. Kaiken kaikkiaan on raportoitu, että optisilla alustoilla olevia solunäytteitä tai kiinteänä soluviljelmänä kasvatettuja näytteitä voidaan

mitata 830 nm laser-herätteellä ja 100-150 mW teholla ilman vaaraa näytteen vaurioitumisesta (Maquelin ym. 2002). Useita hyvälaatuisia spektrejä on pyrittävä saamaan, kun konfokaalitekniikkaa käytetään esimerkiksi solujen tunnistuksessa. Näin biokemiallinen varianssi saadaan mahdollisimman luotettavasti selvitettyä. Myös taustasignaalia aiheuttavat tekijät, kuten optisen alustan aiheuttama sironna, veden aiheuttama sironna tai solumediumin aiheuttama sironna, on tarpeen saada spektreistä tunnistettua. Näin ollen tarpeettomat signaalit voidaan skaalata jonkin merkkiipiikin suhteen (esimerkiksi  $319\text{ cm}^{-1}$   $\text{CaF}_2$ :lla) ja vähentää kokonaissignaalista, jotta tarpeellinen informaatio pystytään erottamaan kokonaisuudesta.



**KUVA 21:** Liposomien kulku MCF-7-solujen sisään (Matthäus ym. 2007).

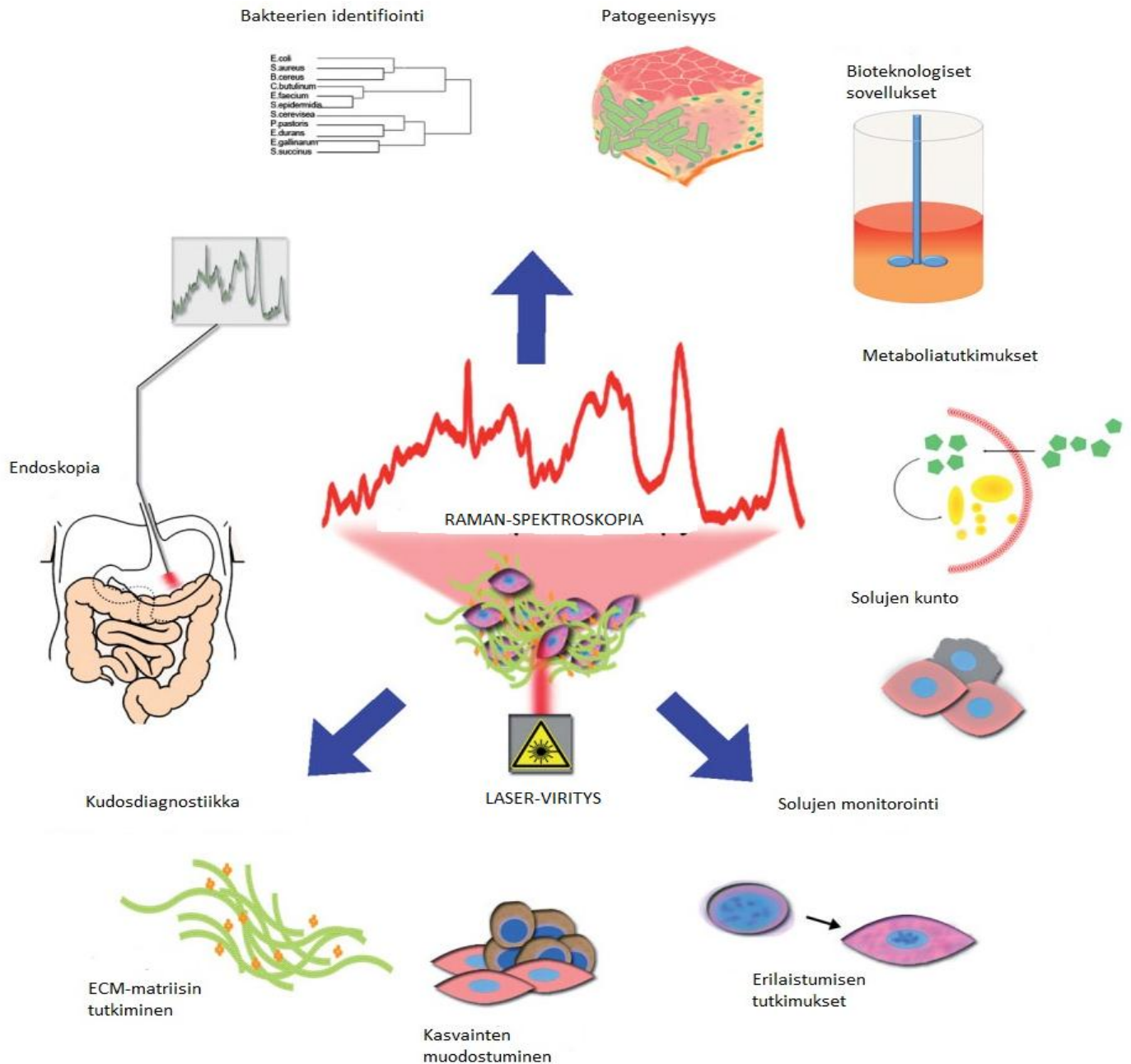
Mikro-organismien tunnistuksessa Raman-spektroskopia on leima-ainevapaana ja nopeana menetelmänä kelpollinen. Viidelle eri bakteerilajikkeelle kehitettiin tunnistamismenetelmä perustuen Raman-spektreihin (Maquelin ym. 2000). Menetelmä perustui vektorialgebraan, jonka avulla soluviljelymediumin vaikutus kokonaisspektriin saatiin poistettua. Muun muassa kliiniseen diagnostiikkaan Raman-menetelmien soveltamisen suurin haaste on ollut ja on edelleen

luotettavan, toistettavan standardisoidun menetelmän kehittäminen. Esitetty bakteeritunnistusmenetelmä toimi hyvin. Tutkimuksessa pystyttiin tunnistamaan 5 eri bakteerilajiketta toisistaan luotettavasti. Tulokset saatiin 6 tunnin ajan inkuboiduista viljelmistä. Käytännössä tämä tarkoittaa paljon perinteistä nopeampaa hoidon aloittamista verrattuna klinikoiden 2-3 päivää kestäviin työläisiin viljelymenetelmiin. Tutkimuksen vektorimenetelmässä käytettiin fluoresenssin vähentämiseksi aluksi spektrien ensimmäistä derivaattaa. Sen jälkeen bakteeriviljelämä + medium ajateltiin  $n$  datapisteestä koostuvaksi vektoriksi  $n$ -ulotteisessa avaruudessa. Samoin tehtiin pelkän mediumin spektrille, sitä käsiteltiin myös  $n$  datapisteestä koostuvaksi vektoriksi  $n$ -ulotteisessa avaruudessa. Tämän jälkeen viljelämä + medium – vektori jaettiin kahteen komponenttiin. Toinen oli medium-vektorin kanssa samansuuntainen, toinen pystysuorassa medium-vektoria kohden. Sopivilla vektorialgebran vähennyslaskuilla oli mahdollista saada erotettua mediumin aiheuttama signaali kokonaissignaalista. Mikrobiologisten näytteiden yhteydessä pitää aina huomioida näytteen vesipitoisuus ja ympäristön aiheuttama kosteus. Näin ollen toimittiin kuvatulla vektorimenetelmällä myös veden suhteen, jotta vesipitoisuuden vaikutus saatiin erotettua lopuksi analysoitavasta, pelkästä bakteeriviljelmän aiheuttamasta spektristä.

Raman-SERS-spektroskopiaa käyttämällä voidaan suorittaa molekyyli-tason kuvantamista tutkittaessa esimerkiksi DNA-synteesiä solujen sisäpuolella (Palonpon ym. 2013). Menetelmä perustuu tietyn, vahvan Raman-signaalin tuottavan molekyylin havainnointiin ja kuvantamiseen. Etuna on myös suhteellisen nopea koejärjestelyn kokoonpano. Mikäli tarvittava tekniikka, soluviljelmät ja ohjelmat ovat saatavilla, protokolla voidaan toteuttaa noin 8 tunnissa. Niin ikään monia komponentteja sisältävien soluviljelymediumien koostumusmäärityksiä voidaan suorittaa perustuen Raman-spektrien informaatioon (Li ym. 2010). Eri komponenttien osuudet mediumissa saadaan selville kemometrinen analyysin avulla. Nämä analyysit liittävät kemiallisen systeemin tai prosessin mittausdatan kohteen todelliseen tilaan. Kemometriassa hyödynnetään matematiikkaa, tilastotiedettä, tietotekniikkaa ja informatiikkaa yhdistettynä. Raman-spektrien intensiteetit ovat lineaarisia kombinaatioita esimerkiksi liuoskomponenttien



yksittäisistä konsentraatioista, joten useimmiten on myös tärkeää saada erotelluksi, mikä osa spektristä kuuluu millekin komponentille tai ainakin tunnistettua, mikä spektrin osa kuvaa varmasti tiettyä komponenttia. Erottelu tehdään usein PCA- ja SIMCA-analyysien (engl. SIMCA = Soft Independent Modelling of Class Analogy) avulla. PCA-analyysi on käyttökelpoinen menetelmä kuvaamaan systeemistä mitatun datan varianssin aiheuttajia. Se ei kuitenkaan sovellu erityisen hyvin datan luokitteluun. Näin ollen käytetäänkin usein SIMCA-analyysiä, joka on eräänlainen sovellus PCA-analyysistä. Se soveltuu paremmin datan luokitteluun. Esimerkiksi solumediumin koostumuksen selvittäminen komponentti kerrallaan on tällaiselle analyysille erittäin hyvä sovelluskohde. Käytännössä solumediumin koostumuksen tuntemus parantaa soluviljelymenetelmiä ja mahdollisuuksia optimoida kasvatusmedium parhaaksi mahdolliseksi käytössä olevalle solulinjalle. Kuvassa 22 on yhteenvetona erityyppisiä mahdollisuuksia Raman-spektroskopian hyödyntämiselle solututkimuksessa ja biologisten määritysten yhteydessä.

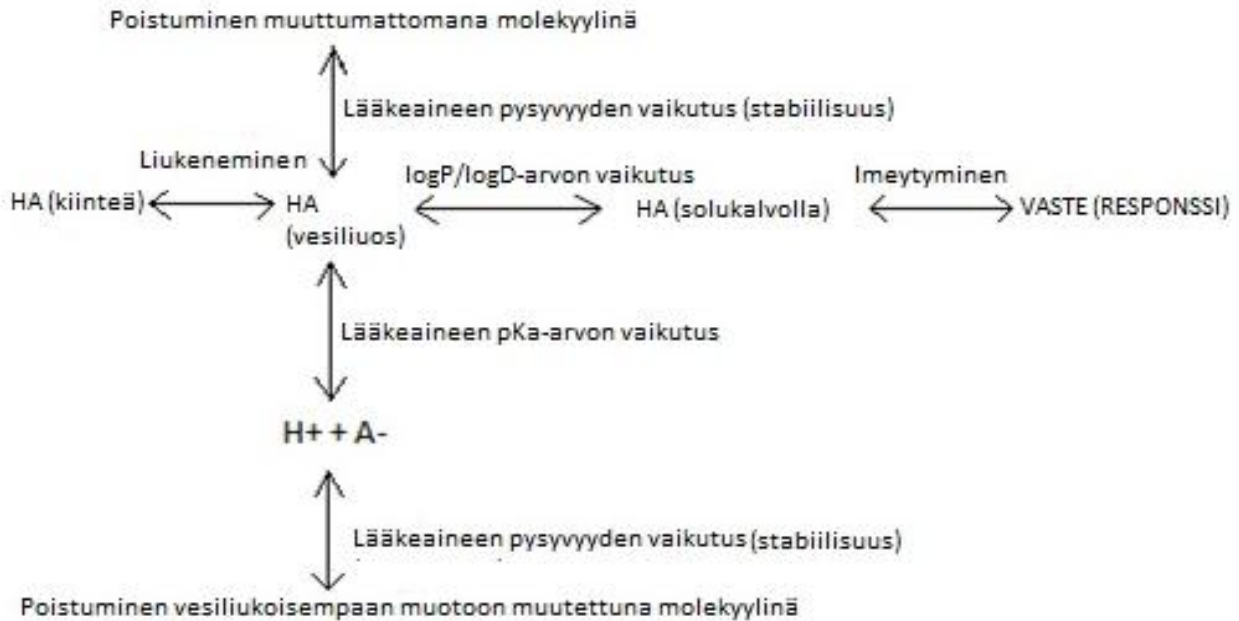


**KUVA 22:** Raman-spektroskopia solumääriyksissä ja biologisissa määriyksissä (Mukailtuna: Brauchle ja Schenke-Layland 2013).

#### 4.3.2. Permeaatiotutkimukset ja kineettiset määriykset

Suun kautta tapahtuva lääkeannostelu on lääkkeen käyttäjälle miellyttävin lääkkeen annostelumuoto. On arvioitu, että jopa 90 % lääkevalmisteista on oraalisia valmisteita (Pavurala ja Achenie 2013). Potilaiden hyvä hoitomyöntyvyys

ja taloudellinen hyödyllisyys lääketeollisuuden kannalta ovat tehneet suun kautta annosteltavista lääkkeistä tärkeimmän lääkevalmisteryhmän. Tuotannon teknologian kehityksen ansiosta suun kautta annosteltavia lääkevalmisteita voidaan tuottaa nopeasti suuria määriä ja tuotantoerien laatu pysyy jatkuvasti korkeana. Ruoansulatuskanava tarjoaa suuren imeytymispinta-alan ja arviolta kolmannes sydämen pumppaamasta verivolyymistä kulkee ruoansulatuskanavan elimien kautta joka hetki. Näistä hyödyistä huolimatta oraalinen antoreitti on myös eräs haastavimmista mahdollisista; lääkeaineiden farmakokineettiset ominaisuudet sekä antoreitin fysiologian vaihtelevuuden (muun muassa suoliston pH:n vaihtelut eri kohdissa suolistoa ja yksilölliset eroavuudet) huomiointi ovat jatkuvia kehityskohteita lääkesuunnittelussa. Suun kautta tapahtuvan lääkeannostelun monimuotoisuutta kuvaa alla oleva kuva 23. Kuvassa on karkeasti eriteltynä eri prosessit, jotka ohjaavat ja vaikuttavat esimerkiksi tablettimuotoisen lääkevalmisteen (HA) kulkua. Prosessi käynnistyy valmisteen hajoamisella ja liukenemisella ruoansulatuskanavan nesteisiin ja jatkuu vaiheisiin, joissa solukalvojen lipidirakenteista läpi pääsevä molekyylimuodossaan (neutraalina) oleva lääkemolekyylä kulkeutuu vaikutuskohteeseensa. Toisaalta samanaikaisesti molekyylä poistuu elimistöstä erilaisten metabolia- ja eritystapahtumien kautta. Prosessikuvassa eräs tärkeimmistä vaiheista on se, että ainoastaan molekyylimuotoinen (HA) lääkeaine voi käytännössä kulkeutua passiivisen diffuusion kautta solukalvorakenteiden läpi. Prosessi ei kuluta energiaa. Muita kulkeutumismuotoja ovat fasilitoitunut diffuusio (helpottaa myös hydrofiilisten ja varautuneiden molekyyliden kalvonläpäisyä, mutta ei tapahdu konsentraatiogradienttia vastaan), aktiivinen kuljetus (helpottaa hydrofiilisten ja varautuneiden molekyyliden kulkua, vaatii energiaa, voi tapahtua myös konsentraatiogradienttia vastaan) sekä endosytoosi (vaatii energiaa, hidas, yleensä suurikokoisille molekyyleille, kuten peptideille sopiva). Lisäksi kuvatussa prosessissa on tarpeen huomioida, että vaihetta HA (kiinteä)  $\leftrightarrow$  HA (vesiliuos) kuvaa formulaation dissoluutio eli hajoaminen esim. aggregaateiksi (dissoluutio) JA liukoisuus eli siirtyminen formulaatiosta liuostilaan joko neutraalina (HA) tai ionittuneena ( $H^+ + A^-$ ) lääkeaineena (lääkeaineen liukoisuus). Selkeyden vuoksi yllä olevassa on tämä esitetty 'yhdistettynä' tapahtumana termin 'liukeminen' alle.



**KUVA 23:** Formulaation ja yhdisteen liikkeet elimistössä kaavakuvana.

Iho on ihmisen monikerroksinen kudokse, joka suojaa ulkopuolisilta biologisilta, kemiallisilta ja fysikaalisilta tekijöiltä. Toisaalta ihoa voidaan käyttää myös esimerkiksi lääkkeiden annostelussa. Lääkevalmiste voidaan formuloida siten, että vaikuttavana aineena toimiva lääkemolekyyli imeytyy ihon pinnan kautta elimistöön. Imeytyminen voi tapahtua haluttuun ihokerrokseen tai keskusverenkiertoon asti. Valmiste voidaan suunnitella siten, että lääkeainetta vapautuu viivästetysti (esimerkiksi lääkelaastrarit, jotka vaihdetaan kerran vuorokaudessa tai harvemmin) tai mahdollisimman nopeasti (esimerkiksi erityyppiset rasvat ja pastat). Ihon kautta tapahtuva lääkeannostelu on suhteellisen hidas reitti verrattuna suun kautta tapahtuvaan annosteluun, mutta etuna on esimerkiksi maksan ensikierron metabolian välttäminen (Tfayli ym. 2007). Maksassa tapahtuva lääkeaineen metabolia rajoittaa huomattavasti monien suun kautta annosteltavien lääkkeiden tehoa. Iholta tapahtuvassa annostelussa lääkeaineen permeaatiokyvyllä on tärkeä osuus annostelun onnistumiseen. Konfokaali Raman-mikrospektroskopia on ei-destruktiivinen ja nopea tapa kuvata tällaisten lääkkeiden penetraation nopeutta ja syvyyttä tosiaikaisesti. Ihon kautta tapahtuva lääkeannostelu on monimutkainen prosessi, johon vaikuttaa monta samanaikaista tekijää; lääkeaineen

fysikokemialliset ominaisuudet, lääkeaineen kuljettajan fysikokemialliset ominaisuudet, lääkeaineen konsentraatio ja lääkkeen annostelukohta. Tutkimuksissa on esitelty konfokaali-Raman-mikrospektroskopian käyttöä ihon ruusufinnin hoitoon tarkoitetun metronidatsoli-molekyylin havainnoinnissa. Määrittelyssä tutkittiin aineen ihopermeaatiota ja interaktioita ihon eri kerrosten molekyylin kanssa. Tutkimusprotokolla koostui neljästä vaiheesta; ensin määritettiin metronidatsolin kiinteän ja liuoksen spektrit. Näistä pyrittiin erottamaan metronidatsolille ominaisia piikkejä ja rakenteita, jotta jatkotutkimuksissa voitiin tunnistaa metronidatsoli luotettavasti spektridatasta. Seuraavaksi lääkeaineliuos annosteltiin iholle ja havainnoitiin Z-suuntaista (syvyys)profiilia. Tällä tavoin saatiin tietoa metronidatsolin penetraatiosta ihon kerrosten läpi. Jälkeenpäin ihonäytteet jäädytettiin ja leikattiin ohuiksi poikittaissuuntaisiksi leikkeiksi. Näillä suoritettiin Raman-kuvantaminen konfokaalitutkimuksessa. Viimeisessä vaiheessa vielä selvitettiin metronidatsolin vaikutuksia ihon muiden biomolekyylin kanssa. Tämä näkyi ennalta määritettyjen ihon biomolekyylin (lipidejä ja proteiineja) spektrien muutoksissa. Instrumenttien vaikutuksia spektreihin pyrittiin tasaamaan vähentämällä kerätystä signaalista detektorin spontaanisti aikaansaama signaali silloin kun laser on poissa päältä (engl. dark current). Detektorin vastetta korjattiin jakamalla spektri niin kutsutulla mustan kappaleen (engl. black body) signaalilla (valkoinen valo) ja lopuksi leikkeiden käsittelyssä käytetyn  $\text{CaF}_2$ :n ja/tai optisen systeemin signaali vähennettiin kerätystä alkuperäisestä signaalista. Lisäksi spektrejä tasoitettiin, suoritettiin pohjataso korjaus (engl. baseline correction) automaattisen polynomifunktion avulla. Kuvantamisen yhteydessä spektrisarjalle tehtiin vektorinormalisointi koko spektrialueella.

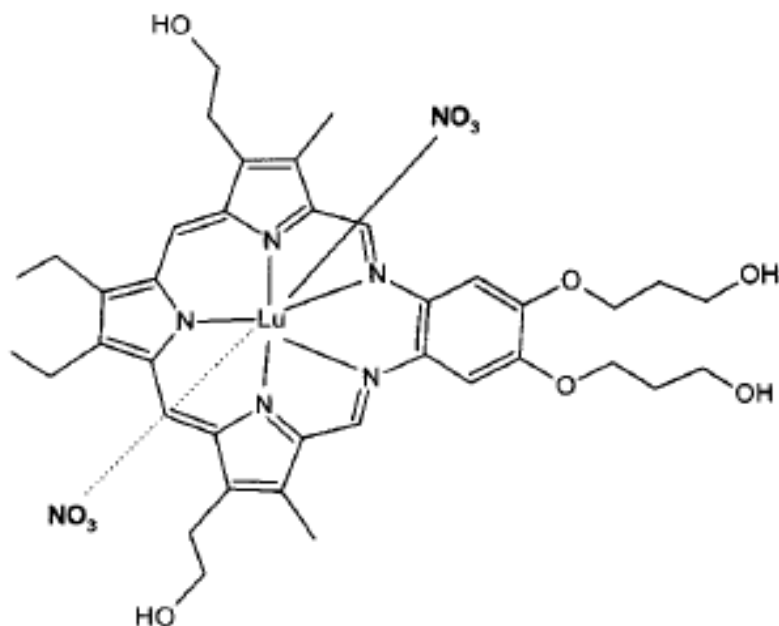
Raman-spektroskopiaa on sovellettu myös dissoluutiotutkimuksiin sekä lääkeaineiden kinetiikan tutkimuksiin. Viivästettyä lääkeaineen vapautumista lääkevalmisteesta pidetään monissa tapauksissa edullisena ominaisuutena. Tällä voidaan saavuttaa tasaisempi terapeuttinen vaikutusprofiili ja harventaa lääkeannostelun kertoja. Uudempaa valmisteteknologiaa edustavat erityyppisiin matriisirakenteisiin applikoidut lääkeaineet (Windbergs ym. 2010). Näistä rakenteista lääkeainemolekyylit vapautuvat joko diffuusiolla matriisin läpi tai

matriisin eroosion seurauksena. Käyttämällä Raman-spektroskopiaan perustuvaa kartoitusta (engl. mapping) ja mikroskooppitekniikoita, on mahdollista muodostaa värikoodattuja kuvia lääkeaineen vapautumisesta matriisista. Lääkeaineen spektristä valitaan esimerkiksi 1-2 tunnistettavaa piikkiä ja sopivia analyysimenetelmiä käyttäen eri kohdista matriisia määritetyt piikkien pinta-alat voidaan rinnastaa lääkeaineen jakaumaan matriisissa. Näin ollen suuremmat pinta-alat ja voimakkaammat signaalit voidaan yhdistää esimerkiksi intensiivisen tummaan sävyyn ja vastaavasti heikomman signaalin tuottavat molekyylimäärät haaleampaan väriin. Edelleen, mikroskooppitekniikan samanaikainen käyttö mahdollistaa myös kuvien muodostamisen valmisteiden tarkemman rakenteen havainnollistamiseksi.

Uusien lääkeaineiden farmakologinen teho on todettavissa jo lääkekehityksen alkuvaiheissa. Ongelmaksi muodostuu kuitenkin monissa tapauksissa heikko dissoluutio lääkevalmisteesta ja heikko vesiliukoisuus (Tres ym. 2014). Näin ollen lääketeollisuudessa on jatkuva kiinnostus löytää formulointikeinoja sellaisten valmisteiden koostamiseksi, joilla olisi riittävä oraalinen biohyväksikäytettävyys ja toisaalta farmakologinen teho elimistössä. Kasvavissa määrin ratkaisuja on löydetty kiinteistä amorfisista dispersioista, joissa amorfinen lääkeaine on yhdistetty vesiliukoisen tai vedessä turpoavan polymeerikantajan kanssa. Tavallisimmin tämä tehdään suihkukuivatuksella (engl. spray drying) tai sulatusekstruusiolla (engl. hot melt extrusion). Koko prosessin tärkeimpänä yksityiskohtana on amorfisessa muodossaan oleva lääkeaine; yleisesti tässä muodossa lääkeaineen dissoluutioprofiili on paljon korkeampi ja suotuisampi kuin kiteisen muodon. Ongelmaksi muodostuukin todellisissa lääkevalmisteissa amorfisen muodon säilyttäminen koko dissoluutiotapahtuman ajan. Esimerkiksi lääkeaineen uudelleenkiteytyminen, nano- tai mikropartikkelien muodostuminen tai kantajapolymeerin vaikutukset dissoluution aikana vaikuttavat kaikki omalta osaltaan dissoluutiotapahtumaan kokonaisuudessaan. Perinteisin keinoin (esimerkiksi USP dissoluutiolaitteet) amorfisen muodon kiteytymistä ja polymorfien muodostumista dissoluutioprosessin aikana ei voida havaita. Toisaalta taas IR-spektroskopiaan perustuvien tekniikoiden haittana on niiden sensitiivisyys vedelle.

Raman-spektroskopia tarjoaa teoriassa selkeitä etuja näiden ongelmakohtien selvittämiseksi. Lisäksi tässä tutkimuksessa käytettävä aika-erotteinen Raman-laitteisto tarjoaa merkittävän hyödyn fluoresenssisuppression aikaansaamiseksi lääkeaineilla, joiden Raman-spektriä häiritsee voimakas fluoresenssi. Näissä tutkimuksissa on vertailtu konventionaalisella ja aika-erotteisella Raman-laitteistolla mitattuja amorfisen indometasiinin Raman-spektrejä. Amorfinen indometasiini tuottaa tavallisella Raman-laitteistolla mitattuna niin voimakkaan fluoresenssin, että jopa aineen tunnistaminen spektrin piikkien perusteella on hyvin vaikeaa. Tietävästi tämä tutkimus on ensimmäinen tutkimus, jossa hyödynnetään hyvin tehokkaaseen fluoresenssisuppression pystyvää Raman-laitteistoa amorfisen indometasiinin tunnistamiseksi. On todennäköistä, että laitteistoa voidaan hyödyntää myös muihin vastaaviin lääkeaineisiin ja esimerkiksi yllä esitettyihin dissoluutiomäärityksiin.

Dissoluutiotutkimusten ohella muutakin farmaseuttisten lääkemolekyylien kineettiikkaa on niin ikään tutkittu Raman-spektroskopiaa hyödyntäen. Raman sopii aiemmin kuvattujen edullisten ominaisuuksiensa vuoksi hyvin monentyppisiin kineettisiin määrityksiin. Esimerkkeinä voidaan mainita teofylliinin ja karbamatsapiinin dehydraatio- ja hydraatiokineettiikka erilaisten apuaineiden läsnä ollessa, märkärakeistuksen yhteydessä sekä erilaisten säilytysolosuhteiden vallitessa (Airaksinen ym. 2003; Wikström ym. 2005; Salameh ja Taylor 2006). Synytsya (2004) tutkimusryhmineen tutki valokemiallisen reaktion käynnistävän lutetium(III) teksapyriinianalogin  $\text{Lu-T}_2\text{B}_2\text{Tex}$  kohdentumista kasvaimiin. Aineesta oli tutkimuksen aikaan lääkekehityksen vaiheessa II hieman kompleksisempi ja vesiliukoisempi molekyyli, jota kehiteltiin kaupalliseen käyttöön. Näin ollen tutkijoiden valitsema  $\text{Lu-T}_2\text{B}_2\text{Tex}$  sopi hyvin tutkittavaksi mallimolekyyliksi fotodynaamisessa terapiassa käytettävästä lääkeaineesta. Tutkimuksesta tekee mielenkiintoisen muutama seikka; se toteutettiin kasvainta kantavilla hiirillä ja tutkitussa molekyylissä oli voimakasta fluoresenssia tuottavia rakenteita (kuva 24).



**KUVA 24:** Lutetium(III) teksapyriinidinitraattikompleksin  $[\text{Lu-T}_2\text{B}_2\text{Tex}](\text{NO}_3)_2$  rakenne (Synytsya ym. 2004).

Raman-spektroskopiaa käyttäen biologisia näytteitä voidaan tutkia monin tavoin vahingoittamatta niitä. Edelleen, molekyylien jakautumista ja sitoutumista biologisiin rakenteisiin voidaan tehokkaasti kartoittaa vibraatiospektroskopian keinoin. Herkkyys molekyylien hienorakenteiden havainnointiin mahdollistaa myös monimutkaisempien biomatriisien tutkimukset. Tutkimuksessa tehtiin kvantitatiivista analyysiä eri kudoksiin kertyneestä Lu-T<sub>2</sub>B<sub>2</sub>Tex-määrästä 1-6 päivän ajalta hyödyntäen Raman-spesifisten spektriipiikkien intensiteettien suhteita. Tutkimuksen tulokset Fourier-muunnetun Raman-spektroskopian ja referenssimenetelmänä toimineen UV-näkyvän valon absorptiospektroskopian kesken olivat hyvin yhteneviä. Voitiin päätellä, että Raman-spektroskopiaa on mahdollista soveltaa kvantitatiivisesti valokemiallisessa terapiassa käytettävien aineiden biolokalisotumisen tutkimuksiin. Fluoresenssin vähentämiseen valovalkaisun (engl. photo-bleaching) keinoin ei tällaisissa tapauksissa voida ryhtyä, koska valon vaikutuksesta tapahtuva kudosten ja tutkittavien molekyylien hajoaminen voi vääristää tuloksia. Ratkaisuna oli Fourier-muunnetun Raman-spektrometrin käyttö. Tämä työ esittelee fluoresenssin vähentämiseen tähtäävää CMOS-SPAD-detektoritekniikkaa, joka on yhdistetty sen kanssa tehokkaasti toimivaan



pulssilaseriin heräte-energian tuottajana. Ongelmana kuvatuissa tutkimuksissa on valoherkkien molekyylien tuottama fluoresenssi ja lisäksi tutkittavien kudosten kromoforien tuottama fluoresenssi. Uudella tekniikalla voi olla mahdollista vähentää fluoresenssin vaikutuksia myös tällaisissa biologisissa tutkimuksissa.

Raman-spektroskopia on osoittautunut käyttökelpoiseksi *in situ* tapahtuviin aineen kiinteän olomuodon muutosten määrittäisiin (Aaltonen ym. 2006). Tutkittiin kahta hydraatteja muodostavaa ainetta, teofylliiniä ja nitrofurantoiinia. Muutoskinetiikkaa anhydraatista monohydraattimuotoon pystyttiin monitoroimaan valitsemalla kolme kuvaavaa piikkiä spektreistä molemmille aineille ja laskemalla niiden intensiteettien suhteita. UV-näkyvän valon absorptiospektroskopiaa käytettiin dissoluutiöväliaineen analysointiin. Etenkin teofylliinin muutoksista anhydraatti- ja monohydraattimuodon välillä saatiin selkeitä tuloksia. Samalla saatiin tietoa dissoluutioprofiileista. Nitrofurantoiini osoittautui hankalammaksi aineeksi ja tutkimusprotokollaa olisi todennäköisesti pitänyt hieman muuttaa. Kiinteän olomuodon mittaukset ja dissoluutionopeus määritettynä UV-näkyvän valon spektroskopiadatasta eivät olleet linjassa keskenään. Eräänä syynä saattoi olla nitrofurantoiinin monohydraattimuodon kiteiden ohut ja kuitumainen muoto, mikä mahdollisesti vaikutti herätelaserin läpäisyyseen. Signaalia todennäköisesti muodostui kiteiden pinnalta (monohydraattia) ja alakerroksista (anhydraattia). Tämänkaltaiset havainnot osoittavat, että Raman-spektrien tulkinnessa on käytettävä riittävää esi- ja jälkikäsitteilyä sekä suorittaa tulosten tarkastelua kriittisesti. Ramanin käytön haasteena ovat edelleen laitteiden kalibrointi ja menetelmien validointi. Esimerkiksi lääketeollisuus ja sairaanhoidon kliiniset analyysit ovat ehdottomia sille, että tulokset ovat aina luotettavia ja toistettavia mittauspaikasta ja mittaajasta riippumatta. Tämä ei kuitenkaan ole varsinainen ongelma, vaan laite- ja menetelmäkehityksessä huomioitava tärkeä seikka. Raman-spektrometrit on pyrittävä rakentamaan sellaisiksi, että niiden käyttäjien ei tarvitse olla välttämättä spektroskopisteja. Kun nopeasti omaksuttavat perustiedot laitteistosta ja käsiteltävästä näytteestä riittävät, kynnyks laitteiden hankinnalle ja käytölle pysyvät riittävän matalina. Tällöin Raman-tekniikan todellista potentiaalia

tutkimuskäytön ulkopuolellekin voidaan hyödyntää ja kaupallisten sovellusten skaala laajenee entisestään.

#### 4.4. Raman in vivo

Eläville organismeille voidaan suorittaa Raman-tutkimuksia. Monien ihosyöpätyyppien diagnosoinnissa on käytetty onnistuneesti Raman-spektroskopiaa (Downes ja Elfick 2010). Menetelmät perustuvat yleensä terveen kudoksen (referenssi) rakenteiden aiheuttamien sirontaintensiteettien ja sairaan kudoksen rakenteiden aiheuttamien sirontaintensiteettien vertailuun. Ramanin etuna on *in vivo* käytössä ei-invasiivisuus ja leima-ainevapaa tutkimus sekä suhteellinen inerttiys paljon vettä sisältävien näytteiden veden aiheuttamalle sironnalle. Invasiiviset menetelmät ovat niin ikään mahdollisia; tällöin Raman-spektroskopia yhdistetään esimerkiksi endoskopiaan. Voidaan myös suorittaa hepariinimääryksiä SERS:n ja kulta-nanopartikkelien avulla (Qu ym. 2014).

Seuraavassa esitettyyn **yhteenvetotaulukkoon 4** on koottu eri Raman-sovellusalueita ja niille ominaisia mittauseräparametreja.

**YHTEENVETOTAULUKKO 4:** Eri sovellustyypeille ominaisia ja sopivia heräte-aallonpituuksia, heräte-laserin tehoja, mittausaikoja, integrointiaikoja, fokusointipisteen kokoja ja pulssilaserin käytön yhteydessä pulssin pituuksia Raman-spektroskopiassa. Taulukkoon on koottu suuntaa-antavia esimerkkiarvoja (Benevides ym. 1993; Chu ym. 1999; Nolasco ym. 2006; Tfayli ym. 2007; Tfayli ym. 2013; Ashton ym. 2013; Brambilla ym. 2013).

Sovellusalue	Heräte-aallonpituus (nm)	Heräte - laserin teho näyt-teessä (mW)	Kokonais-mittausaika (s)/ Integrointiaika (s)/ Skannausten lukumäärä (kpl)	Fokusointipis-teen koko (µm) tai huomioita fokusoinnista	Pulssin pituus (ps)
Pienmolekyyliset lääkeaineet	532 / 785 / 1064	4 - 300	20-∞ / 0.1-10 / 1-∞	50 – 6000	150
Peptidit, proteiinit	413.2 / 422.6 / 442.8 / 785	0.3 - 30	Riippuu koejärjestelystä / 300 / Riippuu koejärjestelystä	Riippuu koejärjestelystä	-
Vasta-aineet	180-260	0.2	Riippuu koejärjestelystä / 60 / Muutamia skannauksia esimerkiksi eri kuoppalevyn kuopista	Fokusointi liukseen, ei esimerkiksi kuoppalevyn pohjaan. Vältettävä photo-bleaching- ilmiötä	-
Lipidit	633	35	480 / 30 / 16	20x ja / tai 50 objektiivin käyttö. Tarpeen tutkia koejärjestelyssä laserin mahdollisia vaikutuksia yhdisteiden konformaatioon	-
Hiilihydraatit	633	~ 1.3	Riippuu koejärjestelystä / 1 - 60 / Riippuu	10x objektiivin käyttö, vältettävä fotokemiallista	-

			koejärjestelystä	ja -termaalista vahinkoa näytteelle	
Nukleiinihapot ja DNA	488.0 / 514.5	< 25	1200 - 1800 / 60 / 20 - 30	80x objektiivin käyttö, mahdollisesti myös mikroskoopin yhdistäminen laitteistoon, jotta tarkka fokusointi haluttuun pisteeseen saavutetaan	-
Solututkimukset	785	50	20 / 10 / 2	100x objektiivin käyttö	-

## 5 RAMAN-SPEKTROSKOPIAN SOVELLUSALUEET MUUALLA

Etenkin nopeatoimisten ja matalatehoisten lasereiden kehityksen myötä Raman-spektroskopia on noussut ikään kuin uudelleen varteenotettavaksi vaihtoehdoksi monentyyppisiin sovelluksiin (Pitt ym. 2005). Alkuun uutta tekniikkaa lanseerattiin muun muassa tuotantoon ja prosessilinjoiille. Raman-spektroskopia yhdistettynä mikroskopiakemian tekniikoihin on saanut aikaan mahdollisuuden nanomittakaavan tutkimuksiin. Potentiaalisia alueita ovat esimerkiksi puolijohdekehitys, farmaseuttiset sovellukset, jalokivitutkimus, huumausaineisiin ja räjähteisiin liittyvä rikostutkimus, tietotekniikkaan liittyvät sovellukset (esimerkiksi kovalevyjen ja lukupäiden kehitys) sekä lääketieteellinen tutkimus (esimerkiksi erilaisten syöpien diagnosointi).

Vibraatiospektroskopian spesifisyys tietyille molekyylien rakenteille auttaa myös esimerkiksi epäpuhtauksien ja lääkevääreännösten tunnistamista (Dégardina ym. 2011). Spektroskopiamenetelmien rinnalla käytetään yleensä kemometrisiä menetelmiä, jotta analyseistä saadaan vakaita, toistettavia ja luotettavia. Vakaus

tarkoittaa tässä yhteydessä sitä, että analyysien tuloksiin aiheutuu mahdollisimman vähän muutoksia esimerkiksi laitteen käyttäjän tai laitteen aiheuttamana.

Kudosteknologia ja regeneratiivinen lääketiede ovat hyvin potentiaalisia sovellusalueita Raman-spektroskopialle (Boyd ym. 2010). Esimerkiksi mesenkyymikantasolujen (engl. mesenchymal stem cells) kontrolloitu kasvatus vaatii tosiaikaista solupopulaatioiden monitorointia. Myös useiden muiden solutyypin määrien, elinvoimaisuuden ja solusyklien vaiheiden tutkimus ovat keskeisessä asemassa. Nykyiset solubiologiset menetelmät soveltuvat tiettyihin tilanteisiin varsin hyvin, mutta tekniikat perustuvat useimmiten mikroskopointiin, immunologisiin (värjäys)menetelmiin tai muihin molekyylibiologisiin määrittämiin. Invasiivisuus, leima-aineiden käytön tarve, solujen kemiallinen hajotus ja/tai solujen kiinnittäminen rajoittavat edellä mainittujen tekniikoiden käyttöä silloin, kun soluviljelmien soluja halutaan käyttää esimerkiksi suorissa kliinisissä implantaatioissa. Raman-tekniikoiden hyödyntämistä näissä tilanteissa on sovellettu solujen elinvoimaisuuden määrittämiseen ja niiden morfologian tutkimiseen. Tulokset ovat olleet lupaavia, tosin tekniikoiden kehitystä vaaditaan. Esimerkiksi solusyklin vaiheiden luotettavaan mittaukseen tarvitaan luotettavia menetelmiä. Lisäksi soluviljelmistä tulee saada tarvittavan laaja otanta Raman-analyysissä, jotta saatu informaatio kuvaisi koko solupopulaation tilaa tutkittavien ominaisuuksien osalta.

SERS-Raman-spektroskopiaa on käytetty myös taideteosten ja arkeologian tutkimuksissa (Lau ym. 2008). Maalausten säilytystä, restaurointia, kuljetusta ja esillepanoa varten niiden pintarakenteesta tulisi saada tarkkaa tietoa. Etenkään kallisarvoisten maalausten pinnoista ei voida kuitenkaan ottaa näytteitä mikroskopointia varten. Monet käytetyt lakat sisältävät erityyppisiä hartseja, jotka toimivat myös niiden koostumuksen arvioinnissa referenssinä. SERS-Raman-spektroskopian avulla hartsien normaalisti Ramania häiritsevää fluoresenssia saadaan vähennettyä ja saada aikaan vahvistettua Raman-sironnan signaalia.

## 6 YHTEENVETO

Tässä katsauksessa esiteltiin vibraatiospektroskopian teoreettista pohjaa ja muutamia vibraatiospektroskopian lajeja (IR-, Raman- ja CARS-spektroskopia). Raman-spektroskopiaa käsiteltiin tarkemmin, koska tämän kirjallisuuskatsauksen sekä kokeellisen osuuden pääpaino oli Raman-tekniikassa. Raman-spektroskopiaa lähestyttiin teoreettiselta kannalta sekä Raman-laitetekniikan ja käytännön mittausten näkökulmasta. Lisäksi esiteltiin spektritulkinnan pääperiaatteita sekä erilaisia Raman-sovelluksia. Voidaan päätellä, että Raman-spektroskopia on erittäin käyttökelpoinen ja vahva työväline moniin farmaseuttisiin ja biologisiin sovelluksiin. Tekniikka ei yleensä vaadi mainittavaa näytteiden esikäsittelyä, mittauksia voidaan suorittaa esimerkiksi pullojen tai pakkausmateriaalien seinämien läpi ja Raman-spektri antaa hyvin spesifistä rakenteellista informaatiota tutkittavista molekyyleistä. Lisäksi etenkin biologisten näytteiden yhteydessä esiintyvä runsas vesipitoisuus ei häiritse Raman-spektreissä tärkeiden spektrivöiden tai -piikkien tulkintaa. Ongelmia aiheuttaa toisinaan Raman-signaalin heikkous sekä heräte-energian aiheuttamat luminesenssi-ilmiöt, kuten fluoresenssi. Näihin on kuitenkin pyritty löytämään erityyppisiä ratkaisuja, muun muassa SERS-Raman signaalin vahvistamiseksi ja aika-erotteinen Raman-spektroskopia fluoresenssin vähentämiseksi. Tämän tutkimuksen kokeellisessa osiossa tutkittiin erityisesti aika-erotteisen ja perinteisemmän laitteiston välisiä eroja erilaisten lääkeaineiden mittauksissa. Pääpaino oli kiinteässä olomuodossa mitattujen puhtaiden lääkeaineiden mittauksissa, mutta myös kahden lääkeaineen liuoksia tutkittiin. Perinteinen referenssilaitteisto edusti laitteistoa, jolla usein pyritään välttämään esimerkiksi lääketeollisuudessa fluoresoivien lääkeaineiden aiheuttamaa fluoresenssi-ilmiötä. Laitteiston heräte-energiana toimi jatkuvan aallon 785 nm laser ja siinä käytettiin CCD-matriisidetektoria. Aika-erotteisessa Raman laitteistossa hyödynnettiin pikosekuntiluokan pulssilaser-herätettä ja sen kanssa synkronoitua, elektronisesti ohjelmoituilla aika-porteilla toimivaa CMOS-SPAD-matriisidetektoria. Lääkeaineita ei ole tiettävästi aiemmin mitattu kuvatulla kokoonpanolla. Työn tulokset ja johtopäätökset esitetään tämän tutkimuksen kokeellisessa osuudessa.

## 7 LÄHTEET

Aaltonen J, Heinänen P, Peltonen L, Kortejärvi H, Tanninen VP, Christiansen L, Hirvonen J, Yliruusi J, Rantanen J: In Situ Measurement of Solvent Mediated Phase transformations during dissolution testing. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 12: 2730–2737, 2006.

Airaksinen S, Luukkonen P, Jørgensen A, Karjalainen M, Rantanen J, Yliruusi J: Effects of Excipients on Hydrate Formation in Wet Masses Containing Theophylline. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1: 516–528, 2003.

Albrecht MG, Creighton JA: Anomalously intense Raman spectra of Pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society* 15: 5215-5217, 1977.

Amigo JM, Ravn J: Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37: 76–82, 2009.

Andrada DM, Vieira HS, Oliveira MM, Santos AP, Yin LC, Saito R, Pimenta MA, Fantini C, Furtado CA: Dramatic increase in the Raman signal of functional groups on carbon nanotube surfaces. *Carbon* 56: 235–242, 2013.

Ashton L, Xu Y, Brewster VL, Cowcher DP, Sellick CA, Dickson AJ, Stephens GM, Goodacre R: The challenge of applying Raman spectroscopy to monitor recombinant antibody production. *Analyst* 138: 6977-6985, 2013.

Benevides JM, Kawakami J, Thomas Jr. GJ: Mechanisms of drug–DNA recognition distinguished by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 39: 1627–1634, 2008.

Benevides JM, Tsuboi M, Wang AHJ, Thomas, Jr. GJ: Local Raman Tensors of Double-Helical DNA in the Crystal: A Basis for Determining DNA Residue Orientations? *J. Am. Chem. Soc.*, 13: 5351-5359, 1993.

Benevides JM, Wang AHJ, van der Marel GA, van Boom JH, Thomas GJ Jr.: Crystal and Solution Structures of the B-DNA Dodecamer d(GCAAATTTGCG) Probed by Raman Spectroscopy: Heterogeneity in the Crystal Structure Does Not Persist in the Solution Structure. *Biochemistry* 27: 931-938, 1988.

Boyd AR, Burke GA, Meenan BJ: Monitoring cellular behaviour using Raman spectroscopy for tissue engineering and regenerative medicine applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 21: 2317–2324, 2010.

Brambilla A, Philippidis A, Nevin A, Comelli D, Valentini G, Anglos D: Adapting and testing a portable Raman spectrometer for SERS analysis of amino acids and small peptides. *Journal of Molecular Structure* 1044: 121–127, 2013.

Brauchle E, Schenke-Layland K: Raman spectroscopy in biomedicine – non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol. J.*, 8: 288–297, 2013.

Bruice PY: *Organic Chemistry*. 5. painos. Pearson Education, Inc., New Jersey 2007.

Chu GC, Tomita T, Sönnischen FD, Yoshida T, Ikeda-Saito M: The Heme Complex of Hmu O, a Bacterial Heme Degradation Enzyme from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.*, 274: 24490-24496, 1999.

Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE: *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3. painos. Academic Press. San Diego 1990.

Davidson MW, The Florida State University 2009: Fluorescence microscopy (online). Basic concepts in fluorescence. Haettu Internetistä 25.7.2014: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Dégardina K, Roggo Y, Beenb F, Margot P: Detection and chemical profiling of medicine counterfeits by Raman spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 705: 334–341, 2011.

Denson SC, Pommier CJS, Denton MB: The Impact of Array Detectors on Raman Spectroscopy. *Journal of Chemical Education* 1: 67-74, 2007.

Doub WH, Adams WP, Spencer JA, Buhse LF, Nelson MP, Treado PJ: Raman Chemical Imaging for Ingredient-specific Particle Size Characterization of Aqueous Suspension Nasal Spray Formulations: A Progress Report. *Pharmaceutical Research* 5: 934-945, 2007.

Downes A, Elfick A: Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors* 10: 1871-1889, 2010.

Efrima S, Zeiri L: Understanding SERS of bacteria. *J. Raman Spectrosc.*, 40: 277–288, 2009.

Evans CL, Xie XS: Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1: 883-909, 2008.

Evans CL, Xu X, Kesari S, Xie XS, Wong STC, Young GS: Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy. *Optics Express* 19: 12076-12087, 2007.

Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS: Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. *Phys. Med. Biol.*, 45: 1-59, 2000.

Furuyamaa N, Hasegawaa S, Hamauraa T, Yadaa S, Nakagamia H, Yonemochi E, Terada K: Evaluation of solid dispersions on a molecular level by the Raman mapping technique. *International Journal of Pharmaceutics* 361: 12–18, 2008.



Gao F, Lei J, Ju H: Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Sensitive DNA Detection by DNA-Mediated Silver Nanoparticle Growth. *Anal. Chem.*, 85: 11788–11793, 2013.

Garfinkel D, Edsall JT: Raman Spectra of Amino Acids and Related Compounds. X. Certain Peptides and of Lysozyme. *Journal of the American Chemical Society* 15: 3818-3823, 1958.

Golcuk K, Mandair GS, Callender AF, Sahar N, Kohn DH, Morris MD: Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 868-873, 2006.

Gordon KC, McGoverin CM: Raman mapping of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 417: 151-162, 2011.

Gotter B, Faubel W, Neubert RHH: FTIR microscopy and confocal Raman microscopy for studying lateral drug diffusion from a semisolid formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74: 14–20, 2010.

Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Hiramatsu H, Saito T: Vertical flow apparatus for enhancement and efficient collection of Raman signal. *Journal of Raman Spectroscopy* 45: 208-210, 2014.

Hokr BH, Yakovlev VV: Raman signal enhancement via elastic light scattering. *Optics Express* 10: 11757-11762, 2013.

Jones RO, Gunnarsson O: The density functional formalism its applications and prospects. *Reviews of Modern Physics* 3: 689-746, 1989.

Kanoa T, Yoshihashi Y, Yonemochic E, Terada K: Clarifying the mechanism of aggregation of particles in high-shear granulation based on their surface properties by using micro-spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 461: 495– 504, 2014.

Knorr F, Smith ZJ, Wachsmann-Hogiu S: Development of a time-gated system for Raman spectroscopy of biological samples. *Optics Express* 19: 20049-20058, 2010.

Kostamovaara J, Tenhunen J, Kögler M, Nissinen I, Nissinen J, Keränen P: Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD. *Optics Express* 25: 31632-31645, 2013.

Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R: Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochimica Acta Part A* 61: 1529–1535, 2005.

Kurouski D, Postiglione T, Deckert-Gaudig T, Deckertbc V, Lednev IK: Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens. *Analyst* 138: 1665-1673, 2013.

Lagant P, Vergoten G, Fleury G, Loucheux-Lefebvre MH: Raman Spectroscopy and normal vibrations of peptides : Characteristic normal modes of a type-II  $\beta$  turn. *European Journal of Biochemistry* 1: 137-148, 1984.

Lau D, Livett M, Praver S: Application of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to the analysis of natural resins in artworks. *J. Raman Spectrosc.*,39: 545–552, 2008.

Lázaro JC, Pacheco MTT, Rodrigues KC, de Lima CJ, Moreira LM, Villaverde AB, Silveira Jr L: Optimizing the Raman signal for characterizing organic samples: The effect of slit aperture and exposure time. *Spectroscopy* 23: 71–80, 2009.

Le Ru EC, Blackie E, Meyer M, Etchegoin PG: Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* 37: 13794-13803, 2007.

Li B, Ryan PW, Ray BH, Leister KJ, Sirimuthu NMS, Ryder AG: Rapid Characterisation and Quality Control of Complex Cell Culture Media Solutions Using Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Biotechnology and Bioengineering* 2: 290-301, 2010.

Lima RTY, Nga WK, Widjajaa E, Tan RBH: Comparison of the physical stability and physicochemical properties of amorphous indomethacin prepared by co-milling and supercritical anti-solvent co-precipitation. *J. of Supercritical Fluids* 79: 186–201, 2013.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 3-25, 1997.

Lipinski CA: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 4: 337-341, 2004.

Ludwig M, Asher SA: Self-Absorption in Resonance Raman and Rayleigh Scattering: A Numerical Solution. *Applied Spectroscopy* 8: 1458-1466, 1988.

Lyndgaard LB, van den Berg F, de Juan A: Quantification of paracetamol through tablet blister packages by Raman spectroscopy and multivariate curve resolution-alternating least squares. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 125: 58–66, 2013.

Maker PD, Terhune RW: Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength. *Physical Review* 3: 801-818, 1965.

Maquelin K, Choo-Smith LP, van Vreeswijk T, Endtz HP, Smith B, Bennett R, Bruining HA, Puppels GJ: Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. *Anal. Chem.*, 72: 12-19, 2000.

Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ: Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 51: 255–271, 2002.

Matousek P, Towrie M, Ma C, Kwok WM, Phillips D, Toner WT, Parker AW: Fluorescence suppression in resonance Raman spectroscopy using a high-performance picosecond Kerr gate. *Journal of Raman Spectroscopy* 32: 983-988, 2001.

Matthäus C, Kale A, Chernenko T, Torchilin V, Diem M: Ways of Imaging Uptake and Intracellular Fate of Liposomal Drug Carrier Systems inside Individual Cells, Based on Raman microscopy. *Molecular Pharmaceutics* 2: 287-292, 2007.

McGivern JV, Ebert AD: Exploiting pluripotent stemcell technology for drug discovery, screening, safety, and toxicology assessments. *Advanced Drug Delivery Reviews* 69–70: 170–178, 2014.

Nelson DL, Cox MM: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. painos. W. H. Freeman and Company, New York 2005.

Nie S, Emory SR: Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* 21: 1102-1106, 1997.

Nigmatullin RR, Baleanu D, Povarova D, Salah N, Habib SS, Memic A: Raman Spectra of Nanodiamonds: New Treatment Procedure Directed for Improved Raman Signal Marker Detection. *Mathematical Problems in Engineering* 2013: 1-11, 2013.

Nissinen I, Länsman AK, Nissinen J, Holma J, Kostamovaara J: 2x (4x)128 Time-gated CMOS Single Photon Avalanche Diode Line Detector with 100 ps Resolution for Raman Spectroscopy. *Proceedings of the ESSCIRC*: 291-294, 2013.

Nissinen I, Nissinen J, Länsman AK, Hallman L, Kilpelä A, Kostamovaara J, Kögler M, Aikio M, Tenhunen J: A Sub-ns Time-gated CMOS Single Photon Avalanche Diode Detector for Raman Spectroscopy. *European Solid-State Device Research Conference*: 375-378, 2011.

Nolasco MM, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA: Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-Bonding and Pseudo-Polymorphism. *ChemPhysChem* 7: 2150 – 2161, 2006.

Palonpon AF, Ando J, Yamakoshi H, Dodo K, Sodeoka M, Kawata S, Fujita K: Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells. *Nature Protocols* 4: 677- 692, 2013.

Pavurala N, Achenie LEK: A mechanistic approach for modeling oral drug delivery. *Computers and Chemical Engineering* 57: 196– 206, 2013.

Pellow-Jarman MV, Hendra PJ, Lehnert RJ: The dependence of Raman signal intensity on particle size for crystal powders. *Vibrational Spectroscopy* 12: 257-261, 1996.

Pitt GD, Batchelder DN, Bennett R, Bormett RW, Hayward IP, Smith BJE, Williams KPJ, Yang YY, Baldwin KJ, Webster S: Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation. *IEE Proc. -Sci. Meas. Technol.*, 6: 1-79, 2005.

Qu G, Zhang G, Wu Z, Shen A, Wang J, Hua J: A "turn-off" SERS assay of heparin with high selectivity based on heparin-peptide complex and Raman labelled gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 1: 124-129, 2014.

Raman CV, Krishnan KS: A New Type of Secondary Radiation. *Nature* 3048: 501-502, 1928.

Rasetti F: Selection Rules in the Raman Effect. *Nature* 3107: 757-759, 1929.

Sacré PY, Lebrun P, Chavez PF, De Bleye C, Netchacovitch L, Rozet E, Klinkenberg R, Strel B, Hubert P, Ziemons E: A new criterion to assess distributional homogeneity in hyperspectral images of solid pharmaceutical dosage forms. *Analytica Chimica Acta* 818: 7-14, 2014.

Salameh AK, Taylor LS: Physical Stability of Crystal Hydrates and their anhydrides in the presence of excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 446-461, 2006.

Schwartz DE, Charbon E, Shepard KL: Single-Photon Avalanche Diode Array for Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 11: 2546-2557, 2008.

Seo BR, DelNero P, Fischbach C: In vitro models of tumor vessels and matrix: Engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70: 205-216, 2014.

Shaw RA, Mantsch HH: Vibrational biospectroscopy: From plants to animals to humans. A historical perspective. *Journal of Molecular Structure* 480-481: 1-13, 1999.

Sinko PJ: *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6. painos. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Baltimore 2011.

Smith E, Dent G: *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. 1. painos. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex 2005.

Snyder RG, Schachtschneider JH: Vibrational analysis of the n-paraffins - I: Assignments of infrared bands in the spectra of C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> through - C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>. *Spectrochimica Acta* 1: 85-116, 1963.

Synytsya A, Kral V, Matejka P, Pouckova P, Volka K, Sessler JL: Biodistribution Assessment of a Lutetium(III) Texaphyrin Analogue in Tumor-bearing Mice Using NIR

Fourier-transform Raman Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology* 5: 453-460, 2004.

Tahara T, Hamaguchi H: Picosecond Raman-Spectroscopy Using a Streak Camera. *Applied Spectroscopy* 4: 391-398, 1993.

Tfayli A, Jamal D, Vyumvuhore R, Manfait M, Baillet-Guffroya A: Hydration effects on the barrier function of stratumcorneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5. *Analyst* 138: 6582-6588, 2013.

Tfayli A, Piot O, Pitre F, Manfait M: Follow up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *Eur. Biophys. J.*, 36:1049-1058, 2007.

Tres F, Treacher K, Booth J, Hughes LP, Wren SAC, Aylott JW, Burley JC: Real time Raman imaging to understand dissolution performance of amorphous solid dispersions. *Journal of Controlled Release* 188: 53-60, 2014.

Tuma R: Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *J. Raman Spectrosc.*, 36: 307-319, 2005.

Valley N, Greeneltch N, Van Duyne RP, Schatz GC: A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4: 2599-2604, 2013.

Van Dyne RP, Deanmaire DL, Shriver DF: Mode-Locked Laser Raman Spectroscopy-A New Technique for the Rejection of Interfering Background Luminescence Signals. *Analytical Chemistry* 2: 213-222, 1974.

Vangala K, Yanney M, Hsiao CT, Wu WW, Shen RF, Zou R, Sygula A, Zhang D: Sensitive Carbohydrate Detection Using Surface Enhanced Raman Tagging. *Anal. Chem.*, 82: 10164-10171, 2010.

Vankeirsbilck T, Vercauteren A, Baeyens W, Van der Weken G, Verpoort F, Vergote G, Remon JP: Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *trends in analytical chemistry* 12: 869-877, 2002.

Wang Y, Tang LJ, Jiang JH: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based, Homogeneous, Multiplexed Immunoassay with Antibody-Fragments-Decorated Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 85: 9213-9220, 2013.

Warshel A: Interpretation of resonance raman spectra of biological molecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6: 273-300, 1977.

Wikström H, Marsac PJ, Taylor LS: In-Line Monitoring of Hydrate Formation during Wet Granulation Using Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1: 209-219, 2005.

Windbergs M, Haaser M, Mcgoverin CM, Gordon KC, Kleinebudde P, Strachan CJ: Investigating the Relationship between Drug Distribution in Solid Lipid Matrices and Dissolution Behaviour Using Raman Spectroscopy and Mapping. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 3: 1464–1475, 2010.

Woodward LA, *Introduction to the Theory of Molecular and Vibrational Spectroscopy*, 1972, Clarendon Press, Oxford University Press.

Xie W, Schlucker S: Medical applications of surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15: 5329-5344, 2013.

Yanoa A, Odaa S, Fukamia T, Nakajimaa M, Yokoia T: Development of a cell-based assay system considering drugmetabolism and immune- and inflammatory-related factors for therisk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicology Letters* 228: 13–24, 2014.

Young HD, Freedman RA: *Sear's and Zemansky's University Physics with Modern Physics*. 10. painos. Addison-Wesley Publishing Company, San Francisco 2000.

Zhbankov RG, Andrianova VM, Marchewkab MK: Fourier transform IR and Raman spectroscopy and structure of carbohydrates. *Journal of Molecular Structure* 436-437: 637-654, 1997.

Zumdahl SS: *Chemical Priciples*. 4. painos. Houghton Mifflin Company, Boston 2002.

## 8 LIITTEET

### 3.4. Spektri vs. molekyylin ominaisuudet Raman-spektroskopiassa

**TAULUKKO 1:** Yksittäisiä vibraatioiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 3600 cm<sup>-1</sup> – 2600 cm<sup>-1</sup>

Aaltoluku (cm <sup>-1</sup> )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
3550-2850	OH (H)
3400-3200	Fenoli (K)
3350-3200	Alkoholi (K)
3450-3150	Amiini, amidi (K)
3300-3250	Alkyyni (H)
3050-2950	CH=CH (V)
3100-2950	Aromaattinen C-H (V)
3050-3000	=CH <sub>2</sub> (V)
2950-2800	C-CH <sub>3</sub> (V)
2850-2750 & 2750-2650	Aldehydi (K)
2950-2900 & 2850-2750	CH <sub>2</sub> (V)
2800-2750	N-CH <sub>3</sub> (K)
2830-2770	O-CH <sub>2</sub> (K)
2600-2500	Tiolit (SH) (V)

**TAULUKKO 2:** Yksittäisiä vibraatioiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 2600 cm<sup>-1</sup> – 1700 cm<sup>-1</sup>

Aaltoluku (cm <sup>-1</sup> )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
2420-2300	P-H (H)
2270-2220	Isosyanaatti (H)
2240-2220	Nitriili (K)
2210-2190	Aromaattinen nitriili (K)
2280-2180	Diatsonisuola (K)
2180-2100	Tiosyanaatti (H)
2180-2080	Isonitriili (K)
2150-2080	Si-H (K)
2150-2100	Atsidi (K)
2230-2050	Alkyyni (V)

2080-2000	Isotiosyanaatti (K)
1850-1750	Anhydridi (K)
1780-1730	Laktoni (K)
1760-1730	Kloorihappo (K)
1710-1700	Aldehydi (K)
1730-1700	Esteri (K)

**TAULUKKO 3:** Yksittäisiä vibraatioiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 1700 cm<sup>-1</sup>

– 1200 cm<sup>-1</sup>

Aaltoluku (cm <sup>-1</sup> )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
1710-1600	Ketoni (K)
1710-1600	Karboksyylihappo (K)
1750-1720	Alifaattinen esteri (K)
1710-1680	Uretaani (K)
1610-1550	Aromaattinen/heterorengas (V)
1670-1610	C=C (V)
1650-1620	C=N (V)
1600-1530	Nitroyhmä (K)
1670-1550	Amidi (K)
1570-1530	Alifaattinen atso (K)
1500-1450	Aromaattinen rengas (K)
1430-1310	Karboksyylaattisuola (K)
1370-1350	C-CH <sub>3</sub> (K)
1450-1400	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> (K)
1350-1310	Nitroyhmä (V)
1440-1350	Aromaattinen atso (V)
1250-1150	Sulfonihappo (H)

**TAULUKKO 4:** Yksittäisiä vibraatioiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 1200 cm<sup>-1</sup>

– 700 cm<sup>-1</sup>

Aaltoluku (cm <sup>-1</sup> )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
1100-990	Aromaattiset renkaat (V)
1200-1050	Sulfoni, sulfonamidi (K)
1055-1010	Sulfonihappo (H)
1220-1000	C=S (V)
1170-1120	Si-O-C (K)
1080-1000	Si-O-Si / Si-O-C (K)



1250-700	V C-C alifaattiset ketjut (K)
780-700	C-Cl (V)
800-720	C-F (V)
950-800	C-O-C/ eetterit (H)
950-900	Karboksyylihappodimeeri (H)
770-700	C-S (V)
980-880	CHX=CYZ (K)

**TAULUKKO 5:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 700 cm<sup>-1</sup> – 200 – 0 cm<sup>-1</sup>

Aaltoluku (cm <sup>-1</sup> )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
780-550	C-Cl (V)
400-250	δ C-C alifaattiset ketjut (V)
700-500	C-Br (V)
650-470	C-I (V)
330-300	Se-Se (V)
540-420	S-S (V)
770-660	C-S alifaattinen (V)
660-510	C=S (V)
420-100	Xmetalli-O (V)
550-450	Si-O-Si (V)
1250-600	V C-C alifaattiset ketjut (K)
200-20	Hilavibraatiot (V)

Yleisesti 2500-2000 cm<sup>-1</sup> alueella esiintyy yleensä kaksoissidoksia (-C=O, -C=N, -C=C-). Alle 1500 cm<sup>-1</sup> joillakin ryhmillä esiintyy spesifisiä spektrialueita (esimerkiksi O=N=O), mutta monilla molekyyileillä on komplekseja kuvioita hiili-hiili ja hiili-typpi-vibraatioiden aiheuttamana. Aluetta kutsutaan yleensä 'sormenjälkialueeksi'. Merkittävät spektrialueet alle 650 cm<sup>-1</sup> muodostuvat yleensä inorgaanisista ryhmistä, metalli-organoryhmistä tai molekyylien runkovibraatioista (engl. lattice vibrations) (Smith ja Dent 2005).

**KONVENTIONAALINEN RAMAN-SPEKTROSKOPIA JA AIKA-EROTTEINEN  
RAMAN-SPEKTROSKOPIA EI-FLUORESOIVIEN JA FLUORESOIVIEN  
LÄÄKEAINEIDEN TUTKIMUKSESSA**

Tatu Rojalin

Helsingin yliopisto

Farmasian tiedekunta

Farmaseuttisten biotieteiden osasto

Elokuu 2014

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
1.1. Fluoresenssin vähentäminen Raman-spektroskopiassa.....	1
1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset .....	5
2. Tutkimuksen tavoitteet.....	9
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	11
3.1. Laitteet ja ohjelmat .....	11
3.2. Tutkitut lääkeaineet .....	13
3.3. Aika-erottelun toteutus .....	15
3.4. Preliminäärianalyysi lääkeaineille .....	19
3.4.1. Preliminäärianalyysi I: Lääkeaineiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja BCS-luokitus	20
3.4.2 Preliminäärianalyysi II : Lääkeaineiden fluoresenssi.....	22
4. TULOKSET.....	26
4.1. Kiinteät lääkeaineet .....	26
4.2. Seulonta ja Raman-spesifinen analyysi .....	28
4.2.1. Taustasignaalianalyysi.....	29
4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi.....	31
4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista.....	39
4.4. Lääkeaineliuosten mittaukset .....	48
4.5. Lääkeaineliuosten mittaukset: Konventionaalinen Raman ja aika-erotteinen Raman .....	50
4.5.1. Konventionaalinen Raman: Kofeiiniliuos .....	52
4.5.2. Konventionaalinen Raman: Ranitidiinihydrokloridiliuos.....	56
4.5.3. Aika-erotteinen Raman: Kofeiiniliuos .....	60
4.5.4. Aika-erotteinen Raman: Ranitidiinihydrokloridiliuos.....	61
5. TULOSTEN POHDINTA .....	61
5.1. Spektrien Raman-spesifisten piikkien analysointia kiinteille lääkeaineille .....	63
5.2. Spektrien Raman-spesifisten piikkien analysointia lääkeaineliuoksille .....	72
5.3. Konventionaalinen ja aika-erotteinen Raman liuosten kvantitatiivisessa määrittämisessä.....	76

5.4. Raman-kokoonpanojen optiikasta, kalibroinnista ja mittausaikojen lyhentämisestä .....	85
5.5. Menetelmäkehitystä I: Stella-malli lääkeaineen passiiviselle permeaatiolle solukalvon läpi .....	94
5.6. Menetelmäkehitystä II: Kohti kvantitatiivista analyysia .....	96
5.7. Menetelmäkehitystä III: Solumittaukset .....	97
5.8. Menetelmäkehitystä IV: Mittaukset biomimeettisillä rakenteilla .....	100
6. YHTEENVETO .....	104
7. KIRJALLISUUSLUETTELO .....	105
8. LIITTEET .....	1
1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset .....	1
4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi .....	4
4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista .....	6

# 1. JOHDANTO

## 1.1. Fluoresenssin vähentäminen Raman-spektroskopiassa

Raman-spektroskopiassa on useita sellaisia hyötyjä – jopa ylivoimaisia ominaisuuksia – jotka tekevät siitä käyttökelpoisen työvälineen lääkeainetutkimukseen ja biologisiin määrittäisiin. Tärkeimpinä voidaan mainita vähäinen herkkyys vedelle, joka on biologisissa systeemeissä hyvin vallitseva komponentti sekä usein minimaalinen tarve näytteen esikäsittelylle (De Luca ym. 2010). Lisäksi Raman on hyvin rakennespesifinen spektroskopiatekniikka, eli sillä pystytään havainnoimaan monia sellaisia molekyylien ja kiderakenteiden ominaisuuksia, jotka olisivat muutoin käytännössä ulottumattomissa. Edelleen, Raman-tutkimuksessa ei tarvita välttämättä leima-aineita, ja tutkimuksia voidaan suorittaa vahingoittamatta näytteitä. Tällaiset ominaisuudet ovat esimerkiksi elävillä soluilla tehtävissä määrittämissä erittäin toivottavia.

Kun tutkittavaan näytteeseen ohjataan heräte-energiaa, yleensä laser-valoa, pieni osuus näytteestä sironneista fotoneista on epäelastisesti sironneita. Niillä voi olla hieman suurempi (anti-Stokes-sironta) tai hieman pienempi (Stokes-sironta) energia kuin alkuperäisillä fotoneilla. Mikäli fotonit palaavat takaisin energialtaan muuttumattomina, kyseessä on elastinen Rayleigh-sironta. Heräte-energian ja sironneiden fotonien välinen energiaero vastaa tutkittavan molekyylin (atomien) sisäisiä värähtelytiloja (De Luca ym. 2010). Tarkemmin ottaen, energiaero riippuu muutoksista molekyylin vibraatio- ja rotaatioenergioissa (Mazilu ym. 2010). Näin ollen prosessin tuloksena saatava spektri kuvaa tarkasti näytteen kemiallista koostumusta (muun muassa, millaisia atomeja molekyyllisessä/tutkittavassa rakenteessa on) sekä rakenteellista järjestymistä (muun muassa miten atomit molekyyllisessä/tutkittavassa rakenteessa ovat sijoittuneet toisiinsa nähden). Lääkeaineiden ja biologisten näytteen fluoresenssi aiheuttaa kuitenkin Raman-spektroskopiaan perustuvissa

määrityksissä usein ongelmia. Fluoresenssi voi olla peräisin näytteen omista rakenteista tai sen sisältämistä epäpuhtauksista (Mandal ym. 2005). Spektrejä tutkittaessa fluoresenssi esiintyy yleensä samoilla aaltolukualueilla kuin Raman-sironnan aiheuttama signaali, useimmiten monia kertaluokkia intensiivisempänä. Laitteiden ja menetelmien kehittyessä on kehitelty erilaisia tekniikoita fluoresenssisuppression aikaansaamiseksi.

Aika-erotteisessa Raman-spektroskopiassa pyritään hieman eri tavoin hyödyntämään Raman-sironnan ja fluoresenssin välistä aikaeroa (Mandal ym. 2005). Raman-sironnan elinaika on tyypillisesti välillä  $10^{-13}$  –  $10^{-11}$  s, fluoresenssin puolestaan  $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  s (Angel ym. 1984). Fluoresenssista peräisin olevien fotonien detektio pyritään estämään käyttämällä nopeita pulssilasereita ja samalla nopeaan aika-portitukseen kykenevää elektroniikkaa. Tällöin valomonistimilta tulevaa signaalia detektoidaan ainoastaan laser-pulssin ajan. Hankaluudeksi on osoittautunut riippuvuus näytteen fluoresenssin elinajasta; tekniikka soveltuu parhaiten näytteille, joilla on suhteellisen pitkä fluoresenssin elinaika. Lisäksi pulssilasereiden ja niiden yhteyteen sopivan detektiotekniikan hinta on tähän asti asettanut rajoitteita yleistymiselle.

Erityyppiset differentiaalitekniikat ovat myös jossakin määrin soveltuvia fluoresenssin ja Raman-signaalin erotteluun (Angel ym. 1984). Näistä voidaan mainita taajuusmodulaatioon, aallonpituusmodulaatioon ja polarisaation modulaatioon perustuvat menetelmät. Kaikki edellä mainitut nojaavat kahden spektrin mittaamiseen. Toinen on fotoluminesenssin (fluoresenssi) ja Raman-sironnan superpositiiona muodostama spektri, toinen pelkästään fotoluminesenssin muodostama spektri. Fluoresenssi saadaan eroteltua vähentämällä ensinnä mainittu jälkimmäisestä. Lisäksi Raman-sironnan signaalin on tässä tapauksessa oltava ainakin taustakohinaa suurempi. Taajuusmodulaatioon perustuva menetelmä on lähinnä aiemmin mainittua pulssilaseriin perustuvaa menetelmää. Aallonpituusmodulaatiossa puolestaan käytetään kahta eri aallonpituuden laseria. Puhdas luminesenssispektri tai luminesenssin ja Raman-signaalin yhteisspektri mitataan vaihtoehtoisesti ja signaalit

lähetetään eri sisäänmenoihin differentiaalitalennukseen. Monimutkaisuus, laitteistojen hinta ja aallonpituusmodulaatiossa kahden eri laserin tarve ovat rajoittaneet näiden kahden menetelmän käyttöä. Polarisatioon perustuvissa menetelmissä hyödynnetään sitä, että Raman-signaali on täysin polarisoitunutta, kun puolestaan fluoresenssisignaali täysin depolarisoitunutta (De Luca ym. 2010). Menetelmässä menetetään kuitenkin hyödyllistä Raman-signaalin informaatiota.

Osittaiseen fluoresenssitaustan vähentämiseen päästään käyttämällä rengasmaista herätesäteiden profiilia (Gormack ym. 2007). Signaalin keruu-aika lyhenee ja kohinan määrä vähenee. Taustan poistaminen Raman-spektristä on mahdollista tehdä myös kahden laserin tekniikalla siten, että toinen laser ikään kuin sieppaa tutkittavat partikkelit ja liikuttelee niitä herätesäteiden optista akselia vastaan kohtisuorassa tasossa halutulla taajuudella niin kutsutun galvopeilin avulla. Toinen säde toimii herätesäteenä (Rusciano ym. 2007). Menetelmässä fotonien keruu-aika on kuitenkin melko pitkä. Matemaattiset menetelmät, kuten ensimmäisen ja toisen asteen derivaattojen käyttö sekä korkeamman asteen polynomisovituksen tekeminen saatuun spektriin, ovat hyvin yleisiä (De Luca ym. 2010). Matemaattisten menetelmien käyttö vaatii laitteiston käyttäjältä vähintään alustavaa ymmärrystä, mitä spektristä halutaan saada selville. Menetelmien haittana on myös se, että on mahdollista menettää oleellisia Raman-spektrille tyypillisiä ominaisuuksia, mikäli sovituksella vähennetään liikaa taustaan luettavaa informaatiota, joka todellisuudessa olisikin Raman-signaalia.

SERDS-menetelmä (engl. Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy) perustuu heräte-laserin pieniin aallonpituuden muutoksiin (McCain ym. 2008). Kun herätteen aallonpituutta muutetaan hieman, saatava Raman-signaali 'seuraa' tätä muuttunutta aallonpituutta tietyssä suhteessa. Käytännössä koko Raman-spektri siirtyy aallonpituuden muutoksen myötä. Tällaisilla pieniellä muutoksilla fluoresenssin voidaan ajatella pysyvän paikoillaan. Fluoresenssitausta saadaan vähennettyä vähentämällä kaksi tällä tavoin saatua Raman-spektriä toisistaan. Menetelmästä on

olemassa muutamia parannuksia, muun muassa usemman kuin kahden muuttuvan aallonpituuden käyttö sekä Raman-signaalin estimaatin määrittäminen erilaisten algoritmien avulla (esimerkiksi EM- eli Expectation-Maximization-algoritmi). Myös monikanavaista 'lukittua' detektiota ja jatkuvassa muutoksessa olevaan aallonpituutta on hyödynnetty sovelluksina SERDS-menetelmään (De Luca ym. 2010). Viimeksi mainittua on käytetty onnistuneesti fluoresoivaksi tiedetyn, Raman-spektriltään tunnetun liuosnäytteen fluoresenssisuppressioon ja edelleen elävän yksisolunäytteen solumembraanin, sytoplasman ja tuman tunnistamiseen. Etenkin solunmäärityksissä selkeästi haittaavaa fluoresenssitaustaa saatiin huomattavasti vähennettyä ja eroteltua luotettavasti spektreistä edellä mainitut rakenteet. Liuosnäytteen spektrianalyysissä käytettiin pienimmän neliösumman menetelmään perustuvaa spektrianalyysiä. Solumääritys perustui puolestaan solun rakenteille ominaisten biomolekyylien (DNA, proteiinit, lipidit) spektrien PCA-analyysiin.

Tässä työssä tutkitaan aika-erotteista Raman-spektroskopiaa perustuen Raman-signaalin ja näytteen fluoresenssin elinajan ajalliseen eroon. Hyödyntämällä tarkasti ajoitettua pulssitettua laseria ja sen kanssa synkronoitua uutta CMOS-SPAD-detektoritekniikkaa (engl. Complementary Metal Oxide Semiconductor-Single Photon Avalanche Detector) voidaan saada aikaan tehokas fluoresenssitaustan vähennys (Kostamovaara ym. 2013; Nissinen ym. 2013). Nopea pulssilaser, aiempaa tehokkaampi fotonien keräys ja fluoresenssin vähentäminen niin kutsuttujen aikaikkunoiden välillä ovat käytetyn tekniikan etuina. Detektorin aikaikkunat on jaksotettu keskenään siten, että niille saapuu fotoneja hieman eri aikaan perustuen siihen, mistä ne todennäköisesti ovat peräisin (esimerkiksi fluoresenssi tai Raman). Tällaista Raman-tekniikkaa ei tiettävästi ole aiemmin tutkittu lääkeainetutkimuksessa, eikä myöskään biologisissa määrityksissä.



## 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset

Jotta mitatusta Raman-spektristä olisi käytännön hyötyä, sen yhteydet tutkittavan näytteen atomien ja molekyylien kanssa on pyrittävä ymmärtämään. Tämä seikka on saattanut hieman hidastaa osaltaan Raman-tekniikan kehitystä ja soveltamista laajemmin. Toisaalta esimerkiksi lääketeollisuudessa hyvin paljon käytetty HPLC-menetelmä (engl. High Performance Liquid Chromatography) ja niin ikään IR-spektroskopia vaativat analyysin suorittajalta taitoja muun muassa näytteen esikäsittelyyn ja kemialliseen rakenteeseen liittyen.

Spektrianalyysiä voidaan suorittaa monin eri lähestymistavoin. Mikäli tutkittavan aineen molekyyli rakenne tiedetään, sen perusteella voidaan tehdä ainakin alustavia päätelmiä vibraatiospektrissä mahdollisesti näkyvistä piirteistä. Seuraavassa kuvatulla protokollalla voidaan tehdä karkeita arvioita molekyylin rakenteeseen ja Raman-spektriin liittyen. Esitellään myös katsauksenomaisesti erilaisia lähestymistapoja Raman-spektrien tulkintaan käytännössä.

Raman-spektrin tulkinta voidaan aloittaa vertailemalla silmämääräisesti tutkittavan molekyylin rakenteita ja spektriä. Aina on tarpeen katsoa ainakin millaisia atomeja molekyyliin on. Ennen kaikkea atomien massoilla ja elektronegatiivisuuksilla on merkitystä. Esimerkiksi  $\text{CH}_3$ -ryhmä on likimäärin samanpainoinen kuin happiatomi. Toisaalta happiatomi on melko elektronegatiivinen. Tämänkaltaisilla karkeilla arvioilla on voidaan muodostaa estimaatti, kuinka vahvoja oskilloivia värähtelyliikkeitä kunkin molekyylin atomien välillä vallitsee. Toisaalta pystytään myös arvioimaan elektronien jakaumaa molekyyliin. Lisäksi on tärkeää havaita, onko mahdollista, että aine tekee vetysidoksia muiden aineiden (esimerkiksi liuottimen tai muiden lähistöllä sijaitsevien molekyylien) kanssa.

Spektrin piikit on niin ikään tarpeen jaotella. Voidaan tehdä arvioita, onko piikki ylipäätään huomioitava piikki ja minkälaisista rakenteista se on mahdollisesti peräisin. Jos kyseessä on useamman piikin 'kombinaatio', eli ei selkeä symmetrinen piikki, vaan

suurempi kokonaisuus, se voidaan purkaa esimerkiksi konvoluution avulla pienempiin osiin. Näin ollen voidaan saada selville, mitkä yksittäiset piikit muodostavat kokonaisuuden. Usein konvoluutio tehdään tietokoneohjelman avulla.

Toisinaan on tarpeen ajatella tilannetta puhtaasti fysikaalisena tapahtumana ja Raman-spektroskopian perusajatuksen avulla. Ramanilla tutkitaan nimenomaan erityyppisiä värähtelyjä (muun muassa vibraatiot ja rotaatiot), joten esimerkiksi spektrissä näkyvät epämääräisemmät muodostelmat saattavat fysikaalisena tapahtumana edustaa erilaisia harmonisia (vierekkäisten rakenteiden) muodostamia värähtelyjä. Myös piikkien ja spektrivöiden merkittävyys on tarpeen arvioida; esimerkiksi jaottelomalla ne muutamaan kategoriaan – hyvin heikko, heikko, keskimääräinen, vahva. Myös spektrin taustan tarkastelu on tärkeää; siitä saadaan usein tietoa esimerkiksi muiden samanaikaisten sirontailmiöiden luonteesta (Smith ja Dent 2005). Tausta voi olla hyvin tasainen tai toisaalta Raman-spektrin piikit voivat näkyä hyvin vahvan taustan päällä vaivoin erotettavina muodostelmina.

Kokonaisuudessaan molekyyli kannattaa purkaa niin pieniksi (tutkimuksen kannalta merkittäviksi) funktionaaliseksi ryhmiksi ja yksittäisten atomien välisten sidosten tarkasteluksi kuin mahdollista ja esimerkiksi listata ne. Lisäksi varsinkin analyysin aluksi on relevanttia tutkia monomeeri-muodossa esiintyvien molekyylien värähdyksiä.

Varsinaisten Raman-spektrin piikkien ja spektrivöiden paikkojen ja vahvuuksien tulkinta voidaan suorittaa esimerkiksi karkeasti seuraavalla tavalla (Smith ja Dent 2005). Aloitettaessa korkeemmista aaltoluvuista, eli korkeampien värähdysenergioiden alueelta;  $3600\text{ cm}^{-1}$ - $3100\text{ cm}^{-1}$  – alueelta voidaan havainnoida –OH- tai –NH-sidoksia. Spektristä on tarpeen katsoa myös vastaavia piirteitä muilta aaltolukualueilta samalla. Esimerkiksi amideilla on karbonyyli-ryhmään viittaavia spektrivöitä sekä –NH-vöitä. Varsinkin heikomman signaalin spektreissä pienemmät yksityiskohdat saattavat jäädä huomaamatta. Tämän tutkimuksen liitteessä 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset, taulukoissa 1-5 on esitetty joitakin aaltolukualueita sekä niiltä löytyviä vastaavia rakenteita. Jatkettaessa alueelle  $3200\text{ cm}^{-1}$ - $2700\text{ cm}^{-1}$ , voidaan tarkastella

tyydyttymättömien tai alifaattisten rakenteiden aiheuttamia spektri-  
 piirteitä. Tyydyttymättömät ovat yleensä  $3000\text{ cm}^{-1}$  yläpuolella, alifaattiset alapuolella. Jos alifaattisia ominaisuuksia on näkyvillä, ne voivat olla esimerkiksi suurehkoista metyyli- tai pidemmistä  $-\text{CH}_2$ -ryhmistä peräisin.  $2700\text{ cm}^{-1}$ - $2000\text{ cm}^{-1}$ , eli kumulatiivisten sidosten (esimerkiksi  $-\text{N}=\text{C}=\text{N}$ ) alueella voidaan nähdä Raman-spektrille tyypillisiä spektrialueita. Kaksoissidosten alue on puolestaan tyypillisesti  $1800\text{ cm}^{-1}$ - $1600\text{ cm}^{-1}$  (esimerkiksi  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{C}=\text{C}-$ ). Raman-spektrille on ominaista, että tyydyttymättömät kaksoissidosten spektrivyyöt ovat vahvempia ja terävämpiä kuin karbonyylivyyöt. IR-aktiivisia vöitä voi esiintyä myös tällä alueella. Edellä esitetyillä arvioilla voidaan päätellä, onko spektrissä alifaattisten, tyydyttymättömien tai aromaattisten ryhmien piirteitä. Useiden sidosten vyyöt (esimerkiksi kaksoissidokset) tai karbonyylivyyöt tulisi myös olla näillä tarkasteluilla hahmotettuina. Lisäksi spektriä voidaan tarkastella muiden vahvojen spektrivöiden osalta ja tehdä vertailuja taulukoituihin arvoihin.

Alue  $1600\text{ cm}^{-1}$  alaspäin sisältää usein molekyylille ominaisen sormenjalkialueen. Alueelta on löydettävissä rakenteellista informaatiota, mutta useimmat spektrivyyöt ja -piikit ovat molekyylin perusrungon aiheuttamia. Joitakin fenyylirenkaan värähtelytiloja ja esimerkiksi atso-ryhmän värähtelyjä voidaan havaita alle  $1600\text{ cm}^{-1}$  alueelta. Hapettuneilla orgaanisilla molekyyyleillä on tavallisesti spektri-  
 piirteitä kyseisellä alueella (esimerkiksi nitro-, sulfa- tai erittäin vahvasti halogenoituneet hiilihydraatit). Niin ikään epäorgaanisilla aineilla on teräviä Raman-vöitä alle  $1600\text{ cm}^{-1}$  alueella.

Spektrin piikkien ja vöiden tunnistamisen ohella huomiota tulee kiinnittää siihen, puuttuuko joltakin alueelta piirteitä, joita tutkittavan molekyylin tulisi tuottaa. Jos esimerkiksi alueella  $3200\text{ cm}^{-1}$ - $2700\text{ cm}^{-1}$  on ainoastaan hyvin heikkoja spektrivöitä, se voi johtua epätavallisista lajikkeista, kuten mainituista vahvasti halogenoiduista rakenteista, alueella olevat molekyylin ryhmät tuottavat vain heikkoa Raman-sirontaa tai näyte on epäorgaaninen. Näiden tarkastelujen lisäksi saatua spektriä kannattaa aina verrata johonkin vastaavaan aiempaan määritettyyn näytteeseen, tai ainakin vastaavia rakenteita sisältävään näytteeseen. Tästä käy hyvänä esimerkkinä hieman

tuonnempana esitetty kofeiinin ja teofylliinin Raman-spektri (kuvat 8 ja 14). Yhdisteet ovat hyvin pitkälti samankaltaisia molekyylirakenteeltaan ja näin ollen osin myös vaikutuksiltaan elimistössä. Kofeiinin ja teofylliinin Raman-spektreissä on nähtävissä hyvin paljon samoja piirteitä.

Raman-spektrien piikkien analysointia voidaan suorittaa useilla eri laskentamenetelmillä (Jones ja Gunnarsson 1989; Badawi ja Förner, 2014). Molekyylirakenteellista stabiiliutta ja värähtelyspektrejä lasketaan yleensä erilaisilla teoriatasoilla, esimerkkeinä nimityksistä ja menetelmistä DFT-B3LYP/6-311G \*\* (tiheysfunktio-laskentaa), MP2/6-311G \*\* (Moller-Plesset-taso). Ne voivat perustua esimerkiksi tiheysfunktio-teorioihin (engl. DFT calculations = Density Function Theory calculations), molekyylirakenteellisesti suosituimpien konformaatioiden ennustamiseen tai molekyylirakenteellisesti stabiileimpien konformaatioiden ennustamiseen. Laskennallisesti voidaan ennustaa tutkittavan molekyylin värähtelyjen taajuuksia (= energioita tai aaltolukuja) tai kokonaisia spektrejä (Strachan ym. 2007). Useimmiten laskelmien tukena tehdään kokeellisia havaintoja esimerkiksi lähi-infrapuna-alueen värähtelyspektroskopian menetelmillä, jotta nähdään, kuinka hyvin laskettu/ennustettu ja kokeellinen tulos ovat linjassa keskenään.

Pääkomponenttianalyysi (engl. PCA = Principal Component Analysis) kuuluu moniin Raman-tutkimusten perusmenetelmiin (Pratiwia ym. 2002). Pääkomponenttianalyysiä käytetään etenkin silloin, kun tutkittavissa näytteissä on useita eri komponentteja, jotka kaikki osallistuvat havaittavan spektrin muodostumiseen. Tällaisissa tilanteissa on usein vaikeaa erotella pelkästään spektrin silmämääräisen tarkastelun avulla, mitkä spektrin piirteet kuuluvat millekin yhdisteelle. Toisinaan tehdään määrittämiä esimerkiksi ajan funktiona muuttuvista komponenttien konsentraatioista liuoksissa. Spektridatasta ei tyypillisesti voida nähdä hyvin pieniä muutoksia tai yhdistää muutoksen suuruutta tietyn komponentin muutoksiin ilman laskentamenetelmiä. Tämä koskee varsinkin kvantitatiivisia määrittämiä. Pääkomponenttianalyysin perusajatuksena on saada vähennettyä monimuuttujajärjestelmän useiden muuttujien määrää alkuperäistä

(raakadataa) selvästi pienemmäksi. Esimerkiksi useita komponentteja sisältävän liuoksen/seoksen Raman-spektrit muunnetaan uuteen koordinaatistoon. Jokainen alkuperäinen mitattu spektri muunnetaan pääkomponenttianalyysin spektrien perussetiksi. Tämän perussetin ensimmäinen spektri on niin kutsuttu pääkomponentti (engl. PC = Principal Component), joka edustaa suurinta vaihtelua kaikkien alun perin mitattujen spektrien välillä. Tällöin tutkittavaan ilmiöön kokonaisuudessaan vaikuttavien 'vähemmän tärkeiden' muuttujien vaihtelut keskiarvon ympärillä eivät vaikuta liiaksi lopulliseen analyysiin. Analyysin tulokseen vaikuttaa näin ollen kokonaisilmiöön suurinta vaihtelua aiheuttavat tekijät. Lisäksi pääkomponenttien tulee olla ei-korreloiva muuttujia (komponentteja). Osuus, joka pääkomponenttisppektriä on jokaisessa mitatussa spektrissä, voidaan määrittää uuden koordinaatiston kuvaajan yhdelle akselille. Valitaan toinen pääkomponentti, joka edustaa toiseksi suurinta vaihtelua mitattujen spektrien välillä ja toimitaan samoin kuin ensimmäisen pääkomponentin kohdalla (määritetään uuden koordinaatiston toiselle akselille). Tarvittaessa voidaan valita myös kolmas pääkomponentti. Näin toimimalla saadaan eroteltua esimerkiksi eri kohdista solua (sytoplasma, solukalvo, tuma) otetut spektrit toisistaan (eli pääteltyä, mitkä spektrit ovat solukalvolta otettujen mittausten spektrejä ja mitkä puolestaan tumasta otettuja spektrejä) (De Luca ym. 2010).

## 2. Tutkimuksen tavoitteet

Lääkeaineiden kehityksessä, *in vitro* solukokeissa, lääketeollisuudessa ja tulevaisuudessa *in vivo* tutkimuksissa voidaan hyödyntää Raman-spektroskopiaa. Raman yhdistettynä esimerkiksi SPR:n antaa paljon erityyppisiä mahdollisuuksia. Käytännössä SERS (engl. Surface Enhanced Raman Spectroscopy) on Raman-spektroskopian ja SPR:n (engl. Surface Plasmon Resonance) 'perillinen' (Zhong-Qun Tian: The Past, Present and Future of Surface-Enhanced Raman spectroscopy. ICORS2014-konferenssin aloitusluento maanantaina 11.8.2014, Jena, Saksa). Ramanin ongelmana tähän asti on pidetty lääkeaineiden, biomolekyylien ja solumittausten

yhteydessä esiintyvää fluoresenssia. Uudella pulssilaseriin ja CMOS-SPAD-detektoriin perustuvalla laitteistolla pyritään tehokkaaseen fluoresenssisuppressioniin (Kostamovaara ym. 2013). Fluoresenssitaustan vähentäminen mittauksissa perustuu ennen kaikkea aiempaa korkeampaan aikaresoluutioon ja mahdollisuuteen erotella tällä tavoin varsinainen Raman-signaali fluoresenssitaustasta. Tässä tutkimuksessa on tavoitteena todistaa uuden aika-erotteisen tekniikan soveltuvuus aluksi kiinteille lääkeaineille ja sen jälkeen mittausten perusteella valittujen lääkeaineiden liuoksille. Näiden tulosten pohjalta on mahdollista siirtyä vähitellen esimerkiksi elävillä soluilla tapahtuviin permeaatio- ja kinetiikkamäärytyksiin, lääkeaineiden kvantitatiiviseen dissoluutiotestaukseen sekä biomimeettisillä kalvorakenteilla suoritettaviin mittauksiin.

Eläviä soluja mitattaessa soluja yleensä kasvatetaan lasi- tai muovialustoilla (Downes ja Elfick 2010). Ramanissa tästä aiheutuu usein ongelmia, koska tavallisesti laboratoriomäärytyksissä käytettävästä Pyrex-lasista aiheutuu voimakasta fluoresenssia ja toisaalta muoveissa olevat C-C, C-H – sidokset aiheuttavat sirontaa alueilla, jotka ovat oleellisia myös erilaisten biologisten molekyylien tunnistusalueilla. Näin ollen astioiden tuottama oma fluoresenssi/sironta saattaa häiritä liikaa mittauksia. Kyseinen asia saattaa olla ongelmana myös näissä mittauksissa havaittuihin sirontaprofiileihin liuosten tapauksessa käytettäessä konventionaalista Raman-tekniikkaa ja niin kutsuttua PhAT-Probe - mittapäätä (lasipullojen fluoresenssi). In vitro on erittäin oleellista käyttää kiderakenteisia astioita, kuten kvartsilasia, MgF tai CaF<sub>2</sub>. Toinen vaihtoehto on esimerkiksi aika-erotteisen tekniikan hyödyntäminen.

Tutkimuksissa oli tavoitteena <sup>a)</sup> saada sekä kiinteistä aineista että liuoksista alustavaa tietoa laitteiston fluoresenssisuppression toimivuudesta. Tällä tavoin luodaan pohjatutkimusta aika-erotteiselle Raman-laitteistolle lääkeaineanalytiikassa ja biologisissa käyttötarkoituksissa. Koska kyseessä on uudenlainen tekniikka, oikeiden ja alkuun parhaiden sovelluskohteiden löytäminen on keskeisessä asemassa. Tämän vuoksi kokeellisen osion loppupuolella on esitelty joitakin potentiaalisia sovellusalueita. Kun tekniikka saadaan vähitellen luotettavaksi, toistettavaksi ja vakaaksi johonkin

käyttökohteeseen, se voidaan optimoida ja validoida sekä jatkaa samalla uusien alueiden etsintää. Laitteiston etuna on korkea muokattavuus muun muassa mittapään asennon, optisten komponenttien ja esimerkiksi (konfokaali)mikroskoopin yhdistämisen suhteen.

Lisäksi tavoitteena oli <sup>b)</sup> selvittää käytettyjen laitteistojen yhtenevyyksiä ja eroja liuostutkimuksissa sekä <sup>c)</sup> optimoida Raman-mittauksia lääkeaineliuoksille. Edelleen, <sup>d)</sup> haluttiin saada näyttö siitä, että aika-erotteinen laitteisto soveltuisi myös fluoresoivien lääkeaineliuosten mittauksiin. Lisäksi <sup>e)</sup> pyrittiin selvittämään tärkeitä huomioitavia tekijöitä Raman-mittauksissa ja –koonpanoissa esimerkiksi liuosten kvantitatiivista analyysiä ja biologisia mittauksia ajatellen.

### **3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT**

#### **3.1. Laitteet ja ohjelmat**

Konventionaaliset Raman-mittaukset suoritettiin käyttäen jatkuvan aallon Raman RXN1-PhAT-785-D- laseria (Invictus 785 nm)(Kaiser Aerospace & Electronics Company, MI, USA). Käyttölämpötila oli määritetty 15-30 °C ja suhteellinen kosteus 0-95% (ei-kondensoitumista). Mittapää laitteistossa oli PhAT System Probehead (Kaiser Optical Systems, Inc., MI, USA). Nimellinen polttoväli oli 250 mm, herätesäteiden halkaisija 6 mm polttopisteessä ja fokustoleranssi  $\pm 12$  mm (etäisyys, jonka päässä polttopisteestä molempiin suuntiin saadaan vielä hyväksyttävä signaalinkeruu). Laserin teho näytteessä oli  $> 20$  mW. Detektori oli CCD-detektori (1024 x 256 EEC MPP Type). Detektorin minimilämpötila -50 °C (Kaiser Optical Systems, Inc., MI, USA). Hallintaohjelmina olivat HoloGRAMS (Kaiser Optical Systems, Inc., MI, USA), GRAMS/AI (Kaiser Optical Systems, Inc., MI, USA) ja Matlab (MathWorks, Massachusetts, USA). Konventionaalisissa Raman-määrittelyissä käytettiin nestemäisen sykloheksaanin tunnettuja Raman-spektrin piikkejä referenssistandardina kertomaan aaltolukualueen

tarkkuudesta. Käytetyt sykloheksaanin Raman-piikit olivat: 801.3  $\text{cm}^{-1}$ , 1028.3  $\text{cm}^{-1}$ , 1157.6  $\text{cm}^{-1}$ , 1266.4  $\text{cm}^{-1}$ , 1444.4  $\text{cm}^{-1}$ . Konventionaaliset Raman-mittaukset suoritettiin  $\sim$  vakiolämpöisessä ( $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) laboratorihuoneessa, jossa ilmankosteus oli niin ikään  $\sim$  vakio. Tutkituille lääkaineille käytettiin 1-20 peräkkäisen mittauksen keskiarvona saatua keräysdataa ja signaalille suoritettiin automaattinen pimeäkorjaus jokaisen mittauksen jälkeen. Detektorin integrointiaika pyrittiin säätämään siten, että detektori ei saturoitunut, mutta saavutettiin mahdollisimman korkea keruuintensiteetti. Integrointiajat vaihtelivat näytteestä riippuen välillä 0.1s-5. Kokonaismittausajat olivat välillä 20s-15min.

Aika-erotteiset Raman-mittaukset suoritettiin käyttäen herätteenä 532 nm pulssi-laseria, jonka keskiteho oli  $\sim 4 \text{ mW}$ , toistotaajuus  $\sim 40 \text{ kHz}$ , pulssin pituus  $\sim 150 \text{ ps}$ , polttopisteen koko polttopisteessä  $\sim 50 \text{ }\mu\text{m}$ , pulssienergia  $\sim 0.1 \text{ }\mu\text{J}$ , huipputeho  $\sim 630 \text{ W}$  ja huippuirradianssi  $\sim 8 \text{ mW/cm}^2$ . Spektrografin tulorako oli  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , suurennos 1.7x, dispersio  $\sim 4 \text{ nm/mm}$  ja resoluutio  $\sim 0.1 \text{ mm}$  eli  $\sim 0.4 \text{ nm}$  eli  $\sim 13 \text{ cm}^{-1}$  550 nm alueella. Detektori oli 128x8 CMOS-SPAD-matriisi ja spektrisuunnan pistejako  $32.2 \text{ }\mu\text{m}$ . Aika-erotteisen Raman-kokoonpanon spektrografin ja detektorin (eli spektrometrin) yhdessä tuottama spektraalinen resoluutio oli  $\sim 13 \text{ cm}^{-1}$ , joissakin osin spektriä mahdollisesti hieman huonompi, koska fokusointi saattoi olla epätäydellistä. Aikaresoluutiona systeemissä (toisin sanoen aika-ikkunan leveys, gate width) oli eniten käytetyn aika-ikkunan (eli Binin) kohdalla  $> 400 \text{ ps}$ . Tämä oli Bin3:n aikaresoluutio. Mittausdatan keruu ja laitteiden ohjaus tapahtui sulautetuissa järjestelmissä käytetyn digitaalisen mikropiirin, FPGA:n (engl. Field-programmable gate array) avulla. Aika-erotteisen systeemin mittausdatan keruu ja laitteiston ohjaus tapahtui näin ollen LabVIEW-ohjelmointikielellä (National Instruments Corporation, TX, USA) toteutetuilla ohjelmilla. Lisäksi mittausdatan käsittelyssä ja muun muassa 3-ulotteisten Bin-vastefunktioiden kuvaamisessa käytettiin Matlab-ohjelmaa. Samoin mitattujen summaspektrien fluoresenssitaustan ja halogeenireferenssin (joka suoritettiin amorfisen indometasiinin pitkän spektrin mittauksen yhteydessä) vähentämisessä käytettiin Matlab-ohjelmaa. Aika-erotteiset Raman-mittaukset suoritettiin hieman vaihtelevan



lämpötilan laboratoriotiloissa. Pääsääntöisesti lämpötila oli  $\sim 20 \pm 5$  °C. Ilmankosteudessa oli myös hieman vaihtelua, mutta pääsääntöisesti se pysyi  $\sim$  vakiona. Tutkituille lääkeaineille käytettiin  $1.2 \cdot 10^8$ - $1.7 \cdot 10^9$  peräkkäisen mittauksen keskiarvona saatua keräysdataa. Kokonaismittausajat olivat välillä 0.9h-11.9h.

Mitatut spektrit siirrettiin ASCII-tiedostoina Origin Pro-ohjelmaan (OriginLab Corporation, USA), jolla piirrettiin spektrit. Kaikissa tämän tutkimuksen normalisoiduissa spektreissä (kuvaajien y-asteikolla merkintä 'Normalisoitu intensiteetti (a.u.)) on käytetty normalisointikriteerinä spektrien jakamista maksimi-intensiteetillään.

### 3.2. Tutkitut lääkeaineet

Tutkitut lääkeaineet olivat ranitidiinihydrokloridi, kofeiini (anhydraatti), propranololihydrokloridi, teofylliini (anhydraatti) ja indometasiini (kiteinen ja amorfinen). Amorfinen indometasiini valmistettiin lämmittämällä jauheena ollutta (kiteistä) indometasiinia alumiiniastiassa. Kofeiini, teofylliini ja propranololi ostettiin Orion Pharmasta (Helsinki, Suomi), ranitidiini Hawkins Pharmaceutical Groupista (Minnesota, USA) ja indometasiini Hangzhou dayangchemistä (Kiina). Liuosmittaukset suoritettiin Pyrex-lasipulloissa ( $V \sim 20$  ml, pohjan halkaisija  $\sim 2$ cm ja korkeus  $\sim 5$  cm). Konventionaalisissa liuosmittauksissa heräte-laseri säde ohjattiin näytekammiossa sijainneeseen pulloon yläkautta. Myös kiinteän olomuodon mittaukset tehtiin konventionaalisella kokoonpanolla samoissa lasipulloissa, pullon pohjalla oli  $\sim 2$  cm kerros tutkittavaa kiinteää lääkeainetta. Aika-erotteiset mittaukset tehtiin suoraan pullon sivuseinämän läpi fokusoimalla polttopiste siten, että se oli pullossa olevan nesteen keskellä. Kiinteän olomuodon mittaukset tehtiin aika-erotteisella kokoonpanolla asettamalla kiinteää lääkeainetta alumiini- tai muoviasian pohjalle pieni kerros ja etsimällä fokuspiste laitteiston ohjausohjelmalla. Käytännössä tämä tehtiin etsimällä suurin sirontaintensiteetti säätämällä optiselle pöydälle kiinnitettyä näytepöydän etäisyyttä mittapäästä. Suodatettujen liuosnäytteiden suodatuksessa käytettiin  $0.45 \mu\text{m}$  steriilisuodattimia (Corning Incorporated, USA). Liuokset valmistettiin

50 mM PBS-puskuriliuokseen (engl. PBS = Phosphate Buffered Solution), jonka pH oli 7.05. Laimennoksissa käytettiin Milli-Q-vettä.

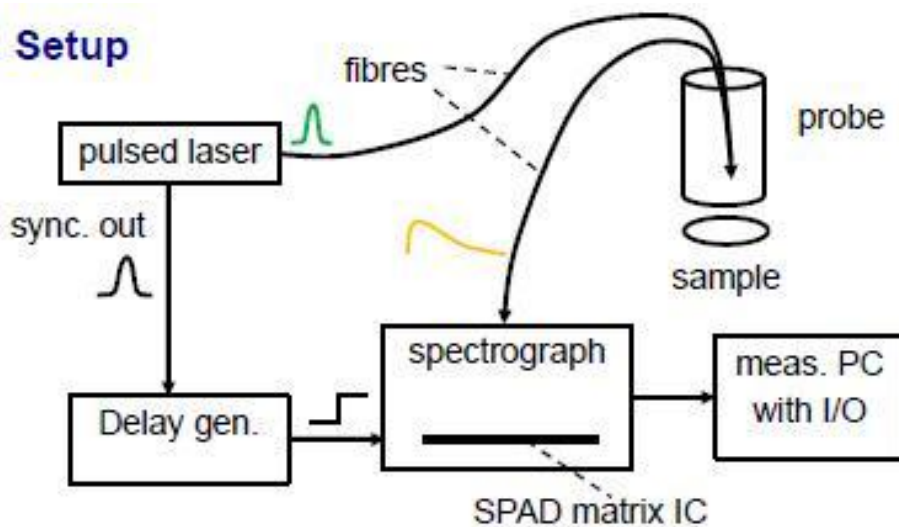
Aluksi lääkeaineista tehtiin alustava preliminäärianalyysi, joka käsitti tutkittujen lääkeaineiden fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia ja arvon niiden fluoresenssista. Tämän jälkeen mitattiin konventionaalinen Raman-spektri kaikista kiinteistä lääkeaineista (kuvat 4-14) ja valittiin samalla 3 piikkiä spektreistä. Tarkoituksena oli valita aineiden rakennetta todennäköisimmin kuvaavia Raman-spektrin piikkejä myöhempään tarkasteluun (**yhteenvetotaulukot 1** liitteessä 4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi). Konventionaaliset mittaukset suoritettiin aaltolukualueella  $0\text{ cm}^{-1}$  -  $2200\text{ cm}^{-1}$ , koska kyseiseltä alueelta tiedettiin preliminäärianalyysin ja aineiden molekyyliarakenteiden perusteella löytyvän lääkeaineita hyvin kuvaavia Raman-spektrin piikkejä. Seuraavaksi valittiin edellisten mittausten tulosten pohjalta lääkeaineet aika-erotteiseen Raman-analyysiin (kuvat 15-19). Konventionaalisen ja aika-erotteisen Raman-analyysin tuloksia on vertailtu liitteen 4.3. Aika-erotteisen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista **yhteenvetotaulukoissa 2**). Aika-erotteiset Raman-mittaukset tehtiin seuraavassa kuvatuilla aaltolukualueilla. Kofeiini:  $400 - 1000\text{ cm}^{-1}$ , ranitidiinihydrokloridi:  $800 - 1300\text{ cm}^{-1}$ , propranololihydrokloridi:  $500 - 1100\text{ cm}^{-1}$ , kiteinen indometasiini:  $600 - 1200\text{ cm}^{-1}$ , amorfinen indometasiini:  $150 - 3000\text{ cm}^{-1}$ . Viimeisessä vaiheessa tehtiin lääkeaineliuokset 2 edellä mitatusta lääkeaineesta, kofeiinista ja ranitidiinista. Lääkeaineista tehtiin ei-suodatetut ja suodatetut 3 konsentraation sarjat ja mitattiin niistä konventionaalinen Raman-spektri (kuvat 20-27). Vahvimmista tehdyistä, suodatetuista kofeiinin ja ranitidiinin lääkeaineliuoksista mitattiin vielä tämän jälkeen aika-erotteinen Raman-spektri. Mitatuille liuoksille käytettiin seuraavassa kuvattuja spektrialueita. Konventionaalinen kofeiini:  $0 - 2000\text{ cm}^{-1}$ , konventionaalinen ranitidiinihydrokloridi:  $0 - 2000\text{ cm}^{-1}$ , aika-erotteinen kofeiini:  $400 - 1000\text{ cm}^{-1}$ , aika-erotteinen ranitidiinihydrokloridi:  $900 - 1500\text{ cm}^{-1}$ . Taulukossa 1 on yhteenvetona mitatut spektrialueet. Spektrien ja tulosten tarkempi analyysi on kuvattu luvussa 5. Tulosten pohdinta.

**TAULUKKO 1:** Tutkitut spektrialueet ei-aika-erotteisille ja aika-erotteisille Raman-mittauksille

Lääke	Kofeiini	Ranitidiinihydrokloridi	Propranololihydrokloridi	Indometa-siini (kiteinen)	Indometa-siini (amorfinen)
<b>Ei-aika-erotteinen Raman</b>	200-2000 cm <sup>-1</sup>	200-2000 cm <sup>-1</sup>	200-2000 cm <sup>-1</sup>	200-2000 cm <sup>-1</sup>	200-2000 cm <sup>-1</sup>
<b>Aika-erotteinen Raman</b>	400-1000 cm <sup>-1</sup>	800-1300 cm <sup>-1</sup>	500-1100 cm <sup>-1</sup>	600-1200 cm <sup>-1</sup>	150-3000 cm <sup>-1</sup>

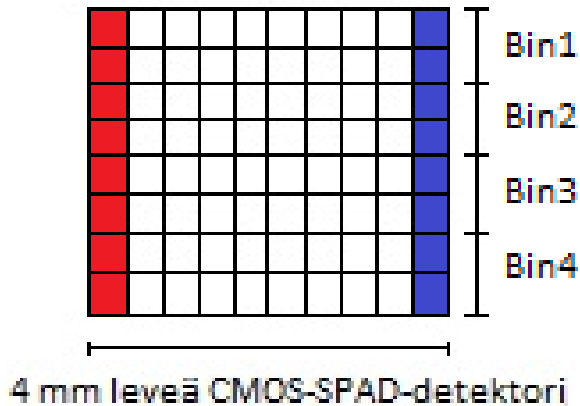
### 3.3. Aika-erottelun toteutus

Aika-erotteisella systeemillä tehdyissä määrityksissä fotonien keruu suoritettiin ~ 1 mm<sup>2</sup> suuruiselta alueelta. Polttopisteen koko oli siis hieman pienempi, mutta näytteiden vaalentamista (polttamista laserilla) (engl. bleaching) yritettiin välttää galvo-peilien avulla toteutetulla polttopisteen jaksottaisella liikuttelulla. Näin pyrittiin mahdollisimman totuudenmukaiseen fluoresenssisuppressioon nojautuen laitteiston ominaisuuksiin, ei vaalentamiseen. Joissakin tapauksissa laserilla tapahtuva näytteiden vaalentaminen ja tällä tavoin aikaansaatu fluoresenssin vähentäminen on kannattavaa, mutta se saattaa muuttaa tutkittavien näytteiden kemiallista rakennetta (Taylor ja Langkilde 2000). Toisinaan samankaltainen fokuksen liikuttelu toteutetaan näytettä liikuttelemalla varsinaisen herätesäteilyn pysyessä paikoillaan. Kuvassa 1 on kaaviokuva aika-erotteisesta Raman-laitteistosta, jota tässä tutkimuksessa käytettiin.



**KUVA 1:** Aika-erotteinen Raman-laitteisto (Kurki L ym. 2014: Fluorescence rejection in Raman detection using novel time-gated approach. Mukailtuna ICORS2014-konferenssin posterista).

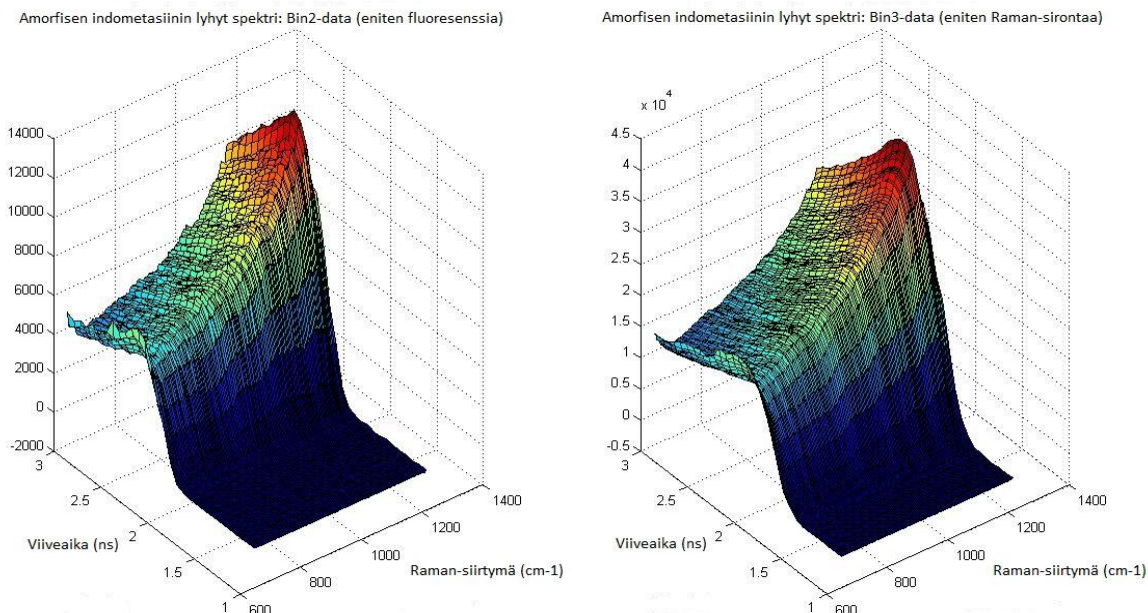
Aika-erotteisissa mittauksissa kerättiin mittaustietoa kaikista neljästä aika-ikkunasta, eli Bin1, Bin2, Bin3 ja Bin4. Fyysisesti 'Binit' vastaavat detektorin rivejä spatiaalisuunnassa. Alla kuva 2 havainnollistaa detektorin rakennetta. Binien ei tarvitse välttämättä olla kuvassa näkyvässä järjestyksessä ylhäältä alas. Aikaportitus on tässä detektorissa toteutettu elektronisesti piirilevylle tehdyllä ratkaisulla, eli ohjelmoitavilla aika-ikkunoilla. Toisin sanoen spektrometriin liitetyn viivegeneraattorin viiveaikaa (engl. delay time) voidaan säätää ohjelmallisesti. Detektion aikana portteja Bin1-Bin4 ei liikutella fyysisesti, vaan aika-portitus (engl. time gating) on toteutettu mikropiirille elektronisesti. Toinen vaihtoehto porttien toteutukseen olisi optisen viiveen tekeminen ns. Kerrgeittauksella (engl. Kerr-gating). Siinä tapauksessa siirrellään fyysisesti optiikkaa, mutta systeemi vaatii muun muassa mikrometrien tarkkuuteen pystyviä peilien liikuttelijoita ja optisten etäisyyksien pidentämistä (= suurikokoiset ja kalliit laitteet). Näiden tutkimuksissa käytetyn prototyyppilaitteiston kehitystyön tavoitteena on mahdollistaa kaikki tämä mikropiirille ja mahdollistaa esimerkiksi liikuteltavuus ja edulliset ratkaisut.



**KUVA 2:** CMOS-SPAD-detektorin toimintaperiaate. Detektorissa on 128 spektrisuunnan pikseliä (tähän piirretty vain 10) ja 8 spatiaalisuunnan pikseliä. Keruukuidusta tuleva sirontasignaali ohjataan tälle matriisille dispergoivan hilan kautta. Hila puolestaan erottelee keruufotonit niiden energioiden mukaan detektorille. Tässä tapauksessa korkeamman energian (taajuuden) emissionfotonit tulivat detektorin oikeaan laitaan (spektrin sininen pääty) ja matalamman energian (taajuuden) fotonit vasempaan laitaan (spektrin punainen pääty). Aikaikkunat eli 'Binit' muodostuvat detektorin spatiaalisuunnan riveistä (Bin1-Bin4).

Näistä tutkittiin Matlab-ohjelmalla ohjelmoidun aliohjelman avulla eri binien vastefunktioita. Näytteestä tulevan Raman-sirannon mukana tulee aina myös fluoresenssifotoneja, vaikka varsinainen fluoresenssi alkaakin tapahtua hieman myöhemmin. Tätä kutsutaan jäännösfluoresenssiksi. Aika-porteilla haluttiin kuitenkin mitata mainittua 'varsinaista' fluoresenssia, jotta sen vaikutus voitiin vähentää kokonaisuudessaan kerätyistä sirontafotoneista. Aluksi binien vastefunktioista pääteltiin, mikä / mitkä binit keräsivät eniten todennäköisiä fluoresenssifotoneja. Tämä oli nähtävissä hyvin eri aika-ikkunoiden vastefunktioiden nousukäyristä; Raman-sirontaa eniten keränneen / keränneiden binien vasteessa näkyi selvä nousu lähes välittömästi laser-pulssin jälkeen. Suurimmasta fluoresenssifotonien keruusta vastannut / vastanneet aika-ikkunat näyttivät puolestaan intensiteetin nousun hieman myöhemmin. Aika-ikkunat oli säädetty toimimaan pulssi-laserin kanssa siten, että osa bineistä havaitsi sirontafotoneja lähes välittömästi herätteen jälkeen. Nämä olivat

todennäköisimpiä Raman-fotoneja. Osa aika-ikkunoista puolestaan detektoi myöhempiä ajanjaksoja herätteen jälkeen. Nämä olivat todennäköisimpiä fluoresenssi-fotoneja, etenkin pitkän fluoresenssin elinajan aineilla. Lisäksi aika-ikkunoiden keskinäinen jaksotus oli säädetty siten, että ne eivät menneet liiksi päällekkäin, eivätkä toisaalta olleet liian kaukana toisistaan aika-akselilla tarkasteltuna. Kuvassa 3 on esimerkkinä kahden eri aikaikkunan, Bin2 ja Bin3, vastefunktiot 3-ulotteisessa koordinaatistossa. Mittaus tehtiin amorfiselle indometasiinille. Kuvasta nähdään, että aika-ikkuna Bin2:n viive on ajoitettu siten, että sen detektointi alkaa  $\sim 2.3$  ns kohdalta. Aika-ikkuna Bin3 viive on ajoitettu siten, että sen detektointi alkaa huomattavasti aiemmin,  $\sim 1.7$  ns kohdalla. Näin ollen Bin3 aikajaksotus oli sellainen, että se keräsi suurimman osan todennäköisistä Raman-sironnan aiheuttamista fotoneista. x-akselilla nähdään detektoitujen fotonien energiat, eli normaalin Raman-spektrin Raman-siirtymät. Ne vastaavat 2-ulotteisessa Raman-spektrissä näkyviä piikkejä x-akselin eri kohdilla. y-akselilla sijaitsee puolestaan detektoitujen fotonien määrät, eli sironnan intensiteetit. Esimerkin tapauksessa kiinnostava osuus olisi tutkia aikahetkiä  $\sim 1.5$  ns –  $1.7$  ns Bin3:n osalta, koska tällä aikavälillä (nousevalla reunalla) tapahtuu todennäköisimmin eniten Raman-sironnan fotonidetektiota. Bin3:lle suoritettiin aluksi pimeämittauksen vähennys Matlab-aliohjelmalla ja sen jälkeen vähennettiin saadusta erotussignaalista vielä sopivalla painotuksella Bin2:n vaste. Tällä tavoin saatiin aika-eroteltua Raman-signaali analysoitavaksi.



**KUVA 3:** Bin2 ja Bin3 vastefunktiot piirrettyinä 3-ulotteiseen koordinaatistoon.

### 3.4. Preliminäärianalyysi lääkeaineille

Kun ryhdytään tutkimaan tavalla tai toisella kiinnostavia lääkeaineita, on tarpeen kartoittaa etukäteen mahdollisimman paljon tutkittavien aineiden fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia. Preliminäärianalyysin tarkoitus tässä yhteydessä on siis valittujen lääkeaineiden relevanttien fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien kuvaus siinä laajuudessa, joka kuvaa niitä riittävän perusteellisesti lääkeaineina annostelun, kinetiikan ja happo-emäs-ominaisuuksien osalta. Myös muun muassa aineen molekyyli rakenne ja mahdolliset vetysidosten muodostumiskohdat on tarpeen selvittää, mikäli mahdollista. Aina ei varsinkaan uusista molekyyleistä ole juurikaan tietoa saatavilla, mutta tähän yhteyteen valitut parametrit ovat yleisimpiä ja ensimmäisten joukossa selvitettäviä, kun uutta lääkeainemolekyyliä valmistetaan ja esimerkiksi *in vitro* kokeita aloitetaan.

### 3.4.1. Preliminäärianalyysi I: Lääkeaineiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja BCS-luokitus

Taulukossa 2 esitetään tutkimukseen valittujen viiden eri lääkeaineen fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, erilaiset liukoisuudet sekä niiden terapeuttinen käyttötarkoitus.

**TAULUKKO 2: Tutkitut lääkeaineet ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia** (Hancock ja Parks 2000; Tubic-Grozdanic ym. 2008; NCBI 2014; Sigma-Aldrich 2014).

Lääke ja molekyylipaino (g/mol)	Molekyylikaava	Väri ja muoto	Fluoresenssi (Kyllä/Hieman /Ei)	pKa	logD (pH 7)	BCS Luokitus (I-IV)
Kofeiini (194.2)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Valkoinen jauhe	Ei	10.4	-0.57	I
Ranitidiini hydrokloridi (350.8)	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	Kellertävä jauhe	Kyllä	8.2; 2.7	-0.03	III
Propranololi (295.8)	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Valkoinen jauhe	Hieman	9.45	1.54	I
Teofylliini (180.2)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Valkoinen jauhe	Ei	8.81	-0.85	I
Indometasiini (kiteinen) (357.8)	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Vaalean keltainen jauhe	Kyllä *)	4.50	0.91	II
Indometasiini (amorfinen) (357.8)	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Keltainen lasi	Kyllä	4.50	0.91	II
<b>Lääkeaine</b>	<b>Vesiliukoisuus</b>	<b>Muu liukoisuus</b>				
Kofeiini	21.6 g/l 25 °C:ssa	Pyridiini, pyrroli, bensiini, tetrahydrofuraani, asetoni, eetteri, bentseeni				
Ranitidine hydrochloride	1800 mg/l 25 °C:ssa	Metanoli, etanoli				
Propranolol	50 mg/l 25 °C:ssa	Etanoli, DMSO				
Teofylliini	7.36 mg/l 25 °C:ssa	Alkoholi, emäksiset liuottimet				
Indomethacin (crystalline)	0.937 mg/l 25 °C:ssa	Etanoli, eetteri, asetoni, risiiniöljy				
Indomethacin (amorphous)	4.5-kertainen verrattuna kiteiseen muotoon [2]	Etanoli, eetteri, asetoni, risiiniöljy				
<b>Lääkeaine</b>	<b>Terapeuttinen käyttötarkoitus</b>					



Kofeiini	Keskushermostostimulantti
Ranitidiini hydrokloridi	H <sub>2</sub> -reseptoriantagonisti; estää mahahapon muodostumista
Propranololi	Verenpaine, angina pectoris, jännitystilat (neuraaliset)
Teofylliini	Astmalääke, COPD-lääke, keuhkoputkien sileän lihaskudoksen rentouttaja
Indometasiini (kiteinen)	Tulehduskipulääke
Indometasiini (amorfinen)	Tulehduskipulääke

**TAULUKKO 3: BCS-luokitus** (FDA 2014).

<b>LUOKKA I</b> Hyvä liukoisuus Hyvä kulkeutuminen solukalvon läpi	<b>LUOKKA II</b> Huono liukoisuus Hyvä kulkeutuminen solukalvon läpi
<b>LUOKKA III</b> Hyvä liukoisuus Huono kulkeutuminen solukalvon läpi	<b>LUOKKA IV</b> Huono liukoisuus Huono kulkeutuminen solukalvon läpi

**TAULUKKO 4: BCS-luokituksen kriteerit eri viranomaisten mukaisesti** (EMA 2014; FDA 2014; WHO 2014).

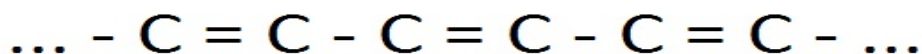
	<b>FDA (2000)</b>	<b>WHO (2006)</b>	<b>EMA (2010)</b>
Hyvä liukoisuus, kun suurin annos liukenee	≤ 250 ml pH = 1-7.5	≤ 250 ml pH = 1.2-6.8	≤ 250 ml pH = 1.2-6.8
Hyvä kulkeutuminen solukalvon läpi	≥ 90 % annoksesta imeytyy	≥ 85 % annoksesta imeytyy	≥ 85 % annoksesta imeytyy
Nopea vapautuminen valmisteesta	≥ 85 % liukenee 30 minuutissa	≥ 85 % liukenee 30 minuutissa	-
Erittäin nopea vapautuminen valmisteesta	-	≥ 85 % liukenee 15 minuutissa	≥ 85 % liukenee 15 minuutissa

Esitetyistä taulukoista 2-4 on tarpeen huomioida muutamia seikkoja. Ensinnä, lääkeaineiden vesiliukoisuudesta voidaan päätellä etenkin neutraaleille lääkeaineille (ei pH-riippuvaa liukoisuutta) arvio niiden liukenevuudelle PBS-puskuriliuokseen. Näissä tutkimuksissa haluttiin saada alustavia tietoja aika-erotteisen laitteiston soveltuvuudesta mahdollisiin elävillä soluilla tehtäviin määrittäisiin. Mikäli ei haluta käyttää liukoisuusapuna esimerkiksi dimetyylisulfoksidia (DMSO), vaan tehdään liukset suoraan useimpiin solukokeisiin soveltuvaan PBS-puskuriliuokseen, vesiliukoisuusarvosta saadaan tähän sopiva arvio. Mikäli DMSO:ta käytetään solukokeissa, sen mahdollinen toksisuus käytetyille solutyypeille tulee tarkoin selvittää. Lisäksi lääkeaineiden BCS-luokitus on tärkeä ominaisuus tutkittaessa niiden liukoisuus- ja solukalvon läpäisyominaisuuksia. Kyseiset ominaisuudet ovat puolestaan keskeisessä asemassa farmaseuttisten (oraalisten) lääkevalmisteiden tutkimuksessa ja kehityksessä (Kortejärvi ym. 2010).

### **3.4.2 Preliminäärianalyysi II : Lääkeaineiden fluoresenssi**

Fluoresenssi kuuluu luminesenssi-ilmiöihin (Davidson 2009). Fluoresenssia yleensä tutkitaan korkea-asteisesti konjugoituneilla polysyklisillä aromaattisilla molekyyileillä. Tällaisilla molekyyileillä on rakenteessaan näin ollen toistuvia peräkkäisiä kaksoissidoksia (kuva 4), joiden välillä on joka toisena atomien välisenä sidoksena yksöisidos. Fluoresoivilla molekyyileillä on yleensä myös useita rengasrakenteita, mihin termi 'polysyklinen' viittaa. Molekyylin elektroninen tila määrää molekyylin negatiivisen (elektronine muodostaman) varausjakauman muodon ja molekyylin geometrian. Jokaisella molekyylillä on useita sille ominaisia elektronisia tiloja riippuen elektronien kokonaisenergiasta ja niiden spin-tilojen symmetriasta. Edelleen, jokainen elektroninen tila jaetaan vibraatio- ja rotaatioenergiatiloihin. Ne liittyvät puolestaan atomiydinten ja molekyylissä niitä yhdistävien sidosorbtaalien energioihin. Useimmille orgaanisille molekyyleille tavallisin perustila on niin kutsuttu elektroninen singletti, jossa kaikilla molekyylin elektroneilla on vastakkaiset spin-arvot. Kokonaisuudessaan

molekyylejä, jotka pystyvät fluoresenssi-ilmiöön johtaviin elektroniin muutoksiin viritysenergian seurauksena, kutsutaan fluorokromeiksi. Suurempiin makromolekyyleihin (esimerkiksi lipideihin tai proteiineihin) absorptiolla tai kovalenttisesti liittyneitä fluorokromeja kutsutaan puolestaan fluoroforeiksi. Edelleen, fluoroforit voidaan vielä jakaa sisäisiin ja ulkoisiin fluoroforeihin. Sisäiset ovat luonnossa ja esimerkiksi elimistössä esiintyviä fluoresoivia rakenteita. Ulkoiset puolestaan ovat synteettisiä värjäysaineita tai muunneltuja biokemiallisia rakenteita, joiden käytön tarkoituksena on saada aikaan fluoresenssia esimerkiksi värjäämällä haluttuja rakenteita fluoresenssikuvasta varten.



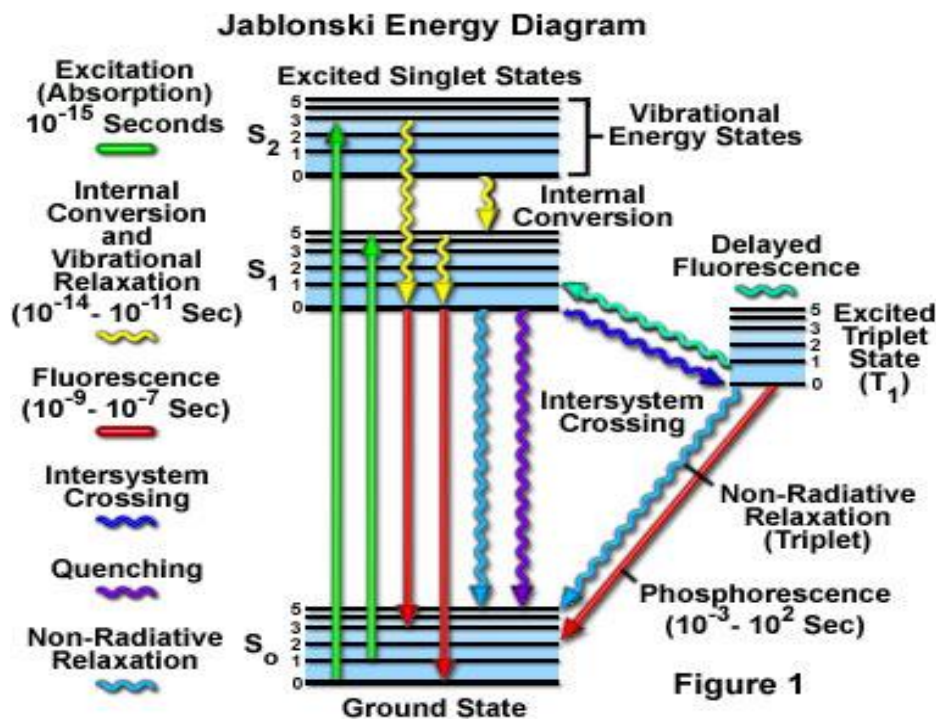
**KUVA 4:** Konjugoitunut kaksoissidosrakenne hiiliatomien välillä

Kun fluorokromi absorboi virittävien fotonien energiaa (esimerkiksi näkyvän valon aallonpituudella tai UV-alueen aallonpituudella), viritysenergian oskilloiva sähkökenttä (vektori) ja fluorokromin elektronit vuorovaikuttavat keskenään. Ilmiö on kaikki-tai-ei-mitään – tyyppinen ja se tapahtuu ainoastaan kullekin kromoforille ja molekyylille ominaisella energian absorptioalueella, Fluoresenssi voidaan jakaa prosessina aikaperusteisesti kolmeen eri vaiheeseen (Davidson 2009). Molekyylin virittyminen saapuvan fotonin vaikutuksesta on lähes välitön, femtosekuntien ( $10^{-15}$  s) aikaskaalan tapahtuma. Tätä jo huomattavasti ( $\sim 1000$ -kertaisesti) hitaampi tapahtuma on virittyneiden elektronien vibraatioiloissa tapahtuva relaksaatio alimmalle vibraatiotilalle, pikosekuntien ( $10^{-12}$  s) aikaskaalalla. Kaikkein pitkäikäisin osa tapahtumasta on molekyylin elektronin palaaminen perustilalle ja samalla tapahtuva alkuperäistä, virittävää fonia pidemmän aallonpituuden (pienemmän energian), fotonin emissio, nanosekuntien ( $10^{-9}$  s) aikaskaalalla. Kuvassa 5 on esitettyä tyypillisimmät prosessit, joita molekyylin rakenteissa tapahtuu virittävän energian seurauksena. Kyseessä on Jablonskin diagrammi, jolla prosesseja usein havainnollistetaan. Kuvassa on myös muita ilmiötä, jotka kuuluvat

kokonaistapahtumaan, mutta joita ei tässä yhteydessä käsitellä erikseen. Tyypillisessä fluoroforissa on useita sallittuja siirtymätiloja, jotka kuuluvat virittyneille vibraatiotasolle. Toisin sanoen molekyylin elektronien viritykset voivat purkautua useita eri reittejä pitkin takaisin virittyneiltä vibraatiotasoilta aina perustilalle asti. Näillä tapahtumilla on erilaisia todennäköisyyksiä ja myös Raman-mittaukset pohjautuvat tiettyjen vibraatiotilojen energiamuutosten havainnointiin. Ongelmia muodostuu ennen kaikkea siitä, että Raman-ilmiöiden pohjana olevat siirtymät tapahtuvat usein samanaikaisesti fluoresenssiin liittyvien prosessien kanssa. Lisäksi Raman-ilmiöiden siirtymät ovat todennäköisyyksiltään hyvin paljon harvinaisempia, kuin fluoresenssin. Näin ollen esimerkiksi fluoresoivien lääkeaineiden Raman-mittauksissa fluoresenssi peittää alleen kiinnostavan Raman-informaation. Tämä asettaa haasteita Raman-laitteiston fotonien keruulle, eli detektion herkkyydelle, keruun tehokkuudelle ja toisaalta muun muassa laitteistosta tai ympäristöstä saapuvien häiritsevien fotonien poissuodatukselle ja näin ollen keruun optiikalle sekä validoinnille siitä, että todella mitataan molekyylin Raman-sironnan fotoneja, eikä niin kutsuttuja 'väärän hälytyksen' aiheuttavia fotoneja. Toisaalta taas fluoresenssi- ja Raman-ilmiöiden eriaikaisuus mahdollistaa aika-erottelun. Aika-erottelulla pyritään detektoimaan mahdollisimman tehokkaasti Raman-sironnan (eli vibraatiotilojen muutosten) aiheuttamia fotoneja ja vähentämään saadusta kokonaissignaalista fluoresenssin aiheuttamia fotoneja.

Edellä esitettyyn pohjautuen voidaan päätellä, että Raman-tekniikan molekyyl- ja rakennespesifisyydestä huolimatta fluoresoivien lääkeaineiden mittauksissa on usein ongelmia, etenkin käytettäessä korkeiden heräte-energioiden laser-lähteitä ja konventionaalista detektoritekniikkaa. Edelleen, vaikka Raman sopii hyvin erityyppisten runsaasti vettä sisältävien biologisten näytteiden tutkimuksiin, esimerkiksi solututkimuksissa esiintyy runsaasti biomolekyylien ja solujen rakenteiden aiheuttamaa intrisiittistä (sisäistä) fluoresenssia (De Luca ym. 2010).

Alla esitettyssä taulukossa 5 on kootusti tässä tutkimuksessa mitatut lääkeaineet, niiden todennäköisyys fluoresenssiin ja arvio fluoresenssin aiheuttajasta aineen molekyyliarakenteessa.



**KUVA 5:** Jablonskin diagrammi (Davidson 2009).

**TAULUKKO 5:** Fluoresenssi kaikkien tutkittavien aineiden osalta ja fluoresenssin mahdollinen aiheuttaja

Lääkeaine (väri ja muoto)	Fluoresenssi (kyllä / vähän / ei)	Fluoresenssin todennäköinen aiheuttaja/aiheuttajat
Kofeiini (anhydraatti) (valkoinen jauhe)	Ei	-
Ranitidiinihydrokloridi (kellertävä jauhe)	Kyllä	Konjugoituneet kaksoissidokset rengasrakenteissa
Propranololihydrokloridi (valkoinen jauhe)	Vähän	Konjugoituneet kaksoissidokset rengasrakenteissa
Teofylliini (anhydraatti) (valkoinen jauhe)	Ei	-
Indometasiini (kiteinen)	Ei / Kyllä*	Ei puhtaassa

(vaalea jauhe)		kidemuodossa/fluoresoivia epäpuhtauksia
Indometasiini (amorfinen) (keltainen massa)	Kyllä	Konjugoituneet kaksoissidokset rengasrakenteissa

\* = Puhtaan kiteisen indometasiinin ei pitäisi fluoresoida. Näissä määrittämissä mitatun kiteiseksi oletetun indometasiinin spektristä on selvästi nähtävissä fluoresointia. Syynä tälle voi olla esimerkiksi se, että mitattu indometasiini ei ole ollut puhtaasti kiteistä tai joukossa on ollut fluoresoivia epäpuhtauksia.

## 4. TULOKSET

### 4.1. Kiinteät lääkkeaineet

Tässä luvussa esitetään sekä konventionaalilla Raman-laitteistolla että aikaerotteisella laitteistolla mitatut lääkkeaineiden spektrit ja muu oleellinen mittausinformaatio. Mittaukset ja näin ollen tämän luvun järjestys on koottu mittausten ja koko tutkimuksen kokonaiskuvaa ajatellen. Aloitetaan puhtaiden kiinteiden lääkkeaineiden tutkimuksesta seulonnalla ja Raman-spesifisellä analyysillä käyttäen konventionaalista Raman-kokoonpanoa. Näiden tulosten perusteella suoritetaan alustava spektrianalyysi. Mikäli mahdollista, hyödynnetään ennen tätä tutkimusta kirjallisuudessa määritettyjä Raman-spesifisten piikkien siirtymäarvoja (aaltolukuja) tutkituille lääkkeaineille. Joillekin havaituille arvoille ei ole löydettävissä kirjallisuudesta vastineita. Täsmällisin tapa tällaisten piikkien todentamiselle olisivat esimerkiksi tiheysfunktioiteorioihin (engl. DFT = Density Function Theory) pohjautuvat laskennalliset määrittäykset, joissa hyödynnetään tietoa muun muassa tutkittavan molekyylin rakenteesta, atomien sitoutumisesta, keskinäisestä orientaatiosta, elektronijakaumasta sekä molekyylin vibraatioihin ja rotaatioihin liittyvistä energioista (Jones ja Gunnarsson 1989). Tällaiset laskelmat ovat kuitenkin hieman tämän tutkimuksen painopisteen ulkopuolella. Näin ollen sellaisille mitatuille Raman-siirtymille, joille ei ole löydettävissä

selkeää vastinetta kirjallisuudesta, siirtymille on esitetty mahdollinen aiheuttaja tämän tutkimuksen kappaleessa 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset kuvatulla tavalla. Tulokinnassa on lisäksi hyödynnetty tämän tutkimuksen kirjallisen osion liitteen 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset taulukoita 1-5.

Tulosten tarkastelussa on tarpeen huomioida, että kuviin on merkitty Raman-piikkien sijainnit kahdella merkintätavalla. Joko suoraan piikin kohdalle pystysuorassa olevalla aaltoluvun numerolla tai nuolen ja numeron, jotka osoittavat piikin sijainnin ja aaltoluvun, avulla. Konventionaalisen mittauksen piikin sijainti on osoitettu **mustalla** ja aika-erotteisen mittauksen piikin sijainti **punaisella**. Tällä tavoin useita piikkejä ja aaltolukuja sisältävät spektrit ovat helpommin luettavissa. Edelleen, konventionaalisten ja aika-erotteisten mittausten tuloksena saatujen spektrien kuvien jälkeen liitteessä 4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi sekä liitteessä 4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista on vielä esitetty **yhteenvetotaulukot 1-2**. Taulukoihin on merkitty valitut potentiaalisimmat, jokaisen mitatun aineen rakenteeseen viittaavat Raman-piikkien sijainnit (3 kappaletta jokaiselle lääkeaineelle). Taulukoissa on konventionaalisen mittauksen piikin sijainti **mustalla** ja aika-erotteisen mittauksen piikin sijainti **punaisella** siten, että niiden voidaan tulkita edustavan saman molekyyliarakenteen aiheuttaman värähtelyn spektripiikkejä valitun toleranssin puitteissa. Mahdollisia eroavuuksia piikkien sijaintien (aaltolukujen) välillä pyritään analysoimaan luvussa 5. Tulosten pohdinta.

Raman-mittaukset ovat kiinteille aineille yleensä melko suoraviivaisia ja erityistä näytteiden esikäsittelyä ei juurikaan tarvitse suorittaa. Ensimmäisessä vaiheessa tutkitut lääkeainejauheet (ja indometasiinin amorfinen muoto) mitattiin lasipulloissa kohdistussäteen tullessa pullon suuaukon kautta näytteen pintaan (konventionaaliset mittaukset). Aika-erotteiset mittaukset toteutettiin samalla tavoin, pääsääntöisesti muovi- tai metalliastioiden pohjalla sijainneen näytteen yläpuolelta. Liukokset mitattiin kiinteiden aineiden tapaan lasipullojen suuaukon kautta (konventionaaliset

mittaukset) tai suoraan pullon seinämän läpi (aika-erotteiset mittaukset). Kiinteistä lääkeaineista indometasiini tutkittiin viimeisenä, koska se edusti tietyllä tavalla erikoistapaus kiinteistä aineista. Indometasiinista tutkittavana oli kiteinen muoto ja amorfinen muoto. Aineilla amorfinen muoto edustaa kiinteän aineen toista olomuotoa kiteisen olomuodon lisäksi. Amorfisen aineen rakenneyksiköt eivät ole järjestyneet säännölliseksi kiderakenteeksi. Aineen amorfisella ja kiteisellä muodolla on usein hyvin erilaiset fysikaaliset ominaisuudet, sillä on usein myös merkitystä lääkekehityksessä ja lääkevalmisteiden formuloinnissa. Raman-tutkimusten kannalta amorfiset aineet ovat useissa tapauksissa fluoresoivia. Ilmiön perustana on se, että amorfisen muodon elektronit eivät ole erityisen vahvasti sitoutuneet ja jakautuneet säännöllisen kiderakenteen muodostavien atomien kesken. Amorfinen muoto on korkea-energisempi kuin stabiilimpi kiteinen muoto (Savolainen ym. 2009). Vähäisempi laserin heräte-energia saa aikaan suurempien elektronimäärien elektronisten siirtymien muodostumisen ja näiden siirtymätilojen purkautuessa tapahtuu voimakasta fluoresenssia.

#### **4.2. Seulonta ja Raman-spesifinen analyysi**

Seulonnan ja Raman-spesifisen analyysin ajatuksena on löytää aluksi voimakkaasti fluoresoivia, ainakin jossakin määrin vesiliukoisia lääkeaineita mittaamalla konventionaalisella Raman-laitteistolla erityyppisten lääkeaineiden spektrejä. Tällä menettelyllä selvitetään potentiaalisimmat lääkeaineet, joilla fluoresenssi aiheuttaa ongelmia konventionaaliin Raman-määrittelyyn. Edelleen, koska näiden määrittelyiden pidemmän mittakaavan tavoitteena on kulkea kohti biologisesti kiinnostavia Raman-mittauksia, on tärkeää saada myös informaatiota fluoresenssisuppression toimivuudesta lääkeaineliuoksille. Valitaan mitatuista lääkeaineista kaksi fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan hieman erilaista lääkeainetta, valmistetaan molemmista liokset PBS-puskuriin ja mitataan niiden konventionaalinen sekä aika-erotteinen Raman. Seulonnan tarkoituksena on kartoittaa nimenomaan



lääkeaineiden Raman-aktiivisia tekijöitä, koska Raman-spektroskopia antaa tekniikkana useita mahdollisuuksia molekyylien rakennespesifiseen analyysiin. Tehtyjen mittausten perusteella tehdään arvioita aika-erotteisen laitteiston toimivuudesta fluoresenssin vähentämiseen.

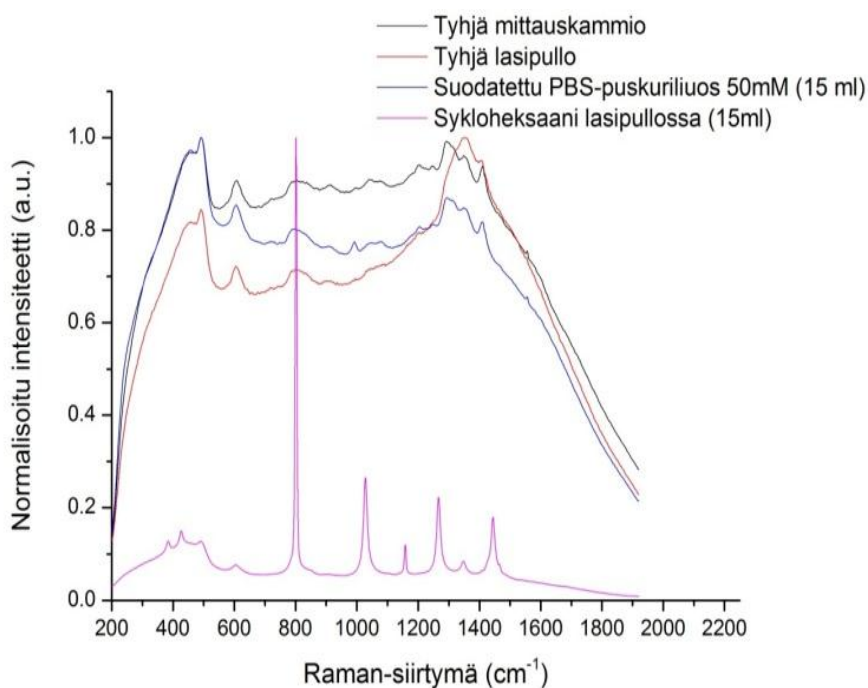
IR-spektroskopian laitteistojen ja käytön yleisyyden vuoksi tässäkin tutkimuksessa esitettyjen määrittysten tekeminen saattaisi tuntua helpommalta ja suoraviivaisemmalta hyödyntää IR-tekniikkaa Raman-analyysin sijaan. Raman-spektroskopiolla on kuitenkin muutamia etuja, joiden vuoksi sillä on enemmän potentiaalia IR-spektroskopiaan verrattuna. Ensinnä, Raman-analyysi ei yleensä vaadi näytteen esikäsitteilyä ja näytteitä voidaan siis mitata koskemattomina, usein jopa pakkausmateriaalien läpi (Taylor ja Langkilde 2000). Toiseksi, liittyen ennen kaikkea kiinteisiin lääkevalmisteisiin, ei-aromaattiset, ei-kiteiset, hydrofiiliset apuaineet ovat usein heikkoja Raman-sironnan aiheuttajia. Lääkeainemolekyylit sen sijaan ovat normaalisti pieniä, aromaattisia heterosyklisiä aineita, mikä puolestaan aiheuttaa voimakasta Raman-sirontaa. Näin ollen pieniäkin lääkemolekyyliä voidaan havaita Raman-spektroskopian avulla, vaikka lääkevalmisteessa aineiden suhde olisi jakautunut siten, että apuaineita olisi suhteellisesti enemmän kuin vaikuttavaa lääkeainemolekyyliä. Kolmatena voidaan mainita biologiset näytteet, joiden suuri vesipitoisuus voi häiritä IR-mittauksia, mutta vesi heikkona Raman-sironnan aiheuttajana ei peitä niin helposti mahdollisia liuostilassa olevien molekyylien Raman-värähtelyjen spektriä. Samalla tulee kuitenkin yleissääntönä, että molekyylin värähtelyt, jotka aiheuttavat voimakkaan IR-absorption, eivät yleensä näy juurikaan Raman-spektrin värähtelyissä, ja päinvastoin.

#### **4.2.1. Taustasignaalianalyysi**

Ennen varsinaisia mittaustuloksia esitettävissä kohdissa I) Taustasignaalianalyysi: Eika-erotteinen Raman (kuva 6) ja II) Taustasignaalianalyysi: Aika-erotteinen Raman

on koottu analyysi käytettyjen Raman-kokoonpanojen taustasignaaleista. Taustasignaalianalyysi on tarpeen suorittaa aina ennen muita Raman-mittauksia. Näin ollen saadaan tietoa siitä, millaisia signaaleja esimerkiksi näytekammiot, tyhjät mitta-astiat ja käytetyt liuottimet antavat. Tästä on kaksi etua. Ensinnä, määritettäessä mitattavaa molekyyliä sisältävän näytteen Raman-spektri, saadaan karkea yleiskuva siitä, mitkä spektrirakenteet aiheutuvat todennäköisesti tutkittavasta molekyylistä ja mitkä puolestaan ovat taustan aiheuttamia. Toiseksi, saaduista Raman-spektreistä voidaan erotella pois tilanteeseen parhaiten sopivan normalisoinnin jälkeen taustojen aiheuttamat signaalit. Näin ollen Raman-spesifiset spektrirakenteet, jotka kuvaavat tutkittavaa molekyyliä, saadaan erottumaan. Edelleen, tämä toimii pohjana myös esimerkiksi kvantitatiivisille määrittämisille. Näiden lisäksi saadaan hahmotettua jo ennen varsinaisia mittauksia, onko mittausjärjestelyjen optimoinnille tarvetta, mikäli taustasignaalianalyysissä ilmenee värähtelyjä, jotka saattavat häiritä tutkittavasta yhdisteestä peräisin olevaa, muutenkin helposti peittyvää Raman-signaalia.

### I) Taustasignaalianalyysi: Ei-aika-erotteinen Raman



**KUVA 6:** Ei-aika-erotteisen Raman-laitteiston taustasignaalianalyysi

## II) Taustasignaalianalyysi: Aika-erotteinen Raman

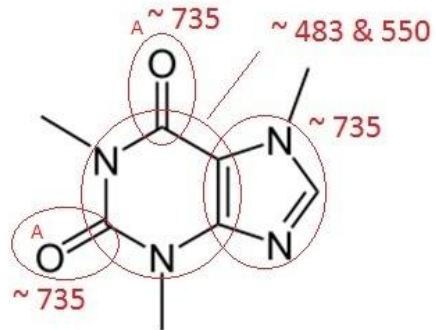
Tehdyissä aika-erotteisissa mittauksissa näyte ei sijainnut varsinaisessa näytekammiossa ja mittausten ajan käytettiin koko ajan suojalaseja. Näin ollen 'näytekammio'-mittaukselle ei ollut tarvetta. Edelleen, mitattaessa pelkän tyhjän lasipullon ja puskuriliuosta (50 mM PBS-liuos) sisältäneen lasipullon aika-erotteinen Raman-spektri, ei havaittu relevanttia signaalia. Näin ollen ei koettu myöskään tarpeelliseksi mitata erikseen pelkän lasipullossa olevan Milli-Q-veden spektriä, koska vesi on tunnetusti heikko Raman-sironnan aiheuttaja. Milli-Q-veteen valmistetun PBS-puskuriliuoksen mittausta voidaan pitää lähestulkoon samana, kuin pelkän Milli-Q-veden mittausta. Koska signaalia ei havaittu puskuriliuoksesta, pelkkä vesi heikkona Raman-sironnan aiheuttajana ei olisi myöskään saanut aikaan havaittavaa signaalia. Aaltolukualueen kalibroinnin tarkistukseen käytettiin niin ikään aika-erotteisessa mittauksessa sykloheksaania, jonka spektriipiikit olivat jokaisella mittauskerralla oikeilla paikoillaan.

### 4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi

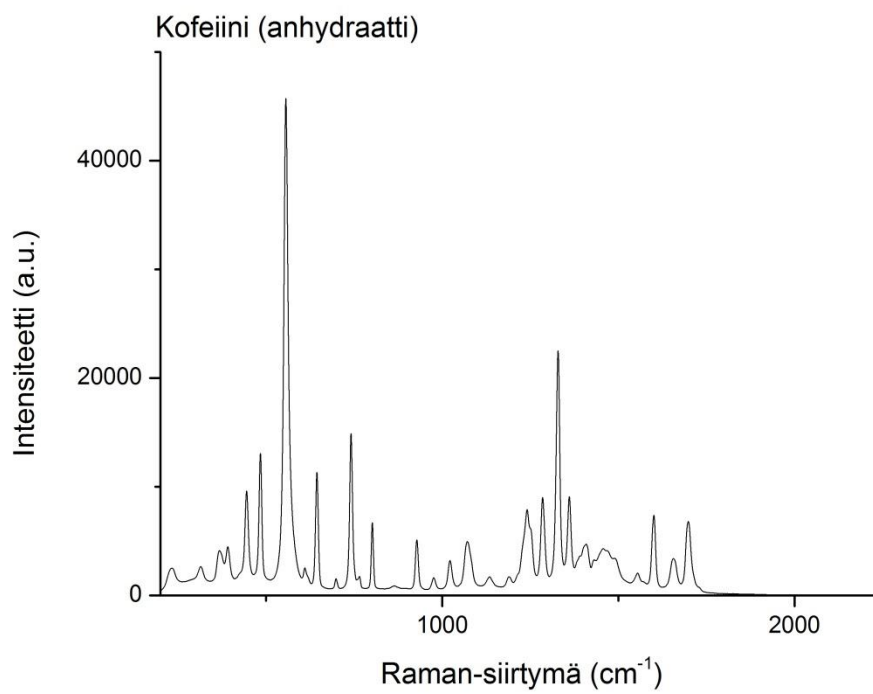
Seuraavassa esitetään tutkittavat puhtaat kiinteät lääkeaineet sekä niiden konventionaalilla Raman-laitteistolla mitatut spektrit (kuvat 7-18). Jokaisen lääkeaineen yhteyteen on liitetty aineen molekyyli rakenne ja merkitty kuviin vetysidosten vastaanottajakohdat molekyyleissä (A). Lääkeaineiden molekyyli rakenteisiin on merkitty punaisella ympyrällä alueita. Alueet merkitsevät niitä rakenteita, joista tässä tutkimuksessa valittujen, kullekin aineelle ominaisten Raman-spektrin piikkien on tulkittu olevan peräisin. Tulkinnessa on käytetty joko kirjallisuudessa esitettyjä tietokonelaskelmiin ja kokeellisiin menetelmiin perustuneita määrittämiä. Kun määrittämiä ei ollut löydettävissä (ranitidiini), piikkien alkuperän määrittäminen suoritettiin kappaleessa 4.1. kuvatulla tavalla. Konventionaaliset Raman-mittaukset suoritettiin

melko vakiolämpöisessä ja kosteudeltaan tasaisessa laboratoriotilassa. Spektrit mitattiin aaltolukualueella  $0 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$  ja detektorin integrointiaika vaihteli mittauksesta riippuen välillä  $0.1 \text{ s} - 1 \text{ s}$  ja spektrit ovat 3 peräkkäisen mittauksen keskiarvospektrit jokaisen yhdisteen osalta.

## Kofeiini

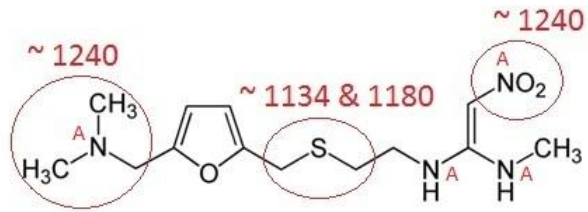


**KUVA 7:** Kofeiinin molekyylirakenne

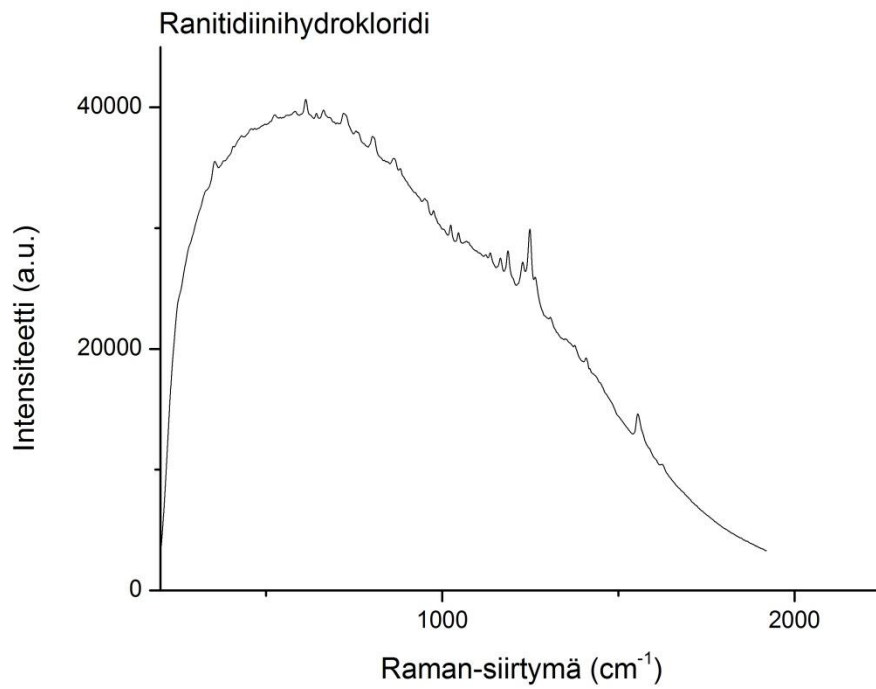


**KUVA 8:** Kiinteän kofeiinin Raman-spektri

## Ranitidiinihydrokloridi

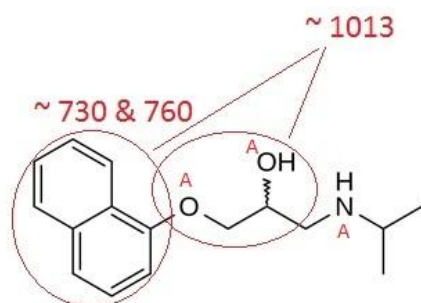


**KUVA 9:** Ranitidiinihydrokloridin molekyyli rakenne

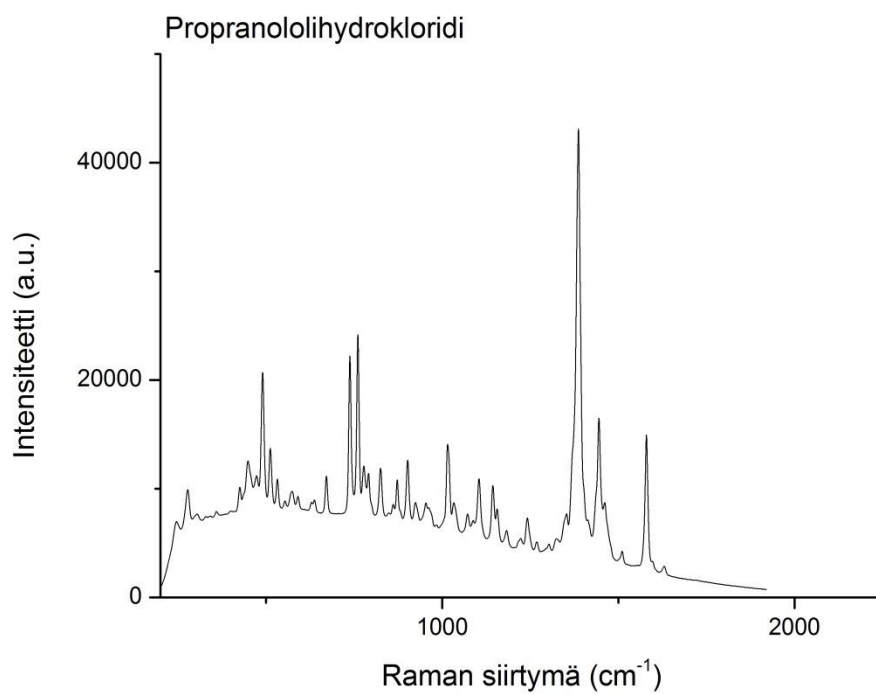


**KUVA 10:** Kiinteän ranitidiinihydrokloridin Raman-spektri

## Propranololihydrokloridi

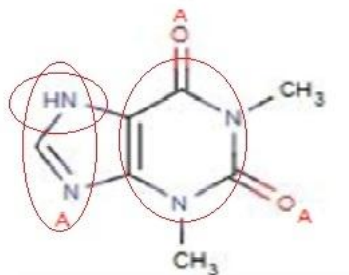


**KUVA 11:** Propranololihydrokloridin molekyyli rakenne

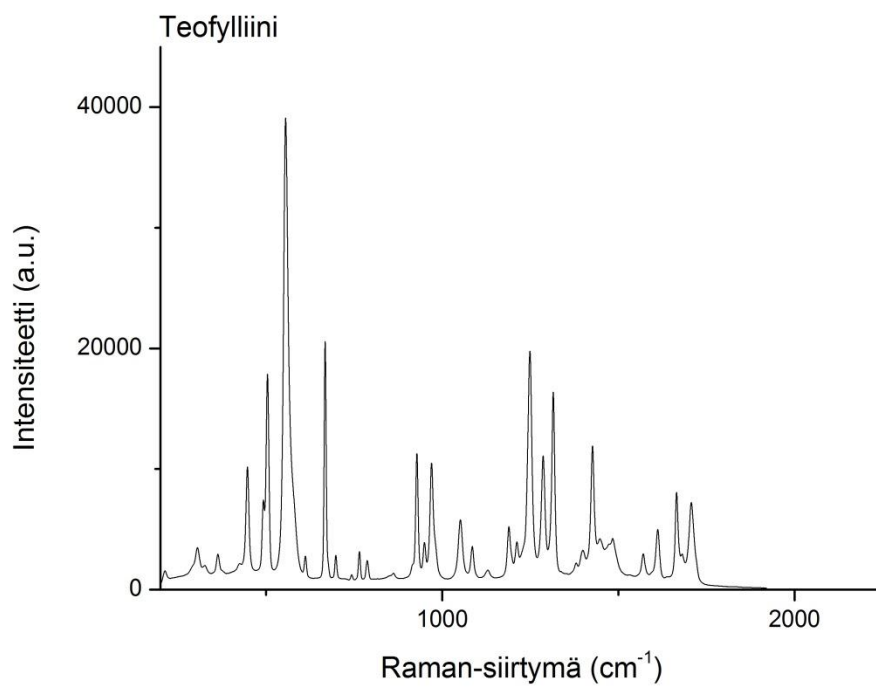


**KUVA 12:** Kiinteän propranololihydrokloridin Raman-spektri

## Teofylliini



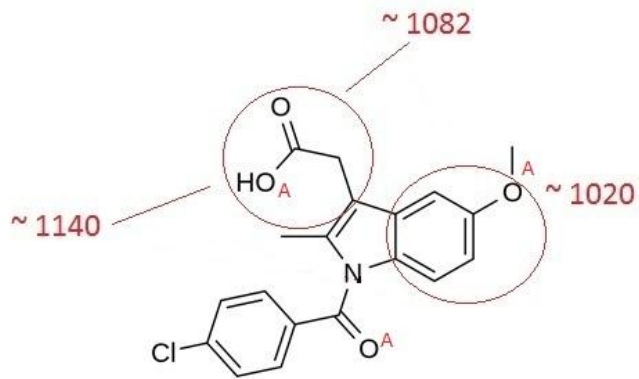
**KUVA 13:** Teofylliinin molekyyli rakenne



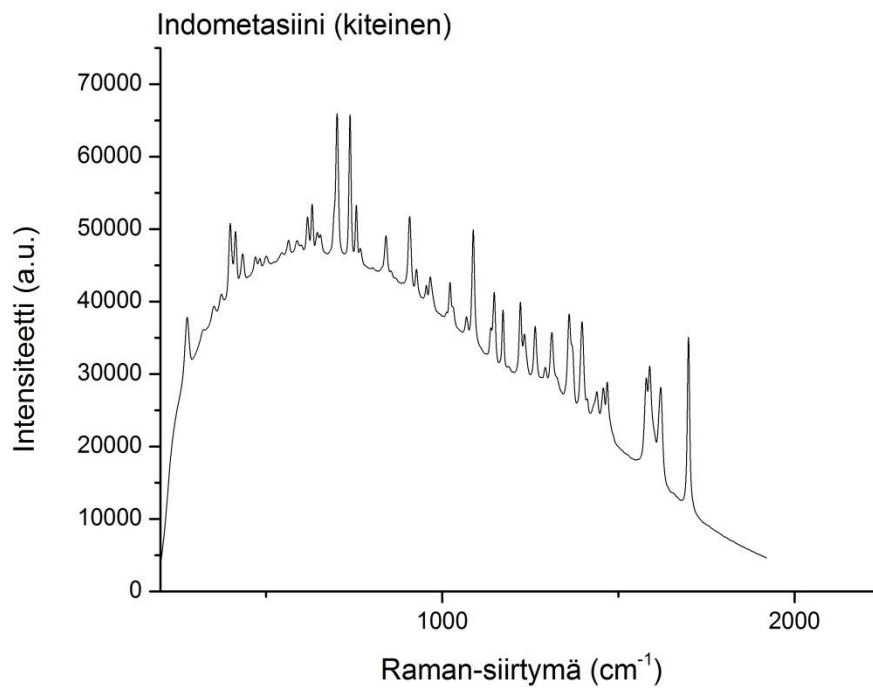
**KUVA 14:** Kiinteän teofylliinin Raman-spektri



## Indometasiini kiteinen

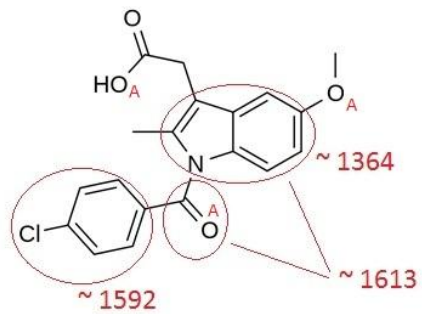


**KUVA 15:** Kiteinen indometasiini (sama molekyyli rakenne kiteiselle ja amorfiselle)

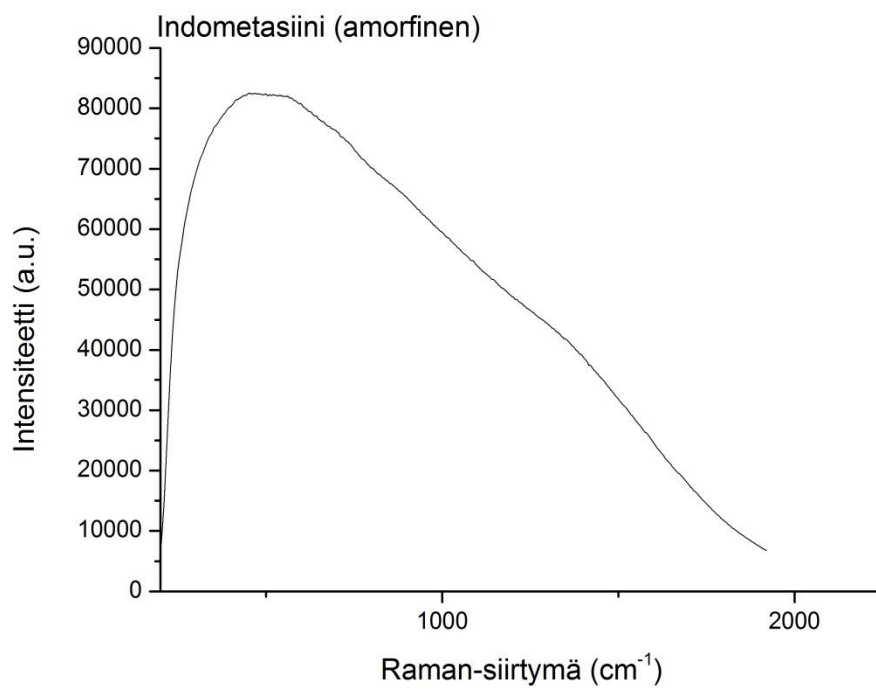


**KUVA 16:** Kiteisen indometasiinin Raman-spektri

## Indometasiini amorfinen



**KUVA 17:** Amorfinen indometasiini



**KUVA 18:** Amorfisen indometasiinin Raman-spektri

Mitattujen spektrien piikit ovat **yhteenvetotaulukoissa 1** liitteessä 4.2.2. Puhtaan kiinteän aineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi. Kaikkia yllä esitetyissä kuvissa 7-18 näkyviä spektrien piikkejä ei ole taulukoitu. Taulukoinnin perusteena on ollut seuraava luokittelu:

a) mitattu ja kirjallisuuden lähteessä aiemmin määritetty piikki sijaitsevat valitun aaltolukutoleranssin ( $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ ) sisäpuolella, jolloin voidaan ajatella, että spektripiikit ovat vastaavat

tai

b) tulkinta on tehty tämän tutkimuksen luvusta 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset sekä liitteestä 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset löytyvien Raman-tulkintataulukoiden 1-5 pohjalta. Tässä tutkimuksessa ei esitetä yksityiskohtaisia laskelmia tutkittujen lääkeaineiden atomien välisten värähtelytilojen energioille, eikä myöskään käytetä esimerkiksi tietokoneella suoritettavia laskentamenetelmiä värähtelyä aiheuttavien molekyyliarakenteiden tunnistamiseen. Näin ollen tulkinnalla b) tehdyt arviot värähtelyjen perustana olevista molekyylien rakenteista perustuvat monomeerimuotoisten molekyylien kuvissa 7-18 esitettyjen rakennekaavojen tarkasteluun. Kuvien 7-18 molekyylien rakennekaavoihin on merkitty ehdotetut värähtelyjen aiheuttajat **punaisella ympyrällä**.

### 4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista

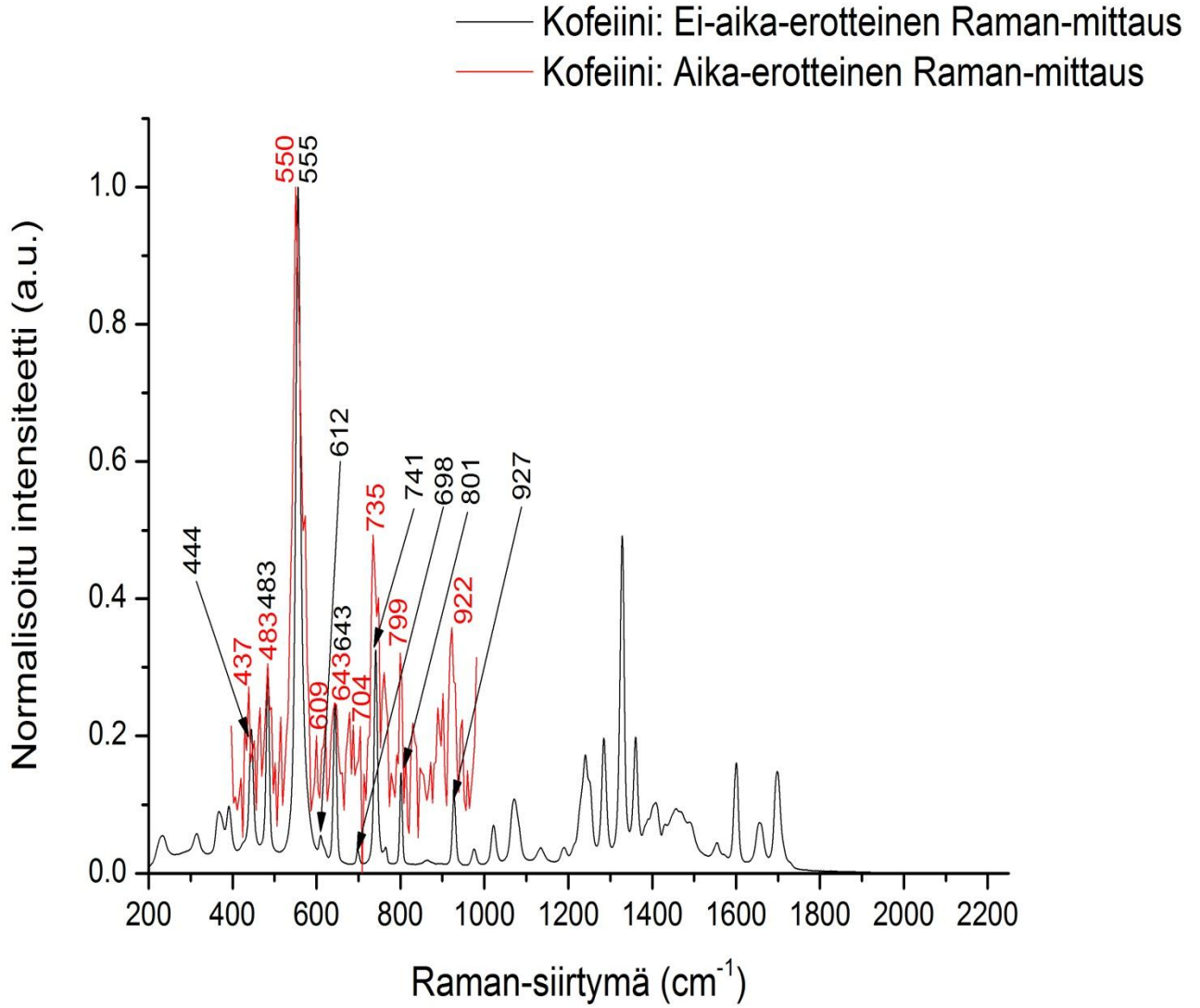
Kiinteillä lääkeaineilla tehtyjen mittausten perusteella valitaan 4 lääkeainetta mitattavaksi aika-erotteisella Raman-laitteistolla. Valitaan ranitidiinihydrokloridi, kofeiini (anhydraatti), propranololihydrokloridi ja indometasiini kiteisenä sekä amorfisena muotona. Näin ollen saadaan mitattavaksi ei-fluoresoiva aine sekä tämän tutkimuksen kannalta keskeisenä tekijänä fluoresoivia rakenteita sisältäviä aineita.

Kofeiini on ei-fluoresoiva aine, jonka spektrissä on havaittavissa selviä molekyylirakennetta osoittavia Raman-spektriipiikkejä. Raman-laitteiston kalibroinnissa verrataan kalibroitavalla laitteistolla mitattavia Raman-spektrin piikkejä jonkin Raman-spektriltään hyvin tunnetun aineen piikkeihin. Nyt ei ole kysymys validoidusta kalibroinnista, mutta mittaamalla spektriltään selkeä ja tunnettu kofeiini aluksi, saadaan välittömästi informaatiota mahdollisista laitteiden ja kokoonpanojen eroista, jotka saattavat näkyä esimerkiksi aaltolukujen välisinä eroina vahvojen, molemillä laitteilla mitattujen spektrien välillä. Muista valituista lääkeaineista ranitidiini vaikuttaa konventionaalisen mittauksen perusteella fluoresoivalta, samoin propranololi jossakin määrin. Indometasiinin puhtaan kiteisen muodon ei tulisi fluoresoida, mutta konventionaalisisessa mittauksen tuloksen mukaan (kuva 16) fluoresenssiä tapahtuu. Todennäköisin aiheuttaja tälle oli jokin fluoresoiva epäpuhtaus tai se, että tutkittava indometasiini ei ollut puhtaasti kidemuotoista. Sen sijaan amorfinen indometasiini osoittaa erittäin voimakasta fluoresenssia, kuten useissa tutkimuksissa on todettu. Näissäkin lääkeainemittauksissa fluoresenssitausta haittaa molekyylien hienorakennetta muutoin hyvin kuvaavan Raman-signaalin havainnointia. Aika-erottelulla on tarkoituksena saada vähennettyä tätä päällekkäisyyttä ja nostettua molekyylirakenteen tulkinnan kannalta oleellinen Raman-signaali vahvemmin esiin.

Kuvaajia ja taulukoita tarkasteltaessa on tarpeen huomioida myös se, että kuvaajiin on merkitty konventionaalisten mittausten (kuvaajissa **mustat numerot**) sekä aika-erotteisten mittausten (kuvaajissa **punaiset numerot**) spektreihin enemmän piikkejä, kuin taulukoissa on esitetty. Tämän tarkoituksena on näyttää, että käytetyllä aika-erotteisella laitteistolla voidaan mahdollisesti saada selville tarkemmin Raman-spektrin hienorakennetta, kuin käytetyllä konventionaalisella laitteistolla. Kysymykseksi muodostuu, ovatko merkityt piikit todellisuudessa peräisin tutkitun molekyylin rakenteiden aiheuttamista värähdystilojen muutoksista vai ovatko ne esimerkiksi laitteiston aiheuttamia artefakteja, toisin sanoen signaalissa esiintyvää kohinaa. Nämä tarkastelut ovat kuitenkin tässä käsiteltävän tutkimuksen aihepiirin ulkopuolella ja mielenkiinnon kohteita myöhempää laitekehitystä ja –optimointia silmällä pitäen.

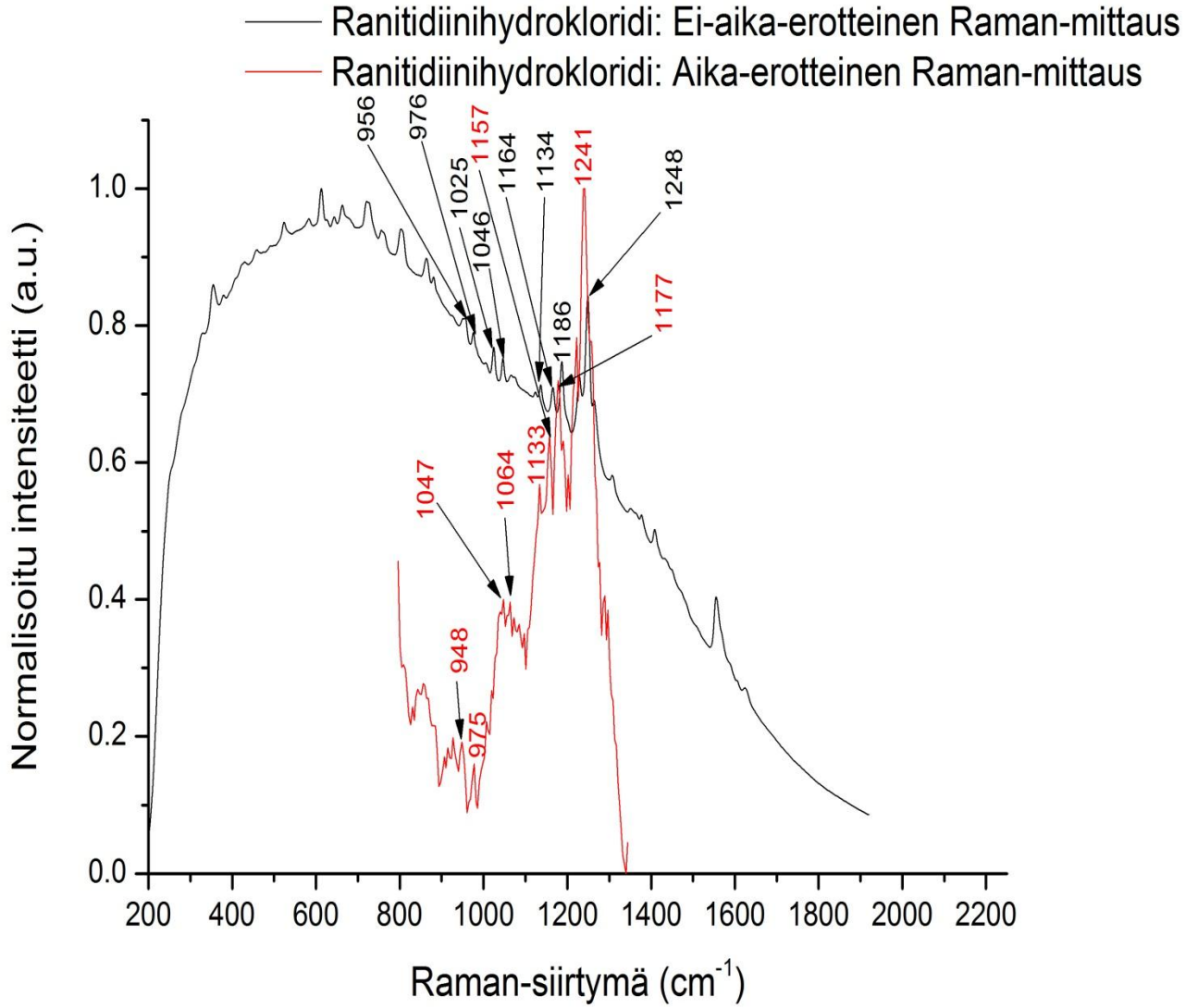
Seuraavassa esitetään valittujen kiinteiden lääkeaineiden Raman-spektrit mitattuna aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla (kuvat 18-22). Jokaiselle valitulle lääkeaineelle valittiin kiinnostava spektrin aaltolukualue, jolta saataisiin todennäköisimmin relevanttia Raman-signaalia ja näin ollen tietoa aineen molekyytirakenteesta. Perusteina aaltolukualueen valinnalle olivat kirjallisuus sekä aiemmin suoritettut konventionaaliset mittaukset. Mittaukset suoritettiin keskimäärin  $1.0 \cdot 10^8$ - $1.5 \cdot 10^8$  peräkkäisen mittauksen keskiarvona saadusta keräysdatasta. Kokonaismittausajat valituille kiinteille lääkeaineille olivat välillä 0.9h-2h.

## KOFEIINI



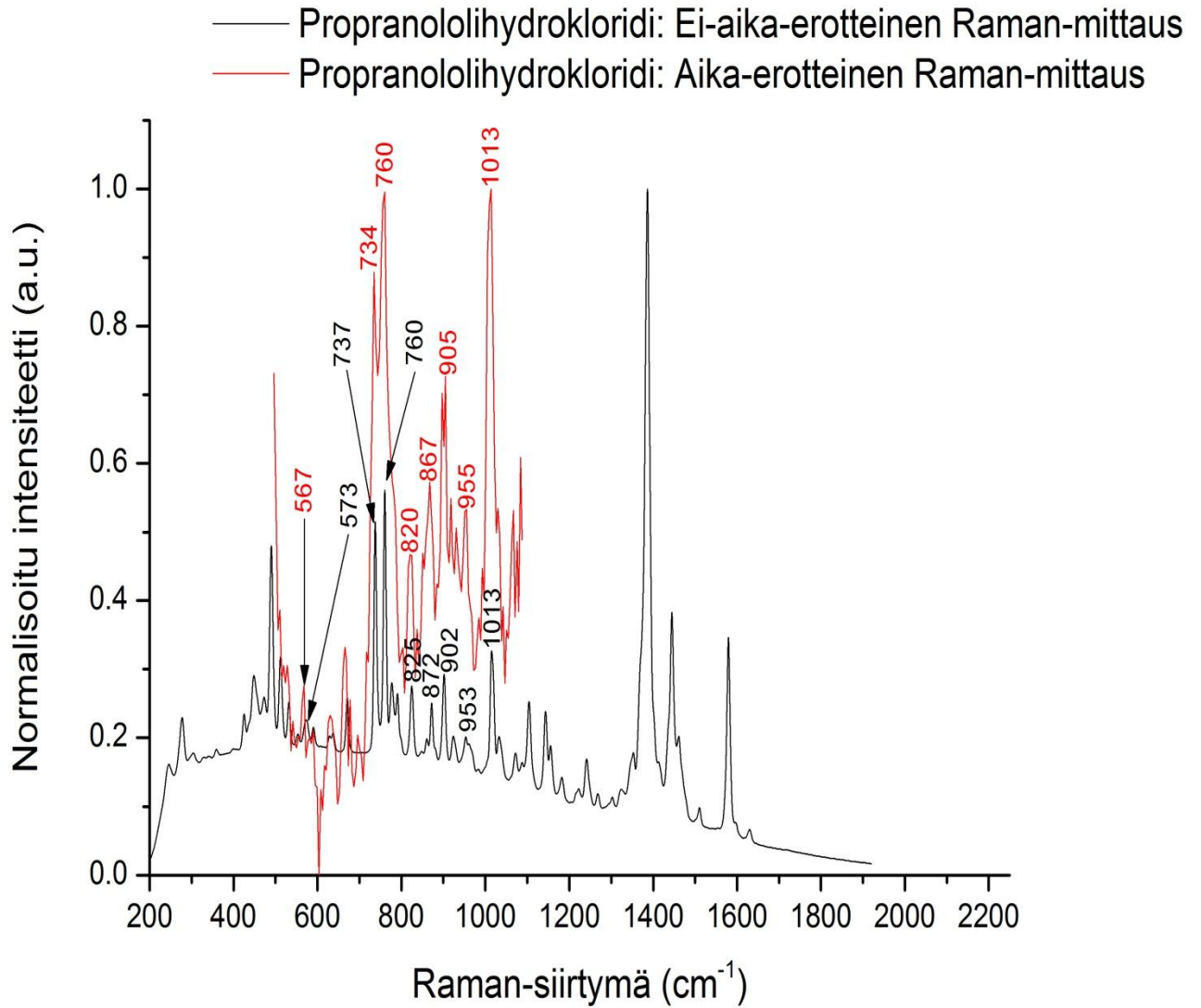
**Kuva 18:** Kofeiinin ei-aika-erotteinen ja aika-erotteinen Raman-spektri

## RANITIDIINI



**Kuva 19:** Ranitidiinihydrokloridin ei-aika-erotteinen ja aika-erotteinen Raman-spektri

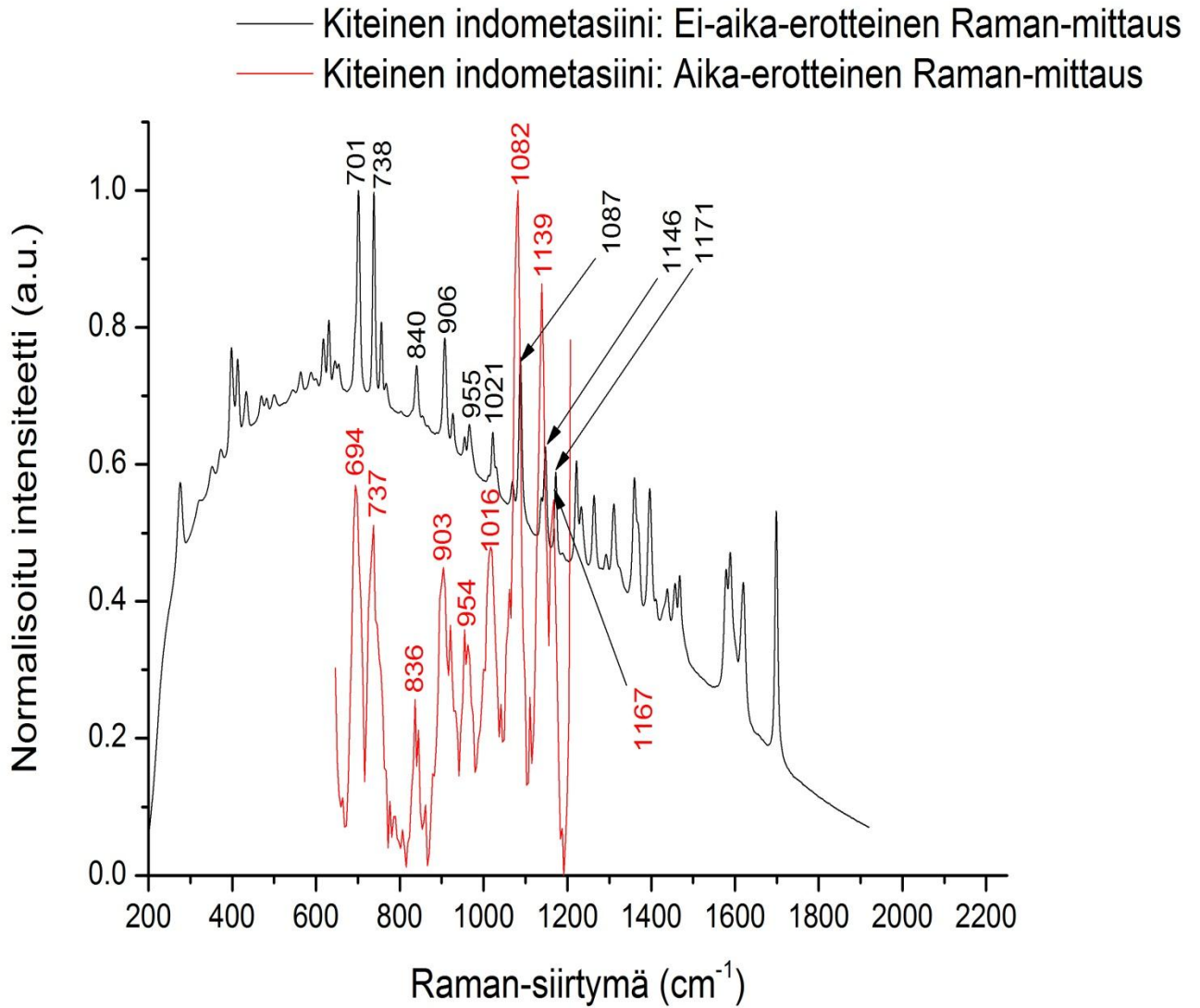
## PROPRANOLOLIHYDROKLORIDI



**Kuva 20:** Propranololihydrokloridin ei-aika-erotteinen ja aika-erotteinen Raman-spektri

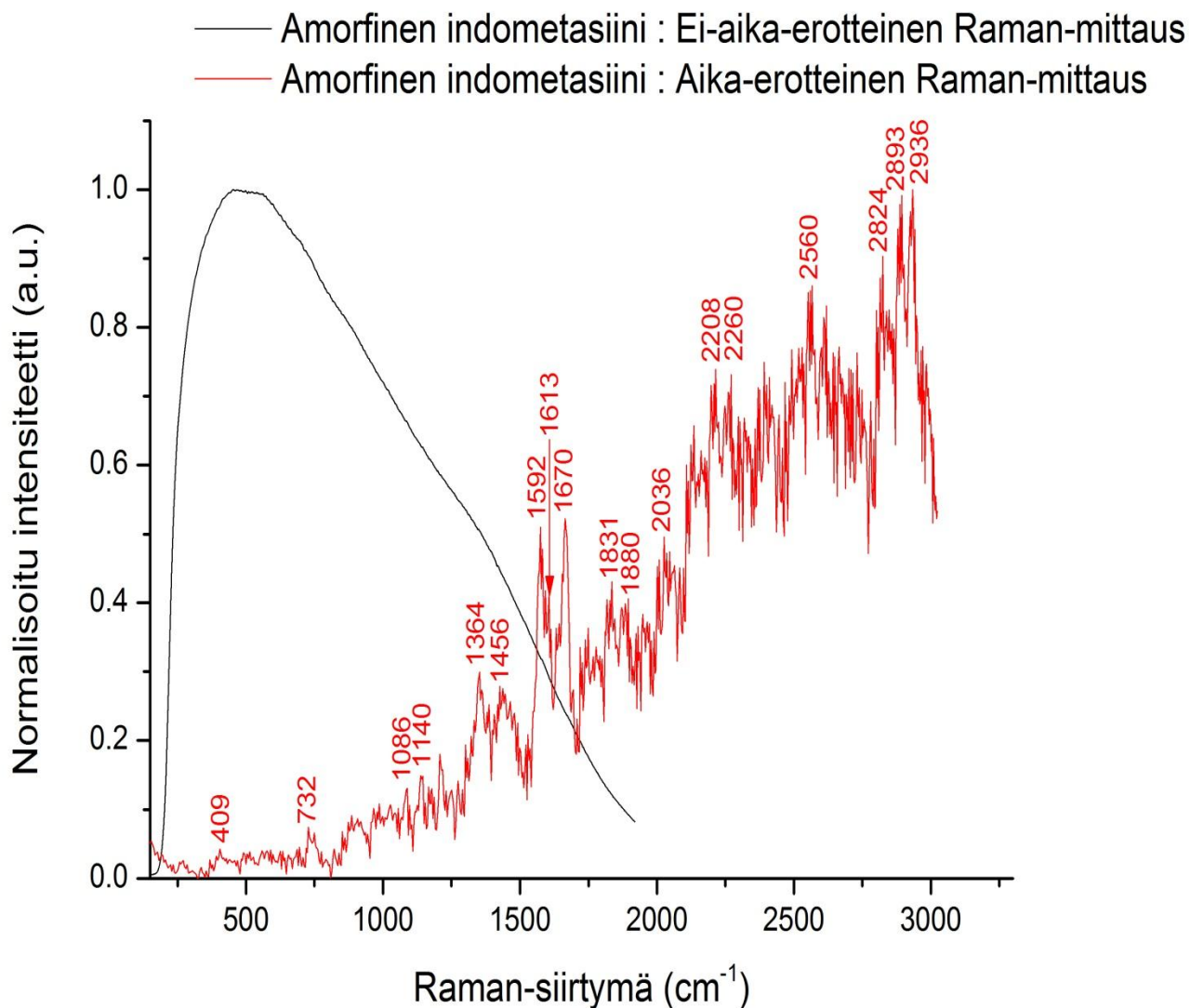


## INDOMETASIINI – KITEINEN



**Kuva 21:** Kiteisen indometasiinin ei-aika-erotteinen ja aika-erotteinen Raman-spektri

## INDOMETASIINI – AMORFINEN



**Kuva 22:** Amorfisen indometasiinin ei-aika-erotteinen ja aika-erotteinen Raman-spektri

Mitattujen konventionaalisten ja aika-erotteisten lääkeaineiden spektrien piikit ovat **yhteenvetotaulukoissa 2** liitteessä 4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista. Taulukoissa esitetään konventionaalisella Raman-mittauksella ja aika-erotteisella Raman-mittauksella määritettyjen, valittujen lääkeaineiden (ranitidiini, kofeiini, propranololi, indometasiini kiteisenä ja amorfisena) Raman-

siirtymien paikat aaltolukuina ( $\text{cm}^{-1}$ ) ilmaistuin. On valittu toleranssi ( $\Delta = \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ), jonka sisäpuolella mainituilla tavoilla mitattuja värähtelyspektrin piikkien sijainteja voidaan pitää vastaavina. Toleranssi on nyt hieman suurempi, kuin luvussa 4.2.2. valittu toleranssi ( $\Delta = \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ ). Tämä sen vuoksi, että mittauslaitteistojen kokoonpanot saattavat aiheuttaa siirtymiä mitattuihin aaltolukuihin. Esimerkiksi spektrometrien aaltolukualueiden kalibrointitavat, käytetyt heräte-lasereiden aallonpituuksien erot, heräte-lasereiden rakenteelliset erot (jatkuvan aallon tuottava heräte vs. pulssiheräte) sekä mittapäiden (engl. probe) ja keräyskuitujen erot voidaan lukea mahdollisiksi tekijöiksi eroavuuksissa. Tiukempi toleranssi oli valittu luvun 4.2.2. määrittäisiin myös siksi, että kyseiset määrittäykset toimisivat paremmin uudelle aika-erotteiselle laitteistolle referenssinä. Voidaan ajatella, että mahdollinen virheen kertaantuminen tulkinnoissa pyritään minimoimaan. Muutoin saatettaisiin valita tämän tutkimuksen ja vertailuaineistojen spektriipiikit liian helpoin perustein vastaaviksi. Tämän jälkeen siirrettäisiin virhe edelleen aika-erotteisella kokoonpanolla tehtyjen mittausten tulkintoihin, joissa on tarpeen myös valita sopiva toleranssi muun muassa laitteistokokoonpanojen aiheuttamille siirtymille spektreissä.

#### 4.4. Lääkeaineliuosten mittaukset

Lääkeaineiden liukoisuus on keskeisin tekijä valmistettaessa niistä liuoksia. Liukenemistapahtumille ja liukoisuusarvoille on olemassa lukuisia erilaisia ennustusmalleja (Elder ja Saal 2014). Lääketeollisuudessa lääkeaineiden heikkoliukoisuus asettaa usein haasteita uusien lääkemolekyylien tutkimukselle ja edelleen valmistettaville lääkeformulaatioille. Liukoisuuksien kokeellinen määrittäminen ja heikkoliukoisten aineiden liukoisuuden parantaminen ovat hyvin yleisiä tutkimuskohteita. Ihmiselimistöön sovellettuna suun kautta annostellun lääkeaineen pitää aluksi vapautua valmisteesta, eli sillä pitää olla riittävän hyvä liukoisuus, jotta sen biologinen hyötyosuus saataisiin riittävän suureksi ja näin ollen toivottu terapeuttinen vaikutus tapahtumaan. Liukoisuus voidaan määrittää kokeellisesti joko termodynaamisesti tai kineettisesti (Hoelke ym. 2009). Termodynaamisen liukoisuuden määrittämiseksi kiinteä aine liuotetaan veteen ja sen annetaan saavuttaa tasapaino. Kineettistä liukoisuutta määritettäessä lähtöaineena on jo etukäteen joko veteen tai esimerkiksi DMSO:n (dimetyylisulfoksidi) liuotettu yhdiste. Termodynaamista liukoisuutta pidetään yleensä yhdisteen niin sanottuna todellisena liukoisuutena. Se määritellään yhdisteen liukoisuudeksi silloin, kun yhdisteen liukenevan ja liukenemattoman osan välillä vallitsee tasapaino. Kineettinen liukoisuus huomioi yhdisteen saostumisen ja se määritellään pitoisuudeksi, jossa yhdisteen saostuminen alkaa. Lääkekehityksen kannalta oleellisempi näistä kahdesta on kineettinen liukoisuus. Sen avulla voidaan sopivaa mittausmenetelmää käyttäen arvioida, pysyykö esimerkiksi usein liukoisuusapuna käytettävään DMSO:n liuotettu yhdiste (vesi)laimennoksen jälkeen liuosfaasissa. Sekä termodynaamisen että kineettisen liukoisuuden määrittäminen perustuu kylläisen vesifaasin konsentraation mittaamiseen. Tämä voidaan tehdä mittaamalla UV-absorptiota käyttäen joko UV-menetelmiä tai korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC tai UPLC).

Näissä tutkimuksissa liuksina tutkitut lääkeaineet liuotettiin 50 mM pH 7.05 PBS-puskuriliuokseen. Suurempia liukoisuuksia, korkeampia liuoskonsentraatioita ja näin ollen todennäköisesti voimakkaampia Raman-signaaleja olisi ollut mahdollista saavuttaa liuosten mittauksissa käyttämällä esimerkiksi DMSO:ta liukoisuudenparantajana. Haluttiin kuitenkin jättää DMSO pois tutkimuksista, koska tutkimuksen osafokus oli aika-erotteisen laitteiston mahdollisuuksien tutkiminen elävillä soluilla toteutettaviin mittauksiin. Eri solulinjojen välillä on eroja, mutta ne pääsääntöisesti kestävät 3-5 % DMSO:n käytön. Lääketeollisuudessa käytetään useimmissa määryksissä DMSO:ta < 5% pitoisuudella liukoisuusapuna tutkittaessa heikkoliukoisten lääkeaineiden liukoisuutta.

Valmistetun liuksen liuostilan kontrollointi jollakin luotettavalla menetelmällä on erittäin oleellista mitattaessa liuksia. Useissa tutkimuksissa ja määryksissä, joissa mitataan erityyppisiä liuksia, tämä seikka jätetään kontrolloimatta. Liuosten silmämääräinen tarkastelu ei missään tapauksessa riitä, koska liuotettu molekyyli on saattanut alkaa muodostaa dynaamista tasapainotilaa ja aggregaatteja jo kauan ennen kuin silmän erotuskyky riittää havaitsemaan valoa vasten tarkasteltaessa näkyviä partikkeleja. Värillisten liuosten yhteydessä ongelma on tavallisesti vielä suurempi. Tämän tutkimuksen yhteydessä liuksia kontrolloitiin nefelometri-mittauksella, joka perustuu valon kulun muutoksiin tutkittavan väliaineen sisältämien partikkelien aiheuttamana (Hoelke ym. 2009). Lisäksi liukset suodatettiin 0.45 µm steriilisuodattimella mahdollisten epäpuhtauksien ja esimerkiksi liuottimen kiteytymisen varalta. Tämän kappaleen luvussa 4.5. esitetään eri Raman-kokoonpanoilla saadut mittaustulokset kofeiinin ja ranitidiinihydrokloridin PBS-liuoksista. Liuuksia mitattiin kontrolloimatta nefelometrillä, kontrolloimalla nefelometrillä, ei-suodatettuina ja suodatettuina. Luvussa 5. puolestaan analysoidaan edellä mainittujen tekijöiden vaikutusta ja tärkeyttä tehtyihin havaintoihin. Nämä havainnot toimivat taustatietona samalla laajempaa kokonaisuutta ajatellen. Tämä tutkimus toimii osana laajempaa kokonaisuutta, jossa halutaan kartoittaa optimaalisia mittaolosuhteita esimerkiksi dissoluutiotestaukseen tai biologisiin määryksiin aika-erotteisella Raman-laitteistolla.

Näin ollen nyt esitettäviä mittaustuloksia ja havaintoja voidaan hyödyntää jatkossa, jotta toteutettavien tutkimusten tuloksiin vaikuttavia häiriötekijöitä voitaisiin välttää.

#### **4.5. Lääkeaineliuosten mittaukset: Konventionaalinen Raman ja aika-erotteinen Raman**

Edellä suoritettujen mittausten perusteella oli tarkoituksenmukaista valita 2 melko erilaista ainetta liuoksiin: Heikommin veteen liukeneva (kofeiini) ja paremmin veteen liukeneva (ranitidiinihydrokloridi) sekä fluoresenssi-ominaisuuksiltaan eroavat aineet, ei-fluoresoiva (kofeiini) ja fluoresoiva (ranitidiinihydrokloridi).

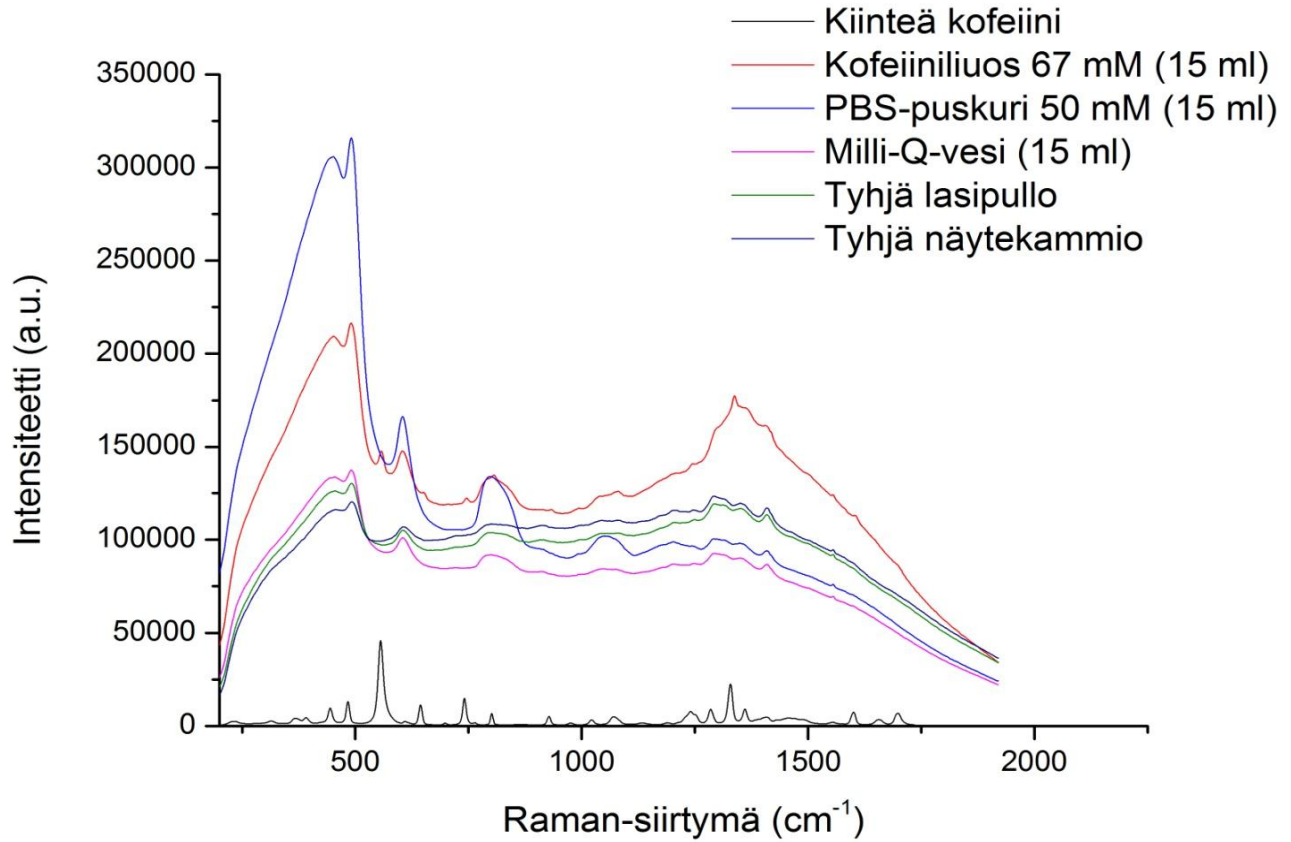
Aluksi esitetään konventionaalisella Raman-laitteistolla mitattujen kofeiini- ja ranitidiiniliuosten spektrit ja sen jälkeen aika-erotteisella Raman-laitteistolla mitattujen kofeiini- ja ranitidiiniliuosten spektrit. Kuvassa 23 ovat kootusti kiinteän kofeiinin, ei-suodatetun kofeiiniliuoksen (67 mM), käytetyn PBS-puskurin (50 mM, pH 7.05), Milli-Q-veden, tyhjän lasipullon ja tyhjän näytekammion konventionaaliset Raman-spektrit, kuvassa 24 ovat kerrosesityksenä samat spektrit järjestyksessä tyhjä näytekammio, tyhjä lasipullo, Milli-Q-vesi, PBS-puskuri (50 mM, pH 7.05), kofeiiniliuos (67 mM) ja kiinteä kofeiini. Seuraavaksi kuvassa 25 ovat ei-suodatettujen kofeiiniliuosten 3 eri konsentraation sarja (67 mM, 33.5 mM, 16.75 mM) konventionaalisella laitteistolla mitattuina. Tämän jälkeen kuvassa 26 ovat suodatettujen kofeiiniliuosten 3 eri konsentraation sarja (60 mM, 30 mM, 15 mM) konventionaalisella laitteistolla mitattuina. Mittausparametreina kaikissa mittauksissa oli 20 peräkkäisen mittauksen keskiarvona saatu Raman-spektri 5 s detektorin integrointiajalla. Ainoa poikkeus oli kofeiinin kiinteän muodon mittaus, jossa vastaavat arvot olivat 3 mittausta ja 1 s integrointiaika. Konventionaaliset mittaukset suoritettiin ilmastoidussa, lähes vakiolämpöisessä laboratorihuoneessa. Aika-erotteiset mittaukset suoritettiin laboratoriotilassa, jossa oli hieman vaihteleva lämpö- ja kosteustila. Kuvassa 27 ovat kootusti kiinteän ranitidiinin, ei-suodatetun ranitidiiniliuoksen (800 mM), käytetyn PBS-

puskurin (50 mM, pH 7.05), Milli-Q-veden, tyhjän lasipullon ja tyhjän näytekammion konventionaaliset Raman-spektrit, kuvassa 28 ovat kerrosesityksenä samat spektrit järjestyksessä tyhjä näytekammio, tyhjä lasipullo, Milli-Q-vesi, PBS-puskuri (50 mM, pH 7.05), ranitidiiniliuos (800 mM) ja kiinteä ranitidiini. Seuraavaksi kuvassa 29 ovat ei-suodatettujen ranitidiiniliuosten 3 eri konsentraation sarja (800 mM, 400 mM, 200 mM) konventionaalisella laitteistolla mitattuina. Tämän jälkeen kuvassa 30 ovat suodatettujen ranitidiiniliuosten 3 eri konsentraation sarja (100 mM, 50 mM, 25 mM) konventionaalisella laitteistolla mitattuina. Mittausparametreina kaikissa mittauksissa oli 20 peräkkäisen mittauksen keskiarvona saatu Raman-spektri 5 s detektorin integrointiajalla. Ainoa poikkeus oli ranitidiinin kiinteän muodon mittaus, jossa vastaavat arvot olivat 10 mittausta ja 0.5 s integrointiaika. Konventionaaliset mittaukset suoritettiin ilmastoidussa, lähes vakiolämpöisessä laboratorihuoneessa. Aika-erotteiset mittaukset suoritettiin laboratoriotilassa, jossa oli hieman vaihteleva lämpö- ja kosteustila.

Kuvassa 31 ovat aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla mitattu kofeiiniliuos ja kiinteän kofeiinin spektri aaltolukualueella  $\sim 400 \text{ cm}^{-1} - 1000 \text{ cm}^{-1}$ . Kuvassa ovat erojen havaitsemiseksi myös ei-aika-erotteisella laitteistolla mitatut kiinteän kofeiinin ja kofeiiniliuoksen spektrit aaltolukualueella  $\sim 200 \text{ cm}^{-1} - 2000 \text{ cm}^{-1}$ . Vastaavasti kuvassa 32 ovat aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla mitattu ranitidiiniliuos ja kiinteän ranitidiinin spektri aaltolukualueella  $\sim 900 \text{ cm}^{-1} - 1500 \text{ cm}^{-1}$  (liuos) ja  $\sim 800 \text{ cm}^{-1} - 1300 \text{ cm}^{-1}$  (kiinteä). Kuvassa ovat erojen havaitsemiseksi myös ei-aika-erotteisella laitteistolla mitatut kiinteän ranitidiinin ja ranitidiiniliuoksen spektrit aaltolukualueella  $\sim 200 \text{ cm}^{-1} - 2000 \text{ cm}^{-1}$ .

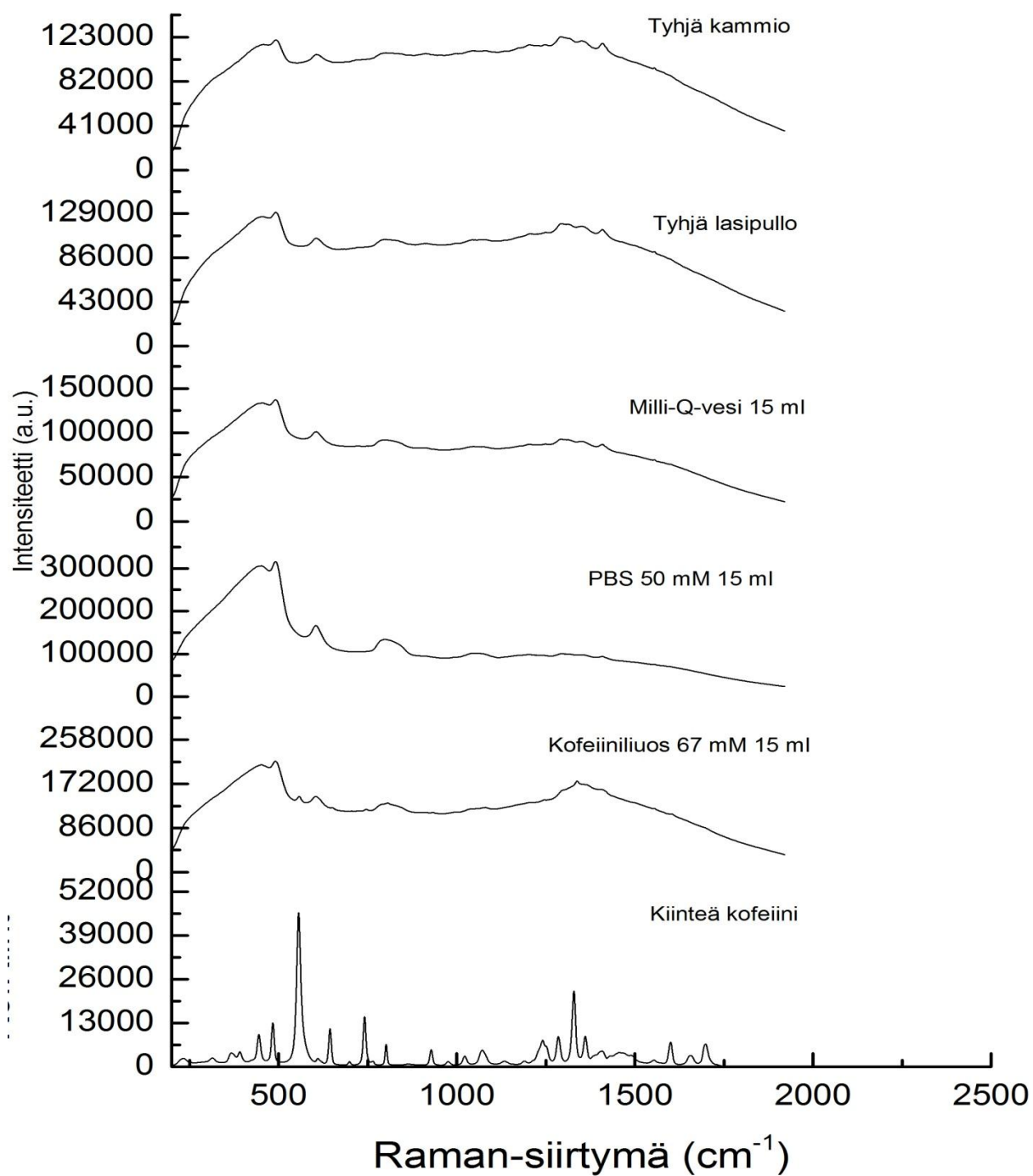
#### 4.5.1. Konventionaalinen Raman: Kofeiiniliuos

##### I) KONVENTIONAALINEN : KOFEIINI

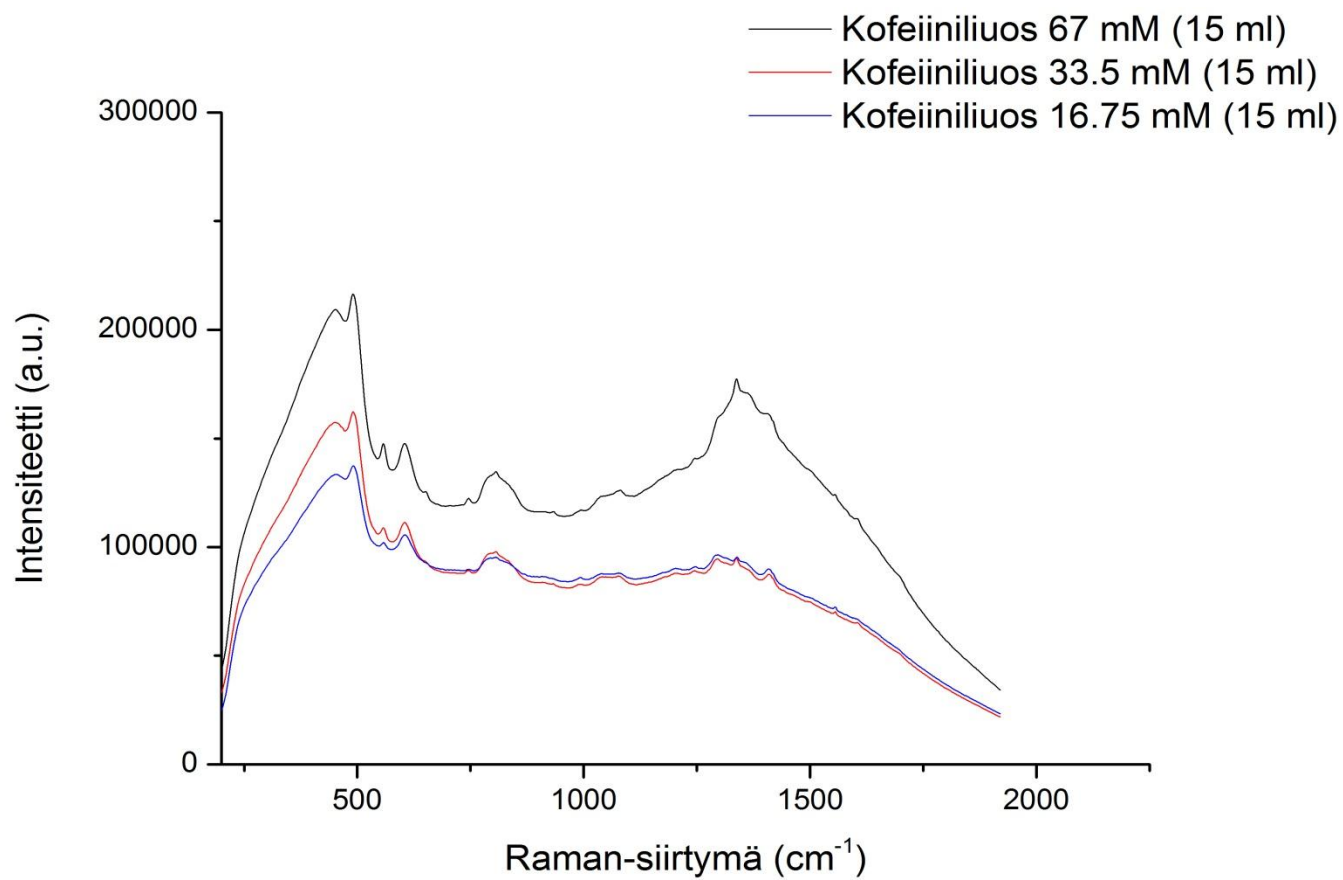


**KUVA 23:** Kofeiinin konventionaalinen Raman-spektri – liuos ja kiinteä (ei-suodatettu)

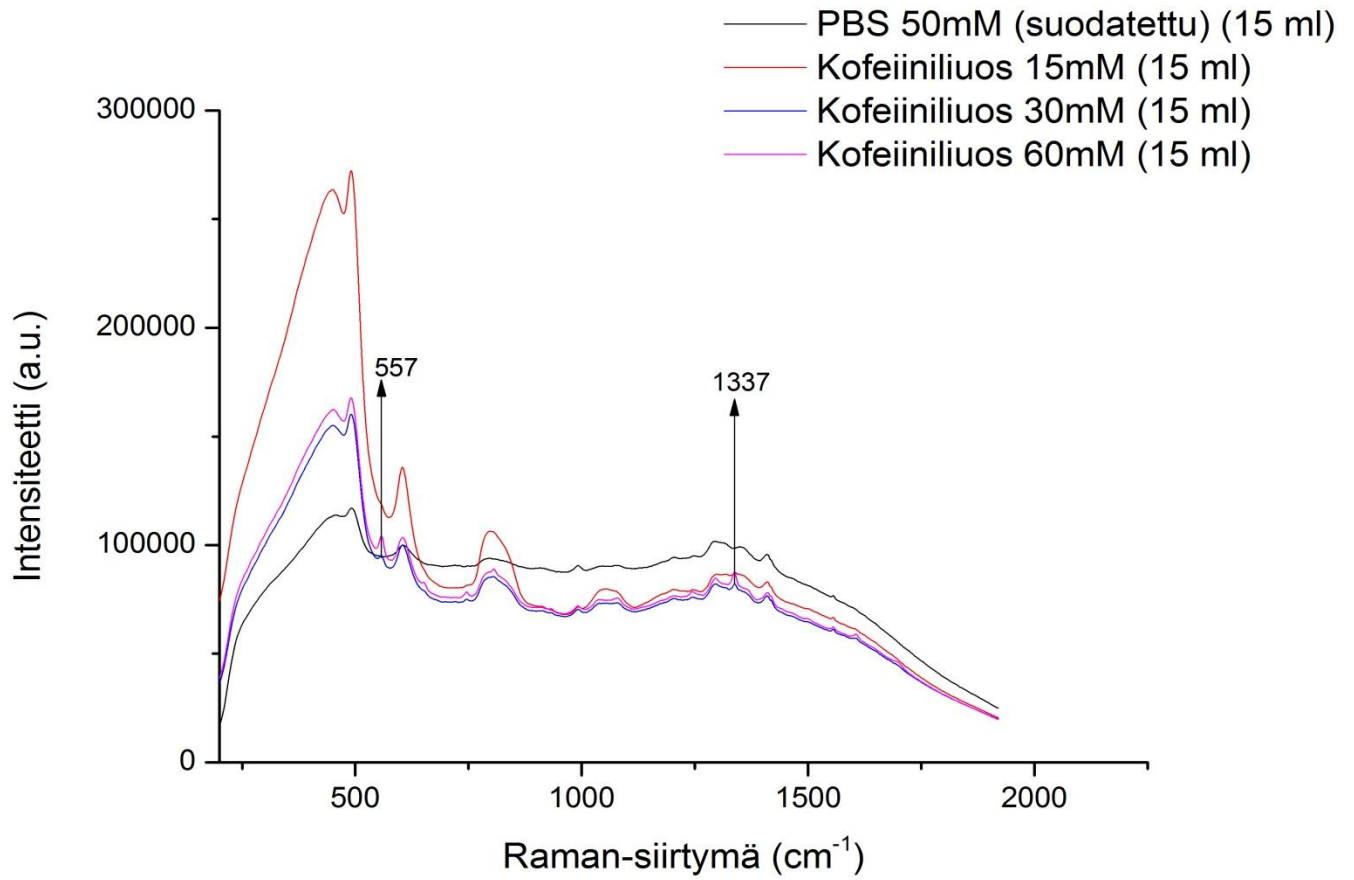




**KUVA 24:** Kofeiinin konventionaalinen Raman-spektri – liuos ja kiinteä (ei-suodatettu)



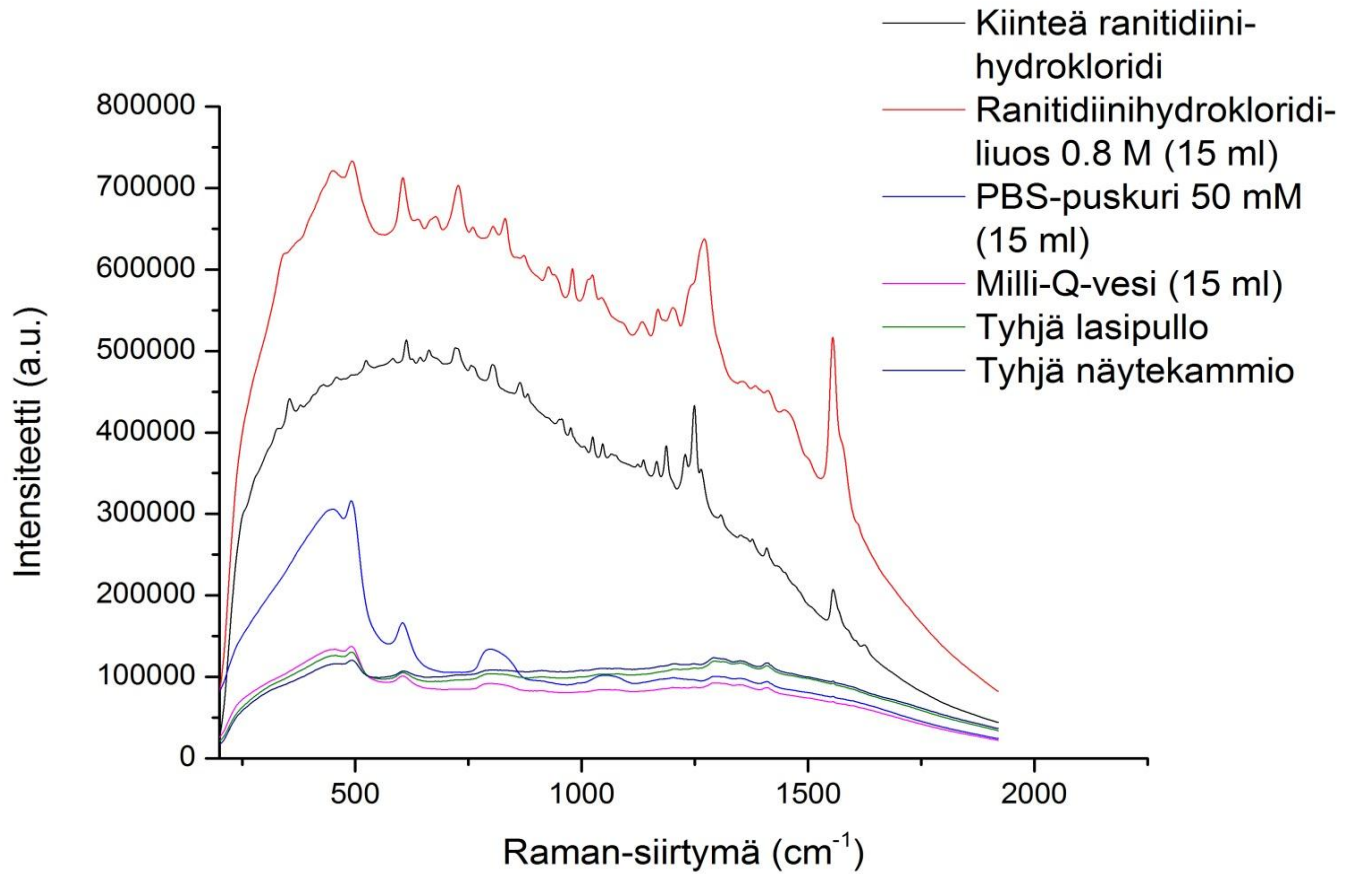
**KUVA 25:** Kofeiinin konventionaalinen Raman-spektri – 3 konsentraation liuosarja (ei-suodatettu)



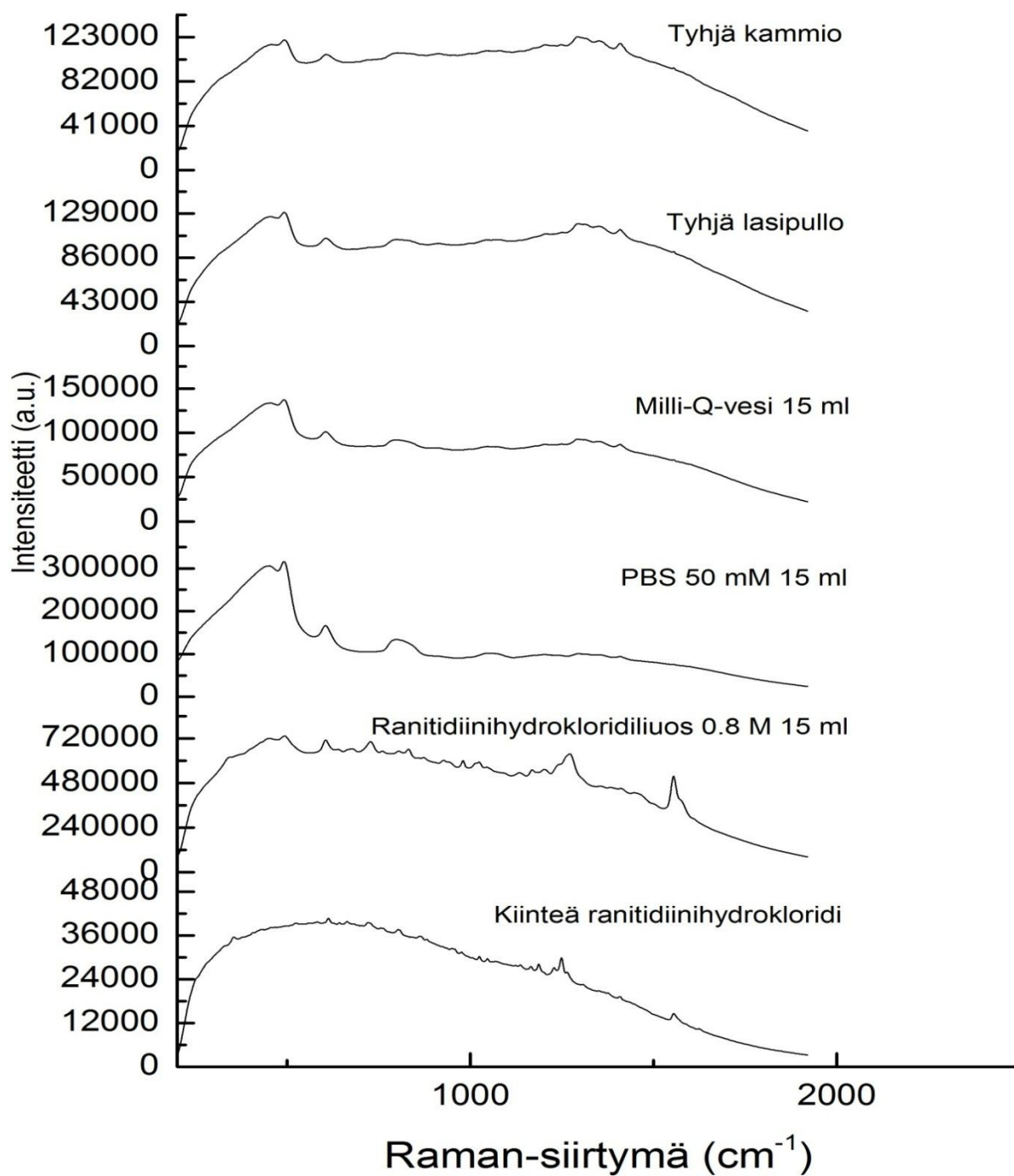
**KUVA 26:** Kofeiinin konventionaalinen Raman-spektri – 3 konsentraation liuosarja (suodatettu)

#### 4.5.2. Konventionaalinen Raman: Ranitidiinihydrokloridiliuos

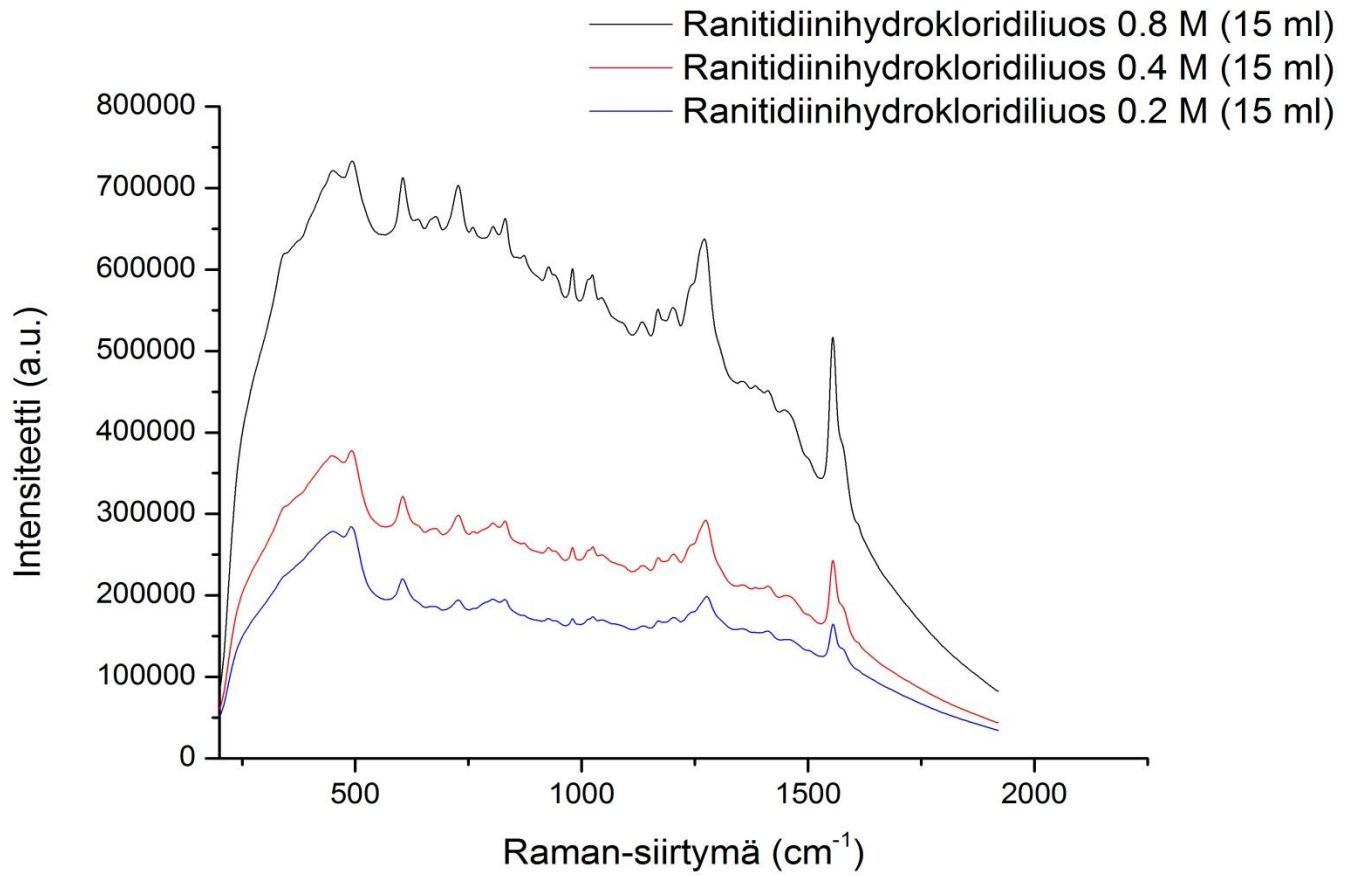
##### II) KONVENTIONAALINEN: RANITIDIINIHYDROKLORIDI



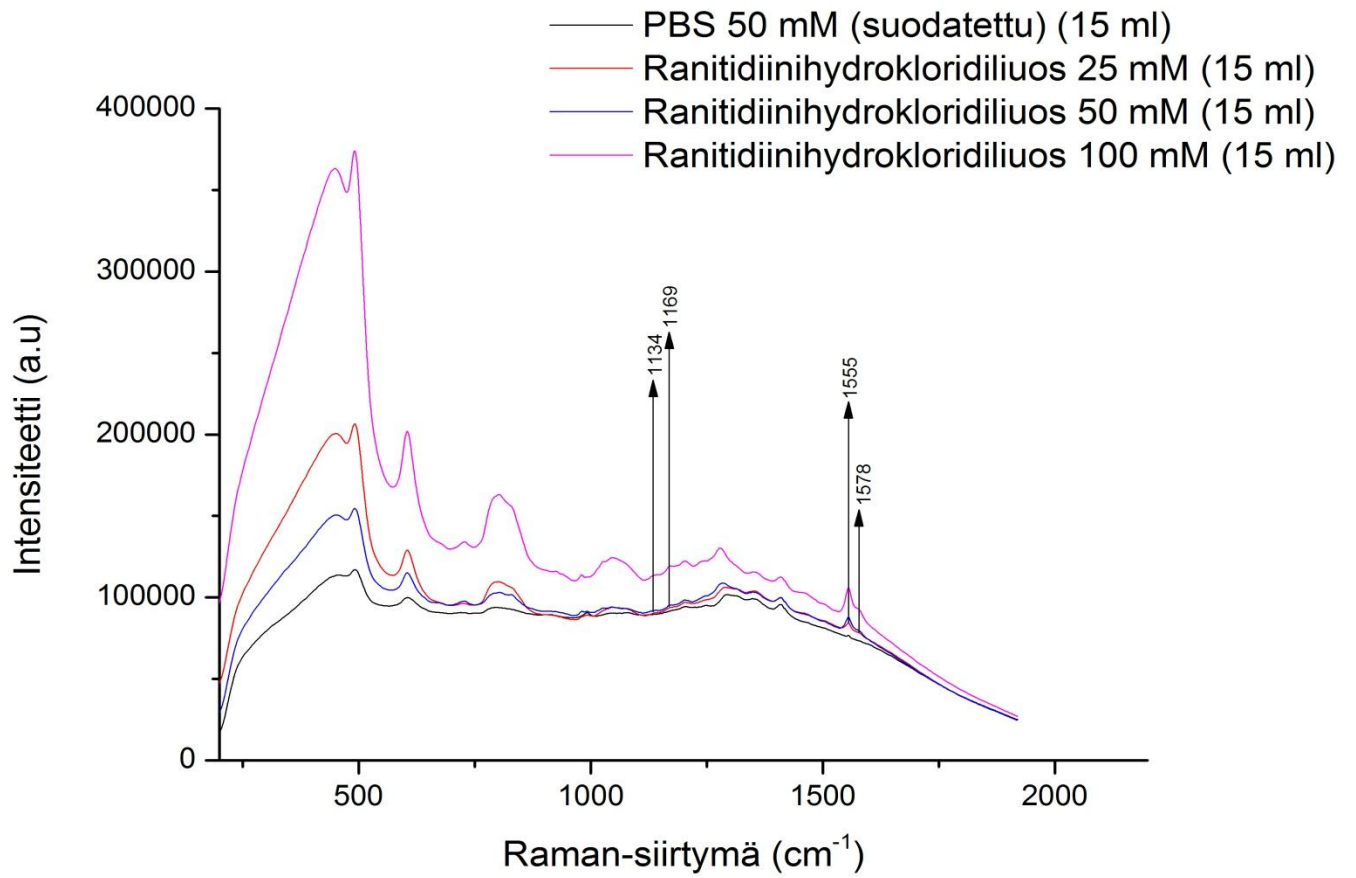
**KUVA 27:** Ranitidiinin konventionaalinen Raman-spektri – liuos ja kiinteä (ei-suodatettu)



**KUVA 28:** Ranitidiinin konventionaalinen Raman-spektri – liuos ja kiinteä (ei-suodatettu)



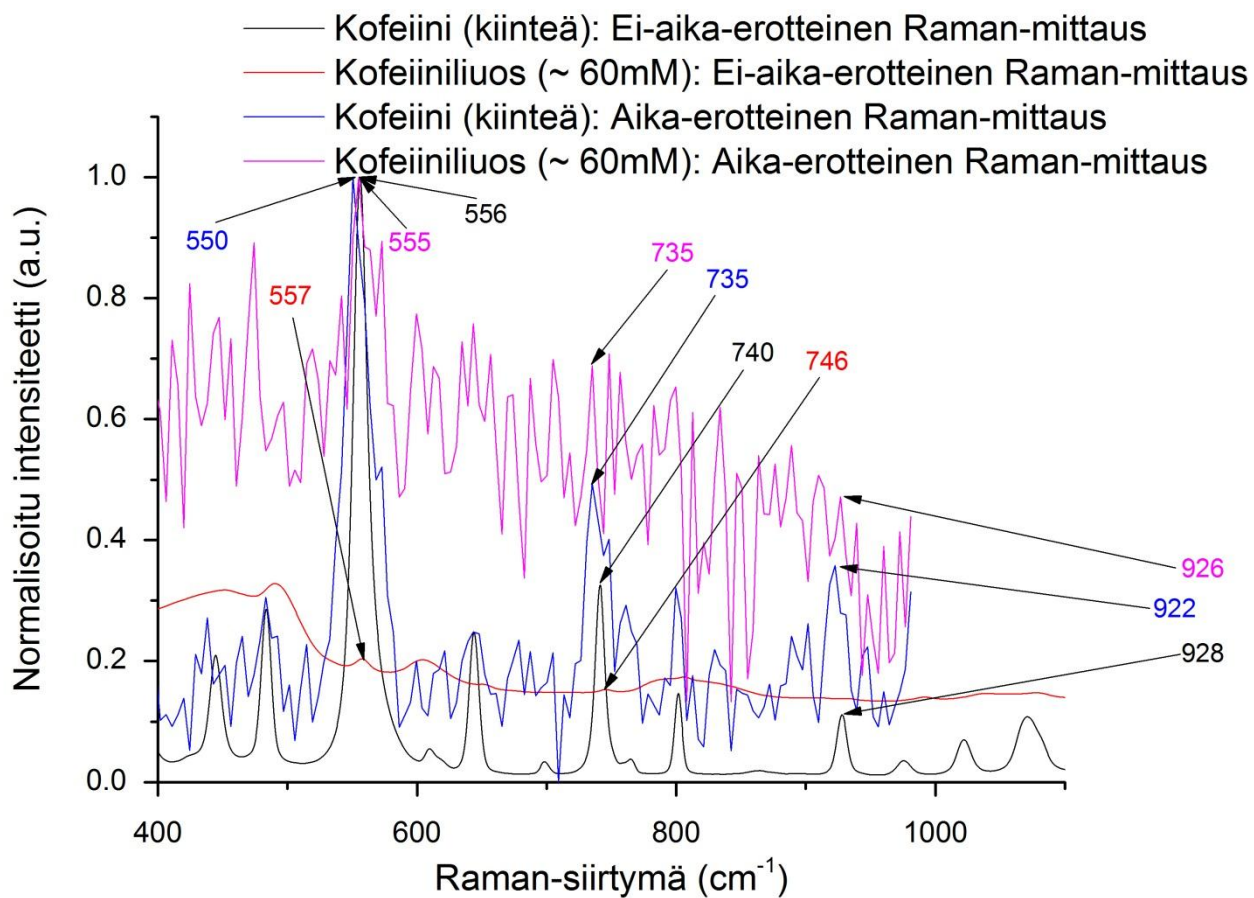
**KUVA 29:** Ranitidiinin konventionaalinen Raman-spektri – 3 konsentraation liuosarja ei-suodatettu)



**KUVA 30:** Ranitidiinin konventionaalinen Raman-spektri – 3 konsentraation liuossarja (suodatettu)

### 4.5.3. Aika-erotteinen Raman: Kofeiiniliuos

#### III) AIKA-EROTTEINEN: KOFEIINI

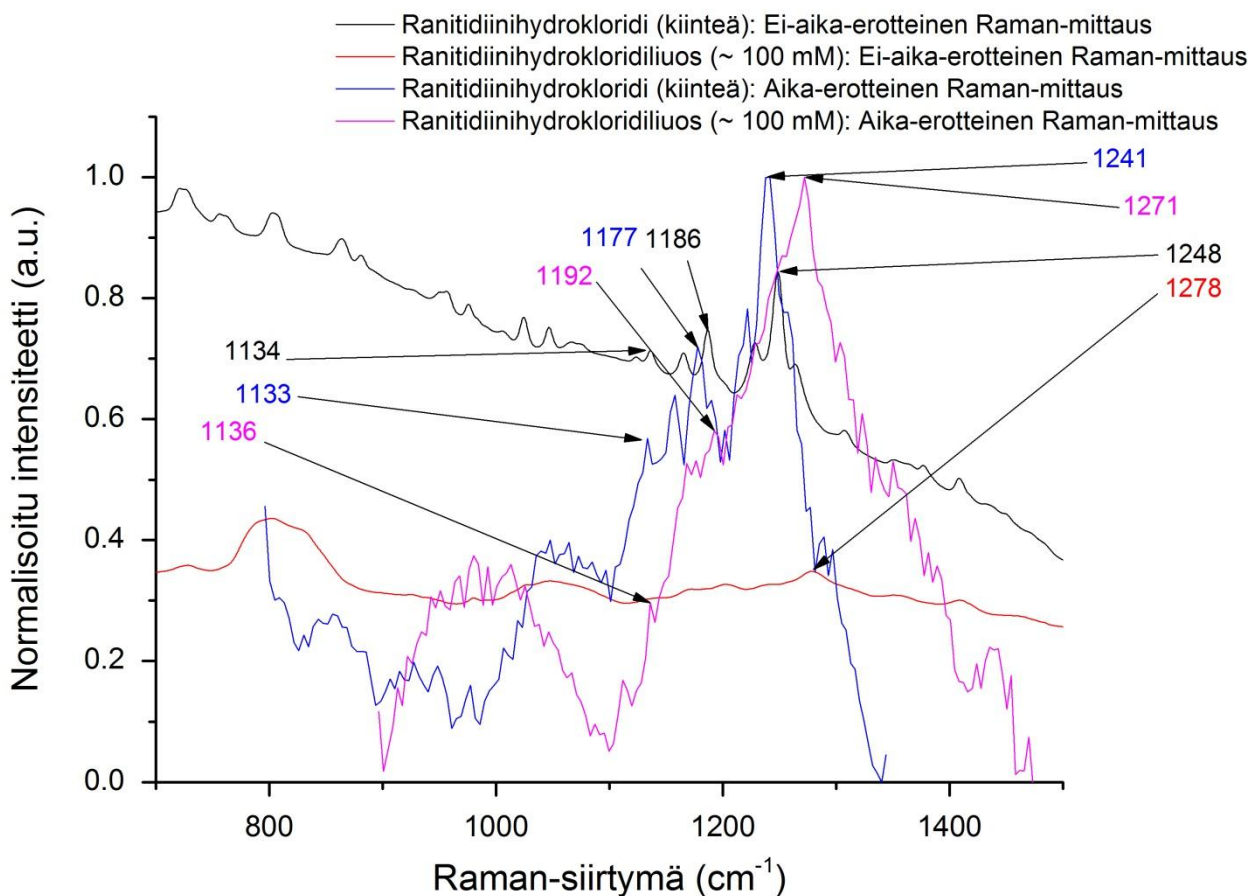


**KUVA 31:** Kofeiinin aika-erotteinen Raman-spektri - liuos ja kiinteä (suodatettu)



#### 4.5.4. Aika-erotteinen Raman: Ranitidiinihydrokloridiliuos

#### IV) AIKA-EROTTEINEN: RANITIDIINIHYDROKLORIDI



**KUVA 32:** Ranitidiinin aika-erotteinen Raman-spektri - liuos ja kiinteä (suodatettu)

## 5. TULOSTEN POHDINTA

Raman-spektroskopia on tehokas analyysimenetelmä molekyylien hienorakenteen selvittämiseen. Sillä on useita etuja verrattuna esimerkiksi infrapuna-spektrien määrittämiseen tai HPLC-analyysiin. Perustutkimuksissa Raman-laitteistolla voidaan

mitata nopeasti ja näytteeseen kajoamatta aineiden spektrejä lähes missä tahansa aineen olomuodossa. Lisäksi laitteistojen korkea muokattavuus antaa mahdollisuuden esimerkiksi konfokaalimikroskopian hyödyntämiseen. Raman-spektroskopian yleistymisen hidasteena ovat osittain saattaneet olla saadun spektridatan käsittelyn ja tulkinnan hankaluudet. Suurempana ongelmana on kuitenkin tähän asti ollut fluoresenssi-ilmiö. Raman-spektroskopian mahdollisuudet ovat lähes rajattomat esimerkiksi lääketeollisuuden prosessianalytiikassa ja erilaisissa biologisissa määrittelyissä *in vitro* sekä *in vivo*. Lääkeaineet ovat kuitenkin usein molekyyliarakenteeltaan sellaisia, että ne aiheuttavat Raman-sironnan ohella voimakasta fluoresenssia. Lisäksi muun muassa *in vitro* suoritettavissa, elävillä soluilla tehtävissä määrittelyissä solujen aiheuttama fluoresenssi häittää esimerkiksi lääkeaineiden kinetiikan tutkimuksia.

Raman-tekniikka perustuu tutkittavien molekyylien atomien värähtelytilojen muutoksiin, ja niistä seuranneisiin muutoksiin molekyylien elektroniverhon polaroituvuudessa, kun molekyyliä viritetään sopivalla heräte-energialla. Ilmiö on kuitenkin hyvin harvinainen ja sen lisäksi heräte-energia saa aikaan molekyyliessä muita samanaikaisia kvanttimekaanisia muutoksia. Muun muassa infrapuna-absorptio, molekyylin oma-absorptio (engl. self-absorption) sekä fluoresenssi ovat kilpailevia ilmiöitä. Osa herätteen fotoneista kuitenkin siroaa epäelastisesti näistä huolimatta ja kyseisiä fotoneja pyritään havaitsemaan. Tässä tutkimuksessa pyrittiin integroimaan laitekehitystä, sovelluskohteiden kartoitusta ja kehitetyn tekniikan toimivuuden arviointia erilaisille sovellusalueille. Sovellusalueiden pohdinnan lähtökohtina olivat tässä tutkimuksessa kiinteiden lääkeaineiden mittaukset ja lääkeaineliuosten mittaukset. Tällä tavoin pyrittiin arvioimaan uuden tekniikan tehokkuutta ja mahdollisuuksia esimerkiksi lääkekehityksen tai solututkimusten tarpeisiin.

Tutkimuksessa käytettiin perinteisellä CCD-detektoritekniikalla ja jatkuvan aallonpituuden laser-herätteellä toimivaa Raman-kokoonpanoa sekä uutta aika-

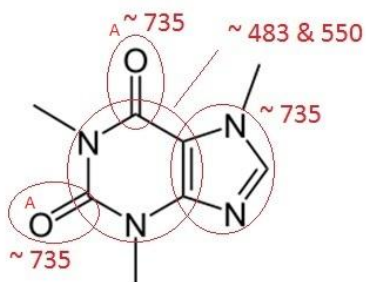
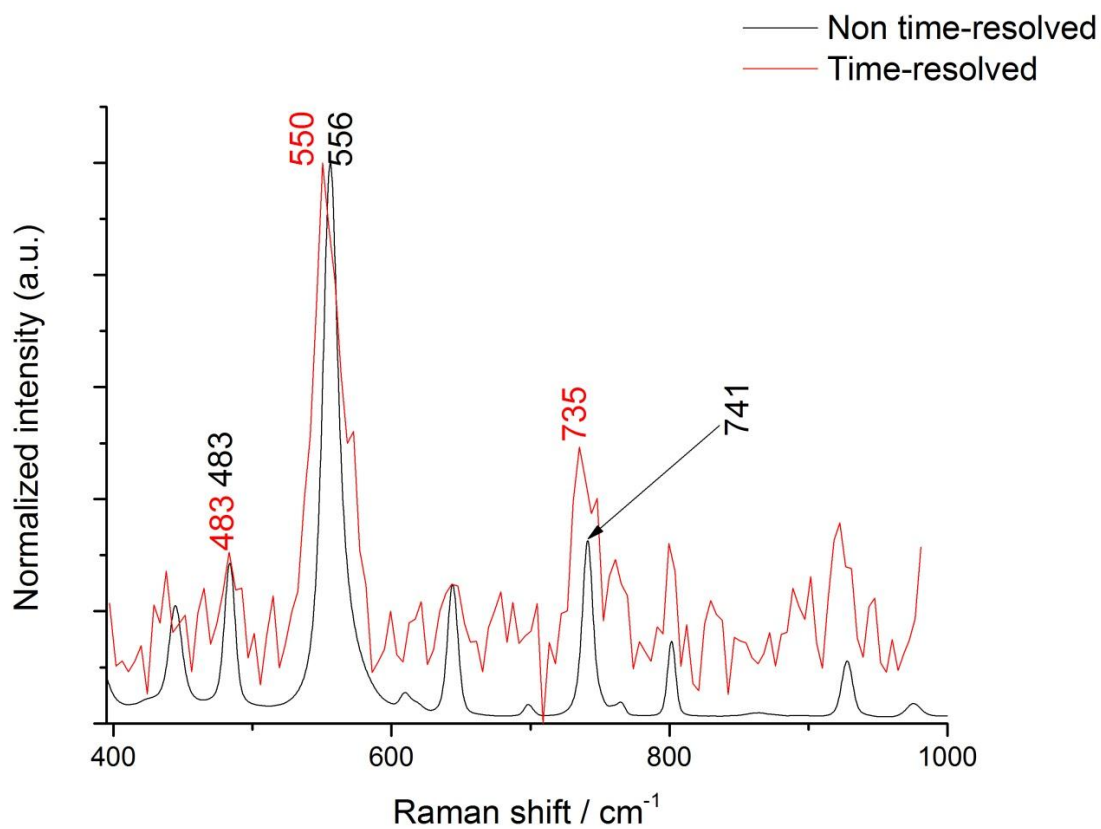
erotteluun perustuvaa Raman-laitteistoa. Aika-erotteluun perustuvassa tekniikassa hyödynnettiin pulssilaser-herätettä sekä herätteen kanssa synkronoitua CMOS-SPAD-detektoritekniikkaa, jolla pystyttiin detektoimaan sironneita fotoneja hieman eriaikaisesti 4 eri aika-ikkunan avulla. Tutkimuksiin valittiin 5 fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan hieman erilaista lääkeainetta. Lääkeaineet olivat ranitidiinihydrokloridi, kofeiini (anhydraatti), propranololihydrokloridi, teofylliini (anhydraatti) ja indometasiini. Molekyylien rakenteita tarkastelemalla ja alkuanalyysin perusteella voitiin tehdä alustavia johtopäätöksiä aineiden ominaisuuksista sekä niiden mahdollisesta fluoresenssista. Seuraavassa vaiheessa pyrittiin selvittämään puhtaiden kiinteiden aineiden Raman-spektrien perusteella, mitkä aineista olivat fluoresoivia. Tehtyjen mittausten perusteella näistä valittiin fluoresoivat lääkeaineet jatkotarkasteluun aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla tehtäviin mittauksiin. Tällä tavoin tarkoituksena oli saada todistettua aika-erottelun toimivuus ja hyödyllisyys fluoresenssin vähentämisessä. Ei-fluoresoivasta ja fluoresoivasta lääkeaineesta, kofeiinista ja ranitidiinihydrokloridista, tässä järjestyksessä, valmistettiin myös liuokset PBS-puskuriin. Muun muassa *in vitro* tehtävissä solumäärityksissä lääkeaineet tulee usein liuottaa ~ pH 7 PBS-puskuriliuokseen, joka on happo-emäsominaisuuksiltaan ja ionitasapainoltaan optimaalista soluille. Näin ollen oli kiinnostavaa saada myös alustavia tuloksia etenkin aika-erotteisen laitteiston sopivuudesta liuosmittauksiin ja tällä tavoin tietoa siitä, voitaisiinko laitteistoa käyttää myöhemmässä vaiheessa esimerkiksi lääkeaineiden kinetiikan tutkimuksessa solumääritysten avulla.

### **5.1. Spektrien Raman-spesifisten piikkien analysointia kiinteille lääkeaineille**

Konventionaalisella Raman-laitteistolla mitattujen kiinteiden lääkeaineiden spektreistä valittiin aluksi 3 vahvaa/selväpiirteistä piikkiä. Mikäli mahdollista, piikkien vastaavuus kirjallisuudesta löytyneisiin määrityksiin tarkistettiin. Mikäli kirjallisuusvastinetta ei löytynyt, piikille tehtiin tulkinta tämän tutkimuksen kappaleessa 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset kuvatulla tavalla. Kyseessä on approksimaatio, joka ei välttämättä ole

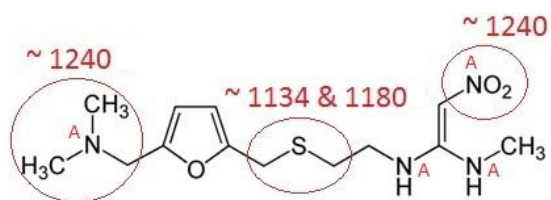
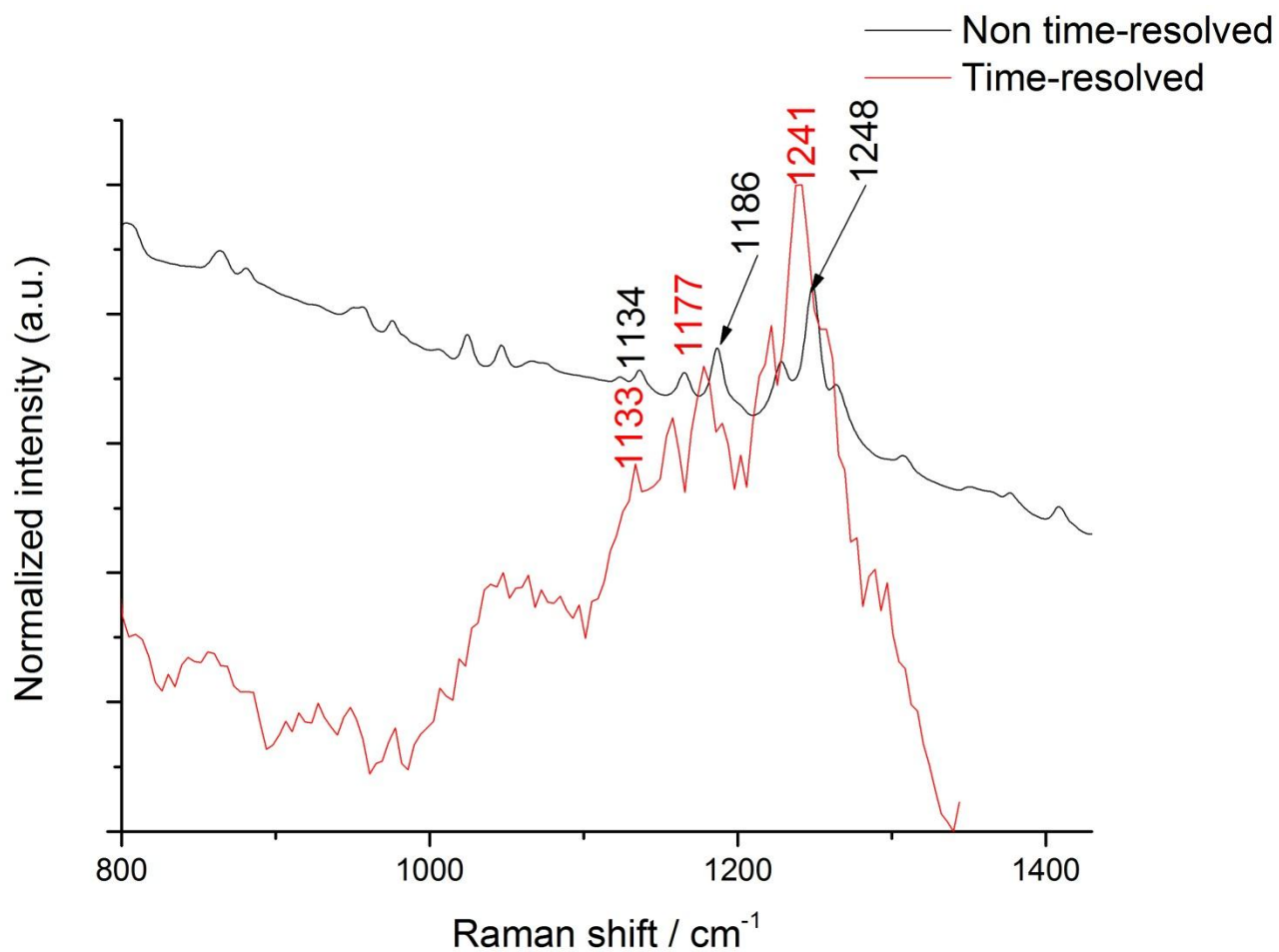
tarkalleen oikea arvio Raman-siirtymän aiheuttajasta molekyylissä. Toleranssi, jonka sisäpuolella piikkien voitiin tulkita edustavan samoja värähtelyjä molekyylissä, oli konventionaalisissa määrittelyksissä  $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ , aika-erotteisissa määrittelyksissä  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$  ja liuosmäärittelyksissä  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ . Aika-erotteisten Raman-mittausten jälkeen valittiin 3 piikkiä siten, että ne löytyivät valitun toleranssin sisään sekä konventionaalisista spektreistä että aika-erotteisista spektreistä. Seuraavassa esitetään **yhteenvetotaulukot ja kuvaajat 1**, joihin on koottu lääkeaineiden molekyylirakenteet, Raman-spektrien kuvat molemmilla mittauslaitteistoilla (konventionaalinen ja aika-erotteinen) sekä valittujen Raman-spesifisten piikkien sijainnit ja määrittelykset. Lääkeaineiden molekyylirakenteisiin on merkitty **punaisella ympyrällä** ehdotetut värähtelyjen lähteiden alueet molekyyleissä. Taulukon viimeisessä sarakkeessa on puolestaan spektritulkinta kullekin valitulle Raman-spektripiikille yllä kuvatulla tavalla määritettynä. Teofylliinille ei tehty tässä yhteydessä aika-erotteista Raman-mittausta, joten sen mittaukset ja ehdotetut Raman-spektripiikkien määrittelykset ovat **yhteenvetotaulukot ja kuvaajat 2**:ssa ensin mainittujen määrittelysten jälkeen.

## YHTEENVETOTAULUKOT JA KUVAAJAT 1: Konventionaaliset ja aika-erotteiset Raman-mittaukset valituille lääkeaineille



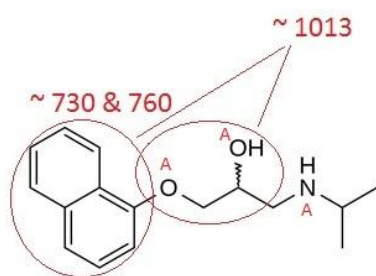
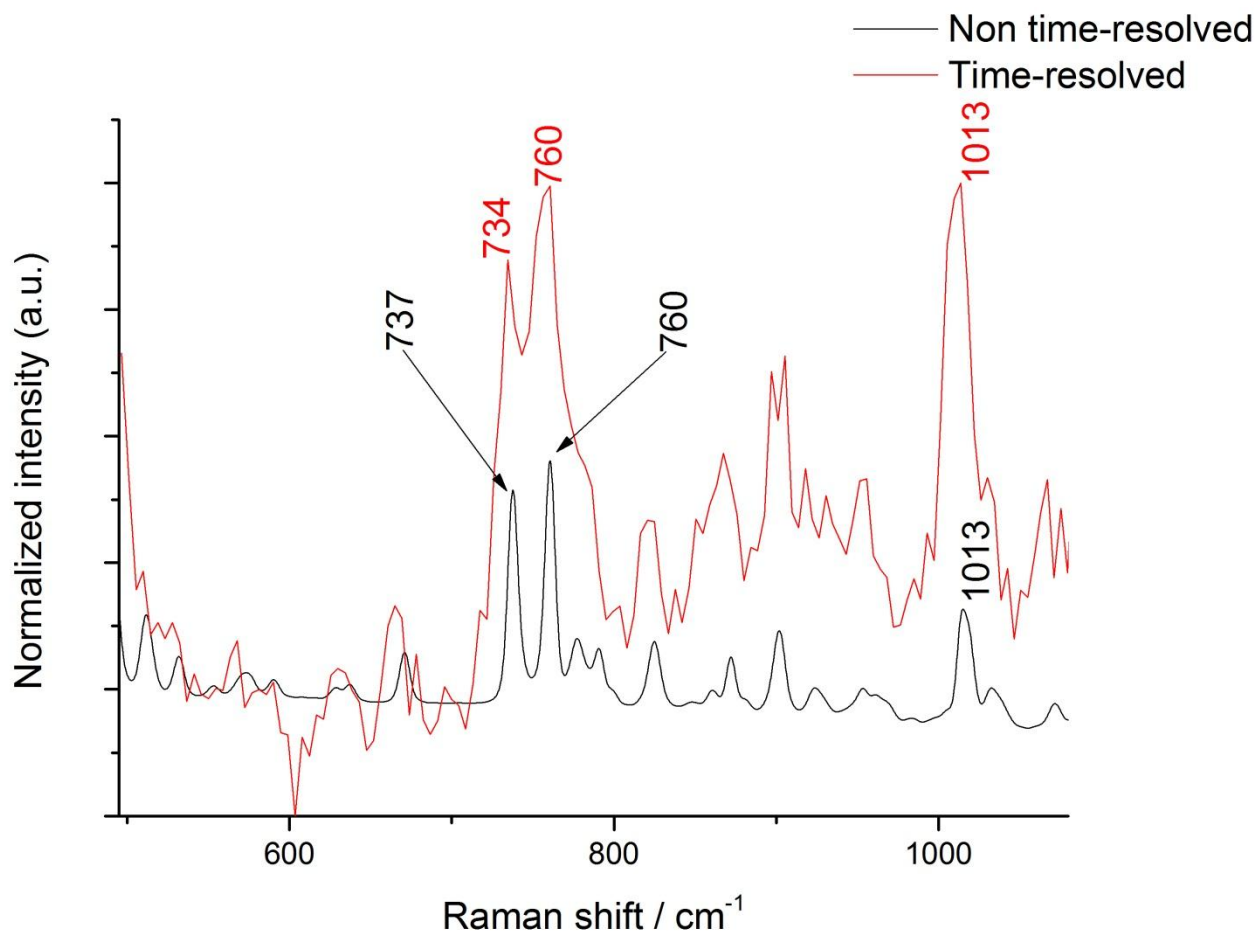
PIIKIN SIJAINTI ( $\sim$ $\text{cm}^{-1}$ )	MÄÄRITYS
483	Pyrimidiinirengas
550	Pyrimidiinirengas
735	Imidatsoli + C=O

**KUVA 33:** Kiinteän kofeiinin Raman-mittaukset



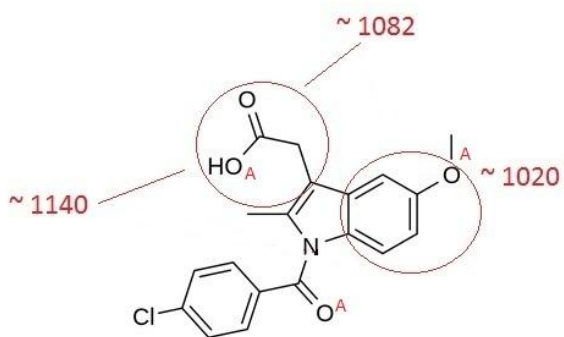
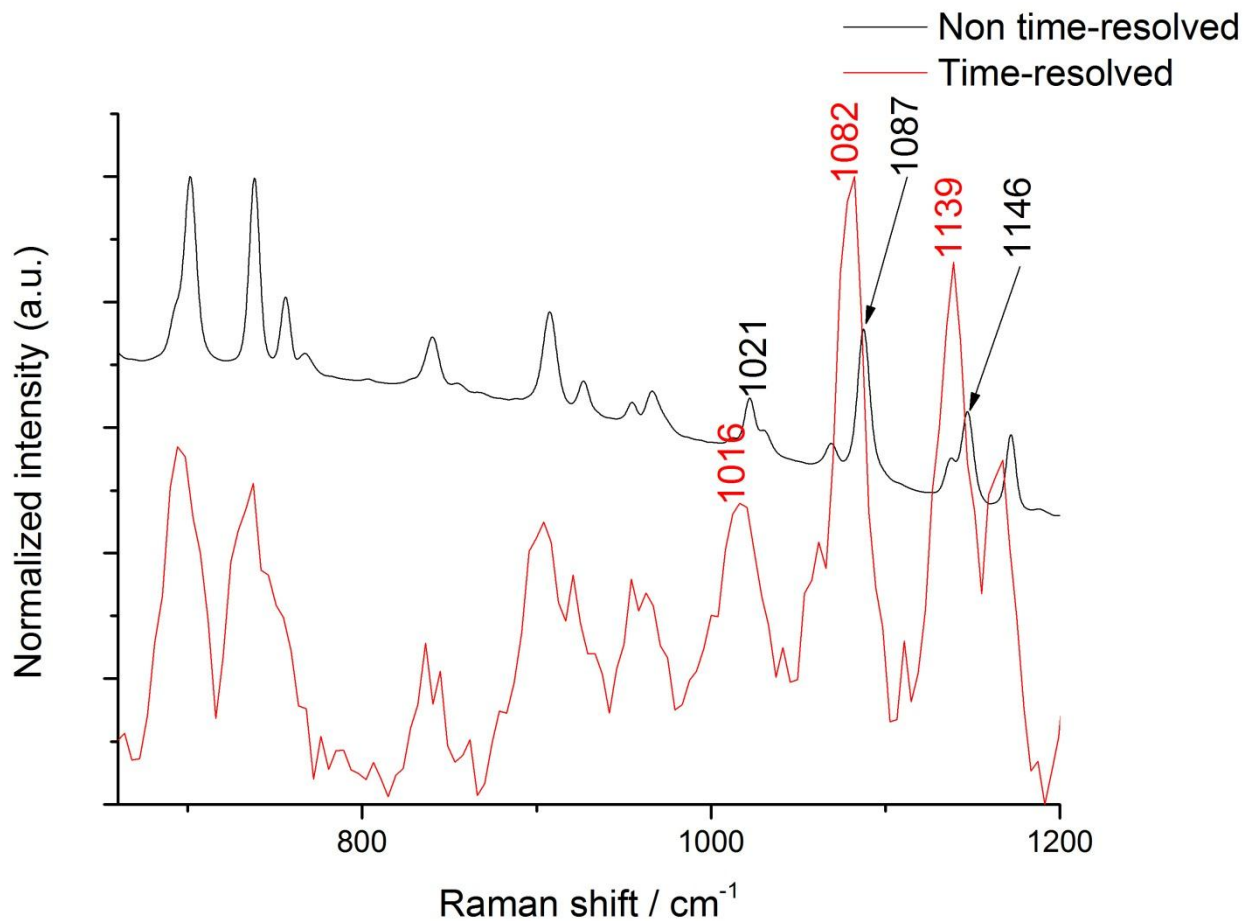
PIIKIN SIJAINTI (~ cm <sup>-1</sup> )	MÄÄRITYS
1134	R-S-R (rikkiatomin lähiympäristö)
1180	R-S-R (rikkiatomin lähiympäristö)
1240	R-NO <sub>2</sub> tai N-CH <sub>3</sub>

**KUVA 34:** Kiinteän ranitidiinihydrokloridin Raman-mittaukset



PIIKIN SIJAINTI ( $\text{cm}^{-1}$ )	MÄÄRITYS (~)
730	Naftaleeni
760	Naftaleeni
1013	Naftaleeni + Happi-Hiili- Hydroksyyli-ryhmä (O-C-OH)

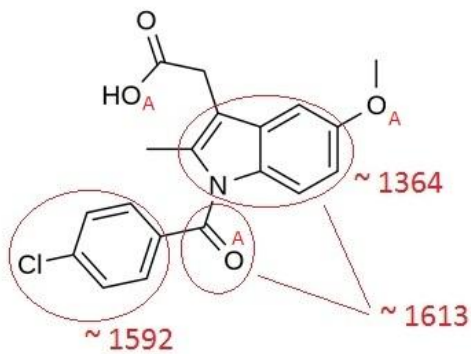
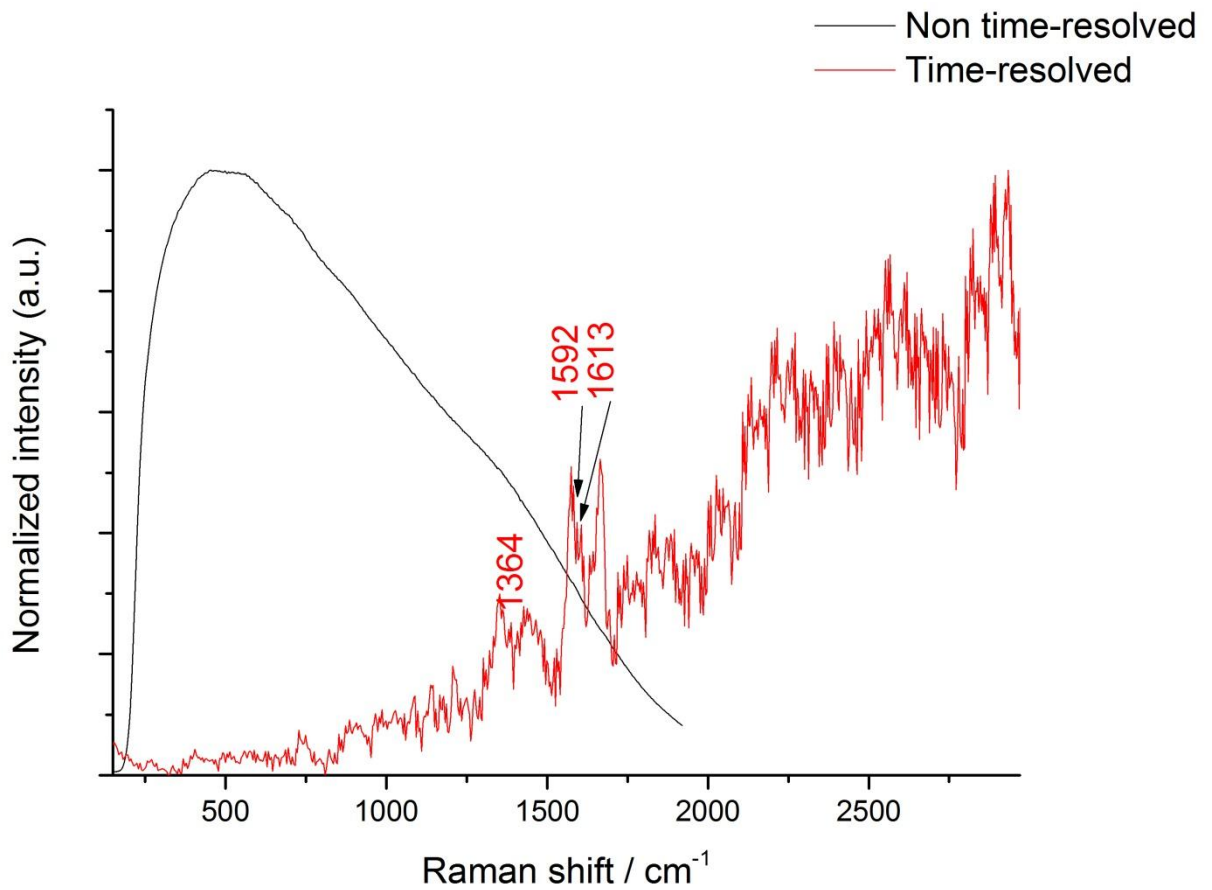
**KUVA 35:** Kiinteän propranololihydrokloridin Raman-mittaukset



PIIKIN SIJAINTI ( $\sim \text{cm}^{-1}$ )	MÄÄRITYS
1020	Bentseeni + fenoli
1082	CH <sub>3</sub> -ryhmä + asetaatin CCC asymmetriset venytysvärähdykset
1140	Asetaatin CH <sub>2</sub> -ryhmän käännösvärähtelyt + C- O(H)-ryhmän venytysvärähtelyt

**KUVA 36:** Kiinteän kiteisen indometasiinin Raman-mittaukset

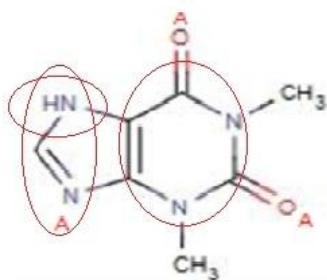
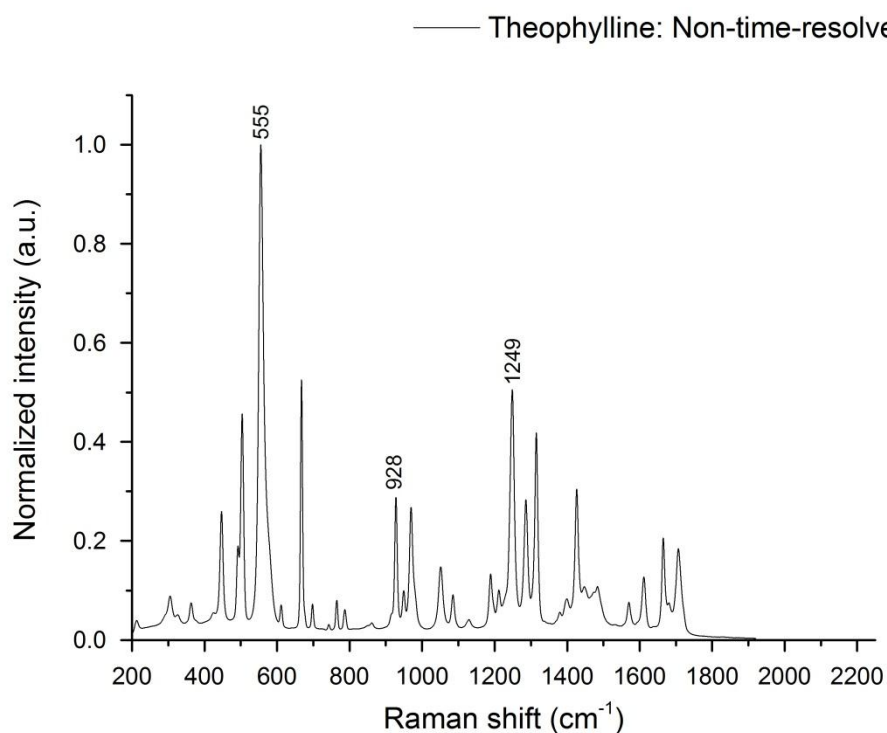




PIIKIN SIJAINTI ( $\sim \text{cm}^{-1}$ )	MÄÄRITYS
1364	Indolirenkaan muodonmuutokset + C- C - venytysvärähtelyt + C-N - venytysvärähtelyt
1592	Chlorobentseenirenkaan muodonmuutokset + C- C - venytysvärähtelyt
1613	C=O - ryhmän venytysvärähtelyt + Indolirenkaan muodonmuutokset

**KUVA 37:** Amorfisen indometasiinin Raman-mittaukset

## YHTEENVETOTAULUKOT JA KUVAAJAT 2: Teofylliinin konventionaalinen Raman-mittaus ja Raman-spektriipiikkien määrittäminen



PIIKIN SIJAINTI (~ cm <sup>-1</sup> )	MÄÄRITYS
555	Pyrimidiinin hengitysvärähtelyt
928	Imidatsolirenkaan tasossa tapahtuvat muodonmuutokset
1249	N-H – tasossa tapahtuvat muodonmuutokset

**KUVA 38:** Kiinteän teofylliinin konventionaalinen Raman-mittaus

**Yhteenvetotaulukot ja kuvaajat 1:n** perusteella voidaan todeta, että kaikkien aika-erotteiseen Raman-mittaukseen valittujen lääkeaineiden spektrit vastaavat hyvin sekä ei-aika-erotteisella kokoonpanolla että kirjallisuudessa aiemmin määritettyjä spektrejä tutkituilla spektrialueilla. Tämän todentamiseksi määriteltiin toleranssialue ( $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ). Mikäli ei-aika-erotteinen, aika-erotteinen ja kirjallisuudessa määritetty spektriinkin sijainti olivat yhteneviä, mittausten voitiin todeta vastaavan toisiaan. Näin ollen saatiin alustavaa tietoa siitä, että aika-erotteisen laitteiston Raman-mittaustulokset vaikuttavat luotettavilta. Esimerkiksi ranitidiinihydrokloridi voitiin tunnistaa molemmilla menetelmillä polymorfimuodoksi II (Kuva 34). Ranitidiinihydrokloridin polymorfimuodon II tärkein Raman-spektriikki on  $\sim 1188 \text{ cm}^{-1}$  kohdalla (Pratiwia ym. 2002). Lisäksi ei-fluoresoivan mallilääkkeen (kofeiini) ja fluoresoivien mallilääkkeiden (ranitidiini, propranololi, indometasiini) spektreissä on havaittavissa selvemmin yksityiskohtia aika-erotteisella laitteistolla tehdyissä mittauksissa verrattuna ei-aika-erotteisella tehtyihin (Kuvat 34-37). Edelleen, pystytään toteamaan, että aika-erotteisella laitteistolla saadaan aikaan tehokas fluoresenssin väheneminen verrattuna ei-aika-erotteiseen laitteistoon. Ranitidiinin ja kiteisen indometasiinin 785 nm laserilla suoritetuissa referenssimittauksissa aineille tyypillisiä Raman-spektriikkejä nähdään voimakkaan fluoresenssitaustan päällä. Aika-erotteisissa mittauksissa puolestaan spektriikit ovat selvästi nähtävillä ilman voimakasta fluoresenssitaustaa. Referenssilaitteiston ja aika-erotteisen Raman-laitteiston mittausten spektriikit vastaavat hyvin toisiaan valitun toleranssin sisäpuolella. Tehokas fluoresenssin vähentyminen on erityisesti nähtävissä amorfisen indometasiinin mittauksissa. Ei-aika-erotteisella laitteistolla ei voitu havaita selviä Raman-spektrin piirteitä ollenkaan amorfisen indometasiinin tapauksessa.

Tulokset aika-erotteisen laitteiston fluoresenssisuppression toiminnasta ovat merkittäviä myös esimerkiksi lääketeollisuuden prosessianalyysiteknologian kannalta (engl. PAT = Process Analytical Technology). Useissa lääketeollisuuden Raman-mittauksissa pyritään välttämään fluoresenssista johtuvia ongelmia käyttämällä 785 nm heräte-energiaa. Ongelmaksi muodostuu kuitenkin se, että energia ei ole välttämättä

riittävä, jotta detektoitavaa ja esimerkiksi kvantitatiivisiin määrittäisiin luotettavaa Raman-signaalia saataisiin aikaan. Lisäksi fluoresenssi-ongelmia esiintyy monissa tapauksissa (kuten esimerkiksi tässä tutkimuksessa määritetty amorfinen indometasiini). Jos puolestaan käytetään esimerkiksi 532 nm korkeampienergistä (eli korkeampitaajuista) herätettä ilman pulssilaseria ja aika-portitusta detektiossa, Raman-signaali vahvistuu, mutta fluoresenssi-ongelma pahenee. Aika-erotteisella laitteistolla saadaan siis korkeamman heräte-energian hyöty korkeampana Raman-sirontana ja toisaalta fluoresenssia saadaan vähennettyä merkittävästi.

## 5.2. Spektrien Raman-spesifisten piikkien analysointia lääkeaineliuoksille

Lääkeaineliuosten kohdalla pyrittiin selvittämään tutkittujen laitteistojen eroja tutkimalla liuosten spektrejä. Tarkoituksena oli ennen kaikkea selvittää yhtenevyyksiä ja eroja laitteistojen välillä sekä optimoimaan Raman-mittauksia lääkeaineliuoksille. Edelleen, haluttiin saada näyttö siitä, että aika-erotteinen laitteisto soveltuisi myös fluoresoivien lääkeaineliuosten mittauksiin. Lisäksi pyrittiin selvittämään tärkeitä huomioitavia tekijöitä esimerkiksi liuosten kvantitatiivista analyysiä ajatellen.

Tutkituista lääkeaineista kofeiinista ja ranitidiinihydrokloridista valmistettiin liuokset 50 mM PBS-puskuriliuokseen, jonka pH-arvoksi mitattiin 7.05. Arvioksi liukoisuudesta PBS-puskuriin valittiin kirjallisuudesta löydetyt arvot aineiden vesiliukoisuudelle. Tätä voidaan pitää perusteltuna, koska PBS-puskuriliuos on koostumukseltaan melko lähellä vettä muutamien poikkeuksin. Ensinnä, se puskuroi pieniä happo-emäs-muutoksia liuoksessa. Toimintamekanismi on samankaltainen kuin esimerkiksi ihmisen elimistön solujen makro- ja mikroympäristössä tapahtuvissa happo-emästäsapainon muutoksissa. Oikean, tarkasti säädellyn pH:n ja ionikonsentraation säilyttäminen ulkoisista muutoksista huolimatta on keskeistä solujen hengissä pysymisen ja fysiologisten toimintojen turvaamiseksi. Toiseksi, mikäli lääkeaineiden liuottaminen aiheuttaisi niiden ionisoitumista sekä ympäristön pH:n muutoksia, ja mikäli niiden

liukoisuus olisi pH:sta riippuvaa, happo-emäsreaktioiden aiheuttama ionisoituminen ei vaikuttaisi ainakaan välittömästi niiden liukoisuuteen. Voitiin siis valmistaa likimääräisesti lähellä maksimivesiliukoisuutta olevat lääkeaineliuokset. Aluksi oli relevanttia valmistaa mahdollisimman vahvoja liuoksia, koska käytettyjen Raman-kokoonpanojen herkkyydestä liuosmittauksissa ei ollut tietoa.

Kuvien 31-32 perusteella voidaan havaita, että aika-erotteisella laitteistolla saadaan määritettyä tutkittujen lääkeaineliuosten Raman-spektrejä paremmin, kuin ei-aikaerotteisella. Tutkitulla spektrialueella voidaan myös havaita, että aika-erotteisella laitteistolla määritetyissä spektreissä on näkyvissä enemmän spektrien hienorakennetta kuin konventionaalisella laitteistolla mitatuissa. Sama ilmiö oli nähtävissä jo kiinteille lääkeaineille tehdyissä määrityksissä. Edelleen, konventionaalisen Raman-laitteiston ongelmana ollut häiritsevän vahva tausta liuospektrien määrityksessä näyttää aika-erotteisella laitteistolla tehdyissä mittauksissa huomattavasti vähäisemmältä. Jatkotoimina olisi voitu tehdä aika-erotteisille spektreille vielä esimerkiksi ohjelmallinen polynomifunktion sovitus taustasignaalin ja vähentää se saaduista spektreistä. Näin tuloksena olisi ollut vieläkin tasaisempi spektrien pohjataso (engl. baseline) ja selvästi erottuvat Raman-spesifiset piikit. Näilläkin menetelmillä saavutettiin kuitenkin huomattavaa parannusta käytettyyn konventionaaliseen kokoonpanoon nähden.

Kirjallisuuden perusteella (Nolasco ym. 2006) Raman-siirtymä  $555\text{ cm}^{-1}$  kuvaa parhaiten kofeiinimolekyylin rakennetta ja sillä kohden löytyy hyvin voimakas piikki spektristä. Ei-aika-erotteisissa liuosmittauksissa kofeiinilla näkyy heikohko piikki kohdalla  $557\text{ cm}^{-1}$  ja aika-erotteisessa kohdalla  $556\text{ cm}^{-1}$  (kuva 31). Kun huomioidaan muun muassa mahdolliset instrumenttien kalibroinneista aiheutuvat eroavuudet, näytteenkäsittelystä aiheutuvat eroavuudet ja mahdolliset PBS-puskurin ja kofeiinimolekyylin keskinäiset interaktiot liuostilassa, tulos on järkevä ja osoittaa etenkin aika-erotteisen kokoonpanon toimivuuden liuosmittauksissa, joiden konsentraatiot ovat muutaman kymmenen mM suuruusluokassa. PBS-puskuriin tehdystä

kofeiiniliuoksesta oli etenkin ei-aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla haastavaa saada kofeiinille ominaisia spektrirakenteita näkyviin (kuva 31), vaikka kiinteällä kofeiinilla tehdyissä mittauksissa kofeiinin spektri oli erittäin selkeäpiirteinen ja tunnistettavat piikit erottuivat hyvin (kuva 8). Tähän ilmiöön liittyviä syitä pohditaan tarkemmin tämän kappaleen luvuissa 5.2. ja 5.3. Tässä yhteydessä voidaan todeta, että ongelmat johtuivat todennäköisimmin laitteiston PhAT-mittapäästä, riittämättömästä fotonien keruutehokkuudesta ja/tai mitta-astioiden aiheuttamasta fluoresenssista. Näiden ratkaisuna muun muassa siirrettiin mittapään etäisyyttä tutkittavan nestenäytteen pinnasta, yritettiin fokuointipisteen muuttamista pinta-alaltaan pienemmäksi kolmella eri N.A.:n mikroskooppiobjektiivilla, jotka kiinnitettiin mittapähän sekä tehtiin myös pitkiä mittaussarjoja. Ensinnä mainitun tarkoituksena oli etsiä sopivampaa polttovälin etäisyyttä ja tätä kautta tarkempaa polttopistettä herätteen säteelle. Viimeisenä mainitun mittauskertojen kasvattamisen ajatuksena oli signaali-kohinasuhteen parantaminen ja näin ollen tarkoituksena saada spektrin hienorakenteen pienet piikit erottumaan. Lisäksi käytettiin mahdollisimman suuria altistusaikoja detektorin aukiololle, kuitenkin siten, ettei signaali päässyt saturoitumaan. Toimenpiteistä huolimatta sekä kofeiini että ranitidiiniliuosten spektrien määrittämisessä oli ongelmia, joita aika-erotteisella laitteistolla mitattaessa ei havaittu.

Kirjallisuudessa aiemmin tehtyjen määritysten perusteella ranitidiinihydrokloridille ominaiset Raman-spektriipiikit ovat  $1210\text{ cm}^{-1}$  (polymorfi muoto I) ja  $1188\text{ cm}^{-1}$  (polymorfi muoto II) (Pratiwia ym. 2002). Edelleen, samoissa määrityksissä tutkijat valitsivat 7 piikkiä niiden korkeuden perusteella tehtyä pääkomponenttianalyysiä varten. Piikkien sijainnit olivat  $1589\text{ cm}^{-1}$ ,  $1552\text{ cm}^{-1}$ ,  $1249\text{ cm}^{-1}$ ,  $1210\text{ cm}^{-1}$ ,  $1188\text{ cm}^{-1}$ ,  $1164\text{ cm}^{-1}$  ja  $1134\text{ cm}^{-1}$ . Kiinteän olomuodon ranitidiinille määritettiin piikit sijainneissa  $1134\text{ cm}^{-1}$ ,  $1188\text{ cm}^{-1}$ ,  $1249\text{ cm}^{-1}$  ja  $1555\text{ cm}^{-1}$ . Ranitidiinin liuokselle saatiin puolestaan spektriipiikit kohdille  $1134\text{ cm}^{-1}$ ,  $1168\text{ cm}^{-1}$  ja  $1555\text{ cm}^{-1}$ .

Liitteen 4.2.2 Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista **yhteenvetotaulukot 1**, taulukon 1 perusteella tämän tutkimuksen ranitidiinille tehdyissä

määrityksissä löydettiin piikit (konventionaalinen ensin mainittuna, sitten aika-erotteinen mittaus):  $1134\text{ cm}^{-1}$  ja  $1133\text{ cm}^{-1}$ ,  $1187\text{ cm}^{-1}$  ja  $1177\text{ cm}^{-1}$ ,  $1248\text{ cm}^{-1}$  ja  $1241\text{ cm}^{-1}$ . Valitun toleranssin ( $\pm 10\text{ cm}^{-1}$ ) puitteissa näitä kolmea piikkiä voidaan pitää ranitidiinimolekyylin värähtelyjen tunnusomaisina Raman-piikkeinä. Kuvan 32 perusteella ranitidiinin liukselle saatiin vastaavasti (konventionaalinen ensin mainittuna, sitten aika-erotteinen mittaus):  $1271\text{ cm}^{-1}$ ,  $1278\text{ cm}^{-1}$ . Valitun toleranssin puitteissa näitä voidaan pitää ranitidiinia kuvaavina piikkeinä. Kuten kofeiiniliuoksen tutkimuksessa, myös ranitidiinihydrokloridin PBS-liuoksen analysointi ei-aika-erotteisella Raman-kokoonpanolla osoittautui hankalaksi suhteellisen suuresta ( $\sim 100\text{ mM}$ ) pitoisuudesta huolimatta. Sen sijaan aika-erotteisella laitteistolla mitatulla spektrialueella nähtiin piikit  $1136\text{ cm}^{-1}$ ,  $1271\text{ cm}^{-1}$  ja  $1192\text{ cm}^{-1}$ . Kahta ensin mainittua voidaan ainakin pitää liuksessa olevalle ranitidiinimolekyylille ominaisina, tätä tukee myös kirjallisuudessa esitetyt arvot (Pratiwia ym. 2002). Edelleen, ottaen huomioon valitun aaltolukutoleranssin ( $\pm 10\text{ cm}^{-1}$ ), eroavuudet laitteiden kalibroinneissa ja mittausolosuhteissa sekä mahdolliset ranitidiinin interaktiot esimerkiksi PBS-puskurin komponenttien kanssa, tulokset ovat linjassa aiempien määritysten kanssa. Ne osoittavat aika-erotteisen laitteiston ominaisuuksien sopivan lääkeaineliuosten mittaamiseen tutkituilla konsentraatioilla. Lisäksi voidaan mainita, että myös ranitidiiniliuoksen spektrin rakenteessa oli nähtävissä pienempiä, mahdollisesti ranitidiinimolekyylä kuvaavia piikkejä, joita konventionaalaisella kokoonpanolla ei voitu havaita.

Kokonaisuudessaan liuosspektreistä haluttiin saada näkyviin myös mahdollisimman paljon spektrien hienorakennetta, joka antaisi tarkempaa informaatiota tutkituista molekyyleistä. Näin ollen molempien liuosten aika-erotteiset mittaukset suoritettiin siten, että laitteisto jätettiin yön yli mittaamaan ja mittausajat liuksille olivat  $\sim 9$  tuntia molemmille. Laboratoriotilaa ei ollut varustettu millään erityisjärjestelyillä, kuten ilmankosteuden tasapainotuksella tai vakiolämmöllä. Huoneessa oli vaihtelevat ilmankosteus- ja lämpötilaolosuhteet. On tärkeää huomioida, että näiden vakioinnilla saatetaan vaikuttaa positiivisesti myös laitteiston ja siten myös mittaustulosten

stabiiliuteen ja toistettavuuteen. Aika-erotteisen laitteiston detektorin aika-ikkunoiden jaksottaminen hoidettiin toistaiseksi manuaalisesti detektorin piirilevyllä olevilla säätimillä. Myöhemmässä laitekehityksen vaiheessa tämä ominaisuus tulee olemaan digitaalisesti hallintaohjelman kautta käyttäjän säädettävissä. Kaikista mahdollista epästabiiliutta aiheuttavista taustatekijöistä huolimatta aika-erotteinen kokoonpano toimi luotettavasti ja vakaasti myös pitkissä mittauksissa.

### **5.3. Konventionaalinen ja aika-erotteinen Raman liuosten kvantitatiivisessa määrittämisessä**

Kofeiinista ja ranitidiinihydrokloridista tehtiin liuoksia, joita mitattiin konventionaalisella Raman-spektrometrillä. Ensimmäisessä vaiheessa tehtiin liuokset 50 mM PBS-puskuriin, jota ei ollut suodatettu. Tarkoituksena oli tehdä mahdollisimman lähelle maksimaalista vesiliukoisuutta vahvat liuokset, koska käytössä ollut konventionaalinen Raman-laitteisto ei ollut kaikkein optimaalisin liuosten mittaukseen ja aika-erotteisen laitteiston detektioherkkyydestä ei ollut tietoa lääkeaineliuosten mittauksissa käytettynä. Syitä etenkin konventionaalisen laitteiston ongelmista liuosmittauksissa käsitellään myöhemmin tässä luvussa Raman-kokoonpanojen optiikkaan liittyvien havaintojen yhteydessä.

Tehtiin liuokset, joiden vahvuudet kontrolloitiin UPLC-analyysillä. UPLC-menetelmällä mitataan todellisuudessa liuennutta pitoisuutta, kun puolestaan esimerkiksi nefelometri-mittaukset perustuvat saostuneiden komponenttien tai partikkelien aiheuttamaan valon kulun muutokseen (Hoelke ym. 2009). Kofeiiniliuos oli noin 67 mM ja ranitidiiniliuos oli noin 0.8 M vahvuudeltaan. Suoritettiin Raman-mittaukset molemmille liuksille, joiden laimennuksessa käytettyä PBS-puskuria ei ollut suodatettu ja myöskään liuoksen tilaa ei ollut tarkistettu nefelometrillä. Saatiin luvun 4.5.1. ja 4.5.2. kuvissa 23-24 ja 27-28 näkyvät Raman-spektrit. Lisäksi tehtiin molemmista liuksista kaksi jatkolaimennosta, kofeiinista 33.5 mM ja 16.75 mM, ranitidiinista 0.4 M ja 0.2 M.



Kuvissa 25 ja 29 on esitettyinä mainitussa järjestyksessä molempien aineiden eri vahvuisten liuosten Raman-spektrit määritettyinä samaan kuvaajaan.

Raman-mittausten jälkeen liuksille suoritettiin nefelometrimääritys, kofeiinille 67 mM ja ranitidiinihydrokloridille 0.8 M kontrolloimaan, että liuokset todella olivat liuostilassa. Näin ei kuitenkaan ollut, vaan osoittautui, että nefelometri-mittauksen perusteella liuosten joukossa oli valon kulkua estäviä rakenteita tai partikkeleja. Nefelometri-mittauksella saadut lukuarvot ovat aina mittaus- ja laitekohtaisia suhdelukuja, joten ne eivät ole yleistettävissä esimerkiksi jonkin toisen nefelometri-laitteen mittaustuloksiin. Tämä seikka on tarpeen huomioida erikseen, mikäli nefelometrillä mitataan liuoksia. Nefelometria on erittäin nopea ja suoraviivainen keino kontrolloida, onko tutkittavan liuoksen joukossa jotakin valon kulkua muuttavia partikkeleita. Nefelometria on kätevä menetelmä tapauksissa, joissa ei ole erityisesti tarvetta määrittää esimerkiksi tarkkaa analyysiä liuenneen molekyylin konsentraatiosta, vaan riittää tieto siitä, onko liuostila saavutettu. Nefelometrimittauksiin perustuen tehtiin päätelmiä ja jatkotutkimuksia, joita kuvataan seuraavaksi.

UPLC-analyysin tuloksena saadut vahvuudet ja tehtyjen jatkolaimennosten vahvuudet olivat hyvin todennäköisesti todellisia konsentraatioita. Ongelma on ennen kaikkea siinä, että UPLC on erotusmenetelmä; siinä detektoidaan ainoastaan liuenneen molekyylin pitoisuutta. Mikäli näytteessä on myös osittain sakkautunutta molekyyliä, epäpuhtauksia tai esimerkiksi liuottimesta muodostuneita kiteitä, niistä ei saada välitöntä informaatiota UPLC-analyysin tuloksena, ellei kyseisiä artefakteja ryhdytä erikseen analysoimaan. Kullekin aineelle on olemassa aineen rakenteesta peräisin olevia tunnistettavia Raman-spektrin piikkejä. Raman-spektrien intensiteetti kuvaa Raman-sironneiden fotonien intensiteettiä kullakin energia-alueella (aaltoluvulla). Konventionaalisella ja aika-erotteisella Ramanilla mitatuista spektreistä voidaan valita esimerkiksi 1-3 piikkiä, jotka ovat tunnistettavissa kiinteän aineen ja liuoksessa olevan aineen molekyylin värähtelytilojen muutosten aiheuttamiksi piikeiksi. Näitä piikkejä voidaan kutsua seurattaviksi piikeiksi tai tunnistettaviksi piikeiksi. Alla

esitettyihin taulukoihin on valittu yksi piikki kofeiinille ja ranitidiinihydrokloridille. Taulukoissa on esitetty piikin sijainti ( $\text{cm}^{-1}$ ), suhteellinen Raman-intensiteetti (a.u.) ja intensiteettiä vastaava konsentraatio (mM tai M). Lisäksi piikkien intensiteetit kertovat ainakin suunta-antavasti, millainen vahvuus liuenutta molekyyliä on liuoksessa. Aiemman tiedon valossa voidaan päätellä, että liuoksen lääkeainemolekyylin konsentraation vähentyessä, myös Raman-spektrissä näkyvän piikin intensiteetin tulisi laskea - ideaaltilanteessa lineaarisesti. Nyt havaittiin, että esimerkiksi kofeiinin konsentraation pienentyessä puoleen laimennettaessa, Raman-intensiteetti ei kuitenkaan laskenut läheskään samassa suhteessa (alla olevat taulukot 7-8 ja kuvat 25 sekä 27 luvussa 4.5.1. ja 4.5.2.). Kofeiinin tapauksessa kuvasta 25 nähdään, että joillakin aaltoluvuilla pienemmän konsentraation (16.75 mM) liuoksen intensiteetti on jopa suurempi kuin kaksi kertaa yhtä vahvan (33.5 mM) liuoksen aiheuttaman Raman-sironnan intensiteetti. Tämä osoittaa, että mitattujen liuokset eivät olleet puhtaasti liuostilassaan tai toimittiin lähellä kyseisen laitteiston detektorirajaa mitattujen liuosten suhteen.

**TAULUKKO 6:** Konventionaalinen: kofeiini (ei-suodatettu)

Tunnistettavan Raman-piikin sijainti ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensiteetti (a.u.)	Piikkiä vastaava konsentraatio (mM)
557	101912	16.75
557	108750	33.5
557	147536	67

**TAULUKKO 7:** Konventionaalinen: ranitidiini (ei-suodatettu)

Tunnistettavan Raman-piikin sijainti ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensiteetti (a.u.)	Piikkiä vastaava konsentraatio (mM)
1134	162055	200
1134	236375	400
1134	535421	800

Pääteltiin, että laimennoksissa käytetty PBS-puskuri on saattanut kiteytyä säilytyksessä (kylmä) esimerkiksi fosfaatti-suolakiteiksi tai liuotetut lääkeaineet eivät ole saavuttaneet täysin liuostilaa. UPLC-analyysillä tarkastellaan siis todellista liuennutta molekyyliä ja suodatetaan näytteestä muu osa pois (Hoelke ym. 2009). Näin ollen ei voida olla varmoja, mistä lääkeaineiden spektreissä näkyvien piikkien intensiteetti Raman-mittauksissa on kokonaisuudessaan peräisin. Toisin sanoen sirontaa on voinut tapahtua liuenneista molekyyleistä - toisaalta taas silmälle havaitsemattomasta aineen sakasta tai muista partikkeleista. Näin ollen olisi luonnollista, että esimerkiksi ranitidiinille ominaiset spektrin piirteet ja piikit havaitaan aineen ominaisuuksiin kuuluvilla paikoillaan, eli molekyyli on havaittavissa liuoksessa. Intensiteettien perusteella ei kuitenkaan voida tehdä kvantitatiivisia päätelmiä esimerkiksi liuoksen vahvuudesta, koska sironta on voinut tapahtua sekä kiinteästä että liuosmuodossa olevasta aineesta. Tämä selittäisi muun muassa kofeiiniliuoksien kohdalla havaitun epälineaarisuuden. Edelleen, 16.75 mM konsentraation ja 33.5 mM konsentraation kofeiiniliuosten spektreissä havaittu intensiteetin suuri vaihtelu (osassa spektriä intensiteetti oli pienemmän konsentraation kohdalla lähes yhtä suuri tai jopa suurempi kuin vahvemman konsentraation liuoksesta saatu intensiteetti) olisi perusteltavissa mahdollisesta kofeiinin sakkautumisesta johtuen.

Jatkotutkimuksena tehtiin ranitidiinista 100 mM liuos ja kofeiinista 60 mM liuos. Valittiin tehtäväksi huomattavasti laimeampi liuos kuin aluksi tehty 0.8 M = 800 mM liuos ja kofeiinista hieman laimeampi (aluksi ~ 67 mM, nyt ~ 60 mM), jotta olisi voitu minimoida aineiden sakkautuminen ja varmistaa, että mitataan nimenomaan liuostilassa olevia molekyyliä. Mahdollisen PBS-puskurin kiteytymisen tai epäpuhtauksien aiheuttaman taustasignaalin minimoimiseksi laimennoksissa käytetty PBS-puskuri suodatettiin 0.45 µm steriilisuodattimella. UPLC-analyysiä ei tässä yhteydessä tehty, joten liuosten vahvuudet ovat suuntaa-antavia. Valittujen konsentraatioiden perusteella laskettiin punnittavien kuiva-aineiden massat ja tehtiin liuokset. Molemmat liuokset tehtiin kaikilta osin samalla tavalla kuin alun perin UPLC-analyysissä kontrolloidut liuokset. Suoritettiin nefelometri-mittaukset käytetylle Milli-Q-vedelle (kontrolli), suodatetulle

PBS-puskurille, suodattamattomalle PBS-puskurille ja lääkeaineliuoksille. Nefelometri-mittausten perusteella todettiin, että liuokset olivat liuostilassa ja mahdollisesti Raman-signaalia häiritseviä partikkeleja tai epäpuhtauksia oli huomattavasti vähemmän. Liuosten stabiiliudesta saatiin samalla tietoa, koska kantaliuoksen ja kahden jatkolaimennoksen valmistamisen jälkeen niitä säilytettiin yön yli seuraavaan vuorokauteen asti huoneenlämmössä. Näin ollen voitiin tehdä karkea validointi siitä, että myös aika-erotteisella Raman-laitteistolla mitattujen liuosten ominaisuudet olisivat olleet samankaltaisen protokollan mukaan konventionaalisissa mittauksissa tehtyjä liuoksia vastaavat. Aika-erotteisella Raman-laitteistolla ei kuitenkaan tehty tässä yhteydessä 3 eri konsentraation sarjoja. Kaiken kaikkiaan tehdyt liuokset säilyivät hyvin, mistä kertoo myös nefelometri-mittauksen tulos.

Valmistetuista kofeiini- ja ranitidiinihydrokloridiliuoksista tehtiin aiemmin määritetyllä tavalla kolmen eri konsentraation sarjat, 60 mM, 30 mM ja 15 mM (kofeiini) ja 100 mM, 50 mM, 25 mM (ranitidiini). Lukujen 4.5.1. ja 4.5.2. kuviin 26 ja 30 on määritettyinä vastaavat Raman-spektrit mainitussa järjestyksessä. Lisäksi alla olevissa taulukoissa 8-9 ovat määritettyinä ranitidiinille ja kofeiinille aiemmin valittujen tunnistettavien Raman-spektrin piikkien intensiteetit ja niitä vastaavat konsentraatiot. Taulukoista havaitaan, että suodattaminenkaan ei kokonaan ratkaissut ongelmaa ja aineiden tunnistuspiikkien intensiteeteissä tapahtuu vaihtelua edelleen selvästi. Edelleen, lineaarista riippuvuussuhdetta konsentraation ja mitatun intensiteetin välillä ei ole havaittavissa. Varsinaisen aaltolukualueen tai laserin kalibrointi oli sen sijaan todennäköisesti kohdallaan, koska esimerkiksi aallonpituusalueen tarkistuksessa käytetyn sykloheksaanin tunnistettavat piikit sijaitsivat jokaisella mittauskerralla hyvin paikoillaan.

**TAULUKKO 8:** Konventionaalinen: kofeiini (suodatettu)

Tunnistettavan Raman-piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> )	Intensiteetti (a.u.)	Piikkiä vastaava konsentraatio (mM tai M)
557	118931	15
557	95164	30
557	104152	60

**TAULUKKO 9:** Konventionaalinen: ranitidiini (suodatettu)

Tunnistettavan Raman-piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> )	Intensiteetti (a.u.)	Piikkiä vastaava konsentraatio (mM tai M)
1134	90075	25
1134	91757	50
1134	113172	100

Mahdollisia syitä havainnoille ovat käytetyn konventionaalisen Raman-kokoonpanon mittapään ja/tai keruuputiikan sopimattomuus esitettyihin liuosten mittauksiin tai laitteiston intensiteettikalibroinnin epätarkkuus. Erot mittauskertojen ja laimennosten välillä ovat niin ikään mahdollisia tekijöitä havaittujen intensiteettien vaihteluun eri laimennosten välillä. Vaihtelun todennäköisyyttä lisää myös Raman-tekniikan herkkyys. Tekniikalla pystytään detektoimaan hyvin pienen mittakaavan molekulaarisia ilmiöitä. Tähän sisältyy myös tässä kappaleessa 5.2.2. kuvattuja ongelmia samanaikaisesti; jotta esimerkiksi mitattujen liuosten spektrien piikkien intensiteeteistä voitaisiin tehdä kvantitatiivisia päätelmiä, on huomioitava useita samanaikaisia tekijöitä. Ensinnä, liuokset ovat kaiken kaikkiaan kiinteitä aineita hankalampia mitata tarkasti Raman-tekniikalla. Näin ollen mittauskokoonpanon on oltava kaikilta osin optimoitavissa kiinteiden aineiden mittauksen lisäksi liuosmittauksiin, jotta intensiteettivaihteluilta vältyttäisiin. Toiseksi, liuosten valmistaminen tulisi tehdä noudattaen erittäin toistettavaa protokollaa ja mahdollisuuksien mukaan olisi tarpeen selvittää aina tutkittavan molekyylin ja liuotinmolekyylien kemiallisia interaktioita

keskenään. Interaktiot tutkittavan molekyylin ja liuotinmolekyylin välillä saattavat aiheuttaa spektriippiikkien siirtymiä (aaltolukuakselilla). Kolmanneksi, Raman-mittausten rinnalle olisi tarpeen valita useita samanaikaisia kontrollimenetelmiä varmistamaan, että liuostila on saavutettu ja se on stabiili (esimerkiksi nefelometri) sekä mittaamaan liuoksen todellista konsentraatiota (esimerkiksi HPLC-analyysi). Lisäksi näytteestä ja tutkimusasetelmasta riippuen voidaan käyttää esimerkiksi röntgen-diffraktiomenetelmää (XRPD) tai differentiaali-skannaus-kalorimetria (DCS)(Kaoa ym. 2012). Neljänneksi, datan esi- ja jälkikäsitteilyyn tulisi käyttää useita erilaisia menetelmiä, jotta minimoitaisiin erityyppisiä ei-kemiallisista tekijöistä johtuvia variaatio- ja virhetekijöitä mittauksissa. Tällaisia voivat olla esimerkiksi yksi- tai monimuuttuja-analyysit, spektrien taustakorjaukset (polynomisovitus), spektrien SNV-korjaukset (engl. Standard Normal Variate) tai toisen derivaatan käyttöön perustuvat korjaukset. Edelleen, pääkomponenttianalyysin käyttö supistamaan esimerkiksi useita komponentteja sisältävän liuoksen spektridataa helpommin käsiteltävään muotoon on usein tarpeellista. Viimeisinä, tutkittavan molekyylin rakenteen sekä preliminäärianalyysien tulosten perusteella voidaan valita analyysin kannalta oleellinen Raman-spektrin alue tarkasteluun. Tämän ohella useiden spektrisarjojen mittaaminen on suositeltavaa. Alla olevassa taulukossa 10 on yhteenvetona huomioitavia seikkoja Raman-mittausten optimoinnista kvantitatiivisia määrittämiä ja erityisesti liuosmittauksia silmällä pitäen.

**TAULUKKO 10:** Raman-mittausten optimointia kvantitatiivisiin määrittäisiin ja liuosmittauksiin

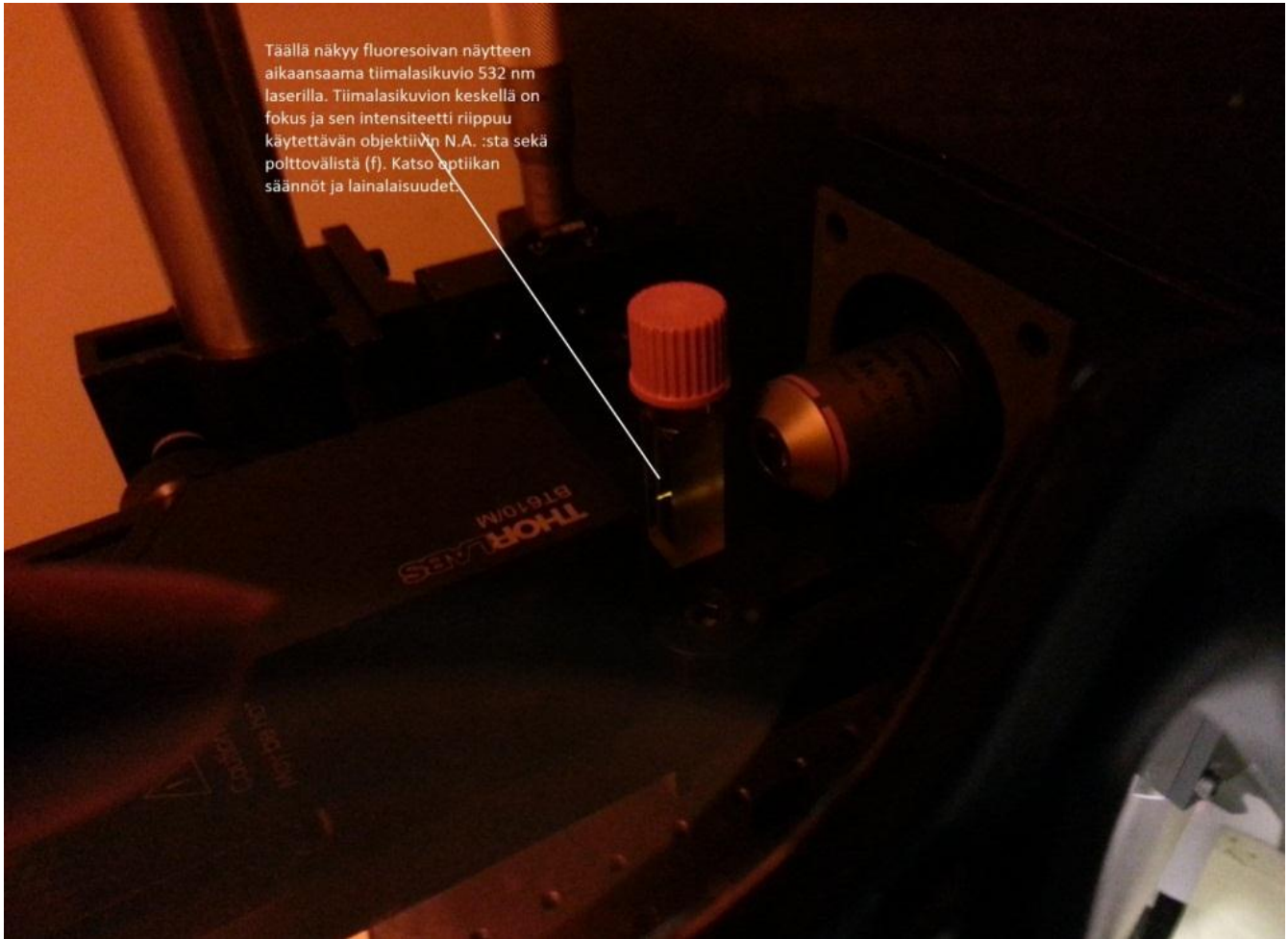
Keino	Tarkoitus
Raman-mittauskokoontalon mekaaninen optimointi (herätesäteen polttopisteen fokusointi, oikean polttovälin määrittäminen helpolla säädöllä)	Näytteestä tulevan sirontaemission keruun optimointi
Raman-mittauskokoontalon käytettyjen optisten materiaalien optimointi	Näytteestä tulevan sirontaemission keruun optimointi
Laitteiston mittapään (engl. probe) polttopisteen ja polttovälin määrittäminen sopivaksi tehtävään mittaukseen	Näytteestä tulevan sirontaemission keruun optimointi; esimerkiksi liuosmittauksissa polttopisteen (= piste tai alue, jolta tapahtuu intensiivisin takaisinsironta) tulisi olla liuoksessa
Liuosten valmistaminen tarkoin määritellyllä protokollalla sekä kemiallisten interaktioiden selvittäminen liuotinmolekyylien kanssa	Liuosten konsentraatiovaihteluiden minimointi, sakkareaktioiden minimointi. Interaktiot tutkittavan molekyylin ja liuotinmolekyylin välillä saattavat aiheuttaa spektriikkien siirtymiä
Useat kontrollimenetelmät liuosten tilan tarkistamiseksi ja todellisen liuoksen pitoisuuden määrittäminen (esimerkiksi nefelometri ja HPLC)	Varmistuminen siitä, että mitataan todellisia liuoksia konsentraatioita
Useat rinnakkaiset mittausdatan esi- ja jälkikäsitteilyt (esimerkiksi yksi- ja monimuuttujaanalyysit, spektrien normalisointi, taustakorjaukset, SNV-korjaukset, toisen derivaatan käyttö, PCA-analyysi)	Ei-kemiallisista tekijöistä johtuvien virhe- ja variaatiotekijöiden vaikutuksen minimointi sekä etenkin monimuuttujadatan yksinkertaistaminen helpommin käsiteltävään muotoon (PCA-analyysi)
Analyysin ja tutkimusten tavoitteiden kannalta oleellisen Raman-spektrialueen valinta	Yleensä aineiden Raman-spektrissä on alueita, joilla sijaitsee niitä parhaiten kuvaavat ja intensiivisimmät Raman-sironnan alueet. Muun muassa eroavuuksien selvittäminen eri konsentraatioiden välillä helpottuu.
Useiden spektrisarjojen mittaaminen	Eri mittauskertojen välisten variaatioiden minimointi

Näitä määrittämiä ja havaintoja voidaan pitää pohjatietona myös esimerkiksi myöhempiä aika-erotteisella Raman-laitteistolla tehtäviä solumäärittämiä ja kvantitatiivisia määrittämiä silmällä pitäen. Raman-määrittämiä pidetään erittäin suoraviivaisina ja helppoina näytteen esikäsittelyn suhteen. Tämä pätee melko hyvin kiinteille aineille, mutta etenkin liuosmittauksissa on noudatettava tarkkoja ja toistettavia protokollia, jotta tulokset olisivat tulkittavissa oikein mittaajasta, laitteistosta ja mittaustaikasta huolimatta. Lisäksi sekä mittauskokoonpanon aaltolukuasteikon, intensiteettiasteikon ja laserin kalibroinnin tulee olla tarkoin kohdallaan. Konventionaalisella Raman-laitteistolla mitattujen liuostulosten perusteella aika-erotteiset liuosmittaukset tehtiin kaikissa tilanteissa 0.45 µm suodattimella suodatetulla 50 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  suhteen) PBS-liuoksella, jonka pH oli 7.05. On myös tärkeää huomioida, että konventionaaliset mittaukset tehtiin käyttäen kaikille liuoksille samoja mittaustarkkuusparametreja (detektorin aukioloaika = integraatioaika = Exp-arvo ja tehtyjen mittausten määrä = Acc-arvo). Aika-erotteisella laitteistolla mitatut spektrit puolestaan normalisoitiin korkeimman piikin mukaan Origin-ohjelman avulla. Näin pyrittiin vakioimaan mittaustarkkuusolosuhteet, jotta tunnistettavien piikkien lisäksi niiden intensiteeteistä olisi saatu alustavaa kvantitatiivista tietoa. Tämän tutkimuksen puitteissa näissä määrittämissä ei ole tarkemmin tehty varsinaista kvantitatiivista analyysiä (luvussa 5.5. Kohti kvantitatiivista analyysiä on kuvattuna joitakin menetelmiä mahdollisille, jatkossa tehtäville kvantitatiivisille mittauksille). Edellä kuvatut määrittämykset ovat kuitenkin oleellista tietoa, mikäli halutaan tehdä esimerkiksi biologisesti kiinnostavia määrittämiä soluilla. Tällöin on tärkeää pystyä yhdistämään solukokeiden yhteydessä mitattavat Raman-spektrit ja niiden intensiteetit solujen sisä- ja/tai ulkopuolella olevaan lääkeaineliuoksen konsentraatioon. Edelleen, myös mikroskoopi- ja kuvantamistekniikoita hyödynnettäessä piikkien intensiteettien ja niitä vastaavien konsentraatioiden vastaavuuksien tunteminen auttaa esimerkiksi PCA-analyysin pohjalta tehtävässä digitaalisessa kuvanmuodostuksessa.



#### 5.4. Raman-kokoonpanojen optiikasta, kalibroinnista ja mittausaikojen lyhentämisestä

Pääsääntöisesti Raman-spektrin mittaaminen kiinteille aineille ja liuoksille vaatii näytteen asettamista oikean etäisyyden päähän laserin säteestä. Näyte tulee asettaa sellaiselle etäisyydelle, että säteen polttopiste on näytteessä. Nesteille ja liuoksille tulisi varmistua siitä, että polttopiste sijaitsee todellisuudessa nesteen sisällä, jotta Raman-spektristä saadaan luotettava ja toistettava (Taylor ja Langkilde 2000). Kuvassa 39 esitetään fluoresoivan nestenäytteen analysointia 532 nm:n herätelaserilla. Kuva havainnollistaa tilannetta, jossa kvartsikyvetissä olevan nesteen sisällä on nähtävissä 'tiimalasimainen' kuvio. Kuvio on objektiivilinssin muodostama kartiokuvio. Polttopiste sijaitsee kartiokuvion keskellä. Kyseisestä pisteeseen tulee eniten herätteen fotoneja ja toisaalta siitä siroaa takaisin keruupäähän fotoneja.



**KUVA 39:** Nestenäytteen Raman-analyysi 532 nm:n herätteellä. Kvartsikyvetin keskellä näkyy fluoresoivassa näytteessä selvästi tiimalasikuvio, jonka keskellä puolestaan sijaitsee käytetyn objektiivin polttopiste.

Moderneissa Raman-laitteistoissa hyödynnetään optiikan lainalaisuuksia tutkittaessa valonsäteiden kohdistamista näytteisiin ja toisaalta takaisin keruukuiduille ja edelleen aina detektorille asti. Optiikan peruslakien mukaan on voimassa (Young ja Freedman 2000)

$$d = k * \lambda / N.A. = 0.61 * \lambda / n * (\sin \theta), \text{ jossa}$$

$d$  = resoluutio = pienin havaittava välimatka kahden viivan välillä

$\lambda$  = aallonpituus

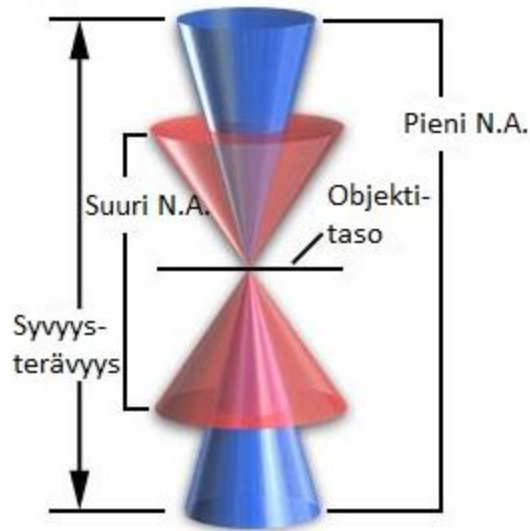
N.A. = numeerinen apertuuri

$n$  = taitekerroin

$\theta$  =  $\frac{1}{2}$  valon tulokulma

Lisäksi voidaan todeta, että mitä suurempi on suurennos, sitä pienempi syvyysterävyys voidaan saavuttaa (kuva 40).

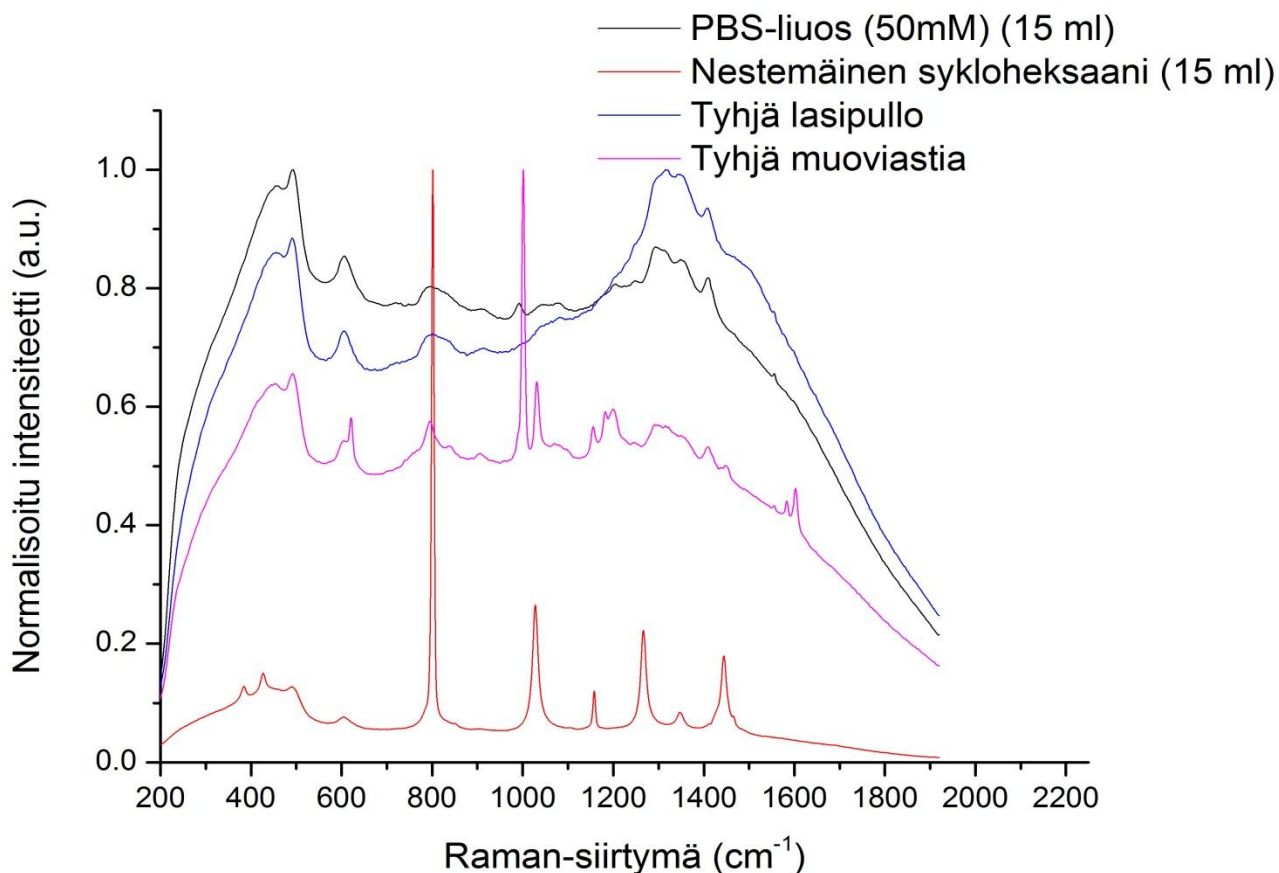
### Syvyysterävyyden mittakaava



**KUVA 40:** Objektiivilinsin kartiokuvion malli.

Lisäksi, kun kun linssin (objektiivin) polttoväliä kasvatetaan, polttopiste siirtyy kauemmaksi. Tässä saattaa olla osittain syy myös etenkin konventionaalisella Raman-laitteistolla suorituissa liuosmittauksissa havaittuun, toistuvaan ja voimakkaaseen kuvioon spektrien aaltolukualueella  $\sim 200 \text{ cm}^{-1} - 700 \text{ cm}^{-1}$  (kuva 41). Ensinnä, kyseisen laitteiston nimellinen polttoväli oli 250 mm, eli melko pitkä. Polttopisteessä säteen nimellinen halkaisija oli 6 mm. Laitteiston PhAT-mittapään (engl. PhAT probe) objektiivin numeerinen apertuuri (N.A.) oli pieni. Kokonaisuudessaan näiden ominaisuuksien vuoksi herätesäde oli lähes kollimoitu laser-säde. Näytteeseen ohjattu valo meni halkaisijaltaan paksuna säteenä näytteeseen, polttopisteen intensiteetti ei ollut missään kohden polttopistettä erityisen suuri ja takaisin sironnut valonsäde palasi

niin ikään samankaltaisena paksuna, suorakaiteenmuotoisena takaisin keräyskuiduille. Fokuspisteestä tulevan takaisinsironnan fotonien keräyskulma ( $\theta$ ) on melko pieni ja näin ollen kuiduille tulevaa fotonivirtaa kuvaava tiheysfunktio venyy pitkälle alueelle. Toisin sanoen, fotonien keruuta detektorille ei tapahdu mistään kohden erityisen tiheästi (tehokkaasti), mutta se tapahtuu pitkältä matkalta. Tilannetta voidaan verrata toisenlaiseen järjestelyyn, jossa keräyskartion kulma olisi suuri, eli objektiivilinssin N.A. olisi suuri. Tällöin tarkan polttopisteen pinta-ala olisi pieni ja keräysfunktio saataisiin integroitua lyhyemmän alueen yli. Täten keräyskuidun päähän ja edelleen detektorille saataisiin kerättyä enemmän sironneita fotoneja ja laitteiston herkkyys paranisi. Toisena mahdollisena tekijänä mainittuun, konventionaalisella kokoonpanolla mitattujen liuosten spektrejä häiritsevään ilmiöön aaltolukualueella  $\sim 200 \text{ cm}^{-1} - 700 \text{ cm}^{-1}$  voidaan pitää käytettyä herätteen aallonpituutta (785 nm) ja sen aiheuttamaa fluoresenssia. Yleensä fluoresenssia esiintyy lyhyemmän aallonpituuden laser-herätettä käytettäessä, mutta toisinaan sitä esiintyykin pidemmän aallonpituusalueen herätettä käytettäessä (Smith ja Dent 2005). Kalibroinnissa käytetty nestemäinen sykloheksaani aiheutti kuitenkin erittäin tarkan ja häiriöttömän Raman-spektrin aina, kun se mitattiin ennen varsinaisia näytteiden mittauksia. Kuitenkin, välittömästi siirryttäessä muihin nestemäisiin näytteisiin, spektreissä näkyi kuvan 41 mukaisesti voimakkaita signaaleja, vaikka nestemäisen sykloheksaanin mittauksessa niitä ei näy. Voidaan myös esittää mahdollisuus sille, että sykloheksaani ( $n = 1.4$ ) aineena siirtää polttopistettä lasipullon sisällä kauemmaksi (jopa lasipullon pohjan taakse), kun taas pelkkä ilma tai veden taitekerrointa lähellä olevat PBS-liuokset siirtävät fokuspistettä vähemmän. Näin ollen fokuspiste on saattanut sijaita likimäärin lasipullon / astian pohjassa ja sirontaa on tapahtunut astioiden pohjista.



**KUVA 41:** Nesteillä tehtyjen konventionaalisten Raman-mittausten spektrejä (vertailuksi myös kalibroinnissa käytetyn sykloheksaanin spektri).

Voidaan myös kiinnittää huomio kuvaan 32, jossa on esitetty kiinteän ranitidiinihydrokloridin ja liuksena olevan ranitidiinihydrokloridin konventionaalinen sekä aika-erotteinen spektri samassa kuvassa. Vaikuttaa osin siltä, että todennäköisten toisiaan vastaavien piikkien sijainnit hieman vaihtelevat näennäisesti seuraavassa kuvatulla tavalla.

Pääsääntöisesti spektrien muodot täsmäävät keskenään, mutta niissä on havaittavissa ikään kuin haitariliikettä. Esimerkiksi konventionaalisisessa välillä  $1046\text{ cm}^{-1}$  -  $1134\text{ cm}^{-1}$  spektrin muodossa tapahtuu loiva lasku (siis katsottuna vasemmalta --> oikealle). Aika-erotteisessa on myöskin välillä  $1047\text{ cm}^{-1}$  -  $1133\text{ cm}^{-1}$  lasku, mutta spektri näyttää 'kaventuneen' suhteettoman paljon kyseisellä välillä. Tiivistettynä, kysymyksiä

herättää, minkä vuoksi piikkien välinen ero ei pysy koko matkalla samana. Vaihtelua tapahtuu seuraavissa kohdissa (a) – (d) kuvatulla tavalla.

**(a)** Piikit  $1134\text{ cm}^{-1}$  ja  $976\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) ja  $1133\text{ cm}^{-1}$  ja  $975\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen) ovat käytännössä täysin kohdillaan ja vastaavat toisiaan.

**(b)** Kohdan  $975\text{ cm}^{-1}$  vasemmalla puolella sijaitsevien piikkien ero on  $956\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $948\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen), eli aika-erotteinen on  $\sim 8\text{ cm}^{-1}$  jäljessä.

**(c)** Välille  $1046\text{ cm}^{-1}$  –  $1134\text{ cm}^{-1}$  sijoittuvien (edelleen, spektrin kokonaismuodon perusteella lähes varmasti vastaavien) vastinpiikkien ero on suurempi,  $1025\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $1047\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen) ja  $1046\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $1064\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen)), eli aika-erotteinen on luokkaa  $\sim 20\text{ cm}^{-1}$  edellä.

**(d)** Kohdan  $1134\text{ cm}^{-1}$  oikealla puolella olevien vastinpiikkien ero on kääntynyt puolestaan siten, että aika-erotteinen onkin  $\sim 7 - 8\text{ cm}^{-1}$  jäljessä konventionaalista ( $1164\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $1157\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen) ja  $1186\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $1177\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen) ja  $1248\text{ cm}^{-1}$  (konventionaalinen) vs.  $1241\text{ cm}^{-1}$  (aika-erotteinen).

Todennäköinen aiheuttaja tälle on käytetyn heräte-laserin aallonpituus. Toisin sanoen  $532\text{ nm}$  laserilla mitatut tulokset voivat olla seurausta heräte-energian erilaisuudesta verrattuna  $785\text{ nm}$  laseriin; molekyylin rakenteessa saattaa tapahtua muutoksia liittyen käytettyyn heräte-energiaan. Ilmiöiden täsmällinen molekyyli- ja atomitason määrittäminen on kuitenkin näiden tarkastelujen ulkopuolella.

Huomioitava seikka Raman-määryksissä on spektrometrin kalibrointi. Esimerkiksi lääketeollisuuden käytössä analyysitulosten on oltava toistettavia ja tarkkoja (Lewis ja Edwards 2001). Dispersiospektrometrin kalibroinnissa on kolme tärkeää parametria, jotka tulee kalibroida säännöllisin väliajoin ja etenkin laitteistoon tehtyjen muutosten yhteydessä. Parametrit ovat spektrografin aallonpituusakseli, systeemin spektrivaste (tai intensiteettiakseli) ja laserin aallonpituus. Näissä määryksissä aika-erotteinen

laitteisto oli kehitysvaiheessa ja joitakin muutoksia muun muassa detektorin aikaikkunoiden jaksotukseen piti suorittaa (eli muutos laitteistoon). Tämän jälkeen suoritettiin spektrografin aallonpituusakselin kalibrointi kahdella erillisellä laserilla; 532 nm ja 623 nm. Ensin mainitun laserin aallonpituutta saatiin muutettua Hg-Ar-kaasupurkauslampulla siten, että detektorin sinisen 'ääripään' kalibrointiin voitiin käyttää tällä menettelyllä aikaansaatuja 3 tunnettua spektriipiikkiä. Detektorin punaisen 'ääripään' kalibrointiin käytettiin 632 nm He-Ne-laseria. Tästä saatiin 1 tunnettu piikki, kaasupurkauslamppua ei käytetty enää 632 nm laserin yhteydessä. Systeemin spektrivasteen kalibrointi on tärkeää, jotta mitatut intensiteetit olisivat samansuuruisia käytetystä herätteestä huolimatta. Jokaisella spektrometrilla on oma yksilöllinen intensiteetin siirtofunktionsa, joka on käytännössä tulos kaikista yksittäisistä komponenteista koko optisella keruumatkalla. Näitä komponentteja ovat muun muassa optisten elementtien transmissio, diffraktiohilojen tehokkuus, CCD-detektorin kvanttisuhde ja pikselistä-pikseliin-vaihtelut CCD-detektorin vasteessa (vastefunktiossa). Laser-herätelähteen kalibrointia ei näissä määrityksissä ollut tarvetta suorittaa, koska käytetty laser on tunnetusti hyvin stabiili.

Saatujen tulosten pohjalta voidaan todeta, että konventionaalinen Raman-laitteisto ei ollut muokattavissa optimaaliseksi esimerkiksi liuosten mittaamiseen. Myöskään mittausjärjestelyjen muuttaminen ja erilaisten mittausastioiden testaaminen ei muuttanut ratkaisevasti tilannetta. Lisäksi konventionaalaisella Raman-kokoonpanolla käytettiin 785 nm jatkuvan aallonpituuden heräte-laseria, aika-erotteisella puolestaan 532 nm pulssilaseria. Saadut tulokset eivät ole tältä kannalta täysin vertailtavissa keskenään. Uudentyyppisellä aika-erotteluun kykenevällä Raman-kokoonpanolla on tästä huolimatta havaittavissa useita etuja. Ensinnä, lyhyemmän aallonpituuden (eli korkeamman taajuuden ja energian) heräte-laserin pitäisi aiheuttaa enemmän fluoresenssiongelmia kuin pidemmän aallonpituuden laserin (eli matalamman taajuuden ja energian). Mitatuissa tuloksissa huomataan, että herätteestä huolimatta aika-erotteisella laitteistolla saadaan aikaan tehokasta fluoresenssin vähenemistä ja toisaalta etuja korkeammasta heräte-energiasta. Yleensä Raman-signaalin keruussa

joudutaan tekemään valintoja näiden kahden tekijän välillä; joko käytetään pidemmän aallonpituuden ja herätettä (esimerkiksi 1064 nm laseria), jolloin Raman-sironnan detektointi vaikeutuu huomattavasti, mutta fluoresenssi-ilmiö vähenee elektronisten siirtymien vähentyessä matalamman heräte-energian vuoksi. Jos taas käytetään lyhyemmän aallonpituuden herätettä, Raman-sirontaa tapahtuu enemmän korkeamman heräte-energian seurauksena, mutta niin ikään fluoresenssi voimistuu. Aika-erottelulla voitiin saadusta kokonaissignaalista vähennettyä fluoresenssin osuus pois niiden aika-ikkunoiden osalta, joiden aikana kerättiin eniten fluoresenssin aiheuttamia emissiofotoneja. Jäljelle jäi nopeasti tapahtuvan Raman-sironnan fotonien detektoinnista saatu spektri. Menetelmän hyötynä oli myös se, että spektrin hienorakennetta oli nähtävissä korkeamman heräte-energian aktivoitua sellaisia molekyylien värähtelyjä, joita pidemmän aallonpituuden herätteen käytöllä ei voitu havaita. Nämä määritykset koskivat sekä kiinteitä että liuksina mitattuja aineita. Näin ollen, vaikka konventionaalinen laitteisto oli ennen kaikkea optimaalinen kiinteiden aineiden mittauksiin, aika-erotteisella kokoonpanolla saatiin selvää parannusta Raman-signaaleihin. Aika-erotteisen laitteiston eduksi voidaan laskea myös korkea muokattavuusaste; muun muassa säteen fokusoinnin ja näytteen altistuksen suunta, fotonien keruuoptyikka ja mahdollisuus mikroskoopin liittämiseen olivat kaikki täysin muokattavissa. Laitteiston fyysinen sijoittelu laboratoriotiloihin voidaan toteuttaa monin eri variaatioin ja sen stabiilius osoittautui hyväksi vaihtelevissa lämpö- ja kosteusolosuhteissa pitkien mittausten aikana.

Monissa Raman-sovelluksissa mielenkiinto prosessien aikana tapahtuvaa monitorointia kohtaan on kasvussa. Lääketeollisuudessa halutaan seurata esimerkiksi lääkeaineiden kiteytymisprosessin muutoksia koko prosessin matkalla. Toistaalta solututkimuksissa voidaan seurata solujen ympäristöönsä tuottamien aineenvaihdunta- ja muiden tuotteiden muutoksia tai antibioottien tehokkuutta (nopeutta) tautia aiheuttavien bakteerien tuhoutumista indikoivien aineiden pitoisuusmuutoksissa. Tällöin Raman-laitteiston on oltava myös on-line-monitorointiin kykenevä, eli mittauksia voidaan haluttaessa suorittaa reaaliajassa. Lisäksi, koska Raman-tekniikka mahdollistaa



mittaukset esimerkiksi lasisten seinämien läpi, mittauksia päästään suorittamaan ilman erillistä näytteenottoa. Nämä kaksi tekijää muodostavat Raman-spektroskopiasta erittäin tehokkaan apuvälineen monipuolisiin reaaliajassa tapahtuviin mittauksiin. Eräs potentiaalinen sovellusalue on näin ollen myös elävien solujen solukalvoseptoreiden toiminnan havainnointi esimerkiksi lääkeaineen sitoutuessa pinnan vastaanottoon. Tässä tutkimuksessa käytetyn aika-erotteisen Raman-laitteiston pitkien spektrien (esimerkiksi amorfisen indometasiinin mittaus spektrialueella  $150\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$  oli  $\sim 11$  h mittaus) mittausajat ovat toistaiseksi pitkiä. Tälle on kuitenkin jo valmiita ratkaisuja, jotka nopeuttavat huomattavasti detektointia myös pitkien spektrialueiden määrittämisessä. Alla olevassa taulukossa 11 on kootusti keinoja, joilla mittauksia nopeutetaan.

**TAULUKKO 11: Yhteenveto Raman-laitteiston optimoinnista mittausaikojen lyhentämiseksi**

Kohde	Parannus
Detektori	Pikseleiden lisääminen, esim. 128 pikselistä 512 pikseliin
Detektori / spektrografi	Detektorin liikuttelun parantaminen
Spektrografi	Mikrolinssien käyttö detektorin yläpuolella
Spektrografi	Keruukuidun kiinnityksen parantaminen, jotta sirontafotoneja ei 'hukata' tilanteisiin, joissa niitä kohdistetaan detektorista ohi
Laser	Tehon lisääminen
Koko laitteisto	Kaikkien käytettyjen optisten materiaalien (kuidut, peilit, linssit) optimointi

Pelkästään taulukossa 11 esitetyillä ratkaisuilla esimerkiksi  $\sim 10$  tunnin mittausaika voidaan vähentää  $\sim 4$  minuuttiin.

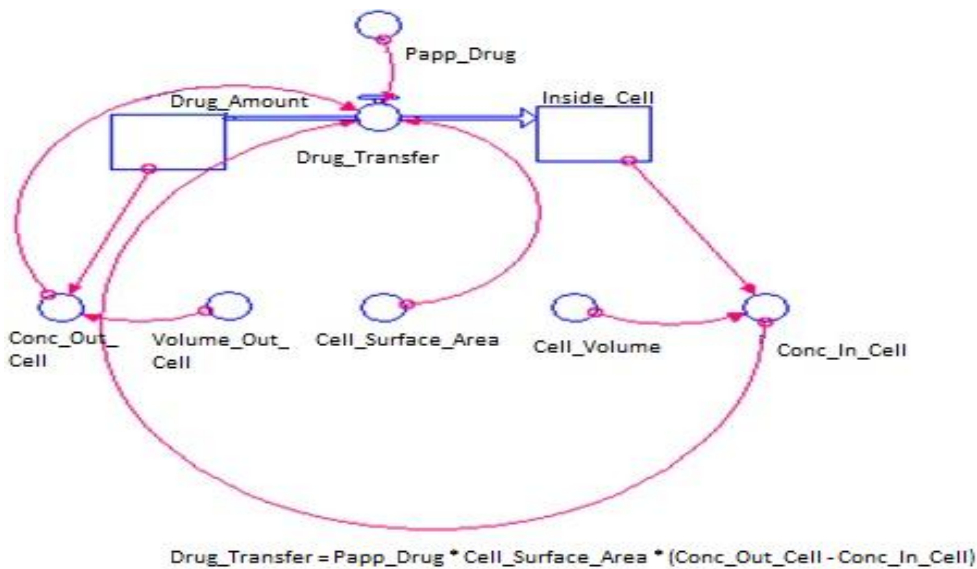
## 5.5. Menetelmäkehitystä I: Stella-malli lääkeaineen passiiviselle permeaatiolle solukalvon läpi

Edellä esitettyjen tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että kehitetyllä uudella Raman-tekniikalla on potentiaalia myös soveltavaan tutkimukseen, kuten solututkimuksiin tai muihin lääkekehitystä ja biologisia määrittämiä integroivaan tutkimukseen.

Elävillä soluilla tehtävien määrittästen alkuvaiheissa olisi käytännöllistä hyödyntää muun muassa lääkekehityksessä usein käytettyä mallia. Karkeasti yleistettynä muodostetaan lääkeaineen tunnettujen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien perusteella tietokonemalli. Malli voi kuvata jotakin tiettyä elimistön osaa - jopa solukalvoa reseptoreineen, tai suurempaa kokonaisuutta, kuten suolistoa ja sieltä tapahtuvaa lääkeaineen imeytymistä (Kortejärvi ym. 2007). Mallin avulla on mahdollista suunnitella esimerkiksi sopivaa koeasetelmaa, kun tiedetään lääkeaineen ominaisuuksia - sekä parhaassa tapauksessa voidaan arvioida jo etukäteen esimerkiksi sen vaikutuskohteen mallinnettavia suureita. Seuraavassa vaiheessa suoritetaan *in vitro* tai *in vivo* tutkimus. Tutkimuksesta saadun mittaustiedon pohjalta voidaan määrittää tärkeitä farmakokineettisiä parametreja tutkittavalle lääkeaineelle jollakin tarkoitukseen soveltuvalla ohjelmalla. Ensimmäisessä vaiheessa muodostettua mallia voidaan näiden tietojen pohjalta tarkentaa ja muokata vastaamaan paremmin lääkeaineen todellisia liikkeitä elimistössä. Pysyttelemällä mahdollisimman yksinkertaisissa malleissa ja tarkentamalla niitä vähitellen saatavalla tutkimusdatalla, päästään optimoimaan esimerkiksi lääkemolekyylin ominaisuuksia haluttuun suuntaan. Etuna on nopeus ja vaivattomuus verrattuna esimerkiksi tilanteeseen, jossa jokaisen lääkemolekyylille tehtävän (kemiallisen) muokkauksen jälkeen jouduttaisiin suorittamaan *in vitro* tai *in vivo* koesarja.

Tässä yhteydessä olisi mahdollista tehdä solukalvon passiivista permeaatiota simuloiva malli, jossa käytetään tutkittavan lääkeaineen P-arvoa, MDCKII-solujen keskimääräistä

imeytymispinta-alaa ym. relevantteja parametreja mallin rakentamiseksi. Mallitetaan esimerkiksi tilanne, jossa lääkeaine on jo valmiiksi liuenneena, eli liukenemista ei tarvitse sinänsä huomioida ja se ei rajoita lääkeaineen poistumista liuostilasta. Edelleen, koska konsentraatio liuospuolella  $\gg$  solun sisällä, mallissa ei tarvitse (ainakaan aluksi) huomioida 'vastavoimaa', joka alkaa rajoittaa permeaatiota solun sisäpuolen konsentraation kohotessa. Voidaan siis olettaa, että 'sink' - olosuhteet säilyvät koko mittauksen ajan. Koejärjestelyssä on tärkeää säilyttää mainitut sink-olosuhteet; tällöin maksimissaan 10 % alkuperäisestä konsentraatiosta saa olla siirtymässä kullakin hetkellä apikaalipuolelta (liuostila) --> basolateraalipuolelle (solun sisään). Edelleen, tämä tarkoittaa esimerkkinä, että jos apikaalipuolen pitoisuus on  $C_{\text{sink}} = 37.8 \mu\text{g}$ , basolateraalipuolelle saa olla siirtymässä  $C_{\text{sink}} = 37.8 \mu\text{g} / \text{ml} \times 0.1 = 3.78 \mu\text{g}$ . Mikäli konsentraatio basolateraalipuolella ylittää tämän, sink-olosuhteet eivät ole voimassa, eli tätä konsentraatiota vastaava mittausajankohta  $t$  on päätte näytteenottoajankohdille. Näin ollen voidaan näytteenottoajankohdat määrittää sopiviksi aikaväliltä  $t_0$  (alkuhetki) -  $t_n$  (viimeinen mahdollinen ajanhetki, kun sink-olosuhteet ovat voimassa).



**KUVA 42:** Stella-malli lääkeaineen passiiviselle permeaatiolle solukalvon läpi

Tiedoilla konstruoidaan edellä esitetty malli, jolla voidaan määrittää sopivat näytteenottoajankohdat (selvitetään, millä logP arvolla ~ permeaatio on tapahtunut muutamissa minuuteissa, suuntaa-antavaksi). Mallinnukseen voidaan käyttää esimerkiksi Stella-ohjelmaa (Isee System Inc., USA). Kuvassa 42 on esitetty lääkeaineen passiivista solukalvopermeaatiota kuvaava malli. Mallinnus on suoraviivainen tapa saada alustavia ja ennustettavia tuloksia solukokeita ajatellen.

## 5.6. Menetelmäkehitystä II: Kohti kvantitatiivista analyysia

Etenkin lääketeollisuudessa käytettyjen menetelmien tulee olla aina validoitavissa, niiden tulee olla luotettavia ja toistettavia mittauskerrasta, mittaajasta ja käytännössä mittaolosuhteista riippumatta. Näin ollen keskeinen kysymys Raman-tekniikoiden hyödyntämiselle on, miten Raman-signaalista voitaisiin saada luotettava ja toistettava kvantitatiivinen mittausmenetelmä kiinteille aineille ja liuoksille. Mikäli halutaan tehdä luotettavaa ja toistettavaa kvantitatiivista analyysiä, menetelmät on validoitava huolella, laitteisto on kalibroitava aina samalla tavalla ja mittausten virheanalyysi on oltava sellainen, että virheen lähteet ovat yksiselitteisesti tulkittavissa.

Esimerkkinä Raman-signaalin perusteella tehtävästä kvantitatiivisesta määrittämisestä voidaan kuvata protokolla yksikomponenttiliuoksille. Valitaan liuoksessa mitatusta lääkeaineesta 'varma', tunnistettava ja vahva piikki, joka kuuluu kyseiselle lääkeaineelle. Yleisemmin, spektroskopian menetelmissä voidaan havainnoida yksittäisen piikin tai muutamien tunnistettavien piikkien muutoksia tai toisaalta voidaan hyödyntää niin kutsuttua PLS-analyysiä (engl. PLS = Partial Least Squares). Jälkimmäisessä käytetään koko spektrin informaatiota kvantitatiiviseen analyysiin (Pajamo O: Amorfisen aineen kvantitointi. Seminaaritiivistelmä 31.5.2005. Helsingin yliopisto).

Tehdään esimerkiksi 3 konsentraation sarja liuoksia ja tarkistetaan jollakin rinnakkaisella menetelmällä, että liuostila on todellisuudessa saavutettu. Otetaan aiemmin valitun

Raman-spektrin piikin intensiteetti indikaattoriksi liuoksen vahvuudesta. Otetaan myös jokaisesta konsentraatiosta (esim. 3 eri konsentraatiota) 3 rinnakkaisnäytettä UPLC-referenssiä varten ja määritetään konsentraatiot UPLC:lla. Tämän jälkeen tehdään standardisuora Raman-mittauksille konsentraatioista (x-akselille pitoisuus ja y-akselille intensiteetti). Raman-signaalin työstäminen kemometrinen menetelmien keinoin tuottaa luotettavia ja toistettavia kvantitatiivisia analyysituloksia (Roggo ym. 2010). Tavallisimmin käsittelyyn kuuluvat spektrien normalisointi (parhaiten tilanteeseen sopivalla normalisointirutiinilla) ja mahdollisesti signaalin taustan korjaaminen esimerkiksi polynomisovitukseen perustuvalla menetelmällä. Myös SNV-menetelmän (engl. SNV = Standard Normal Variate) käyttö kuuluu tavallisiin kvantitatiivisen analyysin vaiheisiin. Kvantitatiivista analyysiä suunniteltaessa on tärkeää etsiä sopivimmat signaalin prosessointimallit. Erilaisia skaalausmenetelmiä (esimerkiksi yksikkövarianssi ja sentteröinti) , normalisointia (SNV-korjaus ja 1. tai 2. derivaatan käyttö) sekä datan rajusmenetelmiä (PLS-analyysi) sekä niiden yhdistelmiä tulisi testata kvantitatiivisten menetelmien yhteydessä. Mallien pätevyyttä voidaan arvioida esimerkiksi RMSEP (engl. RMSEP = Root Mean Square Error of Prediction) tai RMSEC (engl. RMSEC = Root Mean Square Error of Calibration) menetelmillä.

### 5.7. Menetelmäkehitystä III: Solumittaukset

Elävillä soluilla tehtäviin Raman-määrittäisiin tarvitaan käytännössä lähes on-line-monitorointiin kykenevää laitteistoa. Esimerkiksi solujen ympäristössä olevien yhdisteiden reaaliaikainen tunnistaminen ja konsentraatiomuutosten seuraaminen reaaliajassa on lähes välttämätöntä, jotta saataisiin oleellista mittaustietoa.

Elävillä soluilla tehtävissä määrittäyksissä voitaisiin käyttää esimerkiksi MDCKII-solulinjan tai HepG2-solulinjan soluja. Esimerkiksi MDCKII-soluja käytetään usein tutkimuksissa, joissa halutaan mallintaa esimerkiksi ihmisen suoliston solujen solukalvoläpäisyä. Voidaan valita esimerkiksi yksi lääkeaine, jolla on hyvä vesiliuskoisuus (= hyvä liukoisuus

PBS-puskuriliuokseen) ilman liukoisuusapua (esimerkiksi dimetyylisulfoksidi) ja hyvä solukalvon läpäisykyky. Toisin sanoen tällaisessa tutkimuksessa voitaisiin valita BCS I – luokan lääkaineita (hyvä vesiliukoisuus, hyvä solukalvon läpäisyominaisuus) tutkittaviksi. Aika-erottelun fluoresenssisuppression ansiosta esimerkiksi solukalvorakenteiden aiheuttamasta autofluoresenssista ei olisi tässä tapauksessa haittaa.

Kokeissa voitaisiin aluksi tehdä yksinkertainen koejärjestely; miten (yksi)solukerroksen päälle applikoidussa lääkeaineliuoksessa signaalin intensiteetti muuttuu valituissa näytteenottoajankohdissa. Toisin sanoen, miten lääkkeaineiden kulkeutuminen soluihin ja näin ollen lääkeainekonsentraation lasku liuoksessa näkyy Raman-signaalissa. Fokusointi pitäisi pystyä suorittamaan laitteistoon yhdistetyn mikroskoopin avulla. Käytännössä siis pitäisi fokusoida herätelaserin intensiivisin piste (= polttopiste) tarkasti solun ulkopuolella olevaan nestekerrokseen tai solun sisään. Seuraavassa esitetään runkomalli protokollalle, jolla solumittaukset voitaisiin suorittaa.

### **Protokolla vaihe I:**

1. Kofeiinista standardit, esim. PBS-liuoksiin (50 mM) valmistettuina, kofeiinin vahvuudet liuoksissa 18.75 mM, 37.5 mM ja 75 mM.
2. UPLC:lla standardien tarkka pitoisuusmääritys.
3. Standardien Raman-mittaus ja  $555\text{ cm}^{-1}$  piikin intensiteetin seuraaminen.
4. Normalisointi jonkin liuokseen applikoidun sisäisen standardin avulla. Sisäisen standardin tulisi tuottaa vahva ja tunnistettava Raman-signaali ja se ei saisi olla kemiallisesti millään tavalla reaktiivinen liuoksen muiden komponenttien kanssa (esimerkiksi liuotetun lääkeaineen kanssa). Tällaisena sisäisenä standardina voisi toimia esimerkiksi jodi  $\text{I}_2$  tai kalsiumfluoridi  $\text{CaF}_2$  (Tfayli ym. 2007) (kalsiumfluoridi toimii hyvin sisäisenä standardina esimerkiksi kudoksen näytteen käsittelyssä, koska se ei aiheuta Raman-signaalia aaltolukualueelle  $620\text{ cm}^{-1} - 1810\text{ cm}^{-1}$ ). Lisäksi, liuokseen lisätty sisäinen standardi ei saisi häiritä millään tavoin valitun solulinjan

toimintoja. Näin ollen voitaisiin normalisoida kaikkien (3 eri konsentraatiota tässä tapauksessa) yksisolukerroksen päälle applikoitujen lääkeaineliuosten seurattavan / seurattavien Raman-spektrioppiikkien intensiteetit sisäistä standardia vastaan. Erittäin tärkeä seikka tässä olisi se, että sisäisen standardin pitoisuus olisi jatkuvasti kontrolloitavissa ja tiedossa. Tämä tarkoittaa sitä, että jokaiseen solukerroksen päälle applikoituun lääkeaineliuokseen lisätyn sisäisen standardin pitoisuus olisi tarkasti tiedossa, eli sama kaikissa mittauksissa.

5. Standardisuoran rakentaminen (x-akselille pitoisuus, y-akselille intensiteetti).

**Protokolla vaihe II (lääkeaineen kinetiikan tutkimukset solujen, Ramanin ja UPLC:n avulla):**

1. Lääkeaineliuoksen applikointi solukerroksen päälle (konsentraatio on oltava detektorajojen sisällä, esim. 1-50  $\mu\text{M}$ , jos ei ole, laimennetaan UPLC:tä varten ennen analyysiä).

2. Ennalta määriteltynä mittausajankohtina näytteenotto liuoksesta UPLC-määrittystä varten ja on-line tapahtuva Raman-signaalin mittaaminen (joko yksittäisinä mittausajankohtina TAI jatkuva 'monitorointi' esim. puolen tunnin kohdalla tapahtuvalla mittauksella). Mikäli Raman-signaalin mittaamisen aika on liian pitkä lähes reaaliajassa tapahtuvaan mittaamiseen, voidaan harkita laitteiston optimointia joillakin taulukossa 11 kuvatuilla menetelmillä.

3. Raman-signaalin intensiteetti vähenee (oletus), kun lääkeainetta kulkee solujen sisään. Esimerkiksi seurataan kofeiinin piikin  $555\text{ cm}^{-1}$  intensiteetin muutosta ajanhetkestä  $t_0$  ---->> ajanhetkeen  $t_n$ . Tarkistetaan kyseisiä intensiteettejä vastaavat pitoisuudet protokollassa I määritellystä standardista.

4. Mittausajankohdissa otettujen näytteiden pitoisuuksien määrittäminen UPLC:lla referenssiksi / tarkistukseksi Raman-intensiteetin signaalin avulla määritetyn pitoisuuden paikkansa pitävyydestä. Tehdään korrelaatio **R**-arvolla, eli

esimerkiksi x-akselille Raman-intensiteetistä laskettu pitoisuus vs. y-akselille UPLC:lla määritetty tarkka pitoisuus.

5. Suurin ongelma tässä kohden on todennäköisesti vahva fluoresenssi, joka vuoksi konventionaalisella Ramanilla ei näy kuin fluoresenssispektri ilman mitään selkeää merkkiä lääkeaineesta. Aika-erotteisella Ramanille sen sijaan voi olla mahdollista ohittaa tämä fluoresenssi ja saada näkymään lääkeaineen signaali liuksesta. Näin ollen olisi mahdollista tehdä yllä kuvatun kaltainen koejärjestely ja saada alustavaa tietoa lääkeaineen kinetiikasta.

### 5.8. Menetelmäkehitystä IV: Mittaukset biomimeettisillä rakenteilla

On mahdollista eristää esimerkiksi HepG2-soluista solukalvorakenteita, applikoida niitä edelleen tukimateriaalien päälle ja määrittää erityyppisiä solukalvorakenteille tyypillisiä ominaisuuksia (Granqvist ym. 2014). Tällaisia ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi solukalvon reseptoreihin sitoutuvien (lääke)aineiden sitoutumis- ja irtoamisnopeus tai solukalvon lääkeaineläpäisyn tutkimukset. Koska solumäärittämissä on aiemmin havaittu ongelmia fluoresenssin kanssa, aika-erotteinen Raman-spektroskopia saattaisi olla ratkaisu näihin ongelmiin edellä esitettyjen tutkimusten perusteella. Sopivia menetelmiä tällaisiin tutkimuksiin voisivat olla Raman- ja SPR-tekniikat (Viitala ym. 2013). Käytännössä SERS-tekniikat ovat Raman-tekniikoiden ja SPR-tekniikoiden yhdistelmiä.

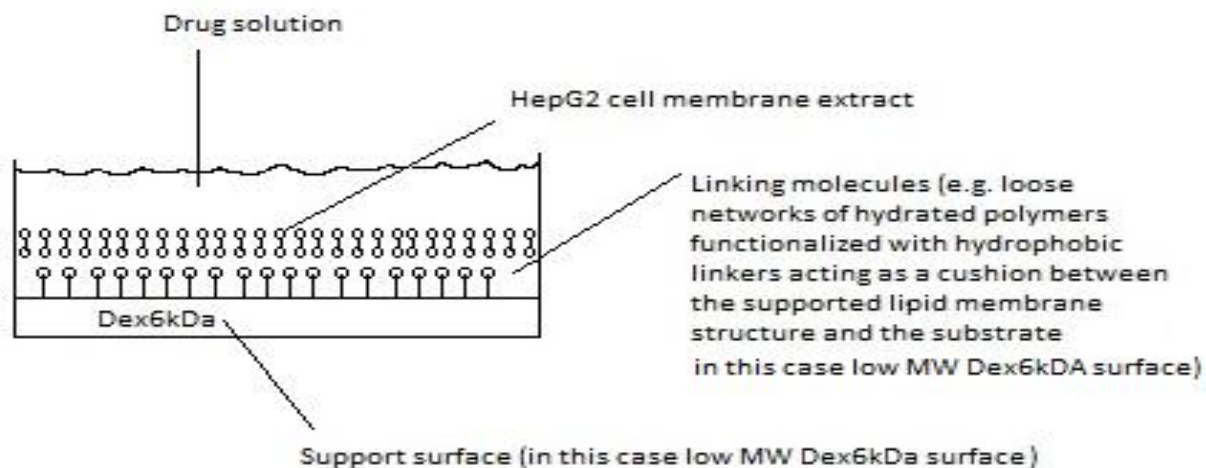
**Aihe: Stella-mallin, biomimeettisen solukalvon ja HepG2-solujen avulla tehtävät määrittäykset lääkeaineiden kinetiikan kokeellisessa mittauksessa**

**Tavoitteet:** <sup>a)</sup> Tutkia, kuinka lähellä toisiaan biomimeettinen solukalvopinta ja HepG2-solujen muodostama yksisolukerros soluviljelmässä ovat esimerkiksi lääkeaineen solukalvoläpäisevyyttä tutkittaessa. <sup>b)</sup> Löytää Papp-arvo lääkeaineelle, mikäli sitä ei ole aiemmin kirjallisuudessa määritetty. <sup>c)</sup> Löytää optimaalinen biomimeettinen



solukalvorakenne permeaatiotutkimuksiin, jotta kyseistä kalvorakennetta voitaisiin käyttää mahdollisimman laajalla skaalalla erilaisten lääkeaineiden permeaatiotutkimuksessa. <sup>d)</sup> Kehittää nopea ja suhteellisen yksinkertainen malli, jota voitaisiin käyttää yleisesti permeaatiomallina erilaisille solulinjoille ja eri lääkeaineille.

**Materiaali ja menetelmät:** Kokeellinen asetelma biomimeettiselle pintarakenteelle on esitetty alla olevassa kuvassa 43. Ainakin aluksi relevantti tukirakenne solukalvoekstraktille voisi olla matalan molekyylipainon dekstraani-pohjainen Dex6kDa-pinta. Kyseinen pinta oli sopiva tukipinta muun muassa seokselle, jossa oli HepG2-solulinjan solukalvosta eristettyjä luonnonmembraaneja (Granqvist ym. 2014).



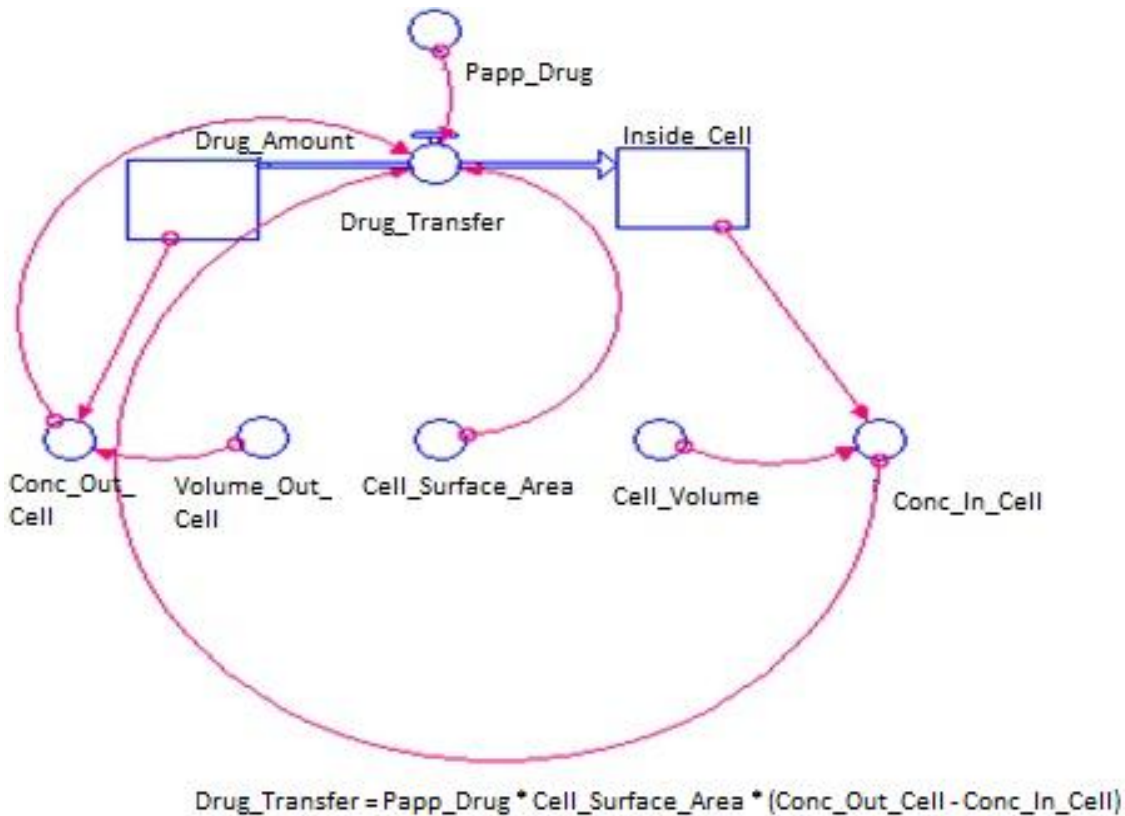
**KUVA 43:** Biomimeettinen pintarakenne permeaatiotutkimuksia varten.

### Protokolla

**Vaihe 1:** Lääkeaineliuoksen lisääminen **biomimeettisen pinnan** yläpuolelta

**Vaihe 2:** HPLC-määritys valituissa näytteenottoajankohdissa perustuen esimerkiksi lääkeaineen logP / logD – arvoon, jotta löydetään **läpäisynopeus**

**Vaihe 3:** Hyödynnetään (aiemmin) tehtyä Stella-mallia (kuva 44) ja siihen liittyviä laskelmia lääkeaineen **Papp-arvon määrittämiseksi**



**KUVA 44: Stella-malli lääkeaineen passiiviselle permeaatiolle tilasta A tilaan B (tässä solun ulkopuolelta solun sisään)**

**Vaihe 4:** Suoritetaan elävillä HepG2-soluilla permeaatiotutkimus Transwell-siirtoalustoja käyttäen

**Vaihe 5:** Suoritetaan HPLC-määritys kontrollimäärityksenä Vaiheille 1-3

**Vaihe 6:** Rakennetaan tarvittaessa **tarkempi Stella-malli** Vaiheista 1-5 saadun tiedon perusteella. Toisin sanoen käytetään aluksi biomimeettistä pintaa, sitten oikeita HepG2-soluja **vertailuun** kuinka lähellä biomimeettinen pinta on oikeita HepG2-solujen membraaneja

**Vaihe 7:** Suoritetaan **aika-eroitteinen Raman-määritys** samalle lääkeaineelle käyttäen biomimeettistä pintaa samalla tavoin, kuin Vaiheissa 1-3. Tässä kohden hyödynnetään uutta aika-eroitteista Raman-tekniikkaa ja Vaiheet 1-6 ovat soveltuvaa referenssidataa ennen aika-eroitteisia Raman-mittauksia.

## Alustavaa pohdintaa

Edellä kuvattuihin koejärjestelyihin liittyy muutamia etuja. Esitetään niistä muutamia.

**Ensinnä**, olisi mahdollista vertailla biomimeettistä solumembraania ja *in vitro* solulinjaa keskenään, jotta voitaisiin tehdä päätelmiä siitä, kuinka tarkasti biomimeettinen membraani toimii lääkeaineen permeaatiotutkimuksissa.

**Toiseksi**, aika-erotteinen mittaus olisi uusi lähestymistapa yhdistää biomimeettiset membraanit ja aika-erotteiset Raman-määritykset. Myöhemmin olisi mahdollista parantaa biomimeettisiä membraaneja vastaamaan enemmän tiettyjä elimistön solujen pintoja. Biomimeettisiä membraaneja voitaisiin kehittää johonkin haluttuun suuntaan, esimerkiksi lisäämällä pinnoille influksi- tai effluksiproteiineja, mallintamalla niitä (Stella-malli), ja tutkimalla kokeellisesti lääkeaineiden liikkeitä solukalvoilla tai niiden kulkua solukalvojen läpi.

**Kolmanneksi**, fluoresenssi on usein ongelma käytettäessä Raman-spektroskopiaa. Tulevissa määrityksissä olisi mahdollisesti helpompaa mitata optimoituja biomimeettisiä solumembraaneja HepG2-solulinjan soluista eristettyjen solumembraanien tai *in vitro* solumääritysten sijaan. Optimointi tarkoittaa tässä yhteydessä sitä, että biomimeettinen membraani voitaisiin syntetisoida mahdollisimman vähän fluoresoivaksi ja toisaalta ihmisen omia luonnollisia solukalvorakenteita muistuttavaksi. Tällöin voitaisiin välttää ennakolta fluoresenssiin liittyviä ongelmia ja aika-erotteinen Raman-spektroskopia vähentäisi fluoresenssin haittoja edelleen.

**Neljänneksi**, kvantitatiivisia menetelmiä voitaisiin niin ikään rakentaa aika-erotteiseen Raman-spektroskopiaan pohjautuen. Näin ollen saataisiin myös uutta informaatiota lääkeaineiden kinetiikan mittauksista käyttäen biomimeettisiä membraaneja ja aika-erotteista Raman-spektroskopiaa yhdessä.

## 6. YHTEENVETO

Tässä tutkimuksessa on esitetty kahden eri Raman-laitteiston avulla toteutettuja ei-fluoresoivien ja fluoresoivien lääkeaineiden mittauksia. Referenssilaitteistona käytetty 785 nm laser ja CCD-detektori ovat usein muun muassa lääketeollisuudessa hyödynnetty kokoonpano, jotta fluoresenssiin liityviltä ongelmilta vältyttäisiin. Osa tutkimuksen lääkeaineista sai aikaan kuitenkin niin vahvan fluoresenssitaustan, että aineiden Raman-spektrien tulkinta oli hyvin vaikeaa, amorfisen indometasiinin tapauksessa käytännössä mahdotonta. Pikosekuntiluokan pulsilaser-herätettä ja sen kanssa tarkoin synkronoitu, elektronisella ohjelmoitavalla viiveajalla toteutettu CMOS-SPAD-detektori vähensi huomattavasti fluoresenssitaustaa mittauksissa. Raman-sironnan ja fluoresenssi-ilmiöiden eriaikaisuutta päästiin aika-erottelulla tehokkaasti hyödyntämään ja Raman-spektri-aiheet erottuivat selvästi lääkeaineille. Aika-erotteisella laitteistolla oli kaksi merkittävää etua; siinä käytettiin korkeaa energistä herätettä (532 nm), joka mahdollisti intensiivisemmän Raman-sironnan ja toisaalta normaalisti korkean heräte-energian käytön aiheuttaman fluoresenssi-ilmiön vaikutuksia saatiin vähennettyä huomattavasti. Kahdelle tutkimuksen lääkeaineelle, kofeiinille ja ranitidiinihydrokloridille suoritettiin myös mittauksia liuosmuodoissaan. Osoittautui, että aika-erotteisella laitteistolla mitatuilla spektrialueilla nähtiin paremmin aineille tyypillisiä Raman-spektrin piirteitä kuin referenssilaitteistolla tehdyissä mittauksissa. Liuosmittauksissa havaittiin jonkin verran kohinaa signaalin joukossa. Signaali-kohinasuhteen parantamiseksi voidaan kuitenkin tehdä useita eri tässä tutkimuksessa esitettyjä teknisiä ratkaisuja. Voidaan myös todeta, että etenkin liuksilla suoritettavissa mittauksissa ensinnä Raman-laitteiston kalibroinnin tulee olla tarkasti suoritettuna ja toiseksi laitteiston muiden ominaisuuksien optimoitavissa nestenäytteille (esimerkiksi fokuksipisteen säädön ja emission keruutehokkuden osalta). Kokonaisuudessaan mittauksista saatiin käyttökelpoista tietoa CMOS-SPAD-kokoonpanon soveltuvuudesta tehokkaaseen fluoresenssin vähentämiseen. Tekniikkaa voidaan hyödyntää laboratorio-olosuhteissa ja mahdollisesti esimerkiksi

prosessianalyysitekniologiassa (PAT). Tehdyt määrittelyt rohkaisevat myös käytetyn uudentyyppisen tekniikan soveltamista esimerkiksi in vitro suoritettaviin solukokeisiin, joissa on ollut usein haittana voimakas fluoresenssitausta. Pulssitetun herätelaserin ja CMOS-SPAD-detektoritekniikan käyttöä voidaan soveltaa tulevaisuudessa myös useille muille sovellusalueille.

## 7. KIRJALLISUUSLUETTELO

Angel SM, DeArmond MK, Hanck KW, Wertz DW: Computer-Controlled Instrument for the Recovery of a Resonance Raman Spectrum in the presence of strong luminescence. *Anal. Chem.* 56: 3000-3001, 1984.

Badawi HM, Förner W: Analysis of the molecular structure and vibrational spectra of the indole based analgesic drug indomethacin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 123: 447–454, 2014.

Bodoki E, Oltean M, Bodoki A, Stiufiuc R: Chiral recognition and quantification of propranolol enantiomers by surface enhanced Raman scattering through supramolecular interaction with  $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* 101: 53-58, 2012.

Davidson MW, The Florida State University 2009: Fluorescence microscopy (online). Basic concepts in fluorescence. Haettu Internetistä 25.7.2014: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>.

De Luca AC, Mazilu M, Riches A, Herrington CS, Dholakia K: Online Fluorescence Suppression in Modulated Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 82: 738–745, 2010.

Downes A, Elfick A: Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors* 10: 1871-1889, 2010.

Elder DP, Saal CS: Solubility in Pharmaceutical R&D: Predictions and Reality. *American Pharmaceutical Review* 1: 1-8, 2014.

EMA: Guideline On the Investigation of Bioequivalence (online). Haettu Internetistä 2.8.2014:

[www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf).

FDA: The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance (online). Haettu Internetistä 2.8.2014:

[www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm](http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm).

Gormack IG, Mazilu M, Dholakia K, Herrington CS: Fluorescence suppression within Raman spectroscopy using annular beam excitation. *Applied Physics Letters* 91: 023903-1-023903-3, 2007.

Granqvist N, Yliperttula M, Välimäki S, Pulkkinen P, Tenhu H, Viitala T: Control of the morphology of lipid layers by substrate surface chemistry. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 10: 2799-2809, 2014.

Hancock BC, Parks M: What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research* 4: 397-404, 2000

Hoelke B, Gieringer S, Arit M, Saal C: Comparison of Nephelometric, UV-spectroscopic, and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. *Anal. Chem.* 81: 3165-3172, 2009.

Jones RO, Gunnarsson O: The density functional formalism its applications and prospects. *Reviews of Modern Physics* 3: 689-746, 1989.

Kao JY, McGoverin CM, Graeser KA, Rades T, Gordon KC: Measurement of amorphous indomethacin Stability with NIR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 58: 19– 26, 2012.

Kortejärvi H, Urtti A, Yliperttula M: Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria The Effects of Gastric Emptying, Dissolution, Absorption and Elimination Rates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30: 155–166, 2007.

Kortejärvi H, Shawahna R, Koski A, Malkki J, Ojala K, Yliperttula M: Very Rapid Dissolution Is Not Needed To Guarantee Bioequivalence for Biopharmaceutics Classification System (BCS) I Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 621–625, 2010.

Kostamovaara J, Tenhunen J, Kögler M, Nissinen I, Nissinen J, Keränen P: Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD. *Optics Express* 25: 31632-31645, 2013.

Lewis IR ja Edwards H: *Handbook of Raman Spectroscopy – From the Research Laboratory to the Process Line*. Marcell Dekker, Inc., New York 2001.

Mandal D, Mizuno M, Tahara T: Temporal fluorescence rejection in Raman spectroscopy using femtosecond up-conversion with single-and multi-channel detection. *Journal of Molecular Structure* 735–736: 189–195, 2005.

Mazilu M, De Luca AC, Riches A, Herrington CS, Dholakia K: Optimal algorithm for fluorescence suppression of modulated Raman spectroscopy. *Optics Express* 11: 11382-11395, 2010.

McCain ST, Willet RM, Brady DJ: Multi-excitation Raman spectroscopy technique for fluorescence rejection. *Optics Express* 15: 10975-10991, 2008.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine: PubChem webpages (online). Haettu Internetistä 2.8.2014: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Nissinen I, Länsman AK, Nissinen J, Holma J, Kostamovaara J: 2x (4x)128 Time-gated CMOS Single Photon Avalanche Diode Line Detector with 100 ps Resolution for Raman Spectroscopy. *Proceedings of the ESSCIRC*: 291-294, 2013.

Nolasco MM, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA: Computationally-Assisted Approach to the Vibrational Spectra of Molecular Crystals: Study of Hydrogen-Bonding and Pseudo-Polymorphism. *ChemPhysChem* 7: 2150 – 2161, 2006.

Pratiwia D, Fawcetta JP, Gordon KC, Rade T: Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54: 337–341, 2002.

Pratiwia D, Fawcetta JP, Gordon KC, Rades T: Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and PCA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54: 337–341, 2002.

Roggo Y, Degardina K, Margot P: Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics. *Talanta* 81: 988-995, 2010.

Rusciano G, De Luca AC, Pesce G, Sasso A: Enhancing Raman analysis in Optical Tweezers by phase-sensitive detection. *European Conference On Lasers and Electro-Optics and the International Quantum Electronics Conference*: 1-1, 2007.

Savolainen M, Kogermann K, Heinz A, Aaltonen J, Peltonen L, Strachan C, Yliruusi J: Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by in situ solid state analysis using Raman spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71: 71–79, 2009.

Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich webpages (online). Haettu Internetistä 2.8.2014: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

Smith E, Dent G: *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. 1. painos. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex 2005.

Strachan CJ, Rades T, Gordon KC: A theoretical and spectroscopic study of *g*-crystalline and amorphous indomethacin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 261-269, 2007.

Taylor LS, Langkilde FW: Evaluation of Solid-State Forms Present in Tablets by Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 10: 1342–1353, 2000.

Tfayli A, Piot O, Pitre F, Manfait M: Follow up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 36: 1049–1058, 2007.

Tubic-Grozdanic M, Bolger MB, Langguth P: Application of Gastrointestinal Simulation for Extensions for Biowaivers of Highly Permeable Compounds. *The AAPS Journal* 1: 213-226, 2008.

Viitala T, Granqvist N, Hallila S, Ravina M, Yliperttula M: Elucidating the signal responses of multi-parametric surface plasmon resonance living cell sensing: a comparison between optical modelling and drug-MDCKII cell interaction measurements. *PLoS One* 8: 1-13, 2013.

WHO: Proposal to Waive *in vivo* Bioequivalence Requirements for the WHO Model List of Essential Medicines Immediate Release, Solid Oral Dosage Forms (online). Haettu Internetistä 2.8.2014:  
[http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04\\_109Rev1\\_Waive\\_invivo\\_bioequiv.pdf](http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_109Rev1_Waive_invivo_bioequiv.pdf).

Young HD, Freedman RA: Sear's and Zemansky's University Physics with Modern Physics. 10. painos. Addison-Wesley Publishing Company, San Francisco 2000.



## 8. LIITTEET

### 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset

Tässä liitteessä esitellään taulukot 1-5, joiden pohjalta osittain tämän tutkimuksen Raman-spesifisten spektrioppiikkien analysoinnista on tehty. Tutkimuksen tekstistä löytyy viittaus näihin taulukoihin siellä, missä taulukoita on hyödynnetty spektritulkintoihin.

**TAULUKKO 1:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 3600  $\text{cm}^{-1}$  – 2600  $\text{cm}^{-1}$

Aaltoluku ( $\text{cm}^{-1}$ )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
3550-2850	OH (H)
3400-3200	Fenoli (K)
3350-3200	Alkoholi (K)
3450-3150	Amiini, amidi (K)
3300-3250	Alkyyni (H)
3050-2950	CH=CH (V)
3100-2950	Aromaattinen C-H (V)
3050-3000	=CH <sub>2</sub> (V)
2950-2800	C-CH <sub>3</sub> (V)
2850-2750 & 2750-2650	Aldehydi (K)
2950-2900 & 2850-2750	CH <sub>2</sub> (V)
2800-2750	N-CH <sub>3</sub> (K)
2830-2770	O-CH <sub>2</sub> (K)
2600-2500	Tiolit (SH) (V)

**TAULUKKO 2:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 2600  $\text{cm}^{-1}$  – 1700  $\text{cm}^{-1}$

Aaltoluku ( $\text{cm}^{-1}$ )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
2420-2300	P-H (H)
2270-2220	Isosyanaatti (H)
2240-2220	Nitriili (K)
2210-2190	Aromaattinen nitriili (K)
2280-2180	Diatsonisuola (K)

2180-2100	Tiosyanaatti (H)
2180-2080	Isonitrili (K)
2150-2080	Si-H (K)
2150-2100	Atsidi (K)
2230-2050	Alkyyni (V)
2080-2000	Isotiosyanaatti (K)
1850-1750	Anhydridi (K)
1780-1730	Laktoni (K)
1760-1730	Kloorihappo (K)
1710-1700	Aldehydi (K)
1730-1700	Esteri (K)

**TAULUKKO 3:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 1700  $\text{cm}^{-1}$  – 1200  $\text{cm}^{-1}$

Aaltoluku ( $\text{cm}^{-1}$ )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
1710-1600	Ketoni (K)
1710-1600	Karboksyylihappo (K)
1750-1720	Alifaattinen esteri (K)
1710-1680	Ureaani (K)
1610-1550	Aromaattinen/heterorengas (V)
1670-1610	C=C (V)
1650-1620	C=N (V)
1600-1530	Nitror ryhmä (K)
1670-1550	Amidi (K)
1570-1530	Alifaattinen atso (K)
1500-1450	Aromaattinen rengas (K)
1430-1310	Karboksyylaattisuola (K)
1370-1350	C-CH <sub>3</sub> (K)
1450-1400	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> (K)
1350-1310	Nitror ryhmä (V)
1440-1350	Aromaattinen atso (V)
1250-1150	Sulfonihappo (H)

**TAULUKKO 4:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 1200  $\text{cm}^{-1}$  – 700  $\text{cm}^{-1}$

Aaltoluku ( $\text{cm}^{-1}$ )	Värähtelyn lähde (intensiteetti)
1100-990	Aromaattiset renkaat (V)
1200-1050	Sulfoni, sulfonamidi (K)
1055-1010	Sulfonihappo (H)
1220-1000	C=S (V)

1170-1120	Si-O-C (K)
1080-1000	Si-O-Si / Si-O-C (K)
1250-700	V C-C alifaattiset ketjut (K)
780-700	C-Cl (V)
800-720	C-F (V)
950-800	C-O-C/ eetterit (H)
950-900	Karboksyylihappodimeeri (H)
770-700	C-S (V)
980-880	CHX=CYZ (K)

**TAULUKKO 5:** Yksittäisiä vibraatiotiloja ja ryhmävärähtelyjä aaltolukualueella 700  $\text{cm}^{-1}$  – 200 – 0  $\text{cm}^{-1}$

<b>Aaltoluku (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Värähtelyn lähde (intensiteetti)</b>
780-550	C-Cl (V)
400-250	$\delta$ C-C alifaattiset ketjut (V)
700-500	C-Br (V)
650-470	C-I (V)
330-300	Se-Se (V)
540-420	S-S (V)
770-660	C-S alifaattinen (V)
660-510	C=S (V)
420-100	Xmetalli-O (V)
550-450	Si-O-Si (V)
1250-600	V C-C alifaattiset ketjut (K)
200-20	Hilavibraatiot (V)

Yleisesti 2500-2000  $\text{cm}^{-1}$  alueella esiintyy yleensä kaksoissidoksia (-C=O, -C=N, -C=C-). Alle 1500  $\text{cm}^{-1}$  joillakin ryhmillä esiintyy spesifisiä spektrialueita (esimerkiksi O=N=O), mutta monilla molekyyileillä on komplekseja kuvioita hiili-hiili ja hiili-typpi-vibraatioiden aiheuttamana. Aluetta kutsutaan yleensä 'sormenjälkialueeksi'. Merkittävät spektrialueet alle 650  $\text{cm}^{-1}$  muodostuvat yleensä inorgaanisista ryhmistä, metalli-organoryhmistä tai molekyylien runkovibraatioista (engl. lattice vibrations) (Smith ja Dent 2005).

#### 4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi

##### YHTEENVETOTAULUKOT 1: Konventionaalisen Ramanin avulla mitatut piikit

Seuraavassa esitettyihin taulukoihin on koottu konventionaalisella Raman-mittauksella puhtaille kiinteille aineille tehtyjen mittausten spektreistä määritetyt Raman-spektriipiikkien paikat ilmaistuna aaltoluvun mukaan Raman-siirtymänä ( $\text{cm}^{-1}$ ). Ensimmäisessä sarakkeessa on mitattu sijainti, toisessa kirjallisuudesta löytyvä vastine ja kolmannessa ennustettu värähtelyn aiheuttaja molekyyllissä. Taulukoista on tarpeen huomioida muutamia seikkoja. Ensinnä, on valittu toleranssi ( $\Delta = \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ ), jonka sisäpuolella mitattua ja lähteiden määrityksissä mitattuja aaltolukuja voidaan pitää vastaavina, jos kirjallisuudesta on löydetty vastaavia määrityksiä kyseessä olevalle aineelle. Toiseksi, näille vastaaviksi tulkituille värähdyssiirtymille on esitetty kolmannessa sarakkeessa ennustettu aiheuttaja joko <sup>a)</sup> siten, että tulkinta on tehty lähteessä mainitussa tutkimuksessa tai <sup>b)</sup> siten, että tulkinta on tehty tämän tutkimuksen kappaleen 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset sekä liitteestä 1.2. Spektrianalyysi ja sovellukset löytyvien Raman-tulkintataulukoiden 1-5 pohjalta.

##### TAULUKKO 1: RANITIDIINIHYDROKLORIDI

Mitattu piikin sijainti ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Kirjallisuusarvo	Piikin ennustettu aiheuttaja (tulkinta <sup>a)</sup> tai <sup>b)</sup> sekä mahdollinen lähde tulkinnalle <sup>a)</sup>
1134 (H)	1134 (Pratiwia ym. 2003)	<sup>b)</sup>
1186 (H)	1186 * (Pratiwia ym. 2003)	<sup>b)</sup>
1248 (K)	1249 (Pratiwia ym. 2003)	<sup>b)</sup>

\* Polymorfimuodon II tärkein Raman-piikki

**TAULUKKO 2: KOFEIINI (ANHYDRAATTI)**

Mitattu piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> ) (vahvuus)	Kirjallisuusarvo	Piikin aiheuttaja (tulkinta <sup>a)</sup> tai b) sekä mahdollinen lähde tulkinnalle <sup>a)</sup> ennustettu
483 (K)	484 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)
556 (V)	556 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)
741 (K)	742 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)

**TAULUKKO 3: PROPANOLOLIHYDROKLORIDI**

Mitattu piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> ) (vahvuus)	Kirjallisuusarvo	Piikin aiheuttaja (tulkinta <sup>a)</sup> tai b) sekä mahdollinen lähde tulkinnalle <sup>a)</sup> ennustettu
737 (K)	730 (Bodoki ym. 2012)	<sup>a)</sup> (Bodoki ym. 2012)
760 (K)	757 (Bodoki ym. 2012)	<sup>a)</sup> (Bodoki ym. 2012)
1013 (K)	1019 (Bodoki ym. 2012)	<sup>a)</sup> (Bodoki ym. 2012)

**TAULUKKO 4: TEOFYLLIINI**

Mitattu piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> ) (vahvuus)	Kirjallisuusarvo	Piikin aiheuttaja (tulkinta <sup>a)</sup> tai b) sekä mahdollinen lähde tulkinnalle <sup>a)</sup> ennustettu
555 (K)	555 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)
928 (K)	928 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)
1249 (K)	1249 (Nolasco ym. 2006)	<sup>a)</sup> (Nolasco ym. 2006)

**TAULUKKO 5: INDOMETASIINI (KITEINEN)**

Mitattu piikin sijainti (cm <sup>-1</sup> ) (vahvuus)	Kirjallisuusarvo	Piikin aiheuttaja (tulkinta <sup>a)</sup> tai b) sekä mahdollinen lähde tulkinnalle <sup>a)</sup> ennustettu
1021 (H)	1019 (Badawi ja Förner 2014)	<sup>a)</sup> (Badawi ja Förner 2014)

1087 (K)	1087 (Badawi ja Förner 2014)	a) (Badawi ja Förner 2014)
1146 (H)	1145 (Badawi ja Förner 2014)	a) (Badawi ja Förner 2014)

## TAULUKKO 6: INDOMETASIINI (AMORFINEN)

Mitattu sijainti (vahvuus)	piikin (cm <sup>-1</sup> )	Kirjallisuusarvo	Piikin aiheuttaja (tulkinna <sup>a)</sup> tai b) sekä mahdollinen lähde tulkinna <sup>a)</sup> )
Konventionaalisen Raman-mittauksen spektrissä ei ole erotettavissa selviä piikkejä	-	-	-

### 4.3. Aika-erotteinen Raman-mittaus valituista kiinteistä lääkeaineista

**YHTEENVETOTAULUKOT 2:** Konventionaalisen ja aika-erotteisen Ramanin avulla mitatut piikit

Seuraavassa esitettyihin taulukoihin on koottu aika-erotteisella Raman-mittauksella tehtyjen mittausten spektriipiikkien paikat. Piikin sijainti on **yhteenvetotaulukoiden 1** tapaan ilmaistu aaltoluvun mukaan Raman-siirtymänä (cm<sup>-1</sup>). Lääkeaineet on valittu konventionaalisten mittausten pohjalta. Ensimmäisessä sarakkeessa on konventionaalisisella Raman-systeemillä mitattu sijainti ja toisessa aika-erotteisella mitattu sijainti. Taulukoista on tarpeen huomioida muutamia seikkoja. Ensinnä, on valittu toleranssi ( $\Delta = \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ), jonka sisäpuolella mitattua ja lähteiden määrityksissä mitattuja aaltolukuja voidaan pitää vastaavina. Toiseksi, piikin todennäköisesti aiheuttavaa molekyyli-rakennetta ei ole enää näissä taulukoissa erikseen mainittu, koska se löytyy liitteen 4.2.2. Puhtaan kiinteän lääkeaineen konventionaaliset Raman-mittaukset ja alustava spektrianalyysi **yhteenvetotaulukoista 1.**

### TAULUKKO 1: RANITIDIINIHYDROKLORIDI

Konventionaalinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Aika-erotteinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)
1134 (H)	1133 (H)
1186 (H)	1177 (K)
1248 (K)	1241 (V)

### TAULUKKO 2: KOFEIINI

Konventionaalinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Aika-erotteinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)
483 (K)	483
556 (V)	550
741 (K)	735

### TAULUKKO 3: PROPANOLOLIHYDROKLORIDI

Konventionaalinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Aika-erotteinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)
737 (K)	734
760 (K)	760 (V)
1013 (K)	1013

### TAULUKKO 4: INDOMETASIINI (KITEINEN)

Konventionaalinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Aika-erotteinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)
1021 (H)	1016
1087 (K)	1082
1146 (H)	1139

### TAULUKKO 5: INDOMETASIINI (AMORFINEN)

Konventionaalinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)	Aika-erotteinen Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) (vahvuus)
-	1364 (K)
-	1592 (V)
-	1613 (H)