

Strykniinin ja brusiinin stereokemian kvantitatiivinen selvittäminen NMR -menetelmillä ja heteronukleaarisen Altona-Haasnoot yhtälön laatiminen

Tomi Mononen

Strykniinin ja brusiinin stereokemian kvantitatiivinen selvittäminen NMR- menetelmillä ja heteronukleaarisen Altona-Haasnoot yhtälön laatiminen

Rakennetutkimuksen kemian

Pro gradu -tutkielma

Tomi Mononen

Kemian laitos

2013

Esipuhe

Ensimmäisenä haluaisin kiittää työssä auttanutta koko rakennetutkimuksen porukkaa. Erityisesti kiitän työn idean esitellyttä ohjaajaa, Sampo Mattilaa, GAUSSIAN-laskelmat laatinutta Joshua Wardia ja monissa asioissa avussa ollutta Ari Turpeista. Myös aikaisemmin aihepiiriä tutkineet henkilöt ansaitsevat erityismaininnan. Vasta tämän tutkimuksen jälkeen ymmärrän kuinka paljon tutkimuksiin on käytetty resursseja.

Tämän työn tekemiseen kului jopa pari vuotta aikaa. Silti en ole vieläkaan tyytyväinen lopputulokseen. Lähinnä ajan rajallisuudesta ja työn jo nyt laajasta pituudesta johtuen en ehdi enää käyttää siihen enempää aikaa.

Kirjallisuusosion ensisijaisena tehtävänä on perehdyttää NMR:n peruseriaatteisiin sekä menetelmän stereokemialliseen määrittämiseen. Olisin halunnut kertoa vieläkin yleisemmällä tasolla NMR-määrittämisen periaatteista ja niiden soveltamisesta tutkimuskäyttöön. Helposti ymmärrettävää ja suomeksi kirjoitettua tekstiä aihepiiristä on hyvin vähän. Tämä ei kuitenkaan onnistu perinteisessä kirjallisuustutkielmassa kovinkaan hyvin.

Tutkimusosiossa olisin halunnut tehdä vieläkin teoreettisemmän työn, jossa olisin keskittynyt yhtälöiden soveltamiseen entistä enemmän. Työn yhteydessä kertyi paljon ainutlaatuista tietoa varsinkin J-kytkentöjen ja torsiokulmien relaatiosta. Työssä on kuitenkin mahdollisuus esitellä vain murto-osa noista tuloksista. Nyt tutkimuksessa saadut kvantitatiiviset tulokset ovat ensimmäisellä sijalla.

Tutkimusosiossa tulokset poikkesivat yllättävän paljon odotetuista. Pohdinta-osiossa on mietitty yleisellä tasolla virheiden syntymistä. Mielenkiintoinen aihepiiri olisi ollut myös noiden virheiden lähteen havaitseminen ja virheiden pienentämiseen keskittyvät menetelmät.

Työn aihepiiri on vielä poikkeuksellisen hedelmällinen, koska tutkimuksia on vielä suhteellisen vähän. Tästä johtuen tässä työssä onnistuttiin vielä kehittämään perusmenetelmiin luettavia Karplus yhtälöitä luotettavampi menetelmä heteronukleaaristen torsiokulmien ratkaisemiseksi. Toisaalta NMR-menetelmät ovat suhteellisen epäherkkiä ja kalliita määrittämenetelmiä, mikä selittää vähäisen tutkimusten määrän.

Lyhenteet

COSY	Korrelaatio-spektroskopia (COrrrelation SpectroscopY)
EXSY	Kemialliseen muutokseen perustuva spektroskopia (Echange spectroscopy)
FID	Näytteestä saatava vaimeneva signaali (Free Induction Decay)
HMBC	heteroytiminen monisidoskoherenssi (Heteronuclear Multiple-bond Correlation Spectroscopy)
HSQC	Heteroytiminen yksöiskvanttikohärenssi (Heteromagnetic single-quantum correlation spectroscopy)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NOE	Ydintenvälinen Overhauser-ilmiö (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	ytimen Overhauser-ilmiöön perustuva spektroskopia (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
ROE	Kiertävä koordinaatisto Overhaus-ilmiö (Rotating frame Overhauser Effect)
ROESY	Kiertävä koordinaatisto Overhaus-ilmiöön perustuva kaksiulotteinen määrittäminen (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy)
TOCSY	Totaalikorrelaatio-spektroskopia (Total Correlation Spectroscopy)

Sisällysluettelo	sivu
Kirjallisuustutkielma	8
1. Johdanto	9
1.1 Historia ja nykyaika	9
1.2 Stereokemiallinen rakenne	9
1.3 Menetelmien esittely	10
2. NMR:n yleiset periaatteet	11
2.1 Spin-tilat	11
2.2 Laitteisto	12
2.3 Laitteiston virittäminen	13
2.4 Radiopulssit	13
2.5 Vektorimalli	14
2.6 Relaksaatio	14
2.7 Detektori ja vaihekierto	17
2.8 Signaalin käsitteleminen	18
2.9 Mittausparametrit	19
2.10 Kemiallinen siirtymä	20
2.11 Overhauserin efekti	20
2.11.1 Kahden spinin välinen vakaan tilan NOE	21
2.11.2 Vakaan tilan NOE monen spinin systeemissä	23
2.11.3 Transienttimittaukset ja NOESY	25
3. Pulssisarjat	26
3.1 Koherenssi ja kytkentä	26
3.2 Protoni- ja hiilispektri	27
3.3 Kaksiulotteiset spektrit	27
3.4 COSY	29
3.5 HSQC	29
3.6 HMBC	30
3.7 Vakaan tilan NOE	31
3.8 NOESY	32
3.9 ROE	33
3.10 J-resolvoitu menetelmä	34
4. Rakenteen selvittäminen	35
4.1 Yksiulotteiset spektrit	35
4.2 Kaksiulotteiset spektrit	35
4.2.1 COSY	35
4.2.2 Heteronukleaariset kytkennät	37
4.2.3 HSQC	38
4.2.4 HMBC	38
5. Stereokemiallisen rakenteen selvittäminen	39
5.1 Rakenteen soveltuvuus ja jäykkyys	39
5.2 NOE rakenneanalyysissä	39
5.2.1 Vakaan tilan NOE	40
5.2.2 NOESY	40
5.3 J-kytkentään perustuvat menetelmät	41
5.3.1 Karplus yhtälö	41
5.3.2 Altona-Hasnoot yhtälö	42

5.3.3 J-resolvoitu menetelmä	42
5.3.4 Muut J-kytkennän määritysmenetelmät	43
5.4 Stereokemiallinen määrittäminen nykyään	43
6. Loppupäätelmä	45
7. Pohdinta	45
Kokeellinen osa	46
1. Johdanto	47
1.1 Työn alue ja tavoite	48
2. Teoria	49
2.1 Kvantitatiivinen mittaaminen	49
2.2 NOESY ja protonien välisen etäisyyden määrittäminen	49
2.3 HMBC ja torsiokulmat	50
2.4 Karplus yhtälö	52
2.5 Altona-Haasnoot yhtälö	53
3. Menetelmät	54
3.1 Näytteet	54
3.2 Pohjustavat mittaukset	54
3.3 Signaalien assignointi	55
3.4 NOESY ja protonien väliset etäisyydet	55
3.5 HMBC-mittaukset ja torsiokulmat	58
3.6 Heteronukleaarisen Altona-Haasnoot yhtälön laatiminen	59
3.7 Vertailuarvot ja tietokonemallinnokset	60
3.8 Kokeelliset määrittäykset	60
4. Tulokset	61
4.1 NOESY ja etäisyyden määrittäminen	61
4.2 J-kytkennät ja torsiokulmien määrittäminen	62
4.3 Menetelmien vertailu ja kokeellisia yhtälöitä	66
5. Päätelmät	71
6. Pohdinta	72
Kirjallisuusviitteet	73
Liiteluettelo	75
Liitteet	76

Kirjallisuustutkielma

1. Johdanto

NMR:llä tarkoitetaan ydinmagneettista resonanssispektrometriaa, joka pohjautuu atomiytimien magneettisiin ominaisuuksiin parittomilla spineillä.

1.1 NMR:n historia ja nykyaika

Ensimmäinen NMR-mittaus suoritettiin jo vuonna 1938 Isidor Rabin toimesta. Nestefaasissa NMR:llä mitattiin ensimmäisen kerran 1946 Felix Blochin ja Edward Purcellin toimesta.¹

Ydinmagneettista resonanssispektrometriaa alettiin käyttämään 1950-luvulla tekniikan kehityttyä riittävästi yksinkertaisten protonispektrien mittaamista varten. Teoria Overhauser-efektiin pohjautuvasta spektrometriasta kehitettiin jo 1950-luvulla, mutta mittaamaan päästiin vasta 1960-luvulla.² 1970-luvulla spektrometrien suorituskyky parani supermagneettien myötä riittävästi hiilimittauksia varten.

Kaksiulotteinen spektrien mittaaminen kehitettiin vasta 1970-luvulla. Tuota ennen atomien väliset kytkennät oli selvitettävä yksiulotteisista spektreistä. Hyvin saataville kaksiulotteiseen mittaukseen kykenevät laitteet tulivat kuitenkin vasta 1980-luvulla.¹

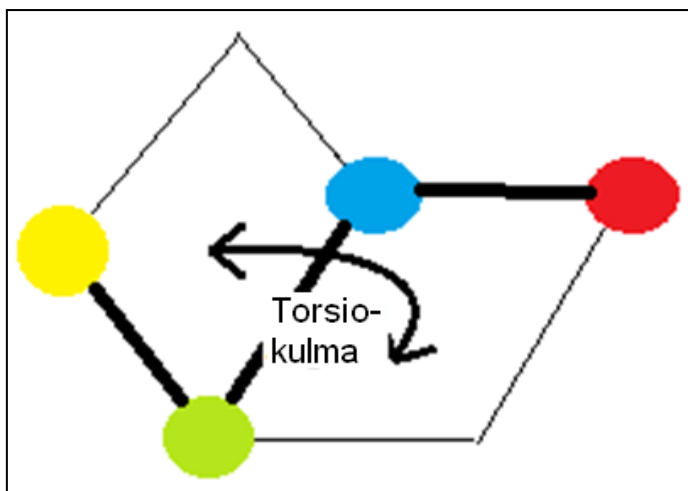
Nykyään spektrometreilla saadaan mitattua hyvin pienistä konsentraatioista tarkkoja spektrejä atomiytimille, joiden suhteellinen pitoisuus on prosenttien tai promillenkin luokkaa. Spektrometrien suojaus auttaa kentän stabilisoimisessa mittauksen aikana.

Valmiilla pulssisarjoilla kyetään mittaamaan tuntemattoman yhdisteen atomit ja niiden väliset sidokset hyvinkin nopeasti. Kolmiulotteisen rakenteen selvittämiseksi on hyvin soveltuvia valmiiksi kirjoitettuja pulssisarjoja. Näistä yleisin lienee Overhauser-ilmiöön perustuva atomien avaruudellisten etäisyyksien mittaaminen. Monimutkaisempia mittauksia varten on kuitenkin muokattava valmista pulssisarjaa mittaukseen soveltuvaksi.

1.2 Stereokemiallinen rakenne

Joillakin yhdisteillä esiintyy symmetriaa, jota ei kyetä esittämään kaksiulotteisissa piirroksissa. Samalla tavoin NMR -menetelmät eivät kykene tavallisesti tunnistamaan symmetriaa suoraan. Tämän kaltaiseen symmetriaan kuuluvat *cis-trans*- ja *E/Z*- isomeria sekä kiraalisuus.

Myös tarkka rakenteen selvittäminen vaatii syvällisempää analyysiä. NMR-menetelmillä kyetään ratkaisemaan atomien välisiä etäisyyksiä ja torsiokulmia epäsuorasti. Torsiokulma on neljän atomin ja kolmen sidoksen välinen kulma, joka on esitetty selvemmin kuvassa 1.



Kuva 1: Torsiokulma

1.3 Stereokemialliseen analyysiin käytettävät menetelmät

Tuntemattoman yhdisteen rakenne atomien välisine etäisyyksineen ja sidoskulmineen saadaan määritettyä hyvin tarkasti röntgenkristallografian avulla.³ Menetelmää ei voida kuitenkaan soveltaa nestefaasissa olevaan aineeseen.

Mikäli halutaan saada oikeita kokeellisia arvoja nestefaasissa olevalle yhdisteelle, on turvaututtava NMR:n. Sitä soveltamalla voidaan selvittää tuntemattoman yhdisteen rakenne ja mitata atomien välisiä etäisyyksiä ja torsiokulmia. Atomien välisten etäisyyksien mittaaminen perustuu Overhauser-ilmiöön.⁴ Torsiokulmien selvittämiseen käytetään J-kytkentöjä.⁵

Overhauser-ilmiöön perustuva etäisyyden määrittäminen onnistuu atomien relaksaatioissa tapahtuvien vuorovaikutusten johdosta. Lähellä toisiaan olevat atomit nopeuttavat huomattavasti virityksen purkamista, kun kauempana olevilla atomeilla on perustilaan palautumisella pienempi vaikutus.⁶

Torsiokulma saadaan laskettua selvittämällä kolmen sidoksen yli menevän J-kytkennän suuruus.⁵ J-kytkennät voidaan mitata esimerkiksi COSY- ja HMBC-pulssisarjoilla. Nämäkin menetelmät eivät sovellu kaikille yhdisteille johtuen symmetriasta tai liian joustavasta rakenteesta.

2. NMR:n peruseriaatteen

NMR tarkoittaa nimensä mukaan ydinmagneettista resonanssispektrometriaa eli tavoitteena on tarkkailla ytimien magneettista resonanssia. Resonanssitiila saadaan aikaan poikkeuttamalla ytimen varausjakaumaa alimmasta energiatilasta.

Muista menetelmistä poiketen NMR:ssä tarkkaillaan atomiytimien eikä elektronien spin-tiloja. Tästä erosta johtuen NMR:n avulla kyetään määrittämään monia ominaisuuksia, joita ei kyetä muiden menetelmien kautta selvittämään. Toisaalta muihin menetelmiin verrattuna esimerkiksi menetelmän tarkkuus on tavallisesti suhteellisen heikko.

2.1 Spin-tilat

Atomiytimillä ja niiden isotoopeilla on ominainen spin-tila, joka riippuu atomin magneettisesta kvanttiluvusta. Esimerkiksi protonille tuo luku on $+1/2$ tai $-1/2$ ja deuteriumille se on $+1, 0$ tai -1 .⁷ Spin puoli tilan omaavat ytimet voivat olla järjestäytyneenä joko ylös- tai alaspäin. Useimmiten spinit ovat kuitenkin pareittain, jolloin niiden yhteisvaikutus kumoaa toisensa. Osalla atomeista tai niiden isotoopeilla spinit eivät ole pareittain, vaan ne ovat ryhmittäytyneinä parittomiksi, mikä ilmenee magneettisina ominaisuuksina. Isotooppikohtaiset spintilat, pitoisuudet ja herkkyudet on esitetty taulukossa 1.

Ytimien spin-tila aikaansaa magneettikentän, jonka vahvuus voidaan myös laskea. Ytimen muodostama magneettinen momentti riippuu kullekin ytimelle ominaisesta gyromagneettisesta suhteesta ja hiukkasen pyörimismäärästä. Ulkoiseen magneettikenttään sijoitettaessa magneettiset momentit järjestäytyvät kentän mukaan. Magneettikenttä luo momentin, mikä saa aikaan magneettisen momentin hyrrämäisen kiertämisen kentän vaikutuksesta. Liikettä sanotaan Larmorin prekessioksi. Kiertoliikkeen taajuus eli Larmorin taajuus riippuu atomin gyromagneettisesta suhteesta ja magneettikentän vahvuudesta.⁸

Ydinmagneettinen resonanssi havaitaan ytimen vaihtaessa spintilaa. Spintilan vaihtuminen saadaan aikaan radiopulsseilla eli sähkömagneettisellä säteilyllä, jonka taajuuden tulee vastata ytimen Larmorin prekessiota.

Spinrit ovat järjestäytyneenä joko kentän suuntaisesti tai vastaisesti. Järjestäytyminen menee Boltzmannin jakauman mukaan.⁹ Kentän suuntainen järjestäytyminen on

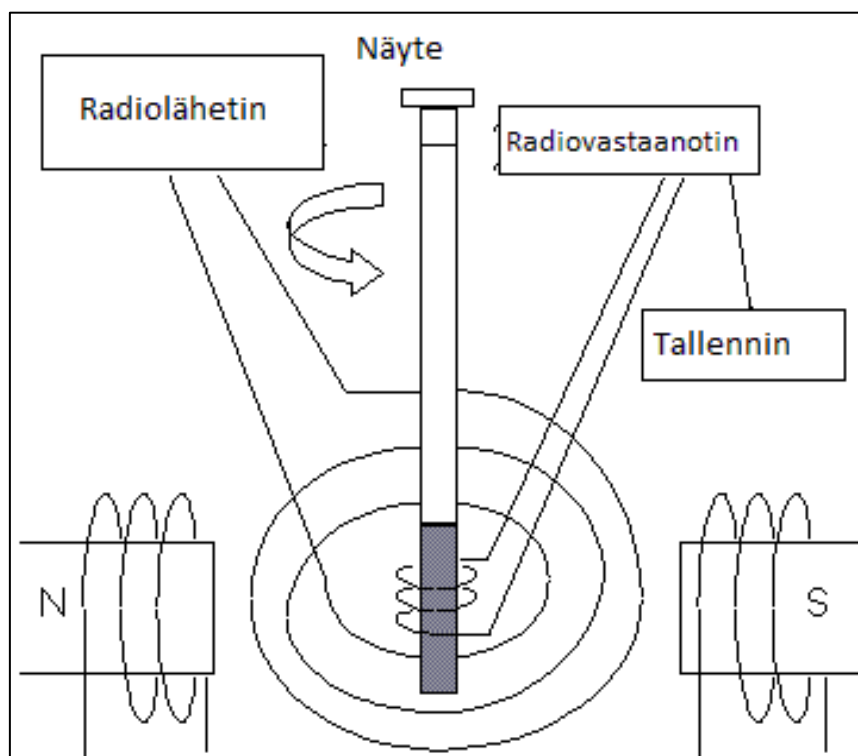
energeettisesti hieman edullisempaa, joten se on lievästi suosittu orientaatio. Koska ero on tilojen välillä hyvin pieni, on NMR määrittämenetelmänä suhteellisen epäherkkä.

2.2 Laitteisto

NMR-laitteen pääkomponenttina on magneetti, jonka sisälle näyte laitetaan. Magneetin sisällä on probe, jossa on radiolähetin radiopulsseja varten ja radiovastaanotin radiopulssien vastaanottamiseksi. Tämä on esitetty kuvassa 2.¹⁰

Taulukko 1: Isotooppien spin-tilat⁷

Ydin	Isotooppi	Spin	Pitoisuus (%)	Suhteellinen herkkyys	Resonanssi-taajuus (MHz)
¹ H	Protoni	1/2	99,98	1,000	100,0
² H	Deuterium	1/2	0,02	0,010	15,4
¹³ C	Hiili-13	1/2	1,10	0,165	25,1
¹⁵ N	Typpi-15	1/2	0,37	0,001	10,1
³¹ P	Fosfori-31	1/2	100	0,066	40,5



Kuva 2: Spektrometri sisältä tarkasteltuna¹⁰

Magneettikenttä voidaan muodostaa kestmagneeteilla. Tehokkaampi kenttä saadaan aikaiseksi käyttämällä supermagneetteja, jotka perustuvat suprajohteisiin. Vahvemmalla kentällä saavutetaan parempi spektrin resoluutio, mikä auttaa muun muassa suurten molekyylien tutkimisessa.

2.3 Laitteiston virittäminen

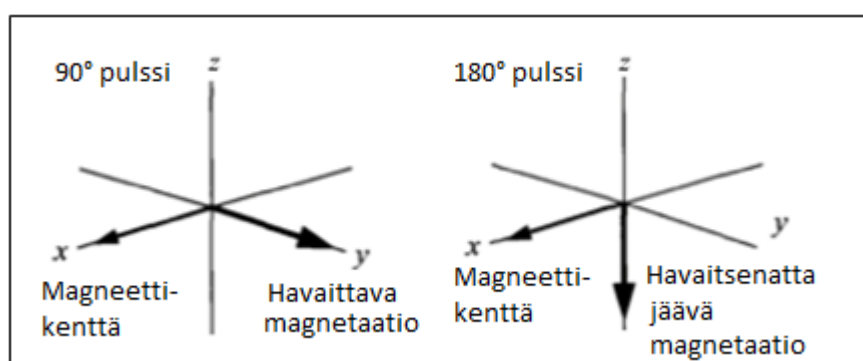
Laitteisto on viriheerkkä näytettä ja sen liuotinta kohtaan. Virheiden välttämiseksi kytetään spektrometrin probe kalibroimaan näihin olosuhteisiin matching ja tuning asetuksilla.¹¹

Samalla tavoin itse magneettikenttä kytetään kalibroimaan näytteelle optimaaliseksi hyödyntämällä liuotimen deuteriumin lähettämää resonanssia. Tämän jälkeen joudutaan vielä magneettikenttä säätämään homogeeniseksi shimmausparametreilla.¹¹

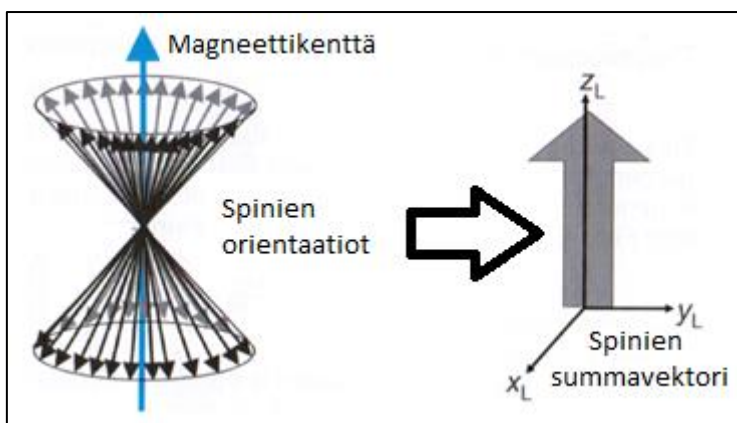
2.4 Radiopulssit

Näytettä ympäröivä kela kykenee lähettämään radiopulsseja. Pulssi on radiotaajuussäteilyä säädetyllä voimakkuudella, jota pidetään päällä määrätyn ajan. Radiopulsseja käyttämällä voidaan kääntää spinien suuntaa riippuen pulssin pituudesta ja voimakkuudesta.¹

90 asteen pulssi saa aikaan spintilojen jakautumisen tasan. 180 asteen pulssi kääntää populaatiot päinvastaisiksi. 360 asteen pulssi palauttaa spinit alkutilaansa, joten tilanne on sama kuin ennen radiopulssia. Radiopulssi vastaanottamalla voidaan myös tallentaa spinien suunta. 180 ja 360 asteen pulsseilla ei saada aikaiseksi signaalia ja 90 ja 270 asteen pulsseilla saadaan maksimimaalinen signaali. Tosin 270 asteen pulssi tuottaa negatiivisen signaalin.¹



Kuva 3: Radiopulssin aikaansaama muutos⁸



Kuva 4: Vektoriesitys¹

Radiotaajuuspulssi kohdistaa vääntömomentin kokonaismagnetaatiovektorille. Spektrometrilla vektoriesityksessä yhden akselin suuntainen esitys tuottaa spektrissä positiivisen signaalin. Kuvassa 3 tuo akseli on y-akseli. Samassa kuvassa 180 asteen pulssi ei tuota ollenkaan signaalia, koska y-akselin suuntaisesti ei ole magnetaatiota.⁸

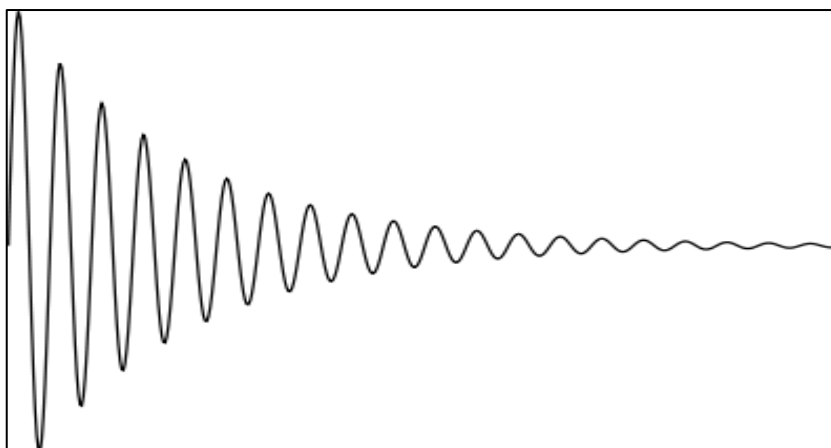
2.5 Vektorimalli

Magneettikentässä lukuisten atomien muodostama magneettinen momentti voidaan kuvata yhtenä magneettikentän mukaan järjestäytyneenä vektorina, vaikka kyseinen magnetaatio sisältääkin vastakkaisiin suuntiin osoittavia magneettisia voimia.¹ Näin ollen voidaan käyttää vektorimallilla. Tämä on esitetty kuvassa 4.

Vektorin suuntaan voidaan vaikuttaa soveltamalla radiotaajuuspulseja. Tavallisimmin pulseilla ohjataan magnetaatiovektori poikittaiseen tasoon, joka on kohtisuoraan magneettikentästä katsottuna.

2.6 Relaksaatio

Vasta atomiytimen radiopulssin jälkeen lähettämät signaalit nähdään spektrissä. Magneettikentän suunnasta poikkeava magnetaatiovektori palaa takaisin magneettikentän suuntaisesti lähettäen samalla oskilloivan signaalin näytettä ympäröivään kelaan. Tämä oskilloiva signaali havaitaan NMR-signaalina. Magnetaatiovektorin suunnan palaaminen takaisin kentän suuntaiseksi tunnetaan nimellä relaksaatio.



Kuva 5: Relaksoituva signaali¹⁴

Relaksaatio on muihin spektrometriin menetelmiin verrattuna erittäin hidas ollen tavallisimmin useita sekunteja tai jopa kymmeniä sekunteja.⁸ Tämän seurauksena NMR-resonanssit ovat suhteellisen kapeita. Hidas relaksaatio mahdollistaa myös spinsysteemien käsittelyn. Relaksaatioaika riippuu atomin ympäristöstä kuten atomin sidoksista, ympäröivistä atomeista ja liuottimesta.

Relaksaatio jaetaan usein pitkittäiseen spin-spin relaksaatioon ja poikittaiseen spin-hila relaksaatioon. Relaksaation aikaansaamiseksi tarvitaan vaihteleva kenttä. Tähän on neljä kilpailevaa mekanismia, jotka ovat dipoli-dipoli, kvadropolinen, spinin rotaation relaksaatio ja kemiallisen siirtymän anisotropian mekanismi.⁸

Pitkittäisessä relaksaatiossa magnetaatio palaa poikkeutetusta tilasta kentän suuntaiseksi saavuttaen jälleen tasapainotilan. Relaksaatio vaatii magneettikentän vaihtelevan Larmorin taajuudella.⁸ Palaaminen alempaan spin-tilaan vapautuu lämpöenergiana, joka on kuitenkin huomaamattoman pieni. Molekyylin pyöriminen saa aikaan poikittaisen relaksaation. Pyörimiseen vaikuttavat muun muassa molekyylin törmäily ja vuorovaikutukset liuoksessa. Liikkeestä riippuvaa relaksaatiovaikutusta mitataan korrelaatioajalla.⁶ Lyhyt korrelaatioaika tarkoittaa nopeaa liikettä.

Spinien kokemassa magneettikentässä on eroja. Tämä aiheuttaa eroja taajuudessa, mikä aikaansaa poikittaisen relaksaation. Erot magneettikentässä aiheutuvat magneettikentän epähomogeenisuudesta tai näytteen molekyylin sisäisistä tai välisistä vuorovaikutuksista.⁸ Pitkittäisen magnetaation palauttavat mekanismit hävittävät poikittaisen relaksaation. Suurilla molekyyliellä poikittainen relaksaatio on huomattavasti pitkittäistä relaksaatiota lyhyempi.⁸

Erittäin nopeasti liikkuvilla molekyyleillä on vain pieni osuus Larmorin taajuudella, joten niiden relaksaatio on hidasku. Ilmiö tunnetaan nimellä extreme narrowing limit.⁶ Hitaammin pyörivät molekyylit relaksoituvat nopeammin, mutta erittäin hitaasti pyörivät molekyylit relaksoituvat hyvin hitaasti. Relaksaatioaikaan voidaan kuitenkin vaikuttaa olosuhteita eli liuotinta ja lämpötilaa muuttamalla.

Dipoli-dipoli relaksaatio⁶ on spin-1/2 ytimillä usein merkittävin relaksaatiomekanismi. Se on myös Overhauserin efektin lähde. Spin-1/2 ytimet toimivat toisiinsa nähden magneettien tavoin joko hylkien tai vetäen puoleensa orientaatiosta riippuen. Molekyylin pyöriessä viereisten molekyyliden suhteellinen paikka vaihtelee, mikä aiheuttaa relaksaation.⁶ Ytimet, joilla ei ole spin-1/2 ytimiä lähellä, relaksoituvat poikkeuksellisen hitaasti ja ovat näin ollen helposti tunnistettavissa. Relaksaatiota voi häiritä pariton elektroni, joka aiheuttaa poikkeuksellisen voimakkaan dipoli-dipoli relaksaation.

Hyvin nopeasti pyörivillä molekyyleillä tai ryhmillä on magneettinen momentti, joka aiheutuu pyörivistä elektronisesta varauksesta tai ytimien varauksista. Tämä tunnetaan nimellä spinin rotaation relaksaatio.⁸ Nopea pyöriminen aiheuttaa kenttään vaihtelua molekyyliden törmäillessä keskenään.

Kvadropolinen relaksaatio esiintyy usein dominoivana relaksaatiomenetelmänä ytimillä, joiden spinkvanttiluku on suurempi kuin puoli.⁸ Kvadropolisella ytimellä on dipolisen momentin lisäksi kvadropolinen momentti. Tämä näkyy sopivalla taajuudella spintilan muuttumisena, mikä aiheuttaa relaksaation. Kvadropolinen relaksaatio voi aiheuttaa häiriöitä myös spin-1/2 ytimien NMR -spektriin.⁸ Tämä näkyy kytkentänä spin-1/2 ytimeen ja yksiulotteisessa spektrissä signaalin hajaantumisenä. Kvadropolisen relaksaation ollessa nopea hajaantumista ei havaita.

Kemiallisen siirtymän anisotropiasta aiheutuva relaksaatio johtuu kemiallisten sidosten elektronien epätasaisesta jakautumisesta ja sijainnista suhteessa maagneettikenttään, mikä heijastuu myös kemialliseen siirtymään.⁶ Liuoksessa molekyylin nopea pyöriminen kadottaa anisotropian aiheuttaman vaikutuksen. Esimerkiksi fluorilla ja fosforilla tämä relaksaatiomekanismi on merkittävä.⁸

Protonien pitkittäisrelaksaatio on keskisuurilla molekyyleillä puolesta sekunnista viiteen sekuntiin, mutta hiilen isotoopilla jopa kymmenen kertaa suurempi. Kaikkien spinien relaksoitumiseen menevä aika on kuitenkin moninkertainen. Viisinkertaisella relaksaatioajalla vasta 99 % spineistä on palautunut tasapainotilaan.¹²

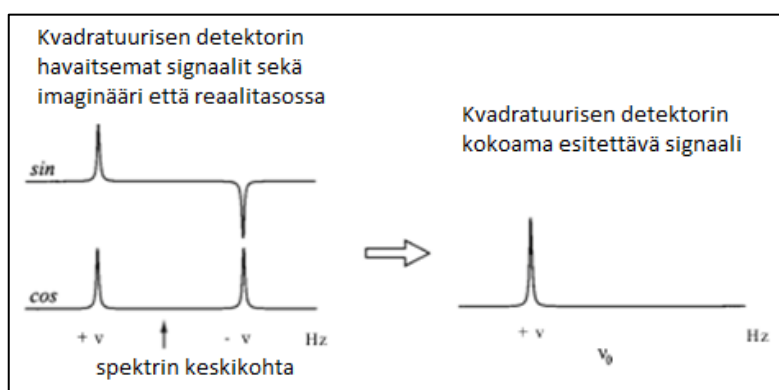
2.7 Detektorit ja vaihekierto

Spektrometreissa käytetään kvadratuurista detektoria, jolla seurataan kahta toisistaan 90 astetta poikkeavaa signaalia.¹¹ Signaalin paikan havaitsemisessa käytetään apuna referenssisignaalia, joka sijoitetaan spektrialueelle. Tämän jälkeen havaittu signaali vähennetään referenssisignaalista, jolloin se saadaan helpommin luettavaan muotoon. Lopullisen signaalin lukeminen tuottaisi vaikeuksia yhdellä detektorilla, sillä se ei kykenisi erottamaan spektrin vastakkaisilla laidoilla olevia signaaleja toisistaan. Tämän ongelman ratkaisee kvadratuurinen detektorit, joka havaitsee signaalin kahdessa eri tasossa ja muodostaa niistä yhden signaalin kuvan 6 osoittamalla tavoin.⁸

Saadut kaksi erillistä signaalia voidaan tallentaa toisistaan erillisinä käyttäen simultaanista kvadratuurista detektoria tai niiden pohjalta voidaan muodostaa yksi signaali käyttäen signaalit yhdistävää sekventuaalista kvadratuurista detektoria. Molempia menetelmiä käytettäessä spektrin ulkonäkö on sama.

Kvadratuurista detektoria käytettäessä valitun spektrialueen ulkopuolelle jäänyt signaali taittuu spektrialueen sisään useimmiten muista signaaleista poikkeavalla vaiheella.³¹ Näin ollen taittunut signaali saadaan havaittua spektrissä muiden mukana, mutta väärällä paikalla ja väärässä vaiheessa.

Vaihekierto¹¹ on käytännöllinen menetelmä spektrin virheiden korjaamiseksi. Vaihekierto on riippuvainen kvadratuurisesta detektorista. Sen vaiheet eivät ole aina tasan 90 astetta, mikä aiheuttaa signaalien monistumisen toiselle puolelle spektriä. Vaikka nämä jäänteet ovatkin pieniä, ne voivat vaikeuttaa spektrin lukemista. Käyttämällä vaihekiertoa päästään eroon spektriin jääneistä jäänteistä. Sen aikana käytetään useita erilaisia pulssin vaiheistuksia, joiden tavoitteena on saada kerättyä kumuloituvat halutut signaalit ja jättää pois virheelliset signaalit.⁶



Kuva 6: Kvadratuurisen detektorin toiminta⁸

2.8 Signaalin käsitteleminen

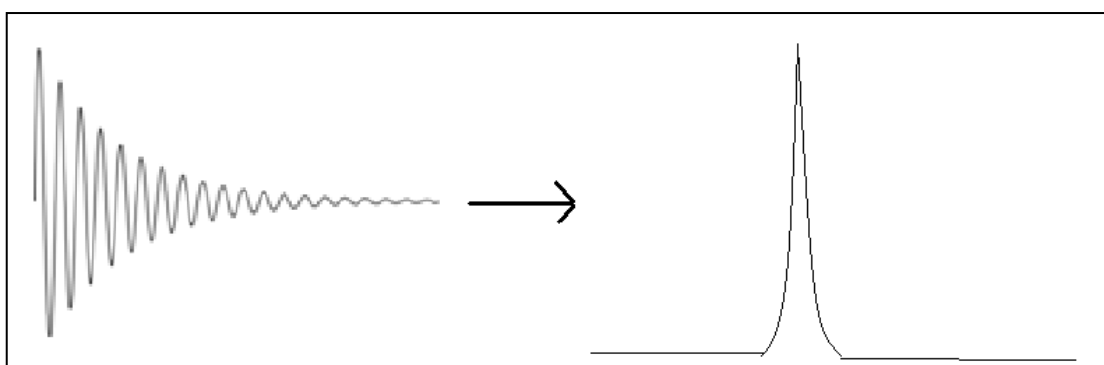
Viritettyjen spinien lähettämä hiljalleen katoava ajasta riippuva signaali saadaan helpommin luettavaan muotoon kääntämällä se taajuudesta riippuvaksi. Tämä saadaan aikaiseksi käyttämällä Fourierin muunnosta, joka on esitetty alempana kaavassa 1.¹³ Yhtälössä $f(\omega)$ esittää taajuusriippuvaista muotoa ja $f(t)$ esittää ajasta riippuvaista muotoa. Yhtälössä t tarkoittaa aikaa ja ω kulmataajuutta. i tulee yhtälön imaginääriosasta. Tosin spektrissä esitetään yleensä vain reaaliosta. Muunnoksen peruseriaate on esitetty kuvassa 7.

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)(\cos \omega t + i \sin \omega t) dt \quad (1)$$

NMR signaalit on käännettävä digitaaliseen muotoon, jotta niitä voidaan käsitellä edelleen digitaalisessa muodossa. Kääntämisvaiheessa käytetään apuna lähettimen referenssisignaalia, jonka ansiosta signaalit saadaan referenssisignaalin ja todellisen signaalin erotuksena.

Analogisen signaalin kääntäminen digitaalseksi sisältää myös rajoituksia. Niihin kuuluvat rajallinen muunnosnopeus, rajallinen suurimman ja pienimmän havaitun signaalin ero, liian voimakkaan intensiteetin leikkautuminen ja kohinan säilyminen tiedoissa. Kohinaa lukuun ottamatta näistä ongelmista päästään eroon sopivilla mittausparametreilla. Kohinan vähentämiseksi voidaan käyttää esimerkiksi taajuusalueen suodatusta.

Spektrin vaihekorjaus⁶ on tarpeellista, sillä referenssinä käytetty taajuus ei vastaa täysin magnetatiorvektorin vaihetta. Virheen aiheuttaa osittain keräysaikaa edeltävä viive, jonka aikana ei saada kerättyä signaalia.



Kuva 7: Fourierin muunnos relaxoituvalla signaalilla¹⁴

Ikkunafunktioita käyttämällä voidaan korostaa kerätyn signaalin eri osia. Korostamalla keräyksen alkuvaihetta, jossa signaalia tulee paljon, saadaan pienennettyä kohinaa. Toisaalta korostamalla myöhempiä osia saadaan nostettua erotuskykyä, mikä voi olla tarpeellista hienorakenteen selvittämiseksi.¹⁵

Spektriä voidaan parantaa pidentämällä kerätyyn tietoon käytettyä aikaa keinotekoisesti. Riittävän pitkällä keräysajalla signaalia ei enää tule, joten tuolloin signaalin intensiteetin tiedetään olevan nolla. Menetelmästä käytetään nimeä zero-filling.⁶ Parempia tuloksia saadaan, kun ennustetaan aikaisempien intensiteetin muutosten avulla signaalien intensiteettiä keräysajan jälkeen.

2.9 Mittausparametrit

Jokaisen analyysin alkaessa tulee määrittää yhdisteelle soveltuvat mittausparametrit. Keskeisimpiä parametreja ovat keräysaika, viive, pulssin pituus ja vahvuus, toistojen määrä ja sekoitusaika.⁶

Keräysajan aikana vastaanotetaan ytimien lähettämä säteily. Pitemmällä keräysajalla tiedon digitaalisesti muuntaminen on parempaa. Keräysaika on valittava riittävän pitkäksi, jotta spektristä saadaan selvitettyä myös signaalien hienorakenne.

Viive on toistojen välissä oleva aika. Viiveen aikana ytimet voidaan saada täysin relaxoitumaan, mutta tavallisesti tämä ei ole tarpeellista mittauksen pitenemisen vuoksi. Kvantitatiivisia spektrejä mitattaessa viiveen on kuitenkin oltava riittävän pitkä.

Oikealla pulssin pituudella saadaan käännettyä ytimien populaatiot haluttuun suuntaan. Usein tavoitellaan 90 asteen pulssia, jolla saadaan positiivinen signaali, mutta monimutkaisemmissa spektreissä on käytettävä useampia pulssien pituuksia. Pulssin voimakkuus vaikuttaa myös saatavaan signaaliin.

Kasvattamalla toistojen määrää saadaan spektrin erotuskykyä kasvatettua. Toisaalta toistojen määrä kasvattaa suoraan mittauksen pituutta, joten toistojen määrässä joudutaan aina tyytymään kompromissiin.

Sekoitusaika on kaksiulotteisissa spektreissä käytetty parametri, jota muuttamalla voidaan optimoida mahdollisimman suuri signaalien muodostuminen tai vaihtoehtoisesti tuoda esiin muita signaalin ominaisuuksia.

Mittauksen onnistuminen riippuu sopivista parametreista. Parametrit tulee valita ennen kaikkea haluttavan informaation ja saatavilla olevan mittausajan mukaan. Lyhyttä

keräysaikaa käytettäessä saavutetaan parempi herkkyys, mutta samalla resoluutio voi kärsiä. Ennen varsinaista spektriä on tarpeellista käyttää dummy scaneja vakaan tilan muodostamiseksi.

2.10 Kemiallinen siirtymä

Atomia suojaavat elektronit vaikuttavat signaalien sijaintiin spektreissä. Esimerkiksi karboksyyli ryhmässä sijaitseva vety havaitaan spektrissä hyvin korkealla siirtymän arvolla. Kemiallinen siirtymä on hyvin hyödyllinen ominaisuus NMR -spektreissä, sillä päällekkäisiä signaaleja ei kyetä lukemaan luotettavasti ja elektronien suojausvaikutus aiheuttaa signaalien hajoamisen laajemmalle spektrialueelle.

Tavallisimmat signaalit tulevat protonispektrissä 0,5 – 12 ppm alueelle ja hiilispektrissä 30 -220 ppm alueelle. Toisin kuin luvuista voisi päätellä, protonispektri on ytimen herkkyydestä johtuen helpommin luettavissa paremman herkkyyden johdosta.¹⁶

2.11 Overhauserin efekti

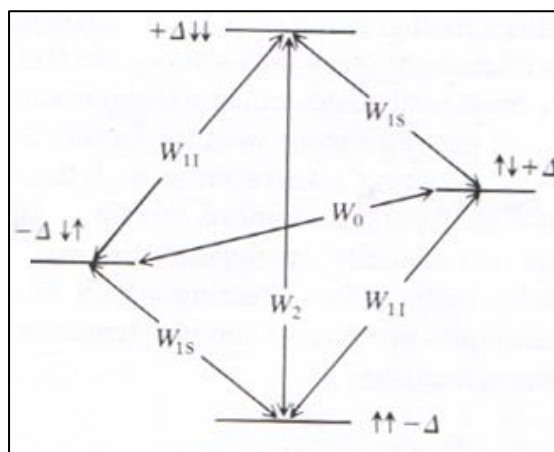
Overhauserin efekti aiheutuu NMR-aktiivisten ytimien suorasta vuorovaikutuksesta toisin kuin korrelaatioon ja kytkentöihin pohjautuvat mittaukset, joissa vuorovaikutus kulkee atomisidoksia pitkin. Menetelmää ei yleensä päästä soveltamaan ennen kuin yhdisteen rakenne tunnetaan jo valmiiksi. Se kuitenkin tarjoaa ainutlaatuisesti tietoa yhdisteen kolmiulotteisesta rakenteesta.

Koe voidaan suorittaa vakaan tilan mittauksena tai hetkellisen tilan transienttimittauksena. Molemmat menetelmät pohjautuvat samaan teoriaan. Pääsääntöisesti vakaan tilan mittaus tarkoittaa NOE-differenssispektrometriaa ja transienttimittaus kaksiulotteista NOESY -mittausta. Tosin esimerkiksi transienttimittaus voidaan suorittaa käyttäen yksiulotteista gradienttiselektiivistä mittausta.¹⁷

NOE voidaan määritellä resonanssin intensiteetin muutokseksi, kun läheistä resonanssia häiritään eli poikkeutetaan tasapainotilasta. Intensiteetin muutokset voivat olla sekä negatiivisia että positiivisia riippuen molekyylin liikkuvuudesta.¹⁷

2.11.1 Kahden spinin välinen vakaan tilan NOE

Vakaan tilan kokeessa spinin populaatioiden häirintä saadaan aikaiseksi käyttämällä heikkoa selektiivistä radiopulssia. Spinin vaikuttavat toisiinsa magneetin tavoin. Häirityn spinin ja tarkkailtavan spinin välisten energiatilojen muutokset aiheuttavat spektreissä havaitun signaalin. Pitkittäinen relaksaatio tuo takaisin tasapainotilan.¹⁷



Kuva 8: Overhauserin efektin energiadiagrammi¹⁶

Kuvan 8 tavoin virittyneestä tilasta on kuusi erilaista relaksaatioreittiä. Reiteissä on neljä yksinkertaista kvanttisiirtymää, kaksinkertainen kvanttisiirtymä ja siirtymä kvanttiluvulla nolla.

Siirtymät kvanttiluvulla nolla ja kaksi vaativat molempien spinien tilan muutosta. Molempien spintilojen muutokset aikaansaavat havaittavan Overhauserin efektin. Kvanttiluvulla nolla oleva siirtymä aiheuttaa negatiivisen signaalin, koska siirtymä tasaa populaatioiden eroja. Kvanttiluvulla kaksi oleva siirtymä aiheuttaa positiivisen signaalin, koska siirtymä lisää populaatioeroja.¹⁶

Vain toisen spinin tilan muutos ei aiheuta Overhauserin efektiä, koska se ei muuta populaatioeroja. Tämä muutos toimii Overhauserin efektin syntymistä vastaan, koska relaksaatio tapahtuu menetelmällä, jota ei voida havaita. Pahimmassa tapauksessa tämä siirtymä voi vaimentaa Overhauserin efektin kokonaan. Myös kvanttiluvuilla nolla ja kaksi olevat siirtymät kilpailevat keskenään ja voivat vaimentaa toisiaan. Näin ollen havaittava NOE syntyykin useampien relaksaatioreittien tuloksena.

Havaittava NOE voidaan kuvata Solomonin yhtälöllä, joka on esitetty alempana kaavana 2. NOE:n vaikuttaa siis tutkittavien ytimien magnetogyriset suhteet ja relaksaatioreitit aiheuttaen negatiivisen tai positiivisen signaalin tai vaimentaen sitä. Yhtälössä γ on magnetogyriinen suhde häirittäväälle ytimelle tai tutkittavalle ytimelle, W_2 on tuplakvanttikohereenssi, W_0 on kohereenssi kvanttiluvulla nolla, W_1 on kilpaileva relaksaatioreitti kvanttiluvulla yksi.^{17, 18, 19}

$$\eta(S) = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left(\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1 + W_2} \right) \quad (2)$$

NOE-virityksen aikaansaamiseksi tarvittava poikittainen relaksaatio ei tapahdu itsestään vaan vaatii muutosta vastaavalla taajuudella vaihtelevan kentän, joka aiheutuu molekyylin liikkeestä liuottimessa.⁸ Magneettien tavoin vierekkäiset ytimet joko vahvistavat tai heikentävät magneettikenttää riippuen ytimien suhteellisesta orientaatiosta toisiinsa nähden. Tästä johtuen kyseessä on dipoli-dipoli relaksaatio.

Molekyylin spinien relaksaatioreitteihin vaikuttaa ennen kaikkea molekyylin liike. Liikettä voidaan kuvata korrelaatioajalla, joka riippuu suuresti molekyylin massasta ja käytettävästä liuottimesta. Lyhyen korrelaatioajan omaavat nopeat molekyylit käyttävät W_2 relaksaatioreittiä aiheuttaen positiivisen signaalin. Sitä vastoin pitkän relaksaatioajan omaavat hitaat molekyylit käyttävät W_0 relaksaatioreittiä aiheuttaen negatiivisen signaalin.⁸

NOE-viritys voi olla enintään 50 % kontrollispektriin verrattuna ja pienimmillään -100 %. Keskisuurilla molekyyileillä viritys voi olla nolla. Tällöin virityksen mittaamiseksi voidaan tuolloin käyttää ROESY sovellusta, joka huomio vain positiivisen virityksen. Myös magneettikentän voimakkuus, lämpötila ja liuotin voivat vaikuttaa virityksen intensiteettiin. Tämä vaihtelu on esitetty kuvassa 9.

NOE:n heteronuklearisessa versiossa esimerkiksi protonin ja hiilen välinen viritys on enimmillään jopa 200 % johtuen relaksaatiosta, joka tapahtuu pääasiassa protonien kautta. Joillakin ytimillä kuten typpi-15:lla viritys esiintyy aina negatiivisena.⁸

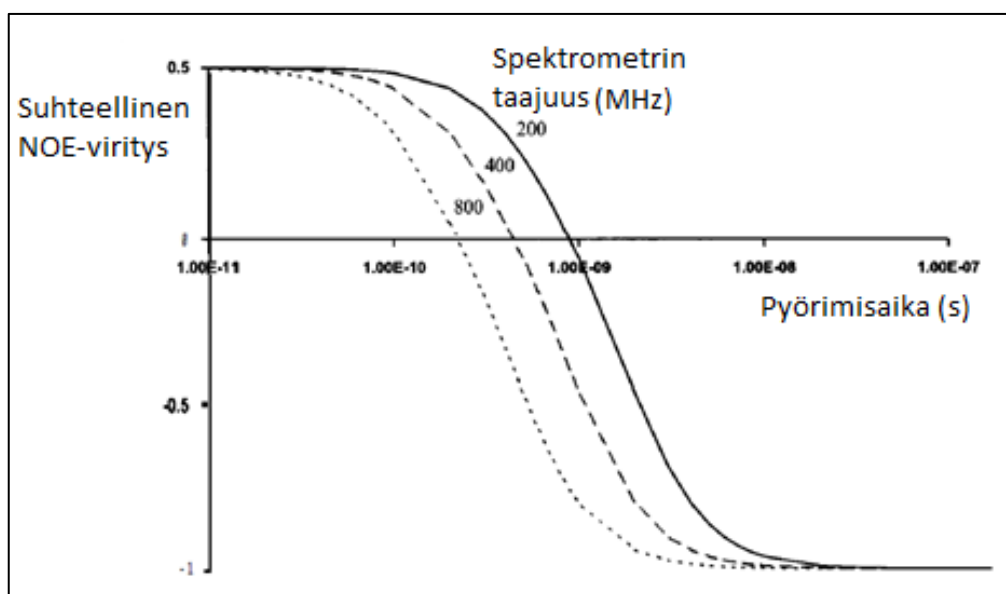
NOE-virityksen intensiteetti on riippuvainen ytimien gyromagneettisen suhteen, relaksaatioajan ja relaksaatioreitin lisäksi ytimien välisestä etäisyydestä. NOE intensiteetti on suhteessa etäisyyden käänteisluvun kuudenteen potenssiin.⁴ Tämä suhdeluku tekee NOE- mittauksista poikkeuksellisen käyttökelpoisen stereokemiallisen rakenteen selvittämisessä. Luvusta havaitaan, että intensiteetti tippuu erittäin nopeasti etäisyyden kasvaessa ja tämän seurauksena yli 0,5 nm toisistaan olevat ytimet jäävät havaitsematta.

2.11.2 Vakaan tilan NOE monen spinin systeemissä

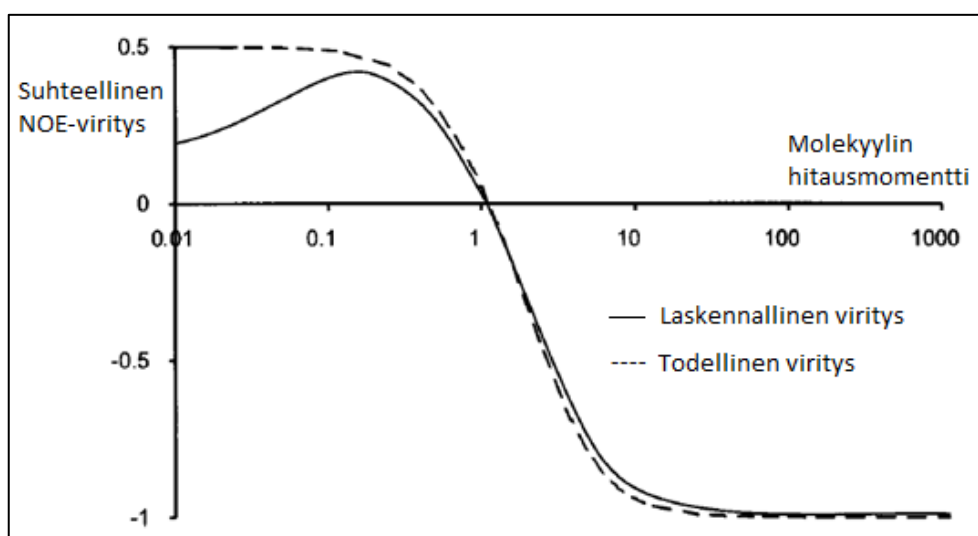
Käytännössä NOE -mittaukset suoritetaan aina useamman spinin systeemeissä, jolloin kvantitatiivisten tuloksien matemaattinen tulkitseminen vaikeutuu huomattavasti kahden spinin systeemiin verrattuna. Havaittava NOE syntyy edelleen vain kahden spinin välille, mutta myös muut spinit voivat vaikuttaa relaksaatioon tavallisimmin pienentäen NOE-virityksen intensiteettiä. Muiden spinien vaimentavaa vaikutusta on havainnollistettu

kuvassa 10. Kuvasta nähdään, että muiden spinien vaikutus intensiteettiin on vain nopeasti liikkuvilla molekyyleillä suuri. Toisaalta virhe vaikeuttaa kvantitatiivisten tulosten laatimista.

Muiden spinien vaikutusta voidaan pienentää käyttämällä paramagneettiseen happeen liuotettua näytettä, sillä sen spin-1/2 ytimet aiheuttavat protoniin verrattuna huomattavasti tehokkaamman relaksaation. Myös molekyylien väliset vuorovaikutukset voivat aiheuttaa odottamattomia signaaleja. Liuottimesta aiheutuvat vuorovaikutukset voidaan välttää yleensä riittävän tehokkaasti käyttämällä deuteroituja liuottimia.



Kuva 9: Overhauserin efektin intensiteetti spektrometrin taajuuden ja tutkittavan yhdisteen pyörimisnopeuden mukaan⁸



Kuva 10: Todellinen Overhauserin efekti vakaan tilan määrittämisessä⁸

Monen spinin systeemissä muut kuin määritettävät kaksi spiniä vaimentavat NOE-intensiteettiä, sillä muutkin spinit voivat vaimentaa relaksaatiota. Kolmannen spinin vaimentavaa vaikutusta voidaan arvioida laskukaavalla 3.⁸ Kaavasta havaitaan, että kolmannen spinin etäisyyden kasvaessa riittävän suureksi sen merkitys tippuu olemattoman pieneksi. Laskukaavassa käytetään hyväksi NOE-intensiteetin ja spinien etäisyyden välistä suhdetta.

$$\eta = \eta_{\max} \frac{r_{12}^{-6}}{r_{12}^{-6} + r_{13}^{-6}} \quad (3)$$

Jos edellä esitetystä laskukaavasta otetaan kolmannen spinin vaikutus pois, menetetään etäisyyden ja intensiteetin välinen suhde. Näin ollen etäisyyden määrittämiseksi systeemissä on oltava vähintään kolme NMR-aktiivista spiniä riittävän lähellä toisiaan.⁸ Toisaalta kolmas spin vaimentaa määritettävän virityksen intensiteettiä, mikä aiheutuu nyt yhä useamman kilpailevan relaksaatioreitin seurauksena.

Määrittystä voi vaikeuttaa myös kolmannen spinin näkyvä signaalin muutos. Häiritäessä ensimmäistä spiniä saadaan aikaan muutos toisen spinin populaatioissa, mikä aiheuttaa vastakkaisen muutoksen kolmannen spinin populaatioissa. Tämä muutos nähdään negatiivisena NOE:na.⁸ Kolmannen spinin signaalin intensiteettiin vaikuttaa suuresti etäisyys relaksoivaan ytimeen sekä ytimien välinen sidoskulma. Poikkeuksellisen lyhyt etäisyys ja lineaarinen sijainti relaksoivaan ytimeen kasvattavat kolmannen spinin negatiivista intensiteettiä.

NOE:n monikäsitteisen tulkinnan vuoksi on järkevää mitata useampien spinien välisiä virityksiä. Tällöin virheellisen tulkinnan mahdollisuus pienenee. Suurilla molekyyileillä negatiivisten spinien tulkinta muuttuu vakaan tilan menetelmällä hyödyttömäksi, koska ei voida tulkita tuleeko negatiivinen signaali suorasta vaikutuksesta vai epäsuorista lähteistä. Pitkillä saturaatioajoilla kahden spinin välinen NOE leviää läpi molekyylin aiheuttaen kaikille ytimille saman virityksen. Myös kemiallinen muutos näkyy virityksissä, mikä voi aiheuttaa negatiivisen signaalin.

2.11.3 Transienttimittaukset ja NOESY

Nykyään käytetyin menetelmä NOE:n mittaamiseen on kaksiulotteinen NOESY, joka on transienttimittaus. Menetelmän peruseriaatteet ovat samat kuin vakaan tilan mittauksessa. Vakaan tilan mittaukseen verrattuna transienttimittauksen etuna on intensiteetin suora relaatio spinien välisiin etäisyyksiin ja pienempi virheherkkyys suurilla molekyyileillä. Transienttimittauksissa NOE-viritykset käyttäytyvät kuin kahden spinin väliset viritykset ilman että viereiset spinit aiheuttavat suuria virheitä.¹⁷

Transienttimittauksessa pulssisarjan sisäiset viiveet pidetään niin lyhyinä, etteivät kauempana olevat ytimet vielä ehdi vaikuttaa lähempänä olevan ytimen relaksaatioon. Näin ollen signaalien intensiteetistä ja herkkyydestä joudutaan tinkimään, mutta tämän johdosta menetelmällä saadaan kvantitatiivisia tuloksia.¹⁷

3. Pulssisarjat

Jokaista mittausta varten on käytettävä sitä varten valikoitua valmista pulssisarjaa. Pulssisarjaa ajetaan säädetyn toiston verran, minkä jälkeen mittaustuloksista saadaan laskettua yhteinen signaali, mikä on vähemmän herkkä virheille kuin yksittäinen mittaustulos.

Yksiulotteisten protoni- ja hiilispektrien pulssisarjat ovat suhteellisen yksinkertaisia, mutta jo kaksiulotteiset peruspulssisarjat ovat paljon monimutkaisempia. Toisinaan pulssisarjoja joudutaan myös muokkaamaan soveltumaan paremmin mittaukseen.

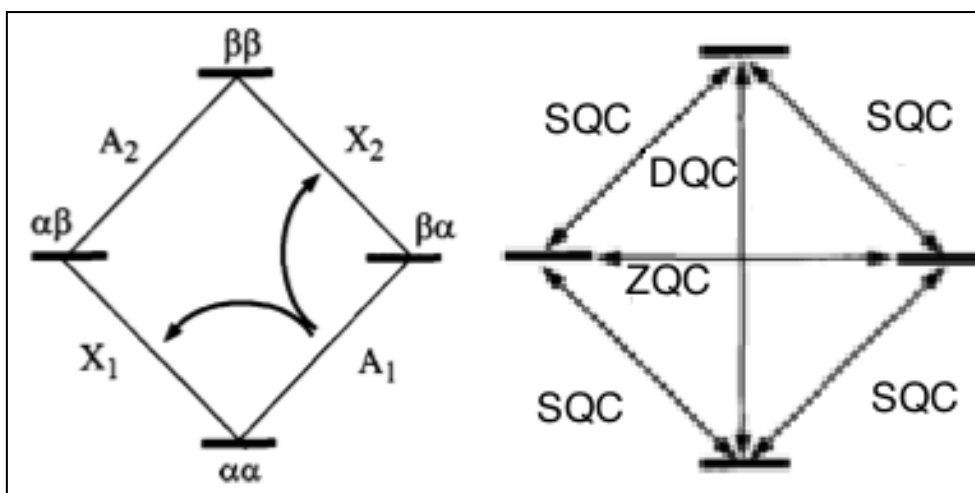
Mittaussparametrit joudutaan kuitenkin lähes poikkeuksetta muuttamaan mittaukseen sopivaksi, sillä määritettävä yhdiste, sen pitoisuus ja käytettävä liuotin muuttavat olosuhteita merkittävästi.

3.1 Koherenssi ja kytkentä

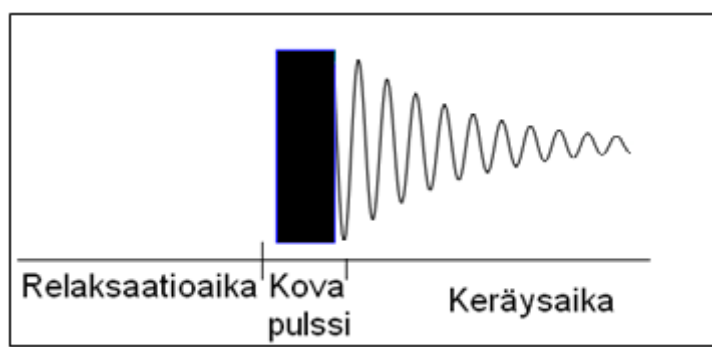
Koherenssi tarkoittaa samaa kuin poikittainen magnetaatio. Koherenssin siirtymätiloja voidaan mallintaa energiadiagrammeilla. 90 asteen pulssilla saavutettu poikittainen magnetaatio aiheuttaa singlettikvanttikoherenssin, mikä havaitaan signaalina detektorilla. Poikittainen magnetaatio voi siirtyä energiadiagrammin tasolta toiselle sopivia pulssisarjoja käytettäessä.

Kahden ytimen systeemissä voidaan molempiin ytimiin kohdistaa selektiivinen pulssi, mikä saa aikaan populaatioiden siirtymisen viritetyltä tilalta vielä korkeammalle tilalle. Tästä käytetään nimitystä tuplakvanttikoherenssi. Samaan tapaan useamman ytimen systeemeissä voi muodostua korkeammalla kvanttiluvulla olevia koherensseja. Tuplakvanttikoherenssia tai korkeampia koherensseja ei kyetä havaitsemaan suoraan.

Aikaansaatu koherenssi saadaan siirrettyä ytimeltä toiselle käyttämällä useamman pulssin sarjoja. Nämä siirtymät saadaan näkyviin lukuisilla kaksiulotteisilla kokeilla. Tavallisimmin kokeiden aikana luodaan magnetaatiot vastakkaisiksi toisiinsa nähden, jonka jälkeen koherenssi levitetään viereisiin spineihin. Koherenssin energiadiagrammi on esitetty kuvassa 11.⁸



Kuva 11: Signaalin muodostuminen koherenssista⁸



Kuva 12: Protoni- ja hiilispektrin pulssisarja²⁰

3.2 Protoni- ja hiilispektri

Protoni- ja hiilispektrin pulssisarjat koostuvat herättävästä pulssista ja sen jälkeisestä keräysajasta, jonka jälkeen on viive seuraavaa toistoa edeltäen. Tämä on esitetty kuvassa 12.²⁰

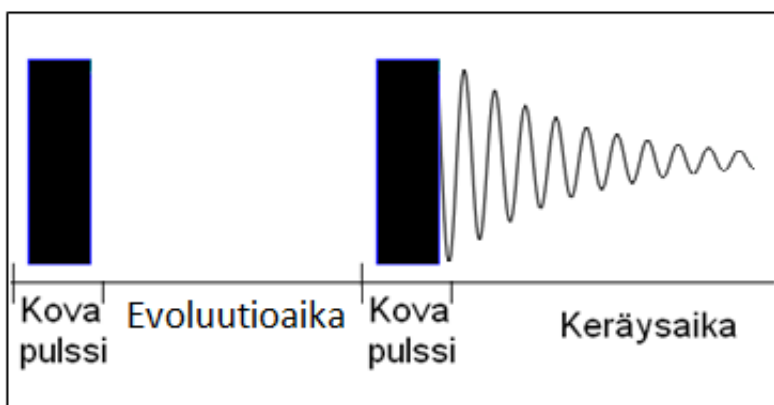
3.3 Kaksiulotteiset spektrit

Kaksiulotteinen pulssisarja koostuu preparoinnista, evoluutioajasta, sekoituksesta ja havaitsemisesta. Preparointi ja sekoitus koostuvat yhdestä tai useammasta pulssista. Evoluutioajalla kerätään ytimien lähettämä tieto. Sen aikana muodostetaan kaksiulotteinen spektri. Taajuusulottuvuuden luomiseksi on vaihdeltava magnetaatiota. Kahden taajuusulottuvuuden luomiseksi on käytettävä kahta erillistä aikaparametria.

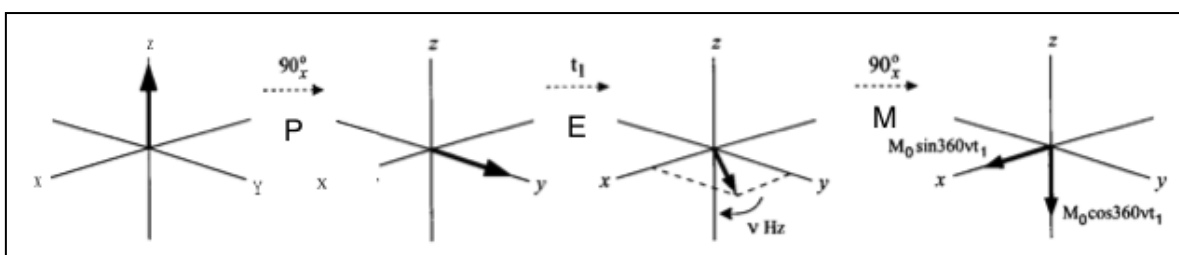
Yksinkertaisimmillaan voidaan seurata evoluutioaikaa ja detektioaikaa, jonka aikana kerätään signaali.

Kaksiulotteisen spektrin keräämiseksi on suoritettava useita mittauksia kasvavilla evoluutioajoilla, jotta saadaan selville korrelaatiot koko spektrialueelta. Muuttuvasta evoluutioajasta johtuvaa toistojen määrää voidaan rajata muuttamalla inkrementtien määrää, joiden määrän valintaan oleellisesti vaikuttaa spektrin leveys.

Kaksiulotteiset spektrit käyttävät hyväkseen kvadratuurista detektoria. Spektrin vaaka-akselilla oleva tieto on kerätty samalla tavoin kuin yksiulotteisessakin spektrissä. Spektrin luomiseksi on tarpeellista erottaa negatiivinen ja positiivinen signaali toisistaan, jotta niiden peilikuvat eivät tule spektriin. Signaalien suunnan erottamiseksi voidaan käyttää joko vaiheherkkää tai absoluuttisen arvon menetelmää. Vaiheherkkä menetelmä erottaa toisistaan signaalin mahdollisesti negatiivisena ja positiivisena esiintyvän osan. Absoluuttisen arvon menetelmä sekoittaa negatiivisen ja positiivisen osan näyttäen ne yhtenä signaalina.⁸



Kuva 13: COSY:n pulssisarja⁶



Kuva 14: Spinien ekvivalenttivektori COSY määrittymisen aikana⁸

3.4 COSY

COSY:n pulssisarja^{21,22} on yksinkertaisin käytettävistä kaksikulotteisten spektrien pulssisarjoista. Se on johdettu spin echo-kokeesta. Kokeessa käytetään kahta 90 asteen protonipulssia, joiden välissä on evoluutioaika. Jotta koe saadaan toteutettua koko taajuusalueelle, on se toistettava useita kertoja käyttäen eri evoluutioaikaa jokaisella toistolla.⁶

Kokeen aikana toinen pulssi saa aikaan magnetaation siirtymisen läheisiin spineihin. Ilmiötä sanotaan koherenssin siirroksi. Kuitenkin vain osa magnetaatiosta siirtyy kokeen aikana spiniltä toiselle, mikä saa aikaan spektrin diagonaaliset signaalit.⁸ Diagonaalisilla signaaleilla on sama kemiallinen siirtymä molemmilla taajuusakseleilla, eivätkä ne tarjoa mitään uutta tietoa verrattuna yksikulotteiseen spektriin.

COSY suoritetaan yleensä vaiheherkkänä, joten signaalit voivat olla sekä negatiivisia että positiivisia. Tavallisimmin spektrin vaihe kuitenkin korjataan esiintymään molemmilla taajuusakseleilla positiivisiksi.

3.5 HMBC

Pulssisarjassa käytetään pitkää preparaatioaikaa pidemmän kantaman kytkentöjen muodostumiseksi.⁶ Homonukleaariset protoni-protoni kytkennät aiheuttavat virheitä vaiheeseen, sillä ne ehtivät kehittyä myös pidemmällä preparaatioajalla.⁸ Vaiheen häiriöiden kätkemiseksi käytetäänkin tuloksille todellisen arvon esitystä, mikä kätkee vaiheen häiriöt.

Spektriin tallentuu vaaka-akselin suuntaisesti spektrin hienorakenne, josta päästään eroon käyttämällä korkean taajuuden omaavien kytkentöjen suodatusta. Suodattamalla korkeat kytkentäarvot saadaan spektristä pois tiedot yhden sidoksen kytkennöistä. Tästä sovelluksesta käytetään nimitystä low-pass J-filter.¹ Samalla menetetään tietoa spektrin hienorakenteesta, mistä voidaan saada tietoa molekyylin rakenteesta, mikä voi olla muuten vaikeaa saada selvitettyä.

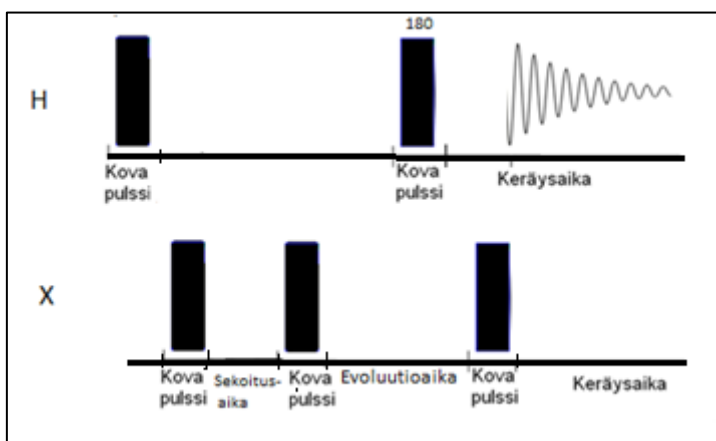
Spektrissä intensiteetti on riippuvainen kytkentöjen voimakkuudesta ja amplitudista, joka riippuu myös kytkennän suuruudesta. Pulssisarjan sisäisiä viiveitä muuttamalla voidaan valita sopiva amplitudi, jolla saavutetaan haluttujen kytkentöjen maksimiarvot. Arvoja joudutaan harvoin säätämään erikseen, sillä sopivat arvot kahden ja kolmen sidoksen päässä olevien kytkentöjen löytämiseksi on jo syötetty valmiiksi. Toisaalta riippuen atomien

asemista toisiinsa nähden voi kytkentä poiketa suuresti odotusarvosta ja näin ollen puuttua spektristä. Samalla tavoin osa kauempana olevista signaaleista voi jäädä havaitsematta johtuen viiveen arvosta.

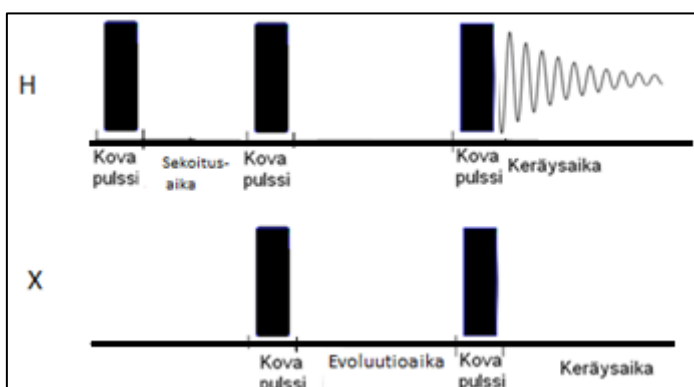
Käytännön ongelmia spektriin aiheuttavat huono herkkyys ja spektrin suuri alue, jolle vaaditaan riittävää erotuskykyä verrattuna esimerkiksi HSQC -mittaukseen. Näin ollen riittävän hyvän spektrin saamiseksi on käytettävä riittävän montaa inkrementtiä tarvittavan erotuskyvyn saavuttamiseksi ja riittävän montaa mittauksen toistoa kohinasuhteen parantamiseksi.

3.6 HSQC

HSQC -pussisarja^{6,24} on heteronukleaarinen eli spektrissä viritetään kahdenlaisia ytimiä. Pulssisarja on kohtuullisen monimutkainen, koska tavoitteena on saada näkyviin vain korkean taajuuden omaavat yhden sidoksen väliset kytkennät ja kadottaa matalamman taajuuden kytkennät, jotka tulevat useamman sidoksen välisistä kytkennöistä.



Kuva 15: HMBC -pulssisarja⁶



Kuva 16: HSQC -pulssisarja^{6,24}

3.7 Vakaan tilan NOE

Vakaan tilan NOE -mittauksessa sovelletaan differenssispektroskopiaa^{17,25}, jossa lasketaan NOE spektrin ja protonispektrin erotus. Tämä on mahdollista, sillä NOE:n soveltaminen muuttaa spektrin intensiteettiä suhteessa tavalliseen protonispektriin.

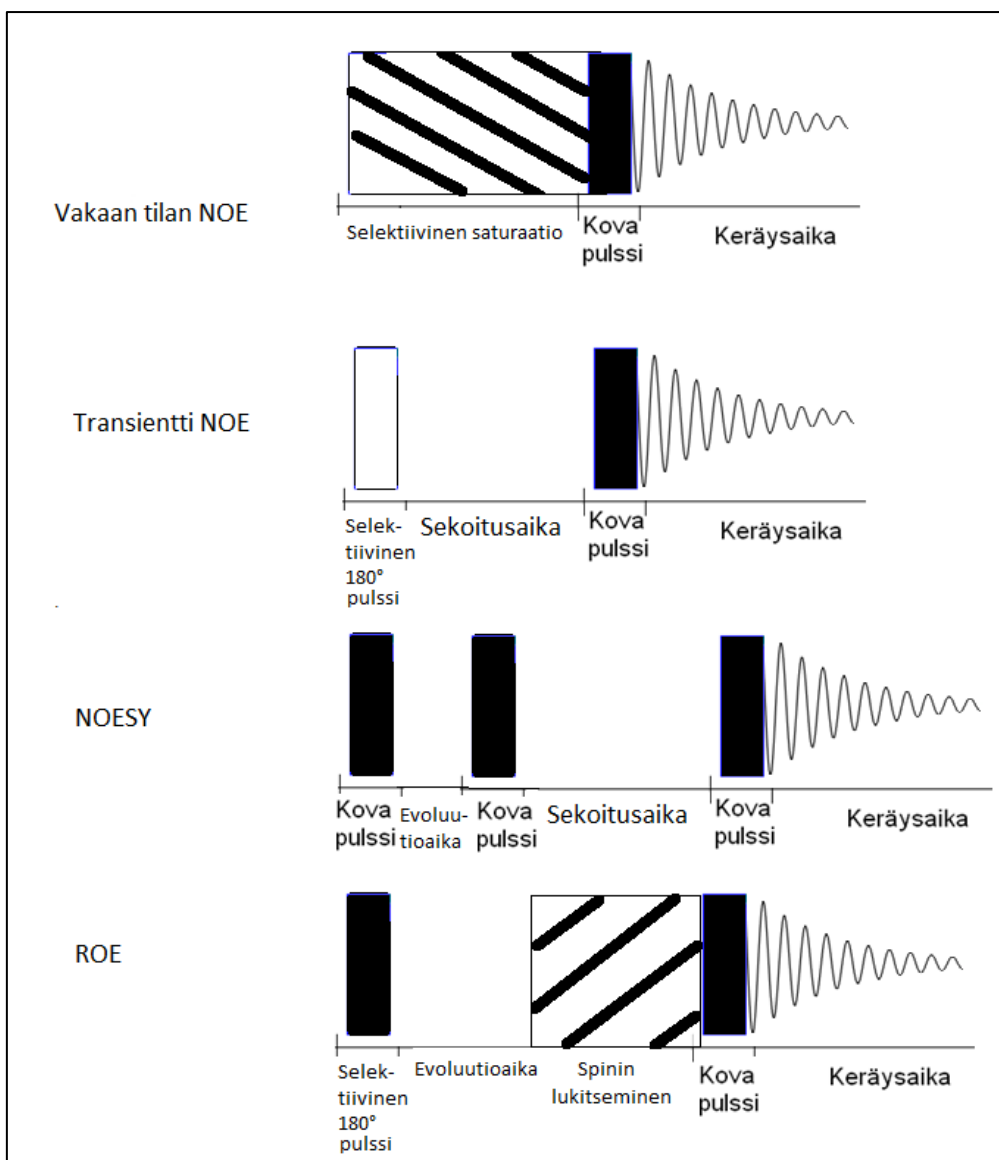
NOE-spektri saadaan poikkeuttamalla spintiloja tasapainotilasta ennen mittausta. Tätä kutsutaan presaturaatioksi. Tämän jälkeen mitataan kontrollispektri ilman presaturaatiota. Mittausolot on oltava täysin samanlaiset, jotta spektreistä saatava erotus olisi riippuvainen vain presaturaation tuomista muutoksista.²⁶ Tulosten yhtenevyyden takaamiseksi mittauksessa on oltava vain yksi resonanssi presaturaatiossa kerrallaan. Viereisen ytimen pienikin saturaatio on haitallista, sillä se aiheuttaa ylimääräisiä signaaleja.

Muutokset spektreissä voivat olla pieniäkin, joten muutosten erottaminen voi vaatia pitempiä mittausaikoja. Mittaus tarvitsee vakaan ympäristön. Muutokset magneettikentässä, radiotaajuudessa, lämpötilassa tai sen vaiheessa aiheuttavat häiriöitä spektriin.

Tekniikka soveltuu vain pienille ja keskisuurille molekyyleille, joille NOE tulee olemaan positiivinen. Sopiva presaturaatioaika riippuu molekyylistä ja tarvittavasta tiedosta. Lyhyillä presaturaatioajoilla havaitaan nopeasti kehittyvät lyhyet vuorovaikutukset selvemmin ja pitkillä presaturaatioajoilla havaitaan hitaasti kehittyvät pitkät vuorovaikutukset entistä paremmin.⁸

Viritys voi aiheutua myös virityksen siirtymisen kautta, missä kemiallinen muutos aiheuttaa virityksen.¹⁷ Esimerkiksi konformaation muutos voi aiheuttaa muutoksen käyneelle spinille virityksen. Muutokset useimmiten vain vaikeuttavat tulosten lukemista. Muutoksesta seuraava signaali on hyvin vahva ja negatiivinen. Vahvistuvat signaalit voivat haitata määrittystä, mutta tarjoavat myös mahdollisuuden tunnistaa vaihtuvat protonit.

NOE-viritysten prosentuaalinen osuus voidaan selvittää suoraan differenssispektristä tai vertaamalla kontrollispektriin. Signaalia, johon saturaatiota on sovellettu, voidaan käyttää vertailuarvona, koska NOE viritykset riippuvat suoraan saturaation määrästä. Pieniä alle prosentin muutoksia ei aina voida määrittää riittävän luotettavasti edes kvalitatiiviseen määrittelyyn.



Kuva 17: NOE -pulssisarjat: vakaan tilan määrittäminen, transientti-määrittäminen, NOESY ja ROE ¹⁷

3.8 NOESY

NOESY -mittauksessa havaitaan kineettiset NOE-viritykset.¹⁷ Tällöin kytkentöjen intensiteetit jäävät melko pieniksi. Pulssisarjassa ensimmäisen pulssin ja sitä seuraavan evoluutioajan aikana magnetaatio on vaakatasossa. Toinen pulssi kääntää NOE-kytkennät pysty akselin suuntaiseksi, mitä seuraavan sekoitusajan kuluessa NOE-kytkennät kehittyvät. Kolmannella pulssilla kerätään syntyneet kytkennät.⁸ Kvantitatiivisilla mittauksilla tulee olla vähintään viisinkertainen viive relaksaatioaikaan verrattuna. Se on tarpeellinen mittauksien välissä, koska ydinten tulee antaa palata magneettikentän suuntaiseksi.

NOESY -sekvenssin aikana käytetään vaihekiertoa, jonka avulla päästään eroon kaikista muista signaaleista kuin NOE-virityksistä. NOE-kytkennät esiintyvät pysty akselin suuntaisesti koherenssiluvulla nolla. Vaihekierrolla saadaan poistettua kaikilla muilla koherenssiluvuilla esiintyvät magnetaatiot ja ne magnetaatiot, jotka eivät ole pysty akselin suuntaisesti.⁸

Sopivan sekoitusajan valitseminen on välttämätöntä kokeen onnistumiseksi. Molekyylin liike määrää sopivan sekoitusajan. Sopiva sekoitusaika riippuu myös haluttavasta informaatiosta. Kvantitatiivisia tuloksia varten on valittava sekoitusaika, joka ei ole vielä saavuttanut intensiteettimaksimiaan. Sekoitusaika saavuttaa maksimiarvonsa ollessaan relaksaatioajan paikkeilla eli pienillä molekyyille yleensä puolesta kahteen sekuntiin. Spinien diffuusio kuitenkin aiheuttaa jo puolen relaksaatioajan mittaisilla relaksaatioajoilla negatiivisen NOE:n alueella häiriöitä.⁸

Yksiulotteisia NOESY -määrityksiä voidaan käyttää kvantitatiivisten tulosten saamiseksi.^{8,17} Yksinkertaisimmillaan voidaan käyttää kontrollispektriä ja differentiaalispektroskopiaa. Yksiulotteinen gradienttiselektiivinen NOESY tarjoaa mahdollisuuden tarkkoihin, nopeisiin ja virheettömiin kvantitatiivisiin mittauksiin. Gradienttimittauksella saadaan mitattua luotettavasti pitemmänkin matkan NOE-kytkennät.

Yksiulotteinen NOESY -spektri^{8,27} saadaan mitattua käyttämällä gradienttiselektiivistä pulssia ja spin echoa, jonka avulla saadaan kerättyä vain halutut NOE-kytkennät. Spektrissä esiintyy valmiiksi vain NOE -kytkennät, joten differenssispektrille ei ole tarvetta. Spektrissä ei siis ole differenssispektrin jäänteitä, ja se on nopea mitata.

3.9 ROE

Suurehkoilla molekyyille NOE-virityksen intensiteetti saattaa tippua nolnaan kilpailevien relaksaatioreittien seurauksena aiheuttaen yhtä suuren positiivisen ja negatiivisen virityksen. Tällöin voidaan kuitenkin käyttää rotating-frame Overhauser efektiä eli ROE:a.

Menetelmällä saatavat signaalit esiintyvät aina positiivisina. Mittauksen aikana magnetaatio pidetään NOE:sta poiketen poikittaisessa tasossa. Pulssisarjan alussa käytetään peräkkäin selektiivistä 180 asteen pulssia ja ei-selektiivistä 90 asteen pulssia, minkä seurauksena spinit kokevat 270 asteen magnetaation muutoksen. Peräkkäiset pulssit saavat aikaan halutut populaatioerot. Tämän jälkeen käytetään spin-lock pulssia, joka estää

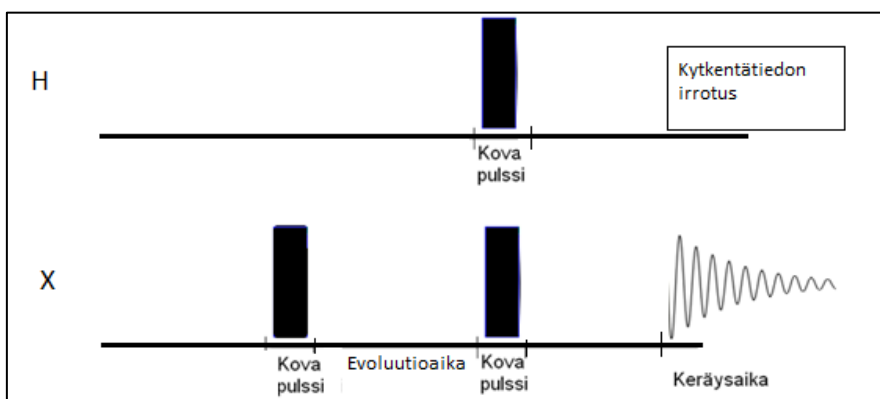
kemiallisen siirtymän kehittymistä ja säilyttää poikittaisen magnetaation pyörivässä tasossa.¹⁷

Poikittaisessa tasossa molekyylit kokevat huomattavasti heikomman magneettikentän. Koska molekyylien pyörimisnopeus riippuu kentän voimakkuudesta, suuret molekyylit käyttäytyvät heikossa kentässä kuin hyvin pienet molekyylit vahvassa kentässä. Näin ollen kaikki ROE -viritykset havaitaan positiivisina.⁸

3.10 J-resolvoitu menetelmä

HMBC-spektriin verrattuna J-resolvoidusta^{28,29} spektristä tulee saada näkyviin kytkennät niiden J-kytkennän mukaan. Toisessa ulottuvuudessa on esitetty kemiallinen siirtymä, kun toisessa on J-kytkentä hertseissä. Heteronukleaarisisä määrityksessä kemiallisen siirtymän tieto kadotetaan toiselta kemiallisen siirtymän akselilta käyttämällä spin echoa evoluutioajan aikana. Tämän aikana molemmille ytimille kohdistetaan samanaikaiset pulssit evoluutioajan puolessa välissä.⁸ Tällä saadaan luotua kemiallinen siirtymä takaisin samalla kun kytkennät jatkavat kehittymistä. Heteronukleaarisen J-resolvoidun menetelmän pulssisarja on esitetty kuvassa 18. Menetelmällä saadaan näkyviin vain kauempana kuin yhden sidoksen päässä olevat ytimet, joihin on kytkeytynyt ainakin yksi määritettävä ydin.

Homonukleaarista J-resolvoitua menetelmää³⁰ käytetään yleisimmin protonien kanssa, mutta se soveltuu myös muille NMR-aktiivisille ytimille. Mittaus antaa kaksikulotteisessa spektrissä J-kytkennän kytkeytyvän kemiallisen siirtymän mukaan. Kemiallisen siirtymän ja kytkennän taajuuden erottaminen omille akseleilleen auttaa multipllettien, kemiallisten siirtymien ja J-kytkentöjen erottamiseen ilman signaalien päällekkäin menoa. Esimerkiksi protonien kytkennät ovat pieniä, joten spektrialueen ja inkrementtien määrän ei tarvitse olla yhtä suuri kuin heteronukleaarisisä mittauksessa.



Kuva 18: Heteronukleaarinen J-resolvoitu pulssisarja⁸

4. Rakenteen selvittäminen

Yhdisteen rakenteen selvittämiseksi on usein tarpeellista käyttää useampaa eri menetelmää. Näin saadaan luotettavammin muodostettua kuva tutkittavasta yhdisteestä tai tunnetun yhdisteen signaalien kemiallisista siirtymistä, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi stereokemiallisen rakenteen analyysissä.

Tavallisimmin rakennetta tulkitaan COSY-, HSQC- ja HMBC-spektreistä. Näiden avulla kyetään tavallisesti tulkitsemaan pienet ja keskisuuret yhdisteet täydellisesti. Suuremmissa ja monimutkaisemmissa yhdisteissä voidaan käyttää apuna muitakin pulssisarjoja ja kolmiulotteista määrittystä.

4.1 Yksiulotteiset spektrit

Yksiulotteisista protoni- ja hiilispektreistä kyetään selvittämään yhdisteiden kemialliset siirtymät. Toisaalta tarkempia tietoja spektreistä on työlästä selvittää. Näin ollen mittauksen jatkaminen kaksiulotteisilla spektreillä on useimmiten välttämätöntä.

4.2 Kaksiulotteiset spektrit

Kaksiulotteisilla NMR-mittauksilla spektreistä saadaan kerättyä enemmän tietoa. Kaksiulotteisella tarkoitetaan yleensä kahta eri taajuusulottuvuutta spektrissä, sillä kaksiulotteisissa spektreissä on kolmantena ulottuvuutena intensiteetti.

Kaksiulotteisista spektreistä yleisimpiä ovat COSY, HSQC, HMBC, TOCSY ja NOESY. COSY, HSQC, HMBC ja TOCSY näyttävät yhden tai useamman sidoksen yli menevät kytkennät.⁶ NOESY taas näyttää avaruuden yli menevät kytkennät.

4.2.1 COSY

COSY:lla mitataan tavallisimmin kolmen sidoksen yli meneviä protoni-protoni kytkentöjä. COSY kykenee myös erottamaan kahden sidoksen yli menevät protonit, jos protoneilla on riittävän suuri ero kemiallisessa siirtymässä, jotta ne voidaan erottaa toisistaan. Menetelmää voidaan käyttää myös muiden korkean pitoisuuden omaavien ydinten kuin protonien kanssa. Saadut spektrit auttavat selvittämään monimutkaisempien molekyylien rakenteita. Menetelmä soveltuu myös protoni-protoni J-kytkentöjen määrittämiseen.¹⁶

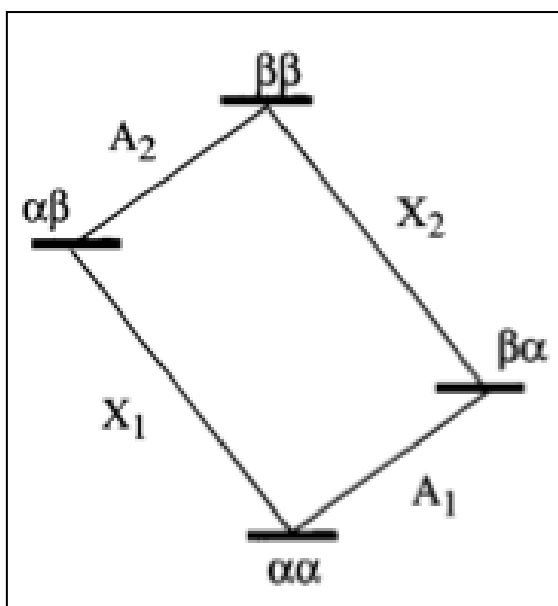
Siirtynyt magnetaatio havaitaan ristikkäisenä signaalina, jolla on eri kemiallinen siirtymä eri akseleilla. Tämä signaali osoittaa suoraan spinien välisen kytkennän. Koska spektri on

symmetrinen, vain spektrin toinen puoli on luettava. Toisaalta osa signaaleista voi erottua paremmin toiselta puolelta, joten koko spektri on hyvä käydä läpi. Kytkeäntöjen selvittämiseksi COSY -spektrin tulkitseminen on monin verroin nopeampaa kuin protonispektrin kytkeäntöjen tulkitseminen. Tästä syystä COSY on tavallisin mitattu kaksiulotteinen spektri.¹⁶

COSY -spektristä ei kyetä yleensä ratkaisemaan koko yhdisteen rakennetta, jos siinä esiintyy protonittomia hiiliatomeita. Tällöin rakenteen selvittämisen apuna on käytettävä esimerkiksi HMBC -menetelmää. Puutteena voidaan pitää myös kykenemättömyyttä erottaa kahden ja kolmen sidoksen kytkeäntöjä toisistaan. Toisaalta tällöin HSQC -spektri tarjoaa tarvittavan tiedon. Kytkeytyvien protonien orientaatiosta riippuen signaali voi jäädä hyvinkin pieneksi, mistä johtuen kytkeäntä ei aina näy spektrissä. Kytkeäntän puuttuminen spektristä ei aina tarkoita kahden tai kolmen sidoksen yli menevän kytkeäntän puuttumista.

Riittävän korkealaatuisessa spektrissä signaaleista voidaan myös lukea multipllettien hienorakenne, joka vastaa yksiulotteisen spektrin hienorakennetta. Hienorakenne on peräisin spinien siirtymätiloista. Toinen pulssi levittää siirtymätilat energiatasokaavion mukaan. Kuvassa 19 lähdeäessä A_1 -tilasta A_2 -tila tuo hienorakenteen diagonaalisignaaliin ja X_1 ja X_2 tilat tuovat ristikkäisen signaalin hienorakenteen. Hienorakenteeseen tarvittava signaali kehittyy sekä evoluutioajan että detektioajan aikana, joten molempien arvot vaikuttavat multipllettirakenteen näkyvyyteen spektrissä.⁸

Spektrialueen ulkopuolelle jääneet signaalit havaitaan peilautuneena spektrialueelle virheellisellä kemiallisella siirtymällä.³¹ Tämä voi olla käytännöllistäkin mittauksen kannalta, sillä sen avulla voidaan pienentää spektrialuetta ja näin ollen lyhentää mittausaikaa. Yleensä peilautuminen koetaan haitallisena, koska signaali havaitaan virheellisellä kemiallisella siirtymällä. Pystydimensiossa tapahtuva peilautuminen voidaan suodattaa tarvittaessa pois käyttäen digitaalisia suodattimia.



Kuva 19: COSY -spektrin energiatasodiagrammi⁸

4.2.2 Heteronukleaariset kytkennät

Heteronukleaarisilla kytkennöillä tarkoitetaan kahden erilaisen atomin välistä sidosten kautta kulkevaa kytkentää, joista toinen ytimistä on tavallisimmin alhaisemmalla pitoisuudella esiintyvä ja toinen hyvin korkealla pitoisuudella. Yleensä nämä ytimet ovat protoni ja hiili. Matala pitoisuus heikentää huomattavasti mittauksen herkkyyttä, mutta käyttämällä korkeammalla pitoisuudella olevaa ydintä saadaan ongelmaa kompensoitua. Nykyisin matalammalla pitoisuudella oleva ydin havaitaan epäsuorasti, kun korkeammalla pitoisuudella olevaa ydintä käytetään sekä magnetaation lähteenä että havaittavana spininä.

Yleisimmät kaksiulotteiset heteronukleaariset kokeet ovat HSQC, HMBC ja HMQC.⁶ HSQC ja HMQC ilmoittavat vain yhden sidoksen kautta kulkevat kytkennät, kun HMBC-menetelmällä saadaan näkyviin myös pidemmät sidokset. HSQC- ja HMQC- spektrit tarjoavat saman tiedon, joten rakennetta selvitetessä vain toinen spektreistä on tarpeellista mitata. Menetelmiä vertailtaessa keskenään HMQC on yksinkertaisempi ja näin vähemmän altis häiriöille, kun HSQC tarjoaa paremman erotuskyvyn ja soveltuu paremmin edelleen muokattavaksi pulssisarjaksi. Korkeampi erotuskyky nostaa HSQC:n käytännöllisemmäksi menetelmäksi varsinkin huonon hajonnan omaavilla molekyyleillä.

4.2.3 HSQC

HSQC:lla määritetään tavallisimmin hiiliin kytkeytyvien protonien siirtymät.⁶ Menetelmä soveltuu myös muiden atomiytimien välisten kytkentöjen määrittämiseen ja J-kytkentöjen laskennalliseen määrittämiseen.

HSQC -pulssisarjaa soveltamalla voidaan mitata myös kauempana olevia NMR- aktiivisia ytimiä. Yleensä ottaen HMBC -pulssisarja on tuolloin huomattavasti tehokkaampi sovellus ja aiheuttaa vähemmän häiriöitä spektreihin.

4.2.4 HMBC

HMBC -mittauksilla pyritään tavallisimmin hakemaan kahden tai useamman sidoksen yli kytkeytyvät ytimet.⁶ Saatavaa tietoa käytetään yleisimmin selvittäessä yhdisteen rakennetta, kun COSY:n avulla saatava tieto ei riitä ratkaisemaan koko yhdisteen rakennetta. HMBC sopii myös hyvin vertailumenetelmäksi COSY:n kanssa suoritettulle mittaussarjalle.

HMBC -spektristä saatavien kytkentöjen intensiteetin avulla ei aina saada erotettua kahden ja kolmen sidoksen päässä olevia ytimiä, koska intensiteetin muutos voi johtua muistakin tekijöistä kuin etäisyydestä. Myöskään kahden ja kolmen sidoksen välisistä kytkennöistä osa ei näy spektreissä. Tähän on syynä ytimien väliset keskiuuret torsioikulmat, jotka aiheuttavat kytkennät hyvin matalilla kytkentävakiolla.⁸ Pieniä kytkentävakioita ei kyetä havaitsemaan perinteisillä menetelmillä.

5. Stereokemiallisen rakenteen selvittäminen

Stereokemiallisen rakenteen selvittäminen voidaan aloittaa, kun yhdiste ja sen kemialliset siirtymät sekä rakenteen riittävä jäykkyys tiedetään. Yhdisteen analysoimiseksi voidaan tämän jälkeen käyttää joko J-kytkentöihin tai Overhauserin efektiin perustuvaa menetelmää tai molempia.

5.1 Rakenteen soveltuvuus ja jäykkyys

Stereokemian rakenteen määrittäminen soveltuu jäykille rakenteille, jotka eivät salli vapaata rotaatiota sidoksen ympäri, sidoskulmien muutoksia tai sidospituuden vaihtelua.¹⁷ Vapaan liikkeen sallivat fluktionaaliset rakenteet liikkuvat mittauksen aikana, eivätkä näin ollen tarjoa luotettavia tuloksia. Tämän seurauksena rakenteen määrittämiseen soveltuvat yhdisteet ovatkin rakenteeltaan tasomaisia, verkkomaisia tai häkkimäisiä.

Häkkimäiset yhdisteet sallivat hyvin vähän hiilien sidosten välistä liikkumista. Kaksoissidokset ja polysyklinen verkottunut rakenne tekevät atomien liikkumisen vaikeaksi. Yksinkertaisin sidoksin sitoutuneet hiilirenkaat sallivat kuitenkin vähän vapaata liikettä. Myös protonit käyttäytyvät häkkimäisessä yhdisteessä melko jäykästi sijoittuen repulsioteorian mukaan edullisimmalla tavoin muihin tilaa vieviin atomeihin. Avoimemmassa tilassa olevat protonit voivat kuitenkin liikkua melko vapaasti.

5.2 NOE rakenneanalyysissä

Rakeneanalyysissä NOE:a käytetään lähes yksinomaan protonien välisten etäisyyksien mittaamiseksi, koska molekyyliä on tavallisesti runsaasti mitattavia protoneita ja koska protoneilta saatava signaali on moninkertainen esimerkiksi hiilen isotooppiin verrattuna.

NOE:a voidaan käyttää cis-trans isomerian tunnistamiseksi, koska isomeereilla on mitattavissa olevia ja poikkeavia atomien välisiä etäisyyksiä. Näin ollen erot kyetään määrittämään intensiteetti-etäisyysuhteen avulla. Rengasrakenteessa ekvatoriaalisten ja aksiaalisten substituuttien tunnistaminen voidaan suorittaa käyttämällä NOE:a. Samoin kuin cis-trans isomeriassa virityksen intensiteetti paljastaa etäisyyden läheisimpiin atomeihin.

Molekyyliä, joissa ei ole vierekkäisiä protoneita voidaan käyttää NOE:a myös rakenteen selvittämiseksi. Viritykset näkyvät kauempanakin kuin kolmen sidoksen päässä.

NOE soveltuu myös molekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen.³² Varsinkin vetysidokset on kohtuullisen helppoa havaita NOE:lla. Myös heikot vuorovaikutukset molekyylin sisällä tai liuottimen kanssa voidaan tunnistaa NOE:lla.

NOE:n sovelluksen avulla voidaan seurata molekyylin kemiallisia muutoksia.¹⁷ Samaa sovellusta käyttäen voidaan myös tutkia molekyylin konformaation muutoksia. Konformaation muutokset näkyvät myös tavallisessa NOE -spektrissä, mikäli muutokset ovat riittävän nopeita.¹⁷ Spektrin tulkitseminen on tosin hyvin vaikeaa, sillä spektrissä näkyy painotettuna molempien rakenteiden konformaatiot. Mikäli toinen rakenne on paljon suotuisampi, havaitaan se paljon vahvempana.

5.2.1 Vakaan tilan NOE

Vakaan tilan NOE-määritykset soveltuvat pienien yhdisteiden määrittämiseen transienttimääritystä paremmin. Toisaalta määrityksiin tulee häiriöitä ympäröivistä spineistä, eikä näin ollen täysin luotettavia kvantitatiivisia tuloksia tavallisimmin saada.

5.2.2 NOESY

Käytännöllisin NOE -sovellus on kaksiulotteinen NOE-spektroskopia (NOESY). Menetelmää on käytetty erityisesti biologisten makromolekyylien kanssa, joilla kytkennät ovat negatiivisia, vahvoja ja kasvavat nopeasti. Pienemmillä molekyyilleillä signaalit ovat heikompia ja nousevat hitaasti. Hyvin pienillä molekyyilleillä kytkennät voivat jäädä jopa havaitsemattoman pieniksi. Yksiulotteisella gradienttiselektiivisellä NOE-mittauksella saadaan näkyviin pienienkin molekyylien kytkennät. Differentiaalimitaukseen verrattuna NOESY on ei-selektiivinen eli se tarjoaa mahdollisuuden havaita kaikki NOE-kytkennät yhdellä mittauksella ja on helppokäyttöinen.¹⁷

NOE-arvoja voidaan käyttää varsinkin protonien etäisyyksien määrittämiseen. Menetelmä on kehitetty makromolekyyilleille, mutta toimii myös pienemmillä molekyyilleillä. NOESY -mittauksessa intensiteetti on suhteessa kuudennen potenssin käänteislukuun.^{32,33} Tämän tiedon avulla voidaan jo tunnettuun etäisyyteen vertaamalla selvittää tuntematon etäisyys. Tarkempia arvoja saadaan, jos mitataan spektri useammilla sekoitusajan arvoilla. Tällöin saadaan lineaariselle kasvualueelle määrättyä kulmakerroin. Kulmakerroin on myös verrannollinen etäisyyden kuudennen potenssin käänteislukuun.^{32,33} Etäisyyden määrittäminen voidaan tehdä myös semikvantitatiivisesti. Tuolloin signaalit lajitellaan intensiteetin

mukaan ja arvioidaan etäisyydet tuon tiedon mukaan.⁸ Tämäkin tarkkuus voi riittää konfiguraation määrittämiseen.

NOESY on käyttökelpoinen keskikokoisten ja pienehköjen molekyylien rakenteen ja konformaation analysoinnissa. Sitä voidaan soveltaa myös monimutkaisiin molekyyliin ja päällekkäin meneviin signaaleihin. NOE-mittauksia voidaan käyttää myös molekyylien väliseen tutkimukseen. Mittauksilla voidaan määrittää kuinka molekyylit ovat suhteessa toisiinsa.³⁴

NOESY:lla voidaan mitata kemiallisia muutosnopeuksia.¹⁷ Muutosnopeuden määrittämiseen on kehitetty EXSY -pulssisarja, mutta käytännössä pulssisarjojen välillä ei ole juurikaan eroa. EXSY:ssä riippuvuus muutosnopeudesta NOESY:n spinien relaksaation sijaan, joka riippuu myös suoraan muutosnopeudesta. Koetta voidaan käyttää sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti. Kvalitatiivisessa analyysissä haetaan kemiallisen muutoksen reittiä ja kvantitatiivisessa analyysissä selvitetään muutoksen nopeutta. Menetelmällä voidaan havaita useampiakin muutoksia samanaikaisesti. Edellytyksenä määrittämiselle on että muutosnopeus on riittävän hidas, jotta se voidaan havaita.

Sekoitusajan sopiva arvo¹⁷ on välttämätön kokeen onnistumiseksi. Arvo riippuu muutosnopeudesta, mutta ennen mittausta sitä ei yleensä tunneta kovinkaan hyvin, joten sekoitusaika joudutaan arvailemaan tai tutkimaan. Kvalitatiivisessa analyysissä arvo tulee valita niin, että saadaan mahdollisimman suuri intensiteetti ja kvantitatiivisessa analyysissä tulee valita arvo lineaariselta kasvualueelta käyttäen yhtä tai useampaa sekoitusaikaa.

5.3 J-kytkentään perustuvat menetelmät

J-kytkentään perustuvissa torsioikulman määrittämenetelmissä apuna on käytettävä Karplus tai Altono-Haasnoot yhtälöä. Tätä ennen on kuitenkin määritettävä J-kytkennät ja käytettävä yhtälöä.

5.3.1 Karplus yhtälö

Karplus yhtälöä on käytetty jo vuosikymmeniä lähinnä kytkentävakioiden selvittämiseksi jo valmiiksi tunnetusta rakenteesta, mutta yhtälöä voidaan käyttää myös toisin päin selvittämään sidoskulmaa määritetyn kytkentävakion perusteella. Tosin tällöin tarkempi rakenteen tuntemus on usein tarpeellista sopivien vakioiden valitsemiseksi kirjallisuudesta,

ja yhtälön moniselitteisen ratkaisun vuoksi. Pienemmillä kulmilla yhtälö voi tarjota vastaukseksi neljä eri ratkaisua ja suuremmillakin sidoskulmilla kaksi eri ratkaisua.

Karplus yhtälön vakioita on tarjolla hyvin eri atomien välisille ja kautta kulkeville kytkennöille. Toisaalta eri yhdisteille ja poikkeaville rakenteille ja sidoskertaluvuille yhtälön ratkaisuja on tarjolla vielä heikosti. Kytkentävakioita rakenteille on määritetty sekä kokeellisesti mittaamalla että laskennallisesti tietokoneavusteisesti.

Karplus yhtälö on esitetty kaavana 4. Yhtälössä J on kytkentävakio, Φ on torsioikulma ja A , B ja C ovat vakioita.⁵

$$J = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C \quad (4)$$

5.3.2 Altona-Haasnoot yhtälö

Altona-Haasnoot yhtälö soveltuu vain kahden protonin ja kolmen sidoksen välisen kytkentävakion määrittämiseen. Se on Karplus yhtälön sovellus, jolla on pyritty huomioimaan protoneja ympäröivien atomien elektronien suojauksen vaikutus laskettavaan kytkentävakioon. Näin on saatu universaali yhtälö, joka soveltuu jäykillä rakenteilla protonien kolmen sidoksen yli olevan kytkentävakion laskemiseen muista ympäröivistä atomeista riippumatta.

Yhtälö on sovitettu Karplus yhtälön pohjalta kokeellisesti kuusirenkaalle eri substituentteja hyödyntämällä, mutta se soveltuu hyvin myös muille jäykillä rakenteille.³³ Yhtälöä ei ole sovitettu muiden kuin vierekkäisissä hiilissä olevien protonien kytkentävakion määrittämiseksi. Näin ollen yhtälön soveltamisala on melko rajattu.

Altona-Haasnoot yhtälö on esitetty kaavana 5. Siinä ${}^3J_{\text{HH}}$ on kytkentävakio, Φ on torsioikulma, λ on elektronegatiivisuusero verrattuna protoniin, ξ_i on substituentin ja hiilirungon välinen välinen torsioikulma (merkitään -1, jos yli 90 astetta, muulloin merkitään +1) ja A , B , C , D , E ja F ovat vakioita.³⁵

$${}^3J_{\text{HH}} = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C + \sum \lambda_i [D + E \cos^2(\xi_i \Phi + F \lambda_i)] \quad (5)$$

5.3.3 J-resolvoitu menetelmä

Kahden atomiytimen välinen J-kytkentä voidaan mitata NMR-spektrometrillä J-resolvoidulla menetelmällä. Heteronukleaarisessa J-resolvoidussa mittauksessa tyypillisin kytkentä on hiilestä yhden, kahden tai kolmen sidoksen yli protoniin. Homonukleaarisessa määrittämisessä mitataan useimmiten protonien välisiä J-kytkentöjä. Menetelmässä ensimmäisessä dimensiossa mitataan kytkentää ja toisessa dimensiossa kemiallista siirtymää. Näin ollen spektrissä näkyvä J-kytkentä kytkeytyneen hiilen kemiallisen siirtymän mukaan.

Homonukleaarisella menetelmällä saadaan määritettyä suoraan esimerkiksi protonien kolmen sidoksen väliset kytkennät, joita voidaan käyttää edelleen torsiokulmien selvittämiseen.³⁶

5.3.4 Yksi- ja kaksiulotteisiin spektreihin perustuvat J-kytkennän määrittämenetelmät

Yksiulotteisesta protonispektristäkin kytetään lukemaan J-kytkennät. Tosin kytkeytyvää protonia on vaikeaa selvittää ja samalla kytkennät menevät usein päällekkäin. J-kytkentä on hajonneen signaalin huippujen välinen etäisyys hertseissä.¹⁶

Kaksiulotteisesta spektristä kytetään määrittämään ytimien välinen J-kytkentä useammallakin menetelmällä. Suhteellisen yksinkertainen menetelmä on korkealaatuisen spektrin yksiulotteinen otos, josta voidaan selvittää hajonneen signaalin huippujen välinen etäisyys samalla tavoin kuin yksiulotteisestakin spektristä.³⁷ Tämä menetelmä toimii esimerkiksi COSY- ja HMBC -spektrissä kolmen sidoksen yli menevää kytkentää selvittäessä.³⁸ Toinen menetelmä on laskea kaksiulotteisen korkealaatuisen spektrin otoksesta hajonneen signaalin reunimmaisten signaalien välinen etäisyys ja vähentää tästä protonispektrissä saman hajonneen signaalin välinen etäisyys. Tällöin saadaan erotuksena J-kytkentä.³⁸

5.4 Stereokemiallinen tutkimus NMR -menetelmillä nykyään

Stereokemiallisia rakenneanalyyskejä on aikaisemmin suoritettu pääasiassa suurille biomolekyyleille NOE-menetelmillä. Toisinaan määrityksissä on käytetty J-kytkentään pohjautuvia menetelmiä. Tekniikan ja menetelmien kehityttyä määrittäminen onnistuu myös pienemmille molekyyleille. Samalla määrittäminen onnistuu nykyään luotettavammin ja tarkemmin.

NOESY ja J-kytkentää hyödyntävä menetelmä toimivat hyvin toistensa vertailumenetelminä. Näillä menetelmillä on määritetty lukuisten yhdisteiden konformaatioita.³⁹ J-kytkentä ollaan määritetty usein myös COSY-sovelluksella tai HMBC-sovelluksella.⁴⁰ Tulevaisuudessa määrittäminen konformaatiolle voidaan jopa onnistua määrittämään automaattisella tulosten käsittelyllä.⁴¹

Kiinteille näytteille suoritettava NMR-tutkimus on kehittynyt viime aikoina nestefaasissa suoritettavaa määrittämistä nopeammin.¹ Näin ollen kiinteän aineen tutkimus voisi tarjota lisätietoa näytteestä. Kiinteässä olomuodossa oleville näytteille voidaan myös tehdä stereokemiallisia määrityksiä käyttäen NMR:ää.

6. Loppupäätelmät

NMR-määrittäyksillä on selkeät fysikaaliset perustat, jotka perusmittauksilla ja valmiilla pulssisarjoilla voidaan jättää huomiotta ja keskittyä vain saatuihin tuloksiin. Menetelmän ymmärtämiseksi ja pulssisarjojen muokkaamiseksi on kuitenkin ymmärrettävä myös menetelmän perusteet.

Stereokemian määrittämiseen perustuvat menetelmät ovat kaikki kokeellisella tasolla, jolla menetelmien tarkempi ymmärtäminen on välttämätöntä. Esimerkiksi kvantitatiivista etäisyysuhdetta ei saada NOE -spektreistä suoraan ja torsiokulmien määrittämiseen vaadittavia J-kytkennät saadaan suoraan vain J-coupled menetelmillä.

Käytettäessä Overhauserin efektiin ja kytkentävakioihin perustuvaa menetelmää yhdessä saadaan melko luotettava arvio yhdisteen orientaatiosta ja jopa kvantitatiivisia arvoja atomien välisistä etäisyyksistä ja niiden välisistä kulmista. Molemmat menetelmät kuitenkin vaativat käyttäjältään erityisosaamista.

7. Pohdinta

Yhdisteen asettamat rajoitukset stereokemialliselle määrittäykselle ovat huomattavia, koska määrittäykset vain täysin jäykille rakenteille ovat luotettavia. Käytännössä tämä rajoittaa tutkittavat rakenteet tasomaisiin, verkkomaisiin ja häkkimäisiin yhdisteisiin.

Menetelmien tarkkuutta ja niiden soveltuvuutta määrittäykseen tulee pohtia tapauskohtaisesti. J-kytkentään perustuva määrittäminen tarjoaa moniselitteisen ratkaisun kulmaa määrittäessä, joten saatua tulosta ei voida suoraan soveltaa tietämättä yhdisteen rakennetta tarkemmin.

Kiinteän aineen NMR -tekniikka on kehittynyt huomattavasti. Määrittäykset kiinteistä aineista voivat antaa tärkeää tietoa nestefaasissa tapahtuvaankin tutkimukseen.

Kokeellinen osa

1. Johdanto

NMR tarjoaa eseempiakin määrittämenetelmiä laajaan stereokemiallisen rakenteen selvittämiseen. Yhdistämällä eri menetelmillä saatavat tulokset voidaan tehdä luotettavia johtopäätöksiä molekyylin kolmiulotteisesta rakenteesta.

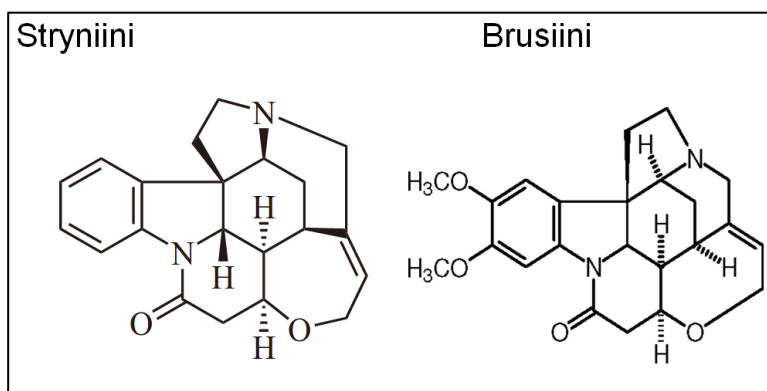
Muista määrittämenetelmistä poiketen NMR-mittaukset suoritetaan yleensä liuotettuna nestefaasiin. Tämän seurauksena määrittäksen yhteydessä voidaan tutkia molekyylin rakennetta liuotimessa, joka poikkeaa osittain kiinteän aineen suoritettusta rakenteesta.

Samoja menetelmiä käyttäen voidaan tutkia myös molekyylin sisäisiä ja molekyylien välisiä vuorovaikutuksia. Menetelmiä voidaan käyttää myös selvittämään molekyylin muutoksia.

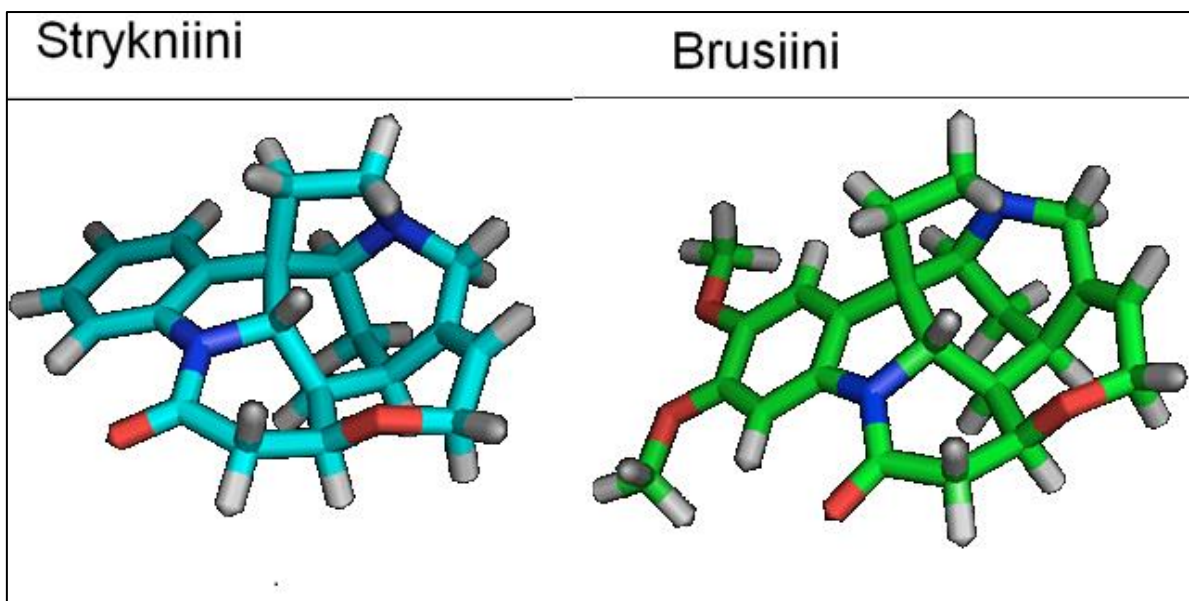
Menetelmien sisältämät rajoitukset vähentävät huomattavasti määrittäykseen soveltuvia yhdisteitä. Määrittettävän molekyylin on oltava ennen kaikkea riittävän jäykkä, jotta sen rakenne voidaan määrittää. Tämä ehto toteutuu aromaattisilla ja häkkimäisillä rakenteilla, mutta usein myös riittävän hyvin rengasrakenteisilla molekyyyleillä.

Toinen huomattava rajoitus on molekyylin symmetria. Merkittävä osa rengasmaisista, häkkimäisistä ja aromaattisista molekyyleistä on symmetrisiä. Tämän seurauksena spektrissä kaikki signaalit kasautuvat päällekkäin, eikä niitä voida erottaa toisistaan. Päällekkäisiä signaaleja esiintyy myös toistensa kaltaisessa asemassa olevilla ryhmillä, jotka asettuvat spektreissä päällekkäin estäen luotettavan kvantitatiivisen määrittäksen. Tässä tapauksessa resoluution parantaminen voi auttaa signaalien erottamisessa.

Määrittäykseen soveltuvien molekyylien joukkoon kuuluvat muun muassa steroidit, rengasrakenteiset aminohapot ja lukuisat myrkyt.



Kuva 1: Stryniinin ja brusiinin rakennekaavat



Kuva 2: Strykniinin ja Brusiinin kolmiulotteinen rakenne

1.1 Työn alue ja tavoite

Tämän työn yhteydessä keskityttiin tarkastelemaan rotanmyrkkyinä tunnettuja strykniiniä ja brusiinia. Yhdisteet ovat rakenteeltaan hyvin lähellä toisiaan. Kuitenkin jo niiden fysikaaliset ominaisuudet poikkeavat merkittävästi toisistaan. Tämän seurauksena yhdisteille oli muun muassa käytettävä eri liuottimia. Yhdisteiden rakenne on esitetty kuvissa 1 ja 2.

Työn tavoitteena oli saada selville mahdollisimman paljon tietoa yhdisteiden rakenteista nestefaasissa käyttäen soveltavia NMR:n pohjautuvia menetelmiä. Määrittäminen käytettiin soveltavaa HMBC:n pohjautuvaa kytkevän kation määrittämistä ja suoraviivaisempaa NOESY:n pohjautuvaa määrittämistä. NOESY:n pohjautuvien määrittämisien signaalien intensiteettien muutosten avulla saatiin laskennallisesti selvitettyä protonien välisiä etäisyyksiä.

Kytkevän kationien avulla pyrittiin määrittämään yhdisteen sisäisiä protonien ja hiilien välisiä torsiokulmia soveltaen valmiita Karplus yhtälöitä. Kun havaittiin Karplus yhtälöiden heikko korrelaatio, pyrittiin kytkevän kationien avulla rakentamaan sovitus Altona-Haasnoot yhtälöstä protonien ja hiilien välille.

Kytkevän kationien, torsiokulmien ja protonien välisten etäisyyksien määrittämiseen käytettiin myös tietokonelaskentaan pohjautuvia GAUSSIAN-menetelmiä. Näin saatiin vertailuarvoja kokeellisille arvoille. Toisena vertailumenetelmänä oli kirjallisuudesta löydetty röntgenkristallografialla määritetyt rakenteet.

2. Teoria

NOESY:n pohjautuva etäisyyden määrittäminen ja kytkeväkertoimien määrittäminen tarjoavat useampiakin rakenteen geometrian selvitysmenetelmiä. Kvantitatiivinen analyysi on välttämätön edellytys luotettavan tiedon hankkimiseksi.

2.1 Kvantitatiivinen mittaaminen

NMR toimii käytännössä kvantitatiivisena määrittämenetelmänä. Useimmiten mittaukset suoritetaan kuitenkin kvalitatiivisena ajan säästämiseksi. Kvantitatiivista mittausta käytetäänkin, kun on tärkeää saada mittauksista tarkkoja absoluuttisia arvoja.

NMR mittauksen aikana ytimet relaksoituvat viritetystä tilasta alkuperäiseen tilaansa kemian mittakaavassa erittäin hitaasti. Tämän ajan optimoimiseksi useamman otoksen sarjoissa täydellistä relaksaatiota ei käytännön mittauksissa ikinä saavuteta. 95 % relaksaatio saavutetaan viisinkertaisella ja 99,7 % relaksaatio kymmenkertaisella relaksaatioajalla normaalimittaukseen nähden.¹² Näin pitkällä relaksaatioajalla menetelmän sisältämät virheet ovat jo poikkeuksetta suurempia kuin ytimien viritystilan aiheuttama virhe.

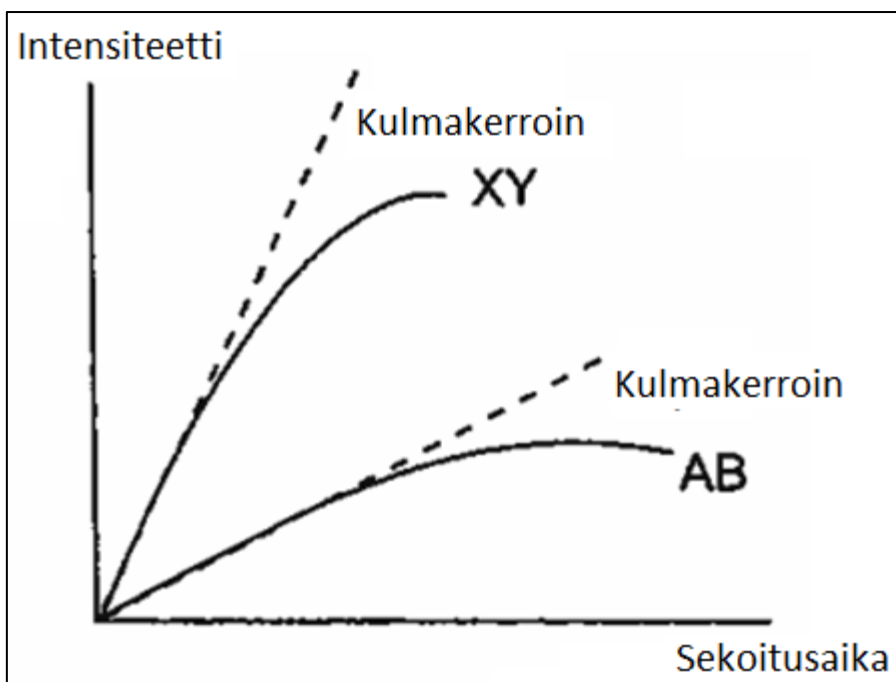
2.2 NOESY ja protonien välisen etäisyyden määrittäminen

NOESY tarjoaa helppokäyttöisen menetelmän atomien välisen etäisyyden määrittämiseksi. NOESY on transienttimittaus, minkä seurauksena viereisten ytimien vaikutus NOE-viritykseen voidaan jättää huomioimatta. Näin ollen virityksen voimakkuus riippuu vain määritettävien ytimien etäisyydestä.

Etäisyyden ja intensiteetin relaation rakentamiseksi on useampiakin menetelmiä. Epätarkimmissa menetelmissä keskitytään silmämääräiseen intensiteetin arviointiin, kun taas tarkemmissa menetelmissä rakennetaan useamman määrittäksen pohjalta matemaattinen riippuvuussuhde. Saadun arvon muuntamiseksi etäisyydeksi on käytettävä yhden sidoksen osalta vertailuarvoa. Vertailuarvoina etäisyydelle voidaan käyttää ab initio-laskuista saatua etäisyyttä.

Etäisyyden ja intensiteetin välinen suhde on esitetty kaavassa 1.⁸ Siinä $\eta_A\{B\}$ on kulmakerroin tutkittavien ytimien A ja B väliselle viritykselle, $\eta_X\{Y\}$ on kulmakerroin vertailtavien ytimien X ja Y väliselle viritykselle, r_{AB} on tutkittavien ytimien A ja B välinen tuntematon etäisyys ja r_{XY} on vertailtavien ytimien X ja Y välinen tunnettu etäisyys.

$$\frac{\eta_A\{B\}}{\eta_X\{Y\}} = \frac{r_{AB}^{-6}}{r_{XY}^{-6}} \quad (1)$$



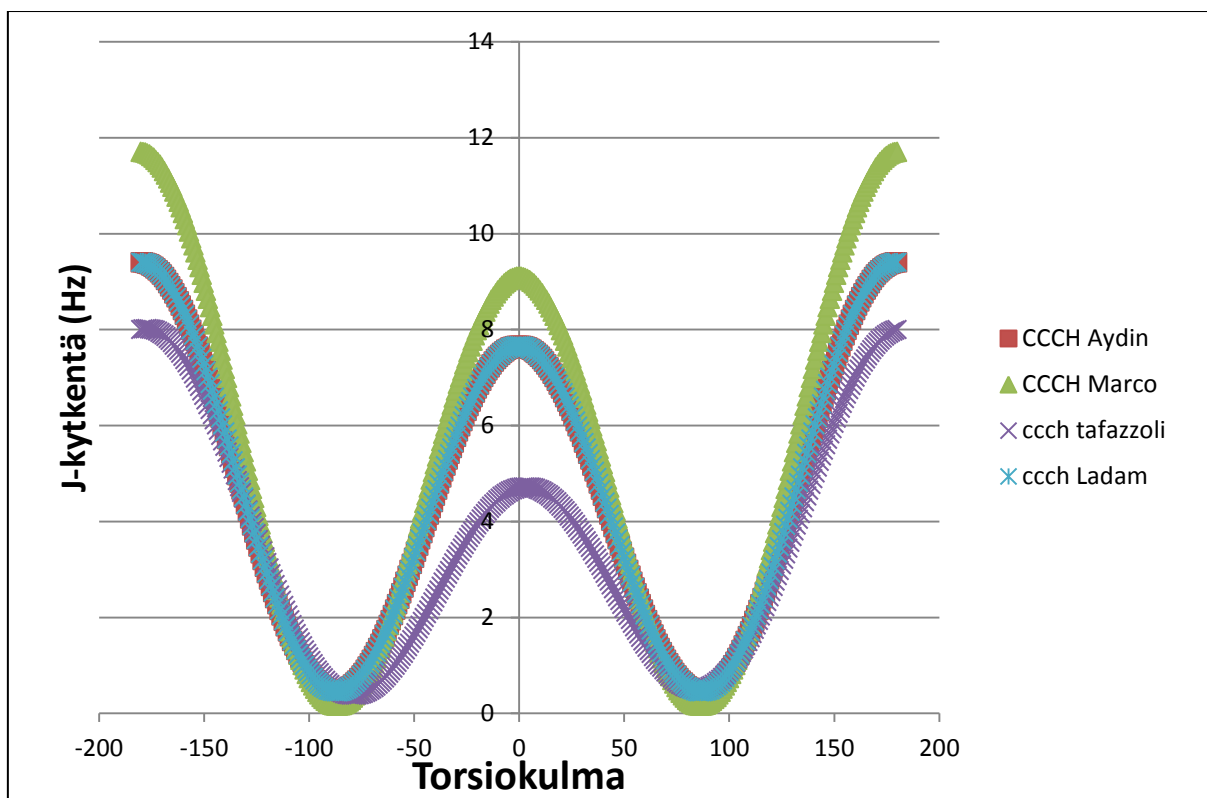
Kuvaaja 1: Kulmakertoimen sovittaminen sekoitusaikaan

NOESY-pulssisarjassa sekoitusajalla on lyhyitä sekoitusaikoja käytettäessä suora vaikutus spektrin signaalien intensiteettiin. Intensiteetin ja etäisyyden ratkaisemiseksi voidaan mitata NOESY-spektrejä kasvattamalla sekoitusajan arvoja, jolloin pienillä sekoitusajoilla signaalien intensiteetti kasvaa suoraan verrannollisesti sekoitusajan pituuteen. Sovittamalla mittauksien intensiteetti ja sekoitus aika kuvaajalle saadaan suora, jonka kulmakerroin antaa tarkan arvon intensiteetin kasvulle. Suoran kulmakerroin voidaan vertailuetäisyyttä käyttämällä saada ratkaistuksi. Tämä on esitetty kuvaajassa 1.⁸

2.3 HMBC ja torsioikulmat

Torsioikulma on kolmen atomin ja neljän sidoksen välisten tasojen muodostama kulma. Tässä työssä vertailuarvot torsioikulmille saatiin GAUSSIAN-määrityksellä optimoiduista rakenteista PYMOL-ohjelman avulla. Kuva 3 esittää torsioikulmaa ja kuva 4 torsioikulmien määrittystä rakenteesta PYMOL-ohjelmalla.

Perusmittauksista tunnetusta HMBC spektristä voidaan määrittää J-kytkennät useammallakin menetelmällä. Tässä työssä käytettiin kokeellista menetelmää, koska haluttiin selvittää kyetäänkö sillä selvittämään pieniä J-kytkentöjä. Tavallisimmin alle kahden hertsin kytkennät jäävät selvittämättä.



Kuvaaja 2: Kirjallisuudessa esitettyjä Karplus yhtälöitä esitettyinä J-kytkennän ja torsiokulman mukaan

2.4 Karplus yhtälö

Karplus yhtälöllä⁴ voidaan laskea torsiokulma tunnetun kytkentävakion avulla. Yhtälö ei kuitenkaan tarjoa yksiselitteistä ratkaisua torsiokulmalle. Kuvaajassa 2 on esitetty kirjallisuudessa esitettyjä Karplus yhtälöitä.^{44,45,46,47}

Vakioita yhtälöön on määritetty sekä kokeellisesti mittaamalla että laskennallisesti tietokoneavusteisesti. Yhtälö on esitetty kaavana 3.⁵ Tafazzolin Karplus sovellus on esitetty kaavana 4.⁴⁷ Kaavassa J on kytkentävakio, Φ on torsiokulma ja A, B ja C ovat vakioita.

$$J = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C \quad (3)$$

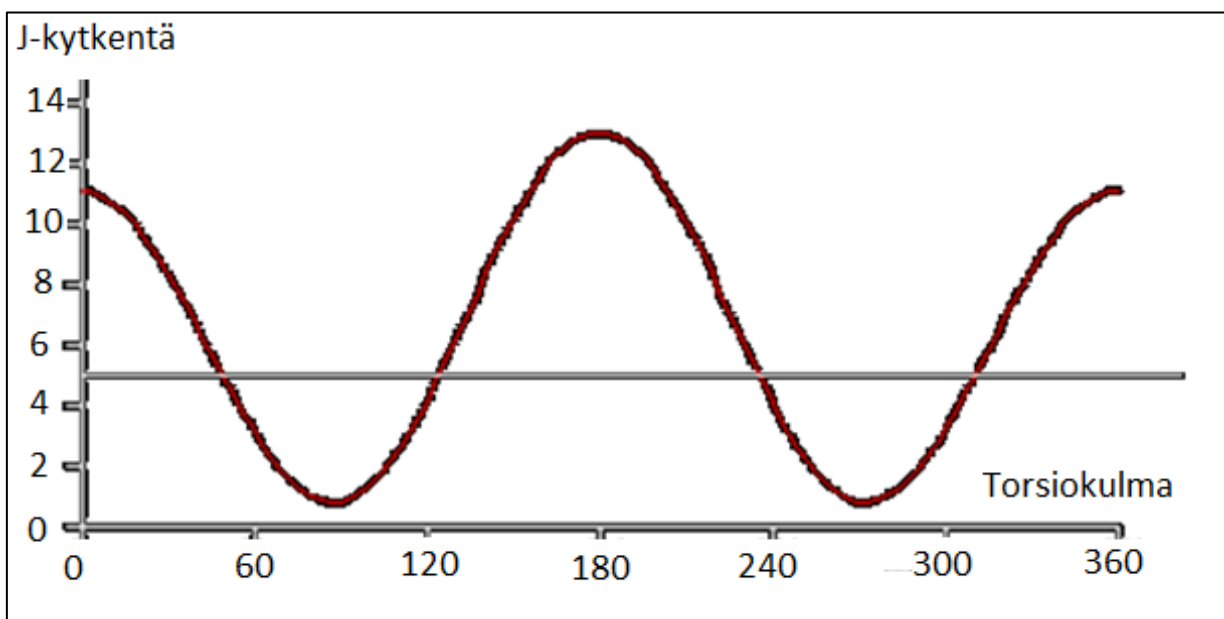
$${}^3J_{\text{CCCH}} = 5.78 \cos^2 \varphi - 1.65 \cos \varphi + 0.32 \sin 2\varphi - 0.031 \sin \varphi + 0.57 \quad (4)$$

2.5 Altona-Haasnoot yhtälö

Altona-Haasnoot yhtälö soveltuu ainoastaan kahden protonin kolmen sidoksen välisen kytkevän vakion määrittämiseen. Se on Karplus yhtälön sovellus, jolla on pyritty huomioimaan protoneja ympäröivien substituenttien elektronien suojausten vaikutus laskettavaan kytkevän vakioon.

Altona-Haasnoot yhtälö³⁵ on esitetty kaavana 5. Siinä $^3J_{HH}$ on kytkevän vakio, Φ on torsiokulma, λ on elektronegatiivisuusero verrattuna protoniin, ξ_i on substituentin ja hiili-rungon välinen välinen torsiokulma (merkitään -1, jos yli 90 astetta, muulloin merkitään +1) ja A, B, C, D, E ja F ovat vakioita. Web-käyttöinen Altona-Haasnoot-sovitin on esitetty kuvaajassa 3.⁴⁸

$$^3J_{HH} = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C + \sum \lambda_i [D + E \cos^2(\xi_i \Phi + F \lambda_i)] \quad (5)$$



Kuvaaja 3: Protonien välinen Altona-Haasnoot yhtälö

3. Menetelmät

Tutkimus suoritettiin soveltavilla NMR-pohjaisilla menetelmillä. Vertailumenetelminä käytettiin GAUSSIAN-menetelmään pohjautuvaa rakenneoptimointia.

Stereokemiallisessa rakenneanalyysissä määritettiin protonien väliset etäisyydet sekä hiilien ja protonien väliset torsiokulmat. Analyysissä protonien väliset etäisyydet määritettiin Overhauserin efektiin pohjautuvalla NOESY-mittauksella. Hiilien ja protonien välisien torsiokulmien määrittämiseen sovellettiin HMBC-määrittämiä, joiden avulla saatiin selvitettyä kytkentävakiot, joita voitiin edelleen käyttää torsiokulmien määrittämiseen.

3.1 Näytteet

Näytteet olivat analyysilaatua. Brusiinista valmistettiin 50 mmol/l ja 10 mmol/l näytteet ja strykniinistä 40 mmol/l ja 10 mmol/l näytteet. Liuottimena brusiinilla oli deuteroitu metanoli ja strykniinillä deuteroitu kloroformi. Strykniinistä tehtiin myös deuteroituun metanoliin liuotettu 5 mmol/l näyte, mutta huonon herkkyyden ja liuottimen signaalien päällekkäisyyksien vuoksi sitä ei käytetty keskeisimpiin mittauksiin.

Vahvemmissa 50 mmol/l ja 40 mmol/l näytteistä tehtiin pohjustavat mittaukset Brukerin 500 MHz spektrometrilla ja HMBC-määrittäykset Brukerin 400 MHz spektrometrilla. Laimeammista 10 mmol/l näytteistä tehtiin NOESY-määrittäykset Brukerin 400 MHz spektrometrilla. Liuottimien ja vahvempien näytteiden pitoisuuksien valinta perustui yhdisteiden liukoisuuksiin.

HMBC määrittäminen vaatii vahvemman näytteen, koska hiili-13:n matalan pitoisuuden johdosta menetelmä on suhteellisen epäherkkä. Overhauserin efektiin pohjautuvat määrittäykset suoritettiin protonien välille, joten ytimien herkkyyden kanssa ei odotettu suurempia häiriöitä. Overhauserin efekti perustuu relaksaatioon ja yhdisteen liikkuvuuteen näytteessä, joten liian vahva näyte voi haitata yhdisteen liikettä ja vääristää arvoja.

3.2 Pohjustavat mittaukset

Bruusiinin ja strykniinin ensimmäisten mittausten aikana selvitettiin bruusiinin ja strykniinin ytimien siirtymät. Kytkentöjen selvittämiseksi mitattiin protoni-, hiili-, COSY-, HMBC- ja HSQC-spektrit. Määritetyt spektrit ja signaalien siirtymät on esitetty

liitteenä.

Rakenteen selvittämisen jälkeen suoritettiin työssä käytettäviä kvantitatiivisia mittauksia ennen kokeellisia mittauksia sisäisten viiveiden optimoimiseksi. NOESY mittauksia varten haettiin sekoitusajat, jolla intensiteetti ja etäisyys vielä kasvoivat suoraan verrannollisesti. HMBC-määrittystä varten haettiin sopivat sisäisen viiveen parametrit.

3.3 Signaalien assignointi

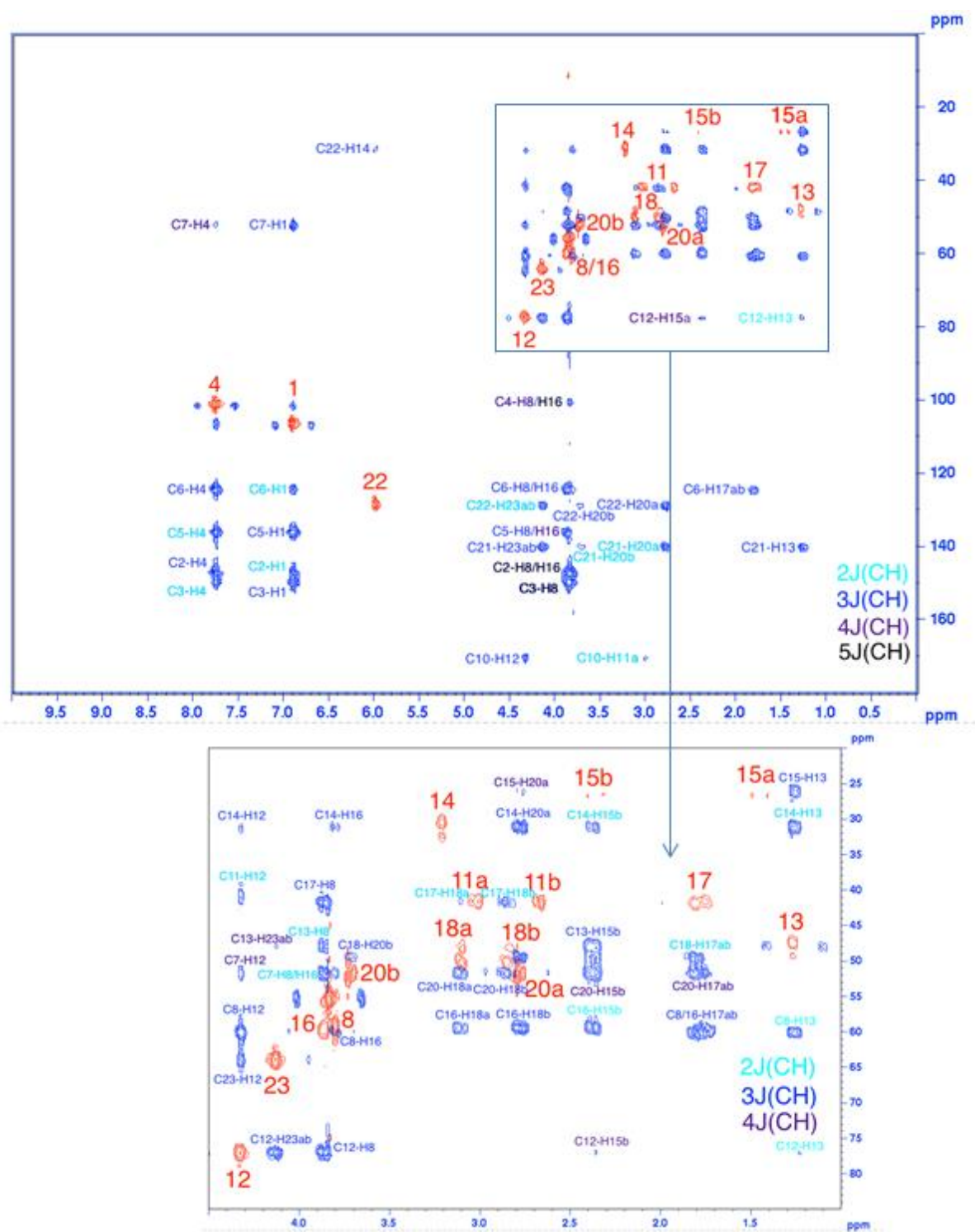
Strykniinin ja brusiinin signaalien assignointi suoritettiin lähinnä COSY-, HMBC- ja HSQC- spektrien avulla. Samalla mitattiin myös protoni-, hiili-13- ja NOESY-spektrit.

Signaalien assignointia ja spektrien lukua vaikeuttivat suurehko rakenne ja lukuisat päällekkäiset signaalit. Kemiallisten siirtymien assignointi on esitetty taulukoituna liitteenä työn lopussa. Kuva viisi esittää assignoitua ja yhdistettyä HSQC- ja HMBC-spektriä, johon on myös merkitty kuinka monen sidoksen yli kytkentä kulkee.

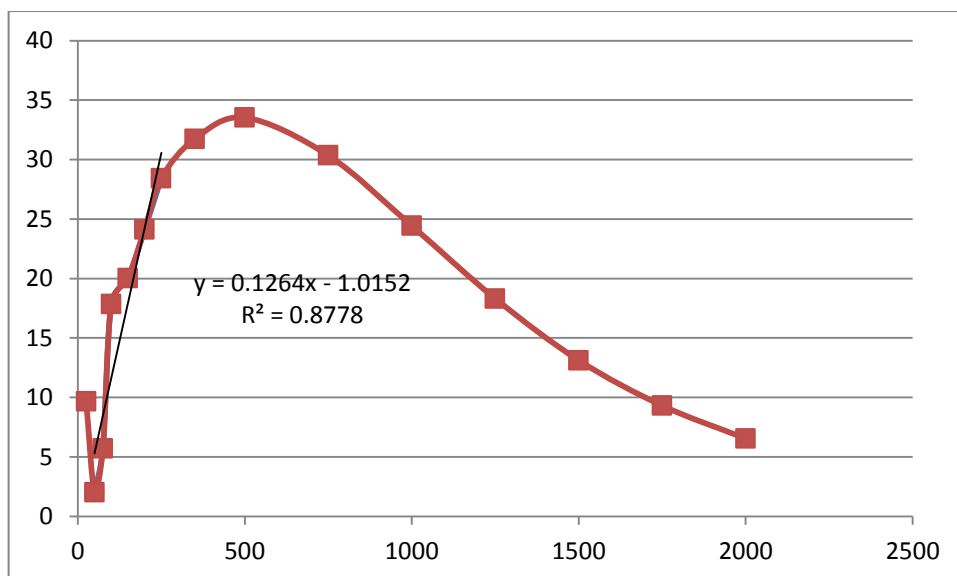
3.4 NOESY ja protonien väliset etäisyydet

Kun ytimien siirtymät tunnettiin, aloitettiin NOESY-mittauksen sekoitusajan lineaarisen alueen hakeminen. Kuvaajassa 4 on esitetty yhdeltä viritykseltä saatu kuvaaja sekoitusajan vaikutuksesta signaalin intensiteettiin ja sekoitusajan lineaarinen alue.

Seuraavaksi määritettiin virityksille lineaarisella alueella intensiteetin ja sekoitusajan välinen kulmakerroin. Eräs kuvaaja kulmakertoimen määrittämiseksi on esitetty kuvaajana 5. Kulmakertoimien avulla saatiin lopulta laskettua etäisyydet käyttämällä erästä tietokonemallinnoksen avulla saatua vertailuetäisyyttä. Taulukossa 1 on esitetty etäisyyden laskeminen vertailuetäisyyden avulla käyttäen hyväksi NOESY-spektreistä laadittua intensiteetin ja sekoitusajan välistä kulmakeroa. Laskussa käytetään apuna teoriaosiossa esitettyä laskukaavaa.



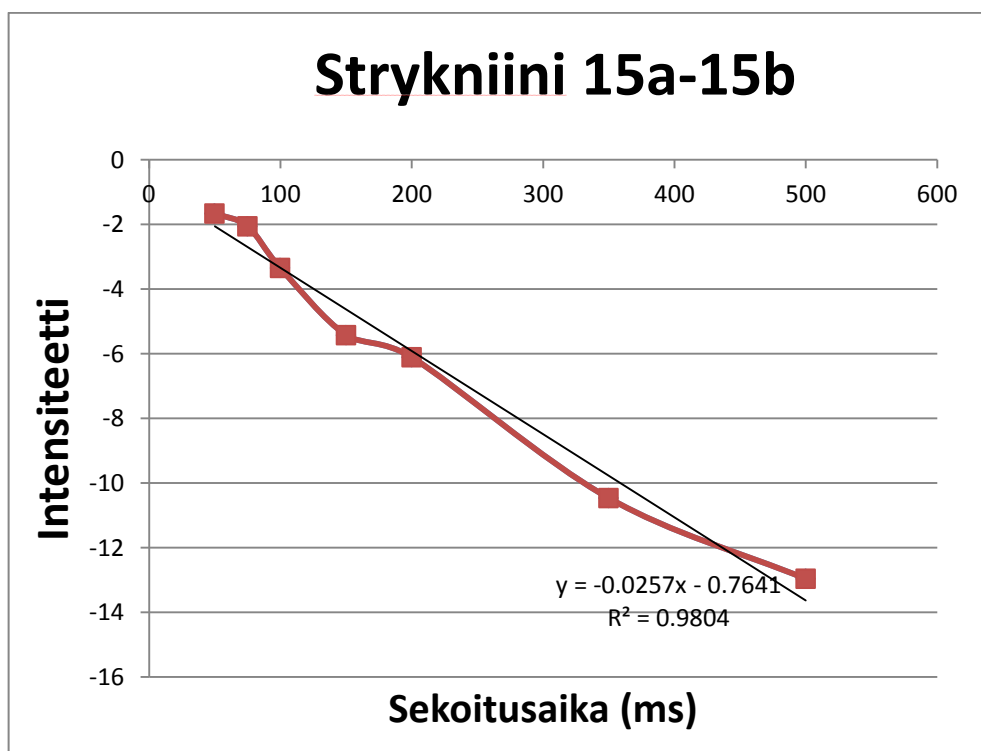
Kuva 5: Brusiinin signaalien assignointi.



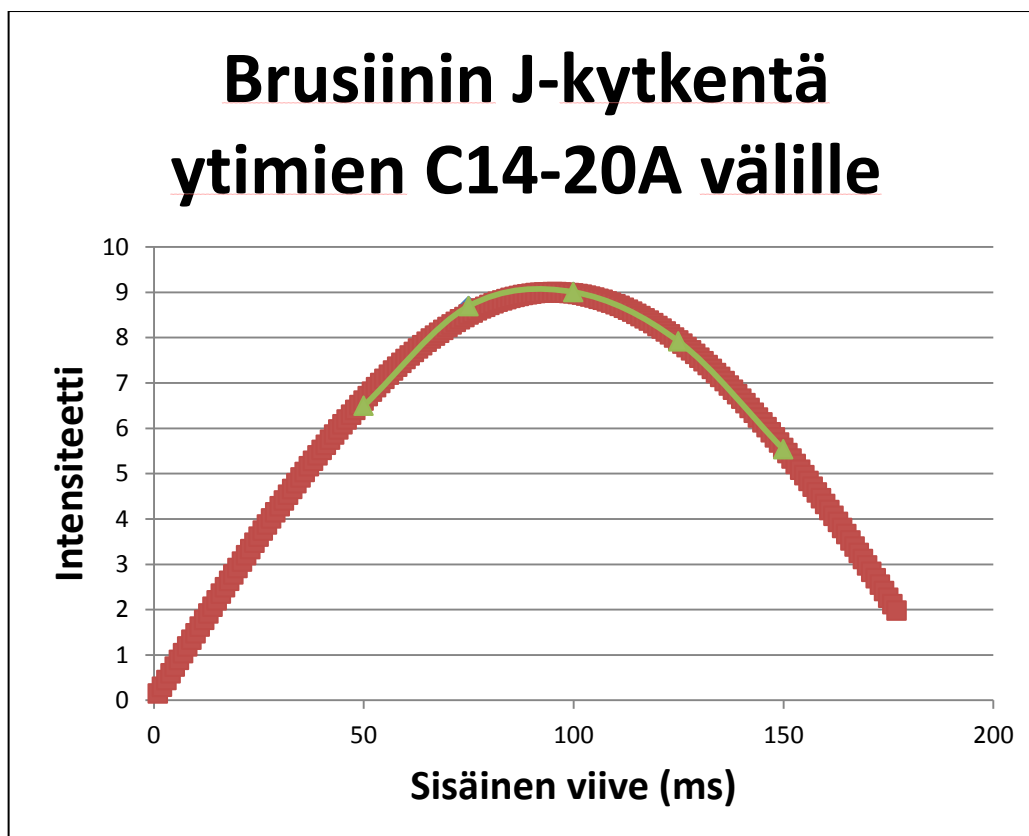
Kuvaaja 4: Brusiinin lineaarinen alue protonien 15a-15b välille

Taulukko 1: Laskut brusiinin etäisyyden laskemiseksi kulmakertoimesta.

	GAUSSIAN	slope	calculated	difference
15-15	1,76	-0,00343	1,76	0,00
14-13	2,41	-0,00051	$=\$E\$5*\text{POWER}(\$F\$5/F6;1/6)$	
15-15	1,76	-0,00413	1,71	0,05



Kuvaaja 5: Kulmakertoimen määrittäminen mittauksista



Kuvaaja 6: Huippuarvon hakeminen ja J-kytkennän ratkaiseminen kuvaajasta

3.5 HMBC-mittaukset ja torsioikulmat

Tässä tutkielmassa käytettiin työn ohjaajan, Sampo Mattilan muokkaamaa HMBC-pulssisarjaa, jossa sisäisiä viiveitä kyettiin muuttamaan helposti parametreja vaihtamalla. HMBC mittauksista haettiin sekoitusaikaa, jolla signaalit saavuttavat huippuarvonsa ensimmäisen kerran. Kun kolmen kytkennän välisten signaalien sopivat sekoitusajat tunnettiin, tehtiin yksi tarkempi määrittäminen. Tästä määrittämisestä selvitettiin J-kytkennät. Eräs määrittämisistä on esitetty kuvaajassa 6. Kuvaajassa näkyy myös tarkan huippuarvon hakemiseen sovitettu sinikäyrä. Kun viive tunnettiin, käytettiin teorisiossa esitettyä laskukaavaa J-kytkennän ratkaisemiseksi.

Torsioikulmien selvittämiseksi käytettiin Karplus yhtälöä ja sovellettua Altona-Haasnoot yhtälöä. Tavallisesti yhtälöitä käytetään kytkentävakioiden määrittämiseen, mutta yhtälöä voidaan käyttää myös toisin päin torsioikulman määrittämiseen. Tosin tällöin vastaus ei ole yksiselitteinen, vaan kytkentävakiolle saadaan kahdesta neljään tulosta. Oikean kulman valitseminen tuloksista vaatii siis rakenteen tarkempaa tuntemusta. Karplus yhtälöiden vakiot haettiin kirjallisuudesta ja samalla kokeiltiin oman Karplus yhtälön laatimista.

3.6 Heteronukleaarisen Altona-Haasnoot yhtälön laatiminen

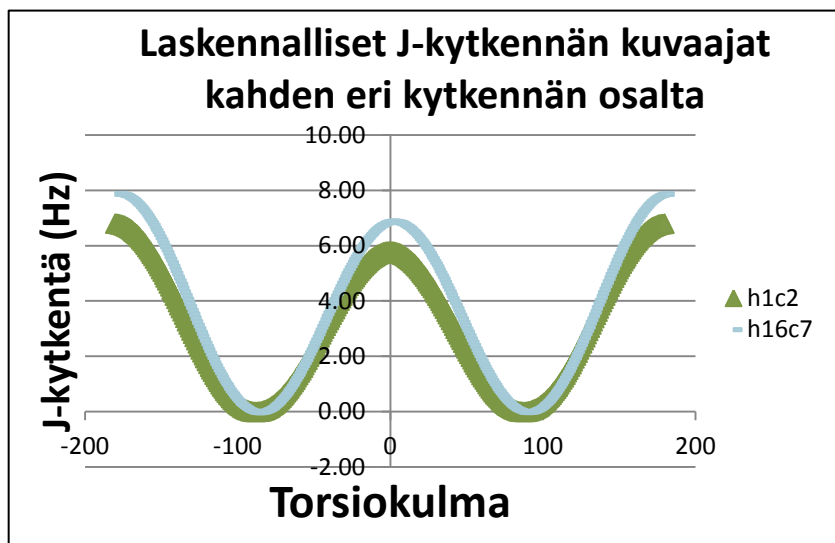
Altona-Haasnoot yhtälö on sovitettu vain protonien väliselle torsioikulmalle. Sama periaate voi toimia myös muidenkin ytimien välillä. Näin ollen uusia kertoimia käyttämällä yhtälö sovitettiin hiilen ja protonin torsioikulman välille. Sovituksessa käytettiin tietokonemallinnoksella saatuja arvoja.

Uusi yhtälö pyrittiin määrittämään soveltaen alkuperäistä Altona-Haasnoot yhtälöä. Uudessa yhtälössä pyrittiin huomioimaan neljännen atomin vaihtuminen protonista hiileksi korjauskertoimilla. Samalla pyrittiin laajentamaan yhtälön sovellusala ottamalla huomioon tutkittavien rakenteiden kaksoissidokselliset ja aromaattiset sidokset. Yhtälö pyrittiin rakentamaan sekä GAUSSIAN-laskelmien kytkennöistä että kokeellisesti määritetyistä kytkennöistä. Kokeellisia kytkentöjä havaittiin kuitenkin olevan liian vähän määrittystä varten.

Jokaiselle kytkennälle saadaan oma yhtälö, sillä elektronegatiivinen ympäristä on erilainen eri kytkennöillä. Kuvaajassa 7 on J-kytkennän kuvaajat kahdelle eri kytkennälle. Kuvaajasta näkyy myös neljä eri torsioikulmaa jokaisella J-kytkennän arvolla, mikä vaikeuttaa myös selvitystä. Tuloksissa käytetyt Altona-Haasnoot yhtälöt on esitetty liitteenä työn lopussa.

Toimivat Altona-Haasnoot yhtälöt saatiin huomioiden kahden ja kolmen hiilen substituenttien vaikutukset. Kahden hiilen substituenttien vaikutukset huomioivassa yhtälössä reunimmainen protoniin kytkeytymätön hiili jätetään alkuperäistä Altona-Haasnoot yhtälöä mukaillen huomioimatta. Kolmen hiilen sovituksessa tuon hiilen substituentit huomioidaan mukaan. Samalla testattiin uutta tekijää yhtälössä, joka huomioi ξ_i -termiä mukaillen substituentin orientaation suhteessa kytkentään. Kytkennässä uloimpana olevan ytimen ja substituentin välinen torsioikulma merkitään α -kulmaksi. Tämä modifioitu Altona-Haasnoot yhtälö on esitetty kaavana 6.

$${}^3J_{HH} = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C + \sum_i [D + E \cos^2(\xi_i \Phi + F \lambda_i + G \cos \alpha * \cos \Phi)] \quad (6)$$



Kuvaaja 7: J-kytkennän arvot torsioikulman mukaan heteronukleaarisella Altona-Haasnoot yhtälöllä kahden eri kytkennän osalta.

3.7 Vertailuarvot ja tietokonemallinnokset

Vertailuarvoina torsioikulmille ja protonien välisille etäisyyksille käytettiin kvanttimekaniikkaan pohjautuvalla GAUSSIAN-tietokonemallinnoksella optimoitua rakennetta sekä kirjallisuudesta löydettyjä röntgenkristallografian avulla määritettyjä rakenteita^{49,50}. Optimointiparametrina GAUSSIAN-ohjelmalla oli 631gs. Samalla menetelmällä määritettiin myös laskennalliset J-kytkennät, joita käytettiin muun muassa Altona-Haasnoot yhtälön laatimisessa. GAUSSIAN-määrittämisellä saadut tutkittavat kulmat ja etäisyydet olivat yhtä suuria sekä brusiinilla metanolissa että strykniinillä kloroformissa.

3.8 Kokeelliset määritykset

Ennen työssä käytettäviä mittauksia suoritettiin sarja kokeellisia määrityksiä, joilla haettiin sopivat parametrit mittauksia varten. Kokeellisissa mittauksissa havaittiin NOESY-spektrin intensiteetin kasvavan suoraan verrannollisesti ytimen etäisyyteen, kun sekoitusaika oli enintään 500 ms. Tuo sekoitusaika sopi hyvin kaikille määritetyille virityksille.

HMBC-mittauksissa havaittu keskimääräinen viive oli 100 ms 500 MHz spektrometrilla. Näin ollen sopiva viiveiden vaihteluväli oli noin 50 -150 ms. Tosin 400 MHz spektrometria käytettäessä viive muuttuu pienemmäksi. Toisaalta mittauksissa havaittiin myös, että määrittäminen voidaan suorittaa isommillakin viiveillä, mutta tuolloin määrittäminen muuttuu monimutkaisemmaksi ja suuremmilla viiveillä intensiteetti pienenee.

4. Tulokset

Tulokset on jaettu useampiin osioihin, koska työssä käytettiin useampia toisistaan poikkeavia menetelmiä ja tulosten aihealueet vaihtelevat kokellisista määritysmenetelmistä kokeellisiin määritystuloksiin. Tuloksissa on esitetty NOESY-mittaukseen pohjautuvat laskennalliset määritykset, HMBC-menetelmän kautta saadut torsioikulmat sekä laskennallisia J-kytkennän arvoja menetelmien tarkkuuden arvioimiseksi.

4.1 NOESY ja protonien väliset etäisyydet

Seuraavassa taulukossa on esitetty määritetyt kokeelliset arvot sekä brusiinin että strykniinin protonien välisille etäisyyksille. Kokeelliset arvot poikkesivat yllättävän paljon laskennallisista arvoista. Näiden poikkeamien syyksi epäillään menetelmän epätarkkuutta sekä yhdisteen ominaisuuksia. Pohdintaa arvoista, niiden tarkkuudesta ja luotettavuudesta on esitetty enemmän pohdinta-luvussa. Vertailuarvona käytettiin brusiinilla protonien 15A-15B ja strykniinillä 3-4 välistä etäisyyttä. Tulokset on esitetty taulukoissa 2 ja 3.

Taulukko 2: NOESY:n avulla määritetyt protonien väliset etäisyydet brusiinille

Ytimet	Kide-rakenne ⁵⁰	GAUSSIAN	Määritetty etäisyys (Å)	Ydin	Kide-rakenne ⁵⁰	GAUSSIAN	Määritetty etäisyys (Å)
1-Ome	2,29	2,32	2,08	17a-1	3,93	2,78	2,75
4-Ome	2,29	2,32	2,24	17b-1	2,64	2,39	1,66
8-13	3,03	3,01	2,14	17a-18a	2,4	2,43	2,01
8-17a	2,28	2,41	2,34	17a-18b	2,67	2,73	1,95
11a-12	2,44	2,35	3,25	17a-8	2,28	2,41	2,39
12-11a	2,44	2,35	2,46	17b-8	3,51	3,61	3,12
12-13	2,31	2,35	2,37	18-18	1,75	1,77	1,09
12-14	2,42	2,73	3,05	18-18	1,75	1,77	1,02
12-23	2,28	2,3	1,63	18b-16	3,8	3,63	2,51
13-14	2,35	2,41	2,46	18b-17b	3,07	3,06	2,87
13-8	3,03	3,01	2,14	18b-20b	2,36	2,45	2,01
14-13	2,35	2,41	2,42	18b-8	2,23	2,37	2,46
14-15a	2,48	2,48	2,84	20a-22	1,97	2,39	2,34
14-23a	2,58	2,6	2,83	20b-15b	2,19	2,24	2,23
15-15	1,78	1,76	1,76	20b-20a	1,77	1,76	1,9
15-15	1,78	1,76	1,71	22-14	3,75	3,86	2,4
15a-16	2,43	2,48	2,96	22-23b	2,25	2,39	2,64
15b-14	2,57	2,55	2,63	23a-14	2,58	2,6	2,48
15b-16	2,36	2,48	2,76	23b-22	2,25	2,39	2,36
15b-20b	2,19	2,24	2,13	Ome-1	2,29	2,32	2,05
16-15a	2,43	2,48	2,58	Ome-4	2,29	2,32	2,28

Taulukko 3: NOESY:n avulla määritetyt protonien väliset etäisyydet strykniinille

Ytimet	Kiderakenne ⁴⁹	GAUSSIAN	Kokeelliset arvot (Å)	Ytimet	Kiderakenne ⁴⁹	GAUSSIAN	Kokeelliset arvot (Å)
1-16	2,51	2,38	2,20	14-15a	2,57	2,55	2,56
1-17a	2,64	2,78	2,67	14-15b	2,48	2,48	2,20
3-4	2,48	2,49	---	14-23a	2,58	2,60	2,58
8-11b	2,73	2,67	2,77	15a-15b	1,78	1,76	1,76
8-13	3,03	3,01	2,34	15b-20b	2,19	2,24	2,52
8-17a	2,28	2,41	2,95	15a-16	2,43	2,48	2,31
8-18b	2,23	2,38	2,04	16-17a	2,95	2,71	2,72
11a-11b	1,81	1,76	1,76	17a-18b	2,47	2,43	2,27
11a-12	2,44	2,35	2,10	18a-18b	1,75	1,77	1,72
12-13	2,31	2,35	2,31	18a-20b	2,36	2,46	3,18
12-23a	2,28	2,29	1,74	20a-20b	1,77	1,76	2,01
13-14	2,35	2,41	2,30	20a-22	2,36	2,39	2,43
13-15a	2,27	2,26	2,07	22-23b	2,25	2,39	2,42

4.2 J-kytkennät ja torsioikulmien määrittäminen

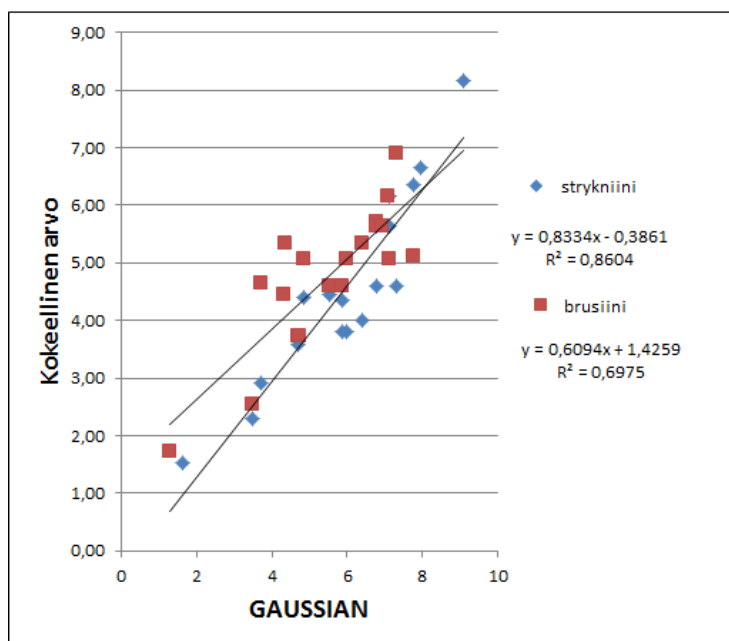
Strykniinille ja brusiinille määritettiin kokeellisista J-kytkennöistä torsioikulmat sekä Karplus että kokeellisen Altona-Haasnoot yhtälön avulla. Karplus yhtälöstä ei saatu määritettyä kaikkien kulmien arvoja, koska yhtälöt eivät leikanneet kaikkia määritettyjä J-kytkennän arvoja. J-kytkentöjä saatiin selvitettyä HMBC-spektreistä vähän verrattuna rakenteessa olleisiin kytkentöihin. Tähän oli syynä lähinnä päällekkäin asettuvat signaalit ja heteronukleaarisen määrittämisen epäherkkyys.

Työn alkuvaiheessa keskityttiin torsioikulmien määrittämiseen Karplus yhtälöiden avulla, mutta työssä havaitun heikon korrelaation seurauksena jouduttiin laatimaan kokeellinen Altona-Haasnoot yhtälö. Uudella yhtälöllä saatiin huomattavasti parempi korrelaatio määritettyjen arvojen välille. Lisää analyysiä tuloksista ja niihin vaikuttavista asioista on esitetty pohdinta-osiossa.

Taulukossa 3 ja kuvaajassa 8 on kokeellisesti määritetyt J-kytkennät. Torsioikulmat laskettiin Karplus yhtälöitä käyttäen ja uudella Altona-Haasnoot sovituksella. Karplus yhtälöillä saadut torsioikulmat on esitetty taulukossa 4 ja kuvaajassa 9. Työn yhteydessä laaditun kokeellisen Karplus yhtälön vakiot vastasivat Ladamin esittämiä vakioita. Torsioikulmien laskemisessa käytettiin alkuperäistä Altona-Haasnoot yhtälöä, johon oli laadittu määrittämiseen sopivat vakiot. Nämä tulokset on esitetty taulukossa 5 ja kuvaajassa 10. Muita Altona-Haasnoot yhtälön sovituksia on esitetty seuraavassa kappaleessa.

Taulukko 3: Strykniinin ja brusiinin kokeelliset J-kytkennän arvot sekä GAUSSIAN-menetelmällä saadut arvot

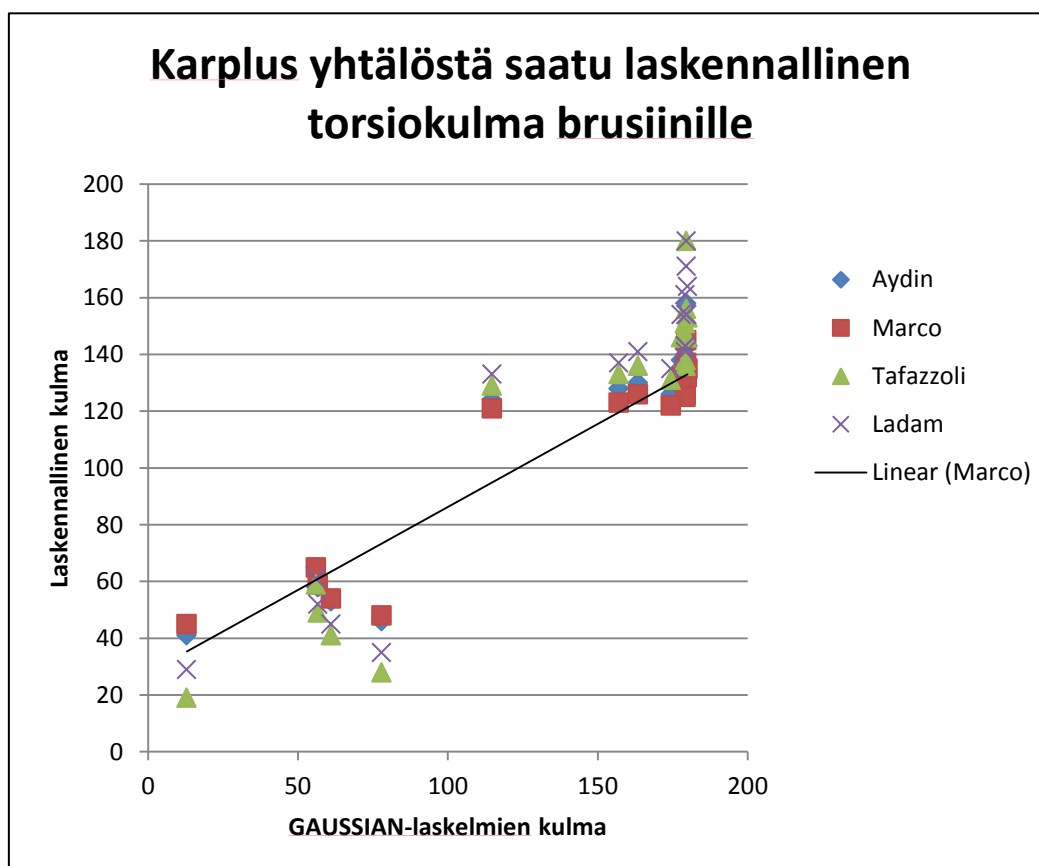
KytKentä	GAUSSIAN	Strykniini	Brusiini
C1-H3	7,96	6,67	
C2-H4	6,79	5,63	5,71
C3-H1	6,78	4,60	5,63
C4-H2	7,13	6,15	
C5-H1	7,32	4,60	6,90
C5-H3	9,08	8,16	
C6-H2	7,11	5,63	
C6-H4	4,86	4,40	5,06
C7-H15B	6,92		5,63
C7-H18A	4,32		4,44
C8-H12	5,55	4,44	4,60
C8-H16	6,39	4,00	5,33
C8-H17B	4,34		5,33
C10-H12	1,28		1,73
C12-H14	1,63	1,53	
C14-H16	5,98		5,06
C15-H13	3,5	2,29	2,55
C16-H14	5,98	3,81	
C16-H17B	5,87	3,81	
C17-H8	5,86	4,35	4,60
C21-H13	7,08	5,63	6,15
C21-H23A	3,71	2,92	4,65
C21-H23B	7,75	6,35	5,13
C22-H20A	4,69	3,57	3,74
C22-H20B	4,72		3,74



Kuvaaja 8: Strykniinin ja brusiinin kokeelliset arvot suhteessa GAUSSIAN-menetelmällä määritettyihin arvoihin

Taulukko 4: Strykniinille Karplus yhtälöstä määritetyt torsiokulmat

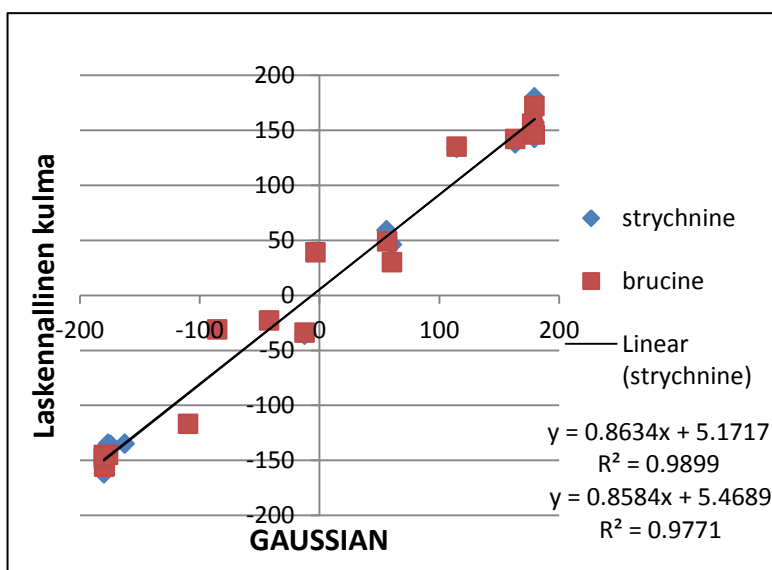
Kytkentä	ab initio	Aydin ⁴⁵	Marco ⁴⁶	Tafazzoli ⁴⁷	Ladam ⁴⁶
C1-H3	179,61	145	137	156	171
C2-H4	179,43	138	132	146	154
C3-H1	179,30	132	126	138	143
C4-H2	179,16	142	135	151	161
C5-H1	179,32	132	126	138	143
C5-H3	179,59	158	145	180	180
C6-H2	179,74	138	132	146	154
C6-H4	179,32	130	125	136	141
C8-H12	163,40	130	126	136	141
C8-H16	157,08	128	123	133	137
C12-H14	56,01	65	65	59	61
C15-H13	56,69	58	59	49	52
C16-H14	174,42	126	122	131	135
C16-H17B	77,89	46	48	28	35
C17-H8	12,91	41	45	19	29
C21-H13	177,87	138	132	146	154
C21-H23A	61,02	53	54	41	45
C21-H23B	179,95	143	135	153	164
C22-H20B	114,74	124	121	129	133



Kuvaaja 9: Karplus yhtälöllä määritetyt torsiokulmat verrattuna GAUSSIAN-menetelmällä määritettyihin kulmiin

Taulukko 5: Kahden hiilen Altona-Haasnoot yhtälön avulla määritetyt kulmat asteina käyttäen Altona-Haasnoot yhtälöä

	GAUSSIAN	Kiderakenne ^{49,50}	Kokeellinen strykniini	Kokeellinen brusiini
C1-H3	179,61	179,91	172	
C2-H4	-179,61	-179,21	-155	-156
C3-H1	-179,13	-179,32	-145	-155
C4-H2	-179,90	179,91	-162	
C5-H1	179,57	178,04	143	172
C5-H3	179,59	-179,21	180	
C6-H2	-179,74	-179,32	-155	
C6-H4	-179,93	177,91	-140	-145
C7-H15B	178,45	-175,58		151
C7-H18A	-85,25	-80,30		-31
C8-H12	163,50	173,12	138	142
C8-H16	-176,30	147,02	-135	-145
C8-H17B	-42,06	-36,15		-23
C10-H12	-109,51	-106,22		-117
C12-H14	56,08	52,37	59	
C14-H16	-179,68	-175,02		-146
C15-H13	56,74	60,05	52,00	49
C16-H14	-174,35	-172,63	-136	
C16-H17B	-162,60	-160,77	-135	
C17-H8	-12,36	-16,85	-36	-34
C21-H13	177,89	177,05	151	156
C21-H23A	60,65	56,68	46	30
C21-H23B	179,90	-179,27	157	146
C22-H20A	114,80	110,85	134	135
C22-H20B	-3,18	-2,73		39

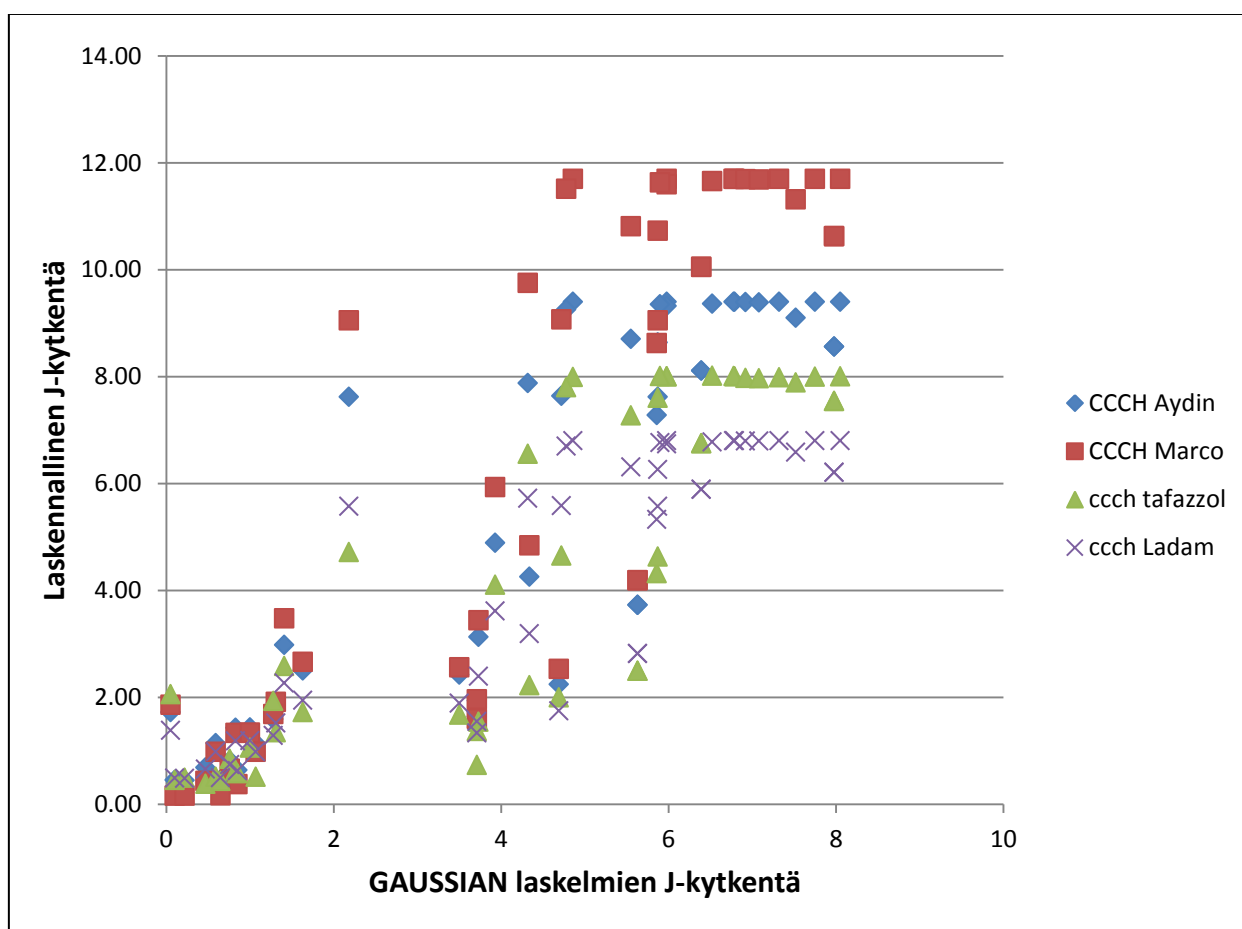


Kuvaaja 10: Altona-Haasnoot yhtälöllä kokeellisesti määritetyt arvot sovitettuna laskennallisiin arvoihin

4.3 Menetelmien vertailu ja kokeellisia yhtälöitä

Strykniinille ja brusiinille pyrittiin alun perin sovittamaan rakenne suoraan Karplus yhtälön avulla J-kytkennöistä. Näin ei kuitenkaan voitu menetellä, koska arvot eivät vastanneet riittävästi GAUSSIAN menetelmällä saatuja arvoja. Sovitus tästä on esitetty kuvaajassa 11 ja arvot taulukossa 6.

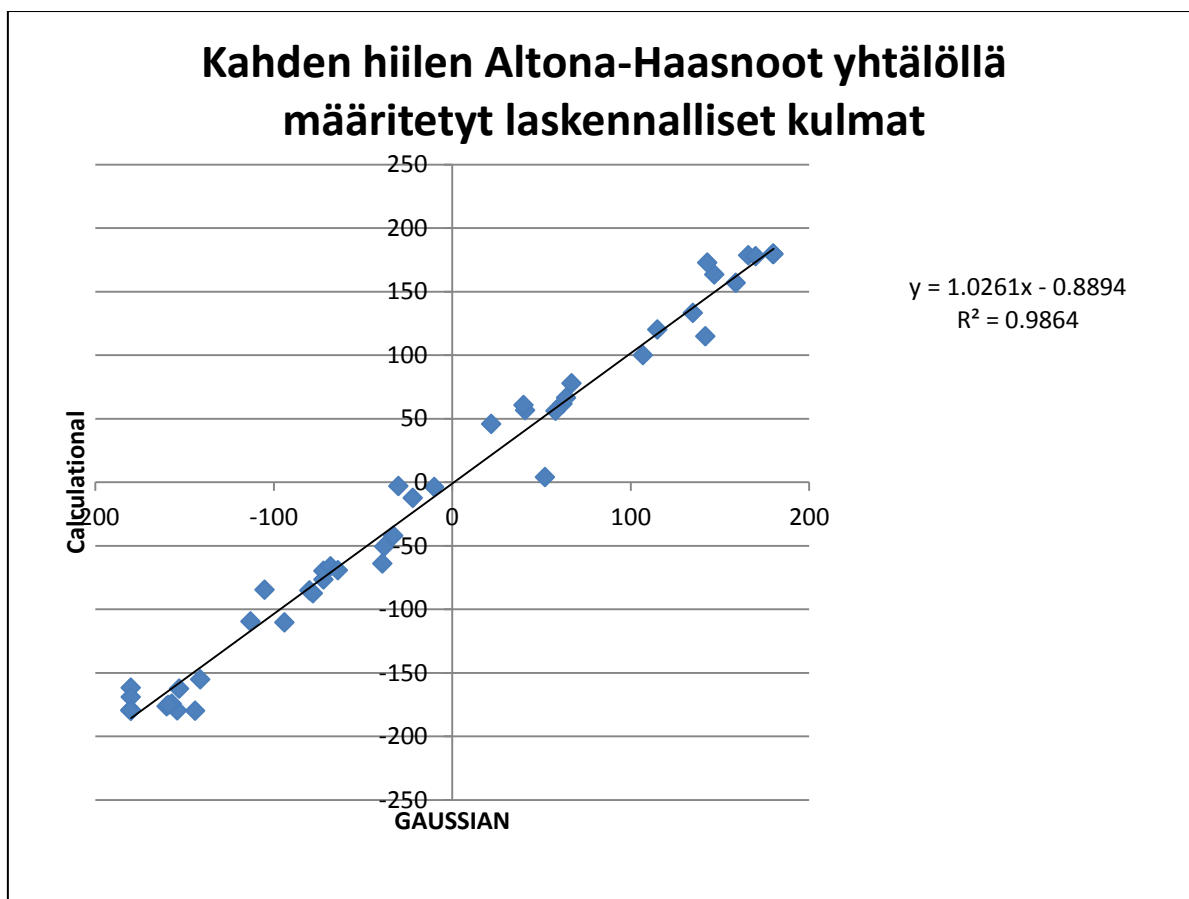
Uusilla Altona-Haasnoot yhtälöillä laskettuja arvoja on taulukossa 8 ja kuvaajissa 12 ja 13. Altona-Haasnoot yhtälöiden vakiot on esitetty taulukossa 7. Työn yhteydessä pyrittiin myös määrittämään vakioita kompensoimaan kaksoissidoksia ja bentseenirenkaita sekä hiilikohtaisia kertoimia substituenteille. Tämä ei kuitenkaan onnistunut, vaan saadut arvot vaihtelivat satunnaisesti ja tarjosivat heikon korrelaation GAUSSIAN-arvojen kanssa. Todennäköisesti käytetty menetelmä ei kykene ottamaan huomioon riittävän montaa muuttujaa kerrallaan.



Kuvaaja 11: GAUSSIAN-laskelmista suoraan saadut J-kytkennän arvot sekä optimoidun rakenteen torsiokulmista Karplus yhtälöllä määritetyt J-kytkennät

Taulukko 6: Laskennalliset kytkentävakioiden arvot strykniinille Karplus yhtälöillä

Kytkeä	Torsiokulmat optimoidusta rakenteesta	Ab initio-arvot	Aydin ⁴⁴	Marco ⁴⁵	tafazzoli ⁴⁷	ladam ⁴⁶
C1-H3	179,61	7,96	9,40	11,70	8,00	9,40
C2-H4	-179,43	6,79	9,40	11,70	8,01	9,40
C3-H1	-179,30	6,78	9,40	11,70	8,01	9,40
C4-H2	-179,9	7,13	9,40	11,70	8,00	9,40
C5-H1	179,16	7,32	9,40	11,70	7,99	9,40
C5-H3	179,59	9,08	9,40	11,70	7,99	9,40
C6-H2	-179,74	7,11	9,40	11,70	8,00	9,40
C6-H4	179,32	4,86	9,40	11,70	7,99	9,40
C7-H1	4,16	2,18	7,62	9,05	4,72	7,62
C7-H13	-76,83	0,47	0,69	0,43	0,38	0,69
C7-H15A	178,41	1,31	9,39	11,69	7,98	9,39
C7-H15B	61,42	6,92	1,90	1,91	1,35	1,90
C7-H18A	154,98	4,32	7,88	9,75	6,55	7,88
C7-H18B	-85,45	0,1	0,45	0,16	0,46	0,45
C8-H12	163,40	5,55	8,71	10,81	7,28	8,71
C8-H14	-176,27	6,52	9,36	11,65	8,02	9,36
C8-H16	157,08	6,39	8,11	10,05	6,75	8,11
C8-H17A	-42,16	7,98	4,25	4,84	2,23	4,25
C8-H17B	-161,66	4,34	8,56	10,62	7,54	8,56
C10-H12	-108,85	1,28	1,59	1,68	1,93	1,59
C11-H13	-69,63	0,59	1,14	0,98	0,52	1,14
C12-H8	46,18	5,63	3,73	4,19	2,50	3,73
C12-H14	56,01	1,63	2,50	2,66	1,72	2,50
C13-H11A	133,52	0,05	4,89	5,93	4,10	4,89
C13-H11B	-110,15	3,93	1,73	1,86	2,06	1,73
C13-H15A	-169,16	7,52	9,10	11,32	7,89	9,10
C13-H15B	-50,86	3,73	3,13	3,44	1,54	3,13
C14-H8	-87,07	0,22	0,45	0,16	0,50	0,45
C14-H12	-66,22	0,83	1,43	1,33	0,64	1,43
C14-H16	-179,84	5,98	9,40	11,70	8,00	9,40
C14-H20A	172,44	1,07	9,25	11,51	7,80	9,25
C14-H20B	-69,67	4,78	1,14	0,98	0,51	1,14
C14-H22	-179,35	8,05	9,40	11,70	8,01	9,40
C15-H13	56,69	3,5	2,42	2,56	1,67	2,42
C16-H8	99,17	0,76	0,81	0,67	0,85	0,81
C16-H14	-174,42	5,98	9,32	11,60	8,00	9,32
C16-H17A	-162,62	0,85	8,64	10,73	7,60	8,64
C16-H17B	77,89	5,87	0,64	0,38	0,58	0,64
C17-H8	-12,91	5,86	7,28	8,62	4,32	7,28
C17-H16	-84,50	0,65	0,46	0,17	0,43	0,46
C20-H14	120,44	1,41	2,98	3,48	2,58	2,98
C20-H22	-4,13	5,87	7,62	9,05	4,63	7,62
C21-H13	177,87	7,08	9,39	11,69	7,97	9,39
C21-H15A	66,14	5,9	1,44	1,34	1,06	1,44
C21-H15B	-175,56	1	9,35	11,63	8,01	9,35
C21-H23A	61,02	3,71	1,94	1,96	1,37	1,94
C21-H23B	-179,95	7,75	9,40	11,70	8,00	9,40
C22-H14	-63,95	3,71	1,64	1,60	0,74	1,64
C22-H20A	114,74	4,69	2,25	2,53	2,00	2,25
C22-H20B	-3,14	4,72	7,64	9,07	4,65	7,64



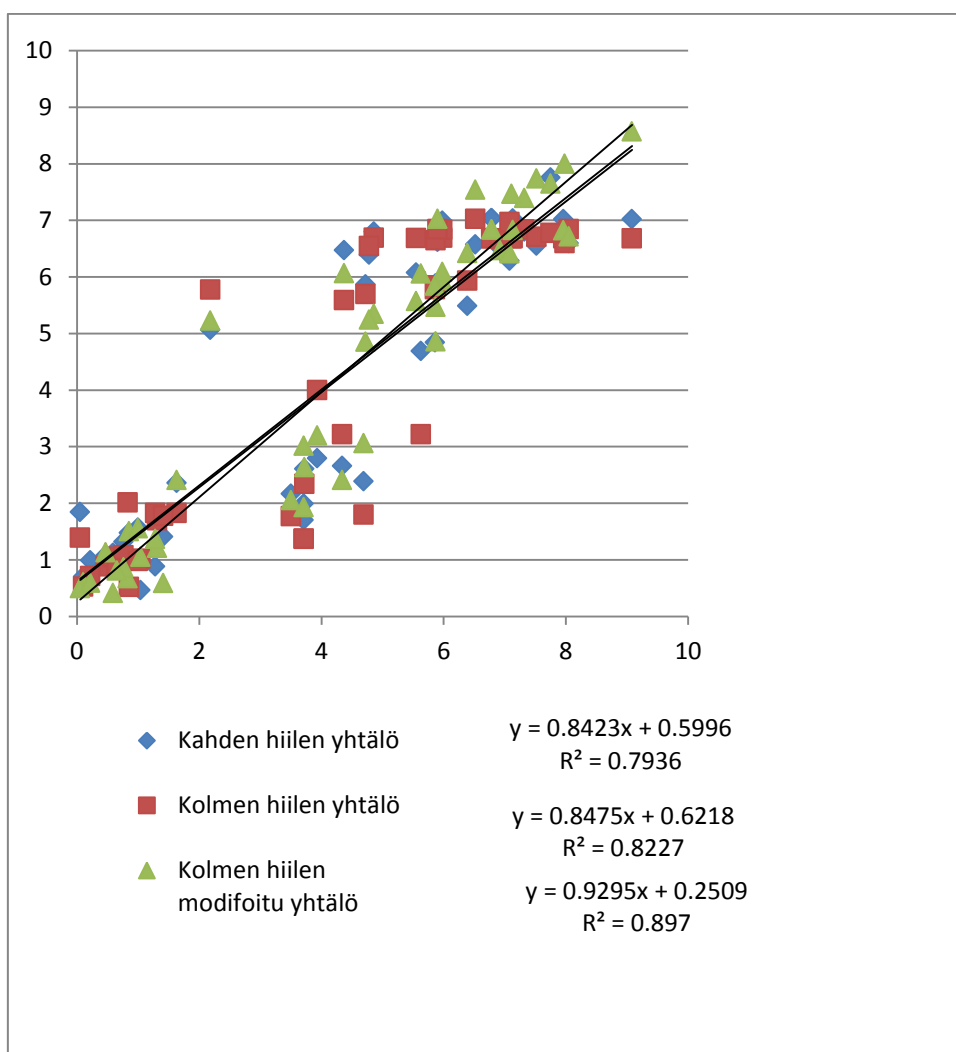
Kuvaaja 12: Uuden Altona-Haasnoot yhtälön laskennallisten torsiokulmien korrelaatio suoraan GAUSSIAN menetelmällä saatuihin torsiokulmiin verrattuna

Taulukko 7: Eri heteronukleaarisen Altona-Haasnoot yhtälön sovitusten vakiot ja arvoilla saatu keskihajonta ja korrelaatio suhteessa Gaussian-määrittelyssä saatuihin arvoihin

Kahden hiilen		Kolmen hiilen		Kolmen hiilen modifioitu	
A	6,02	A	6,84	A	8,78
B	-0,500	B	-0,627	B	-0,402
C	0	C	0	C	0
D	0,664	D	-1,56	D	-1,43
E	-1,66	E	0,880	E	0,820
F	-0,00680	F	0,828	F	0,614
Keskihajonta	76	Keskihajonta	64	G	2,27
Korrelaatio	0,89	Korrelaatio	0,91	Keskihajonta	38
				Korrelaatio	0,95

Taulukko 8: Kokeellisilla Altona-Haasnoot yhtälöillä GAUSSIAN-laskelmien torsioikulmista määritetyt J-kytkennät

Kytkenä	GAUSSIAN	Kahden hiilen yhtälö	Kolmen hiilen yhtälö	Kolmen hiilen modifioitu yhtälö	Kytkenä	GAUSSIAN	Kahden hiilen yhtälö	Kolmen hiilen yhtälö	Kolmen hiilen modifioitu yhtälö
C1-H3	7,96	7,02	6,68	6,82	C13-H15A	3,72	2,61	2,34	2,63
C2-H4	6,79	7,03	6,68	6,83	C13-H15B	7,52	6,55	6,71	7,74
C3-H1	6,78	7,04	6,69	6,84	C14-H8	0,22	0,99	0,71	0,59
C4-H2	7,13	7,03	6,68	6,83	C14-H12	0,83	0,92	2,01	0,67
C5-H1	7,32	6,80	6,84	7,39	C14-H16	5,98	6,81	6,69	5,94
C5-H3	9,08	7,02	6,68	8,57	C14-H20A	1,04	0,46	1,02	1,05
C6-H2	7,11	6,81	6,68	7,47	C14-H20B	4,78	6,39	6,54	5,24
C6-H4	4,86	6,80	6,69	5,35	C14-H22	8,05	6,60	6,85	6,72
C7-H1	2,18	5,07	5,78	5,23	C15-H13	3,5	2,17	1,77	2,06
C7-H13	0,47	1,07	0,88	1,13	C16-H8	0,76	1,32	1,08	0,87
C7-H15A	1,31	1,70	1,70	1,21	C16-H14	5,98	6,99	6,83	6,09
C7-H15B	6,92	6,52	6,68	6,47	C16-H17A	0,85	1,48	0,52	1,50
C7-H18A	0,1	0,70	0,53	0,60	C16-H17B	5,87	6,73	6,65	5,47
C7-H18B	4,37	6,47	5,59	6,07	C17-H8	5,86	4,84	5,78	5,85
C8-H12	5,55	6,08	6,69	5,57	C17-H16	0,65	0,98	0,85	0,81
C8-H14	6,52	6,58	7,03	7,54	C20-H14	1,41	1,41	1,77	0,59
C8-H16	6,39	5,49	5,94	6,42	C20-H22	5,87	5,88	5,85	4,86
C8-H17A	7,98	6,71	6,60	8,00	C21-H13	7,08	6,29	6,97	6,42
C8-H17B	4,34	2,66	3,22	2,41	C21-H15A	5,9	6,62	6,84	7,03
C10-H12	1,28	0,88	1,83	1,37	C21-H15B	1	1,57	0,98	1,55
C11-H13	0,59	1,12	1,05	0,41	C21-H23A	3,71	1,99	1,37	3,02
C12-H8	5,63	4,69	3,22	6,06	C21-H23B	7,75	7,76	6,78	7,65
C12-H14	1,63	2,36	1,83	2,41	C22-H14	3,71	1,71	1,37	1,93
C13-H11A	0,05	1,84	1,39	0,50	C22-H20A	4,69	2,39	1,80	3,06
C13-H11B	3,93	2,80	4,00	3,19	C22-H20B	4,72	5,87	5,70	4,86



Kuvaaja 13: J-kytkennän GAUSSIAN-arvojen ja laskettujen arvojen korrelaatio yhtälöittäin

5. Johtopäätökset

Tuloksissa vertailuarvona käytettiin GAUSSIAN-laskennalla saatuja arvoja. Laskennalla saatiin myös huomioitua käytetty liuotin. Strykniinin ja brusiinin välillä lasketuissa arvoissa ei havaittu eroja, vaikka käytettyjen liuottimien ominaisuudet poikkeavatkin toisistaan merkittävästi. Arvojen voidaan olettaa vastaavan hyvin todellisia arvoja. Tulosten perusteella voidaan olettaa, että lasketut arvot olivat paljon tarkempia kuin mitatut arvot.

NOESY:n pohjautuvat määritykset osoittautuivat hyvin epätarkoiksi, sillä poikkeamat laskennallisista arvoista olivat jopa kymmeniä prosentteja. NOESY:ä pidetään yleisesti melko tarkkana menetelmänä. Tässä työssä esiintyviä virhelähteitä ja niiden poistamista on käsitelty seuraavassa luvussa.

J-kytkennät saatiin määritettyä vain osalle mitatuista kytkennöistä. Kokeellisella J-kytkentöjen määritysmenetelmällä erittäin pienen arvon saavat kytkennät jäivät havaitsematta. J-kytkentöjen määrittämistä haittasi myös spektrin rajallinen tarkkuus ja mahdollisesti molekyylin sisäinen liike. Näin ollen työssä jouduttiin turvautumaan suurelta osin laskennallisesti määritettyihin arvoihin.

Oppikirjoissa usein esitettävä Karplus yhtälö osoittautui liian epätarkaksi sekä kytkentöjen että torsiokulmien laskemista varten. Näin ollen työssä pyrittiin muodostamaan kokeellinen yhtälö hiilten ja protonien välisten torsiokulmien laskemiseksi.

Kokeellinen Altona-Haasnoot yhtälö saatiin laadittua vain laskennallisista tuloksista, sillä signaalien päällekkäisyydet tekivät signaalien intensiteetin derivoinnin epätarkaksi. Laskennallisilla arvoilla määritetystä yhtälöstä saatiin kuitenkin määritettyä vakiot uutta Altona-Haasnoot yhtälön heteronukleaarista sovellusta varten. Kokeellisella Altona-Haasnoot yhtälöllä mitatuista J-kytkennöistä määritetyt torsiokulmat vastasivat melko hyvin laskennallisia arvoja.

Kaikissa menetelmissä rakenteen tunteminen ennalta on välttämätöntä, sillä NOESY:n pohjautuvassa määrityksessä joudutaan käyttämään yhtä tunnettua etäisyyttä vertailuarvona muille määritettäville etäisyyksille. Toisaalta tuo etäisyys voi olla esimerkiksi alfa-protonien välillä, joten vertailuetäisyys voidaan tuntea hyvinkin luotettavasti. J-kytkentöihin pohjautuvassa määrityksessä Karplus ja Altona-Haasnoot yhtälö tarjoaa useita mahdollisia ratkaisuja, joista tulee kyetä tunnistamaan todellinen kulma.

6. Pohdinta

Työn aikana pyrittiin sovittamaan Altona-Haasnoot yhtälö myös kokeellisista arvoista. Sovitus ei kuitenkaan onnistunut, koska luotettavia J-kytkennän arvoja ei ollut riittävästi. Työssä testattiin myös kaksoissidosten ja aromaattisten renkaiden vaikutusta J-kytkennän arvoon ja havaittiin, että niillä ei ole juurikaan vaikutusta. Samalla yritettiin käyttää vakiota kompensoimaan kaksoissidoksia, mutta kaksoissidoksille saadut vakioiden arvot eivät olleet luotettavia. Työn aikana laaditulla modifoidulla Altona-Haasnoot yhtälöllä saavutettiin hyvä korrelaatio. Yhtälön soveltuvuutta on kuitenkin kokeiltava tarkemmin.

Määrittelyssä esiintyneet epätarkkuudet arvellaan johtuneen lähinnä määritysmenetelmästä ja molekyylin ominaisuuksista. Myös lähekkäin asettuneet signaalit ovat voineet aiheuttaa epätarkkuutta. HMBC-mittauksissa epätarkkuutta aiheuttaa myös hiilen heikko NMR-aktiivisuus.

Mittauksissa havaittuja virheitä voisi pienentää käyttämällä yksiulotteista intensiteetin derivointia. Tosin tuolloin jouduttaisiin käyttämään yksiulotteista spektriä, missä päällekkäisiä signaaleja tulee vielä enemmän. Eräs analyysin ongelmista oli jo valmiiksi päällekkäin asettuvat signaalit. Myös molekyylin sisäinen liike heikentää tulosten luotettavuutta.

Karplus yhtälö soveltuu erittäin hyvin, kun yhtälön vakiot on määritetty analyysin kohteena oleville elektronegatiivisille atomeille. Toisaalta kaikkiin mahdollisiin tilanteisiin soveltuvat Karplus yhtälöt vaatisivat huomattavan määrän yhtälöitä. Altona-Haasnoot yhtälöllä voidaan sovittaa kaava toimimaan halutuille ytimille. Yhtälöiden vakioita voitaisiin määrittää myös muille ytimille. Muita merkittäviä NMR-aktiivisia ytimiä biomolekyyleillä ovat esimerkiksi typpi ja fosfori.

Kirjallisuusviitteet

- 1 Blümich, B. 2005 *Essential NMR*, Springer, 2005, ss. 6-35
- 2 Overhauser, A. *Phys. Rev.* 1953, 92, ss. 411-415
- 3 WWW-viite *Rönthengristallografia*,
<http://fi.wikipedia.org/wiki/R%C3%B6ntgenkristallografia>, sivua muokattu viimeksi
 6.8.2013, viite poimittu 5.11.2013
- 4 Noggle, J. *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, 1971, ss. 52-53
- 5 Karplus, Martin, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85 (18), ss. 2870–2871.
- 6 Keeler, J. *Understanding NMR spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, 2006, ss. 103-383
- 7 Iriguchi, N. *J. Appl. Physics*, 1993, 73, ss. 2956 - 2957
- 8 Claridge, T. *High resolution NMR*, Elsevier, 1999, ss. 13-327
- 9 Becker, E. *High resolution NMR*, Academic Press, 2000, ss. 19-20
- 10 WWW-viite, *NMR Spectroscopy instrumentation*,
<http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/nmr/instrumentation.html>,
 sivua muokattu viimeksi 20.1.2010, viite poimittu 5.11.2013
- 11 Derome, A. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press 1987, ss.
 42-82
- 12 Hiltunen, L. *Hiilihydraatimolekyylien kvantitatiivinen NMR-spektroskopia*, Pro gradu-
 tutkielma, Oulun Yliopisto, Kemian laitos, 2011, ss. 23-24
- 13 Roberts, J. *ABCs of the FT-NMR*, University Science Books, 2000, s.45
- 14 WWW-viite, *Free induction decay*,http://en.wikipedia.org/wiki/Free_induction_decay,
 sivua muokattu viimeksi 16.10.2013, viite poimittu 5.11.2013
- 15 Traficante, D. *Concept magnetic res* 2000, 12 (2), ss. 83-101
- 16 Williams D. *Spectroscopic methods in organic chemistry 4th ed.* McGraw-Hill Book
 Company, 1989, ss. 66-113
- 17 Neuhaus, D. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformatinal analysis*, VCH
 Publishers 1989, ss. 23-280
- 18 Solomon, I. *Phys. Rev.* 1955, 99, s. 559
- 19 Bloembergen, N. *Phys. Rev.* 1948, 73, s. 679
- 20 WWW-viite, *Pulse sequences and vector model*,
<http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/pulseq.htm>, sivua muokattu viimeksi
 21.4.2013, viite poimittu 5.11.2013
- 21 Aue, W. *J. Chem. Phys.* 1976, 64, ss. 2229-2246

- 22 J. Jeener *J. Chem. Phys.* 1979, 71, ss. 4546–4553
- 23 Schulte-Herbrüggen, T. *J. Magn. Reson.*, 2002, 156, s. 282
- 24 Bodenhausen, G. *J. Chem. Phys. Lett.* 1980, 69, s.185
- 25 Anet, F., *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, s. 5250
- 26 Wagner, G. *J. Magn. Reson.* 1979, 33, s. 675
- 27 Kaiser, R. *J. Chem. Phys.* 1963, 39, ss. 2435-2442
- 28 Aue, W., *J. Chem. Phys.* 1976, 64, 4226
- 29 Gidley, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1985, 4, ss. 220-222
- 30 Nagayama, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 78 (1), ss. 99-105
- 31 Rule, G. *Fundamentals of protein NMR spectroscopy*, Springer 2006, ss. 48-49
- 32 Kumar, A. *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, s. 3654
- 33 Macura, S. *Mol. Phys.* 1980, 41, ss. 95-117
- 34 Dominquez, C. *NMR-based docking of protein-protein complexes* Universiteit Utrecht 2004 ss. 34-45
- 35 Haasnoot, C. *Tetrahedron*, 1980, 36 (19). ss. 2783-2892
- 36 Ludvig, C. *Phytochem Anal.* 2010, 21(1), ss. 22-32
- 37 Griesinger, C. *J. Am. Chem.* 1985, 107, ss. 6394-6396
- 38 Delaglio, F. *Spectra J Magn Reson.* 2001 149(2), ss. 276-281
- 39 Sugiyama, R. *Tetrahedron* 2013, 54 (12), ss. 1531-1533
- 40 Griesinger, C. *J. Am. Chem.* 1985, 107, ss. 6394-6396
- 41 Nilges, M. *J. Mol. Biol.* 1997, 269 (3), ss. 408-422
- 42 Ottiger, M. *J Mag Res* 1998, 134, ss. 365-369
- 43 Heikkinen, S. *J Am Chem Soc.* 2003, 125 (14), ss. 4362-4367
- 44 Aydin, R. *Mag. Reson. Chem.* 1990, 28, ss. 448-457
- 45 Marco et al. *Biochemistry*, 1979, 18, s. 3847
- 46 Ladam, P. *Mag. Res Chem* 1994, 32 (1), ss. 1-7
- 47 Tafazzoli, M. *Carbohydr. Res.*, 2007, 342 (14), ss. 2086-2096
- 48 WWW-viite, Generalized 3JHH calculation acc. Haasnoot et al.
<http://www.stenutz.eu/conf/jhh.html>, sivua muokattu viimeksi 31.6.2013, viite pomittu 23.9.2013
- 49 Brams, M. *Plos Biol.* 2011, 9 (3), 1001034
- 50 Bialonska, A. *Acta Cryst.* 2004. 60 (12), ss. 853-855

Liiteluettelo

Liite 1: Strykniinin ja brusiinin protonien ja hiilien numerointi

Liite 2: Strykniinin ja brusiinin signaalien kemialliset siirtymät

Liite 3: Brusiinin mittaukset ja mittaussparametrit

Liite 4: Strykniinin mittaukset ja mittaussparametrit

Liite 5: Brusiinin rakennemääritykseen käytetyt spektrit

Liite 6: Strykniinin rakennemääritykseen käytetyt spektrit

Liite 7: Brusiinin stereokemialliseen määritykseen käytetty NOESY-spektri 500 ms sekoitusajalla

Liite 8: Brusiinin HMBC stereokemialliseen määritykseen käytetty spektri käyttäen 75 ms sisäistä viivettä

Liite 9: Strykniinin stereokemialliseen määritykseen käytetty NOESY spektri 500 ms sekoitusajalla

Liite 10: Strykniinin stereokemiallisessa määrityksessä käytetty HMBC spektri 100 ms sisäisellä viiveellä

Liite 11 : Stereokemiallisissa määrityksissä käytetty HMBC pulssisarja

Liite 12: Brusiinin määritetyt NOESY-kuvaajien kulmakertoimet ja niiden avulla lasketut etäisyydet

Liite 13: Brusiinin NOESY-kuvaajat ja kulmakertoimet virityksittäin intensiteetin ja sekoitusajan funktiona

Liite 14: Strykniinin määritetyt NOESY-kuvaajien kulmakertoimet ja niiden avulla lasketut etäisyydet

Liite 15: Strykniinin NOESY-kuvaajat ja kulmakertoimet virityksittäin intensiteetin ja sekoitusajan funktiona

Liite 16: Brusiinin HMBC-spektrien signaalien sekoitusajat ja J-kytkennät

Liite 17: Brusiinin HMBC-spektrien kuvaajat intensiteetin ja sisäisen viiveen funktiona kytkennöittäin

Liite 18: Strykniinin HMBC-spektrien signaalien sekoitusajat ja J-kytkennät

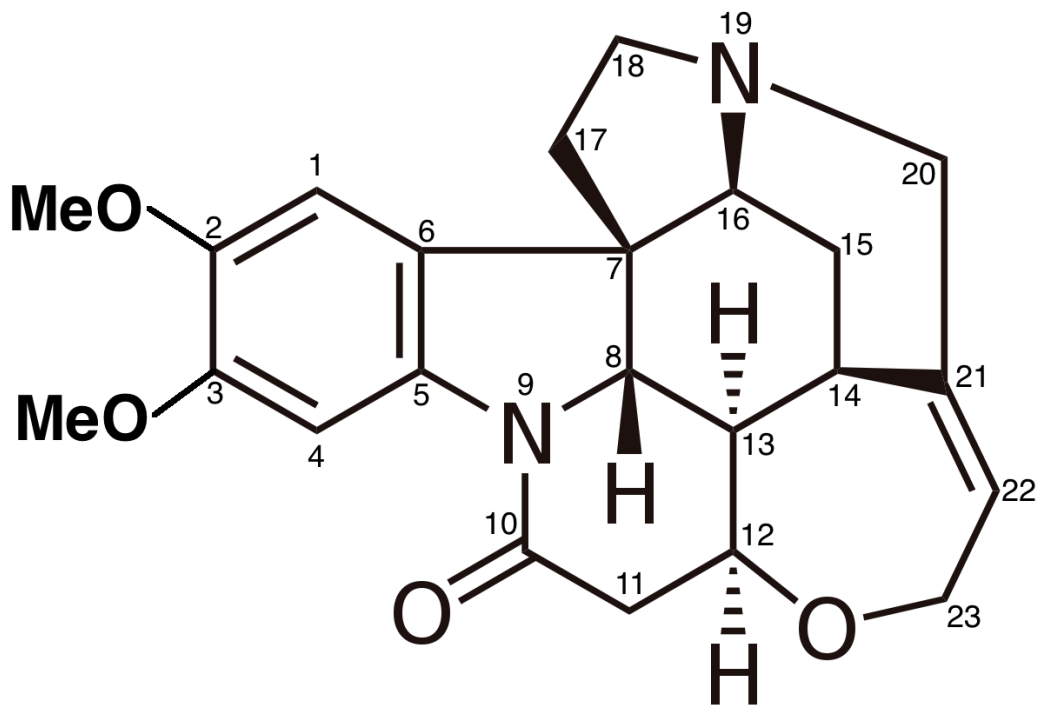
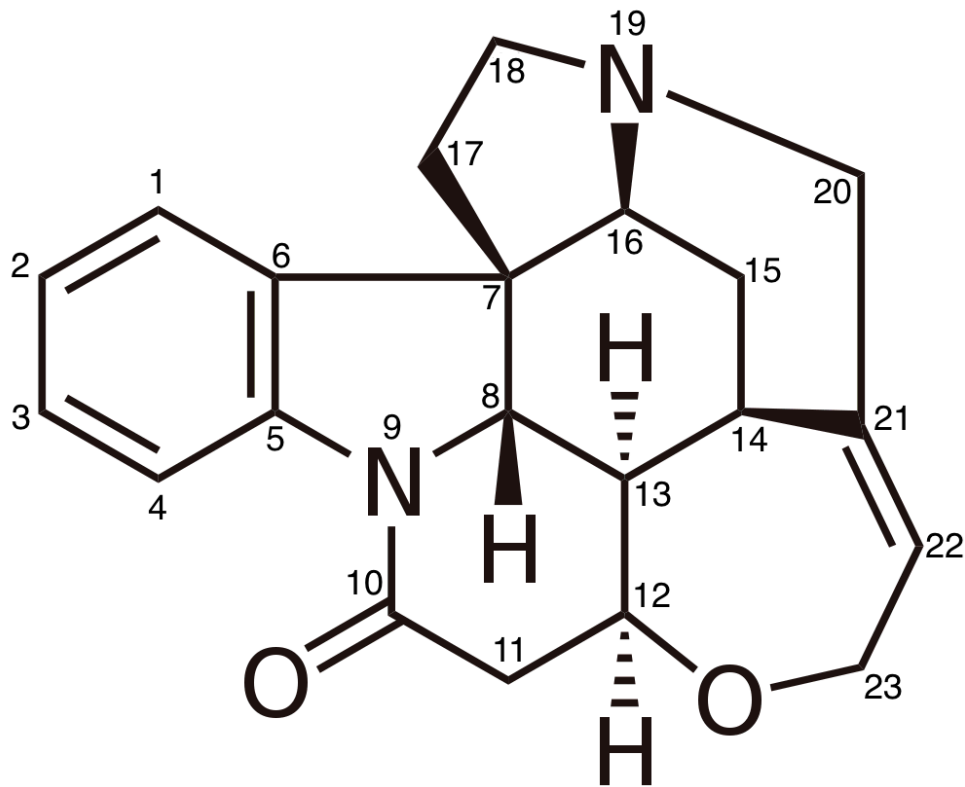
Liite 19: Strykniinin HMBC-spektrien kuvaajat intensiteetin ja sisäisen viiveen funktiona kytkennöittäin

Liite 20: Altona-Haasnoot yhtälöiden kuvaajat kytkennöittäin J-kytkennän ja torsioikulman mukaan

Liite 21: Kirjallisuuden Karplus yhtälöiden vakiot ja yhtälöt

Liitteet

Liite 1: Strykniinin ja brusiinin protonien ja hiilien numerointi



Liite 2: Strykniinin ja brusiinin signaalien kemialliset siirtymät

strykniini				Brusiini			
Protonien kemialliset siirtymät	Protoni	Hiilien kemialliset siirtymät	Hiili	Protonien kemialliset siirtymät	Protoni	Hiilien kemialliset siirtymät	Hiili
1,30	13	28	15	1,26	13	25	15
1,48	15a	33	14	1,47	15a	31	14
1,92	15b	44	11/17	1,81	17a	41	11
2,70	17	18	13	1,85	17b	42	17
2,65	11b	50	18	2,66	15b	49	13/18
2,75	20a	52	7	2,69	11b	53	7/20
2,90	18b	53	20	2,78	20a	59	8
3,17	11a	62	8/16	3,00	18b	60	16
3,22	14	67	23	3,03	11a	64	23
3,22	18a	78	12	3,11	18a	77	12
3,73	20b	128	4	3,21	14	102	4
3,88	8	115	1	3,72	20b	127	1
3,97	16	124	2	3,84	8	125	6
4,10	23a	127	22	3,86	16	129	22
4,16	23b	128	3	4,14	23ab	136	5
4,31	12	133	6	4,33	12	139	21
5,93	22	141	21	5,98	22	148	2
7,13	2	144	5	6,90	1	150	3
7,19	1	170	10	7,75	4	170	10
7,29	3						
8,12	4						

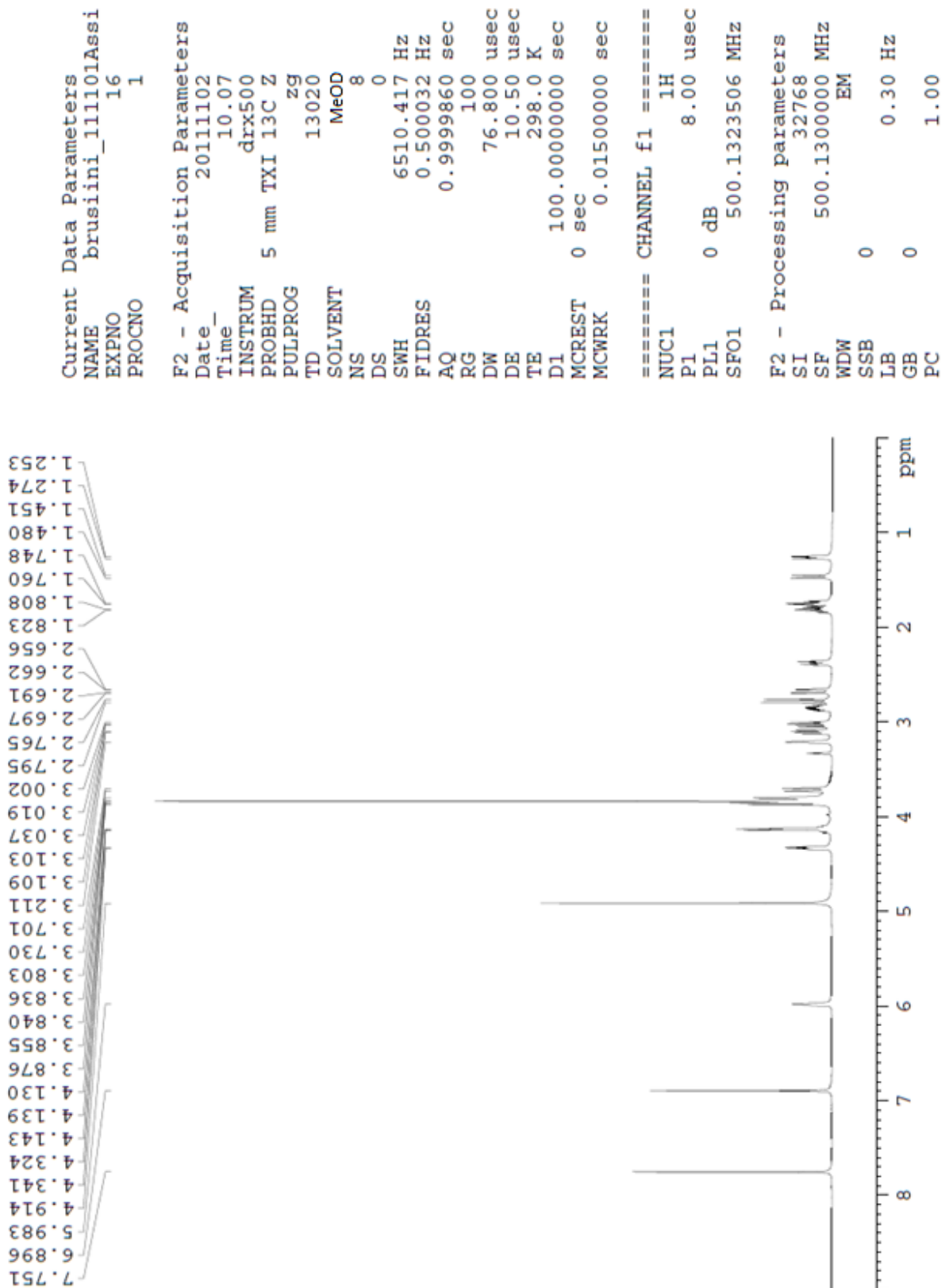
Liite 3: Brusiinin mittaukset ja mittausparametrit

Näyte	Määrittäminen	Viive (d1)	Sekoitus-aika (d5/d7)	pulsin pituus		Mittausaika	Määrittysten määrä	Inkrementit (TD1) Inkrementit (TD2)		spektrin leveys	
				8 µs	20 µs			13020	27774	13 ppm	165 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	Protoni	100 s				100 ms	8				
Brusiini 50 mmol/l MeOD	Hiihi	0,215 s				500 ms	256				
Brusiini 50 mmol/l MeOD	COSY	3,2 s		8,8 µs	8,8 µs	128 ms	4	1024	512	8 ppm	8 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	HSQC	3,4 s		8,8 µs	17,6 µs	128 ms	4	1024	512	8 ppm	180 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	HMBC	3,2 s		8,8 µs	17,6 µs	256 ms	4	2048	256	8 ppm	180 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	NOESY	3,2 s	1 s	8,8 µs	8,8 µs	256 ms	16	2048	256	8 ppm	8 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	50 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	75 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	100 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	150 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	200 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	250 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	300 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	350 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	400 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	450 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 10 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen NOESY	26 s	500 ms	8,8 µs	8,8 µs	1000 ms	16	8168	128	10 ppm	10 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen HMBC	24 s	50 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	7	2048	256	10 ppm	248 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen HMBC	24 s	75 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	7	2048	256	10 ppm	248 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen HMBC	24 s	100 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	7	2048	256	10 ppm	248 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen HMBC	24 s	125 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	7	2048	256	10 ppm	248 ppm
Brusiini 50 mmol/l MeOD	kvantitatiivinen HMBC	24 s	150 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	7	2048	256	10 ppm	248 ppm

Liite 4: Strykniinin mittaukset ja mittaussparametrit

Näyte	Määrittys	Viive (d1)	Sekoitusaika (d5/d7)	pulsin pituus		Mittausaika	Määrittysten määrä	Inkrementit (TD1) Inkrementit (TD2)		spektrin leveys
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	Protoni	1,94 s		9,3 µs		230 ms	1	2994		13 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	Hiili	0,215 s		20 µs		500 ms	128	30020		165 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	COSY	2,2 s		9,3 µs	9,3 µs	205 ms	4	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	HSQC	2,2 s		9,3 µs	18,6 µs	205 ms	16	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	HMBC	2,2 s		9,3 µs	18,6 µs	205 ms	4	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	NOESY	2,2 s	1 s	9,3 µs	9,3 µs	205 ms	16	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	50 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	75 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	100 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	150 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	200 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	350 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 40 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen NOESY	27 s	500 ms	8,6 µs	8,6 µs	256 ms	8	2048	256	10 ppm
Strykniini 10 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen HMBC	27 s	30 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	6	2048	256	10 ppm
Strykniini 10 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen HMBC	27 s	65 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	6	2048	256	10 ppm
Strykniini 10 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen HMBC	27 s	100 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	6	2048	256	10 ppm
Strykniini 10 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen HMBC	27 s	135 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	6	2048	256	10 ppm
Strykniini 10 mmol/l CDCl3	kvantitatiivinen HMBC	27 s	170 ms	8,6 µs	17,2 µs	256 ms	6	2048	256	10 ppm

Liite 5: Brusiinin rakennemääriytykseen käytetyt spektrit



Current Data Parameters
 NAME Brusini_11101Assignment1500
 EXFNO 5
 PROCNO 999

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 2011101
 Time_ 11.19
 INSTRUM dirx500
 PROBUID 5 mm TXI 13c Z
 PULPROG zgpg30
 TD 2774
 SOLVENT MeOD
 NS 256
 DS 4
 SWH 2777.777 Hz
 FIDRES 1.006136 Hz
 AQ 0.4998820 sec
 RG 32768
 DW 18.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 D1 0.21500000 sec
 d11 0.03000000 sec
 MCREST 0 sec
 MCWEX 0.01500000 sec

----- CHANNEL f1 -----

NUC1 13C
 P1 20.00 usec
 PL1 0 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

----- CHANNEL f2 -----

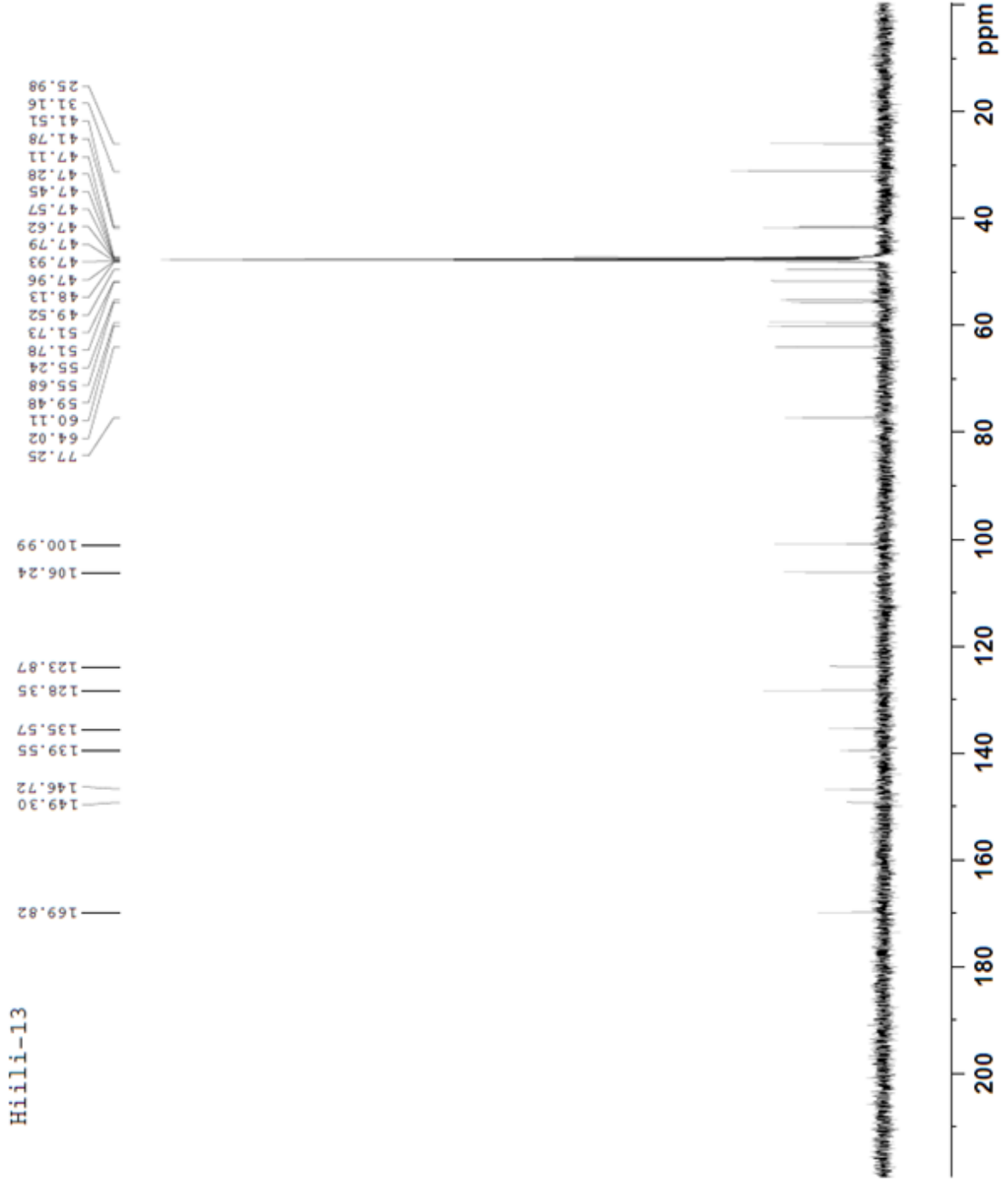
CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 6.00 dB
 PL12 25.00 dB
 PL13 24.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F1 - Acquisition parameters

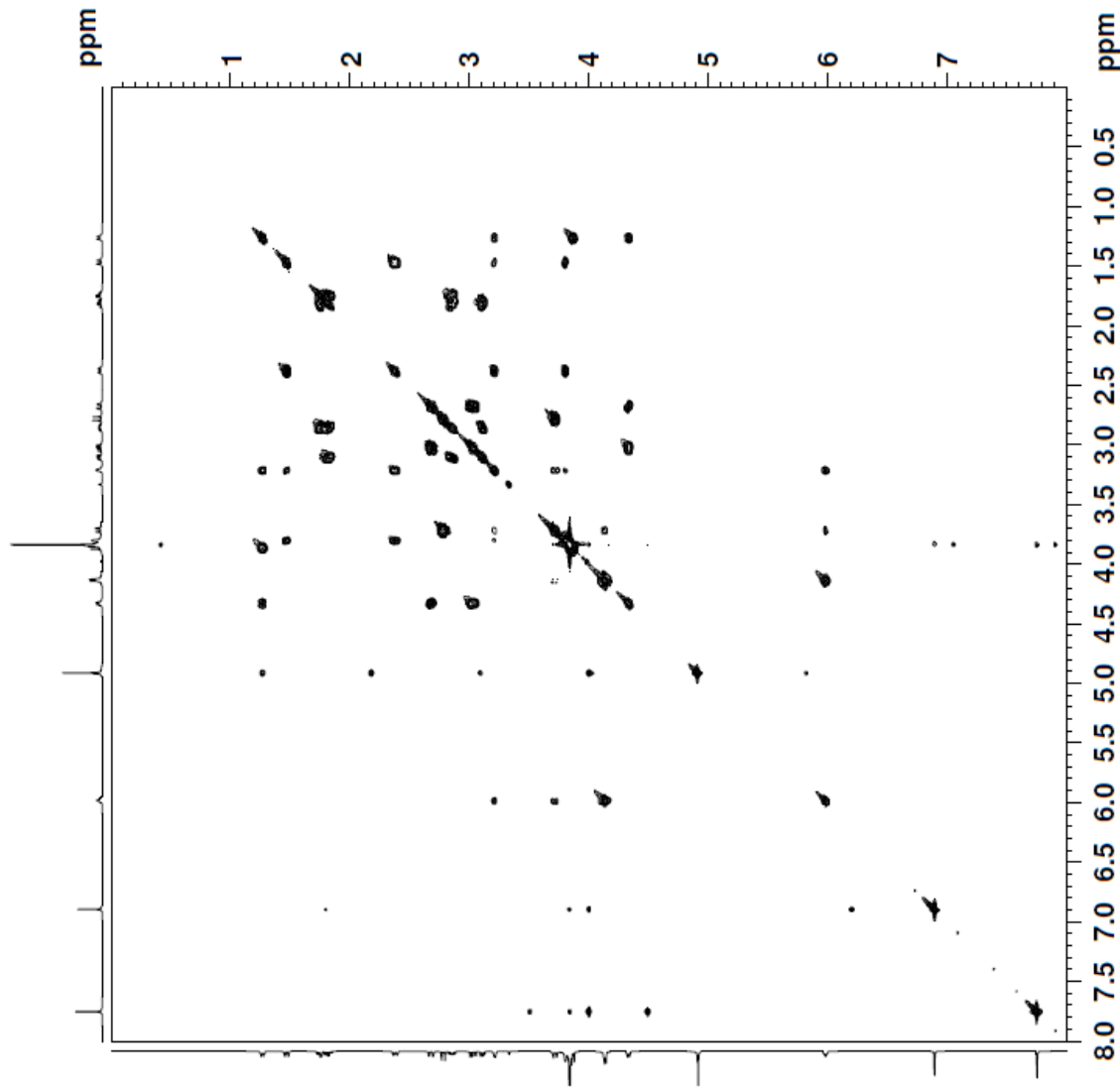
TD 1
 SFO1 125.7672 MHz
 FIDRES 20833.332031 Hz
 SW 165.450 PPM
 PrMODE Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters

SI 32768
 SF 125.7577890 MHz
 KDM 0
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



COSY



Current Data Parameters
NAME brusiini_111101Assignointi500
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20111101
Time 14.38
INSTRUM drx500
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG cosyqf45
TD 1024
SOLVENT MeOH
NS 4
DS 4
SWH 4006.410 Hz
FIDRES 3.912510 Hz
AQ 0.1278452 sec
RG 300
DW 124.800 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
d0 0.00000300 sec
D1 3.20700693 sec
IN0 0.00024994 sec
MCREST 0 sec
MCWRK 3.20700693 sec

==== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H
P1 8.79 usec
PL1 0 dB
SFO1 500.1320005 MHz

F1 - Acquisition parameters

TD 512
SFO1 500.132 MHz
FIDRES 7.814454 Hz
SW 8.000 ppm
EnMODE QF

HSQC

Current Data Parameters
 NAME brusiini_111101Assignpoint1500
 EXPNO 12
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

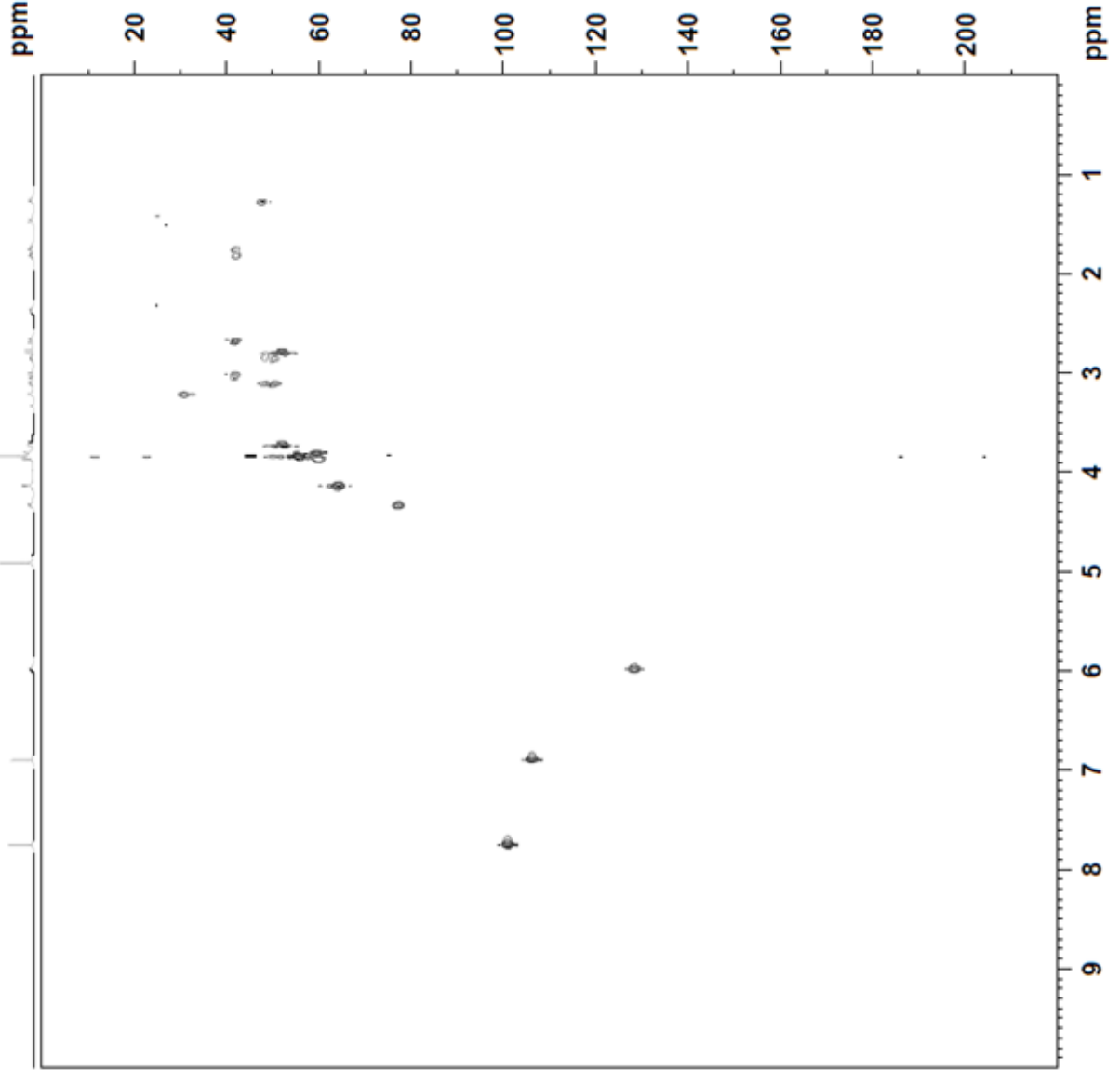
Date_ 2011101
 Time 17.36
 INSTRUM dirx500
 PROBHD 5 mm TXI 13C Z
 PULPROG hsqcetgp
 TD 1024
 SOLVENT MeOD
 NS 4
 DS 4
 SWH 4006.410 Hz
 FIDRES 3.912510 Hz
 AQ 0.1278452 sec
 RG 20000
 DW 124.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 CNST2 145.0000000
 d0 0.0000300 sec
 D1 3.36062098 sec
 d4 0.00172414 sec
 d11 0.0300000 sec
 d13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 DELTA 0.00122358 sec
 DELTA1 0.00071614 sec
 INO 0.00002209 sec
 MCREST 0 sec
 MCWRR 0.67212421 sec
 STCNT 0

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 8.79 usec
 P2 17.58 usec
 P28 10.00 usec
 PL1 0 dB
 SFO1 500.1320005 MHz

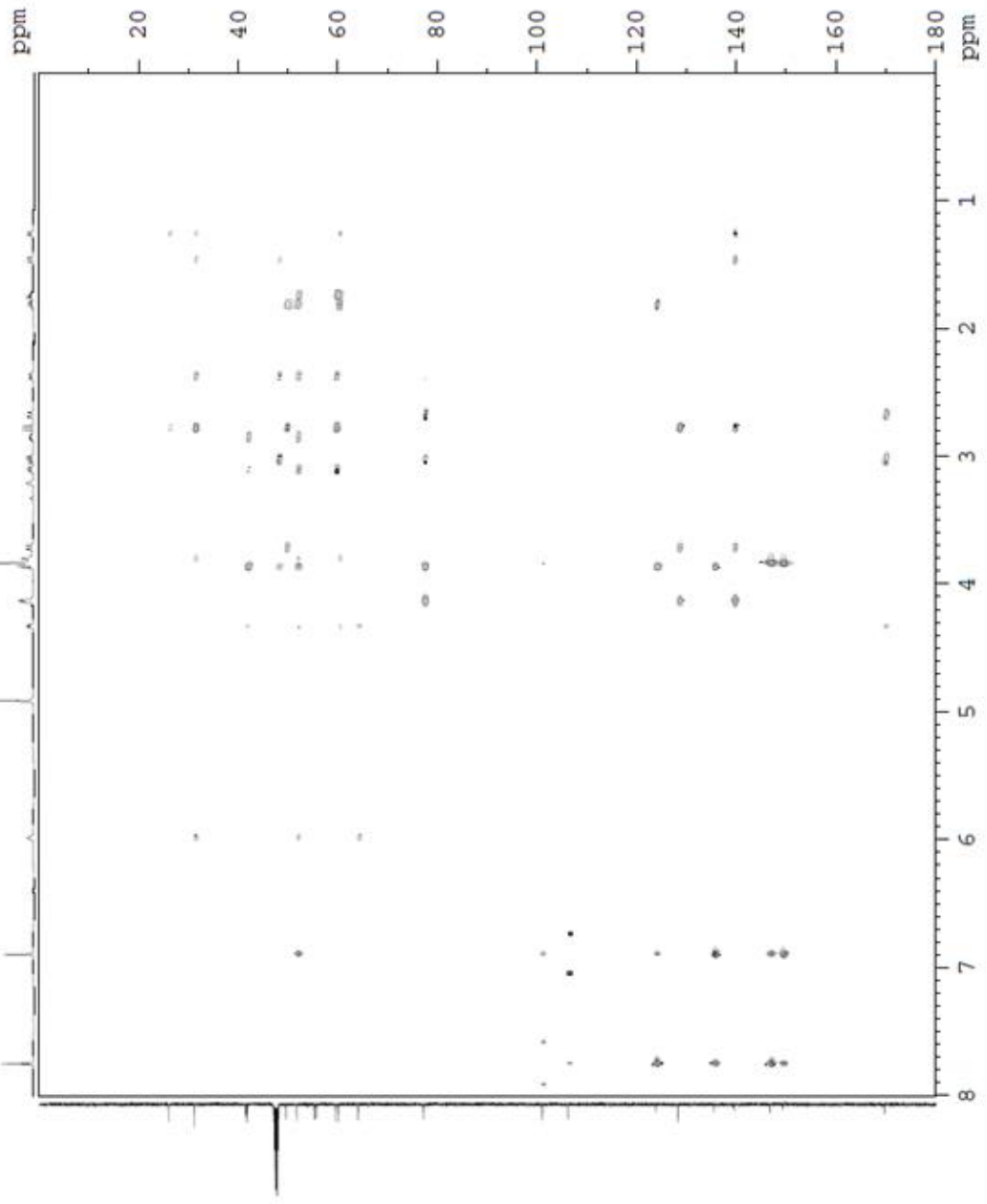
***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 garp
 NUC2 13C
 P3 20.00 usec
 P4 40.00 usec
 PCPD2 65.00 usec
 PL2 0 dB
 PL12 10.24 dB
 SFO2 125.7691072 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
 GFNAM1 SINE.100
 GFNAM2 SINE.100
 GF1 0 %
 GF2 0 %
 GF3 0 %
 GF4 0 %
 GF5 80.00 %
 GF6 20.10 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 512
 SFO1 125.7691 MHz
 FIDRES 44.213356 Hz
 SW 179.990 ppm
 FMODE Echo-Antiecho



HMBC



```

Current Data Parameters
NAME  Brusini_11101Assignointj
EXPNO  11
PROCNO  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_  2011101
Time   16.35
INSTRUM  drx500
PROBHD  5 mm TXI 13C Z
PULPROG  inv4gplprndqf
TD       2048
SOLVENT  MeOD
NS       4
DS       16
SWH      4006.410 Hz
FIDRES   1.956255 Hz
AQ       0.2556404 sec
RG       60000
LW       124.800 usec
DE       6.00 usec
TE       298.0 K
CNST2    145.0000000
d0       0.00000300 sec
D1       3.20700693 sec
d2       0.00344828 sec
D6       0.06500000 sec
d13      0.00000400 sec
D16      0.00020000 sec
INO      0.00002209 sec
MCREST  0 sec
MCWBK    3.20700693 sec

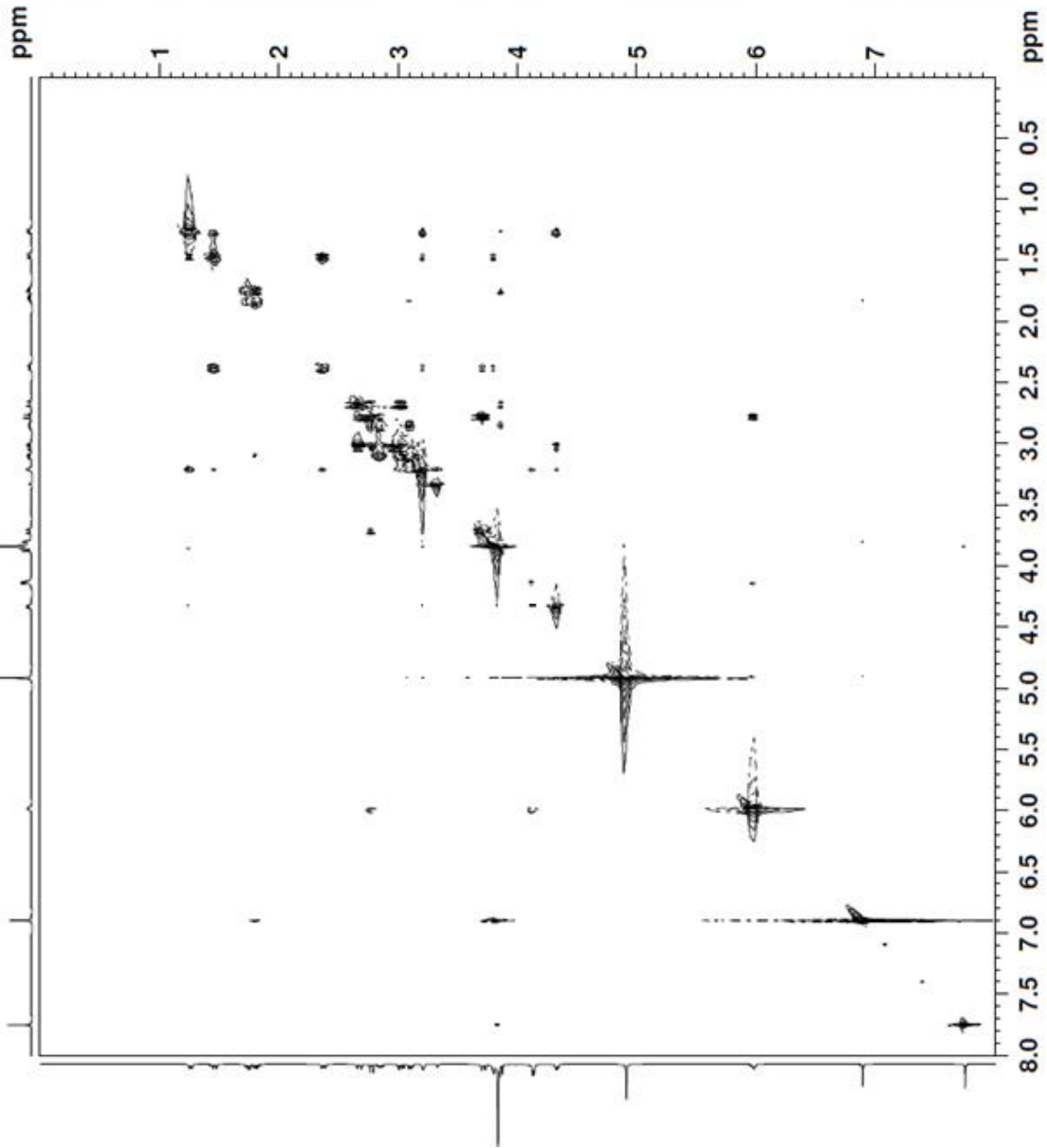
***** CHANNEL f1 *****
NUC1     1H
P1       8.79 usec
PL1      0 dB
SFO1     500.1320005 MHz

***** CHANNEL f2 *****
NUC2     13C
P2       20.00 usec
PL2      0 dB
SFO2     125.7690572 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GPNAM1   SINE.100
GPNAM2   SINE.100
GPNAM3   SINE.100
GPX1     0 %
GPX2     0 %
GPX3     0 %
GPI1     0 %
GPI2     0 %
GPI3     0 %
GPZ1     50.00 %
GPZ2     30.00 %
GPZ3     40.10 %
PL6      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     125.7691 MHz
FIDRES   88.426712 Hz
SW       179.991 ppm
FwMODE   QF
  
```

<noesygpph19>



Current Data Parameters
NAME brusiini_11101Assignointi500
EXPNO 14
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 2011101
Time 20.54
INSTRUM drx500
PROBHD 5 mm TXI 13C Z
PULPROG noesygpph19
ID 2048
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 16
SWH 4006.410 Hz
FIDRES 1.956255 Hz
AQ 0.2556404 sec
RG 300
DW 124.800 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
d0 0.00011378 sec
D1 3.20700693 sec
D8 1.00000000 sec
d12 0.00020000 sec
D16 0.00020000 sec
D19 0.00025000 sec
IN0 0.00024994 sec
MCREST 0 sec
MCWRK 1.60350347 sec
STICNT 0

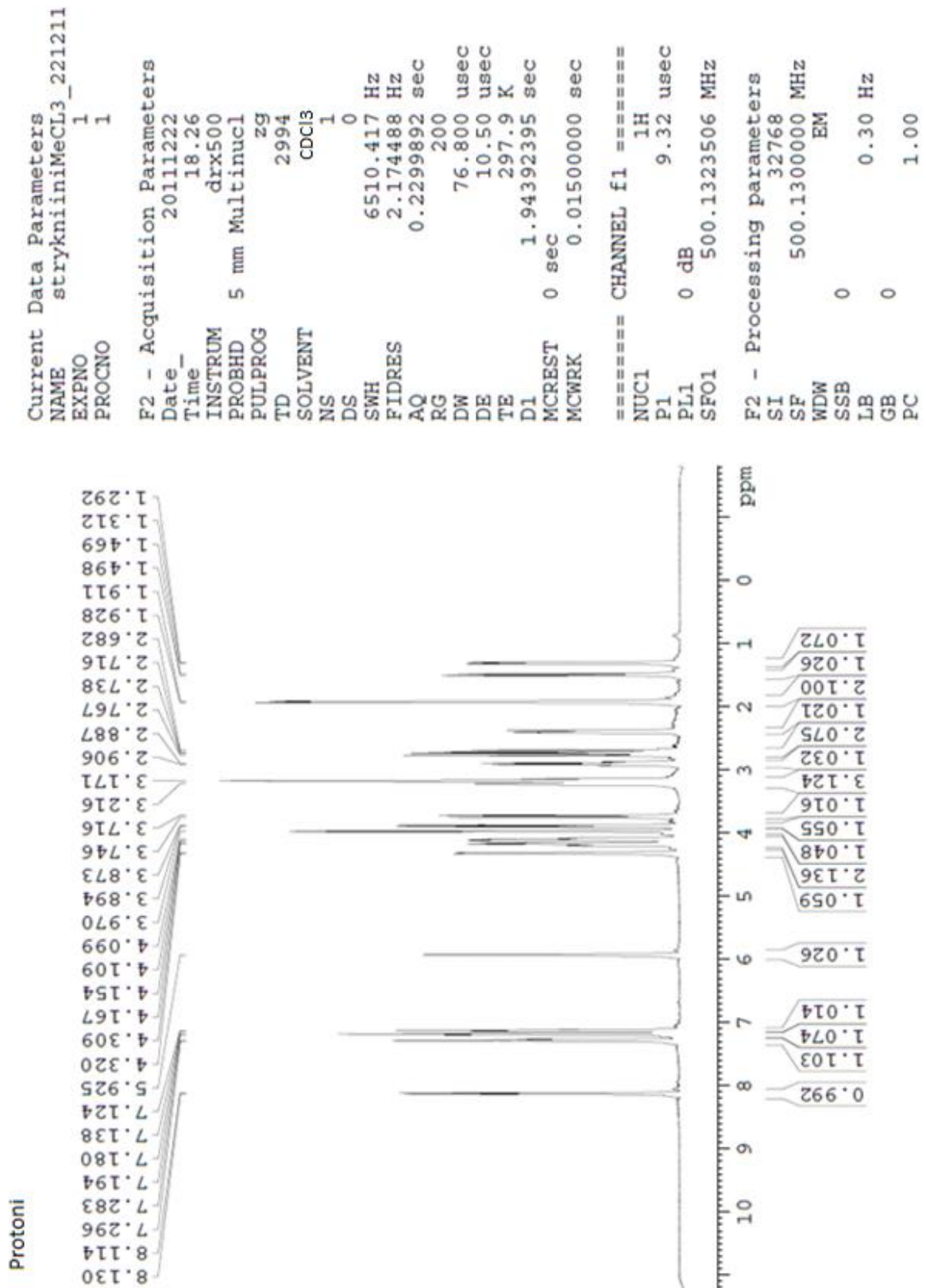
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P0 8.79 usec
P1 8.79 usec
P27 8.79 usec
PL1 0 dB
PL18 0 dB
SFO1 500.1320005 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM1 SINE.100
GPX1 0 %
GPY1 0 %
GPZ1 20.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters

ID 256
SFO1 500.132 MHz
FIDRES 15.628907 Hz
SW 8.000 Ppm
FnMODE States-IFPI

Liite 6: Strykniinin rakennemäärikykseen käytetyt spektrit

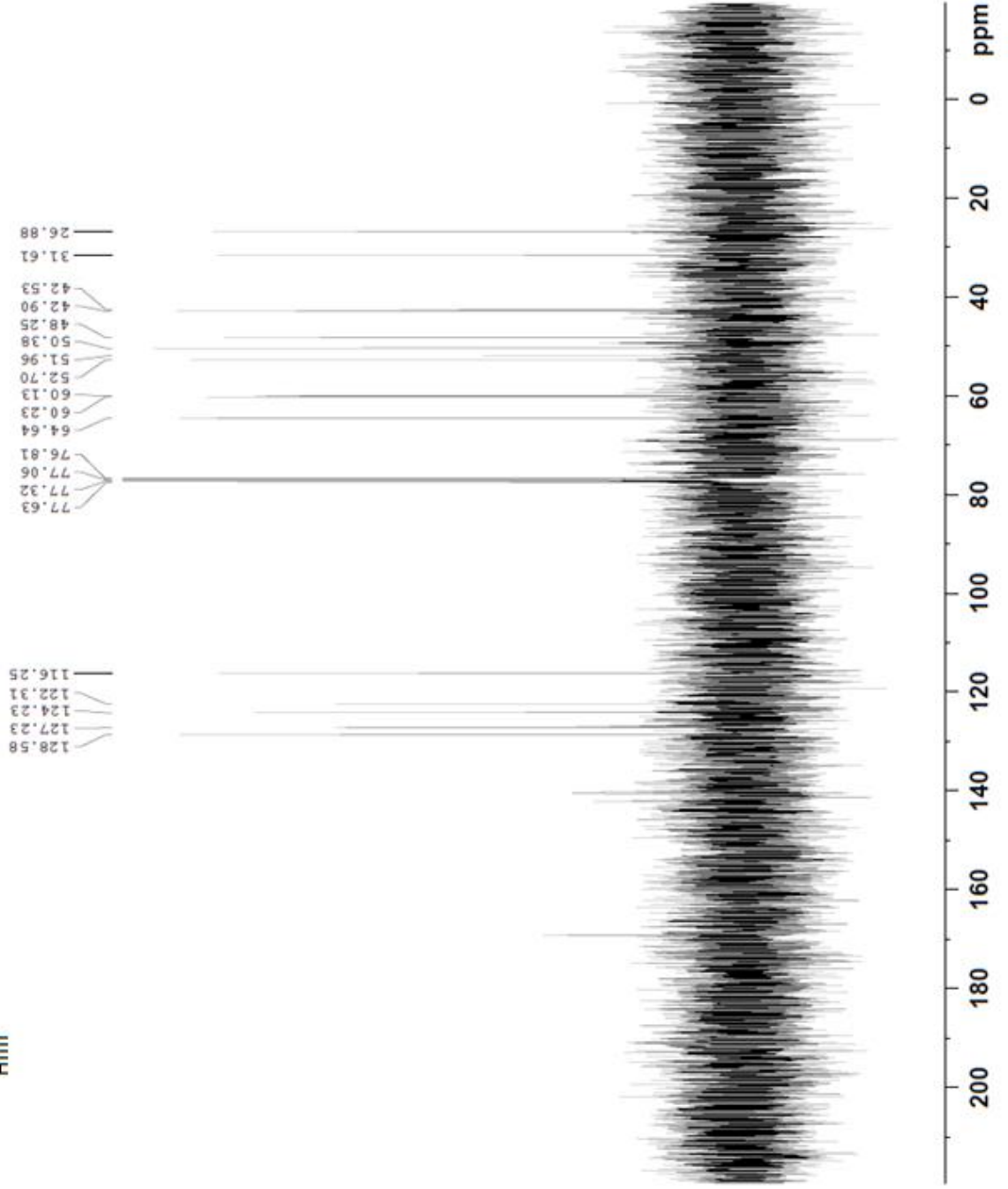


H1H1

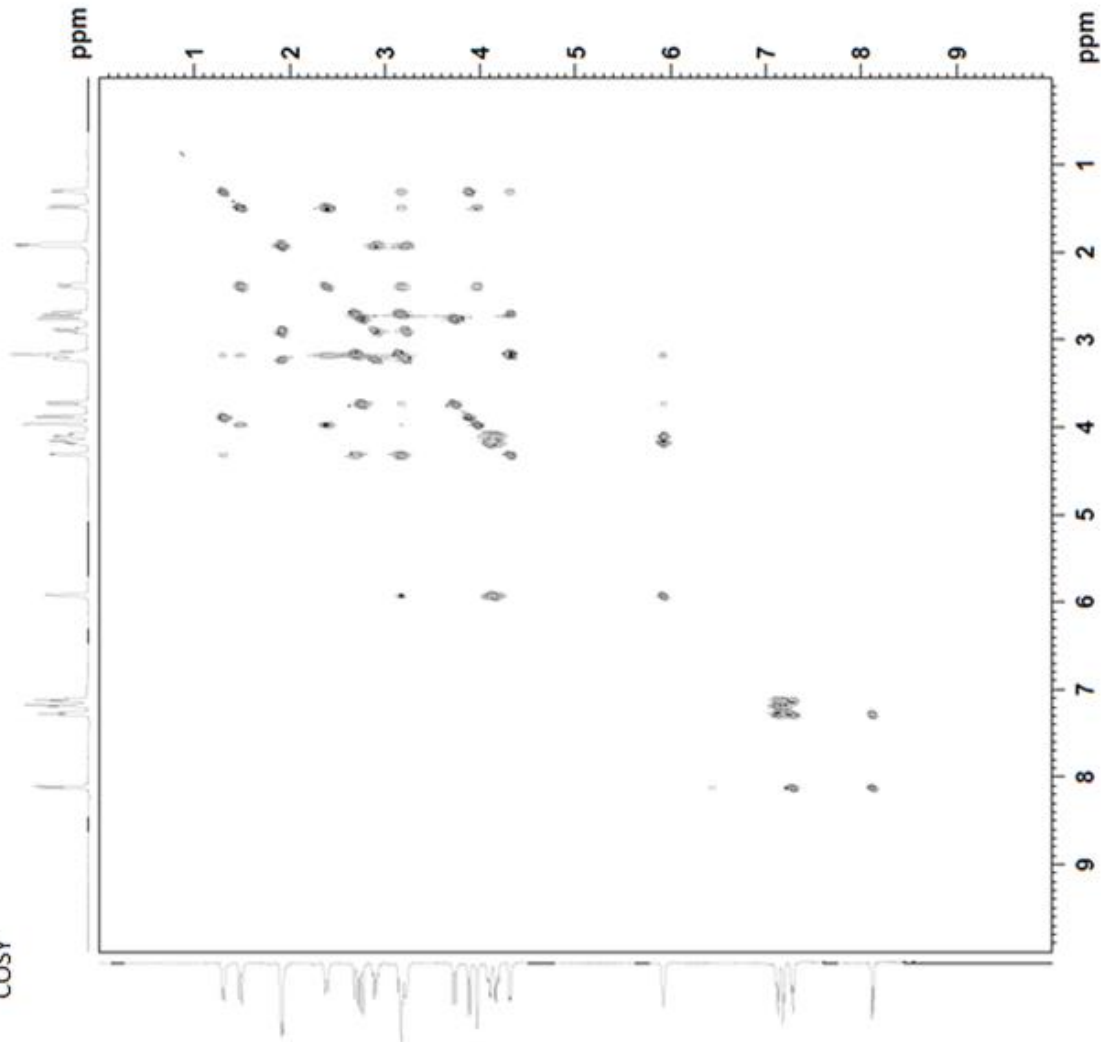
```

Current Data Parameters
NAME      stryminimimel_212111
EXPNO    0
PROCNO   999
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_     201112
Time     08:55:00
INSTRUM   draco
PROBHD   5 mm Multinuc
PULPROG   zgpg30
TD       32768
SOLVENT   CDCl3
NS       128
DS       4
SWH       30030.029 Hz
FIDRES   1.000134 Hz
AQ       0.4999829 sec
RG       327.680
DM       16.480 usec
DE       6.00 usec
TE       298.0 K
D1       0.2180710 sec
d11      0.03000000 sec
MORPHET  0 sec
NOISE    0.01500000 sec
-----
***** CHANNEL f1 *****
NUC1     13C
P1       13C usec
PL1      -6.00 dB
SFO1     125.7703643 MHz
-----
***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      -6.00 dB
PL12     19.00 dB
PL13     19.00 dB
SFO2     500.1320050 MHz
-----
F1 - Acquisition parameters
TD       32768
SFO1     125.7672 MHz
FIDRES   1.000134 Hz
PROBHD   5 mm Multinuc
PULPROG   zgpg30
SOLVENT   CDCl3
NS       128
DS       4
SWH       30030.029 Hz
F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       125.767180 MHz
RG       327.680
DM       16.480 usec
DE       6.00 usec
TE       298.0 K
D1       0.2180710 sec
MORPHET  0 sec
NOISE    0.01500000 sec
-----

```



COSY



Current Data Parameters
NAME strykniniMeCL3_221211
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20111222
Time 18.55
INSTRUM drx500
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG cosygaf45
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 4
SWH 5000.000 Hz
FIDRES 2.441406 Hz
AQ 0.2048500 sec
RG 500
DW 100.000 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
d0 0.0000300 sec
D1 2.2000005 sec
IN0 0.00019995 sec
MCREST 0 sec
MCWRK 2.2000005 sec

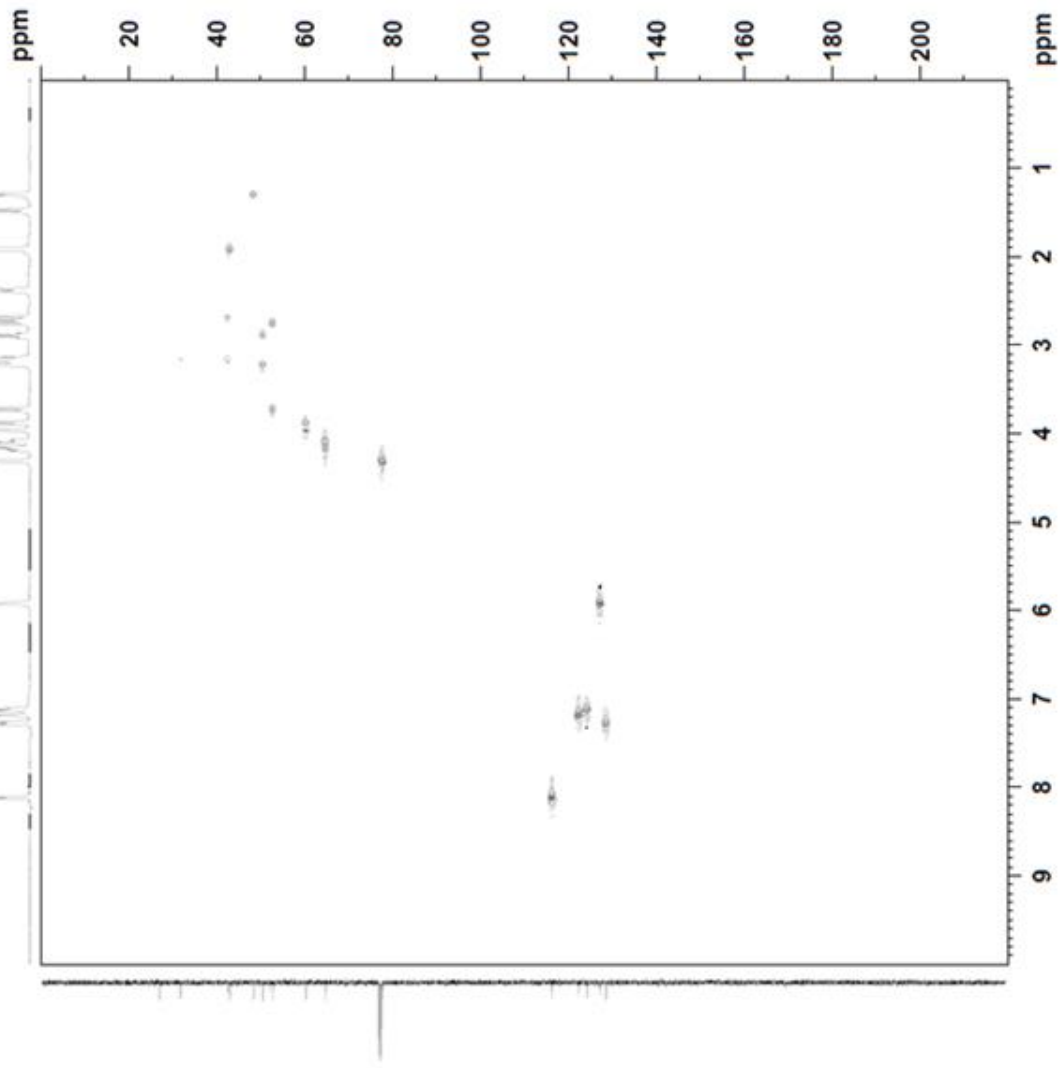
==== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H
P1 9.30 usec
PL1 0 dB
SFO1 500.1325006 MHz

F1 - Acquisition parameters

TD 256
SFO1 500.1325 MHz
FIDRES 19.536135 Hz
SW 10.000 ppm
FMODE QF

HSQC



```

Current Data Parameters
NAME      stryminiMeCL3_221211
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20111223
Time      0.33
INSTRUM   drx500
PROBRD    5 mm Multinucl
PULPROG   waqzetgp
TD         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         16
SWH        5000.000 Hz
FIDRES     2.441806 Hz
AQ         0.2048500 sec
RG         18390.4
DW         100.000 usec
DE         6.00 usec
TE         298.0 K

CNSRT2    145.0000000
G0         0.0000300 sec
G1         2.0075075 sec
G2         0.0775000 sec
G3         0.0900000 sec
G4         0.0000000 sec
G5         0.0000000 sec
D16        0.0010000 sec
DELTA      0.00112660 sec
DELTAL     0.00071614 sec
IN0         0.00001807 sec
MCREST     0 sec
MCMXK      0.44000000 sec
ST:CNT     0

***** CHANNEL f1 *****
NUC1        13C
P1          9.30 usec
P2          18.60 usec
P28         2000.00 usec
PL1         0 dB
SFO1        500.1325006 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPOPRG2     garp
NUC2        13C
P3          23.00 usec
P4          46.00 usec
PCPD2       65.00 usec
PL2         0 dB
PL12        9.02 dB
SFO2        125.7716224 MHz

***** GRADIENT CHANNEL *****
GGRM1       0 %
GGRM2       0 %
GZX1        0 %
GZY1        0 %
GFX2        0 %
GFY2        0 %
GFZ2        80.00 %
P16         20.10 %
P16         1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD          256
SFO1        125.7716 MHz
FIDRES      108.056709 Hz
SN          219.942 ppm
PRMODE      Echo-Antiecho
  
```

Current Data Parameters
 NAME stryminiMeCl3_221211
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

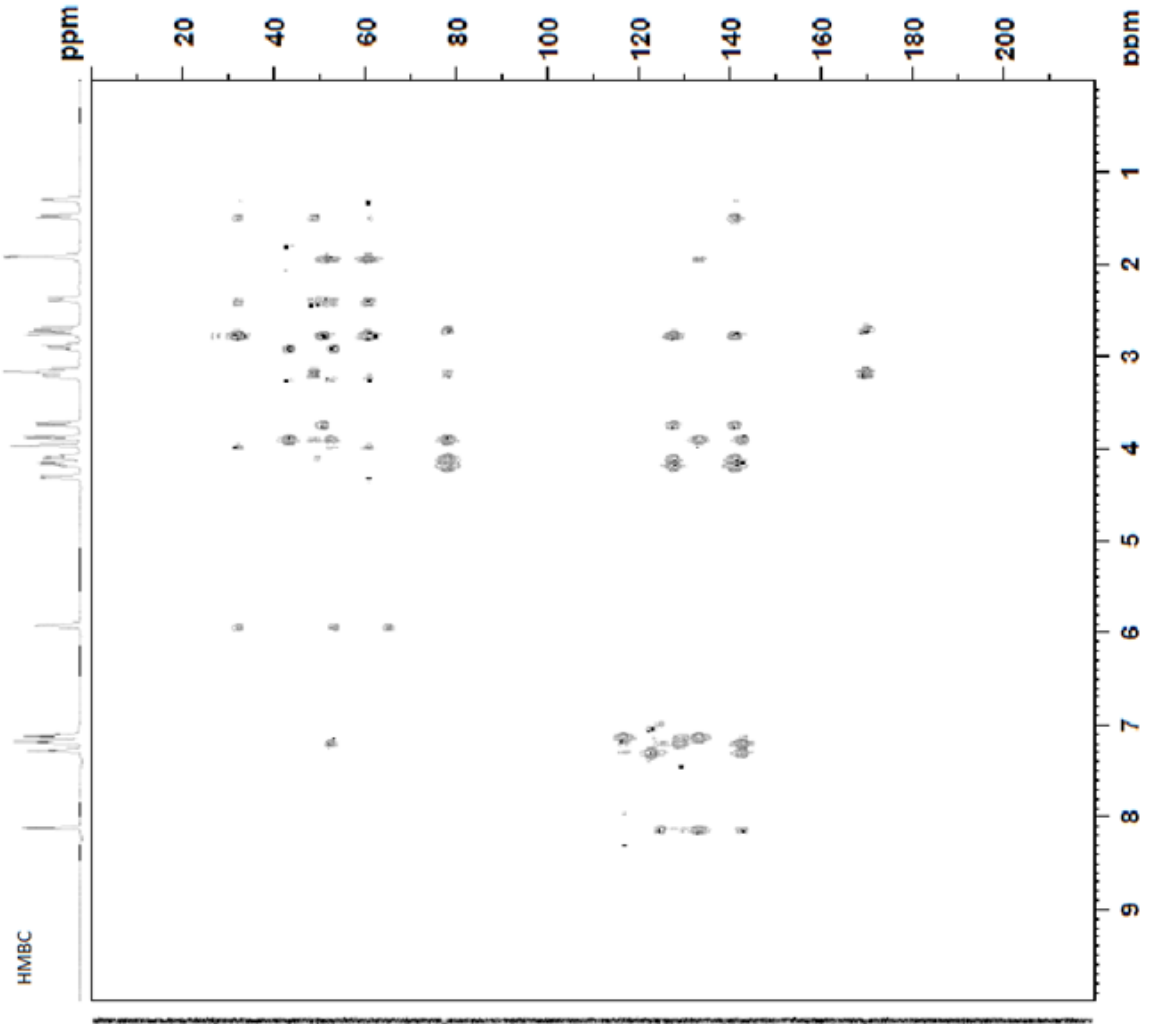
Date_ 20111222
 Time 21.42
 INSTRUM drx500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG invgpp1rbdqf
 TD 2048
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 16
 SMH 5000.000 Hz
 FIDRES 2.441406 Hz
 AQ 0.2048500 sec
 RG 16384
 DW 100.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 CNST2 145.000000
 d0 0.0000300 sec
 d1 2.20000005 sec
 d2 0.0034828 sec
 d3 0.06500000 sec
 d13 0.00000400 sec
 d16 0.00010000 sec
 INO 0.00001807 sec
 MCREST 0 sec
 MCWRK 2.20000005 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 9.30 usec
 P2 18.60 usec
 PL1 0 dB
 SFO1 500.1325006 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 NUC2 13C
 P3 23.00 usec
 PL2 0 dB
 SFO2 125.7715724 MHz

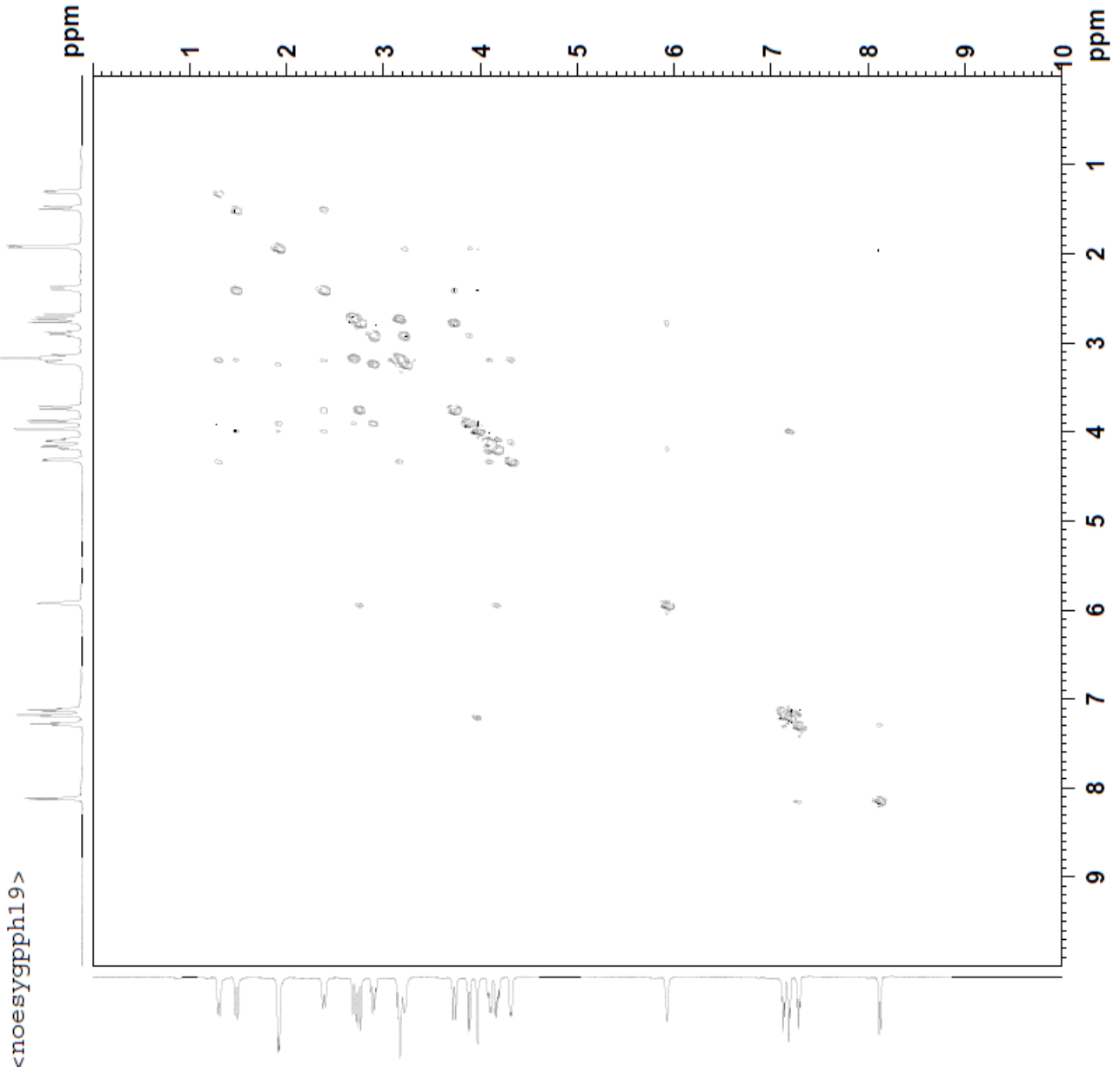
***** GRADIENT CHANNEL *****
 GPNAM1 SINE.100
 GPNAM2 SINE.100
 GPNAM3 SINE.100
 GPC1 0 %
 GPC2 0 %
 GPC3 0 %
 GPY1 0 %
 GPY2 0 %
 GPY3 0 %
 GPZ1 50.00 %
 GPZ2 30.00 %
 GPZ3 40.10 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SFO1 125.7716 MHz
 FIDRES 108.056709 Hz
 SW 219.943 ppm
 PnMODE QF



HMBC

<noesygpqh19>



Current Data Parameters
 NAME strykniiniMeCL3_221211
 EXPNO 13
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20111223
 Time_ 3.19
 INSTRUM drx500
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG noesygpqh19
 TD 2048
 SOLVENT CDC13
 NS 16
 DS 16
 SWH 5000.000 Hz
 FIDRES 2.441406 Hz
 AQ 0.2048500 sec
 RG 64
 DW 100.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 d0 0.0008813 sec
 D1 2.20000005 sec
 D8 1.00000000 sec
 d12 0.0002000 sec
 D16 0.00010000 sec
 D19 0.00025000 sec
 INO 0.00019995 sec
 MCREST 0 sec
 MCWRK 1.10000002 sec
 ST1CNT 0

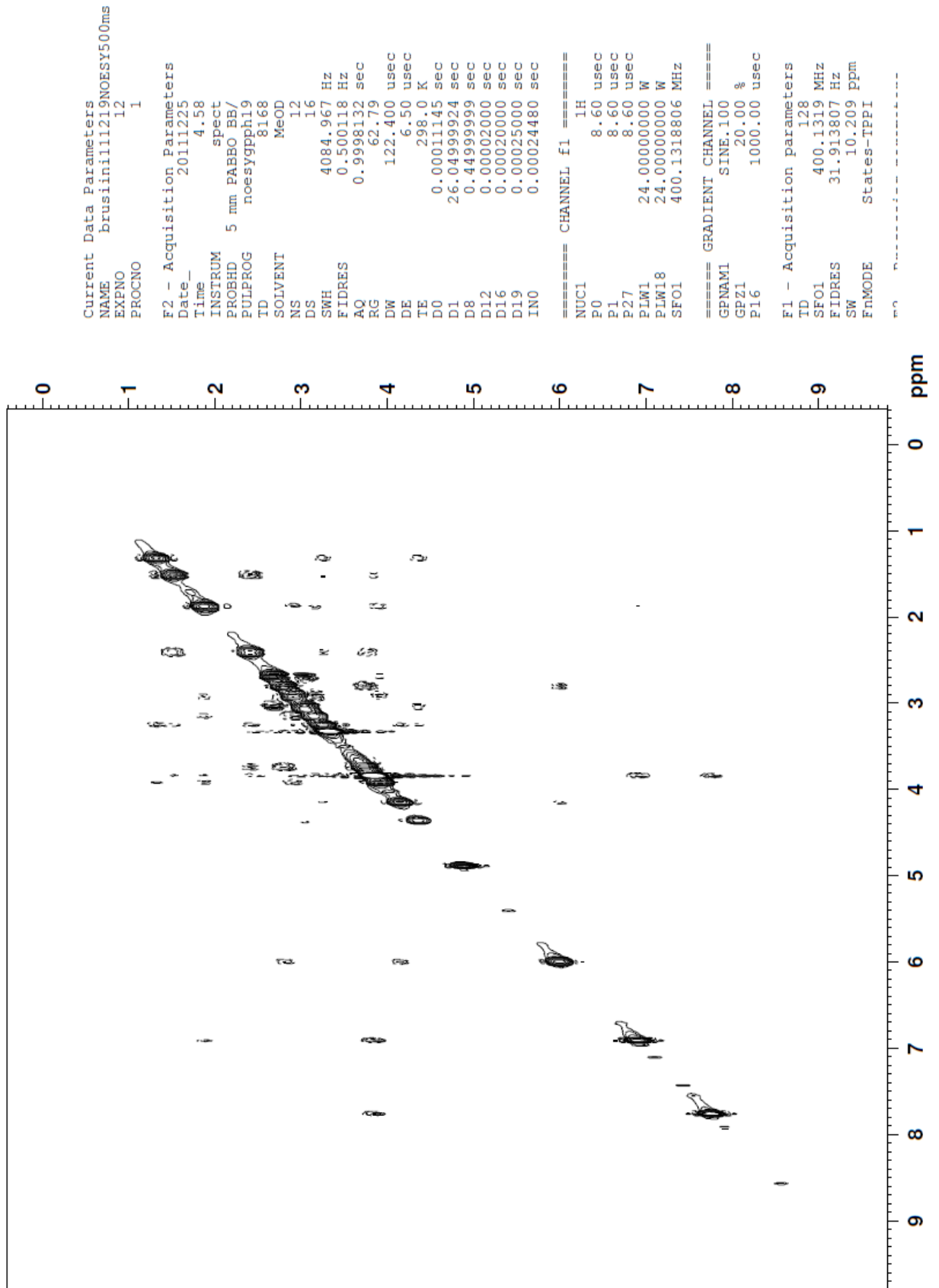
==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P0 9.30 usec
 P1 9.30 usec
 P27 9.30 usec
 PL1 0 dB
 PL18 0 dB
 SFO1 500.1325006 MHz

==== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM1
 GPX1 0 %
 GPY1 0 %
 GPZ1 20.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters

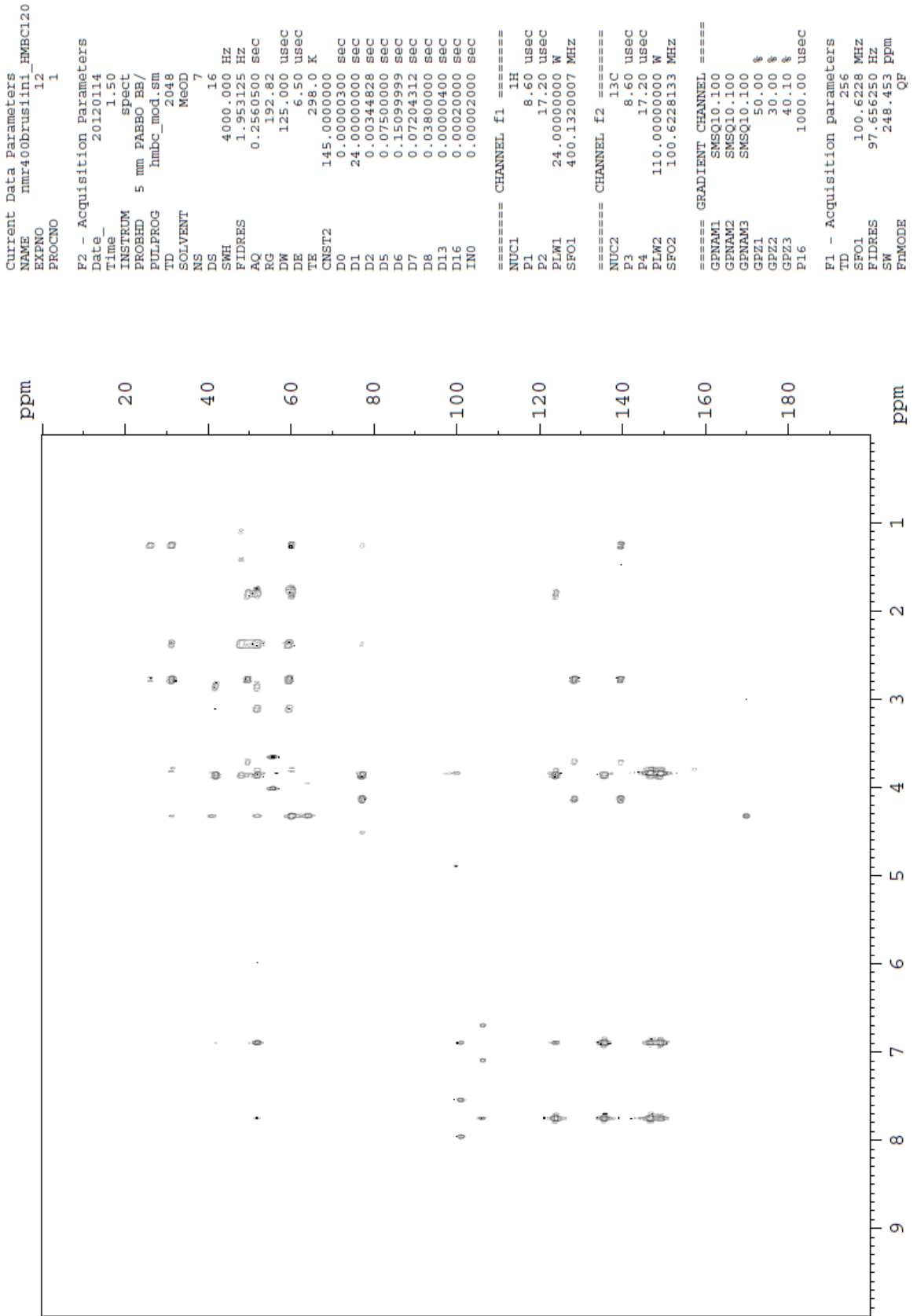
ID 256
 SFO1 500.1325 MHz
 FIDRES 19.536135 Hz
 SW 10.000 ppm
 FnmODE States-TPPI

Liite 7: Brusiinin NOESY-spektri 500 ms sekoitusajalla

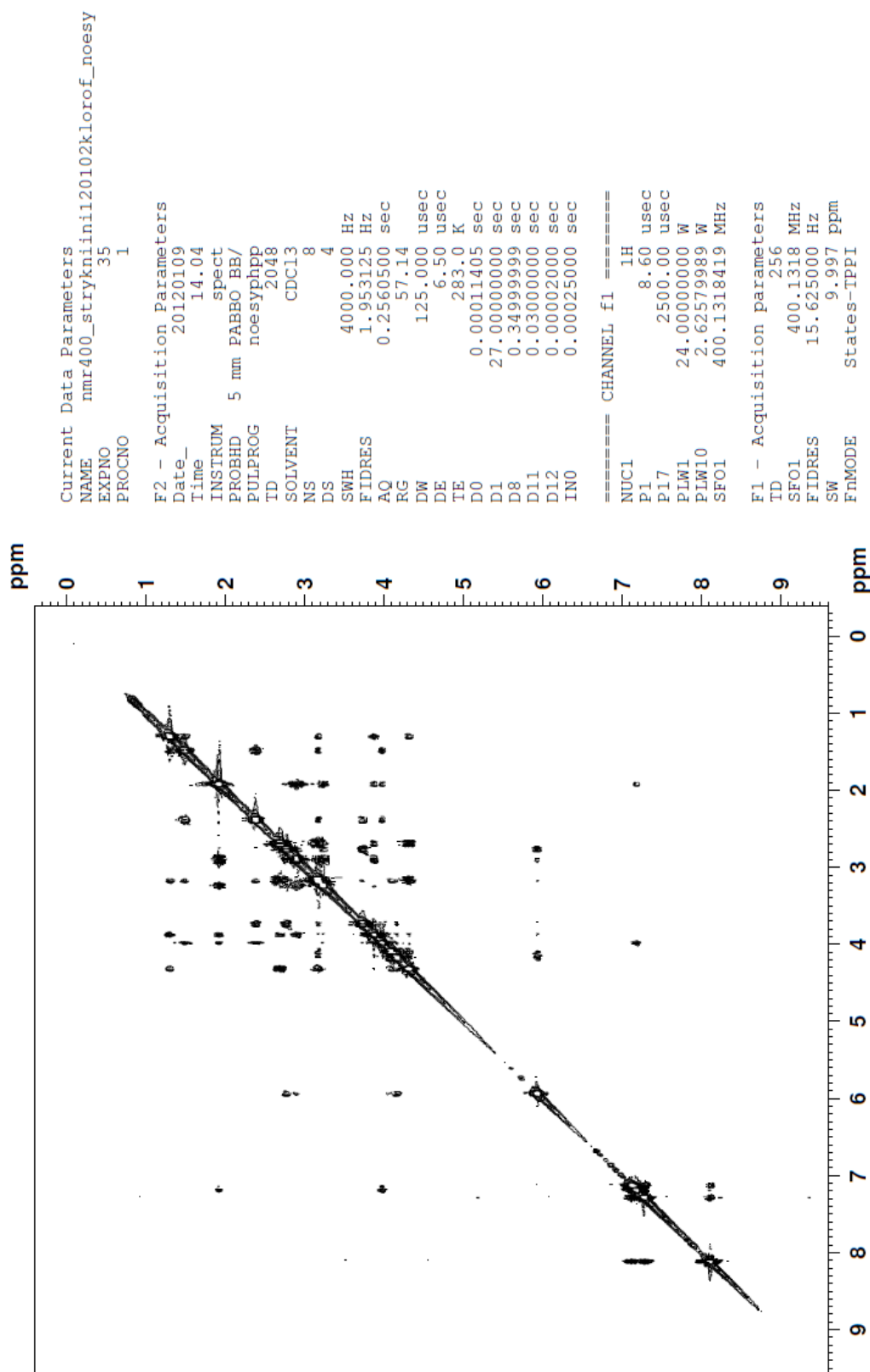


Liite 8: Brusiinin HMBC spektri käyttäen 75 ms sisäistä viivettä

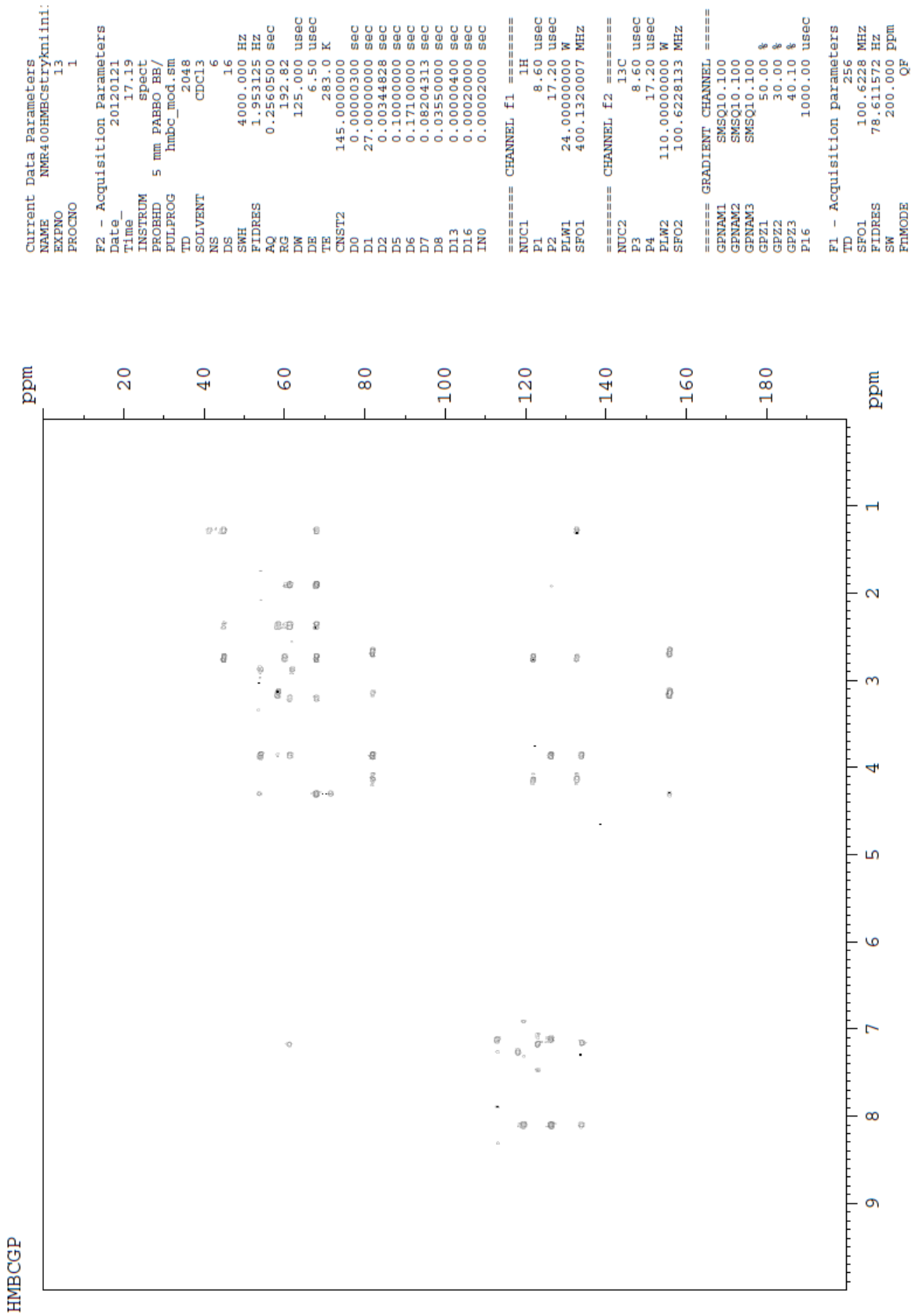
HMBCGP



Liite 9: Strykniinin stereokemialliseen määrittämiseen käytetty NOESY spektri 500 ms sekoitusajalla



Liite 10: Strykniinin stereokemiallisessa määrittäksessä käytetty HMBC spektri 100 ms sisäisellä viiveellä



Liite11 : Stereokemiallisissa määrittelyissä käytetty HMBC pulssisarja

```

;hmbcgpndqf
;avance-version (09/04/17)
;HMBC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double
quantum
; coherence
;optimized on long range couplings
;no decoupling during acquisition
;using gradient pulses for selection
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1*2"
"d6=1s/(cnst13*2) "

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

1 ze
2 d1
3 p1 ph1
  d6
  p3:f2 ph3
  d0
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16
  p2 ph2
  50u
  p16:gp2
  d16
  d0
  p3:f2 ph4
  4u
  p16:gp3
  d16
  4u BLKGRAD

```



```

    go=2 ph31
    d1 mc #0 to 2 F1QF(caldel(d0, +in0))
exit

ph1=0
ph2=0 0 2 2
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d6 : delay for evolution of long range couplings
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst13: = J(XH) long range
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
;          50 : 30 : 40.1 for C-13
;          70 : 30 : 50.1 for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 50% for C-13, 70% for N-15
;gpz2: 30%
;gpz3: 40.1% for C-13, 50.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100

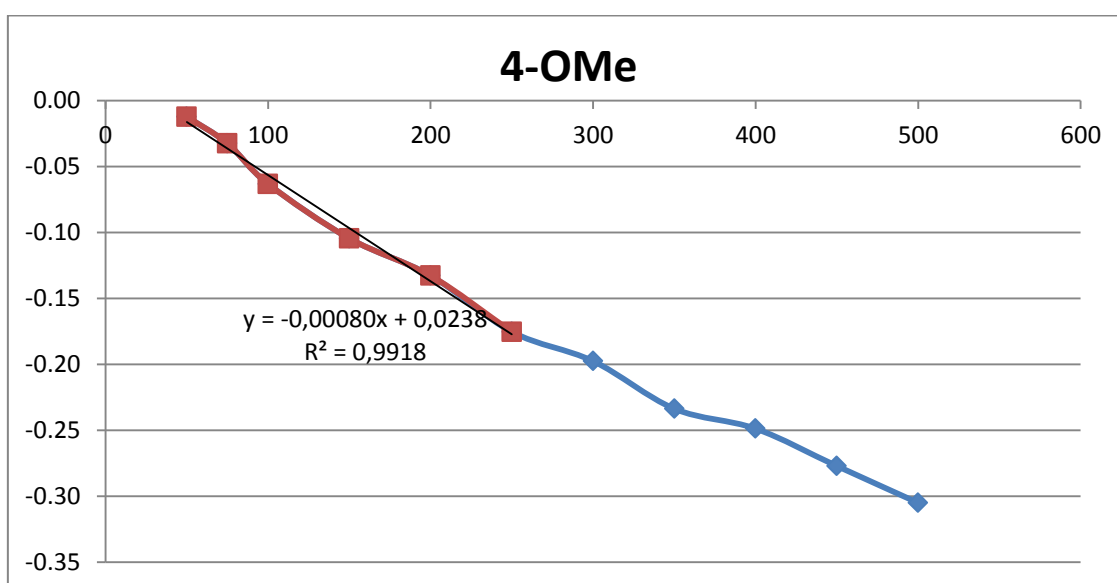
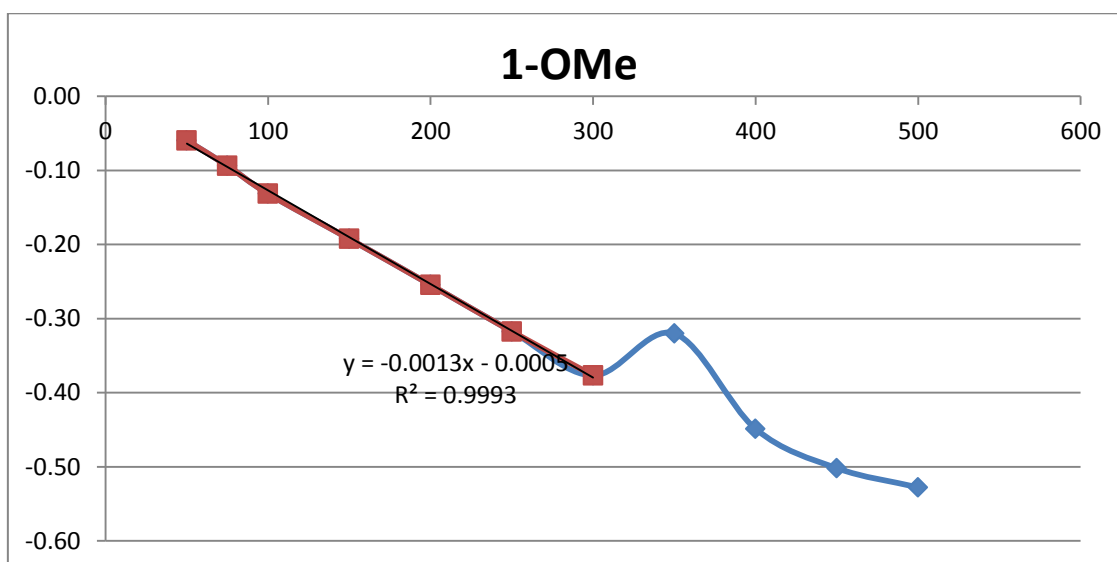
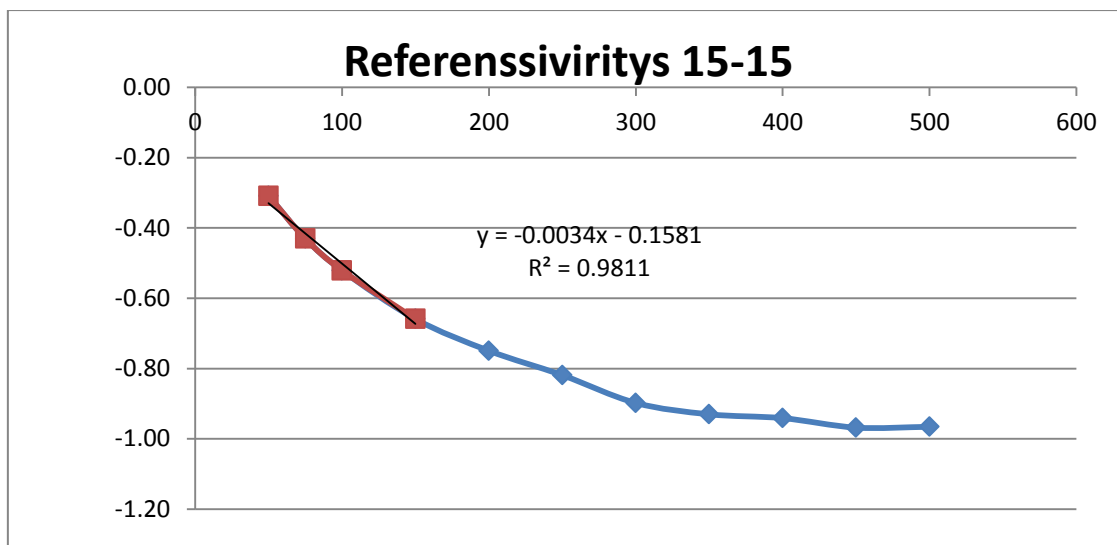
;$Id: hmbcgpnqf,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $

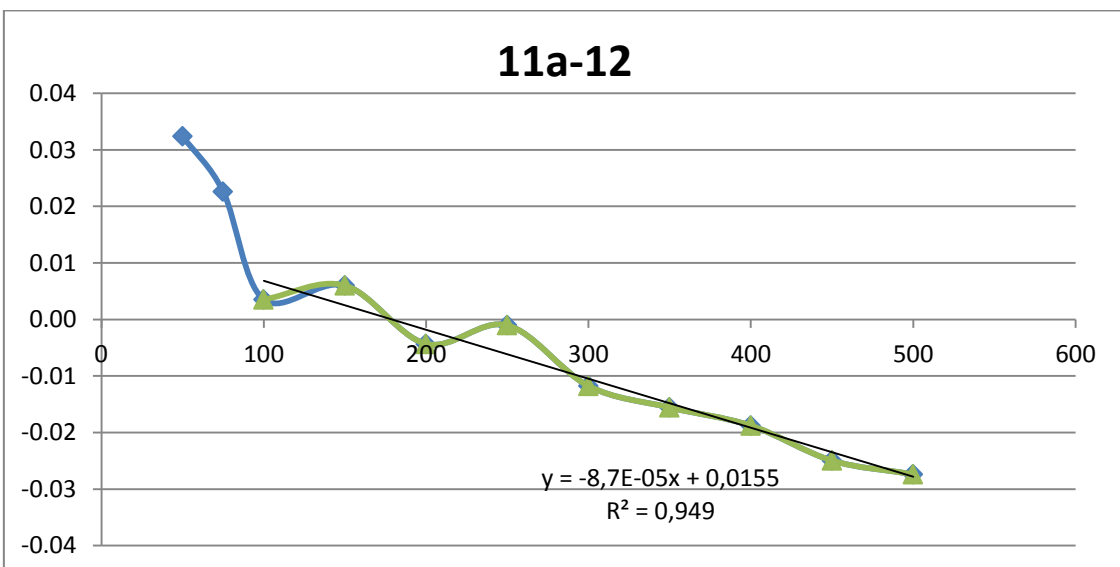
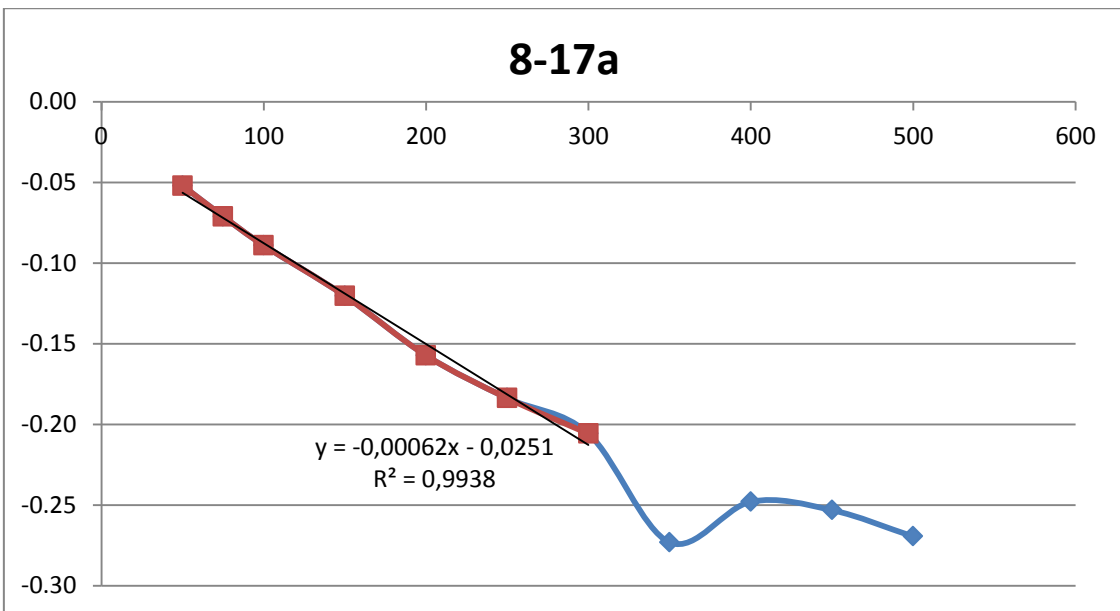
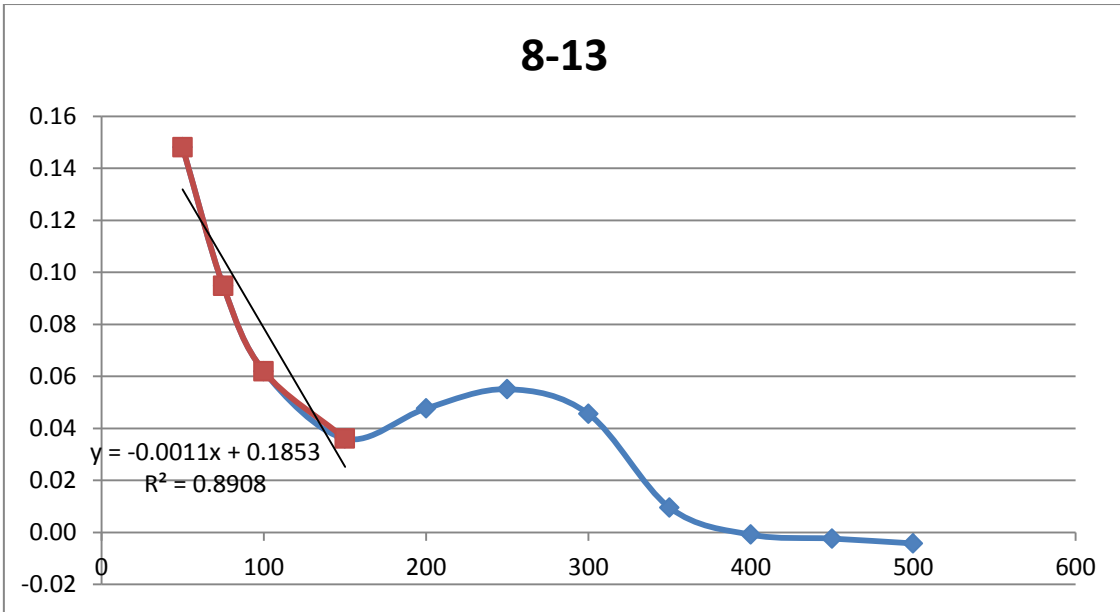
```

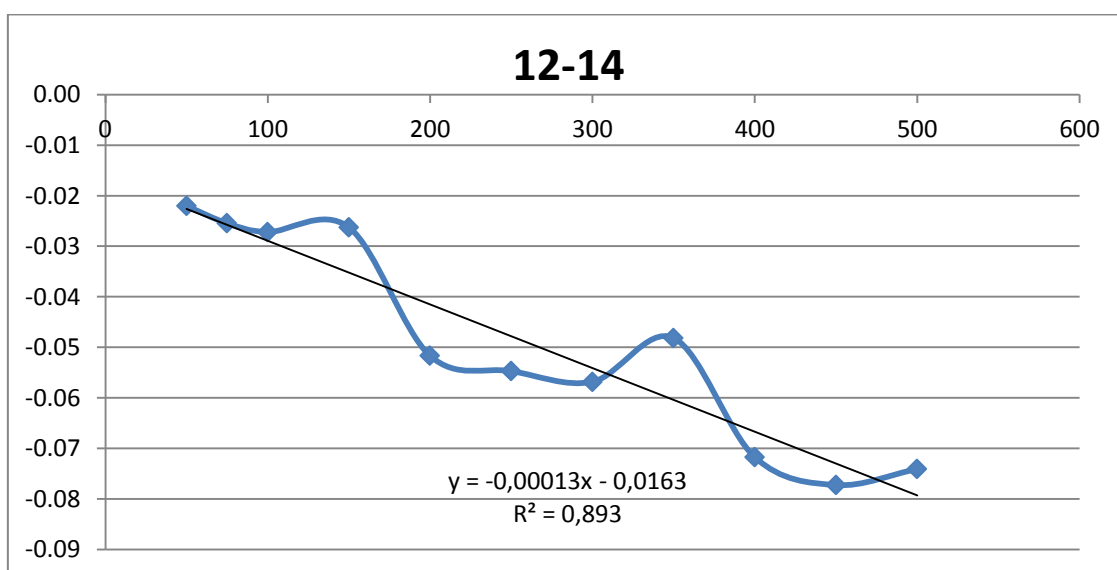
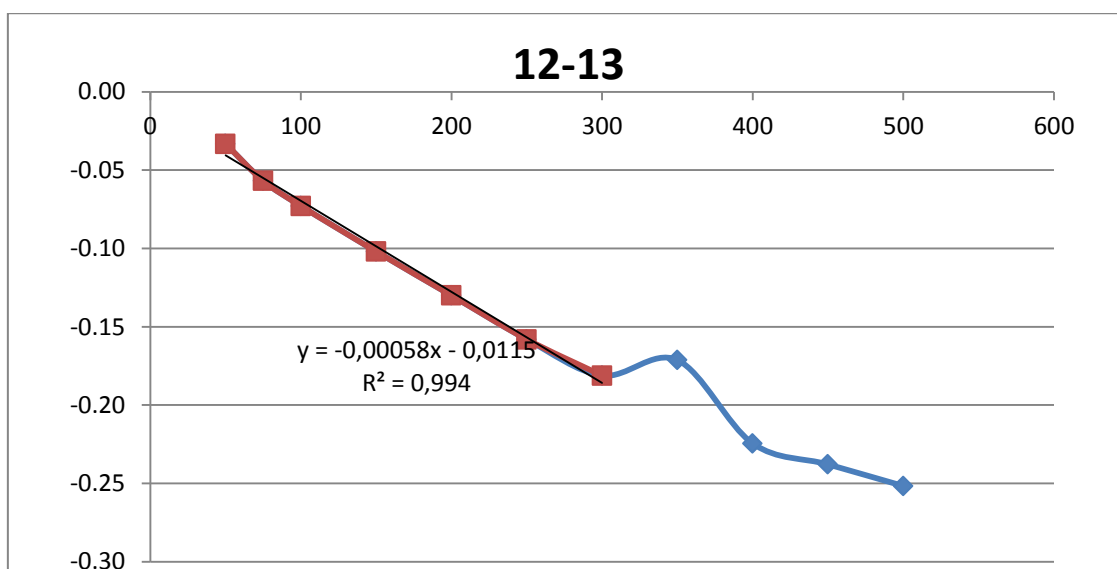
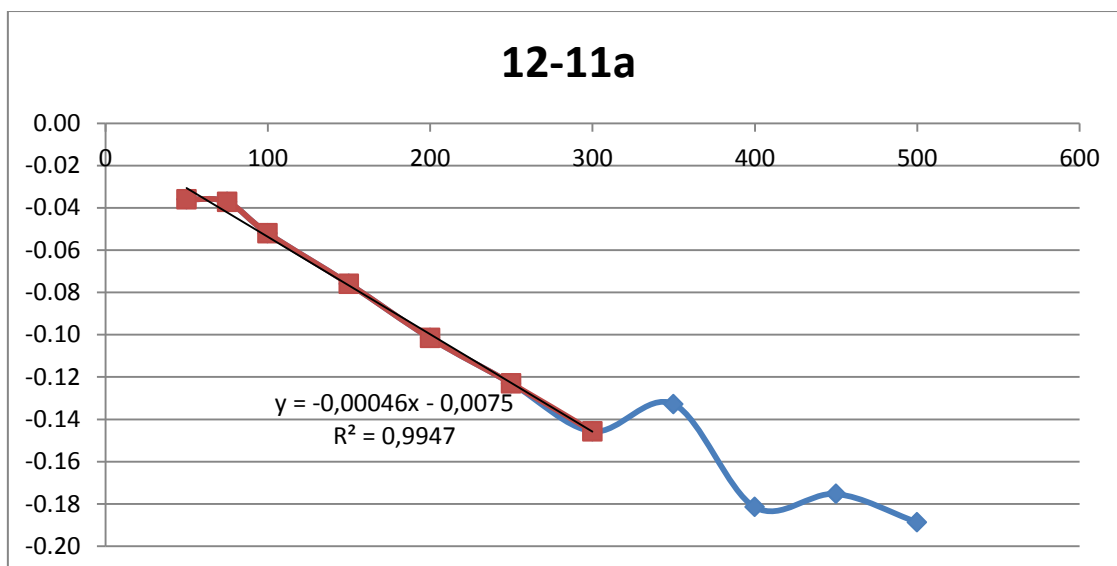
Liite 12: Brusiinin määritetyt NOESY-kuvaajien kulmakertoimet ja niiden avulla lasketut etäisyydet

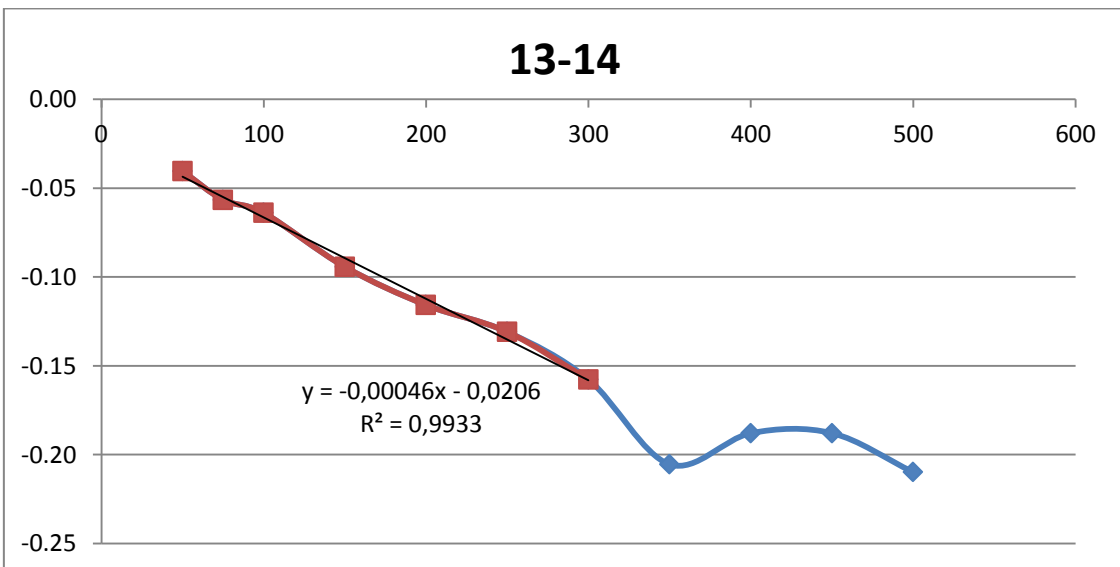
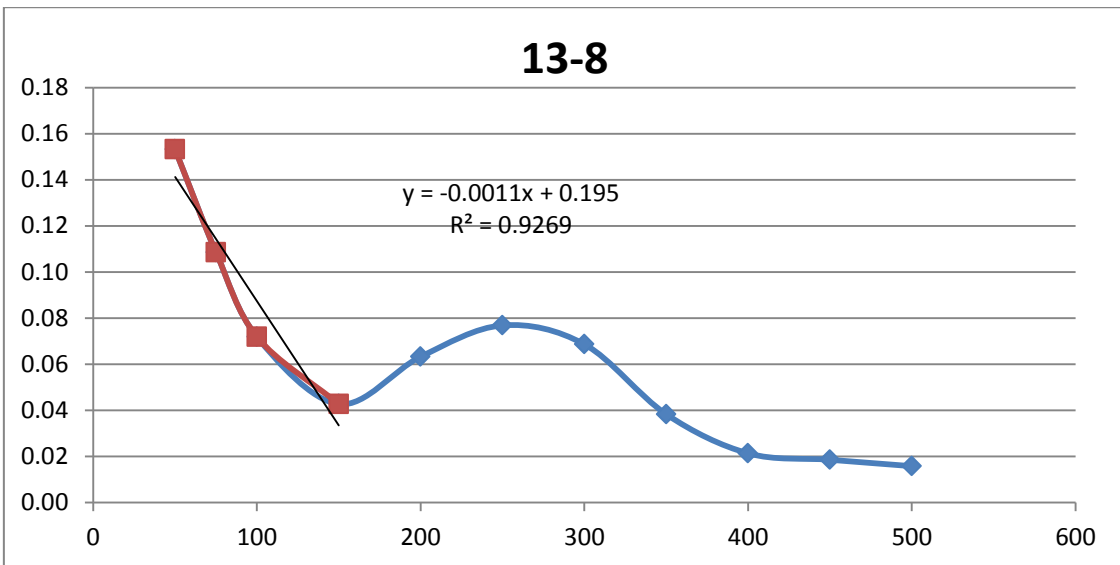
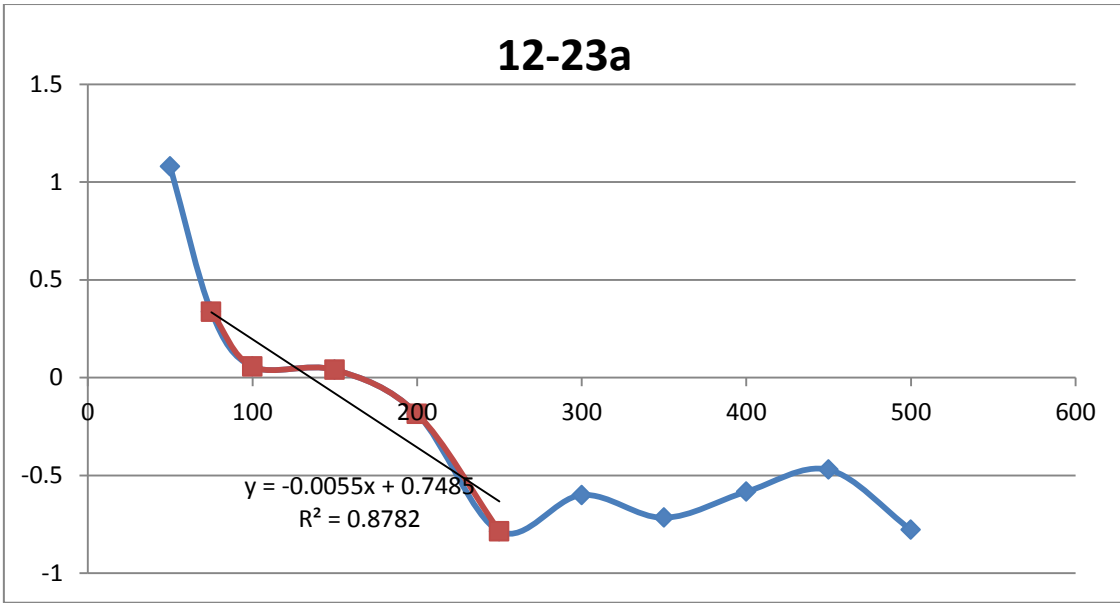
Ytimet	Kulmakerroin	GAUSSIAN	Kokeellinen
1-Ome	-0,0013	2,32	2,08
4-Ome	-0,0008	2,32	2,24
8-13	-0,0011	3,01	2,14
8-17a	-0,00062	2,41	2,34
11a-12	-0,000087	2,35	3,25
12-11a	-0,00046	2,35	2,46
12-13	-0,00058	2,35	2,37
12-14	-0,00013	2,73	3,05
12-23	-0,0055	2,3	1,63
13-14	-0,00046	2,41	2,46
13-8	-0,0011	3,01	2,14
14-13	-0,00051	2,41	2,42
14-15a	-0,00019	2,48	2,84
14-23a	-0,0002	2,6	2,83
15-15	-0,0034	1,76	1,76
15-15	-0,0041	1,76	1,71
15a-16	-0,00015	2,48	2,96
15b-14	-0,00031	2,55	2,63
15b-16	-0,00023	2,48	2,76
15b-20b	-0,0011	2,24	2,13
16-15a	-0,00034	2,48	2,58
17a-1	-0,00026	2,78	2,75
17b-1	-0,00024	2,39	1,66
17a-18a	-0,0016	2,43	2,01
17a-18b	-0,0019	2,73	1,95
17a-8	-0,00055	2,41	2,39
17b-8	-0,00011	3,61	3,12
18-18	-0,0611	1,77	1,09
18-18	-0,0887	1,77	1,02
18b-16	-0,00041	3,63	2,51
18b-17b	-0,00018	3,06	2,87
18b-20b	-0,0014	2,45	2,01
18b-8	-0,00029	2,37	2,46
20a-22	-0,00062	2,39	2,34
20b-15b	-0,00083	2,24	2,23
20b-20a	-0,0021	1,76	1,9
22-14	-0,00053	3,86	2,4
22-23b	-0,0003	2,39	2,64
23a-14	-0,00024	2,6	2,48
23b-22	-0,00058	2,39	2,36
Ome-1	-0,0014	2,32	2,05
Ome-4	-0,00072	2,32	2,28

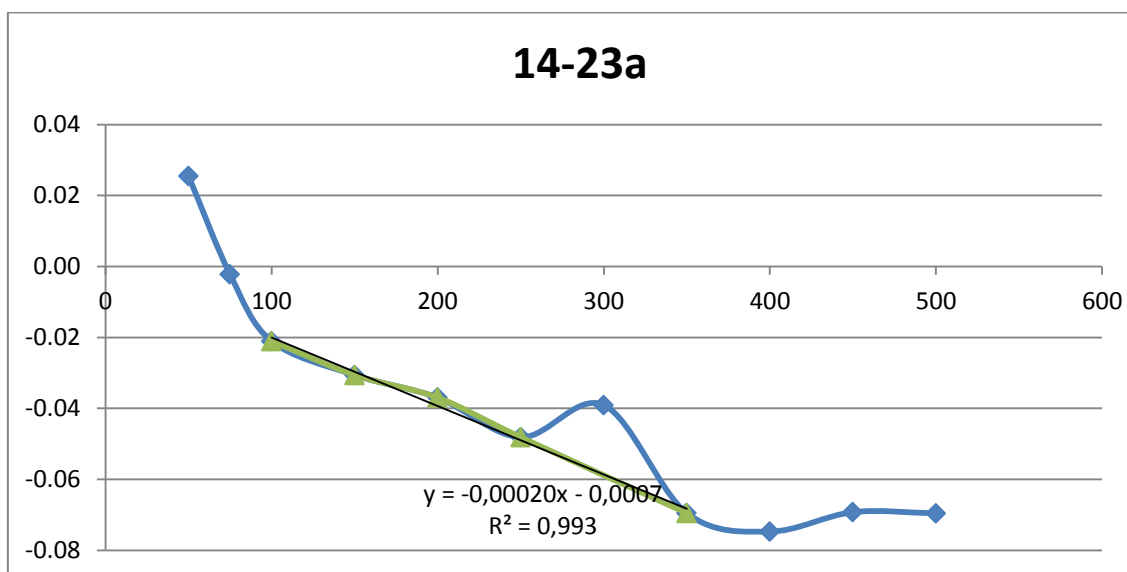
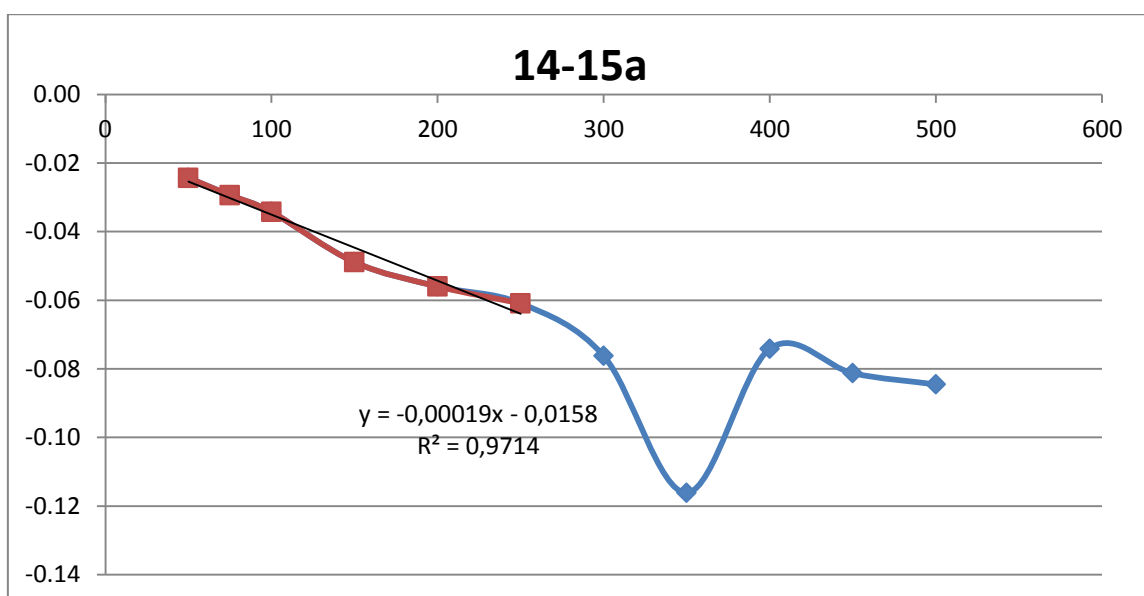
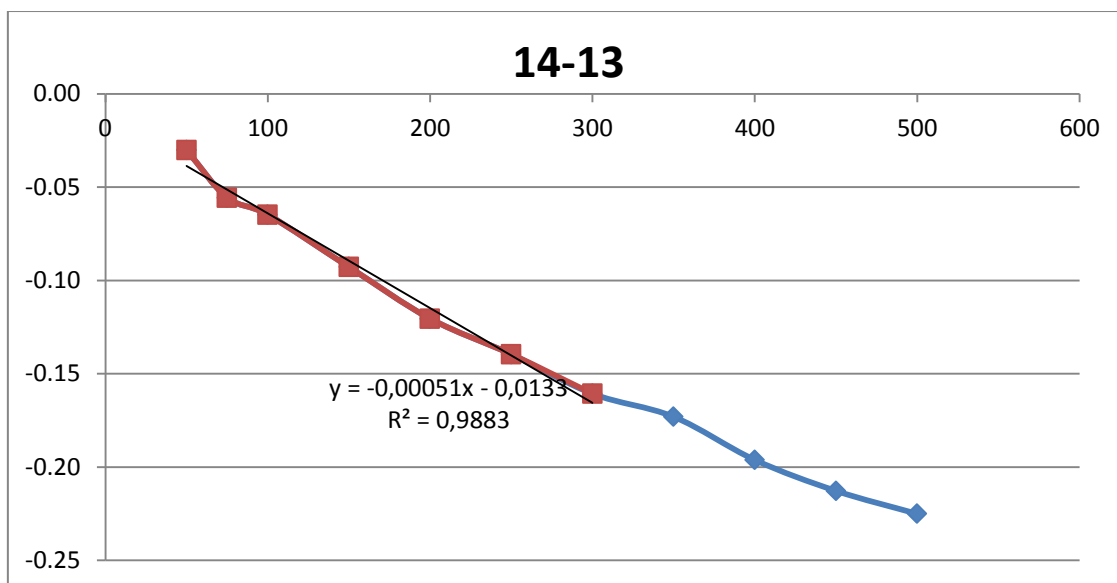
Liite 13: Brusiinin NOESY-kuvaajat ja kulmakertoimet vireyksittäin intensiteetin ja sekoitusajan funktiona

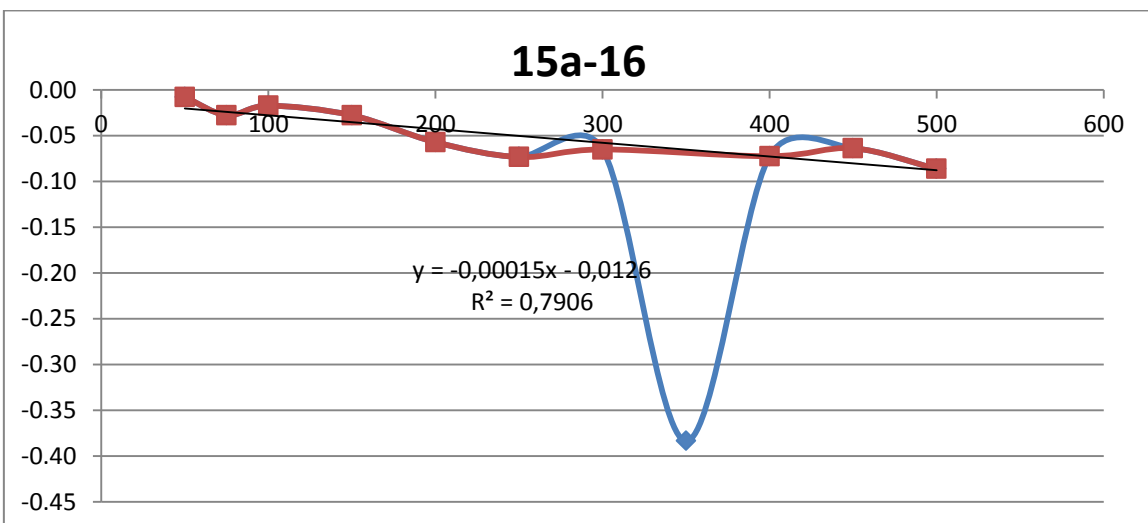
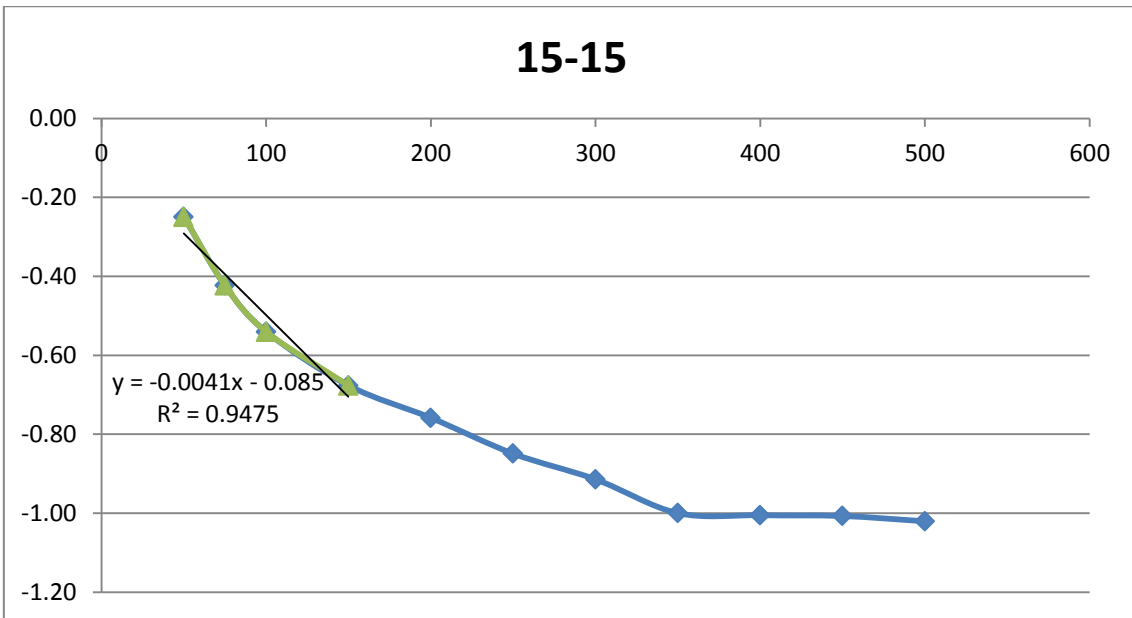
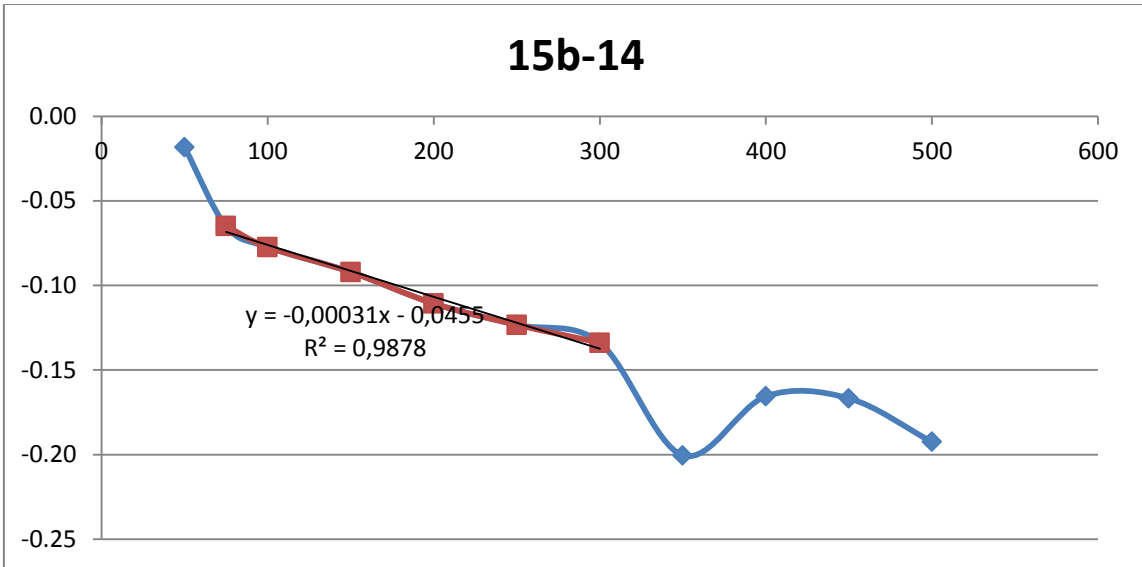


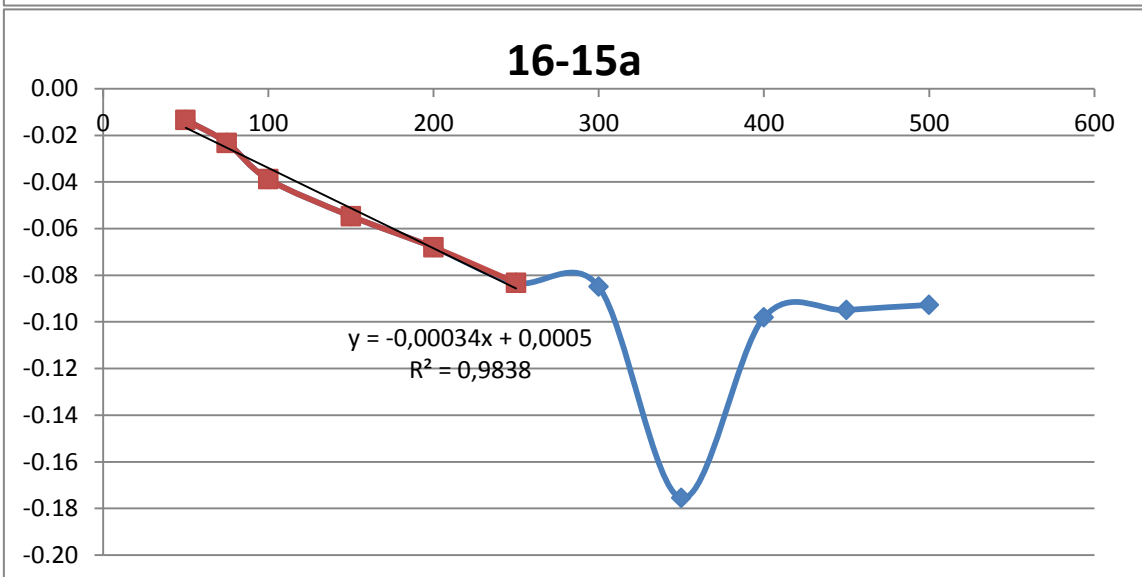
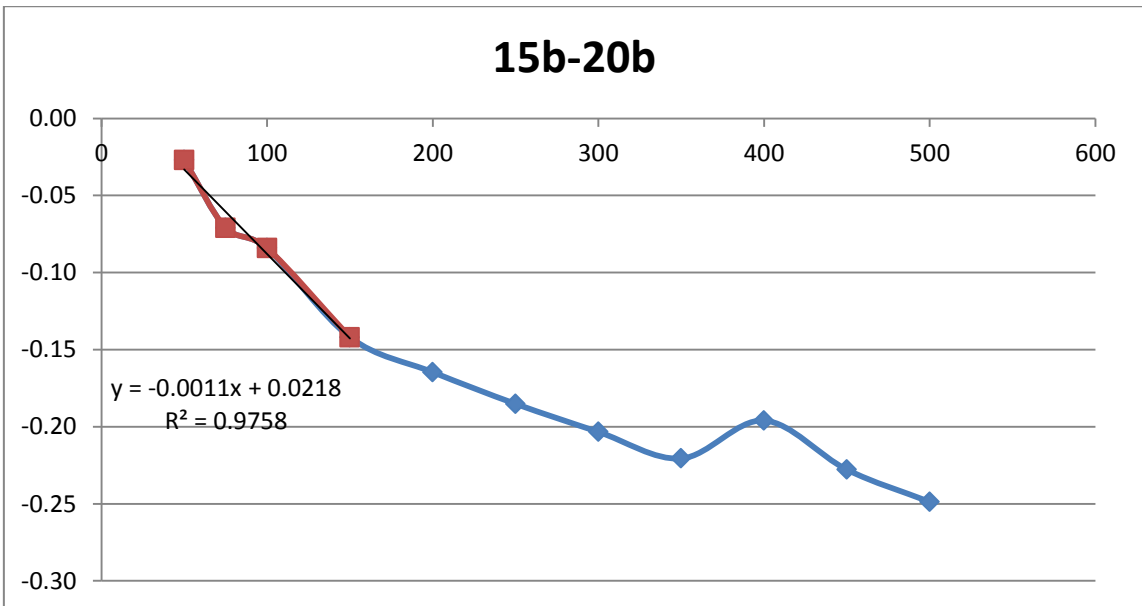
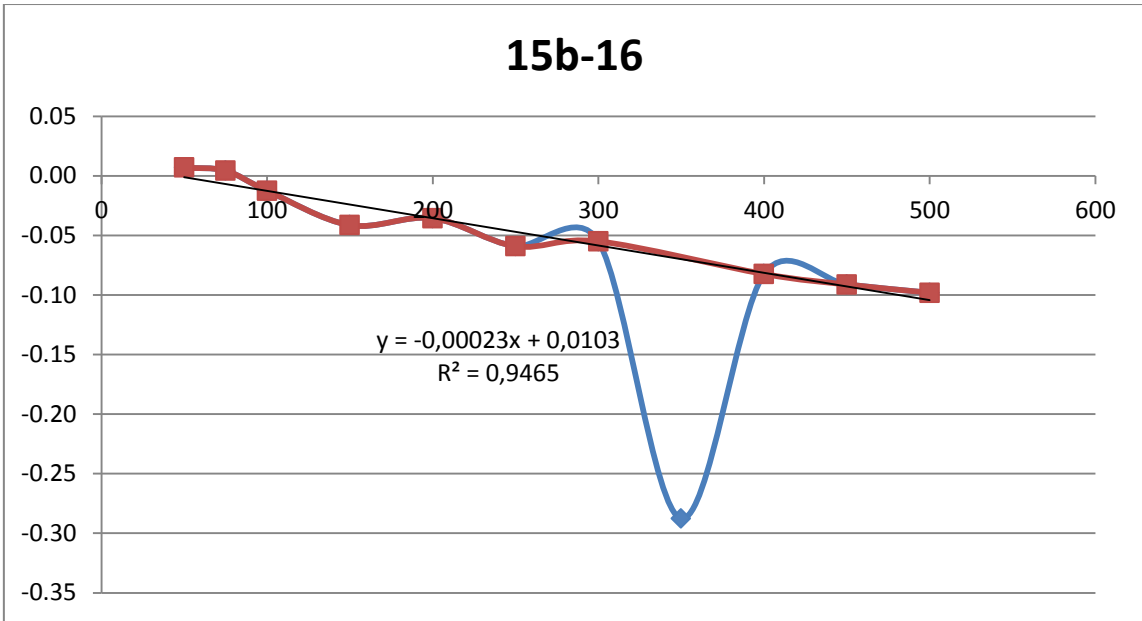


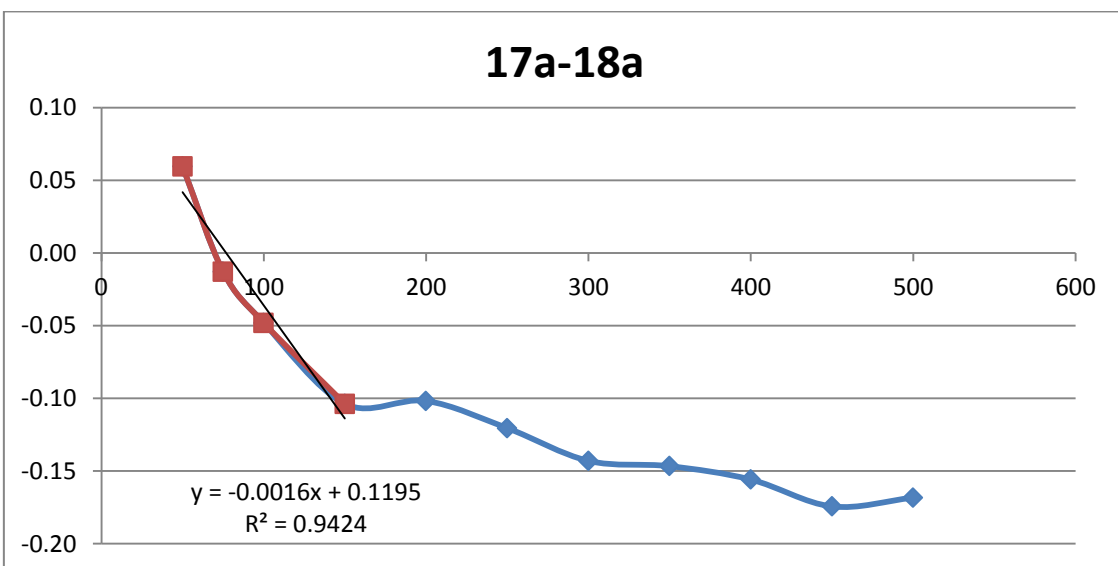
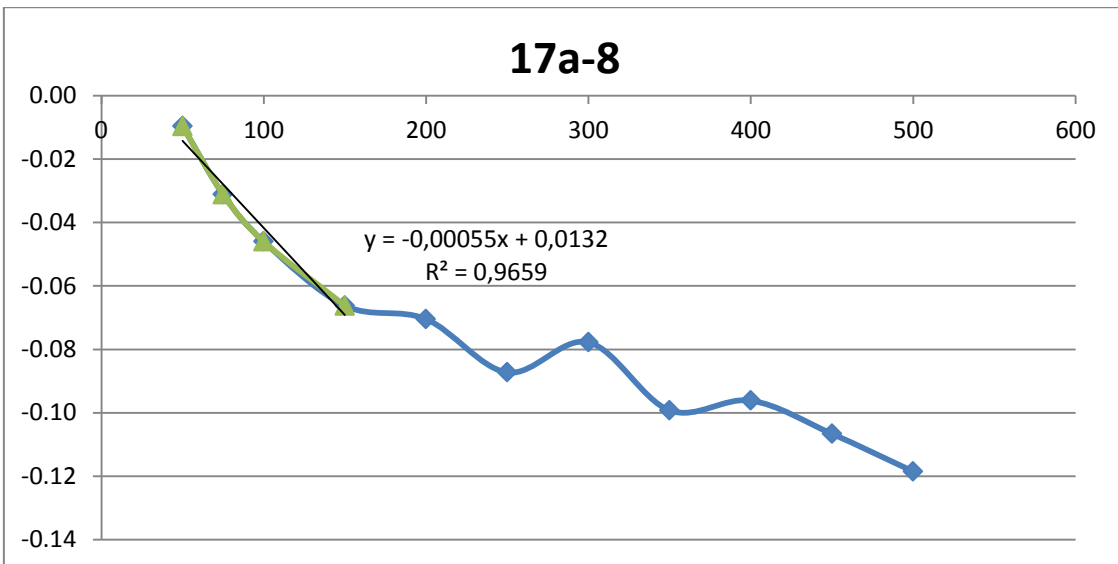
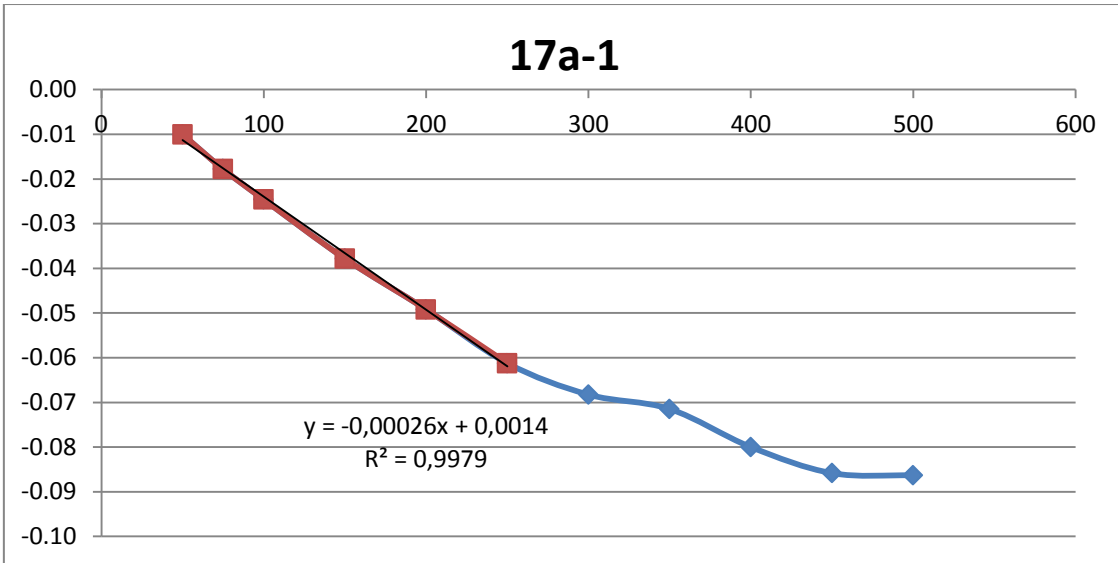


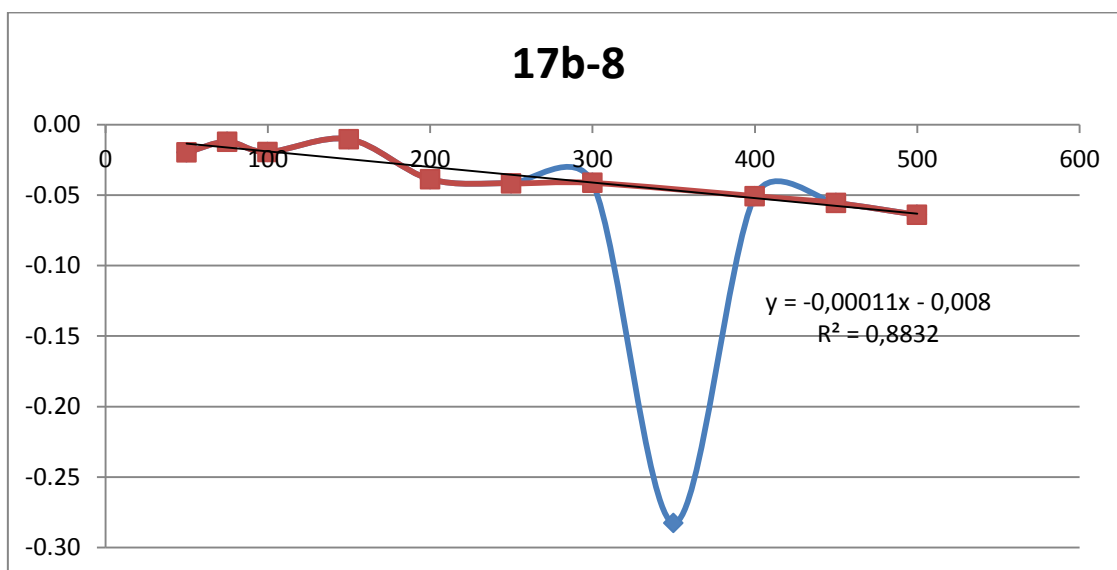
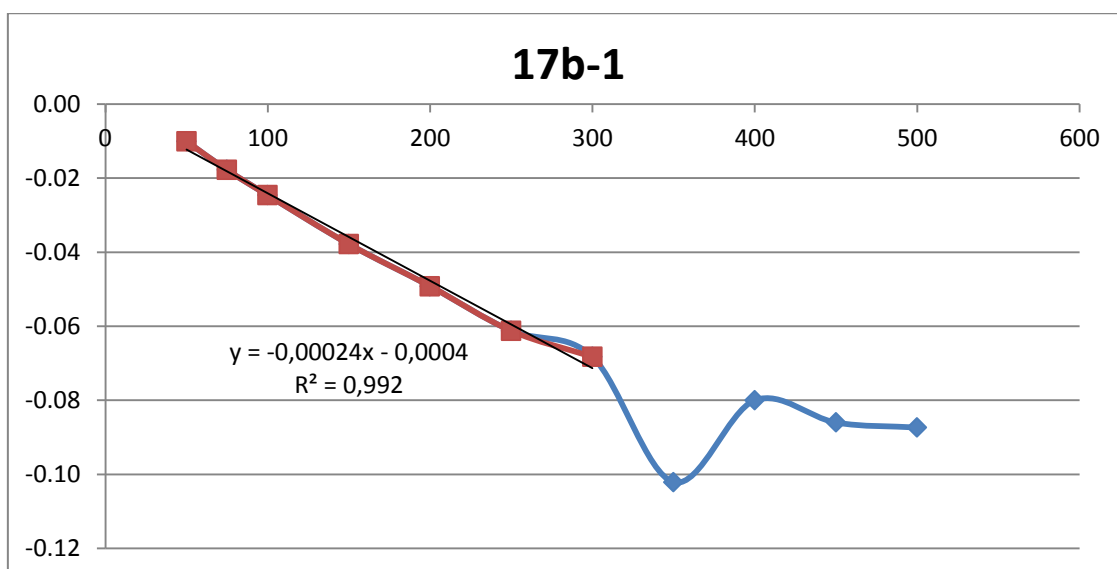
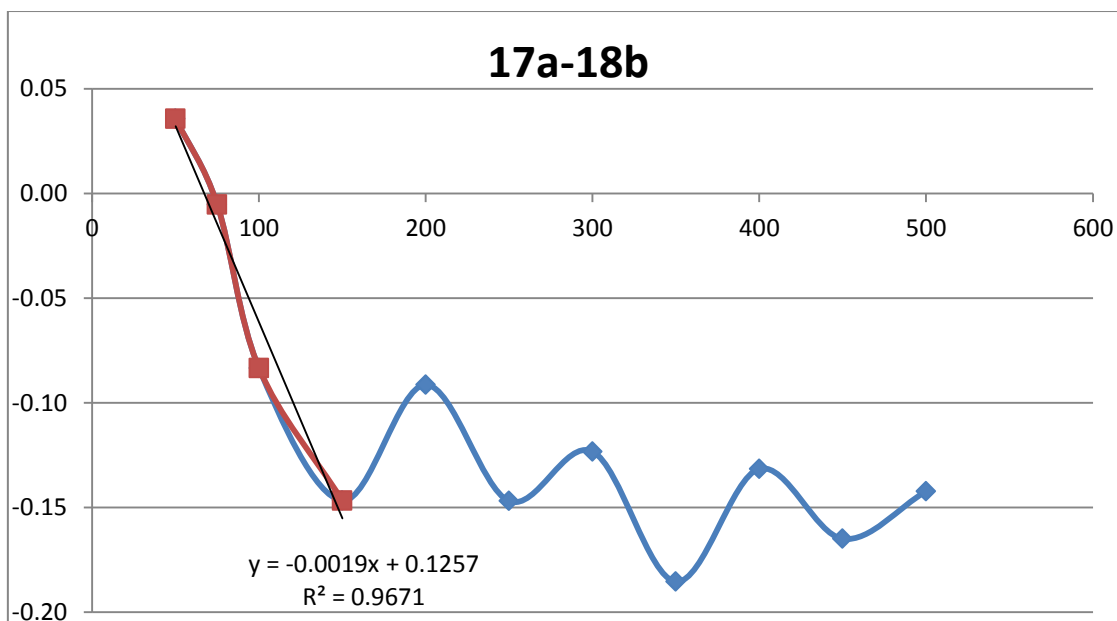


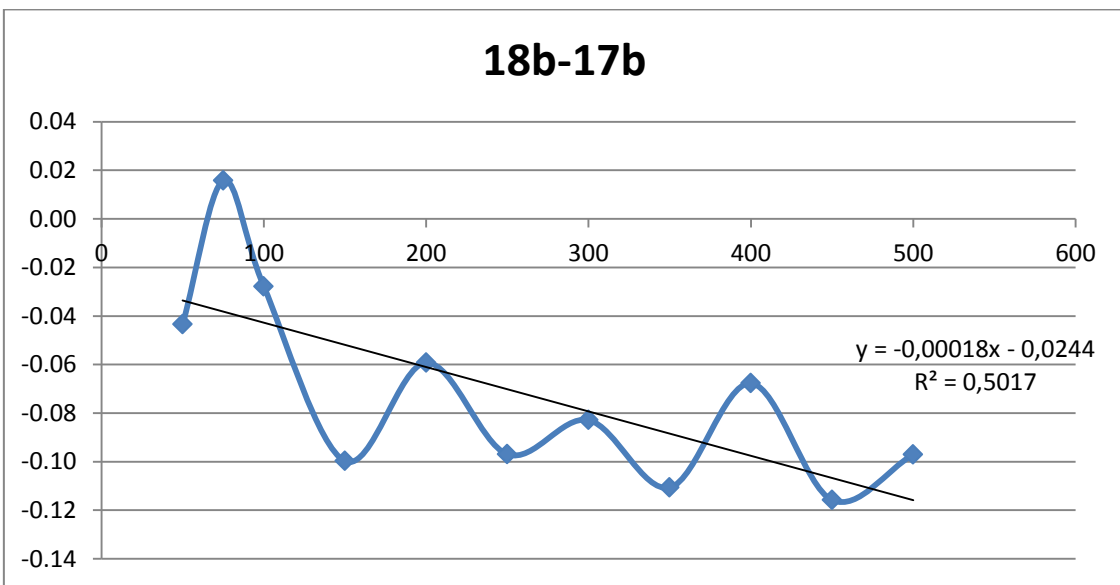
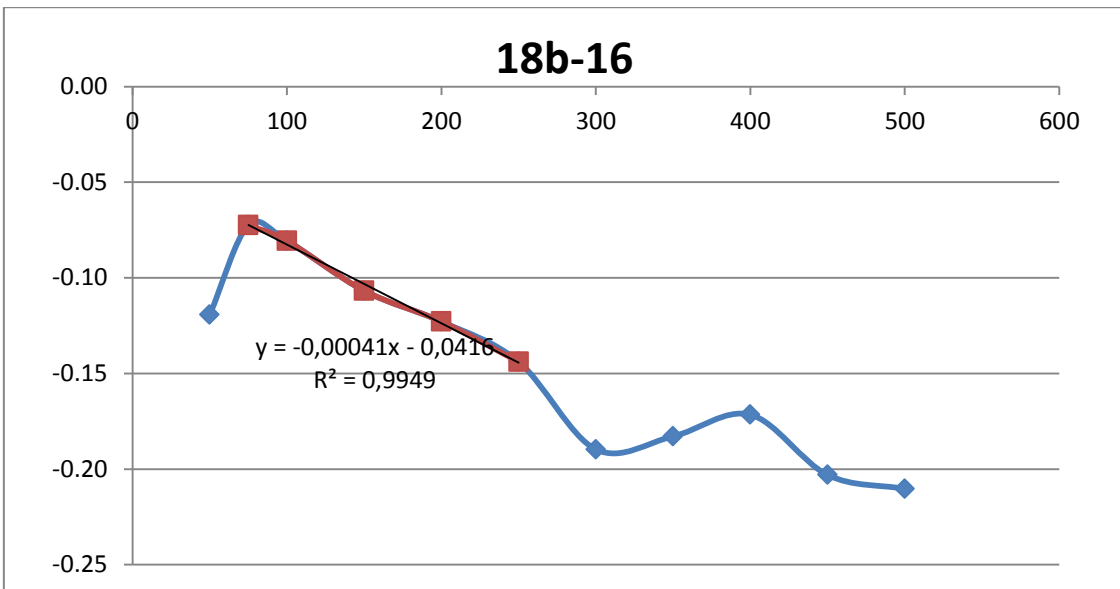
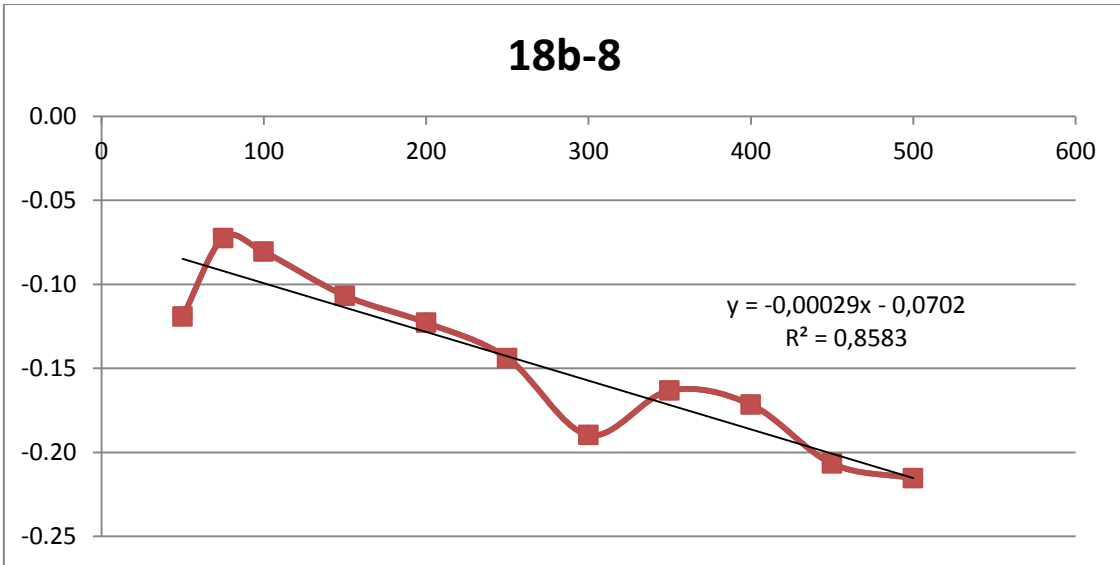


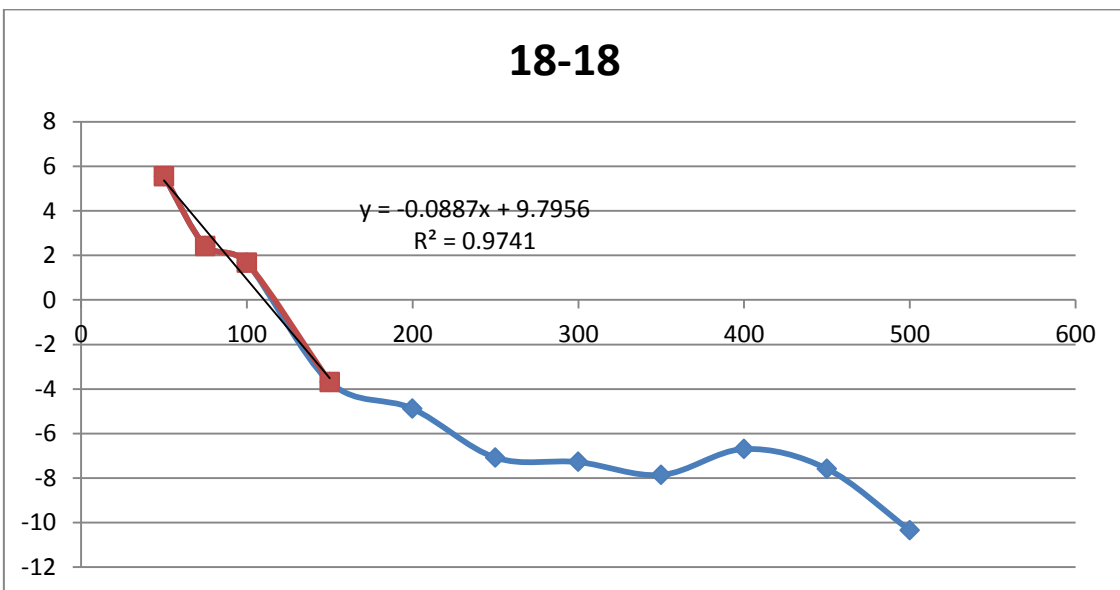
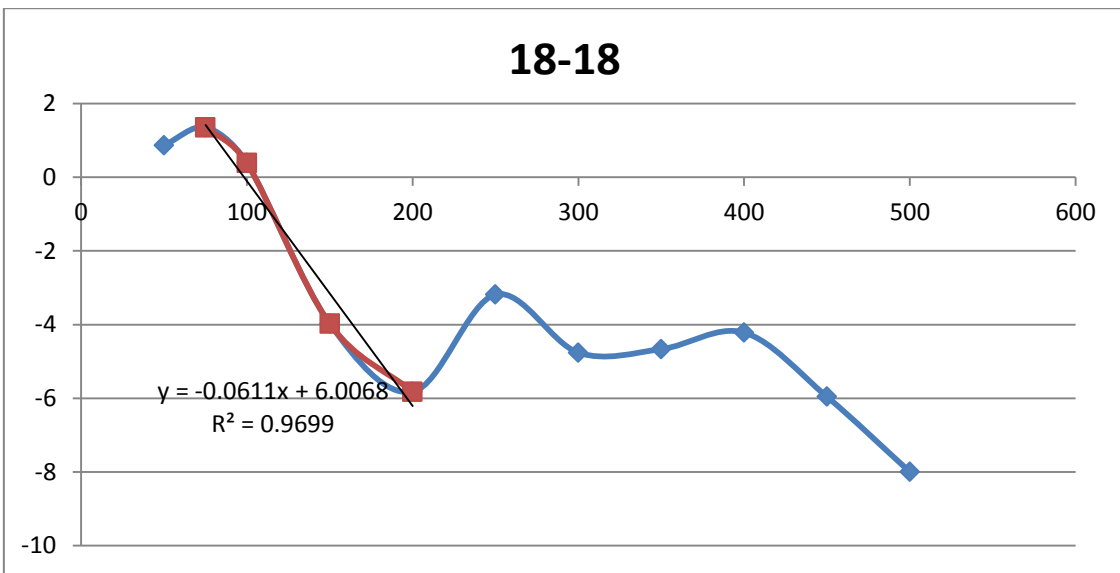
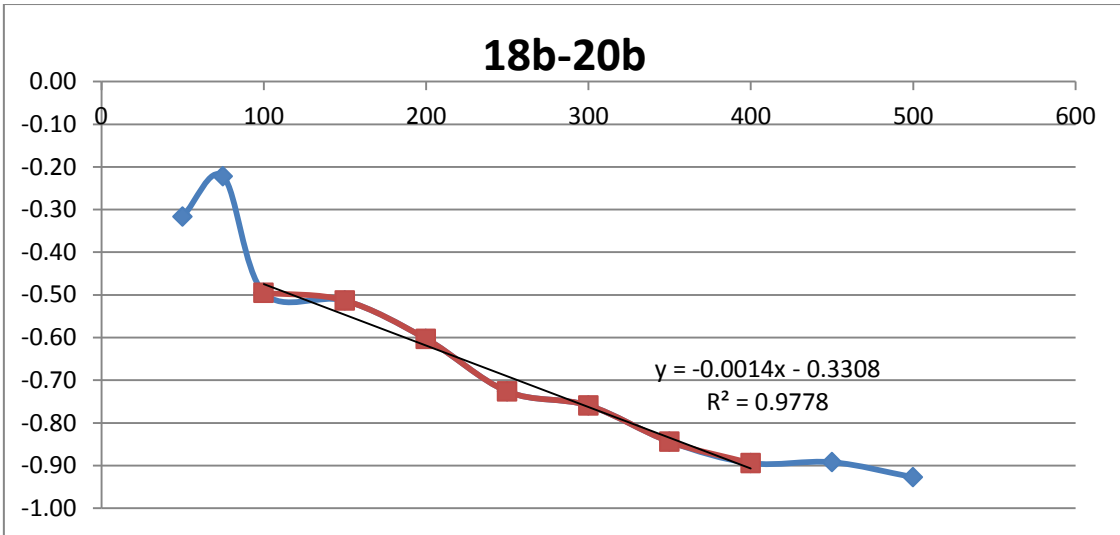


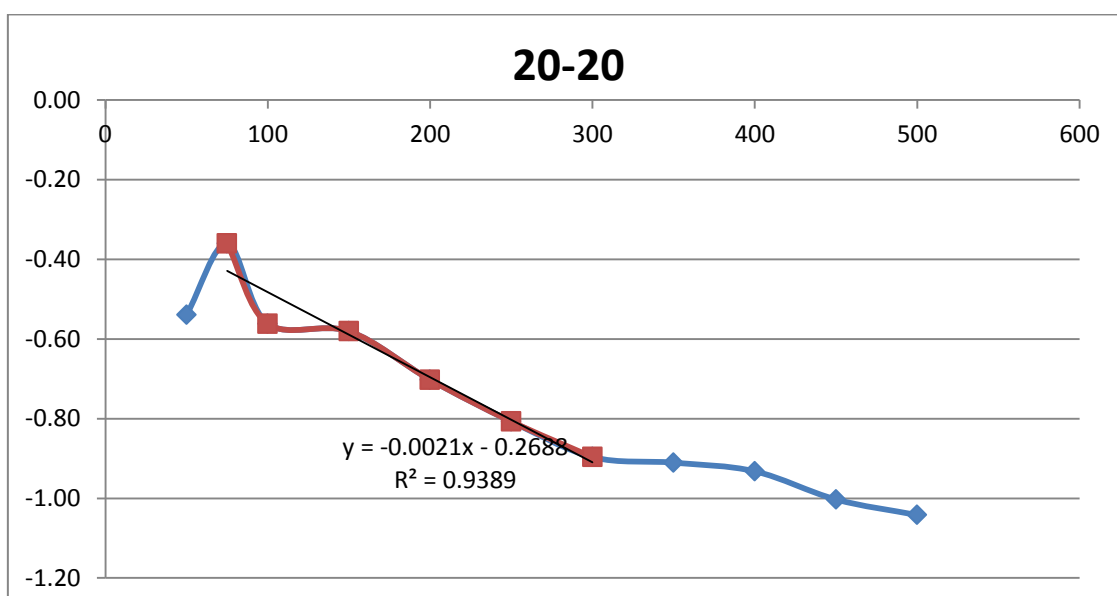
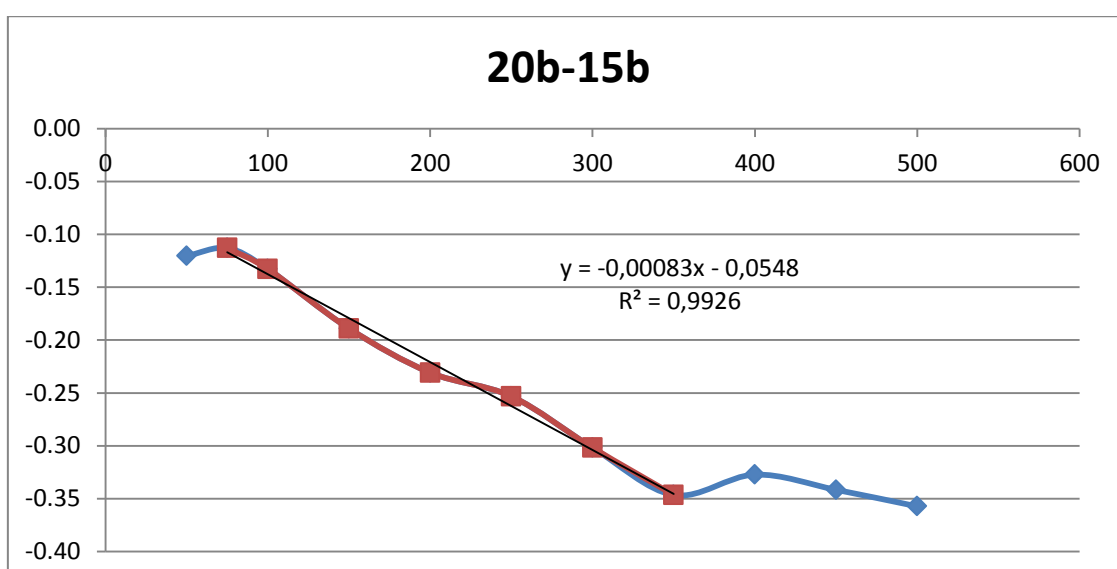
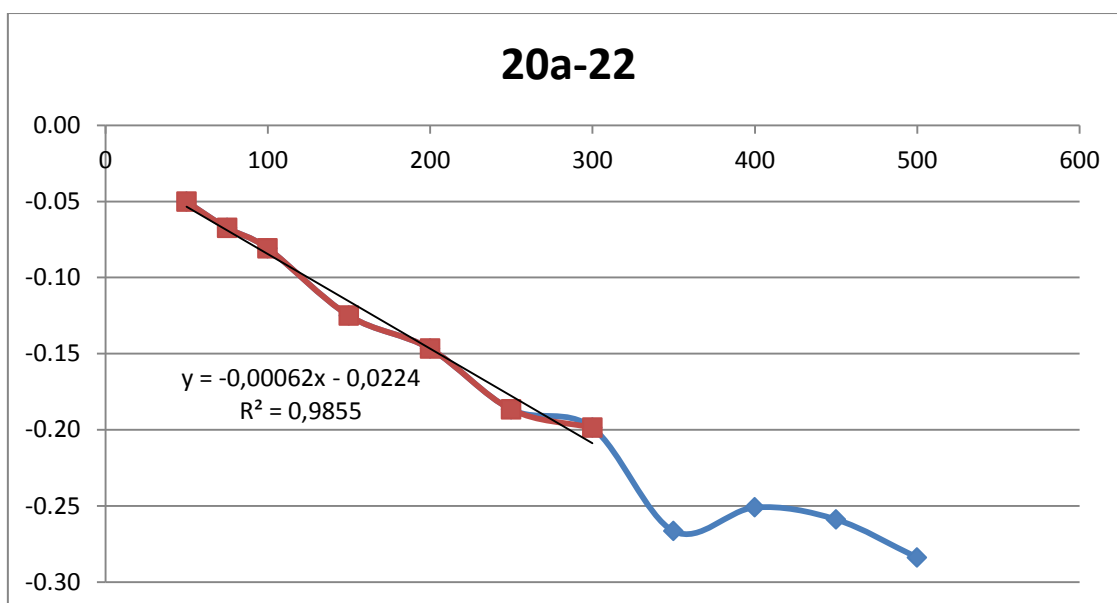


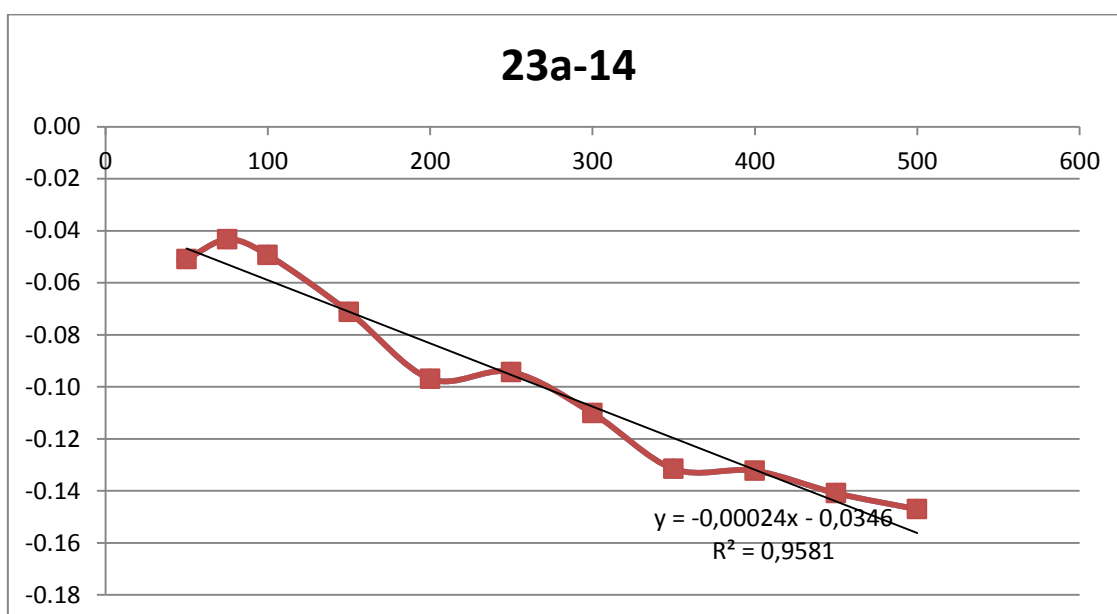
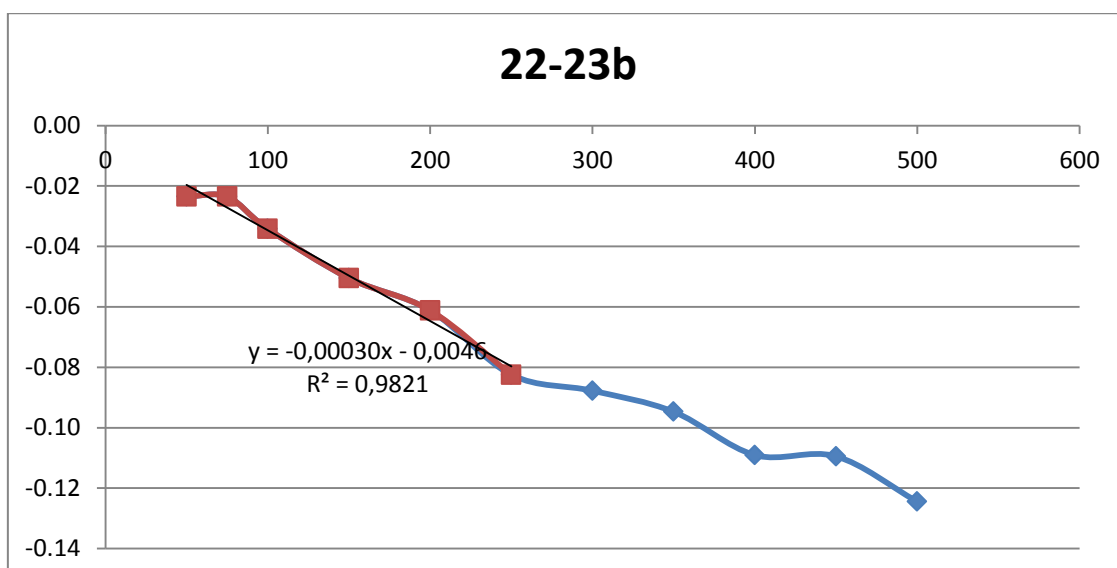
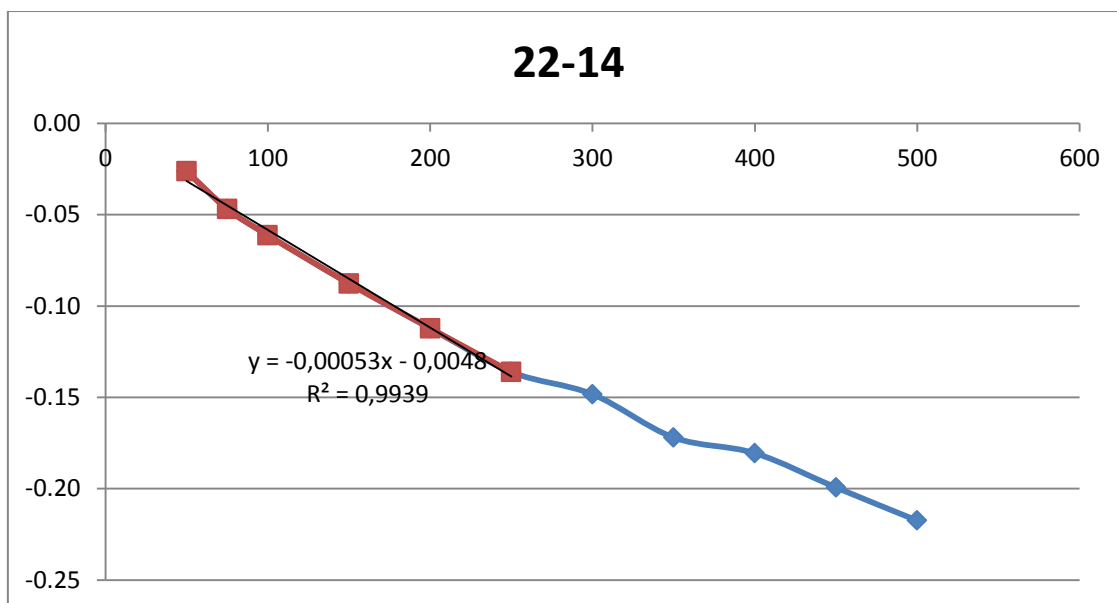


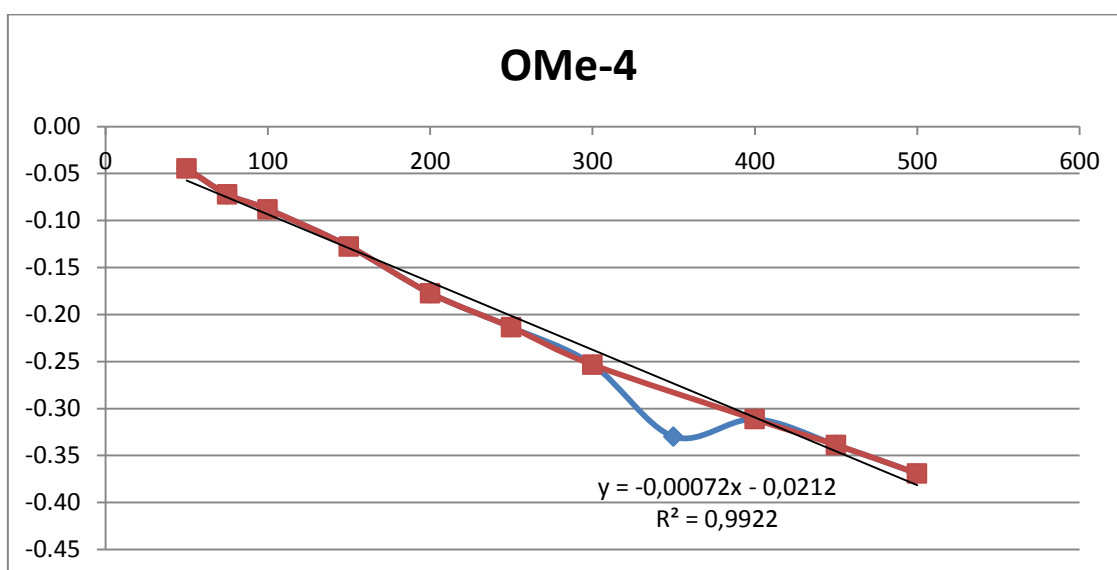
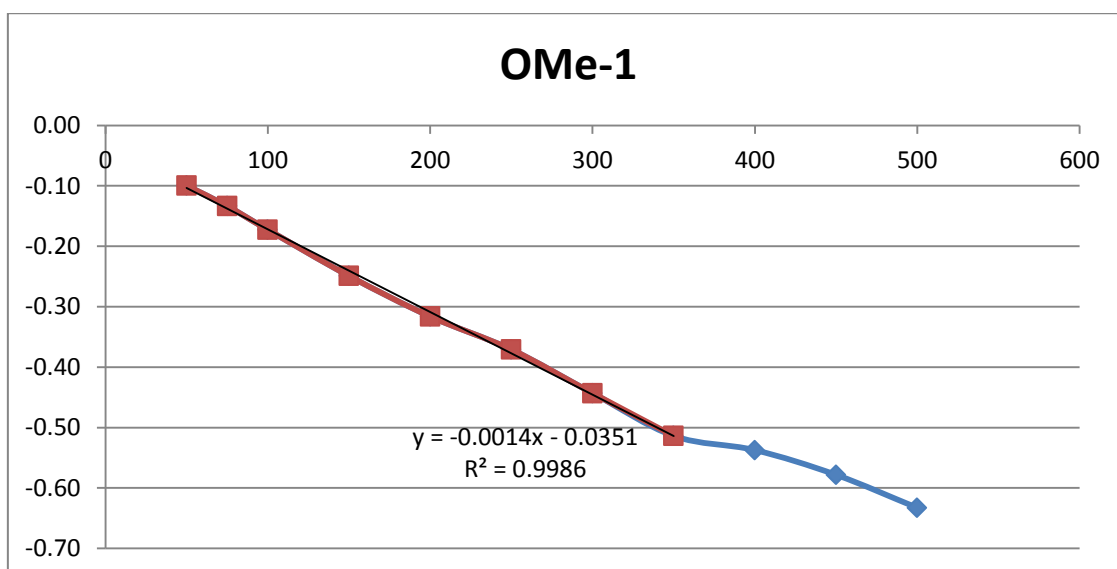
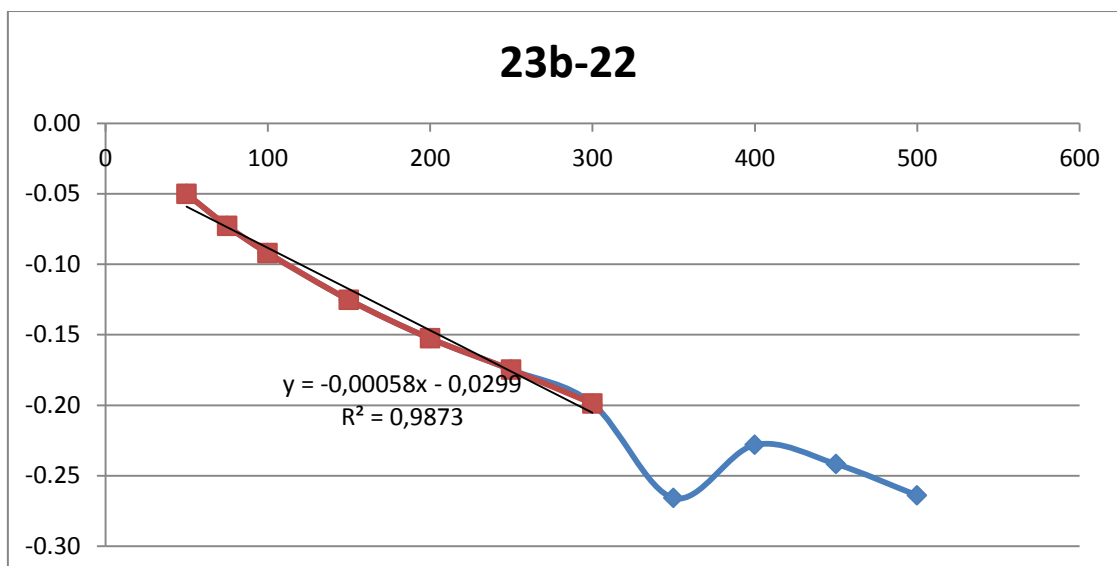








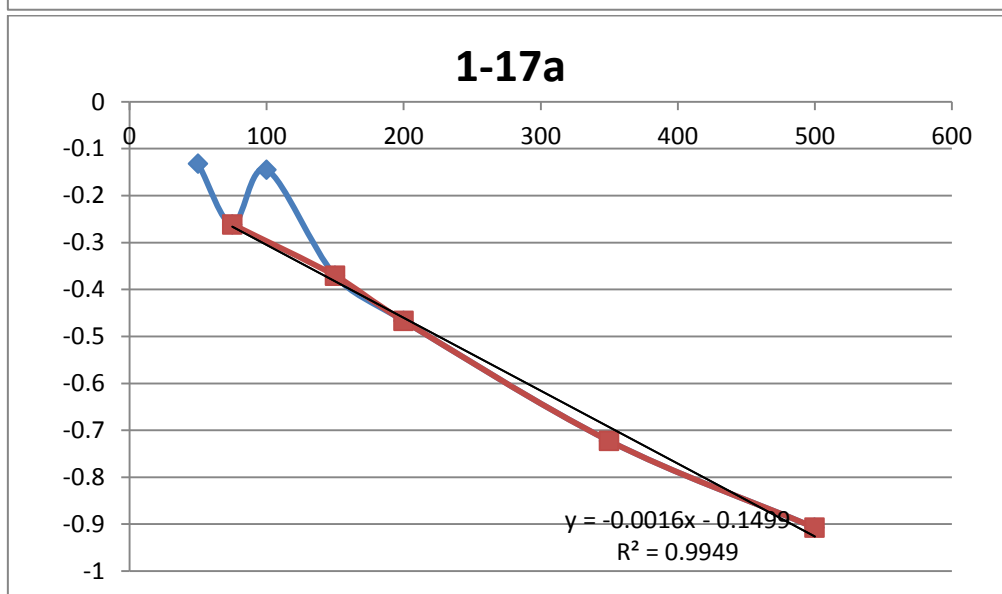
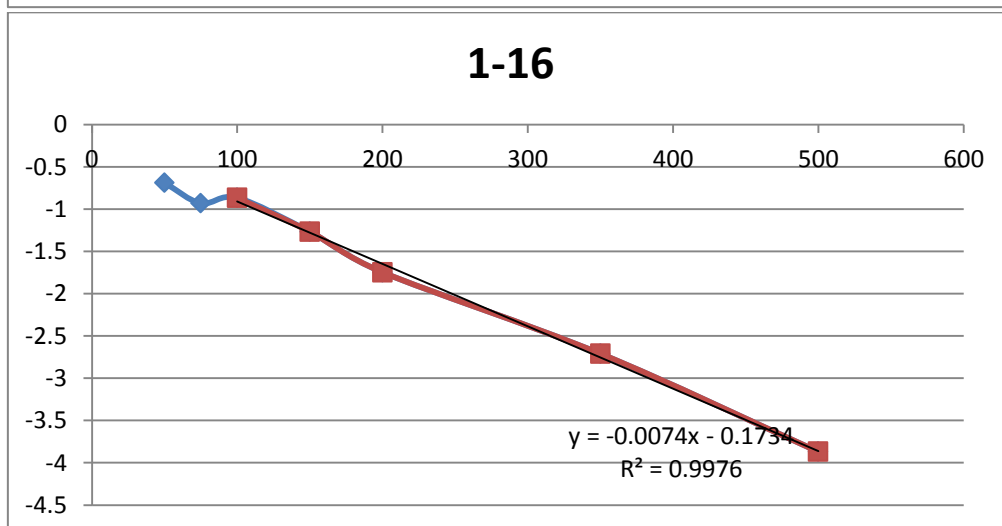
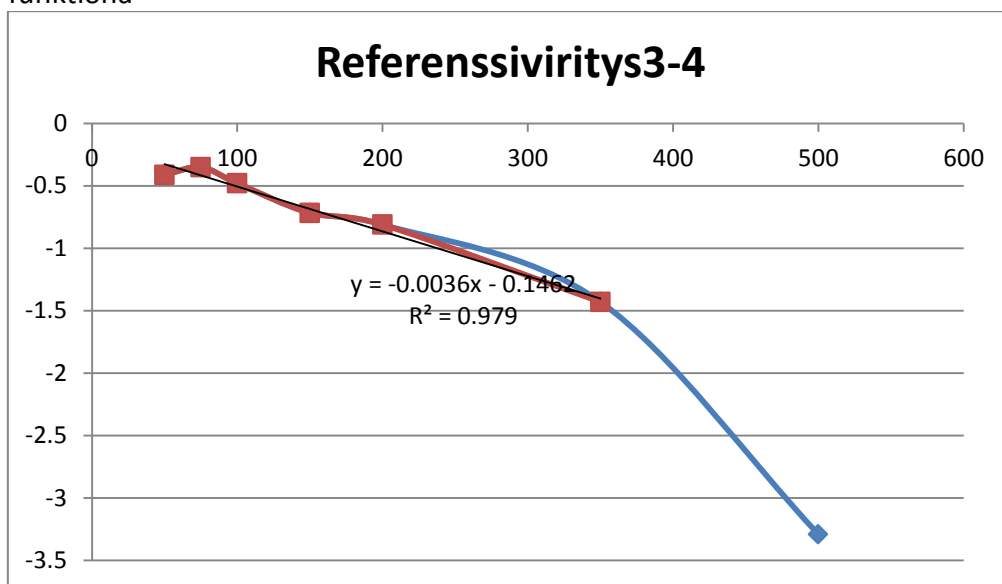


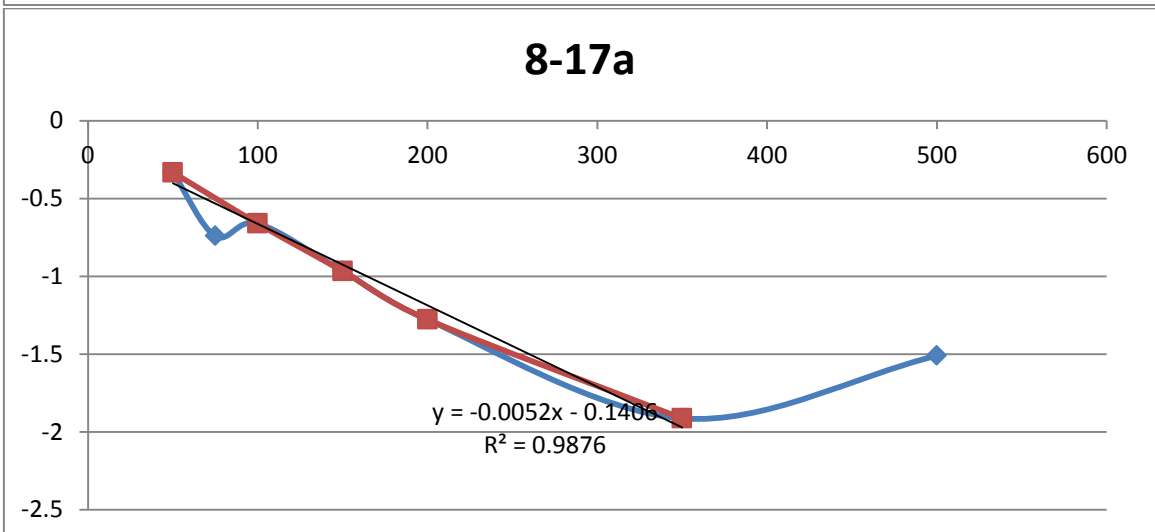
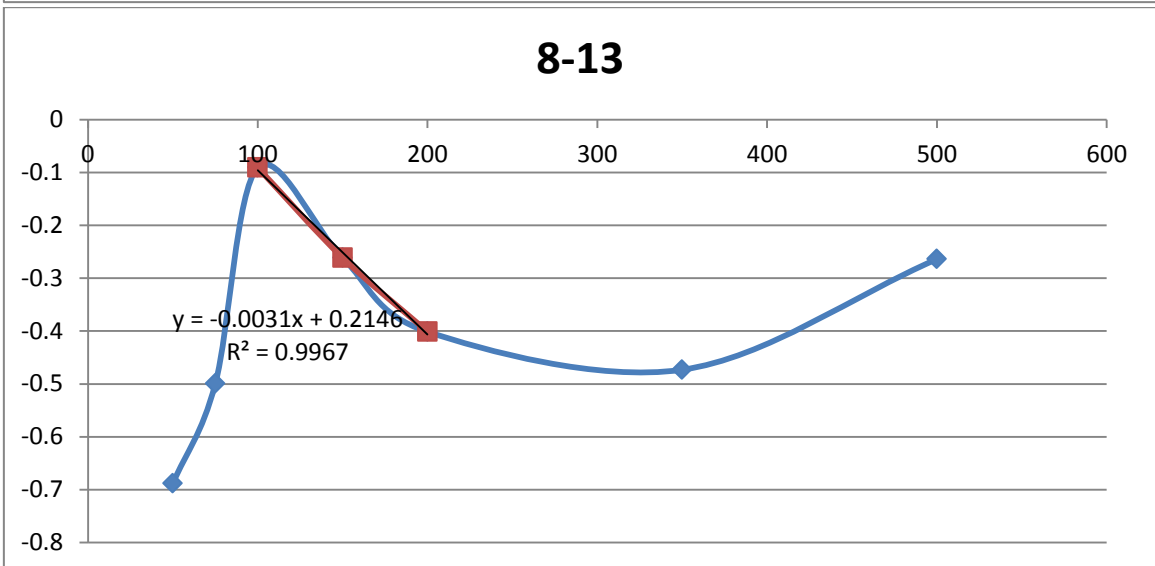
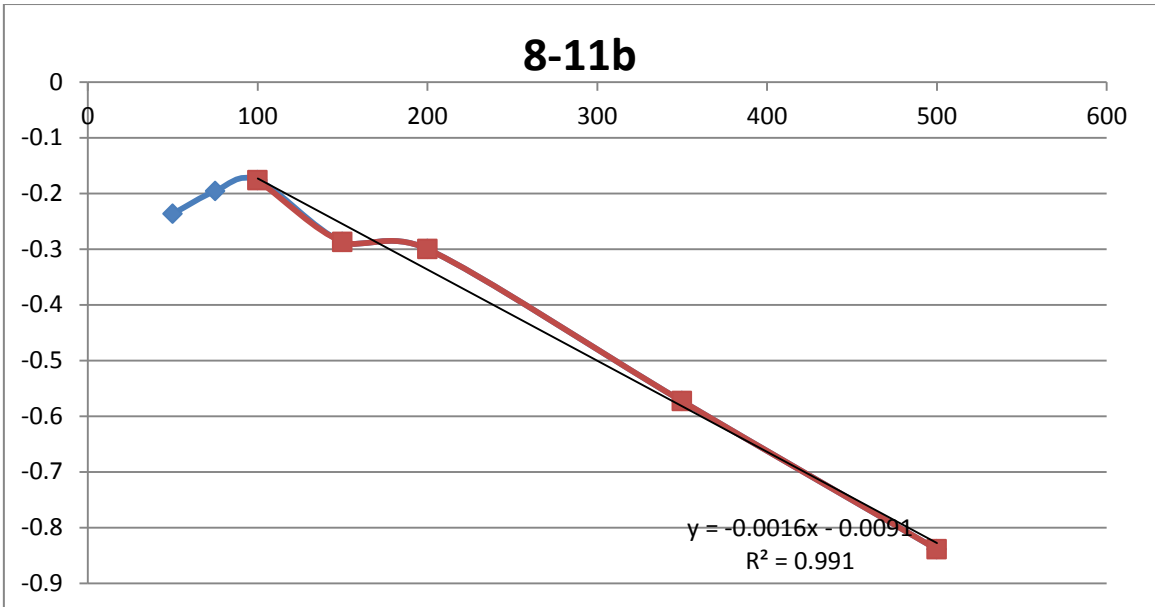


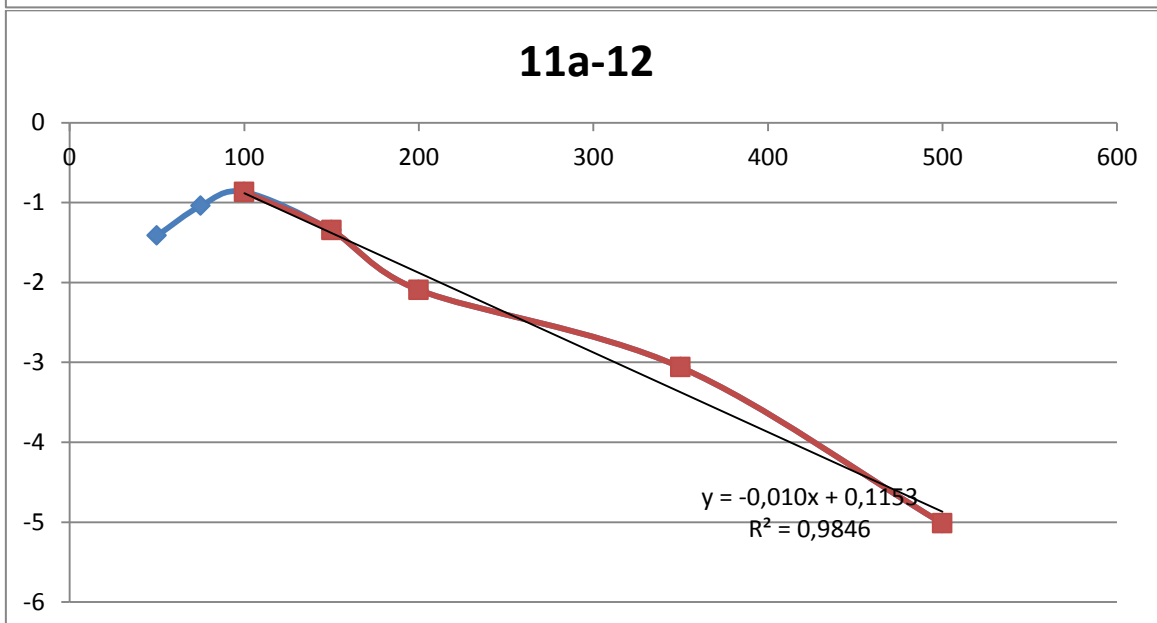
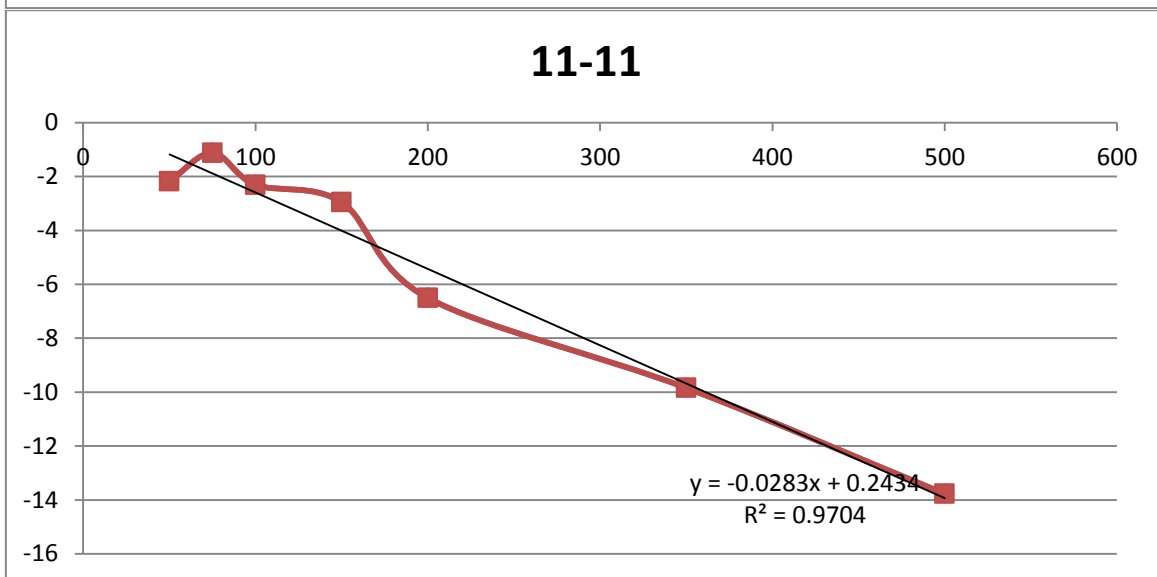
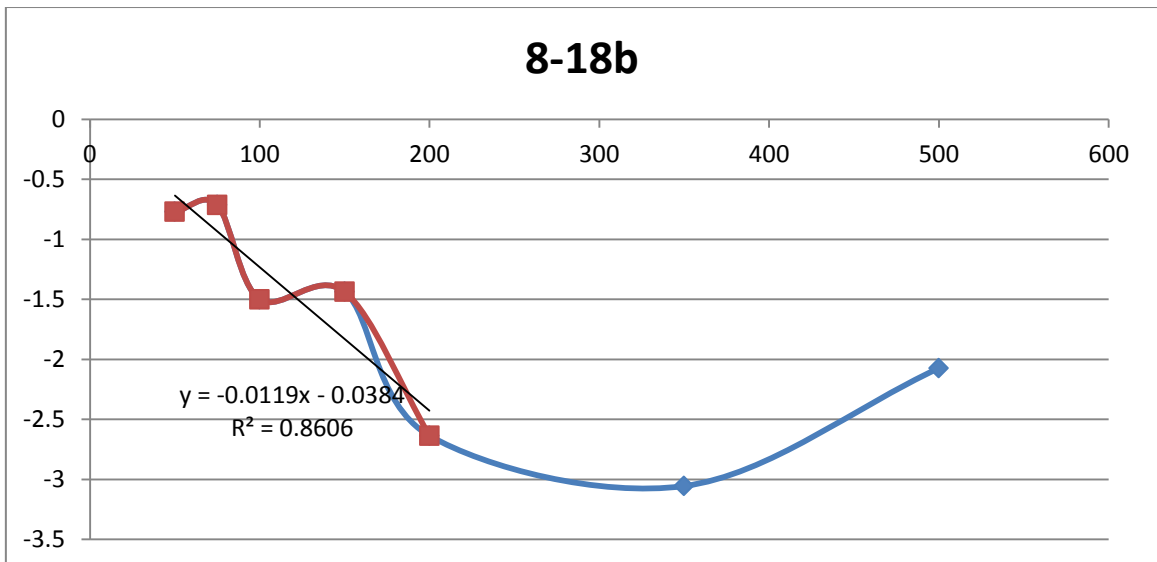
Liite 14: Strykniinin määritetyt NOESY-kuvaajien kulmakertoimet ja niiden avulla lasketut etäisyydet

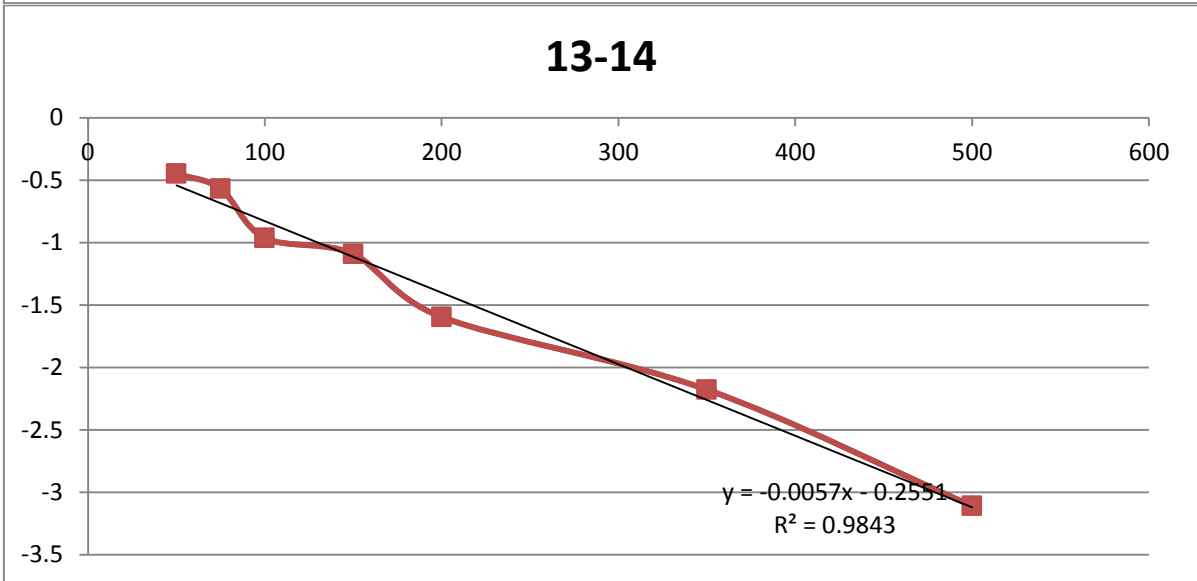
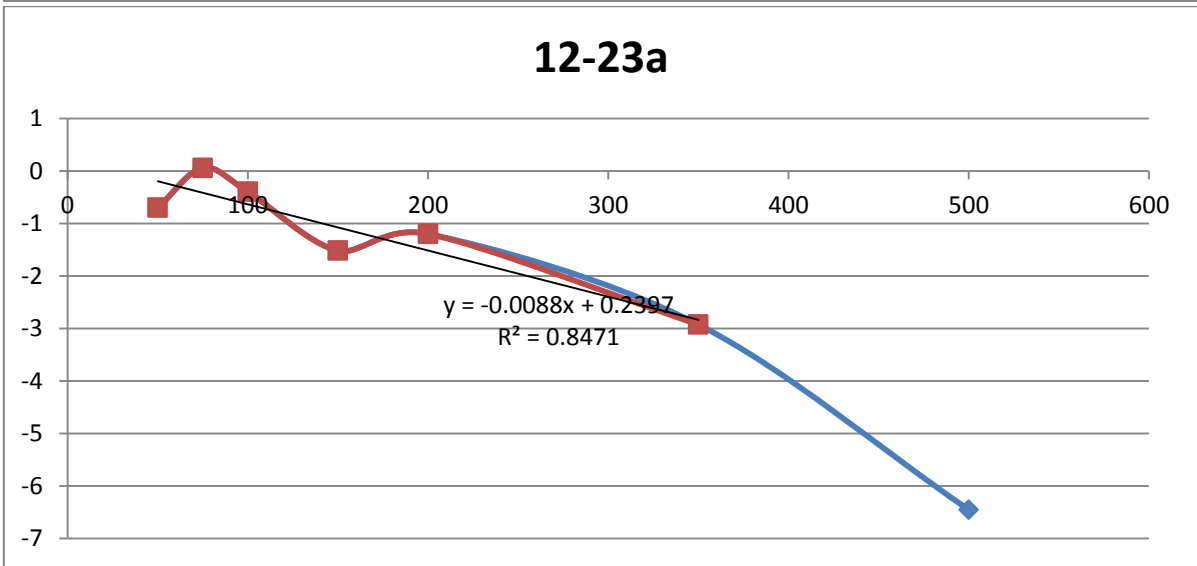
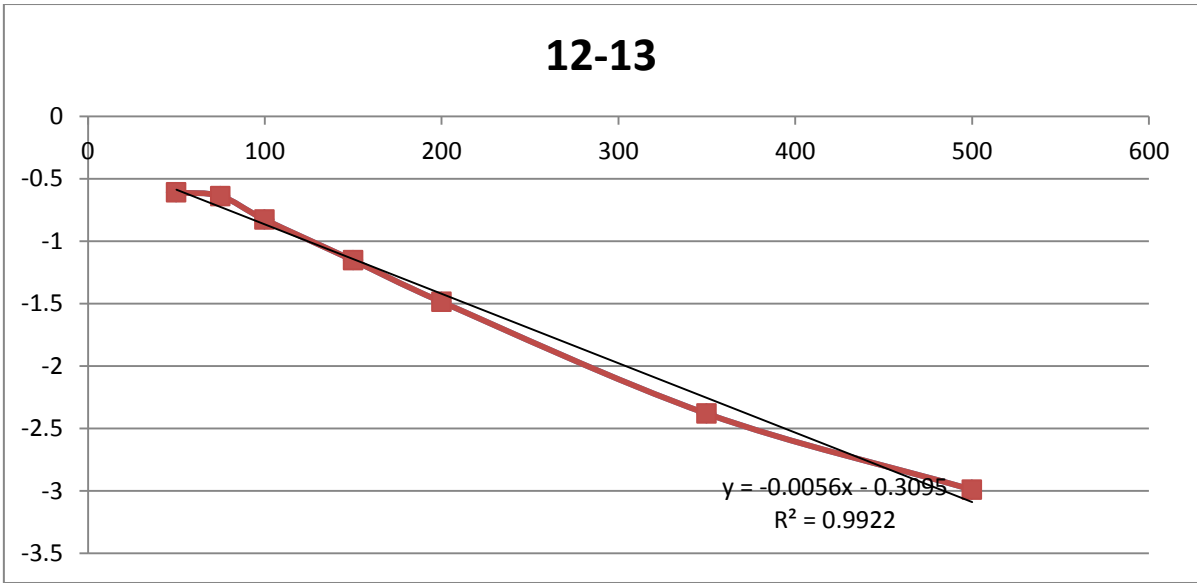
Ytimet	Kulmakerroin	GAUSSIAN etäisyys (Å)	Kokeelliset etäisyys (Å)
1-16	-0,0074	2,38	2,2
1-17a	-0,0016	2,78	2,67
3-4	-0,0036	2,49	---
8-11b	-0,0016	2,67	2,77
8-13	-0,0031	3,01	2,34
8-17a	-0,0052	2,41	2,95
8-18b	-0,012	2,38	2,04
11a-11b	-0,0283	1,76	1,76
11a-12	-0,01	2,35	2,1
12-13	-0,0056	2,35	2,31
12-23a	-0,0088	2,29	1,74
13-14	-0,0057	2,41	2,3
13-15a	-0,011	2,26	2,07
14-15a	-0,0075	2,55	2,56
14-15b	-0,003	2,48	2,2
14-23a	-0,0029	2,6	2,58
15a-15b	-0,0292	1,76	1,76
15b-20b	-0,0069	2,24	2,52
15a-16	-0,003	2,48	2,31
16-17a	-0,0021	2,71	2,72
17a-18b	-0,0063	2,43	2,27
18a-18b	-0,0332	1,77	1,72
18a-20b	-0,00083	2,46	3,18
20a-20b	-0,0245	1,76	2,01
20a-22	-0,004	2,39	2,43
22-23b	-0,0042	2,39	2,42

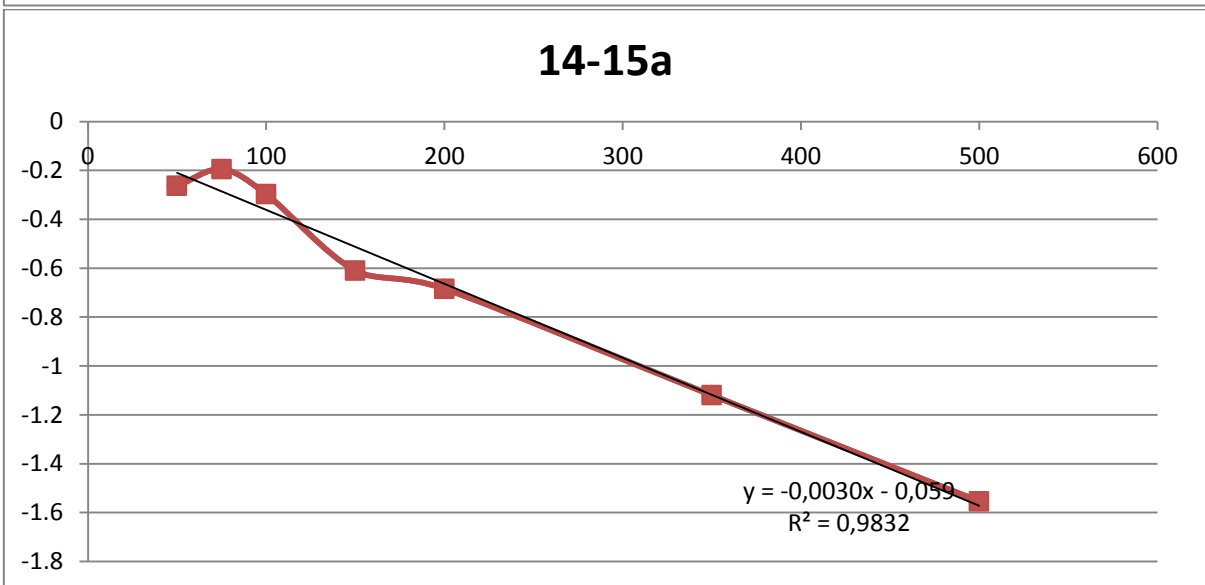
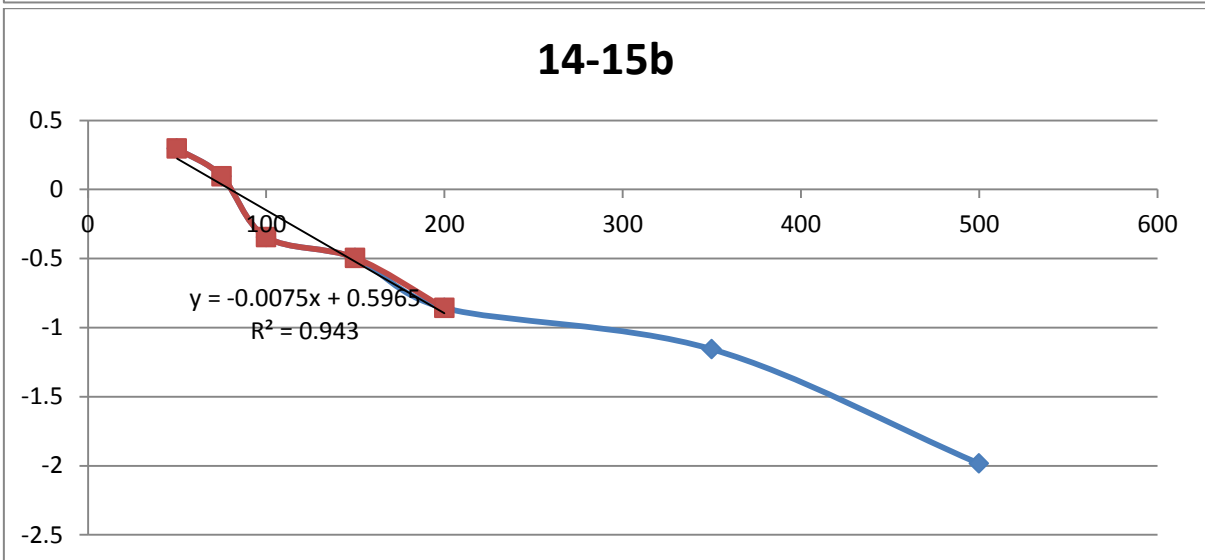
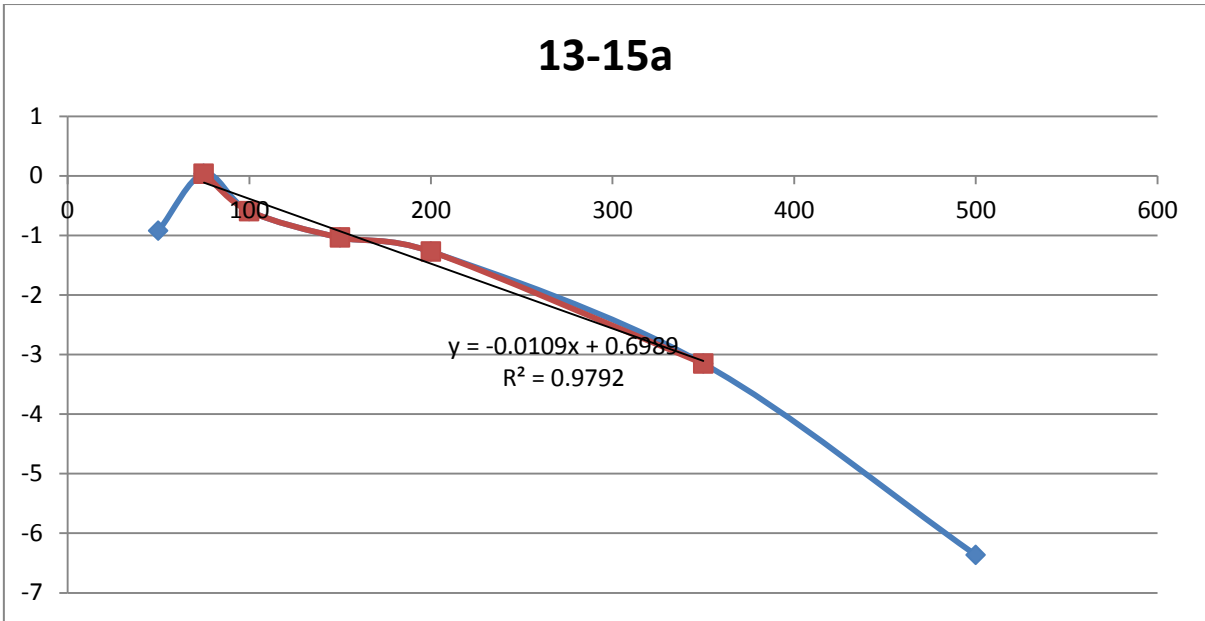
Strykniinin NOESY-kuvaajat ja kulmakertoimet virityksittäin intensiteetin ja sekoitusajan funktiona

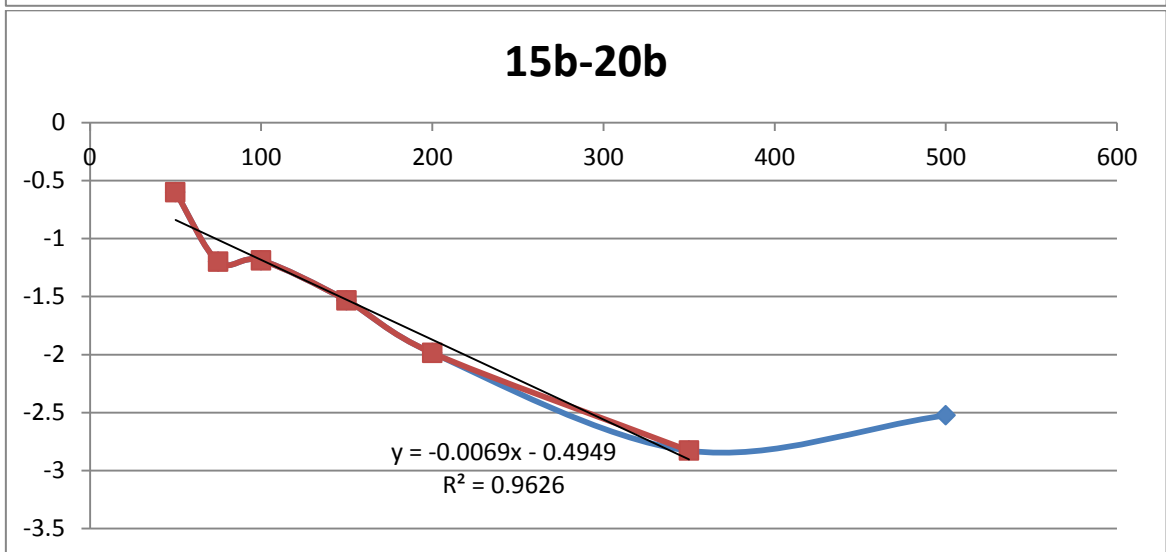
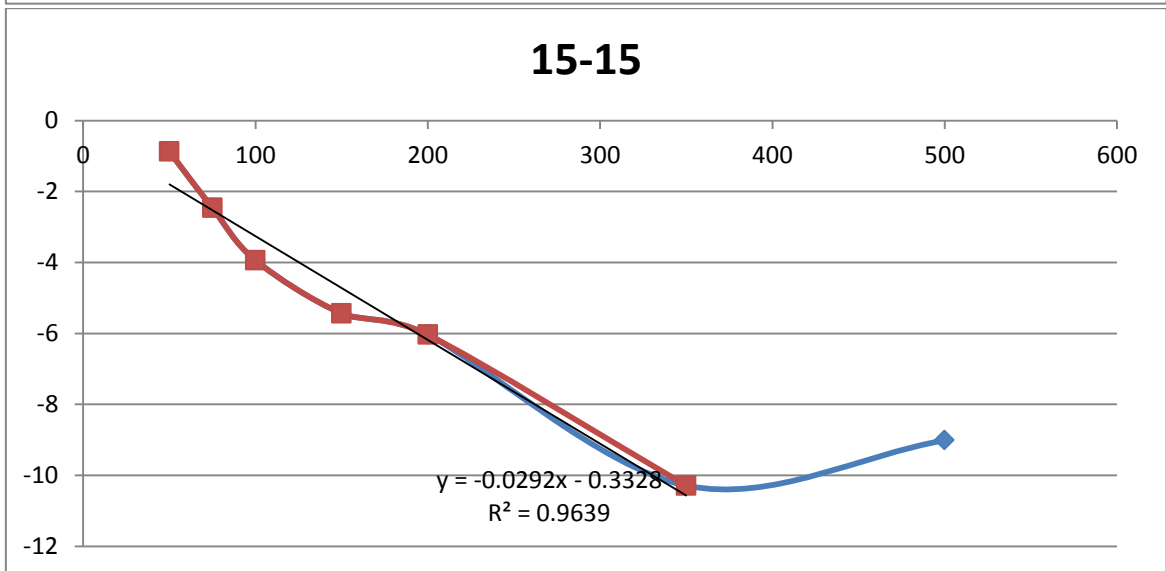
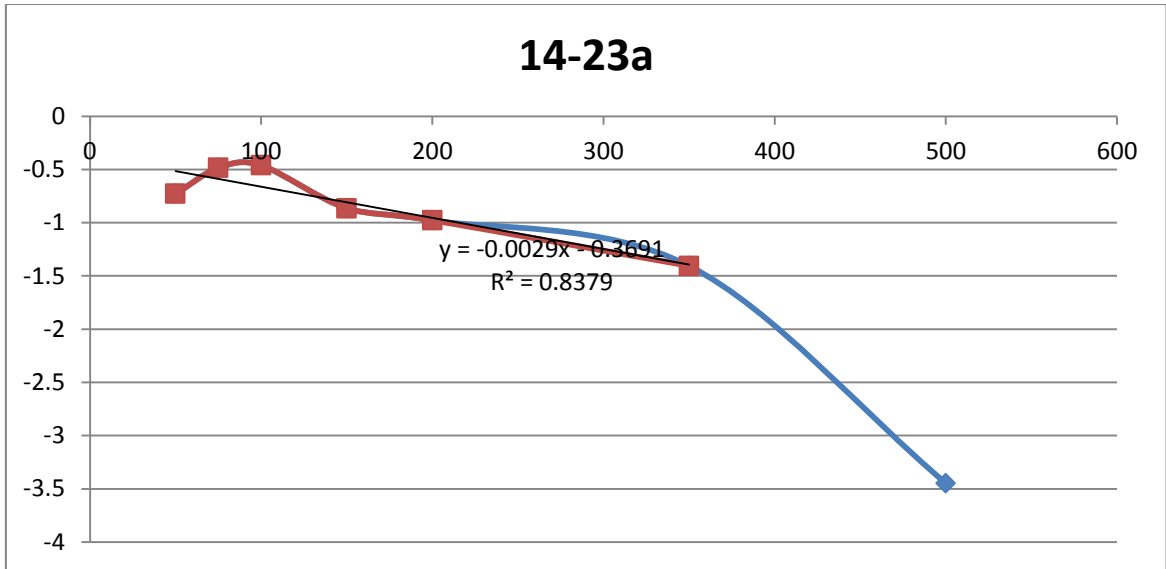


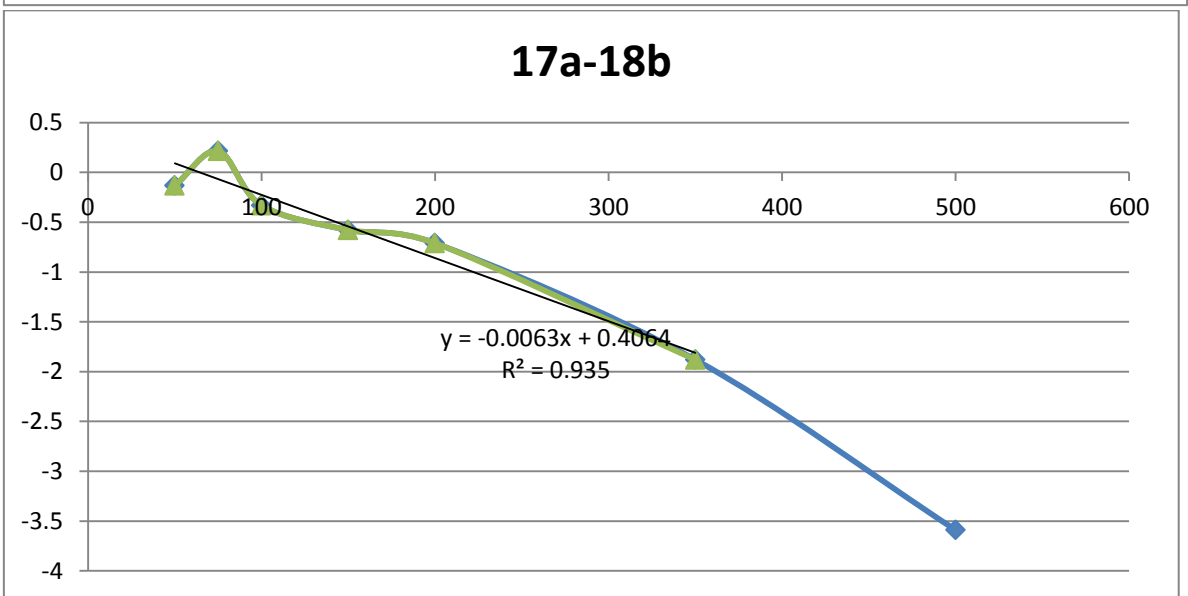
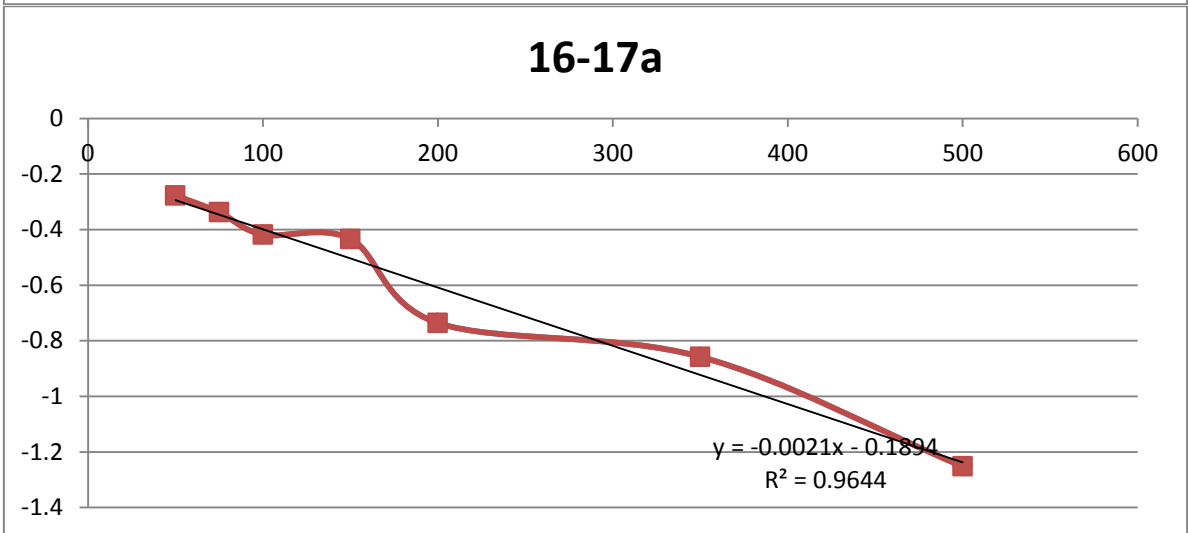
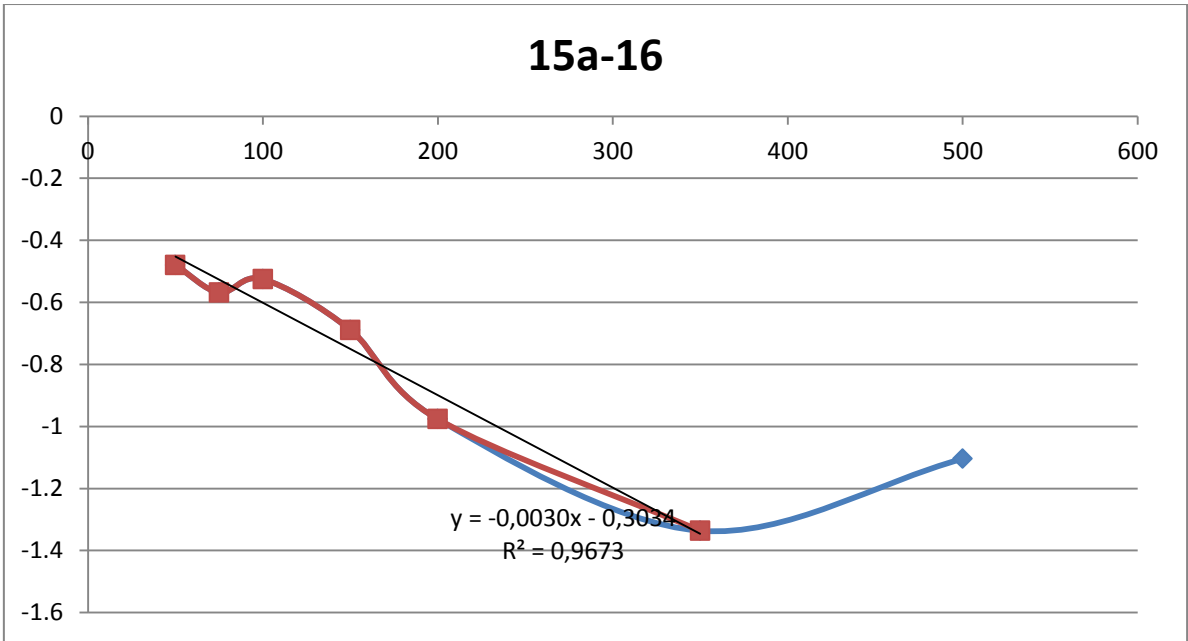


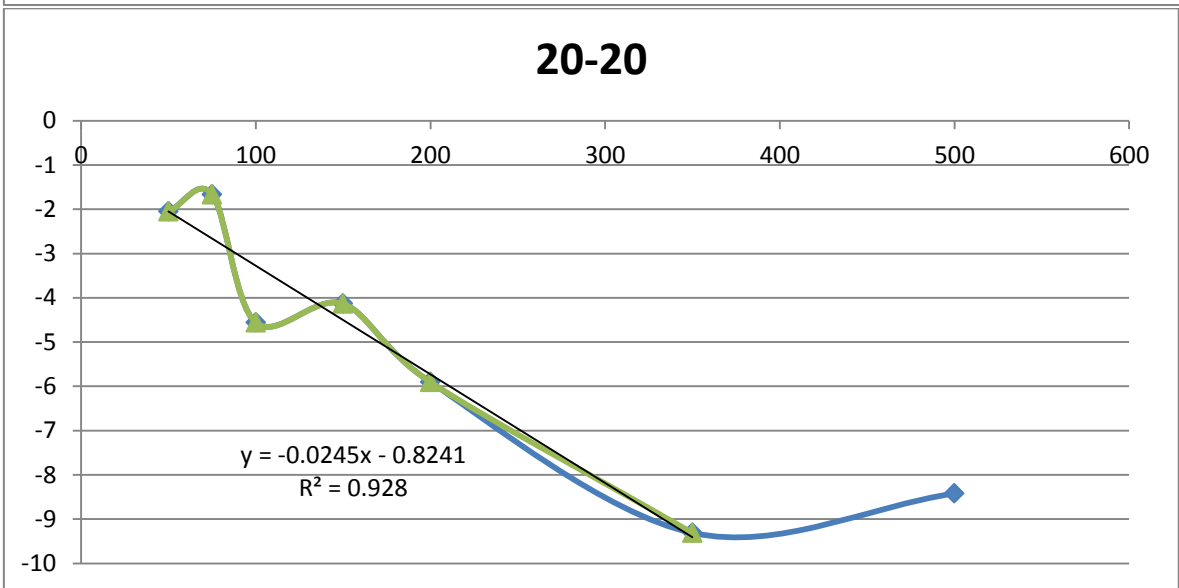
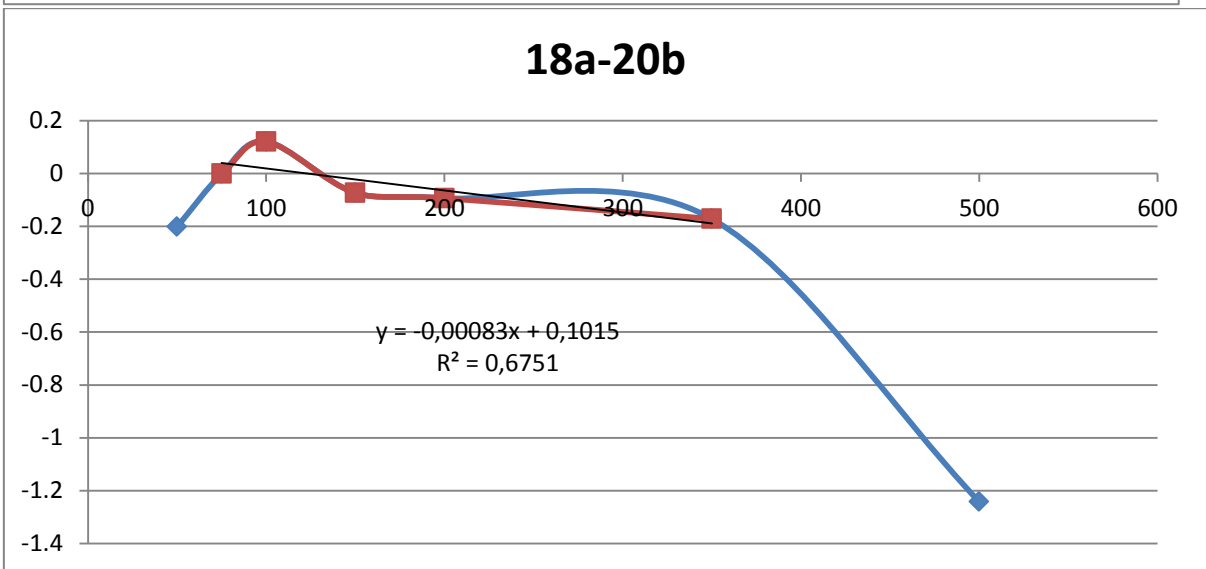
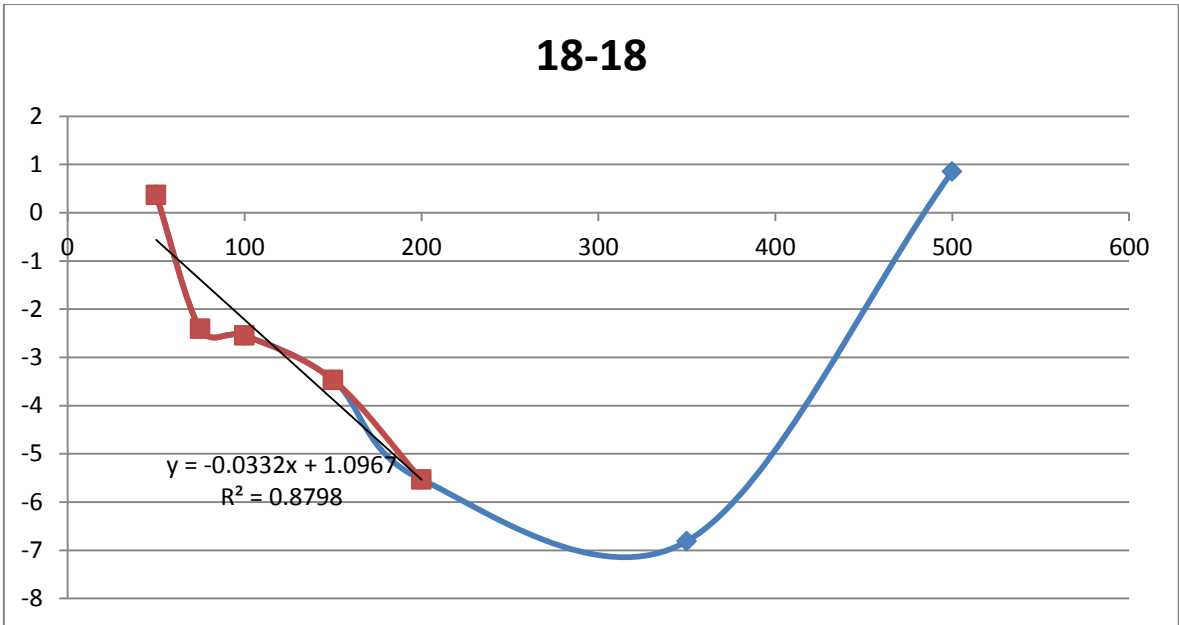


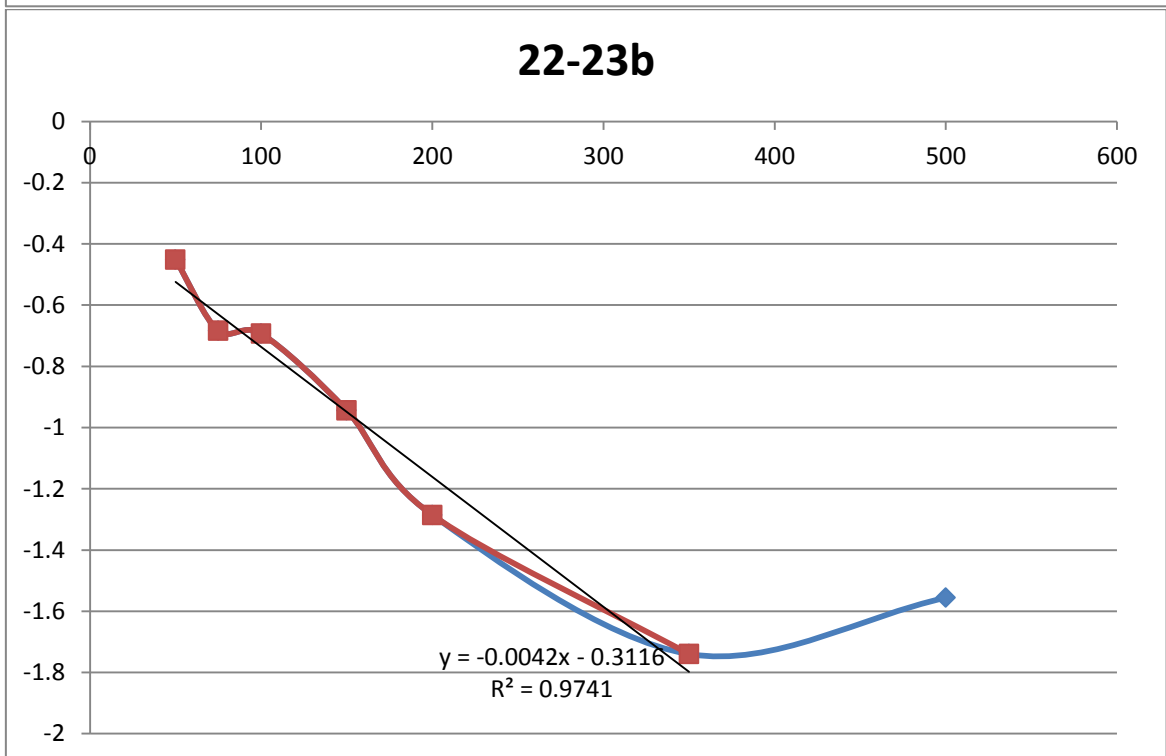
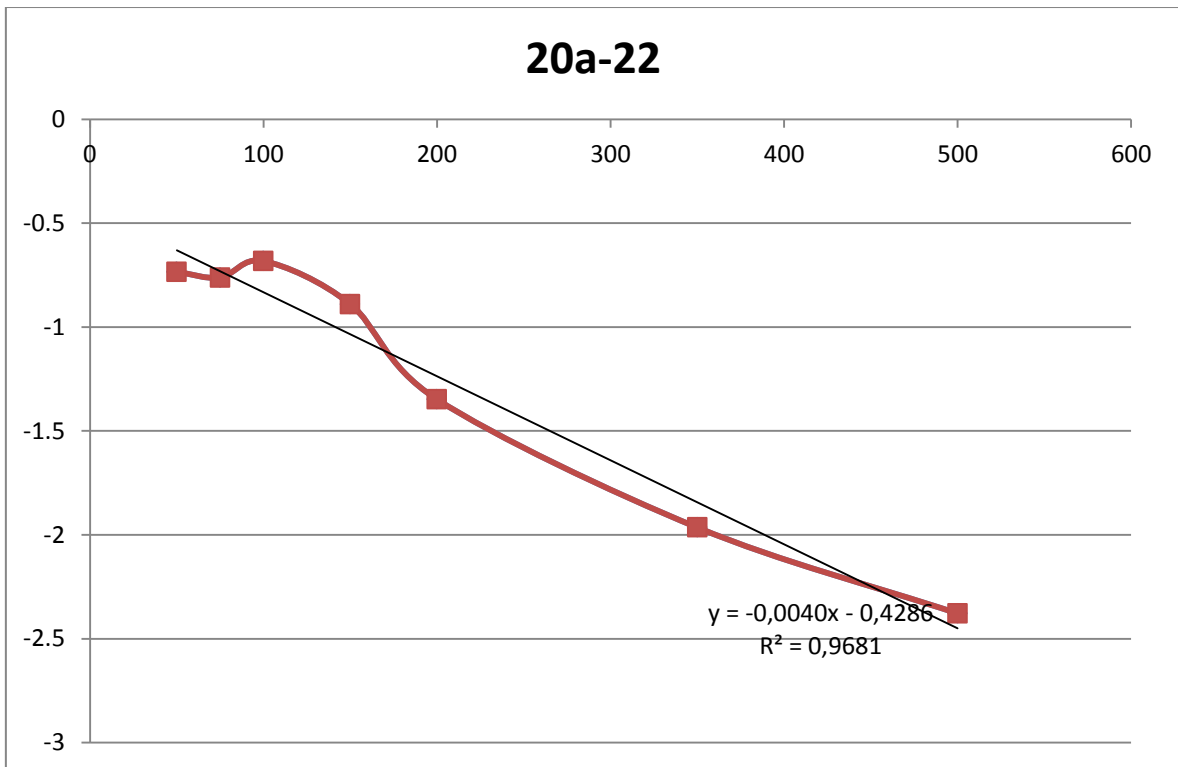








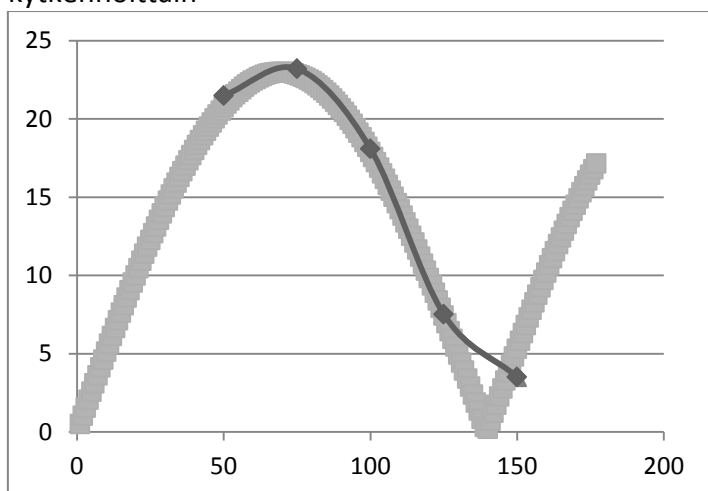




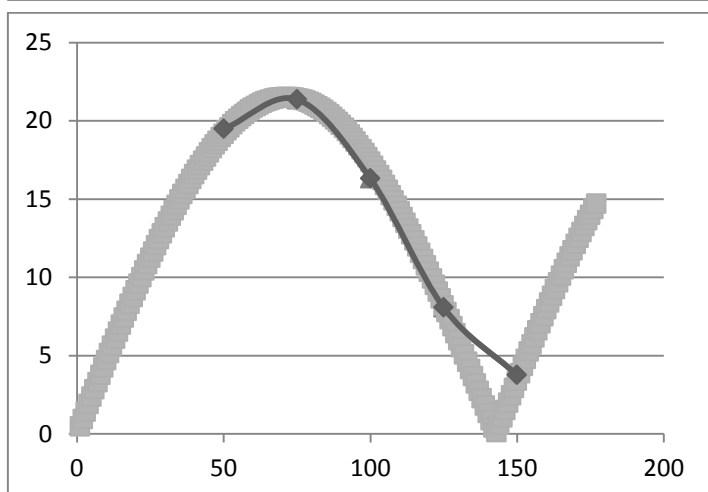
Liite 16: Brusiinin HMBC-spektrien signaalien sekoitusajat ja J-kytkennät

KytKentä	Sekoitus aika (ms)	J-kytkentä (Hz)
C2-H4	70	5,71
C3-H1	71	5,63
C5-H1	58	6,9
C6-H4	79	5,06
C7-H15B	71	5,63
C7-H18A	90	4,44
C8-H12	87	4,6
C8-H16	79	5,33
C8-H17B	75	5,33
C10-H12	231	1,73
C14-H16	79	5,06
C15-H13	127	2,55
C17-H8	87	4,6
C21-H13	65	6,15
C21-H23A	86	4,65
C21-H23B	78	5,13
C22-H20A	107	3,74
C22-H20B	107	3,74

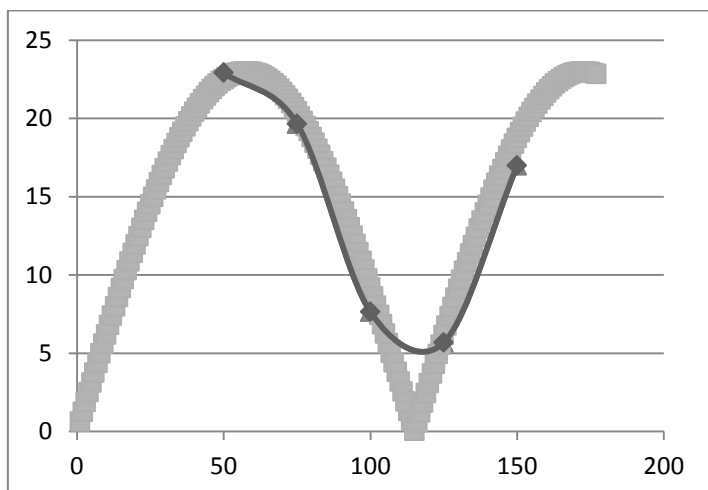
Liite 17: Brusiinin HMBC-spektrien kuvaajat intensiteetien ja sisäisen viiveen funktiona kytkennöittäin



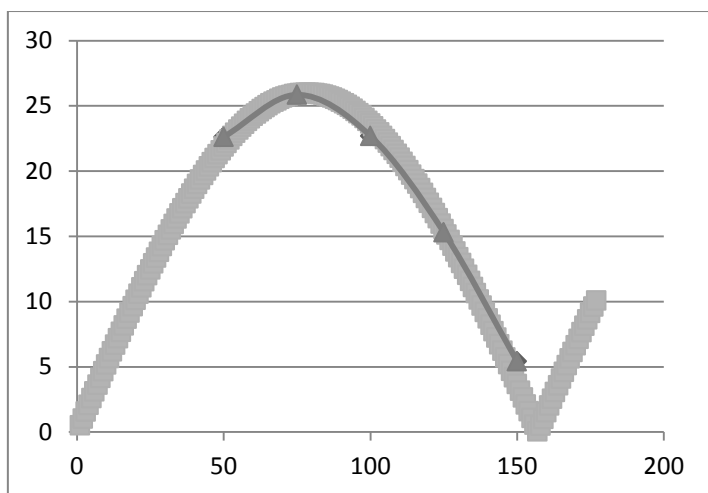
C2-H4 maksimi 70 ms



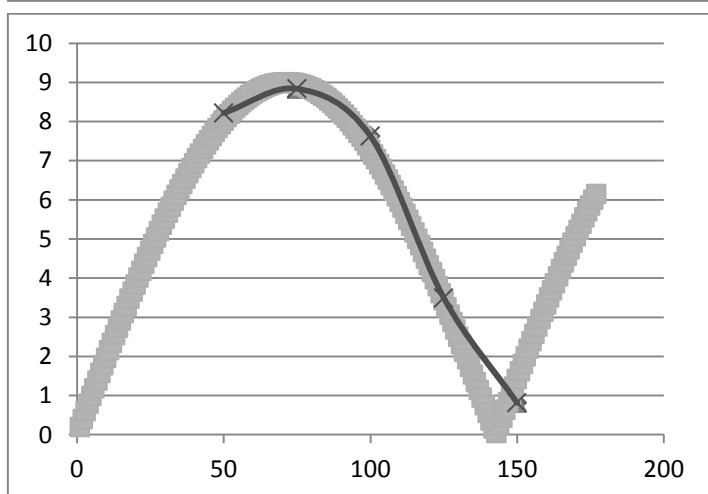
C3-H1 maksimi 71 ms



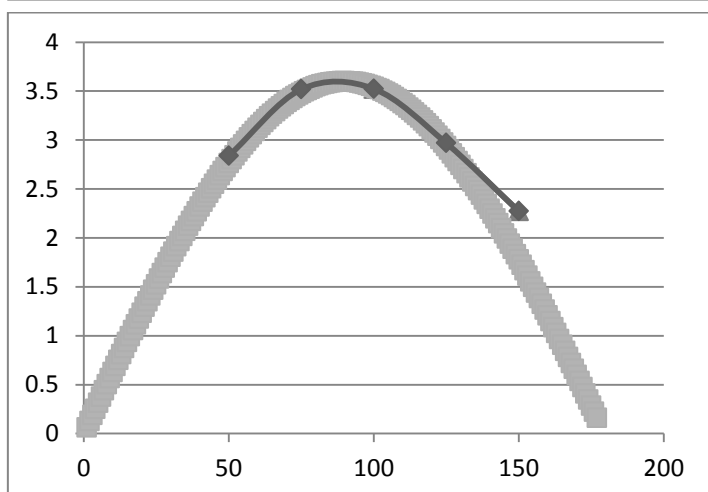
C5-H1 maksimi 58 ms



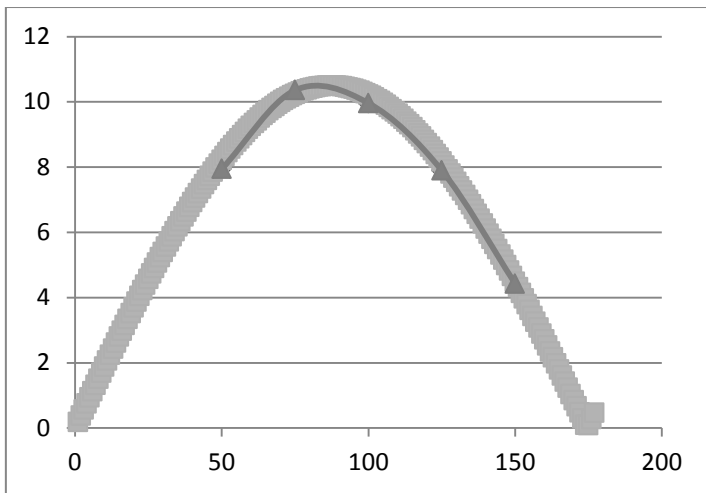
C6-H4 maksimi 79 ms



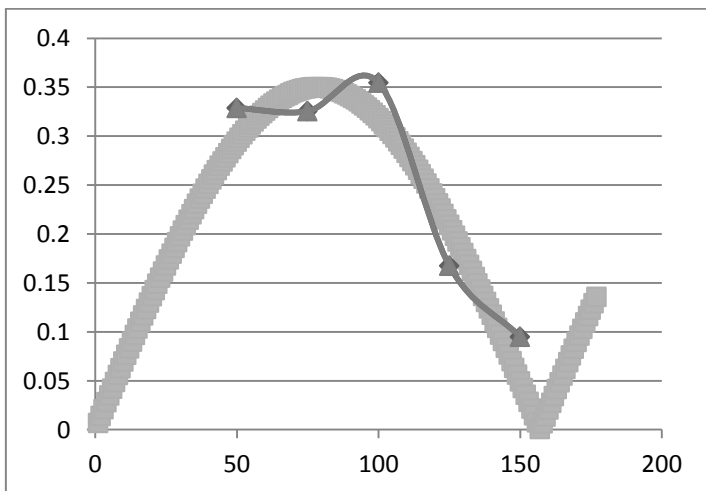
C7-H15b maksimi 71 ms



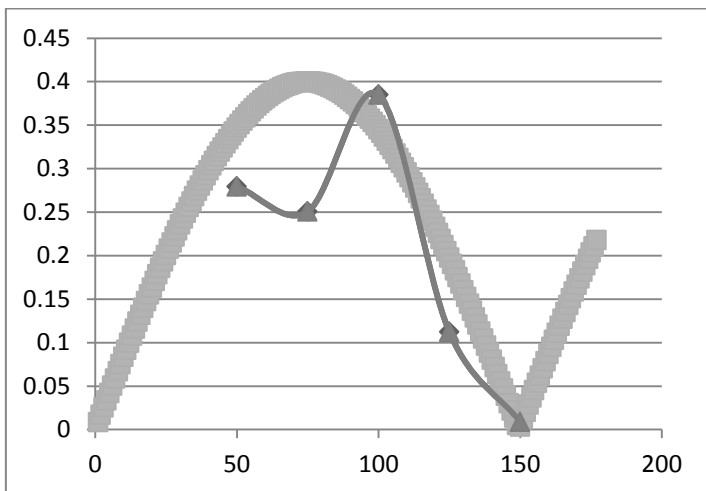
C7-H18A maksimi 90 ms



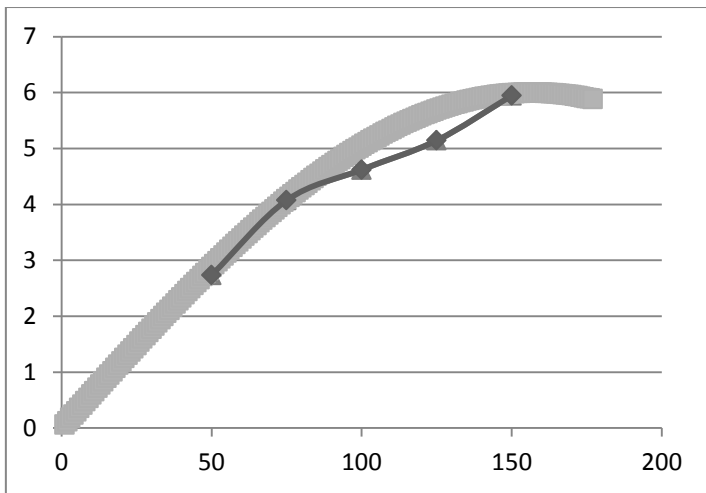
C8-H12 maksimi 87 ms



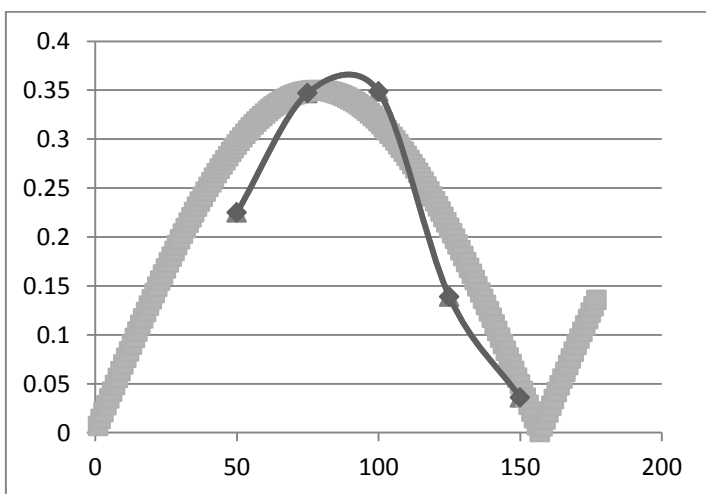
C8-H16 maksimi 79 ms



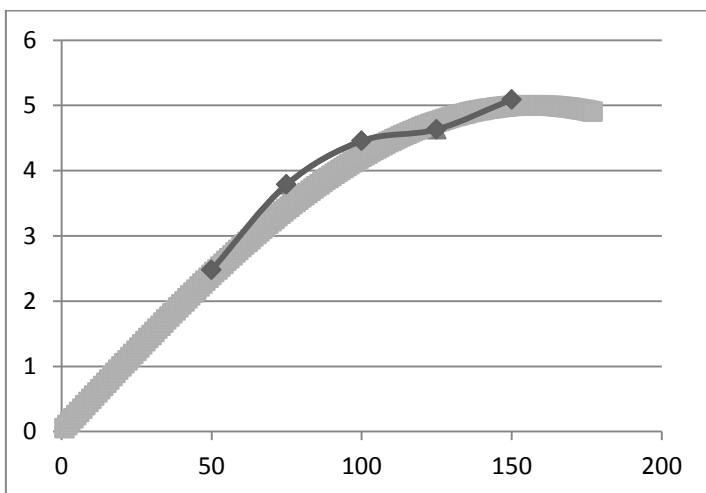
C8-H17B maksimi 75 ms



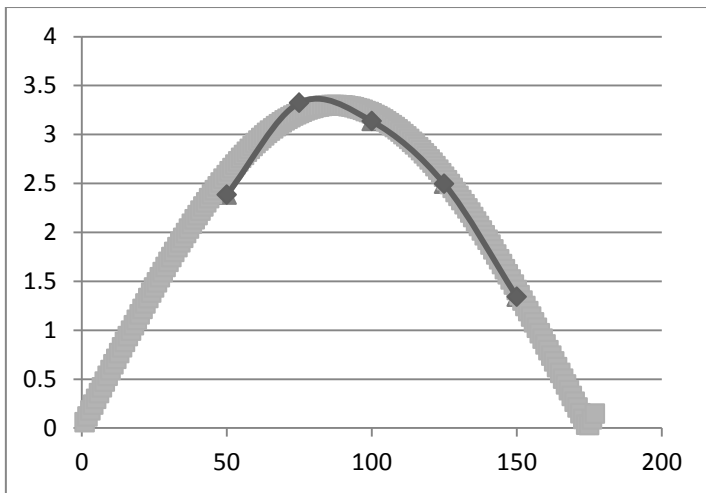
C10-H12 maksimi 231 ms



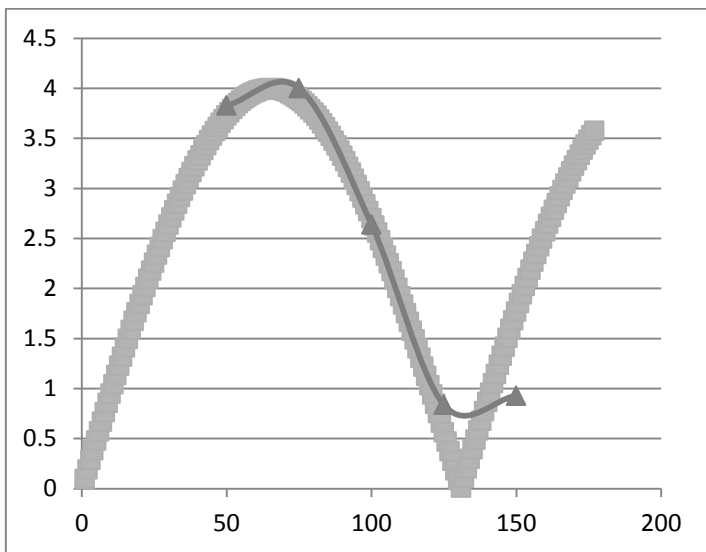
C14-H16 maksimi 79 ms



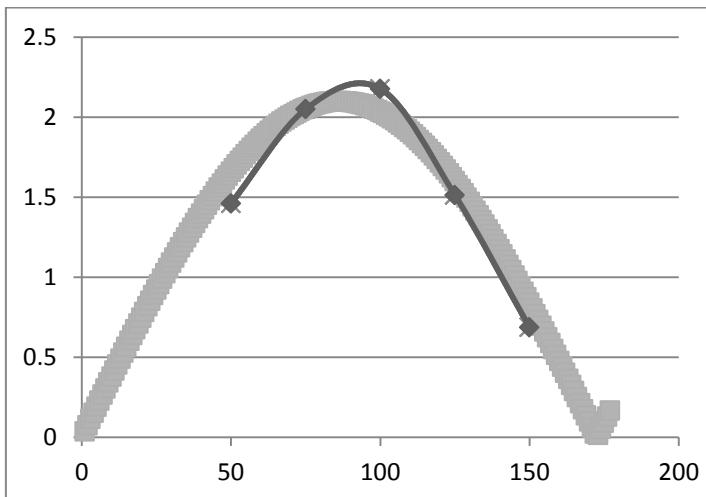
C15-H13 maksimi 127 ms



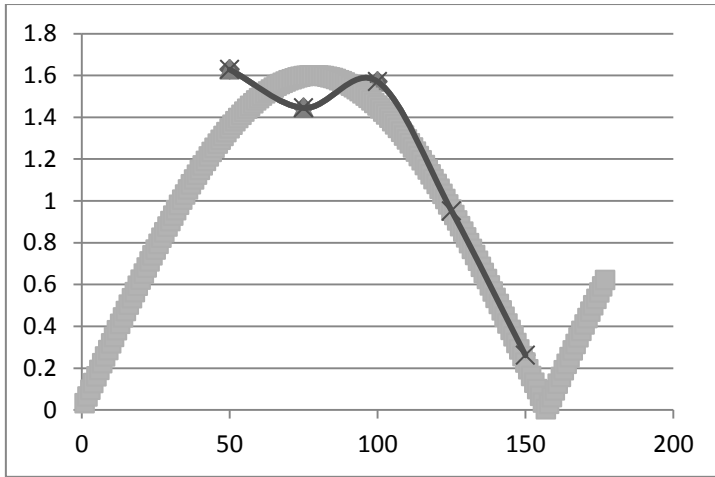
C17-H8 maksimi 87 ms



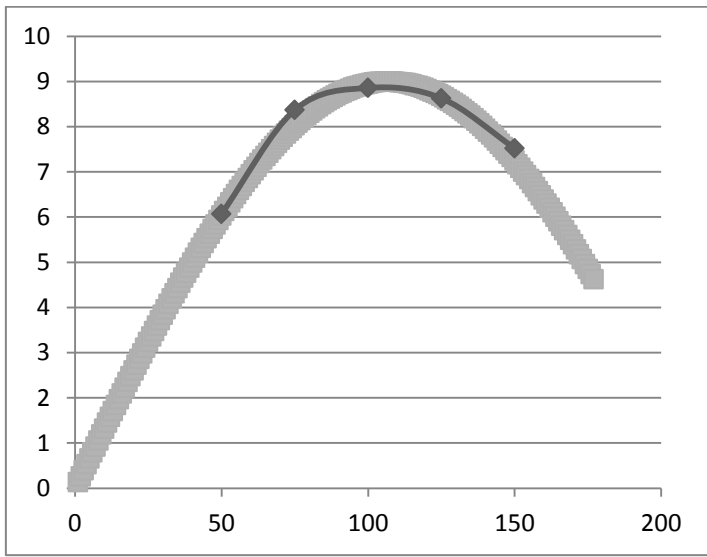
C21-H13 maksimi 65 ms



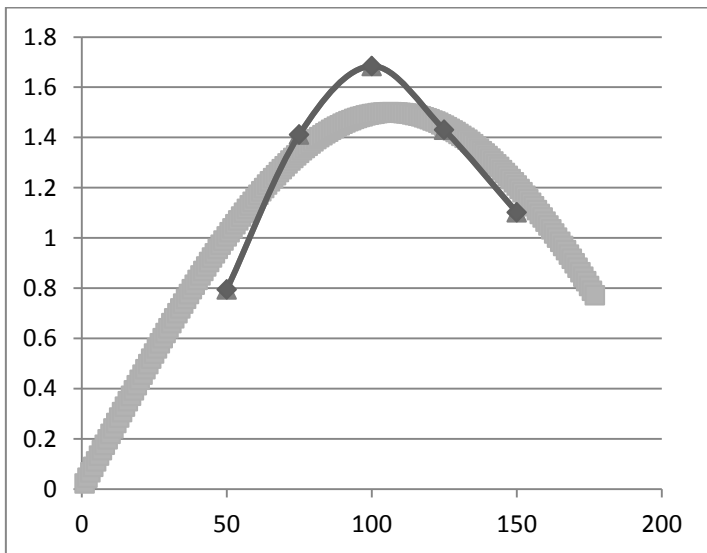
C21-H23A maksimi 86 ms



C21-H23B maksimi 78 ms



C22-H20A maksimi 107 ms

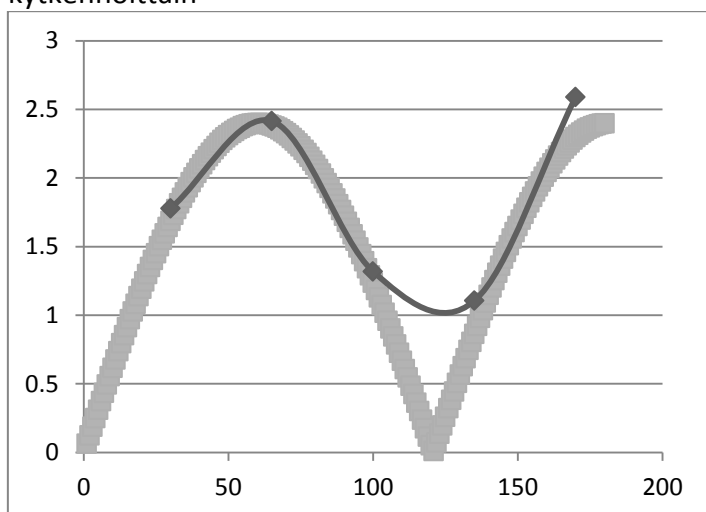


C22-H20B maksimi 107 ms

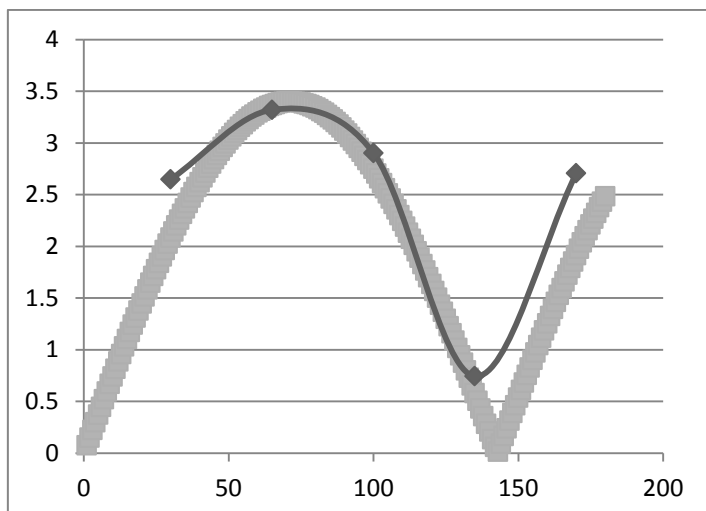
Liite 18: Strykniinin HMBC-spektrien signaalien sekoitusajat ja J-kytkennät

Kytkentä	sekoitusaika (ms)	J-kytkentä (Hz)
C1-H3	60	6,67
C2-H4	71	5,63
C3-H1	87	4,6
C4-H2	65	6,15
C5-H1	87	4,6
C5-H3	49	8,16
C6-H2	71	5,63
C6-H4	91	4,4
C8-H12	90	4,44
C8-H16	100	4
C12-H14	261	1,53
C15-H13	175	2,29
C16-H14	105	3,81
C16-H17B	105	3,81
C17-H8	92	4,35
C21-H13	71	5,63
C21-H23A	137	2,92
C21-H23B	62	6,35
C22-H20A	112	3,57

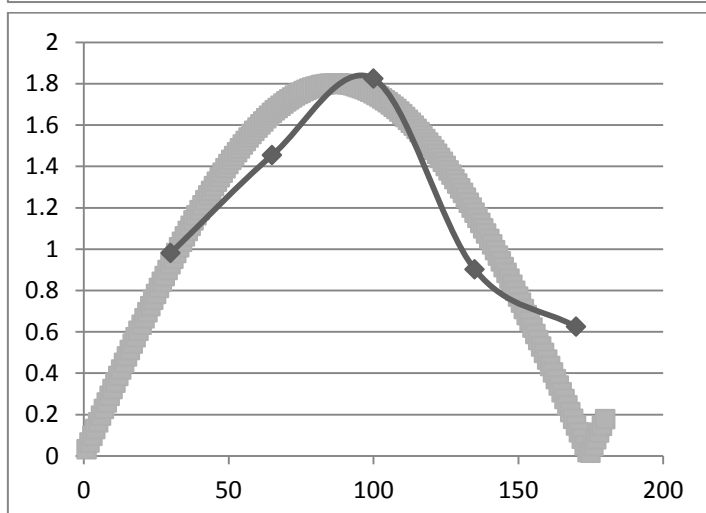
Strykniinin HMBC-spektrien kuvaajat intensiteetin ja sisäisen viiveen funktiona kytkennöittäin



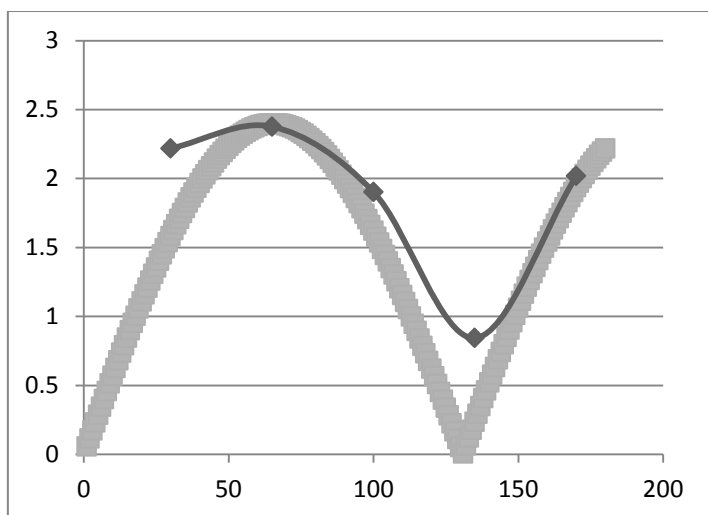
C1-H3 maksimi 60 ms



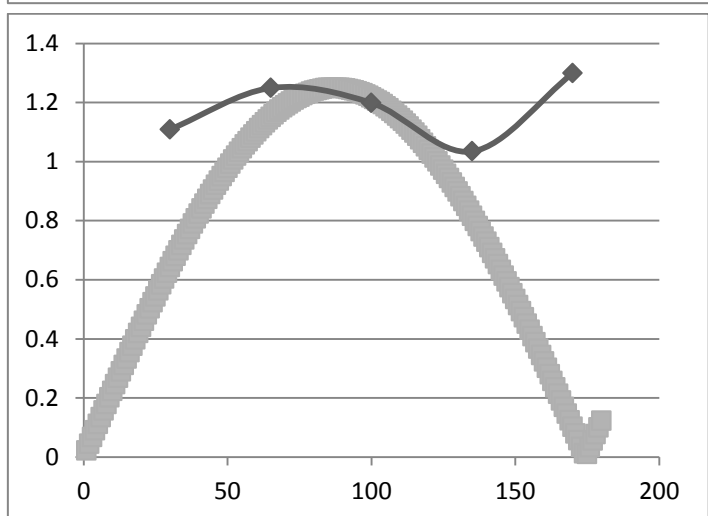
C2-H4 maksimi 71 ms



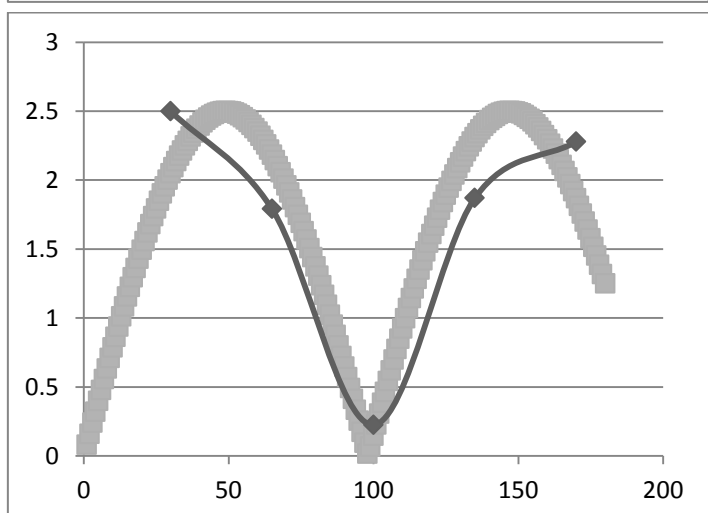
C3-H1 maksimi 87 ms



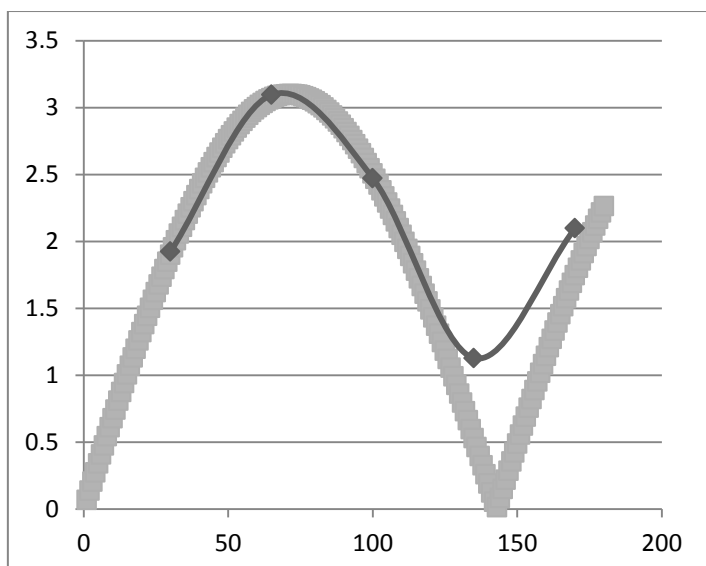
C4-H2 maksimi 65 ms



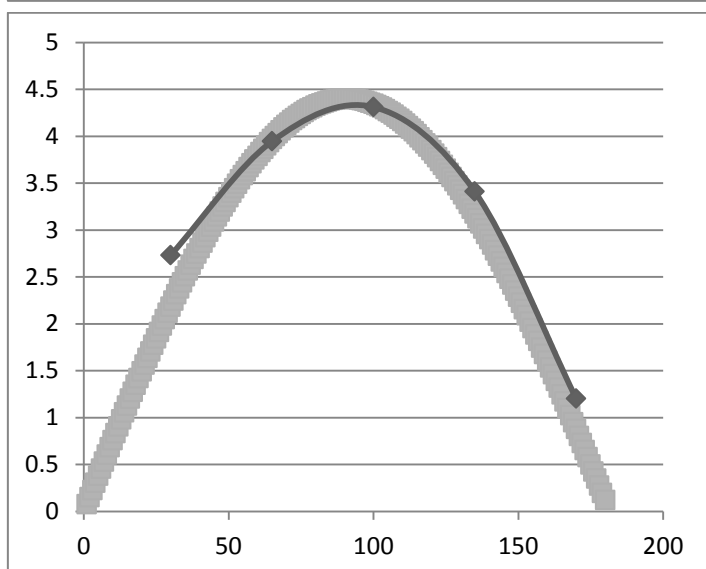
C5-H1 maksimi 87 ms



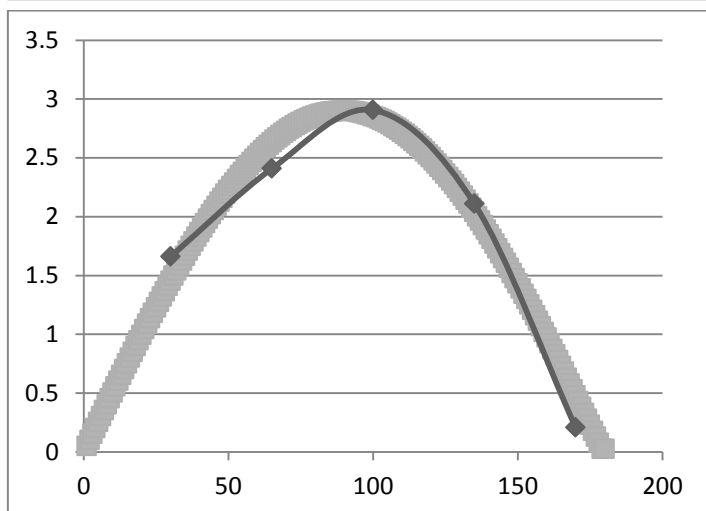
C5-H3 maksimi 49 ms



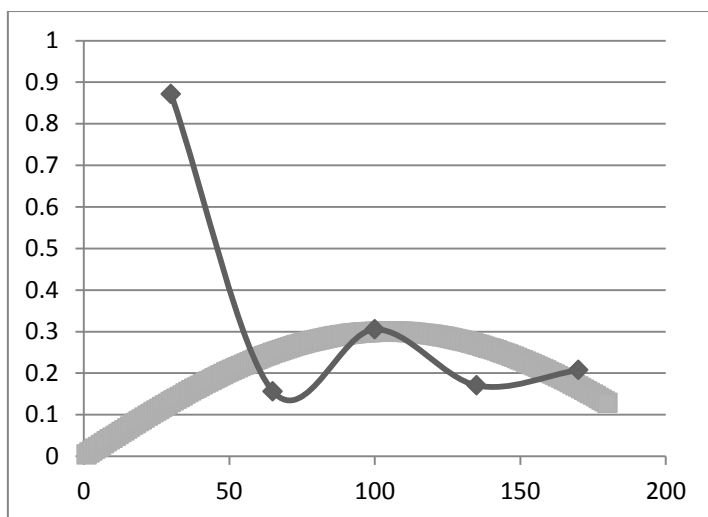
C6-H2 maksimi 71 ms



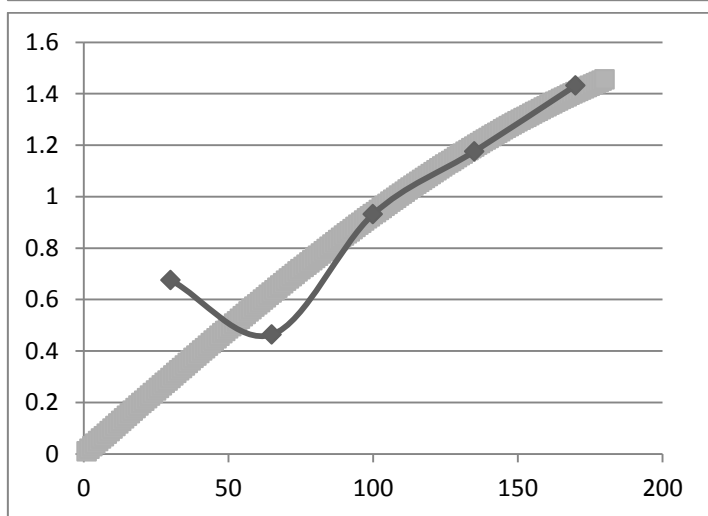
C6-H4 maksimi 91 ms



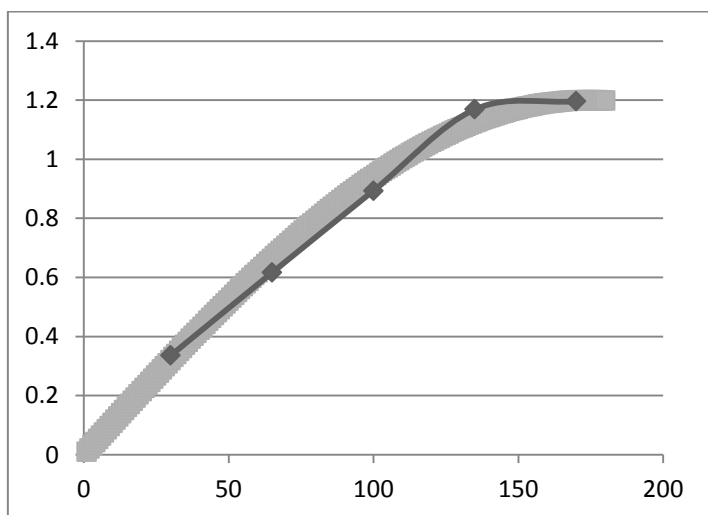
C8-H12 maksimi 90 ms



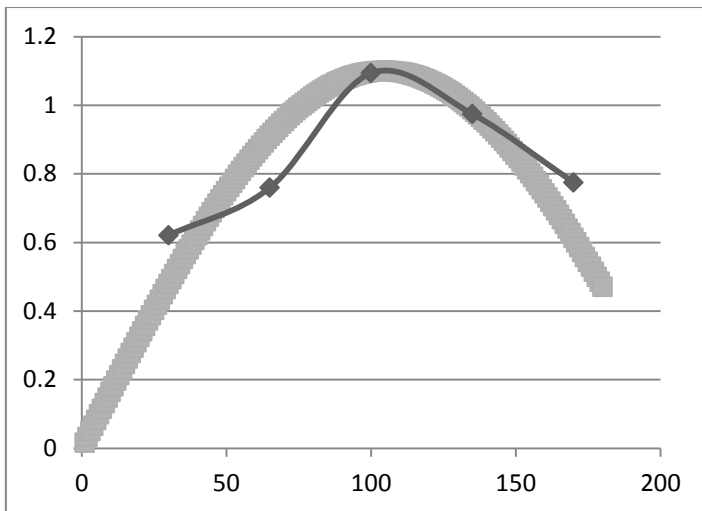
C8-H16 maksimi 100 ms



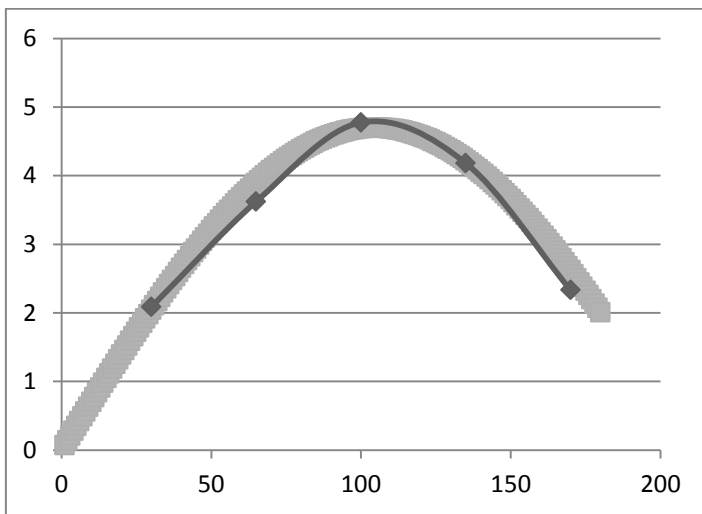
C12-H14 maksimi 261 ms



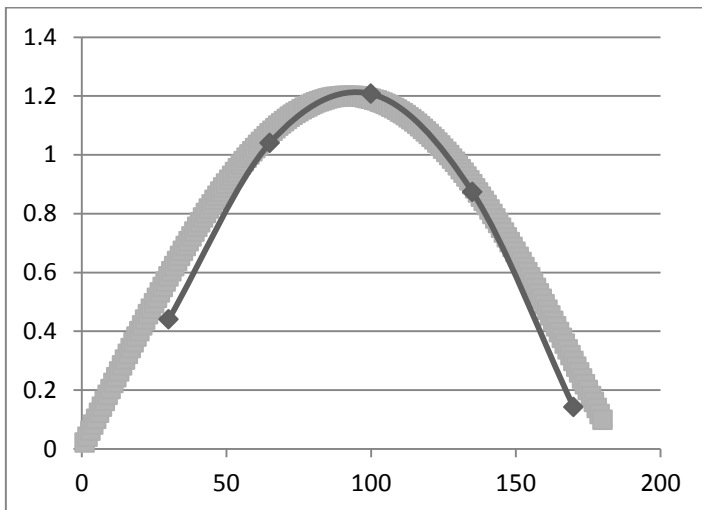
C15-H13 maksimi 175 ms



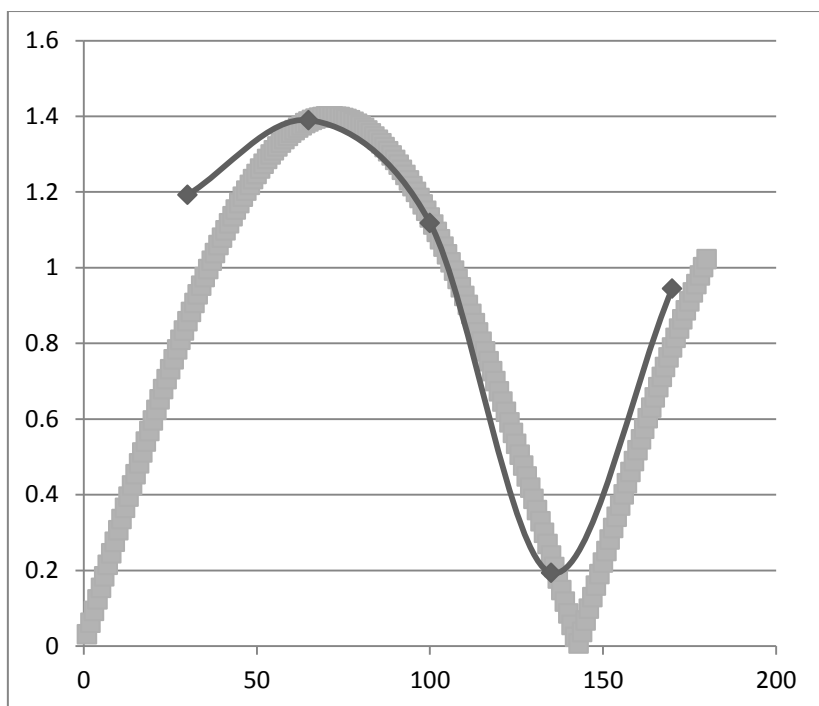
C16-H14 maksimi 105 ms



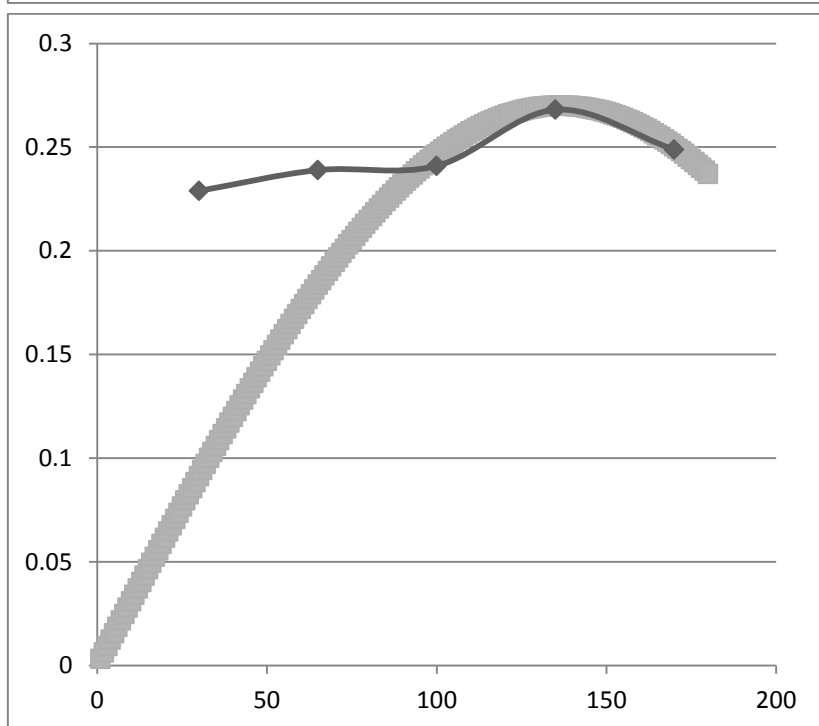
C16-H17B maksimi 105 ms



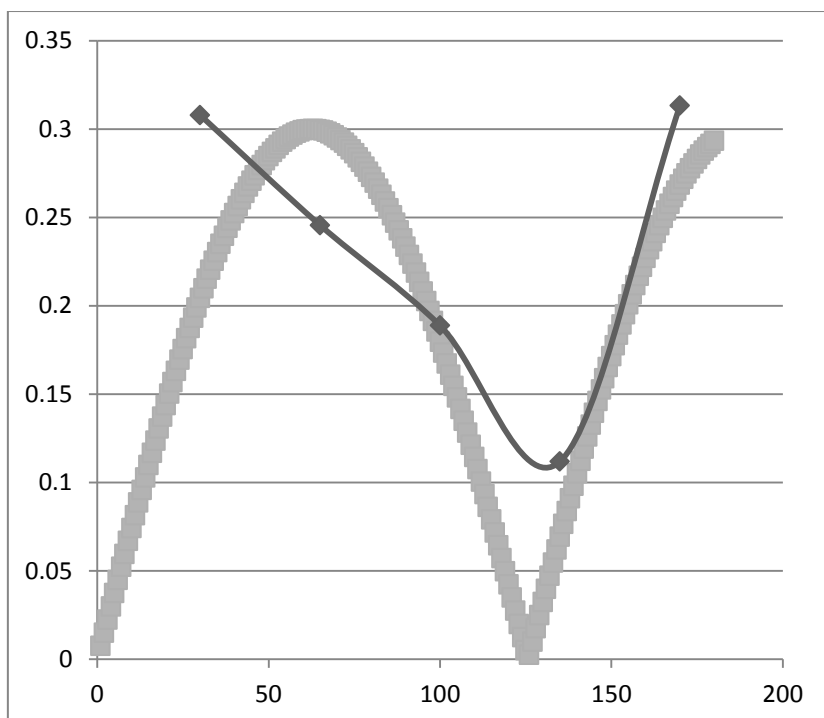
C17-H8 maksimi 92 ms



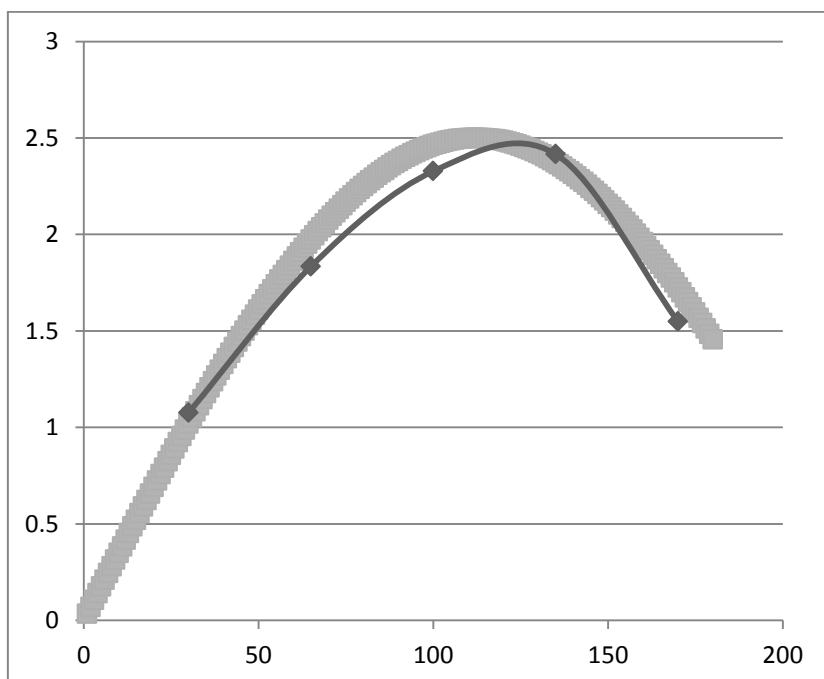
C21-H13 maksimi 71 ms



C21-H23A maksimi 137 ms

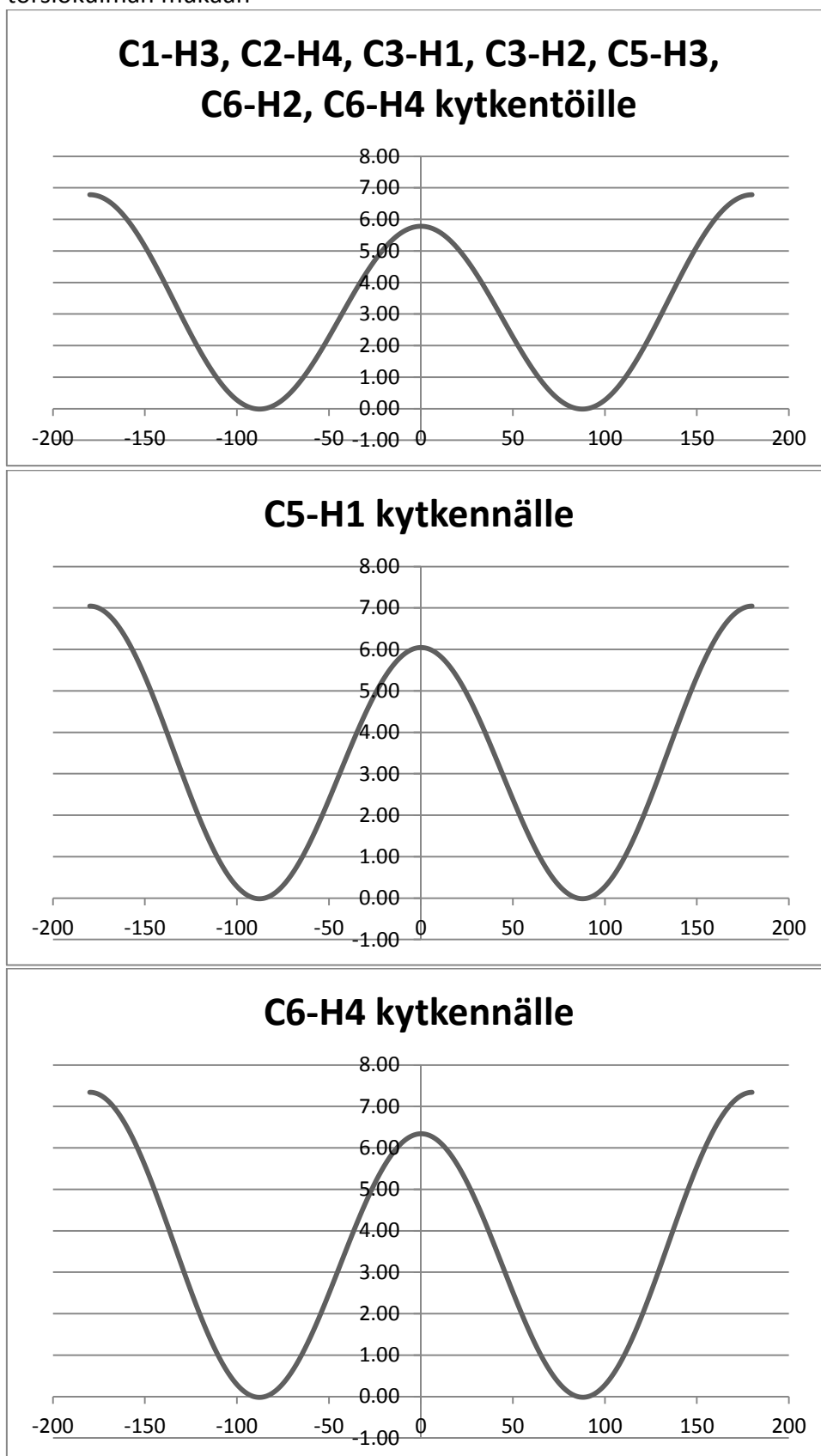


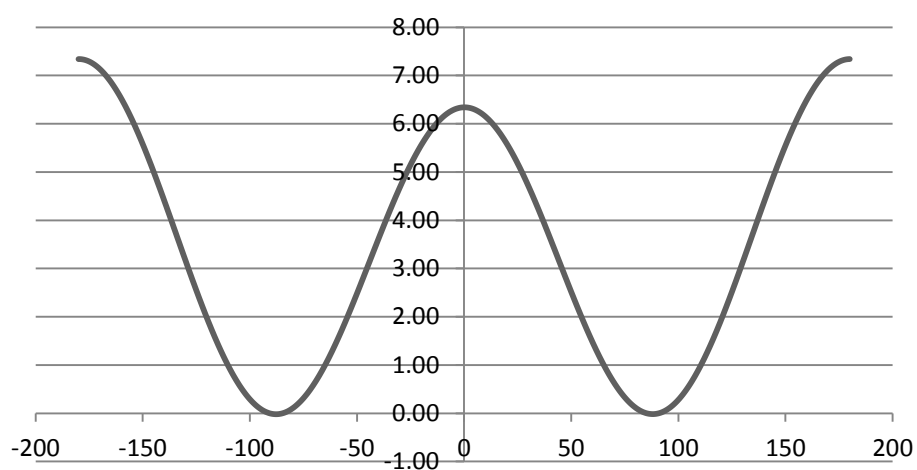
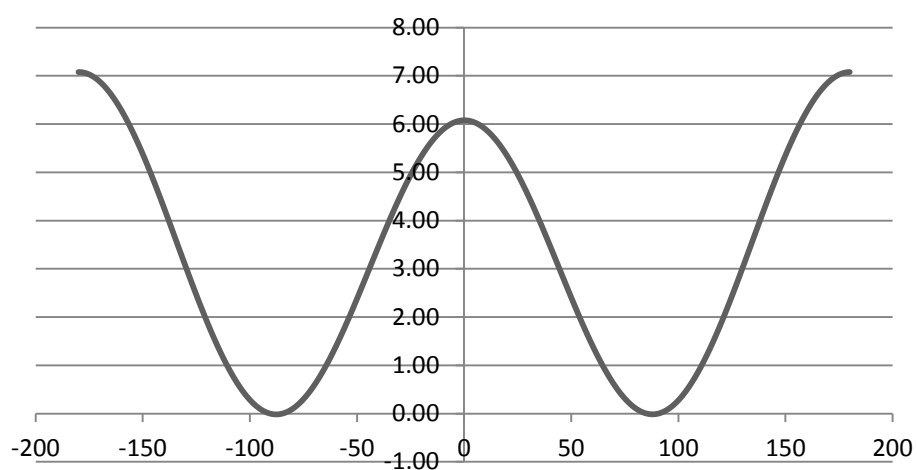
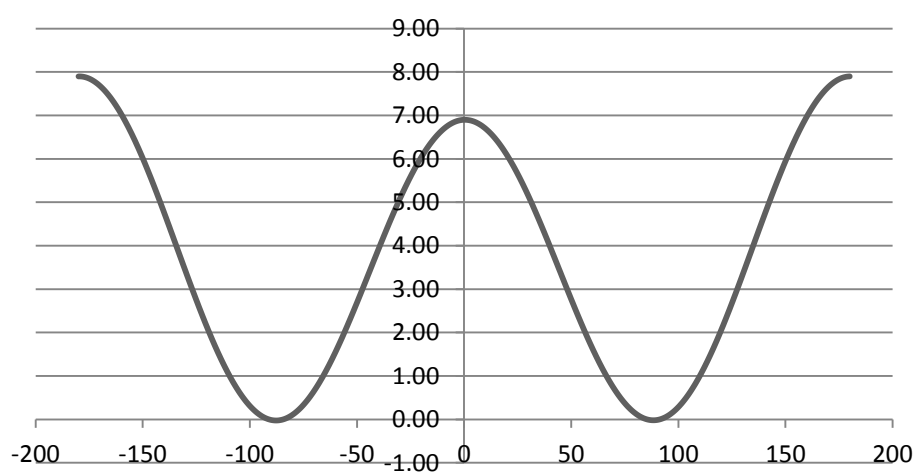
C21-H23B maksimi 62 ms

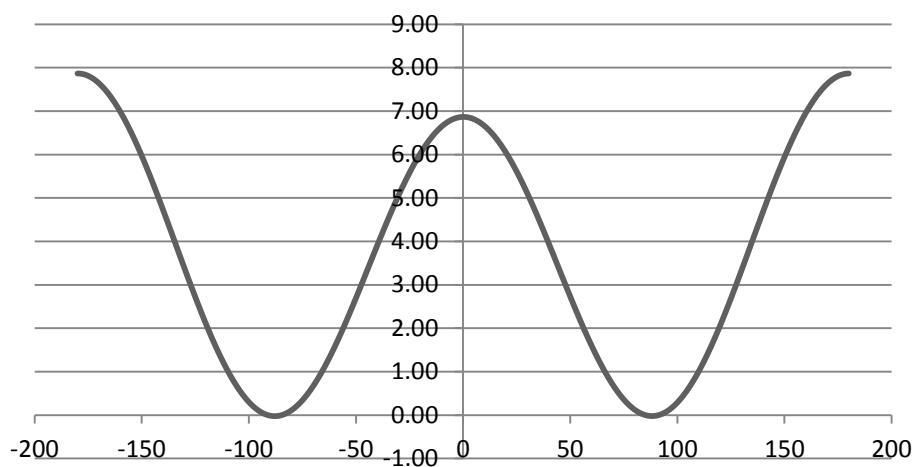
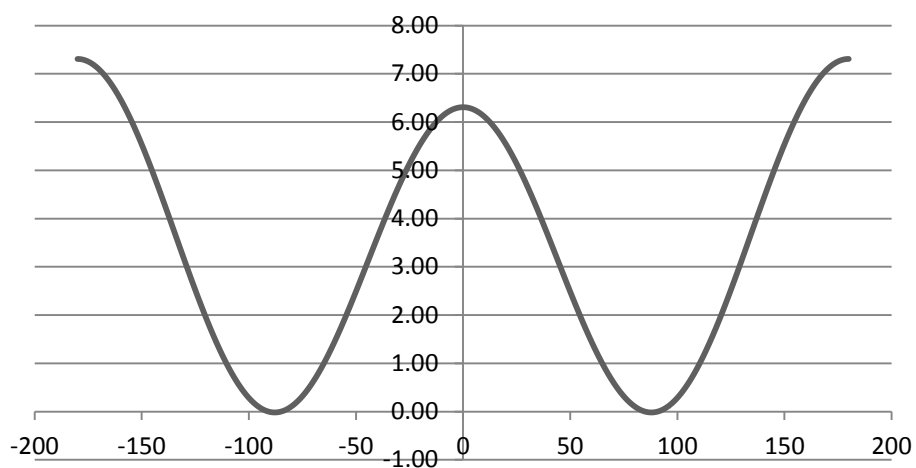
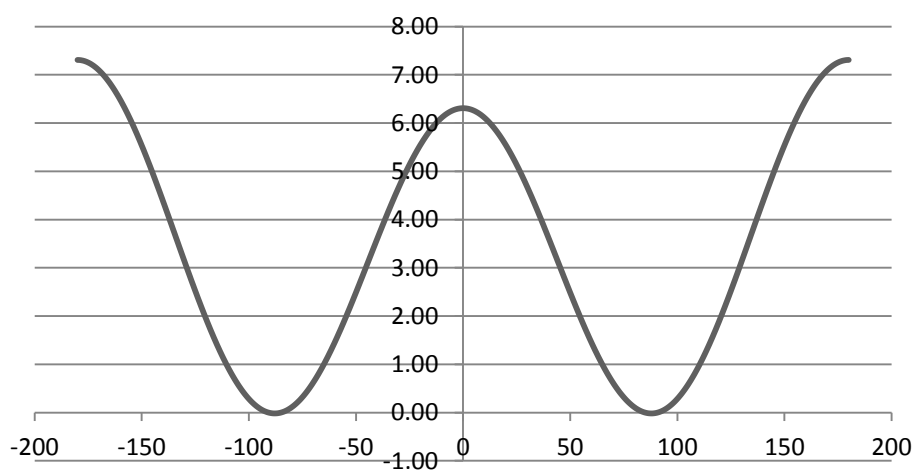


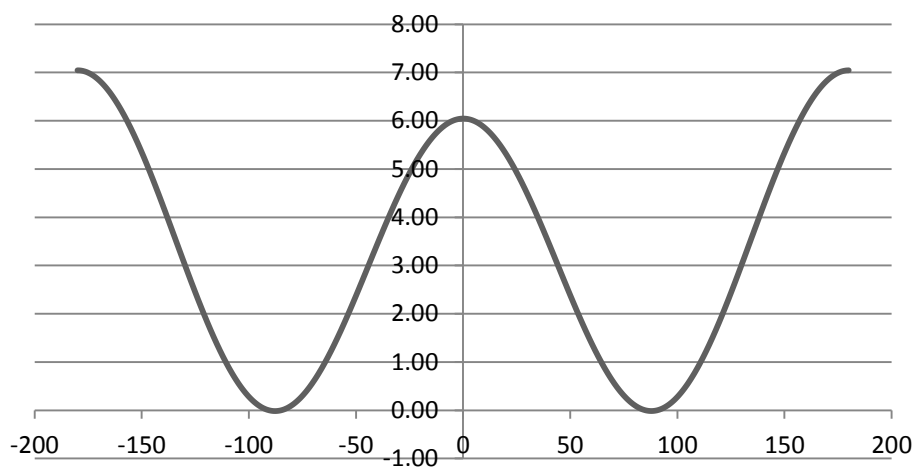
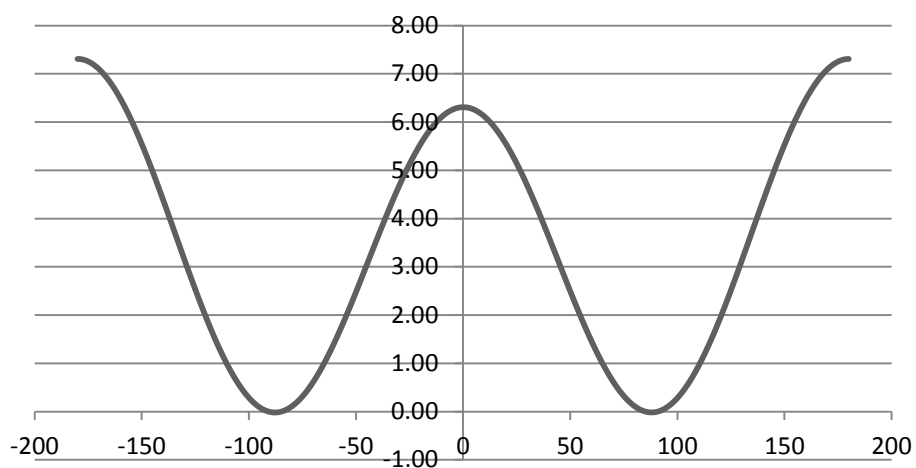
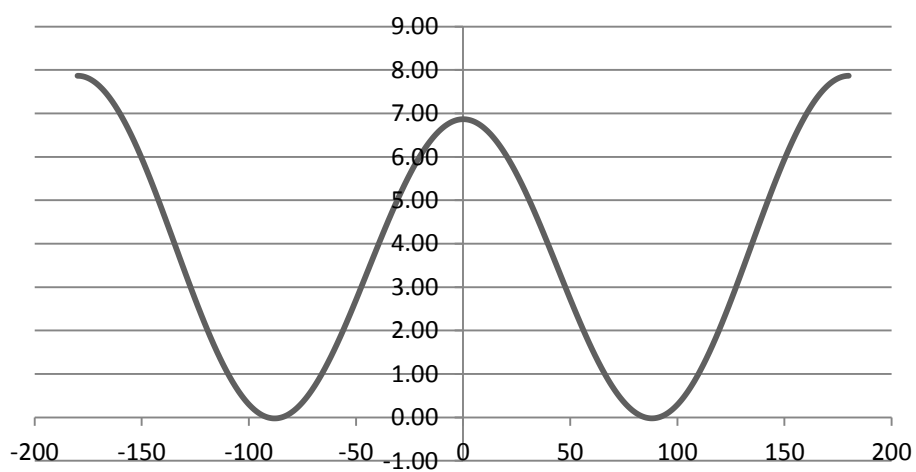
C22-H20A maksimi 112 ms

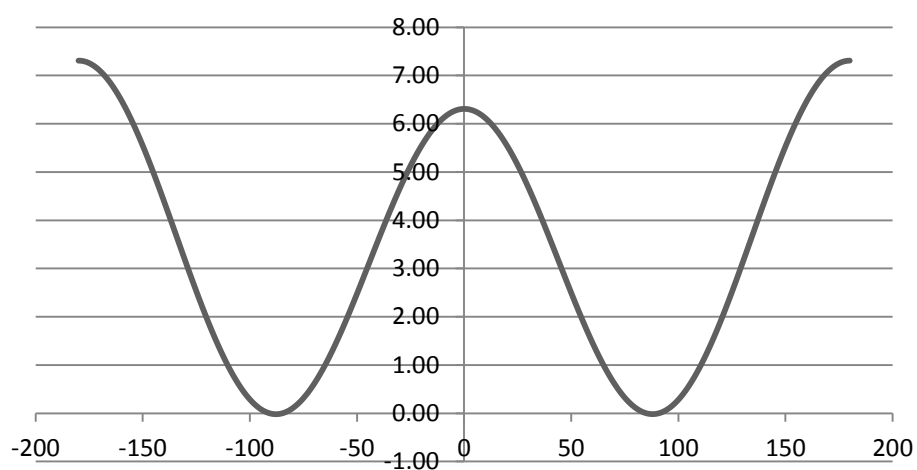
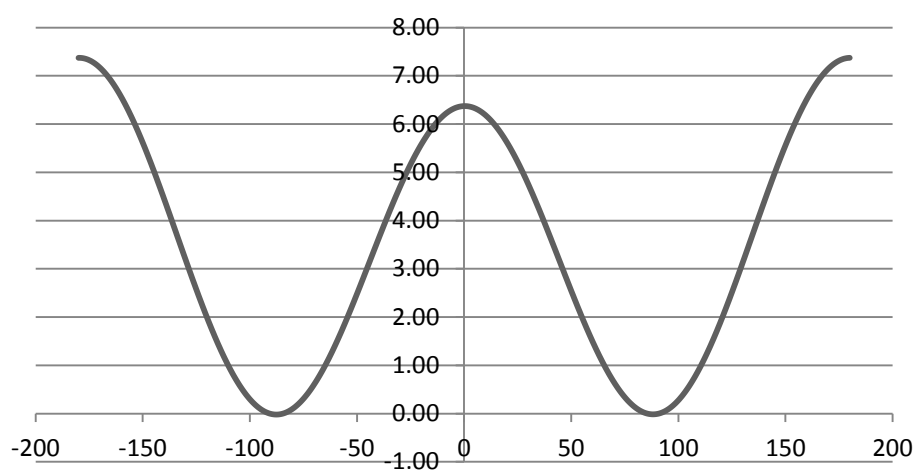
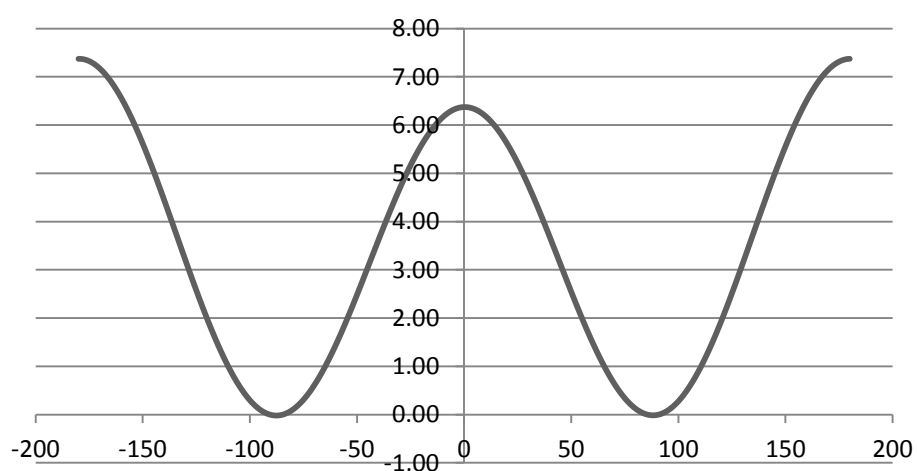
Liite 20: Laaditut Altona-Haasnoot yhtälöiden kuvaajat kytkennöittäin J-kytkennän ja torsiokulman mukaan

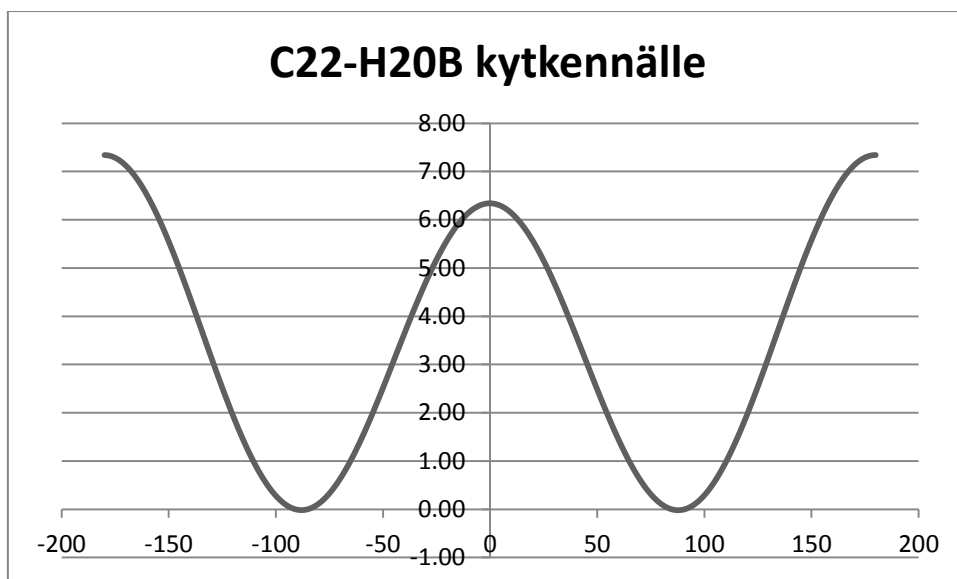


C7-H15B kytkennälle**C7-H18A kytkennälle****C8-H12 kytkennälle**

C8-H16 kytkennälle**C12-H14 kytkennälle****C15-H13 kytkennälle**

C16-H14 kytkennälle**C16-H17B kytkennälle****C17-H8 kytkennälle**

C21-H13 kytkennälle**C21-H23A kytkennälle****C21-H23B kytkennälle**



Liite 21: Kirjallisuuden Karplus yhtälöiden vakiot ja yhtälöt

	Aydin	Marco	Ladam
A	8,06	10,20	5,70
B	0,87	1,30	0,60
C	0,47	0,20	0,50

Karplus yhtälö: $J = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C$

Tafazzolin Karplus-sovitus:

$${}^3J_{CCCH} = 5.78 \cos^2 \varphi - 1.65 \cos \varphi + 0.32 \sin 2\varphi - 0.031 \sin \varphi + 0.57$$