

# KONFORMASJONSANALYSE OG TEORETISKE BEREGNINGER AV MORFIN



**Master i Biomedisin**

**2013**

**Linda Syversen**



# Konformasjonsanalyse og teoretiske beregninger av morfin

Linda Syversen

Masteroppgave 60 sp

21.mai 2013

Master i Biomedisin  
Fakultet for Helsefag  
Høgskolen i Oslo og Akershus

Hovedveileder: Dr. M. Rachel Suissa, HIOA

Biveileder: Prof. Harald Møllendal, UiO



HØGSKOLEN I OSLO  
OG AKERSHUS



## FORORD

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Høgskolen i Oslo og Akershus og Universitet i Oslo skoleåret 2012/2013. Det har vært et meget interessant og lærerikt år! Den største årsaken til at dette har blitt et vellykket år er min utrolige dyktige veileder Dr. Michal Rachel Suissa. Hun er et vandrende leksikon innen legemiddelkemi, og alltid tilgjengelig til å svare på spørsmål. Tusen, tusen takk for alt hun har gjort for meg dette året. Jeg er også takknemlig for hvor godt jeg har blitt tatt imot av hennes kollegaer ved HIOA.

En stor takk til Professor Harald Møllendal ved kjemisk institutt, UiO, som har hjulpet oss med de teoretiske beregninger og kyndig veiledning for tolkning av disse. Uten hans hjelp hadde ikke denne oppgaven vært mulig å gjennomføre.

Takk til Siri, min medstudent som jeg har delt kontor med dette året. Det har vært så godt å ha noen i samme situasjon til å dele alle gleder, bekymringer og frustrasjoner med.

Jeg vil også takke min arbeidsgiver, Sykehuset Østfold, og seksjonsleder Pål Nilsen som har lagt til rette slik at det har vært økonomisk mulig å kombinere jobb og studier. Alle mine hyggelige kolleger på seksjon for automasjon ved senter for laboratoriemedisin, fortjener også en takk for all støtte og oppmuntrende ord i denne tiden.

Til slutt vil jeg takke Henning, mannen min, for all støtte og oppmuntring underveis. Barna mine, Emmet og Maria, fortjener også en takk, som bare ved sitt nærvær har gitt meg gylne pauser fra tykke bøker, tunge artikler og pc-skriving!

Oslo 21.mai 2013



Forsidebildene er hentet fra: (1)

## INNHALDSFORTEGNELSE

|   |        |
|---|--------|
| FORORD .....  | - 3 -  |
| INNHALDSFORTEGNELSE .....                           | - 4 -  |
| FORKORTELSER: .....                                 | - 7 -  |
| ORDLISTE .....                                      | - 8 -  |
| SAMMENDRAG .....                                    | - 9 -  |
| SUMMARY .....                                       | - 10 - |
| 1. MÅLET MED MASTEROPPGAVEN .....                   | - 11 - |
| 2. TEORI .....                                      | - 12 - |
| 2.1. Hvorfor opioider? .....                        | - 12 - |
| 2.2. Opioider og samfunnet .....                    | - 12 - |
| 2.3. Rusmiddelanalyser i Sykehuset Østfold .....    | - 14 - |
| 2.4. Smerter og smertesignalering .....             | - 15 - |
| 2.5. Kroppens egne smertestillende mekanismer ..... | - 16 - |
| 2.6. Morfins Historie .....                         | - 17 - |
| 2.7. Bivirkninger .....                             | - 18 - |
| 2.8. Opiat og opioid .....                          | - 19 - |
| 2.9. Det opioide reseptorsystemet .....             | - 21 - |
| μ-reseptorer .....                                  | - 22 - |
| κ-reseptorer .....                                  | - 22 - |
| δ-reseptorer .....                                  | - 23 - |
| σ-reseptorer .....                                  | - 23 - |
| 2.10. Morfins kompleksering med reseptorene .....   | - 24 - |
| 2.11. Struktur-Aktivitet-Relasjoner (SAR) .....     | - 27 - |
| Fri rotasjon rundt enkeltbindinger .....            | - 27 - |
| Nitrogeninversjoner .....                           | - 29 - |
| Ringinversjon .....                                 | - 30 - |
| 3. METODER .....                                    | - 32 - |
| 3.1. Molekyl byggesett .....                        | - 32 - |
| 3.2. Molekylær Mekanikk (MM) .....                  | - 33 - |
| 3.3. Kvantekjemi .....                              | - 35 - |
| B3LYP - en tetthetsfunksjonal-metode (DFT) .....    | - 36 - |
| MP2 – en ab initio metode .....                     | - 37 - |
| Basissett 6-31G** og cc-pVTZ .....                  | - 37 - |
| B3LYP vs. MP2 .....                                 | - 37 - |

|  |        |
|--|--------|
| Abel.....  | - 37 - |
| Kvantekjemiske beregninger .....                                 | - 38 - |
| 4. RESULTATER OG DISKUSJON .....                                 | - 39 - |
| 4.1. Planlegging av forsøkene .....                              | - 39 - |
| Gass- eller væskefase? .....                                     | - 39 - |
| Morfin's stereokjemi.....  | - 40 - |
| Konformasjonsanalyse av morfin .....                             | - 41 - |
| Organisering av forsøkene .....                                  | - 43 - |
| 4.2. Forsøkene .....   | - 44 - |
| DEL A: Ammoniakk/Ammonium .....                                  | - 44 - |
| DEL B: Nitrogeninversjon i morfin.....                           | - 46 - |
| DEL C: Beregninger av de stabile konformerene.....               | - 50 - |
| Gruppe 1: 3-OH syn – 6-OH g <sup>+</sup> .....                   | - 53 - |
| Gruppe 2: 3-OH syn – 6-OH anti .....                             | - 55 - |
| Gruppe 3: 3-OH syn – 6-OH g <sup>-</sup> .....                   | - 56 - |
| Gruppe 4: 3-OH anti – 6-OH g <sup>+</sup> .....                  | - 58 - |
| Gruppe 5: 3-OH anti – 6-OH anti .....                            | - 59 - |
| Gruppe 6: 3-OH anti – 6-OH g <sup>-</sup> .....                  | - 60 - |
| Oppsummering av de stabile konformerene .....                    | - 61 - |
| DEL D: Skanninger .....  | - 64 - |
| Forsøk I: Rotasjon av 6-OH. Fast: 3-OH syn.....                  | - 66 - |
| Forsøk II: Rotasjon av 6-OH. Fast: 3-OH anti .....               | - 68 - |
| Forsøk VI: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH anti .....               | - 70 - |
| Forsøk VII: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH g <sup>+</sup> .....    | - 72 - |
| Forsøk VIII: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH g <sup>-</sup> .....   | - 74 - |
| 4.3. Videre diskusjon av utvalgte resultater .....               | - 75 - |
| Mulliken atomladninger.....                                      | - 75 - |
| Vinkler .....  | - 76 - |
| Geometrien rundt det alifatiske aminet.....                      | - 77 - |
| Konturer og overflater .....                                     | - 77 - |
| Rotasjon rundt enkeltbindinger.....                              | - 78 - |
| Hvorfor får vi ikke C6OH-syn?.....                               | - 79 - |
| H <sup>+</sup> effekten.....                                     | - 79 - |
| Hvorfor vi får g <sup>-</sup> i morfinum men ikke i morfin?..... | - 80 - |
| Stol eller twist-båt? .....                                      | - 80 - |

|   |         |
|---|---------|
| Hvilke(n) er den bioaktive konformer(en)? .....                   | - 81 -  |
| 5. KONKLUSJON .....   | - 83 -  |
| KILDER .....  | - 85 -  |
| VEDLEGG 1: Rus-statistikk .....                                   | - 87 -  |
| VEDLEGG 2: Pakningsvedlegg Opiatanalyser Siemens Advia 1650 ..... | - 88 -  |
| VEDLEGG 3: Antall rusmiddelanalyser i Sykehuset Østfold .....     | - 90 -  |
| VEDLEGG 4: Metabolisme av morfin.....                             | - 93 -  |
| VEDLEGG 5: Mulliken atomladning .....                             | - 95 -  |
| VEDLEGG 6: Vinkler .....  | - 107 - |
| VEDLEGG 7: Sammenligninger av skanninger .....                    | - 110 - |

**FORKORTELSER:**

Aks: Aksial

BHB: Blod-hjerne-barrieren

CNS: Sentralnervesystemet

DDD: Definerte døgn-doser

Ekv: Ekvatorial

IUPAC: the International Union of Pure and Applied Chemistry

IUPHAR: The International Union of Basic and Clinical Pharmacology

LM: Legemiddel

M: Morfin

M<sup>+</sup>: Morfinum

MM: Molekylær Mekanikk

NBE: non-bondings-elektroner (ledige elektronpar)

PNS: Perifere nervesystemet

SAR: Struktur-Activity-Relation, Struktur-Aktivitet-Relasjon

TS: Transition state, Overgangstilstand

-----  
*a: anti*

*ac: anti-clinal*

*g: gauche*

*s: syn*

*sc: syn-clinal*

## ORDLISTE

**Agonist:** Legemiddel som binder til en reseptor og stimulerer reseptorens aktivitet.

**Analgetika:** Legemidler som opphever eller lindrer smerte.

**Antagonist:** Legemiddel som binder til reseptor, men som mangler effekt. Den blokkerer og stabiliserer reseptoren i den tilstanden den var i da den komplekserte seg.

**Diastereomerer:** Forbindelser der atomene er likt bundet sammen, men de er ikke speilbilder av hverandre. Dette skyldes at de har ulike konfigurasjoner for et eller flere kirale sentre, men ikke for alle. Diastereomerer har ulike kjemiske og fysiske egenskaper.

**Enantiomer:** To molekyler som inneholder de samme atomene, og de er likt bundet sammen, men har speilvendt romlig oppbygning og inneholder et kiralt senter. Molekylene har like kjemiske og fysiske egenskaper, bortsett fra at de roterer planpolarisert lys i motsatt retning.

**Farmakofor:** Den delen av molekylet som binder til reseptor.

**Kiralt senter:** Et asymmetrisk punkt i molekylet, for eksempel et atom som er bundet til fire ulike atomer/atomgrupper.

**Konfigurasjon:** Molekyler med samme kjemiske formel, men atomene er bundet sammen på ulike måter. Kan ikke interkonverteres uten å bryte og nydanne kovalentiske bindinger.

**Konformasjon:** Molekyler med samme kjemiske formel, og atomene er bundet sammen på samme måte, men med ulik orientasjon i rommet. Kan interkonvertere ved rotasjon rundt enkeltbindinger. (Ved spesielle tilfeller, særlig ved høye temperaturer, kan det oppstå rotasjoner rundt dobbeltbindinger.)

**Konformasjonsanalyse:** Studie av molekylenes romlige oppbygning og hvordan disse kan gå fra den mest stabile konformerer over i alternative mindre stabile konformerer via en eller flere en eller flere energibarrierer.

**Konformer:** En bestemt anordning av substituenten på en gitt atom skjelett-konformasjon.

**Stereokjemi:** Romlige forhold ved molekylet som optisk isomeri og cis/trans isomeri



## SAMMENDRAG

Morfin og morfinderivater er de beste smertestillende medisinene vi har i dag. Dessverre har disse medikamentene en mørk bakside i form av alvorlige bivirkninger som blant annet eufori, avhengighet og respirasjonsundertrykkelse. Til tross for omfattende forskning, har man hittil ikke klart å utvikle morfinderivater med like god smertestillende effekt, men med færre alvorlige bivirkninger. Mye forskningsarbeid har blitt utført i forbindelse med fremstilling av ulike derivater uten å lykkes nevneverdig. I denne oppgaven tar vi ett skritt tilbake for å se på molekylstrukturen til morfin. Kunnskap om morfins konformasjonelle adferd samt molekylets topologi i de ulike konformasjoner, både i nøytrale og ladede former, kan bidra til en bedre forståelse av molekylets komplekseringsmønster og dermed være et mulig utgangspunkt i søken etter nye derivater med færre bivirkninger.

Morfin har fem kirale sentra, og dermed 64 mulige diastereomerer, hvorav kun en bioaktiv. Dataprogrammet ChemDraw og MM2 minimaliseringer ble brukt for å finne molekylets koordinater. For å sikre at vi jobbet med riktig stereoisomer, sjekket vi atom-koordinatene opp mot morfins krystallstruktur som ble publisert i 1968.<sup>(2)</sup> Koordinatene ble deretter overført til en superdatamaskin (Abel) ved UIO for videre kvantemekaniske beregninger ved hjelp av programvaren Gaussian 09. Det ble brukt både B3LYP/cc-pvtz og MP2/cc-pvtz beregningsmetoder for å sikre kvaliteten på resultatene. Disse metodene gir beregninger av meget høy kvalitet på et nivå som ikke var mulig for bare 2-3 år siden for så store strukturer som morfin. Resultatene fra beregningene ble brukt i vår konformasjonsanalyse, som det legges mest vekt på i denne oppgaven. Dataprogrammene GaussView, ChemDraw og Chem3D ble benyttet til dette formålet.

Resultatene vi fant var overveldende. Totalt ble det beregnet 8 stabile former av morfin og 12 av morfinum, alle i gass fase. Det ble også utført 18 skannings forsøk. Morfin er et relativt stort, komplekst og rigid molekyl, med to OH-grupper på den ene siden og et 3° amin som er inkorporert i en seksring på den andre siden av molekylet. Resultatene viser at rotasjoner av de to OH-gruppene påvirker hverandre, og at nitrogeninversjon påvirker de to OH-gruppens konformasjonelle adferd. Addering av en H<sup>+</sup> til det alifatiske aminet i morfin førte til endringer i hele molekylets topologi, og dermed også til endringer i OH-gruppens konformasjonsadferd. Dette er viktig informasjon da det er allment akseptert at det er den ladede formen, morfinum, som bindes til reseptorene i CNS. Vi fant også oppsiktsvekkende resultater rundt geometrien i ekvatorial og aksial posisjon av N-metylgruppen.

Konformasjonsanalysen og de teoretiske beregningene som ble gjort her, danner et godt utgangspunkt for videre forskning innen dette feltet.

## SUMMARY

Morphine and morphine derivatives are the best analgesic medicine we have today. Unfortunately, these medications have a dark side in the form of serious side effects including euphoria, addiction and respiration depression. Despite extensive research, one has so far failed to develop morphine derivatives with equal analgesic effect, but with fewer serious side effects. Much research has been done by adding or removing various substituents in the molecule without significant success. In this paper we take a step back to look at the molecular structure of morphine. Understanding of morphine conformational behavior and knowledge of the molecule topology in different conformations in both neutral and charged forms can contribute to a better understanding of the molecule complex pattern and thus be a good starting point in the search for new derivatives with fewer side effects.

Morphine has five chiral centers, resulting in 64 possible diastereomers, of which only one is biologically active. The computer program ChemDraw with MM2 minimal implementations were used to find the molecule's coordinates. To ensure that we dealt with properly stereoisomer, we checked the atomic coordinates against morphine crystal structure published in 1968.<sup>(2)</sup> The coordinates were then transferred to a supercomputer (Abel) by UiO for further quantum mechanical calculations using the software Gaussian 09. It was used both B3LYP/cc-pvtz and MP2/cc-pvtz computational methods to ensure the quality of the results. These methods give us estimates of very high quality at a level that was not possible for only 2-3 years ago for such large structures as morphine. The results of the calculations was used to a conformation analyzes as it will be most emphasized in this paper. We studied the results using computer programs GaussView, ChemDraw and Chem3D.

The results we found were overwhelming. In total, calculations showed 8 stable forms of morphine and 12 stable forms of morphinum. 18 scanning trials were also performed. Morphine is a relatively large, complex and rigid molecule, with two OH groups on one side and a 3° amine as incorporated in a six ring on the other side. The results show that the rotations of the two OH groups influence one another and that nitrogeninversion influenced the two OH groups conformational behavior. The addition of an H<sup>+</sup> in the nitrogen of morphine, also resulted in changes in the molecule topology, and thus changed the conformation behavior of the two OH groups. This is important information as it is widely accepted that it is the charged form, morphinum, which binds to receptors in the CNS. We also found startling results about the geometry of the equatorial and axial position of the N-methyl group. The conformation analysis and the theoretical calculations that were made here, provides a good starting point for further research in this field.

## 1. MÅLET MED MASTEROPPGAVEN

Smertebehandling er uten tvil et av de høyest prioriterte områder for utvikling av nye legemidler. Til tross for mange år med forskning, er opioider fremdeles de beste smertestillende legemidler vi har.(3) Problemet ved bruk av opioider er de alvorlige bivirkningene som avhengighet og respirasjonsstans. Kjennskap til de(n) konformasjonen(e) til morfin som gir analgetisk effekt og de(n) som står for andre effekter kan være et godt utgangspunkt for design av nye derivater. Vi mener det er nødvendig med en konformasjonell analyse og teoretiske beregninger for å forstå de ulike konformerenes stereokjemiske variasjoner.

Følgende spørsmål ønsker vi svar på:

- Hvilke av morfins mange konformasjoner er de stabile?
- Påvirker de to OH-gruppene hverandres konformasjonsatferd?
- Påvirker de to OH-gruppenes konformasjonelle atferd nitrogen inversjon og visa versa?
- Har den ladede formen, altså morfinum-formen, noen effekt på den konformasjonelle atferden til de to OH-gruppene?
- Hvis ja, har den da samme effekt på begge formene, aksial og ekvatorial, eller ikke?
- Hvilke(n) av de mange konformerene er de(n) bioaktive?
- Er ring D i den bioaktive formen i stol eller twist-båt konformasjon?

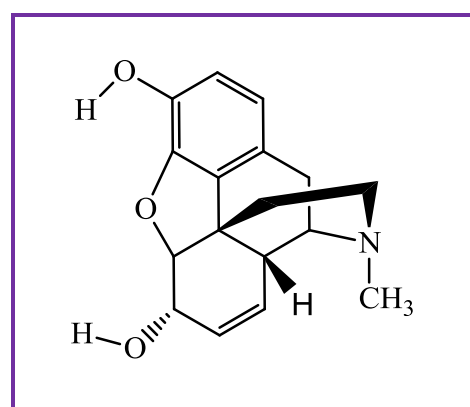
Hensikten er å danne et bedre grunnlag for videre forskning, der modifisering av strukturen til morfin forhåpentligvis kan gi morfinderivater med god analgetisk effekt, men med færre alvorlige bivirkninger.

## 2. TEORI

### 2.1. Hvorfor opioider?

De aller fleste mennesker opplever ulike smerter i løpet av livet. Allerede som små barn møter man smerter i form av skrubbsår, blåmerker, muskelverk ved feber og lignende. Ofte vil man prøve å dempe disse smertene ved hjelp av reseptfrie smertestillende som for eksempel paracetamol og ibuprofen, noe som regnes som relativt harmløse medikamenter.

Sterke smerter på grunn av alvorlige skader etter ulykker, større operasjoner eller som følge av ulike sykdommer som for eksempel kreft, krever sterkere analgetika. Opioider har den beste smertestillende effekten av alle medikamenter som vi kjenner til, og er den som blir mest brukt ved sterke smerter. Dessverre har disse medisinene en bakside i form av alvorlige bivirkninger som blant annet avhengighet, eufori og respirasjonshemming.<sup>(3)</sup> Mange som har vært igjennom store traumer opplever å bli avhengige av opioider som følge av behandlingen. Dette fører til en ekstra belastning i form av en avvennings-prosess som ikke alltid er vellykket. Avhengighet til medikamenter og andre rusmidler er ofte et tabubelagt problem og en stor belastning for de som blir rammet.



Figur 1: Molekylstrukturen til Morfin

Denne masteroppgaven tar for seg konformasjonsanalyse og teoretiske beregninger av morfin. Til tross for den omfattende forskningen som hittil er blitt gjort på morfin og dets derivater, finnes det fortsatt ingen fullstendig analyse av molekylenes konformasjonelle atferd i dens nøytrale og ladede form.

Ved første øyekast skulle man tro at morfin er så pass rigid med sine mange kondenserte ringer, at her er det ikke stort å hente når det gjelder konformasjonell atferd. Sannheten er at molekylet i prinsippet kan eksistere i minst 144 ulike konformasjoner og overgangstilstander (TS) slik vi skal se på senere.

### 2.2. Opioider og samfunnet

Rusmidler er stoffer som kan inntas på ulike måter for å gi en form for velbehag og dempe ubehagelige følelser. Det er stor forskjell på virkninger og bivirkninger blant de ulike stoffene. Ett eksempel på "rusmiddel" som er en naturlig del av hverdagen til mange, er

koffein som finnes både i kaffe og te. Koffein regnes vel som et ganske harmløst middel som i verste fall tar fra oss nattesøvnen om det inntas for sent. Men for de fleste rusmidler innebærer det en viss risiko ved bruk, fra relativt små bivirkninger som dårlig søvn til alvorlige og livstruende bivirkninger som respirasjonsstans. Rusmidler kan grovt deles inn i tre hovedtyper etter virkningsmønster:

- Dempende: For eksempel Opioider, Alkohol, Cannabis, Benzodiazepiner
- Oppkvikkende: For eksempel Kokain, Amfetamin, Nikotin, Koffein, Khat
- Hallusinogene: For eksempel LSD, spiss fleinsopp

Det er viktig å merke seg at de kan også deles inn i andre kategorier, og at ett stoff kan ha flere ulike virkninger.

Morfin og morfinderivater har en dobbeltrolle, idet de både kan inntas som legale analgetika og som illegale rusmidler. Som i en rekke andre land så er mange narkotiske stoffer forbudt i Norge. Noen narkotiske stoffer kan man derimot få som legale legemidler på resept fra legen under visse betingelser, men det illegale markedet er stort og uoversiktlig. Antall saker som blir registrert hos Politiet (4) er antagelig bare toppen av isfjellet.(vedlegg 1)

Beregninger antyder at omlag 8000 personer injiserer heroin i Norge.(5) Bruk av narkotiske sprøyter er en stor risiko for liv og helse, og det fører til mange overdosedødsfall hvert eneste år. Den totale kostnaden for rusavhengighet i vårt samfunn er ikke fullstendig kjent. I 2010 brukte staten og kommunene til sammen rundt 5 milliarder kroner direkte til rusfeltet.(6) Kostnader som er knyttet indirekte til rus, som for eksempel sosiale stønader og utgifter knyttet til kriminalitet, er ikke regnet med i denne summen. Økonomiske kostnader er bare en liten del av det rusmiddelavhengighet koster samfunnet og individene. De menneskelige belastningene for de narkomane og pårørende, kan ikke beregnes i kroner og øre.

Hovedbehandlingsformen ved opioidavhengighet er det såkalte legemiddelassistert rehabilitering (LAR) med metadon eller eventuelt buprenorfin.(6) Disse medikamentene er også opioider, men de har en lang halveringstid i kroppen. Behandling med metadon/buprenorfin vil gi en jevnere konsentrasjon av opioider i blodet, uten de store toppene og bunnene som er forbundet med henholdsvis en deilig rus og grusomme abstinenssymptomer. De som er under slik behandling vil kunne fungere bedre i dagliglivet og være en mindre belastning for familie, venner og samfunnet generelt. Enkelte som er imot denne behandlingen peker på at slik substitusjonsbehandling ikke kurerer avhengigheten, og man vet lite om langtidsvirkningene av disse stoffene som er også narkotiske midler.

Metadon ble innlemmet i WHO-listen over essensielle legemidler i 2005 og buprenorfin i 2007.(7)

FNs organ for narkotikakontroll, UNOCD, anslår at det globalt er rundt 16 millioner brukere av illegale opioider. Om lag 11 millioner, hovedsakelig menn, bruker heroin.(7) Dette viser at problemene rundt opioider er et tema som absolutt er relevant for dagens samfunn.

### 2.3. Rusmiddelanalyser i Sykehuset Østfold

På laboratoriet ved Sykehuset Østfold, utføres det per desember 2012 screening av rusmiddelanalyser ved hjelp av immunkjemiske metoder,(8) utviklet av Siemens.(9) Ifølge pakningsvedlegget til opiat-analysen (vedlegg 2) står det at immunoassayet bruker monoklonale antistoffer for å detektere opiat i urin. Assayet baserer seg på konkurranse mellom enzym-G6PDH-merket opiat i reagenset og frie opiat fra urinprøven med en bestemt mengde antistoffer. Ved fravær av opiat i prøven, vil det spesifikke antistoffet binde til de enzym-merkede opiatene fra reagenset og enzymet blir hemmet. Dette utgjør en direkte sammenheng mellom opiatkonsentrasjonen i urin og enzymaktiviteten. Enzym G6PDH-aktiviteten blir bestemt spektrofotometrisk ved 340 nm ved måling av evnen til å konvertere nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) til NADH.

Det ble sendt en forespørsel til Siemens i håp om å få vite mer om hvor antistoffene binder seg når det gjelder morfin-molekylet. Svaret var at de dessverre hadde begrenset med kunnskap på dette detaljnivået. De kunne i midlertidig informere om at antistoffene ble laget ved å gi sau et immunogen som dyret lager antistoffer mot. Disse antistoffene vil reagere med en rekke morfin-lignende stoffer, men er mest følsomt for morfin, morfin-3-glukuronid (En morfin-metabolitt) og kodein.

I 2011 ble det utført 17 403 opiatanalyser ved Sykehuset Østfold (SØ), og totalt ble det utført 283 003 rusmiddelanalyser.( vedlegg 3) Sammenlignet med andre sykehuslaboratorier i østlandsområde er SØ store på rusmiddelanalyser. Grunnen til dette er ikke hovedsakelig at folk ruser seg mer i Østfold, men at Sykehuset Østfold har en stor markedsandel av de polikliniske analysene. Mens det i Oslo-området er privateide laboratorier, for eksempel Fürst, som hovedsakelig analyserer prøver som blir tatt ved institusjoner utenfor sykehuset.

Til tross for det store volumet prøver som blir undersøkt ved SØ, så er det ikke opiatlaboratoriet har mest kunnskaper om. Det er benzodiazepiner som er blitt viet mest oppmerksomhet fordi en klassifisering av disse er viktig hos metadonbrukere for å skille lovlig og ulovlige benzodiazepiner. (Metadon gir ofte søvnproblemer, og det gis derfor ofte benzodiazepiner i tillegg).

Siden undertegnende er ansatt ved SØ, kan forhåpentligvis arbeidet med denne oppgaven på sikt tilføre laboratoriet ved SØ mer kunnskap om morfin og morfinderivater.

## 2.4. Smerter og smertesignalering

Smerte-følelse oppstår ved stimuli som ødelegger, eller er nær ved å ødelegge kroppsvev.

International Association for the Study of Pain (IASP) har definert smerte slik:

*«En ubehagelig sensorisk eller følelsesmessig opplevelse assosiert med faktisk eller potensiell vevsskade, eller beskrevet i former for slik skade».* (10)

Smertesansen aktiverer det sympatiske nervesystemet, noe som fører til økt hjertefrekvens og blodtrykk samtidig som blodsirkulasjonen i huden reduseres. Ved akutte smerter trekker også kroppen automatisk den smerteutsatte delen bort fra det som volder smerte.(11) Smertesansen er livsviktig for oss. Uten den ville vi utsette oss for store farer i hverdagslivet. Vi føler smerte når vi dypper hendene i for varmt vann, eller ikke har på oss nok klær når det er kaldt ute. Smertesansen fungerer som et "beskyttelses-signal-system" mot ulike skader som forbrenninger og forfrysninger og mange andre potensielle farer.

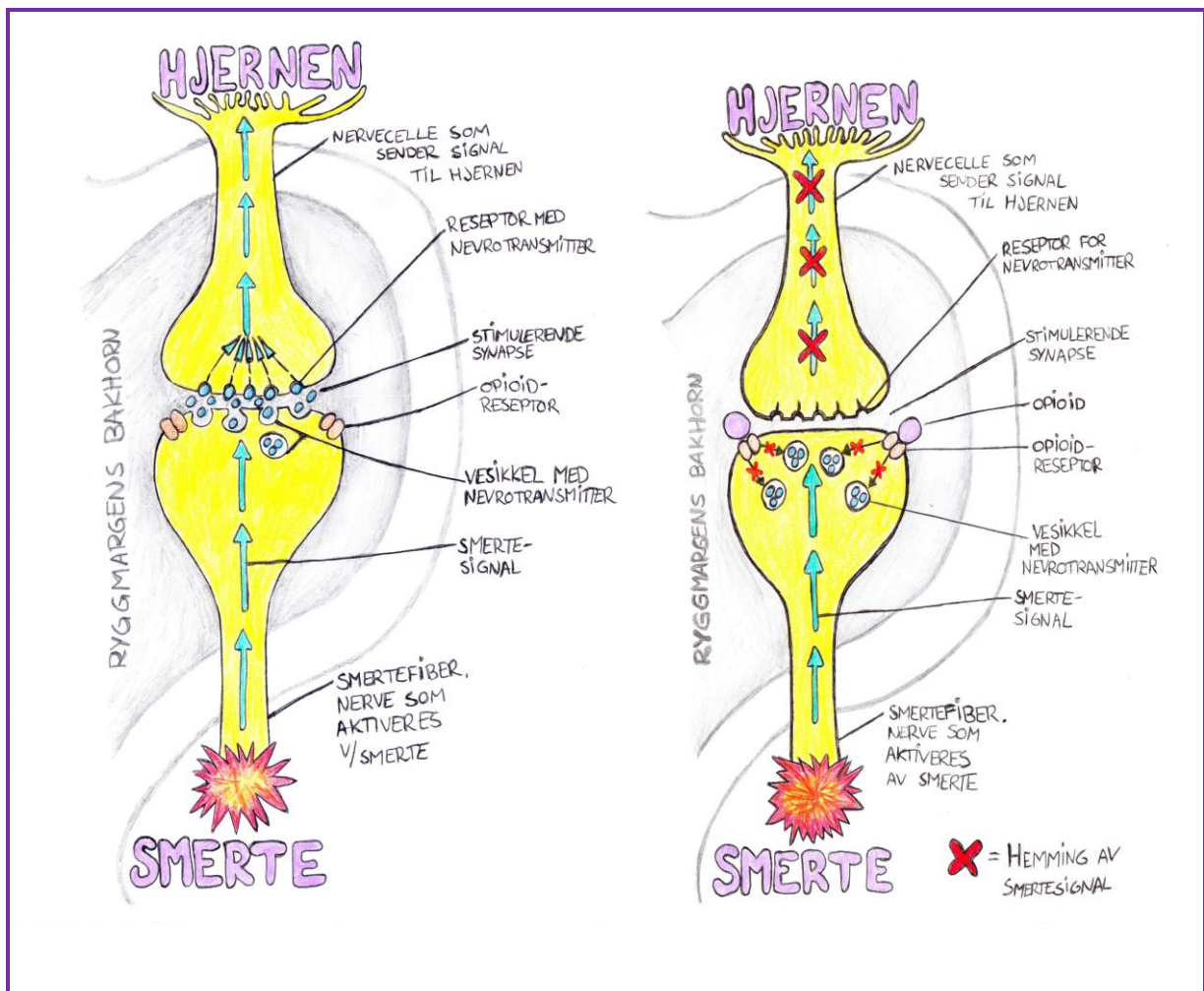
Smerte kan være akutt og direkte knyttet til en faktisk vevsskade som for eksempel et kutt i fingeren eller en forbrenning. Akutt smerte virker da som et alarmsignal. Men smerte kan også vare over lang tid som med leddsmerter og muskelsmerter. Dette kaller vi det kronisk smerte, og det er da liten sammenheng mellom opplevelsen av smerte og faren for vevsskade. Ved kronisk smerte har ikke lenger smertesignaleringen noen verdi som faresignal.(11)

Smertesignalet starter i smertereseptorer som kan påvirkes av ekstrem temperatur og sterke kjemiske eller mekaniske stimuli. Det kan aktiveres direkte av de fysiske stimuliene, men det er vanligere at de aktiveres indirekte via kjemiske substanser som frigjøres/dannes ved vevsskade. Eksempler på slike kan være prostaglandiner, histamin og andre enzymer.

Smertereseptorene sitter ytterst på smertefibrene som har sine cellekropper i spinalgangliene i ryggmargnervenes bakre røtter. I ryggmargens dorsale horn danner smertefibrene stimulerende synapser med nerveceller som sender impulsene videre til hjernen.

Nervefibrene som går til hjernen ender enten opp i hjernestammen eller talamus. I hjernestammen blir hovedsakelig retikulærsubstansen påvirket, noe som får en døsig eller sovende person til å bli våken og ved full bevissthet slik at den kan fjerne det som forårsaker smerte. Dette forklarer hvorfor man ofte har problemer med å sove når man har smerter. Fra synapser i talamus føres smertesignalet videre til storhjernebarken, og det er antagelig disse områdene som er ansvarlig for vår bevisste oppfatning av smerte.(11)





Figur 2: SmertesIGNALERING. Til venstre går smertesignalet uhindret til hjernen, mens til høyre blir smertesignalet hemmet av opioider. "Smerten" er der fortsatt, men den blir ikke registrert i hjernen, og vi kjenner den ikke lenger.

## 2.5. Kroppens egne smertestillende mekanismer

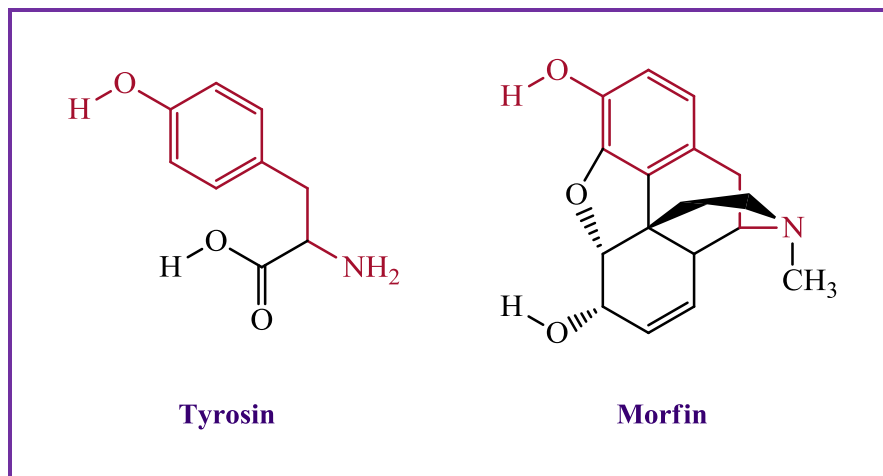
Kroppen vår har et finurlig system for å dempe smerter. Den produserer endogene peptider, enkefalinere og endorfiner, som fører til at smertesignalet til hjernen blir hemmet eller redusert. De første enkefalinene som ble oppdaget var Met-enkefalin og Leu-enkefalin.(12)



Mer enn 15 endogene peptider har senere blitt oppdaget, med varierende lengde fra 4-33 aminosyrer. Disse enkefalinene (neurotransmittere) og endorfinene (hormoner) binder til opioidreseptorene, som det finnes et stort antall av i CNS, og hemmer smertesignalene i å nå hjernen.(figur 2)



Opioid-reseptorer finnes mange steder i sentralnervesystemet (CNS), spesielt rundt smertebanens synapser i hjernen.(11) Nesten alle endogene peptider har enten Met-enkefalin eller Leu-enkefalin skjelettet på sin N-terminale ende, noe som betyr at denne pentapeptiden er viktig for analgetisk aktivitet. Det er aminosyren tyrosin som er farmakoforen, og vi kan finne igjen tyrosinskjelettet i morfin strukturen. Uten tyrosin bindes ikke de endogene peptidene til opioidreseptorene.(12) Det finnes også reseptorer i det perifere nervesystemet (PNS), men disse er mest forbundet med bivirkninger, som for eksempel forstoppelse.



Figur 3: Tyrosin og morfin. Den felles farmakoforen er tegnet i rødt.

## 2.6. Morfins Historie

Morfin har sin opprinnelse fra opiumsvalmuen. Planten har gjennom evolusjonen utviklet stoffet for å bekjempe insekter, noe vi mennesker drar stor nytte av i form av smertestillende legemidler. Oppdagelsen av opioider sies å være at folk la merke til at det ofte lå besvimte insekter rundt opiumsvalmuen, som etter en stund våknet opp og fløy videre. Dette førte til at de begynte å eksperimentere rundt hvordan mennesker kunne få den samme virkningen. Saften fra de umodne frøkapslene til den vakre valmuen *Papaver somniferum* er blant de eldste registrerte medisiner som har blitt brukt av mennesker. Det finnes bevis på at sumerisk kultur brukte dette så tidlig som 3500 år f.kr.. Den gangen drakk eller



Figur 4: *Papaver somniferum*(13)

røykte de opium. Opium inneholder omlag 25 nitrogenholdige, organiske baser, men det er i prinsippet kun en av dem som gir analgetisk effekt hos mennesker. I 1803 ble det for første gang isolert et alkaloid (nitrogenholdig, alkalisk base) fra opium av farmasøyten Surtürner. Han kalte alkaloiden morfin etter Morpheus, den greske guden av drømmer.(14) Det var først i 1933 at kjemikere klarte å isolere morfin i kommersiell skala. I 1953 fikk legene tillatelse til å injisere morfin i pasientens blod. De oppdaget at det hadde god analgetisk og sedativ effekt, og var mer effektiv enn presset juice fra valmuen. Morfin ble brukt på soldatene i den Amerikanske borgerkrigen (1861-65) og den fransk-russiske krigen. Men uten kjennskap til hva som var forsvarlig dosering, eller mulige bivirkninger, var det et stort antall soldater som døde av overdose, eller ble sterkt avhengige.(12)

Morfin er et komplekst molekyl, og med kunnskapen som fantes på 1800-tallet var det vanskelig å forstå dens struktur. I 1881 ble de ulike funksjonelle gruppene på morfin identifisert, men det tok mange år før hele strukturen var analysert. På denne tiden var den eneste måten å analysere strukturen til et komplisert molekyl på, å bryte det ned i mindre og enklere fragmenter som allerede var kjent og som kunne identifiseres hver for seg. De degraderte morfin ved hydrolyse i basisk miljø. Ett av produktene var  $\text{CH}_3\text{-NH}_2(\text{g})$  som beviste at molekylet måtte ha hatt en  $\text{N-CH}_3$ -gruppe i seg.(12)

I 1925 foreslo Sir Robin Robinson den korrekte strukturen til morfin, og i 1952 ble den første fullstendige syntesen av morfin gjennomført. Først i 1968 ble morfins struktur bekreftet ved x-ray krystallografi, 164 år etter at den ble isolert første gang.(2) I denne masteroppgaven ble denne krystallstrukturen brukt som utgangspunkt for beregningene for å sikre at vi hadde den riktige stereoisomeren.

I begynnelsen når morfin ble syntetisert, ble det laget en miksturblanding som inneholdt mange diasteromerer i tillegg til den man ønsket. Disse ble senere isolert og de enkelte diasteriomerne ble testet for analgetisk effekt, men de hadde som forventet ingen slik virkning. Siden antall diasteriomerer av morfin er mange, er det svært uøkonomisk å produsere den syntetisk, og den utvinnes fortsatt den dag i dag fra opiumsvalmuen.(15)

## 2.7. Bivirkninger

Alle medikamenter har bivirkninger av en eller annen sort. Det er vanlig at medisiner ikke er spesifikke kun der de skal gi effekt, men interagerer med andre makromolekyler, for eksempel andre reseptorer. Et av hovedmålene ved legemiddelutvikling er å eliminere bivirkningene uten å miste den ønskede effekten. Legemiddelkjemikere prøver derfor kontinuerlig å modifisere strukturen til medikamentet for å øke dets selektivitet overfor mål makromolekylet

og dermed få mindre uønskede bivirkninger. Til tross for at morfin er et urgammelt medikament, så er det fortsatt ikke funnet noen derivater som gir den tilsvarende gode smertestillende effekten, samtidig som den er fri for bivirkninger.(16, 17)

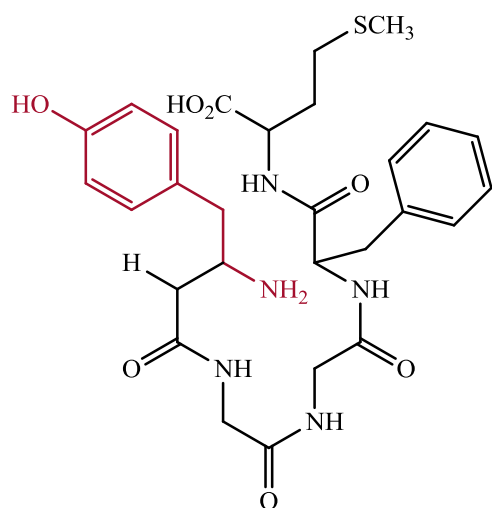
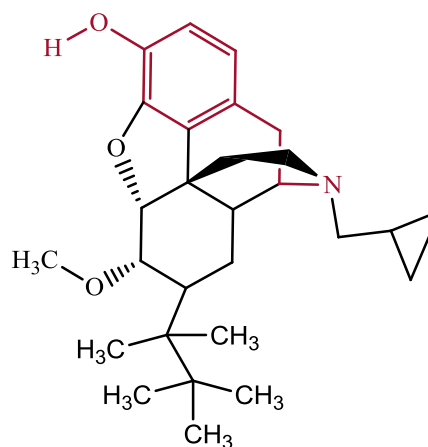
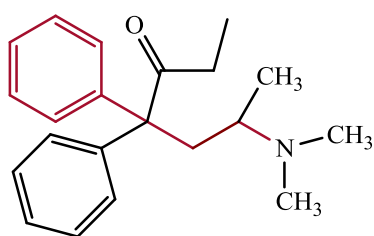
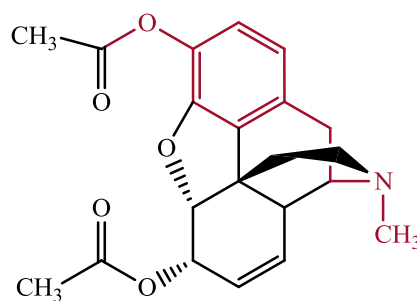
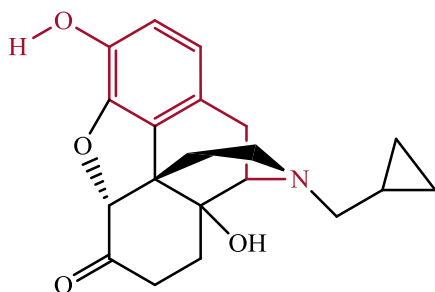
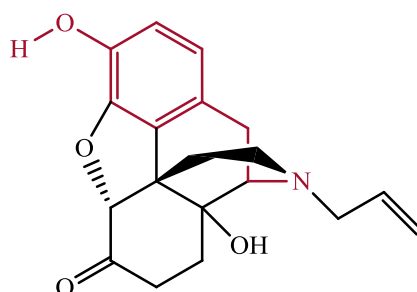
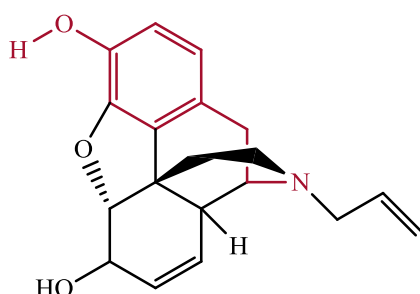
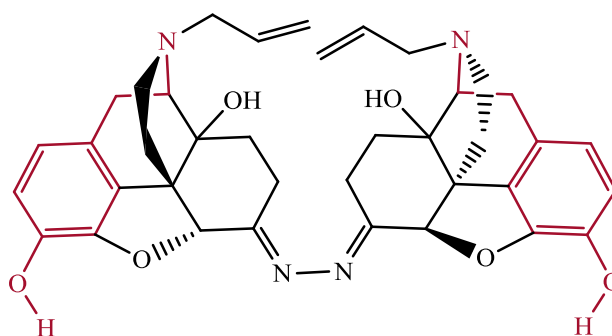
På grunn av denne omfattende forskningen finnes det derfor et stort antall morfinderivater med ulik effekt og varierende bivirkninger.(12)

Noen av de viktigste bivirkningene til opioider er:

1. Respirasjonshemming
2. Avhengighet
3. Eufori
4. Toleranse (Over tid kreves større og større dose for å oppnå samme virkning)
5. Skjelvinger
6. Lav kroppstemperatur
7. Forstoppelse (Morfin er effektiv mot diaré!)
8. Økt blodtrykk og økt puls
9. Irritabilitet
10. Kvalme /Vekttap/Magekramper
11. Unormalt mye svette

## 2.8. Opiat og opioid

I dagligtale blir ofte ordene opiat og opioid brukt om hverandre. Frem til 1980-tallet ble begrepet "*opiat*" brukt som beskrivelse på alle naturlige og syntetiske stoffer som var derivater av morfin. Alle opiater lignet strukturelt på morfin. Da de på midten av 70-tallet oppdaget peptider i hjernen (endorfiner og enkefalinere) som ga farmakologisk effekt som lignet veldig på morfin, var det nødvendig med en endring i nomenklaturen. Disse endogene peptidene lignet nemlig ikke strukturelt på morfin men inneholdt den aromatiske aminosyren tyrosin som har en struktur man kan finne igjen i morfin skjelettet.(figur 3) Opioider er derfor alle stoffer som har morfinlignende farmakologisk effekt. Dermed inkluderer begrepet "*opioid*" både opium-alkaloider, syntetiske derivater relatert til opiumsalkaloidene og alle naturlige og syntetiske peptider som har morfin-lignende farmakologisk effekt. Et tilleggskriterie for å kalles opioider, er at de må bli antagonisert av opioid-antagonister som f.eks Naloxon.(14)(figur 5)

**Met-enkefalin****Buprenorfin****Metadon****Heroin****Naltrexon****Naloxon****Nalorfin****Naloxonazin**

Figur 5: Met-enkefalin og eksempler på morfinderivater. Tyrosin-skjelettet er markert med rødt.

## 2.9. Det opioide reseptorsystemet

Opioidreseptorene er delt i tre hovedtyper:  $\mu$ ,  $\delta$  og  $\kappa$ .(3) De er hovedsakelig lokalisert i hjerne og ryggmarg. En fjerde familie med opioidreseptorer er også identifisert,  $\sigma$  eller N/OFQ peptid, men den har ingen smertestillende effekt. Kroppen produserer, som nevnt tidligere, naturlige endogene peptider som binder seg til opioid-reseptorene kalt: enkefaliner (nevrotmitter), endorfiner og dynorfiner (hormoner). Disse inngår i kroppens eget smertedempende system, der peptidenes agonisme av reseptorene medfører til nedsettelse av smertefølelsen og øker følelsen av velvære.(11)

Reseptorene i de ulike undergruppene er ganske like, men uttrykker noen forskjeller i blant annet aminosyresekvens. Konsekvensen av det, er at forskjellige opioider og endogene peptider bindes med ulik affinitet til de ulike typene.(18) Dette forklarer også hvorfor noen opioider er mer selektive til enten  $\mu$ ,  $\kappa$  eller  $\delta$ . Foreløpig har man ikke fullstendig oversikt over forskjellen mellom reseptorene, noe som er relevant for videre forskning. Denne kunnskapen kunne ha bidratt til å skreddersy derivater som viser mer selektivitet for de ulike undergruppene av opioidreseptorer.(19)

IUPHAR forsøkte i 1996 å sette navn på disse reseptorene etter når de ble oppdaget. Senere i 2000 kom nok en ny nomenklatur. I denne oppgaven brukes benevningene  $\mu$ ,  $\delta$  og  $\kappa$ , men en oversikt over de ulike navnene er gjengitt i tabell 1.

Tabell 1: De ulike benevningene til undergruppereseptorene i det opioide system.(14)

| Reseptor | Kalles også | IUPHAR 1996     | IUPHAR 2000   | Også brukt i litteraturen |
|----------|-------------|-----------------|---------------|---------------------------|
| $\delta$ | delta       | OP <sub>1</sub> | DOP- $\delta$ | DOR                       |
| $\kappa$ | kappa       | OP <sub>2</sub> | KOP- $\kappa$ | KOR                       |
| $\mu$    | my          | OP <sub>3</sub> | MOP- $\mu$    | MOR                       |
| $\sigma$ | sigma       | OP <sub>4</sub> | NOP           | N/OFQ peptid/ORL          |

Mangel på genomiske bevis på undergruppe reseptorene indikerer at reseptor-subtypene er posttranslasjonelle modifikasjoner (spleise-varianter) av de kjente hoved-reseptorene. Foreløpig er det kun  $\mu$  og  $\kappa$  agonister som er i klinisk bruk som opioide smertestillende medikamenter.

### *$\mu$ -reseptorer*

Endomorfin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>)(20) og endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>)(21) er endogene tetra-peptider med høy grad av affinitet og selektivitet for  $\mu$ -reseptor. Morfin binder sterkt til denne undergruppen, hvilket indikerer at morfin danner et kompleks som ligner den som Endo-1 og Endo-2 selv danner med  $\mu$ -reseptorene.(22) Det finnes mange terapeutisk brukbare forbindelser som også er selektive for  $\mu$ -reseptorene. Alle de opioide alkaloidene og de fleste av de syntetiske opioid-derivatene er  $\mu$ -selektive agonister. Studier med  $\mu$ -reseptor knock-out-mus har vist at nesten all den farmakologiske effekten som er observert ved injeksjon av morfin, skjer ved interaksjoner med  $\mu$ -reseptorer. Det gjelder både den smertelindrende effekten, og bivirkninger som respirasjonshemming, forstoppelse, kvalme og fysisk avhengighet.(14)

Eksempler på antagonister som virker på  $\mu$ -reseptorene er naloxon og naltrexon. De har en 5-10 ganger selektivitet for  $\mu$ -reseptor, noe som er svakere enn morfin som har enn 10-20 ganger  $\mu$ -selektivitet.  $\mu$ -reseptor kan deles i minimum to undergrupper. Det finnes bevis for at  $\mu_1$ -reseptorer har høy-affinitets-bindingssteder som inngår i smerte-nerve-overføringen, mens  $\mu_2$  reseptorer kontrollerer respirasjonshemmingen.(14) Et aktuelt forskningsområde er å finne et opioid-analgetika som er spesifikk for  $\mu_1$ , slik at man kunne unngå den mest alvorlige bivirkningen som er respirasjonshemming. Naloxonazin er en selektiv antagonist av  $\mu_1$ -reseptorer.

### *$\kappa$ -reseptorer*

De endogene peptidene som er selektive for  $\kappa$ -reseptor er først og fremst dynorfiner, et middels langt peptid (17 aminosyrer), der de fem første aminosyrene er de samme som hos leu-enkefalin, men også litt  $\beta$ -endorfiner (31 aminosyrer) der de fem første aminosyrene er de samme som met-enkefalin.(23) Morfin binder svakere til denne reseptoren.  $\kappa$ -reseptor finnes både hos dyr og mennesker, og aktivering av denne gir en smertestillende effekt i tillegg til å virke vandrivende og beroligende samt å føre til økt irritabilitet. Sammenlignet med  $\mu$ -agonister, så har  $\kappa$ -agonister færre alvorlige bivirkninger som respirasjonshemming, eufori og fysisk avhengighet. Det var et ønske om at  $\kappa$ -agonister skulle bli en sterk analgetika uten bivirkninger, men kliniske forsøk med ulike selektive og potente  $\kappa$ -agonister har blitt stoppet på grunn av uakseptable bivirkninger som sedasjon og irritabilitet.  $\kappa$ -selektive opioider med kun en perifer rolle i behandling av inflammasjon og smerten relatert til den, har vist god effekt. Vitenskapelig forskning har bevist at det finnes  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  og  $\kappa_3$  undergrupper av reseptoren, men den fysiologiske effekten initiert av disse er ikke blitt særlig godt utredet. Det finnes selektive  $\kappa$ -antagonister, men ingen av disse er i klinisk bruk.(14)

Nalorfin virker som en antagonist på  $\mu$ -reseptor, og kan dermed blokkere for morfin til å virke der. Samtidig virker den som en svak agonist på  $\kappa$ -reseptor sammen med morfin og gir en svak analgetisk effekt. Dessverre har Nalorfin uønskede bivirkninger i form av hallusinasjoner som følge av binding til  $\sigma$ -reseptor.(12)

### *$\delta$ -reseptorer*

Enkefalin er de naturlige endogene ligandene med en høyere selektivitet for  $\delta$ -reseptorer i forhold til  $\mu$ -reseptorer. Endringer i aminosyresammensetningen gir forbindelser som har høy potens og selektivitet for  $\delta$ -reseptor. Slike derivater har vært nyttige i forskningen av  $\delta$ -reseptorer in vitro. Men på grunn av metabolsk ustabilitet og dårlige distribusjons egenskaper har det ikke vært mulig med in vivo studier. (kryssing av BHB er begrenset på grunn av for høy hydrofilisitet). Studier med  $\delta$ -antagonister har vist klinisk potensiale som immunhemmere og i behandling av kokain-misbruk.(14)

Buprenorfin binder sterkt til både  $\mu$ ,  $\kappa$  og  $\delta$  reseptorene. Den virker som en antagonist på  $\delta$  og  $\kappa$ , og en modarat agonist på  $\mu$ . Dermed skulle man tro at den ga de samme bivirkninger som morfin. Det faktum at den ikke gjør det, er relatert til hvordan den danner kompleks med reseptor. Den er treg til å binde seg på grunn av størrelsen, men når den først er bundet, er den treg til å rive seg løs igjen.(12)

### *$\sigma$ -reseptorer*

En fjerde undergruppe opioidreseptorer har blitt identifisert og klonet basert på homologi med cDNA-sekvenser fra kjente  $\mu$ ,  $\kappa$  og  $\delta$ -reseptorer. Til tross for homologien i cDNA-sekvensen, så binder ikke  $\sigma$ -reseptoren klassiske opioid peptider eller non-peptid agonister eller antagonister med særlig høy affinitet. Derfor ble reseptoren først kalt opioid-lignende-reseptor, OPLR-1. Videre forskning fant at aktivering av denne reseptoren førte til sterke smerter, (hyperalgesia) og kalte den nociceptin. Flere vanlig brukte opioid-medikamenter, som for eksempel buprenorfin, har vist seg å binde til nociceptin-reseptorer, men denne bindingen er relativt ubetydelig sammenlignet med bindingen til de andre opioide reseptorene. Studier har vist at injeksjon av  $\sigma$ - peptid-antagonister i hjernen på laboratoriedyr har vist en smertestillende effekt.(14)

Tabell 2: Relative analgetiske aktiviteter.(12)

| Reseptor | Virkning   | Morfin | Nalorfin | Pentazocin | Enkefalin | Petidin | Naloxon |
|----------|--|--------|----------|------------|-----------|---------|---------|
| $\mu$    | Smertestillende,<br>Resp.hemming, Eufori,<br>Avhengighet | +++    | -        | -          | +         | +++     | ---     |
| $\kappa$ | Smertestillende<br>Beroligende                           | +      | +        | +          | +         | +       | -       |
| $\delta$ | Hallusinasjoner  | ++     | -        | -          | +++       | +       | -       |
| $\sigma$ | Smerter, hallusinasjoner                                 | 0      | +        | +          | 0         | 0       | 0       |

+ : molekylet virker som agonist

- : molekylet virker som antagonist

0: Ingen/minimal aktivitet

## 2.10. Morfins kompleksering med reseptorene

Opioidreseptorene er presynaptiske G-protein koblede reseptorer som har en hemmende effekt på signaloverføringen av smerteimpulser til CNS.(24) Det finnes også opioidreseptorer i PNS, som forårsaker ulike bivirkninger som for eksempel forstoppelse. Aktivering av reseptorene hemmer adenylat cyclase aktiviteten, noe som resulterer i en redusert produksjon av cAMP, efflux av  $\text{Na}^+$  og stengning av spenningsstyrte  $\text{Ca}^+$ -kanaler. Dette fører til en hyperpolarisering av nervecellen og en sterk hemming av nerveimpulsen.(14)

Det er allment kjent at det er interaksjoner med den fenoliske ringen og det alifatiske nitrogenet, som danner hovedinteraksjonene i reseptor.(25) Disse interaksjonene er de samme vi har i aminosyren tyrosin som finnes i endorfiner og enkefalin, kroppens egne smertestillende endogene forbindelser.

Der er identifisert minst fire viktige interaksjoner mellom morfin og opioidreseptoren(12):

### Ionisk/polar binding til ladet aminogruppe

Morfin inneholder, som ca. 2/3 deler av alle legemidler, et alifatisk amin. I kationisk konjugert syreform, altså ladet morfinum, kan den danne en kvasi ionisk binding med en  $\text{RCOO}^-$  i reseptoren. Alle G-protein-koblede reseptorer har en Asp-aminosyre. Denne aminosyren inneholder  $\text{RCOOH}$ , som er ladet ved fysiologisk pH, og som danner den essensielle elektrostatiske bindingen til det ladede aminet i opioidene. Dersom nitrogenatomet fjernes fra opioidene, danner de ikke kompleks med opioidreseptorene, og den analgetiske aktiviteten opphører. (14)



### $\pi$ - $\pi$ -interaksjoner til benzen-ringen

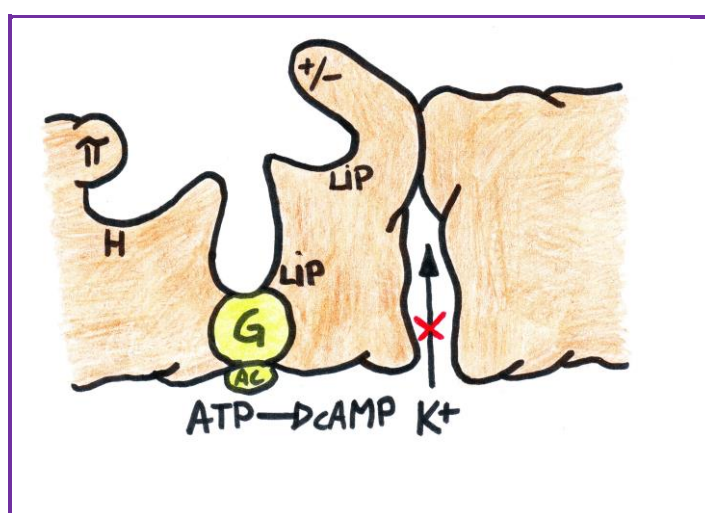
Fenolen i morfin må være i passende avstand fra nitrogenet for å danne en van der Waals interaksjon med et passende hydrofobisk område i reseptoren. Dersom avstanden mellom nitrogenet og fenolen ikke er riktig, klarer ikke legemiddelet å kompleksere seg. Når fenol er inn i reseptoren, peker den alifatiske alkoholen (6-OH) ut av reseptoren. Benzen-ringen er essensiell, uten denne danner ikke morfin kompleks med reseptor.

### Fenolisk OH

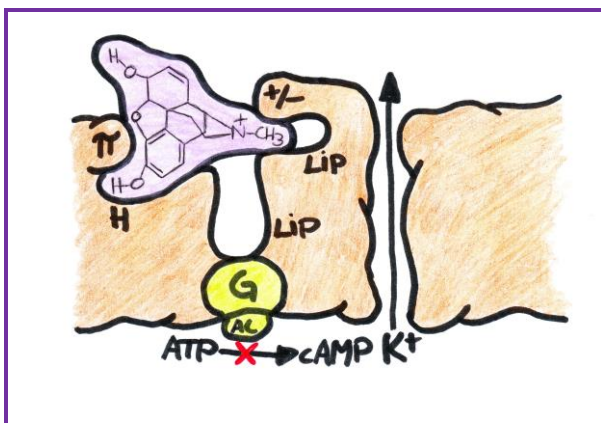
OH-gruppen på benzen-ringen (3-OH) danner hydrogen-binding som H-donor til et passende sted på reseptor. Derivater uten denne, kan også danne gode komplekser med reseptor, slik at denne bindingen er ikke avgjørende for om legemiddelet kan danne kompleks med reseptor eller ikke.

### Lipofile lommer

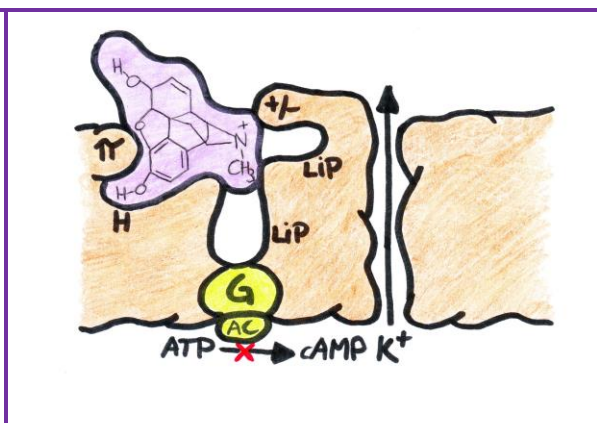
I komplekset mellom opioidene og reseptorene dannes også ikke-kovalente interaksjoner. (26) Det ser ut til at det finnes en stor og en liten lipofil lomme som brukes av enkelte morfinderivater, der det oppstår en lipofile interaksjoner mellom den N-alifatiske substituenten og en av de lipofile lommene. Morfinum klarer ikke å nyttiggjøre seg av disse bindingene, fordi den korte metylgruppen er for liten til å nå fram til lommene, uansett om den sitter i aksial eller ekvatorial posisjon. Derivater som bruker den store lipofile lommen, som for eksempel ethyl-fenyl-morfin, er mer potente enn morfin.(14) Den lille lipofile lommen er det antagoniserende derivater, for eksempel naloxon, som bruker.



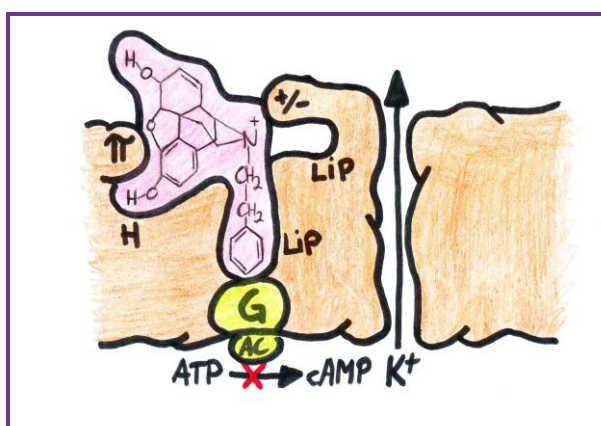
Figur 6: Ikke aktivert opioidreseptor.  $\pi$ - $\pi$ - $\pi$ -interaksjoner med fenol, H=H-binding, Lip=lipofil lomme, +/- = ionisk/polar binding. G=G-protein, AC=Adenylat Cyclase.



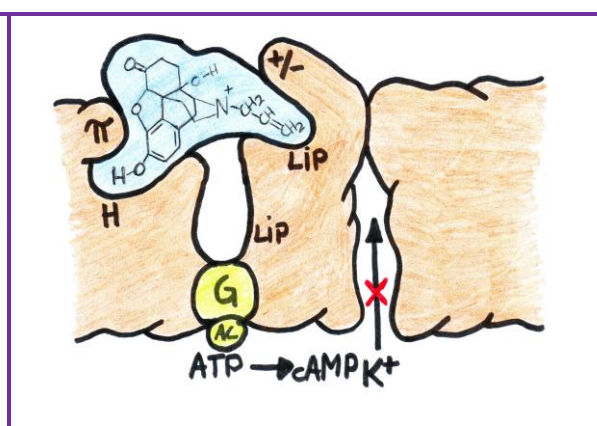
Figur 7: Aktivert Opioid-reseptor med morfin med CH<sub>3</sub>-ekvatorial.



Figur 8: Aktivert Opioidreseptor med morfin med CH<sub>3</sub>-aksial.



Figur 9: Aktivert Opioid-reseptor med etyl-fenyl-morfin som bruker den store lipofile lommen. (14x mer potent enn morfin)



Figur 10: Inaktivert opioidreseptor med antagonisten naloxon som benytter den lille lipofile lommen

For hver interaksjon mellom makromolekylet (i dette tilfelle reseptoren) og substratet (legemiddel), vil vi få et visst energibidrag som gir utslag i kompleksets  $\Delta G^\ddagger$ . Hvorvidt kompleksset er godt nok eller ikke vil være avhengig av en topologisk tilpassing av de to, antall interaksjoner, ulike intermolekylære interaksjoner, osv. Alt i alt kan vi tenke oss mange ulike kompleksset som dannes, og som stadig er i likevekt seg imellom. Likevekten vil gå mot den mest stabile med en forskjell på  $\Delta G^\ddagger$ .

Energien til et slikt kompleks er gitt:  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger = -RT \ln K$  (27)

Det mest stabile kompleksset er likevel ikke nødvendigvis det som gir den beste farmakologiske effekten. Dessuten, hos både reseptor og LM, er den mest stabile konformasjonen ikke nødvendigvis den bioaktive. Kunnskap om de bioaktive konformasjonene, kan som nevnt tidligere, brukes som et godt utgangspunkt for videre utvikling av nye legemidler.

## 2.11. Struktur-Aktivitet-Relasjoner (SAR)

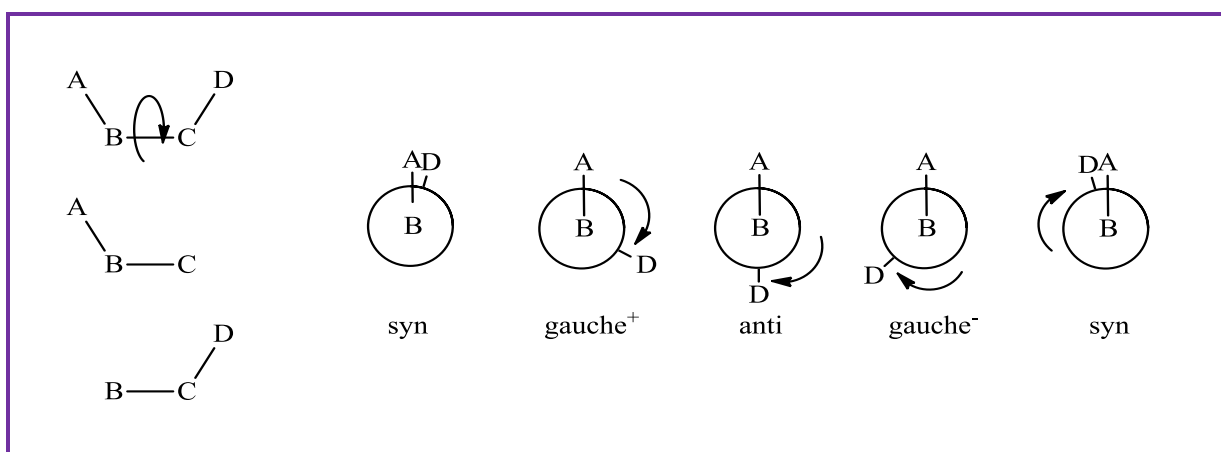
Dynamiske prosesser i et gitt molekyl, som gir opphav til ulike konformasjoner, kan deles i følgende hovedgrupper:

1. **Fri rotasjon rundt enkelt bindinger**
2. **Nitrogeninversjoner**
3. **Ringinversjoner**
4. **Rotasjon rundt dobbeltbindinger**

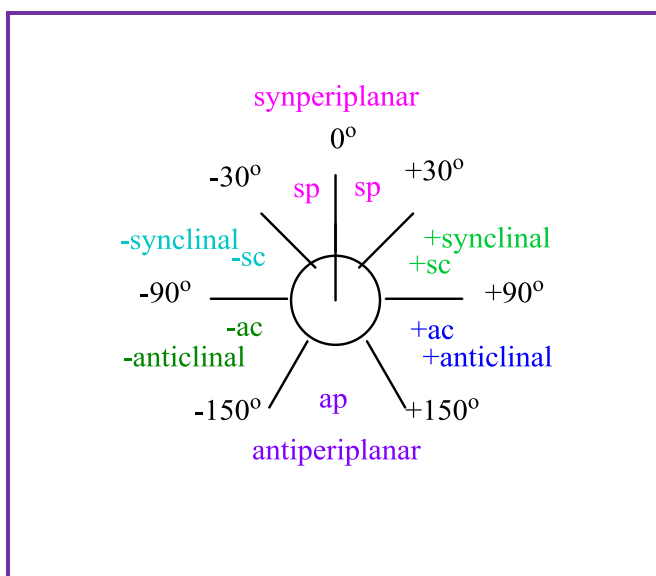
Punkt 4 blir ikke omtalt videre, da dobbeltbindingene i morfin kun er lokalisert i ringene, slik at rotasjon av disse vil være høyst usannsynlig. Punkt 1-3 beskrives nærmere i påfølgende avsnitt.

### *Fri rotasjon rundt enkeltbindinger*

En dihedral vinkel i en kjede med atomer A-B-C-D er den vinkelen mellom to plan som er definert av henholdsvis atomene A-B-C og B-C-D. Vinkelens størrelse er avhengig av rotasjon rundt bindingen mellom B og C. Når A og D er på samme plan og parallelle, blir vinkelen lik  $0^\circ$ . Vinkelen øker ved å rotere bindingen mellom B og C, da beveges D med klokken. Ved å rotere D i forhold til A med klokkeslett  $180^\circ$ , er A og D igjen på samme plan men peker da i motsatt retning, de er altså i *anti* posisjon i forhold til hverandre. Ved ytterligere rotasjon på  $180^\circ$  kommer man tilbake til utgangspunktet (en vinkel på  $360^\circ$  som er lik  $0^\circ$ ).<sup>(28)</sup>



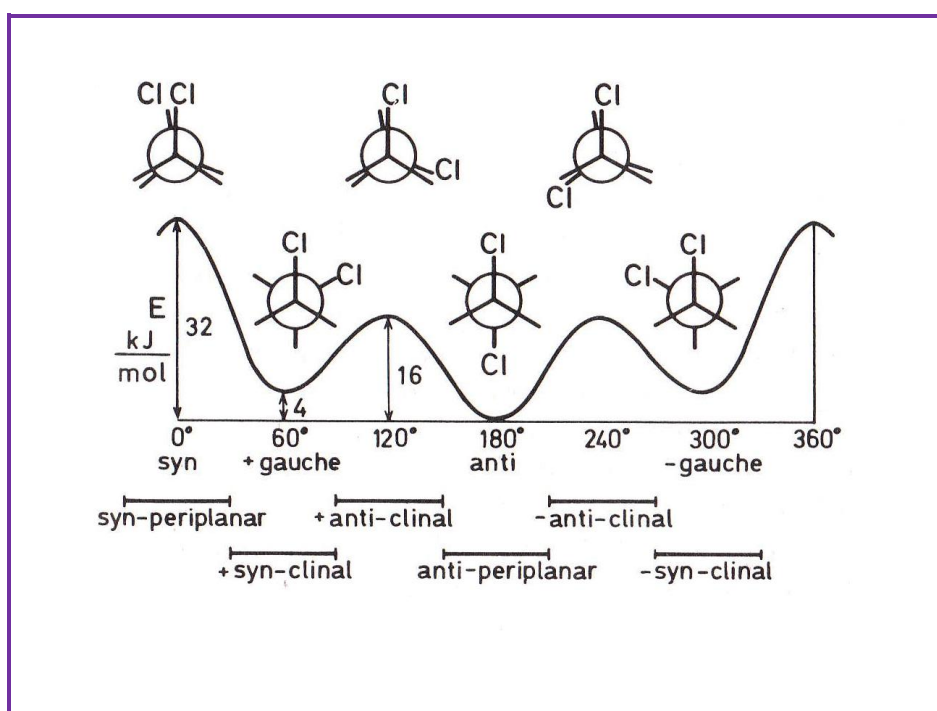
Figur 11: Rotasjon rundt enkeltbinding.



Figur 12: IUPACS navnsetting av dihedrale vinkler

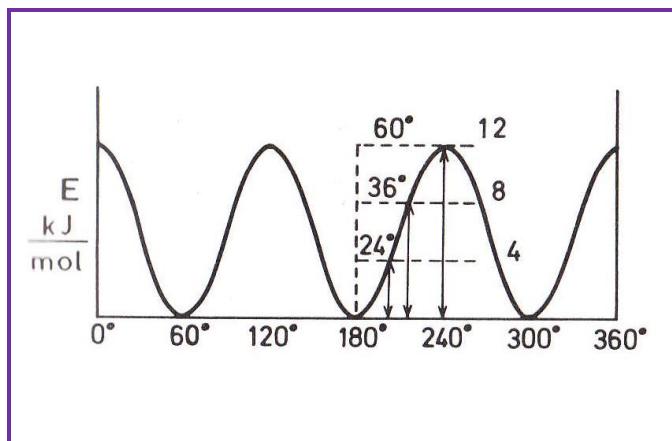
IUPAC 's navnsetting på de ulike konformasjonene, delt i vinkel soner på  $30^\circ$ , er vist i figur 12. Selv om det finnes internasjonale regler for å beskrive konformasjonene til de ulike torsjonsvinklene, er det allikevel de "gamle" benevningene som fortsatt dominerer i litteraturen. *Synperiplanar* er fortsatt kalt for *syn* og *antiperiplanar* for *anti*, mens *-/+ synclinal* er  $g^-$  og  $g^+$ .(29) *Antichinal* har ikke noe gammelt navn, da dette blir regnet som en overgangstilstand. I

figur 13 er det vist et eksempel med di-klor-etan og hvordan rotasjon av enkeltbindinger fører til endringer i energien til molekylet. Både IUPAC nomenklatur og de gamle navnene er gitt under. I dette tilfellet ser vi at TS har ulike energier som er avhengig av hvilke substituenten skal passere hverandre underveis i rotasjonen. Den største barrieren er når de to store kloratomene krysses i *syn*-konfigurasjon.



Figur 13: Energidiagram ved rotasjon av enkeltbinding i di-klor-etan. Legg merke til at det er den bakre bindingen mellom C-Cl som roteres med klokkeslett.(30)

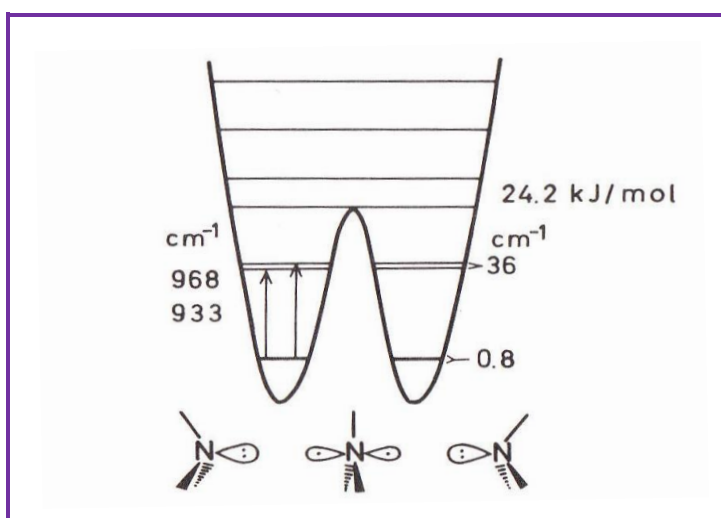
Topologien til et molekyl påvirker dets kjemiske og fysikalske egenskaper. Ser vi på et enkelt molekyl som etan, så kan denne ha et uendelig antall former som en konsekvens av rotasjon av bindingen mellom de to karbonatomene. Den molekylære geometrien til de stabile konformerene kalles *staggered*, der H-C-H vinkelen på det ene karbonet vil halvere vinkelen til H-C-H på det andre karbonet. De ustabile konformerene forekommer når hydrogenatomene står parallelt og er i *eclipsed* posisjon. Da vil det være en relativt stor frastøtning som følge av sterisk "kollisjon" mellom de positive kjernene i hydrogenene og mellom elektronene i bindingene. I figur 14 der bindingen C-C roteres i etan, ser vi at siden CH<sub>3</sub>-molekylet er symmetrisk er alle TS (120°, 240°, 360°) identiske, og alle stabile konformasjoner (60°, 180°, 300°) er også identiske. Hos etan skyldes hele 11 kJ/mol av barrieren på 12 kJ/mol interaksjoner mellom elektronene. Bare 1 kJ/mol skyldes substituentene som i etan er hydrogenatomer.(29)



Figur 14: Energibarrierene ved rotasjon av enkeltbindingen mellom karbonene i etan. På grunn av symmetrien i CH<sub>3</sub>, er energien til alle TS identiske og energien til alle stabile konformasjoner identiske.(30)

### Nitrogeninversjoner

Ved nitrogeninversjon går molekylet igjennom en overgangstilstand hvor molekylets geometri blir forandret fra pyramidal trigonalt til planart trigonalt med vinkel på 120° mellom



Figur 15: Nitrogeninversjon og dens energibarriere i ammoniakk

hydrogen atomene. Nitrogen atomet har med andre ord en geometri som tilsvarer en SP<sup>2</sup> hybridisering og elektronene befinner seg i et p orbital.(31)

Prosessene kan beskrives som en paraply som vrenger seg og inverterer til dets speil bilde. For ammoniakk ble denne

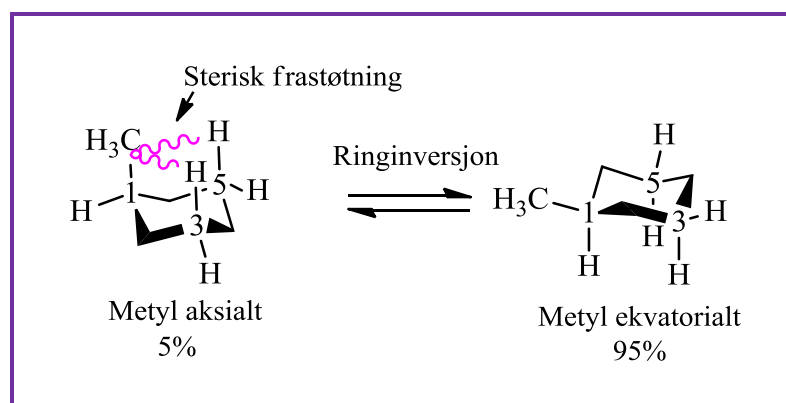
overgangsbarrieren beregnet på 70-tallet med mikrobølge og infrarød spektroskopi til å være 24

kJ/mol.(29) Når nitrogenet sitter i en fem-karbon-ring eller mindre ringer, øker inversjonsbarrieren på grunn av tapt fleksibilitets nivå og dermed blir det vanskeligere å oppnå den planare overgangstilstanden for inversjonen. Vi skal senere i oppgaven undersøke om nitrogeninversjons-prosessen i morfins ulike konformerer blir påvirket av å sitte i et komplekst molekyl.

### Ringinversjon

Sykloheksaner vil være i en likevekt mellom to stolkonformasjoner som de kan interkonvertere seg i mellom via ringinversjon. Det skjer ved at alle bindinger vris delvis samme vei. Konsekvensen av ringinversjon, er at alle substituenten som var i ekvatorial posisjon flyttes til aksial posisjon og vise versa.

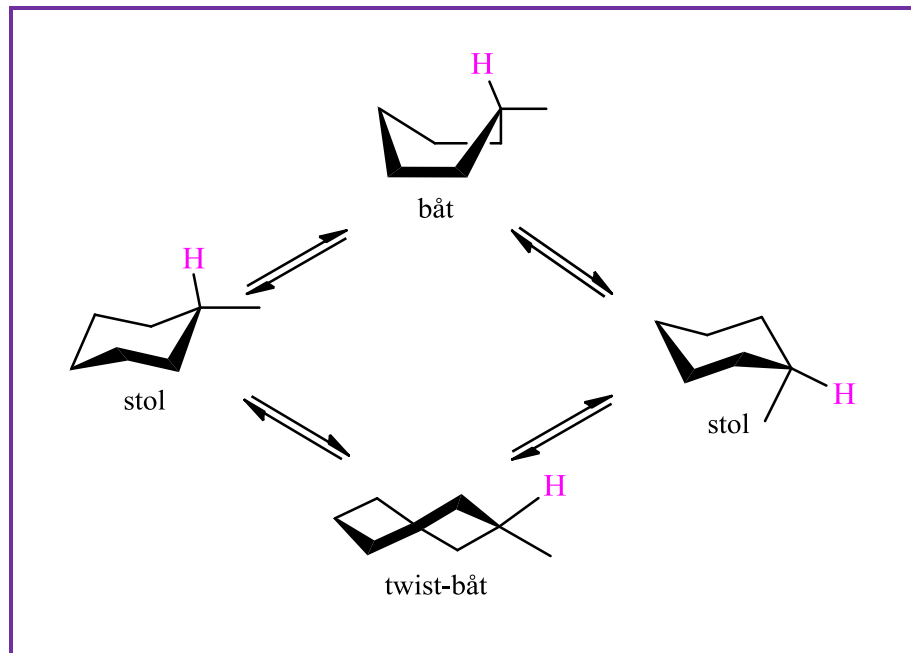
Normalt er vil substituenten som er større enn hydrogen være mest stabil i ekvatorial posisjon på sykloheksanen for å unngå 1,3,5 frastøtninger i aksial posisjon på begge sidene av ringen. Ekvatorial orientasjon unngår med andre ord frastøtende interaksjoner, noe som forklarer hvorfor  $\Delta H^\ddagger$  til den aksiale konformerer er høyere enn til den ekvatoriale formen i de aller fleste tilfellene. Figur 16 viser at likevekten for en isolert sykloheksan er sterkt forskjøvet mot den ekvatoriale konformerer, hele 95 % av konformerene har denne konformasjonen.



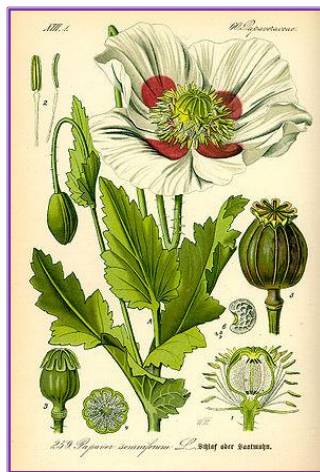
Figur 16: Aksiale 1-3 og 1-5 frastøtninger

Halvveis i ringinversjons-prosessen får sykloheksanen en båtformasjon. Den kan enten være en normal båt, eller en twist-båt. Hvilken av båtformasjonene som favoriseres er avhengig eventuelle substituenten og om ringen er en del av et større molekyl. I noen 1,4-disubstituerte sykloheksaner er det faktisk twist-båt formen som har lavere energi enn stolkonformasjonene.





Figur 17: Ringinversjon via normal båt og twist-båt



Figur 18: De ulike delene til opiumsvalmuen. (32)

### 3. METODER

#### 3.1. Molekyl byggesett

Når et molekyl skal analyseres og forskes på, er det nesten umulig å få et godt resultat uten å bygge molekylet. Det finnes ulike molekyl byggesett som man kan benytte til formålet. De mest vanlige molekylbyggesett som brukes er bygget av atomer og bindinger.(33) Settet gir



Figur 19: Molekyl byggesett er alltid et godt utgangspunkt

ikke riktig fordeling av elektronene eller molekylenes volum, men gir en generelt bilde av molekyl-topologien. Fordelen med denne type byggesett er at man lett kan studere konformasjonene til molekylet ved å rotere de ønskede bindingene etter behov. På denne måten får man en relativt god tredimensjonal modell som fysisk kan utforskes ved å vri og vende

på utvalgte bindinger. Bygging av morfin-molekylene med et slikt byggesett var nødvendig for å sikre at både struktur og stereoisomeri var riktig før vi gikk videre med analyse og teoretiske beregninger. Imidlertid er det mange spørsmål som plastmodellen ikke gir oss fullstendig svar på, som for eksempel følgende momenter:

- Molekylets indre energi  $\Delta H^\ddagger$
- Antall stabile konformasjoner og konformasjonenes energi innhold
- Avstanden mellom to utvalgte atomer i et molekyl
- Molekylenes totale topologi og volum
- Vinkelverdier og bindingslengder i molekylet
- Osv...

Molekyl byggesettet kan brukes til selve konformasjons-analysen av molekylene, som er en viktig del av vårt arbeid. Modellene kan også gi god informasjon om de ulike dynamiske prosesser som foregår i molekylet som for eksempel rotasjoner, N- inversjon og ring inversjon. En pekepinn om steriske og induktive effekter er også mulig å få, men dette er ikke en informasjon man kan bruke med mindre det gjøres teoretiske beregninger på de ulike konformasjonene og på overgangstilstandene (*Transition state*=TS), hvorvidt ladningen er spredt på molekylets atomer, osv..



### 3.2. Molekylær Mekanikk (MM)

Uttrykket ”molekylær mekanikk” blir i dag brukt for å definere en kalkuleringsmetode som er designet for å gi den nøyaktige strukturen og energien til molekyler. Metoden har blitt utviklet fra gammel vitenskap om bindinger mellom atomer i molekyler, og van der Waals krefter mellom ubundne atomer. Utgangspunktet i denne type beregninger er at alle bindinger har en ”naturlig” lengde og vinkel, og at atomene i molekylene ville justere den totale geometrien for å oppfylle dette i størst mulig grad. I tillegg justeres det for steriske interaksjoner som van der Waals krefter. I kompliserte molekyler vil atomer og elektroner i bindingene finne en geometri som gir minst mulig konflikter seg imellom. Men det er umulig å oppfylle alle atomenes ”ønsker”, spesielt i større molekyler, slik at det vil til en hver tid oppstå en viss spenning i molekylet. Denne spenningen er forutsigbar og kan regnes ut ved hjelp av ulike ligninger.(34)

Energien til et molekyl i sin mest stabile form er en funksjon av kjernene og elektronenes posisjoner. Born-Oppenheimer overflaten er en multidimensjonal ”overflate” som beskriver energien til et molekyl som et sett vilkår for kjerneposisjonene. I molekylær mekanikk er det vanlig bare å kalle det for den potensielle overflate energien.(34)

Molekylære mekaniske metoder tar utgangspunkt i følgende punkter:

- Hvert atom blir simulert som en individuell partikkel
- Hver partikkel blir tildelt en radius (vanligvis van der Waals radius), polariserbarhet og en konstant nettoladning(vanligvis derivert fra kvantemekaniske beregninger og/eller eksperimenter)
- Bindings-interaksjoner behandles som "fjærer" med en likevekts-avstand lik den eksperimentelle eller beregnede bindings-lengde (34)

Molekylærmekaniske beregninger bruker et empirisk derivert sett av likninger for å beskrive Born Oppenheimer overflaten som matematisk ligner klassisk mekanikk. Dette settet av potensielle funksjoner, kalt kraftfeltet, inneholder justerbare parametere som er optimalisert til å gi den beste tilnærmingen til kalkulerte og eksperimentelle egenskaper i molekylet. Eksempelvis geometrier og konformasjonelle energier. Forutsetningene i molekylær mekanikk er at korresponderende parametere og kraft-konstanter kan overføres fra et molekyl til et annet. Med andre ord er denne kvantiteringen gjort med et sett enkle forbindelser, og deretter er disse verdiene blitt justert og brukt for andre lignende forbindelser.(35)

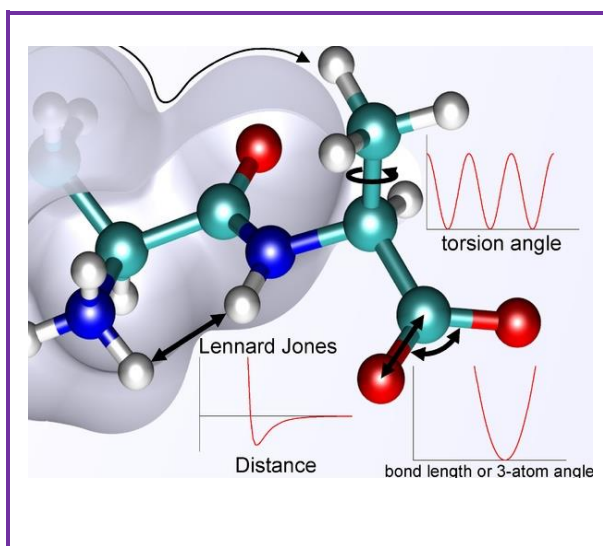
Energien i et molekylært system kan med MM sammenfattes i fem vesentlige vilkår:

1. Summen av alle diatomiske bindinger
2. Summen av alle mulige triatomiske bindingsvinkler
3. Summen av alle tetra-atomære bindingstorsjoner
4. Summen av alle ikke-bundne Van der Waals interaksjoner
5. Summen av alle elektrostatiske tiltrekninger mellom individuelle bindings-dipoler.

Molekylets totale energi blir summert ved hjelp av alle disse vilkårene. Vilkår 1-3 vil dekke de ulike spenningene som finnes i molekylet. Vilkår 4 tar høyde for sterisk frastøtning og vilkår 5 inkluderer hydrogenbindinger.(36)

Den potensielle energien ( $E$ ) i en gitt konformasjon kan oppsummeres i følgende ligning:(35)

$$E = E_{\text{binding-lengde}} + E_{\text{vinkel-bøying}} + E_{\text{torsjons-vridning}} + E_{\text{van der Waals}}$$



Figur 20: Prinsippene som molekylær mekanikk er bygget på.(37)

For et spesifikt molekyl vil molekylær-mekanikk modellen tilstrebe å nå et energi minimum ved å justere alle bindingslengder, vinkler og torsjoner.

Informasjonen som molekylær mekanikk gir, inkluderer optimalisert molekylergeometri av en bestemt konformasjon og konformasjonenes entalpi ( $\Delta H^\ddagger$  i kJ/ mol). Molekylær mekanikk kan brukes til å studere både små molekyler og store molekylære systemer med mange tusen til millioner av atomer.

Mannen bak utviklingen av MM er Norman "Lou" Allinger, en amerikansk data-kjemiker. Han er kjent for sitt pionerarbeid innen bruk av databehandling i kjemi, og da spesielt molekylær mekanikk, for å løse ulike kjemiske problemer. Han utviklet MM2 software-program som blir brukt til å beregne morfin i denne oppgaven. MM2 ble utviklet primært for konformasjonsanalyse av hydrokarboner og andre små organiske molekyler. Det er designet for å reprodusere geometrien i et molekyl så nøyaktig som mulig. Programmet implementerer et stort sett av parametere som blir kontinuerlig oppdatert for et bredt spekter av organiske forbindelser.(38)

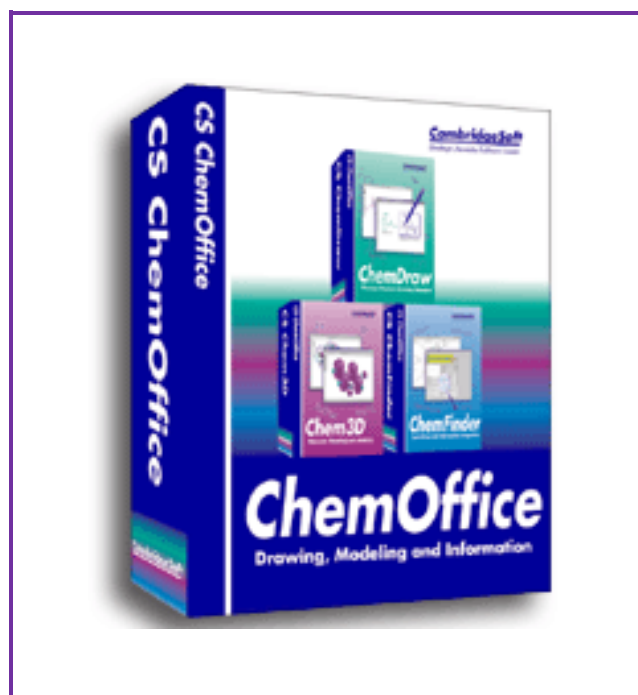
Alle molekylær mekaniske beregninger er basert på en rekke tilnærminger og er avledet fra forskjellige typer eksperimentelle data. Derfor kalles de også empiriske beregninger.

Alle typer van der Waals krefter er også sterkt miljø-avhengige, fordi disse kreftene kommer fra induerte og forbigående interaksjoner mellom partikler i et medium. Slike effekter tas ikke hensyn til i standard molekylære mekanismer.(39)

Born-Oppenheimer tilnærmingen sier at Schrödingers ligning for molekyler kan deles inn i en del som ser på forholdene rundt elektronene og en del som ser på forholdene rundt kjernene.

Disse to delene kan studeres uavhengige av hverandre. Men en relativt vanlig praksis er å etablere posisjonene til kjernene med molekylær mekanikk, for deretter å se på elektronenes posisjoner med kvantemekanikk.(34)

I denne oppgaven ble det brukt dataprogrammet Chem Draw og Chem3D versjon 12.0 for å tegne molekylene, og foreta MM2-minimaliseringer for hver konformer. Koordinatene til de strukturene med lavest  $\Delta H^\ddagger$  til hver konformasjon ble videre brukt i kvantemekaniske beregninger som vil bli omtalt senere i oppgaven.



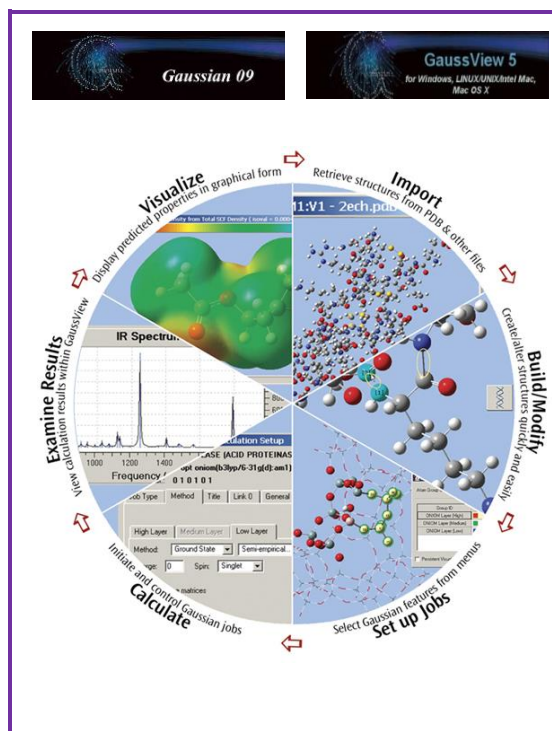
Figur 21: Dataprogrammene Chem draw og Chem3D som ble brukt til å tegne molekyler og gjøre molekylær mekaniske minimaliseringer.

### 3.3. Kvantekjemi

Av hensyn til denne masteroppgavens omfang, blir det ikke lagt stor vekt på hvordan de kvantekjemiske utregninger ble utført og den teoretiske bakgrunnen til selve beregningene, da dette ligger utenfor oppgavens mål. Vi konsentrerer oss hovedsakelig om resultatene og konformasjonsanalysen. Til å utføre beregningene har vi fått hjelp av Prof. Møllendal ved UIO og kun en kort innføring i disse er beskrevet nedenfor.

Kvantekjemi er den delen av kjemien som bruker kvantemekanikk til å beskrive kjemiske systemer. Dette kan for eksempel være beskrivelse av elektronstrukturer og energier. Disse brukes videre i beregninger som kan sette lys på molekylenes kjemiske egenskaper. Slike

beregninger kan være ekstremt ressurskrevende, særlig for nøyaktige beregninger på store molekyler eller kondenserte systemer. I prinsippet kan alle observerbare størrelser bestemmes



Figur 22: Illustrasjon over hovedfunksjonene til Gaussian og GaussView.

– deriblant energinivåer, dipolmomenter, likevektsgeometrier (bindingsvinkler og bindingsavstander) og vibrasjonsfrekvenser. Detaljerte modeller for reaksjoners forløp (reaksjonsmekanisme og -dynamikk) kan også beregnes med kvantekjemiske metoder.

Schrödingers ligning brukes for å beskrive atomære systemer og deres egenskaper. Men det viser seg at når systemer inneholder mer enn to partikler blir Schrödingersligningen umulig å løse eksakt. Dette er lite tilfredsstillende når vi skal se på store molekyler med mange elektroner som i morfin. Teoretisk kjemi er et eget forskningsfelt innen kjemi som arbeider med å utvikle og teste beregningsmetoder som kan løse Schrödingersligningen på en tilnærmet måte også for større molekylære systemer.(40)

### **B3LYP - en tetthetsfunksjonal-metode (DFT)**

I vitenskapelige artikler med resultater fra kvantekjemiske beregningsmetoder av organiske molekyler som utgis i dag, er det svært ofte metoden DFT (Density functional theory) som er benyttet.(41) Denne metoden er relativt rask, kan brukes på relativt store molekyler og gir nokså nøyaktige resultater.

Mens Schrödingersligningen baserer seg på bølgefunksjonen, baseres DFT på tettheten av elektroner i molekylet. Tetthetsfunksjonalteori åpner for raskere beregningsmetoder fordi elektrontettheten er en mye enklere funksjon enn bølgefunksjonen. Den elektrontettheten som gir lavest energi vil være den man får ved å løse Schrödingersligningen. Den eksakte energifunksjonale er ikke kjent, og i DFT er det denne funksjonale som må tilnærmes.(40)

I praksis har det vist seg å være enklest å utvikle DFT-metoder som bygger elektrontettheten fra molekylorbitaler. I denne oppgaven skal vi bruke en funksjonal som heter B3LYP.(42)

## *MP2 – en ab initio metode*

Ved *ab initio*-beregninger tas det utgangspunkt i hvert enkelt atom og beregner ut fra dette hvordan molekylorbitalene formes, hvilke interaksjoner som oppstår, bindingslengder osv. For disse metodene står bølgefunksjonen sentralt, og ikke elektrontettheten slik som i DFT-metodene. Beregningstiden er lang fordi det først må gjøres Hartree Fock beregninger som danner grunnlaget for MP2-beregningene.(43) I denne oppgaven har vi brukt 2.ordens Møller Plesset perturbasjonsmetode, som var den vanlige metoden frem til DFT-metodene overtok i 1996.(41)

## *Basissett 6-31G\*\* og cc-pVTZ*

Hvert molekylorbital beskrives som en lineær kombinasjon av kjente funksjoner. Dette kalles ett basissett. I denne oppgaven brukte vi først basissettet 6-31G\*\* og deretter cc-pVTZ som er et meget høyt beregningsnivå. Dette basissettet er av trippel- $\zeta$ -kvalitet.(44) I cc-pVTZ står cc for correlation consistent, p for polarized Valence electrons of TZ er acronym for triple zeta)

## *B3LYP vs. MP2*

MP2 beregner korrelasjons-korreksjoner etter å først ha gjort Hartree Fock (HF) beregninger og tar derfor lang tid. B3LYP gjør beregningene direkte med elektron-tettheten istedenfor med molekylorbitalene og trenger ikke HF-beregningene først. Derfor er B3LYP en raskere metode, og det er nok mye av grunnen til at den har overtatt for MP2 etter 1996. Men til tross for at B3LYP er den mest populære metoden for tiden, så er det MP2 som er den mest solide beregningsmetoden.(41)

## *Abel*

Den største utfordringen med slike teoretiske beregninger er data-kapasiteten. De ulike beregningsmetodene krever store ressurser for å kunne gjøre kompliserte beregninger.

I juni 2012 installerte Universitetet i Oslo en ny super-datamaskin som fikk navnet Abel. Den er plassert på Institutt for informatikk, fyller et helt rom og krever store ressurser å drifte. Teoretisk toppytelse er på 258 Teraflops (billioner flyttallsoperasjoner per sekund). Denne investeringen har skapt oppmerksomhet langt utover Norges grenser. På Abels egen nettside kan vi lese følgende:

*«Abel, det nye tungregneanlegget ved UiO, er med sin teoretiske toppytelse på 258 Teraflops, innenfor topp 100 på den prestisjetunge listen over verdens 500 kraftigste datamaskiner» (45)*

Dette regnearklegget er i stand til å gjøre ekstremt ressurskrevende beregninger, og har gjort det mulig for oss å gjøre denne komplekse konformasjonsanalysen av morfin. Slike beregninger var ikke mulig å gjøre i Norge før juni 2012.

### *Kvantekjemiske beregninger*

Etter grundige molekylærmekaniske beregninger i Chem Draw, ble resultatene i form av atomenes koordinater i molekylet overført til Abel ved universitetet i Oslo for videre kvantekjemiske beregninger ved hjelp av programvaren Gaussian 09.(46)

De kvantemekaniske beregningene som har blitt gjort i denne oppgaven tok fra 1-45 døgn. Det ble satt opp beregninger med B3LYP/6-31G\* men det viste seg at dette gikk veldig raskt, bare 2-4 timer. Derfor ble beregningene gjort på nytt på et høyere nivå, B3LYP/6-31G\*\*. Da også disse beregningene tok overraskende kort tid, ble det bestemt å gjøre B3LYP/cc-pVTZ beregninger. Dette basissettet gir ekstremt nøyaktige beregninger av høy kvalitet. Hver enkelt beregning av denne typen tok ca. 1-3 døgn.

Fordi beregningene med B3LYP-metoden lot seg gjennomføre, bestemte vi å gjenta alle enkeltberegningene på nytt med MP2-metoden, med samme basissett cc-pvtz. Energiene vi fikk her var veldig like de energiene vi fikk med B3LYP. Dette styrker troverdigheten til beregningene. På bakgrunn av beregningenes høye nivå kan vi fastslå at vi har fått meget gode strukturer og energi-verdier.

Resultatene oppgis i hartee. Dette er den eksakte energien til elektronene. Det er videre gitt relative verdier i kJ/mol. 1 hartee = 2625,5 kJ/mol.

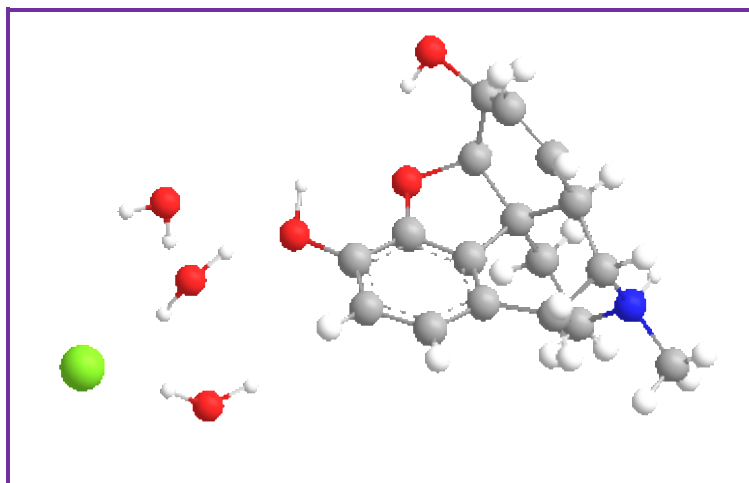
## 4. RESULTATER OG DISKUSJON

I resultatene som blir presentert her henviser 3-OH (eventuelt bare 3) til den dihedrale vinkelen C4-C3-O-H og 6-OH (eventuelt bare 6) til den dihedrale vinkelen C5-C6-O-H. For eksempel vil 3*syn*-6*anti* bety at C4-C3-O-H står i *syn* posisjon og C5-C6-O-H står i *anti* posisjon.

### 4.1. Planlegging av forsøkene

#### *Gass- eller væskefase?*

I denne oppgaven ser vi på hvordan morfin-molekylet oppfører seg i gass-fase, isolert fra eksterne påvirkninger som løsningsmidler eller proteiner som det kan interagere med i et biologisk system. Dette er noe man med rette kan anse som en svakhet, siden adferden mellom molekyler i gassfase og i en celle kan være nokså forskjellig. Det har blitt diskutert hyppig i forbindelse med denne oppgaven, om hvorvidt vi skal gjøre beregninger på morfinmolekylene i gass- eller væskefase. Med dagens software og programvare er det mulig å "addere" to-tre, eventuelt et lag med vannmolekyler i beregningene. Men bruk av vannmolekyler i beregningene betyr ikke nødvendigvis at vi får et bilde som er lik de virkelige forholdene inni cellene, der det også vil være utallige andre ioner og molekyler. Biologien er komplisert og kunnskapen om opioidreseptorene er mangelfull. Denne typen teoretiske beregninger i gassfase blir stadig mer brukt som et verktøy og hjelpemiddel for å forstå kjemiske eller biologiske problemstillinger. Siden masteroppgaven har foregått over en meget begrenset tidsperiode, var vårt valg derfor å begrense oss til kun beregninger av de ulike konformasjonene i gassfase, og det bør ikke nødvendigvis være mer riktig å studere dem i vannfase.(47)



Figur 23: Krystallstrukturen til morfin med tre vannmolekyler og et klor-ion

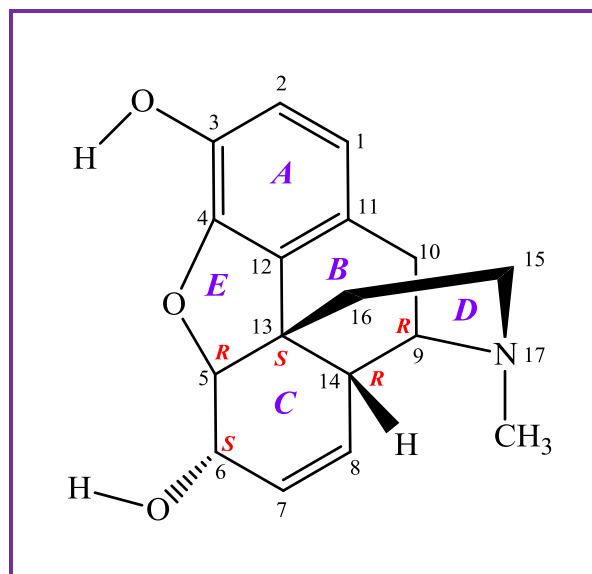


## Morfins stereokjemi

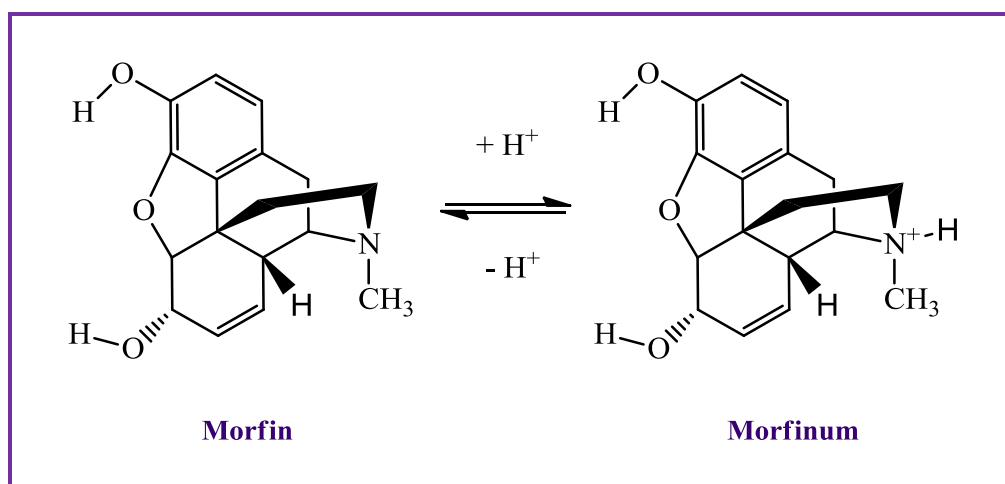
Morfin er et molekyl bestående av 5 kondenserte ringer som er bundet sammen i en rigid kvasidiamant struktur. Det finnes et alifatisk 3° amin i molekylet og to hydroksylgrupper. Figur 24 viser strukturen til morfin, og nummerering av karbonene. Det er denne nummereringen som vil bli brukt i resten av oppgaven.

Morfin inneholder 5 kirale sentra. Det finnes derfor 64 mulige diasteromerer som ikke kan interkonvertere med hverandre uten å bryte og danne nye bindinger.(15) Kun en av disse konfigurasjonene er biologisk aktiv og dens absolutte konfigurasjon er: **5R, 6S, 9R, 13S og 14R**.

Fordi morfin inneholder et 3° amin som kan binde til seg en  $H^+$ , så vil det oppstå en likevekt mellom molekylets nøytrale og ladede former, henholdsvis morfin og morfinum. Biologiens hovedverktøy er hydrogenbindinger, og likevekter gjør det mulig stadig å kunne rette uønskede interaksjoner frem og tilbake uten store energikostnader.(14)



Figur 24: Nummerering av karbonene og ringene i morfin.

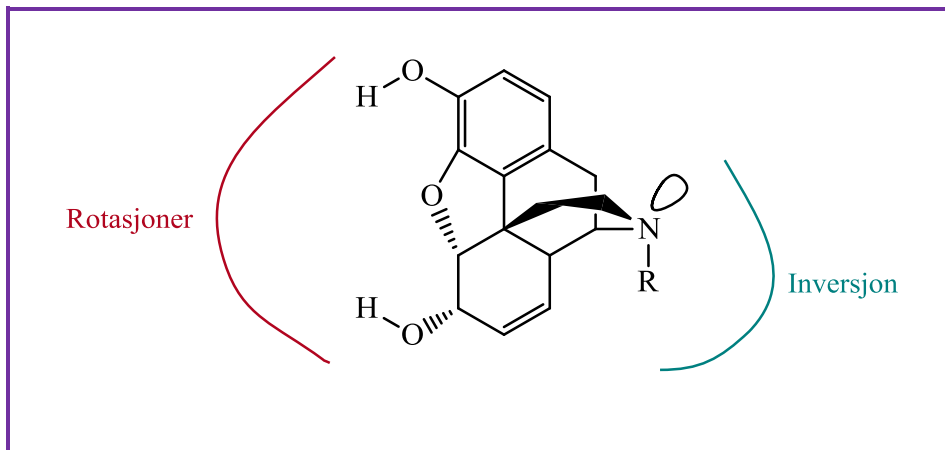


Figur 25: Likevekt mellom morfin og morfinum



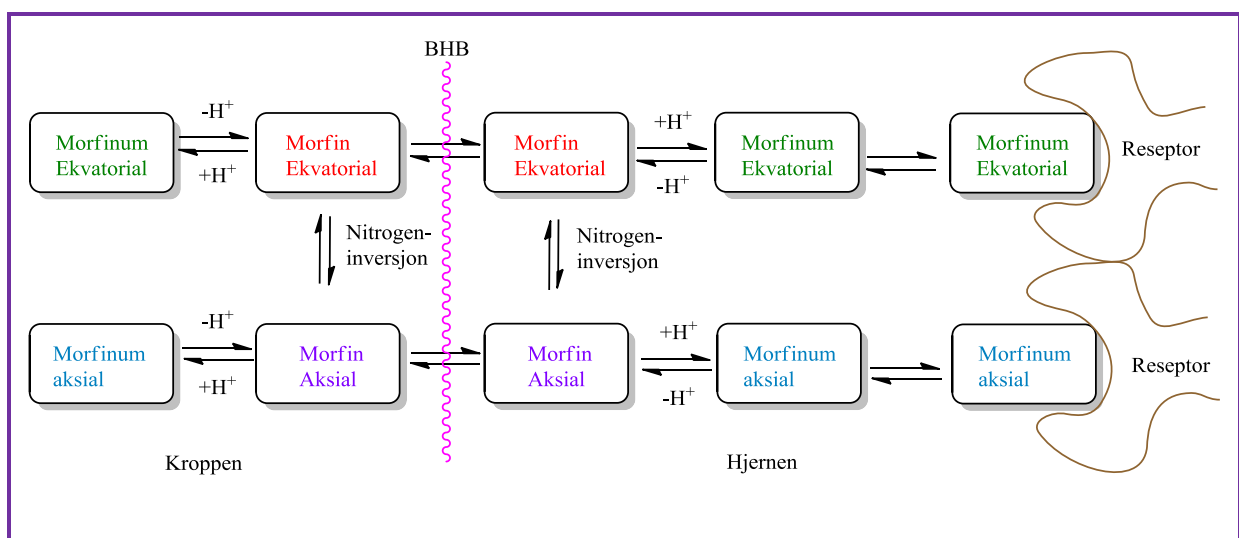
## Konformasjonsanalyse av morfin

Morfin har to fleksible deler. På den ene siden sitter to OH-grupper som kan roteres slik at hydrogenene kan være i ulike posisjoner. På den andre siden er en N-metyl som kan skifte mellom ekvatorial og aksial posisjon via nitrogeninversjon i nøytral morfin.



Figur 26: Morfin har to fleksible deler. Rotasjon av OH-gruppene på den ene siden, og nitrogeninversjon på den andre siden.

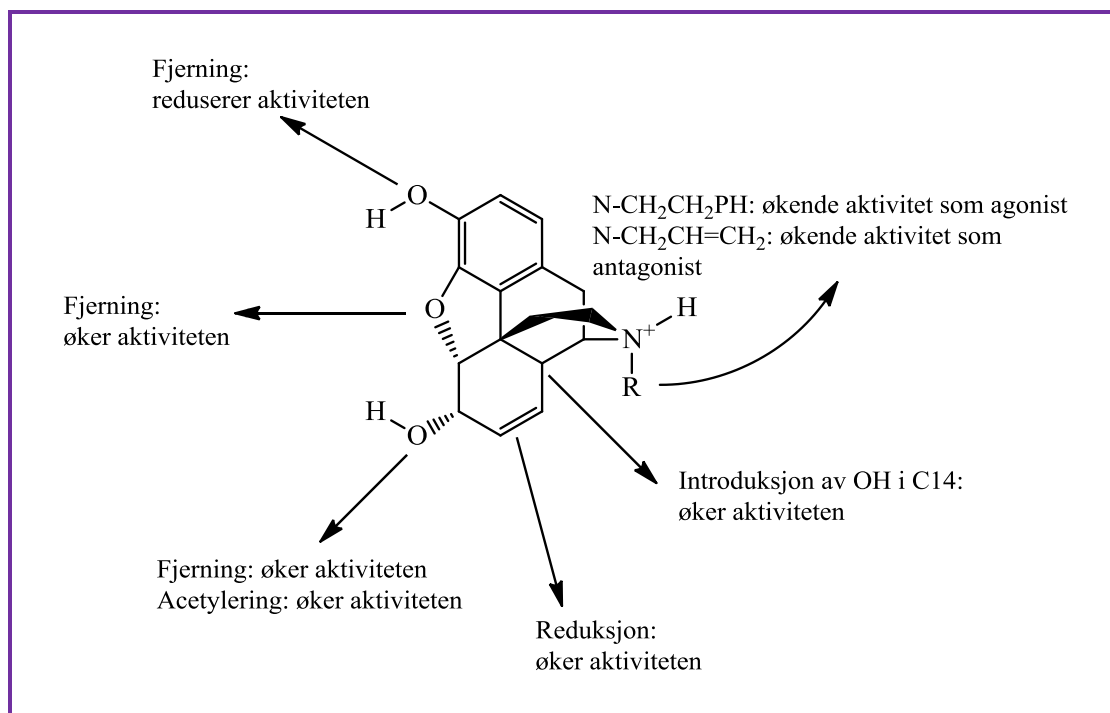
I blodet vil morfin, som sagt, til enhver tid befinne seg i ulike likevekter mellom ladete og nøytrale former, men også med N-metyl aksialt eller ekvatorialt, noe som er helt essensielt for transport, effekt, metabolisme og utskillelse. Fordi blodet har en pH på 7,4, og  $R_3NH^+$  i morfin har en pKa på 8,0, vil morfins likevekt forskyves mot ladet form. Det er likevel de nøytrale formene som krysser BHB, men i CNS vil det dannes en ny likevekt som forskyves mot ladet form, og som igjen danner likevekt med kompleks til reseptoren som vist i figur 27.



Figur 27: Likevekter i kroppen og hjernen mellom morfin og morfinum

## Tidligere forskning på morfin og morfinderivater

Det er gjort omfattende forskning med morfinmolekylet der ulike deler av molekylet er blitt fragmentert bort for å finne farmakoforen og eventuelt nye og bedre morfinderivater. (figur 28)



Figur 28: Addering og fjerning av substituenten på morfin gir ulike endringer i aktiviteten.

Ett grundig litteratursøk som vi foretok viste at det ikke finnes noen helhetlig konformasjonsanalyse av morfin per dags dato. Den eneste artikkelen med noen beregninger med B3LYP-metoden var skrevet av Rincon et al,(48) men denne inneholdt store mangler. Det ble ikke tatt hensyn til at morfin kan ha metylgruppen både ekvatorialt og aksialt, eller at den kan være ladet og nøytral. I tillegg hadde de gjort en konformasjonsanalyse av heroin, for så å relatere dette til kompleksering i reseptor, til tross for at heroin er et prodrug som blir metabolisert til morfin eller 6-acetyl morfin, før den kan binde seg til reseptorene. Konformasjonsanalyse av heroin er derfor ikke aktuell når det gjelder selve bindingen til reseptorene. Ifølge Rincon et al, har de funnet en stabil konformer av morfin ekvatorial som er 6-OH i g<sup>-</sup>, men det har ikke vi klart å finne tross flere forsøk på beregninger med ulike strategier. I tillegg er verdiene på energiene som de publiserte nokså annerledes enn det vi fant ut, til tross for at vi har benyttet samme beregningsnivå. Det kan hende at de faktisk ikke har beregnet hver og en konformer, men heller kanskje skannet energien ved rotasjon av OH-gruppene, og plukket ut cirka-verdier herfra.

## Organisering av forsøkene

Beregningene vi gjorde var store og omfattende og ga enorme mengder med resultater. Det har vært en utfordring å finne ut hvordan disse kan presenteres på en oversiktlig og forståelig måte. Vi har valgt å dele beregningsforsøkene i fire deler:

- **DEL A: Ammoniakk/Ammonium.** Beregninger av  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$  ble gjort for å sammenligne forholdene rundt nitrogenet i et enkelt molekyl med nitrogenet som sitter i et stort kompleks som morfin.
- **DEL B: Nitrogeninversjon i morfin.** Beregninger av N-inversjon i morfin danner grunnlag for analyse av den konformasjonelle adferden som foregår rundt nitrogen. Vi er interessert i å vite om TS til nitrogeninversjon i morfin har høyere eller lavere energi enn TS i ammoniakk, og om ulike konformasjoner rundt OH-gruppene kan påvirke nitrogeninversjon.
- **DEL C: Beregninger av de stabile konformerene.** Dette gir oss informasjon om konformasjonsadferden rundt OH-gruppene, i kombinasjon med at N-metyl kan være ekvatorialt eller aksialt og at molekylet kan være nøytralt og ladet. Hvilke konformasjoner av OH-gruppene og N-metyl gruppen som gir mest stabilitet, og hvordan de påvirker hverandre, er av interesse her.
- **DEL D: Skanninger.** Dette ble gjort for å sikre at vi ikke hadde oversett noen stabile konformerer, for å sammenligne TS mellom de stabile konformerene og se på den generelle konformasjonsadferden til de ulike konformerene.

Resultatene i de fire gruppene presenteres hver for seg, inkludert noe diskusjon. Deretter kommer et avsnitt der vi tar for oss de resultatene som vi mener må drøftes mer.

## 4.2. Forsøkene

### *DEL A: Ammoniakk/Ammonium*

Vi besluttet å foreta beregninger av ammoniakk og ammonium som referanse molekyler, samt TS og inversjonsbarrieren i ammoniakk, siden de verdiene som finnes i litteraturen er gamle, og kan ikke sammenlignes med våre høy-kvalitets beregninger. Beregningene av ammoniakk gir et godt bilde av hvordan hydrogenatomene rundt nitrogen "oppfører seg" når de ikke er påvirket av andre atomer eller bundet fast i et rigid molekyl. Dette blir brukt som utgangspunkt for sammenligning av tilsvarende forhold rundt nitrogen i morfin og morfinum.

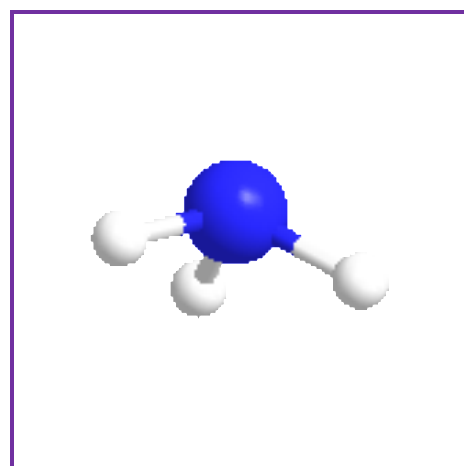
#### **Ammoniakk**

Vinkler:  $106,5^\circ$

Ladning (Mulliken): N = -0,46     H = 0,15

Bindingslengde: N-H =  $1,01\text{\AA}$

I ammoniakk viser resultatene, slik som vi forventet, at det ledige elektronparet tar så mye plass at de presser hydrogenene mot hverandre. I en perfekt tetraeder er alle vinklene  $109,5^\circ$ , men her er H-C-H-vinklene presset sammen til  $106,5^\circ$ . Det store nitrogenatomet trekker også til seg elektronene fra de små hydrogenene slik at det får en liten negativ ladning. De tre hydrogen-atomene blir litt positive.



Figur 29: Ammoniakk

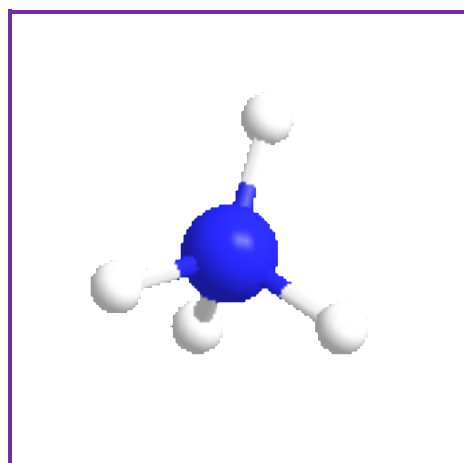
#### **Ammonium**

Vinkler:  $109,5^\circ$

Ladning (Mulliken): N = 0.03     H = 0,24

Bindingslengde: N-H =  $1,01\text{\AA}$

Vinklene tilsvarer en perfekt tetraeder. Ladningen er likt fordelt mellom de fire hydrogenatomene, mens nitrogen er tilnærmet nøytral. Bindingslengdene er de samme som i ammoniakk.



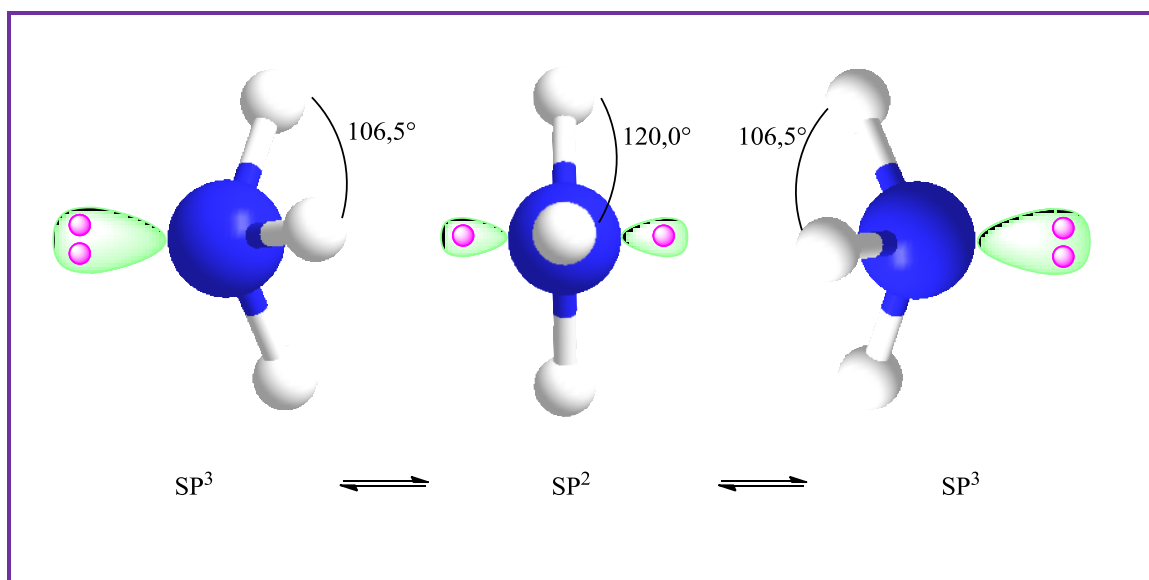
Figur 30: Ammonium

## Nitrogeninversjon i ammoniakk

Nitrogenet i ammoniakk kan invertere, fordi molekylet i nøytral form har ledige non bonding elektroner som kan flytte fra den store loben til  $SP^3$  orbitalen, til den lille loben på andre siden, via et punkt hvor lobene er like, dvs. at orbitalet blir P og nitrogenet blir  $SP^2$ .(49) Nitrogen inversjon er umulig i kvarternære atomer, da de ikke har et par nbe. Derfor er nitrogeninversjon umulig i ammonium.(30) På 70-tallet eksperimenterte den avdøde Professor Johannes Dale seg frem til at inversjonsbarrieren i ammoniakk var 24 kJ/mol.(30) Med dagens avanserte B3LYP/cc-pvtz beregningsmetode fant vi TS til inversjonen på 22,2 kJ/mol, noe som ikke er vesentlig stor forskjell fra det de fant på 70-tallet.

Tabell 3: Inversjonsbarrieren i ammoniakk beregnet med B3LYP/cc-pvtz.

| Ammoniakk       |  |                 |
|-----------------|--|-----------------|
| NH <sub>3</sub> | Overgangstilstand                          | NH <sub>3</sub> |
| HF= -56,5847252 | HF= -56,5762884                            | HF= -56,5847252 |
| 0 kJ/mol        | <b><math>\Delta E = 22,2</math> kJ/mol</b> | 0 kJ/mol        |

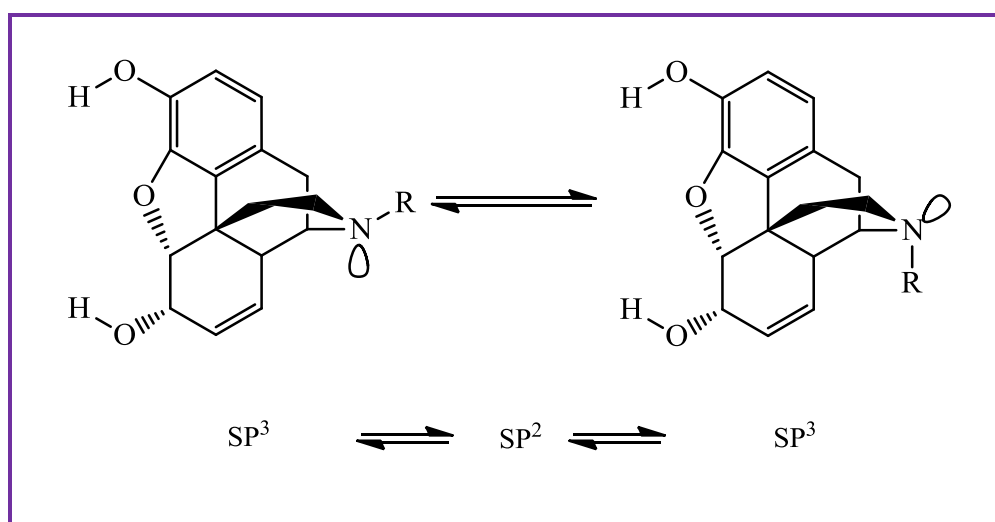


Figur 31: Nitrogeninversjon i ammoniakk. Non bonding elektronene (rosa prikker) går fra den store loben (grønn) på venstre side, via to små lober ved TS og over til den andre siden.

### DEL B: Nitrogeninversjon i morfin

Nitrogenet i morfin er tertiært og  $SP^3$  hybridisert med et par nonbonding elektroner (nbe) som befinner seg i et  $SP^3$  orbital. Disse elektronene kan enten fungere som en svak base og danne en  $\sigma$ -binding med  $H^+$  eller gjøre en nitrogeninversjon. Fordi nitrogeninversjon er umulig i kvartenære atomer, er denne dynamiske prosessen utelukket i morfins ladede form.

I morfin inngår to av nitrogens bindinger i en sykloheksan som er kondensert med andre ringer i makromolekylet. Den tredje bindingen i det nøytrale nitrogenet er til en metylgruppe. Ved nitrogeninversjon vil denne N-metylgruppen bli flyttet fra ekvatorial til aksial eller fra aksial til ekvatorial posisjon på sykloheksanringen. Altså vil N-metyl-gruppen ekvilibrere mellom aksial og ekvatorial posisjon via en  $sp^2$  TS.



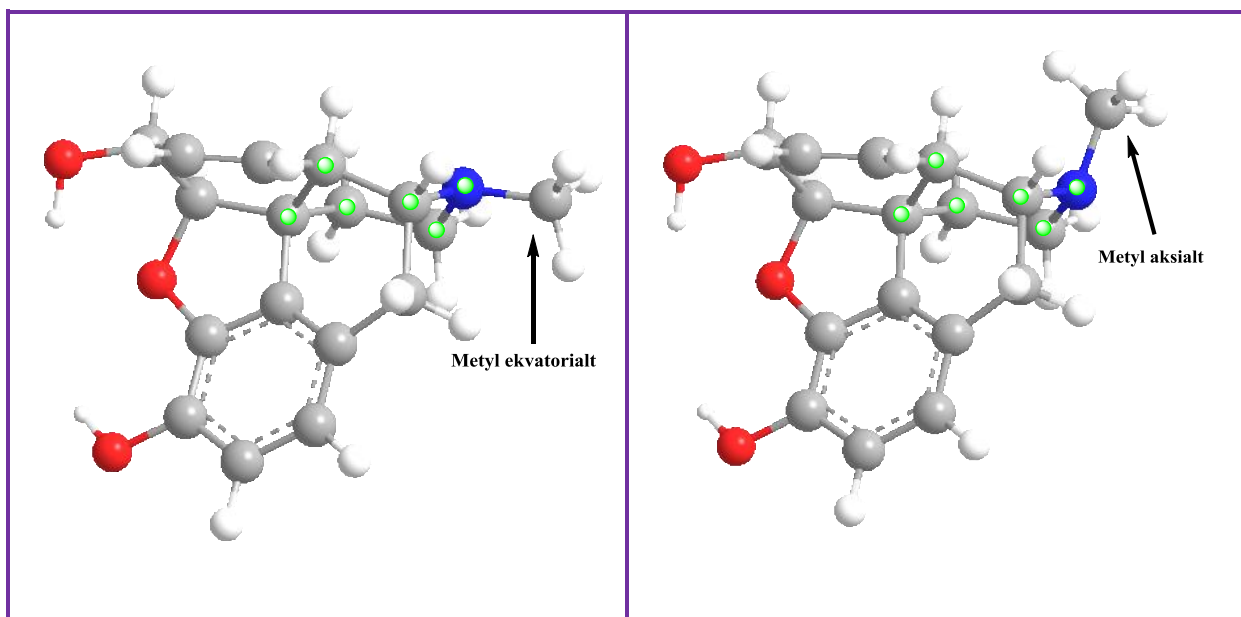
Figur 32: Nitrogeninversjon i morfin

Som beskrevet tidligere i oppgaven, er ekvatorial posisjon av substituenten det mest stabile i "frie" seks-karbon-ringer og likevekten er derfor sterkt forskjøvet mot denne. For morfin kan situasjonen være annerledes i forhold til ammoniakk, fordi ringen er kondensert i morfins rigide struktur, og steriske hindringer fra andre steder på molekylet kan kanskje forskyve likevekten noe mer mot aksial posisjon for N-metyl. TS via en planar N kan også tenkes å være en prosess med høyere energi i morfin enn i  $NH_3$  på grunn av molekylets størrelse og rigiditet. Endringer i forholdene rundt nitrogen, som nitrogen-inversjon og addering eller fjerning av hydrogen, kan forplante seg utover i molekylet. For å kunne svare på dette og på hvorvidt nitrogen inversjon er påvirket av OH gruppens konformasjonelle atferd, er det nødvendig å beregne energien til TS ved nitrogen inversjon i de ulike konformerene.

Vi kan dele morfins stabile konformerer i fem grupper. De ladede formene er ikke aktuelle her, da de ikke kan gjøre nitrogeninversjon på grunn av 4° nitrogen. De nøytrale formene hadde ingen stabile konformerer med 6-OH  $g^-$ , slik at ut fra vår analyse må vi utføre 4 ulike N-inversjons beregninger som er oppsummert i tabell 4. Det ble et forsøk i hver gruppe der vi beregnet energien til TS ved overgang fra  $M_{ekv}$  til  $M_{aks}$ .

Tabell 4: Oversikt over nitrogeninversjonene

| Gruppe 1    | Gruppe 2     | Gruppe 3                 | Gruppe 4     | Gruppe 5      |
|-------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------|
| $3syn-6g^+$ | $3syn-6anti$ | $3syn-6g^- / 3anti-6g^-$ | $3anti-6g^+$ | $3anti-6anti$ |
| $M_{ekv}$   | $M_{ekv}$    | Ikke stabil              | $M_{ekv}$    | $M_{ekv}$     |
| $M_{aks}$   | $M_{aks}$    | Ikke stabil              | $M_{aks}$    | $M_{aks}$     |
| gjort       | gjort        | Ikke gjort               | gjort        | gjort         |

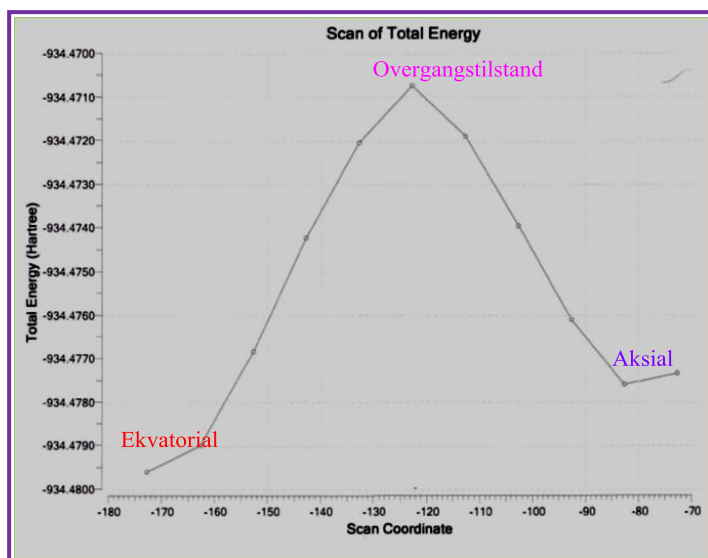


Figur 33:  $Morfinum_{ekv} 3syn 6g^+$ . Grønne prikker viser atomene i sykloheksanringen. Pilen peker på N-metyl som sitter ekvatorialt på sykloheksanen.

Figur 34:  $Morfinum_{aks} 3syn 6g^+$ . Grønne prikker viser atomene i sykloheksanringen. Pilen peker på N-metyl som sitter aksialt på sykloheksanen.



Det var litt vrient å finne overgangstilstanden mellom morfin<sub>ekv</sub> og morfin<sub>aks</sub>. For å finne ut omtrent hvor det skal letes etter denne, så ble det gjort en skanning med metoden B3LYP og basissett 6-31G\*. Vi gjorde en skanning av energiene når morfin gikk fra ekvatorial til aksial ved en nitrogeninversjon. (Figur 35) Det høyeste punktet vil være omtrent der overgangstilstanden er. Vi ser tydelig at ekvatorial posisjon har lavere energi enn aksial posisjon. Denne informasjonen ble brukt til å finne overgangstilstanden til de ulike morfin-konformerene med det høyeste beregningsnivået, B3LYP/cc-pvtz.



Figur 35: Energi-skanning av N-inversjon i morfin<sub>ekv</sub>. 3syn 6g<sup>+</sup> med B3LYP/basissett 6-31G\*

Energibarrieren fra skan-kurven med 6-31G\* basissett:

$$\Delta E_{\text{ekv-TS}} = (934,4796 - 934,4707) \text{ Hartree} \times 2625,5 = \underline{23,4 \text{ kJ/mol}}$$

$$\Delta E_{\text{aks-TS}} = (934,4776 - 934,4707) \text{ Hartree} \times 2625,5 = \underline{18,1 \text{ kJ/mol}}$$

Det ble gjort beregninger for å finne overgangstilstanden mellom alle de ulike konformerene til morfin som vi har funnet med B3LYP/cc-pvtz for å få mer nøyaktige verdier. Det ga høyere energibarriere enn det vi fikk med 6-31G\* basissett og er oppsumert i tabell 5. Det viser seg at N-inversjonsbarrieren er 5-6 kJ/mol høyere i morfin enn i ammoniakk, noe som ikke var uventet siden det alifatiske aminet inngår i morfinets rigide struktur og ikke er like fri. Overgangstilstanden er i tillegg litt høyere når 6-OH står *i anti* posisjon enn når den står *i g<sup>+</sup>* posisjon, noe som betyr at de to delene av molekylet påvirker hverandre til tross for at de ikke er knyttet sammen.

Tabell 5: Energiene til de ulike overgangstilstandene

| <b>Morfin 3-OH-syn 6-OH-g<sup>+</sup></b>  |  |                             |
|--|--|-----------------------------|
| <b>Morfin<sub>ekv</sub></b>                | <b>Overgangstilstand</b>                   | <b>Morfin<sub>aks</sub></b> |
| <b>HF= -939,9559324</b>                    | HF= -939,9454019                           | HF= -939,9520137            |
| <b>0 kJ/mol</b>                            | <b><math>\Delta E = 27,6</math> kJ/mol</b> | $\Delta E = 10,3$ kJ/mol    |
|  |  |                             |
| <b>Morfin 3-OH-anti 6-OH-g<sup>+</sup></b> |  |                             |
| <b>Morfin<sub>ekv</sub></b>                | <b>Overgangstilstand</b>                   | <b>Morfin<sub>aks</sub></b> |
| <b>HF= -939,9534072</b>                    | HF= -939,9429007                           | HF= -939,9495448            |
| <b>0 kJ/mol</b>                            | <b><math>\Delta E = 27,6</math> kJ/mol</b> | $\Delta E = 10,2$ kJ/mol    |
|  |  |                             |
| <b>Morfin 3-OH-syn 6-OH-anti</b>           |  |                             |
| <b>Morfin<sub>ekv</sub></b>                | <b>Overgangstilstand</b>                   | <b>Morfin<sub>aks</sub></b> |
| <b>HF= -939,9498619</b>                    | HF= -939,939149                            | HF= -939,9459288            |
| <b>0 kJ/mol</b>                            | <b><math>\Delta E = 28,1</math> kJ/mol</b> | $\Delta E = 10,4$ kJ/mol    |
|  |  |                             |
| <b>Morfin 3-OH-anti 6-OH-anti</b>          |  |                             |
| <b>Morfin<sub>ekv</sub></b>                | <b>Overgangstilstand</b>                   | <b>Morfin<sub>aks</sub></b> |
| <b>HF= -939,9447356</b>                    | HF= -939,9340264                           | HF= -939,9408452            |
| <b>0 kJ/mol</b>                            | <b><math>\Delta E = 28,1</math> kJ/mol</b> | $\Delta E = 10,2$ kJ/mol    |

### DEL C: Beregninger av de stabile konformerene

I morfin er det to hydroksylgrupper, en på karbon nummer 6 (6-OH) og en på karbon nummer 3 (3-OH). Rotasjon rundt bindingen mellom C6/C3 og Oksygen vil flytte Hydrogenet rundt i rommet. Det er verken likegyldig eller tilfeldig hvor disse hydrogenene orienterer seg. De vil være påvirket av interaksjoner med de andre atomene i molekylet og eventuelt andre forhold som for eksempel i reseptor eller i blodet. Vi har forsøkt å beregne de enkelte konformasjoner av morfin rundt C6-OH mens C3-OH er holdt fast ved bestemte konformasjoner, og vise versa. Dette ble gjort for både morfin med N-CH<sub>3</sub> ekv, N-CH<sub>3</sub> aks, og deres korresponderende ladede former.

En del informasjon om konformerene kan resoneres allerede før beregningene starter, dersom vi ser på molekylens topologi og symmetri.

Konformerer med metylgruppen i ekvatorial posisjon vil generelt være mer stabile enn tilsvarende konformerer med metylgruppe i aksial posisjon, da metyl gruppen ikke blir involvert i 1,3 og 1,5 *diaksial*-interaksjoner

Når en eller begge hydrogenene i OH-gruppene vender mot det eteriske oksygenet kan de danne hydrogenbinding til oksygenets nbe, noe som vil øke stabiliteten. OH-gruppene må da stå i *syn*,  $g^+$  eller  $g^-$  for å oppnå dette. Dersom begge OH-gruppene vender mot eterisk oksygen kan det oppstå en konkurranse om de to par nbe, eventuelt er hver av de tiltrukket til hvert sitt par nbe. Når en av de OH gruppene holdes i *anti* posisjon kan den ikke konkurrere med den andre OH gruppen om nbe til det eteriske oksygenet. De to nbe-parene er ikke identiske, siden de to sidene av molekylet ikke er like, og dermed vil deres evne til å danne hydrogenbinding ikke være den samme.

OH gruppene i seg selv er ulike, den ene er aromatisk og dermed mer polarisert enn den andre som er alifatisk. Den aromatiske ringen vil påvirke konformasjons adferden til C3-OH som igjen kan ha innvirkning på C6-OH.

Allerede nå kan vi slå fast at siden morfinets to sider er ulike, vil vi forvente at konformasjonsadferden rundt  $g^-$  og  $g^+$  for hver av disse to OH-gruppene vil være forskjellig, spesielt for C6-OH der vi forventer at  $g^+$  skal være mer stabil enn  $g^-$ . Ved  $g^+$  vil H-atomet danne stabiliserende interaksjoner med både nbe til det eteriske oksygenet,  $\pi$ -elektroner til fenol ringen og  $\pi$ -elektroner til C7-C8, mens  $g^-$  har flere frastøtende interaksjoner med nabo-hydrogenatomer som C6-H og C5-H.

Det er kjent at fjerning av C6-OH fra molekylet gir mer potente forbindelser.(12) Grunnen til at man får bedre forbindelser har ikke nødvendigvis å gjøre med molekylets

konformasjonsatferd, men med molekylets lipofilisitet og evne til å krysse BHB.

Likevektkonstantene til kryssing av BHB er avhengige av molekylets log P. Ved å fjerne C6-OH fra molekylet, kan det være at den ønskede konformasjonen må ofres for en større gevinst i form av lipofilisitet. Derfor mener vi at det er viktig å analysere C6-OH til tross for at den ikke direkte deltar i selve komplekseringen med reseptoren, noe som kan ha en viss påvirkning på C3-OH slik som våre resultater indikerer.

Rotasjoner av bindingene mellom C3-O og C6-O vil gi ulike konformasjoner til molekylet. Med utgangspunkt i rotasjon  $60^\circ$  om gangen er det teoretisk 36 muligheter. For hver av morfin med N-CH<sub>3</sub> aksial og morfin med N-CH<sub>3</sub> ekvatorial, samt deres korresponderende ladede former, er de totale mulig formene  $36 \times 4 = 144$ . Som omtalt i tidligere er det i *syn*, *anti*, *g<sup>+</sup>* og *g<sup>-</sup>* posisjoner vi kan finne stabile konformerer. De *syn-clinale* orientasjonene vil kun være overgangstilstander. (Ustabile konformasjoner kan forekomme i selve komplekset med reseptoren) Med kun 16 av 36 muligheter for hver av morfin<sub>ekv</sub>, morfin<sub>aks</sub>, morfinum<sub>ekv</sub> og morfinum<sub>aks</sub>, kan vi teoretisk finne 64 stabile konformerer som må, om de blir funnet, beregnes hver for seg. (tabell 6)

Tabell 6: Antall mulige konformerer ved rotasjoner av  $60^\circ$  rundt hver av de to OH bindingene. De hvite er mulige stabile konformerer, mens de fargede er TS. Dette gjelder for både nøytrale, ladede, ekvatoriale og aksiale konformerer, altså fire muligheter i hver rute.

| C6-OH<br>C3-OH      | <i>syn</i> | <i>gauche+</i><br>( <i>syn-clinal+</i> ) | <i>anti-clinal+</i> | <i>anti</i> | <i>anti-clinal-</i> | <i>gauche-</i><br>( <i>syn-clinal-</i> ) |
|---------------------|------------|--|---------------------|-------------|---------------------|--|
| <i>syn</i>          | 3s6s       | 3s6g+                                    | 3s6ac+              | 3s6a        | 3s6ac-              | 3s6g-                                    |
| <i>gauche+</i>      | 3g+6s      | 3g+6g+                                   | 3g+6ac+             | 3g+6a       | 3g+6ac-             | 3g+6g-                                   |
| <i>anti-clinal+</i> | 3ac+6s     | 3ac+6g+                                  | 3ac+6ac+            | 3ac+6a      | 3ac+6ac-            | 3ac+6g-                                  |
| <i>anti</i>         | 3a6s       | 3a6g+                                    | 3a6ac+              | 3a6a        | 3a6ac-              | 3a6g-                                    |
| <i>anti-clinal-</i> | 3ac-6s     | 3ac-6g+                                  | 3ac-6ac+            | 3ac-6a      | 3ac-6ac-            | 3ac--g-                                  |
| <i>gauche-</i>      | 3g-6s      | 3g-6g+                                   | 3g-6ac+             | 3g-6a       | 3g-6ac-             | 3g-6g-                                   |

Arbeidet med å finne alle de stabile konformerene var tidkrevende og utfordrende. Av de totalt 64 mulige stabile konformerer, viste det seg at det var langt færre vi klarte å finne. Kun totalt 20 stk var stabile nok til å kunne kalles konformerer 8 nøytrale og 12 ladede. De andre variantene må anses å være overgangstilstander.

Tabell 7: Oversikt over de stabile konformerene til morfin og morfinum som ble beregnet.

| Gruppe 1<br>3syn-6g <sup>+</sup> | Gruppe 2<br>3syn-6anti        | Gruppe 3<br>3syn-6g <sup>-</sup> | Gruppe 4<br>3anti-6g <sup>+</sup> | Gruppe 5<br>3anti-6anti       | Gruppe 6<br>3anti-6g <sup>-</sup> |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| M <sub>ekv</sub>                 | M <sub>ekv</sub>              | -                                | M <sub>ekv</sub>                  | M <sub>ekv</sub>              | -                                 |
| M <sub>aks</sub>                 | M <sub>aks</sub>              | -                                | M <sub>aks</sub>                  | M <sub>aks</sub>              | -                                 |
| M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub>    | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub> | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub>    | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub>     | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub> | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub>     |
| M <sup>+</sup> <sub>aks</sub>    | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub> | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub>    | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub>     | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub> | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub>     |
| 4 stk                            | 4 stk                         | 2 stk                            | 4 stk                             | 4 stk                         | 2 stk                             |

De stabile konformerene er delt i grupper, og resultatene i hver gruppe blir presentert nedenfor. Fordi resultatene fra beregningene av stabile konformerer var mange og kompliserte, vil vi for diskusjonens skyld først presentere hvert gruppeforsøk med tilhørende konformerer og deres totalenergi i Hartree og  $\Delta E$  i kJ/mol. Etter at siste gruppe (nr. 6) er presentert, kommer en et nytt avsnitt der alle konformerene er samlet i to tabeller (tabell 18 og 19), en for de nøytrale formene og en for de ladede formene, og figur 45 som viser alle de 144 konformerene og overgangstilstandene.

### Gruppe 1: 3-OH *syn* – 6-OH *g*<sup>+</sup>

Energiforskjellen i morfin mellom N-CH<sub>3</sub> ekvatorialt og aksialt var 10,3/8,3 kJ/mol (utregninger med B3LYP/MP2) For morfinum konformerene var forskjellen i energi mellom ekvatorial og aksial kun 5,9/3,9 kJ/mol. Forskjellen på energien som ble beregnet med metodene B3LYP og MP2 var 2,0 kJ/mol i begge tilfellene. Med andre ord gir begge beregningsmetodene tilnærmet like verdier som resultat. Morfin blir tydelig mer påvirket av endringer rundt nitrogen enn morfinum når OH-gruppene er orientert slik.

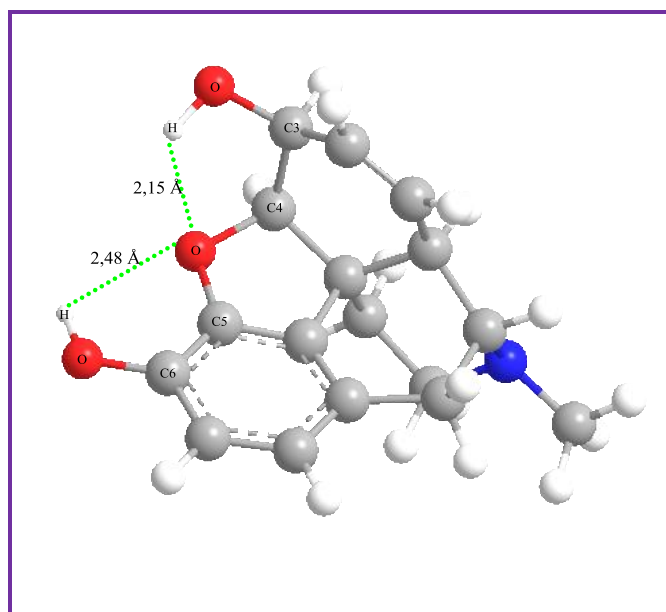
Tabell 8: Energien til *morfin<sub>ekv</sub>* og *morfin<sub>aks</sub>* med 3*syn* og 6*g*<sup>+</sup>

| Konformer                       | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | ΔE kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | ΔE kJ/mol<br>MP2 |
|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------|
| <i>M<sub>aks</sub>-3syn-6g+</i> | -939,9520137                       | 10,3               | -937,8072755                     | 8,3              |
| <i>M<sub>ekv</sub>-3syn-6g+</i> | -939,9559324                       | 0                  | -937,8104417                     | 0                |

Tabell 9: Energien til *morfinum<sub>ekv</sub>* og *morfinum<sub>aks</sub>* med 3*syn* og 6*g*<sup>+</sup>

| Konformer                                   | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | ΔE kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | ΔE kJ/mol<br>MP2 |
|---|------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------|
| <i>M<sub>aks</sub><sup>+</sup>-3syn-6g+</i> | -940,3354554                       | 5,6                | -938,1884347                     | 3,9              |
| <i>M<sub>ekv</sub><sup>+</sup>-3syn-6g+</i> | -940,3375743                       | 0                  | -938,1899163                     | 0                |

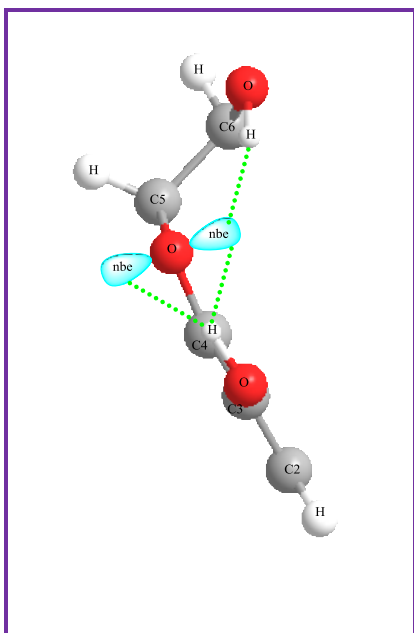
De konformerene som vi fant som de mest stabile var de i gruppe 1 med C4-C3-OH i *syn* posisjon. I denne posisjonen vil hydrogenet, som nevnt tidligere, kunne danne en viss hydrogen-binding med nbe til det eteriske oksygenet, noe som fører til økt stabilitet. I 3-OH *syn* konfigurasjon er H-atomet ortogonal til nbe til det eteriske oksygen. Det er faktisk forventet å få til mye mer effektiv hydrogen binding i *g*<sup>-/+</sup> enn i *syn* for da er hydrogenet rettet direkte mot et av orbitalene til nbe.



Figur 36: *Morfin<sub>ekv</sub>* 3*syn* 6*g*<sup>+</sup>. De grønne, stiplede linjene viser H-bindinger til eterisk oksygen.

C3-OH er en fenolisk alkohol og nbe elektronene til oksygenet er delvis delokaliserte i benzen ringen. Det ligger i benzen-ringens natur, der karbonene er  $SP^2$ -hybridisert og elektronene i  $\pi$ -orbitalene inngår i resonans, at ringens  $\sigma$ -skjelett er planart. Atomer som er direkte bundet til ringen orienterer seg i det samme planet slik at de ikke kolliderer med resonans-elektronene.(31)

Oksygenatomet må derfor av geometriske grunner være på samme plan som ringens  $\sigma$ -skjelett. H-atomet som er bundet til O-atomet kan rotere fritt og vil befinne seg i de mest stabile konformasjoner, avhengig av miljøet, topologien osv. Beregningene viste at også dette



Figur 37: Utsnitt av morfin. Hydrogenenes konkurranse om nbe til det eteriske oksygenet.

H-atomet kun var stabilt når det orienterte seg planart i forhold til benzen-ringens.

Det er to posisjoner 3-OH kan befinne seg i og hvor hydrogen er i samme plan med benzen-ringens: *syn* (*syn-periplanar*) og *anti* (*anti-periplanar*). I *anti*-konfigurasjon er det forventet en frastøtende interaksjon mellom H-atomet i C3-OH og H-atomet som sitter på C2 i ring A i morfinskjelettet.

$g$  +/- vil derfor i dette tilfellet være overgangstilstander, og ikke stabile konformerer på grunn av forholdene rundt benzenringens. Hydrogenet vil i *syn*-posisjon peke midt mellom de to parene nbe. Siden C6-OH i dette forsøket står i  $g^+$ , kan det oppstå konkurranse om det ene nbe, slik at C3-OH kanskje foretrekker H-binding til det andre nbe.



## Gruppe 2: 3-OH *syn* – 6-OH *anti*

For morfin 3*syn*–6*anti* var forskjellen i energi mellom ekvatorial og aksial N-metyl 10,4/8,5 kJ/mol (B3LYP/MP2) Tilsvarende for morfinum var bare 5,5/ 3,8 kJ/mol. Forskjellen på de to metodene B3LYP og MP2 er henholdsvis 1,9 og 1,7 kJ/mol. På samme måte som 3-OH *syn* 6-OH *g*<sup>+</sup> i gruppe 1, blir morfin mer påvirket av endringer rundt nitrogen enn morfinum. Energiforskjellene er omtrent de samme som i gruppe 1.

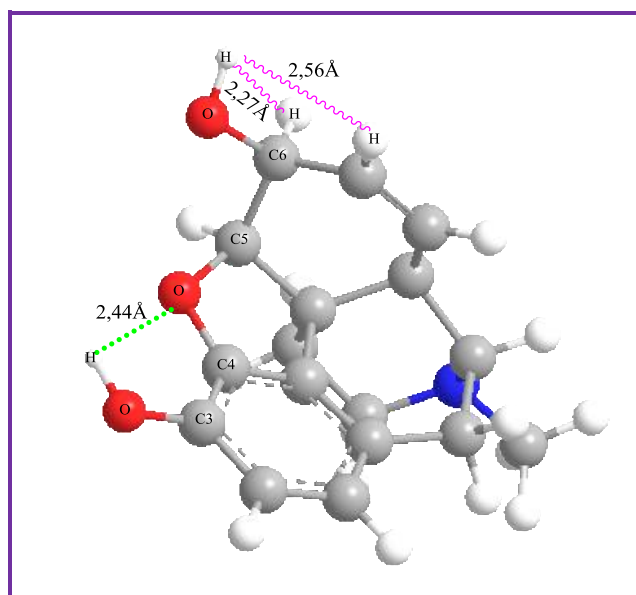
Tabell 10: Energien til morfin<sub>ekv</sub> og morfin<sub>aks</sub> med 3*syn* og 6*anti*

| Konformer                                  | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|--|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| $M_{aks}^{-}$ -3 <i>syn</i> –6 <i>anti</i> | -939,9459288                       | 10,4                       | -937,8013395                     | 8,5                      |
| $M_{ekv}^{-}$ -3 <i>syn</i> –6 <i>anti</i> | -939,9498619                       | 0                          | -937,8045674                     | 0                        |

Tabell 11: Energien til morfinum<sub>ekv</sub> og morfinum<sub>aks</sub> med 3*syn* og 6*anti*

| Konformer                                  | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|--|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| $M_{aks}^{+}$ -3 <i>syn</i> –6 <i>anti</i> | -940,3320348                       | 5,5                        | -938,1851410                     | 3,8                      |
| $M_{ekv}^{+}$ -3 <i>syn</i> –6 <i>anti</i> | -940,3341351                       | 0                          | -938,1866033                     | 0                        |

I gruppe 2 holdes 3-OH fortsatt i *syn*, men 6-OH har nå orientert seg i *anti*. Det er ingen konkurranse om nbe til eterisk oksygen, slik at H-bindingen mellom 3-OH og eterisk oksygen vil være sterkere og mer stabil. Forholdet rundt 6-OH har derimot endret seg dramatisk. OH-gruppen er nå i *anti*, noe som gjør at den stabiliserende H-bindingen til eterisk oksygen opphører og det er isteden frastøtende interaksjoner til H-atomene på C6 og C7. Til tross for dette, er morfin og morfinum med 3*syn* 6*anti*, stabile nok til å kalles konformerer.



Figur 38: Morfin<sub>ekv</sub> 3*syn* 6*anti*. De grønne, stiplede linjene viser H-bindinger til eterisk oksygen. De rosa, bølgede linjene viser steriske frastøtninger.

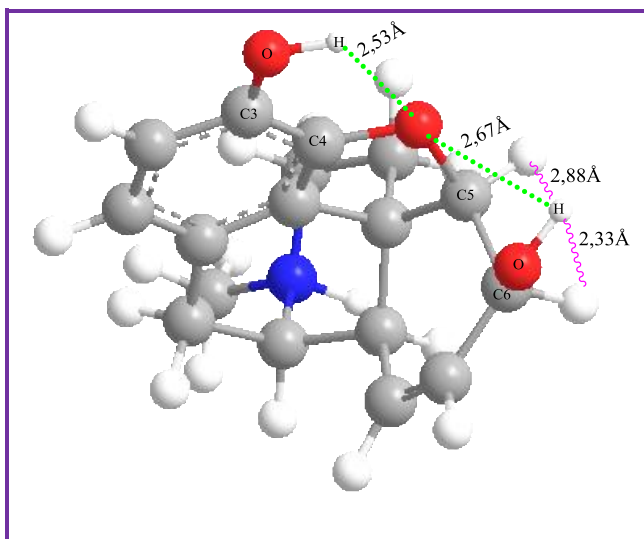
### Gruppe 3: 3-OH *syn* – 6-OH $g^-$

Ved beregninger av konformerene med 3-OH i *syn* og 6-OH i  $g^-$  posisjon ble vi overrasket da vi til tross for flere forsøk ikke klarte å finne 6-OH  $g^-$  for morfin da Gaussian 09 raffinerte molekylet hver gang tilbake til  $g^+$  for. Det var uventet da vi hadde en formening om en relativt stabil H-binding til eterisk oksygen med 6-OH i  $g^-$ . Som en konsekvens av det var det derfor overraskende når vi faktisk klarte å finne  $g^-$  varianter for morfinum. Både B3LYP og MP2 fant stabile konformerer for både morfinum<sub>ekv</sub> og morfinum<sub>aks</sub>, med en energiforskjell på henholdsvis 5,6 og 4,6 kJ/mol med de to metodene. Disse konformerene var i tillegg mer stabile enn *anti*-variantene i gruppe 2.

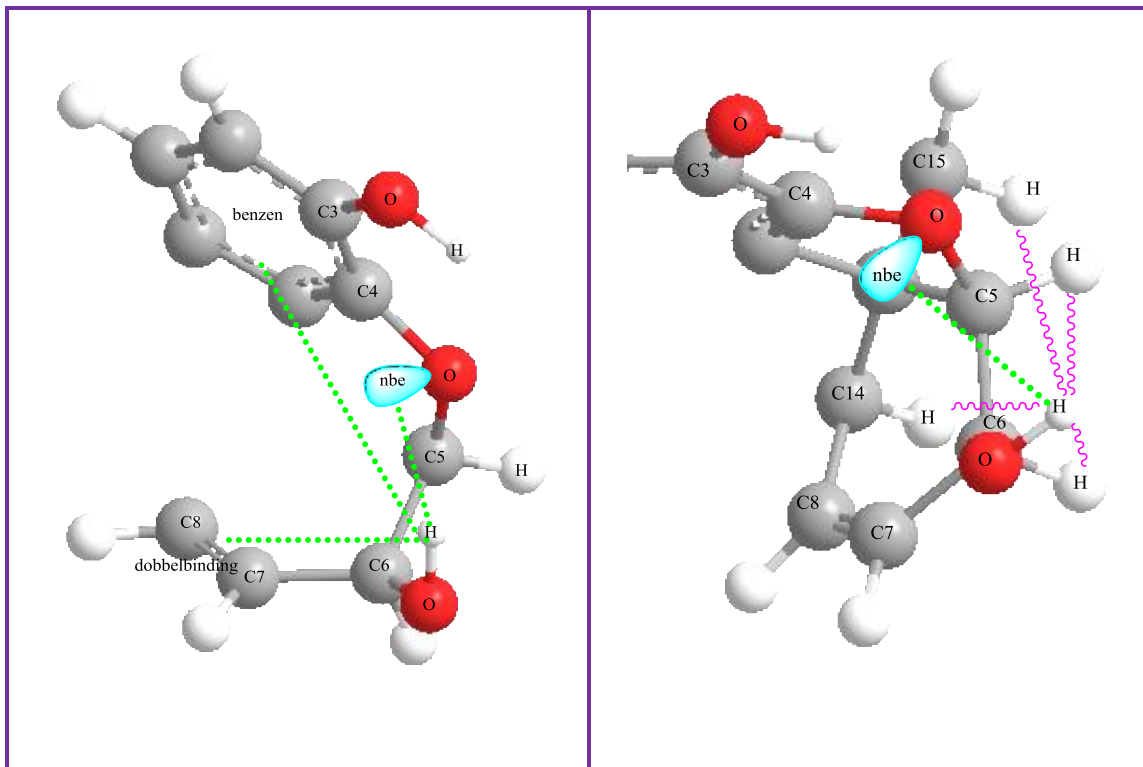
Tabell 12: Morfinums konformerer i gruppe 3: 3-OH *syn* 6-OH  $g^-$

| Konformer             | Elektron energi<br>I Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| $M^+_{aks}-3syn-6g^-$ | -940,3332066                       | 5,6                        | -938,1863850                     | 4,6                      |
| $M^+_{ekv}-3syn-6g^-$ | -940,3353088                       | 0                          | -938,1881541                     | 0                        |

C5-C6-OH kan danne hydrogen binding med det eteriske oksygenet i konformasjoner *syn*,  $g^+$  og  $g^-$ . I  $g^-$  er det frastøtende interaksjoner mellom OH og C5-H, C6-H og kanskje litt C15-H, og C16-H. Mens i  $g^+$  er C6-OH tiltrukket både  $\pi$ -elektronene i fenolen,  $\pi$ -elektronene til dobbel-binding C7=C8, og nbe til det eteriske oksygenet. C6-OH  $g^+$  skal derfor være mye mer stabil enn C6-OH  $g^-$ , men vi hadde allikevel forventet å finne en stabil konformer her. Til tross for dette så får man altså kun stabile konformerer når molekylet er ladet. Det er oppsiktsvekkende å se at addering av et atom på den ene siden av molekylet kan forårsake slike endringer på den andre siden av molekylet.



Figur 39: Morfinum<sub>ekv</sub> 3syn 6g<sup>-</sup>. Grønne stiplede linjer viser H-binding. Bølgete rosa linjer viser to mulige steriske frastøtninger.



Figur 40: Utsnitt av morfinum 3syn 6g<sup>+</sup> med stabiliserende H-bindinger.

Figur 41: Utsnitt av morfinum 3syn 6g<sup>-</sup> med steriske frastøtninger og en H-binding.

### Gruppe 4: 3-OH anti – 6-OH g<sup>+</sup>

I gruppe 1-3 var 3-OH orientert i *syn* posisjon. I gruppe 4- 6 ble beregninger gjort med 3-OH i *anti* posisjon. For morfin 3*anti*-6g<sup>+</sup> var forskjellen i energi mellom N-CH<sub>3</sub> ekvatorialt og aksialt 10,2/8,1 kJ/mol (B3LYP/MP2) Tilsvarende for morfinum var bare 5,5 og 3,9 kJ/mol. Dette er omtrent de samme energiforskjellene som mellom de respektive formene med 3-OH *syn* i gruppe 1.

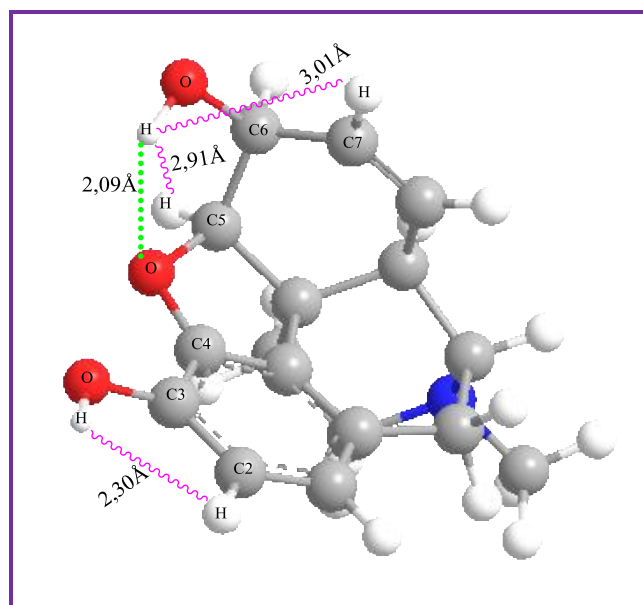
Tabell 13: Energien til morfins konformerer i gruppe 4: 3-OH anti 6 OH g<sup>+</sup>

| Konformer  | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | ΔE kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | ΔE kJ/mol<br>MP2 |
|--|------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------|
| M <sub>aks</sub> -3 <i>anti</i> -6g <sup>+</sup> | -939,9495448                       | 10,2               | -937,8048109                     | 8,1              |
| M <sub>ekv</sub> -3 <i>anti</i> -6g <sup>+</sup> | -939,9534072                       | 0                  | -937,8078904                     | 0                |

Tabell 14: Energien til morfinums konformerer i gruppe 4: 3-OH anti 6-OH g<sup>+</sup>

| Konformer   | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | ΔE kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | ΔE kJ/mol<br>MP2 |
|---|------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------|
| M <sub>aks</sub> <sup>+</sup> -3 <i>anti</i> -6g <sup>+</sup> | -940,3346284                       | 5,5                | -938,1876511                     | 3,9              |
| M <sub>ekv</sub> <sup>+</sup> -3 <i>anti</i> -6g <sup>+</sup> | -940,3367481                       | 0                  | -938,1891286                     | 0                |

Denne konformasjonen vil ikke danne intramolekylær hydrogenbinding mellom 3-OH og eterisk oksygen, siden hydrogenet peker i motsatt retning. I *anti* konformasjon har C3-OH en sterk frastøtende interaksjon med hydrogenet på C2. Denne konformasjonen vil derfor være mer ustabil enn konformasjoner med 3-OH i *syn* slik som i gruppe 1. Forholdet mellom ekvatoriale og aksiale konformasjoner er tilnærmet upåvirket av om C3-OH står i *syn* eller *anti*. ΔE verdiene i gruppe 1 og gruppe 4 er identiske.



Figur 42: Morfin<sub>ekv</sub> 3*anti*-6g<sup>+</sup>. Hydrogenet i C6-OH danner hydrogenbinding med eterisk oksygen. Hydrogenet i C3-OH har en frastøtende interaksjon med hydrogenet på C2.

### Gruppe 5: 3-OH anti – 6-OH anti

I energiberegningen av disse fire konformerene ble både C3-OH og C6-OH fiksert i *anti*-posisjon og strukturene ble minimalisert både i B3LYP og MP2 metodene. Nok en gang ser vi at forholdet mellom ekvatoriale og aksiale former er ganske lik som i de foregående gruppeforsøkene.

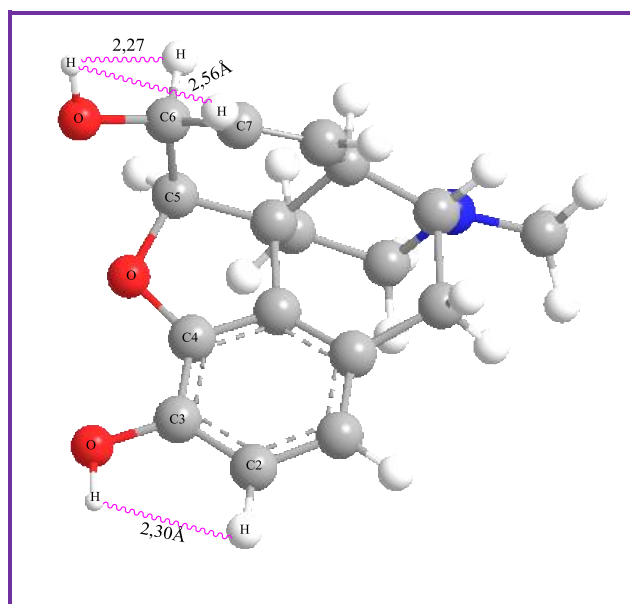
Tabell 15: Energien til morfins konformerer i gruppe 5: 3-OH anti 6-OH anti

| Konformer                           | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| $M_{\text{aks}}\text{-3anti-6anti}$ | -939,9408452                       | 10,2                       | -937,7961142                     | 8,2                      |
| $M_{\text{ekv}}\text{-3anti-6anti}$ | -939,9447356                       | 0                          | -937,7992590                     | 0                        |

Tabell 16: Energien til morfinums konformerer i gruppe 5: 3-OH anti 6-OH anti

| Konformer                             | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| $M_{\text{aks}}^+\text{-3anti-6anti}$ | -940,3285818                       | 5,6                        | -938,1815733                     | 3,9                      |
| $M_{\text{ekv}}^+\text{-3anti-6anti}$ | -940,3307155                       | 0                          | -938,1830443                     | 0                        |

Ingen av OH-gruppene vil danne intramolekulære stabiliserende H-bindinger til eterisk oksygen. Begge hydrogenene i OH-gruppene vil ha steriske frastøtninger til andre atomer i molekylet. Likevel finner vi relativt stabile konformerer med *3anti* og *6anti* for både morfin og morfinum.



Figur 43:  $M_{\text{ekv}}\text{-3anti-6anti}$ : Ingen av OH-gruppene danner hydrogenbindinger med eterisk oksygen. Begge hydrogenene på OH-gruppene opplever steriske frastøtninger fra andre atomer i molekylet.

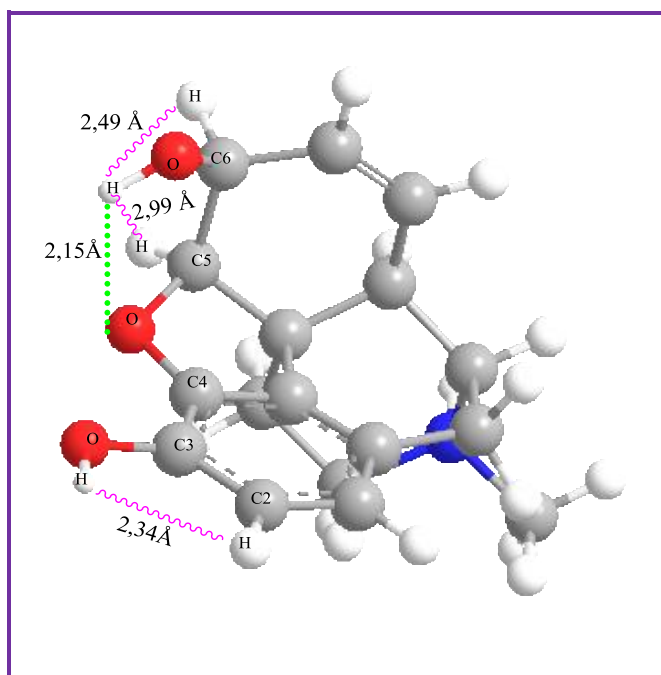
### Gruppe 6: 3-OH *anti* – 6-OH *g*<sup>-</sup>

Ved beregninger av disse konformerene fikk vi nok en liten overraskelse. I utgangspunktet skulle man kanskje tro at det ikke fantes noen stabil konformer med 3*anti* og 6*g*<sup>-</sup>, da vi allerede har funnet at 3*syn* 6*g*<sup>-</sup> er relativt ustabil, og en rotering av 3-OH til *anti* posisjon vil gjøre molekylet enda mer ustabil. Det overraskende momentet her var at mens MP2-metoden klarte å finne stabil konformer for både aksial og ekvatorial morfinum, så klarte B3LYP-metoden bare å finne morfinum<sub>ekv</sub> med 3-OH *anti* og 6-OH *g*<sup>-</sup>. Vi har ikke noe godt svar på hvorfor det er slik, annet enn at B3LYP og MP2 er to ulike metoder, slik at resultatene av den grunn kan avvike noe. Ingen av metodene fant noen stabile konformerer for morfin, noe som var forventet, siden vi ikke fant det i gruppe 3.

Tabell 17: Energien til morfinums konformerer i gruppe 6: 3-OH *anti* 6-OH *g*<sup>-</sup>

| Konformer   | Elektron energi i Hartree B3LYP | $\Delta E$ kJ/mol B3LYP | Elektron energi i Hartree MP2 | $\Delta E$ kJ/mol MP2 |
|---|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| $M^+_{aks}$ -3 <i>anti</i> -6 <i>g</i> <sup>-</sup> | -                               | -                       | -938,1861306                  | 4,7                   |
| $M^+_{ekv}$ -3 <i>anti</i> -6 <i>g</i> <sup>-</sup> | -940,3346793                    | 0                       | -938,1879149                  | 0                     |

På figur 44 ser vi en stabiliserende H-binding til eterisk oksygen og flere destabiliserende steriske hindringer.



Figur 44: Morfinum<sub>ekv</sub> 3*anti* 6*g*<sup>-</sup>. Grønn stiple linje viser H-binding. Bølgede rosa linjer viser mulige steriske frastøtninger.

### Oppsummering av de stabile konformerene

Et viktig moment å ta med når man skal sammenligne morfin konformerer med dets korresponderende ladet form, morfinum, er at beregningene er designet slik at økende masse ved addisjon av flere atomer slik som H<sup>+</sup> i dette tilfelle, vil gi en ekstra stabilitet som ikke tar høyde for ladningen. Med andre ord: man skal sammenligne verdier til nøytrale konformerer med verdier til nøytrale konformerer, og ladede med ladede, men ikke nøytrale med ladede.

For alle konformerene som vi har beregnet er forskjellen mellom ekvatoriale og aksiale former for morfin ca 10,2-10,4 kJ/mol (B3LYP) og 8,1-8,5 kJ/mol (MP2), mens det for morfinum er ca. 5,5-5,6 kJ/mol (B3LYP) og 3,8-3,9 kJ/mol (MP2). Unntaket er morfinum med 6-OH g<sup>-</sup> der energiforskjellene er noe høyere på 4,6 og 4,7 kJ/mol med MP2-beregninger. Nitrogeninversjon fra ekvatorial til aksial fører altså til mer ustabilitet hos morfin enn det gjør for morfinum. I tabell 18 og 19 er alle konformerene oppsummert etter stabilitet (lavest til høyest energi).

Tabell 18: Oversikt over de beregnede stabile konformerene til morfin. De er rangert etter minskende stabilitet. Det er en liten uoverensstemmelse mellom B3LYP og MP2 rangeringen. Disse er markert med gult

| Konformer                               | Elektron energi<br>i Hartree B3LYP | ΔE kJ/mol<br>B3LYP | Elektron energi<br>i Hartee | ΔE kJ/mol<br>MP2 |
|---|------------------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------|
| M <sub>aks</sub> -3anti-6anti           | -939,9408452                       | 39,6               | -937,7961142                | 37,6             |
| M <sub>ekv</sub> -3anti-6anti           | -939,9447356                       | 29,4               | -937,7992590                | 29,4             |
| M <sub>aks</sub> -3syn-6anti            | -939,9459288                       | 26,3               | -937,8013395                | 23,9             |
| M <sub>aks</sub> -3anti-6g <sup>+</sup> | -939,9495448                       | 16,8               | -937,8048109                | 14,8             |
| M <sub>ekv</sub> -3syn-6anti            | -939,9498619                       | 15,9               | -937,8045674                | 15,4             |
| M <sub>aks</sub> -3syn-6g <sup>+</sup>  | -939,9520137                       | 10,3               | -937,8072755                | 8,3              |
| M <sub>ekv</sub> -3anti-6g <sup>+</sup> | -939,9534072                       | 6,6                | -937,8078904                | 6,7              |
| M <sub>ekv</sub> -3syn-6g <sup>+</sup>  | -939,9559324                       | 0                  | -937,8104417                | 0                |

I tabell 18 ser vi at Morfin<sub>ekv</sub>-3syn-6g<sup>+</sup> er den mest stabile konformereren. Den satt vi til |0| for å kunne finne ΔE til de andre konformerene. Morfin<sub>ekv</sub>-3anti-6g<sup>+</sup> er nest mest stabil. 6-OH g<sup>+</sup> og ekvatorial posisjon av metylgruppen bidrar så mye til stabilitet at både 3-OH syn og 3-OH anti er mer stabil enn den mest stabile aksiale formen som er Morfin<sub>aks</sub>-3syn-6g<sup>+</sup>. Helt øverst og mest ustabil er de konformerene der begge OH-gruppene står i anti-posisjon. Forskjellen fra den mest stabile varianten av morfin til den mest ustabile er på nesten 40 kJ/mol!



Dersom vi sammenligner resultatene fra B3LYP metoden med MP2-metoden ser vi at de er relativt like. Resultatene avviker 0,0-2,4 kJ/mol mellom de to metodene. Dette fører til kun en forskjell i rangeringen av konformerene mellom B3LYP og MP2, merket med gult i tabell 18, men energiforskjellen her er så liten at vi i praksis kan se bort fra dette. Med tanke på at dette er store og kompliserte beregninger med to ulike tilnæringsmåter, er det overveldende å få så samsvarende resultater. Det betyr at vi har fått meget gode og pålitelige strukturer.

Tabell 19: Oversikt over de beregnede stabile konformerene til morfinum. De er rangert etter minskende stabilitet. B3LYP-metoden klarte ikke å finne noen stabil konformer for  $M^+_{aks}-3anti-6g^-$ .

| Konformer               | Elektronenergi<br>i Hartree (B3LYP) | $\Delta E$ kJ/mol<br>B3LYP | Elektronenergi<br>i Hartree (MP2) | $\Delta E$ kJ/mol<br>MP2 |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| $M^+_{aks}-3anti-6anti$ | -940,3285818                        | 23,6                       | -938,1815733                      | 21,9                     |
| $M^+_{ekv}-3anti-6anti$ | -940,3307155                        | 18,0                       | -938,1830443                      | 18,0                     |
| $M^+_{aks}-3syn-6anti$  | -940,3320348                        | 14,5                       | -938,1851410                      | 12,5                     |
| $M^+_{aks}-3anti-6g^-$  | -                                   | -                          | -938,1861306                      | 9,9                      |
| $M^+_{aks}-3syn-6g^-$   | -940,3332066                        | 11,5                       | -938,1863850                      | 9,3                      |
| $M^+_{ekv}-3syn-6anti$  | -940,3341351                        | 9,0                        | -938,1866033                      | 8,7                      |
| $M^+_{aks}-3anti-6g^+$  | -940,3346284                        | 7,7                        | -938,1876511                      | 5,9                      |
| $M^+_{ekv}-3anti-6g^-$  | -940,3346793                        | 7,6                        | -938,1879149                      | 5,3                      |
| $M^+_{ekv}-3syn-6g^-$   | -940,3353088                        | 5,9                        | -938,1881541                      | 4,6                      |
| $M^+_{aks}-3syn-6g^+$   | -940,3354554                        | 5,6                        | -938,1884347                      | 3,9                      |
| $M^+_{ekv}-3anti-6g^+$  | -940,3367481                        | 2,2                        | -938,1891286                      | 2,1                      |
| $M^+_{ekv}-3syn-6g^+$   | -940,3375743                        | 0                          | -938,1899163                      | 0                        |

For morfinum-konformerene i tabell 19 er det ingen uoverensstemmelse mellom rangeringen til B3LYP og MP2-metodene. Resultatene her avviker 0,0-2,3 kJ/mol mellom de to metodene, noe som er omtrent det samme som for morfin-konformerene.  $\Delta E$  fra den mest stabile til den mest ustabile konformeren er her i overkant av 23 kJ/mol. Nå kan man ikke sammenligne energien mellom nøytral og ladet form direkte, da teoretiske beregninger er konstruert slik at addering av et atom øker massen og senker energien til molekylet. Likevel er det helt tydelig at  $H^+$  har en stabiliserende effekt på hele molekylet, slik at det blir relativt mye mindre påvirket av endringer ellers i molekylet slik som nitrogeninversjon og rotasjoner av OH-gruppene.

### MORFIN og MORFINIUM, konformerer og overgangstilander



**Ser på torsjonsvinklene:**

3-OH = C4-C3-O-H  
6-OH = C5-C6-O-H

**Ordbruk:**

Antiperiplanar = ap = anti  
Minus anticlinal = -ac = ac-  
Minus synclinal = -sc = g'  
Synperiplanar = sp = syn  
Synclinal = +sc = g'  
Anticlinal = +ac = ac+

**Forkortelser:**

Morfin: M  
Morfinium: M+  
Gauche: g  
3-OH: 3  
6-OH: 6  
N-inversjon: N-inv

Rinco et al har funnet denne, ikke vi  
Disse konformerene har vi funnet med både B3LYP og MP2  
Overgangstilander  
Mulige stabile konformerer, men beregningene fant ikke disse.  
Denne konformerer fant vi kun med MP2

Figur 45: Morfin og morfiniums mange konformerer og overgangstilander ved 60° rotasjoner.

## DEL D: Skanninger

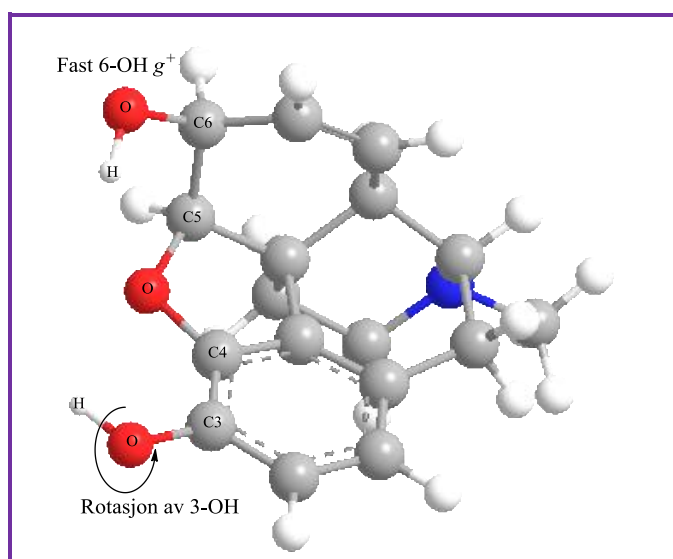
Ut fra vår analyse besluttet vi å gjøre skanningsforsøk for å sikre at vi har en fullstendig oversikt over alle de stabile konformerene. Tabell 20 viser hvordan skanningene ble fordelt i ulike gruppeforsøk og hvilke gruppeforsøk som var aktuelle å gjøre skanning på. Når vi skanner molekylene på denne måten vises et oversiktlig energidiagram som gir et godt bilde over de mest stabile konformasjonene og de ulike overgangstilstandene (TS). Energiene på bunnen av "dalene" i disse grafene skal være lik energien til de stabile konformerene som vi har beregnet hver for seg i DEL C. Det var ingen hensikt å skanne de molekylene som ikke var stabile konformerer, da software vil raffinere molekylet over til en av de stabile konformerene. Alle skanninger er utført med B3LYP/cc-pvtz.

Tabell 20: Oversikt over de 18 skanningene som har blitt utført.(B3LYP)

| Forsøk                        | I               | II               | III         | IV          | V               | VI               | VII        | VIII         |
|-------------------------------|-----------------|------------------|-------------|-------------|-----------------|------------------|------------|--------------|
| skanning                      | 6-OH            | 6-OH             | 6-OH        | 6-OH        | 3-OH            | 3-OH             | 3-OH       | 3-OH         |
| Fast:                         | 3-OH <i>syn</i> | 3-OH <i>anti</i> | 3-OH $g^+$  | 3-OH $g^-$  | 6-OH <i>syn</i> | 6-OH <i>anti</i> | 6-OH $g^+$ | 6-OH $g^-$   |
| M <sub>ekv</sub>              | Gjort (1)       | Gjort (5)        | Ikke stabil | Ikke stabil | Ikke stabil     | Gjort (9)        | Gjort (13) | Ikke stabil  |
| M <sub>aks</sub>              | Gjort (2)       | Gjort (6)        | Ikke stabil | Ikke stabil | Ikke stabil     | Gjort (10)       | Gjort (14) | Ikke stabil  |
| M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub> | Gjort (3)       | Gjort (7)        | Ikke stabil | Ikke stabil | Ikke stabil     | Gjort (11)       | Gjort (15) | Gjort* (17)  |
| M <sup>+</sup> <sub>aks</sub> | Gjort (4)       | Gjort (8)        | Ikke stabil | Ikke stabil | Ikke stabil     | Gjort (12)       | Gjort (16) | Gjort** (18) |

\*kollapset etter 40 graders dreining

\*\*skiftet til 6-OH  $g^+$  ved 50 graders dreining



Figur 46: Eksempel på skanningsforsøk i morfin<sub>ekv</sub>. Skanning av energien ble gjort når man roterte 3-OH mens 6-OH ble holdt fast i 6-OH  $g^+$

Skanningsforsøkene ble gjort slik at den ene OH-gruppen ble fiksert i en bestemt stabil geometri, mens den andre OH-gruppen ble rotert 10° om gangen, med full minimalisering for hvert trinn. Det er bindingen mellom karbon og oksygen som roteres og hydrogen flyttes rundt i en sirkel. Totalt 360° og dermed 36 trinn for hver skanning. På denne måten kan man se både de stabile konformerene og de ustabile overgangstilstandene. For å sikre at vi ikke gikk glipp av noe informasjon, roterte vi opptil 380°, slik

at ikke noe skulle "kamoufleres" i starten eller slutten på skanningen.

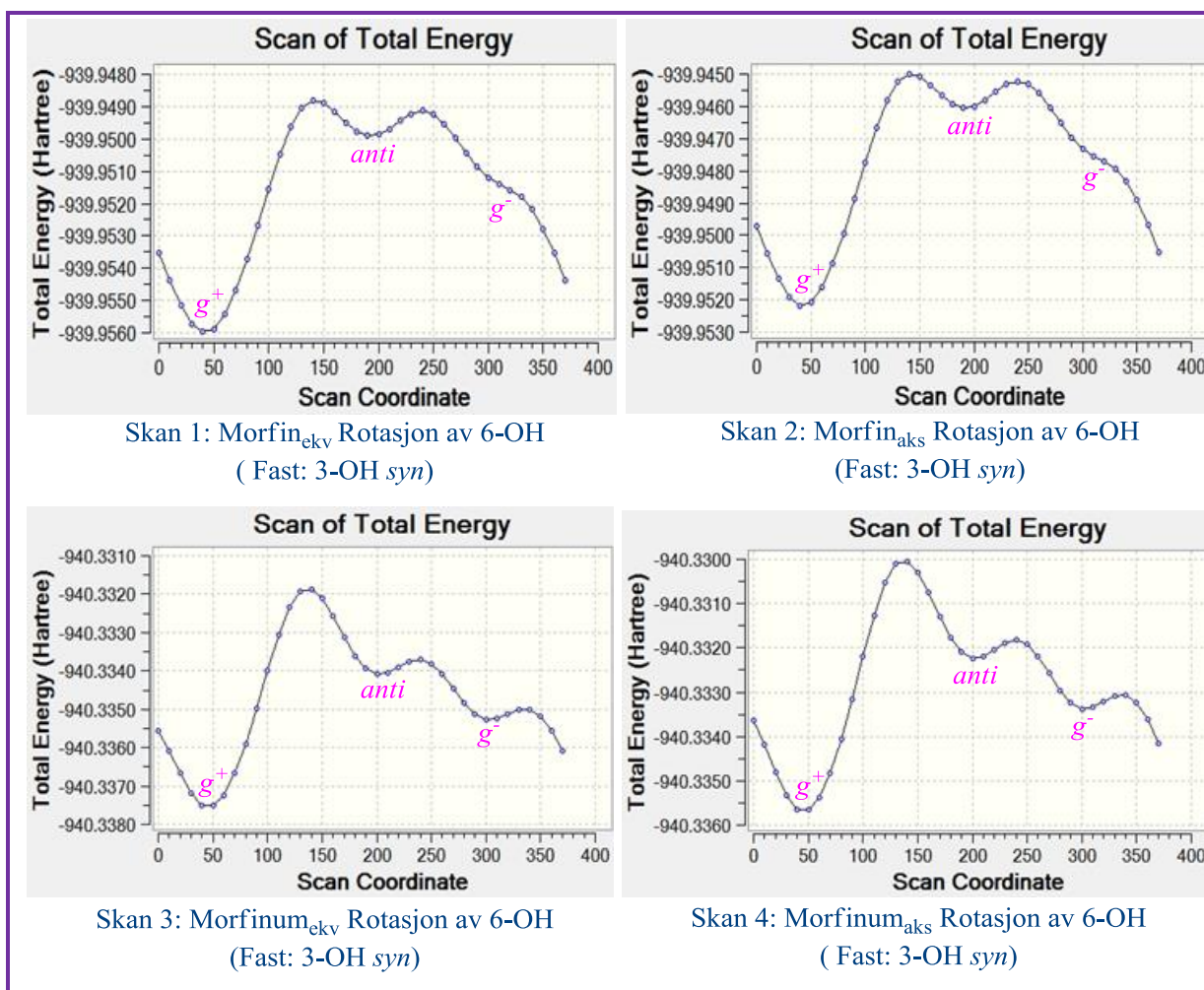
Skanningene utgjorde tilsammen 18 forsøk. Hvert forsøk tok 25-45 døgn å beregne. Outfilene fra hver skanning var på mellom 2000 og 3000 sider i word!

Energien i skanning-kurvene er oppgitt som absolutte tall i Hartree. I de diagrammene der vi sammenligner de ulike konformerene har vi brukt relative tall i kJ/mol. (1 hartee = 2625,5 kJ/mol) Vi tok den mest stabile konformereren som |0| og la kurvene oppå hverandre, slik at vi ser tydeligere forskjellen på de ulike konformerene.

## Forsøk I: Rotasjon av 6-OH. Fast: 3-OH syn

### Skanning 1-4

De første skanningene som ble gjort var ved rotasjon av bindingen mellom C6-O. 3-OH ble holdt fast i *syn*-posisjon under hele forsøket. Hvert punkt i skanningene er fullt minimalisert og hver skanning varte i 25-45 "cpu-døgn."

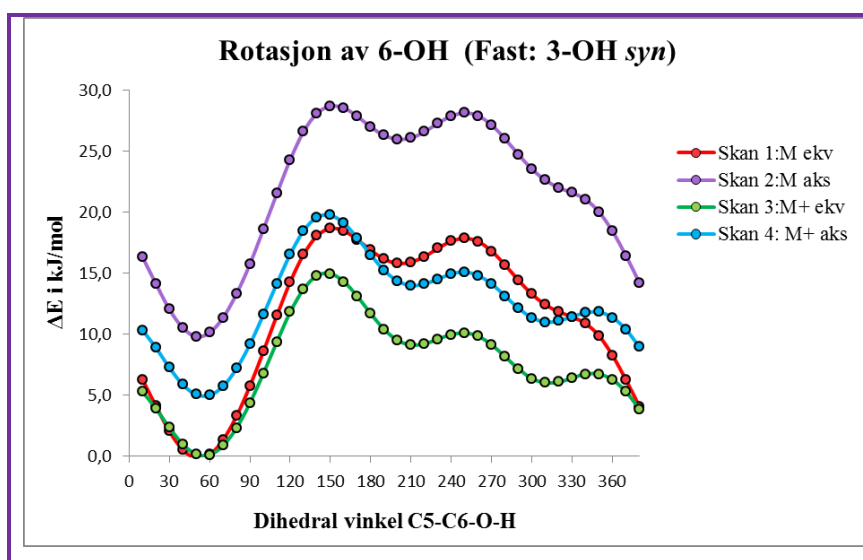


Figur 47: Skanning 1-4. Rotasjon av 6-OH, fast 3-OH *syn*.

Diagrammene fra skanningene gir oss mye verdifull informasjon. Vi ser tydelig at det er intet minimum for  $g^-$  i området rundt ved ca. 300° for nøytrale former. For de ladede konformerene ser vi derimot en tydelig "dal" ved ca. 300°. Dette forklarer hvorfor beregningene av enkeltkonformerer i DEL C har funnet stabile konformerer av morfinum med 6-OH $g^-$ , men ikke for morfin. 6-OH  $g^+$ -konformerene i nøytral form har relativt mye lavere energi enn  $g^-$ , slik at 6-OH trekkes mot hydrogenbindingen som er mulig på  $g^+$ , fremfor  $g^-$ . Overgangen fra  $g^+$  til *anti* er mer markant i morfinum enn morfin, den har også mye lavere

energi hos de ladede formene. For de nøytrale konformerene ser det ut til at bare  $g^+$  er ordentlig stabil, mens alle andre vinkler er relativt ustabile.

I figur 48 har vi sammenlignet energien til de ulike skanningene 1-4. Vi ser tydelig her at de konformerene med N-CH<sub>3</sub> aksialt ligger jevnt høyere i energi enn sine respektive ekvatoriale konformerer. Energiforskjellene er også mye større i de nøytrale formene enn de ladede konformerene. Det indikerer en stabiliserende effekt ved addering av H<sup>+</sup>. Ved 300° ses også den vesentlige forskjellen mellom morfin og morfinum, der morfin ikke har den samme dalen i kurven, slik som morfinum har. Morfinum har mer stabile *anti*-konformerer, som vi ser ved ca. 200°, enn morfin. Terskelen for å gå fra *anti* til  $g^-$  ved ca 240° er også mye lavere i morfinum enn for morfin.



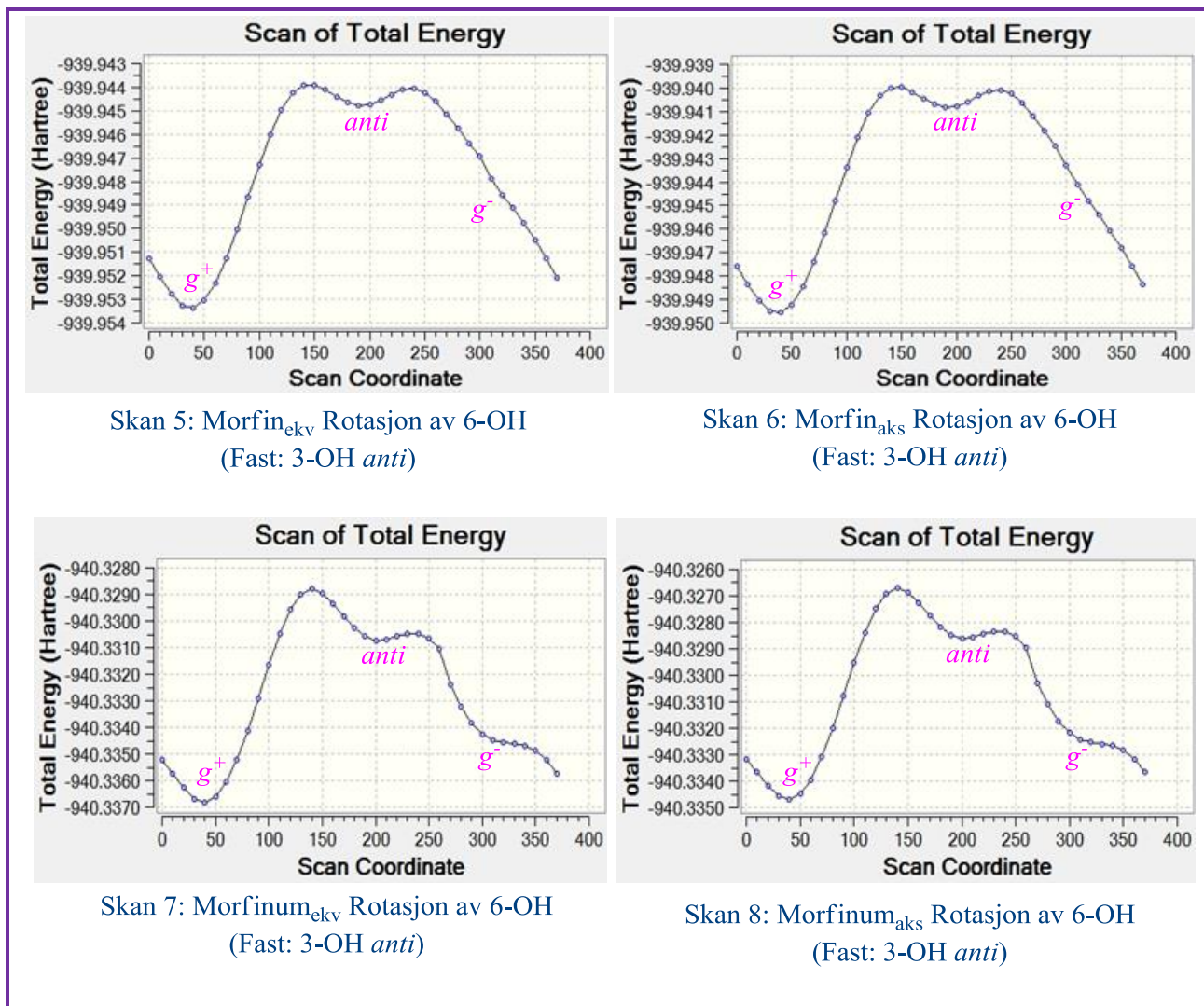
Figur 48: Sammenligning av konformerene i skanning 1-4. Energiverdiene på y-aksen er relative tall i kJ/mol.



## Forsøk II: Rotasjon av 6-OH. Fast: 3-OH anti

## Skanning 5-8

De neste skanningene som ble gjort var også rotasjon av bindingen mellom C6 og oksygenet. Men denne gangen ble 3-OH holdt fast i *anti*-posisjon hele tiden.

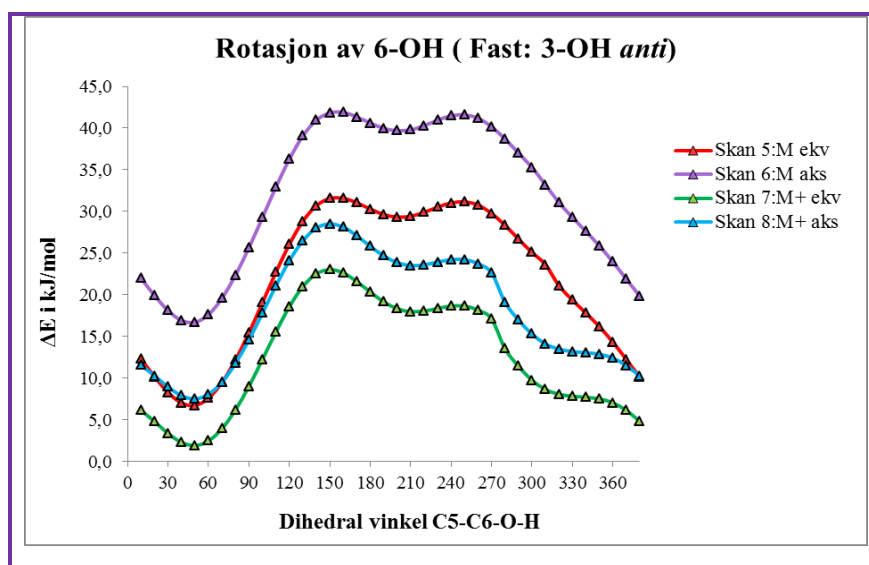


Figur 49: Skanning 5-8. Rotasjon av 6-OH, fast: 3-OH anti

Kurvene for rotasjon av 6-OH hos morfin med 3-OH *anti* er ganske lik de forrige med 3-OH *syn*, men med litt grunnere daler. *Anti*-konformerene til både morfin og morfinum er relativt mer ustabile enn  $g^+$  i forhold til skanning 1-4. Ved  $g^-$  er det ingen antydning til stabilitet for de nøytrale formene. For morfinum ser vi også den samme tendensen til grunnere daler, slik som det var med 3-OH *syn*. Ved  $g^-$  har kurven blitt mer til et platå enn en dal slik som når 3-OH var *syn*. Vi ser her at det er små marginer for å finne en stabil konformer ved  $6 g^-$  når 3-OH er i *anti*. Det forklarer også hvorfor vi fikk avvikene resultater ved beregninger av enkelt

konformerer. Mens B3LYP ikke klarte å finne morfinum<sub>aks</sub> 3*anti* 6*g*<sup>-</sup>, så fant MP2 metoden en stabil konformer her.

I figur 50 har vi sammenlignet energien til de ulike skanningene 5-8. Vi ser tydelig her at de aksiale konformerene ligger jevnt høyere i energi enn sine respektive ekvatoriale konformerer. Ved 300° ses vi tydelig at alle kurvene har blitt rettere enn i skanning 1-4. Det samme gjelder av "anti-dalen" som er mye grunnere for alle konformerene. De to kurvene til morfin ligger begge høyere enn morfinum-kurvene, noe som betyr at 3-OH i *anti*-posisjon skaper mer ustabilitet i de nøytrale formene enn for de ladede.



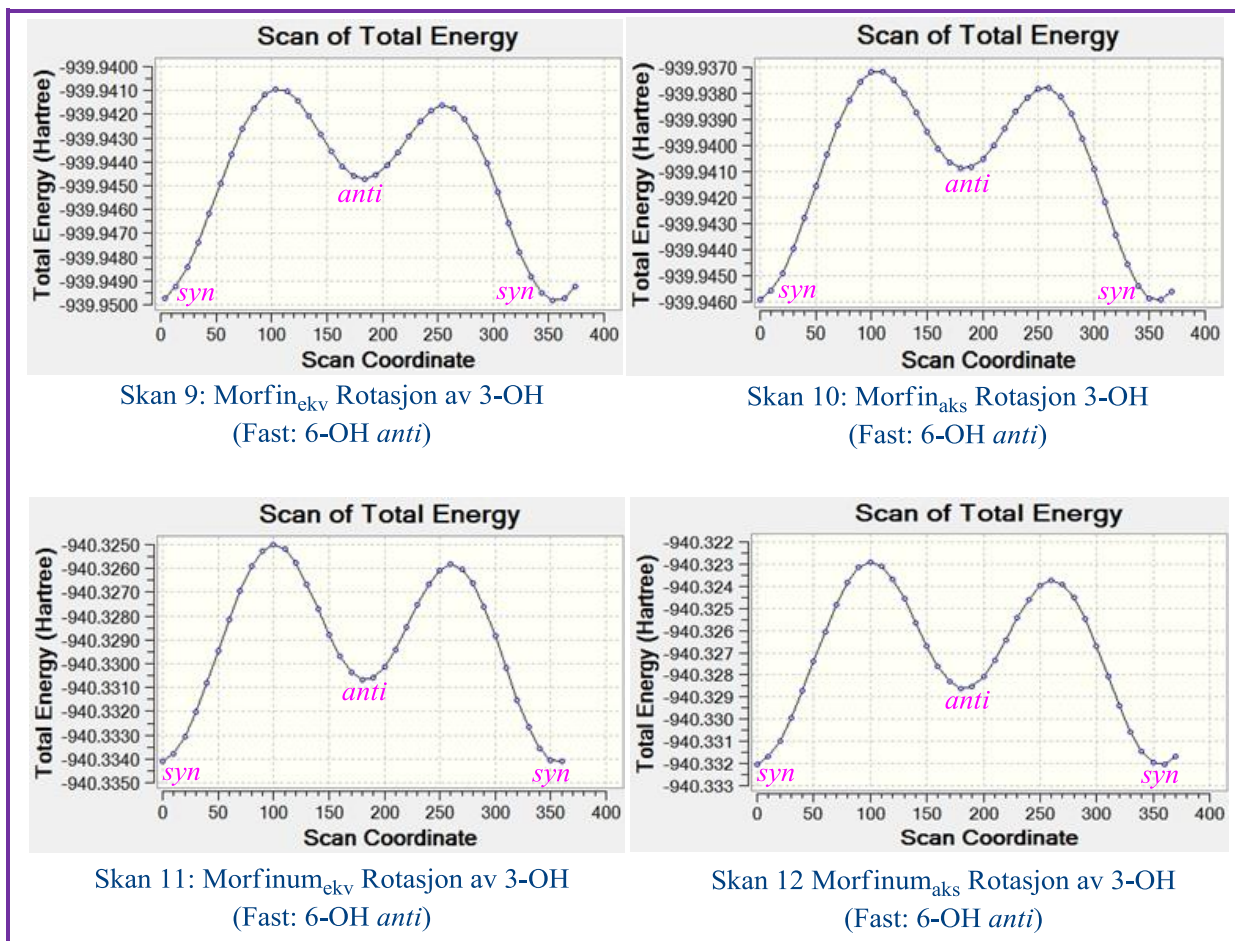
Figur 50: Sammenligning av konformerene i skanning 5-8. Energiverdiene på y-aksen er relative tall i kJ/mol.



Forsøk VI: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH *anti*

## Skanning 9-12

I disse skanningene ble det gjort rotasjon av bindingen mellom C3-O. Men denne gangen var det 6-OH som ble holdt fast i *anti*-posisjon hele tiden. Vi fikk to minima fordi 3-OH kun var stabil i *syn* og *anti*.

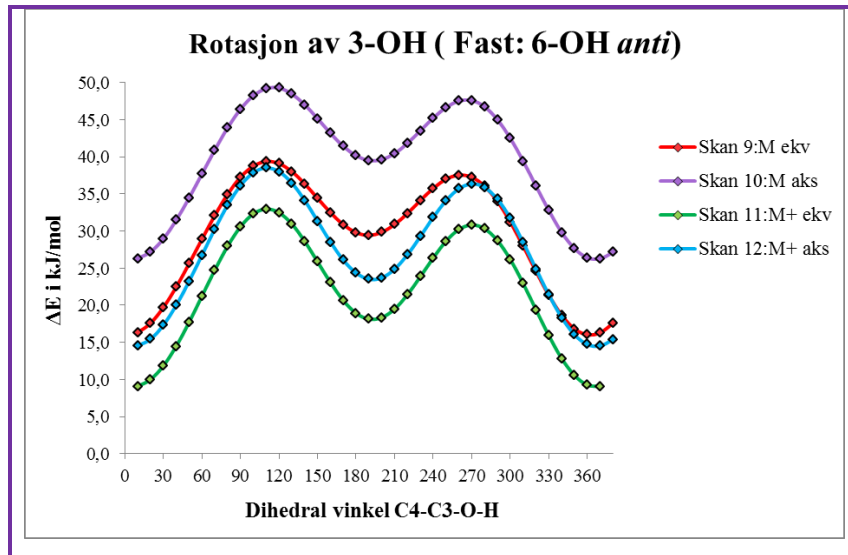


Figur 51: Skanning 9-12. Rotasjon av 3-OH, fast: 6-OH *anti*

Ved første øyekast ser de fire kurvene i figur 51 ganske like ut. De har alle to minima, et ved  $0^\circ$  som er *syn*, og et ved  $180^\circ$  som er *anti*. Dette stemmer godt overens med resultatene vi fikk ved beregninger av de enkelte konformerene. Den viktigste forskjellen er at for de ladede formene så er dalen rundt  $180^\circ$  mye dypere enn hos de nøytrale formene. Nok en gang har vi altså mer stabile *anti*-konformerer når molekylene er ladet.

I figur 52 har vi sammenlignet energien til de ulike skanningene 9- 12. Vi ser tydelig her at de aksiale konformerene ligger høyere i energi enn sine respektive ekvatoriale konformerer. N-metylgruppen i aksial posisjon gjør både morfin og morfinum mer ustabile. Ved  $180^\circ$  ses tydelig at morfinum-kurvene har dypere og brattere daler, noe som viser mer stabile 3-OH

*anti*-konformerer. Vi vet fra beregningene i del C at det var  $g^+$ -konformasjoner som var de mest stabile for 6-OH. De omtales i skanning-forsøk VII. I figur 52 med 6-OH *anti* ser vi at det er morfin-kurvene som har jevnt over høyest energi. Det er altså det samme som gjentar seg nok en gang. Ved rotasjon av OH-gruppene bort fra sine mest stabile posisjoner, så er det de nøytrale molekylene som blir mest påvirket og mest ustabile.

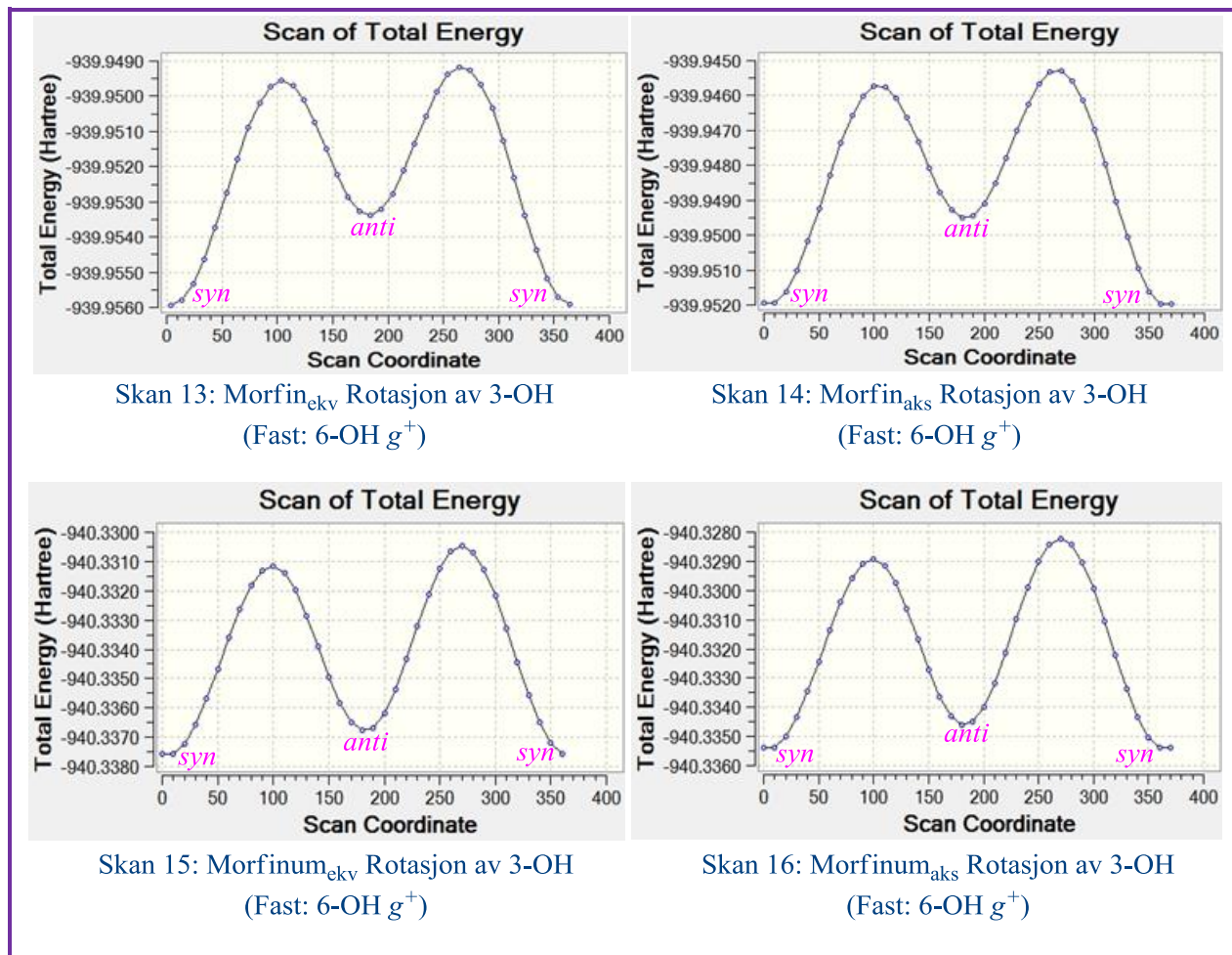


Figur 52: Sammenligning av konformerene i skanning 9-12. Energiverdiene på y-aksen er relative tall i kJ/mol.

Forsøk VII: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH  $g^+$ 

## Skanning 13-16

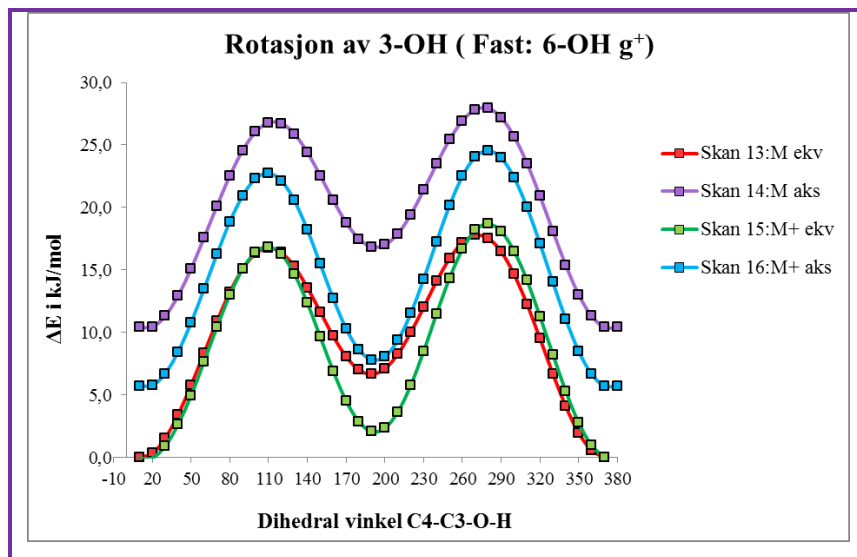
Disse skanningene ble gjort ved rotasjon av bindingen mellom C3-O. 6-OH ble holdt fast i  $g^+$ -posisjon hele tiden.



Figur 53: Skanning 13-16. Rotasjon av 3-OH, fast: 6-OH  $g^+$

Diagrammene i figur 53 viser alle to minima som forventet rundt *syn* og *anti*. Det som avsløres her er de dype dalene rundt *anti*-konformerene. Nok en gang er dalene mye grunnere for morfin enn de er hos morfinum. For de ladede konformerene har *anti*-formene nesten like lav energi som *syn*-formene! Overgangstilstanden fra *anti* til *syn* er stor.

I figur 54 har vi sammenlignet energien til de ulike skanningene 13-16. Vi ser tydelig her at de aksiale konformerene ligger høyere i energi enn sine respektive ekvatoriale konformerer. Metylgruppen i aksial posisjon gjør både morfin og morfinum mer ustabile. Ved  $180^\circ$  ses dype daler for alle skanningene, men morfinum har en del dypere og brattere enn morfin.

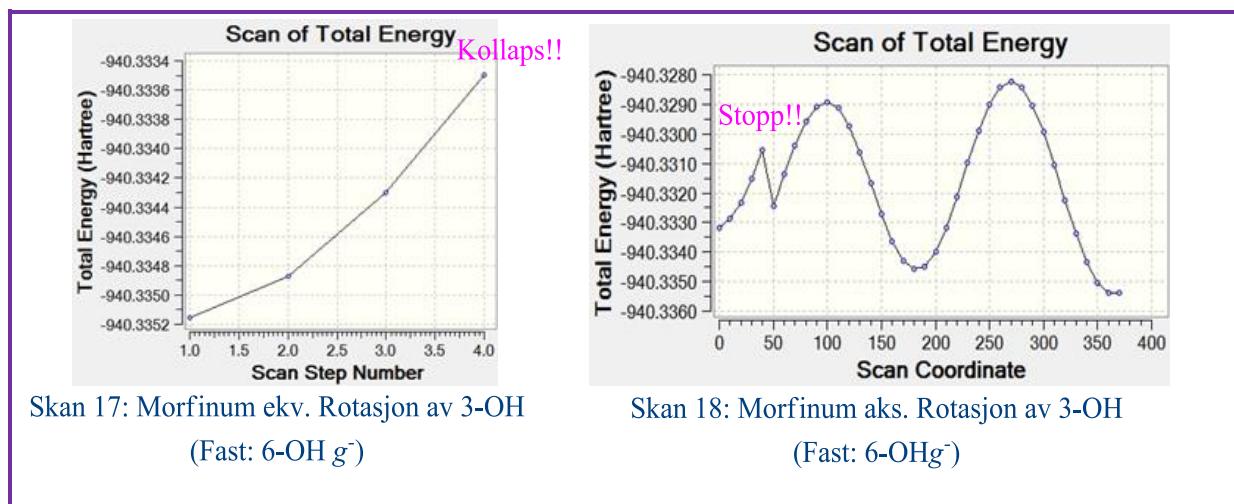


Figur 54: Sammenligning av konformerene i skanning 13-16. Energiverdiene på y-aksen er relative tall i kJ/mol.

## Forsøk VIII: Rotasjon av 3-OH. Fast: 6-OH $g^-$

### Skanning 17-18

Vi gjorde et par forsøk på morfinum med rotasjon av 3-OH mens 6-OH ble holdt fast i  $g^-$ . For de nøytrale morfinene fantes det ingen stabilitet i dette området, slik at disse var uaktuelle her.



Figur 55: Skanning 17-18. Rotasjon av 3-OH, fast 6-OH  $g^-$ . På grunn av ustabile konformerer var ikke skanningene vellykket.

Ved beregningene av morfinum i DEL C, var det kun MP2-metoden som ga en stabil konformer av den aksiale formen med 6-OH i  $g^-$ . Både MP2 og B3LYP ga en stabil konformer for den ekvatoriale formen med 6-OH i  $g^-$ . Det var derfor ikke overraskende at vi fikk problemer med disse skanningene. Skanningen av Morfinum<sub>ekv</sub> endte i full kollaps etter 40° dreining. Software stoppet hele skanningen, og ville ikke gjøre flere rotasjoner. Ved skanning av morfinum<sub>aks</sub> raffinerte dataprogrammet seg over til den stabile 6-OH  $g^+$  konformerer ved 50° dreining.

### 4.3. Videre diskusjon av utvalgte resultater

Denne delen av oppgaven tar ett nærmere blikk på noen av våre resultater med det målet for øye å få en dypere forståelse av morfins konformasjonelle atferd i nøytral og ladet form. Det er sikkert mange flere resultater som kunne vært drøftet, da vi har flere tusen sider med informasjon om de ulike konformerene, men vi har prøvd å velge ut det vi mener er de viktigste funnene. Disse avsnittene er med å danne grunnlag for konklusjonen.

#### Mulliken atomladninger

Tabell 21 viser et utdrag av ladningene på atomene til konformerene i gruppe 1. For enkelhet skyld har vi nummerert oksygen i de to OH-gruppene med samme nummer som karbonet de er bundet til. Det samme gjelder hydrogenene ellers i molekylet. Hydrogenene i OH-gruppene, derimot, er merket etter hvilket oksygen de er bundet til. En fullstendig oversikt over atomladningene til alle atomene i samtlige stabile konformerer finnes i vedlegg 5.

Tabell 21: Mulliken atomladning på utvalgte atomer i Gruppe 1, 3syn 6g<sup>+</sup>. Se vedlegg 5 for fullstendige tabeller. Karbonene er nummerert som i figur 24.

| Atomnr.        | B3LYP            |                  |                               |                               | MP2              |                  |                               |                               |
|----------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                | M <sub>ekv</sub> | M <sub>aks</sub> | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub> | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub> | M <sub>ekv</sub> | M <sub>aks</sub> | M <sup>+</sup> <sub>ekv</sub> | M <sup>+</sup> <sub>aks</sub> |
| C3             | 0,10             | 0,10             | 0,11                          | 0,11                          | 0,15             | 0,14             | 0,16                          | 0,16                          |
| O3             | -0,28            | -0,28            | -0,25                         | -0,25                         | -0,36            | -0,36            | -0,33                         | -0,33                         |
| H på O3        | 0,22             | 0,22             | 0,22                          | 0,22                          | 0,25             | 0,25             | 0,25                          | 0,25                          |
| C6             | 0,12             | 0,12             | 0,11                          | 0,11                          | 0,18             | 0,18             | 0,17                          | 0,17                          |
| O6             | -0,35            | -0,35            | -0,32                         | -0,32                         | -0,43            | -0,43            | -0,40                         | -0,40                         |
| H på O6        | 0,20             | 0,20             | 0,21                          | 0,21                          | 0,24             | 0,24             | 0,24                          | 0,24                          |
| C7             | -0,17            | -0,16            | -0,14                         | -0,14                         | -0,23            | -0,23            | -0,19                         | -0,19                         |
| C8             | -0,19            | -0,20            | -0,22                         | -0,22                         | -0,27            | -0,27            | -0,30                         | -0,30                         |
| C9             | 0,00             | 0,00             | -0,07                         | -0,07                         | -0,02            | -0,02            | -0,08                         | -0,09                         |
| C14            | -0,02            | -0,05            | -0,06                         | -0,06                         | -0,02            | -0,07            | -0,06                         | -0,08                         |
| C15            | -0,10            | -0,11            | -0,16                         | -0,17                         | -0,12            | -0,13            | -0,17                         | -0,19                         |
| C16            | -0,18            | -0,21            | -0,22                         | -0,22                         | -0,17            | -0,22            | -0,22                         | -0,23                         |
| Et-O           | -0,35            | -0,35            | -0,33                         | -0,33                         | -0,44            | -0,44            | -0,41                         | -0,41                         |
| N              | -0,18            | -0,18            | 0,08                          | 0,07                          | -0,24            | -0,24            | 0,04                          | 0,04                          |
| Met-C          | -0,21            | -0,21            | -0,22                         | -0,22                         | -0,20            | -0,21            | -0,22                         | -0,22                         |
| 24H7           | 0,12             | 0,12             | 0,16                          | 0,15                          | 0,17             | 0,18             | 0,20                          | 0,20                          |
| 31H9           | 0,09             | 0,09             | 0,15                          | 0,15                          | 0,12             | 0,12             | 0,18                          | 0,18                          |
| 32H15          | 0,10             | 0,10             | 0,14                          | 0,14                          | 0,13             | 0,13             | 0,16                          | 0,17                          |
| 33H15          | 0,11             | 0,10             | 0,13                          | 0,12                          | 0,14             | 0,13             | 0,16                          | 0,14                          |
| 34H16          | 0,08             | 0,09             | 0,12                          | 0,12                          | 0,10             | 0,12             | 0,14                          | 0,14                          |
| 35H16          | 0,09             | 0,09             | 0,14                          | 0,14                          | 0,11             | 0,11             | 0,16                          | 0,16                          |
| 36H15          | 0,09             | 0,09             | 0,16                          | 0,16                          | 0,11             | 0,12             | 0,18                          | 0,18                          |
| 37H15          | 0,07             | 0,09             | 0,16                          | 0,16                          | 0,09             | 0,11             | 0,17                          | 0,18                          |
| Met-H          | 0,09             | 0,09             | 0,15                          | 0,15                          | 0,10             | 0,10             | 0,15                          | 0,16                          |
| Met-H          | 0,09             | 0,05             | 0,15                          | 0,14                          | 0,10             | 0,06             | 0,15                          | 0,15                          |
| Met-H          | 0,05             | 0,10             | 0,14                          | 0,15                          | 0,06             | 0,11             | 0,15                          | 0,15                          |
| H <sup>+</sup> | -                | -                | 0,13                          | 0,14                          | -                | -                | 0,14                          | 0,15                          |



Ut fra de beregningene av ammonium som vi utførte (DEL A) kan vi se at den positive ladningen er fordelt mellom hydrogenene, mens nitrogenet var tilnærmet nøytralt. Den samme tendensen ser vi i morfinum. Den positive ladningen er spredt som "bølger" gjennom hele molekylet. Nitrogenet i morfin har en negativ ladning på  $-0,18 / -0,24$  (B3LYP/MP2). Når molekylet blir ladet endres nitrogens ladning til cirka 0,2. Siden morfinum har en total ladning på  $1^+$ , er resten av den positive ladningen på cirka 0,8 spredt utover hele molekylet. Det er fascinerende å se at oksygenatomene på den andre siden faktisk også blir mer positive. Både B3LYP og MP2 viser en økning på 0,03-0,04 på alle tre oksygenatomene. H6 er så vidt litt mer negativ enn H3, som følge av at benzenringen trekker på elektronene til 3-OH. På nesten alle atomene ellers i molekylet ser vi små endringer i ladning når molekylet får en  $H^+$ .

### Vinkler

Tabell 22 gir en oversikt over noen av vinklene til konformerene i gruppe 1. En komplett liste over vinklene i alle gruppene er i vedlegg 6, men alle gruppene viser den samme tendensen som vi ser i gruppe 1. De to ulike metodene B3LYP og MP2 har gitt noe ulike resultater, men i størrelses orden er de praktisk talt like.

Tabell 22: Utvalgte vinkler i grader hos konformerene i gruppe 1; 3 syn  $6g^+$ .

| VINKEL / ° | B3LYP            |                  |                    |                    | MP2              |                  |                    |                    |
|------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
|            | $M_{\text{ekv}}$ | $M_{\text{aks}}$ | $M_{\text{ekv}}^+$ | $M_{\text{aks}}^+$ | $M_{\text{ekv}}$ | $M_{\text{aks}}$ | $M_{\text{ekv}}^+$ | $M_{\text{aks}}^+$ |
| MetC-N-C9  | 114,4            | 114,3            | 114,4              | 113,9              | 112,8            | 113,0            | 113,9              | 113,4              |
| MetC-N-C15 | 112,5            | 114,1            | 112,1              | 112,9              | 110,9            | 112,4            | 111,7              | 112,4              |
| C9-N-C15   | 113,6            | 112,4            | 112,3              | 112,3              | 112,1            | 111,3            | 112,0              | 112,1              |
| H-O3-C3    | 108,7            | 108,9            | 110,3              | 110,3              | 107,4            | 107,4            | 108,9              | 108,9              |
| C4-C3-O3   | 123,2            | 123,3            | 123,9              | 123,9              | 123,3            | 123,3            | 124,0              | 124,0              |
| C2-C3-O3   | 120,1            | 120,1            | 119,6              | 119,6              | 120,2            | 120,2            | 119,6              | 119,6              |
| C4-EtO-C5  | 107,1            | 107,0            | 107,6              | 107,5              | 105,9            | 105,9            | 106,5              | 106,4              |
| EtO-C5-C6  | 109,6            | 109,5            | 110,2              | 110,2              | 108,9            | 108,9            | 109,6              | 109,7              |
| EtO-C5-C13 | 106,3            | 106,3            | 105,9              | 105,9              | 106,8            | 106,8            | 106,3              | 106,3              |
| H-O6-C6    | 106,7            | 106,9            | 108,3              | 108,3              | 105,1            | 105,1            | 106,7              | 106,7              |
| C7-C6-O6   | 113,0            | 113,0            | 113,4              | 113,4              | 113,2            | 113,2            | 113,6              | 113,6              |
| H+-N-MetC  | -                | -                | 106,4              | 106,1              | -                | -                | 107,0              | 106,6              |
| H+-N-C9    | -                | -                | 104,4              | 104,9              | -                | -                | 105,0              | 105,2              |
| H+-N-C15   | -                | -                | 106,3              | 105,9              | -                | -                | 106,6              | 106,4              |

Den største forskjellen i vinklene mellom ladet og nøytral form, er rundt de to OH-gruppene. Forskjellen i vinklene H-O3-C3 og H-O6-C6 mellom nøytralt morfin og ladet morfinum er konsekvent rundt  $1,5^\circ$ , uansett om de var *syn*, *anti*  $g^+$  eller  $g^-$ . Dette er en betydelig endring når det gjelder molekyler. Fordi den fenoliske OH-gruppen inngår i reseptorbindingen, er det en fordel at hoved konformasjonene har denne gruppen fri for interne hydrogenbindinger slik

at den kan lett benyttes for hydrogenbinding i selve komplekset med reseptoren. Det er flere vinkler på "oksygen-siden" av morfin/morfinum som endrer seg rundt  $0,5^\circ$  avhengig av om molekylet er ladet eller ikke.

### *Geometrien rundt det alifatisk aminet*

I en normal sykloheksan er karbonene  $sp^3$  hybridisert og vinklene mellom C-C-C er på  $109,5^\circ$ , noe som tilsvarer en perfekt tetraeder. Beregningene viste at vinklene rundt nitrogenet i morfin var fra  $111^\circ$  til  $114^\circ$ , noe som er vesentlig større enn i ammoniakk som hadde  $106,5^\circ$ . Siden nitrogen og sykloheksanen i morfin er en del av en større komplisert struktur, kan man ikke forvente at vinklene er helt de samme som i en enkel sykloheksan. Det at vinklene i morfin er mye større enn i ammoniakk, betyr mer planaritet rundt N-atomet, altså mer  $sp^2$  karakter, i forhold til  $NH_3$  som har mer  $sp^3$  karakter. Disse ulikhetene i vinklene må også bety noe forskjell i basisitetsgraden (pK<sub>b</sub>-verdien) og N-inversjons-prosessen. Man skulle tro at siden nitrogenet i morfin i utgangspunktet har en mer planar struktur, så vil N-inversjonen gå lettere her fordi den allerede er mye "nærmere" TS på  $120^\circ$ . Men ut fra beregningene av N-inversjon (DEL A og DEL B) ser vi at inversjonen skjer lettere i ammoniakk enn i morfin. TS for N-inversjon i ammoniakk som vi beregnet var på 22,2 kJ/mol, mens det i morfin var 27,6-28,1 kJ/mol. Forklaringen må være at selv om nitrogenet i morfin er mer planar, så er resten av ringen bundet fast i det store rigide molekylet, som gjør at selv små bevegelser mot planaritet krever mer energi.

Hos morfinum er vinklene fra  $H^+$  til nitrogens tre andre substituenten på bare  $104^\circ$ - $107^\circ$ . Vinklene mellom de tre andre substituentene er omtrent som hos de nøytrale konformerene. Det er altså liten endring i vinklene rundt nitrogen når den går fra nøytral til ladet form. Den ladede formen er altså mer lik  $NH_3$  når det gjelder vinkler (geometri) rundt N-atomet.

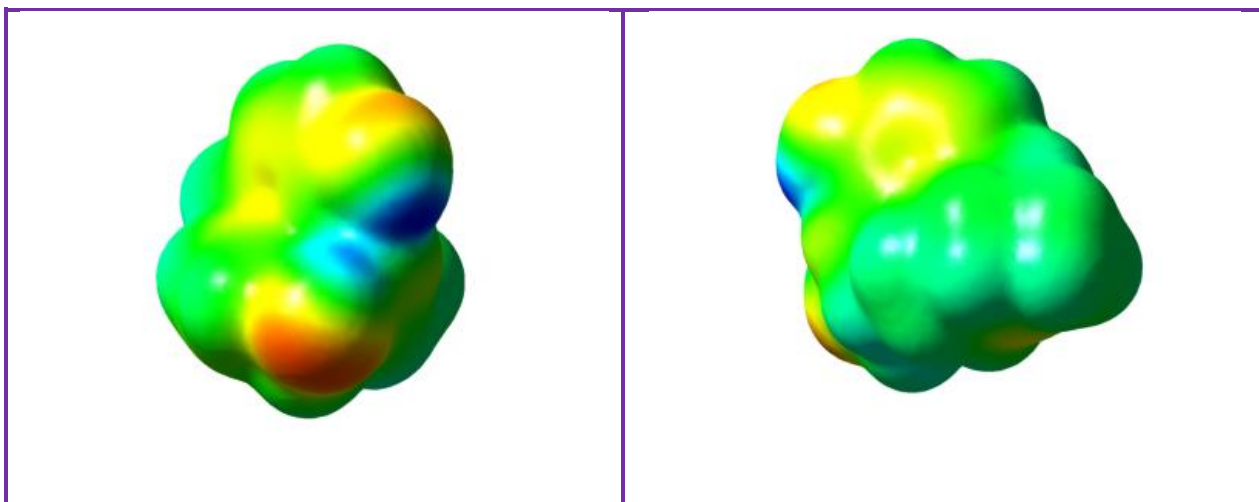
### *Konturer og overflater*

Gaussian 09 programvare gjør det mulig å vise molekylets kontur der ulike farger illustrerer lipofilitets- og hydrofilitets-grad av ulike deler av molekylet, samt at de gir den totale topologien og volumet til molekylet. N-metylgruppen i morfin er en liten substituent, slik at det er ikke synlig om den sitter ekvatorialt eller aksialt når man ser på konturene. Det er ikke lett å vise dette uten mulighet for 3D visning, men disse bildene gir uansett en liten pekepinn på hvordan de ser ut. Det mest iøyenfallende er fargen på molekylene. Blå farge betyr mer ladning/ økt hydrofilitet. For nøytral morfin er både oksygen og nitrogen svakt negativt ladet, med tilsvarende andre positive områder. Dette kan sees ved at molekylene i figur 56 og 57 er grønne med små områder rødt og blått. Figur 58 og 59 er av ladet morfinum som er



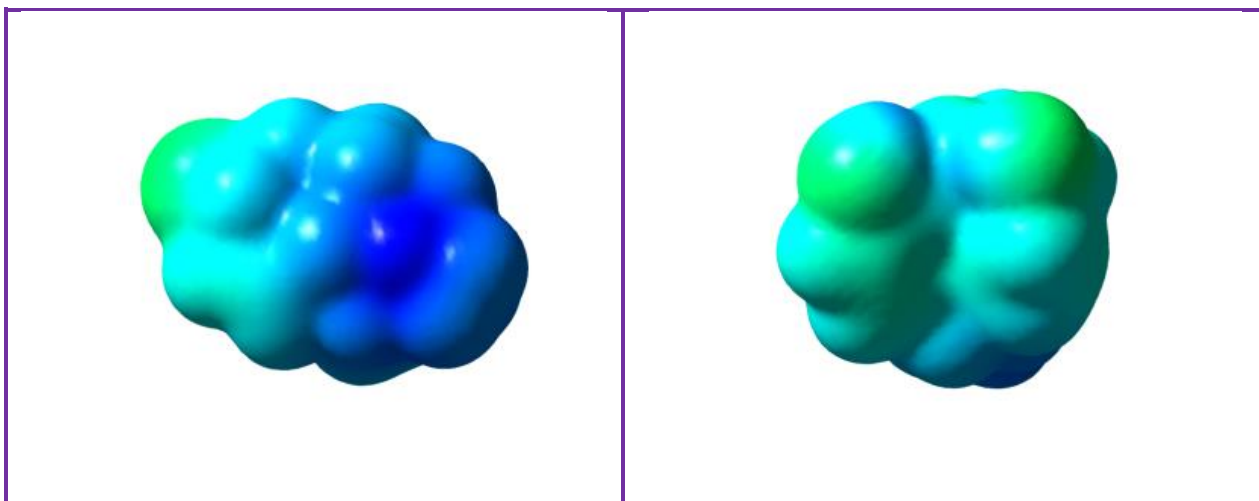
nesten helt blå over det hele med en forsterket farge rundt nitrogen. Dette viser hvordan  $H^+$  påvirker hele molekylet med sin ladning.

Som beskrevet tidligere må morfin i nøytral form krysse BHB for å nå reseptorene i CNS. Vi ser at de nøytrale formene er både mer lipofile og selvsagt ikke ladet. Vi har ikke regnet logP til de ulike formene, men det er noe som er verdt å prøve å utføre for å se om det er betydelig forskjell i lipofilisitet mellom de ulike konformerene.



Figur 56: Kontur av  $morfin_{ekv}$  (B3LYP)

Figur 57: Kontur  $morfin_{ekv}$  (B3LYP)



Figur 58: Kontur  $morfinum_{ekv}$  (B3LYP)

Figur 59: Kontur  $morfinum_{ekv}$  (B3LYP)

### **Rotasjon rundt enkeltbindinger**

Beregninger av enkeltkonformerene viste tydelig at orientasjonen av OH gruppene ikke er likegyldig. Når begge OH-gruppene vender seg mot det eteriske oksygenet, vil de konkurrere om stabiliserende bindinger til det eteriske oksygenets to par nbe. Dersom en av OH-gruppene er i *anti*, kan den andre OH-gruppen danne en sterkere binding til nbe på eterisk

oksygen og vise versa. Siden de to sidene av morfin ikke er identiske, er de to par nbe til det eteriske oksygenet ikke identiske heller, hvilket betyr at kvaliteten av hydrogenbindingen ikke vil være det samme.

Dersom morfin fungerer som hydrogen donor fra det fenoliske C3-OH, så er det faktisk ønskelig med en C6-OH som danner bedre hydrogenbinding til det eteriske oksygenet i molekylet og som dermed utkonkurrerer C3-OH fra å gjøre det. Slik får vi mer C3-OH "fri" til å bruke dets hydrogenbinding med reseptoren isteden.

Dette betyr at vi ønsker minst mulig av konformasjonene *syn*,  $g^+$ ,  $g^-$  for C3-OH og mest mulig C3-OH med *anti* konformasjon. C3-OH-*anti* skal dessuten ha mest tendens til å fungere som hydrogendonor, for da kvitter den seg også med den frastøtende interaksjonen med C2-H.

### *Hvorfor får vi ikke C6OH-syn?*

Man skulle tro at C6-OH i *syn* posisjon skulle være mer stabil enn *anti* formen både pga mulig hydrogenbinding til det eteriske oksygenet og færre frastøtende interaksjoner. I *anti* er det både C6-H og C7-H som kan ha uheldige interaksjoner med C6-OH mens i *syn* er det kun C5-H som er aktuelt. Ved å rotere molekylene i GaussWiew kan man se at hydrogenet i C6-OH både i  $6g^+$  og  $6g^-$  binder til den samme nbe-loben på eterisk oksygen som peker "innover" i molekylet. En slik posisjon er vanskelig å få til dersom C6-OH skulle vært i *syn*.

### *H<sup>+</sup> effekten*

Det at vi ikke klarte å få til  $g^-$  konformer på de nøytrale formene må antyde at interaksjonene som er involvert i denne konformerer bidrar til en betydelig forskjell i entalpi. Ut fra dette kan vi prøve å forklare hvorfor vi får  $g^+/g^-$  i morfinum men ikke i nøytral form. I ladet form er det elektronegative nitrogenets induktive effekt tydelig mer markant, noe en kan lett se ved å sammenligne Mullikens ladnings verdier. Det er forskjell i ladnings verdier på nesten alle atomene mellom nitrogen helt frem til OH. Vinklene rundt nitrogen atomet er også ulike, og disse små endringer i vinklene medfører til små endringer over hele skjelettet av molekylet.

Det kan tenkes at  $SP^3$  orbitalet til det eteriske nitrogen er trukket mot nitrogen atomet og blir smalere (mer P karakter). Endringene er kanskje nok for at de frastøtende interaksjonene som 6-OH opplever i  $g^-$  er blitt lave nok til at morfinum finner en stabil posisjon her.

Om dette er en riktig forklaring, kan en ta dette som lærdom på hvor små endringer som kan ha betydelig effekt, ikke minst med tanke på forståelse av hvordan morfin kompleks seg til reseptorene og hva som kan gjøres i fremtidig design av dets derivater, når målet er derivater med færre alvorlige bivirkninger som avhengighet og respirasjonshemming. Hittil er det bare

blitt gjort en omfattende struktur modifikasjon i morfin.(14, 50) Vi har ikke funnet noen som har forsket på slike små, fintfølede og delikate effekter.

### *Hvorfor vi får $g^-$ i morfinum men ikke i morfin?*

Ulikhetene mellom  $6g^+$  og  $6g^-$  er et resultat av de to ulike sidene av morfin/morfinum hvor  $g^-$  har mer frastøtende interaksjoner og  $g^+$  flere stabiliserende interaksjoner. Det samme gjelder forskjellen mellom  $6g^+$  og  $6 anti$ , med stabiliserende interaksjoner i  $g^+$  og frastøtende interaksjoner i  $anti$  posisjon. Når energiforskjellen mellom  $g^+$  og  $anti$  er stor, ser det ut til at det er vanskelig å finne en stabil  $g^-$ , slik som er tilfellet for de nøytrale formene.

Skanning av morfin og morfinum bekreftet de overraskende resultatene vi fant da vi lette etter stabile konformerer. Ved å sette til en  $H^+$  på nitrogen atomet som befinner seg helt på andre siden av molekylet i forhold til der rotasjonene foregår, fikk vi et annerledes konformasjons bilde enn det vi fikk i den tilsvarende nøytrale morfin formen.  $g^-$  konformerer er lokalisert ved en dal på kurven ved  $300^\circ$  hos morfinum, men ikke i morfin. Grunnen til at det er slik kan se ut til å være den relativt lave barrieren for overgangen fra  $anti$  til  $g^-$  i ladet form.

Dermed kan 6-OH finne en relativt stabil posisjon ved  $g^-$  fordi energien her allerede er ganske lav. Hvilke effekter et ladet nitrogen har på en dynamisk prosess som foregår på den andre siden av molekylet er overveldende.

### *Stol eller twist-båt?*

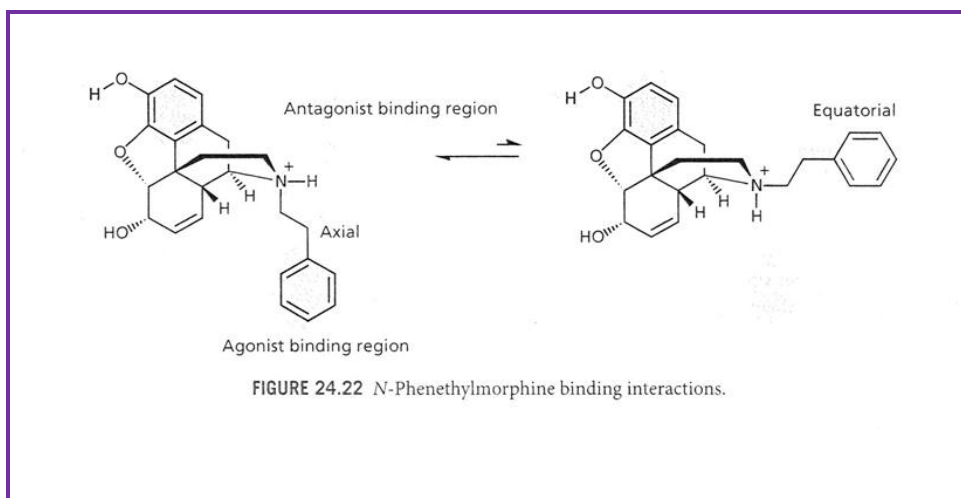
På grunn av morfins rigide struktur der ringene er tilnærmet låst i hverandre, er fullstendige ringinversjoner umulig. Men en delvis ringinversjon av sykloheksanen med nitrogen atomet kan gi en twist-båt konformasjon. Dette kan kanskje være en fordel når morfin skal kompleksere seg med reseptor. Konformasjonen kan i seg selv være ustabil men den kan bli stabilisert i selve komplekset med reseptoren.

Dessverre er det vanskelig å beregne disse twist-båt konformasjonene, da programmet vil raffinere molekylet over i nærmeste stol-form.

Figur 60 viser et bilde fra legemiddelboken av Patrick.(12) I følge denne figuren har opioidreseptoren en øvre antagoniserende lipofil lomme og en nedre, dypere agoniserende lipofil lomme.

Ser vi derimot på topologien til morfin og hvordan denne binder til reseptor, finner vi at ekvatoriale substituenten peker nedover, slik at både N-R og fenol gruppene havner nede, eller på samme side av reseptoren.

Dersom vi holder molekylet med fenolen ned og tar utgangspunkt i at sykkloheksan ringen med nitrogen atomet er i en stol form, ville de aksiale substituentene peke oppover, slik at N-R og morfin er lokalisert så å si i en "trans" geometri, altså motsatt av det denne figuren prøver å si. Siden fenol er nødvendig for kompleksring, og den alifatiske alkoholen ikke trengs, er det innlysende at når fenol er inn i reseptoren vil N-R gruppen peke ut av reseptoren dersom den er i aksial posisjon. For at begge skal peke i samme retning må sykkloheksanen med nitrogenet være i en twist-båt for å binde i de lipofile lommene slik som det står i litteraturen. For å finne ut av dette kreves mye teoretiske beregninger som ikke ennå er blitt gjort.



Figur 60: Illustrasjon fra legemiddelkjemiboken av Patrick (12)

### Hvilke(n) er den bioaktive konformer(en)?

Forholdet mellom de ulike konformerene til et legemiddel, dets bioaktive konformerer inkludert, vil selvsagt være avhengige av miljøet i cellene, pKa verdier osv. Hvilke(n) av de mange konformerene som er de(n) bioaktive i morfin dette tilfellet kan vi ikke svare på. De(n) bioaktive konformer(en)e behøver ikke nødvendigvis å være den mest stabile. Ut fra Le Chateliers prinsipp vet vi at likevektene ved kompleks dannelse med proteiner i cellene, ville bli forskjøvet mot det komplekset med den laveste  $\Delta G^\ddagger$ .

Konformasjonsanalysen av morfin og dets ladet form, i denne oppgaven, har vist at dette molekylet som tilsynelatende ser nokså rigid ut kan eksistere i mange mulige former og at minst 20 av dem er stabile nok til å bli kunne beregnes hver for seg i gass fase. I og med at N-R gruppen påvirker molekylets konformasjonelle adferd, betyr dette at man kan i prinsippet forskyve likevektens konformerer seg i mellom ved å forandre N-R gruppene. Det samme gjelder for eksempel bytting av den alifatiske OH gruppen med ulike funksjonelle grupper

som  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$  osv. Dette vil gi utslag i både den konformasjonelle atferden til den fenoliske  $\text{OH}$ -gruppen og til inversjon barrieren av  $\text{N-R}$  på den andre siden av morfinet, i tillegg til molekylens kjemiske og fysikalske egenskaper, samt evne til å danne kompleks med reseptorer og andre protein molekyler.

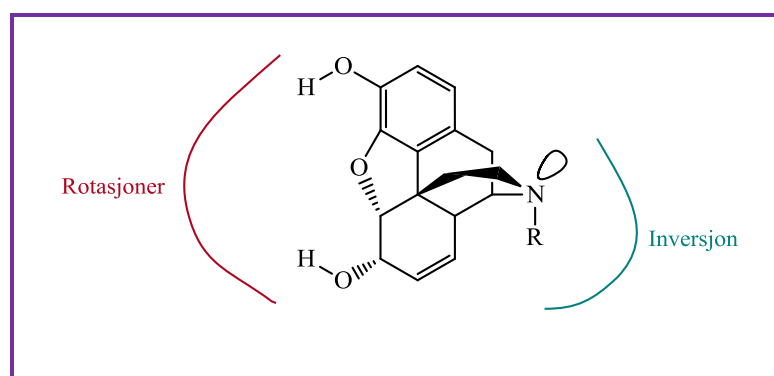
Hadde vi med andre ord visst hvem de(n) bioaktive(e) konformerer(e) er, hadde vi kunnet prøve syntetisere morfin derivater som enten disse konformasjonene er "fanget" i, eller foreta strukturelle modifikasjoner som sikrer at disse konformasjonene blir molekylets hoved konformasjoner i blodet. Før dette kan gjøres er trengs det en god porsjon teoretiske beregninger som kan gi en pekepinn på hva som kan være molekylens adferd i blodet og dermed hva som kan være lurt å prøve fremstille.

## 5. KONKLUSJON

I denne oppgaven har vi gjort konformasjonsanalyse og teoretiske beregninger av morfin. Vi har funnet at 20 av de 144 mulige morfin-konformerene er stabile, beregnet energien deres og sett på vinkler, ladninger og konturer. Forskjellen i energi mellom den mest stabile og den minst stabile av disse konformerene er på om lag 40 kcal / mol, noe som er et formidabelt tall. Ved hjelp av skanninger har vi sikret at det ikke finnes flere stabile konformerer enn de vi har beregnet hver for seg.

Resultatene kan kort oppsummeres i følgende punkter:

1. Inversjonsbarrieren i morfin er høyere enn i ammoniakk, henholdsvis 27,6 / 28,1 (6-OH  $g^+$  / 6-OH *anti*) og 22,2 kJ/mol. Barrieren i morfin med 6-OH *anti* er høyere enn med 6-OH  $g^+$ . Det blir mindre fleksibilitet rundt aminet når det sitter i et komplekst molekyl som morfin.
2. Energiforskjellen mellom de nøytrale ekvatoriale formene og deres korresponderende aksiale konformerer var på 10,2-10,4 kJ/mol. Energiforskjellen mellom de ladede ekvatoriale formene og deres korresponderende aksiale konformerer var på 5,5-5,6 kJ/mol. Ekvatorial posisjon av N-metyl gruppen var mest stabil i begge tilfeller.
3. Konformasjonsadferden til de nøytrale formene er annerledes enn til de korresponderende ladede formene. For eksempel blir 3-OH *anti* konformerene mer stabile i forhold til 3-OH *syn*, når molekylet er ladet.
4. Sammenhengen mellom  $g^+$  og  $g^-$  ser ut til å avhenge av planariteten i ring C: Jo mer planar ring C er, jo mer stabil blir konformerene  $g^-$ . Det ladede nitrogenet forårsaker endringer i molekylets fleksibilitet. Når ring C blir mer planar, blir  $g^-$  mer stabil. De to fleksible sidene i morfin, OH-gruppene og Nitrogen, påvirker hverandres konformasjonsatferd. De to OH-gruppene påvirker også hverandre. Effekten ser ut til å være den samme for både ekvatoriale og aksiale konformerer.



Hvilke(n) av de 20 konformerene som er de(n) bioaktive formen, og om noen av dem i det hele tatt er det, kan ikke dette arbeidet svare på. Vi kan heller ikke svare på hvorvidt ring D i den bioaktive konformeren er i en stol eller i en twist-båt konformasjon. Dette krever mer forskning som er utover denne masteroppgavens grenser.

### ***Til slutt...***

Morfin var og er fremdeles en av verdens beste analgetiske legemidler vi har når det gjelder behandling og lindring av akutte smerter, hos ulike grupper av pasienter, forårsaket av blant annet alvorlige skader og kreft. Vi kan bare anta at både bruk og misbruk av morfin og dets derivater vil øke i tiden som kommer.

Vårt håp er at disse resultatene kan danne grunnlag for videre arbeid som kan bidra til utvikling av morfinderivater som beholder den gode analgetiske effekten, men uten de mange alvorlige bivirkningene.

Kunnskap om de(n) bioaktive konformeren(e) er avgjørende i videre utvikling av legemidler som er mer potente og forhåpentligvis med færre alvorlige bivirkninger. Men dette krever mye konformasjonsanalyse og teoretiske beregninger av flere morfinderivater for å danne et godt grunnlag for videre omfattende syntese arbeid.



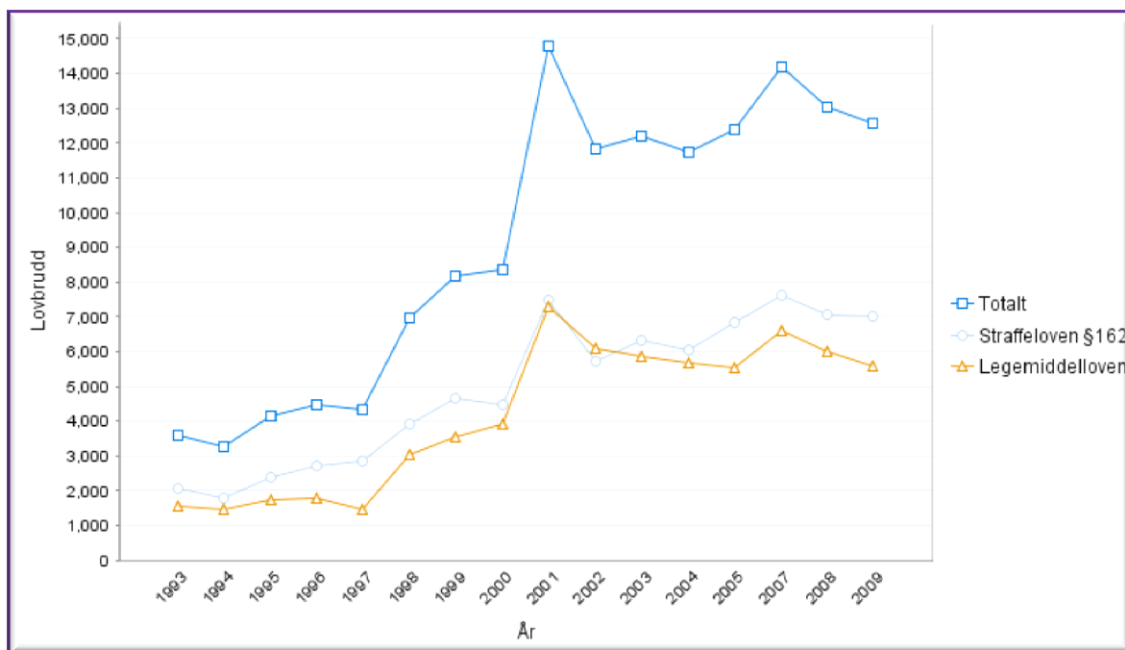
## KILDER

1. <http://tinyurl.com/c2x4jce> <http://tinyurl.com/cypgbka> <http://feztis.blogg.se/2011/august/> <http://tinyurl.com/cjo88xo> <http://tinyurl.com/d9e8gg9>.
2. Gylbert L. The crystal and molecular structure of morphine hydrochloride trihydrate. *Acta Cryst.* 1973 (B29):1630-5.
3. Eguchi M. Recent advances in selektive opioid receptor agonists and antagonists. *Medicinal Research Reviews.* 2004;24(2):182-212.
4. <http://tinyurl.com/d97cr4f>.
5. Amundsen, Bretteville-Jensen. Heroinforbruk og heroinbeslag i Norge. 2009.
6. Stoltenberg T, Andresen R, Hætta E, Osberg S, Haga Å, Lae E, et al. Rapport om narkotika. Oslo: 2010.
7. [www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/lar/2-opioidavhengighet](http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/lar/2-opioidavhengighet).
8. Burtis A, Ashwood E. *Tietz Fundamentals of clinical chemistry.* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company; 2001.
9. Pakningsvedlegg. Siemens Advia 1800. Se vedlegg 3.
10. <http://www.iasp-pain.org//AM/Template.cfm?Section=Home>.
11. Bjålie J, Haug E, Sand O, Sjaastad ØV, Toverud K. *Menneskekroppen, Fysiologi og Anatomi.* Oslo: Universitetsforlaget; 1998.
12. Patrick G. *An introduction to Medicinal Chemistry.* 2<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press; 2001. 511-50 p.
13. [www.herbalfire.com](http://www.herbalfire.com).
14. Lemke T, Williams D, Roche V, Zito S. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry.* 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health; 2013.s13-58, 658-695
15. McConathy J, Owens M. Stereochemistry in drug action. *Primary care companion J Clin Psychiatry.* 2003;5:70-3.
16. Novak B, Hudlicky T, Reed J, Mulzer J, Trauner D. *Current Organic Chemistry.* 2000;4:343.
17. Casy AF, Parfitt RT. *Opioid Analgesics - Chemistry and receptors.* 1<sup>th</sup> ed. New York: Plenum Press; 1986.
18. Strange P. Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology.* 2008 Apr;153(7):1353-63.
19. McFadyen I, Metzger T, Subramanian G, Poda G, Jorvig E, Ferguson D. Molecular modeling of opioid receptor-ligand complexes. *Progress in medicinal chemistry.* 2002;40:107-33.
20. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4470614.html>.
21. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4470615.html>.
22. Kane BE, Svensson B, Ferguson DM. Molecular recognition of opioid receptor ligands. *Aaps Journal.* 2006 2006;8(1):E126-E37.
23. Kalant H, Grant D, Mitchell J. *Medical Pharmacology.* 7<sup>th</sup> ed. Toronto: Elsevier; 2007.
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell.* 4<sup>th</sup> ed. USA: Garland Science; 2008.
25. Gentilucci L, Tolomelli A, De Marco R, Artali R. Molecular Docking of Opiates and Opioid Peptides, a Tool for the Design of Selective Agonists and Antagonists, and for the Investigation of Atypical Ligand-Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry.* 2012 Apr;19(11):1587-601.
26. Contreras-García J, Johnson E, Keinan S, Chaudret R, Piquemal J-P, Beratan D, et al. NCIPLOT A program for plotting noncovalent interaction regions. *Journal of chemical theory and computation.* 2011 (7):625-32.
27. Pedersen B. *Kjemidata.* Oslo: Universitetsforlaget; 2004.s.53-55
28. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/stereo/TZ.html>.
29. Dale J. *Stereochemistry and conformational analysis.* 1<sup>th</sup> ed. Oslo, New York: Universitetsforlaget,Verlag Chemie; 1978.
30. Dale J. *Stereokjemi og konformasjonsanalyse.* 1<sup>th</sup> ed. Oslo: Universitetsforlaget; 1975.
31. Hart H, Craine L, Hart D. *Organic Chemistry - a short course.* 10<sup>th</sup> ed. New York: Houghton Mifflin Company; 1998.

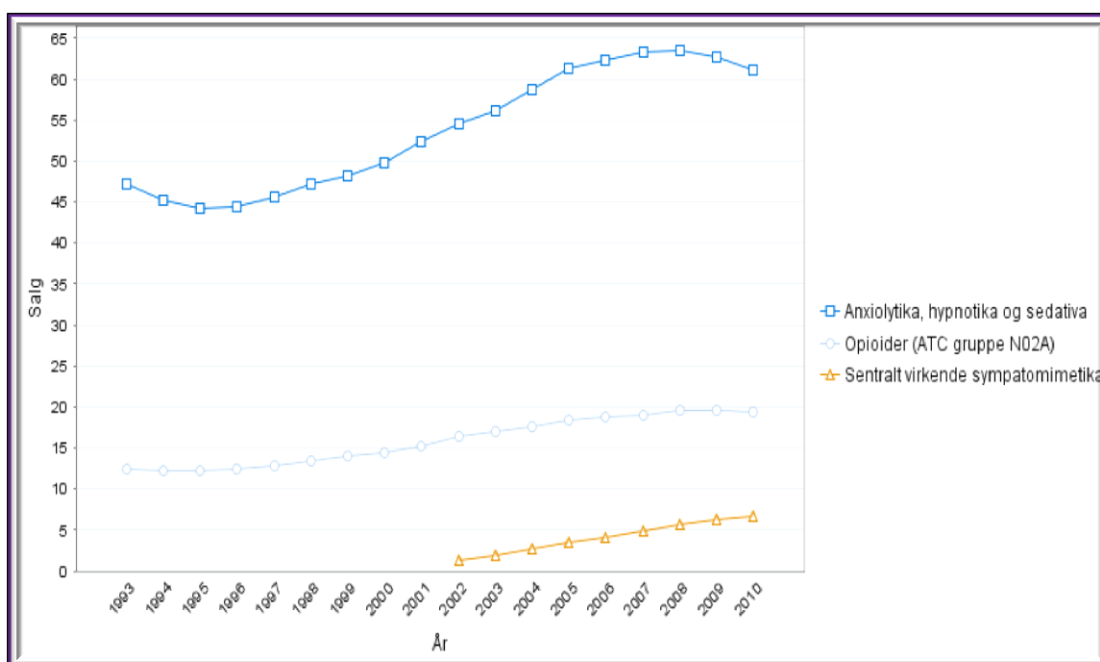


32. [http://en.wikipedia.org/wiki/Papaver\\_somniferum](http://en.wikipedia.org/wiki/Papaver_somniferum).
33. Molecular modelset for organic chemistry. The Prentice Hall ISSN: 0-205-08N36-3.
34. Burkert U, Allinger NL. Molecular mechanics. USA: American Chemical Society; 1982.
35. Allinger N. Molecular Structure. New Jersey: Wiley; 2010.
36. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/organic/t2.html>.
37. [http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular\\_mechanics](http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_mechanics).
38. Allinger N. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. J Am Chem Soc. 1977;99:4831-7.
39. [http://en.wikipedia.org/wiki/Force\\_field\\_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Force_field_(chemistry)).
40. Atkins P, Paula J. Elements of physical chemistry. 5th ed. United States: Oxford University Press; 2009.
41. <http://www.staff.ncl.ac.uk/bruce.tattershall/teaching/chy850/abmeths.html>.
42. Lee C, Yang W, Parr R. Phys Rev B. 1988;37(2):785-9.
43. Møller C, Plesset M. Phys. Rev.1934.
44. Peterson K, Dunning TH. J ChemPhys. 2002;117(23):10548-60.
45. <http://www.usit.uio.no/om/aktuelt/top500.html>.
46. Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, et al. Gaussian 09, Revision B.01. Wallingford CT: 2010.
47. Subramanian G, Paterlini M, Portoghese P, Ferguson D. Molecular docking reveals a novel binding site model for fentanyl at the mu-opioid reseptor. American Chemical Society. 2000 (43):381-91.
48. Rincon D, Cordeiro M, Mosquera R. Theoretical Study of Morphine and Heroin: Conformational Study in Gas Phase and Aqueous Solution and Electron Distribution Analysis. International Journal of Quantum Chemistry. 2010 Nov;110(13):2472-82.
49. Zumdahl S. Chemical Principles. 6<sup>th</sup> ed: Brooks/Cole; 2009.s661-687
50. DeGraw J, Lawson J, Crase H, Johnson H, Ellis M, Uyeno E, et al. Analgesics. 1. Synthesis and analgesic properties of N-sec-alkyl- and N-tert-alkylnormorphines. journal of medicinal chemistry. 1978;21(5):415-22.
51. Silverman RB. The organic chemistry of drug design and drug action. 2<sup>th</sup> ed. Illinois: Elsevier Academic Press; 2004.

## VEDLEGG 1: Rus-statistikk



Reaksjoner på narkotikaforbrytelser etter straffeloven §162 og legemiddeloven (4)



Salg av legemidler i definerte døgndoser, DDD(4)

## VEDLEGG 2: Pakningsvedlegg Opiatanalyser Siemens Advia 1650

**Catalog No.:** 0135 (100 mL Kit)  
0136 (500 mL Kit)

### Intended Use

The DRI® Opiate Assay is intended for the qualitative and semiquantitative determination of opiates in human urine.

**The assay provides only a preliminary analytical test result. A more specific alternative chemical method must be used in order to obtain a confirmed analytical result. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is the preferred confirmatory method.<sup>1,2</sup> Clinical consideration and professional judgment should be applied to any drug of abuse test result, particularly when preliminary positive results are used.**

### Summary and Explanation of the Test

Opiate compounds, such as morphine and codeine, are naturally occurring alkaloids of opium and are widely used as analgesics. Although drug abusers may abuse morphine and codeine, another opiate compound, heroin, is synthesized from morphine and is the most commonly abused opiate. When ingested or injected, heroin is metabolized to the molecule, 6-Monoacetyl morphine, which is hydrolyzed back to morphine. Opiates are rapidly metabolized by the body and excreted in urine, allowing immunoassays to detect recent use of morphine, codeine, and/or heroin.

The DRI Opiate Assay is a homogeneous enzyme immunoassay<sup>3</sup> using ready-to-use liquid reagents. The assay uses monoclonal antibodies that detect opiates in urine. The assay is based on the competition between an enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) labeled drug and the free drug from the urine sample for a fixed amount of specific antibody binding sites.

In the absence of free drug from the sample, the specific antibody binds the drug-labeled G6PDH and the enzyme activity is inhibited. This phenomenon creates a direct relationship between drug concentration in urine and the enzyme activity. The enzyme G6PDH activity is determined spectrophotometrically at 340 nm by measuring its ability to convert nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) to NADH.

### Reagents

**Antibody/Substrate Reagent.** Contains monoclonal anti-morphine antibody, glucose-6-phosphate (G6P), and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in Tris buffer with sodium azide as a preservative.

**Enzyme Conjugate Reagent.** Contains morphine labeled with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in Tris buffer with sodium azide as a preservative.

### Additional Materials Required (sold separately):

### Precautions and Warnings

1. This test is for in vitro diagnostic use only. The reagents are harmful if swallowed.
2. Reagents used in the assay components contain sodium azide, which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of such reagents, always flush with a large volume of water to prevent azide build-up.
3. Do not use the reagents beyond their expiration dates.

### Reagent Preparation and Storage

The reagents are ready for use. No reagent preparation required. All assay components, when stored at 2-8°C, are stable until the expiration date indicated on the label.

## DRI® Opiate Assay

For In Vitro Diagnostic Use

### Specimen Collection and Handling

Collect urine specimens in plastic or glass containers. Testing of fresh urine specimens is suggested.

*The Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs; Final Guidelines* recommends that specimens that do not receive an initial test within 7 days of arrival in the laboratory should be placed into secure refrigeration units.

Samples within a pH range of 3 to 11 are suitable for testing with this assay. An effort should be made to keep pipetted samples free of gross debris. It is recommended that highly turbid specimens be centrifuged before analysis.

Adulteration of the urine sample may cause erroneous results. If adulteration is suspected, obtain another sample and forward both specimens to the laboratory for testing.

**Handle all urine specimens as if they were potentially infectious.**

### Assay Procedure

Analyzers capable of maintaining a constant temperature, pipetting samples, mixing reagents, measuring enzymatic rates at 340 nm and timing the reaction accurately can be used to perform this assay.

Before performing the assay, refer to the analyzer-specific protocol sheet, which contains parameters and/or additional instructions for use.

### Quality Control and Calibration

Good laboratory practice suggests the use of control specimens to ensure proper assay performance. Use controls near the cutoff calibrator to validate the calibration. Control results must fall within established ranges as determined by your laboratory. If results fall outside of established ranges, assay results are invalid.

#### **Qualitative analysis**

For qualitative analysis of samples, use the 300 ng/mL or 2000 ng/mL calibrator as a cutoff level for distinguishing "positive" from "negative" samples. The DRI® Opiate Low Urine Calibrator contains 300 ng/mL morphine. The DRI® MultiDrug Calibrator 2 contains 2000 ng/mL morphine.

#### **Semiquantitative analysis**

For semiquantitative analysis, use all calibrators.

### **Results and Expected Values**

#### **Qualitative results**

A sample that exhibits a change in absorbance ( $\Delta A$ ) value equal to or greater than the value obtained with the cutoff calibrator is considered positive. A sample that exhibits a change in absorbance ( $\Delta A$ ) value lower than the value obtained with the cutoff calibrator is considered negative.

#### **Semiquantitative results**

A rough estimate of drug concentration in the samples can be obtained by running a standard curve with all calibrators and quantitating samples off the standard curve. Refer to the analyzer-specific protocol sheets.

#### **Limitations**

1. A positive result from this assay indicates only the presence of opiates and does not necessarily correlate with the extent of physiological and psychological effects.
2. A positive result by this assay should be confirmed by another nonimmunological method such as GC, TLC or GC/MS.
3. The test is designed for use with human urine only.
4. It is possible that other substances and/or factors (eg, technical or procedural) not listed in the specificity table may interfere with the test and cause false results.

### **Specific Performance Characteristics**

Typical performance results obtained on the Hitachi 717 analyzer are shown below.<sup>4</sup>

#### **Precision**

The following tables summarize the precision results obtained by testing the 300 ng/mL calibrator, 2000 ng/mL calibrator, and their respective low and high controls.

#### **Qualitative**

#### **Semiquantitative**

#### **Sensitivity**

Sensitivity, defined as the lowest concentration that can be differentiated from the negative urine with 95% confidence, is 6 ng/mL for the 300 ng/mL cutoff assay and 26 ng/mL for the 200 ng/mL cutoff assay.

#### **Accuracy**

One hundred and seventy-nine clinical urine specimens were tested using the 300 ng/mL as a cutoff calibrator and analyzed by GC/MS. Ninety-one samples were positive, eighty-one were negative, and seven were false positive using the 300 ng/mL cutoff calibrator. One hundred and sixty-three clinical urine specimens were tested using the 2000 ng/mL as a cutoff calibrator and analyzed by GC/MS. Eighty-nine were positive, seventy were negative, and four were false positive using the 2000 ng/mL cutoff calibrator.

Interference from endogenous and exogenous substances were investigated. No interference was observed when urine samples were spiked with the following compounds up to the concentrations indicated.

#### **Specificity**

The specificity of the assay was evaluated using 300 ng/mL and 2000 ng/mL as cutoff calibrators. The following tables summarize the results.

The compounds in the table below produced a result approximately equivalent to the cutoff calibrator.

Concentration of compounds that produced a negative result with both the 300 ng/mL and 2000 ng/mL cutoff calibrators:

#### **References**

1. *Urine Testing for Drug of Abuse*. National Institute on Drug Abuse (NIDA). Research Monograph 73, 1986.
2. *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs*. National Institute on Drug Abuse. Federal Register Vol. 53, No 69, pp 11970 (1988).
3. Rubenstein KE, Schneider RS, and EF Ullman: *Homogeneous Enzyme Immunoassay: A New Immunochemical Technique*. Biochem Biophys Res Commun 47, 846-851 (1972).
4. Data on file at Microgenics Corporation.

## VEDLEGG 3: Antall rusmiddelanalyser i Sykehuset Østfold

| Oversikt over antall medikament-rusanalyser<br>Total oversikt for 2009 |                        |                      |              |            |              |           |          |             |                  |       |        |
|--|------------------------|----------------------|--------------|------------|--------------|-----------|----------|-------------|------------------|-------|--------|
| Foretak: SØ HF   | Analysekode            | Analyse              | Medium       | Instrument | Inneliggende | Int. pol. | Eks.pol. | Totalt ant. | Refusjon fra NAV | Takst | Beløp  |
|  | BENZO                  | s-Benzodiazepiner    | Serum        | Advia 1650 | 102          | 793       | 74       | 969         | 19 074           | 707c  | 22,00  |
|  | DIGI                   | s-Digitoksin         | Serum        | Advia 1650 | 645          | 511       | 2 269    | 3 425       | 61 160           | 707c  | 22,00  |
|  | ETHYL                  | s-Etanol             | Serum        | Advia 1650 | 85           | 1 327     | 55       | 1 467       | 30 404           | 707c  | 22,00  |
|  | FENO                   | s-Fenobarbital       | Serum        | Advia 1650 | 40           | 20        | 82       | 142         | 2 244            | 707c  | 22,00  |
|  | FENY                   | s-Fenytoin           | Serum        | Advia 1650 | 96           | 23        | 173      | 292         | 4 312            | 707c  | 22,00  |
|  | GENTA                  | s-Gentamicin         | Serum        | Advia 1650 | 1 257        | 10        | 11       | 1 278       | 462              | 707c  | 22,00  |
|  | KARBZ                  | s-Karbamazepin       | Serum        | Advia 1650 | 101          | 123       | 293      | 517         | 9 152            | 707c  | 22,00  |
|  | LI                     | s-Litium             | Serum        | Advia 1650 | 355          | 251       | 1 309    | 1 915       | 34 320           | 707c  | 22,00  |
|  | PARAC                  | s-Paracetamol        | Serum        | Advia 1650 | 129          | 651       | 32       | 812         | 15 026           | 707c  | 22,00  |
|  | SALISY                 | s-Salisylater        | Serum        | Advia 1650 | 3            | 5         | 9        | 17          | 308              | 707c  | 22,00  |
|  | TEO                    | s-Teofyllin          | Serum        | Advia 1650 | 131          | 38        | 48       | 217         | 1 892            | 707c  | 22,00  |
|  | TOBRA                  | s-Tobramycin         | Serum        | Advia 1650 | 28           | 14        | 6        | 48          | 440              | 707c  | 22,00  |
|  | VALPR                  | s-Valproat           | Serum        | Advia 1650 | 309          | 187       | 342      | 838         | 11 638           | 707c  | 22,00  |
|  | CYA                    | b-Cya                | EDTA-blod    | Advia 1650 | 53           | 680       | 61       | 794         | 48 906           | 707d  | 66,00  |
|  | TCA                    | u-TCA                | Urin         | Hurtigtest | 8            | 63        | 6        | 77          | 1 518            | 707c  | 22,00  |
|  | RUS                    | u-Rushurtigtest      | Urin         | Hurtigtest | 69           | 130       | 1        | 200         | 2 882            | 707c  | 22,00  |
|  | ETGU                   | u-EtG                | Urin         | Advia 1650 | 1 733        | 33        | 6 313    | 8 079       | 139 612          | 707c  | 22,00  |
|  | U6AM                   | u-6AM                | Urin         | Advia 1650 | 2 622        | 166       | 12 055   | 14 843      | 256 641          | 709a  | 21,00  |
|  | UAMF                   | u-Amfetamin          | Urin         | Advia 1650 | 3 021        | 232       | 13 182   | 16 435      | 281 694          | 709a  | 21,00  |
|  | UBARB                  | u-Barbiturater       | Urin         | Advia 1650 | 2 814        | 82        | 12 497   | 15 393      | 276 738          | 707c  | 22,00  |
|  | UBENZ                  | u-Benzodiazepiner    | Urin         | Advia 1650 | 2 948        | 227       | 13 171   | 16 346      | 294 756          | 707c  | 22,00  |
|  | UBUPR                  | u-Buprenorfin        | Urin         | Advia 1650 | 2 693        | 72        | 12 208   | 14 973      | 270 160          | 707c  | 22,00  |
|  | UECST                  | u-Ecstasy            | Urin         | Advia 1650 | 2 839        | 87        | 12 597   | 15 523      | 266 364          | 709a  | 21,00  |
|  | UEDDP                  | u-EDDP               | Urin         | Advia 1650 | 2 698        | 65        | 12 067   | 14 830      | 266 904          | 707c  | 22,00  |
|  | UETHYL                 | u-Etylalkohol        | Urin         | Advia 1650 | 1 704        | 29        | 6 300    | 8 033       | 139 238          | 707c  | 22,00  |
|  | UKANN                  | u-Kannabis           | Urin         | Advia 1650 | 3 025        | 237       | 13 248   | 16 510      | 283 185          | 709a  | 21,00  |
|  | UKOKA                  | u-Kokain             | Urin         | Advia 1650 | 2 938        | 222       | 12 794   | 15 954      | 273 336          | 709a  | 21,00  |
|  | UKRE-R                 | u-Kreatinin (u-kreR) | Urin         | Advia 1650 | 3 042        | 240       | 13 314   | 16 596      | 54 216           | 707a  | 4,00   |
|  | ULSD                   | u-LSD                | Urin         | Advia 1650 | 1 494        | 54        | 7 793    | 9 341       | 164 787          | 709a  | 21,00  |
|  | UMETA                  | u-Metadon            | Urin         | Advia 1650 | 2 726        | 78        | 12 217   | 15 021      | 270 490          | 707c  | 22,00  |
|  | UOPIA                  | u-Opiater            | Urin         | Advia 1650 | 2 991        | 227       | 13 152   | 16 370      | 294 338          | 707c  | 22,00  |
|  | UPCP                   | u-PCP                | Urin         | Advia 1650 | 2 709        | 66        | 12 029   | 14 804      | 253 995          | 709a  | 21,00  |
|  | UPH-R                  | u-pH                 | Urin         | Advia 1650 | 3 039        | 239       | 13 291   | 16 569      | 54 120           | 707a  | 4,00   |
|  | UPROP                  | u-Propoxyfen         | Urin         | Advia 1650 | 2 694        | 63        | 12 023   | 14 780      | 265 892          | 707c  | 22,00  |
|  | U6AMB                  | u-6AM                | Urin         | GCMS       | 25           | 1         | 297      | 323         | 38 442           | 709c  | 129,00 |
|  | U7AFLU                 | u-7-a-flumi.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | U7AKLO                 | u-7-aklona.kvan      | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | U7ANIT                 | u-7-nitra.kvan       | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UAHALP                 | u-a-h-alpra.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UAHMD                  | u-a-h-midaz.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UESME                  | u-Desmetyld.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UOKSAZ                 | u-Oksazepam.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UTEMAZ                 | u-Temazepam.kvan     | Urin         | GCMS       | 547          | 19        | 3 460    | 4 026       | 448 791          | 709c  | 129,00 |
|  | UTHC                   | u-THC spesefikk      | Urin         | GCMS       | 407          | 13        | 1 336    | 1 756       | 174 021          | 709c  | 129,00 |
|  | METALK                 | B-Metanol            | Heparin-blod | GCMS       | 0            | 0         | 0        | 0           | 0                | 707e  | 131,00 |
|  | ISOALK                 | B-Isopropanol        | Heparin-blod | GCMS       | 0            | 0         | 0        | 0           | 0                | 707e  | 131,00 |
|  | EGLYK                  | S-Etylenglykol       | Serum        | GCMS       | 2            | 1         | 0        | 3           | 131              | 707e  | 131,00 |
|  | Totalt antall analyser |                      |              |            |              |           |          |             |                  |       |        |
|  | Fordeling i %          |                      |              |            |              |           |          |             |                  |       |        |
|  |                        |                      |              |            | 55 951       | 7 412     | 244 335  | 307 698     | 8 153 126        |       |        |
|  |                        |                      |              |            | 18,2         | 2,4       | 79,4     |             |                  |       |        |

| Oversikt over antall medikament-rusanalyser<br>Total oversikt for 2010 |                      |              |            |                |           |          |             |                  |       |        |
|--|----------------------|--------------|------------|----------------|-----------|----------|-------------|------------------|-------|--------|
| Foretak: SØ HF   |                      |              |            |                |           |          |             |                  |       |        |
| Analysekode  | Analyse              | Medium       | Instrument | Imneilleggende | Int. pol. | Eks.pol. | Totalt ant. | Refusjon fra NAV | Takst | Beløp  |
| BENZO  | s-Benzodiazepiner    | Serum        | Advia 1650 | 136            | 947       | 95       | 1 178       | 23 966           | 707c  | 23 00  |
| DIGI   | s-Digitoksain        | Serum        | Advia 1650 | 573            | 573       | 2 080    | 3 226       | 61 019           | 707c  | 23 00  |
| ETHYL  | s-Etanol             | Serum        | Advia 1650 | 117            | 1 438     | 21       | 1 576       | 33 557           | 707c  | 23 00  |
| FENO   | s-Fenobarbital       | Serum        | Advia 1650 | 106            | 13        | 86       | 205         | 2 277            | 707c  | 23 00  |
| FENY   | s-Fenytoin           | Serum        | Advia 1650 | 159            | 20        | 160      | 339         | 4 140            | 707c  | 23 00  |
| GENTA  | s-Gentamicin         | Serum        | Advia 1650 | 1 060          | 11        | 20       | 1 091       | 713              | 707c  | 23 00  |
| KARBZ  | s-Karbamazepin       | Serum        | Advia 1650 | 62             | 110       | 284      | 456         | 9 062            | 707c  | 23 00  |
| LI   | s-Litium             | Serum        | Advia 1650 | 381            | 249       | 1 145    | 1 775       | 32 062           | 707c  | 23 00  |
| PARAC  | s-Paracetamol        | Serum        | Advia 1650 | 151            | 800       | 36       | 987         | 19 228           | 707c  | 23 00  |
| SALISY   | s-Salisylater        | Serum        | Advia 1650 | 4              | 3         | 12       | 19          | 345              | 707c  | 23 00  |
| TEO  | s-Teofyllin          | Serum        | Advia 1650 | 164            | 29        | 39       | 232         | 1 564            | 707c  | 23 00  |
| TOBRA  | s-Tobramycin         | Serum        | Advia 1650 | 52             | 11        | 2        | 65          | 299              | 707c  | 23 00  |
| VALPR  | s-Valproat           | Serum        | Advia 1650 | 251            | 181       | 266      | 698         | 10 281           | 707c  | 23 00  |
| CYA  | b-Cya                | EDTA-blod    | Advia 1650 | 128            | 729       | 60       | 917         | 56 019           | 707d  | 71 00  |
| TCA  | u-TCA                | Urin         | Hurtigtest | 0              | 0         | 0        | 0           | 0                | 707c  | 23 00  |
| RUS  | u-Rushurtigtest      | Urin         | Hurtigtest | 62             | 100       | 0        | 162         | 2 300            | 707c  | 23 00  |
| ETGU   | u-Etg                | Urin         | Advia 1650 | 2 495          | 55        | 10 982   | 13 532      | 253 851          | 707c  | 23 00  |
| U6AM   | u-6AM                | Urin         | Advia 1650 | 2 950          | 92        | 13 177   | 16 219      | 305 187          | 709a  | 23 00  |
| UAMF   | u-Amfetamin          | Urin         | Advia 1650 | 3 207          | 230       | 14 266   | 17 703      | 333 408          | 709a  | 23 00  |
| UBARB  | u-Barbiturater       | Urin         | Advia 1650 | 3 062          | 103       | 13 617   | 16 782      | 315 560          | 707c  | 23 00  |
| UBENZ  | u-Benzodiazepiner    | Urin         | Advia 1650 | 3 185          | 226       | 14 300   | 17 711      | 334 098          | 707c  | 23 00  |
| UBUPR  | u-Buprenorfin        | Urin         | Advia 1650 | 2 973          | 93        | 13 497   | 16 563      | 312 570          | 707c  | 23 00  |
| UECST  | u-Ecstasy            | Urin         | Advia 1650 | 3 059          | 118       | 13 562   | 16 739      | 314 640          | 709a  | 23 00  |
| UFDDP  | u-EDDP               | Urin         | Advia 1650 | 2 943          | 86        | 13 102   | 16 131      | 303 324          | 707c  | 23 00  |
| UETHYL   | u-Etylalkohol        | Urin         | Advia 1650 | 2 685          | 57        | 11 997   | 14 739      | 277 242          | 707c  | 23 00  |
| UKANN  | u-Kannabis           | Urin         | Advia 1650 | 3 219          | 231       | 14 335   | 17 785      | 335 018          | 709a  | 23 00  |
| UKOKA  | u-Kokain             | Urin         | Advia 1650 | 3 170          | 218       | 13 889   | 17 277      | 324 461          | 709a  | 23 00  |
| UKRE-R   | u-Kreatinin (u-kreR) | Urin         | Advia 1650 | 3 236          | 240       | 14 494   | 17 970      | 58 936           | 707a  | 4 00   |
| ULSD   | u-LSD                | Urin         | Advia 1650 | 0              | 0         | 0        | 0           | 0                | 709a  | 23 00  |
| UMETA  | u-Metadon            | Urin         | Advia 1650 | 2 996          | 98        | 13 352   | 16 446      | 309 350          | 707c  | 23 00  |
| UOPTA  | u-Opiater            | Urin         | Advia 1650 | 3 207          | 235       | 14 275   | 17 717      | 333 730          | 707c  | 23 00  |
| UPCP   | u-PCP                | Urin         | Advia 1650 | 2 960          | 83        | 13 059   | 16 102      | 302 266          | 709a  | 23 00  |
| UPH-R  | u-pH                 | Urin         | Advia 1650 | 3 206          | 240       | 14 448   | 17 894      | 58 752           | 707a  | 4 00   |
| UPROP  | u-Propoxyfen         | Urin         | Advia 1650 | 2 942          | 82        | 13 007   | 16 031      | 301 047          | 707c  | 23 00  |
| U6AMB  | u-6AM                | Urin         | GCMS       | 43             | 1         | 249      | 293         | 34 750           | 709c  | 139 00 |
| U7AFU  | u-7-a-flumi.kvan     | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| U7AKLO   | u-7-aklona.kvan      | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| U7ANIT   | u-7-nitra.kvan       | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| UAHALP   | u-a-h-alpra.kvan     | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| UAHMID   | u-a-h-midaz.kvan     | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| UDESME   | u-Desmetylid.kvan    | Urin         | GCMS       | 729            | 26        | 4 073    | 4 828       | 569 761          | 709c  | 139 00 |
| UOKSAZ   | u-Oksazepam.kvan     | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| UTEMAZ   | u-Temazepam.kvan     | Urin         | GCMS       | 729            | 22        | 3 220    | 3 971       | 450 638          | 709c  | 139 00 |
| UTHC   | u-THC spesefikk      | Urin         | GCMS       | 401            | 15        | 1 112    | 1 528       | 156 653          | 709c  | 139 00 |
| METALK   | B-Metanol            | Heparin-blod | GCMS       | 11             | 6         | 0        | 17          | 846              | 707e  | 141 00 |
| ISOALK   | B-Isopropanol        | Heparin-blod | GCMS       | 2              | 4         | 0        | 6           | 564              | 707e  | 141 00 |
| EGLYK  | S-Etylglykol         | Serum        | GCMS       | 2              | 6         | 0        | 8           | 846              | 707e  | 141 00 |
| Totalt antall analyser   |                      |              |            | 61 192         | 7 913     | 261 639  | 330 744     | 8 948 158        |       |        |
| Fordeling i %  |                      |              |            | 18,5           | 2,4       | 79,1     |             |                  |       |        |



## VEDLEGG 4: Metabolisme av morfin

Morfin inneholder to OH-grupper, men disse er ikke like. Den ene OH-gruppen er alifatisk, og den andre er aromatisk slik at det er ikke likegyldig hvilke av disse som blir metabolisert først.

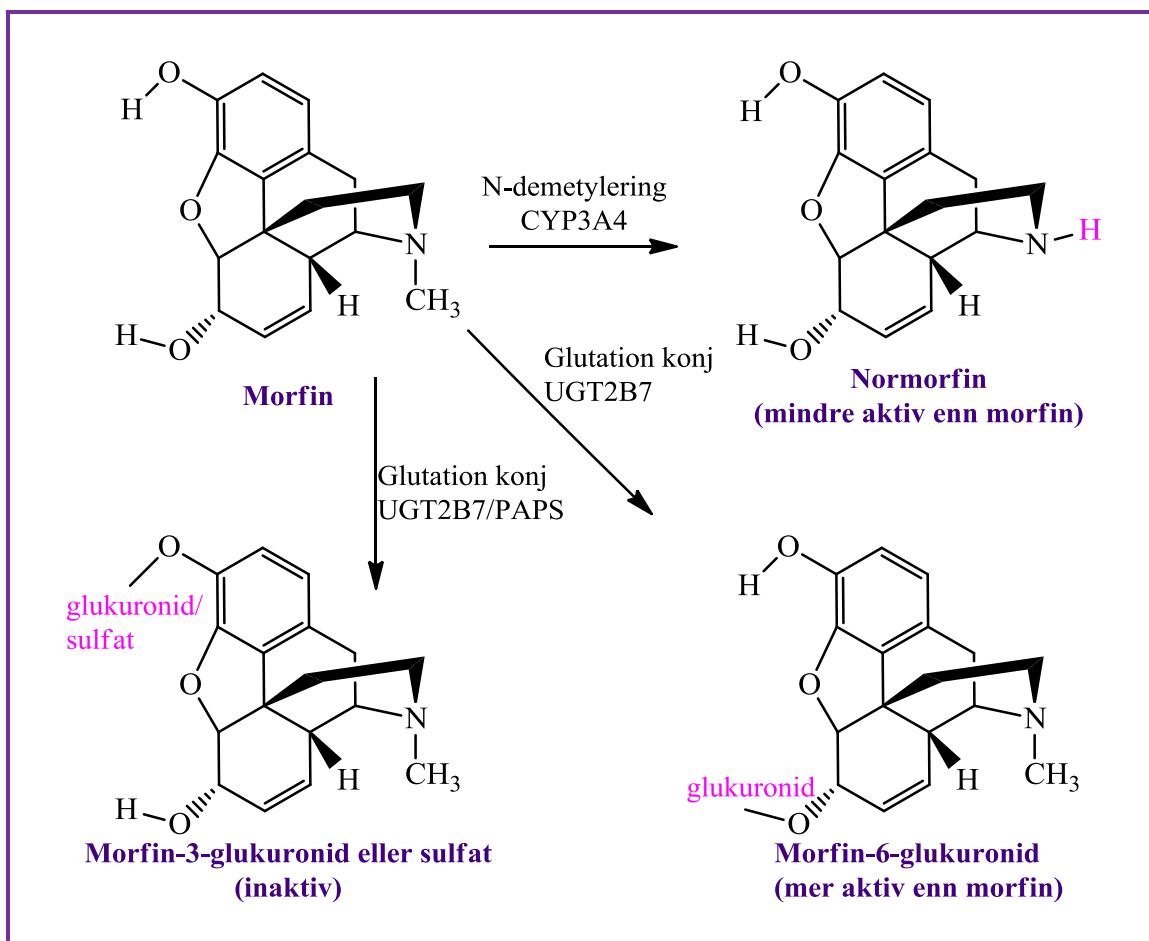
Morfin blir metabolisert ved hovedsakelig tre ulike måter:

- Den alifatiske OH-gruppen på karbon nummer 6 blir oksidert. I fase 1 metabolismen blir morfin katalysert av morfin 6-dehydrogenase til alifatisk oksidasjon til morfinon, som i fase 2 gjennomgår en glutatjon konjugering til morfin-6-glukuronid (M6G). Denne er faktisk mer aktiv en morfin selv.(14, 51)
- Den aromatiske OH-gruppen på karbon nummer 3 blir oksidert. I fase 1 metabolismen blir morfin katalysert av CYP450 enzymer til aromatisk oksidasjon av 3-OH, som videre gjennomgår en glutatjon konjugering til morfin-3-glukuronid (M3G) eller morfin-3-sulfat (M3S). Disse metabolittene er inaktive.(14, 51)
- Nitrogen blir dealkylert. Morfin kan bli dealkylert av CYP3A4 til normorfin, som bare har 1/20 av aktiviteten til morfin. Denne teoretiske aktiviteten er ikke klinisk relevant.(14)

Morfin har en lav oral biotilgjengelighet på grunn av høy prehepatisk (GI) og hepatisk (lever) metabolisme til de inaktive metabolittene M3G og M3S. I tarmen og leveren finnes høye konsentrasjoner av CYP450 enzymer som metaboliserer morfin. Dersom morfin skal tas oralt er det derfor nødvendig med høye doser i starten.(14)

Den aktive metabolitten M6G skilles ut via nyrene. Det er viktig å være varsom med inntak av morfin ved nyresykdom eller annen renal retardasjon, da denne aktive metabolitten kan akkumuleres til toksiske konsentrasjoner dersom den ikke kan bli skilt ut gjennom nyrene på normal måte.(14)





Hovedmetabolismen til morfin (14)

## VEDLEGG 5: Mulliken atomladning

MULLIKEN ATOM LADNING – svarene er avrundet!

Gruppe 1: 3syn 6g<sup>+</sup>

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,03  | 0,03  | 0,02   | 0,02   | 0,08  | 0,07  | 0,07   | 0,06   |
| C6      | 0,12  | 0,12  | 0,11   | 0,11   | 0,18  | 0,18  | 0,17   | 0,17   |
| C7      | -0,17 | -0,16 | -0,14  | -0,14  | -0,23 | -0,23 | -0,19  | -0,19  |
| C8      | -0,19 | -0,20 | -0,22  | -0,22  | -0,27 | -0,27 | -0,30  | -0,30  |
| C14     | -0,02 | -0,05 | -0,06  | -0,06  | -0,02 | -0,07 | -0,06  | -0,08  |
| C13     | 0,09  | 0,12  | 0,11   | 0,12   | -0,02 | 0,04  | 0,01   | 0,03   |
| O6      | -0,35 | -0,35 | -0,32  | -0,32  | -0,43 | -0,43 | -0,40  | -0,40  |
| C4      | 0,14  | 0,14  | 0,14   | 0,14   | 0,17  | 0,17  | 0,17   | 0,16   |
| Et-O    | -0,35 | -0,35 | -0,33  | -0,33  | -0,44 | -0,44 | -0,41  | -0,41  |
| C1      | -0,16 | -0,16 | -0,16  | -0,16  | -0,19 | -0,18 | -0,18  | -0,18  |
| C2      | -0,14 | -0,15 | -0,12  | -0,13  | -0,20 | -0,19 | -0,17  | -0,17  |
| C3      | 0,10  | 0,10  | 0,11   | 0,11   | 0,15  | 0,14  | 0,16   | 0,16   |
| O3      | -0,28 | -0,28 | -0,25  | -0,25  | -0,36 | -0,36 | -0,33  | -0,33  |
| C9      | 0,00  | 0,00  | -0,07  | -0,07  | -0,02 | -0,02 | -0,08  | -0,09  |
| C10     | -0,20 | -0,19 | -0,21  | -0,22  | -0,22 | -0,20 | -0,22  | -0,22  |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,01 | -0,02 | -0,04  | -0,04  |
| C12     | 0,01  | 0,01  | 0,01   | 0,00   | -0,02 | -0,03 | -0,02  | -0,04  |
| C16     | -0,18 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,17 | -0,22 | -0,22  | -0,23  |
| C15     | -0,10 | -0,11 | -0,16  | -0,17  | -0,12 | -0,13 | -0,17  | -0,19  |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,08   | 0,07   | -0,24 | -0,24 | 0,04   | 0,04   |
| Met-C   | -0,21 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  |
| H5      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,14  | 0,14  | 0,16   | 0,16   |
| H6      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,15   |
| H7      | 0,12  | 0,12  | 0,16   | 0,15   | 0,17  | 0,18  | 0,20   | 0,20   |
| H8      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,16  | 0,16  | 0,18   | 0,18   |
| H14     | 0,09  | 0,10  | 0,12   | 0,13   | 0,12  | 0,14  | 0,15   | 0,17   |
| H på O6 | 0,20  | 0,20  | 0,21   | 0,21   | 0,24  | 0,24  | 0,24   | 0,24   |
| H1      | 0,10  | 0,10  | 0,12   | 0,12   | 0,14  | 0,15  | 0,16   | 0,16   |
| H2      | 0,11  | 0,11  | 0,14   | 0,14   | 0,16  | 0,16  | 0,18   | 0,18   |
| H på O3 | 0,22  | 0,22  | 0,22   | 0,22   | 0,25  | 0,25  | 0,25   | 0,25   |
| H9      | 0,09  | 0,09  | 0,15   | 0,15   | 0,12  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,10  | 0,10  | 0,14   | 0,14   | 0,13  | 0,13  | 0,16   | 0,17   |
| H15     | 0,11  | 0,10  | 0,13   | 0,12   | 0,14  | 0,13  | 0,16   | 0,14   |
| H16     | 0,08  | 0,09  | 0,12   | 0,12   | 0,10  | 0,12  | 0,14   | 0,14   |
| H16     | 0,09  | 0,09  | 0,14   | 0,14   | 0,11  | 0,11  | 0,16   | 0,16   |
| H15     | 0,09  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,11  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,07  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,09  | 0,11  | 0,17   | 0,18   |
| Met-H   | 0,09  | 0,09  | 0,15   | 0,15   | 0,10  | 0,10  | 0,15   | 0,16   |
| Met-H   | 0,09  | 0,05  | 0,15   | 0,14   | 0,10  | 0,06  | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | 0,05  | 0,10  | 0,14   | 0,15   | 0,06  | 0,11  | 0,15   | 0,15   |
| H+      | -     | -     | 0,13   | 0,14   | -     | -     | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

Gruppe 1: 3syn 6g<sup>+</sup>

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,14  | 0,14  | 0,15   | 0,15   | 0,21  | 0,20  | 0,22   | 0,22   |
| C6      | 0,23  | 0,23  | 0,24   | 0,24   | 0,32  | 0,32  | 0,32   | 0,32   |
| C7      | -0,04 | -0,04 | 0,02   | 0,01   | -0,06 | -0,05 | 0,01   | 0,01   |
| C8      | -0,08 | -0,09 | -0,09  | -0,08  | -0,10 | -0,11 | -0,13  | -0,12  |
| C14     | 0,07  | 0,05  | 0,06   | 0,07   | 0,10  | 0,07  | 0,09   | 0,09   |
| C13     | 0,09  | 0,12  | 0,11   | 0,12   | -0,02 | 0,04  | 0,01   | 0,03   |
| O6      | -0,15 | -0,15 | -0,12  | -0,12  | -0,20 | -0,20 | -0,16  | -0,16  |
| C4      | 0,14  | 0,14  | 0,14   | 0,14   | 0,17  | 0,17  | 0,17   | 0,16   |
| Et-O    | -0,35 | -0,35 | -0,33  | -0,33  | -0,44 | -0,44 | -0,41  | -0,41  |
| C1      | -0,07 | -0,06 | -0,04  | -0,04  | -0,04 | -0,04 | -0,01  | -0,01  |
| C2      | -0,04 | -0,04 | 0,01   | 0,01   | -0,04 | -0,04 | 0,01   | 0,01   |
| C3      | 0,10  | 0,10  | 0,11   | 0,11   | 0,15  | 0,14  | 0,16   | 0,16   |
| O3      | -0,07 | -0,07 | -0,03  | -0,03  | -0,11 | -0,11 | -0,08  | -0,08  |
| C9      | 0,09  | 0,08  | 0,08   | 0,08   | 0,11  | 0,10  | 0,10   | 0,09   |
| C10     | 0,01  | 0,02  | 0,06   | 0,04   | 0,04  | 0,06  | 0,10   | 0,09   |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,01 | -0,02 | -0,04  | -0,04  |
| C12     | 0,01  | 0,01  | 0,01   | 0,00   | -0,02 | -0,03 | -0,02  | -0,04  |
| C16     | -0,01 | -0,03 | 0,04   | 0,04   | 0,04  | 0,01  | 0,08   | 0,08   |
| C15     | 0,06  | 0,07  | 0,16   | 0,15   | 0,08  | 0,10  | 0,17   | 0,17   |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,20   | 0,21   | -0,24 | -0,24 | 0,18   | 0,19   |
| Met-C   | 0,03  | 0,03  | 0,22   | 0,22   | 0,06  | 0,06  | 0,24   | 0,24   |

**MULLIKEN ATOM LADNING**  
**Gruppe 2: 3syn 6anti**

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,06  | 0,05  | 0,04   | 0,04   | 0,10  | 0,09  | 0,09   | 0,08   |
| C6      | 0,12  | 0,12  | 0,10   | 0,10   | 0,18  | 0,18  | 0,16   | 0,16   |
| C7      | -0,16 | -0,15 | -0,12  | -0,12  | -0,23 | -0,23 | -0,17  | -0,18  |
| C8      | -0,19 | -0,20 | -0,22  | -0,22  | -0,26 | -0,27 | -0,30  | -0,30  |
| C14     | -0,02 | -0,05 | -0,07  | -0,06  | -0,03 | -0,08 | -0,07  | -0,08  |
| C13     | 0,08  | 0,11  | 0,10   | 0,11   | -0,03 | 0,03  | 0,00   | 0,02   |
| O6      | -0,33 | -0,33 | -0,31  | -0,31  | -0,40 | -0,39 | -0,38  | -0,38  |
| C4      | 0,14  | 0,14  | 0,14   | 0,14   | 0,17  | 0,17  | 0,17   | 0,17   |
| Et-O    | -0,31 | -0,31 | -0,29  | -0,29  | -0,39 | -0,39 | -0,36  | -0,36  |
| C1      | -0,17 | -0,16 | -0,16  | -0,16  | -0,19 | -0,19 | -0,18  | -0,18  |
| C2      | -0,15 | -0,15 | -0,13  | -0,13  | -0,20 | -0,20 | -0,17  | -0,18  |
| C3      | 0,10  | 0,10  | 0,11   | 0,11   | 0,15  | 0,15  | 0,16   | 0,16   |
| O3      | -0,29 | -0,29 | -0,26  | -0,26  | -0,37 | -0,36 | -0,33  | -0,33  |
| C9      | 0,00  | 0,00  | -0,07  | -0,07  | -0,01 | -0,02 | -0,08  | -0,08  |
| C10     | -0,21 | -0,19 | -0,21  | -0,22  | -0,23 | -0,20 | -0,22  | -0,22  |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,01 | -0,02 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,00  | 0,00  | 0,01   | 0,00   | -0,02 | -0,03 | -0,03  | -0,04  |
| C16     | -0,17 | -0,20 | -0,22  | -0,22  | -0,17 | -0,22 | -0,22  | -0,23  |
| C15     | -0,10 | -0,11 | -0,16  | -0,17  | -0,12 | -0,13 | -0,17  | -0,19  |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,08   | 0,07   | -0,24 | -0,24 | 0,04   | 0,04   |
| Met-C   | -0,21 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  |
| H5      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,15   |
| H6      | 0,07  | 0,07  | 0,09   | 0,09   | 0,09  | 0,09  | 0,11   | 0,11   |
| H7      | 0,11  | 0,11  | 0,14   | 0,14   | 0,16  | 0,16  | 0,19   | 0,19   |
| H8      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,16  | 0,16  | 0,18   | 0,17   |
| H14     | 0,08  | 0,10  | 0,12   | 0,13   | 0,12  | 0,14  | 0,15   | 0,16   |
| H på O6 | 0,19  | 0,19  | 0,21   | 0,21   | 0,22  | 0,22  | 0,23   | 0,23   |
| H1      | 0,09  | 0,09  | 0,12   | 0,12   | 0,14  | 0,14  | 0,16   | 0,16   |
| H2      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,14   | 0,16  | 0,16  | 0,18   | 0,18   |
| H på O3 | 0,22  | 0,22  | 0,23   | 0,23   | 0,25  | 0,25  | 0,26   | 0,26   |
| H9      | 0,09  | 0,08  | 0,15   | 0,15   | 0,12  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,10  | 0,10  | 0,14   | 0,14   | 0,13  | 0,13  | 0,16   | 0,16   |
| H15     | 0,11  | 0,10  | 0,13   | 0,12   | 0,14  | 0,13  | 0,16   | 0,14   |
| H16     | 0,08  | 0,09  | 0,12   | 0,12   | 0,10  | 0,12  | 0,14   | 0,14   |
| H16     | 0,09  | 0,08  | 0,14   | 0,14   | 0,11  | 0,11  | 0,16   | 0,17   |
| H15     | 0,09  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,11  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,07  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,09  | 0,11  | 0,17   | 0,18   |
| Met-H   | 0,09  | 0,09  | 0,15   | 0,15   | 0,10  | 0,10  | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | 0,09  | 0,05  | 0,15   | 0,15   | 0,10  | 0,06  | 0,15   | 0,16   |
| Met-H   | 0,05  | 0,10  | 0,15   | 0,14   | 0,06  | 0,11  | 0,15   | 0,14   |
| H+      | -     | -     | 0,13   | 0,14   | -     | -     | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

## Gruppe 2: 3syn 6anti

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,14  | 0,16  | 0,17   | 0,17   | 0,23  | 0,22  | 0,24   | 0,23   |
| C6      | 0,23  | 0,19  | 0,19   | 0,19   | 0,27  | 0,27  | 0,27   | 0,27   |
| C7      | -0,04 | -0,05 | 0,02   | 0,02   | -0,07 | -0,06 | 0,01   | 0,01   |
| C8      | -0,08 | -0,09 | -0,09  | -0,09  | -0,10 | -0,11 | -0,13  | -0,12  |
| C14     | 0,07  | 0,05  | 0,05   | 0,06   | 0,10  | 0,06  | 0,08   | 0,08   |
| C13     | 0,09  | 0,11  | 0,10   | 0,11   | -0,03 | 0,03  | 0,00   | 0,02   |
| O6      | -0,15 | -0,13 | -0,10  | -0,10  | -0,18 | -0,18 | -0,15  | -0,15  |
| C4      | 0,14  | 0,14  | 0,14   | 0,14   | 0,17  | 0,17  | 0,17   | 0,17   |
| Et-O    | -0,35 | -0,31 | -0,29  | -0,29  | -0,39 | -0,39 | -0,36  | -0,36  |
| C1      | -0,07 | -0,07 | -0,05  | -0,05  | -0,05 | -0,04 | -0,02  | -0,02  |
| C2      | -0,04 | -0,04 | 0,01   | 0,01   | -0,04 | -0,04 | 0,01   | 0,00   |
| C3      | 0,10  | 0,10  | 0,11   | 0,11   | 0,15  | 0,15  | 0,16   | 0,16   |
| O3      | -0,07 | -0,07 | -0,03  | -0,03  | -0,11 | -0,11 | -0,07  | -0,07  |
| C9      | 0,09  | 0,09  | 0,08   | 0,08   | 0,11  | 0,10  | 0,10   | 0,09   |
| C10     | 0,01  | 0,01  | 0,06   | 0,04   | 0,03  | 0,05  | 0,09   | 0,08   |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,01 | -0,02 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,01  | 0,00  | 0,01   | 0,00   | -0,02 | -0,03 | -0,03  | -0,04  |
| C16     | -0,01 | -0,03 | 0,04   | 0,04   | 0,05  | 0,01  | 0,08   | 0,08   |
| C15     | 0,06  | 0,07  | 0,16   | 0,15   | 0,08  | 0,10  | 0,17   | 0,17   |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,20   | 0,21   | -0,24 | -0,24 | 0,18   | 0,19   |
| Met-C   | 0,03  | 0,03  | 0,22   | 0,21   | 0,05  | 0,06  | 0,24   | 0,23   |

**MULLIKEN ATOM LADNING**  
**Gruppe 3: 3syn 6g**

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | -     | -     | 0,01   | 0,01   | -     | -     | 0,10   | 0,10   |
| C6      | -     | -     | 0,09   | 0,08   | -     | -     | 0,12   | 0,12   |
| C7      | -     | -     | -0,09  | -0,10  | -     | -     | -0,14  | -0,14  |
| C8      | -     | -     | -0,22  | -0,22  | -     | -     | -0,30  | -0,30  |
| C14     | -     | -     | -0,07  | -0,07  | -     | -     | -0,08  | -0,09  |
| C13     | -     | -     | 0,12   | 0,13   | -     | -     | 0,00   | 0,01   |
| O6      | -     | -     | -0,31  | -0,31  | -     | -     | -0,39  | -0,39  |
| C4      | -     | -     | 0,14   | 0,15   | -     | -     | 0,15   | 0,17   |
| Et-O    | -     | -     | -0,31  | -0,31  | -     | -     | -0,41  | -0,41  |
| C1      | -     | -     | -0,16  | -0,15  | -     | -     | -0,16  | -0,17  |
| C2      | -     | -     | -0,13  | -0,13  | -     | -     | -0,17  | -0,17  |
| C3      | -     | -     | 0,11   | 0,11   | -     | -     | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -     | -     | -0,25  | -0,25  | -     | -     | -0,33  | -0,33  |
| C9      | -     | -     | -0,08  | -0,07  | -     | -     | -0,09  | -0,10  |
| C10     | -     | -     | -0,20  | -0,21  | -     | -     | -0,20  | -0,19  |
| C11     | -     | -     | -0,01  | 0,00   | -     | -     | -0,03  | -0,04  |
| C12     | -     | -     | 0,01   | 0,00   | -     | -     | -0,02  | -0,03  |
| C16     | -     | -     | -0,22  | -0,23  | -     | -     | -0,24  | -0,25  |
| C15     | -     | -     | -0,16  | -0,17  | -     | -     | -0,18  | -0,19  |
| N       | -     | -     | 0,07   | 0,07   | -     | -     | 0,03   | 0,03   |
| Met-C   | -     | -     | -0,22  | -0,22  | -     | -     | -0,22  | -0,22  |
| H5      | -     | -     | 0,13   | 0,13   | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| H6      | -     | -     | 0,11   | 0,11   | -     | -     | 0,13   | 0,14   |
| H7      | -     | -     | 0,15   | 0,15   | -     | -     | 0,19   | 0,19   |
| H8      | -     | -     | 0,13   | 0,13   | -     | -     | 0,18   | 0,18   |
| H14     | -     | -     | 0,12   | 0,13   | -     | -     | 0,16   | 0,17   |
| H på O6 | -     | -     | 0,20   | 0,20   | -     | -     | 0,23   | 0,23   |
| H1      | -     | -     | 0,12   | 0,12   | -     | -     | 0,16   | 0,16   |
| H2      | -     | -     | 0,14   | 0,14   | -     | -     | 0,18   | 0,18   |
| H på O3 | -     | -     | 0,22   | 0,22   | -     | -     | 0,25   | 0,25   |
| H9      | -     | -     | 0,15   | 0,15   | -     | -     | 0,18   | 0,17   |
| H15     | -     | -     | 0,14   | 0,14   | -     | -     | 0,16   | 0,16   |
| H15     | -     | -     | 0,13   | 0,12   | -     | -     | 0,15   | 0,14   |
| H16     | -     | -     | 0,12   | 0,12   | -     | -     | 0,14   | 0,14   |
| H16     | -     | -     | 0,14   | 0,14   | -     | -     | 0,16   | 0,17   |
| H15     | -     | -     | 0,16   | 0,16   | -     | -     | 0,18   | 0,18   |
| H15     | -     | -     | 0,16   | 0,16   | -     | -     | 0,18   | 0,19   |
| Met-H   | -     | -     | 0,15   | 0,15   | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | -     | -     | 0,15   | 0,15   | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | -     | -     | 0,15   | 0,14   | -     | -     | 0,16   | 0,15   |
| H+      | -     | -     | 0,13   | 0,14   | -     | -     | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

## Gruppe 3: 3syn 6g

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | -     | -     | 0,14   | 0,14   | -     | -     | 0,25   | 0,25   |
| C6      | -     | -     | 0,20   | 0,19   | -     | -     | 0,26   | 0,26   |
| C7      | -     | -     | 0,06   | 0,06   | -     | -     | 0,05   | 0,05   |
| C8      | -     | -     | -0,09  | -0,09  | -     | -     | -0,12  | -0,12  |
| C14     | -     | -     | 0,05   | 0,06   | -     | -     | 0,08   | 0,08   |
| C13     | -     | -     | 0,12   | 0,13   | -     | -     | 0,00   | 0,01   |
| O6      | -     | -     | -0,10  | -0,11  | -     | -     | -0,16  | -0,16  |
| C4      | -     | -     | 0,14   | 0,15   | -     | -     | 0,15   | 0,17   |
| Et-O    | -     | -     | -0,31  | -0,31  | -     | -     | -0,41  | -0,41  |
| C1      | -     | -     | -0,04  | -0,04  | -     | -     | 0,00   | 0,00   |
| C2      | -     | -     | 0,01   | 0,01   | -     | -     | 0,01   | 0,01   |
| C3      | -     | -     | 0,11   | 0,11   | -     | -     | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -     | -     | -0,03  | -0,03  | -     | -     | -0,08  | -0,08  |
| C9      | -     | -     | 0,08   | 0,08   | -     | -     | 0,09   | 0,08   |
| C10     | -     | -     | 0,06   | 0,05   | -     | -     | 0,11   | 0,10   |
| C11     | -     | -     | -0,01  | 0,00   | -     | -     | -0,03  | -0,04  |
| C12     | -     | -     | 0,01   | 0,00   | -     | -     | -0,02  | -0,03  |
| C16     | -     | -     | 0,03   | 0,03   | -     | -     | 0,07   | 0,06   |
| C15     | -     | -     | 0,16   | 0,15   | -     | -     | 0,17   | 0,17   |
| N       | -     | -     | 0,20   | 0,21   | -     | -     | 0,17   | 0,19   |
| Met-C   | -     | -     | 0,22   | 0,21   | -     | -     | 0,24   | 0,23   |



**MULLIKEN ATOM LADNING**  
**Gruppe 4: 3anti 6g<sup>+</sup>**

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,02  | 0,02  | 0,01   | 0,01   | 0,07  | 0,06  | 0,06   | 0,05   |
| C6      | 0,12  | 0,12  | 0,11   | 0,11   | 0,18  | 0,19  | 0,17   | 0,17   |
| C7      | -0,16 | -0,16 | -0,13  | -0,13  | -0,22 | -0,22 | -0,18  | -0,19  |
| C8      | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,27 | -0,28 | -0,31  | -0,30  |
| C14     | -0,02 | -0,05 | -0,06  | -0,06  | -0,02 | -0,07 | -0,06  | -0,08  |
| C13     | 0,09  | 0,13  | 0,11   | 0,12   | -0,01 | 0,04  | 0,01   | 0,03   |
| O6      | -0,36 | -0,36 | -0,33  | -0,33  | -0,44 | -0,44 | -0,41  | -0,41  |
| C4      | 0,18  | 0,18  | 0,18   | 0,18   | 0,21  | 0,21  | 0,22   | 0,21   |
| Et-O    | -0,31 | -0,31 | -0,29  | -0,29  | -0,39 | -0,39 | -0,37  | -0,37  |
| C1      | -0,17 | -0,17 | -0,17  | -0,17  | -0,20 | -0,19 | -0,18  | -0,18  |
| C2      | -0,19 | -0,19 | -0,17  | -0,17  | -0,24 | -0,24 | -0,22  | -0,23  |
| C3      | 0,11  | 0,11  | 0,12   | 0,12   | 0,16  | 0,16  | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -0,28 | -0,28 | -0,25  | -0,25  | -0,35 | -0,35 | -0,32  | -0,32  |
| C9      | 0,00  | 0,00  | -0,07  | -0,07  | -0,02 | -0,02 | -0,08  | -0,09  |
| C10     | -0,20 | -0,19 | -0,21  | -0,22  | -0,22 | -0,20 | -0,22  | -0,22  |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,00   | -0,01 | -0,03 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,01  | 0,00  | 0,01   | 0,00   | -0,01 | -0,03 | -0,03  | -0,04  |
| C16     | -0,18 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,17 | -0,22 | -0,22  | -0,23  |
| C15     | -0,10 | -0,11 | -0,16  | -0,17  | -0,12 | -0,13 | -0,17  | -0,19  |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,08   | 0,07   | -0,24 | -0,24 | 0,04   | 0,04   |
| Met-C   | -0,21 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  |
| H5      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,14  | 0,13  | 0,16   | 0,15   |
| H6      | 0,11  | 0,11  | 0,12   | 0,12   | 0,13  | 0,13  | 0,14   | 0,14   |
| H7      | 0,12  | 0,12  | 0,15   | 0,15   | 0,17  | 0,17  | 0,20   | 0,20   |
| H8      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,16  | 0,16  | 0,18   | 0,18   |
| H14     | 0,09  | 0,10  | 0,12   | 0,13   | 0,12  | 0,14  | 0,15   | 0,17   |
| H på O6 | 0,21  | 0,21  | 0,21   | 0,21   | 0,25  | 0,25  | 0,25   | 0,25   |
| H1      | 0,10  | 0,10  | 0,12   | 0,12   | 0,14  | 0,15  | 0,16   | 0,16   |
| H2      | 0,08  | 0,08  | 0,11   | 0,11   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,15   |
| H på O3 | 0,21  | 0,21  | 0,22   | 0,22   | 0,24  | 0,24  | 0,25   | 0,25   |
| H9      | 0,09  | 0,08  | 0,15   | 0,15   | 0,12  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,10  | 0,10  | 0,14   | 0,14   | 0,13  | 0,13  | 0,16   | 0,16   |
| H15     | 0,11  | 0,10  | 0,13   | 0,12   | 0,14  | 0,13  | 0,16   | 0,14   |
| H16     | 0,08  | 0,09  | 0,12   | 0,12   | 0,10  | 0,12  | 0,14   | 0,14   |
| H16     | 0,09  | 0,09  | 0,14   | 0,14   | 0,12  | 0,11  | 0,16   | 0,17   |
| H15     | 0,09  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,11  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,07  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,09  | 0,11  | 0,17   | 0,18   |
| Met-H   | 0,09  | 0,09  | 0,14   | 0,15   | 0,10  | 0,10  | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | 0,09  | 0,05  | 0,15   | 0,15   | 0,10  | 0,06  | 0,15   | 0,16   |
| Met-H   | 0,05  | 0,10  | 0,15   | 0,14   | 0,06  | 0,10  | 0,15   | 0,15   |
| H+      |       |       | 0,13   | 0,14   |       |       | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

Gruppe 4: 3anti 6g<sup>+</sup>

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,13  | 0,13  | 0,14   | 0,14   | 0,20  | 0,19  | 0,21   | 0,21   |
| C6      | 0,23  | 0,23  | 0,24   | 0,24   | 0,31  | 0,31  | 0,32   | 0,32   |
| C7      | -0,04 | -0,04 | 0,02   | 0,02   | -0,05 | -0,05 | 0,02   | 0,01   |
| C8      | -0,09 | -0,10 | -0,09  | -0,09  | -0,11 | -0,12 | -0,14  | -0,13  |
| C14     | 0,07  | 0,05  | 0,06   | 0,07   | 0,10  | 0,07  | 0,09   | 0,09   |
| C13     | 0,09  | 0,13  | 0,11   | 0,12   | -0,01 | 0,04  | 0,01   | 0,03   |
| O6      | -0,15 | -0,15 | -0,11  | -0,11  | -0,19 | -0,19 | -0,16  | -0,16  |
| C4      | 0,18  | 0,18  | 0,18   | 0,18   | 0,21  | 0,21  | 0,22   | 0,21   |
| Et-O    | -0,31 | -0,31 | -0,29  | -0,29  | -0,39 | -0,39 | -0,37  | -0,37  |
| C1      | -0,08 | -0,07 | -0,05  | -0,05  | -0,05 | -0,05 | -0,02  | -0,02  |
| C2      | -0,11 | -0,11 | -0,06  | -0,06  | -0,11 | -0,11 | -0,07  | -0,07  |
| C3      | 0,11  | 0,11  | 0,12   | 0,12   | 0,16  | 0,16  | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -0,07 | -0,07 | -0,03  | -0,03  | -0,11 | -0,11 | -0,08  | -0,08  |
| C9      | 0,09  | 0,08  | 0,08   | 0,08   | 0,11  | 0,10  | 0,10   | 0,09   |
| C10     | 0,00  | 0,01  | 0,06   | 0,04   | 0,04  | 0,06  | 0,10   | 0,09   |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,00   | -0,01 | -0,03 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,01  | 0,00  | 0,01   | 0,00   | -0,01 | -0,03 | -0,03  | -0,04  |
| C16     | -0,01 | -0,03 | 0,04   | 0,04   | 0,04  | 0,01  | 0,08   | 0,08   |
| C15     | 0,06  | 0,07  | 0,15   | 0,15   | 0,08  | 0,10  | 0,17   | 0,17   |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,20   | 0,21   | -0,24 | -0,24 | 0,18   | 0,19   |
| Met-C   | 0,03  | 0,03  | 0,22   | 0,22   | 0,05  | 0,06  | 0,24   | 0,24   |

**MULLIKEN ATOM LADNING**  
**Gruppe 5: 3anti 6anti**

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,05  | 0,05  | 0,04   | 0,04   | 0,09  | 0,08  | 0,08   | 0,08   |
| C6      | 0,12  | 0,12  | 0,10   | 0,10   | 0,18  | 0,18  | 0,16   | 0,16   |
| C7      | -0,16 | -0,15 | -0,12  | -0,12  | -0,23 | -0,22 | -0,17  | -0,18  |
| C8      | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,27 | -0,27 | -0,31  | -0,30  |
| C14     | -0,02 | -0,05 | -0,07  | -0,06  | -0,03 | -0,08 | -0,07  | -0,08  |
| C13     | 0,08  | 0,12  | 0,10   | 0,11   | -0,03 | 0,03  | 0,00   | 0,02   |
| O6      | -0,32 | -0,32 | -0,30  | -0,30  | -0,39 | -0,39 | -0,37  | -0,37  |
| C4      | 0,18  | 0,18  | 0,18   | 0,18   | 0,21  | 0,21  | 0,22   | 0,22   |
| Et-O    | -0,26 | -0,26 | -0,24  | -0,24  | -0,33 | -0,33 | -0,31  | -0,31  |
| C1      | -0,18 | -0,18 | -0,17  | -0,17  | -0,20 | -0,20 | -0,19  | -0,19  |
| C2      | -0,19 | -0,19 | -0,17  | -0,17  | -0,24 | -0,24 | -0,22  | -0,23  |
| C3      | 0,11  | 0,11  | 0,12   | 0,12   | 0,16  | 0,16  | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -0,27 | -0,27 | -0,25  | -0,25  | -0,34 | -0,34 | -0,32  | -0,31  |
| C9      | 0,00  | 0,00  | -0,07  | -0,07  | -0,01 | -0,02 | -0,08  | -0,08  |
| C10     | -0,21 | -0,19 | -0,21  | -0,22  | -0,23 | -0,20 | -0,23  | -0,22  |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,02 | -0,03 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,00  | -0,01 | 0,00   | -0,01  | -0,02 | -0,04 | -0,03  | -0,05  |
| C16     | -0,18 | -0,20 | -0,22  | -0,22  | -0,17 | -0,22 | -0,22  | -0,23  |
| C15     | -0,10 | -0,11 | -0,16  | -0,17  | -0,12 | -0,13 | -0,17  | -0,19  |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,08   | 0,07   | -0,24 | -0,24 | 0,04   | 0,04   |
| Met-C   | -0,21 | -0,21 | -0,22  | -0,22  | -0,20 | -0,21 | -0,22  | -0,22  |
| H5      | 0,10  | 0,10  | 0,13   | 0,13   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,15   |
| H6      | 0,07  | 0,07  | 0,08   | 0,08   | 0,09  | 0,09  | 0,10   | 0,10   |
| H7      | 0,11  | 0,11  | 0,14   | 0,14   | 0,16  | 0,16  | 0,19   | 0,19   |
| H8      | 0,11  | 0,11  | 0,13   | 0,13   | 0,16  | 0,16  | 0,17   | 0,17   |
| H14     | 0,08  | 0,10  | 0,12   | 0,13   | 0,12  | 0,14  | 0,15   | 0,16   |
| H på O6 | 0,19  | 0,19  | 0,21   | 0,21   | 0,21  | 0,21  | 0,23   | 0,23   |
| H1      | 0,09  | 0,09  | 0,11   | 0,11   | 0,14  | 0,14  | 0,16   | 0,16   |
| H2      | 0,08  | 0,08  | 0,11   | 0,11   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,15   |
| H på O3 | 0,20  | 0,20  | 0,22   | 0,22   | 0,23  | 0,23  | 0,24   | 0,24   |
| H9      | 0,09  | 0,08  | 0,15   | 0,15   | 0,12  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,10  | 0,10  | 0,14   | 0,14   | 0,13  | 0,13  | 0,16   | 0,16   |
| H15     | 0,10  | 0,10  | 0,13   | 0,12   | 0,13  | 0,13  | 0,15   | 0,14   |
| H16     | 0,08  | 0,09  | 0,12   | 0,12   | 0,10  | 0,12  | 0,14   | 0,14   |
| H16     | 0,09  | 0,08  | 0,14   | 0,14   | 0,12  | 0,11  | 0,16   | 0,17   |
| H15     | 0,09  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,11  | 0,12  | 0,18   | 0,18   |
| H15     | 0,07  | 0,09  | 0,16   | 0,16   | 0,09  | 0,11  | 0,17   | 0,18   |
| Met-H   | 0,09  | 0,09  | 0,14   | 0,15   | 0,10  | 0,10  | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | 0,09  | 0,05  | 0,15   | 0,15   | 0,10  | 0,06  | 0,15   | 0,16   |
| Met-H   | 0,05  | 0,09  | 0,15   | 0,14   | 0,06  | 0,10  | 0,15   | 0,15   |
| H+      |       |       | 0,13   | 0,14   |       |       | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

## Gruppe 5: 3anti 6anti

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | 0,16  | 0,15  | 0,17   | 0,16   | 0,22  | 0,21  | 0,23   | 0,23   |
| C6      | 0,19  | 0,19  | 0,19   | 0,18   | 0,27  | 0,27  | 0,26   | 0,26   |
| C7      | -0,05 | -0,05 | 0,02   | 0,02   | -0,07 | -0,06 | 0,01   | 0,01   |
| C8      | -0,09 | -0,10 | -0,10  | -0,09  | -0,11 | -0,11 | -0,13  | -0,13  |
| C14     | 0,06  | 0,05  | 0,05   | 0,06   | 0,10  | 0,06  | 0,08   | 0,08   |
| C13     | 0,08  | 0,12  | 0,10   | 0,11   | -0,03 | 0,03  | 0,00   | 0,02   |
| O6      | -0,13 | -0,13 | -0,09  | -0,09  | -0,17 | -0,17 | -0,14  | -0,14  |
| C4      | 0,18  | 0,18  | 0,18   | 0,18   | 0,21  | 0,21  | 0,22   | 0,22   |
| Et-O    | -0,26 | -0,26 | -0,24  | -0,24  | -0,33 | -0,33 | -0,31  | -0,31  |
| C1      | -0,09 | -0,08 | -0,06  | -0,06  | -0,06 | -0,06 | -0,03  | -0,03  |
| C2      | -0,11 | -0,11 | -0,06  | -0,06  | -0,12 | -0,12 | -0,07  | -0,07  |
| C3      | 0,11  | 0,11  | 0,12   | 0,12   | 0,16  | 0,16  | 0,17   | 0,17   |
| O3      | -0,07 | -0,07 | -0,03  | -0,03  | -0,11 | -0,11 | -0,07  | -0,07  |
| C9      | 0,09  | 0,08  | 0,08   | 0,08   | 0,11  | 0,10  | 0,10   | 0,09   |
| C10     | 0,00  | 0,01  | 0,06   | 0,04   | 0,03  | 0,05  | 0,09   | 0,08   |
| C11     | 0,03  | 0,02  | 0,00   | 0,01   | -0,02 | -0,03 | -0,05  | -0,04  |
| C12     | 0,00  | -0,01 | 0,00   | -0,01  | -0,02 | -0,04 | -0,03  | -0,05  |
| C16     | -0,01 | -0,03 | 0,04   | 0,04   | 0,05  | 0,01  | 0,08   | 0,08   |
| C15     | 0,06  | 0,07  | 0,15   | 0,15   | 0,08  | 0,10  | 0,17   | 0,17   |
| N       | -0,18 | -0,18 | 0,20   | 0,21   | -0,24 | -0,24 | 0,18   | 0,19   |
| Met-C   | 0,03  | 0,03  | 0,22   | 0,21   | 0,05  | 0,06  | 0,24   | 0,23   |

**MULLIKEN ATOM LADNING**  
**Gruppe 6: 3anti 6g<sup>-</sup>**

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | -     | -     | 0,03   | -      | -     | -     | 0,10   | 0,10   |
| C6      | -     | -     | 0,08   | -      | -     | -     | 0,13   | 0,13   |
| C7      | -     | -     | -0,09  | -      | -     | -     | -0,14  | -0,14  |
| C8      | -     | -     | -0,22  | -      | -     | -     | -0,30  | -0,30  |
| C14     | -     | -     | -0,08  | -      | -     | -     | -0,08  | -0,09  |
| C13     | -     | -     | 0,11   | -      | -     | -     | 0,00   | 0,01   |
| O6      | -     | -     | -0,33  | -      | -     | -     | -0,40  | -0,40  |
| C4      | -     | -     | 0,18   | -      | -     | -     | 0,18   | 0,19   |
| Et-O    | -     | -     | -0,30  | -      | -     | -     | -0,38  | -0,38  |
| C1      | -     | -     | -0,16  | -      | -     | -     | -0,17  | -0,17  |
| C2      | -     | -     | -0,17  | -      | -     | -     | -0,23  | -0,23  |
| C3      | -     | -     | 0,12   | -      | -     | -     | 0,19   | 0,19   |
| O3      | -     | -     | -0,26  | -      | -     | -     | -0,33  | -0,33  |
| C9      | -     | -     | -0,08  | -      | -     | -     | -0,09  | -0,10  |
| C10     | -     | -     | -0,19  | -      | -     | -     | -0,20  | -0,19  |
| C11     | -     | -     | -0,01  | -      | -     | -     | -0,03  | -0,04  |
| C12     | -     | -     | 0,02   | -      | -     | -     | 0,00   | -0,01  |
| C16     | -     | -     | -0,23  | -      | -     | -     | -0,24  | -0,25  |
| C15     | -     | -     | -0,16  | -      | -     | -     | -0,18  | -0,19  |
| N       | -     | -     | 0,07   | -      | -     | -     | 0,03   | 0,03   |
| Met-C   | -     | -     | -0,22  | -      | -     | -     | -0,22  | -0,22  |
| H5      | -     | -     | 0,13   | -      | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| H6      | -     | -     | 0,11   | -      | -     | -     | 0,13   | 0,13   |
| H7      | -     | -     | 0,15   | -      | -     | -     | 0,19   | 0,19   |
| H8      | -     | -     | 0,13   | -      | -     | -     | 0,18   | 0,18   |
| H14     | -     | -     | 0,13   | -      | -     | -     | 0,16   | 0,17   |
| H på O6 | -     | -     | 0,22   | -      | -     | -     | 0,25   | 0,25   |
| H1      | -     | -     | 0,12   | -      | -     | -     | 0,16   | 0,16   |
| H2      | -     | -     | 0,11   | -      | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| H på O3 | -     | -     | 0,22   | -      | -     | -     | 0,25   | 0,25   |
| H9      | -     | -     | 0,15   | -      | -     | -     | 0,18   | 0,17   |
| H15     | -     | -     | 0,14   | -      | -     | -     | 0,16   | 0,16   |
| H15     | -     | -     | 0,13   | -      | -     | -     | 0,15   | 0,14   |
| H16     | -     | -     | 0,12   | -      | -     | -     | 0,14   | 0,14   |
| H16     | -     | -     | 0,14   | -      | -     | -     | 0,16   | 0,17   |
| H15     | -     | -     | 0,16   | -      | -     | -     | 0,18   | 0,18   |
| H15     | -     | -     | 0,16   | -      | -     | -     | 0,17   | 0,19   |
| Met-H   | -     | -     | 0,14   | -      | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | -     | -     | 0,15   | -      | -     | -     | 0,15   | 0,15   |
| Met-H   | -     | -     | 0,15   | -      | -     | -     | 0,16   | 0,15   |
| H+      | -     | -     | 0,13   | -      | -     | -     | 0,14   | 0,15   |

## Mulliken ladning med hydrogenene summert sammen med de store atomene

## Gruppe 6: 3anti 6g

| Atomnr. | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|---------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|         | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| C5      | -     | -     | 0,16   | -      | -     | -     | 0,25   | 0,25   |
| C6      | -     | -     | 0,19   | -      | -     | -     | 0,26   | 0,26   |
| C7      | -     | -     | 0,06   | -      | -     | -     | 0,05   | 0,05   |
| C8      | -     | -     | -0,09  | -      | -     | -     | -0,12  | -0,12  |
| C14     | -     | -     | 0,05   | -      | -     | -     | 0,08   | 0,08   |
| C13     | -     | -     | 0,11   | -      | -     | -     | 0,00   | 0,01   |
| O6      | -     | -     | -0,12  | -      | -     | -     | -0,16  | -0,16  |
| C4      | -     | -     | 0,18   | -      | -     | -     | 0,18   | 0,19   |
| Et-O    | -     | -     | -0,30  | -      | -     | -     | -0,38  | -0,38  |
| C1      | -     | -     | -0,04  | -      | -     | -     | -0,01  | -0,01  |
| C2      | -     | -     | -0,06  | -      | -     | -     | -0,07  | -0,07  |
| C3      | -     | -     | 0,12   | -      | -     | -     | 0,19   | 0,19   |
| O3      | -     | -     | -0,03  | -      | -     | -     | -0,08  | -0,08  |
| C9      | -     | -     | 0,07   | -      | -     | -     | 0,09   | 0,08   |
| C10     | -     | -     | 0,07   | -      | -     | -     | 0,11   | 0,10   |
| C11     | -     | -     | -0,01  | -      | -     | -     | -0,03  | -0,04  |
| C12     | -     | -     | 0,02   | -      | -     | -     | 0,00   | -0,01  |
| C16     | -     | -     | 0,03   | -      | -     | -     | 0,07   | 0,07   |
| C15     | -     | -     | 0,15   | -      | -     | -     | 0,17   | 0,17   |
| N       | -     | -     | 0,20   | -      | -     | -     | 0,17   | 0,18   |
| Met-C   | -     | -     | 0,22   | -      | -     | -     | 0,23   | 0,23   |

## VEDLEGG 6: Vinkler

**VINKLER**  
**Gruppe 1: 3syn 6g<sup>+</sup>**

| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | 114,4 | 114,3 | 114,4  | 113,9  | 112,8 | 113,0 | 113,9  | 113,4  |
| metC-N-C15 | 112,5 | 114,1 | 112,1  | 112,9  | 110,9 | 112,4 | 111,7  | 112,4  |
| C9-N-C15   | 113,6 | 112,4 | 112,3  | 112,3  | 112,1 | 111,3 | 112,0  | 112,1  |
| H-O3-C3    | 108,7 | 108,9 | 110,3  | 110,3  | 107,4 | 107,4 | 108,9  | 108,9  |
| C4-C3-O3   | 123,2 | 123,3 | 123,9  | 123,9  | 123,3 | 123,3 | 124,0  | 124,0  |
| C2-C3-O3   | 120,1 | 120,1 | 119,6  | 119,6  | 120,2 | 120,2 | 119,6  | 119,6  |
| C2-C3-C4   | 116,6 | 116,6 | 116,4  | 116,5  | 116,5 | 116,5 | 116,3  | 116,4  |
| C3-C4-EtO  | 125,6 | 125,6 | 126,0  | 125,9  | 125,4 | 125,4 | 125,8  | 125,8  |
| C4-EtO-C5  | 107,1 | 107,0 | 107,6  | 107,5  | 105,9 | 105,9 | 106,5  | 106,4  |
| EtO-C5-C6  | 109,6 | 109,5 | 110,2  | 110,2  | 108,9 | 108,9 | 109,6  | 109,7  |
| EtO-C4-C12 | 112,8 | 112,8 | 112,7  | 112,7  | 113,0 | 113,0 | 112,9  | 112,9  |
| EtO-C5-C13 | 106,3 | 106,3 | 105,9  | 105,9  | 106,8 | 106,8 | 106,3  | 106,3  |
| H-O6-C6    | 106,7 | 106,9 | 108,3  | 108,3  | 105,1 | 105,1 | 106,7  | 106,7  |
| C5-C6-O6   | 111,1 | 111,1 | 111,4  | 111,4  | 110,6 | 110,6 | 111,0  | 111,0  |
| C7-C6-O6   | 113,0 | 113,0 | 113,4  | 113,4  | 113,2 | 113,2 | 113,6  | 113,6  |
| C5-C6-C7   | 113,4 | 113,4 | 113,4  | 113,5  | 112,6 | 112,7 | 112,8  | 112,8  |
| H+-N-MetC  | -     | -     | 106,4  | 106,1  | -     | -     | 107,0  | 106,6  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,4  | 104,9  | -     | -     | 105,0  | 105,2  |
| H+-N-C15   | -     | -     | 106,3  | 105,9  | -     | -     | 106,6  | 106,4  |

**Gruppe 2: 3syn 6anti**

| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | 114,3 | 114,4 | 114,4  | 113,9  | 112,8 | 113,1 | 113,8  | 113,4  |
| metC-N-C15 | 112,5 | 114,1 | 112,1  | 112,8  | 111,0 | 112,4 | 111,7  | 112,4  |
| C9-N-C15   | 113,5 | 112,4 | 112,4  | 112,4  | 111,9 | 111,2 | 112,1  | 112,2  |
| H-O3-C3    | 108,3 | 108,3 | 109,9  | 109,9  | 106,9 | 106,9 | 108,5  | 108,5  |
| C4-C3-O3   | 122,8 | 122,8 | 123,6  | 123,5  | 122,8 | 122,8 | 123,6  | 123,6  |
| C2-C3-O3   | 120,5 | 120,5 | 120,0  | 120,0  | 120,6 | 120,6 | 120,1  | 120,0  |
| C2-C3-C4   | 116,7 | 116,7 | 116,5  | 116,5  | 116,6 | 116,6 | 116,4  | 116,4  |
| C3-C4-EtO  | 125,3 | 125,3 | 125,9  | 125,8  | 125,0 | 125,0 | 125,6  | 125,6  |
| C4-EtO-C5  | 107,2 | 107,2 | 107,6  | 107,5  | 106,1 | 106,1 | 106,5  | 106,4  |
| EtO-C5-C6  | 111,8 | 111,8 | 111,9  | 112,0  | 111,2 | 111,2 | 111,5  | 111,5  |
| EtO-C4-C12 | 113,1 | 113,1 | 112,8  | 112,8  | 113,4 | 113,4 | 113,1  | 113,1  |
| EtO-C5-C13 | 106,5 | 106,6 | 105,8  | 105,8  | 107,1 | 107,2 | 106,3  | 106,3  |
| H-O6-C6    | 108,4 | 108,4 | 109,5  | 109,4  | 107,3 | 107,3 | 108,3  | 108,3  |
| C5-C6-O6   | 108,3 | 108,3 | 107,7  | 107,7  | 107,9 | 107,9 | 107,1  | 107,1  |
| C7-C6-O6   | 113,8 | 113,9 | 113,6  | 113,6  | 114,1 | 114,1 | 114,0  | 114,0  |
| C5-C6-C7   | 113,3 | 113,3 | 113,7  | 113,7  | 112,3 | 112,4 | 113,0  | 113,0  |
| H+-N-MetC  | -     | -     | 106,5  | 106,2  | -     | -     | 107,0  | 106,6  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,4  | 104,8  | -     | -     | 105,1  | 105,2  |



|          |   |   |       |       |   |   |       |       |
|----------|---|---|-------|-------|---|---|-------|-------|
| H+-N-C15 | - | - | 106,3 | 105,9 | - | - | 106,5 | 106,4 |
|----------|---|---|-------|-------|---|---|-------|-------|

### Gruppe 3: 3syn 6g<sup>-</sup>

| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | -     | -     | 114,3  | 113,5  | -     | -     | 113,5  | 112,8  |
| metC-N-C15 | -     | -     | 112,0  | 112,6  | -     | -     | 110,9  | 111,8  |
| C9-N-C15   | -     | -     | 112,7  | 112,9  | -     | -     | 113,8  | 113,4  |
| H-O3-C3    | -     | -     | 110,0  | 110,0  | -     | -     | 108,7  | 108,7  |
| C4-C3-O3   | -     | -     | 123,9  | 124,0  | -     | -     | 124,2  | 124,2  |
| C2-C3-O3   | -     | -     | 119,7  | 119,6  | -     | -     | 119,6  | 119,6  |
| C2-C3-C4   | -     | -     | 116,4  | 116,4  | -     | -     | 116,2  | 116,2  |
| C3-C4-EtO  | -     | -     | 126,6  | 126,8  | -     | -     | 127,4  | 127,4  |
| C4-EtO-C5  | -     | -     | 106,7  | 106,4  | -     | -     | 103,9  | 103,9  |
| EtO-C5-C6  | -     | -     | 111,2  | 110,9  | -     | -     | 109,2  | 109,3  |
| EtO-C4-C12 | -     | -     | 112,2  | 112,1  | -     | -     | 111,9  | 111,8  |
| EtO-C5-C13 | -     | -     | 105,0  | 104,7  | -     | -     | 103,7  | 103,8  |
| H-O6-C6    | -     | -     | 110,1  | 110,0  | -     | -     | 108,1  | 108,1  |
| C5-C6-O6   | -     | -     | 112,9  | 112,9  | -     | -     | 112,8  | 112,7  |
| C7-C6-O6   | -     | -     | 106,9  | 106,7  | -     | -     | 105,0  | 105,2  |
| C5-C6-C7   | -     | -     | 114,8  | 115,0  | -     | -     | 115,2  | 115,3  |
| H+-N-MetC  | -     | -     | 106,5  | 106,1  | -     | -     | 107,1  | 106,7  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,3  | 104,9  | -     | -     | 104,5  | 105,3  |
| H+-N-C15   | -     | -     | 106,3  | 105,8  | -     | -     | 106,3  | 106,3  |

### Gruppe 4: 3anti 6g<sup>+</sup>

| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | 114,4 | 114,3 | 114,4  | 113,8  | 112,8 | 112,9 | 113,9  | 113,4  |
| metC-N-C15 | 112,5 | 114,1 | 112,2  | 112,8  | 111,0 | 112,3 | 111,7  | 112,3  |
| C9-N-C15   | 113,6 | 112,4 | 112,3  | 112,4  | 112,1 | 111,3 | 112,1  | 112,2  |
| H-O3-C3    | 109,1 | 109,1 | 110,5  | 110,5  | 107,9 | 107,9 | 109,2  | 109,2  |
| C4-C3-O3   | 119,3 | 119,3 | 118,8  | 118,7  | 119,1 | 119,1 | 118,5  | 118,5  |
| C2-C3-O3   | 124,1 | 124,1 | 124,8  | 124,8  | 124,4 | 124,4 | 125,1  | 125,1  |
| C2-C3-C4   | 116,6 | 116,6 | 116,4  | 116,5  | 116,5 | 116,5 | 116,3  | 116,3  |
| C3-C4-EtO  | 126,5 | 126,4 | 126,5  | 126,5  | 126,3 | 126,3 | 126,4  | 126,4  |
| C4-EtO-C5  | 107,3 | 107,2 | 107,7  | 107,7  | 106,1 | 106,0 | 106,6  | 106,5  |
| EtO-C5-C6  | 109,2 | 109,2 | 109,8  | 109,8  | 108,6 | 108,6 | 109,3  | 109,3  |
| EtO-C4-C12 | 112,6 | 112,6 | 112,6  | 112,6  | 112,8 | 112,8 | 112,8  | 112,8  |
| EtO-C5-C13 | 106,3 | 106,3 | 105,9  | 105,8  | 106,7 | 106,7 | 106,2  | 106,2  |
| H-O6-C6    | 106,7 | 106,7 | 108,3  | 108,3  | 105,1 | 105,1 | 106,7  | 106,7  |
| C5-C6-O6   | 110,9 | 110,9 | 111,2  | 111,3  | 110,5 | 110,5 | 110,8  | 110,8  |
| C7-C6-O6   | 112,9 | 112,9 | 113,2  | 113,2  | 113,0 | 113,1 | 113,3  | 113,4  |
| C5-C6-C7   | 113,4 | 113,4 | 113,5  | 113,5  | 112,8 | 112,8 | 113,0  | 112,9  |
| H+-N-metC  | -     | -     | 106,5  | 106,1  | -     | -     | 107,1  | 106,6  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,4  | 104,9  | -     | -     | 105,0  | 105,3  |
| H+-N-C15   | -     | -     | 106,3  | 105,9  | -     | -     | 106,5  | 106,4  |

## Gruppe 5: 3anti 6anti

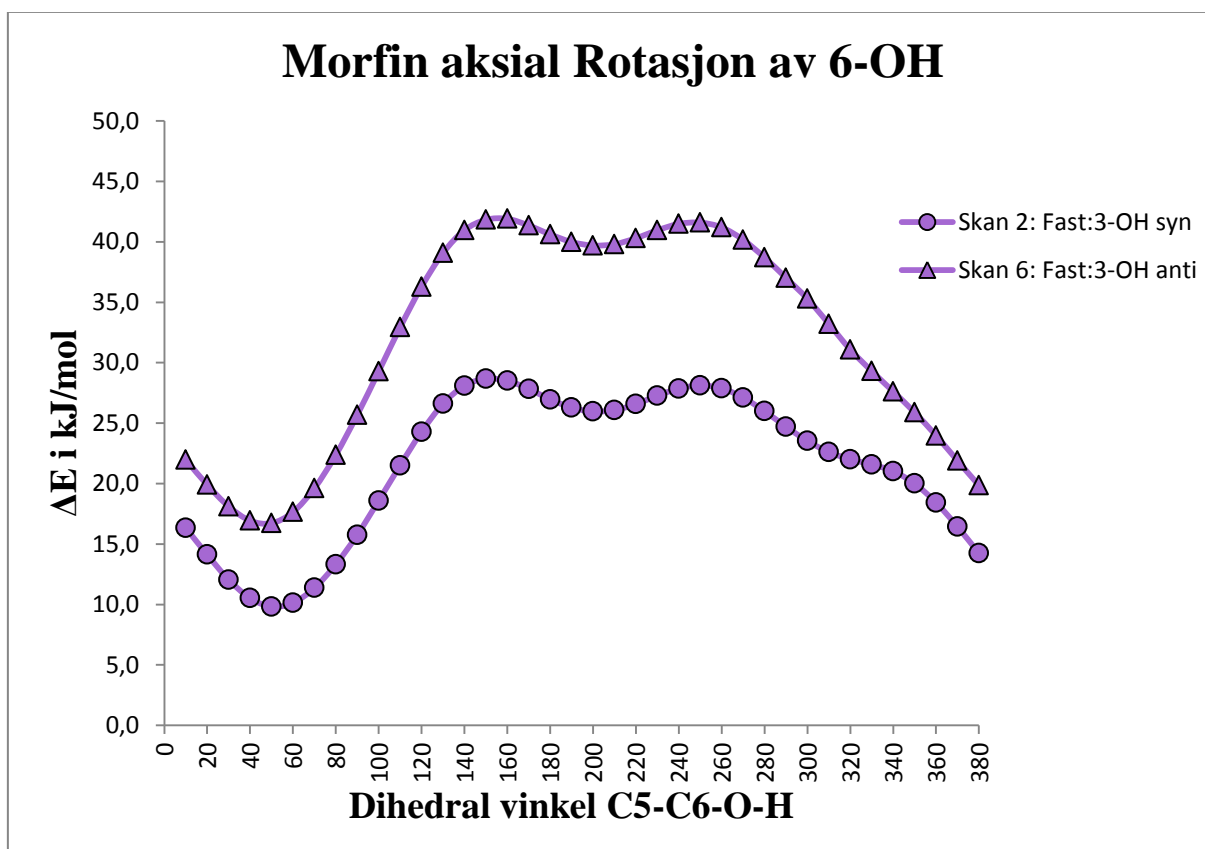
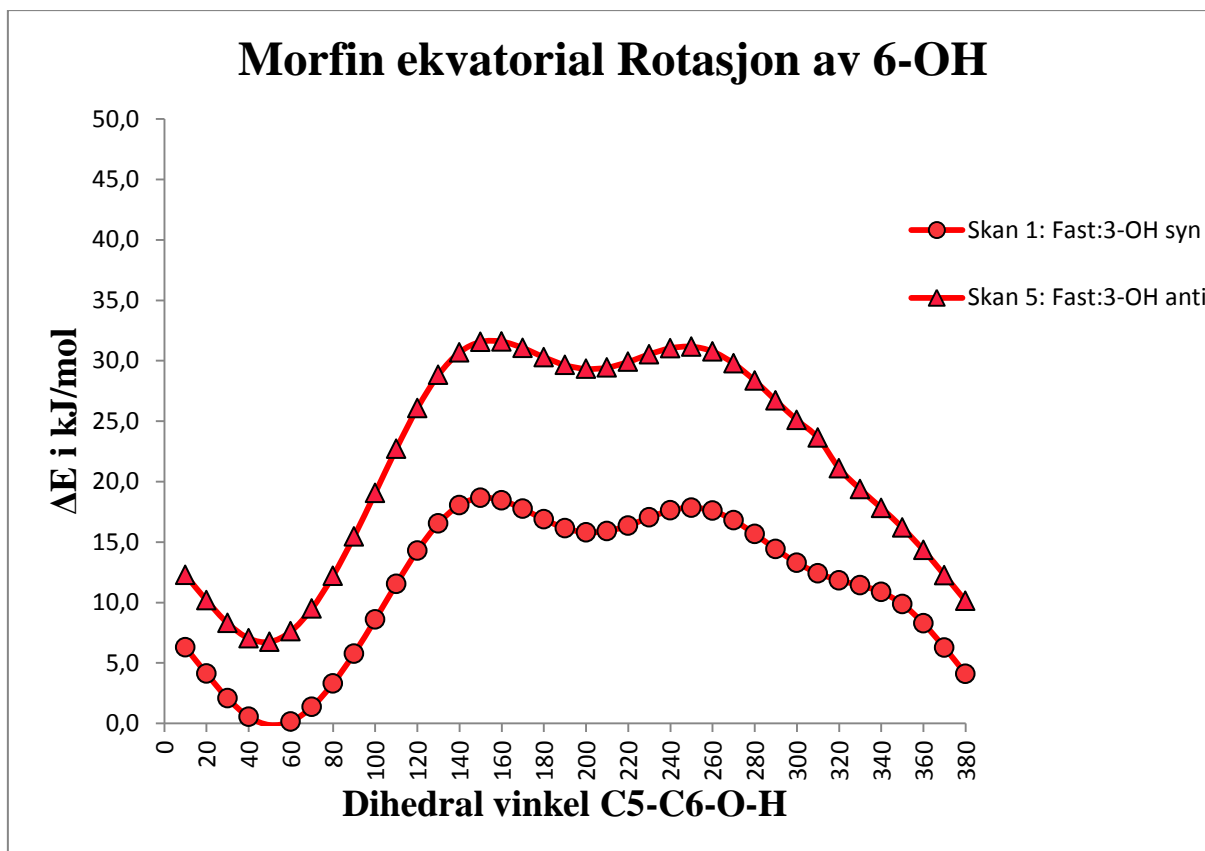
| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | 114,3 | 114,3 | 114,4  | 113,8  | 112,8 | 113,0 | 113,8  | 113,4  |
| metC-N-C15 | 112,5 | 114,1 | 112,1  | 112,8  | 111,0 | 112,4 | 111,7  | 112,3  |
| C9-N-C15   | 113,5 | 112,3 | 112,4  | 112,4  | 111,8 | 111,2 | 112,0  | 112,2  |
| H-O3-C3    | 109,0 | 109,1 | 110,4  | 110,4  | 107,7 | 107,7 | 109,1  | 109,1  |
| C4-C3-O3   | 119,4 | 119,4 | 118,9  | 118,9  | 119,2 | 119,2 | 118,7  | 118,7  |
| C2-C3-O3   | 123,9 | 123,9 | 124,6  | 124,6  | 124,1 | 124,1 | 124,9  | 124,9  |
| C2-C3-C4   | 116,7 | 116,7 | 116,5  | 116,5  | 116,7 | 116,6 | 116,4  | 116,4  |
| C3-C4-EtO  | 126,6 | 126,6 | 126,8  | 126,7  | 126,3 | 126,4 | 126,6  | 126,6  |
| C4-EtO-C5  | 107,6 | 107,6 | 107,9  | 107,9  | 106,6 | 106,5 | 106,9  | 106,8  |
| EtO-C5-C6  | 112,0 | 112,0 | 112,1  | 112,1  | 111,5 | 111,5 | 111,7  | 111,7  |
| EtO-C4-C12 | 112,9 | 112,9 | 112,8  | 112,8  | 113,3 | 113,2 | 113,1  | 113,1  |
| EtO-C5-C13 | 106,7 | 106,7 | 106,0  | 105,9  | 107,3 | 107,3 | 106,6  | 106,5  |
| H-O6-C6    | 108,4 | 108,4 | 109,5  | 109,5  | 107,3 | 107,3 | 108,4  | 108,4  |
| C5-C6-O6   | 108,5 | 108,5 | 107,8  | 107,8  | 108,1 | 108,1 | 107,3  | 107,3  |
| C7-C6-O6   | 113,9 | 113,9 | 113,7  | 113,7  | 114,2 | 114,3 | 114,1  | 114,2  |
| C5-C6-C7   | 113,2 | 113,2 | 113,6  | 113,6  | 112,2 | 112,3 | 112,7  | 112,8  |
| H+-N-metC  | -     | -     | 106,5  | 106,1  | -     | -     | 107,1  | 106,6  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,4  | 104,8  | -     | -     | 105,1  | 105,2  |
| H+-N-C15   | -     | -     | 106,3  | 105,9  | -     | -     | 106,5  | 106,4  |

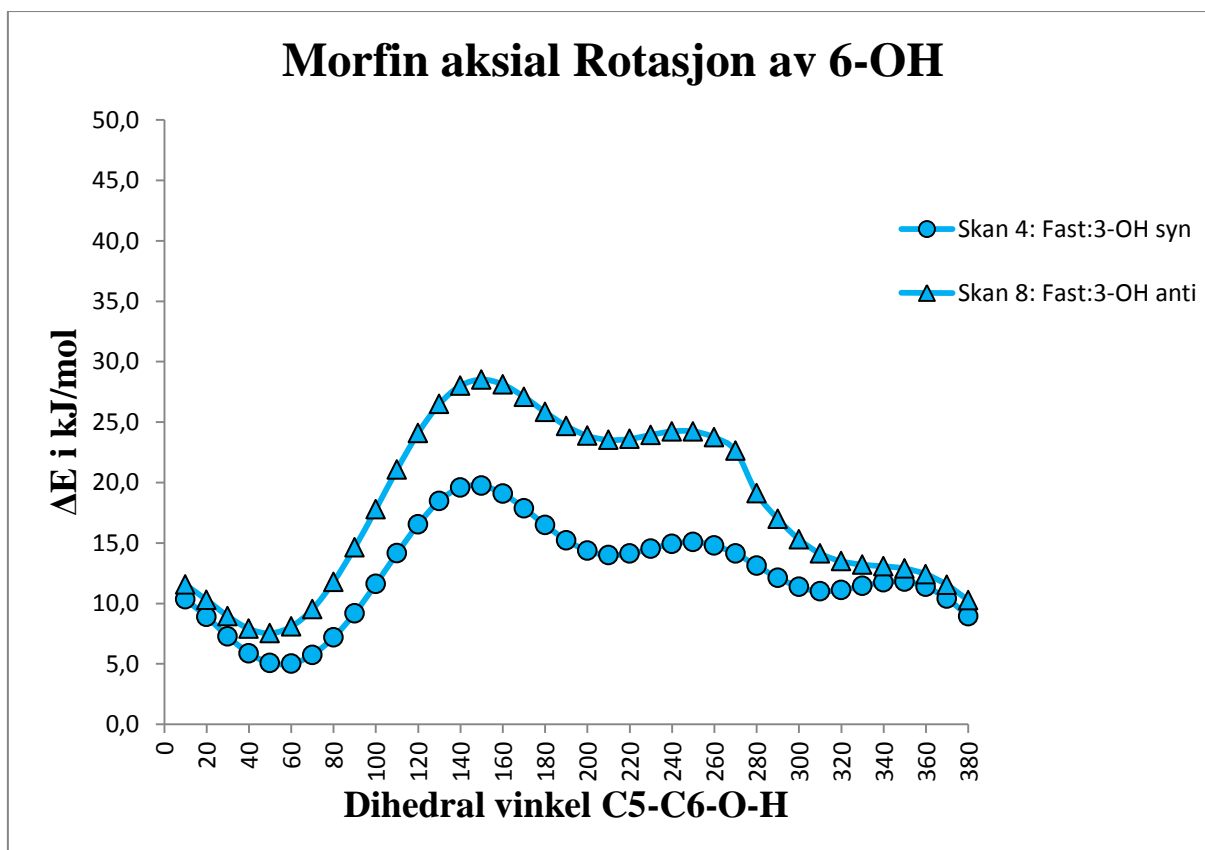
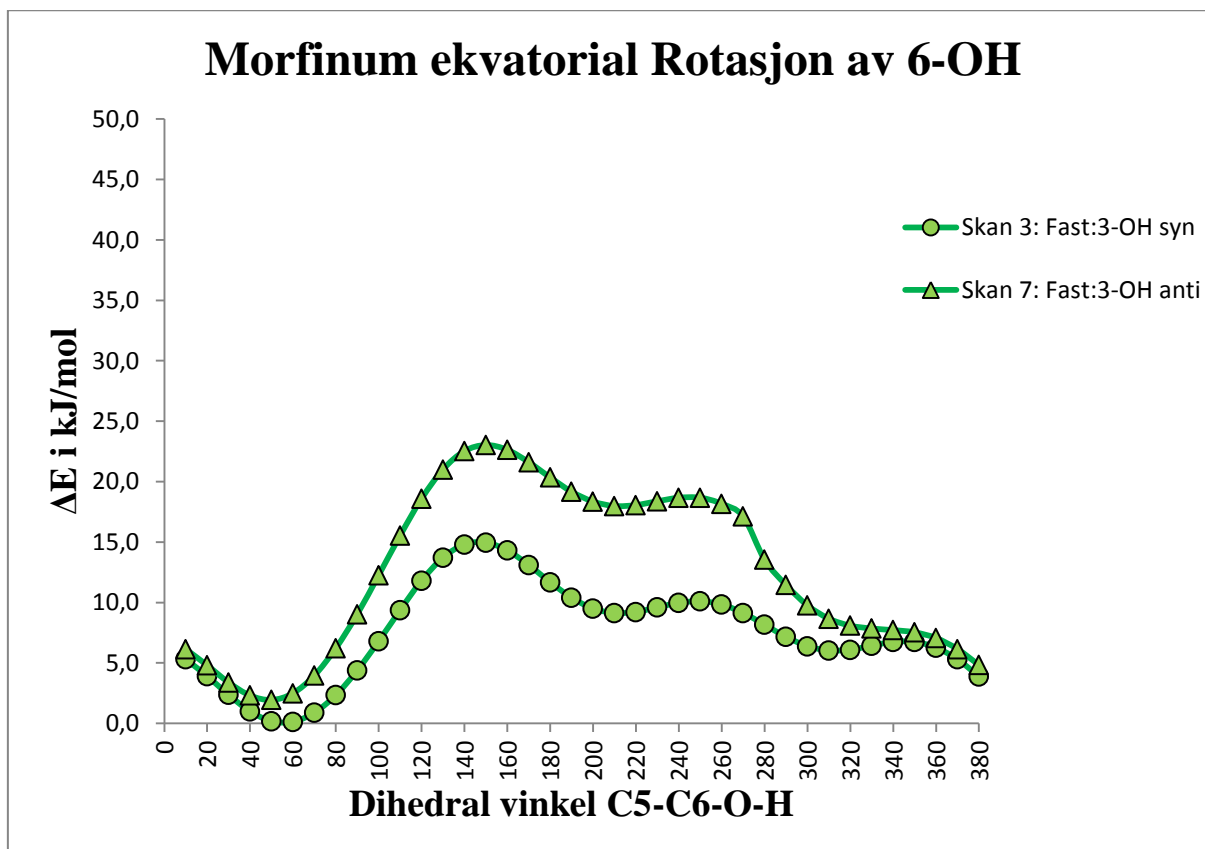
Gruppe 6: 3anti 6g<sup>-</sup>

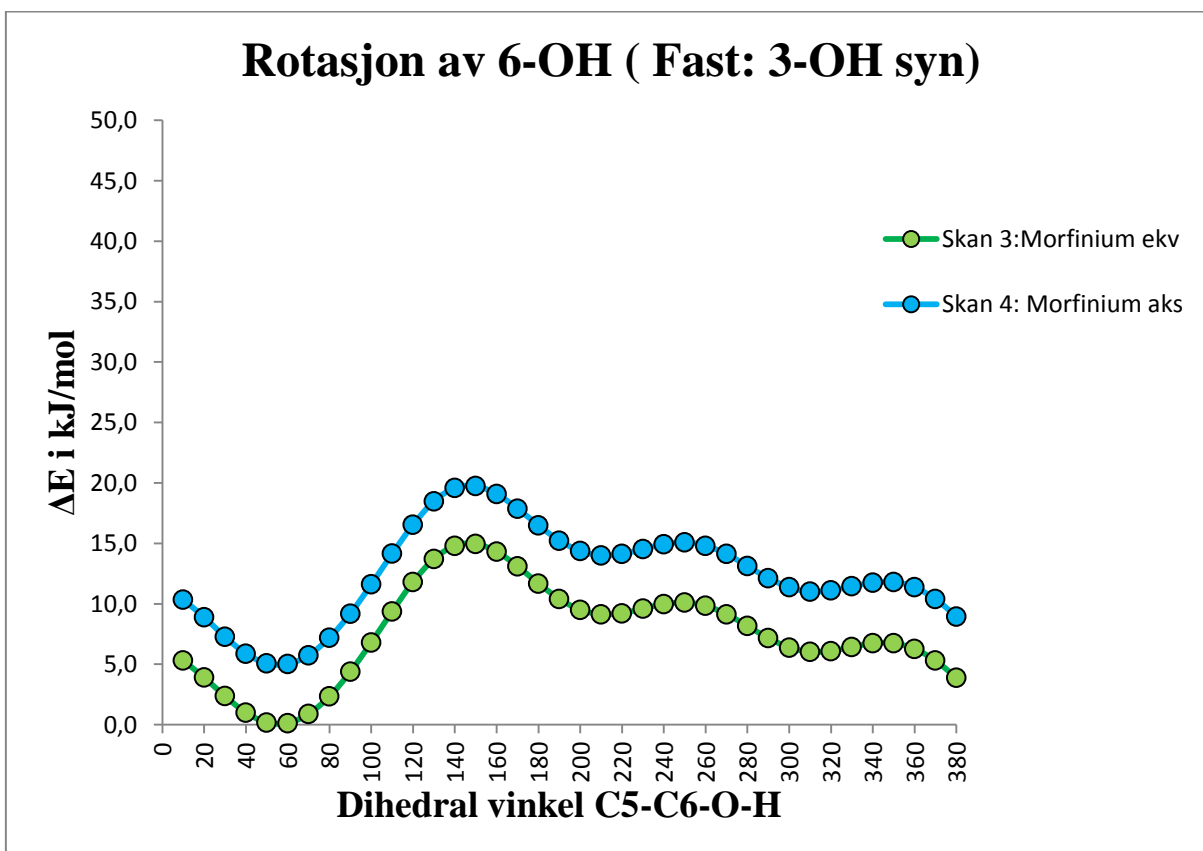
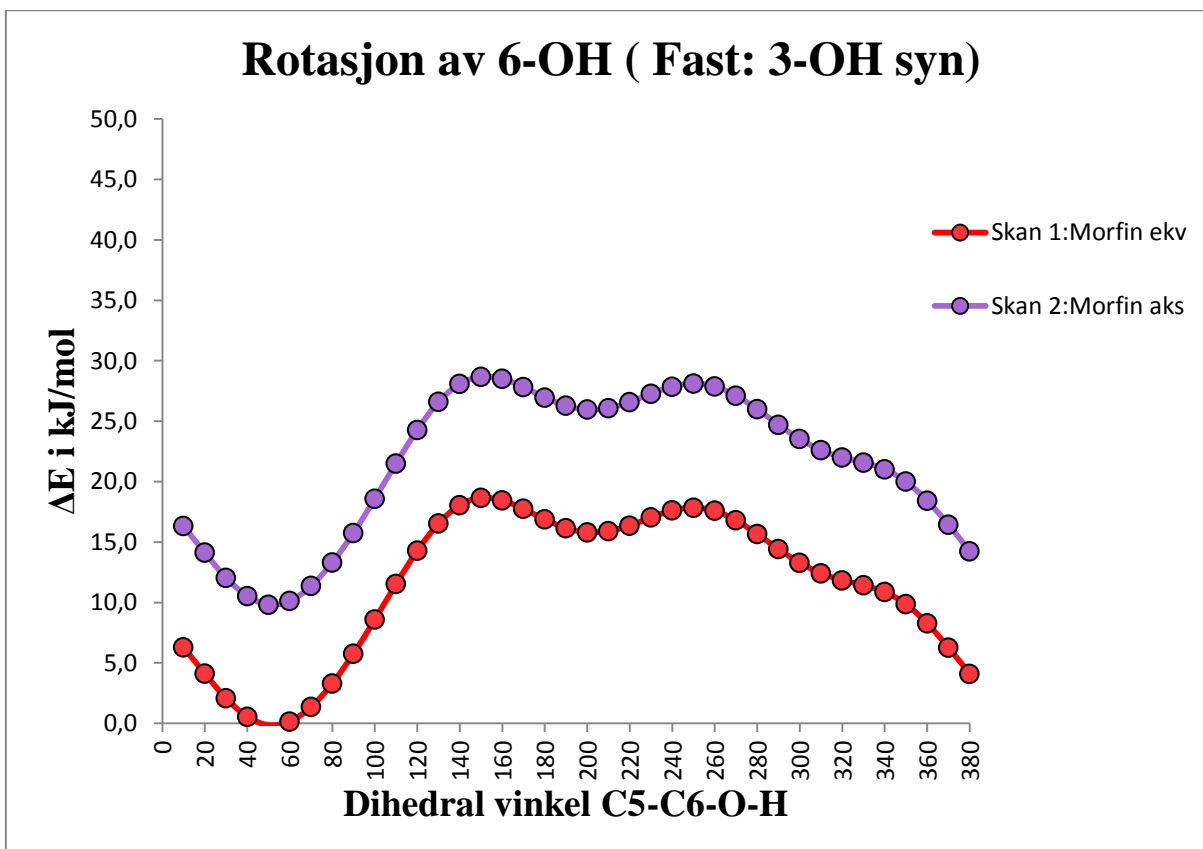
| VINKEL     | B3LYP |       |        |        | MP2   |       |        |        |
|------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|            | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks | M ekv | M aks | M+ ekv | M+ aks |
| metC-N-C9  | -     | -     | 114,2  | -      | -     | -     | 113,4  | 112,8  |
| metC-N-C15 | -     | -     | 111,8  | -      | -     | -     | 111,0  | 111,7  |
| C9-N-C15   | -     | -     | 113,3  | -      | -     | -     | 113,8  | 113,5  |
| H-O3-C3    | -     | -     | 110,5  | -      | -     | -     | 109,2  | 109,2  |
| C4-C3-O3   | -     | -     | 119,0  | -      | -     | -     | 118,8  | 118,8  |
| C2-C3-O3   | -     | -     | 124,7  | -      | -     | -     | 125,0  | 125,0  |
| C2-C3-C4   | -     | -     | 116,3  | -      | -     | -     | 116,2  | 116,2  |
| C3-C4-EtO  | -     | -     | 127,6  | -      | -     | -     | 127,8  | 127,8  |
| C4-EtO-C5  | -     | -     | 106,0  | -      | -     | -     | 103,9  | 103,9  |
| EtO-C5-C6  | -     | -     | 109,7  | -      | -     | -     | 108,6  | 108,7  |
| EtO-C4-C12 | -     | -     | 111,8  | -      | -     | -     | 111,8  | 111,8  |
| EtO-C5-C13 | -     | -     | 104,2  | -      | -     | -     | 103,8  | 103,8  |
| H-O6-C6    | -     | -     | 109,2  | -      | -     | -     | 107,8  | 107,8  |
| C5-C6-O6   | -     | -     | 112,7  | -      | -     | -     | 112,7  | 112,6  |
| C7-C6-O6   | -     | -     | 106,4  | -      | -     | -     | 105,0  | 105,1  |
| C5-C6-C7   | -     | -     | 115,2  | -      | -     | -     | 115,1  | 115,1  |
| H+-N-MetC  | -     | -     | 106,5  | -      | -     | -     | 107,1  | 106,6  |
| H+-N-C9    | -     | -     | 104,0  | -      | -     | -     | 104,5  | 105,4  |
| H+-N-C15   | -     | -     | 106,1  | -      | -     | -     | 106,3  | 106,3  |

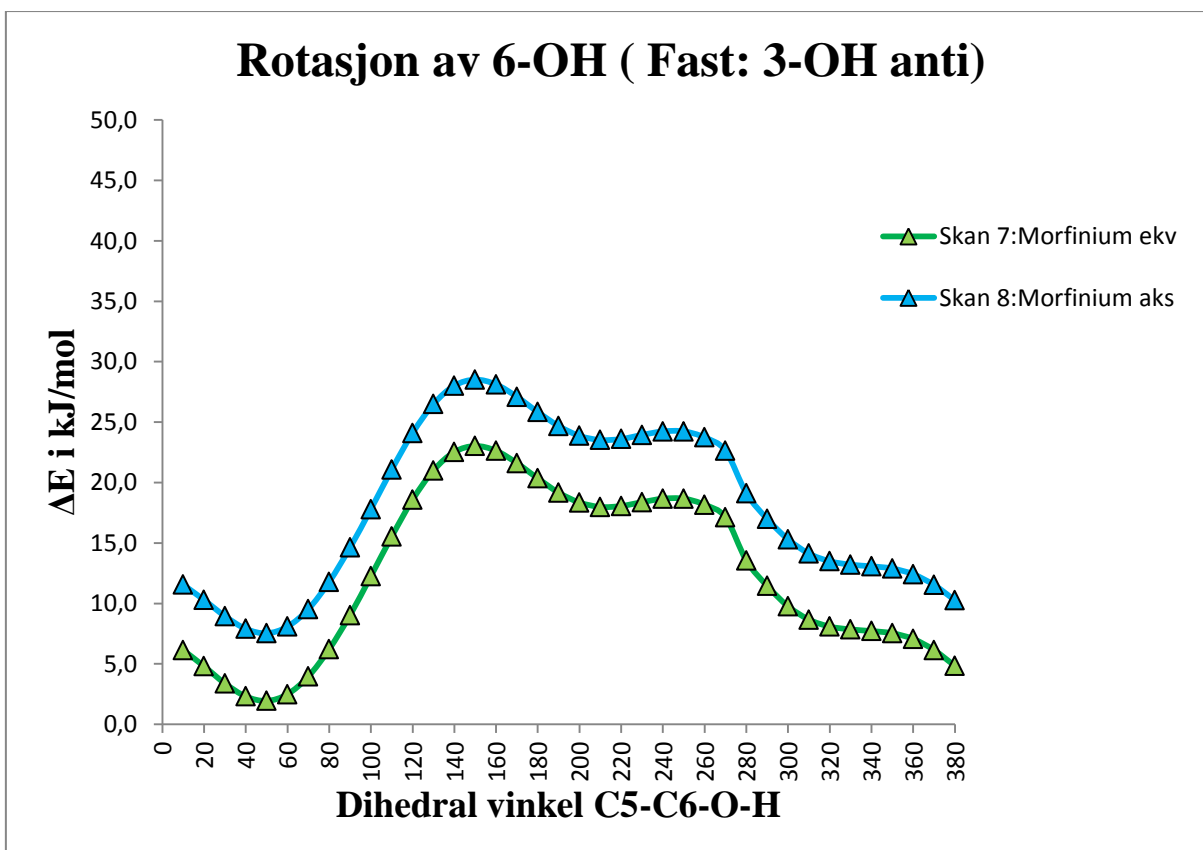
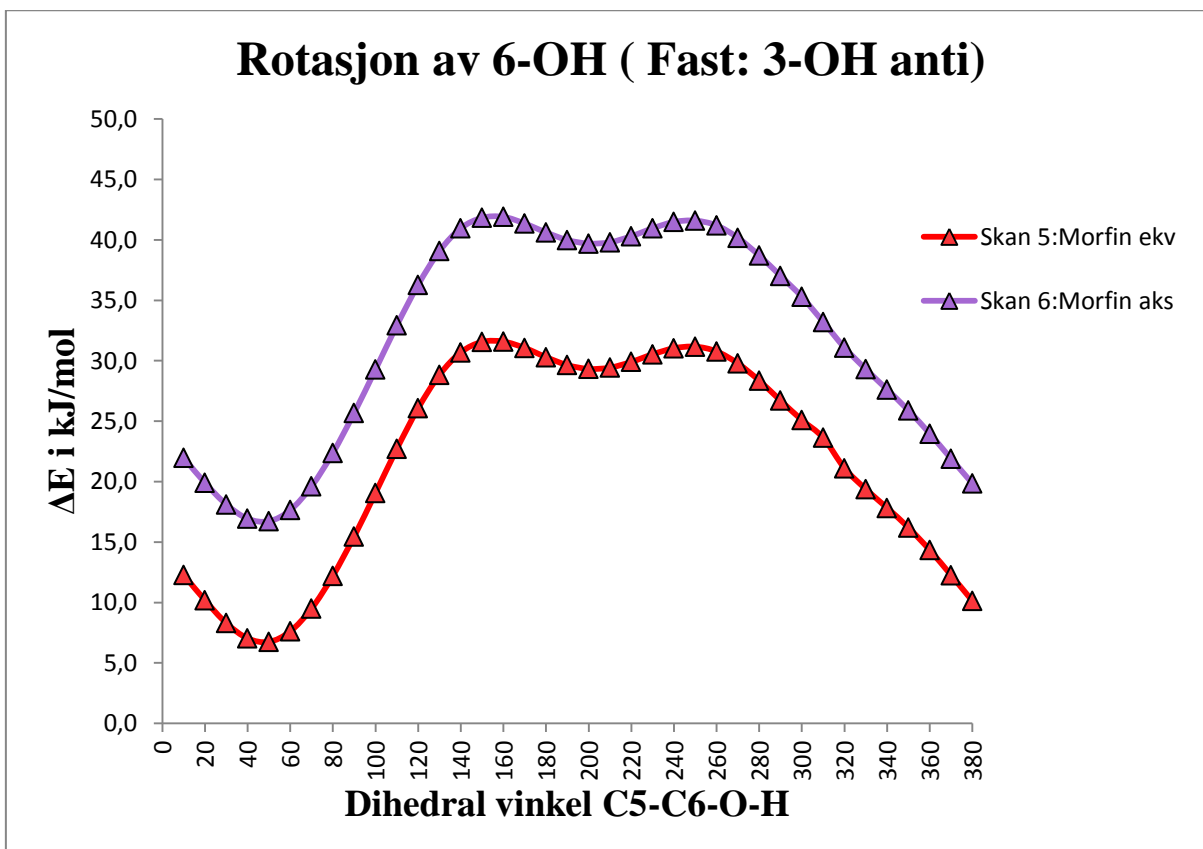
## VEDLEGG 7: Sammenligninger av skanninger

## Sammenligninger av rotasjoner rundt 6-OH









## Sammenligninger av rotasjoner rundt 3-OH

