

**Tietokoneistettu NMR-spektroskopia: uuden sukupolven
käyttöliittymä ja spektrianalyysi**

pro Gradu –tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian osasto

8.11.2016 Pekka Laatikainen

TIIVISTELMÄ

Korkean resoluution NMR-spektroskopia eroaa muista molekyyli-spektroskopiaista siinä, että jopa kaikkein monimutkaisimmat, tuhansista yksittäisistä spektriviivoista muodostuvat spektrit voidaan esittää vain muutaman parametrin avulla käyttämällä kvanttimekaanista teoriaa. Tietokoneistetun NMR-spektrianalyysin tarkoituksena on määrittää nämä parametrit havaitusta spektristä kvanttimekaanisen spektrianalyysin (QMSA) avulla. Tutkielmassa käydään läpi tietokoneistetun NMR-spektroskopian taustahistoriaa ja teoriaa sekä sivutaan sen eri käyttökohteita.

Tutkielman kokeellisessa osassa luotiin käyttöliittymä (ChemAdder) tietokoneistettuun NMR-spektroskopiaan erikoistuneeseen tietokoneohjelmaan, joka toimii yhdessä laskutoimituksia tekevän Fortran-ohjelman (SpinAdder) kanssa. Ohjelma soveltuu hyvin myös perinteiseen spektrianalyysiin, ja se tukee tällä hetkellä JCAMP-DX-spektriformaattia (1D ja 2D). Käyttöliittymä toteutettiin Qt:lla, joka on moderni alustariippumaton ohjelmistojen ja graafisten käyttöliittymien C++ kehitysympäristö.

QMSA:n yksi lupaavimmista sovellutuksista on erilaisten seosten, kuten biologisten nesteiden kvantitatiivinen analyysi. Ohjelman avulla voidaan rakentaa, tallentaa ja käyttää tehokkaasti adaptiivisia spektrikirjastoja (ASL), jotka sisältävät esimerkiksi metaboliittien spektrit parametritiedostoina. Parametritiedostojen koko on murto-osa alkuperäisistä spektreistä ja niitä käyttämällä analyysissä tarvittavat varsinaiset spektrit voidaan simuloida hetkessä missä tahansa kentässä, käyttämällä mitä tahansa juovan muotoa tai leveyttä. Ohjelman sisältämä ASL-apuri mahdollistaa lähes automaattisen suurienkin spektriaineistojen käsittelyn muutamalla klikkauksella spektridatasta pylväsdigrammiin ja CSV-tiedostoon. ChemAdder-projektin kotisivu, posteresitys ja video löytyvät osoitteesta <http://chemadder.com>.

ESIPUHE

Tämä työ aloitettiin syksyllä 2015. Työhön liittyvät NMR-mittaukset tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian laboratoriossa loppukevällä 2016. Kirjallinen osa on kirjoitettu vuoden 2016 aikana. Lähdekirjallisuus on etsitty Scifinderin, Googlen ja eri kustantajien hakukoneita käyttämällä.

Suuret kiitokset kuuluvat työn ohjaajalle ja tarkastajalle dosentti Elina Sieväselle. Haluan kiittää myös työn tarkastajaa professori Perttu Permiä. Lisäksi haluan kiittää Esa Haapaniemeä NMR-mittauksiin liittyvästä avusta.

Lämpimät kiitokset myös avopuolisolleni Annalle ymmärryksestä ja tuesta.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	i
ESIPUHE	ii
SISÄLLYSLUETTELO.....	iii
KÄYTETYT LYHENTEET	v
1 JOHDANTO	1
1.1 NMR-parametrit ja niihin vaikuttavat tekijät	2
1.2 Kemiallinen siirtymä	2
1.3 Kytkevävakiot	4
1.4 Spinsysteemit.....	8
2 TIETOKONEISTETTU NMR-SPEKTRIANALYYSI	9
2.1 NMR-simulaatio	11
2.2 Matriisialgebra	13
2.2.1 NMR-spektrin laskeminen	14
2.3 Suurien spinsysteemien simulaatio	18
2.4 Taajuuteen perustuvat menetelmät	20
2.5 Kokonaisjuovaiteraattorit	21
2.6 TLS-iteraattorin toimintaperiaate	24
2.6.1 Newton Raphson -menetelmä	24
2.6.2 Epälineaaristen yhtälöryhmien ratkaiseminen Newton-Raphson ja Gauss-Newton -menetelmillä.....	25
2.6.3 Pääkomponenttianalyysi	28
2.6.4 Pääkomponenttianalyysin vaiheet.....	30
3 NMR JA METABOLOMIikka.....	35
4 KVANTITATIIVINEN NMR SPEKTROSKOPIA.....	38
4.1 Kvantitatiivisen NMR-spektroskopian kokeelliset muuttujat ja niiden vaikutus mittaustulosten tarkkuuteen.....	38

4.1.1	Mittausdatan kerääminen	38
4.1.2	Mittausdatan käsittely	40
4.2	Referenssi- ja kalibroitistandardit.....	42
5	YHTEENVETO.....	44
6	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	46
7	KÄYTETYT LAITTEET	Error! Bookmark not defined.
8	KÄYTTÖLIITTYMÄ CHEMADDER	47
8.1	Dataselain ja tiedostojen avaaminen	48
9	TIEDOSTOFORMAATIT.....	52
9.1	PMR-formaatti.....	52
10	2D-EDITORI	58
10.1	Mielenkiintoalueet.....	60
11	PARAMETRITAUUKOT PANEELI.....	64
12	SPEKTRIPARAMETRIEN KIINNITYS JA LUKITSEMINEN	67
13	USEAN SPEKTRIN TARKASTELU	71
14	ASL-SPEKTRIKIRJASTO	75
15	ÄLYKÄS SIIRTYMÄPERMUTAATTORI.....	80
16	GALAKTOOSIN ANALYYSI	84
17	YHTEENVETO.....	86
18	KIRJALLISUUSLUETTELO	87

KÄYTETYT LYHENTEET

ASL	adaptive spectral library, adaptiivinen spektrikirjasto
COSY	correlation spectroscopy, korrelaatio-spektroskopia
CSF	cerebrospinal fluid, aivo-selkäydinneste
DSS	4,4-dimetyyli-4-silapentaani-sulfonihappo
ERETIC	electronic reference to access in vivo concentrations
FT	Fourier transform, Fourier-muunnos
HDL	high density lipoprotein, korkeatiheyksinen lipoproteiini
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation, heteroydinten useamman sidoksen yli tapahtuva korrelaatio
HSQC	heteronuclear single quantum coherence, heteroydinten yksikvanttikohereenssi
IDL	intermediate density lipoprotein, keskitiheyksinen lipoproteiini
IR	infrared, infrapuna
LDL	low density lipoprotein, keskitiheyksinen lipoproteiini
MS	massaspektrometria
NMR	nuclear magnetic resonance, ydinmagneettinen resonanssi
NOESY	nuclear Overhauser spectroscopy, ytimen Overhauser-ilmiöön perustuva spektroskopia
QM	quantum mechanical, kvanttimekaaninen
QMSA	quantum mechanical spectral analysis, kvanttimekaaninen spektrianalyysi
qNMR	kvantitatiivinen (quantitative) ydinmagneettinen resonanssi
qQMSA	kvantitatiivinen (quantitative) kvanttimekaaninen spektrianalyysi
ROI	region of interest, mielenkiintoalue
RMSE	root-mean-square error, keskineliövirheen neliöjuuri
S/N	signal-to-noise ratio, signaali-kohina-suhde
SNP	single nucleotide polymorphism, yhden nukleotidin polymorfismi
TLS	total line shape, kokonaisjuova
TMS	tetrametyylisilaani
TOCSY	total correlation spectroscopy, totaalikorrelaatio-spektroskopia
TSP	3-(trimetyylisilyyli)-propionihappo
UV	ultravioletti

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Sellaiset atomiytimet, joilla on magneettinen momentti, absorboivat radioaaltoja kun ne laitetaan voimakkaaseen magneettikenttään. Tätä ilmiötä kutsutaan ydinmagneettiseksi resonanssiksi (Nuclear Magnetic Resonance = NMR). Ytimillä, joiden spinkvanttiluku on $\frac{1}{2}$, on magneettikentässä kvanttimekaniikan mukaan kaksi prekessiotilaa tai spintilaa, joista energialtaan alempi α -tila (spinkvanttiluku on $1/2$) vastaa ulkoisen magneettikentän B_0 suuntaista asentoa ja energialtaan ylempi β -tila (spinkvanttiluku on $-1/2$) vastaa kentän vastaista asentoa.¹ Tilojen energioiden erotusta voidaan kuvata yhtälöllä (1),

$$\Delta E = h\nu_0 = \frac{h\gamma B_0}{2\pi}, \quad (1)$$

jossa ν_0 on Larmor-taajuus, h on Planckin vakio, γ on gyromagneettinen suhde ja B_0 on ulkoisen magneettikentän voimakkuus. Energioiden erotus on hyvin pieni (n. $1/10^5$), joten termisten yhteentörmäysten seurauksena syntyvä energia on riittävää sille, että osa alemmista tiloista siirtyy ylemmille tiloille. Tämä erottaa NMR-spektroskopian ultraviolettii (UV)- ja infrapuna (IR) -spektroskopiosta, joissa kaikki molekyylit ovat perustiloilla huoneenlämpötilassa. Lämpötilan ja energiaeron välistä suhdetta voidaan kuvata Boltzmannin jakaumalla:

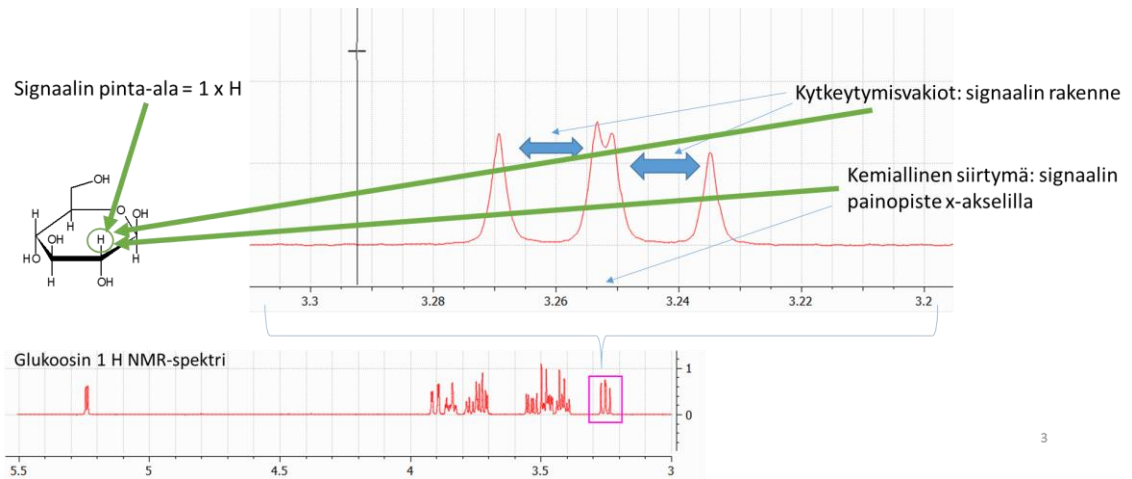
$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{\Delta E}{kT}}, \quad (2)$$

jossa N_β ja N_α kuvaavat ylemmän ja alemman tilan populaatioita, k on Boltzmannin vakio ja T on lämpötila.

Energioiden erotus on suoraan verrannollinen ulkoisen magneettikentän vahvuuteen. Tämä puolestaan vaikuttaa Boltzmannin jakaumaan siten, että populaatioiden erotus on sitä suurempi mitä voimakkaampi magneettikenttä on. Vahvempi magneettikenttä siis vahvistaa NMR-signaaleja huomattavasti.

1.1 NMR-parametrit ja niihin vaikuttavat tekijät

NMR-spektroskopian oleelliset parametrit ovat kemiallinen siirtymä, kytkentävakio ja signaalin pinta-ala (Kuva 1). Kemiallinen siirtymä kertoo ytimen elektroniympäristöstä, kytkentävakioista saadaan tietoa ytimen kytkennästä muihin ytimiin ja signaalin pinta-ala on suoraan verrannollinen ydinten suhteelliseen lukumäärään, joka on myös perustana kvantitatiiviselle NMR-spektroskopialle.



Kuva 1. NMR-spektroskopian oleelliset parametrit ovat **kemiallinen siirtymä**, **kytkentävakio** ja **signaalin pinta-ala**. Kemiallisella siirtymällä tarkoitetaan signaalin painopistettä taajuusakselilla (x-akseli), ja sen avulla saadaan tietoa ytimen elektroniympäristöstä. Kytkeytymisvakio määrittelevät signaalin rakenteen ja ne kertovat, kuinka ydin on kytketty muihin ytimiin. Signaalin pinta-ala antaa tietoa ydinten suhteellisesta määrästä.

1.2 Kemiallinen siirtymä

Yhtälön (1) perusteella kaikki ytimet antaisivat ulkoisessa magneettikentässä B_0 NMR-signaalin samalla Larmor-taajuudella ν_0 . Todellisuudessa taajuus kuitenkin vaihtelee, koska ytimen ympäristöön muodostuva magneettikenttä B_e on aina pienempi kuin ulkoinen kenttä. Tämä on seurausta elektronien kiertovirtauksesta molekyyllissä, minkä seurauksena ydinten ympärille syntyy paikallisia magneettikenttiä B_e , jotka vastustavat ulkoista magneettikenttää:

$$B = B_0 - B_e = B_0(1 - \delta) \quad (3)$$

Termiä σ (=sigma) kutsutaan varjostustekijäksi. Seuraavissa kappaleissa keskitytään tietokoneistetun NMR-spektroskopian kannalta oleellisimpiin vaikutuksiin, jotka saavat aikaan muutoksia varjostustekijään.

Paramagneettinen ja diamagneettinen vaikutus. Ulkoisen magneettikentän aikaansaama elektronien kiertoliike häiriintymättömässä pallomaisessa elektronijakaumassa (esim. s-orbitaali) saa aikaan virtauksen, joka johtaa puhtaaseen diamagneettiseen vaikutukseen.¹ Tällöin varjostustekijä voidaan laskea Lambin kaavalla (4) ydintä ympäröivän tiheyden $\rho(r)$ perusteella:

$$\delta = \frac{\mu_0 e^2}{3e} \int_0^\infty r \rho(r) dr, \quad (4)$$

jossa $\rho(r)$ on elektronitiheyden funktio etäisyydellä r ytimeen. Diamagneettinen vaikutus on vallitseva tarkasteltaessa protonien kemiallisia siirtymiä.²

Molekyyleissä tilanne on kuitenkin paljon monimutkaisempi, koska täytyy ottaa huomioon elektronien liike koko molekyylin sisällä.¹ Tällöin magneettikentän aikaansaama elektronien liike virittyneiden ja perustiloilla olevien p-orbitaalien välillä saa aikaan viereisten ydinten s-orbitaaleilla diamagneettisen vaikutuksen vähenemisen, mikä puolestaan saa aikaan suuria siirtymiä alakentälle päin. Vaikutusta kutsutaan paramagneettiseksi ja se on kääntäen verrannollinen ytimen massan neliöön ja matalien energiatilojen elektronisiin viritysenegioihin ΔE :

$$\text{paramagneettien vaikutus} \propto \frac{1}{m^2 \Delta E}$$

Vetyä painavammassa ytimissä (¹³C jne.) on alempia energiatiloja, joiden ΔE :t ovat matalia. Termistä ΔE tulee tällöin merkittävä. Sen avulla voidaan selittää mm. miksi painavampien ydinten siirtymien vaihteluväli on suurempi kuin kevyiden ydinten.

Aromaattinen rengasvirta. Aromaattisen renkaan delokalisoituneet elektronit indusoivat uuden sekundäärisen magneettikentän.¹ Ytimen kokema magneettikenttä

vahvistuu kun syntynyt sekundäärinen magneettikenttä on yhdensuuntainen ulkoisen magneettikentän kanssa ja heikentyy sen ollessa ulkoisen magneettikentän vastainen. Tämän seurauksena protonit molekyylin tasossa ja renkaan ulkopuolella resonoivat korkeammilla taajuuksilla ja protonit renkaan ylä- ja alapuolella alemmilla taajuuksilla.

Viereisen ryhmän anisotropia. Diamagneettinen elektronien kiertovirtaus saa aikaan magneettikenttiä, jotka vaikuttavat viereisiin ytimiin.

Liuotinvaikutukset. Liuottimen vaikutus protonin siirtymään ei yleensä ole 1 ppm:ää suurempi. Liuottimen aikaansaamia ongelmia/siirtymiä voidaan välttää käyttämällä kemiallisesti inertejä liuottimia. Toisaalta liuotinvaikutuksia voidaan myös käyttää apuna esimerkiksi limittäin menevien signaalien erottelemiseen.

pH. pH:lla on erityisen suuri vaikutus kemiallisiin siirtymiin yhdisteissä, jotka sisältävät aminoryhmiä, karboksyylihapporyhmiä tai aminohappotähteitä. Tällaisten yhdisteiden malliesimerkkeinä voidaan käyttää aminohappoja, joissa pH:n muutoksen aikaansaamat kemialliset siirtymät ovat seurausta edellä mainittujen ryhmien protonaatioasteen muutoksista.

Jos protonin vaihto on nopeaa suhteessa NMR-mittauksen keston, kemiallinen siirtymä muodostuu painotetusta keskiarvosta puhtaan happomuodon ja sitä vastaavan konjugaattiemäksen siirtymän välillä. Tällöin pH:n ja kemiallisen siirtymän riippuvuutta voidaan kuvata Henderson-Hasselbalchin yhtälöllä:

$$pH = pK_a + \log \frac{\delta - \delta_{HA}}{\delta_A - \delta} \quad (5)$$

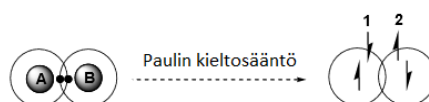
jossa δ , δ_{HA} ja δ_A ovat havaitun, happomuodon ja konjugaattiemäksen siirtymien arvot samassa järjestyksessä.

1.3 Kytkevakiot

Ydinten A ja B, joiden spin on nolasta poikkeava, välillä on olemassa kahdenlaista magneettista vuorovaikutusta: suoraa vuorovaikutusta (dipoli-dipoli –kytkeytyminen) sekä epäsuoraa vuorovaikutusta (skalaarinen eli spin-spin –kytkeytyminen). Dipoli-

dipoli –vuorovaikutus on n. tuhat kertaa suurempaa kuin epäsuora skalaarinen vuorovaikutus. Suorat dipoli-dipoli –vuorovaikutukset vaikeuttavat kiinteiden tai erittäin viskoosien näytteiden korkean resoluution NMR-mittauksia ja tekevät nestekiteiden NMR-spektreistä hyvin monimutkaisia. Tämä johtuu siitä, että nestekiteiden dipoli-dipoli –vuorovaikutukset eivät keskiarvoistu molekyylien osittaisen suuntautumisen takia. Liikkuviissa isotrooppisissa nesteissä molekyylien sattumanvarainen liike keskiarvoistaa dipoli-dipoli –vuorovaikutukset, eikä niillä ole spektreihin yleensä suoraa näkyvää vaikutusta.

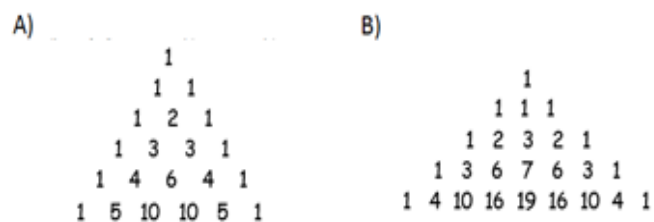
Skalaarisen kytkeytymisen mekanismi. Skalaarista kytkeytymistä voidaan kuvata usealla erilaisella mekanismilla. Tärkein niistä on Fermin kontakti (Kuva 2), jonka mekanismia voidaan havainnollistaa sidoksella A-B (tai esim. ^1H - ^{13}C):



Kuva 2. Skalaarisen kytkeytymisen mekanismi.

jossa kontakti syntyy, kun sidoselektroni 1 ”viettää aikaa” ytimen B tilassa. Elektronin 1 ja ytimen A spinit ovat Paulin kieltoäännön mukaan suuremmalla todennäköisyydellä vastakkaiset. Ytimen spinin vastakkaista suuntautumista vuorovaikutuksen seurauksena kutsutaan spin-polarisaatioksi. Paulin kieltoäännön mukaan myös sidoselektronipari (1 ja 2) sekä ydin B ja sidoselektroni 2 ovat samalla tavoin vastakkain suuntautuneita. Tästä seuraa lopulta, että myös ytimet A ja B ovat vastakkain polarisoituneita. Kun kytkeytyneet ytimet ovat vastakkain polarisoituneita, kytkentävakion arvo on positiivinen. Tästä syystä yhden sidoksen kytkeytymät ovat melkein aina positiivisia.

$2nI+1$ -sääntö. Yksinkertaisia ensimmäisen kertaluvun kytkentöjä, joissa kytkentävakion arvo on huomattavasti suurempi kuin kytkeytyneiden ydinten siirtymien erotus, voidaan kuvata ytimen spinkvanttiluvun I ja ydinten määrän n avulla. Yleinen sääntö on, että kytkennän multiplisiteetti M (kytkennän piikkien määrä) noudattaa kaavaa $M = 2nI+1$. Kaava yksinkertaistuu muotoon n+1 ytimillä, joiden spinkvanttiluku on $\frac{1}{2}$. Kytkeymien intensiteetit noudattavat tällöin Pascalin kolmiota (Kuva 3). Jos spinkvanttiluku on suurempi kuin $\frac{1}{2}$, intensiteettien kuvaamiseen voidaan käyttää erilaista kolmiota.



Kuva 3. NMR-kytkentäpattereiden intensiteettien suhde ja multiplisiteetti kun A) ydin kytkeytyy spin $\frac{1}{2}$ -yttimeen (Pascalin kolmio) ja B) kun ydin kytkeytyy spin 1 -yttimeen.

Kun kytkeytyminen tapahtuu kahteen tai useampaan ei-ekvivalenttiin viereiseen yttimeen tai kun kyseessä on toisen kertaluvun kytkeytyminen, eivät edellä mainitut säännöt aina päde. Esimerkiksi metyyliakrylaatin spektrissä esiintyvä dubletin dubletti on seurausta kahden ei-ekvivalentin spin $\frac{1}{2}$ -ytimen kytkeytymisestä samaan protoniin.

Visinaalinen kytkeytyminen. Vierekkäisiin hiiliatomeihin sitoutuneiden protonien, eli visinaalisten protonien, välinen kytkeytyminen on yksi hyödyllisimmistä ja informatiivisimmista vetyjen välisistä kytkeymistä. Kytkennän arvo on ennustettavissa ja sen avulla saadaan tietoa kytkeytyneiden vetyjen välisestä avaruudellisesta asemasta. Visinaalinen kytkentävakio on melkein aina positiivinen ja se vaihtelee suuresti eri avaruusrakenteiden välillä. Asyklisissä tyydyttymättömissä yhdisteissä, joissa eri rakenteiden välillä ei ole suuria energiaeroja, visinaalinen kytkentävakio on yleensä 6-8 Hz:n luokkaa. Vaihtelua kytkennän arvoon aiheuttavat elektronegatiiviset substituentit, jotka pienentävät kytkentävakion arvoa.

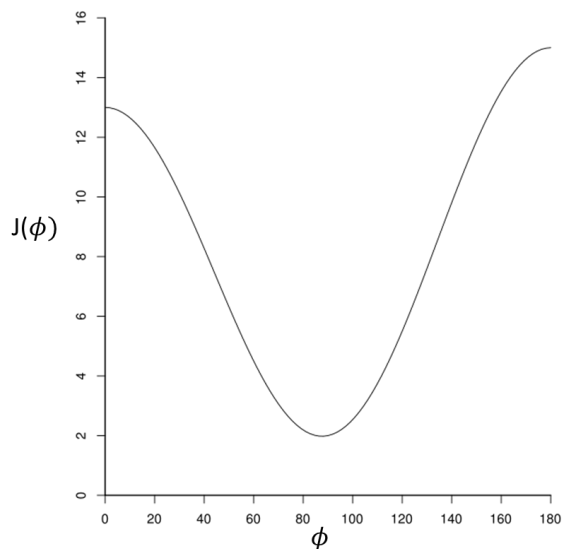
Visinaalisen kytkentävakion arvon ja vetyjen välisen diedrikulman riippuvuutta voidaan kuvata Karplus-yhtälön avulla:

$$J(\phi) = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi \quad (6)$$

jossa J on kytkentävakio, A, B ja C ovat vakioita ja ϕ on H-C-C-H -sidoksen diedrikulma. Yhtälöstä on olemassa useita erilaisia variaatioita, kuten seuraava yksinkertaistettu muoto:

$$\begin{aligned}
 J(\phi) &= 8.5 \cos^2 \phi - 0.28 & 0 < \phi < 90 \\
 J(\phi) &= 9.5 \cos^2 \phi - 0.28 & 90 < \phi < 180
 \end{aligned}$$

Karplus-yhtälön perusteella piirretystä kuvaajasta (Kuva 4) nähdään, että visinaalisten kytkeväkertojen arvot ovat suurimmillaan, kun vetyjen välinen diedrikulma on 180° tai 0° ja pienimmillään silloin, kun diedrikulma on 90° . Kokeellisia havaintoja voidaan perustella sillä, että orbitaalien välinen päällekkäisyys on suurimmillaan silloin, kun diedrikulma on 180° (eclipsed-konformaatio) tai 0° (anti-konformaatio).



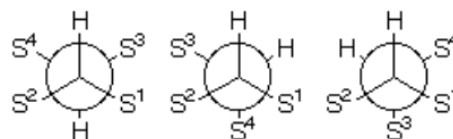
Kuva 4. Karplus-yhtälön perusteella piirretty kuvaaja eli ns. Karplus-käyrä.

Karplus-yhtälön käytölle on olemassa kuitenkin rajoitteita. Ongelmia aiheuttavat esimerkiksi substituenttien elektronegatiivisuus, suuntautuminen, hiilen hybridisaatio ja sidospituudet. Tällä hetkellä kaikista tarkin tapa laskea $^3J_{\text{H,H}}$ on käyttää Haasnoot-yhtälöä.³ Yhtälö on hyvin monimutkainen ja se ottaa huomioon substituenttien elektronegatiivisuuden ja keskinäisen suuntautumisen (

Taulukko 1).

Taulukko 1. Haasnoot-yhtälöllä laskettuja visinaalisia kytkentävakioita.

S_1	S_2	S_3	S_4	$J(60^\circ)$
H	H	H	H	2.98
O	F	H	H	7.31
O	N	O	H	4.66



1.4 Spinsysteemit

Monimutkaisten NMR-kytkentäpattereiden analyseissä käytetään usein apuna Poplen merkintätapaa, jonka avulla spinsysteemit luokitellaan. Jokainen kemiallisesti ekvivalentti protoni nimetään kirjaimella. Kun ydinten välinen kytkentä on ensimmäistä kertalukua, eli jos kemiallisen siirtymien erotus on suuri suhteessa kytkentävakion suuruuteen, ytimille annetaan kirjaimet, jotka ovat aakkosissa kaukana toisistaan (esim. AMX, AX). Jos siirtymien erotuksen ja ydinten välisen kytkentävakion suhde on pieni, kyseessä on toisen kertaluvun kytkentyminen, jolloin ytimet nimetään vierekkäisten aakkosten mukaan (esim. ABC). Ei ole olemassa tarkkaa arvoa sille, kuinka suuri siirtymien ja kytkentävakioiden erotuksen tulisi olla, jotta voitaisiin varmasti sanoa, onko kyseessä ensimmäisen tai toisen kertaluvun kytkentyminen. Usein arvioidaan, että jos $\delta\nu > 10 J$, on kyseessä ensimmäisen kertaluvun kytkentä.

Jos siirtymät ovat magneettisesti ekvivalentteja, ne merkitään samalla kirjaimella ja niiden määrä merkitään alaindeksillä. Esimerkiksi CH_3 merkitään A_3 . Magneettisesti ekvivalenttien ydinten siirtymät ovat samanlaiset ja ne kytkeytyvät ryhmän ulkopuolisiin ytimiin samalla tavalla. Jos ydinten siirtymät ovat samanlaiset, eli ne ovat kemiallisesti ekvivalentteja, mutta ne kytkeytyvät eri tavalla ympäristönsä kanssa, eli ne ovat magneettisesti ei-ekvivalentteja, erotetaan ne toisistaan yläindeksillä (esim. $AA'BB'$).

2 TIETOKONEISTETTU NMR-SPEKTRIANALYYSI

Korkean resoluution NMR-spektroskopia eroaa muista molekyyli-spektroskopiaista siinä, että jopa kaikkein monimutkaisimmat, tuhansista yksittäisistä spektriviivoista muodostuvat spektrit voidaan esittää vain muutaman parametrin avulla käyttämällä kvanttimekaanista teoriaa.¹ Tietokoneavusteisen NMR-spektrianalyysin tarkoituksena on määrittää nämä parametrit havaitun spektrin avulla käyttämällä kvanttimekaanista spektrianalyysiä (QMSA). Matemaattisesti kyseessä on epälineaarinen käänteisarvo-ongelma, joka voidaan ratkaista iteratiivisesti käyttäen apuna kvanttimekaanista teoriaa, jonka avulla laskettu spektri voidaan simuloida vastaamaan havaittua spektriä. Usein spektriparametreista saadaan riittävän tarkat arviot tarkastelemalla spektriä silmämääräisesti. On kuitenkin tilanteita, joissa tarkempi analyysi on tarpeen. Automatisoidun analyysin avulla voidaan myös säästää aikaa ja vaivaa.

Tietokoneistetun NMR-spektroskopian yksi tämän hetken lupaavimmista käyttökohteista on erilaisten seosten kvantitatiivinen kvanttimekaaninen spektrianalyysi (qQMSA).⁴ Tämän on seurausta mm. laitekehityksestä, jonka myötä on mahdollista mitata suuri määrä näytteitä lyhyessä ajassa täysin automatisoidusti. Esimerkiksi Kuopion NMR-metabolomiikkalaboratoriossa on mahdollista mitata ja analysoida n. 150-180 näytettä vuorokaudessa.^{5, 6} Erilaisia käyttökohteita qQMSA:lle ovat esimerkiksi

- biologiset nesteet, kuten veri (seerumi tai plasma), CSF ja virtsa
- epäpuhtausanalyysit (esim. lääkeaineet)
- fermentaatiotuotteet (usein yksinkertaisia sokereita ja happoja)
- HSQC-slice-analyysi: ¹³C-isotopomeerien Flux-analyysi
- biouutteet (esim. ulosteista, aivoista ja lihaksista)
- kaikki muut nesteet ja liukoiset materiaalit, kuten mehut, rasvat ja polttoaineet.

Biologiset nesteet sisältävät yleensä suuren määrän yhdisteitä laajalta pitoisuusalueelta. Yhdisteiden kvantitatiivinen määrittäminen ¹H NMR-spektristä voi olla hyvin vaikeaa johtuen spektrien monimutkaisuudesta ja yhdisteiden signaalien päällekkäisyydestä.⁷ Esimerkiksi yhdestä seeruminäytteestä (kolme eri spektriä) mitattu patteri voi sisältää

yli 200 muuttujaa sisältäen yksittäisiä metaboliitteja ja rasvahappoja sekä lipoproteiineja (kaikkiaan lähes 100).⁵ Tämän työn kokeellisen osan tarkoituksena oli kehittää ohjelmisto (ChemAdder, SpinAdder), jonka avulla kvantitatiivisen analyysin tekeminen olisi mahdollisimman helppoa ja pitkälle automatisoitua.

Kemialliset siirtymät saadaan usein määritettyä jopa 0,001 ppm:n tarkkuudella silmämääräisesti. Tämä on riittävän tarkkaa useimmissa rakenne-NMR-spektroskopisissa sovelluksissa. Tarkkojen arvojen määrittäminen voi olla kuitenkin tarpeellista sovelluksissa, jotka liittyvät kvantitatiiviseen NMR-spektroskopiaan. Koeolosuhteet tai tertiäärinen rakenne eivät vaikuta juurikaan kytkentävakioihin, kun taas molekyylien välisillä vuorovaikutuksilla voi olla suurikin vaikutus kemialliseen siirtymään. Tämän seurauksena kytkentävakioita voidaan käyttää esimerkiksi tietynlaisen aromaattisen fragmentin tunnistamiseen seoksessa.

Tietokoneistettua analyysia voidaan käyttää apuna, kun spektri on vaikeaselkoinen, toista kertalukua tai kun spinsysteemi sisältää symmetriaa, jonka seurauksena voi olla vaikeaa tai jopa mahdotonta määrittää kytkentävakioita. Tällaisissa tapauksissa tietokoneistettu analyysi helpottaa spektriin liittyvien yksityiskohtien selvittämistä. Kun lasketulle ja havaitulle spektrille saadaan riittävän hyvä sovitus, voidaan sitä pitää riittävänä argumenttina siirtymiä assignoitaessa.

Kvanttimekaanisen teorian mukaan NMR-spektroskopiassa tarkastellaan siirtymiä ydinten spintilojen välillä. Ytimillä, joiden spinkvanttiluku on $\frac{1}{2}$, on kaksi spintilaa, joita kutsutaan α - ja β -tiloiksi. Spektri voidaan analysoida manuaalisesti ensimmäisen kertaluvun spektrinä, kun siirtymien A ja B välinen erotus on riittävän suuri suhteessa kytkentävakioon. Tällöin spintiloista muodostuvat tulojen aaltofunktiot $\alpha\beta$ ja $\beta\alpha$ kuvaavat riittävän tarkasti siirtymien spinsysteemejä. Jos siirtymien A ja B spinit ovat vahvasti kytkettyneet, $\alpha\beta$ ja $\beta\alpha$ sekoittuvat. Sekoittumista voidaan kuvata lineaarikombinaatioilla $a\alpha\beta + b\beta\alpha$ ja $c\alpha\beta + d\beta\alpha$. Kertoimet a, b, c ja d saadaan käyttämällä matemaattista formalismia.¹ Spintilojen sekoittuminen saa aikaan muutoksia signaalien resonanssitaajuuksissa ja intensiteeteissä. Esimerkiksi AA'BB' –spinsysteemeissä, kuten *para*-disubstituoituissa bentseeniyhdisteissä, sekoittuminen johtaa $[\alpha\beta + \beta\alpha]^{1/2}$ ja $[\alpha\beta - \beta\alpha]^{1/2}$ –aaltofunktioihin, jotka voidaan muuttaa matemaattiseen muotoon ainoastaan käyttämällä monimutkaisia sääntöjä.

2.1 NMR-simulaatio

Kuten edellisessä kappaleessa todettiin, spin $\frac{1}{2}$ -ytimillä on magneettikentässä kvanttimekaniikan mukaan kaksi spintilaa.¹ Kvanttimekaniikassa spintiloja kuvataan aaltofunktioina. Energialtaan alemmaa tilaa kuvataan perusaaltofunktiolla α (spinkvanttiluku = $-\frac{1}{2}$) ja energialtaan ylempää perusaaltofunktiolla β (spinkvanttiluku = $\frac{1}{2}$). Kuten muissakin spektroskopian lajeissa, ainoastaan tiettyjen energiatilojen väliset siirtymät ovat sallittuja. Näitä rajoituksia kutsutaan valintasäännöiksi. NMR-spektroskopiassa valintasääntö määritellään kvanttiluvun m muutoksen avulla:

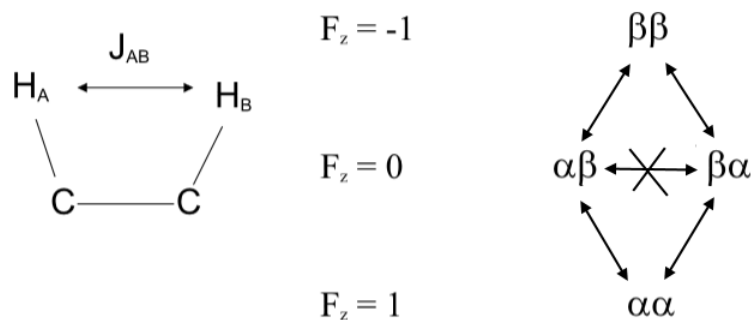
$$\Delta m = \pm 1,$$

jonka mukaan ainoastaan siirtymät, joissa kvanttiluku muuttuu yhdellä (ylöspäin tai alaspäin) ovat sallittuja.

Jos molekyyli sisältää kaksi spinydintä, joiden siirtymien välinen erotus on suuri suhteessa niiden väliseen kytkentään, systeemi nimetään Poplen merkintätavan mukaan AX-systeemiksi.¹ Spintilojen välistä sekoittumista voidaan tällöin kuvata riittävän tarkasti perusaaltofunktioiden α ja β tulojen avulla. Mahdollisia aaltofunktioiden tuloja on siis neljä;

$$\begin{aligned}\phi_1 &= \alpha\alpha, & F_z &= 1 \\ \phi_2 &= \alpha\beta & F_z &= 0 \\ \phi_3 &= \beta\alpha & F_z &= 0 \\ \phi_4 &= \beta\beta & F_z &= -1\end{aligned}$$

Jokainen näistä yhdistelmistä vastaa yhtä energiatilaa (Kuva 5), jota kuvataan kokonaiskvanttiluvulla F_z . Valintasäännön mukaan mahdollisia tilojen välisiä transitioita on neljä; $\alpha\alpha \leftrightarrow \alpha\beta$, $\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\alpha$, $\beta\beta \leftrightarrow \alpha\beta$ ja $\beta\beta \leftrightarrow \beta\alpha$.



Kuva 5. AX-systeemin spintilat ja niitä vastaavat kokonaisspinkvanttiluvut (F_z).

Jos molekyyli sisältää kaksi spinydintä, joiden siirtymien välinen erotus on pieni suhteessa niiden väliseen kytkentävakioon, systeemi nimetään Poplen merkintätavan mukaan AB-systeemiksi. Tällöin ei ole riittävää kuvata spintilojen välistä sekoittumista aaltofunktioiden tulojen avulla, kuten esimerkiksi AX-systeemissä.¹ Toisen kertaluvun vaikutukset saavat aikaan aaltofunktioiden tulojen $\alpha\beta$ ja $\beta\alpha$ sekoittumisen. Sekoittuminen johtuu ydinten magneettisten momenttien xy-komponenttien vuorovaikutuksista. Ne alkavat prekessoida toistensa suhteen. Sekoittuneita aaltofunktioita voidaan kuvata lineaarikombinaatioiden avulla;

$$\phi_2 = c_{22}\alpha\beta + c_{23}\beta\alpha$$

$$\phi_3 = c_{32}\alpha\beta + c_{33}\beta\alpha$$

Ainoastaan ne aaltofunktiot, joilla on sama kokonaisspinkvanttiluku, sekoittuvat. Sekoittuneiden aaltofunktioiden määrä on sama kuin sekoittumiseen osallistuvien aaltofunktioiden. Kertoimet c_{22} , c_{23} , c_{32} ja c_{33} kuvaavat aaltofunktioiden tulojen osuutta sekoittuneissa aaltofunktioissa. Kertoimia rajoittaa *normalisaatioehto*, jonka mukaan niiden neliöiden summa on yksi;

$$c_{ij}^2 + c_{kl}^2 = 1$$

Jos ydinten kemialliset siirtymät ovat samoja ($\nu_a = \nu_b$) ja tilojen $\alpha\beta$ ja $\beta\alpha$ energiat ovat samat, kertoimien arvot ovat myös samat. Sekoittuneet aaltofunktiot voidaan tällöin esittää seuraavasti:

$$\phi_2 = 1/\sqrt{2} (\alpha\beta + \beta\alpha) \text{ symmetrinen}$$

$$\phi_3 = 1/\sqrt{2} (\alpha\beta - \beta\alpha) \text{ asymmetrinen}$$

Voidaan huomata, että kerroin $1/\sqrt{2}$ tulee normalisaatioehdosta.¹

2.2 Matriisialgebraa

Tämän kappaleen tarkoituksena on käydä lyhyesti läpi muutamia matriisialgebraan liittyviä käsitteitä, joita käytetään laskennallisen NMR-spektroskopian yhteydessä.

Ominaisarvot ja ominaisarvovektorit. Ominaisarvojen ja ominaisarvovektoreiden määrittäminen on äärimmäisen tärkeää useissa erilaisissa fysiikkaan ja matematiikkaan liittyvissä analyysimenetelmissä ja sovelluksissa. Niiden määrittäminen tarkoittaa samaa kuin matriisin diagonalisoiminen.⁸

Matriiseja voidaan kertoa keskenään, jos niissä on sama määrä rivejä. Ominaisarvovektorit ovat näiden matriisien erikoistapauksia. Jokaista ominaisarvovektoria vastaa yksi ominaisarvo. Kirjallisuudessa törmää usein termeihin *ominaisarvohajotelma* (eigen decomposition) ja *ominaisarvohajotelmateoria* (eigen decomposition theory). Ominaisarvohajotelmateorian mukaan ominaisarvojen ja ominaisarvovektoreiden määrittäminen on mahdollista ainoastaan neliömatriiseille. Kun neliömatriisista määritetään ominaisarvot ja ominaisarvovektorit, kutsutaan sitä ominaisarvohajotelmaksi.

Vektori v on neliömatriisin A ominaisarvovektori jos sille pätee

$$Av = \lambda v, \tag{7}$$

jossa λ on ominaisvektoria v vastaava ominaisarvo. Yhtälöä kutsutaan matriisin A ominaisarvoyhtälöksi. Yhtälö voidaan kirjoittaa myös seuraavaan muotoon

$$(A - \lambda I)v = 0, \tag{8}$$

jossa I on identiteettimatriisi. Yhtälöllä (8) on nollasta poikkeava ratkaisu v vain, jos matriisin $(A - \lambda I)$ determinantti on nolla. Kun matriisi $(A - \lambda I)$ muutetaan determinanttimuotoon, saadaan ns. sekulaarinen yhtälö (tai karakteristinen yhtälö):

$$|A - \lambda I| = 0, \quad (9)$$

joka ratkaisemalla saadaan matriisin A ominaisarvot. Leibnizin säännön⁹ mukaan yhtälön (9) vasen puoli on polynomifunktio, jonka aste on sama kuin matriisin kertaluku n. Polynomifunktiota kutsutaan matriisin A karakteristiseksi polynomiksi.

Käytetään esimerkkinä matriisia M:

$$M = \begin{bmatrix} 2 & 1 \\ 1 & 2 \end{bmatrix}.$$

Kun matriisista M otetaan determinantti $\det(M - \lambda I)$, voidaan karakteristinen polynomi kirjoittaa seuraavasti:

$$|A - \lambda I| = \begin{vmatrix} 2 - \lambda & 1 \\ 1 & 2 - \lambda \end{vmatrix} = 3 - 4\lambda^2 + 2\lambda = 0.$$

Karakteristisen polynomin juuret ($\lambda_1 = 1$ ja $\lambda_2 = 3$) ovat myös matriisin A ominaisarvoja. Ominaisarvoja vastaavat ominaisarvovektorit voidaan määrittää sijoittamalla ominaisarvoyhtälöön (8) vuoron perään määritetyt ominaisarvot.

2.2.1 NMR-spektrin laskeminen

Yksi kvanttimekaniikan perusdogmeista on se, että mitkä tahansa systeemin ominaisuudet tai spintilat voidaan kuvata aaltofunktion avulla. NMR-spektroskopiassa tarkastellaan siis spinsysteemin aaltofunktioita.¹ Aaltofunktiot Ψ määritellään systeemin kokonaisenergiasta E käyttämällä kuuluisaa Schrödingerin yhtälöä:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (10)$$

jossa \hat{H} on spin-Hamilton-operaattori, Ψ spinsysteemiä kuvaava aaltofunktio (ominaisarvofunktio) ja E systeemin kokonaisenergia. Kokonaisenergioita E kutsutaan myös aaltofunktion Ψ ominaisarvoksi. Operaattoreita käytetään erilaisten ominaisuuksien, esimerkiksi tässä tapauksessa energian, määrittämiseen aaltofunktiosta. Hamiltonin operaattorin ominaisarvot ovat spinsysteemin mahdollisia energioita, joiden perusteella myös mahdolliset resonanssitajuudet voidaan laskea. Ominaisarvoja

vastaavat ominaisarvovektorit tarvitaan siirtymien intensiteettejä laskettaessa. Ominaisarvojen ja ominaisarvovektoreiden määrittäminen onkin ensimmäinen ongelma, kun NMR-spektri lasketaan. Seuraavissa kappaleissa käydään lyhyesti läpi spektrin laskennan oleelliset vaiheet.

Laskeminen aloitetaan kirjoittamalla aaltofunktioiden tulot (esim $aaaa$, $a\beta a\alpha$, ...) joiden määrä voidaan laskea seuraavasti:

$$n = 2^N,$$

jossa N on spinsysteemin ydinten määrä (Esimerkiksi ABCD-systeemissä funktioiden tulojen lukumäärä on $2^4=16$). Jos systeemi ei sisällä toisen kertaluvun kytkeytymistä, voidaan näitä funktioita käyttää suoraan spinsysteemin perusaaltofunktioina (esim. AX-systeemi). Jos systeemi sisältää toisen kertaluvun vaikutuksia, aaltofunktioiden tuloista muodostetaan tarvittavat lineaarikombinaatiot (esim. AB-systeemi).¹

Perusaaltofunktioista muodostetaan yhtälöryhmä, jonka perusteella muodostetaan neliömatriisi. Neliömatriisia kutsutaan Hamiltonin matriisiksi, ja se voidaan jakaa pienempiin alimatriiseihin, joista jokainen vastaa yhtä kokonaiskvanttilukua. Alimatriisien kertaluku ja määrä noudattavat Pascalin kolmiota (Kuva 6).

N	Matriisin kertaluku									
0	1									
1	1 1									
2	1 2 1									
3	1 3 3 1									
4	1 4 6 4 1									
5	1 5 10 10 5 1									
6	1 6 15 20 15 6 1									
7	1 7 21 35 35 21 7 1									
8	1 8 28 56 70 56 28 8 1									
9	1 9 36 84 126 126 84 36 9 1									
10	1 10 45 120 210 252 210 120 45 10 1									

Kuva 6. Hamiltonin alimatriisien kertaluku ja määrä noudattavat Pascalin kolmiota. N = spinsysteemin ydinten määrä.

ABCD-systeemi jakautuu esimerkiksi kahteen 4x4-matriisiin ($F_z=1$ ja $F_z=-1$) ja yhteen 6x6-matriisiin ($F_z=0$), joka vastaa kokonaiskvanttilukua $F_z=0$. Käytetään esimerkkinä 6x6-matriisia, joka voidaan kirjoittaa seuraavasti:

$$A = \begin{bmatrix} H_{11} & \frac{1}{2}J_{BC} & \frac{1}{2}J_{AC} & \frac{1}{2}J_{BD} & \frac{1}{2}J_{AD} & 0 \\ \frac{1}{2}J_{BC} & H_{22} & \frac{1}{2}J_{AB} & \frac{1}{2}J_{CD} & 0 & \frac{1}{2}J_{AD} \\ \frac{1}{2}J_{AC} & \frac{1}{2}J_{AB} & H_{33} & 0 & \frac{1}{2}J_{CD} & \frac{1}{2}J_{BD} \\ \frac{1}{2}J_{BD} & \frac{1}{2}J_{CD} & 0 & H_{44} & \frac{1}{2}J_{AB} & \frac{1}{2}J_{AC} \\ \frac{1}{2}J_{AD} & 0 & \frac{1}{2}J_{CD} & \frac{1}{2}J_{AB} & H_{55} & \frac{1}{2}J_{BC} \\ 0 & \frac{1}{2}J_{AD} & \frac{1}{2}J_{BD} & \frac{1}{2}J_{AC} & \frac{1}{2}J_{BC} & H_{66} \end{bmatrix} \quad (11)$$

Matriisien diagonaali-alkiot voidaan määrittää perusfunktioista käyttämällä seuraavaa yhtälöä:¹⁰

$$H_{mm} = \sum_{i=1}^N v_i [(I_z)_i]_m + \frac{1}{4} \sum_{j<i} \sum J_{ij} T_{ij}, \quad (12)$$

missä

$$[(I_z)_i]_m = \begin{cases} +\frac{1}{2}, & \text{jos ytimellä } i \text{ on spin } \alpha \text{ aaltofunktiossa } \phi_m \\ -\frac{1}{2}, & \text{jos ytimellä } i \text{ on spin } \beta \text{ aaltofunktiossa } \phi_m \end{cases}$$

ja

$$T_{ij} = \begin{cases} +1, & \text{jos spinit } i \text{ ja } j \text{ ovat samansuuntaisia aaltofunktiossa } \phi_m \\ -1, & \text{jos spinit } i \text{ ja } j \text{ ovat vastakkaissuuntaisia aaltofunktiossa } \phi_m \end{cases}.$$

Jos esimerkiksi

$$\phi_m = \alpha_1 \alpha_2 \beta_3 \alpha_4,$$

niin

$$H_{mm} = \frac{1}{2}(v_1 + v_2 - v_3 + v_4) + \frac{1}{4}(J_{12} - J_{13} + J_{14} - J_{23} + J_{24} - J_{25}).$$

Diagonaalien ulkopuoleiset alkiot voidaan määrittää seuraavasti:

$$H_{mn} = \frac{1}{2} U J_{ij}, \quad (13)$$

jossa

$$U = \begin{cases} +1, & \text{jos } \phi_m \text{ ja } \phi_n \text{ eroavat toisistaan ainoastaan spinien } i \text{ ja } j \text{ suhteen} \\ -1 & \text{muulloin} \end{cases}$$

Koska spinsysteemin perusaaltofunktiot ovat myös Hamiltonin operaattorin ominaisfunktioita, Schrödingerin yhtälö voidaan kirjoittaa niiden avulla ominaisarvoyhtälömuotoon (8):

$$(A - \lambda I)v = 0,$$

missä A on Hamiltonin matriisi, v on A :n ominaisarvovektori, I on identiteettimatriisi ja λ :n ratkaisut ovat A :n ominaisarvoja. Yhtälöllä on nollasta poikkeava ratkaisu v vain, jos matriisin $(A - \lambda I)$ determinantti on nolla. Kun matriisi $(A - \lambda I)$ muutetaan determinanttimuotoon, saadaan ns. sekulaarinen yhtälö (9):

$$\det(A - \lambda I) = 0.$$

Spintiloja vastaavat energiatilat λ ovat ratkaisuja sekulaariselle yhtälölle. Spektriviivojen taajuudet lasketaan energiatilojen erotuksina noudattamalla valintasääntöä. Pelkkä ominaisarvojen laskeminen ei kuitenkaan ole riittävää, sillä ominaisarvovektorit v tarvitaan siirtymien intensiteettejä laskettaessa. Ominaisarvovektorit saadaan laskettua sijoittamalla kaavaan (8) vuorotellen sekulaariyhtälöstä saadut energioiden arvot.

Leibnizin säännön⁹ mukaan yhtälön vasen puoli on polynomifunktio, jonka aste on sama kuin matriisin kertaluku n . Kun kertaluku on suurempi kuin kaksi, yhtälö on mahdotonta ratkaista algebrallisesti. Yhtälöiden ratkaisuun voidaan käyttää iteratiivisia menetelmiä.

2.3 Suurien spinsysteemien simulaatio

Ytimen spinsysteemin Schrödingerin yhtälö voidaan kirjoittaa matriisimuodossa käyttämällä ns. Hamiltonin matriiseja.¹¹ Matriisien diagonalisaatiolla saadaan määritettyä ominaisarvot ja ominaisarvovektorit, joita käytetään siirtymien taajuuksien, intensiteettien ja iteraatioiden osittaisderivaattojen laskemiseen. Spinsysteemien koon kasvaessa kasvaa myös matriisien koko, siirtymien määrä ja laskentaan vaadittavien resurssien määrä. Matriiseja voidaan kuitenkin yksinkertaistaa käyttämällä X-approksimaatiota, symmetriaa tai jakamalla spinsysteemi pienempiin alisysteemeihin. Tämän seurauksena laskut on mahdollista suorittaa useimmille molekulaarisille systeemeille pois lukien yhdisteet, jotka sisältävät pitkiä CH_2 -ketjuja, joiden signaalit ovat vahvasti degeneroituneita ja jotka sisältävät vain vähän rakenteellista informaatiota.

Käytännössä suurin mahdollinen spin $\frac{1}{2}$ -systeemi, joka voidaan simuloida ilman approksimointia, on 12 protonin muodostama systeemi, jossa jokainen protoni vastaa

4096 siirtymää, jotka menevät päällekkäin ja jonka seurauksena spektristä ei voida havaita yksittäisiä viivoja.¹¹ Tällaisen systeemin suurin Hamiltonin matriisi on kooltaan 924x924. Laskenta-aikoja voidaan vähentää huomattavasti käyttämällä X-approksimaatiota.¹ ”X-kerrointa” kuvataan kaavalla (14), jossa H_{ii} , H_{jj} ja H_{ij} ovat Hamiltonin matriisielementtejä.

$$X - \text{kerroin} = |(H_{ii}H_{jj})/H_{ij}| \quad (14)$$

Jos X-kerroin on riittävän suuri ja spintilat i ja j eivät ole sekoittuneet merkittävästi, voidaan diagonaalien ulkopuolinen elementti H_{ij} jättää huomioimatta. Tätä kautta Hamiltonin matriisi voidaan jakaa pienempiin alimatriiseihin. Spektrin intensiteetit saadaan laskettua ilman vääristymiä käytettäessä X-kerrointa > 100 . Pienempiä arvoja käytettäessä saattaa vääristymiä syntyä. Kohtalaisen luotettava spektrianalyysi on kuitenkin vielä mahdollista, kun X-kerroin > 10 . Tätä voidaan pitää analogiana sille, että spektri voidaan analysoida luotettavasti käyttämällä ensimmäisen kertaluvun sääntöjä silloin, kun siirtymien erotus on kymmenen kertaa suurempi kuin vastaavien kytkentävakioiden arvot.

Symmetria pienentää matriiseja huomattavasti. CH_3 - ja homotooppiset CH_2 -protonit voidaan käsitellä yksittäisinä spin-partikkeleina.¹¹ Tämän seurauksena esimerkiksi CH_2CH_3 -ryhmästä saadaan 14 spektriviivaa, joiden määrä vähenee kuuteen, jos siirtymät eroavat riittävästi. Ero on huomattava verrattuna ABCDE-systeemiin, jonka seurauksena saataisiin teoreettisesti 80 spektriviivaa. Samalla tavoin kun verrataan $\text{AA}'\text{BB}'$ - ja ABCD-systeemejä, spektriviivojen teoreettinen määrä vähenee 32:sta 24:ään; $\text{AA}'\text{BB}'$ -systeemi pelkistyy kahteen 1×1 -, viiteen 2×2 - ja yhteen 4×4 -matriisiin. CH_3 -partikkelin kaikki protonit ovat magneettisesti ekvivalentteja, minkä seurauksena niiden välisellä kytkennällä ei ole vaikutusta spektriin, kun taas AA' -partikkeli, joka muodostuu kahdesta kemiallisesti ekvivalentista mutta magneettisesti ei-ekvivalentista ytimeistä, saa aikaan multipletin.

NUMARIT oli ensimmäinen ohjelma, joka käytti tehokkaasti magneettista ja kemiallista ekvivalenssia hyödyksi.¹² Menetelmä on riittävän tehokas, kun simuloidaan tunnettuja spinsysteemejä ja kytkentävakiot voidaan esittää epäsymmetrisinä taulukoina, joissa $J_{ij} \neq J_{ji}$. Jos systeemi sisältää korkeampaa symmetriaa, täytyy osa

parametreista pitää vakioina analyysin aikana, jotta iteraatiot eivät alkaisi hajaantua. Esimerkiksi butaanin ($A_3A_3'B_2B_2'$ -systeemi) B_2 - ja B_2' -partikkelien siirtymät täytyy pitää vakiona iteroitaessa.

Tietokoneistetun analyysin peruseriaate on aina sama.¹¹ Ensimmäisessä vaiheessa hankitaan kokeelliset spektriparametrit joko manuaalisesti analysoimalla tai jos rakenteesta on riittävästi tietoa, rakenne-ennustuksen avulla. Kokeellisia parametreja käytetään kokeellisen spektrin simulaatioon, minkä jälkeen niitä säädetään iteraatiovaiheessa, jossa pyritään minimoimaan havaitun ja lasketun spektrin muuttujien $O(i)$ keskineliövirheen neliöjuuri (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n [O_{hav}(t) - O_{las}(t)]^2}{n}} \quad (15)$$

Kvanttimekaaniset spektrianalyysimenetelmät voidaan jakaa kahteen ryhmään: taajuusmenetelmiin ja kokonaisjuovamenetelmiin (TLS = Total Line Shape). Taajuusmenetelmissä muuttujat $O(i)$ ovat siirtymätaajuuksia tai spektripiikkien maksimeja, jotka voivat sisältää tietoa useasta eri siirtymästä. TLS-menetelmissä muuttujat $O(i)$ ovat spektrin intensiteettejä tai niiden perusteella laskettuja numeroita.

2.4 Taajuuteen perustuvat menetelmät

Ensimmäisiä taajuuteen perustuvia menetelmiä olivat LACoon ja NMRIT/NMREN, ja niissä muuttujina $O(i)$ toimivat NMR-siirtymien taajuudet.^{13, 14} PERCH-iteraattorin ensimmäisissä versioissa edellä mainittuihin menetelmiin lisättiin automaattinen piikkien assignointi.¹⁵ Käytännössä uudemmat TLS-menetelmät ovat muutamaa tapauslukuun ottamatta parempia käytettävyyden ja soveltuvuuden kannalta.

Ensimmäinen poikkeus ovat spektrit, joiden resoluutiota on vahvistettu voimakkaasti. Tällainen on esimerkiksi naftaleenin 1H NMR-spektrin peak-top-fitting -analyysi.¹⁶ Kyseessä on $AA'A''A''''BB'B''B''''$ -systeemi, joka sisältää yli 800 ei-degeneroitua spektriviivaa, mutta joista vain n. 300 huippupiikkiä saadaan näkyviin kun spektrin resoluutiota kasvatetaan voimakkaasti. Tämän seurauksena intensiteetit valitettavasti vääristyvät.

Toinen poikkeus ovat tapaukset, joissa kytkentävakioihin liittyvä tieto saadaan hyvin heikoista signaaleista, jotka eivät erotu kunnolla pohjaviivan virheistä ja ^{13}C -satelliiteista. Tällaisissa tapauksissa piikkimaksimeista saatavaa tietoa voidaan käyttää ylimääräisenä tietona, kun tehdään TLS-analyysia. Näin voidaan tehdä esimerkiksi kun analysoidaan $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -fragmenttien kytkentävakioita.

2.5 Kokonaisjuovaiteraattorit

Heinzer esitti ensimmäisenä TLS-menetelmän käyttöä kvanttimekaanisessa spektrianalyysissa.¹⁷ Menetelmää on kehitetty sen jälkeen useissa eri ohjelmissa.^{15, 18-23} Integraalimuunnosten perusteet esittelivät ensimmäisen kerran Diehl *et al.* vuonna 1977,¹⁸ mikä jälkeen niiden käyttöä kehittivät Stephenson ja Binsch ohjelmassa DAVINS.²¹ Tämän tutkimuksen kokeellisessa osassa kehitetyn SpinAdder-ohjelman iteratiivinen lähestymistapa on samantapainen kuin ohjelmissa DAVINS, DAISY²⁰ ja WIN-DAISY.¹⁹

TLS-menetelmän perusajatuksena on minimoida havaitun ja lasketun spektrin erotus.¹¹ Yhtälön (15) muuttujana $O(i)$ voi olla spektrin intensiteetti $I(v)$ annetussa spektripisteessä tai integraalimuunnos, joka on saatu käyttämällä sopivaa ikkunafunktiota. Yleisesti voidaan sanoa, että intensiteetti muodostuu kemiallisten komponenttien spektrien summasta, pohjaviivasta ja kohinasta:

$$I(v) = \sum x_n S_n(v) + P(v) + noise(v) \quad (16)$$

jossa x_n on komponentin n populaatio. Jokainen spektri $S_n(v)$ voidaan kirjoittaa spektriparametrien funktiona:

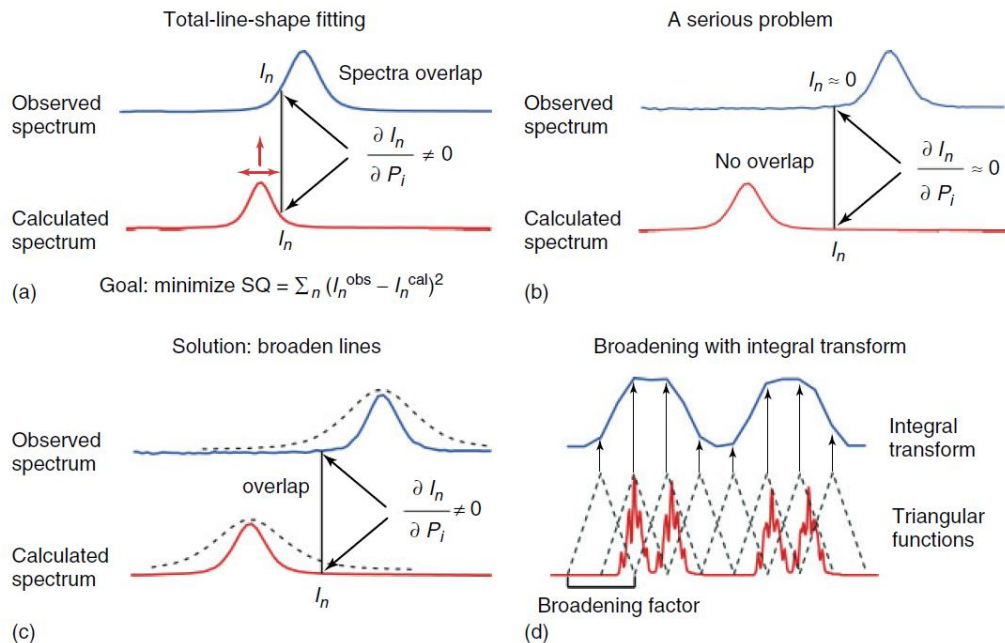
$$S_n(v) = F_n(v, \underline{W}, \underline{J}, \underline{R}, \underline{\Delta}, \text{juovan muoto}) \quad (17)$$

jossa \underline{W} , \underline{J} , \underline{R} , ja $\underline{\Delta}$ ovat kemiallisten siirtymien, kytkentävakioiden, vastekertoimien ja juovan leveyden vektoreita. Vastekertoimilla \underline{R} kuvataan eroja spinlajien signaali-integraalien relaksaatioajoissa, ja niiden pitäisi olla lähellä arvoa 1.0, joka annetaan suurimman integraalin signaalille. Juovan leveyden parametrien voidaan olettaa olevan samoja kaikilla spinlajeilla, ja niitä voidaan kuvata Lorenzilaisten, Gaussilaisten ja

dispersietermien summana.²⁴ Pohjaviivaa voidaan kuvata Fourier-kehitemällä, jota voidaan optimoida iteraatioiden aikana. Sovittamalla pieniä signaaleja suurien signaalien viereen voidaan iteraatioihin ottaa mukaan myös muutama polynomitermi.

TLS-sovitus on hyvin vahvasti epälineaarinen ongelma, ja se vaatii useiden erilaisten osittaisderivaattojen $\partial I_n(v)/\partial P$ laskemista parametrien suhteen.¹¹ Moolifraktiot, juovan leveydet, vastekertoimet ja juovan muoto voidaan jättää huomioimatta rakenneanalyysin alkuvaiheessa, jolloin pyritään päättämään kytkentävakiot ja siirtymien oikea järjestys.

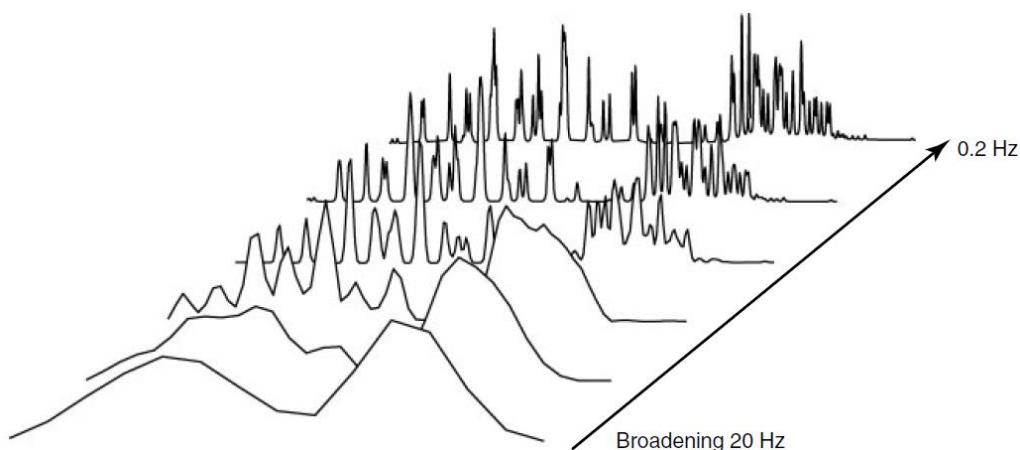
Kuvassa (Kuva 7) on havainnollistettu TLS-menetelmän perusongelmaa ja yhtä ratkaisua siihen.¹¹ Jos havaitun ja lasketun spektrin intensiteetit eivät ole päällekkäin, osittaisderivaattojen $\partial I_n(v)/\partial P$ arvo on nolla eikä iteraatiovaiheessa voida päätellä mihin suuntaan laskettua signaalia tulisi siirtää. Laskettuja spektriviivoja voidaan kuitenkin leventää keinotekoisesti, minkä seurauksena iteraatiot alkavat konvergoitua. SpinAdder-ohjelman iteraattori käyttää iteraatiomuunnoksiin kolmion muotoista Bartlettin ikkunafunktiota.²⁵ Iteraatioiden aikana myös spektriin liittyvä informaatio pakkaantuu, minkä seurauksena laskut nopeutuvat.



Kuva 7. TLS-iteraattorin perusongelma ja sen ratkaisu integraalimuunnosten avulla.¹¹

Kuvasta (Kuva 8) nähdään, kuinka laskettu spektri muuttuu iteraatioiden edetessä.¹¹ Iteraatioiden alussa kytkentävakioihin liittyvät yksityiskohdat hävitetään käyttämällä

suurta juovan levennystä (broadening). Tällöin ainoastaan kemialliset siirtymät ja kytkentävakiot vaikuttavat spektrin ulkonäköön. Kun kemialliset siirtymät ja kytkentävakioiden summat on saatu optimoituja, levitystä pienennetään asteittain, minkä seurauksena suurien kytkentävakioiden säätäminen on mahdollista. Prosessia jatketaan, kunnes levitys on sama kuin juovan leveys. Viimeinen iteraatio tehdään ilman levitystä ja mukaan otetaan juovan leveydet ja muodot. Prosessin oleellisena osana toimii PCA (Principal Component Analysis), joka tunnistaa, mitä parametreja tulee optimoida milläkin levityksellä ja milloin spektri ei ole herkkä jollekin tietylle parametrille.



Kuva 8. Lasketun spektrin muutos iteraatioiden edetessä, kun käytetään suurta juovan levennystä.¹¹

Iteraatioiden konvergoituminen riippuu siitä, miten monimutkainen systeemi on kyseessä.¹¹ ABC-systeemi sisältää kolme kytkentävakiota, joita vastaavat siirtymät ovat samalla kohtaa spektrissä ja jotka voidaan määrittellä niiden multipletti-leveyksien perusteella. ABC-systeemi sisältää siis kuusi ”piirrettä”, joiden perusteella systeemin kuusi parametria voidaan analysoida automaattisesti käyttämällä integraalimuunnoksia. Kun suuri kytkentäväkio jakaa multipletin, se lisää yhden tällaisen piirteen. Käytännössä ABCD-systeemin ja jopa sitä suurempien systeemien automaattinen analyysi onnistuu ilman aikaisempaa tietoa spektriparametreista, jos spektri ei ole vahvasti toista kertalukua. Tällöin oleellinen osa tiedosta välittyy heikkojen signaalien kautta. Kun ydinten ja nollassa poikkeavien kytkentävakioiden määrä kasvaa, analyysin luotettavuus vähenee, jos kokeellisten parametrien arvot eivät ole lähellä oikeita. Tästä syystä pienten kytkentävakioiden poistamisen mahdollistava PCA on tarpeen. Jos

rakenne tiedetään, voidaan käyttää parametriennustusta. Muussa tapauksessa 2-D -informaatio voi olla tarpeellista.

2.6 TLS-iteraattorin toimintaperiaate

Ongelma, jota TLS-iteraattori yrittää ratkaista, on hyvin vahvasti epälineaarinen ja se on mahdollista ratkaista ainoastaan iteratiivisesti. Perusideana on, että spektrin jokaisesta pisteestä muodostetaan spektriparametrien avulla epälineaarinen yhtälö, joka yritetään ratkaista käyttämällä Newton-Gauss -algoritmia,²⁶ joka puolestaan on variaatio Newton-Raphson -menetelmästä.²⁷ Jotta TLS-iteraattorin toimintaperiaate voidaan selittää, seuraavissa kappaleissa käydään lyhyesti läpi Newton-Raphson -menetelmän oleelliset vaiheet.

2.6.1 Newton Raphson -menetelmä

Monimutkaisten yhtälöiden tai yhtälöryhmien ratkaisujen löytäminen voi olla joskus algebrallisesti hyvin vaikeaa. Tällaisissa tapauksissa voidaan käyttää apuna numeerisia menetelmiä, kuten esimerkiksi Newton-Raphson -menetelmää.

Yhtälöllä voi olla useita juuria. Se, minkä juurista Newton-Raphson -menetelmä löytää, riippuu alustavasta x -arvosta. Menetelmä määrittää seuraavasti:²⁷

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x_n)}{f'(x_n)} = x_n - \Delta x_n, \quad (18)$$

missä x_n on jokin tiedetty arvo, $f(x_n)$ on funktion arvo kohdassa x_n ja $f'(x_n)$ on funktion derivaatta kohdassa x_n . Termillä x_{n+1} kuvataan seuraavaa arvoa, joka yhtälöllä yritetään löytää.

Esimerkkinä voidaan käyttää seuraavaa yksinkertaista funktiota:

$$f(x) = x^2 - 1$$

ja sen derivaattaa

$$f'(x) = 2x.$$

Sijoittamalla ne yhtälöön (18) saadaan

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x_n)}{f'(x_n)} = x_n - \frac{x_n^2 - 1}{2x_n}.$$

Yhtälön juuret ($x=1.0$ tai $x=-1.0$) voidaan ratkaista helposti algebran avulla. Taulukossa (Taulukko 2) on listattu neljän ensimmäisen Newton-Raphson -iteraation arvot, kun alkuarvoksi x_n annetaan 10. Taulukosta nähdään, että toinen funktion juurista (1.0) löytyy jo viidennellä iteraatiokierroksella.

Taulukko 2. Newton-Raphson -menetelmä ja iteraatioiden eteneminen kun $f(x)=x^2 - 1$.

n	x_n	$f(x_n)$	$f'(x_n)$	x_{n+1}	Δx
1	10	99	20	5.05	89
2	5.05	24.50	10.1	2.62	19.45
3	2.62	5.88	5.2	1.50	3.26
4	1.50	1.26	3.00	1.08	0.24
5	1.08	0.18	2.17	1.00	0.91

2.6.2 Epälineaaristen yhtälöryhmien ratkaiseminen Newton-Raphson ja Gauss-Newton -menetelmillä

Kun Newton-Raphson -menetelmää käytetään epälineaaristen yhtälöryhmien ratkaisussa, on tarpeellista tarkastella ns. Jakobin matriisia, joka määritellään seuraavasti:²⁷

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial f_1}{\partial x_3} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1} & \frac{\partial f_n}{\partial x_2} & \dots & \frac{\partial f_n}{\partial x_3} \end{bmatrix}, \quad (19)$$

missä matriisin alkioit ovat funktion f eri muuttujien osittaisderivaattoja. Esimerkiksi kahden epälineaarisen funktion

$$f_1(x_1, x_2) = x_1^2 + x_2^2 + 100$$

$$f_2(x_1, x_2) = x_1^2 - 100$$

Jakobin matriisi on

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2x_1 & 2x_2 \\ 2x_1 & 0 \end{bmatrix}.$$

Yhtälö 18 voidaan helposti muuttaa soveltuvaksi epälineaaristen yhtälöryhmien ratkaisuun, kun derivaatta $f'(x)$ korvataan Jakobin matriisilla, jolloin se saa muodon

$$x_{n+1} = x_n - J^{-1} * f(x_n) = x_n - \Delta x_n. \quad (20)$$

Edellytyksenä menetelmän käytölle on kuitenkin se, että Jakobin matriisi on neliömatriisi. Muuttujien määrän täytyy siis olla sama kuin yhtälöiden. Jos yhtälöiden määrä on suurempi kuin muuttujien, Jakobin käänteismatriisi korvataan sen yleistetyllä käänteismatriisilla $(J^T J)^{-1} J$

$$x_{n+1} = x_n - (J^T J)^{-1} J^T * f(x_n) = x_n - \Delta x_n. \quad (21)$$

Jos systeemille ei löydy ratkaisua, yritetään se löytää käyttämällä pienimmän neliösumman menetelmiä. Menetelmää kutsutaan tällöin *Gauss-Newton -algoritmiksi*.²⁶

TLS-iteraattorissa Jakobin matriisin alkiot ovat intensiteettien osittaisderivaattoja spektriparametrien suhteen.¹¹ Jokainen ratkaistava epälineaarinen yhtälö vastaa siis yhtä spektripistettä. Matriisien koko voi kasvaa hyvinkin suureksi; jos spektri sisältää esimerkiksi 512000 spektripistettä, ja muuttujien määrä on n. 1000, matriisin koko on siis 521000x1000. Koska yhtälöiden määrä on tällöin suurempi kuin muuttujien, käytetään Gauss-Newton -algoritmia.²⁶

Alla käydään lyhyesti läpi iteraation eri vaiheita.²⁸

1. Hankitaan mahdollisimman hyvät arvaukset alustaville spektriparametreille P_m parametriennustuksen avulla tai silmämääräisesti spektriä tarkastelemalla.
2. Lasketaan teoreettinen spektri.

3. Lasketaan teoreettisen ja havaitun spektrin RMSE-arvo siirtymien tai intensiteettien perusteella:

$$RMSE(I) = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n [I_t^o - I_t^{obs}]^2}{n}}$$

$$RMSE(E) = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n [E_t^o - E_t^{obs}]^2}{n}}$$

4. Lasketaan intensiteettien osittaisderivaatat spektriparametrien suhteen

$$\frac{\partial I(n)}{\partial P_m}$$

5. Muodostetaan lasketuista derivaatoista yhtälöryhmä

$$\begin{cases} \left(\frac{\partial I(1)}{\partial P_1} \right) dP_1 + \left(\frac{\partial I(1)}{\partial P_2} \right) dP_2 + \dots + \left(\frac{\partial I(1)}{\partial P_m} \right) dP_m = \Delta I(1) \\ \left(\frac{\partial I(2)}{\partial P_1} \right) dP_1 + \left(\frac{\partial I(2)}{\partial P_2} \right) dP_2 + \dots + \left(\frac{\partial I(2)}{\partial P_m} \right) dP_m = \Delta I(2), \\ \dots \dots \dots \\ \left(\frac{\partial I(n)}{\partial P_1} \right) dP_1 + \left(\frac{\partial I(n)}{\partial P_2} \right) dP_2 + \dots + \left(\frac{\partial I(n)}{\partial P_m} \right) dP_m = \Delta I(n) \end{cases}$$

joka voidaan esittää matriisimuodossa

$$\underline{D} \underline{dP} = \underline{\Delta I},$$

missä \underline{D} on $n \times m$ - matriisi.

6. Muutetaan matriisimuoto ensin ”normaaliyhtälömuotoon”

$$\underline{D^T D} \underline{dP} = \underline{D^T \Delta E},$$

missä $\underline{D^T D}$ on $m \times m$ -neliömatriisi.

7. Ratkaistaan normaaliyhtälöt. Pienimmän neliösumman ratkaisu muutoksille on

$$\underline{dP} = (\underline{D^T D})^{-1} \underline{D^T \Delta E} = (\underline{D^T D})^{-1} \underline{D^T \Delta E}$$

8. Sovelletaan \underline{dP} arvaukseen P^o

$$\underline{P} = \underline{P}^o + \underline{dP},$$

9. Toistetaan vaiheita 1-8 kunnes $dP \approx 0$.

2.6.3 Pääkomponenttianalyysi

Pääkomponenttianalyysi (PCA = Principal Component Analysis) on tilastollinen menetelmä, jota käytetään esimerkiksi kasvojen tunnistamisessa tai datan pakkaamisessa, ja sen on yleinen tekniikka kun yritetään löytää korrelaatioita tai järjestystä moniulotteisesta datasta.^{29, 30} TLS-iteraattori käyttää menetelmää tunnistamaan, mitä parametreja tulee optimoida milläkin levityksellä ja tunnistaa ne tapaukset, joissa spektri ei ole herkkä jollekin tietylle parametrille.¹¹ Seuraavissa kappaleissa käydään läpi muutamia tilastotieteellisiä muuttujia, joita pääkomponenttianalyysin yhteydessä tarvitaan.

Keskihajonta. Keskihajonta on hajontaluku, joka kertoo, kuinka havaintoarvot ovat keskittyneet keskiarvonsa ympärille.²⁹ Mitä lähemmäksi keskiarvoa ja toisiaan havaintoarvot ovat ryhmittyneet, sitä pienempi on keskihajonta. Hajallaan sijaitsevien eli keskenään erisuurien lukujen keskihajonta on iso. Keskihajonnan laskukaava havaintoarvoille $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ on

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (22)$$

jossa \bar{x} on keskiarvo ja n on havaintoarvojen lukumäärä.

Varianssi. Varianssi on keskihajonnan tapaan hajontaluku, ja se saadaan korottamalla keskihajonta toiseen potenssiin:²⁹

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}, \quad (23)$$

Keskihajonta ja varianssi mittaavat molemmat sitä, kuinka hajanainen ja laajalle levinnyt havaintoarvojen joukko on. Keskihajonta on näistä kahdesta yleisimmin käytetty, mutta myös varianssia käytetään. Varianssin avulla saadaan luotua vakaa pohja seuraavassa kappaleessa käytävälle käsitteelle *kovarianssi*.

Kovarianssi. Varianssi ja keskihajonta ovat molemmat puhtaasti yksiulotteisia suureita. Kuitenkin useissa havaintojoukoissa on useampi ulottuvuus. Tilastotieteellisen analyysin tarkoituksena on tällöin selvittää, onko näiden ulottuvuuksien välillä korrelaatioita. Kovarianssi on tällainen suure. Kovarianssi mitataan aina kahden ulottuvuuden välillä.²⁹ Laskukaava kovarianssille on hyvin samankaltainen kuin varianssille. Kovarianssin laskukaava on

$$\text{cov}(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1}. \quad (24)$$

On myös helppoa huomata, että kovarianssi kahden saman havaintojoukon välillä on sama kuin varianssi;

$$\text{cov}(x, x) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})}{n - 1} = \text{var}(x).$$

Korrelaatio. Korrelaatio mittaa kovarianssin tapaan kahden ulottuvuuden välistä riippuvuutta.²⁹ *Korrelaatiokerroin* mittaa havaintojen välistä riippuvuutta. Tarkkaan ottaen se on numeerinen mitta satunnaismuuttujien väliselle lineaariselle riippuvuudelle. Riippumattomien muuttujien välillä ei ole korrelaatiota.

Korrelaatiokerroin saadaan standardoimalla muuttujien kovarianssi välille [-1,1]. Standardointi tehdään jakamalla kovarianssi muuttujien keskihajontojen tulolla:

$$\text{cor}(x, y) = \frac{\text{cov}(x, y)}{\sqrt{s_x s_y}}. \quad (25)$$

Kovarianssimatriisi ja korrelaatiomatriisi. Kuten edellä todettiin, korrelaatio mittaa kahden ulottuvuuden välistä korrelaatiota.²⁹ Jos mitattavien ulottuvuuksien määrä on suurempi kuin kaksi, voidaan korrelaatio laskea useammalle muuttujalle. Jos

esimerkiksi laskettava havaintojoukko on 3-ulotteinen (ulottuvuudet x , y , z) voidaan laskea kovarianssit $cov(x,y)$, $cov(x,z)$ ja $cov(y,z)$.

Kun kovarianssit laitetaan matriisiin, saadaan ns. kovarianssimatriisi, joka voidaan kirjoittaa esimerkiksi 3-ulotteiselle havaintojoukolle seuraavasti:²⁹

$$\begin{bmatrix} var(x) & cov(x,y) & cov(x,z) \\ cov(y,x) & var(y) & cov(y,z) \\ cov(z,x) & cov(z,y) & var(z) \end{bmatrix}.$$

Saadaan neliömatriisi, jonka jokainen alkio on korrelaatio kahden eri muuttujan välillä. Lävistäjän alkiot $cov(x,x)$, $cov(y,y)$ ja $cov(z,z)$ ovat variansseja, koska ne ovat havaintojoukkojen x , y ja z kovariansseja itsensä kanssa. Tästä syystä matriisia kutsutaan usein varianssi-kovarianssi -matriisiksi.

Kun kovarianssimatriisin alkiot korvataan korrelaatiolla, saadaan korrelatiomatriisi²⁹

$$\begin{bmatrix} 1 & cor(x,y) & cor(x,z) \\ cor(y,x) & 1 & cor(y,z) \\ cor(z,x) & cor(z,y) & 1 \end{bmatrix}.$$

Lävistäjän alkiot $cor(x,x)$, $cor(y,y)$ ja $cor(z,z)$ saavat arvon yksi, koska ne ovat havaintojoukkojen x , y ja z korrelaatioita itsensä kanssa.

Pääkomponenttiregressiossa käytetään joko kovarianssi- tai korrelatiomatriisia. Se, kumpaa käytetään, riippuu muuttujien mitta-asteikoista.³¹ Kun muuttujien arvot ovat samankaltaisia, käytetään aina kovarianssimatriisia, koska korrelatiomatriisi menettää informaatiota kun se standardisoidaan. Korrelatiomatriisin käyttö on suositeltavaa silloin, kun muuttujien asteikot ovat erilaisia.

2.6.4 Pääkomponenttianalyysin vaiheet

Seuraavissa kappaleissa käydään läpi pääkomponenttianalyysin oleelliset vaiheet. Esimerkkinä analyysissä käytetään kaksiulotteista havaintojoukkoa x ja y , jonka muuttujien arvot on listattu taulukossa (

Taulukko 3). Jotta PCA toimisi kunnolla, pitää jokaisesta x :n ja y :n arvosta vähentää niiden keskiarvo. Kun TLS-iteraattori tekee pääkomponenttianalyysiä, havaintojoukkojen tilalla ovat spektripistettä kuvaavien spektriparametrin arvot.

Taulukko 3. Esimerkkidatan arvot ja niiden normalisoidut arvot, jotka on laskettu vähentämällä alkuperäisistä arvoista niiden keskiarvon neliöjuuri.

x	$x - \bar{x}$	y	$y - \bar{y}$
2.5	0.69	2.4	0.49
0.5	-1.31	0.7	-1.21
2.2	0.39	2.9	0.99
1.9	0.09	2.2	0.29
3.1	1.29	3.0	1.09
2.3	0.49	2.7	0.79
2	0.19	1.6	-0.31
1	-0.81	1.1	-0.81
1.5	-0.31	1.6	-0.31
1.1	-0.71	0.9	-1.08

Pääkomponenttianalyysi aloitetaan laskemalla muuttujien kovarianssi- tai korrelaatiomatriisi. Käytetään esimerkissä kovarianssimatriisia, joka on seuraava:

$$\begin{bmatrix} 0.6166 & 0.6144 \\ 0.6154 & 0.71655 \end{bmatrix}$$

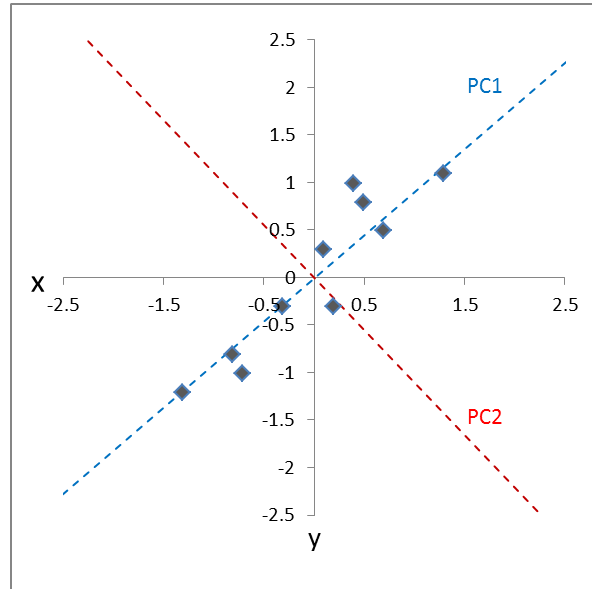
Koska kovarianssimatriisi on neliömatriisi, voidaan sille laskea ominaisarvot ja ominaisarvovektorit käyttämällä ominaisarvoyhtälöä (9) ja sekulaarista yhtälöä (8). Ominaisarvoiksi saadaan

$$\lambda_1 = 1.284 \text{ ja } \lambda_2 = 0.0491,$$

ja niitä vastaavat ominaisarvovektorit ovat seuraavat:

$$PC1 = \begin{pmatrix} 0.6779 \\ -0.7352 \end{pmatrix}, \quad PC2 = \begin{pmatrix} 0.6779 \\ -0.7352 \end{pmatrix}$$

Kun mittausdatasta ja ominaisarvovektoreista piirretään käyrä (Kuva 9), huomataan, että toinen ominaisarvovektoreista menee datapisteiden läpi aivan kuin se olisi niiden paras sovitus (regressiosuora).



Kuva 9. Normalisoidun mittausdatan pistekuvaaja ja ominaisarvovektorit PC1 ja PC2.

Ominaisarvoja ja ominaisarvovektoreita tarkastellessa huomataan, että suoralla, joka kuvaa datapisteitä parhaiten, on suurin ominaisarvo ja se on myös datajoukon *ensimmäinen pääkomponentti*. Toinen ominaisarvoista on datajoukon *toinen pääkomponentti*. Ominaisarvovektoreita merkitään usein lyhenteellä PCN, jossa N on pääkomponenttia vastaava järjestysnumero. Ensimmäistä pääkomponenttia vastaavaa ominaisarvovektoria merkataan esimerkiksi PC1, toista PC2, kolmatta PC3, jne.

Kun ominaisarvot laitetaan suuruusjärjestykseen, saadaan siis muuttujat, jotka kuvaavat parhaimmin mittausjoukkoa. Tässä vaiheessa voidaan päättää, mitkä ominaisarvovektoreista hylätään. Kun hylätään ominaisarvovektorit, joiden ominaisarvot ovat riittävän pieniä, ei menetetä paljon muuttujien sisältämästä informaatiosta. Voidaan olettaa, että jos n-ulotteisesta datajoukosta valitaan k kappaletta pääkomponentteja, ne selittävät kokonaisvarianssista vähintään osan k/n . Mittausdatan määrä ja ulottuvuudet pienenevät myös tätä kautta. Jos esimerkiksi n-ulotteisesta mittausdatasta valitaan k kappaletta pääkomponentteja, on lopullinen mittausdata k-ulotteinen.

Seuraavassa vaiheessa muodostetaan matriisi ominaisarvovektoreiden perusteella. Matriisia kutsutaan *piirrevektoriksi*³⁰ ja se voidaan kirjoittaa esimerkkitalalle kahdella tavalla. Ensimmäiseen valitaan molemmat ominaisarvovektorit, jolloin se on

$$PV_1 = \begin{bmatrix} -0.6779 & -7.352 \\ -0.7352 & 0.6779 \end{bmatrix}$$

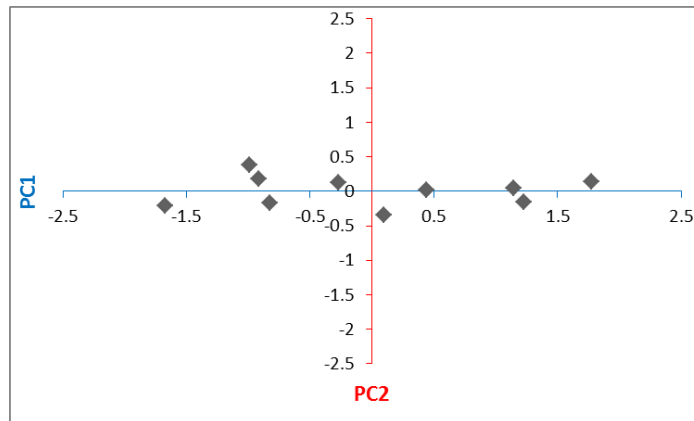
Toisesta piirrevektorista jätetään pois vähemmän merkityksellinen ominaisvektori PC2, jolloin saadaan

$$PV_2 = \begin{bmatrix} -0.6779 \\ -0.7352 \end{bmatrix}$$

Analyysin seuraavassa vaiheessa muuttujien koordinaatit muutetaan valittujen ominaisarvovektoreiden suuntaisiksi. Tämä saadaan aikaan kertomalla normalisoidusta datasetistä muodostettu matriisi A valitulla piirrevektorilla PV_i . Jos käytetään esimerkiksi piirrevektoria PV_1 , muutoslasku tapahtuu seuraavasti:

$$F = PV_1 A = \begin{bmatrix} -0.6779 & -7.352 \\ -0.7352 & 0.6779 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.69 & 0.49 \\ -1.31 & -1.21 \\ 0.39 & 0.99 \\ 0.09 & 0.29 \\ 1.29 & 1.09 \\ 0.49 & 0.79 \\ 0.19 & -0.31 \\ -0.81 & -0.81 \\ -0.31 & -0.31 \\ -0.71 & -1.08 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0.827970186 & -0.175115307 \\ 1.77758033 & 0.142857227 \\ -0.992197494 & 0.384374989 \\ 0.274210416 & 0.130417207 \\ -1.67580142 & -0.209498461 \\ -0.912949103 & 0.175282444 \\ 0.0991094375 & -0.349824698 \\ 1.14457216 & 0.0464172582 \\ 0.438046137 & 0.0177646297 \\ 1.22382056 & -0.162675287 \end{bmatrix}$$

jossa matriisin F vasen sarake vastaa muuttujien x projektiota ensimmäisen pääkomponentin PC1 (sama kuin PV_2) suhteen ja oikea sarake muuttujien y projektioita toisen pääkomponentin PC2 suhteen. Tämä voidaan havainnollistaa, kun lopullisesta datasta piirretään kuvaaja pääkomponenttien PC1 ja PC2 suhteen (Kuva 10).



Kuva 10. Mittausdatan A projektiio pääkomponenttien PC1 ja PC2 suhteen.

Kun projektioiden varianssit lasketaan yhteen ja niitä verrataan, huomataan, että ensimmäisen pääkomponentin PC1 avulla voidaan selittää n. 96 % mittausdatan kokonaisvariانسista (Taulukko 4).

Taulukko 4. Pääkomponenttien PC1 ja PC2 projektioiden varianssien summat, ja niiden osuudet kokonaisvariانسista.

	Varianssien summa	Osuus (%)
Projektiio PC1:n suhteen	1.2807	96.3089
Projektiio PC2:n suhteen	0.04908	0.03691

Johtopäätöksiä. Käyttämällä pääkomponenttianalyysiä voidaan löytää komponentit, jotka kuvaavat alkuperäistä muuttujajoukkoa parhaiten. Tämän seurauksena myös muuttujajoukkoa kuvaavien arvojen määrä vähenee alkuperäisestä.

3 NMR JA METABOLOMIIKKA

Metabolomiikka on tieteenala, jossa tutkitaan metaboliittien eli aineenvaihduntatuotteiden osallistumista erilaisiin kemiallisiin prosesseihin. Metaboliiteista saatua tietoa voidaan käyttää hyödyksi useissa erilaisissa biokemiallisissa tutkimuksissa, kuten toksikologiassa,³² ruoka-aineiden tutkimuksessa,³³ geneettisen muuntelun vaikutuksen tutkimuksessa,³⁴ diabeteksen³⁵ ja syövän³⁶ tutkimuksessa sekä neurologisten tautien diagnostiikassa.³⁷ Metaboliittien tunnistaminen ja kvantifiointi on oleellinen osa näitä tutkimuksia, ja ne nojaavat vahvasti elektronisten spektrikirjastojen käyttöön.³⁸

NMR-spektroskopia ja massaspektrometria (MS) ovat yleisimmin käytettyjä analyttisiä tekniikoita metabolomiikassa.³⁹ Kaasu- tai nestekromatografiaa käytetään usein yhdisteiden erotteluun ennen MS-mittausta. Massaspektrometrinen analyysi vaatii usein myös näytteen esikäsittelyn, jossa näytteen epäpuhtaudet poistetaan. Yksi massaspektrometrian suurimpia etuja on sen herkkyys. Kun mitattavien metaboliittien konsentraatiot ovat riittävän korkeita NMR-mittaukselle, on sen käytöllä kuitenkin etuja massaspektrometriaan nähden; NMR-mittaus ei vaadi näytteen kallista erottelua tai esikäsittelyä, se on ei-destruktiivinen ja helposti toistettava.

Viime vuosien saavutukset NMR-spektroskopiassa ja massaspektrometriassa ovat saaneet aikaan sen, että uusia ohjelmia ja kasvavassa määrin yhä monimutkaisempia ja hienostuneempia metaboliittitietokantoja julkaistaan koko ajan.³⁸ Vapaasti käytettävät ja kaupalliset tietokannat sisältävät kokeellisia 1D ¹H- ja ¹³C-spektrejä ja 2D ¹H-¹H ja ¹³C-¹H spektrejä, spektriparametreja ja teoreettisia spektrejä tuhansista erilaisista yhdisteistä (Taulukko 5). Tietokannat tarjoavat mahdollisuuden testata erilaisia NMR-spektroskopiaan pohjautuvia tietokoneistettuja kvantitatiivista ja kemometrisia menetelmiä.

Taulukko 5. Erilaisia metaboliittitietokantoja, joita voidaan käyttää lähtökohtana NMR-spektroskopiaan perustuvassa metaboliittianalyysissä.³⁸

Tietokannan nimi	Spektrityypit
Biological Magnetic Resonance Bank	¹ H, ¹³ C, DEPT-90, DEPT-135, ¹ H J-resolved, ¹ H- ¹³ C HSQC, ¹ H- ¹³ C HMBC, ¹ H- ¹ H TOCSY, ¹ H- ¹ H COSY
Human Metabolome Database (HMDB)	¹ H, ¹ H- ¹³ C HSQC
Madison-Qindao Metabolomics Consortium Database (MQMCD)	¹ H, ¹³ C, DEPT-90, DEPT-135, ¹ H- ¹³ C HSQC, ¹ H- ¹³ C HMBC, ¹ H- ¹ H TOCSY, ¹ H- ¹ H COSY
Birmingham Metabolite Library (BML-NMR)	¹ H, ¹ H J-resolved
Platform for RIKEN Metabolomics via SpinAssign (PRIME)	¹ H, ¹³ C, ¹ H- ¹³ C HSQC
TOCSY Customized Carbon Trace Archive (TOCCATA)	¹³ C- ¹³ C TOCSY
Magnetic Resonance Metabolomics Database (MRMD)	¹ H, HMQC, HMQC-TOCSY, DQF-COSY, TOCSY
NMRShiftDB	¹ H, ¹³ C

On olemassa kaksi olennaisesti erilaista lähestymistapaa, joiden avulla metaboliittidata voidaan analysoida: kemometrinen ja kvantitatiivinen.³⁸ Kemometrisessa lähestymistavassa kytkentäpatterit ja intensiteetit analysoidaan ja niitä vertaillaan tilastollisesti, jotta tunnistettaisiin eri metaboliittien oleellisia spektriipiirteitä. Kvantitatiivisessa lähestymistavassa metaboliitit tunnistetaan ja kvantifioidaan vertaamalla dekonvoluution tai juovan sovituksen avulla kokeellista spektriä spektrikirjaston sisältämien yksittäisten komponenttien spektreihin.

Metabolomiikan automatisaatio on osa-alue, jossa on vielä paljon kehittämisen varaa. Metabolomiikka on vielä tällä hetkellä matalan suoritusnopeuden tiede, verrattaessa

vaikkapa genomiikkaan, proteomiikkaan tai transkriptomiikkaan.⁴⁰ Genetiikassa on esimerkiksi mahdollista automatisoidusti karakterisoida tuhansia geenejä, satoja tuhansia transkriptoreita ja miljoonia SNP:tä vain muutamassa minuutissa, kun taas metabolomiikassa muutaman kymmenen metaboliitin tunnistaminen ja kvantifiointi saattaa kestää useita tunteja ja vaatii paljon manuaalista työtä.

4 KVANTITATIIVINEN NMR-SPEKTROSKOPIA

Kvantitatiivisen NMR-spektroskopian (qNMR) tarkoituksena on määrittää yhden tai useamman yhdisteen konsentraatiot liuoksesta. Kvantitatiivinen NMR-spektroskopia perustuu siihen, että NMR-signaalin pinta-ala on suoraan verrannollinen sitä vastaavien ydinten määrään ja tämä ”vaste” on sama kaikille yhdisteille. Lisäksi kaikki yhdisteen protonit ovat yhtä herkkiä, joten yhdistekohtainen kalibrointi tai kertoimien määrittäminen ei ole tarpeellista, kun tarkastellaan saatuja kvantitatiivisia tuloksia. Tämä myös erottaa qNMR-spektroskopian muista kvantitatiivisista tekniikoista, joiden ongelmia ovat usein yhdisteiden erilaiset vastekertoimet. Ei ole olemassa universaalia kromatografista detektoria.

NMR-spektroskopiaa pidetään kasvavassa määrin yhtenä tärkeimmistä kvantitatiivisista työkaluista, vaikka sitä käytetään edelleen useimmin yhdisteen rakenneanalyysiin. Kvantitatiivista NMR-spektroskopiaa on käytetty useisiin erilaisiin tarkoituksiin. Tällaisia ovat esimerkiksi aktiivisten lääkeaineiden puhtauden määrittäminen,^{41, 42} lääkeainetietokantojen kvantifiointi,⁴³ luonnonaineiden määrittäminen,⁴⁴ rikostekninen analyysi⁴⁵ ja elintarviketiede.⁴⁶

4.1 Kvantitatiivisen NMR-spektroskopian kokeelliset muuttujat ja niiden vaikutus mittaustulosten tarkkuuteen

Kvantitatiivisen NMR-kokeen tarkkuuteen vaikuttavat useat erilaiset kokeelliset muuttujat kuten mittaussviive, pulssisarja ja toisto-aika. Tästä syystä niiden huolellinen optimointi on tarpeen ennen kvantitatiivisten mittausten suorittamista.

4.1.1 Mittausdatan kerääminen

Pulssisarja. Pienten molekyylien kvantifioinnissa käytetään usein yhden pulssin NMR-koetta, joka muodostuu relaksaatioviiveestä, 90° radiotaajuuspulssista ja signaalien keräämisestä.⁴⁷ Jos mitattavan analyyttiliuoksen konsentraatio on hyvin pieni ja spektri sisältää voimakkaan liuotinsignaalin, voi syntyä dynaamisen alueen ongelma, joka vaikuttaa kvantitatiivisten tulosten tarkkuuteen. Tällaisissa tapauksissa voidaan käyttää liuottimenvaimentamismenetelmiä, joiden avulla saadaan parempi S/N-suhde.

Käytetyimpiä tällaisia menetelmiä ovat taajuuden esikyllästysmenetelmät WET-CPMG ja NOESY.⁴⁸

Pulssikulmana voidaan käyttää 90° tai pienempää. Pulssin virityspeveyden tulisi olla sama koko spektrin leveydeltä. Matalataajuussuodattimen tyyppi (tiiliseinän tai soikion muotoinen) vaikuttaa pulssin tehokkuuteen ja siihen, miten paljon se aiheuttaa virhettä intensiteetteihin.⁴⁹ Tehokkuus vaihtelee myös eri näytteiden välillä riippuen näytteiden fysikokemiallisista ominaisuuksista. Tästä syystä pulssin pituus tulisi säätää sopivaksi näytekohtaisesti. Kaikkein vahvin intensiteetti saadaan aikaan yleensä 90° pulssilla. Käyttämällä pienempää pulssikulmaa voidaan lyhentää magnetisaation palautumiseen kuluva aikaa ja tätä kautta myös koko kokeen kesto. Hyvän S/N-suhteen aikaansaamiseksi lyhyellä toistoajalla voidaan käyttää hyödyksi Ernstin pulssikulmaa, joka lasketaan seuraavasti:⁴⁸

$$\cos \alpha = e^{\left(-\frac{T_A}{T_1}\right)} \quad (26)$$

jossa α , T_1 ja T_A kuvaavat optimaalista pulssikulmaa, relaksaatioaikaa ja toistoaikaa.

Toisto aika. NMR-kokeen toisto aika T_A on aika, joka kuluu yhteen pyyhkäisyyn. Tarkemmin määriteltynä se sisältää siis relaksaatioviiveen ja mittausajan. Toisto aika riippuu pisimmästä relaksaatioajasta, jonka näyte sisältää. Toistoajan pituuden tulisi olla ainakin viisinkertainen relaksaatioajan T_1 suhteen, jotta magnetisaatio olisi palautunut riittävästi.^{48, 50} Magnetisaatio on palautunut tällöin n. 99 %

Laajan taajuusalueen irtikykentä. NOE (Nuclear Overhauser Effect) voi saada aikaan vääristymiä heterodydin-NMR-kokeissa, joissa käytetään komposiittipulsseja laajan taajuusalueen ^1H -irtikykentään.⁴⁷ Vääristymiä voidaan vähentää käyttämällä 90° pulssikulmaa, irtikykentää keräyksen aikana ja vähintään 5-7 -kertaista toisto aikaa relaksaatioviiveen suhteen.⁴⁸ Seoksien spektreissä osa spektriipiikeistä voi olla niin heikkoja, että ne ovat samaa luokkaa ^{13}C -satelliittisignaalien kanssa. Metaboliittiseoksissa olevien suuresti konsentroituneiden metaboliittien ^{13}C -satelliittien intensiteetit voivat olla yhtä suuria kuin heikon konsentraation metaboliittien spektriipiikit. Tällaisissa tilanteissa ^{13}C -satelliittien poistamiseen tulisi käyttää laajan taajuusalueen irtikykentää.⁵¹

Keräysaika. Mittauksissa tulisi käyttää riittävää keräysaikaa. Liian lyhyt keräysaika voi saada aikaan FID-signaalin lyhenemisen, minkä seurauksena voi syntyä vääristymiä spektrin intensiteeteissä.⁴⁷

S/N-suhde. Jotta kvantitatiiviset tulokset olisivat riittävän tarkkoja ja virheettömiä, tulisi S/N-suhteen olla vähintään 250:1 ¹H-ytimille, 300:1 ¹⁹F-ytimille ja 600:1 ³¹P-ytimille.⁵² Resonanssiipiikin S/N-suhde on riippuvainen siihen liittyvien protonien määrään. Jos näytteen konsentraatio on hyvin matala, voidaan S/N-suhdetta parantaa lisäämällä pyyhkäisyjen määrää. Suhdetta voidaan myös pyrkiä parantamaan lisäämällä toistoaikaa.

Vahvistimen voimakkuus. Vastaanottimen vahvistimen voimakkuuden (RG = Receiver Gain) optimointi on tärkeää. Liian suuri voimakkuus saa aikaan pohjaviivan signaalin vääristymisen ja liian matala voimakkuus puolestaan signaalin häviämisen tai erittäin huonon S/N-suhteen.⁴⁷ Modernit NMR-laitteet sisältävät perusasetuksena automaattisen vastaanottimen voimakkuuden säädön. Automaattisessa voimakkuuden säädössä voimakkuus on aluksi voimakkaimmillaan. Jos valitulla pulssikulmalla lähetetty pulssi saa aikaan vastaanottimessa ylivuodon, voimakkuutta lasketaan 10 %, minkä jälkeen pulssi lähetetään uudelleen. Näin jatketaan kunnes ylivuotoa ei enää tapahdu.

Shimmaus. NMR-laitteen magneettikentän epähomogeenisuus saa aikaan vääristymiä signaalien intensiteeteissä ja juovanmuodoissa, minkä seurauksena spektrin resoluutio huononee ja S/N-suhde laskee. Magneettikentän homogeenisuutta voidaan säätää eli ”shimmata” usealla eri tavalla.

4.1.2 Mittausdatan käsittely

Ikkunointi. Ennen kuin saadulle datalle tehdään Fourier-muunnos (FT), voidaan se kertoa funktiolla, jonka avulla saadaan parannettua joko spektrin resoluutiota tai S/N-suhdetta.⁴⁷ Tekniikkaa kutsutaan ikkunoinniksi. 1-D -spektrin S/N-suhdetta parannetaan tyypillisesti kertomalla FID:ä eksponentiaalisella ikkunafunktiolla. Eksponenttifunktion heikentymisnopeus määrittelee signaalien juovan levityksen. Heikentymisnopeutta säädetään juovan levitys (lb = line broadening) -parametrin kautta. Lb:n arvoväliksi suositellaan väliä 0,3-1,0 Hz.

Nollatäyttö. Ikkunoinnin jälkeen seuraava datan käsittelyvaihe on FID:n datapisteiden kaksinkertaistaminen nollatäytön (zero filling) avulla.⁴⁷ Jos FID sisältää 32 000 datapistettä ennen nollatäyttöä, sisältää se nollatäytön ja Fourier-muunnoksen jälkeen 64 000 datapistettä. Tätä kautta saadaan siis havaittua spektriä kuvaavien pisteiden (taajuus, intensiteetti) määrä kaksinkertaistumaan. Ainoa kokeellinen vaatimus nollatäytölle on se, että FID:n täytyy heikentyä lähellä nollakohtaa keräysajan lopussa.

Vaiheenkorjaus. Vaiheenkorjaus on tärkeää spektriviivojen intensiteettien kannalta. Vaihevirheet voivat aiheuttaa suuriakin heittoja signaalien intensiteeteissä ja tätä kautta vaikuttaa qNMR-analyysin suhteellisiin ja absoluuttisiin konsentraatioihin.⁴⁷ Manuaalinen vaiheenkorjaus on automaattista vaiheenkorjausta suositeltavampaa metabolisissa mittauksissa, koska automaattinen vaiheenkorjaus vääristää heikkoja signaaleja. Vaiheenkorjausta tehtäessä tulisi käyttää riittävää vertikaalista levitystä.

Pohjaviivan korjaus. Spektrin pohjaviivan korjauksella on vaiheenkorjauksen tavoin suuri vaikutus signaalien integraalien arvoihin ja tätä kautta kvantitatiivisiin tuloksiin. Huono pohjaviiva voi vaihevirheiden tavoin saada aikaan suuria virheitä signaalien integraaleissa. Automaattinen pohjaviivan korjaus on manuaalista suositeltavampaa. NMR-ohjelmat sisältävät usein erilaisia algoritmeja, joiden avulla automaattinen pohjaviivan korjaus voidaan suorittaa. Tällainen on esimerkiksi TopSpin-ohjelman absn-algoritmi.

Integrointi. Integroiminen on yksi tärkeimmistä vaiheista qNMR-analyysissä. Integraaliväli-, bias- ja slope -asetukset vaikuttavat suuresti integraalin kvantitatiiviseen tarkkuuteen. Suurin virheen aiheuttaja integrointia tehtäessä on todennäköisimmin liian kapea integraaliväli. Jotta integraali sisältäisi 100 % piikin pinta-alasta, täytyisi sen integraalivälien levittäytyä molemmista suunnista äärettömyyteen. Jotta integraali sisältäisi 99 % piikin pinta-alasta, täytyisi integraalivälin olla n. 20 kertaa piikin leveyden verran molempiin suuntiin. Bias- ja slope -parametrit ovat integraalin pohjaviivan 0. ja 1. kertaluvun kertoimia. Niiden avulla integraalia voidaan korjata lineaarisesti. Slope- ja bias -asetusten säätäminen ei ole tarpeellista, jos pohjaviivan- ja vaiheenkorjaukset on tehty riittävän hyvin.

Dekonvoluutio. Signaalien pinta-alan tarkka määrittäminen ei ole mahdollista integroinnin tai bucketing-metodien avulla, jos resonanssiipiikit menevät päällekkäin.

Tällöin pinta-alojen määrittämiseen voidaan käyttää juovan sovitusta, jota kutsutaan yleisemmin dekonvoluutioksi. Dekonvoluutiossa käytetään pienimmän neliösumman menetelmiä piikin sovittamiseen. Juovan sovitusta -analyysiin tarvittavia alustavia muuttujia ovat taajuus, leveys, korkeus ja juovan muoto, ja ne voidaan hankkia käyttämällä aikaisempia tietoja, spektriparametrikirjastoja, parametriennustetta tai piikin poimimista (peak picking).

4.2 Referenssi- ja kalibrointistandardit

Kvantitatiivinen analyysi vaatii kalibrointi- ja referenssistandardit, joita käytetään kemiallisten siirtymien kalibrointiin ja kvantitatiivisen arvon määrittämiseen. Standardit voivat olla joko sisäisiä tai ulkoisia. Sisäinen standardiyhdiste lisätään suoraan analyyttiliuokseen ja ulkoinen vertailuyhdiste laitetaan erilliseen kapillaariputkeen. Ihannetapauksessa tällainen yhdiste olisi kemiallisesti puhdas, inertti, helposti saatavilla, stabiili, ei-hygroskooppinen, halpa ja liukoinen yleisimpiin NMR-liuottimiin.⁴⁷ Yhdisteen signaalien tulisi olla mahdollisimman yksinkertaisia ja erillään analyytin signaaleista, mikä tekee sopivan standardiyhdisteen valinnan joskus hyvin vaikeaksi tai jopa mahdottomaksi.

Yleisimpiä sisäisiä standardeja ovat veteen liukenematon tetrametyylisilaani (TMS) ja sen vesiliukoiset johdokset 3-(trimetyylisilyyli)propionihappo (TSP) ja 4,4-dimetyyli-4-silapentaanisulfonihappo (DSS).⁴⁷ Muita yleisesti käytettyjä yhdisteitä kvantitatiivisessa NMR-spektroskopiassa ovat 1,4-dioksaani, maleiinihappo, *p*-tolueenisulfonihappo, 1,3,5-trioksaani, natriummaleaatti ja metaanihappo.⁵¹ TMS ja dioksaani eivät sovellu kalibrointistandardeiksi johtuen niiden herkästä haihtuvuudesta. Tästä johtuen on vaikeaa valmistaa standardiliuosta, jonka tarkka konsentraatio tiedetään.

Liukoisuus ja kemiallinen reaktiivisuus analyytin suhteen ovat tärkeitä ominaisuuksia valittaessa sisäistä standardia.⁴⁷ Tämä on erityisen tärkeää biologisissa näytteissä (esim. seerumi, plasma), jotka sisältävät proteiineja, rasvahappoja ja lipoproteiineja. Esimerkiksi DSS:n ja TSP:n tiedetään sitoutuvan proteiineihin ja rasvahappoihin, mikä puolestaan vaikuttaa kvantitatiiviseen tarkkuuteen. Tällaisten näytteiden referenssistandardina voidaan käyttää esimerkiksi DSS:n ja TSP:n johdannaisista 4,4-dimetyyli-4-silylipentaani-1-ammoniumtrifluoriasetaattia (DSA), joka ei reagoi peptidien, proteiinien tai rasvahappojen kanssa.

Ulkoiset standardit. Ulkoista standardia käytetään yleensä biologisissa tutkimuksissa ja silloin, kun on tarpeellista välttää analyytin kontaminaatiota. Koaksiaaliseen kapillaariputkeen laitettava standardiliuos valmistetaan liuottamalla ulkoinen standardi sopivaan määrään deuteroitua liuotinta, minkä jälkeen siitä mitataan kvantitatiivinen NMR.

Koaksiaalinen kapillaariputki sijoitetaan NMR-putken sisään, minkä jälkeen analyytti- ja standardiliuosten korkeuksien tulisi olla samat. Liuoksista mitataan NMR-spektri, minkä jälkeen analyytti voidaan lopulta kvantifioida käänteisesti laskemalla.

Elektroniset kalibrointimenetelmät. Akokan ryhmä julkaisi vuonna 1999 menetelmän nimeltään ERETIC (Electronic Reference To access In vivo Concentrations). Menetelmän avulla luodaan elektronisesti tuotettu signaali, jota voidaan käyttää kalibrointisignaalina kvantitatiivisessa NMR-spektroskopiassa. Elektronisen signaalin avulla luodaan pseudo-FID, jolla on kaikki NMR-signaalille ominaiset parametrit (frekvenssi, suuruus, vaihe) ja jota voidaan kontrolloida työasemalta käsin.

5 YHTEENVETO

Korkean resoluution NMR eroaa muista molekyyli-spektroskopiaista siinä, että jopa kaikkein monimutkaisimmatkin spektrit, jotka muodostuvat tuhansista yksittäisistä spektriviivoista, voidaan esittää vain muutaman parametrin avulla käyttämällä kvanttimekaanista teoriaa. Tietokoneistetun NMR-spektrianalyysin tarkoituksena on määrittää nämä parametrit havaitun spektrin avulla.

Tietokoneistetun spektrianalyysin peruseräite on aina sama. Ensimmäisessä vaiheessa hankitaan kokeelliset spektriparametrit joko manuaalisesti analysoimalla tai jos rakenteesta on riittävästi tietoa, rakenne-ennusteen avulla. Kokeellisia parametreja käytetään kokeellisen spektrin simulaatioon, minkä jälkeen niitä säädetään iteraatiovaiheessa, jossa pyritään minimoimaan havaitun ja lasketun spektrin muuttujien keskineliövirheen neliöjuuri. Matemaattisesti kyseessä on epälineaarinen käänteisarvo-ongelma, joka voidaan ratkaista ainoastaan iteratiivisesti käyttämällä apuna kvanttimekaanista teoriaa.

Ytimen spinsysteemin Schrödingerin yhtälö voidaan kirjoittaa matriisimuodossa käyttämällä Hamiltonin matriiseja. Matriisien diagonalisaatiolla saadaan määritettyä ominaisarvot ja ominaisarvovektorit, joita käytetään siirtymien taajuuksien, intensiteettien ja iteraatioiden osittaisderivaattojen laskemiseen. Spinsysteemien koon kasvaessa kasvaa myös matriisien koko, siirtymien määrä ja laskentaan vaadittavien resurssien määrä. Matriiseja voidaan kuitenkin yksinkertaistaa käyttämällä X-approksimaatiota, symmetriaa tai jakamalla spinsysteemi pienempiin alisysteemeihin.

Kvanttimekaanisessa kvantitatiivisessa NMR-spektroskopiassa yhdisteitä tunnistetaan ja kvantifioidaan vertaamalla kokeellista spektriä spektrikirjaston sisältämien yksittäisten komponenttien spektreihin. Yksi tämän hetken tärkeimmistä käyttökohteista on metabolomiikka, jossa qNMR-spektroskopiaa käytetään monimutkaisten metaboliittiseosten analyysissä.

KOKEELLINEN OSA

6 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tutkimuksen kokeellisen osan tarkoituksena oli suunnitella ja kehittää käyttöliittymä NMR-ohjelmaan (ChemAdder), joka toimisi yhdessä spektrianalyysiin liittyviä laskutoimituksia hoitavan Fortran-ohjelmointikielellä kirjoitetun laskentaohjelman (SpinAdder) kanssa.

Käyttöliittymän pääasiallisia tavoitteita olivat:

1. Kemiallisten siirtymien esittäminen pääikkunassa.
2. Monisivuisuus.
3. Spektrien hallinnoiminen päällekkäin, yksitellen ja limittäin.
4. Spektriparametrien esittäminen taulukossa.
5. Metaboliittien etsiminen ja kvantifiointi ASL-kirjastosta.

7 KÄYTTÖLIITTYMÄ CHEMADDER

ChemAdder-ohjelman käyttöliittymä luotiin Qt:lla (lausutaan virallisesti kuten englannin kielen sana ”cute”), joka on alustariippumaton ohjelmistojen ja graafisten käyttöliittymien kehitysympäristö. Ohjelmointikieleksi valittiin C++.

Käyttöliittymän perusnäkyvä muodostuu kuudesta eri alueesta (Kuva 11):

1. **Pääikkunassa** näkyvät spektrit ja spektri-parametrit.
2. **Dataseleimen** kautta voidaan tarkastella kansioiden sisältöä ja lisätä spektri- ja parametritiedostoja.
3. **Rakenteet-paneeliin** voidaan lisätä kuvia omille välilehdilleen.
4. **Spektrit-paneelin** kautta voidaan hallinnoida spektrejä.
5. **Parametritaulukot-paneelissa** näkyvät spektri-parametrit ja niihin liittyvät asetukset.
6. **Spinsysteemit-paneelissa** on taulukoituna spinsysteemit.

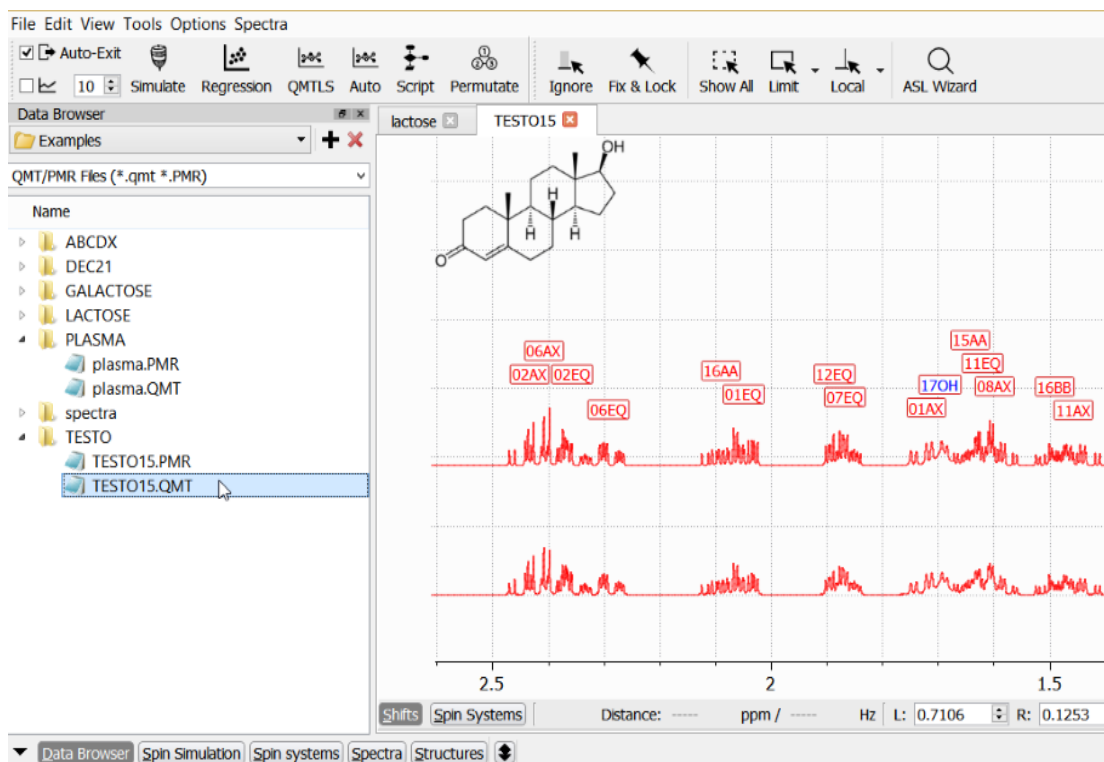


Kuva 11. ChemAdder-ohjelman käyttöliittymä

Käyttöliittymä on monisivuinen, samalla tavoin kuin esimerkiksi Powerpoint. Piirtämisessä käytetään anti-aliasing -tekniikkaa, minkä seurauksena piirtämisen grafiikka on erittäin korkealuokkaista.

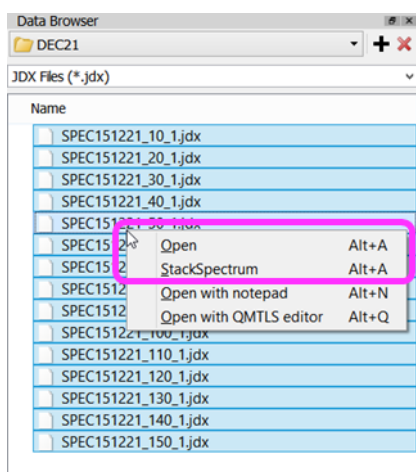
7.1 Datalain ja tiedostojen avaaminen

Datalaimen kautta voidaan aukaista tiedostoja ja tarkastella kansioden sisältöä. Spektrejä voidaan avata tuplaklikkaamalla spektritiedostoa, jolloin se aukeaa automaattisesti pääikkunaan uudelle välilehdelle (Kuva 12). Jos kansio sisältää samannimisen parametritiedoston, se lisätään automaattisesti spektriin.



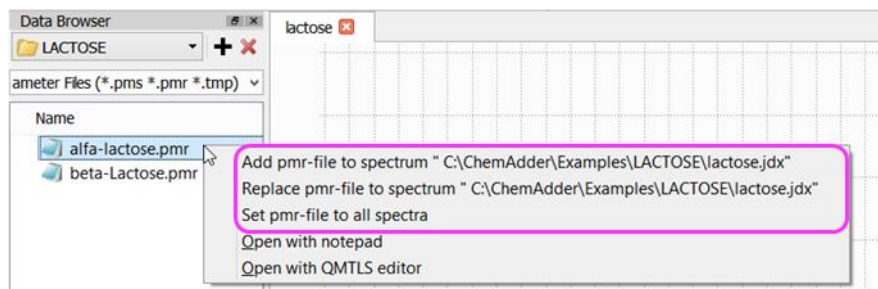
Kuva 12. Spektrien lisäys dataselaimen kautta ChemAdder-ohjelmassa.

Useita spektrejä voidaan lisätä pääikkunaan valitsemalla spektrit dataselaimesta, klikkaamalla oikeaa hiiren näppäintä ja valitsemalla avautuvasta ponnahtusvalikosta **Open** tai **Stack Spectrum** (Kuva 13). **Open** avaa valitut spektrit uuteen välilehteen ja **Stack Spectrum** lisää ne avoinna olevaan välilehteen.



Kuva 13. Usean spektrin lisääminen ChemAdder-ohjelmassa

PMR-tiedostoja voidaan lisätä klikkaamalla parametritiedostoa oikealla hiiren näppäimellä ja valitsemalla haluttu lisäystapa avautuvasta ponnahdusvalikosta (Kuva 14).



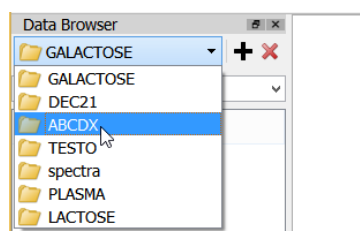
Kuva 14. PMR-tiedostojen lisääminen ChemAdder-ohjelmassa.

Tiedostosijainteja voidaan lisätä dataselaimen raahaamalla ja tiputtamalla tai painamalla sopivaa painiketta (Kuva 15).



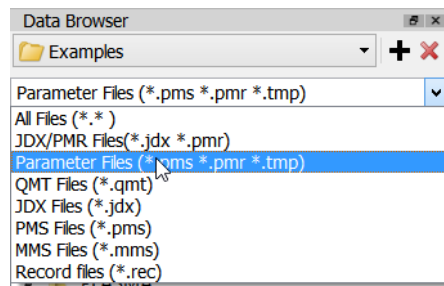
Kuva 15. Tiedostosijaintien lisääminen Dataselaimen ChemAdder-ohjelmassa.

Lisätyt tiedostosijainnit näkyvät dataselaimen pudotusvalikossa (Kuva 16).



Kuva 16. Tiedostosijainnit dataselaimen pudotusvalikossa.

Dataselein sisältää tiedostosuodattimen, jonka avulla voidaan valita, mitkä tiedostoformaateista näkyvät (Kuva 17). Tarkasteltavat formaatit voidaan kirjoittaa käsin tai valita pudotusvalikosta.



Kuva 17. Dataselaimen tiedostosuosdatin.

8 TIEDOSTOFORMAATIT

Ohjelma tukee JCAMP-DX(*.DX, *JDX)-spektriformaattia (1D ja 2D). Formaatti on alun perin suunniteltu IR-spektroskopiadatan tallentamiseen, mutta nykyisin sitä käytetään esimerkiksi kemiallisten rakenteiden ja NMR/MS-spektrien tallennukseen. QMT- ja PMR -formaattit ovat ohjelman omia formaatteja. QMT-formaattia käytetään lasketun ja havaitun spektrin tallennukseen ja se on tiedostokoon säästämisen vuoksi binäärimuodossa. PMR-formaatti sisältää QMSA:ssä käytetyt spektriparametrit.

8.1 PMR-formaatti

PMR-formaatti on uusi versio aikaisemmasta PMS-formaatista. Erona PMS-formaattiin on mm. se, että PMR-formaatti sisältää suuremman määrän erilaisia spektrianalyysiin liittyviä parametreja. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi PMR-tiedoston sisältö.

Kemialliset siirtymät. Kemialliset siirtymät luetellaan PMR-tiedostossa CHEMICAL SHIFTS -rivin jälkeen (Kuva 18). Siirtymät on jaoteltu omiin spinsysteemeihinsä. Riveissä alaspäin mentäessä ensimmäisenä luetellaan spinsysteemin nimi ja siihen liittyviä parametreja, minkä jälkeen seuraavilla riveillä luetellaan siihen liittyvät kemialliset siirtymät ja niihin liittyvät muuttujat.

```
&CHEMICAL SHIFTS(PPM):      MATCH% = 0.010
lactate  2*SPIN= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y)= 0.242285[OBS= 0.242285] MWGT= 90.00 SLOPE= 1.0000
lactH2/  1 4.130019 1*1*1 STAT=Y PRED= 4.1760 RANGE= 0.1000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.000200
lactH3/  1 1.335579 1*1*3 STAT=Y PRED= 1.2830 RANGE= 0.0500 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.1500 SDEV= 0.000100
acetate  2*SPIN= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y)= 0.187532[OBS= 0.187532] MWGT= 60.00 SLOPE= 1.0000
aceH2 /  2 1.924663 1*1*3 STAT=Y PRED= 1.9200 RANGE= 0.0500 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.000100
ala      2*SPIN= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y)= 0.009110[OBS= 0.009110] MWGT= 89.00 SLOPE= 1.0000
alaH2 /  3 3.828394 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.7830 RANGE= 0.0500 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.000100
alaH3 /  3 1.479844 1*1*3 STAT=Y PRED= 1.4830 RANGE= 0.0500 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.000100
valine   2*SPIN= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y)= 0.007401[OBS= 0.007401] MWGT= 110.00 SLOPE= 1.0000
valH2 /  4 2.264934 1*1*1 STAT=Y PRED= 2.2780 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
valH1 /  4 3.575073 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.6180 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
valH4 /  4 1.044514 1*1*3 STAT=Y PRED= 1.0460 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
valH3 /  4 0.978779 1*1*3 STAT=Y PRED= 0.9930 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leu      2*SPIN= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y)= 0.014538[OBS= 0.014538] MWGT= 131.00 SLOPE= 1.0000
leuH4 /  5 1.713900 1*1*1 STAT=Y PRED= 1.7180 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leuH3A/  5 1.689205 1*1*1 STAT=Y PRED= 1.6920 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leuH3B/  5 1.757343 1*1*1 STAT=Y PRED= 1.7490 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leuH2 /  5 3.768835 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.7430 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leuH5 /  5 0.957262 1*1*3 STAT=Y PRED= 0.9710 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
leuH6 /  5 0.930637 1*1*3 STAT=Y PRED= 0.9600 RANGE= 1.0000 WIDTH(Y)= 4.695 RESP(N)= 1.0000 SDEV= 0.001999
```

Kuva 18. Viiden eri spinsysteemin (laktaatti, asetaatti, alaniini, valiini ja leusiini) kemialliset siirtymät PMR-tiedostossa.

Kytkentävakiot. Kytkentävakiot luetellaan PMR-tiedostosta löytyvän COUPLING CONSTANTS -rivin jälkeen (Kuva 19). Kytkentävakiot on jaoteltu kemiallisten siirtymien tapaan omiin spinsysteemeihinsä. Riveissä alaspäin mentäessä ensimmäisenä luetellaan spinsysteemin nimi, minkä jälkeen seuraavilla riveillä luetellaan siihen liittyvät kytkentävakiot ja niihin liittyvät parametrit.

```

&COUPLING CONSTANTS(HZ):      MATCH% =  0.010
lactate
  Jlact      6.9279   J lactH2 lactH3   STAT=N   PRED=  6.928 RANGE=  4.460 SDEV=  4.4600
ala
  Jala      7.2550   J alaH2  alaH3    STAT=N   PRED=  7.255 RANGE=  4.610 SDEV=  4.6100
valine
  Jval1     4.3574   J valH2  valH1    STAT=N   PRED=  4.357 RANGE=  3.170 SDEV=  3.1700
  Jval2     7.0329   J valH2  valH4    STAT=N   PRED=  7.033 RANGE=  4.510 SDEV=  4.5100
  Jval3     7.0059   J valH2  valH3    STAT=N   PRED=  7.006 RANGE=  4.500 SDEV=  4.5000
leu
  Jleu1     5.8909   J leuH4  leuH3A   STAT=N   PRED=  5.891 RANGE=  3.940 SDEV=  3.9400
  Jleu2     8.5891   J leuH4  leuH3B   STAT=N   PRED=  8.589 RANGE=  5.290 SDEV=  5.2900
  Jleu3     6.6386   J leuH4  leuH5    STAT=N   PRED=  6.639 RANGE=  4.310 SDEV=  4.3100
  Jleu4     6.6756   J leuH4  leuH6    STAT=N   PRED=  6.676 RANGE=  4.330 SDEV=  4.3300
  Jleu5    -14.3511   J leuH3A leuH3B   STAT=N   PRED=-14.351 RANGE=  8.170 SDEV=  8.1700
  Jleu6     8.7627   J leuH3A leuH2    STAT=N   PRED=  8.763 RANGE=  5.380 SDEV=  5.3800
  Jleu7     5.2635   J leuH3B leuH2    STAT=N   PRED=  5.264 RANGE=  3.630 SDEV=  3.6300

```

Kuva 19. Neljän eri spinsysteemin (laktaatti, alaniini, valiini ja leusiini) kytkentäväkiöt NMR-tiedostossa.

Kontrolliparametrit ja TLS-profiili. Kontrolliparametrit sisältävät iteraattorin käyttämiä asetuksia ja niistä saadaan tietoa esimerkiksi lasketun ja havaitun spektrin sovituksesta (RMSE). Kontrolliparametrit luetaan PMR-tiedostosta löytyvän CONTROL PARAMETERS -rivin alapuolella (Kuva 20). Jokaisella parametririvillä annetaan puolipisteen oikealla puolella lyhyt selitys parametrille.

```
&CONTROL PARAMETERS & FIT INFO:
ORIGINAL = ND ; TYPE = JDX, QMT, OBS, ASL(=PMR), HMD, SDB
SPECTRUM = C:\CHEMADDER\EXAMPLES\ABCDX\ABCDX.QMT ; ND => (RE)READ ORIGINAL!
BATCHFILE = C:\CHEMADDER\EXAMPLES\ABCDX\ABCDX.BAT ; PROTOCOL(MENU) FILE (.REC or .BAT-file)
PROFILE = C:\CHEMADDER\PROFILE\BASIC_PROFILE.TXT ; OPTIONS/ADDER PROFILE
TEMPLATE = ND ; PMR-FILE/AUTO/DEF/ND
STRUCTURE = ND ; MMS/MOL-FILE/ND/AUTO
PREDICTION = C:\CHEMADDER\PROFILE\PREDPROFILE.TXT ; PREDICTION PROFILE
SOLVENT = ND ; POLYSOL, CCL4, CDCL3, C6D6, DMSO, ACD6, CD3CN, CD3OD, D2O, CD2C12, ..ND
REFERENCE = TMS ; TMS, TSP, DSS, REF_N(N=No. of protons/molecule), ...ND
REFERENCE MMOL = 1.000 ; QUANTITATIVE(=GLOBAL) REFERENCE (ND=1.0)
FIELD = 400.00000000 ; FOR 1H in MHZ, USED TO TRANSFORM SHIFTS TO HZ
CURSOR LEFT = 1.05068 ; LEFT CURSOR DEFAULT FREQUENCY (PPM)
CURSOR RIGHT = -0.03675 ; RIGHT CURSOR DEFAULT FREQUENCY (PPM)
POINT RESOLUTION = 0.04000854 ; DATA-POINT-RESOLUTION (HZ)
LINE WIDTH = 0.100 ; 0.0 = USE SPECIES DEFAULT (HZ)
SIGNAL LW = 0.000 ; 0.0 = AUTO, DEFAULT LINE WIDTH FOR EXTRA SIGNALS
GAUSSIAN = 119.507 ; GAUSSIAN % IN LINE-SHAPE (CAN BE >100%)
DISPERSION = 0.000 ; ASYMMETRY % IN LINE-SHAPE (CAN BE <0)
RRMS = 1.0692 ; % FROM MAX. INTENSITY
ABSOLUTE SCALING = 0.100000E+01 ; ORIGINAL/OBS SCALING FACTOR
SCALING FACTOR = 0.385033E+01 ; OBS/CALC SCALING FACTOR
R-FACTOR(%) = 99.163 ; R-FACTOR, USING BROADENING OF 10(HZ)
MATCH(%) = 0.000 ; OBSERVED-DEFAULT(=PREDICTED) MATCH
Total RRMS = 1.0693 ; TOTAL RRMS (no WEIGHTING)
QM LINES = 84 ; NO. OF QM LINES
QM AREA = 0.299446E+03 ; AREA OF QM SYSTEM...
OF THEOR. = 100.000 ; ..CORRESPONDING TO (%)THEORETICAL QM AREA
```

Kuva 20. PMR-tiedostosta löytyvät kontrolliparametrit. Parametreille on annettu lyhyt selitys puolipisteen oikealla puolella.

Profile-kontrolliparametri määrittelee analyysissä käytettävän profiilitiedoston sijainnin. Profiilitiedosto on analyysin kannalta erittäin tärkeä, koska se sisältää (QM)TLS-iteraattorin käyttämät kvanttimekaaniset asetukset (Kuva 21). Erilaisia profiilitiedostoja löytyy ohjelman alikansista PROFILE. Profiiliasetuksia voidaan muuttaa Parametritaulukot-paneelin kautta (kts. kpl 10).

```

=====
& DEFAULT Profilefile for QMSA
& For HELP, see C:\CHEMADDER\PROFILE\TLSPROFILE.HLP (or EXIT EDITOR and Press F10)
=====
SETPROFILE = Y                ! Y/N = Read / not-read PROFILEFILE when starting QMSA [1]

ASL-LIBRARY = C:\CHEMADDER\ASLIBS\METLIB      ! DEFAULT DIRECTORY FOR ASL-FILES

QMSA MODE = Q                ! A = AUTO (Q if >1 structures), Q = qQMSA, S = QMSA SPEC MODE [2]
THRESHOLD = 0.1              ! Threshold for PCA; 0 => Regression analysis used (def with qQMSA) [2]
ITERATION = 10               ! No. of iterations; negative => convergence not tested [2]
CONVERGENCE = 0.05           ! Coverage criterium (0.1 means that if RMS is decreased < 0.1%, iteration is ended) [2]

USE TEMPLATE = N             ! Y/N = Apply / TURN OFF Template constraints (FORCE parameters) [4]
DAMPINGS = N                 ! Y/N = Apply / TURN OFF DAMPING constraints [5].

LINewidth(1H) = 0            ! def QM LineWidth (see OPTIMIZE LINewidth = A), 0 = from PMR-file or 1.0 [6]
LINewidth(13C) = 0           ! def LineWidth for X-species(X=13C,19F,31P,..); 0 = from PMR-file or 1.0 [7]
GAUSSIAN% = DEF              ! Gaussian contribution in line-shape (in %), DEF = from PMR-file or 0 [8]
DISPERSION% = DEF            ! Dispersion contribution in line-shape (in %), DEF = from PMR-file or 0 [8]
GAUSSIAN OPTIMIZED = Y       ! Y/N = GAUSSIAN% optimized / not optimized [8]
DISPERSION OPTIMIZED = N     ! Y/N = DISPERSION% optimized / not optimized [8]

FOURIER = 0                  ! No. of baseline FOURIER terms for WHOLE SPECTRAL RANGE (max = 256), (0 = LINEAR) [9]
POLYNOMIAL = 1               ! No. of baseline POLYNOMIAL terms (< 6), ..POLYNOMIAL = 0 if FOURIER > 0 [9]

NEGATIVE = N                 ! N/Y negative intensities NOT/YES allowed, def = N [10]

WINDOW = B                   ! B=Bartlett, S=SIN2, Z=Z-type, T=Tophat [11]
INITIAL BROADENING = 50.0    ! Initial BROADENING (Hz) [11]
FINAL BROADENING = 2.0       ! Final BROADENING (Hz), not less than line-width [11]
GRADIENT = 0.66              ! Gradient of BROADENING (0.50 - 0.90, def = 0.66) [11]
POWER = 0                     ! POWER FOR FORCING PARAMETERS TO PREDICTED ONES, ..IN BROADENING-MODE [11]

LINewidth OPTIMIZED = F      ! N/Y/A/F QM-LW FIXED / DIFFERENT / ALL SAME in-range / FORCE TO TEMPLATE/SAME [15]
LINewidth FORCE = 0.10        ! QM-LW'S forced to TEMPLATE/SAME; use 0.1 - 5, def=0.1 [15]

BASELINE = L                 ! N = None, L = Linear, F = Local Fourier (=def) [16]
FORCE BASELINE = 0.01        ! Force BASELINE linear; use 0.01 - 1, def=0.01 [16]
FORCE NEG BASELINE = 0.10    ! Force negative BASELINE toward zero; use 0.01 - 1, def=0.1 [16]

FORCE SHIFT = 0.0            ! Force SHIFTS to originals/template; use 0.1 - 5, def=0 [17]
FORCE COUPLING = 0.0         ! Force COUPLINGS to originals/template; use 0.1 - 5, def=0 [17]
FIX SHIFTS = N               ! Y/N/A = FIX / release shifts (if STAT=N) / fix ALL [17]
FIX COUPLINGS = N            ! Y/N/A/B = FIX / release couplings (if STAT=N) / fix ALL / fix J < LW of JAA'-type species
FIX COUPLING SIGNS = N       ! Y/N = FIX COUPLING SIGNS [17]
FIX PSEUDO SHIFTS = N        ! Y/N/A = FIX / release PSEUDO shifts (if STAT=N) / fix ALL[17]
FIX PSEUDO LW = N            ! Y/N = FIX / unfix PSEUDO LineWidths[17]

FIX POPULATIONS = N          ! Y/N/A = FIX / UNFIX POPULATIONS / FIX ALSO PSEUDO POPULATIONS [18]
POPULATION THRESHOLD = 0.01  ! COMPONENTS WITH POPULATION < THRESHOLD (mol%) CAN BE ZEROED & IGNORED [18]

FORCE PSEUDO SHIFTS = 0.0    ! Shifts forced to originals/template values; use 0.1 - 5, def=0.1 [19]
FORCE PSEUDO LW = 0.0        ! Force WIDTH(F) to originals/template values; use 0.1 - 5, def=0.1 [19]
HEIGHT FORCE = 0.0            ! HEIGHT force; use 3 ... 10 x QM Line-Width, def=5 [5]

DAMPING DIAGONAL = 0.0       ! Diagonal damping, 0 = none (0.01-0.20, def=0) [20]
DAMPING FIT = 0.0            ! Damping for good/bad fit, 0 = None (def=0) [20]]
DAMPING INTENSITY = 0.0      ! Damping based on intensity, 0 = None, in QMTLS -0.25 ..-0.60 (def=0) [[20]
DAMPING AVERAGE = 0.0        ! Window (width in HZ) for intensity damping, 0 = None (def=0) [[20]
DAMPING OVERLAP = 1.0        ! Damping for Overlap, 0 = None (def=0), .. 1-3 for mixtures [20]

ASSIGNMENTS = N              ! Y/N = Use / Ignore assignments [ 21]

RESPONSES = N                ! 1/N/Y/F SET RESPONSES to 1.0 & LOCK / LOCK / adjust if RESP(Y) / Force to 1.0/TEMPLATE
FORCE RESPONSES = 0.10       ! Use 0.01 - 1 [22]

&END

```

Kuva 21. TLS-Profilitiedosto sisältää (QM)TLS-iteraattorin asetukset. PMR-tiedostosta löytyvä Profile-kontrolliparametri määrittelee analyysissä käytettävän profilitiedoston.

Raja-alueet. Raja-alueet ovat alueita, joita ei oteta huomioon TLS-iteratioissa, ja ne on määritelty PMR-tiedostossa CONSTRAINTS-rivin alapuolella (Kuva 22).


```

5      1.39253      0.82689      100.00000      97.347
6      0.09940      -0.11906      100.00000      97.347

&CONSTRAINTS (in equations X0 = 1.0)
IGNORE(PPM): 9.00681 to 7.46464
IGNORE(PPM): 7.24574 to 6.79610
IGNORE(PPM): 4.99275 to 4.68878
&ASL TEMPLATES AT 500.362355 MHZ (for autosearch)
1 lactate
1 2076.922119      0.347434      1      1
2 2069.941162      0.856660      1      1

```

Raja-alueen oikea raja

Raja-alueen vasen raja

Kuva 22. Raja-alueet PMR-tiedostossa.

Integraalit. Spektrin integraalit on määritelty PMR-tiedostossa INTEGRALS-rivin alapuolella (Kuva 23).

```

&INTEGRALS; left & right freq.      AREA AREA/ref      AREA%(TOTAL-IGNORED)
1      7.64620      6.76575      100.00000      97.347      1.255      AROMATICS      typ= 10aver
2      5.34597      5.13156      100.00000      97.347      1.255      a-sugars      typ= 10aver
3      4.68497      4.54369      100.00000      97.347      1.255      b-sugars      typ= 10aver
4      4.00274      2.93068      100.00000      97.347      1.255      CH2+HAC      typ= 10aver
5      1.39253      0.82689      100.00000      97.347      1.255      METHYLS      typ= 10aver
6      0.09940      -0.11906      100.00000      97.347      1.255      TSP          typ= 10aver

```

Kuva 23. Integraalit PMR-tiedostossa.

Ydinten ASL-spektriipiikit. Ydinten ASL-spektriipiikit (taajuus, intensiteetti) on listattu PMR-tiedostossa ASL TEMPLATES -rivin alapuolella (Kuva 24).

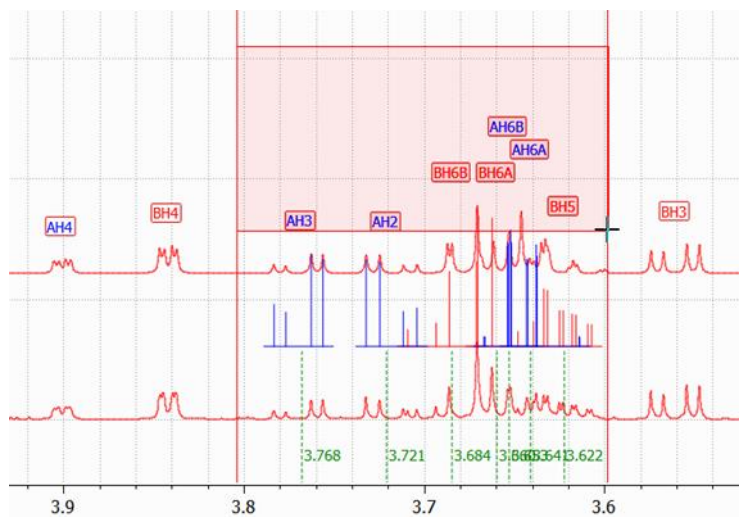
```

&ASL TEMPLATES AT: 500.362355 MHZ (for autosearch)
1 lactate
1 2076.922119      0.347434      1      1
2 2069.941162      0.856660      1      1
3 2062.960205      0.860435      1      1
4 2056.093750      0.354126      1      1
5 671.702026      3.822674      2      2
6 664.721130      3.778754      2      2
2 acetate
7 962.954163      5.993929      1      3

```

Kuva 24. Ydinten ASL-spektriipiikit.

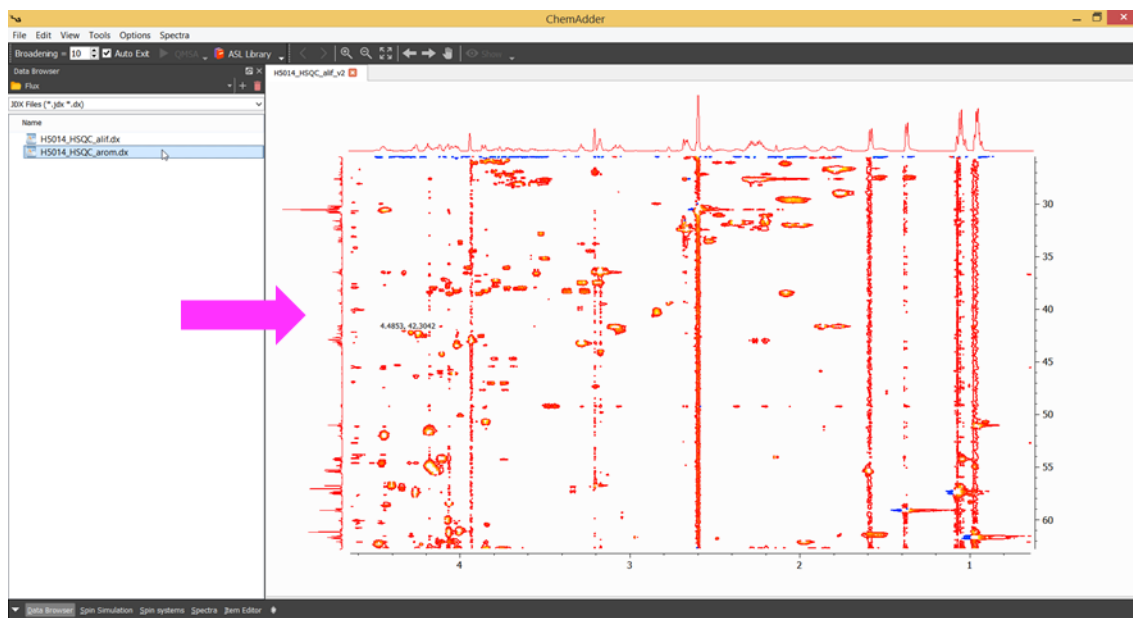
Seuraavassa kuvassa on havainnollistettu, kuinka ASL-piikit saadaan näkyviin pääikkunassa (Kuva 25). Piikkien avulla on helppo etsiä siirtymien oikeat paikat raahaamalla niitä vasemmalla hiiren näppäimellä ja vertaamalla havaittuun spektriin.



Kuva 25. ASL-piikkipatterit saadaan näkyviin pääikkunassa Suorakaide-työkalun avulla.

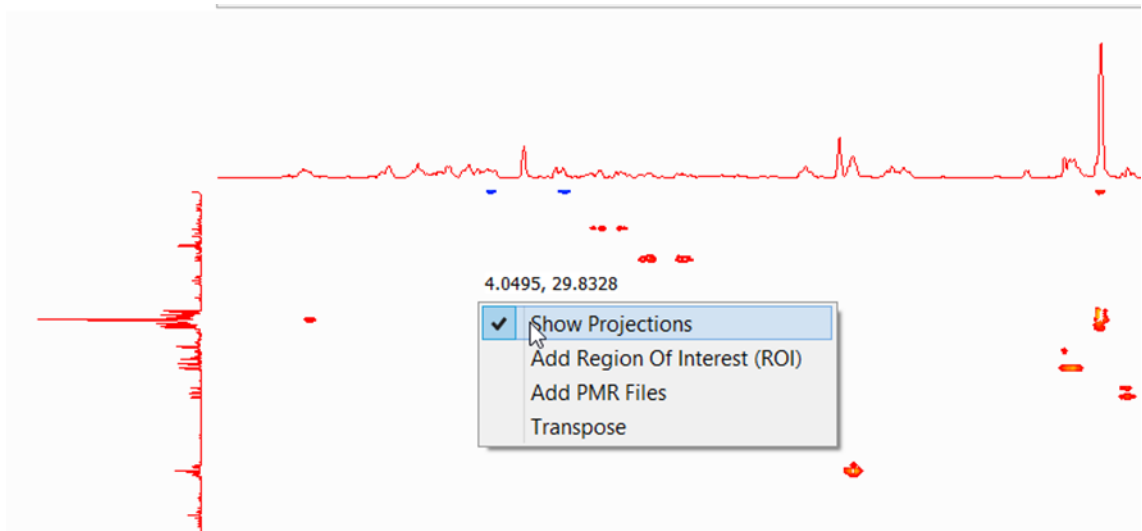
9 2D-EDITORI

ChemAdder-ohjelman avulla on mahdollista tarkastella ja analysoida myös 2D-spektrijä. 2D-spektrien avaaminen onnistuu helpoimmin **Datase-laimen** kautta tuplaklikkamalla spektritiedostoa (Kuva 26).



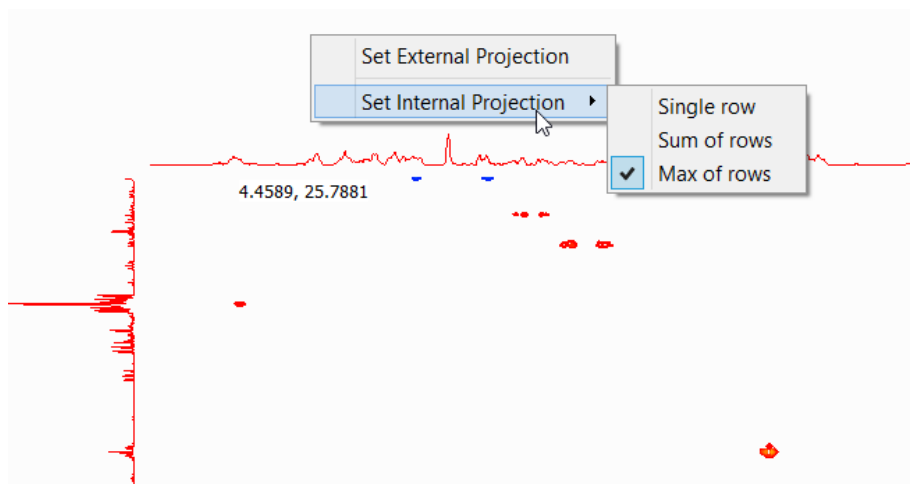
Kuva 26. 2D-spektrit saadaan avattua tuplaklikkaamalla spektritiedostoa dataselaimesta.

Spektrin projektiot saadaan piilotettua ja uudelleen näkyviin painamalla pääikkunaa hiiren oikealla näppäimellä ja valitsemalla avautuvasta ponnahdusvalikosta **Show Projections** (Kuva 27).



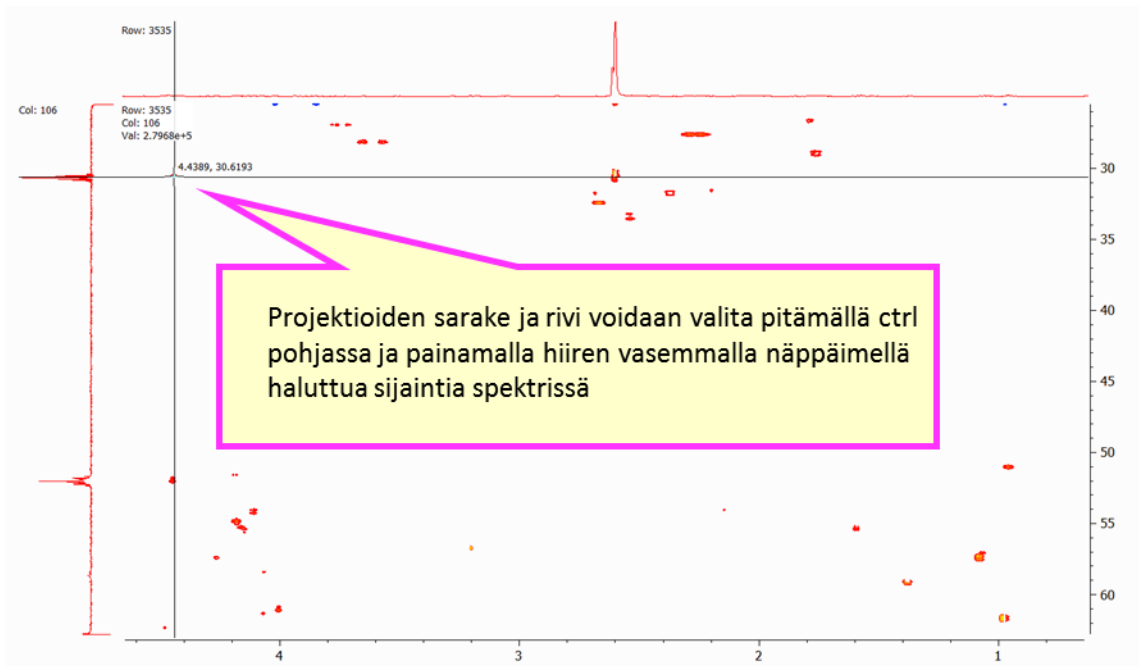
Kuva 27. Projektioiden näyttäminen ja piilottus.

Sisäisiä projektioita voidaan tarkastella kolmella eri tavalla; 1) yksi viipale kerrallaan, 2) viipaleiden maksimien perusteella ja 3) viipaleiden summien perusteella. Tarkastelutapa voidaan valita painamalla projektiota oikealla hiiren painikkeella ja valitsemalla tarkastelutapa avautuvasta ponnahtusvalikosta (Kuva 28).



Kuva 28. Projektioiden tarkastelutavan muuttaminen.

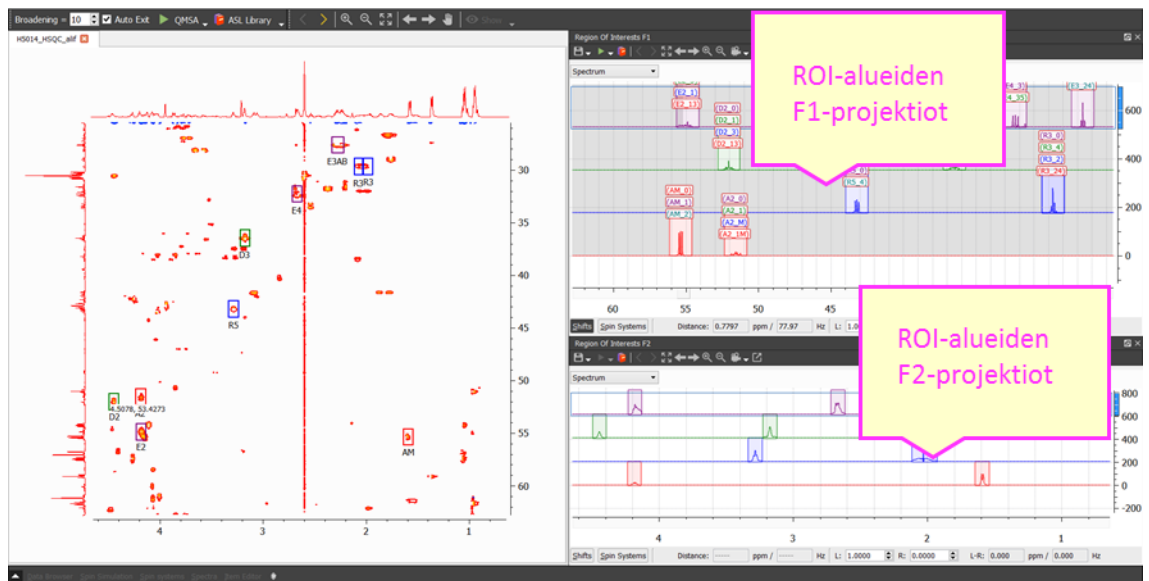
Yksittäisiä rivejä tai sarakkeita voidaan valita pääikkunan kautta (Kuva 29).



Kuva 29. Rivien ja sarakkeiden valinta pääikkunan kautta.

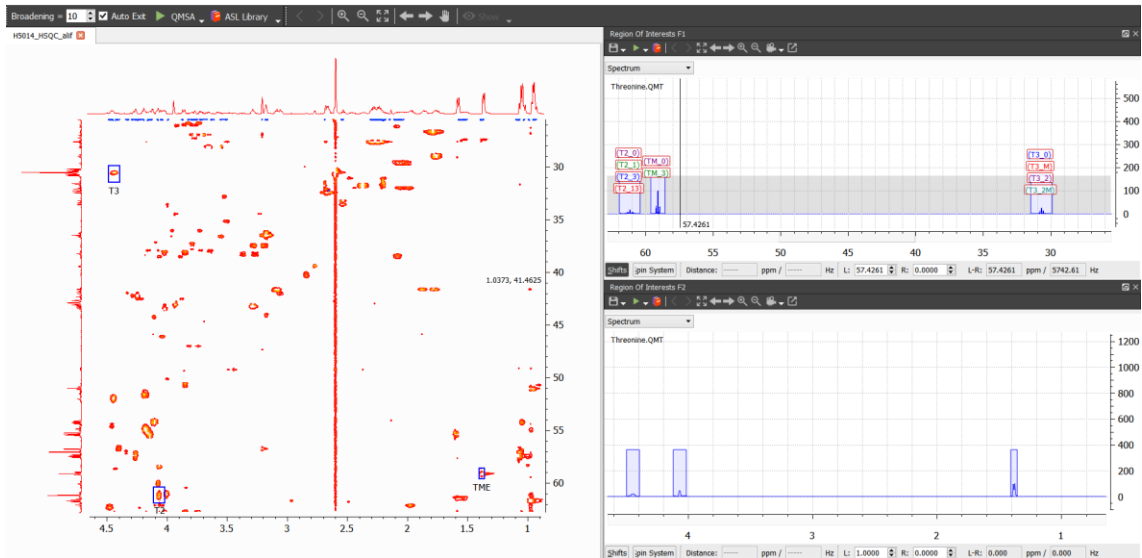
9.1 Mielenkiintoalueet

ChemAdder-ohjelman avulla voidaan 2D-spektreihin lisätä mielenkiinto- eli ROI-alueita (Region Of Interest). Alueiden tilavuuksista saadaan kvantitatiivista tietoa ja niiden 1D-projektioita voidaan käyttää lähtökohtana QMSA:ssa. ROI-alueet ovat suorakaiteen muotoisia ja niitä vastaavat F1- ja F2 -projektiot näkyvät erillisinä spektriikkunoina (Kuva 30). Alueita voidaan liikutella ja niiden kokoa voidaan muuttaa hiiren avulla.

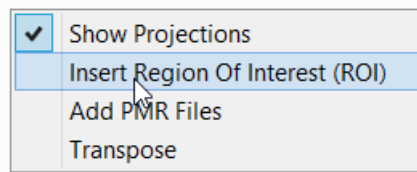


Kuva 30. ROI-alueet ja niiden F1- ja F2 -projektioit ChemAdder-ohjelmassa.

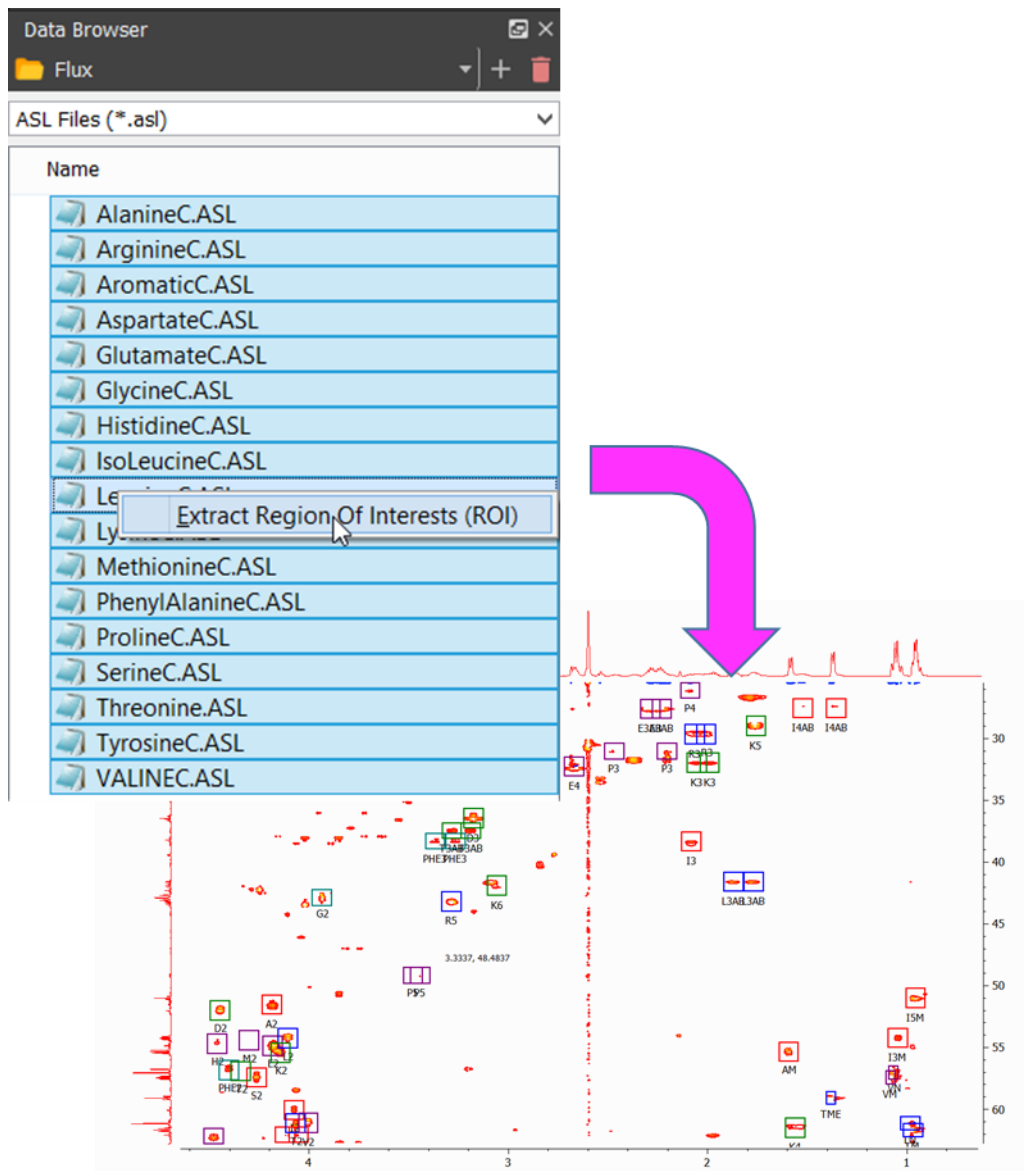
ROI-alueita ja niiden projektioita on myös mahdollista yhdistää (Kuva 31). ROI-alueita voidaan lisätä spektriin piirtämällä hiiren avulla (Kuva 32) tai parametritiedostojen kautta (Kuva 33).



Kuva 31. Kolmen yhdistetyn ROI-alueen F1- ja F2 -projektiot.



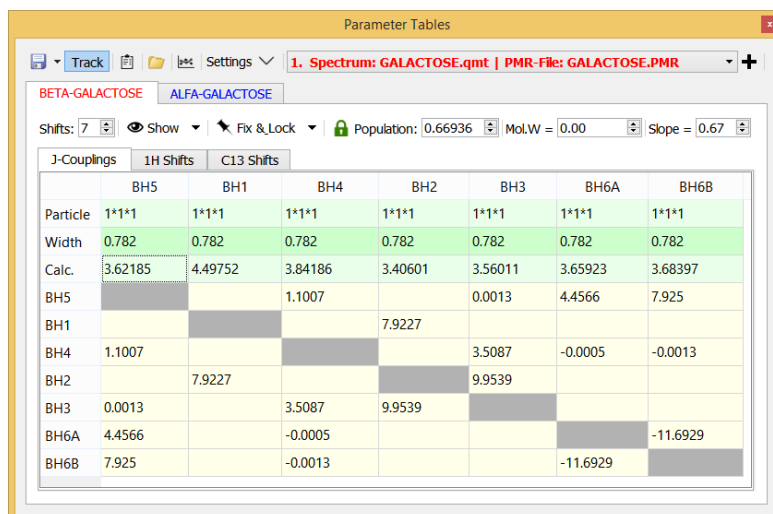
Kuva 32. ROI-alueita voidaan lisätä spektriin painamalla spektriä hiiren oikealla näppäimellä ja valitsemalla avautuvasta ponnahtusvalikosta **Insert Region Of Interest (ROI)**. Tämän jälkeen ROI-alue voidaan piirtää spektriin käyttämällä vasenta hiiren painiketta.



Kuva 33. Parametritiedostojen sisältämät ROI-alueet voidaan lisätä spektriin valitsemalla tiedostot **Dataselaimen** kautta, painamalla hiiren oikeaa painiketta ja valitsemalla avautuvasta ponnahdusvalikosta **Extract Region Of Interests (ROI)**.

10 PARAMETRITAUUKOT-PANEELI

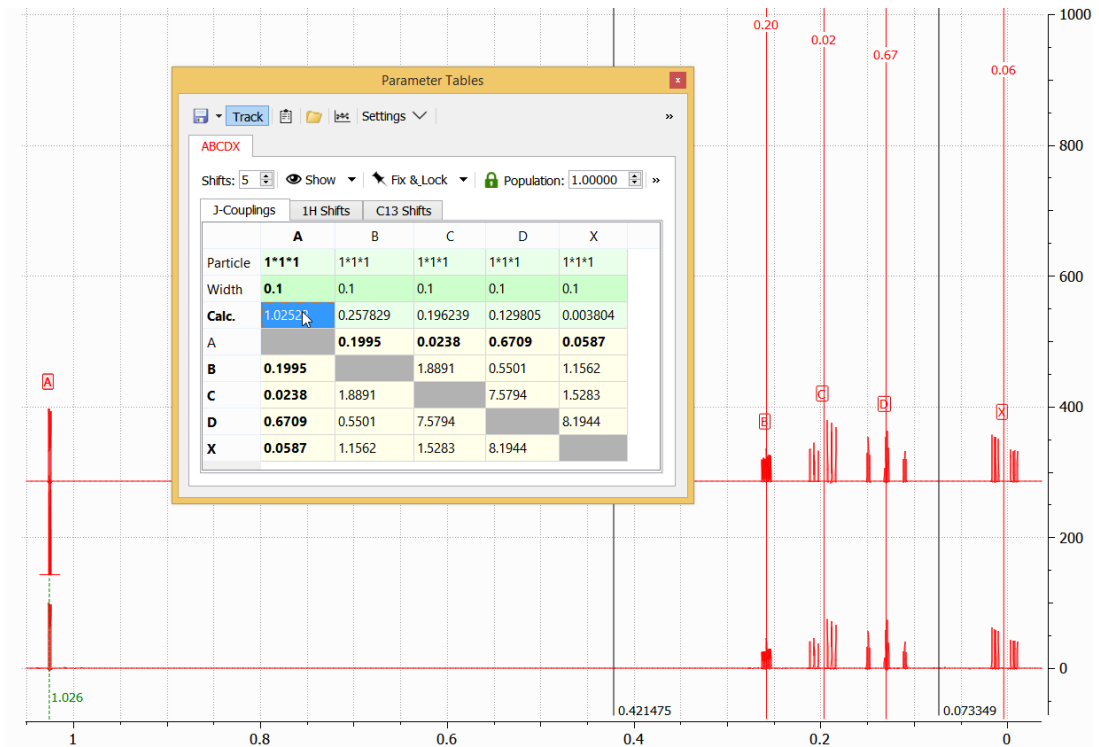
Parametritaulukot-paneeli sisältää QMSA:ssä käytetyt spektriparametrit (Kuva 34). Paneeli saadaan näkyviin valitsemalla valikosta **View**→**Parameter Tables**. Kytkevävakiot sekä ^1H - ja ^{13}C -siirtymät on jaettu omille välilehdilleen.



	BH5	BH1	BH4	BH2	BH3	BH6A	BH6B
Particle	1*1*1	1*1*1	1*1*1	1*1*1	1*1*1	1*1*1	1*1*1
Width	0.782	0.782	0.782	0.782	0.782	0.782	0.782
Calc.	3.62185	4.49752	3.84186	3.40601	3.56011	3.65923	3.68397
BH5			1.1007		0.0013	4.4566	7.925
BH1				7.9227			
BH4	1.1007				3.5087	-0.0005	-0.0013
BH2		7.9227			9.9539		
BH3	0.0013		3.5087	9.9539			
BH6A	4.4566		-0.0005				-11.6929
BH6B	7.925		-0.0013			-11.6929	

Kuva 34. Parametritaulukot-paneeli ChemAdder-ohjelmassa.

Kemialliset siirtymät näkyvät pääikkunassa spektrin yläpuolella. Kun hiiren osoitin siirretään siirtymän päälle, siihen kytkeytyneiden siirtymien kohdalla näkyvät pääikkunassa punaiset pystyviivat ja kytkentävakioiden arvot (Kuva 35).



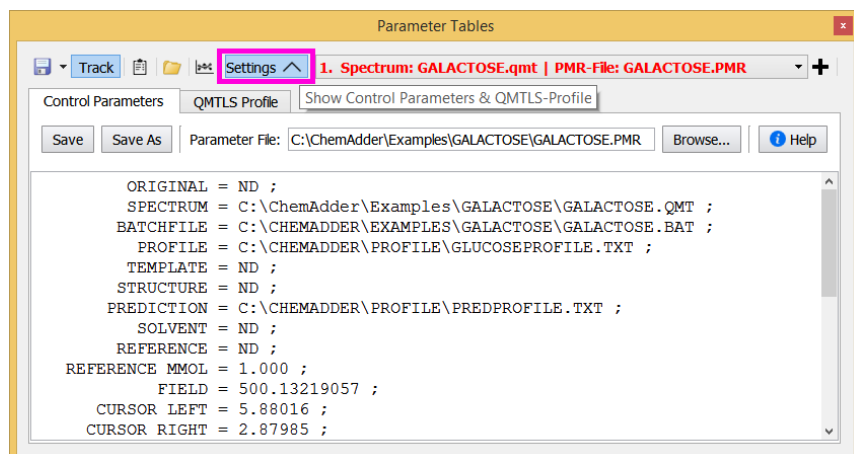
Kuva 35. Parametritaulukot-paneelin vuorovaikutus pääikkunan kanssa.

1H Shifts- ja 13C -välilehdillä on listattu PMR-tiedostojen protoni- ja hiilisiirtymien parametrit (Kuva 36).

Group	Particle	Calculated	Predicted	Response	Line Width	Range
5 X	1*1*1	0.003804	0.0040	🔒 1.0000	0.1	1
4 D	1*1*1	0.129805	0.1300	🔒 1.0000	0.1	1
3 C	1*1*1	0.196239	0.1960	🔒 1.0000	0.1	1
2 B	1*1*1	0.257829	0.2580	🔒 1.0000	0.1	1
1 A	1*1*1	1.02523	1.0250	🔒 1.0000	0.1	1

Kuva 36. Parametritaulukot-paneelin 1H Shifts -välilehti

Kontrolliparametrit ja QMTLS-profiili saadaan näkyviin painamalla **Settings**-painiketta (Kuva 37).

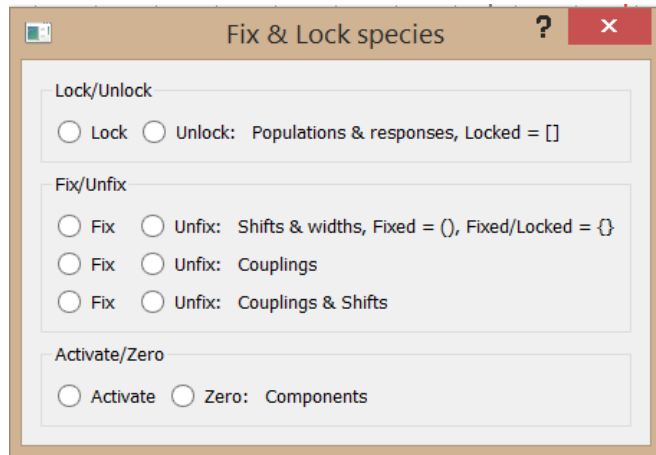


Kuva 37. Kontrolliparametrit ja QMTLS-iteraattorin asetukset.

11 SPEKTRIPARAMETRIEN KIINNITYS JA LUKITSEMINEN

Spektriparametrien kiinnittäminen ja lukitseminen ovat spektrianalyysin kannalta erittäin oleellisia operaatioita. Kun spektriparametri lukitaan tai kiinnitetään, sen arvoa ei muuteta TLS-iteraatioissa. Kiinnittämällä ja vapauttamalla vaikutetaan kemiallisten siirtymien ja kytkentävakioiden parametreihin. Lukitsemisella ja avaamisella puolestaan vaikutetaan spinsysteemien populaatioparametreihin ja kemiallisten siirtymien vastekertoimiin.

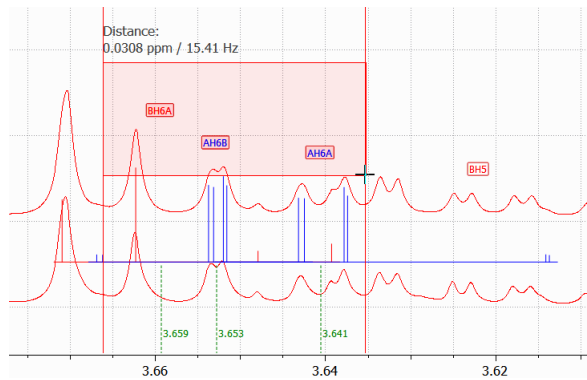
Spektriparametreja voidaan lukita ja kiinnittää usealla eri tavalla, kuten esimerkiksi **L & Lock** -paneelin kautta (Kuva 38). Paneeli saadaan auki painamalla työkalupalkin painiketta **Fix & Lock**. Valitut operaatiot tapahtuvat kursorien välillä sijaitseviin parametreihin.



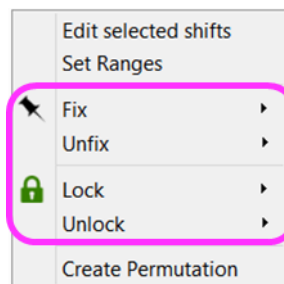
Kuva 38. Fix & Lock -paneeli.

Spektriparametreja voidaan lukita ja kiinnittää myös pääikkunan kautta:

1. Valitsemalla siirtymät käyttämällä **Suorakaide-työkalua**.



2. Painamalla oikeaa hiiren painiketta pääikkunan päällä ja valitsemalla haluttu operaatio avautuvasta ponnahdusvalikosta.



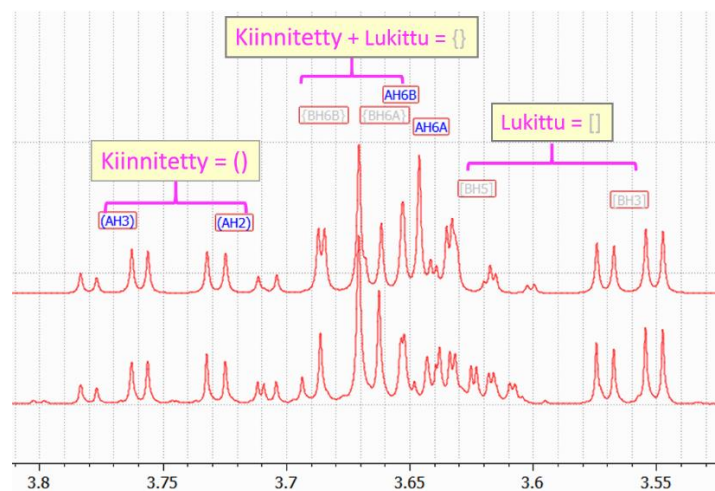
Kiinnitettyjä/lukittuja spektriparametreja merkitään parametritiedostossa N:llä ja vapautettuja/avattuja parametreja Y:llä (Kuva 39).

```
&CHEMICAL SHIFTS(PPM):
BETA-GALACTOSE 2*Spin= 1 SPECIES=1H POPULATION(N) 0.669355[OBS= 0.009900] MWGT=0.00 SLOPE= 1.000000
BH5 /1 3.621850 1*1*1 STAT=N PRED= 3.4850 RANGE= 5.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH1 /1 4.497522 1*1*1 STAT=N PRED= 4.6650 RANGE= 2.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH4 /1 3.841856 1*1*1 STAT=N PRED= 3.4310 RANGE= 2.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH2 /1 3.406014 1*1*1 STAT=N PRED= 3.2690 RANGE= 2.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH3 /1 3.560111 1*1*1 STAT=N PRED= 3.5140 RANGE= 2.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH6A /1 3.659231 1*1*1 STAT=N PRED= 3.9210 RANGE= 5.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
BH6B /1 3.683972 1*1*1 STAT=N PRED= 3.7500 RANGE= 5.0000 Width(N)= 0.7820 Resp(N)= 1.0000
ALFA-GALACTOSE 2*Spin= 1 SPECIES=1H POPULATION(Y) 0.330645[OBS= 0.009900] MWGT=0.00 SLOPE= 1.000000
AH5 /2 4.003243 1*1*1 STAT=Y PRED= 4.0910 RANGE= 2.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH1 /2 5.177879 1*1*1 STAT=Y PRED= 5.2570 RANGE= 2.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH4 /2 3.900486 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.4380 RANGE= 2.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH2 /2 3.720205 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.5600 RANGE= 2.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH3 /2 3.767522 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.7390 RANGE= 2.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH6A /2 3.640435 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.8660 RANGE= 5.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
AH6B /2 3.652721 1*1*1 STAT=Y PRED= 3.7890 RANGE= 5.0000 Width(Y)= 0.7820 Resp(Y)= 1.0000
```

■ Lukittu = N
■ Avattu = Y
■ Kiinnitetty = N
■ Vapautettu = Y

Kuva 39. Kiinnitetty ja lukitut spektriparametrit PMR-tiedostossa.

Lukittujen spinsysteemien siirtymät näkyvät pääikkunassa harmaina ja ne on merkitty hakasulkeisiin. Kiinnitetty siirtymät on merkitty kaarisulkeisiin. Kiinnitetty ja lukittu siirtymät on merkitty harmaalla ja kaarisulkeisiin (Kuva 40).



Kuva 40. Kiinnitetty/lukittu siirtymät pääikkunassa.

Kiinnitetty kytkentävakiot näkyvät pääikkunassa suluissa, kun hiiren osoitin siirretään siirtymän päälle (Kuva 41).

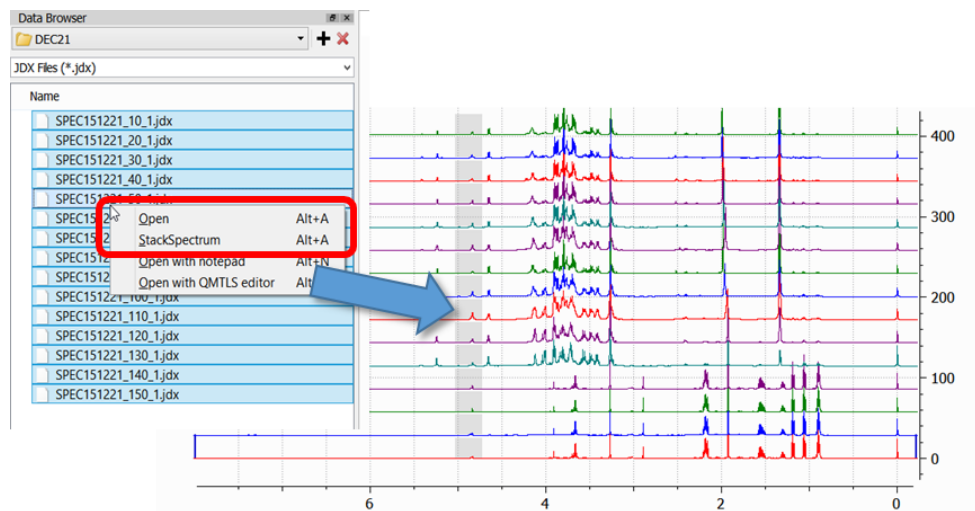


Kuva 41. Kiinnitettyt kytkentävakiot pääikkunassa.

12 USEAN SPEKTRIN TARKASTELU

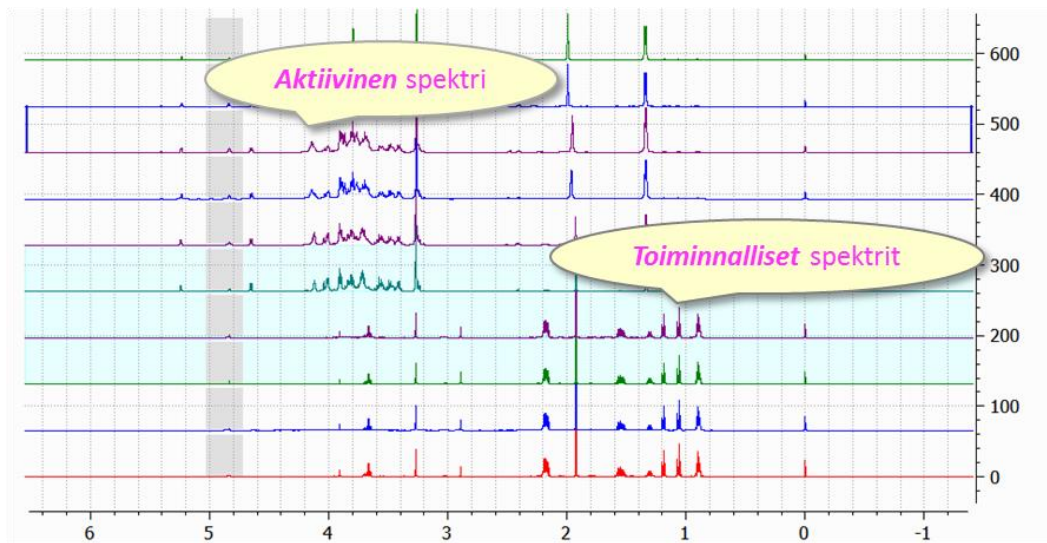
Spektrianalyysessä tehdessä on usein tarpeellista tarkastella useampaa spektriä yhdellä kertaa. Tämä voi olla tarpeellista esimerkiksi silloin, kun halutaan vertailla samaa aluetta spektrien välillä tai kun halutaan tarkastella mittaussarjaa, jossa spektrit on mitattu eri olosuhteissa (pH, lämpötila).

Spektrejä voidaan lisätä seuraavasti: 1) Valitsemalla spektrit dataselaimesta 2) Painamalla oikealla hiiren näppäimellä dataselainta, 3) Valitsemalla avautuvasta ponnahdusvalikosta **Open** tai **Stack Spectrum** (Kuva 42). Valitsemalla **Open** spektrit avautuvat uudelle välilehdelle. Valitsemalla **Stack Spectrum** spektrit lisätään avoimna olevalle välilehdelle.



Kuva 42. Usean spektrin lisääminen pääikkunaan.

Spektrien tarkastelun kannalta tärkeitä käsitteitä ovat *aktiivinen* spektri ja *toiminnalliset* spektrit (Kuva 43). Yksi spektreistä on aina aktiivinen, kun spektrejä on lisätty pääikkunaan enemmän kuin yksi. Aktiivinen spektri näkyy, kun spektrejä tarkastellaan yksitellen (one at a time). Aktiivisen spektrin reunoilla näkyvät siniset pystyviivat pääikkunassa. Spektrien prosessointi vaikuttaa ainoastaan toiminnallisiin spektreihin. Toiminnalliset spektrit on korostettu vaaleansinisellä taustavärillä pääikkunassa.



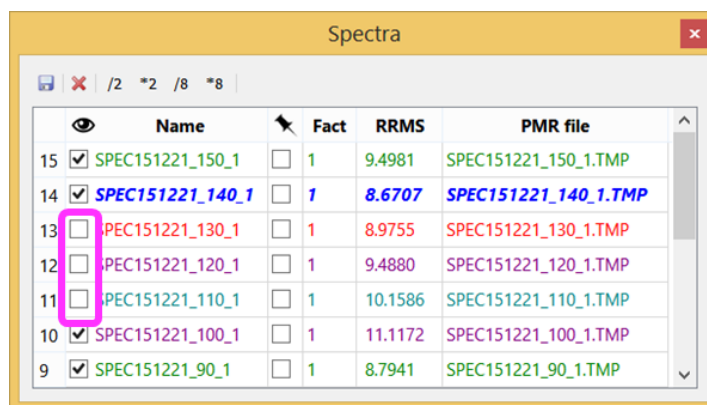
Kuva 43. Aktiivinen spektri ja toiminnalliset spektrit.

Spektreihin voidaan vaikuttaa Spektrit-paneelin kautta (Kuva 44). Paneeli saadaan auki valitsemalla valikosta **View**→**Spectra Panel**.

	<input checked="" type="checkbox"/>	Name	<input type="checkbox"/>	Fact	RRMS	PMR file
180	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_150_1	<input type="checkbox"/>	1	9.4981	SPEC151221_150_1.TMP
179	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_140_1	<input type="checkbox"/>	1	8.6707	SPEC151221_140_1.TMP
178	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_130_1	<input type="checkbox"/>	1	8.9755	SPEC151221_130_1.TMP
177	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_120_1	<input type="checkbox"/>	1	9.4880	SPEC151221_120_1.TMP
176	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_110_1	<input type="checkbox"/>	1	10.1586	SPEC151221_110_1.TMP
175	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_100_1	<input type="checkbox"/>	1	11.1172	SPEC151221_100_1.TMP
174	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_90_1	<input type="checkbox"/>	1	8.7941	SPEC151221_90_1.TMP
173	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_80_1	<input type="checkbox"/>	1	10.2028	SPEC151221_80_1.TMP
172	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_70_1	<input type="checkbox"/>	1	10.8759	SPEC151221_70_1.TMP
171	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_60_1	<input type="checkbox"/>	1	8.6018	SPEC151221_60_1.TMP
170	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_50_1	<input type="checkbox"/>	1	6.1193	SPEC151221_50_1.TMP
169	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_40_1	<input type="checkbox"/>	1	3.3926	SPEC151221_40_1.TMP
168	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_30_1	<input type="checkbox"/>	1	2.9229	SPEC151221_30_1.TMP
167	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_20_1	<input type="checkbox"/>	1	3.0983	SPEC151221_20_1.TMP
166	<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_10_1	<input type="checkbox"/>	1	3.3973	SPEC151221_10_1.TMP

Kuva 44. Spektrit-paneeli.

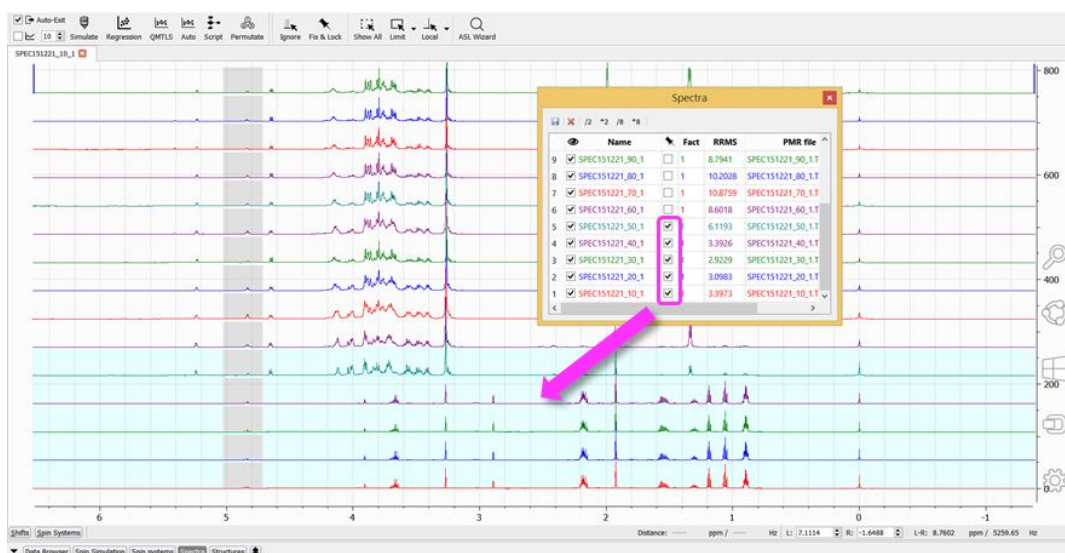
Taulukon ensimmäisen sarakkeen valintaruutujen kautta voidaan piilottaa spektrejä (Kuva 45). *Aktiivinen* spektri voidaan valita tuplaklikkaamalla spektriä ja se näkyy dialogissa lihavoituna ja kursivoituna.



<input type="checkbox"/>	Name	<input type="checkbox"/>	Fact	RRMS	PMR file
<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_150_1	<input type="checkbox"/>	1	9.4981	SPEC151221_150_1.TMP
<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_140_1	<input type="checkbox"/>	1	8.6707	SPEC151221_140_1.TMP
<input type="checkbox"/>	SPEC151221_130_1	<input type="checkbox"/>	1	8.9755	SPEC151221_130_1.TMP
<input type="checkbox"/>	SPEC151221_120_1	<input type="checkbox"/>	1	9.4880	SPEC151221_120_1.TMP
<input type="checkbox"/>	SPEC151221_110_1	<input type="checkbox"/>	1	10.1586	SPEC151221_110_1.TMP
<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_100_1	<input type="checkbox"/>	1	11.1172	SPEC151221_100_1.TMP
<input checked="" type="checkbox"/>	SPEC151221_90_1	<input type="checkbox"/>	1	8.7941	SPEC151221_90_1.TMP

Kuva 45. Spektrien piilotus ja aktiivinen spektri spektrit-paneelissa.

Dialogin kolmannen sarakkeen valintaruutujen kautta voidaan valita *toiminnalliset* spektrit (Kuva 46).



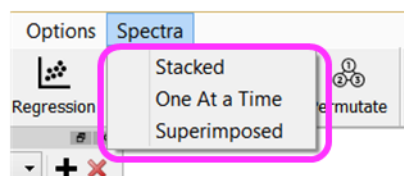
Kuva 46. Toiminnallisten spektrien valinta spektrit-paneelin kautta.

Spektrien prosessointi vaikuttaa ainoastaan *toiminnallisiin* spektreihin (Kuva 47).

	✓	Name	☐	Fact	RRMS	
15	✓	SPEC151221_150_1	☐	1	9.4981	SF
14	✓	SPEC151221_140_1	☑	1	8.6707	SF
13	✓	SPEC151221_130_1	☑	1	8.9755	SF
12	✓	SPEC151221_120_1	☑	1	9.4880	SF
11	✓	SPEC151221_110_1	☐	1	10.1586	SF
10	✓	SPEC151221_100_1	☑	1	11.1172	SF
9	✓	SPEC151221_90_1	☐	1	8.7941	SF
8	✓	SPEC151221_80_1	☐	1	10.2028	SF
7	✓	SPEC151221_70_1	☐	1	10.8759	SF

Kuva 47. Spektrien prosessointi spektrit-paneelin kautta.

Spektrejä voidaan tarkastella pinona (stacked), yksitellen (one at a time) ja päällekkäin (superimposed). Tarkastelutapa voidaan valita Spectra-valikon kautta (Kuva 48).

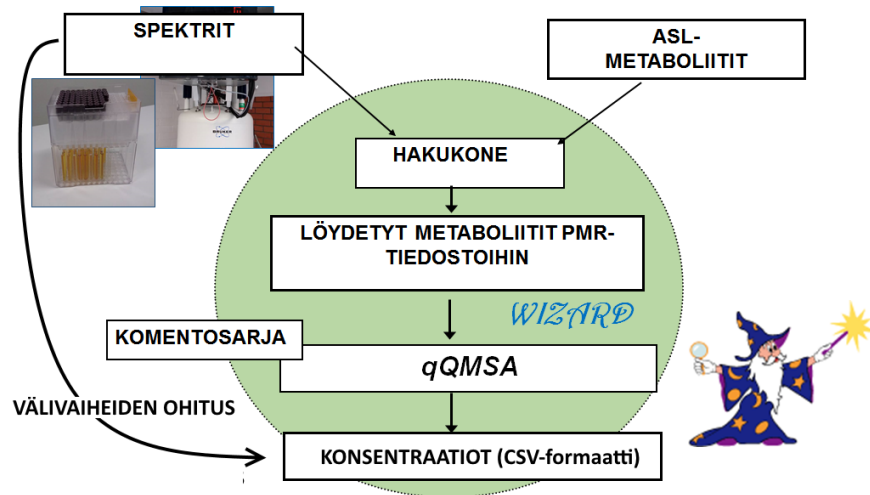


Kuva 48. Spektrien tarkastelutavan valitseminen.

Kun spektrejä tarkastellaan yksitellen, ainoastaan *aktiivinen* spektri näkyy pääikkunassa. Päällekkäin tarkastelu voi olla hyödyllistä esimerkiksi metabolomisissa tutkimuksissa.

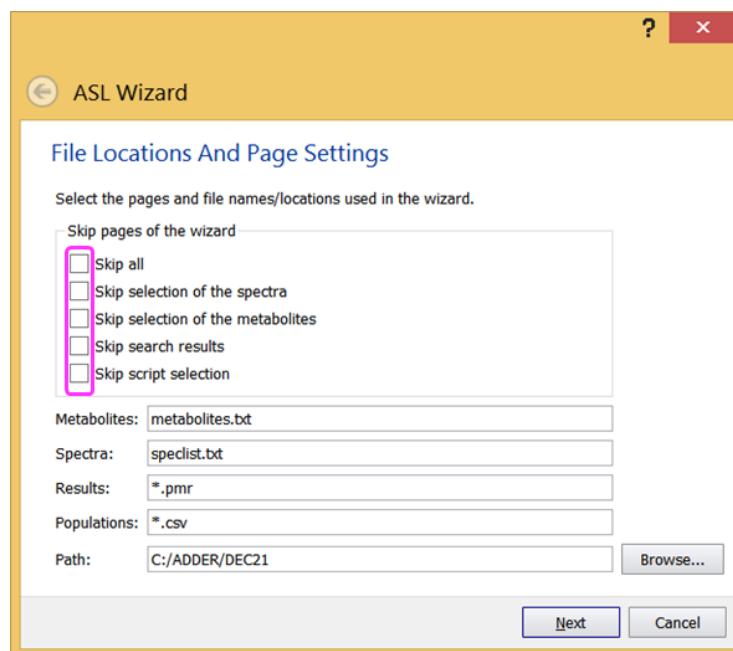
13 ASL-SPEKTRIKIRJASTO

QMSA:n ehkä lupaavin sovellutus on bionesteiden (seerumi, selkäydinneste, virtsa, erilaiset uutteen) kvantitatiivinen analyysi, jonka on tehnyt mahdolliseksi myös laitekehitys. Ohjelman avulla voidaan rakentaa, tallentaa ja käyttää tehokkaasti adaptiivisia spektrikirjastoja (ASL). Ohjelma sisältää ASL-apurin, joka mahdollistaa lähes automaattisen suurienkin spektriaineistojen analyysiin ja käsittelyyn muutamalla klikkauksella spektridatasta CSV-tiedostoon (Kuva 49). Seuraavissa kappaleissa käydään läpi tarkemmin apurin eri vaiheita.



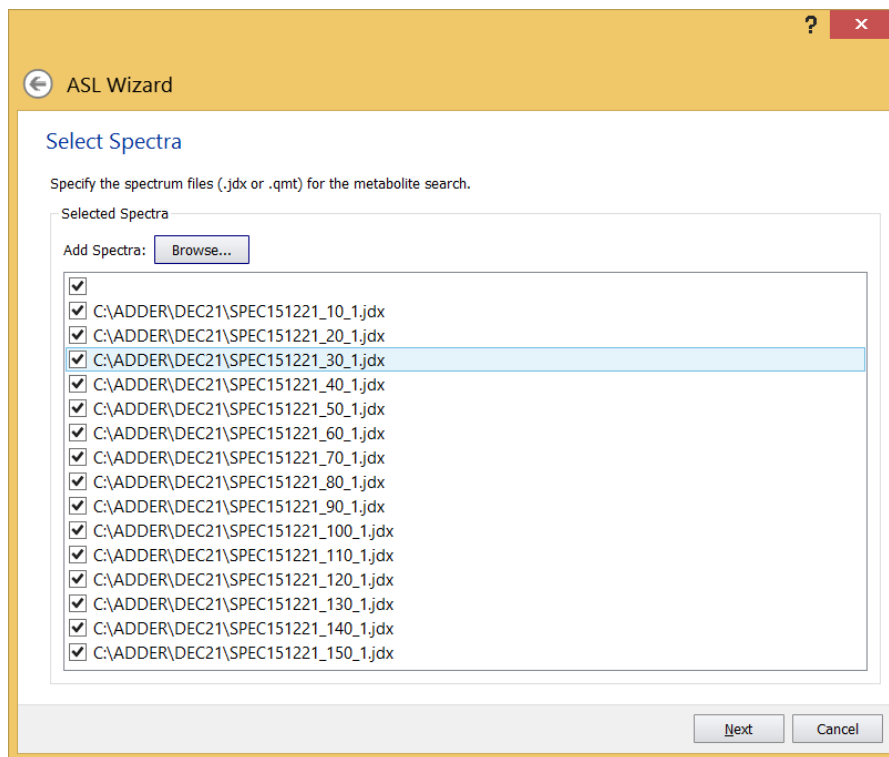
Kuva 49. Yleiskatsaus ASL-apurin toiminnasta. Ensimmäisenä valitaan spektrit ja metaboliitit, jotka lähetetään hakukoneelle, joka siirtää löydetty metaboliitit PMR-tiedostoihin. PMR-tiedostot analysoidaan käyttämällä komentosarjaa, minkä jälkeen tulokset tallentuvat CSV-tiedostoon. Kun oikea protokolla apurille on löydetty, käyttäjä voi ohittaa suurimman osan välivaiheista.

Apurin 1. sivulla valitaan tiedostonimet ja kansio, joita apuri käyttää eri vaiheissa (Kuva 50). Kentät ovat valmiiksi täytettyjä, eikä peruskäyttäjän tarvitse niitä muuttaa. Sivulla voidaan lisäksi valita, mitkä apurin sivuista hypätään yli. Apuri käyttää tällöin oletusasetuksina edellisellä kerralla käytettyjä asetuksia.



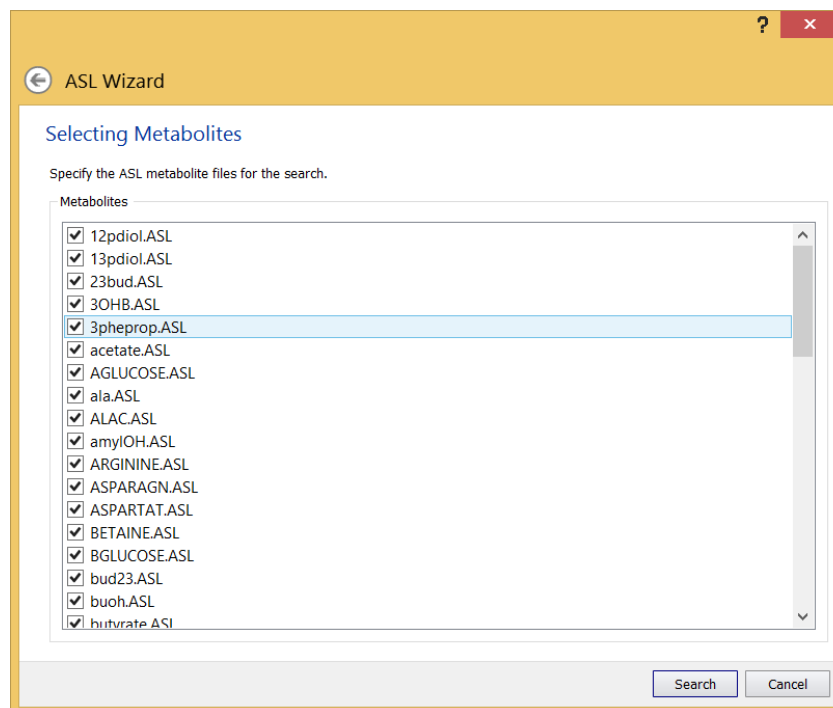
Kuva 50. ASL-apurin 1. sivu.

Apurin 2. sivulla valitaan spektrit, joille metaboliittihaku ja kvantifiointi suoritetaan (Kuva 51). Pääikkunan sisältämät spektrit ovat valmiiksi valittuina. Spektrejä voidaan lisätä **Browse**-painikkeen kautta.



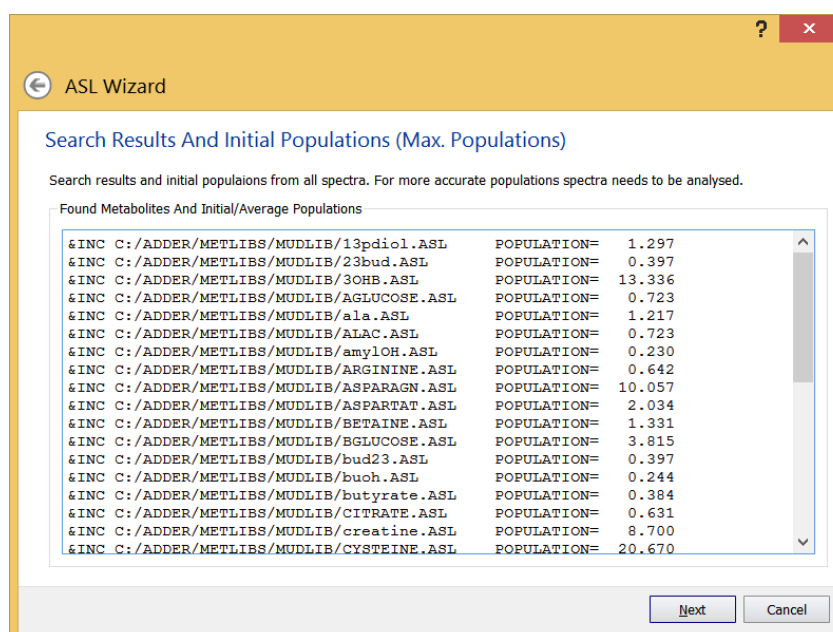
Kuva 51. ASL-apurin 2. sivu.

Apurin 3. sivulla valitaan ASL-kirjaston metaboliitit, joille metaboliittihaku suoritetaan.



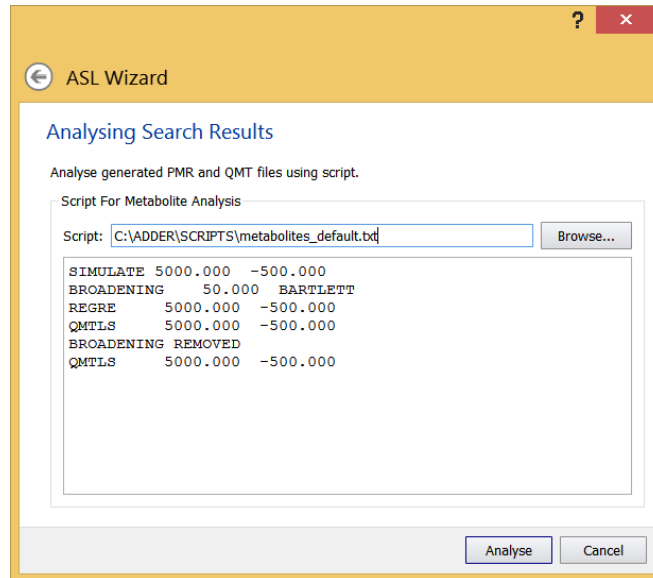
Kuva 52. ASL-apurin 3. sivu.

ASL-apurin 4. sivulla nähdään metaboliittihaun tulokset ja niiden alustavat populaatiot. Löydetyt metaboliitit analysoidaan tarkemmin seuraavalla sivulla.



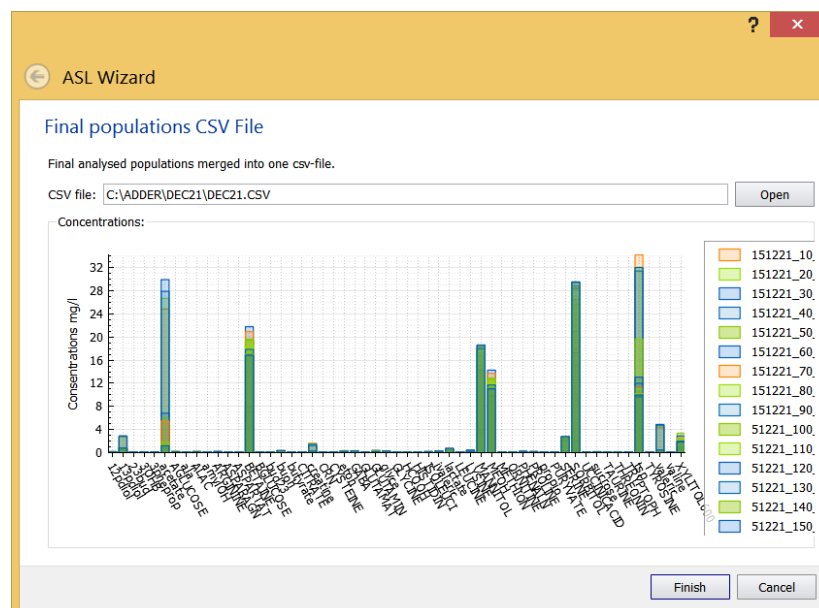
Kuva 53. ASL-apurin 4. sivu.

ASL-apurin 5. sivulla määritellään komentosarja, jonka avulla löydetty metabolitit analysoidaan. Oletuksena käytetään metabolites_default.txt-tiedostoa, joka löytyy ohjelman alikansiosta SCRIPTS.



Kuva 54. ASL-apurin 5. sivu.

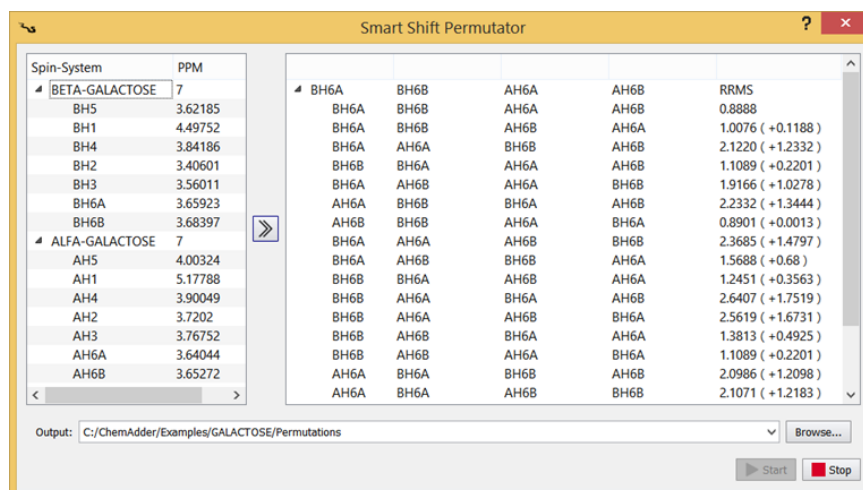
ASL-apurin viimeiseltä sivulta löytyvät analysoidut populaatiot, jotka esitetään histogrammina.



Kuva 55. ASL-apurin 6. sivu.

14 ÄLYKÄS SIIRTYMÄPERMUTAATTORI

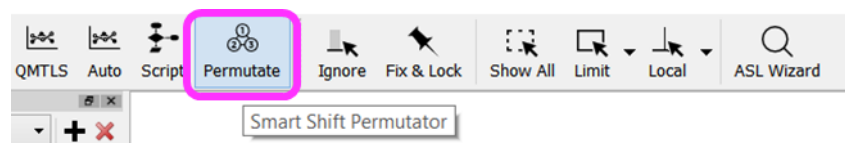
ChemAdder-ohjelma sisältää älykkään siirtymäpermutaattorin (Kuva 56), jota voidaan käyttää siirtymien paikkojen ja oikean järjestyksen löytämisessä.



Kuva 56. Älykäs siirtymäpermutaattori.

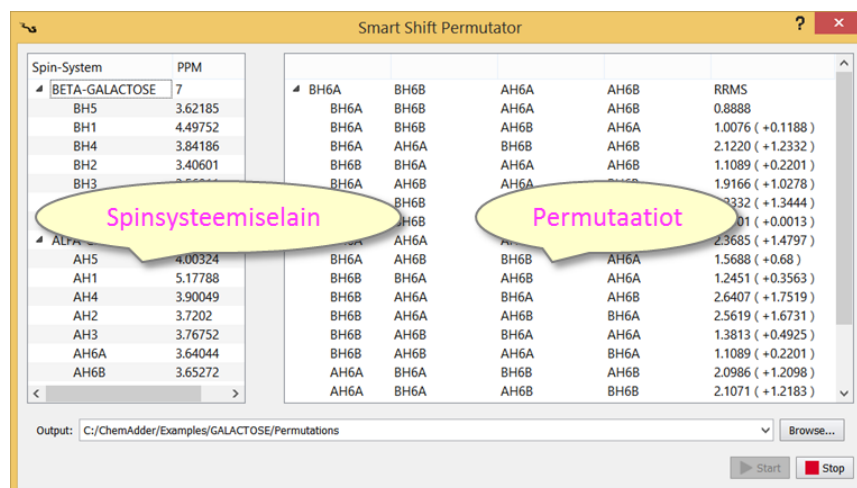
Permutaattorin käyttö voi olla tarpeellista esimerkiksi silloin, jos spektri on hyvin vaikeaselkoinen toisen kertaluvun vaikutuksesta. Permutaattori luo siirtymäjärjestyksiä yksi kerrallaan, minkä jälkeen ne analysoidaan kvanttimekaanisesti käyttämällä Bartlettin integraaleja ja kokonaisjuovansovitusta. Jos uusi järjestys on parempi kuin edellinen, permutaattori käyttää tätä tietoa luodessaan seuraavaa permutaatiota. Permutaattori arvioi permutaatioita siirtymien lokaalien ja kokonais-RMSE-arvojen perusteella.

Permutaattori saadaan auki klikkaamalla **Permutate**-painiketta työkalupalkista (Kuva 57).



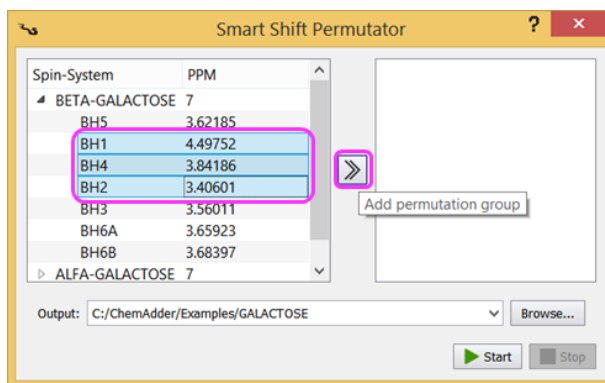
Kuva 57. Permutaattorin avaaminen.

Permutaattori sisältää spinsysteemiselaimen, jonka kautta voidaan valita permutoitavat siirtymät (Kuva 58).



Kuva 58. Älykkään siirtymäpermutaattorin alueet.

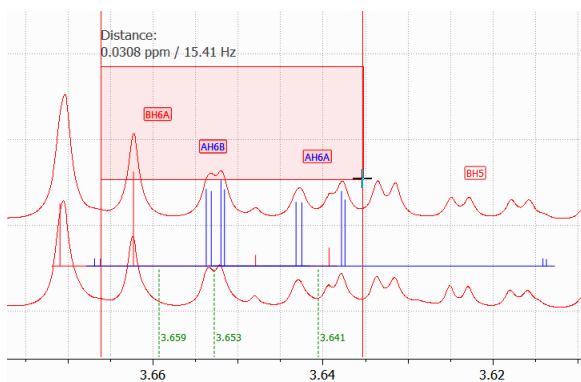
Spinsysteemiselainta voidaan käyttää permutoitavien siirtymien valintaan (Kuva 59).



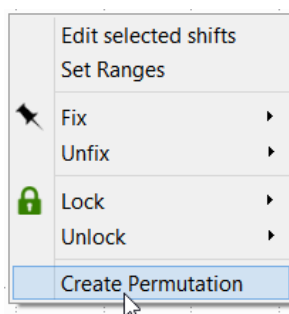
Kuva 59. Permutoitavien siirtymien valinta spinsysteemiselaimen kautta.

Permutoitavia siirtymiä voidaan valita myös pääikkunan kautta:

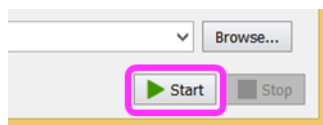
1. Valitaan permutoitavat siirtymät suorakaide-työkalun avulla.



2. Painetaan oikeaa hiiren näppäintä ja valitaan avautuvasta ponnahdusvalikosta **Create Permutation**.

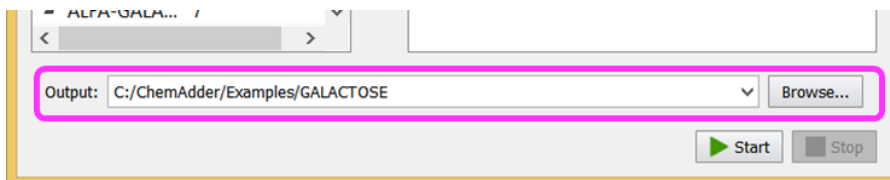


Kun siirtymät on valittu, permutaattori voidaan käynnistää **Start**-painikkeesta (Kuva 60).



Kuva 60. Siirtymäpermutaattorin käynnistäminen.

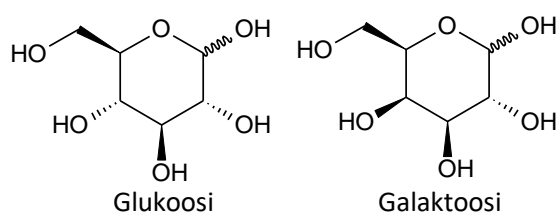
Permutaattori tallentaa jokaisesta permutaatioista QMT- ja PMR-tiedostot. Kohdesijainti tallennettaville tiedostoille näkyy **Output**-kentässä ja se voidaan muuttaa **Browse**-painikkeen kautta (Kuva 61).



Kuva 61. Kohdesijainnin valinta tallennettaville QMT- ja PMR-tiedostoille.

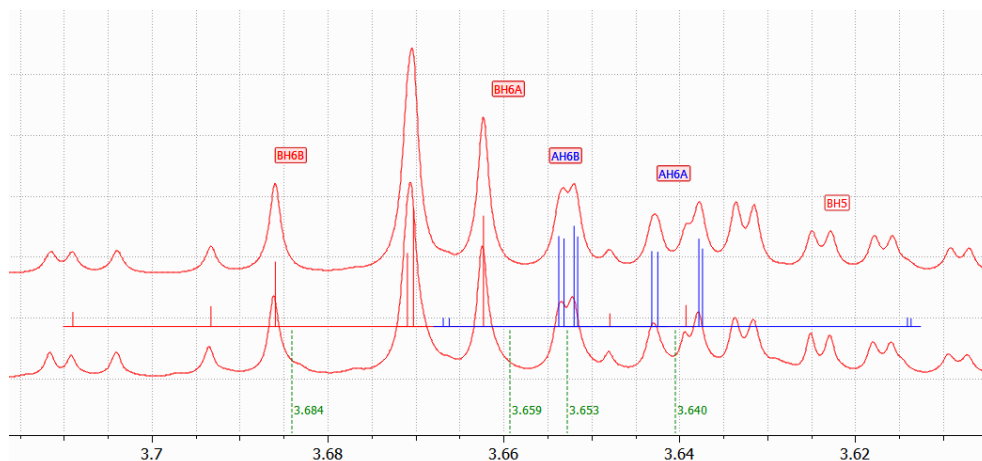
15 GALAKTOOSIN ANALYYSI

Ohjelmaa testattiin analysoimalla galaktoosin ^1H NMR -spektri. Spektri mitattiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen NMR-laboratoriossa, minkä jälkeen se muutettiin JDX-formaattiin. Alustavina spektriparametreina käytettiin aikaisemmin analysoidun glukoosin parametreja. Galaktoosi ja glukoosi ovat toistensa rakenneisomeerejä ja niiden ainoa rakenteellinen ero on 4'-hiileen liittyneen hydroksyyliiryhmän avaruudellinen asema (Kuva 62). Tästä syystä glukoosin spektriparametreja voitiin pitää hyvänä lähtökohtana analyysiä aloitettaessa.



Kuva 62. Glukoosin ja galaktoosin rakenteellinen ero on ainoastaan 4'-hiileen liittyneiden hydroksyyliiryhmien avaruudellinen asema.

1',2',3',4' -hiilien protonisignaalit ja kytkentävakiot pystyttiin päättämään silmämääräisesti ja käyttämällä apuna ASL-piikkipattereita sekä QMTLS- ja Autofit -analyysityökaluja. Ongelmaksi muodostui beta- sekä alfa-muotojen 6'-hiileen liittyneiden protonien (Kuva 63) toisen kertaluvun kytkeytyminen, jonka seurauksena niiden paikkoja ja keskinäistä järjestystä oli mahdotonta päätellä. Ongelma ratkaistiin käyttämällä älykästä siirtymäpermutaattoria. Permutaattorin avulla iteroitiin kaikki 24 (4!) erilaista siirtymäjärjestystä käyttämällä sumennusarvona 100:a Bartlettin integraalia ja siirtymien vaihteluvälinä arvoa 20 Hz. Sovituksen RMSE-arvoksi saatiin 0.9621 ja beta- ja alfamuotojen populaatioiden arvoiksi 0.669355 ja 0.330645. Sovitusta voidaan pitää erittäin hyvänä.



Kuva 63. Galaktoosin QMT-spektri ja 6'-hiileen liittyneiden protonien kemialliset siirtymät sekä ASL-piikkipatterit. Alfa-muodon siirtymät ja piikit näkyvät sinisellä ja beta-muodon punaisella.

Kemiallisten siirtymien spektriparametreja muokattiin pääasiassa pääikkunan kautta. Kytkeväkivioiden muokkaamiseen käytettiin parametritaulukot-paneelia. ASL-piikkipattereiden käyttö siirtymien paikkojen löytämisessä helpotti ja nopeutti analyysin tekemistä huomattavasti (kts. Kuva 25).

16 YHTEENVETO

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin käyttöliittymä (ChemAdder) tietokoneistettuun NMR-spektrianalyysiin erikoistuneeseen tietokoneohjelmaan, joka toimii yhdessä laskutoimituksia tekevän Fortran-ohjelman (SpinAdder) kanssa. Ohjelmisto tukee JCAMP-DX-spektriformaattia, mikä tekee siitä laitevalmistajista riippumattoman. Ohjelman omia formaatteja ovat QMT- ja PMR -formaatit. QMT-formaatti mahdollistaa havaitun, lasketun ja taustaspektrin tehokkaan tallennuksen. PMR-tiedosto sisältää analyysissä käytetyt spektriparametrit sekä siihen liittyviä tunnuslukuja ja informaatiota. Ohjelman sisältämä ROI-työkalu mahdollistaa 2D-spektristä saatavan tiedon muuttamiseen muotoon, joka mahdollistaa sen QMSA:n. Ohjelmisto soveltuu hyvin myös perinteiseen spektrianalyysiin ja sisältää siihen tarkoitettuja työkaluja.

Tietokoneistetun NMR-spektroskopian yksi tämän hetken lupaavimmista sovelluksista on erilaisten seosnäytteiden (seerumi, selkäydinneste, virtsa, erilaiset uutteen) kvantitatiivinen analyysi. Biologiset nesteet sisältävät tyypillisesti 10–50 merkittävää kvantifioitavaa yhdistettä laajalta pitoisuusalueelta. Esimerkiksi virtsasta on tunnistettavissa NMR-spektroskopian avulla yli 200 yhdistettä. Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantifiointi voi olla haastavaa johtuen spektrien monimutkaisuudesta ja signaalien päällekkäisyydestä. Tämän työn kokeellisen osan tarkoituksena oli kehittää ja testata ohjelmistoa (ChemAdder & SpinAdder), jonka avulla kvantitatiivisen analyysin tekeminen olisi mahdollisimman helppoa ja pitkälle automatisoitua.

Ohjelmistolla voidaan rakentaa, tallentaa ja käyttää tehokkaasti kohdistettuja adaptiivisia spektrikirjastoja (ASL), jotka sisältävät mahdollisten yhdisteiden spektrit parametritiedostoina kohdistettuna esimerkiksi yllämainituille seoksille. Parametritiedostojen koko on murto-osa alkuperäisistä spektreistä ja niitä käyttämällä analyysissä tarvittavat varsinaiset spektrit voidaan simuloida missä tahansa kentässä, käyttämällä mitä tahansa juovan muotoa tai leveyttä. Ohjelman sisältämä ASL-apuri mahdollistaa lähes automaattisen suurienkin spektriaineistojen käsittelyn muutamalla klikkauksella spektridatasta pylvädiagrammiin ja CSV-tiedostoon. ChemAdder-projektin kotisivu, posteriesitys ja video löytyvät osoitteesta <http://chemadder.com>.

17 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. R.J. Abraham, *Analysis of High Resolution NMR Spectra*, Elsevier, New York, 1971.
2. M. Balci, *Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy*, Elsevier, 2005.
3. C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. de Leeuw ja C. Altona, The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I. An empirical generalization of the Karplus equation, *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 2783-2792.
4. R. Laatikainen, P. Laatikainen, H. Martonen, M. Tiainen ja E. Hakalehto, Quantitative Quantum Mechanical NMR Analysis: the Superior Tool for Analysis of Biofluids, *In Proceedings of the 1st Int. Electron. Conf. Metabolomics*, Sciforum Electronic Conference Series, 1-30.11.2016, ss. 1-31.
5. P. Soininen, A.J. Kangas, P. Wurtz, T. Suna ja M. Ala-Korpela, Quantitative serum nuclear magnetic resonance metabolomics in cardiovascular epidemiology and genetics, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2015**, *8*, 192-206.
6. P. Soininen, A.J. Kangas, P. Wurtz, T. Tukiainen, T. Tynkkynen, R. Laatikainen, M. Jarvelin, M. Kahonen, T. Lehtimäki, J. Viikari, O.T. Raitakari, M.J. Savolainen ja M. Ala-Korpela, High-throughput serum NMR metabolomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism, *Analyt.*, **2009**, *134*, 1781-1785.
7. M. Tiainen, P. Soininen ja R. Laatikainen, Quantitative Quantum Mechanical Spectral Analysis (qQMSA) of (¹H) NMR spectra of complex mixtures and biofluids, *J. Magn. Reson.*, **2014**, *242*, 67-78.
8. G.B. Arfken ja H.J. Weber, *Mathematical Methods for Physicists*, 6, Academic Press, Orlando, 1985.
9. L.N. Trefethen ja D. Bau, *Numerical Linear Algebra*, 1, SIAM, Philadelphia, 1997.
10. E.D. Becker, *High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications*, 3, ACADEMIC PRESS, New York, 1969.
11. R. Laatikainen, M. Tiainen, S. Korhonen ja M. Niemitz, Computerized Analysis of High-resolution Solution-state Spectra. Kirjassa: R.K. Harris ja R.E. Wasylshen (toim.), *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
12. A.R. Quirt ja J.S. Martin, NMR spectra of symmetric molecules. I. The spin Hamiltonian for twofold symmetry, *J. Magn. Reson.*, **1971**, *5*, 318-327.
13. S. Castellano ja S.S. Bothner-By, Analysis of NMR Spectra by Least Squares, *J. Chem. Phys.*, **1964**, *41*, 3863-3869.
14. J.D. Swalen ja C.A. Reilly, Analysis of complex NMR spectra. An iterative method, *J. Chem. Phys.*, **1962**, *37*, 21-29.

15. R. Laatikainen, An application of ${}^nJ(\text{CH}_2, \text{H})$ and ${}^5J(\text{OH}, \text{H})$ long-range couplings in the conformational analysis of 2-hydroxybenzyl methyl ether in various solvents. Computational strategies for spectral analysis and determination of association thermodynamic parameters, *Magn. Reson. Chem.*, **1986**, *24*, 588-594.
16. R. Laatikainen, Dipolar coupling and solvent dependence of ${}^1\text{H}$, ${}^1\text{H}$ spin-spin coupling in naphthalene - Analysis of spectra containing overlapping lines, *J. Magn. Reson.*, **1988**, *78*, 127-132.
17. J. Heinzer, Iterative least-squares NMR lineshape fitting with use of symmetry and magnetic equivalence factorization, *J. Magn. Reson. (1969-1992)*, **1977**, *26*, 301-316.
18. P. Diehl, S. Sykora ja J. Vogt, Automatic Analysis of NMR Spectra: An Alternative Approach, *J. Magn. Reson.*, **1975**, *19*, 67-82.
19. D.S. Stephenson ja G. Binsch, Automated analysis of high-resolution NMR spectra. II. Illustrative applications of the computer program DAVINS, *J. Magn. Reson.*, **1980**, *37*, 409-430.
20. U. Weber ja H. Thiele, *NMR-Spectroscopy: Modern Spectral Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
21. G. Hägele, M. Engelhardt ja W. Boenigk, Simulation Und Automatisierte Analyse Von Kernresonanzspektren, *Wiley-VCH*, **1987**.
22. S.S. Golotvin ja V.A. Chertkov, Pattern recognition of the multiplet structure of NMR spectra, *Russ. Chem. Bull.*, **1997**, *46*, 423-430.
23. S.V. Zubkov, S.S. Golotvin ja V.A. Chertkov, VALISA: a new procedure for total lineshape analysis of NMR spectra. Conformational analysis of trans-1,2-dibromocyclopentane, *Russ. Chem. Bull.*, **2002**, *51*, 1222-1230.
24. R. Laatikainen, M. Niemitz, W.J. Malaisse, M. Biesemans ja R. Willem, A computational strategy for the deconvolution of NMR spectra with multiplet structures and constraints: analysis of overlapping ${}^{13}\text{C}$ - ${}^2\text{H}$ multiplets of ${}^{13}\text{C}$ enriched metabolites from cell suspensions incubated in deuterated media, *Magn. Reson. Med.*, **1996**, *36*, 359-365.
25. M.S. Bartlett, Periodogram analysis and continuous spectra, *Biometrika*, **1950**, *37*, 1-16.
26. Å Björck, *Numerical Methods for Least Squares Problems*, SIAM, Philadelphia, 1996.
27. K.E. Atkinson, *An Introduction to Numerical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1989.
28. R. Laatikainen, Theory of NMR-simulation, *Luentomateriaali*, **2007**.

29. Tutorial on Principal Component Analysis, http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf, Department of Computer Science - University of Otago (12.9.2016).
30. Luento 5: Faktori- ja pääkomponenttianalyysi, people.uta.fi/~petri.nokelainen/s33/luennot/luento5.ppt, Kasvatustieteiden yksikkö Tampereen Yliopisto (13.9.2016).
31. R.O. Duda, P.E. Hart ja D.G. Stork, *Pattern Classification*, 2, Wiley-Interscience, 2000.
32. T. Ramirez, M. Daneshian, H. Kamp, F.Y. Bois, M.R. Clench, M. Coen, B. Donley, S.M. Fischer, D.R. Ekman, E. Fabian, C. Guillou, J. Heuer, H.T. Hogberg, H. Jungnickel, H.C. Keun, G. Krennrich, E. Krupp, A. Luch, F. Noor, E. Peter, B. Riefke, M. Seymour, N. Skinner, L. Smirnova, E. Verheij, S. Wagner, T. Hartung, B. van Ravenzwaay ja M. Leist, Metabolomics in toxicology and preclinical research, *ALTEX*, **2013**, *30*, 209-225.
33. J.M. Cevallos-Cevallos ja J.I. Reyes-De-Corcuera, Metabolomics in food science, *Adv. Food Nutr. Res.*, **2012**, *67*, 1-24.
34. H. Tweeddale, L. Notley-McRobb ja T. Ferenci, Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool ("Metabolome") Analysis, *J. Bacteriol.*, **1998**, *180*, 5109-5116.
35. R. Wang-Sattler, Z. Yu, C. Herder, A.C. Messias, A. Floegel, Y. He, K. Heim, M. Campillos, C. Holzapfel, B. Thorand, H. Grallert, T. Xu, E. Bader, C. Huth, K. Mittelstrass, A. Doring, C. Meisinger, C. Gieger, C. Prehn, W. Roemisch-Margl, M. Carstensen, L. Xie, H. Yamanaka-Okumura, G. Xing, U. Ceglarek, J. Thiery, G. Giani, H. Lickert, X. Lin, Y. Li, H. Boeing, H.G. Joost, M.H. de Angelis, W. Rathmann, K. Suhre, H. Prokisch, A. Peters, T. Meitinger, M. Roden, H.E. Wichmann, T. Pischon, J. Adamski ja T. Illig, Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics, *Mol. Syst. Biol.*, **2012**, *8* 5.5.2017.
36. E.G. Armitage ja C. Barbas, Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, *87*, 1-11.
37. A.H. Zhang, H. Sun ja X.J. Wang, Recent advances in metabolomics in neurological disease, and future perspectives, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, 8143-8150.
38. J.J. Ellinger, R.A. Chylla, E.L. Ulrich ja J.L. Markley, Databases and Software for NMR-Based Metabolomics, *Current Metabolomics*, **2013**, *1*, 10.2174/2213235X11301010028.
39. A.H. Emwas, The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research, *Methods Mol. Biol.*, **2015**, *1277*, 161-193.
40. S. Ravanbakhsh, P. Liu, T.C. Bjordahl, R. Mandal, J.R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner ja D.S. Wishart, Accurate,

Fully-Automated NMR Spectral Profiling for Metabolomics, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0124219.

41. U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer ja B. Waibel, Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, *38*, 806-812.
42. R. Espina, L. Yu, J. Wang, Z. Tong, S. Vashishtha, R. Talaat, J. Scatina ja A. Mutlib, Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a quantitative tool to determine the concentrations of biologically produced metabolites: implications in metabolites in safety testing, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *22*, 299-310.
43. X. Liu, M.X. Kolpak, J. Wu ja G.C. Leo, Automatic analysis of quantitative NMR data of pharmaceutical compound libraries, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 6914-6918.
44. G.F. Pauli, T. Godecke, B.U. Jaki ja D.C. Lankin, Quantitative ¹H NMR. Development and potential of an analytical method: an update, *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 834-851.
45. P.A. Hays, Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures, *J. Forensic Sci.*, **2005**, *50*, 1342-1360.
46. P. Maes, Y.B. Monakhova, T. Kuballa, H. Reusch ja D.W. Lachenmeier, Qualitative and Quantitative Control of Carbonated Cola Beverages Using ¹H NMR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 2778-2784.
47. S.K. Bharti ja R. Roy, Quantitative ¹H NMR spectroscopy, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2012**, *35*, 5-26.
48. R.R. Ernst ja W.A. Anderson, Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance, *Rev. Sci. Instrum.*, **1966**, *37*, 93-102.
49. E.J. Saude, C.M. Slupsky ja B.D. Sykes, Optimization of NMR analysis of biological fluids for quantitative accuracy, *Metabolomics*, **2006**, *2*, 113-123.
50. S.K. Bharti, N. Sinha, B.S. Joshi, S.K. Mandal, R. Roy ja C.L. Khetrpal, Improved quantification from ¹H-NMR spectra using reduced repetition times, *Metabolomics*, **2008**, *4*, 367-376.
51. G.F. Pauli, B.U. Jaki ja D.C. Lankin, Quantitative ¹H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis, *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 133-149.
52. C.K. Larive, D. Jayawickrama ja L. Orfi, Quantitative analysis of peptides with NMR spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, **1997**, *51*, 1531-1536.

