



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธี MD-ONIOM2 เพื่อการทำนายค่า ^1H -
NMR chemical shifts ของโมเลกุลเอมีนในตัวทำละลาย

โดย ดร. วีรมวล ไวลีขิต และคณะ

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธี MD-ONIOM2 เพื่อการทำนายค่า ^1H -
NMR chemical shifts ของโมเลกุลเอมีนในตัวทำละลาย

1. ดร. วีรพล ไวลิจิต

โครงการจัดตั้งสายวิชาเคมี

คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. รศ. ดร. สุภา หารหนองบัว ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หน้า

Abstract	1
บทคัดย่อ	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	7
Output ที่ได้จากโครงการ	26
Reprint	27

บทคัดย่อ

จากผลการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของเนเวราฟีนในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ถูกต้องด้วยวิธี MD-ONIOM2 งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้คำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของโมเลกุลเอมีนโดยทั่วไปในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธี MD-ONIOM2 สามารถที่จะใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความถูกต้อง

โมเลกุลเอมีนที่ใช้ในงานวิจัยได้แก่ aniline acetamide N-methylaniline และ valerolactam โดยที่ตัวถูกละลายเอมีนจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน เช่น จำนวนโปรตอนที่วงไนโมเลกุลที่สามารถที่จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลาย โดยผลจากการคำนวณได้ถูกเปรียบเทียบกับค่าจริงของ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่ได้จากการทดลอง การคำนวณทางควอนตัมในสถานะแก๊ส และการคำนวณทางควอนตัมแบบ IEFPCM

Keyword: MD-ONIOM2 $^1\text{H-NMR}$ Solvent effect

Abstract

MD-ONIOM2 has been previously used to model nevirapine in the polar solvent DMSO, accurately predicting the ^1H NMR chemical shifts of all the protons, including the acidic amine proton that suffers significant deshielding due to hydrogen bonding. In this work, MD-ONIOM2 is shown to be a more generally applicable model by predicting the NMR shifts of four amines in DMSO solution with acceptable accuracy. The solutes N-methylaniline and valerolactam with a single acidic proton, and aniline and acetamide with two acidic protons were used, and the NMR predictions compared to experimental values. Gasphase models and IEFPCM are shown to not predict the acidic proton shifts well in comparison to MDONIOM2.

Keyword: MD-ONIOM2 ^1H -NMR Solvent effect

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

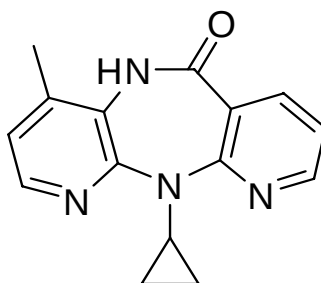
การจำลองแบบโมเลกุลในตัวทำละลายให้มีความถูกต้องและมีประสิทธิภาพ มีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาโครงสร้าง และอิทธิพลของตัวทำละลายในหลาย ๆ ระบบ รวมถึงการศึกษาทางสเปกโทรสโกปีของสารละลาย เช่น NMR แต่เนื่องจากการความซับซ้อนที่มากขึ้นจากการที่มีตัวทำละลาย อาจทำให้ใช้เวลานานในการคำนวณกว่าแบบจำลองในสภาวะก๊าซ และบางครั้งยังไม่สามารถจำลองแบบได้อย่างเหมือนจริง

ในปัจจุบันการคำนวณ NMR chemical shifts จากแบบจำลองโมเลกุลมีประโยชน์ทั้งช่วยในการวิเคราะห์ผลการทดลอง และตรวจสอบโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ในแบบจำลอง จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามจะสร้าง ^1H -NMR predictor ขึ้น เช่น Williams และกลุ่มผู้ร่วมงานได้เสนอ Advanced Chemistry Development (ACD) ในปี 2001 เพื่อใช้เป็น ^1H -NMR predictor จากการสร้างฐานข้อมูล จากสารประกอบประมาณ 175,000 ชนิด แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหากโมเลกุลตัวอย่างมีโครงสร้างที่ไม่ใกล้เคียงกับโมเลกุลในฐานข้อมูล และอยู่ในตัวทำละลายต่างชนิดไป และในปี 2004 Abraham ได้เสนอวิธีการใช้ CHARGE program และฐานข้อมูลจากการทดลองเพื่อใช้ในการคาดเดา ^1H -NMR chemical shifts ได้อย่างถูกต้องมากขึ้นเพราะมีการเพิ่มอิทธิพลของตัวทำละลายเข้าไปด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็ยังไม่สามารถให้ค่า chemical shifts ที่ถูกต้องสำหรับ acidic proton ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ระเบียบวิธี MD-ONIOM (Molecular Dynamic Simulations-Our Own N-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics) เป็นวิธีที่ถูกนำเสนอในการจำลองโมเลกุลของเนวิราพีน (nervirapine) ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ได้อย่างถูกต้อง เพราะสามารถจำลองระบบที่ amine proton ซึ่งเป็น acidic proton สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) กับอะตอมออกซิเจนของ DMSO ได้ และสามารถใช้คำนวณ ^1H -NMR chemical shifts โดยเฉพาะ amine proton ได้ ถูกต้องกว่าแบบจำลองอย่างง่ายในสภาวะก๊าซ ผลงานชิ้นนี้เป็นผลงานของผู้สมัครขอรับทุนเอง (Vailikhit *et al.*, 2007) โดยหลักการของ MD-ONIOM คือ การใช้ Molecular Dynamic Simulations เพื่อจำลอง Dynamics ของโมเลกุลในตัวทำละลาย และเพื่อแสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลใดของตัวทำละลาย และก็มีโมเลกุลที่อยู่ใน solvation shells จากนั้นจึงคำนวณโครงสร้างของโมเลกุลที่มีโมเลกุลใดของตัวทำละลาย ด้วย Quantum Mechanics เพื่อความถูกต้องมากขึ้น และใช้ระเบียบวิธี ONIOM เพื่อลดเวลาในการคำนวณ

โครงการวิจัยนี้จะทำการประยุกต์และพัฒนาระเบียบวิธี MD-ONIOM กับกลุ่มโมเลกุลขนาดเล็กของเอมีน เนื่องจากเอมีนเป็น organic molecule ที่มีการศึกษากันทั่วไป แต่ experimental ^1H -NMR spectra ของ amine proton จะเลื่อน (shift) ไปทาง de-shielded region และมักจะกว้าง (broad) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่เป็นตัวทำละลายที่ใช้มากสำหรับ organic molecule ทำให้ยากต่อการประมวลผล และการใช้เพียงแบบจำลองโมเลกุลอย่างง่ายในสภาวะก๊าซก็มักจะไม่สามารถอธิบายและคำนวณ ^1H -NMR chemical shifts ได้อย่างถูกต้อง

หากระเบียบวิธี MD-ONIOM สามารถใช้จำลองแบบโมเลกุลของกลุ่มโมเลกุลขนาดเล็กของเอมีน ในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ นั่นคือสามารถพิสูจน์ได้ว่า ระเบียบวิธี MD-ONIOM สามารถใช้ได้คำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts กับเอมีนโปรตอนโดยทั่วไป จะเป็นประโยชน์ในการลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำการทดลองวัดค่า chemical shifts โดยเครื่องมือ NMR และสามารถถูกพัฒนาเป็นวิธีการ หรือซอฟต์แวร์ได้ในลำดับต่อไป



รูปที่ 1 โครงสร้างของเนวิราพีน และ amine proton

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างแบบจำลองโมเลกุลของกลุ่มสารประกอบเอมีนในตัวทำละลาย DMSO ด้วยระเบียบวิธี MD-ONIOM
2. ศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลาย คือ การเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลเอมีน และการสร้าง solvation shells
3. คำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของโมเลกุลเอมีน จากแบบจำลองที่ได้ และเปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง
4. นำเสนอระเบียบวิธี MD-ONIOM เพื่อใช้ในการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts โดยเฉพาะอย่างยิ่ง amine proton ทั่วไป

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

1. สร้างโมเลกุลเอมีนต่าง ๆ และทำการ optimise โครงสร้างด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G* ด้วยโปรแกรม Gaussian
2. ทำ Molecular Dynamic Simulations (MD) ของโมเลกุลเอมีนในตัวทำละลาย โดยใช้โปรแกรม AMBER
3. ศึกษาการละลายของโมเลกุลเอมีน และหาค่า Radial Distribution Function (RDF) ของโมเลกุลของตัวทำละลายรอบ ๆ โมเลกุลเอมีน
4. กำหนด solvation shells และระยะ cut off จากความสัมพันธ์ของค่า RDF ที่ได้

5. ใช้ระยะ cut off ที่ได้เป็นตัวกำหนดการสร้างแบบจำลองโมเลกุลของของเอมีนที่มีโมเลกุลของตัวทำละลายอยู่ด้วย
6. ใช้ ONIOM2 method ในการ optimise และคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-311++G**: $\text{HF/STO-3G//B3LYP/6-31G**}$:PM3 โดยให้โมเลกุลของเอมีนถูกคำนวณอยู่ที่ higher level of calculations และโมเลกุลของตัวทำละลายถูกคำนวณที่ lower level of calculations และหาค่าเฉลี่ยของ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts จากแบบจำลองที่ได้แต่ละ snapshot
7. เปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts กับการทดลอง และข้อมูลอ้างอิง
8. สรุปผล และเผยแพร่ผลงานวิจัย

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ขั้นตอน	ปีที่ 1 (เดือนที่)												
	1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
3.1	✓	✓	✓										
3.2				✓	✓	✓		✓	✓	✓			
3.3											✓	✓	✓
3.4											✓	✓	✓
3.5											✓	✓	✓
	ปีที่ 2 (เดือนที่)												
3.6	✓	✓	✓	✓	✓	✓							
3.7								✓	✓	✓	✓		
3.8												✓	✓

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Efficient Modelling of $^1\text{H-NMR}$ Shifts of Hydrogen Bonded Amines in a Polar Solvent

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Chemical Information and Modeling (impact factor 2006 = 3.423)

บทนำ

การคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของโมเลกุลในสารละลายมีความซับซ้อนโดยเฉพาะในระบบที่ตัวถูกละลายมีโปรตอนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา และสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลายที่มีขั้วได้[1,2] ตัวอย่างเช่น เอมีนที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จะเกิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างไฮโดรเจนที่หมู่เอมีนกับออกซิเจนของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ซึ่งจะทำให้ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของหมู่เอมีนจะมีตำแหน่งเลื่อนไปทาง de-shielded มากกว่าเอมีนที่ละลายในตัวทำละลายโคโรฟอร์ม

การคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของสารประกอบในสารละลายมีประโยชน์ในการแยกพีคในสเปกตรัมที่มีความซับซ้อน หรือตรวจสอบความถูกต้องของโครงสร้างทางโมเลกุล [3,4] โดยทั่วไปวิธีการคำนวณในระบบก๊าซสามารถใช้ในการคำนวณ NMR chemical shifts ได้ถูกต้อง แต่เมื่อมีอิทธิพลของตัวทำละลายเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากในระบบมีการสร้างพันธะไฮโดรเจน การจำลองระบบแบบง่าย จะไม่สามารถใช้คำนวณได้อย่างถูกต้อง การใช้ continuum model เพื่อจำลองตัวทำละลายขึ้นในระบบโดยการใช้ค่าไดอิเล็กทริก คอนสแตนต์ (dielectric constant) อาจจะทำให้ตำแหน่งของโปรตอนที่ว่องไวนี้ เลื่อนไปในตำแหน่งที่ de-shielded มากขึ้น แต่ก็ยังคงให้ค่าที่ไม่ถูก และยังมีผลให้โปรตอนในตำแหน่งอื่น ๆ ของโมเลกุลผิดพลาดมากขึ้นด้วย การเพิ่มโมเลกุลของตัวทำละลายเพิ่มเข้าไปในระบบของตัวถูกละลายจึงอาจจะจำเป็น

ในทางการค้า มีซอฟต์แวร์ เช่น Advanced Chemistry Development (ACD) [5] สำหรับการทำนาย $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่เป็นการใช้ฐานข้อมูลของ chemical shifts และ coupling constants ที่มาจากสารประกอบประมาณ 175,000 โครงสร้าง โดยการทำนายจะได้จากการเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่คล้ายกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล อย่างไรก็ตามก็ยังมีความจำเป็นสำหรับโครงสร้างที่มีความแตกต่างจากฐานข้อมูลที่มี และตัวทำละลายที่แตกต่างกัน Abraham และคณะ [6] ได้พัฒนาวิธีการในการใช้ CHARGE program และฐานข้อมูลที่ได้จากการทดลองของฟังก์ชันนอล กรุ๊ปต่าง ๆ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็ยังคงไม่ถูกต้อง

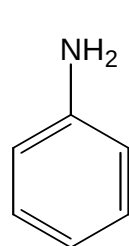
การใช้ ONIOM2 [7] ในการทดลองนี้ คือ การแบ่งระดับการคำนวณออกเป็นสองระดับ โดยคำนวณตัวถูกละลาย แยกออกจากตัวทำละลาย และตัวถูกละลายจะถูกคำนวณที่ระเบียบวิธีที่สูง และถูกต้องมากกว่า ตัวทำละลายที่อยู่ในระบบ โดยคำนวณ isotopic shielding tensor ของแต่ละโปรตอน $^1\text{H}_i$ ได้จาก

$$\sigma(^1\text{H}_i)_{\text{ONIOM2}} = \sigma(^1\text{H}_i)_{\text{High, Solute}} + \sigma(^1\text{H}_i)_{\text{Low, Solute-DMSO}} - \sigma(^1\text{H}_i)_{\text{Low, Solute}}$$

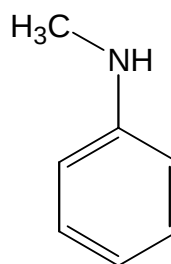
การคำนวณแบบ MD-ONIOM2 เป็นการใช molecular dynamics modelling ในการคำนวณทางไดนามิกส์ระหว่างตัวถูกละลาย และตัวทำละลาย และใช้โครงสร้างที่ได้มา ซึ่งจะประกอบด้วยตัวถูกละลาย และตัวทำละลายที่สร้างพันธะไฮโดรเจนในการคำนวณทางควอนตัมของ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ตามที่ได้มีการอธิบาย และคำนวณมาก่อนหน้านี้ กับเนวินาพีน [8]

วิธีการทดลอง

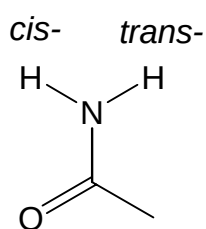
สร้าง aniline n-methylaniline acetamide และ valerolactam ด้วย SYBYL7.0 program [9] และทำการ optimised ด้วยโปรแกรม Gaussian03 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G** จากนั้นสร้าง ESPs ด้วยการ ทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี HF/6-31G* และ Merz-Kollman-shigh charge scheme (MK) สร้าง ไฟล์ “prep” ด้วย Antechamber module โดยการใช้ AMBER force-field parameters



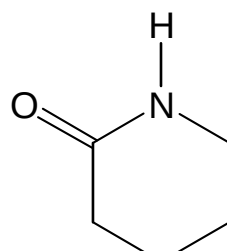
Aniline



N-methylaniline



Acetamide



Valerolactam

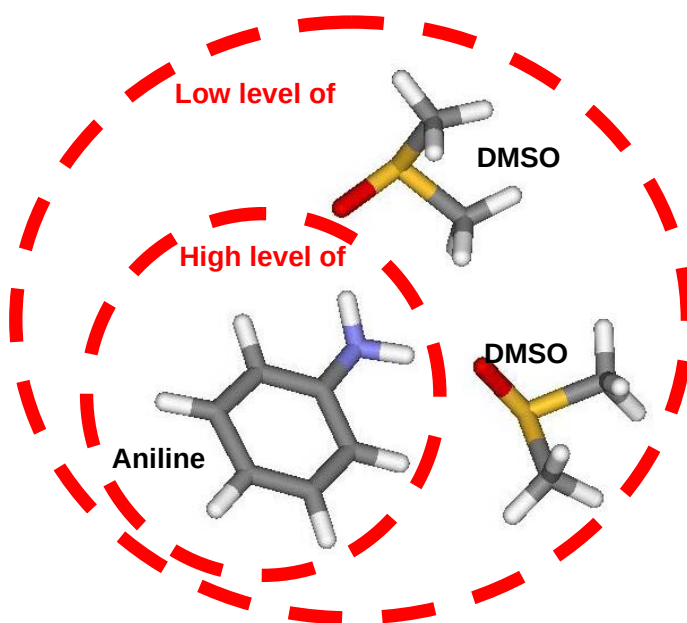
รูปที่ 1 โครงสร้างของเอมีนที่ใช้ในงานวิจัย

โครงสร้างของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ก็ถูกสร้างขึ้นในลักษณะเดียวกัน จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างเป็นกล่องของ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และทำการ equilibrated นำโมเลกุลของเอมีนมาใส่ในกล่องของตัวทำละลาย โดยกล่องจะมีขนาด 10Å จากผิวหน้าของโมเลกุลเอมีน ทำการ minimisation ระบบ และ equilibrated

จากอุณหภูมิ 0 ถึง 300K ด้วย Canonical Ensemble (NVT) เป็นเวลา 20ps และต่อด้วย Isobaric-Isothermal Ensemble (NPT) เป็นเวลา 30ps ที่ 300K และ 1atm

ทำการคำนวณระบบแบบ molecular dynamic simulations เป็นเวลา 2ns ที่ 300K ด้วย periodic boundary conditions ใน NPT ensemble จากนั้น นำข้อมูลในทุก ๆ 1ps หรือ 500 step มาสร้างเป็น radial distribution function (RDF) เพื่อหาค่าเฉลี่ยของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่อยู่รอบ ๆ โปรตอนในหมู่เอมีนของตัวถูกละลาย ซึ่งจะทำให้ทราบถึงจำนวนโมเลกุลของตัวทำละลายที่อยู่ใน solvation shell ที่จะใช้เพิ่มเข้าไปในโครงสร้างของระบบที่จะนำไปคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ด้วย ONIOM2 ต่อไป โครงสร้างของเอมีน-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จะนำมาจากทุก ๆ 100ps snapshots ของระบบใน MD โดยแต่ละ snapshot จะถูกนำมาคำนวณด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 B3LYP/6-311++G**/B3LYP/6-31G**::HF/STO-3G//PM3 และใช้ TMS เป็นมาตรฐานในการคำนวณ

ผลการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับผลการคำนวณเอมีนในสภาวะก๊าซ และ IEFPCM ด้วยระเบียบวิธี ONIOM2 B3LYP/6-311++G**/B3LYP/6-31G** และข้อมูลจากการทดลองที่ได้จากเอกสารอ้างอิง



รูปที่ 2. ตัวอย่างโครงสร้างสำหรับคำนวณ ONIOM2

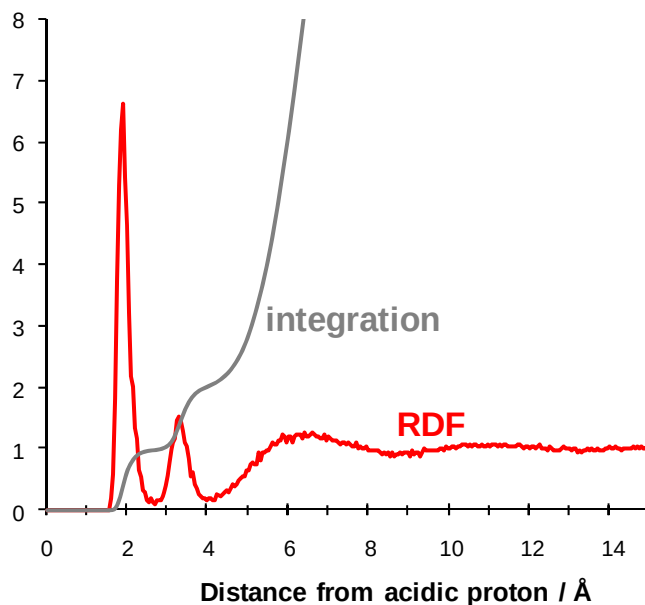
สามารถคำนวณพลังงานได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 E_{\text{High, Solvated}} &\approx E_{\text{ONIOM2}} \\
 &= E_{\text{High, Solute}} + E_{\text{Low, Solvated}} - E_{\text{Low, Solute}}
 \end{aligned}$$

ผลการทดลอง

Aniline

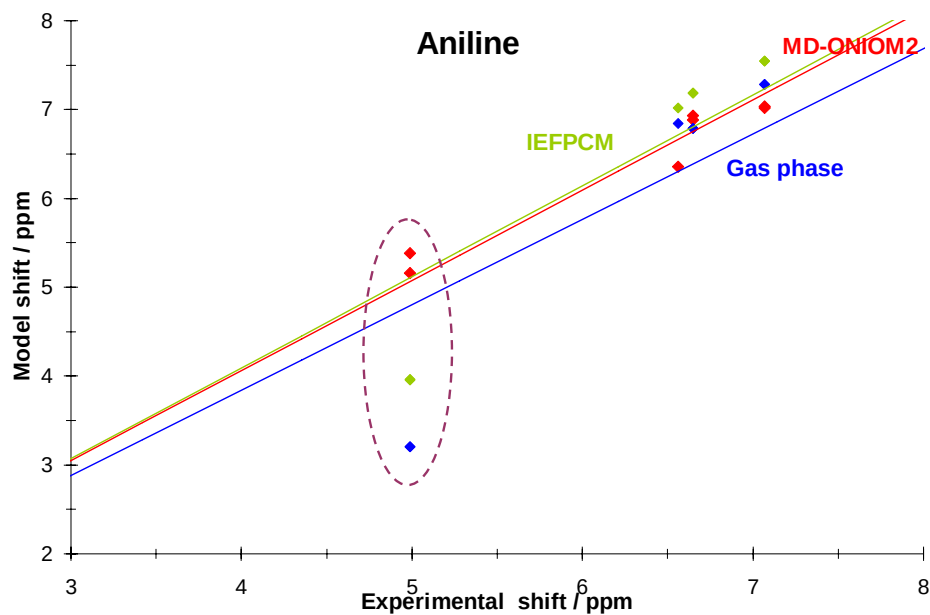
Radial distribution function (RDF) จาก MD แสดงให้เห็นว่าแต่ละโปรตอนตำแหน่งเอมีนของโมเลกุล aniline สร้างพันธะกับโมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์รวมทั้งหมดสองโมเลกุล เกิด dynamic ของการแลกเปลี่ยนระหว่างโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่อยู่ในกล่อง อย่างไรก็ตาม จาก RDF จะพบว่า ระยะ cut-off คือที่ $4.0 \text{ \AA}$ และระยะนี้จะใช้ในการเตรียมโครงสร้างเพื่อคำนวณทางควอนตัม



รูปที่ 3 RDF ของอะตอมของออกซิเจนในโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่อยู่รอบโปรตอนในตำแหน่งเอมีนของอะนิลีน

จะเห็นได้ว่าจาก dynamics ที่เกิดขึ้นเป็นสามารถอธิบายการเกิด $^1\text{H-NMR}$ ที่กว้างของเอมีนโปรตอนที่อยู่ในตัวทำละลายที่มีขึ้น โดยจากการทำการคำนวณทางควอนตัมจากตัวอย่าง 10 snapshot ทำให้ได้ข้อมูล 20 $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ของทั้งสองโปรตอน เมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย ก็จะทำให้ได้ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่เป็นผลการทดลองสุดท้ายในการเปรียบเทียบกับผลการทดลองอื่นต่อไป

การคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts จากการทำ MD-ONIOM2 การคำนวณในระบบก๊าซ และ IEFPCM เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง รวมถึงค่าความชัน (m) และ correlations (R^2) แสดงดังรูปที่ 4



	m	R ²
Gas phase	0.9604	0.7049
IEFPCM	1.0235	0.8014
MD-ONIOM2	1.0153	0.9237

รูปที่ 4. กราฟเปรียบเทียบ ¹H-NMR chemical shifts ของ aniline ด้วย MD-ONIOM2 กับการคำนวณแบบก๊าซ และ IEFPCM กับค่าจากการทดลอง

ผลการทดลองค่าคำนวณ ¹H-NMR chemical shifts จากวิธี MD-ONIOM2 แสดงในตารางที่ 1 โดยเปรียบเทียบกับค่าคำนวณในระบบก๊าซ และ IEFPCM เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลอง [12,13] นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบกับผลการทดลองของอะนิลีนในคลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า ¹H-NMR chemical shifts จากการคำนวณด้วยวิธี MD-ONIOM2 กับวิธีอื่น และค่าจากการทดลอง

H position	Ref. 12	Ref. 13	Present work			Ref. 13
	DMSO		MD-ONIOM2	Gas phase	IEFPCM	CDCl ₃
	Expt.	Expt.	Calc.	Calc.	Calc.	Expt.
o	6.65	6.55	6.91	6.59	6.99	6.67
m	7.07	6.98	7.03	7.24	7.48	7.14
p	6.56	6.47	6.36	6.67	6.80	6.75
N	4.99	4.94	5.27	3.43	4.25	3.61

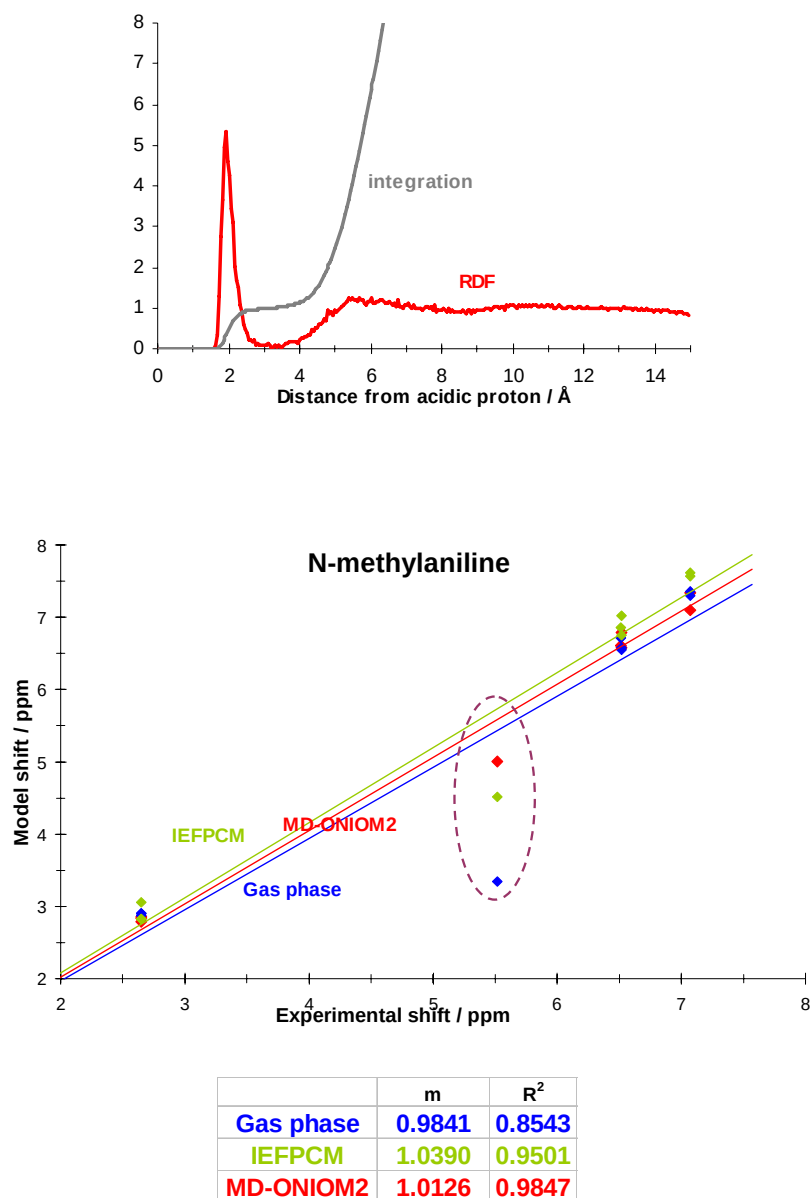
จะพบว่าค่าการคำนวณในก๊าซจะให้ค่า $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่ถูกต้องยกเว้นโปรตอนตำแหน่งเอมีน ทั้งนี้เนื่องมาจากอิทธิพลของ short range intramolecular effects แต่เนื่องจากในโมเดลไม่ได้มีการเพิ่มอิทธิพลของตัวทำละลายไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าค่าการคำนวณในก๊าซจะให้ค่า $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ที่มีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองของอะนิลีนในคลอโรฟอร์ม ทั้งนี้เนื่องจากคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นจึงไม่เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่างอะนิลีนกับคลอโรฟอร์ม

เมื่อพิจารณาผลการคำนวณแบบ IEFPCM พบว่าการคำนวณให้ผลที่ถูกต้องมากขึ้นที่ตำแหน่งเอมีน แต่โปรตอนตำแหน่งอื่น ๆ ในโมเลกุลผิดพลาดมากขึ้นแบบ overestimate ทั้งนี้เมื่อทำการโมเดลตัวทำละลายในระบบแบบ continuous medium โดยการใช้ค่า dielectric constant นั้นคือการเพิ่มผลทาง long range effects ให้กับค่าการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts และจากประสบการณ์การคำนวณ NMR chemical shifts แบบ IEFPCM มักให้ผลการทดลองที่ไม่ถูกต้อง

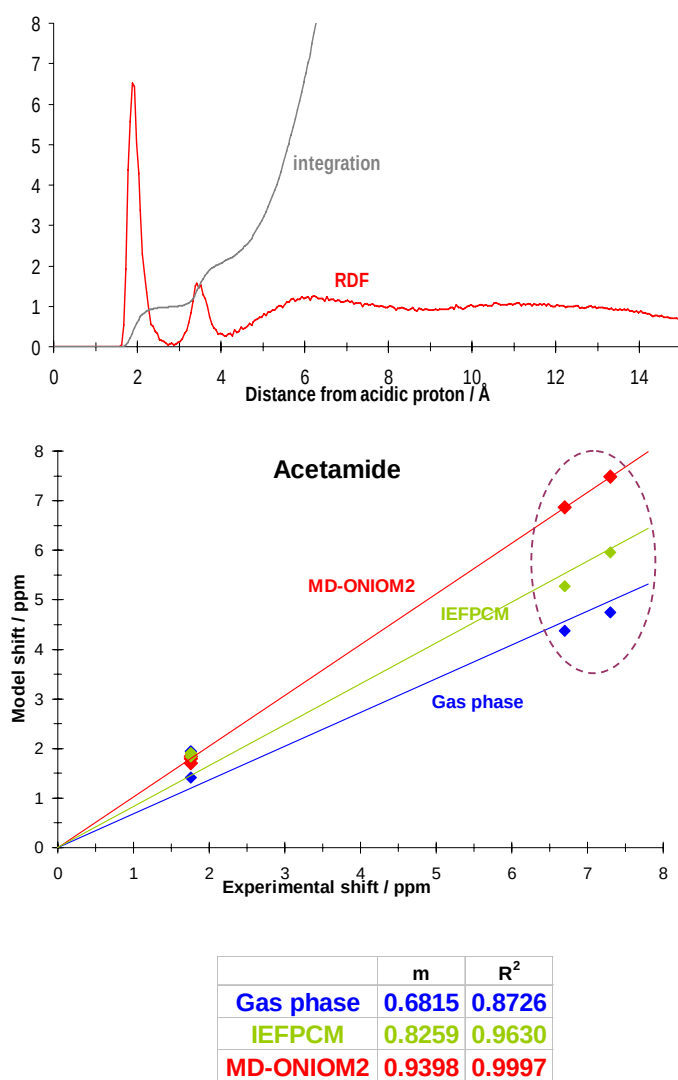
MD-ONIOM2 model เป็นวิธีคำนวณที่รวมเอาอิทธิพลของทั้ง short range และ long range effects โดยการนำโมเลกุลของตัวทำละลายใน solvation shell มาคำนวณทางควอนตัมในชั้นของ outer layer ของ ONIOM2 ทำให้ผลการคำนวณดีกว่า การคำนวณแบบ IEFPCM และ ระบบก๊าซ

N-methylaniline acetamide และ valerolactam

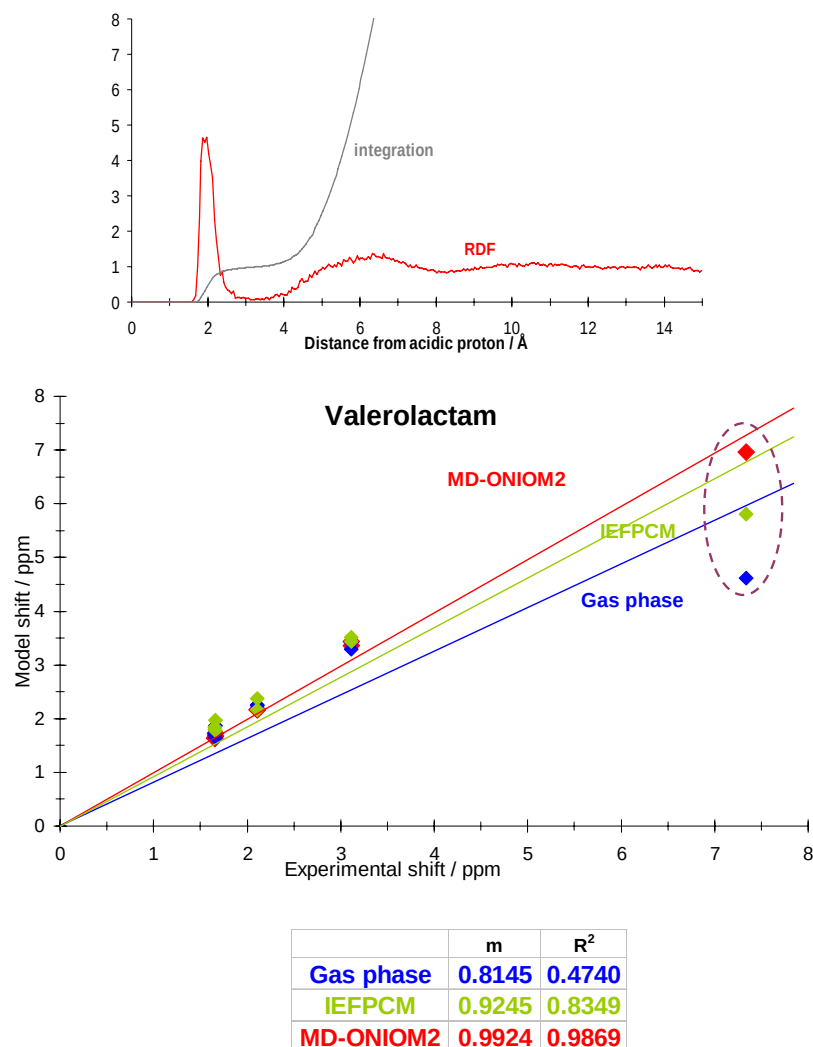
RDF จาก MD simulations แสดงให้เห็นว่า แต่ละโปรตอนที่เอมีนกรุปจะมีโมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ใน solvation shells ผลการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts แสดงโดยการพล็อตกับค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงดังรูปที่ 5-7



รูปที่ 5. RDF ของอะตอมออกซิเจนของไตรเมทิลซิลฟอสไซด์ รอบโปรตอนของกลุ่มเอมีนของ n-methylaniline และกราฟเปรียบเทียบ¹H-NMR chemical shifts ด้วย MD-ONIOM2 กับการคำนวณแบบก๊าซ และ IEFPCM กับค่าจากการทดลอง



รูปที่ 6. RDF ของอะตอมออกซิเจนของไธเมทิลซัลโฟไซด์ รอบโปรตอนของกลุ่มเอมีนของ acetamide และกราฟเปรียบเทียบ¹H-NMR chemical shifts ด้วย MD-ONIOM2 กับการคำนวณแบบ ก๊าซ และ IEFPCM กับค่าจากการทดลอง



รูปที่ 7. RDF ของอะตอมออกซิเจนของไดเมทิลซัลโฟไซด์ รอบโปรตอนของกลุ่มเอมีนของ valerolactam และกราฟเปรียบเทียบ ¹H-NMR chemical shifts ด้วย MD-ONIOM2 กับการคำนวณแบบ ก๊าซ และ IEFPCM กับค่าจากการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การคำนวณ ¹H-NMR chemical shifts แบบก๊าซโมเดลไม่เหมาะสมสำหรับการคำนวณกับระบบที่มี พันธะไฮโดรเจน โดยที่การคำนวณแบบ IEFPCM ให้ผลการทดลองที่ดีขึ้นแต่ยังคงให้ผลการทดลองที่ ผิดพลาดแบบ overestimate กับโปรตอนอื่น ๆ ในโมเลกุล ในงานวิจัยขั้นนี้ วิธี MD-ONIOM2 สามารถ

ใช้ในการคำนวณ $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts ในตัวทำละลายมีขั้วได้อย่างถูกต้อง โดยการทำ MD simulations จะแสดงถึง solvation shells และจำนวนไดเมทิลซัลโฟลไซด์ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวถูกละลาย ค่าเฉลี่ยของผลการคำนวณที่ได้จาก วิธี MD-ONIOM2 จากจำนวน 10 ตัวอย่างที่ได้จาก MD snapshots มีค่าที่ถูกต้อง และสามารถใช้อธิบายถึงอิทธิพลของพันธะไฮโดรเจนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในการสนับสนุนทุนวิจัย และคณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

บรรณานุกรม

1. Hannongbua, S.; Prasithichokekul, S.; Pungpo, P.; *Compt. Aided Mol. Des.* **15** (2001) 997.
2. Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; (Eds.), *Identification of Organic Compounds*, sixth ed., John Wiley and Sons, New York, 1998, p. 166.
3. Helgaker, T.; Jaszunski, M.; Ruud, K.; *Chem. Rev.* **99** (1999) 293.
4. Saen-oon, S.; Hannongbua, S.; Wolschann, P.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43** (2003) 1412.
5. Williams, A.; Bakulin, S.; Golotvin, S.; *NMR Prediction Software* Advanced Chemistry Development Inc, Toronto, Ontario (2001).
6. Abraham, R.J.; Mobli, M.; *Spectro. Eur.* **16** (2004) 16.
7. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struct. (Theochem)*. **1999**, 461, 1-21.
8. Vailikhit, V.; Treesuwan, W.; Hannongbua, S. *J. Mol. Struct. (Theochem)*. **2007**, 806, 99-104.
9. SYBYL 7.0, Tripos Associates Inc., 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis, Missouri 63144, USA.
10. M.J. Frisch *et al.*, *Gaussian03*, Inc., Wallingford CT, 2004.

11. D.A. Case *et al.*, *AMBER 7*, University of California, San Francisco, 2002.
12. Shi, Q.; Lu, R.; Jin, K.; Zhang, Z.; Zhao, D. *Green Chem.* **2006**, 8, 868-870.
13. Abraham, R.J.; Byrne, J.J.; Griffiths, L.; M. Perez, *Magn. Reson. Chem.* **44** (2006) 491-509.

ผลงานวิจัยเพิ่มเติมที่ได้จากการคำนวณ IR spectra

วิธีการทดลอง

MD: AMBER9

1. ใช้โครงสร้าง Acetamide, Valerolactam ที่ optimise ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G* ในการสร้าง input files สำหรับการคำนวณ MD
2. ใช้ Force-Field parameters ของ DMSO จาก Fox and Kollman
3. ทำการ equilibrate ระบบของเอมีนใน DMSO เป็นเวลา 50 ps จากนั้นคำนวณที่ NPT ensemble ที่ 1 atm, 300K เป็นเวลา 1 ns
4. นำโครงสร้าง amine-DMSO ที่ได้จากการทำ MD จากทุก ๆ 100 ps
5. ใช้ radial distribution functions (RDFs) ในการหาจำนวน และตำแหน่งของโมเลกุลของ DMSO ที่สร้างพันธะกับโมเลกุลของเอมีน

QM: GAUSSIAN03

1. คำนวณ IR frequency ของแต่ละ acetamide-DMSO ทั้ง 10 โครงสร้าง ที่ B3LYP/6-31G*/B3LYP/6-31G**
2. เปรียบเทียบกับผลการทดลองกับการคำนวณ IR frequency ของ acetamide และ DMSO โมเลกุลเดี่ยว

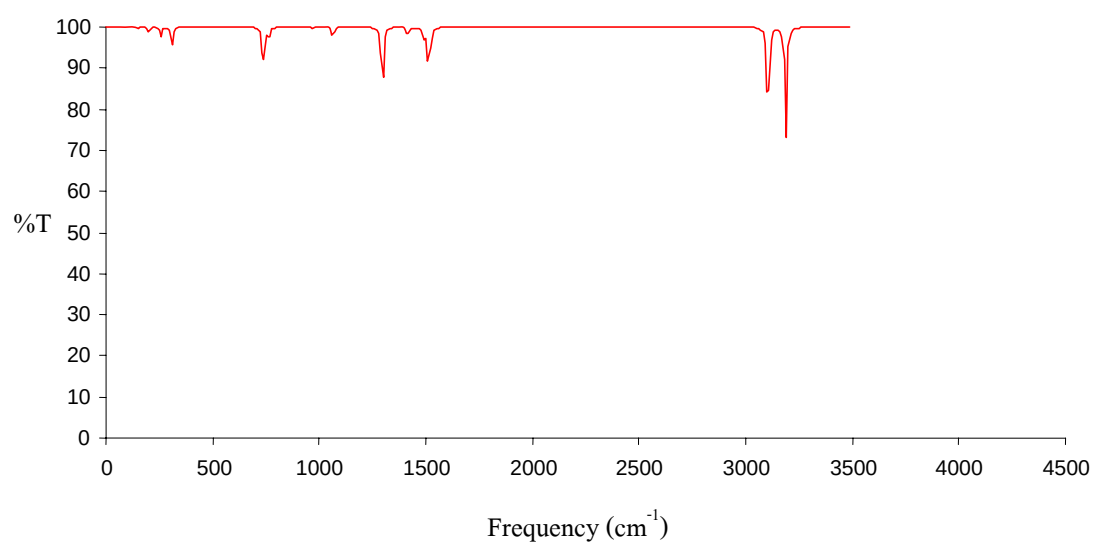
จากผลการคำนวณพบว่า เมื่อทำการคำนวณความถี่ (frequency) ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G*/B3LYP/6-31G** ของโครงสร้าง acetamide-DMSO ทั้ง 10 โครงสร้างที่ได้จากการทำ MD ดังวิธีการทดลองนี้จะเห็นการเลื่อน (shift) ของตำแหน่ง N-H bending และ N-H stretching ของหมู่เอมีนในโครงสร้าง ซึ่งอธิบายได้จากผลของการเกิดพันธะไฮโดรเจน ระหว่าง เอมีนโปรตอนกับ ออกซิเจนของตัวทำละลาย DMSO โดยแสดงผลการทดลองในรูปของตาราง และสเปกตรา ดังนี้

ตารางที่ 1 ตำแหน่งพีก IR Spectrum (cm⁻¹) ของอะเซตามีดโมเลกุลเดี่ยวและอะเซตามีดในสารละลาย Dimethylsulfoxide (DMSO)

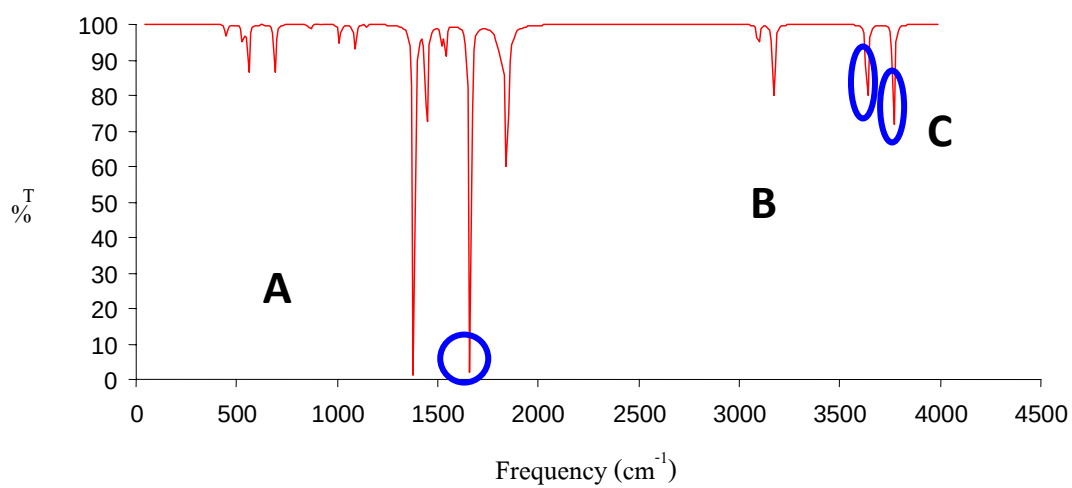
โมเลกุล	โครงสร้าง	N-H Bending ^A	N-H Stretching		% ความคลาดเคลื่อน ^D		
			Symmetric ^B	Asymmetric ^C	N-H Bending	N-H Stretching	
						Symmetric	Asymmetric
Acetamide		1641	3616	3748	-0.06	-3.31	-7.09
Acetamide – DMSO	1	1678	3350	3690	-2.32	4.29	-5.43
	2	1672	3240	3592	-1.95	7.43	-2.63
	3	1689	3417	3542	-2.99	2.37	-1.20
	4	1735	3385	3511	-5.79	3.29	-0.31
	5	1706	3581	3687	-4.02	-2.31	-5.34
	6	1689	3419	3602	-2.99	2.31	-2.91
	7	1712	3250	3479	-4.39	7.14	0.60
	8	1680	3551	3720	-2.44	-1.46	-6.29
	9	1697	3335	3654	-3.48	4.71	-4.40
	10	1695	3432	3540	-3.35	1.94	-1.14

^{A,B,C} คือ ค่าที่วัดได้จากภาพที่ 6-17

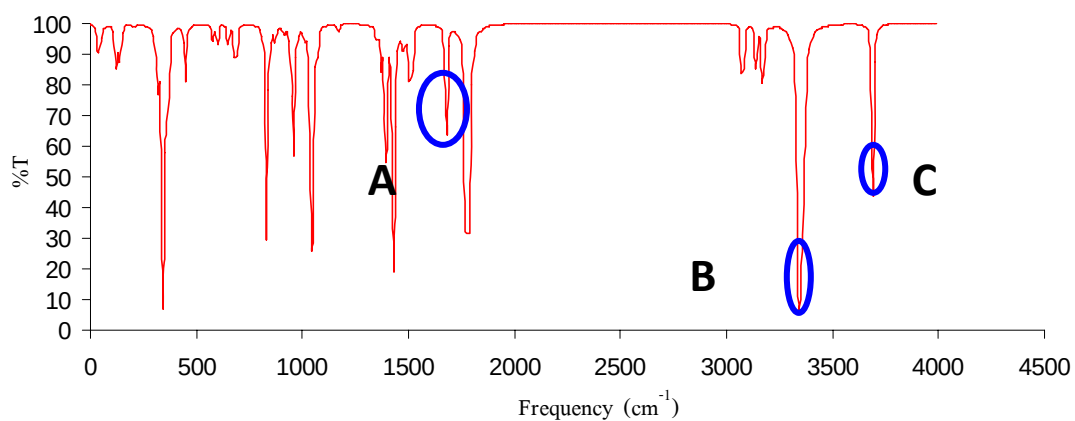
$$^D \text{ คือ } \% \text{ ความคลาดเคลื่อน} = \frac{(\chi_{Expt} - \chi_{Cal})}{\chi_{Expt}} \times 100$$



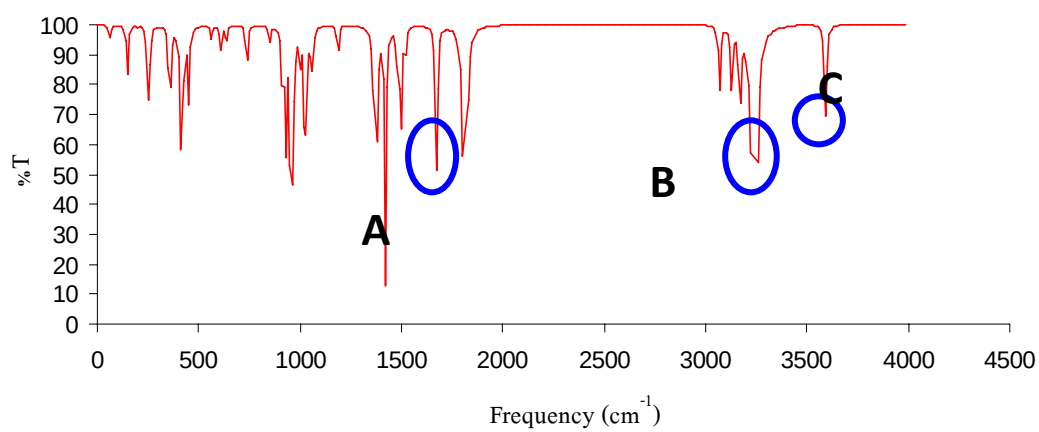
รูปที่ 1 IR Spectrum ของโมเลกุล Dimethylsulfoxide (DMSO)



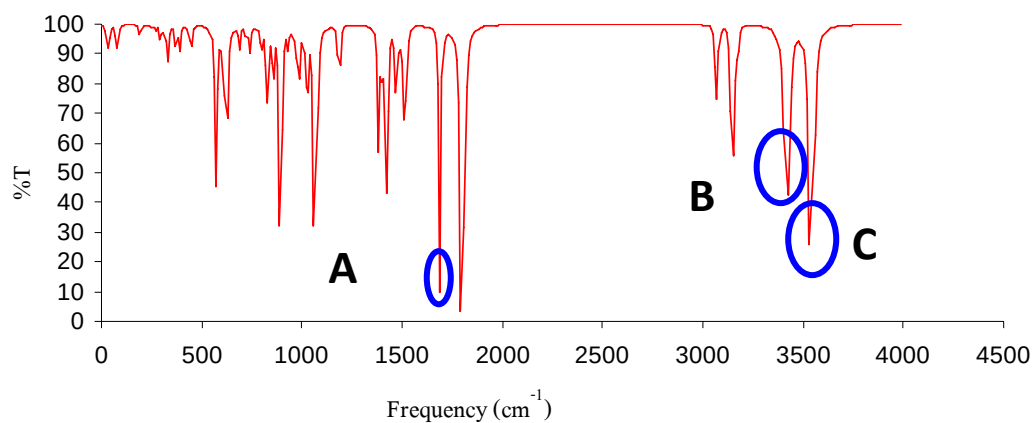
รูปที่ 2 IR Spectrum ของ Acetamide โมเลกุลเดี่ยว



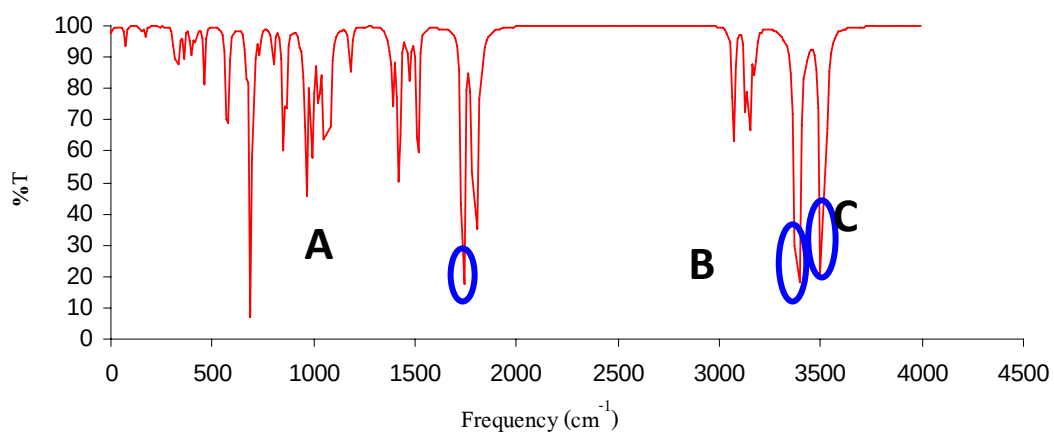
รูปที่ 3 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 1



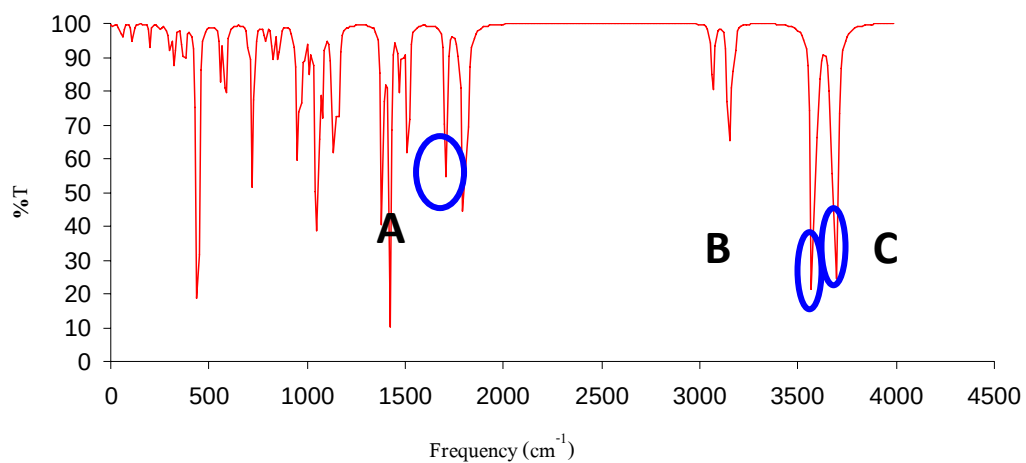
รูปที่ 4 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่



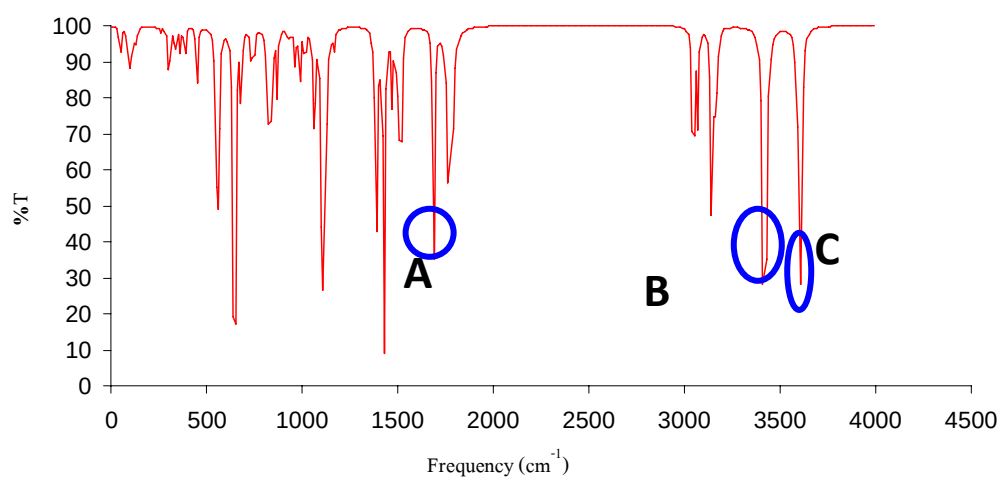
รูปที่ 5 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 3



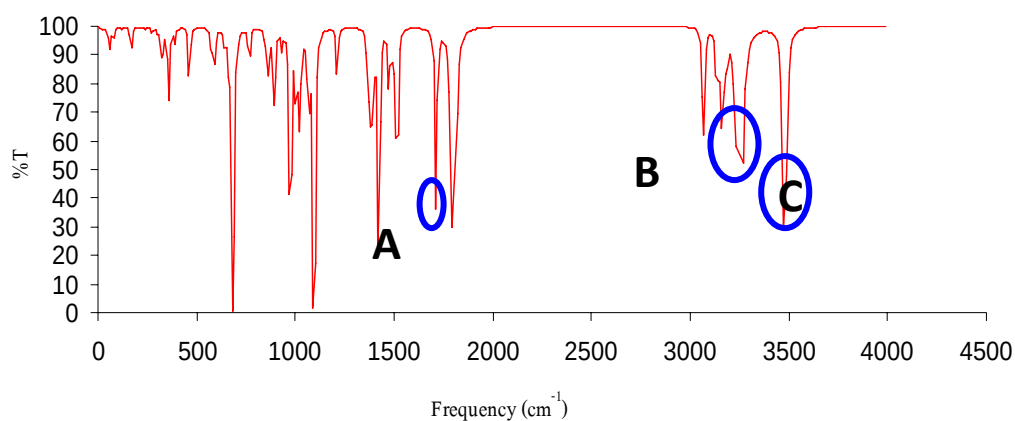
รูปที่ 6 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 4



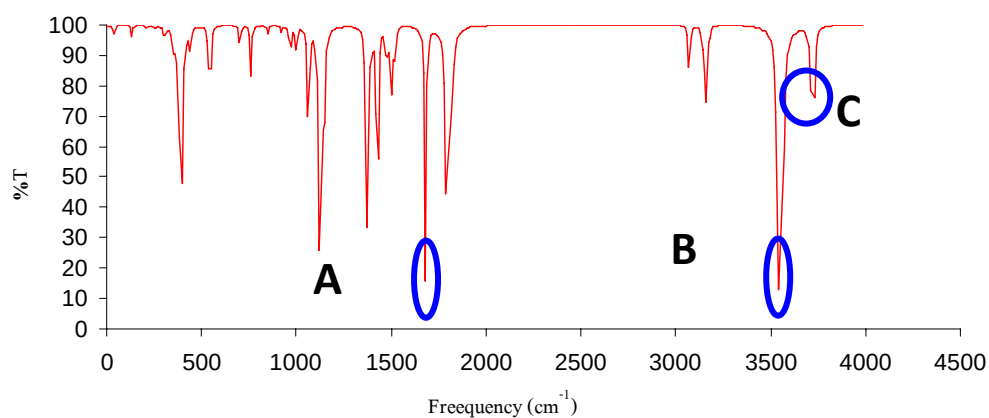
รูปที่ 7 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 5



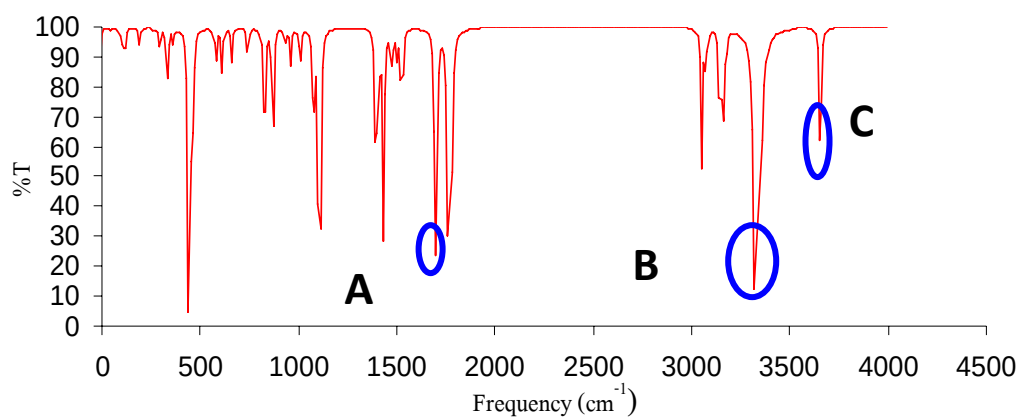
รูปที่ 8 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 6



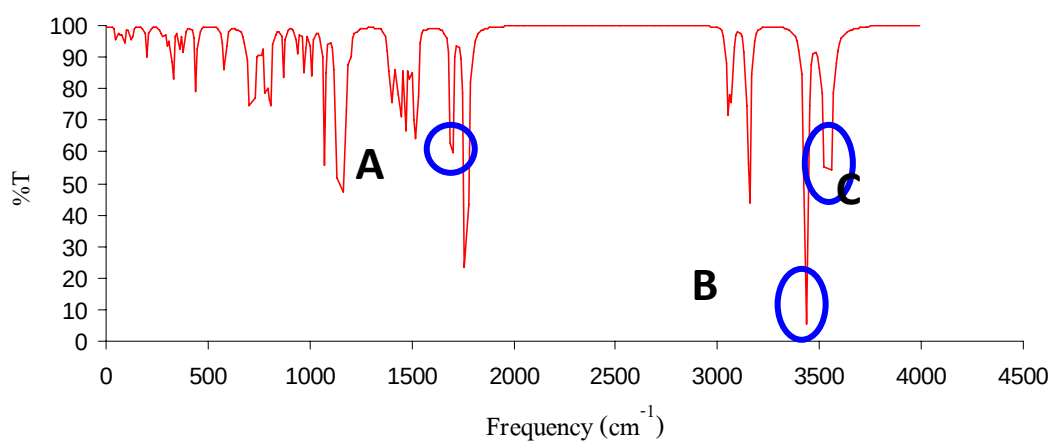
รูปที่ 9 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 7



รูปที่ 10 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 8



รูปที่ 11 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 9



รูปที่ 12 IR Spectrum ของ Acetamide ในสารละลาย Dimethylsulfoxide โครงสร้างที่ 10

Output ที่ได้จากโครงการ

Publications:

"H-NMR Chemical Shifts of Some DMSO-Solvated Amines Using MD-ONIOM2."

V. Vailikhit, W. J. Holzschuh and S. Hannongbua

Conferences:

J. Mol. Struct. (THEOCHEM), Vol. 944 (2010) 173-176.

"Modelling Solutes in DMSO –MD-ONIOM2 and the Solvation Shell.

Pure and Applied Chemistry International Conference 2009 (PACCON2009)

January 2009, Phitsanulok, Thailand

"Affordable Modelling of H-bonded Solutes Using MD-ONIOM2."

The World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC2008)

September 2008, Sydney, Australia.



Short communication

 ^1H NMR chemical shifts of some DMSO-solvated amines using MD-ONIOM2Veeramol Vailikhit^{a,*}, Wilhelm J. Holzschuh^a, Supa Hannongbua^b^a Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand^b Department of Chemistry, Faculty of Science, and Center of Nanotechnology, Kasetsart University, Jatuchak, Bangkok 10900, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2009

Received in revised form 30 December 2009

Accepted 30 December 2009

Available online 14 January 2010

Keywords:

MD-ONIOM2

 ^1H NMR

Solvent effect

ABSTRACT

MD-ONIOM2 has been previously used to model nevirapine in the polar solvent DMSO, accurately predicting the ^1H NMR chemical shifts of all the protons, including the acidic amine proton that suffers significant deshielding due to hydrogen bonding. In this work, MD-ONIOM2 is shown to be a more generally applicable model by predicting the NMR shifts of four amines in DMSO solution with acceptable accuracy. The solutes *N*-methylaniline and valerolactam with a single acidic proton, and aniline and acetamide with two acidic protons were used, and the NMR predictions compared to experimental values. Gas-phase models and IEFPCM are shown to not predict the acidic proton shifts well in comparison to MD-ONIOM2.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of the Molecular Dynamics-Our own *N*-layered Integrated molecular Orbital and Molecular mechanics, with $N=2$, (MD-ONIOM2) method for the prediction of ^1H NMR chemical shifts has been previously reported for nevirapine in DMSO [1], with good results when compared to an experimentally measured spectrum. This included the acidic proton that forms a hydrogen bond with a polar DMSO solvent molecule and suffers significant deshielding as a result. In comparison, using a gas-phase model, while cheap to calculate in terms of computer resources, gives good results for all hydrogen NMR shifts except those of the acidic protons. This is expected as there are no solvent interactions included in such a simple model, and hydrogen bonding is a significant interaction.

To show that the MD-ONIOM2 method has general application for modelling acidic protons in polar solvents, the predicted ^1H NMR shifts of four simple amine compounds in DMSO are reported here and compared to experimentally measured shifts. The molecules were chosen to represent a limited range of different electronic environments for the acidic protons. *N*-methylaniline is the simplest with only a single acidic proton with an adjacent phenyl group. Aniline has a second equivalent acidic proton attached to the amine nitrogen. δ -Valerolactam has a carbonyl group adjacent to the amine and its one acidic proton, and acetamide has two acidic protons on the amine nitrogen adjacent to the carbonyl group. Acetamide has the extra complication of keto-enol

tautomerism preventing rotation around the C–N bond, and thus the *cis*- and *trans*-amine protons are not equivalent.

The results were also compared to the Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model (IEFPCM) which has also been proposed to include solvent effects on the solute molecule. This model treats the solvent as a continuum of polarizable dielectric described by the solvent's dielectric constant, and only considers relatively long range electrostatic interactions between the solute molecule and the continuum. This may be appropriate for non-polar solvents, but fails to include the localised strong effect of hydrogen bonding between a solute and discrete solvent molecules. The MD-ONIOM2 method, in comparison, attempts to model the solute molecule with discrete solvent molecules bonded to it, and so it incorporates short-range, localised interactions such as hydrogen bonding.

2. Method

Modelling of the solute molecules was performed in two stages: first MD of the molecule in a box of solvent molecules, followed by ONIOM2 of sample snapshots from the MD stage to calculate ^1H NMR shifts. This was described in detail previously [1] and only a summary and differences given below.

The AMBER9 software package was used for the MD with this work. Each solute molecule, like DMSO previously, was generated with the SYBYL7.0 program [2] and optimised with the Gaussian03 program [3] at B3LYP/6-31G** level. The molecule ESP was generated using single point calculation at HF/6-31G* level with the Merz–Kollman–Shigh charge scheme (MK). The Antechamber module was used to generate the “prep” input file and atomic charge, using the AMBER force-field parameters [4]. The solute

* Corresponding author. Tel.: +66 34 281 105.

E-mail address: veeramol.v@ku.ac.th (V. Vailikhit).

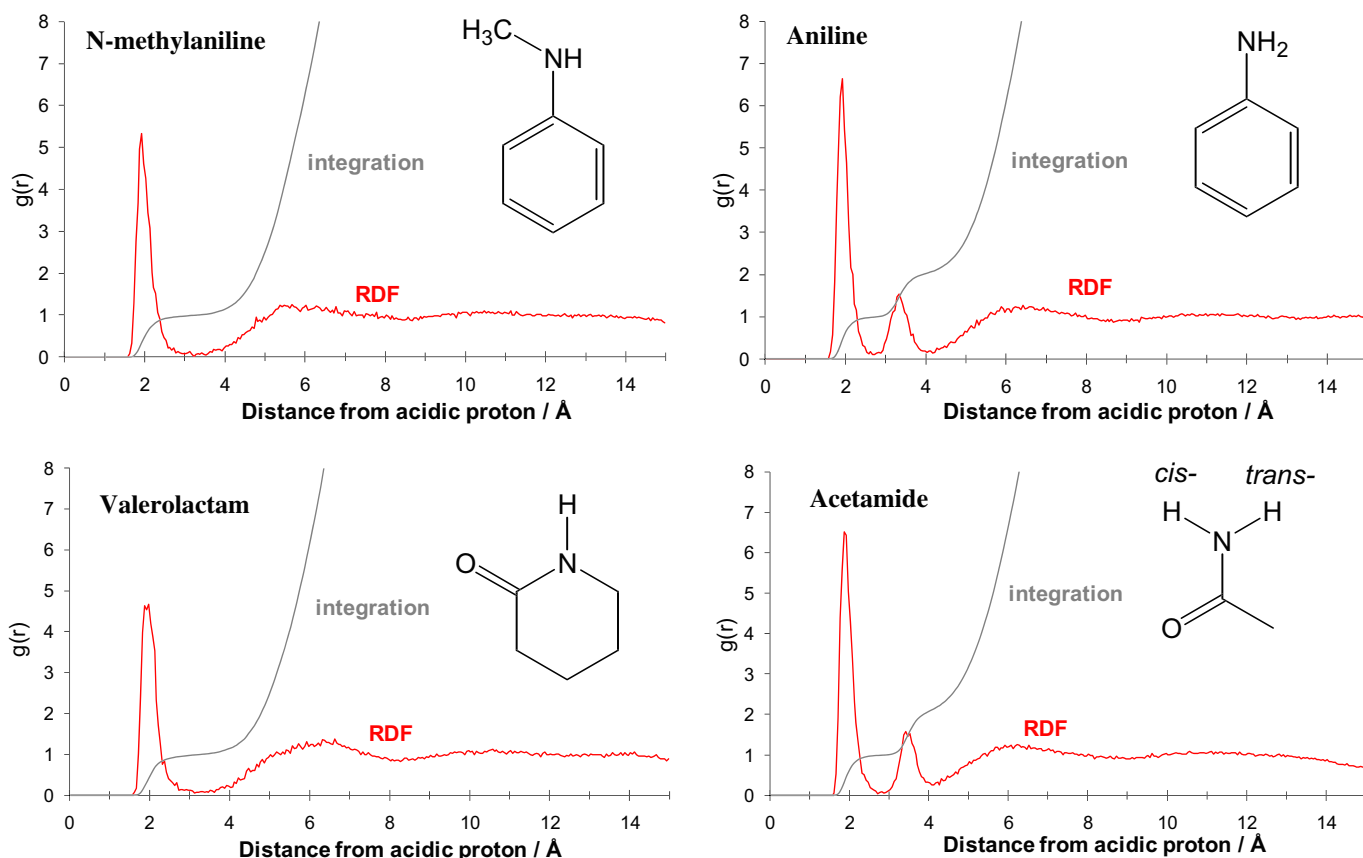


Fig. 1. From the molecular dynamics simulations of each solute molecule in DMSO, the radial distribution of DMSO-oxygen atoms can be determined. The peaks show the extent of the solvation shell, used for the cut-off in ONIOM2, and integration determined that one DMSO molecule was bonded to each acidic proton.

molecule model was placed in a box of DMSO molecules [1] for the MD run and a radial distribution function (RDF) was used to determine the average distribution of DMSO-oxygen atoms around the acidic protons. The RDF was used to determine the discrete models

(Fig. 2), from 10 snapshots taken every 100 ps during the final 1 ns of the production period, for the ONIOM2 modelling with the Gaussian03 software package at B3LYP/6-311++G**/B3LYP/6-31G**::HF/STO-3G//PM3, using TMS as the standard NMR reference. The predicted ^1H NMR shifts from each of the ten snapshots were averaged at the end.

For comparison, the solutes were modelled as isolated molecules in the gas phase, and in with DMSO solvent using SCRF-IEFPCM in Gaussian03. The accuracies of the predicted chemical shifts were evaluated against experimentally measured NMR data reported in the literature [5].

3. Results

During the MD simulations, the root mean square deviation (RMSD) of heavy atoms in the solute molecules from the starting geometry and the total energy of the whole system were observed to ensure the MD simulations were stable.

For each solute MD run, the RDF of the acidic proton to the DMSO-oxygen atoms was used to determine the radius of the solvation shell; that is, the distance within which the DMSO molecules are bonded to the acidic protons. This was obvious from peaks in the RDF shown in Fig. 1, and integration of the area under the peaks showed that on average only one DMSO molecule was bonded to each acidic proton. The solvation shell radius was used as the cut-off for the ONIOM2 model with only DMSO molecules that were at least partially inside the radius included. All other DMSO molecules were discarded. The cut-off radius was approximately 3 Å for the molecules with only one acidic proton, and approximately 4 Å for those with two acidic protons.

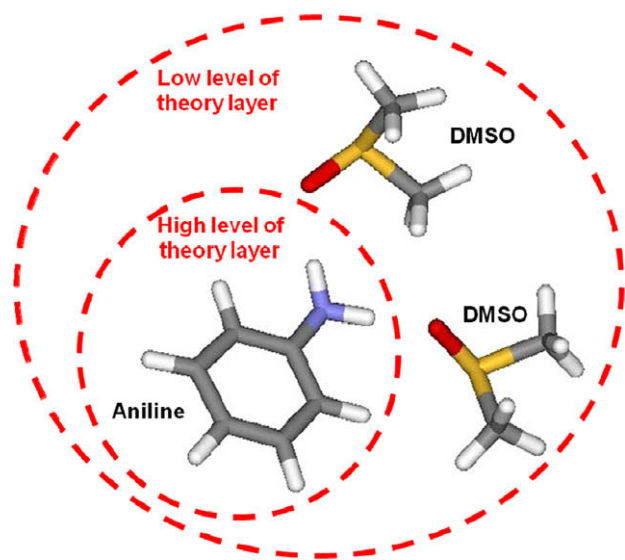


Fig. 2. Schematic of the two layers in the ONIOM2 model showing, in this case, an aniline molecule which is treated at a high level of quantum mechanics theory, and the combined aniline and H-bonded DMSO molecules treated at a low level of quantum mechanics theory.

Table 1

Shown here are the experimentally measured NMR shifts of the acidic amine protons of the four solutes, and the predicted values from each of the three models. The difference, experimental value–predicted value, is given to make comparison easier. The shifts for all protons are given as online [Supplementary data](#).

	Expt.	ONIOM2		Gas phase		IEFPCM	
	ppm	ppm	Difference	ppm	Difference	ppm	Difference
N-methylaniline	5.52	5.00	0.52	3.35	2.17	4.52	1.00
Aniline	4.99	5.16	−0.17	3.20	1.79	3.96	1.03
	4.99	5.39	−0.40	3.20	1.79	3.96	1.03
Valerolactam	7.34	6.96	0.38	4.62	2.72	5.81	1.53
Acetamide	6.70	6.28	0.42	4.38	2.32	5.28	1.42
	7.30	6.85	0.45	4.74	2.56	5.95	1.35

The ONIOM2 calculated NMR shifts for the acidic amine protons can be seen in [Table 1](#). Also seen are the experimental NMR shift values, and the corresponding gas-phase model and IEFPCM re-

sults. The differences from the experimental value are shown for clarity. The shifts from all protons are shown in [Supplementary Data](#) available online.

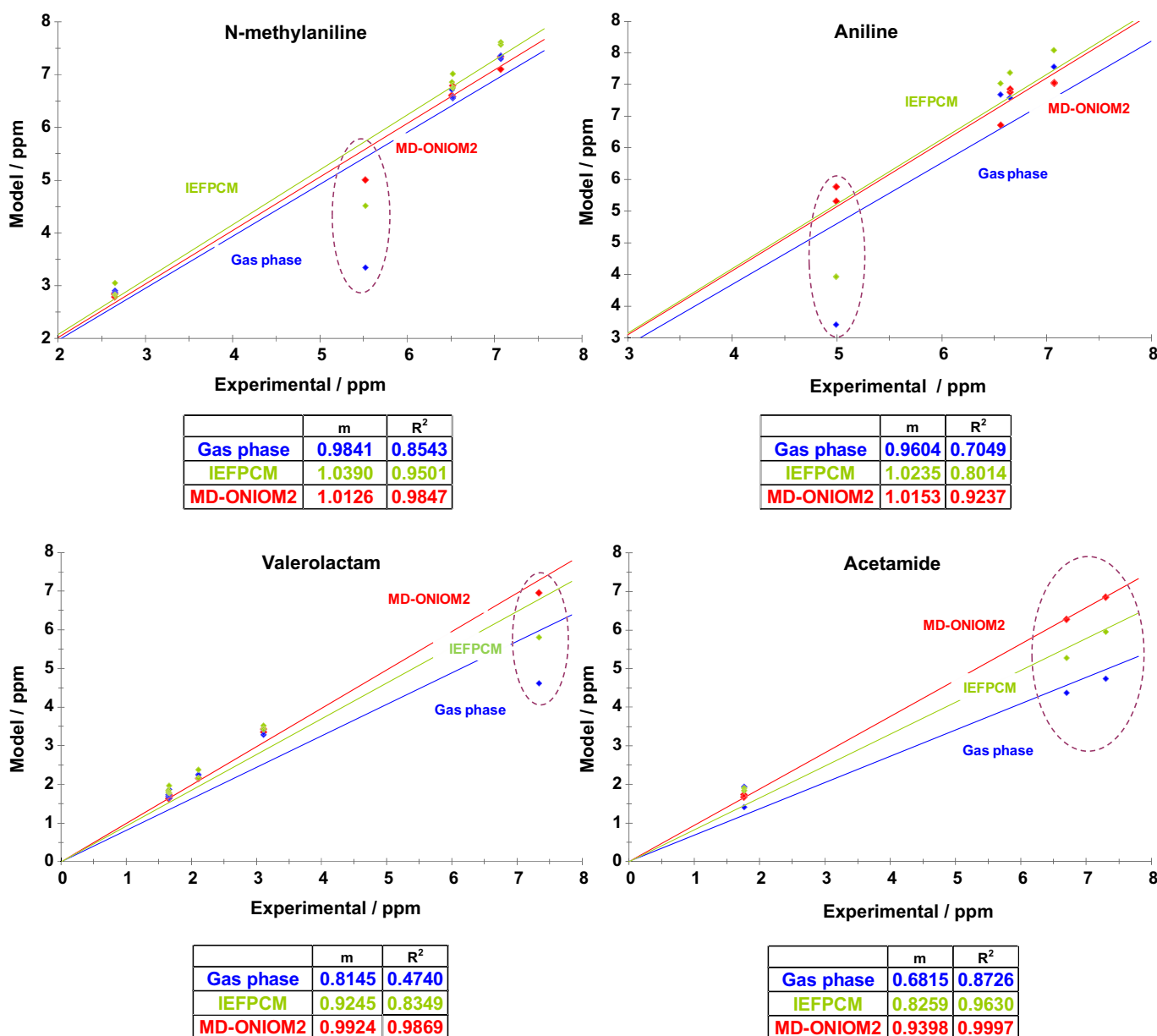


Fig. 3. Modelled NMR shifts plotted against experimental values are shown. The slope and correlation are also given for least squares regression lines which are constrained to go through the origin, since all shifts are relative to TMS. It can be seen that the MD-ONIOM2 results are very close to the ideal line which would have $m = 1$ and $R^2 = 1$. The encircled points are the shifts of the acidic protons and show the large variation in their predicted values.

The three models give similar predictions of NMR shifts for all the non-acidic protons. However, for the acidic amine protons, the gas-phase model gives the poorest predictions and ONIOM2 the best. The IEFPCM predictions are approximately halfway between the other two. This can be seen in the graphs of Fig. 3 which plot the predicted shifts against the experimentally measured shifts of all the protons. Using least squares regression analysis, the slope and correlation for a line fitted to each set of points is also given. The regression line is constrained to go through the origin as both modelled and experimental shifts are relative to TMS with a shift of 0 ppm. For a perfect model, the resultant points would lie on a line with a slope, $m = 1$, and correlation, $R^2 = 1$. MD-ONIOM2 gives results closest to the ideal. The gas-phase model especially but also IEFPCM consistently give shifts for the acid protons that are too low. The IEFPCM also consistently overestimates the shifts of all the non-acid protons.

It should also be noted that the *cis*- and *trans*-protons in acetamide are also well modelled and different values for each predicted. Additionally, either acid proton can be chosen as the centre for the RDF as all the bonded DMSO molecules will still be observed and the same snapshots used in ONIOM2.

4. Conclusion

The MD-ONIOM2 method has been shown to be capable of modelling the interaction between a solute with acidic protons and a polar solvent, including the hydrogen bonding. MD shows that in the solvation shell, a DMSO molecule is generally attached to each acidic proton, and there is exchange of solvent molecules over time. Averaging the ONIOM2 results from a sample set of

MD snapshots gives the final NMR shifts, with the desheilding from H-bonding properly included, and the other protons well described. The other two models are adequate if it is acceptable that the acidic protons and their complex local electronic environments do not need to be accurately described. This may be the case if modelling a solute in an apolar solvent such as chloroform.

Acknowledgement

The Thailand Research Fund (MRG5180282) and Kasetsart University Research and Development Institute are thanked for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.theochem.2009.12.038](https://doi.org/10.1016/j.theochem.2009.12.038).

References

- [1] V. Vailikhit, W. Tressuwan, S. Hannongbua, J. Mol. Struct. (THEOCHEM) 806 (2007) 99.
- [2] SYBYL 7.0, Tripos Associates Inc., 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis, Missouri 63144, USA.
- [3] M.J. Frisch et al., Gaussian03, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [4] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, K.M. Merz, D.A. Pearlman, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, K.F. Wong, F. Paesani, X. Wu, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, D.H. Mathews, C. Schafmeister, W.S. Ross, P.A. Kollman, AMBER 9, University of California, San Francisco, 2006.
- [5] R.J. Abraham, J.J. Byrne, L. Griffiths, M. Perez, Magn. Reson. Chem. 44 (2006) 491.