



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**Kemiallinen analytiikka**

**OPINNÄYTETYÖ**

**<sup>13</sup>C-LÄHETTIMEN TAAJUUDEN VAIKUTUS  
KVANTITATIIVISESSA 2D-NMR-MENETELMÄSSÄ**

**Työn tekijä: Tuomas Niemi-Aro  
Työn ohjaaja: Jukka Toivonen  
Työn ohjaaja: Hannu Maaheimo**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

**Jukka Toivonen  
yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin VTT:lle kansallisessa NMR-laboratoriossa Helsingin Viikissä. Mittaukset suoritettiin heinä-elokuussa 2008.

Haluan kiittää työni ohjaajaa, dosentti Hannu Maaheimoa, kärsivällisestä opastuksesta, sekä koko laboratorion henkilökuntaa suuresta avusta. Kiitän yliopettaja Jukka Toivosta, joka oli apuna erityisesti kirjallisen työn viimeistelyvaiheessa.

Kiitän kaikkia läheisiäni ja ystäviäni kannustuksesta ja tuesta. Erityisesti haluan kiittää tyttöystävääni Jaanaa.

Helsingissä 25.11.2008

Tuomas Niemi-Aro

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Tuomas Niemi-Aro	
<b>Työn nimi:</b> $^{13}\text{C}$ -lähettimen taajuuden vaikutus kvantitatiivisessa 2D-NMR-menetelmässä	
<b>Päivämäärä:</b> 25.11.2008	<b>Sivumäärä:</b> 40
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	<b>Ammatillinen suuntautuminen:</b> Kemiallinen analytiikka
<b>Työn ohjaaja:</b> Yliopettaja Jukka Toivonen	
<b>Työn ohjaaja:</b> Dosentti Hannu Maaheimo	
<p>Tässä opinnäytetyössä tutkittiin uuden kaksulotteisen NMR-menetelmän soveltuvuutta aminohappomittauksiin. Menetelmä on kvantitatiivinen HSQC (heteronuclear single quantum coherence). Työssä tutkittiin hiililähettimen taajuuden vaikutusta tuloksiin. Tavoitteena oli ottaa menetelmä käyttöön laboratoriossa.</p> <p>Tutkittiin kaupallisista aminohapoista valmistettuja seoksia ja puhdasta metanolia. Mitattiin sarjoja hiililähettimen taajuutta vaihdellen. Teorian mukaan signaali heikkenee, kun hiililähetin etäännyttävä mittausten keskikohdasta.</p> <p>Aminohaponäytteitä tutkittiin ensin koko spektrin leveydeltä ja sitten vain alifaattiselta alueelta. Tulokset eivät vastanneet odotuksia. Kummassakin tapauksessa kvantitatiivisuus oli heikkoa. Metanolin mittauksesta havaittiin, että menetelmällä saadaan virheellisiä tuloksia.</p>	
<b>Avainsanat:</b> NMR, kvantitatiivinen, aminohappo, HSQC	

**ABSTRACT**

<b>Name:</b> Tuomas Niemi-Aro	
<b>Title:</b> Effect of Decoupler Offset in Quantitative 2D NMR	
<b>Date:</b> 25 November 2008	<b>Number of pages:</b> 40
<b>Department:</b> Laboratory Sciences	<b>Study Programme:</b> Analytical Chemistry
<b>Supervisor:</b> Jukka Toivonen, Principal lecturer	
<b>Instructor:</b> Hannu Maaheimo, Docent	
<p>This thesis examines a new analytical method based on two-dimensional HSQC NMR sequence. The purpose of this study was to determine how the method is suited for measuring amino acids. As the National Biological NMR laboratory wishes to utilize this method in their laboratory, the main aim of this study was to find out how decoupler offset affects the results.</p> <p>One of the target applications would be a study of yeast metabolism. The samples were mixtures of commercial amino acids. One test was made with methanol. A series of spectra with various decoupler offset values were measured. In theory, the signals diminish progressively as the distance to offset increases.</p> <p>The amino acids were at first measured along the whole spectrum and then only in the aliphatic part. The results were not as expected. Neither experiment provided quantitative results. The experiment with methanol showed that this method does not work properly.</p>	
<b>Keywords:</b> NMR, quantitative, HSQC, amino acids	

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TYÖN TAVOITE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>NMR:n perusteet</b>	<b>4</b>
3.1.1	<i>Hiukkanen magneettikentässä</i>	5
3.1.2	<i>Kemiallinen siirtymä</i>	7
3.1.3	<i>NMR rakenneanalytiikassa</i>	7
3.1.4	<i>Protonikytkentä</i>	9
3.1.5	<i>Hiilikytkentä</i>	11
<b>3.2</b>	<b>Pulssimenetelmä</b>	<b>11</b>
3.2.1	<i>Pulssi</i>	11
3.2.2	<i>Taajuusalue ja lähetin</i>	12
3.2.3	<i>Pulssin vaikutus ytimen magnetisaatioon</i>	12
3.2.4	<i>Signaalin mittaus</i>	13
<b>3.3</b>	<b>2D-NMR</b>	<b>14</b>
3.3.1	<i>2D-spektrin mittaaminen</i>	15
3.3.2	<i>HSQC:n perusteet</i>	16
3.3.3	<i>Kvantitatiivinen HSQC</i>	17
3.3.4	<i>Hiililähettimen taajuuden vaikutus</i>	18
<b>4</b>	<b>TYÖN SUORITUS</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Mittalaite</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Näytteet</b>	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Mittaukset näytteellä 1</b>	<b>20</b>
<b>4.4</b>	<b>Mittaukset näytteellä 2</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>Tutkittavat piikit</b>	<b>24</b>
<b>4.6</b>	<b>Metanolikoe</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>TULOKSET</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Näyte 1</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Näyte 2</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Metanolinäyte</b>	<b>34</b>

<b>6</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>35</b>
<b>6.1</b>	<b>Näyte1</b>	<b>35</b>
6.1.1	<i>Alifaattinen alue 1</i>	35
6.1.2	<i>Alifaattinen alue 2</i>	35
6.1.3	<i>Aromaattinen alue</i>	36
6.1.4	<i>Yhteenveto</i>	36
<b>6.2</b>	<b>Näyte 2</b>	<b>36</b>
<b>6.3</b>	<b>Metanolikoe</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>POHDINTA</b>	<b>39</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>40</b>

## 1 JOHDANTO

Ihmiskunta on hyödyntänyt hiivaa erilaisissa bioteknisissä prosesseissa jo tuhansien vuosien ajan. Tunnetuimpia käyttökohteita ovat tietenkin leivonta ja oluen valmistus. Nykyään erilaiset hiivalajit ja -kannat ovat monen bioteknisen prosessin perusta. Prosesseja pyritään jatkuvasti kehittämään luomalla entistä nopeampia, kestävämpiä ja tehokkaampia hiivakantoja.

Esimerkiksi bioetanolia valmistetaan biomassasta käymismenetelmällä *Sacharomyces cerevisiae* -hiivan avulla. Nykyään käytössä oleva kanta pystyy käyttämään ravinnokseen vain glukoosia. Biomassassa on kuitenkin mukana myös muita sokereita, kuten pentoosisokereita, joita hiivasolu ei pysty hyödyntämään. Uusia hiivakantoja kehittämällä pystyttäisiin prosessin hyötysuhdetta parantamaan merkittävästi. [1, s. 3.]

NMR-spektrometria on käytännöllinen menetelmä hiivojen tutkimiseen. Se mittaa atomiydinten reaktioita voimakkaassa magneettikentässä. NMR tulee sanoista *nuclear magnetic resonance* eli ydinmagneettinen resonanssi. Mittauksessa saadaan informaatiota näytteessä olevien molekyylien rakenteesta, mutta se soveltuu hyvin myös pitoisuuksien mittaamiseen. Sairaaloiden magneettikuvauksessa on kyse samasta ilmiöstä.

Tämä opinnäytetyö käsittelee mittausmenetelmää, jolla pyritään selvittämään hiivasolun sisäistä toimintaa. Solun aineenvaihdunta eli metabolo-miikka tarkoittaa käytännössä sitä, miten solu käyttää sokeria ravinnokseen. Miten glukoosi muuttuu solun sisällä aminohapoiksi ja edelleen proteiineiksi? Ilman tietämystä solun toiminnasta, ei tehokkaita uusia kantoja pystytä kehittämään.

$^{13}\text{C}$  on hiilen isotooppi, jota on luonnossa noin 1,1 %:a kaikista hiiliatomeista. Hiivojen aineenvaihduntavirtoja tutkitaan  $^{13}\text{C}$ -leimatun glukoosin avulla. Leimatussa glukoosissa on osa tavallisista  $^{12}\text{C}$ -atomeista korvattu harvinaisemmalla isotoopilla. Hiivasoluille annetaan ravinnoksi leimattua sokeria ja ajan myötä  $^{13}\text{C}$ -pitoisuus alkaa kasvaa hiivan metaboliatuotteissa, proteiineissa. Pitoisuuden kasvu havaitaan NMR-spektrometrilla. Leimana käytetään juuri  $^{13}\text{C}$ :a, koska se on yksi ytimistä, jotka voidaan havaita NMR:llä.

Aminohappojen mittaamista varten on hiiva hydrolysoitava. Hydrolysointi tarkoittaa solun hajottamista kuumassa hapossa. Proteiinien peptidisidokset katkeavat ja aminohapot vapautuvat. Mittauksen kannalta ongelmallista on, että hydrolyysissä hajoavat myös muut solurakenteet. Näyte on siis seos kaikesta mitä solussa on. Useimmiten näyte on puhdistettava ennen mittaamista. Aminohappojen mittaamiseen lisähaastetta tuo se, että niiden signaalit reagoivat voimakkaasti pH:n muutoksiin.

NMR:llä voidaan mitata monilla eri tavoin. Voidaan mitata eri ytimiä tai esimerkiksi kahden ytimen vaikutusta toisiinsa. Yksinkertaiset, yksiulotteiset kokeet ovat kvantitatiivisia, mutta niiden erotuskyky on heikko, eikä yleensä riitä aminohapposeokselle. Kaksiulotteisella kokeella saadaan signaalit tunnistettavasti erilleen, mutta kvantitatiivisuus menetetään. Käytännössä joudutaan tekemään useita eri kokeita tulosten saamiseksi.

HSQC tulee sanoista heteronuclear single quantum coherence, ja sillä havaitaan toisiinsa sitoutuneet hiili- ja vetyatomit. Tavallinen HSQC on altis monenlaisille häiriöille. Helsingin yliopiston tutkimusryhmä professori Ilkka Kilpeläisen johdolla on kehittänyt uuden HSQC-menetelmän, jolla häiriöitä on onnistuttu poistamaan tehokkaasti. Tämä opinnäytetyö käsittelee uuden kvantitatiivisen HSQC:n testaamista.



## 2 TYÖN TAVOITE

HSQC on yleisesti käytetty työkalu VTT:n hiivan metabolomiikan tutkimuksissa. Tässä työssä tutkitaan uuden kvantitatiivisen version soveltuvuutta aminohapposeosten luotettavaan mittaamiseen. Tavoitteena on ottaa menetelmä käyttöön kansallisessa NMR-laboratoriossa. Selvitetään, pystytäänkö koko resonanssialue mittaamaan yhdellä kertaa, vai joudutaanko mittaamaan alifaattinen ja aromaattinen alue erikseen. Tutkimusongelmana on hiililähettimen taajuuden vaikutus kvantitatiivisuuteen.

Hiililähettimen taajuus on käyttäjän asettama mittausparametri. Se määrittää hiilispektrin keskikohdan. Lähettimen lähettämä pulssi vaikuttaa näytteeseen täysin oikein vain täsmälleen keskellä. Pulssin kesto on optimoitu lähettimen taajuuden kohdalle. Mitä kauempana mittaussignaalin taajuus on tästä keskikohdasta, sitä enemmän aiheutuu virhettä. Työssä pyritään selvittämään, kuinka paljon virhettä lähettimen taajuudessa voi olla ilman, että kvantitatiivisuus kärsii.

### 3 NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

NMR, nuclear magnetic resonance, on analyysimenetelmä, jota käytetään rutiininomaisesti kvantitatiivisiin määrittäyksiin. Yksinkertaisessa yksiulotteisessa spektroskopiassa piikkien pinta-alat korreloivat hyvin pitoisuuksien kanssa. Mitä enemmän on tutkittavaa ainetta, sitä voimakkaampi signaali. Kaksiulotteisessa NMR:ssä asia ei ole aivan niin yksinkertainen, sillä signaalin voimakkuuteen vaikuttaa konsentraatiosta riippumattomia tekijöitä kuten kytkentöjä.

HSQC, heteronuclear single quantum coherence, on mittaussuunnitelma, joka havaitsee hiilen ja vedyn välisen kytkennän. HSQC:lla voidaan tutkia myös esimerkiksi tyypin kytkentöjä vetyyn, mutta tässä työssä keskitytään  $^{13}\text{C}$ -kytkentöihin. Kytkentä tarkoittaa ytimien välistä vuorovaikutusta toisiinsa. Signaalin voimakkuus riippuu paitsi konsentraatiosta myös hiili-protoni-kytkennän voimakkuudesta, joka saattaa vaihdella suuresti molekyylin sisällä. Lisäksi vety-ydin, protoni, saattaa kytkeä häiritsevästi muihin lähiympäristön protoneihin.

Professori Ilkka Kilpeläisen ryhmän kehittämä kvantitatiivinen HSQC (q-CAHSQC) pyrkii poistamaan edellä mainittuja häiriöitä [2].

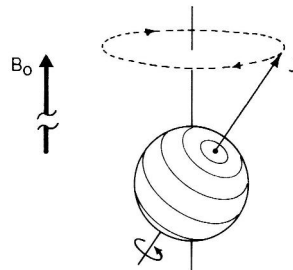
#### 3.1 NMR:n perusteet

NMR-laitteet havaitsevat atomydinten reaktioita radiotaajuussäteilyyn magneettikentässä. Laitteet havaitsevat vain niitä ytimiä, joiden spinquanttiluku,  $I$ , on erisuuri kuin 0. Spinquanttiluku on ytimelle ominainen vakio ja riippuu protonien ja neutronien lukumäärästä ytimessä. Jos molempia on parillinen määrä, saa  $I$  arvon 0, eikä ytimellä ole merkitystä NMR:ssä. Tällaisia ovat muun muassa yleiset  $^{12}\text{C}$  ja  $^{16}\text{O}$ . [3, s. 2.]

Tärkeimmät ytimet NMR:ssä ovat  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$ . Niistä merkittävin on vety-ydin, koska sen luontainen esiintyvyys on yli 99,9 %. Sitä on paljon mitattavaksi, toisin kuin hiili-13:a, jota esiintyy luontaisesti vain 1,1 %. Muita NMR:llä havaittavia ytimiä ovat muun muassa  $^{15}\text{N}$  ja  $^{31}\text{P}$ . Tässä työssä keskitytään  $^1\text{H}$ - ja  $^{13}\text{C}$ -spektroskopiaan. [3, s. 2.]

### 3.1.1 Hiukkanen magneettikentässä

Kun atomiydin asetetaan magneettikenttään, asettuu se spininsä mukaisesti kahteen eri energiatilaan. Spinien voidaan ajatella olevan kuin pieniä magneetteja, jotka asettuvat joko magneettikentän suuntaisesti tai sitä vastaan. Spin kuvaa hiukkasen pyörimissuuntaa, joka voi olla joko myötä- tai vastapäivään. Magneettikentässä hiukkanen pyörii kuvan 1 mukaisesti hyrrän tavoin hieman vinossa. Magneettikentän,  $B_0$ , suunta on z-akselin suunta suoraan ylöspäin. Hiukkasen akselin suuntaisesti aiheutuva magneettinen momentti on kuvattu vektorilla  $J$ . Tässä työssä puhuttaessa ytimen magnetisaatiosta tarkoitetaan magneettisen momentin projektiota z-akselille. [4, s. 64.]



Kuva 1. Hiukkasen pyörimisliike magneettikentässä ja sen aiheuttama magneettinen momentti [4, s. 64]

Taajuutta, jolla  $J$  pyörii z-akselin ympäri, sanotaan resonanssi- eli Larmor-taajuudeksi [4, s. 64]. Taajuuden energiaa kuvaa kaava 1 [5, s. 3].

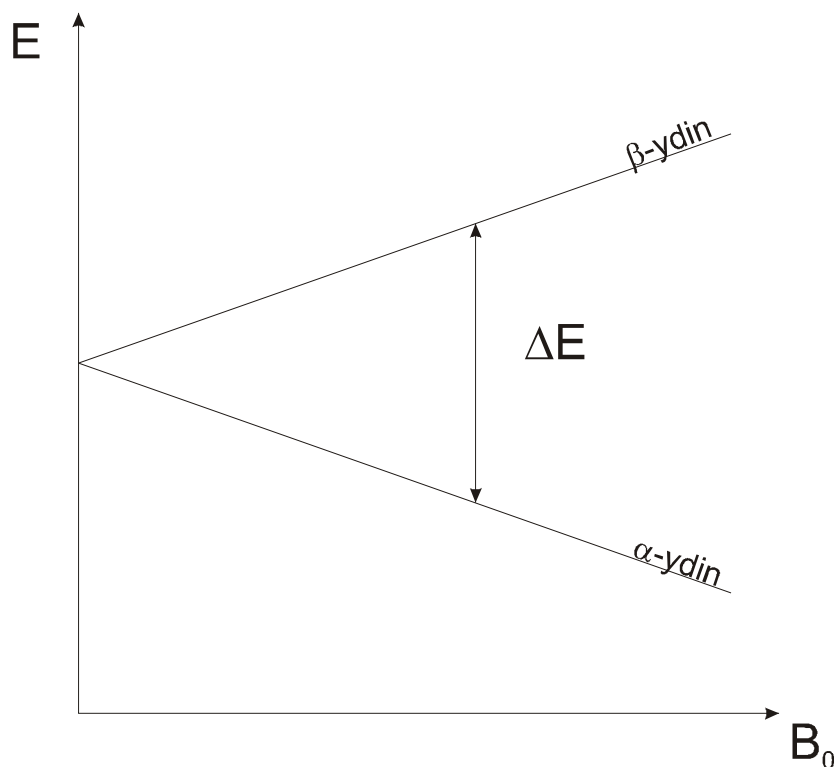
$$E = h\nu \quad (1)$$

missä:

$$h = \text{Plankin vakio} = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

$$\nu = \text{taajuus [Hz]}$$

Magneettikentän suuntaisesti olevan  $\alpha$ -ytimen ja vastakkaisen  $\beta$ -ytimen välistä energiaeroa havainnollistaa kuva 2. Energiaero on suoraan verrannollinen ulkoisen magneettikentän voimakkuuteen  $B_0$ . [5, s. 3.]



Kuva 2. Kahden spin-tilan välinen energiaero magneettikentän voimakkuuden funktiona [5 s. 4]

Tilojen välistä energiaeroa kuvaa kaava 2 [5, s.3].

$$\Delta E = \gamma \hbar B \quad (2)$$

missä:

$\gamma$  = gyromagneettinen suhde [ $\text{rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,054 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

$B$  = magneettikentän voimakkuus [T]

Gyromagneettinen suhde on ytimelle ominainen vakio, joka kuvaa ytimen magnetisaation voimakkuutta. Protonille se on  $2,675 \cdot 10^8 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$  ja hiili-13:lle  $0,702 \cdot 10^8 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ . [3, s. 3.]

Kaavoista 1 ja 2 saadaan johdettua kaavan 3 mukainen resonanssiefoto:

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (3)$$

Kun näytteeseen johdetaan resonanssiehdon täyttävää säteilyä, vaihtavat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ytimet suuntaa eli ytimet virittyvät. Ilmiötä kutsutaan resonanssiksi. NMR-laitteilla havaitaan ytimen viritystila.

### 3.1.2 Kemiallinen siirtymä

Spektrien tulkintaa varten on käytännöllistä muuttaa resonanssitaajuus yksiköittäväksi kemialliseksi siirtymäksi. Se lasketaan resonanssitaajuudesta kaavan 4 mukaisesti.

$$\delta = \frac{\nu_{\text{näyte}} - \nu_{\text{standardi}}}{\nu_0} \quad (4)$$

missä

$\nu_{\text{näyte}}$  = mitattu resonanssitaajuus

$\nu_{\text{standardi}}$  = standardin resonanssitaajuus

$\nu_0$  = laitteen nimellinen resonanssitaajuus.

Standardina käytetään tyypillisesti tetrametyylisilanaa (TMS) tai sen johdannaisista, jonka kemiallinen siirtymä on sovittu olevan 0. Osoittajan erotuksen arvo on tyypillisesti joitain satoja hertsejä, kun nimittäjässä on esimerkiksi 600 MHz. Kemiallinen siirtymä ilmaistaankin miljoonasosina ppm-asteikolla. [5, s. 18.]

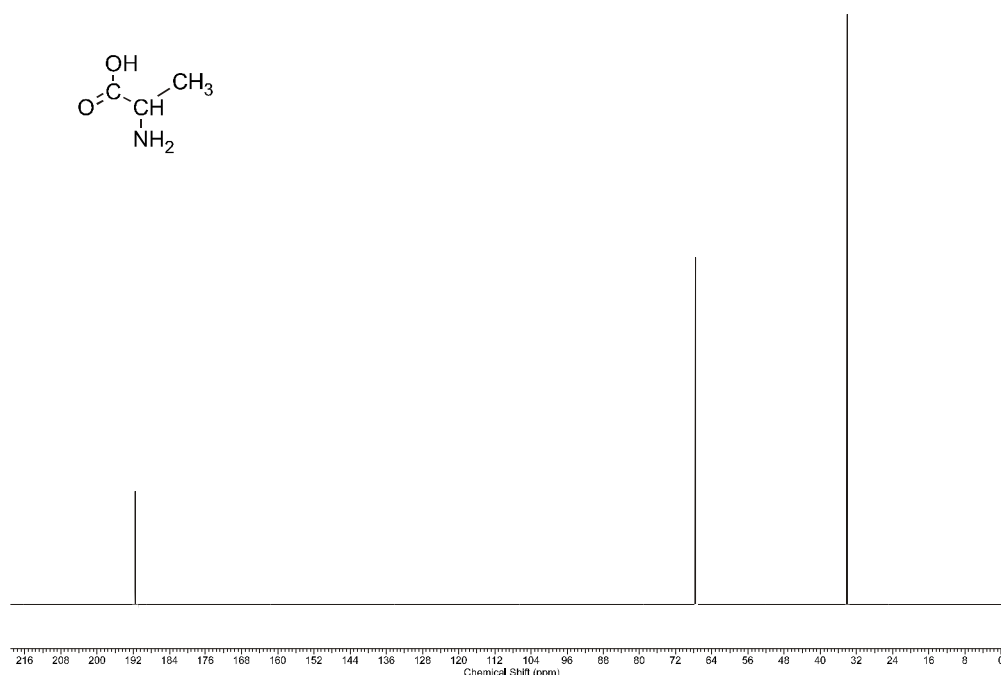
Kemiallisen siirtymän tekee hyödylliseksi se, että se on riippumaton mittauslaitteen nimellisestä resonanssitaajuudesta. Näin voimme helposti verrata eri laitteilla mitattuja tuloksia keskenään.

### 3.1.3 NMR rakenneanalytiikassa

NMR:n käyttö molekyylien rakenneanalytiikassa perustuu siihen, että ytimet resonovat kukin hieman eri taajuuksilla. Ytimen kokema magneettikenttä riippuu ytimien kemiallisesta ympäristöstä. Kemialliseen ympäristöön vaikuttavat 1–4 sidoksen päässä olevat atomit. [5, s. 70.]

Ytimen ympärillä oleva elektroniverho suojaa ydintä ulkoiselta magneettikentältä. Ydin "kokee" magneettikentän useimmiten pienempänä kuin mitä on ulkoisen magneettikentän teho. Ytimen kemiallinen ympäristö vaikuttaa suojaavan elektroniverhon rakenteeseen. [5, s. 70.]

Ytimen resonanssitaajuudesta pystytään päättelemään, minkälaisessa kemiallisessa ympäristössä ydin on. Erilaisissa ympäristöissä olevien ydinten kemialliset siirtymät pystytään ennustamaan taulukoiden avulla. Elektro-negatiivinen atomi ytimen vieressä vetää elektroneja puoleensa voimakkaasti ja vähentää näin elektroniverhon suojausten vaikutusta. Mitä vähemmän on elektroniverhon suojausta, sitä voimakkaammin koetaan magneettikenttä ja sitä korkeampi on resonanssitaajuus. Tilannetta havainnollistaa kuvan 3 alaniinin  $^{13}\text{C}$ -spektri. [3, s. 43.]



Kuva 3. Alaniinin  $^{13}\text{C}$ -spektri

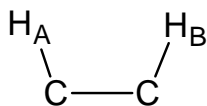
Spektrissä havaitaan kolme piikkiä, joista kukin vastaa yhtä alaniinin hiili-atomia. Vasemmanpuoleisin piikki aiheutuu karbonyylihiilestä, jonka kaksi happiatomia yhden sidoksen päässä vetävät elektroniverhoa tehokkaasti puoleensa. Oikeanpuoleisin piikki on metyyliryhmästä, koska se on neutraalissa ympäristössä ja sillä on siten eniten varjostusta. Keskimäinen piikki jää  $\alpha$ -hiilelle. Elektro-negatiivisen typhen läheisyys vähentää sen varjostusta.

Spektrin tulkinta on triviaalia, kun näytteessä on yksi pieni tunnettu aminohappo. Jos kuvan 3 spektri olisi tuntemattomasta yhdisteestä, olisi tilanne hankalampi. Tutkimalla ja vertailuspektrien avulla saattaisi löytää oikean yhdisteen, mutta paljon helpompaa on mitata esimerkiksi protoni-spektri. Siitä havaitaan muun muassa kytkentöjä.

### 3.1.4 Protonikytkentä

Kytkentä on kahden ytimen vuorovaikutusta toisiinsa. Magneettikentässä se havaitaan normaalisti yhden, kahden tai kolmen sidoksen yli. [3. s. 26.]

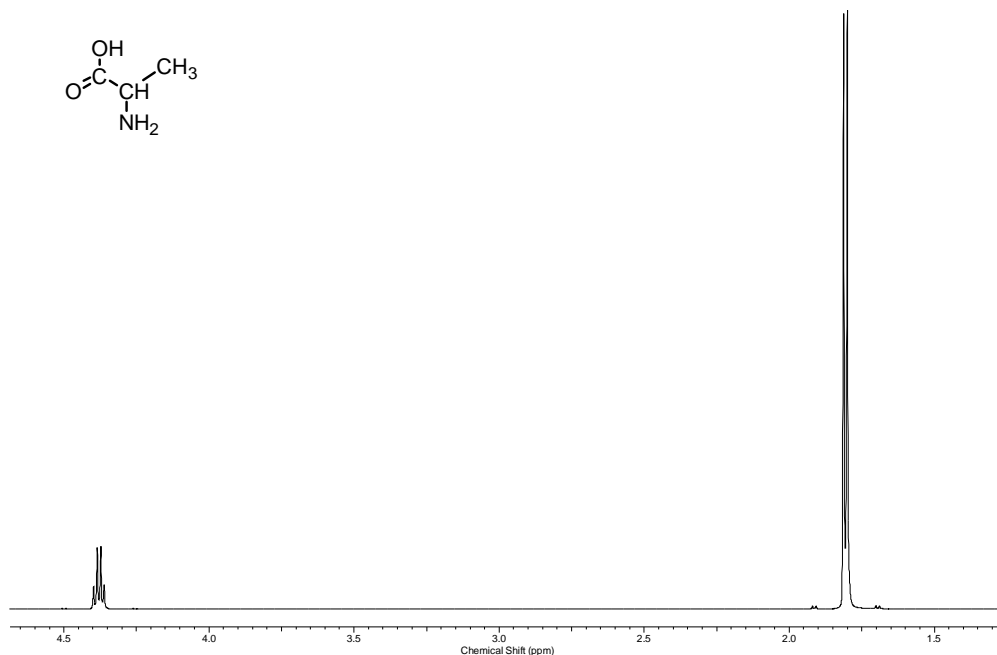
Kuvan 4 tapauksessa vierekkäiset vedyt  $H_A$  ja  $H_B$  kytkevät toisiinsa. Magneettikentässä molemmat protonit ovat magnetisoituneet. Viereinen B-protoni aiheuttaa magneettikenttään oman spininsä suuruisen häiriön, joka spinin suunnasta riippuen joko voimistaa magneettikenttää hieman tai heikentää sitä yhtä paljon. A-protoni "aistii" magneettikentän hienoisen muutoksen ja sen Larmor-taajuus muuttuu hieman. Taajuuden muutos on kytkentä, joka ilmoitetaan hertseinä. [3. s. 26.]



Kuva 4. Toisiinsa kytkevät vedyt  $H_A$  ja  $H_B$

Spektrissä kytkentä havaitaan piikin jakaantumisenä useaan osaan. Näytteessä on miljoonia molekyyliä, joista kaikista havaitaan kytkentä. Todennäköisyyksien mukaan puolessa molekyyleistä  $H_B$ :n spin on ylöspäin ja puolessa alaspäin. Näytteen A-protonit resonovat kahdella vierekkäisellä taajuudella yhtä voimakkaasti, joten spektriin saadaan kaksi yhtä korkeaa piikkiä vierekkäin. Sama pätee toisin päin B-protonille. Rakenneanalytiikassa käytetään hyväksi sitä, että  $H_A$ :n kytkentä  $H_B$ :hen on yhtä suuri hertseissä kuin  $H_B$ :n kytkentä  $H_A$ :han. [5, s. 29.]

Toinen esimerkki on kuvan 5 alaniinin  $^1H$ -spektri. Metyyliryhmän kaksoispiikki eli dubletti on kuvassa oikealla ja CH-ryhmän kvartetti vasemmalla. Piikkien hienorakenne syntyy viereisen hiilen protonien lukumäärästä. Piikkejä havaitaan aina yksi enemmän, kuin viereisessä hiilessä on vetyjä. Kummankin piikkiryhmän keskikohta on kemiallisen ympäristönsä mukaisella paikalla. [5, s. 33.]



Kuva 5. Alaniinin  $^1\text{H}$ -spektri

Metyylin viereisessä  $\alpha$ -hiilessä on vain yksi protoni, joka luo kaksi erilaista energiatilaa ympäristöönsä. Tämän takia metyyliryhmästä saadaan kaksi piikkiä [3, s. 26]. CH-ryhmän signaali on jakaantunut neljään osaan kvartetiksi. Viereisen  $\beta$ -hiilen kolme protonia voivat jokainen olla magneettikentän suuntaisesti tai sitä vastaan [3, s. 26]. Protonit aiheuttavat yhteensä neljä erilaista energiatilaa, joiden suhteet ovat 1:3:3:1 [5, s. 33]. CH-ryhmän signaali on jakaantunut tässä suhteessa.

Hapteen ja typpeen sitoutuneita vetyjä ei havaita, mikä johtuu käytetystä deuteroidusta liuottimesta. Liuoksessa nämä vedyt vaihtuvat nopeasti deuteriumiin, jota ei havaita tavallisessa protonispektrissä. [3, s. 59.]

Alaniinin dubletin pinta-ala suhteessa kvartettiin on 3:1. Kolme metyylin vetyä vastaan  $\alpha$ -hiilen yksi. Spektristä saadaan erilaisten protonien suhteet kvantitatiivisesti. [3, s. 34.]

Kytkenän avulla pystytään tuntemattoman yhdisteen rakennetta selvittämään tehokkaammin kuin pelkän kemiallisen siirtymän avulla. Kytkenän voimakkuus vaihtelee ytimien ympäristön mukaan ja sen voimakkuutta kuvaa kytkentävakio.



### 3.1.5 Hiilikytkentä

Tarkasti katsoen voi kuvassa 5 havaita myös hiilikytkennän. Dubletin molemmilla puolilla on pohjaviivassa pienet nyppylät. Se on protonin  $^{13}\text{C}$ -kytkentä yhden sidoksen yli. Signaali on pieni, sillä vain 1,1 % kaikista hiiliatomeista on hiili-13:a. [3, s. 33.]

Hiilispektreissä havaitaan vastaavanlainen protonikytkentä. Useimmiten se ei tuo lisäarvoa analyysiin, vaan päinvastoin vaikeuttaa entisestään heikon hiilisignaalin mittaamista. Usein on järkevää irtauttaa protonikytkennät, kuten kuvassa 3 on tehty. Kuva 3 onkin tarkkaan ottaen alaniinin *protoni-irtautettu*  $^{13}\text{C}$ -spektri. [3, s. 133.]

Protonikytkennät pirstoisivat jo valmiiksi pienet piikit vaikeasti tulkittaviksi multipleteiksi. Irtautuksella kumotaan protonien vaikutus kemialliseen ympäristöön ja  $^{13}\text{C}$ -piikit havaitaan singletteinä. Kytkennän irtautus tapahtuu nykyään yleensä pulssimenetelmällä. [3, s. 133.]

## 3.2 Pulssimenetelmä

Ensimmäiset NMR-laitteet mittasivat jatkuvalla radiotaajuuksisella säteilyllä. Siinä säteilyn taajuutta nostettiin tasaisesti yli resonanssialueen. Kun taajuus osuu täsmälleen oikeaan, ydin resonoi ja saadaan signaali. Menetelmä on sinänsä toimiva, mutta hidas, ja mahdollistaa vain yksiulotteisen spektroskopian. Nykyaikaiset laitteet käyttävät pulssitekniikkaa. [4, s. 9.]

### 3.2.1 Pulssi

Pulssitekniikassa ideana on lähettää näytteeseen kaikkia taajuuksia yhtä aikaa. Silloin kaikki ytimet resonoi samanaikaisesti ja koko spektri saadaan mitattua hetkessä. Lyhytkestoisella radiotaajuuspulssilla, jonka pituus on vain noin 10  $\mu\text{s}$ :a, on juuri sellainen vaikutus ytimiin. Epätarkkuusperiaatteen mukaan mitä lyhyempi on pulssin kesto, sitä laiveampi on sen taajuusalue. Epätarkkuusperiaate on esitetty kaavassa 5. [4, s. 10.]

$$\Delta E \cdot \Delta t \approx h \quad (5)$$

missä:

$$E = h\nu$$

### 3.2.2 Taajuusalue ja lähetin

Protonispektrin resonanssialue on noin 600 MHz:n laitteella noin 6000 Hz:ä. Tarvittava pulssin pituus voidaan laskea epätarkkuusperiaatteen avulla. [4, s. 10.]

Kaavasta 5 saadaan:

$$\begin{aligned} h\Delta\nu \cdot \Delta t &\approx h \\ \Leftrightarrow \\ \Delta t &\approx \frac{1}{\Delta\nu} \end{aligned} \tag{6}$$

Kaavasta 6 saadaan, että 6000 Hz:n taajuusalueelle riittää n. 0,2 ms:n pituinen pulssi. Todellisuudessa pulssit ovat kymmenen mikrosekunnin luokkaa. Hiili resonoi kuitenkin suuremmalla taajuusalueella kuin protoni, noin 35 000 Hz:n alueella. Kaavan 6 mukaan riittävä pulssin pituus olisi noin 30  $\mu$ s:a. [4, s. 10.]

Pulssin keskikohdan määrittää lähettimen taajuus. Lähettimen taajuus pyritään asettamaan mahdollisimman keskelle spektriä, jotta pulssi vaikuttaisi tasaisesti koko mittausalueella. Pulssin vaikutus heikkenee, kun etäännyttään keskikohdasta. Protonispektroskopiassa lyhyen pulssin taajuusalue riittää mainiosti kattamaan tutkittavan alueen, mutta hiilispektriin saattaa spektrin reunoilla syntyä merkittävää virhettä.

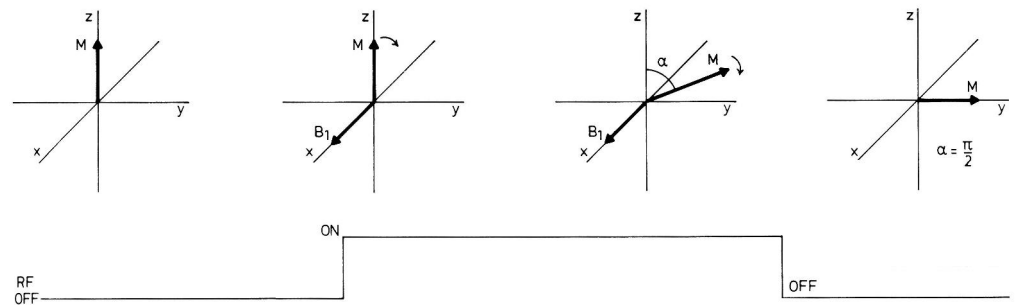
Spektrometrissa on erikseen hiili- ja protonitaajuuslähettimet. Monissa kokeissa ne lähettävät pulsseja samanaikaisesti. Hiililähettimen taajuuden määrää mittauksissa parametri dof, joka tulee sanoista decoupler offset.

### 3.2.3 Pulssin vaikutus ytimen magnetisaatioon

Kuvassa 6 on vektorimalli pulssin vaikutuksesta ytimen magnetisaatioon eri ajanhetkillä. Kuva on aikajanalla vasemmalta oikealle. Yllä on vektorimalli magnetisaation muutoksesta ja alla lähettimen signaalin voimakkuus eli pulssi. Ulkoinen magneettikenttä on z-akselin suuntainen. Ytimen magnetisaatio kuvataan M-vektorina.

Pulssi lähetetään 90 asteen kulmassa kenttään nähden, x-akselilla. Kuvassa pulssia havainnollistaa  $B_1$ -vektori. Niin kauan kuin pulssi on päällä, se kiertää ytimen magnetisaatiota x-akselin suhteen. Pulssin pituus valitaan

siten, että magnetisaatio on kiertynyt  $90^\circ$  verran. Tällaista pulssia kutsutaan  $90^\circ$ -pulssiksi. [4, s. 67.]



Kuva 6.  $90^\circ$ -pulssi ja sen vaikutus ytimen magnetisaatioon [4, s. 67]

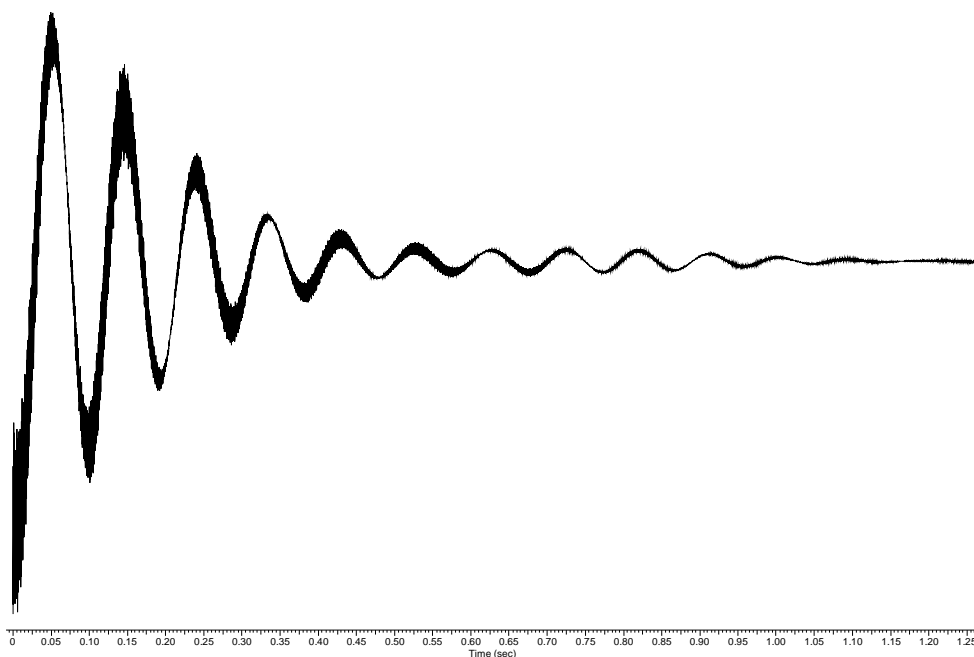
Kuvan 6 alalaidassa on radiotaajuuslähtetimen tehon kuvaaja [4, s. 67]. Se kuvaa varsinaisen pulssin alkamista ja loppumista ajan funktiona [4, s. 67]. Vektorimalli jätetään yleensä kuvasta pois, ja pulssisarja esitetään lähtetimen tehon kuvaajalla, kuten kuvassa 10.

Pulssitekniikka mahdollistaa kaikkien resonanssitaajuuksien yhtäaikaisen mittaamisen [4, s. 11]. Yhdistelemällä erilaisia pulsseja pystytään kääntelemään ytimen magnetisaatiota halutulla tavalla. Tämä mahdollistaa muun muassa kytkennän irtautukset ja kaksikulotteiset mittaukset, joilla molekyylin rakennetta pystytään toden teolla analysoimaan.

### 3.2.4 Signaalin mittaus

NMR-laite mittaa ytimen viritystilaa. Kuvan 6 tapauksessa mitataan M-vektorin projektiota xy-tasoon. Kuvassa käännettiin magnetisaatiota  $90^\circ$ , jotta M-vektorin projektio xy-tasoon olisi mahdollisimman suuri. Silloin mittaussignaali on mahdollisimman voimakas.

Pulssin jälkeen magnetisaatio alkaa oskilloiden palata takaisin normaaliin tilaan. Mittauksen tuloksena saadaan vaimeneva oskilloiva käyrä FID eli free induction decay. Kuvassa 7 on alaniinin protonimittauksessa saatu signaali ajan funktiona. [4, s. 12.]



*Kuva 7. Alaniinin protonispektrin FID*

Kuvan 7 käyrässä on yhteenlaskettuna kaikki alaniinista tulevat signaalit. Matemaattisella Fourier-muunnoksella saadaan FID:stä havainnollinen spektri. Tässä tapauksessa tuloksena on kuvan 5 alaniinin  $^1\text{H}$ -spektri. [4, s. 13.]

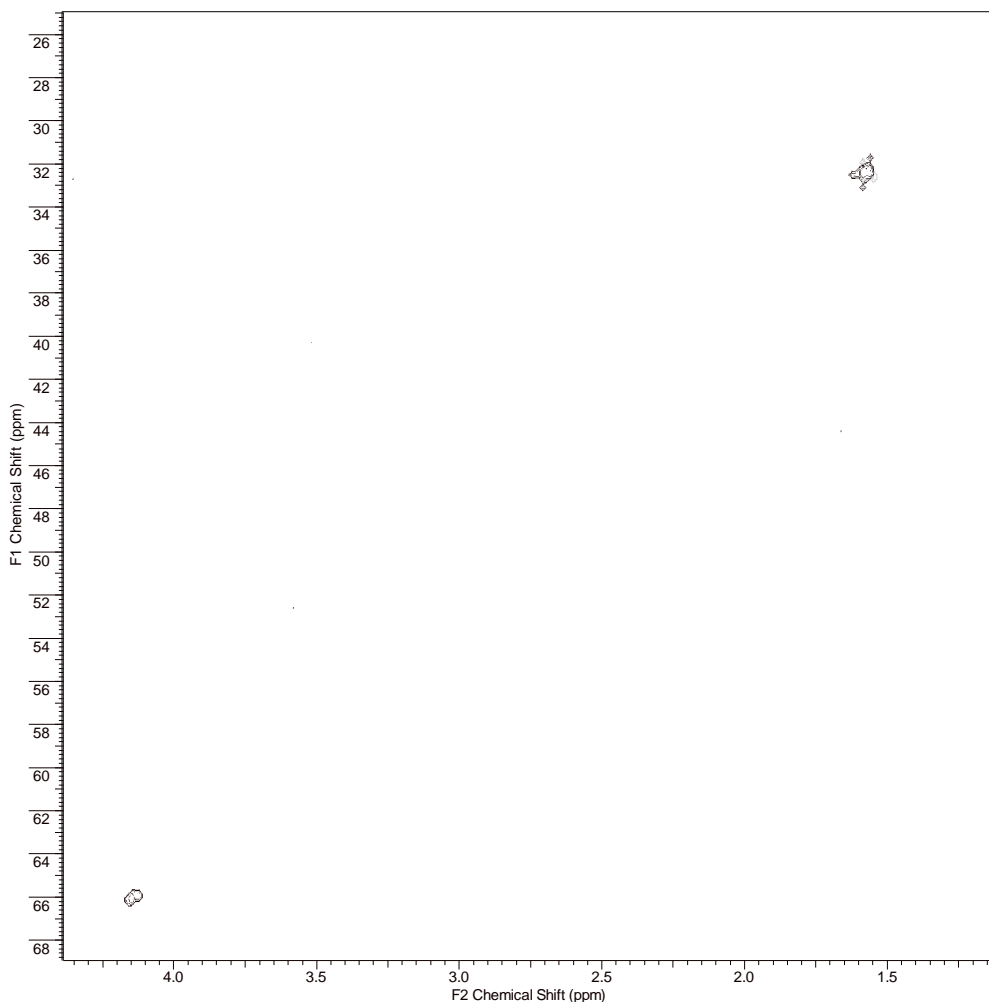
### 3.3 2D-NMR

Kaksiulotteinen NMR on tehokas työkalu molekyylien rakenteen selvittämiseksi. Sillä pystytään monimutkaisista näytteistä selvittämään ytimien välisiä kytkentöjä ja vuorovaikutuksia. [5, s. 274.]

2D-NMR ei ole vain yksi menetelmä, vaan laaja kirjo erilaisia mittausmenetelmiä, joista kukin mittaa tarkasti vain yhtä asiaa. Yksi mittaa vierekkäisten vetyjen välistä kytkentää, toinen havaitsee kytkennät useamman sidoksen päässä olevaan vetyyn, kolmas havaitsee vedyn ja hiilen välisen yhteyden. [3, s. 231.]

Yksi yleisimmin käytetyistä menetelmistä on HSQC. Se mittaa vety-ytimen kytkentää yhden sidoksen yli hiileen. Kuvan 5 spektrissä havaitaan pienet kytkennät dubletin molemmilla puolilla. HSQC mittaa pelkästään näitä pieniä hiilikytkentöjä [3, s. 264]. Lopputuloksesta nähdään, mihin hiileen kukin protoni on liittynyt. [6, s. 418.]

Kuvassa 8 on alaniinin HSQC-spektri. Se on kuin yhdistelmä kuvista 4 ja 5. Protonin ppm-asteikko on vaaka-akselilla ja hiilen pystyakselilla. Piikit näkyvät pisteinä akselien muodostamassa kentässä ja osoittavat todellisuudessa tasosta ylöspäin. Hiilispektrin karbonyylipeikkiä ei havaita, koska siihen hiileen ei ole sitoutunut vetyä.



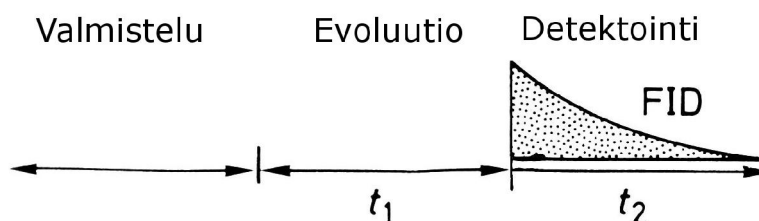
Kuva 8. Alaniinin HSQC-spektri

### 3.3.1 2D-spektrin mittaaminen

Kaksiulotteisen spektrin mittaamisen perusidea on seuraava: Mitataan useita 1D-spektrejä peräjälkeen siten, että jokaisen pulssisarja eroaa hienokseltaan edellisestä. Näin saadusta spektrisarjasta havaitaan signaalien intensiteetin tai vaiheen muutos, josta Fourier-muunnoksella saadaan toinen ulottuvuus. [5, s. 275.]

Pulssisarjassa on kolme perusosaa, joita havainnollistaa kuva 9. Valmisteluvaiheessa systeemi saatetaan lähtötilaan, niin että mittaukset ovat

alkuasetelmiltaan samat. Evoluutiovaiheessa systeemin annetaan kehittyä vapaasti ajan  $t_1$  verran. Lopuksi detektoidaan signaali. Koetta toistetaan esimerkiksi 128 kertaa ja joka kierroksella evoluutioaikaa jatketaan hiukan. [5, s. 274.]

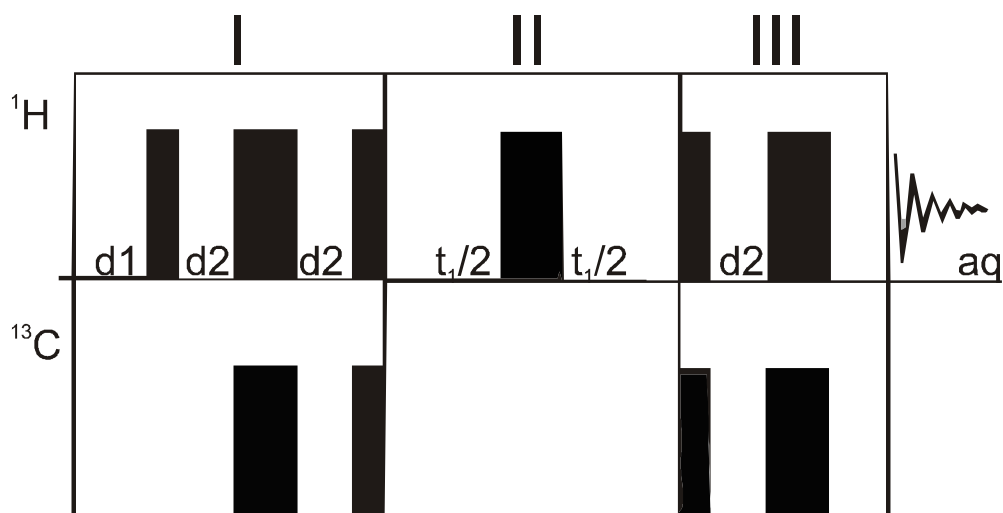


Kuva 9. 2D-mittauksen vaiheet [5, s. 274 mukailten]

### 3.3.2 HSQC:n perusteet

Tavallisen HSQC-mittauksen pulssisarja on kuvassa 10. Ylempi taso kuvaa protonikanavan pulsseja ja alempi hiilikanavan. Kapeat pulssit ovat  $90^\circ$ -pulsseja ja leveät  $180^\circ$ -pulsseja. Kuvassa  $d_1$  ja  $d_2$  ovat erimittaisia taukoja ja  $t_1$  kuvaa evoluutioaikaa. [6, s. 418.]

Ensimmäinen osa on valmisteluvaihe. Siinä protonin polarisaatio siirretään hiillelle niin sanotulla INEPT-menetelmällä. Siirto tapahtuu CH-kytkennän kautta. Pulssien välinen tauko,  $d_2$ , on optimoitu vastaamaan näytteen kytkentävakioiden keskiarvoa. [6, s. 418.]



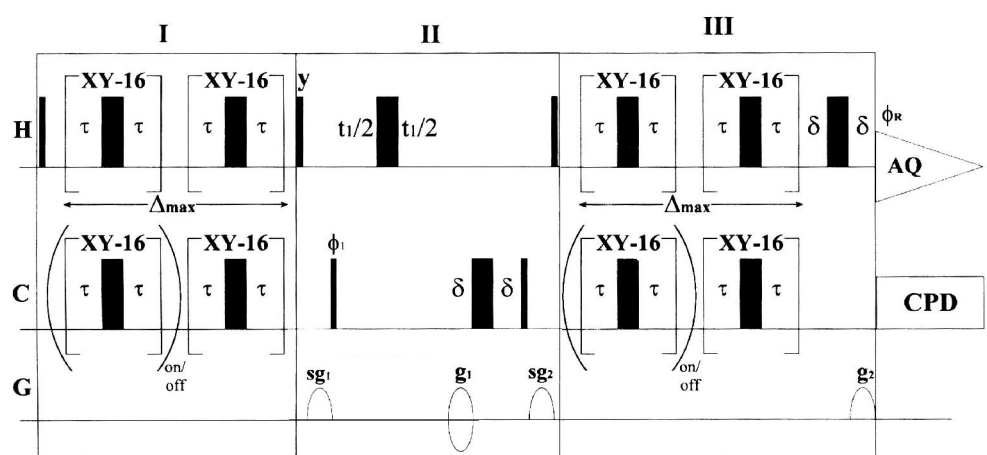
Kuva 10. HSQC-pulssisarja [6, s. 418 mukailten]

Kuvassa osa II on evoluutiovaihe. Siinä magnetisaation annetaan kehittyä hiilellä ajan  $t_1$  verran. Samanaikainen protonikanavan  $180^\circ$ -pulssi poistaa häiriötä aiheuttavan CH-kytkennän. Osassa 3 siirretään magnetisaatio takaisin protonille tekemällä käänteinen INEPT. Lopuksi mitataan signaali protonikanavalta. Seuraavissa mittauksissa evoluutioaikaa  $t_1$  pidennetään asteittain. [3, s. 263; 5, s. 418.]

### 3.3.3 Kvantitatiivinen HSQC

Edellä kuvatun HSQC-mittauksen ongelma kvantitatiivisessa mielessä on CH-kytkennän kautta tapahtuva polarisaation siirto. Se on optimoitu toimimaan oikein yhdellä kytkentävakiolla. Mitä kauemmas tästä keskiarvosta siirrytään, sitä enemmän virhettä signaaleissa esiintyy. Kilpeläisen ryhmän kehittämässä menetelmässä jokainen spektri kerätään neljään kertaan d2-aikaa vaihdellen. Näin saadaan vertailukelpoisia signaaleja yli tutkittavan kytkentäväkioalueen. [2.]

Kvantitatiivisen HSQC:n pulssisarja on esitetty kuvassa 11. Ylimmäisenä on jälleen  $^1\text{H}$ -kanava, keskellä  $^{13}\text{C}$ -kanava ja alimmaisena gradienttikanaava. Gradienttipulssien tarkoituksena on tasoittaa magneettikenttää mittausalueessa ja näin parantaa mittaustulosta [3, s. 188]. Kuvassa AQ tarkoittaa signaalin mittausta protonikanavalta. CPD hiilikanavan lopussa tulee sanoista composite pulse decoupling [7, s. 105]. Se tarkoittaa hiilikytkentöjen irtauttamista [7, s. 105].



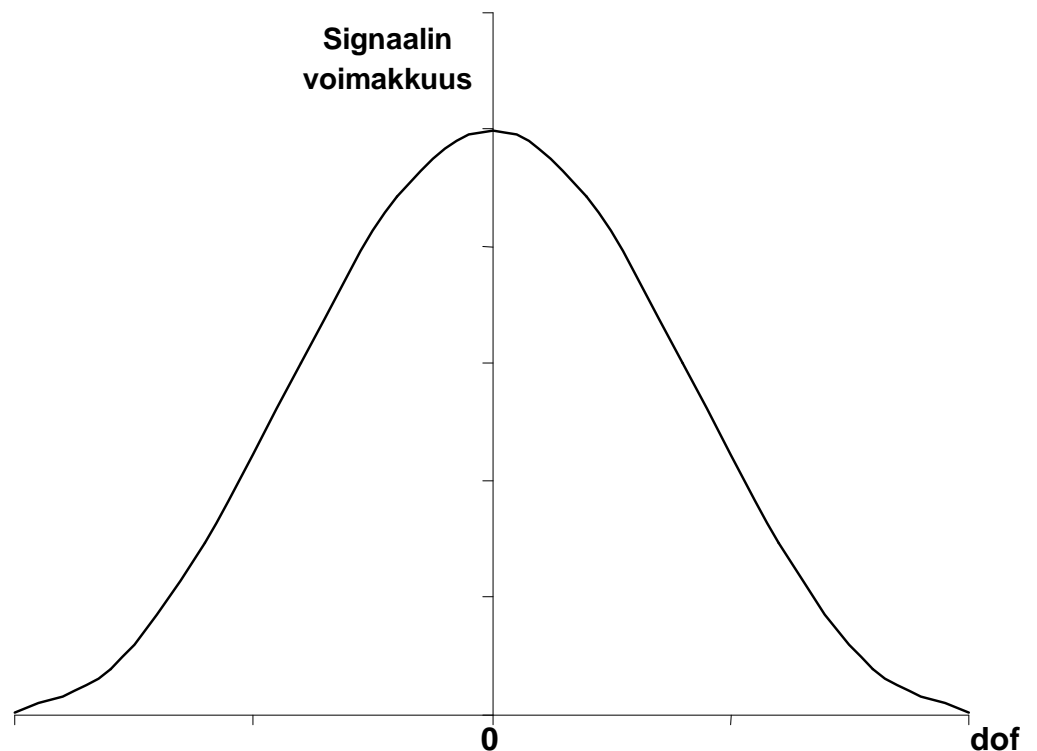
Kuva 11. kvantitatiivisen HSQC:n pulssisarja [2 mukailen]

Perinteisen HSQC:n INEPT-osat on korvattu XY-16-menetelmillä. XY-16-sarja sisältää 16 xy-suunnissa vaihtelevaa  $180^\circ$ :n pulssia. Lopputulos on

magnetisaation kannalta sama kuin INEPT-menetelmällä, mutta protonien väliset kytkennät putoavat tehokkaasti pois. [2.]

### 3.3.4 Hiililähettimen taajuuden vaikutus

Pulssi vaikuttaa ytimiin täysin oikein vain lähettimen kohdalla. Kun ytimen resonansitaajuus eroaa lähettimen taajuudesta, saadaan mittauksessa hieman todellisuutta heikompi signaali. Sama vaikutus on lähettimen paikan siirrolla.



Kuva 12. Sinc-käyrä [2 mukailen]

Kilpeläisen ryhmä mittasi metanolilla, kuinka paljon dof:n siirtymä vaikuttaa piikin intensiteettiin. Mittaus suoritettiin kvantitatiivisen HSQC:n menetelmällä yksiulotteisesti dof:n arvoa vaihdellen. Saatiin sarja 1D-spektrejä, joista piikin intensiteetti mitattiin. Tulokset noudattivat hyvin kaavan 7 kaltaista sinc-funktiota. Kuvaaja on esitetty kuvassa 12. [2.]

$$y = (\text{sinc}(3x))^2 = \left( \frac{\sin(3x)}{3x} \right)^2 \quad (7)$$

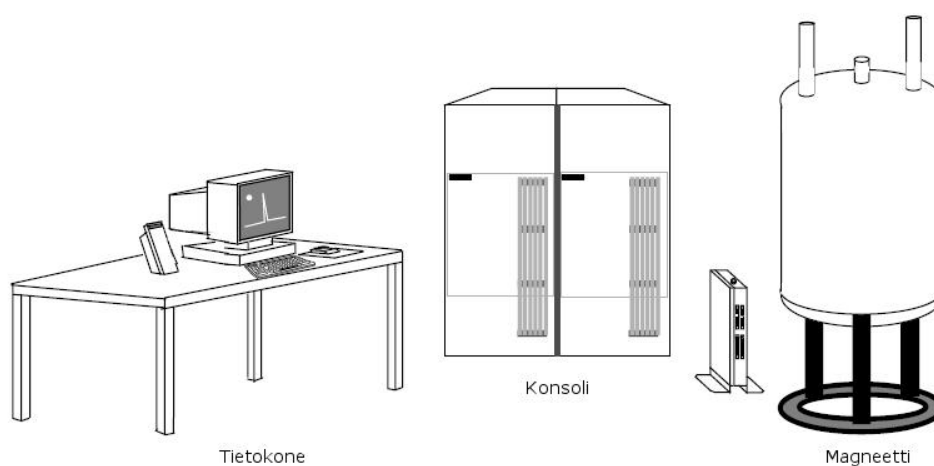


## 4 TYÖN SUORITUS

Työn aluksi perehdyttiin yliopistolta saatuun C-kieliseen pulssisekvenssiin. Koodista korjattiin yksi selkeä lapsus, joka liittyi XY-16-pulssisarjaan. Yksi pulssi oli suunnattu väärään suuntaan.

### 4.1 Mittalaite

Mittaukset tehtiin Varianin Inova 600 -spektrometrillä. Laitteiston yleiskuva on kuvassa 13. 600 MHz:n laitteessa magneettikentän voimakkuus on 14,1 teslaa. Se saadaan aikaan suprajohtavalla sähkömagneetilla, jota jäähdytetään nestemäisellä heliumilla ja typellä.



Kuva 13. Mittalaitteisto [8]

### 4.2 Näytteet

Mittaukset tehtiin kaupallisilla puhtailla aminohapoilla. Aminohapoista valmistettiin kaksi seosta, näytteet 1 ja 2. Seokset pyrittiin valmistamaan siten, että näytteessä olisi yhtä suuret ainemäärät kutakin aminohappoa.

Näytteessä 1 on neljä aminohappoa: alaniini, asparagiini, seriini ja tyrosiini. Punnitustulokset ja ainemäärät on listattu taulukkoon 1. Aminohapot valittiin siten, että ne kattaisivat mittausalueen mahdollisimman hyvin. Valittiin lähinnä hydrofiilisiä aminohappoja, poikkeuksena alaniini, jotta liuotuksessa syntyisi mahdollisimman vähän suhteellista virhettä yhdisteiden välille. Aminohapot liuotettiin 600 µl:aan raskasta vettä, D<sub>2</sub>O. Liuoksen pH säädettiin arvoon 1 deuteroidulla suolahapolla, DCl.

Taulukko 1. Näytteen 1 koostumus

	M (g/mol)	Punnitustulos (mg)	n (mmol)
Ala	89,1	9,9	0,11
Asn	132,1	13,8	0,10
Ser	105,1	10,9	0,10
Tyr	181,2	18,3	0,10

Näyte 2 valmistettiin kaikista proteiineissa esiintyvistä 20 aminohaposta. Näytteen koostumus on esitetty taulukossa 2. Aminohappojen kokonaismassa on nyt suurempi kuin näytteessä 1, joten liuotukseen jouduttiin käyttämään noin 5 ml D<sub>2</sub>O:ta. Happamuus säädettiin pH-arvoon 1 kuten edellä.

Taulukko 2. Näytteen 2 aminohapot

	M (g/mol)	Punnitustulos (mg)	n (mmol)
Ala	89,1	18,5	0,21
Arg	174,2	43,3	0,25
Asn	132,1	25,7	0,19
Asp	133,1	27,8	0,21
Cys	121,2	23,7	0,20
Glu	147,1	28,5	0,19
Gln	146,1	29,5	0,20
Gly	75,1	15,2	0,20
His	155,2	31,9	0,21
Ile	131,2	25,3	0,19
Leu	131,2	25,7	0,20
Lys	146,2	29,2	0,20
Met	149,2	31,0	0,21
Phe	165,2	32,0	0,19
Pro	115,1	22,9	0,20
Ser	105,1	21,2	0,20
Thr	119,1	24,7	0,21
Trp	204,2	41,0	0,20
Tyr	181,2	36,6	0,20
Val	117,1	24,8	0,21

Näytteen liuotuksessa oli odotusten mukaisia ongelmia niukkaliukoisten aminohappojen kanssa. Lämmittämällä seosta vesihauhteella ja laskemalla pH saatiin suuri osa näytteestä liuokseen. Pohjalle jäi kuitenkin pieni sakka.

### 4.3 Mittaukset näytteellä 1

Näytteellä 1 tutkittiin menetelmän soveltuvuutta koko spektrin mittaamiseen kerralla. Tärkeimmät mittaussparametrit on esitetty taulukossa 3.

Yksi mittaus kesti lähes yhdeksän tuntia. Saatu signaali painotettiin kosinifunktiolla. Pohjaviiva korjattiin 4. asteen sovituksella protonispektrin suunnassa. Piikkien poiminnassa ja integroinnissa huolehdittiin yhtenevistä menettelytavoista.

*Taulukko 3. Mittauksen 1 parametrit*

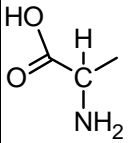
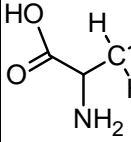
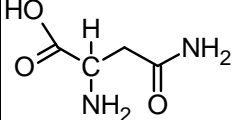
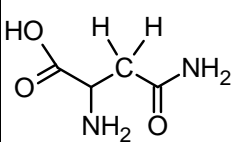
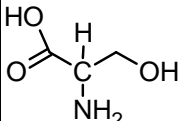
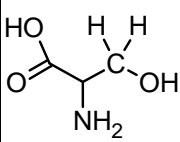
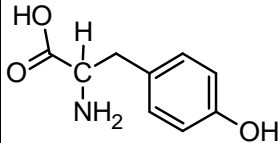
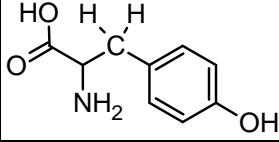
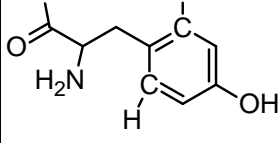
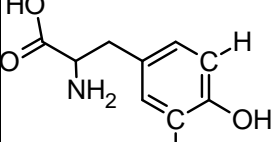
at	0,359	nt	64
np	4096	dpwr	44
sw	5711	dmm	ccg
bs	4	dmf	12700
ss	64	pwC	14,8
tpwr	60	pwxlvl	60
pw	10,5	sw1	25000
tof	-750	ni	128

Mittauksissa meni selvästi väärin hiilipulssin pituuden säätö. Se säädetään parametrilla pwC, "pulse width carbon". Toisinaan käytetään parametria pwx, jossa x edustaa mitä tahansa ydintä. Mittaukset optimoitiin epähuomiossa parametrilla pwx, joka ei tässä pulssisarjassa vaikuttanut mihinkään. PwC:n arvo oli alkuarvossaan 14,8  $\mu$ s, joka on melko hyvä arvaus. Myöhemmin optimoinnilla päästiin arvoon 13,9  $\mu$ s. Käytännössä tällä ei ole vaikutusta tämän opinnäytetyön tuloksiin.

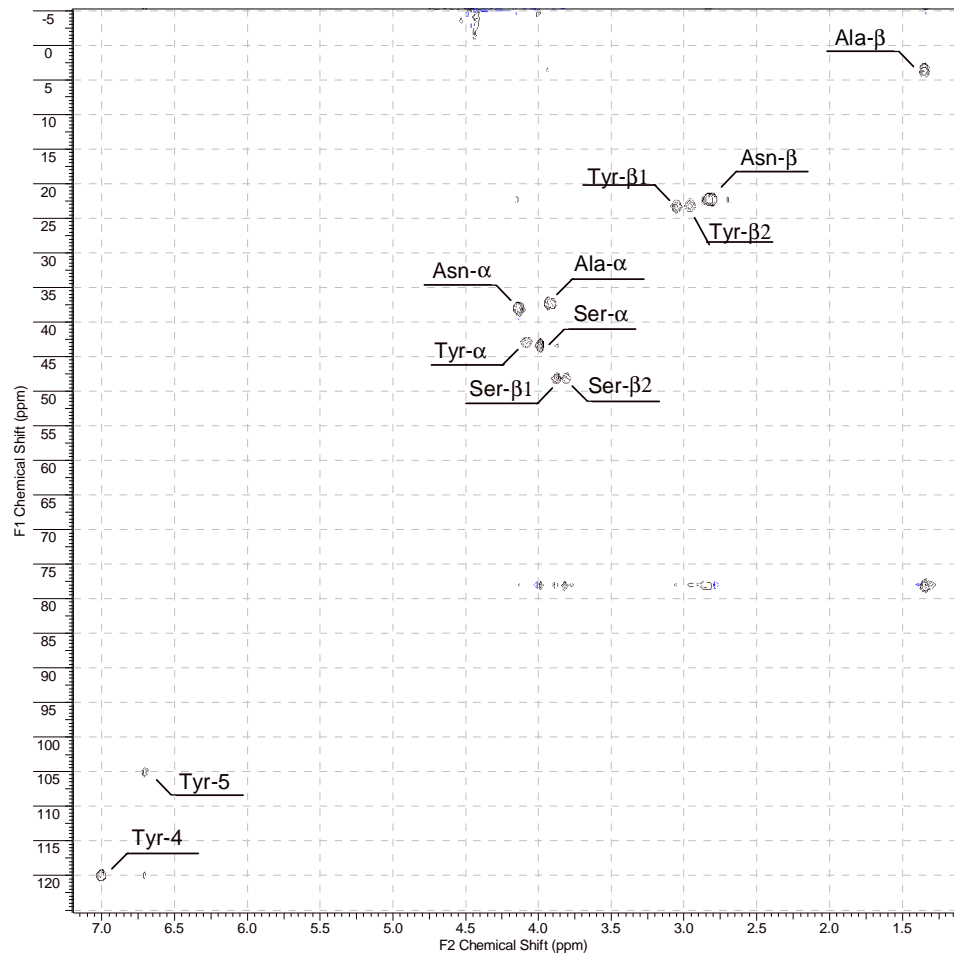
Taulukon 1 aminohapoista saadaan 12 piikkiä, jotka on eritelty taulukkoon 4. Taulukossa on lähtöaineiden rakennekaavaan piirretty näkyviin ne hiilet ja vedyt, joiden vuorovaikutuksesta signaali muodostuu. Hydroksyyli- ja aminoryhmien protoneita ei spektreissä havaita, sillä deuteroidussa liuottimessa nämä vedyt korvautuvat nopeasti deuteriumilla.

Seriinin ja tyrosiinin  $\beta$ -hiilen protonit näkyvät erillään. Seriinin hydroksyyli-ryhmä ja tyrosiinin bentseenirengas jäykentävät hiiliketjua niin, että vedyt ovat erilaisessa kemiallisessa ympäristössä, jolloin ne voidaan havaita erikseen. Suhdeluku tarkoittaa vety-ytimien lukumäärää eli piikkien teoreettista suhteellista tilavuutta.

Taulukko 4. Näytteessä 1 havaittavien signaalien listaus rakenteineen

Rakenne	Nimi	Tunnus	Suhdeluku
	Alaniini- $\alpha$	Ala- $\alpha$	1
	Alaniini- $\beta$	Ala- $\beta$	3
	Asparagiini- $\alpha$	Asn- $\alpha$	1
	Asparagiini- $\beta$	Asn- $\beta$	2
	Seriini- $\alpha$	Ser- $\alpha$	1
	Seriini- $\beta$	Ser- $\beta$ 1 Ser- $\beta$ 2	1+1
	Tyrosiini- $\alpha$	Tyr- $\alpha$	1
	Tyrosiini- $\beta$	Tyr- $\beta$ 1 Tyr- $\beta$ 2	1+1
	Tyrosiini- $\delta$	Tyr- $\delta$	2
	Tyrosiini- $\epsilon$	Tyr- $\epsilon$	2

Esimerkkispektri on kuvassa 14. Kuvaan on nimetty kaikki taulukon 4 piikit. Piikkien tunnistus tehtiin käyttämällä Hannu Maaheimon esimerkkispektriä.



Kuva 14. Näytteen 1 spektri, dof = 0

Näytteestä ajettiin spektrejä eri dof:n arvoilla välillä -4500–0 Hz:ä. Spektrit mitattiin 500 Hz:n välein. Mittauksen keskikohtana oli dof:n arvo 0. Kaikki parametrit optimoitiin siihen arvoon.

#### 4.4 Mittaukset näytteellä 2

Näytteellä 2 keskityttiin mittaamaan pelkästään alifaattista aluetta. Tärkeimmät mittausparametrit on esitetty taulukossa 5. Toistokertoja, ni, lisättiin mittaukseen tarkkuuden parantamiseksi. Tämä nosti mittausajan 17 tuntiin. Ni tulee sanoista number of increments.

Mittausten välillä dof:n arvoa muutettiin 1000 Hz:n askelin alueella -5000– -11000. Lisäksi mitattiin dof = -6900 ja dof = -7562, joka asetettiin mittauksen keskikohdaksi. Se saatiin vanhasta alifaattista aluetta

mittaavasta HSQC-menetelmästä. Spektrin käsittely suoritettiin samoin kuin näytteellä 1.

*Taulukko 5. Näytteen 2 mittausten tärkeimmät parametrit*

at	0,359	nt	64
np	4096	dpwr	48
sw	5711	dmm	ccg
bs	4	dmf	17900
ss	64	pwC	14,8
tpwr	60	pwxlv1	60
pw	13	sw1	10000
tof	-207	ni	256

Spektrin leveys, sw, pidettiin mittauksen aikana vakiona. Sw, spectral window, on nimensä mukaisesti kuin ikkuna, jossa piikit havaitaan. Ikkunan keskikohta on spektrin keskikohdassa eli lähettimen paikalla. Koska lähetin siirtyi mittausten välillä, myös ikkuna siirtyi. Dof:n ääriarvoilla reunimmaisat piikit putosivat kuvasta pois, eikä niitä pystytty mittaamaan.

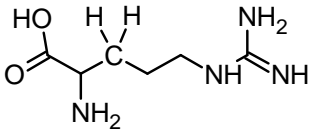
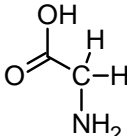
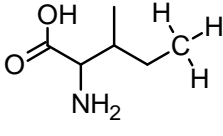
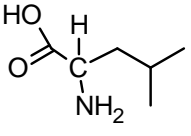
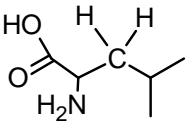
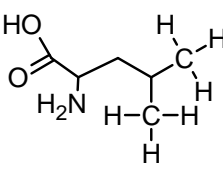
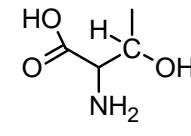
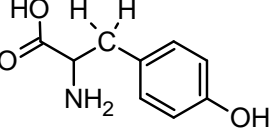
#### 4.5 Tutkittavat piikit

Näytteen 2 kaikista 20 aminohaposta tulee valtava määrä signaaleja HSQC:ssa. Kaikkia piikkejä ei kannata ryhtyä tutkimaan. Osa piikeistä ei erotu täysin viereisestä, eikä kaikkia piikkejä pystytä varmasti tunnistamaan. Valitaan joukosta mahdollisimman edustava ote erilaisia piikkejä.

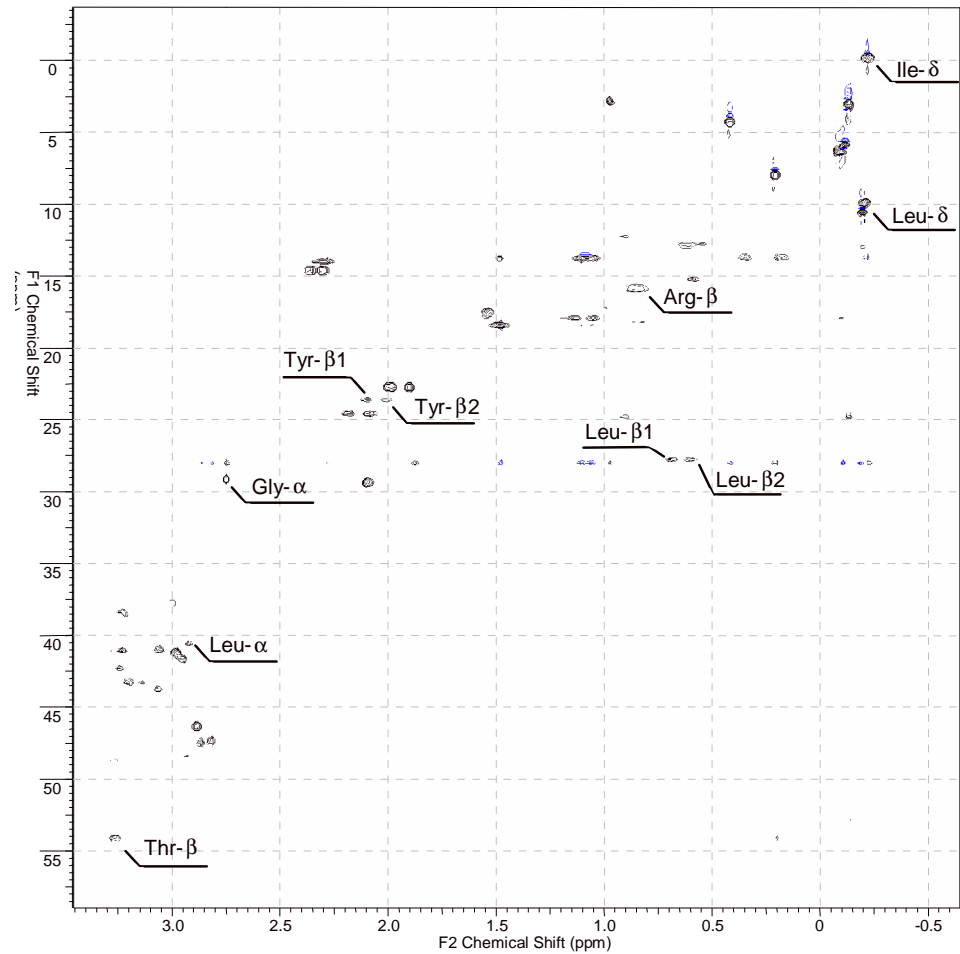
Valitut 10 piikkiä on listattu taulukkoon 6. Rakennekaavoihin on piirretty kyseessä olevat hiilet ja vedyt näkyviin. Leusiinin  $\beta$ -hiilessä olevat vedyt antavat erilliset piikit ja ne mitataan erikseen, samoin tyrosiinin. Tutkittavat piikit on nimetty esimerkkipiikkiin kuvassa 15.

Piikit valittiin niistä piikeistä, jotka pystyttiin varmasti tunnistamaan ja jotka erottuivat selkeästi muista piikeistä. Treoniini- $\beta$  ja isoleusiini- $\delta$  valittiin edustamaan spektrin äärilaitoja.

Taulukko 6. Tutkittavat piikit näytteestä 2

Rakenne	Nimi	Tunnus	Suhdeluku
	Arginiini-β	Arg-β	2
	Glysiini-α	Gly-α	2
	Isoleusiini-δ	Ile-δ	3
	Leusiini-α	Leu-α	1
	Leusiini-β	Leu-β1 Leu-β2	1+1
	Leusiini-δ	Leu-δ	6
	Treoniini-β	Thr-β	1
	Tyrosiini-β	Tyr-β1 Tyr-β2	1+1

Leusiinista pystyttiin valitsemaan neljä erillistä piikkiä. Sen avulla voimme seurata molekyylin sisäisen virheen kehitystä mittauksessa. Leusiinin metyyliiryhmät päätettiin integroida yhdessä, sillä niiden erottaminen toisistaan olisi ollut osassa spektreissä mahdotonta. Tyrosiini valittiin edustamaan isoja molekyyliä ja glysiini pieniä. Arginiini-β täydentää spektrin keskikohdan.



Kuva 15. Tutkittavat piikit merkittyinä spektriin, dof = -7562

#### 4.6 Metanolikoe

Metanolikokeessa toistettiin Koskelan ym. tekemä 1D-koe. Mitataan q-HSQC:n pulssisarjalla yksiulotteisia spektrejä eli asetetaan ni arvoon 1. Mittauksessa ei käytetä hiilen irtautusta. Tärkeimmät parametrit on esitetty taulukossa 7. [2.]

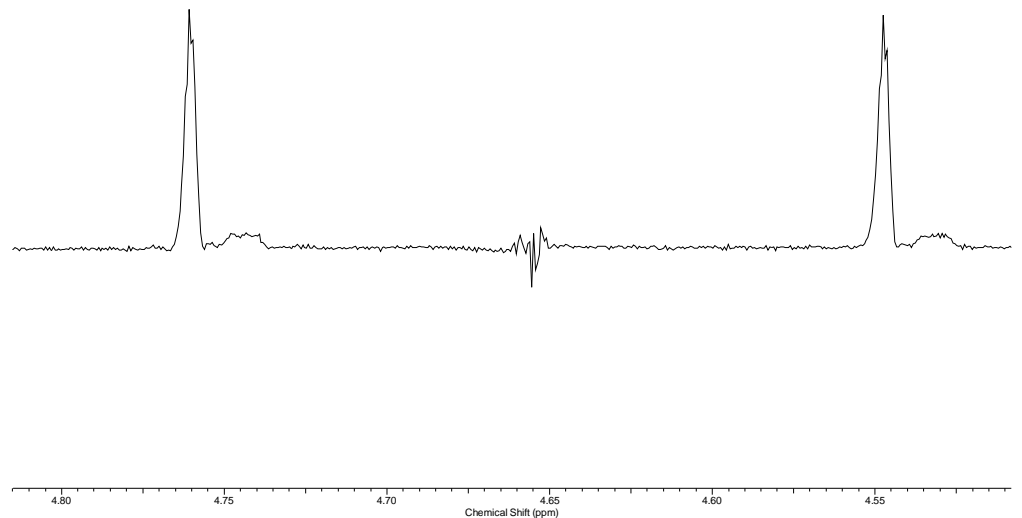
Taulukko 7. Metanolikokeen parametrit.

at	2	tof	-1660
np	22844	nt	32
sw	5711	dm	nnn
bs	4	pwC	15,2
ss	4	pwxvl	60
tpwr	60	sw1	10000
pw	7,7	ni	1

Lähdetutkimuksessa [2] menetelmällä selvitettiin kuvan 12 mukainen korjauskerroin eri siirtymillä oleville hiilisignaaleille. Tässä opinnäytetyössä metanolikokeella pyrittiin varmistamaan menetelmän toimivuus.



Valmistettiin 5 % metanolinäyte. Liuottimena käytettiin deuteroitua metanolia MeOH-d<sub>4</sub>. Liuottimen kaikki vedyt on korvattu deuteriumilla. Mitattiin spektrijä 500 Hz:n välein dof-alueella -15000–15000 Hz. Spektri dof:n arvolla 0 on esitetty kuvassa 16.



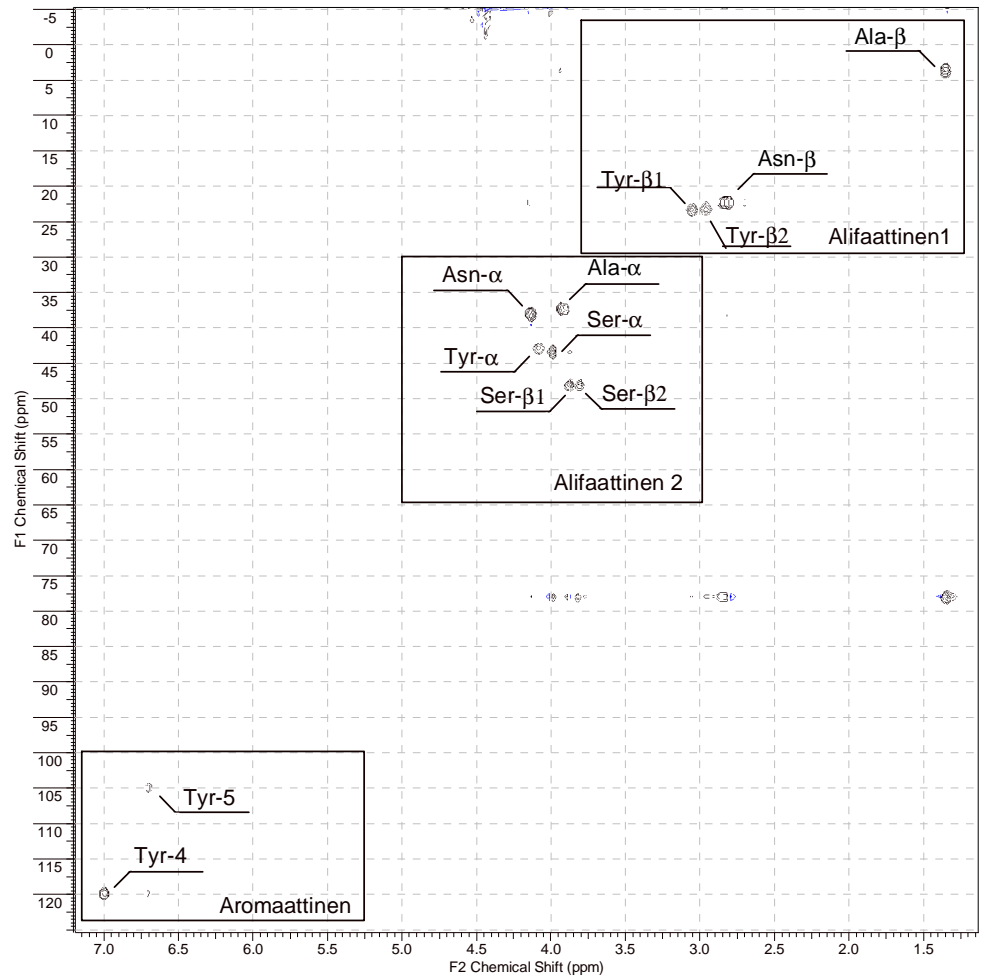
*Kuva 16. Metanolin dubletti dof = 0*

Spektrissä havaittu dubletti johtuu metanolin <sup>13</sup>C-kytkennästä, jota ei irtautettu. Keskimmäinen spektri on vertailuspektri, joka oletusarvoisesti on sinc-käyrän huippukohdassa. Vaihe-ero korjattiin vain keskimmäiseen spektriin. Se tarkoittaa normaalia spektrin muokkaamista siten, että molemmat piikit osoittavat ylöspäin. Spektrin keskellä, piikkien välissä, on häiriö, jolla ei ole merkitystä.

## 5 TULOKSET

### 5.1 Näyte 1

Tulosten havainnollistamiseksi jaetaan spektri kolmeen osaan: alifaattiset alueet 1 ja 2 sekä aromaattiset. Alueet ja niiden sisältämät piikit on esitetty kuvassa 17.

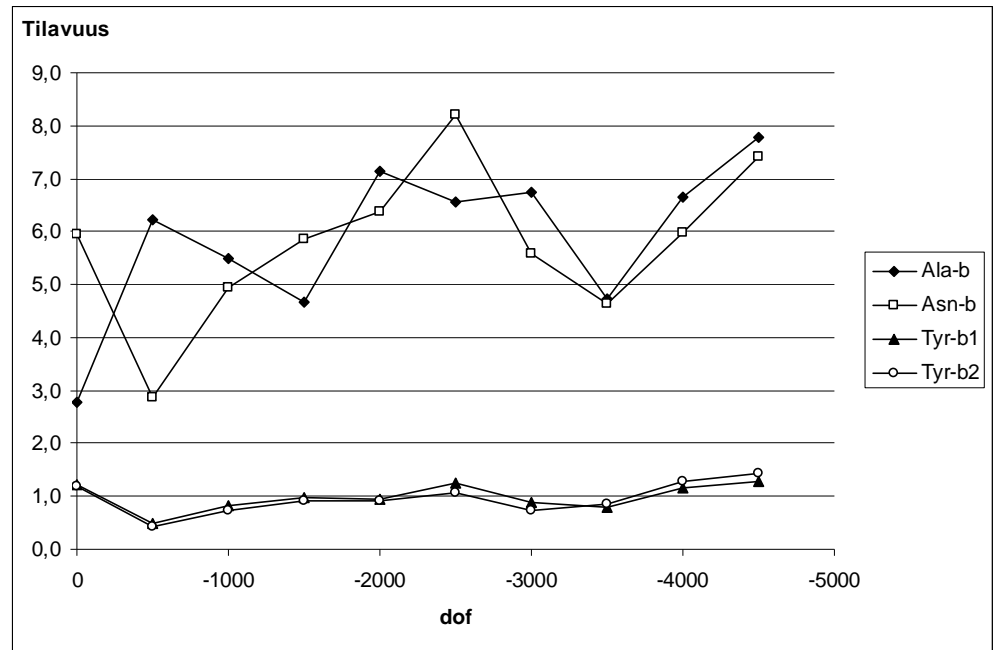


Kuva 17. Spektrialueet

Taulukkoihin 8, 9 ja 10 on listattu näytteen 1 piikkien tilavuudet alueittain. Kuvissa 18, 19 ja 20 on havainnollistettu vastaavien taulukoiden arvoja.

Taulukko 8. Piikkien tilavuudet 1. alifaattisella alueella eri dof:n arvoilla

	0	-500	-1000	-1500	-2000	-2500	-3000	-3500	-4000	-4500
Ala-β	2,8	6,2	5,5	4,7	7,2	6,6	6,7	4,7	6,7	7,8
Asn-β	5,9	2,9	4,9	5,9	6,4	8,2	5,6	4,6	6,0	7,4
Tyr-β1	1,2	0,5	0,8	1,0	0,9	1,2	0,9	0,8	1,2	1,3
Tyr-β2	1,2	0,4	0,7	0,9	0,9	1,1	0,7	0,9	1,3	1,4

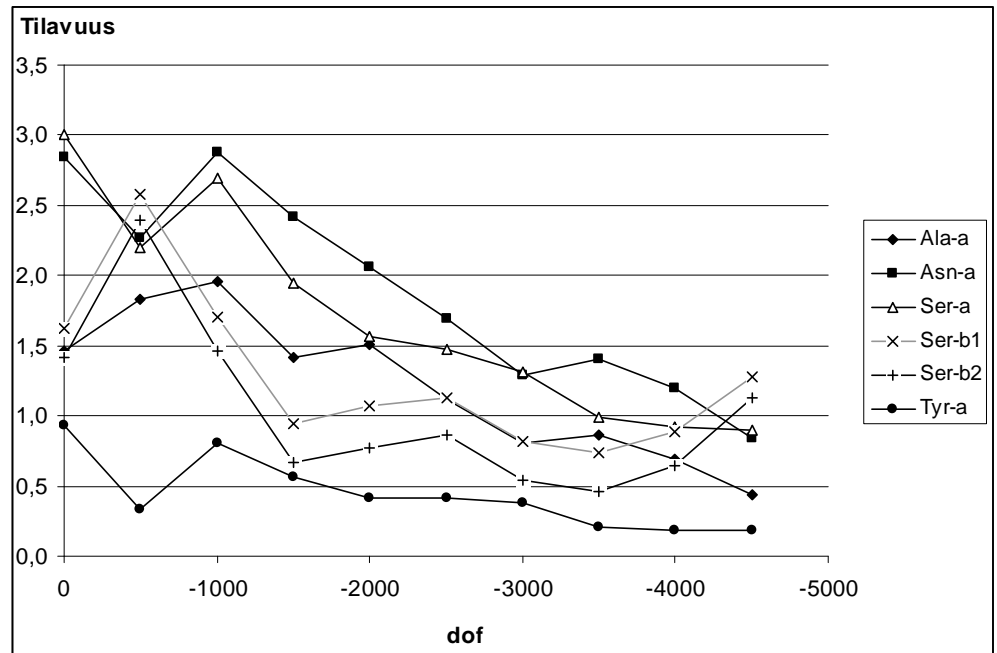


Kuva 18. Piikkien tilavuuksien kehitys 1. alifaattisella alueella

Taulukko 9. Piikkien tilavuudet eri dof:n arvoilla 2. alifaattisella alueella

	0	-500	-1000	-1500	-2000	-2500	-3000	-3500	-4000	-4500
Ala- $\alpha$	1,5	1,8	2,0	1,4	1,5	1,1	0,8	0,9	0,7	0,4
Asn- $\alpha$	2,8	2,3	2,9	2,4	2,1	1,7	1,3	1,4	1,2	0,8
Ser- $\alpha$	3,0	2,2	2,7	1,9	1,6	1,5	1,3	1,0	0,9	0,9
Ser- $\beta$ 1	1,6	2,6	1,7	0,9	1,1	1,1	0,8	0,7	0,9	1,3
Ser- $\beta$ 2	1,4	2,4	1,5	0,7	0,8	0,9	0,5	0,5	0,6	1,1
Tyr- $\alpha$	0,9	0,3	0,8	0,6	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2

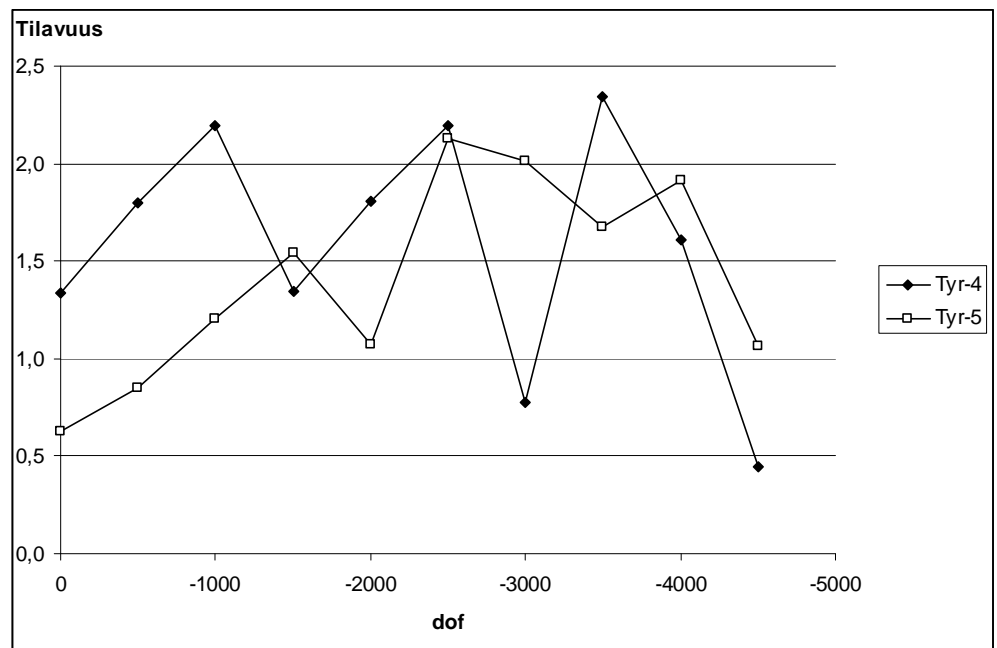
Tilavuuksissa havaitaan huomattavaa aaltoliikettä, joka ei kuitenkaan ole symmetristä kaikkien piikkien kesken. Asn- $\alpha$ , Ser- $\alpha$  ja Tyr- $\alpha$  näyttävät noudattavan samankaltaista aaltoliikettä ja Ser- $\beta$ 1 ja - $\beta$ 2 omaansa.



Kuva 19. Näytteen 1 piikkien tilavuuksien kehitys 2. alifaattisella alueella

Taulukko 10. Näytteen 1 aromaattisen alueen piikkien tilavuudet eri dof:n arvoilla

	0	-500	-1000	-1500	-2000	-2500	-3000	-3500	-4000	-4500
Tyr-4	1,3	1,8	2,2	1,3	1,8	2,2	0,8	2,3	1,6	0,4
Tyr-5	0,6	0,9	1,2	1,5	1,1	2,1	2,0	1,7	1,9	1,1



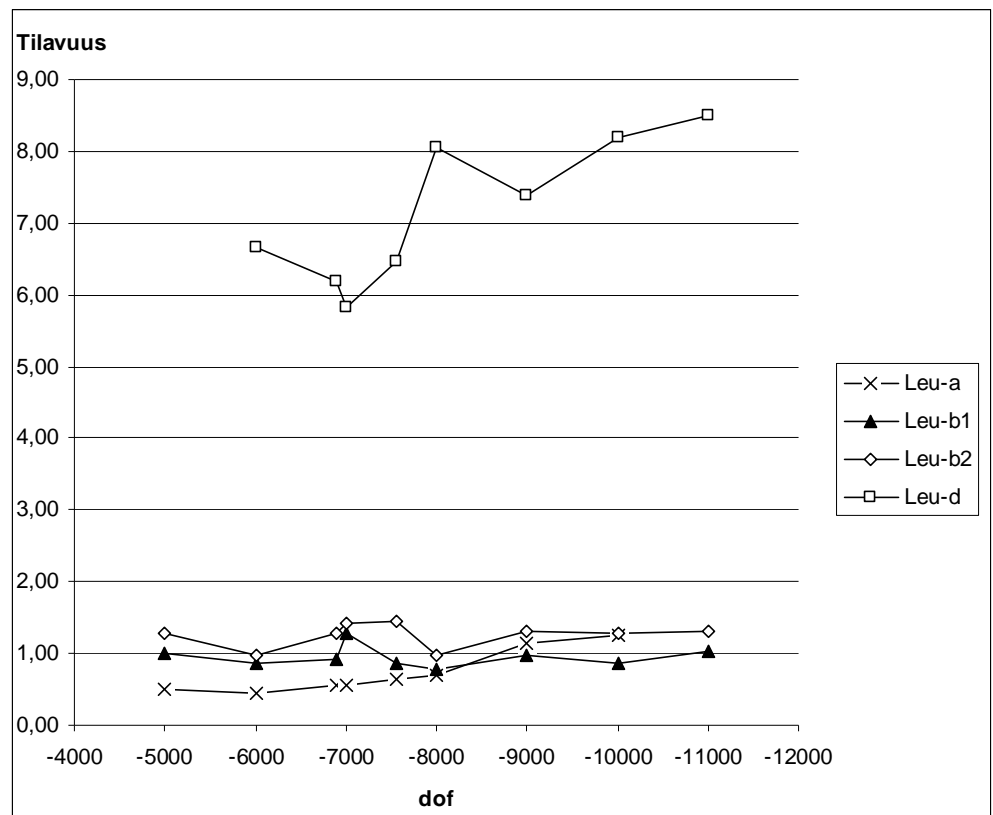
Kuva 20. Näytteen 1 aromaattisen alueen piikkien tilavuuksien kehitys

## 5.2 Näyte 2

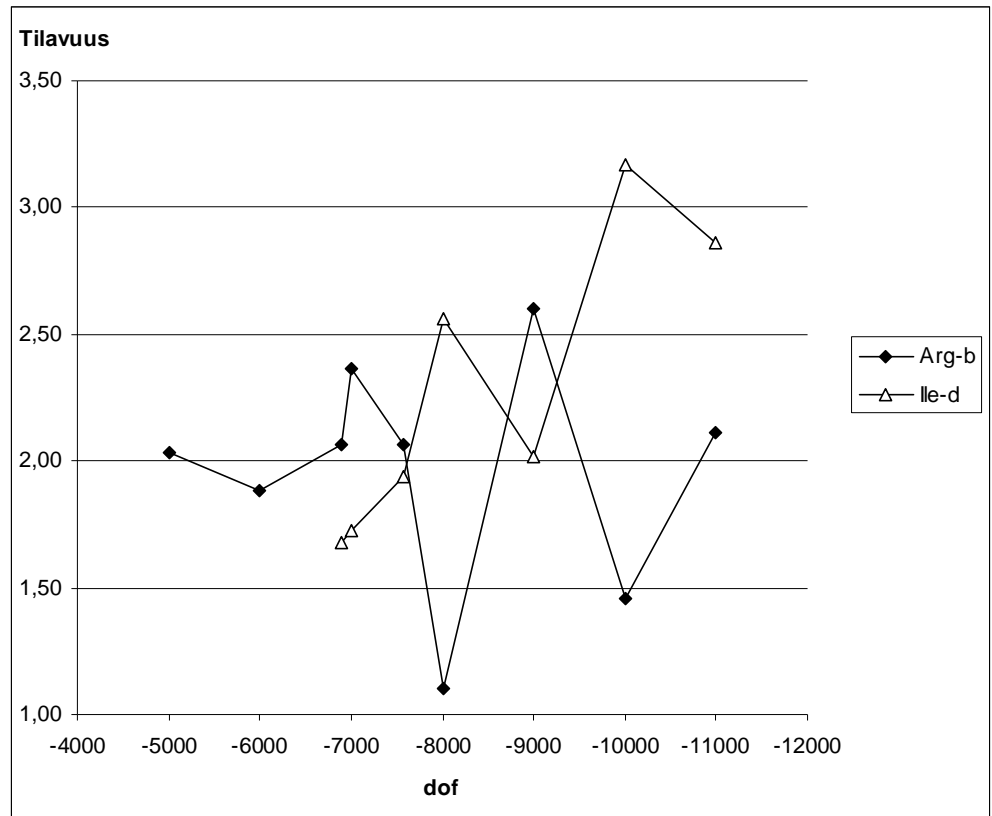
Taulukossa 11 on näytteestä 2 tutkittujen piikkien tilavuudet. Taulukon arvoja havainnollistavat kuvat 21, 22 ja 23. Ensimmäisessä kuvaajassa ovat leusiinin kaikki neljä signaalia ja kahdessa seuraavassa loput koon perusteella jaettuina. Kuvassa 22 ovat arginiinin ja isoleusiinin suurin piirtein samankokoiset piikit ja kuvassa 23 glysiinin, treoniinin ja tyrosiinin piikit.

Taulukko 11. Piikkien tilavuudet näytteen 2 mittauksissa

	-5000	-6000	-6900	-7000	-7562	-8000	-9000	-10000	-11000
Arg- $\beta$	2,0	1,9	2,1	2,4	2,1	1,1	2,6	1,5	2,1
Gly- $\alpha$	1,0	0,6	0,7	0,8	0,8	0,6	1,1	0,8	1,3
Ile- $\delta$			1,7	1,7	1,9	2,6	2,0	3,2	2,9
Leu- $\alpha$	0,5	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	1,1	1,3	
Leu- $\beta$ 1	1,0	0,9	0,9	1,3	0,9	0,8	1,0	0,9	1,0
Leu- $\beta$ 2	1,3	1,0	1,3	1,4	1,4	1,0	1,3	1,3	1,3
Leu- $\delta$		6,7	6,2	5,8	6,5	8,0	7,4	8,2	8,5
Thr- $\beta$	0,2	0,6	0,8	0,9	1,1	0,8			
Tyr- $\beta$ 1	0,5	0,9	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7
Tyr- $\beta$ 2	0,6	0,9	0,7	0,8	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6

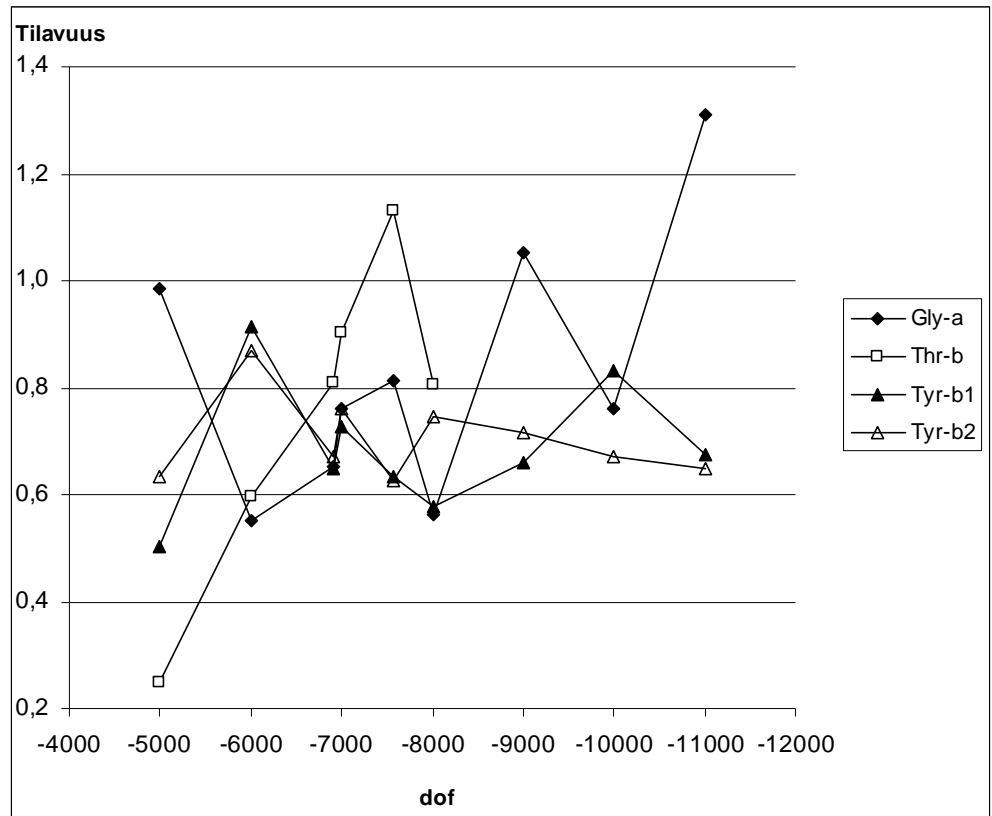


Kuva 21. Leusiinin piikkien tilavuuksien vaihtelu eri dof:n arvoilla



Kuva 22. Arginiinin ja isoleusiinin piikkien tilavuudet graafisesti

Arginiinin ja isoleusiinin käyrät heilahtelevat voimakkaasti kuvassa 22. Tilavuuksien heilahtelu on vastakkaista toisiinsa nähden. Kuvassa 23 huomion herättää keskellä spektriä oleva keskittymä. Gly- $\alpha$ :n teoreettinen tulos on 2, mutta muut näyttävät antavan oikean suuntaisia tuloksia.



Kuva 23. Glysiinin, treoniinin ja tyrosiinin piikkien tilavuudet mittauksissa

### 5.3 Metanolinäyte

Metanolikokeen tulokset 3000 Hz:n välein on koottu kuvaan 24. Spektri dof = 0 on esitetty kuvassa 16.



Kuva 24. Metanolikokeen tulokset 3000 Hz:n välein



## 6 TULOSTEN TARKASTELU

### 6.1 Näyte1

Näytteen 1 tuloksissa on signaalinkäsittelystä aiheutuvaa virhettä. Mittauksissa tapahtui analogi-digitaalimuuntimella ylivuoto eli ADC-overflow. Näytteestä saatiin siis voimakkaampaa signaalia kuin pystyttiin käsittelemään. Virhe tapahtui jokaisen mittauksen kohdalla useasti. Kun virhe huomattiin, ei ollut enää aikaa eikä syytä mitata spektrejä uudestaan, vaan siirryttiin näytteen 2 mittauksiin.

#### 6.1.1 Alifaattinen alue 1

Kuvasta 18 havaitaan, että piikkien tilavuudet toisiinsa nähden eivät ole ollenkaan tarkkoja. Piikkien tilavuudet heittelevät toistensa suhteen. Ala- $\beta$  ja Asn- $\beta$  ovat kaksi voimakkainta signaalia spektrissä. Niiden keskinäisen suhteen tulisi olla 3:2 niissä olevien protonien mukaan. Pienet eroavaisuudet selittyisivät liukoisuuseroilla, mutta silloinkin tilavuuksien suhteen tulisi pysyä suurin piirtein vakiona. Tilavuudet vaihtelevat sekä itsessään, että toisiinsa nähden runsaasti. Ainoa yhtenäinen tekijä on hienoinen tilavuuksien kasvu siirryttäessä kauemmaksi keskikohdasta.

Tyrosiinin kaksi  $\beta$ -signaalia antavat selkeän tuloksen. Signaalit näkyvät spektrissä täysin vierekkäin ja antavat lähes yhteneviä tilavuuksia suhteessa 1:1. Näissäkin piikeissä on havaittavissa hienoinen nouseva tendenssi.

#### 6.1.2 Alifaattinen alue 2

Kuvasta 19 havaitaan ensimmäiseksi selvä laskusuhdanne jokaisessa signaalissa. Se tuntuu sopivan yhteen teorian kanssa, eli mitä kauemmas läheltä siirtyy, sitä pienemmiksi käyvät signaalit.

Seriinin  $\beta_1$  ja  $\beta_2$  antavat keskenään yhteneviä tuloksia aivan kuten tyrosiinin  $\beta$ -ytimet aikaisemmin. Ser- $\beta_1$ :n signaalit ovat kaikissa mittauksissa muutamaa kymmenystä suuremmilla arvoilla kuin Ser- $\beta_2$ .

Tyr- $\alpha$ :n tilavuudet ovat kaikki alle 1 ja laskevat hienoisesti. Taulukoista 8 ja 9 havaitaan, että tilavuudet verrattuna Tyr- $\beta_1$ :n ja Tyr- $\beta_2$ :n kanssa ovat lähes samat dof:n arvoon -1000 asti. Sen jälkeen Tyr- $\alpha$ :n tilavuudet pienenevät huomattavasti, kunnes dof:n arvolla -4500  $\beta$ -ytimet antavat jopa 7-kertaisen signaalin.

Ala- $\alpha$ :n tilavuudet kasvavat dof = -1000:een asti ja alkavat sitten pienentyä. Samanaikaisesti Ala- $\beta$ :n tilavuudet ovat kasvamassa. Kahden piikin tilavuuksien suhteen tulisi olla 3. Taulukkoon 12 on laskettu suhdeluku Ala- $\beta$  / Ala- $\alpha$ . Taulukosta havaitaan, että kun siirrytään yli -1500:n, niin suhteet vääristyvät voimakkaasti.

Taulukko 12. Ala- $\alpha$ :n ja Ala- $\beta$ :n välinen suhde

	0	-500	-1000	-1500	-2000	-2500	-3000	-3500	-4000	-4500
suhde	1,9	3,4	2,8	3,3	4,8	5,9	8,4	5,5	9,6	17,7

### 6.1.3 Aromaattinen alue

Tyrosiinin kahdesta aromaattisen alueen signaalista saadaan hyvin epä-määräisiä tuloksia. Jos edellisistä kahdesta alueesta pystyttiin havaitsemaan tiettyä johdonmukaisuutta, niin aromaattisesta alueesta ei pystytä. Taulukon 10 arvoissa on yli 100 %:n heilahduksia kahden mittauksen välillä.

On mahdollista, että kun taajuudet ovat liian kaukana keskikohdasta, niin signaalien käytös on arvaamatonta.

### 6.1.4 Yhteenveto

Näytteen 1 mittauksissa kvantitatiivisuus molekyylien välillä on heikkoa. Koko mittausalueella havaitaan voimakasta aaltoliikettä tilavuuksissa pienilläkin dof:n muutoksilla. Molekyylin sisäinen kvantitatiivisuus on taulukon 12 mukaan siedettävää dof:n arvoon -1500 saakka. Aromaattisella alueella kvantitatiivisuutta ei tässä kokeessa havaittu.

Koko spektrin mittaaminen yhdellä kertaa ei näytä onnistuvan. Täsmällisiä tuloksia ei saatu mistään osa-alueesta. Näytteen 2 mittauksissa kavenne-taan tutkimusaluetta kattamaan vain alifaattinen alue.

## 6.2 Näyte 2

Kuvan 21 tulokset ovat lupauksia herättäviä. Leusiinin piikkien tilavuudet ovat oikeassa suuruusluokassa. Pienet piikit ovat melko tasaisesti lähellä ykköstä ja  $\delta$ -piikin arvot ovat moninkertaisesti suurempia. Tosin yhtä lukuun ottamatta  $\delta$ -piikin arvot ovat suurempia kuin kuusi, joka on oletusarvo. Arvot näyttäisivät olevan kasvamassa, mikä on ristiriidassa teorian kanssa. Keskikohta näissä mittauksissa oli dof = -7562.

Isoleusiinin piikin heittelevä tulos kuvassa 22 ei ole kovin yllättävä, sillä sen piikki oli koko mittausten ajan häiriöinen ja epämääräisen muotoinen. Häiriöt johtuivat todennäköisesti sen sijainnista spektrin oikeassa yläkulmassa. Vaikka arginiinin piikki ei ole kovin kaukana yläkulmasta, oli sen piikki hyvin symmetrinen ja vakaa kaikissa mittauksissa.

Taulukosta 6 saadaan arginiinille suhdeluku 2 ja isoleusiinille 3. Spektrin keskikohdassa, kun  $dof = -7562$ , ovat kummankin piikin arvot lähellä 2:ta. Kun siirretään hiililähetintä vain 438 Hz:ä arvoon  $-8000:n$ , laskee arginiinin tilavuus lähes puoleen ja isoleusiinin kasvaa yli neljänneksen. Heilahtelu vaikuttaa selittämättömältä ja se voimakkuus on huolestuttavaa.

Piikkien tilavuudet heilahtelevat epäloogisessa järjestyksessä. Osa piikeistä vaikuttaisi noudattavan samaa sykliä, kun taas toiset käyrät ovat vastakkaisessa vaiheessa. Jos piikit heittelehtisivät kaikki samaan tahtiin, todennäköinen syy olisi mittakaavavirhe. Piikkien integrointivaiheessa olisi osaan spektrejä lipsahtanut väärä vakio. Kuitenkin osa piikeistä heilahtelee päinvastaiseen tahtiin ja osan tilavuudet näyttävät pysyvän melko vakioina. On vaikea löytää selitystä, joka kattaisi kaikki piikit.

Tässä työssä pyrittiin tutkimaan kvantitatiivisen HSQC:n tehokkuutta aminohappomittauksissa. Tavoitteena oli mitata, miten hiililähettimen paikka vaikuttaa kvantitatiivisuuteen. Tuloksissa ei ole havaittu kvantitatiivisuutta juuri ollenkaan. Sen sijaan tulosten tarkastelussa on jatkuvasti jouduttu etsimään selityksiä tilavuuksien voimakkaaseen heilahteluun mittausten välillä. Menetelmän toimivuutta testataan toistamalla lähdetutkimuksen metanolikoe.

### 6.3 Metanolikoe

Metanolikokeen piikkien intensiteettien pitäisi vastata aikaisemmin esitettyä sinc-käyrää. Kuvasta 24 havaitaan, että metanolin kaksi piikkiä vääristyvät voimakkaasti etäännyttäessä keskikohdasta  $dof = 0$ . Kokeen alkupäässä oikeanpuoleinen piikki on negatiivinen, loppupäässä vasemmanpuoleinen.

Kyseessä on vaihevirhe. Tavallisessa kokeessa se on normaali signaalinkäsittelystä johtuva ilmiö, joka on helppo poistaa. Tällä kertaa vaihevirhettä ei olisi pitänyt ilmetä, eikä sitä pystytty poistamaan.

Kuvassa 16 on täysin vaiheistettu keskimäinen spektri. Siinä molemmat piikit osoittavat ylöspäin ja pohjaviiva on suorassa. Voitaisiin kääntää -15000:n spektrin molemmat piikit osoittamaan kauniisti ylöspäin, mutta se kääntäisi puolestaan keskimäisen spektrin piikit kieroon. Tasapainoa ei löydy.

Vaihevirhe oli odottamaton löytö. Sellainen ei käy ilmi lähteestä [2]. Päinvastoin, XY-16 pulssisekvenssin pitäisi tehokkaasti poistaa kaikki vaihevirhe.

## 7 POHDINTA

Vaikuttaa siltä, että pulssisekvenssi, jota tässä työssä käytettiin, ei ollut sama kuin mikä Kilpeläisen ryhmällä oli käytettävissään. Oliko kyseessä jokin vanha tai viallinen versio sekvenssistä, ei ole selvinnyt.

Testattua menetelmää ei tämän opinnäytetyön tulosten perusteella oteta käyttöön hiivan metabolomiikan tutkimuksessa. Jos mittauksia tällä menetelmällä halutaan jatkaa, on ensin löydettävä paremmin toimiva pulssisarja.

## VIITELUETTELO

- [1] Salusjärvi, Laura, *Transcriptome and proteome analysis of xylose-metabolising Saccharomyces cerevisiae*. VTT Publications 679. Espoo: Eita. 2008.
- [2] Koskela, Harri – Kilpeläinen, Ilkka – Heikkinen, Sami, *Some aspects of quantitative 2D NMR*. Journal of Magnetic Resonance, 2005, Vol 174, s. 237 - 244.
- [3] Friebolin, Horst, *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*. 4. painos. Weinheim: WILEY-VCH. 2005.
- [4] Derome, Andrew E., *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*. Oxford: Pergamon press. 1987.
- [5] Günther, Harald, *NMR spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry*. 2. painos. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. 1995.
- [6] Berger, Stefan – Braun, Siegmund, *200 and More NMR Experiments*. Weinheim: WILEY-VCH. 1998.
- [7] Hull, William E., *Experimental Aspects of Two-Dimensional NMR*. Teoksessa Croasmun, William R. – Carlson, Robert M. K., toim., *Two-Dimensional NMR Spectroscopy – Applications for Chemists and Biochemists*. 2. painos. Weinheim: VCH Publishers, Inc. 1994.
- [8] <sup>UNITY</sup>INOVA System Overview. Varian <sup>UNITY</sup>INOVA NMR spectrometer systems. Palo Alto: Varian Associates. 1999