Syaniiniväriaineet ja niiden synteesit

Pro gradu-tutkielma

Johanna Alaranta

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

18.5.2020

Tiivistelmä

Tämä Pro gradu-tutkielma käsittelee erilaisia syaniiniväriaineita ja niiden synteesejä. Työssä käydään läpi esimerkkejä kirjallisuudessa esitetyistä synteeseistä, vertaillaan niitä toisiinsa sekä esitellään näiden erilaisia käyttökohteita.

Tutkielman kokeellisessa osassa oli tavoitteena syntetisoida uusia lähtöaineita väriainesynteesiä varten sekä syntetisoida uusia väriaineita. Uusien lähtöaineiden synteesit toimivat hyvin, työssä saatiin syntetisoitua uusia fluorattuja kinoliineja, pyridiinejä sekä substituoituja tiatsoleja. Väriaineiden kaikki synteesit eivät tuottaneet haluttua tulosta, mutta yksi täysin uusi fluorattu syaniiniväriaine saatiin syntetisoitua.

Esipuhe

Tutkielman aiheeksi valitsin syaniiniväriaineet, koska niiden monipuoliset ominaisuudet ja FT Tanja Lahtisen tutkimusryhmän tarjoama poikkitieteellinen tutkimus vaikuttivat kiinnostavilta. Tutkielman kokeellinen osa keskittyi syaniiniväriaineiden synteesiin laboratoriossa, ja sen vuoksi kirjallisessa osassa haluttiin vertailla erilaisia kirjallisuudessa esitettyjä synteesejä ja kertoa niiden käyttökohteista.

Filosofian maisterin tutkintoon kuuluvaan Pro gradu-tutkielmaani kuului kokeellinen työ laboratoriossa ja kirjallinen työ. Tutkielman kokeellinen osa suoritettiin kesällä 2019 FT Tanja Lahtisen tutkimusryhmässä tohtorikoulutettava Ville Saarion ohjauksessa Jyväskylän yliopiston nanotiedekeskuksessa. Kirjallista työtä tehtiin syksyllä 2019 ja se viimeisteltiin keväällä 2020. Kirjallisuutta tutkielmaan etsittiin Google Scholarista, WOS-tietokannasta sekä yliopiston kirjaston kokoelmista. Hakusanoina käytettiin esimerkiksi ’’cyanine dyes’’, ’’cyanine dye synthesis’’ ja ’’dyes’’.

Haluan kiittää ohjaajaani FT Tanja Lahtista jatkuvasta kannustuksesta, hyvistä neuvoista ja uusien ovien avaamisesta. Kiitos myös tohtorikoulutettava Ville Saarniolle neuvoista ja tuesta kokeellista työtä tehdessä sekä kaikista vinkeistä tutkielman teon varrella. Lopuksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni, jotka jaksavat aina tukea ja kannustaa. Erityisesti haluan kiittää rakasta kihlattuani, joka uskoo minuun ja on auttamassa vaikeimpinakin hetkinä.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ I

ESIPUHE II

SISÄLLYSLUETTELO III

KÄYTETYT LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT V

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO 1

2 SYANIINIVÄRIAINEET 7

2.1 Yleistä 7

2.2. Esimerkkejä synteeseistä 8

3 SYANIINIVÄRIAINEIDEN KÄYTTÖKOHTEITA JA SOVELLUKSIA 47

3.1 Nukleiinihappoihin sitoutuvat syaniiniväriaineet 47

3.2 Syaniiniväriaineiden lääketieteelliset käyttökohteet 48

3.3 Nanomateriaalit 55

3.4 Aggregaatit 57

4 YHTEENVETO 59

KOKEELLINEN OSA

5 TYÖN TARKOITUS 62

6 KÄYTETYT LAITTEET JA REAGENSSIT 62

7 YLEISTÄ SYNTEESEISTÄ 63

7.1 Kinoliinien ja pyridiinien synteesit 65

7.2 Bentsotiasolien synteesit 70

7.3 Syaniiniväriaineiden synteesit 72

8 SYNTEESIOHJEET 77

8.1 THX-022 ja THX-023 77

8.2 THX-024, THX-029 ja THX-031 78

8.3 THX-032 79

8.4 THX-033 80
8.5 THX-034 81
8.6 THX-035 82
8.7 THX-036 83
8.8 THX-037 83
8.9 THX-038 84
8.10 THX-039 85
8.11 THX-040 86
8.12 THX-041 A ja B 86
8.13 THX-042 87
9 TULOKSET 89
10 YHTEENVETO 91
11 KIRJALLISUUS 91

Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat

1,2-DCE	Dikloorietaani
Ac_2O	Asetanhydridi
ACN	Asetonitriili
AcOH	Etikkahappo
AcONa	Natriumasetaatti
Aggregaatti	Monomeereistä muodostuva itsejärjestäytynyt systeemi
Buffer	Puskuriliuos
CLB	Klooriambusiili
DCC	Disykloheksyylikarbodi-imidi
DCM	Dikloorimetaani
DEAD	Dietyyliatsodikarboksylaatti
DIPEA, DIEA	*N,N*-Di-isopropyylietyyliamiini
DMF	Dimetyyliformamidi
Et_3N	Trietyyliamiini
EtOH	Etanoli
GC	G-quadruplex
HATU	(1-[Bis(dimetyyliamino)metyleeni]-1H-1,2,3-triatsolo[4,5-b]pyridinum-3-oksidiheksafluorifosfaatti
HNMe2	Dimetyyliamiini
Kromofori	Molekyylin osa, joka saa aikaan molekyylin värin
MeOH	Metanoli
MeOTf	Metyylitrifluorometaanisulfonaatti
NTR	Nitroreduktaasi

PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
$POCl_3$	Fosforioksikloridi
PPA	Fenyylipropanoliamiini
Probe	Koetin
Py	Pyridiini
TEA	Trietyyliamiini
TFA	Trifluorietikkahappo
THF	Tetrahydrofuraani
TSTU	*N,N,N',N'*-tetrametyyli-O-(*N*-butaani-imidyl)uroniumtetrafluoriboraatti

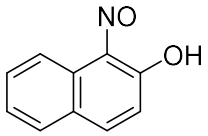
KIRJALLISUUSOSA

1. Johdanto

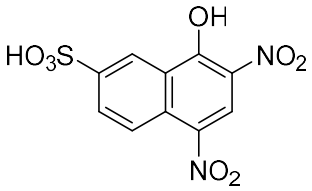
Ihmisiä ovat jo tuhansia vuosia kiehtoneet värit ja erilaisia väriaineita ja värjäysmetodeja on käytetty jo antiikin Egyptissä.[1] Varhaiset väriaineet olivat peräisin luonnosta, kasveista tai osa myös eläimistä. Aluksi väriaineita käytettiin paljon esimerkiksi vaatteiden värjäämiseen, mutta vuosien saatossa erilaiset väriaineet ja käyttökohteet ovat lisääntyneet huomattavasti.[1,2]

Väriaineet ovat usein orgaanisia molekyylejä tai seoksia, jotka värjäävät halutun materiaalin, kuten kankaan, paperin, muovin tai nahkan. Väriaineen täytyy siis usein kestää hyvin pesua ja valoa säilyttäen värinsä. Kaikki väriaineet eivät kuitenkaan ole värillisiä. Valkoiset väriaineet voivat kirkastaa värejä tai niitä voidaan käyttää valkaisuun. Kaikki värilliset molekyylit tai seokset eivät ole väriaineita, vaan olennaista on, että väriaine pystyy pysyvästi muuttamaan halutun kohteen väriä. Väriaineet jaotellaan eri ryhmiin sen perusteella, mikä osa molekyyliä aiheuttaa sen värin eli kromoforin perusteella.[1]

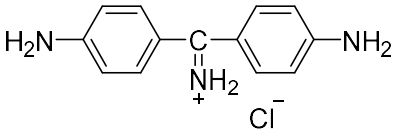
Seuraavaksi esitellään erilaisten orgaanisten väriaineiden rakenteet kuvassa 1 ja käydään lyhyesti läpi, mistä ne saavat värinsä ja millaisia käyttökohteita niillä on.



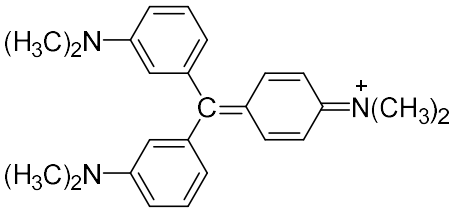
Naphtol Green G
Nitroso väriaineet



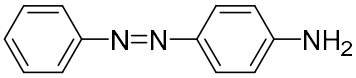
Naphthol Yellow S
Nitro väriaineet



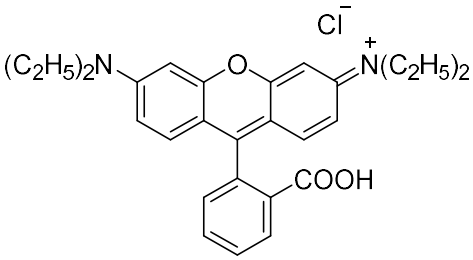
Auramine O
Difenyylimetaani väriaineet



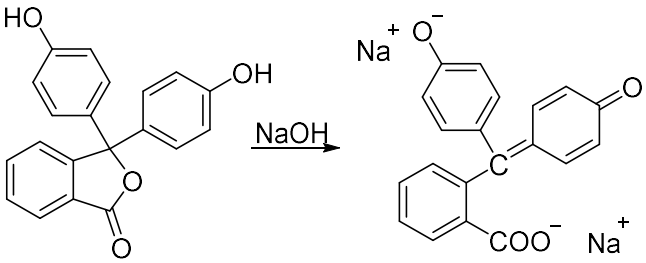
Crystal violet
Trifenyylimetaani väriaineet



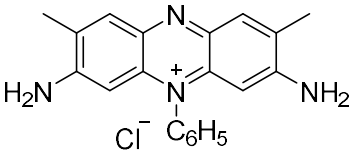
Aniline Yellow
Atso väriaineet



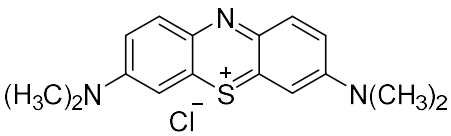
Rhodamine B
Ksantaani väriaineet



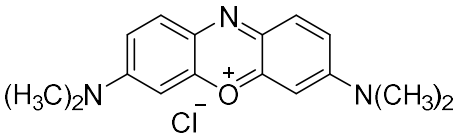
Fenoliftaleiini
Ftaleiini väriaineet



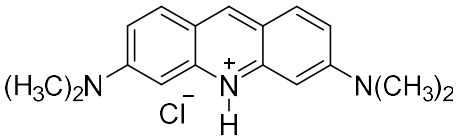
Safranine T
Atsiini väriaineet



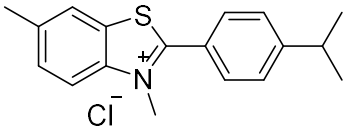
Methylene blue
Tiasiini väriaineet



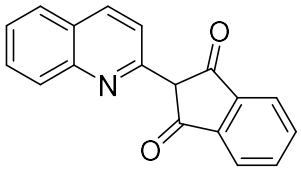
Capri blue GN
Oksasiini väriaineet



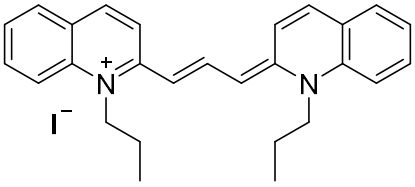
Acridine orange R
Akridiini väriaineet



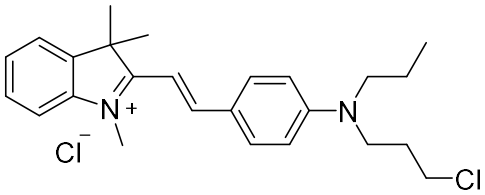
Thioflavin
Tiasoli väriaineet



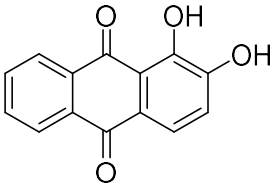
Quinoline Yellow
Kinoliini väriaineet



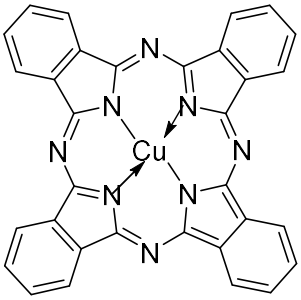
Pinacyanol
Syaniini väriaineet



Astrazone Pink FG
Polymeteeni väriaineet



Alizarin
Antrakinoni väriaineet



Monastral Fast Blue BS
Ftalosyaniini väriaineet

Kuva 1. Esimerkkejä erilaisista väriaineista jaoteltuna niiden kromoforin perusteella.[1]

Kuvassa 1 on esiteltynä muutamia erilaisia orgaanisia väriaineita. Tässä kuvassa on esiteltynä vain yksi esimerkki kustakin väriainekategoriasta, mutta kaikki näistä voivat sisältää myös erilaisia substituentteja, jotka vaikuttavat väriaineen ominaisuuksiin.

Nitrosoväriaineissa on nimensä mukaisesti kromoforina nitrosoryhmä –N=O kromoforina, joka voi tautomerisoitua –NOH:ksi. Tämän ryhmän väriaineita voidaan käyttää komplekseina esimerkiksi raudan kanssa, jolloin ne muodostavat vihreitä värejä. Myös muut metallikompleksit ovat mahdollisia, jolloin saatavat värit ovat erilaisia. Ilman metalleja molekyylit eivät ole värillisiä. Nitrosoväriaineilla voidaan värjätä esimerkiksi villaa, paperia, nahkaa tai sitä voidaan käyttää maaleissa.[3]

Nitroryhmän väriaineet sisältävät kromoforina nitroryhmän $–NO_2$. Nitroväriaineiden ensimmäinen käyttökohde oli villan värjääminen, mutta nykyään niitä voidaan käyttää myös esimerkiksi synteettisten kuitujen värjäämiseen ja joitakin myös räjähteinä. Lisäksi joillakin tämän ryhmän väriaineilla on biologisia ominaisuuksia ja niitä voidaan käyttää esimerkiksi virusinfektioiden hoitamiseen.[3]

Atsoväriaineissa on ainakin yksi atsoryhmä –N=N-. Niitä on käytetty hyvin laajasti vaatteiden värjäykseen teollisuudessa. Viime aikoina on kuitenkin tullut ilmi, että nämä väriaineet aiheuttavat ongelmia luonnossa, koska ne hajoavat huonosti ja aiheuttavat erilaisille organismeille esimerkiksi mutaatioita.[4]

Difenyylimetaaniväriaineet ovat difenyylimetyylijohdannaisia, joita käytetään väriaineina suoloina. Vastaavasti *trifenyylimetyyliväriaineet* ovat trifenyylimetyylijohdannaisia, joita käytetään myös suoloina. Varauksettomina molekyyleinä ne eivät toimi väriaineina. Näitä väriaineita voidaan käyttää esimerkiksi paperin, silkin ja nahan värjäämiseen .[1]

Ftaleiiniväriaineet ovat yksiä yleisimmin käytettävistä happo-emäsindikaattoreista. Kuvassa 1 on esitetty väriaineen muoto ennen emäksen lisäystä, jolloin se on väritön. Emäksen lisäyksen jälkeen viisirengas aukeaa, mikä voidaan nähdä liuoksen värin muutoksena. Ftaleiiniväriaineilla on kuitenkin monia muitakin käyttökohteita, kuten liimat, erilaiset hygieniatuotteet ja niillä on myös joitain biologisia käyttökohteita esimerkiksi verianalyyseissä ja genomiikassa.[5]

Ksantaaniväriaineissa kromofori on kuvassa 1 nähtävä kolmen renkaan muodostama rakenne. Siinä voi olla kiinnittyneenä monia erilaisia substituentteja, kuten tässä

tapauksessa on myös yksi ylimääräinen rengas, bentsoehappo. Ksantaaniväriaineet ovat usein fluoresoivia ja ne eivät välttämättä itse ole kovin valoa kestäviä, mutta silti niiden käyttökohteet ovat melko perinteisiä, esimerkiksi villaa, silkkiä ja paperia voidaan värjätä ksantaaniväriaineilla. Niitä käytetään myös kosmetiikan, ruuan ja lääkkeiden värjäämiseen. Fluoresenssiominaisuuksia voidaan hyödyntää myös biologisissa ja lääketieteellisissä tutkimuksissa.[6]

Atsiini, tiatsiini ja oksatsiini ovat kaikki hyvin saman näköisiä väriaineita. Niissä on samanlainen kromofori kaikissa, ainoastaan heteroatomit vaihtelevat. Kaikki edellä mainitut väriaineet muodostuvat kolmesta renkaasta, joista keskimmäisessä on kaksi heteroatomia vastakkaisilla puolilla rengasta. Kaikissa toinen heteroatomi on typpi. Atsiinissa on kaksi typpeä, tiatsiinissä toinen heteroatomi on rikki ja oksatsiinissä happi. Myös näiden väriaineiden väri perustuu hapettamis-pelkistämisreaktioon, ja monia niistä onkin käytetty indikaattoreina. Metyleenisininen on eniten käytetty väriaine näistä luokista. Sitä voidaan käyttää tekstiilien värjäämiseen, biologisissa sovelluksissa, diagnostiikassa ja sen johdannaista käytetään myös lääkkeenä Alzheimerin tautiin.[7]

Akridiiniväriaineet ovat hyvin lähellä edellä esiteltyjä väriaineita rakenteeltaan. Niissä on myös kolmen renkaan muodostama systeemi, mutta tässä tapauksessa heteroatomeja on vain yksi ja se on typpi. Näitä väriaineita käytetään löytyvän kirjallisuuden perusteella vähemmän kuin edellisiä. Akridiinit voivat sitoutua DNA:han, jolloin niitä voidaan käyttää erilaisissa biologisissa sovelluksissa.[8]

Tiatsoliväriaineissa kromoforina on tiatsoli, eli bentseenirengas, johon on kiinnittynyt viisi rengas, jossa on rikki- ja typpiatomit välittömästi bentseenirenkaan jälkeen viisirenkaassa. Tiatsoliväriaineille löytyi hyvin vähän eri käyttökohteita. Merkittävin löydetyistä oli se, että tioflaviini T sitoutuu amyloidifibriileihin. Tämän ominaisuuden ansioista sen avulla voidaan diagnosoida erilaisia sairauksia, kuten Alzheimerin tautia.[9]

Kinoliiniväriaineissa kromofori on nimensä mukaisesti kinoliini. Kinoliinissä bentseenirengas ja pyridiini muodostavat rungon, jossa voi olla mukana erilaisia substituentteja. Kinoliiniväriaineita on käytetty lisäaineina ruuassa, lääkkeissä ja kosmetiikassa. Myös niiden biologisia sovelluksia on tutkittu ja niiden on huomattu

olevan myrkyllisiä syöpäsoluille. Myös niiden käyttöä fluoresoivina tekstiiliväriaineena on tutkittu.[10]

Antrakinoniväriaineissa on myös kolmen renkaan muodostama kromofori. Siinä keskellä olevassa renkaassa on kaksi karbonyyliryhmää keskimmäisessä renkaassa toisiinsa nähden *para*-asemassa. Antakinonien värikirjo on laaja ja niitä käytettiinkin alun perin esimerkiksi villan värjäämiseen. Myöhemmin myös synteettisten kuitujen värjääminen ja erilaiset pigmentit ovat antrakinonien merkittävimpiä käyttökohteita. Antrakinonit ovat yksi teollisuuden eniten käyttämistä väriaineista.[11]

Ftalosyaniiniväriaineissa kromoforina on neljän bentseenirenkaan ja viiden viisirenkaan, sekä typpiatomien muodostama metalleja sitova kompleksi. Ilman metalleja molekyyli ei ole värillinen. Ftalosyaniiniväriaineet kestävät erittäin hyvin lämpöä ja valoa, joten niitä voidaan käyttää esimerkiksi maaleissa, puuvillan ja paperin värjäämisessä sekä tulostimien värikaseteissa. Värisävyt näillä väriaineilla ovat rajatut vihreään ja siniseen, mutta joissain tapauksissa voidaan päästä lähelle infrapuna-aallonpituutta. Näitä infrapuna-aallonpituuksilla fluoresoivia ftalosyaniiniväriaineita voidaan käyttää esimerkiksi lasereissa, pesuaineissa ja syövän fototerapiassa.[12]

Syaniiniväriaineissa on kahden heteronukleaarisen typpiatomin välissä konjugoitunut hiiliketju. Syaniiniväriaineita on käytetty paljon teollisuuden tarpeisiin, esimerkiksi vaatteiden värjäykseen, koska niiden synteesit ovat melko yksinkertaisia ja erilaisia värejä on paljon. Viime aikoina syaniiniväriaineiden tutkimus on keskittynyt niiden kykyyn sitoutua nukleiinihappohin ja fluoresenssiominaisuuksiin esimerkiksi lääketieteessä.[13]

Orgaanisia väriaineita on siis paljon erilaisia ja niillä on monia eri käyttökohteita niin vaateteollisuudessa ja esimerkiksi maalien teossa kuin biologisissa ja lääketieteellisissä käyttökohteissa. Syaniiniväriaineet ovat vain yksi luokka tätä laajaa kirjoa, mutta niiden ominaisuudet tekevät niistä hyvin mielenkiintoisen tutkimuskohteen.

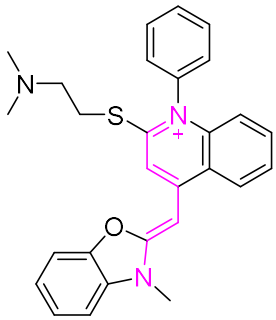
Seuraavassa kappaleessa lähdetään käsittelemään syaniiniväriaineita tarkemmin. Ensin käsitellään yleisiä asioita ja tämän jälkeen siirrytään synteesien vertailuun ja käyttökohteisiin.

2. Syaniiniväriaineet

2.1. Yleistä

Klassisen määritelmän mukaan syaniiniväriaineissa on kromoforina konjugoitunut hiiliketju, jonka molemmissa päissä ovat typpiatomit osana rengasta. Alun perin myös syaniiniväriaineita käytettiin vaatteiden värjäykseen, mutta käyttökohteita on tullut paljon lisää tutkimusten myötä. Esimerkiksi myös valokuvien värit olivat mahdollisia syaniiniväriaineiden avulla. Näissä tapauksissa hyödynnetään näkyvän valon aallonpituuksia, tällöin esimerkiksi punainen vaate absorboi kaikkia muita valon aallonpituuksia paitsi punaista, jolloin vaate näyttää punaiselta. Nykyään vallitseva tutkimus keskittyy väriaineiden fluoresenssiin ja sen hyödyntämiseen esimerkiksi solujen kuvantamisessa.[13]

Kuvassa 2 esitellään hyvin tunnetun ja yleisesti käytetyn syaniiniväriaineen SYBR Green II:n rakenne, jonka kiderakenne julkaistiin vuonna 2020.[14] Violetilla värillä on korostettu edellä esitetty syaniiniväriaineiden määritelmä.



SYBR Green II

Kuva 2. Kaupallisesti saatavilla olevan syaniiniväriaineen SYBR Green II rakenne.[14]

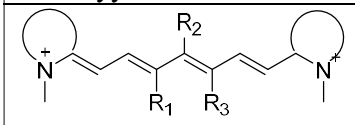
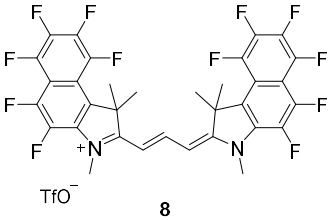
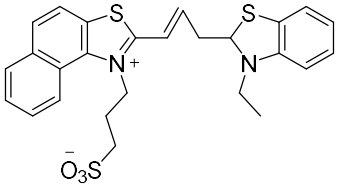
Seuraavassa kappaleessa esitellään muutamia viime aikoina julkaistuja tai ominaisuuksiltaan kiinnostavia syaniiniväriaineita ja niiden synteesejä.

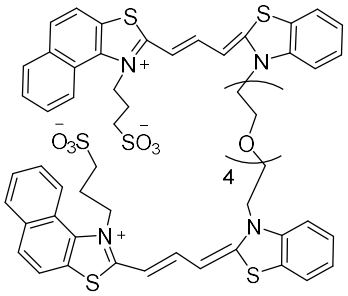
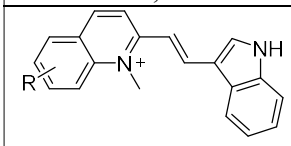
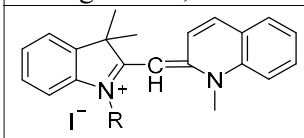
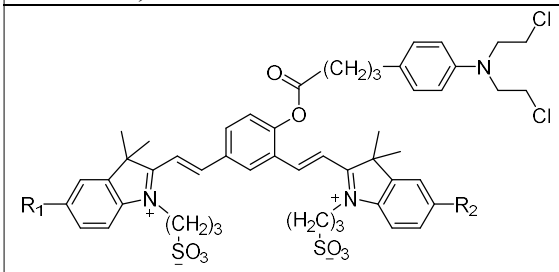
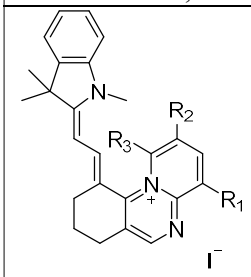
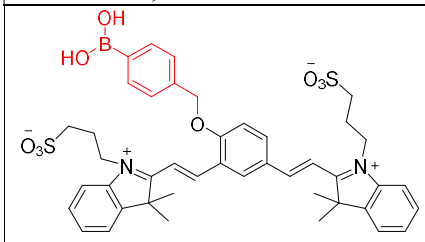
2.2. Esimerkkejä syaniiniväriaineiden synteeseistä

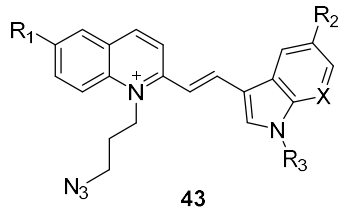
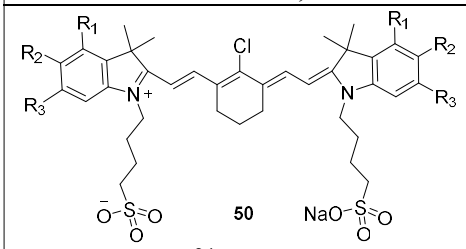
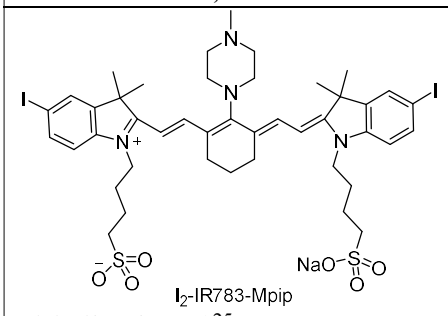
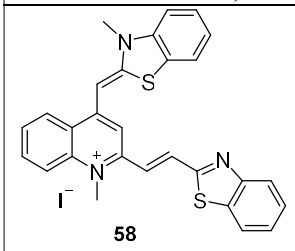
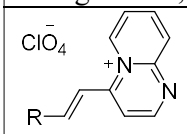
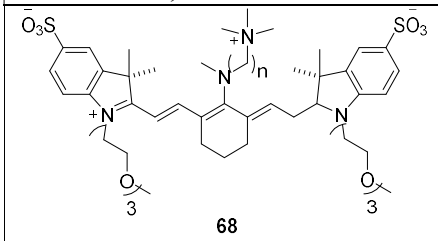
Syaniiniväriaineiden synteeseissä ei ole yhtä yhtenäistä kaavaa. Niitä on monia erilaisia ja niissä käytetään paljon erilaisia lähtöaineita, liuottimia ja katalyyttejä. Usein niissä on kuitenkin lähtöaineena, tai synteesin jossain vaiheessa syntetisoidaan, heterosykli, jossa on bentseenirengas ja viisirengas ja jossa on myös typpi mukana. Liuottimena käytetään useissa tapauksissa etanolia, ja piperdiini on yleinen katalyytti. Myöskin synteesien kestot ja niiden herkkyys ilmalle ja kosteudelle vaihtelevat paljon. Jotkut vaativat pitkiä kuumennuksia korkeissa lämpötiloissa ja toiset taas toimivat paljon miedoimmissa olosuhteissa.

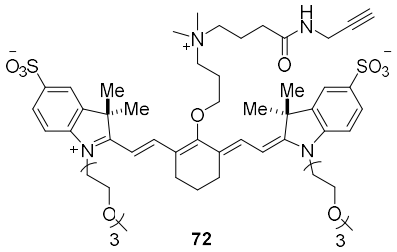
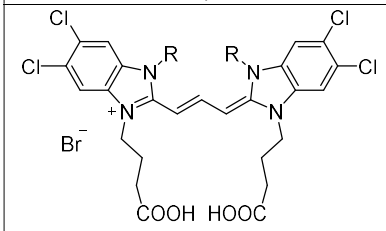
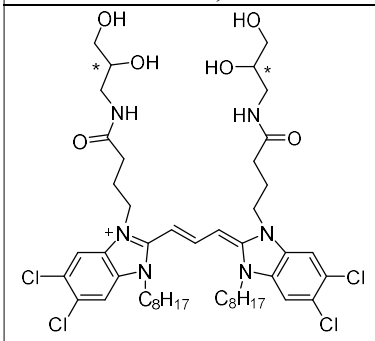
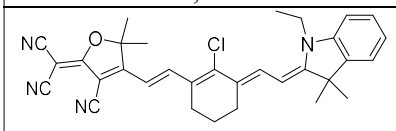
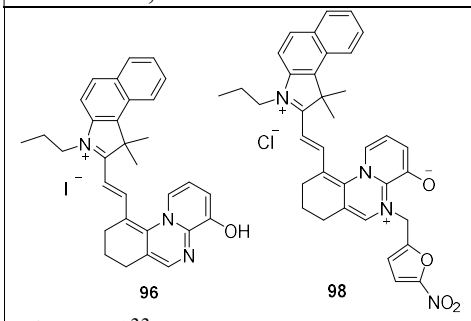
Taulukossa 1 esitetään tässä kappaleessa käsiteltävien synteesireittien tuotteena saatavat väriaineet ja niiden saantoprosentit.

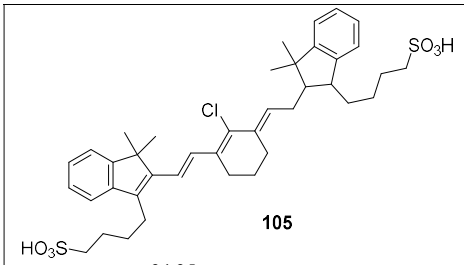
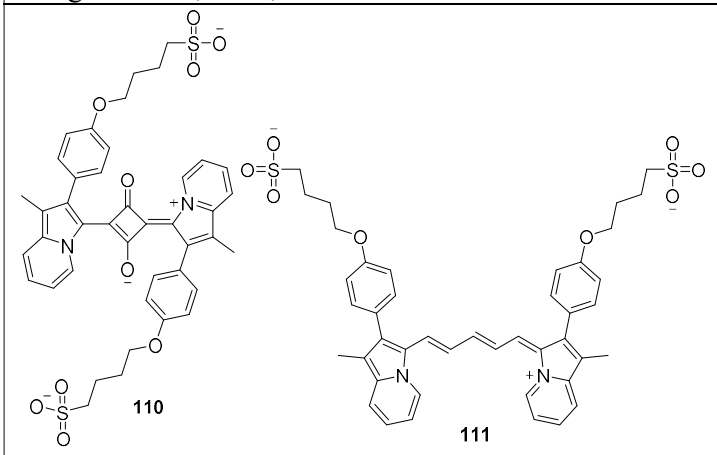
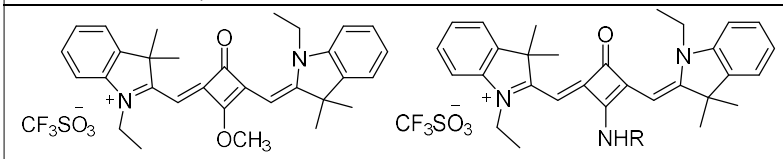
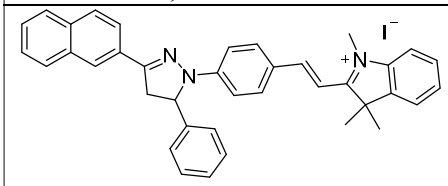
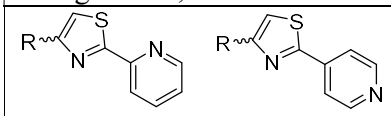
Taulukko 1. Kaikki työssä esitellyt väriaineet ja niiden saannot

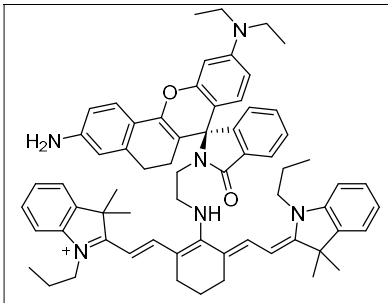
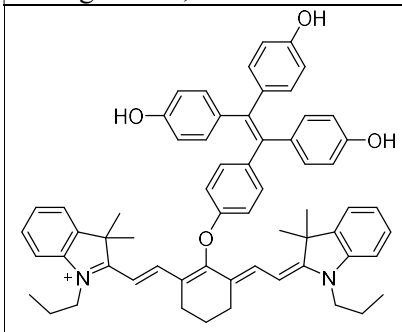
Molekyyli	Saanto
 6 Stácková *et al.*[15], 2019	40-90 %
 8 Funabiki *et al.*[16], 2019	56-70 %
 16 TC	**16 TC** 82,1 % **18 TC-P4** 38,9 %

 18 TC-P4 Sun *et al.*[17], 2015	
 21 Zhang *et al.*[18], 2008	89-98 %
 26 Fu *et al.*[19], 2009	Parhaimmillaan 59,0 %
 30 Bokan *et al.*[20], 2019	**30a** 23% **30b** 31%* *molemmat syntetisoidaan samaan aikaan
 33 Sha *et al.*[21], 2018	16-41 %
 38	68 %

Karton-Lifshin *et al.*[22], 2011	
 **43** Schwechheimer *et al.*[23], 2018	63-89 %
 **50** Atchison *et al.*[24], 2017	**50a** 33 % **50b** 41 %
 I_2-IR783-Mpip Siriwibool *et al.*[25], 2020	80,4 %
 **58** Wang *et al.*[26], 2018	56 %
 **61** Chen *et al.*[27], 2019	52,4-66,7 %
 **68** Cha *et al.*[28], 2018	**68a** 86% **68b** 67 %

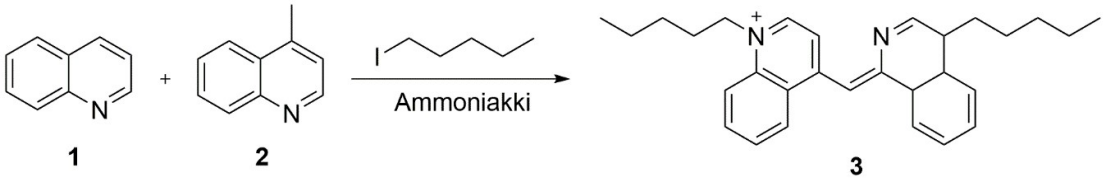
 **72** Luciano *et al.*[29], 2019	71 %
 **77** De Rossi *et al.*[30], 1995	17-35 %
 **82** Schade *et al.*[31], 2020	Saantoa ei ilmoitettu
 **93** Mu *et al.*[32], 2020	65,5 %
 **96** **98** Sha *et al.*[33], 2020	**96** 56,9% **98** 42,3 %

 105 Yang *et al.*[34,35], 2019, 2020	97,8 %
 110 111 Meador *et al.*[36], 2020	**110** 60 % **111** 53%
 115 116 Lima *et al.*[37], 2020	**115** 98% **116** 54-78%
 126 Wang *et al.*[38], 2019	63,9 %
 129 131 Eryılmaz *et al.*[39], 2020	**129** 60-75 % **131** 55-72%

 138 Zhang *et al.*[40], 2018	Saantoa ei ilmoitettu
 141 Fang *et al.*[41], 2018	48,0 %

Taulukosta 1 nähdään, että saannot vaihtelevat melkoisesti synteesien välillä ja joskus myös saman synteesin sisällä. Suurin osa synteesien saannoista oli välillä 60-70%. Mukaan mahtuu myös todella huonoja saantoja, alle 20 % ja todella erinomaisia saantoja, lähes 100 %.

Ensimmäisenä syaniiniväriaineena pidetään kuvassa 3 esiteltävää Williamsin[42] syntetisoimaa syaniiniväriainetta **3**.

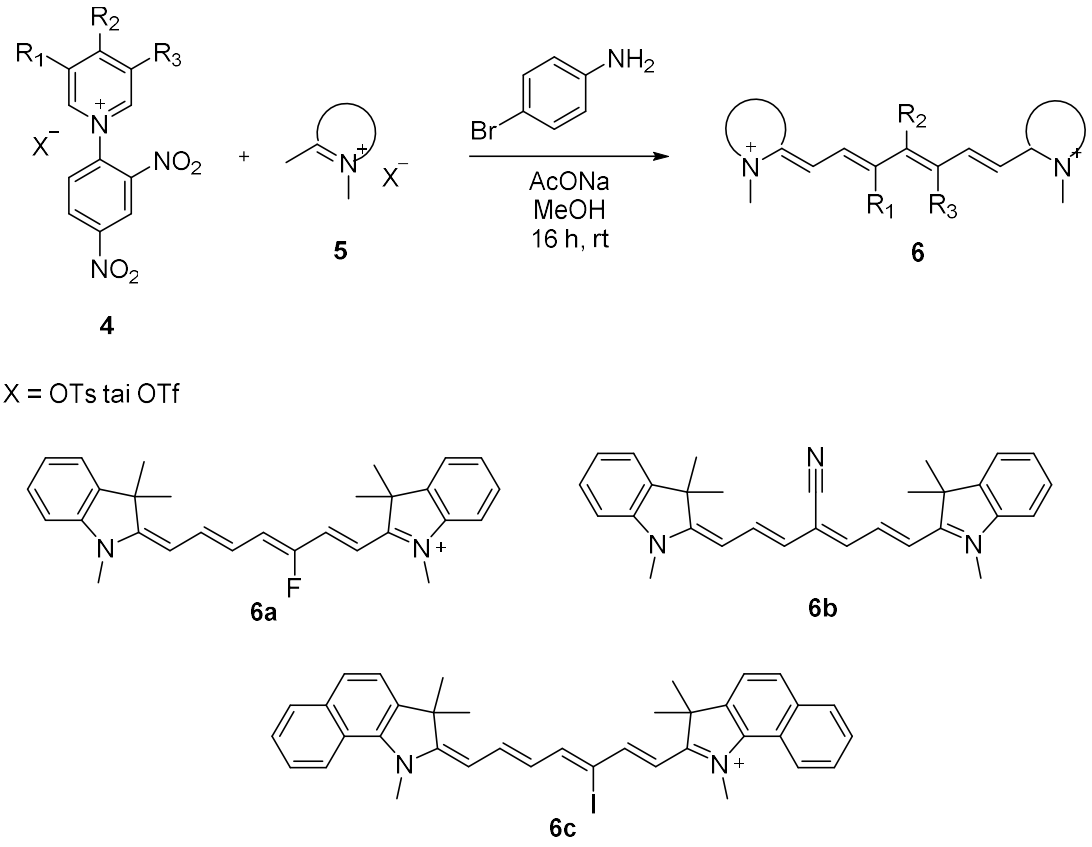


Kuva 3. Williamsin[42] esittämän syaniiniväriaineen synteesikuvaus.

Väriaine löytyi vahingossa vuonna 1856, kun Williams yhdisti kinoliinia **1** ja jodipentaania sekä käytti liuottimena ammoniakkia. Kinoliini sisälsi epäpuhtautena

lepidiiniä **2**, joka on mukana toisena syaniiniväriaineen heterosyklinä. Syaniiniväriaine **3** on väriltään kirkkaan sinistä.[42] Tämän jälkeen syaniiniväriaineiden kehitys lähti nousuun ja nykyään niitä käytetään laajasti erilaisiin käyttötarkoituksiin kuten solujen kuvantamiseen, syövän hoitoon ja tutkimiseen ja ionien havaitsemiseen liuoksesta.

Štacková *et al.*[15] julkaisivat vuonna 2019 kuvassa 4 esiteltävän synteesireitin fluoratuille syaniiniväriaineille.

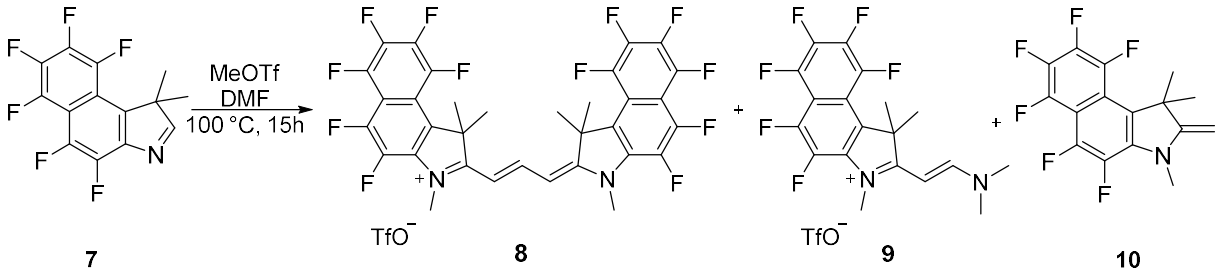


Kuva 4. Yleinen synteesikuvaus Štackován *et al.*[15] esittämästä synteesistä.

Štackován *et al.*[15] esittämä reaktio on melko yksinkertainen, mutta suola **4** täytyy erikseen valmistaa. Tämä vaatii kaksi tai kolme vaihetta pyridiinijohdannaisesta riippuen. Näihin vaiheisiin kuluu aikaa jonkin verran, koska ne vaativat pitkiä sekoituksia ja tuotteet täytyy puhdistaa ennen seuraavaa vaihetta. Synteesien saannot vaihtelivat 40 % ja 90 % välillä riippuen substituenteista R_1-R_3 ja heterosyklistä **5**. Parhaiten toimivat synteesit, joiden tuotteet **6a**, **6b** ja **6c** on esitetty kuvassa 4. Tuotteen **6a** saanto oli 90 %, tuotteen **6b** 86 %

ja tuotteen **6c** 87 %. Huonoin saanto tuli synteesissä, jossa R_2 oli karboksyyliryhmä ja toisessa synteesissä, jossa R_3 oli $–OCH_3$. Näissä muu rakenne vastasi **6a** ja **6b** rakennetta. Näissäkin synteeseissä saannot olivat 40 %. Yleisesti ottaen saannot olivat siis suhteellisen hyviä, yli 50 % lähes kaikissa.

Funabiki *et al.*[16] esittivät 2019 synteesireitin fluoratulle syaniiniväriaineelle. Tämä synteesireitti esitellään kuvassa 5.



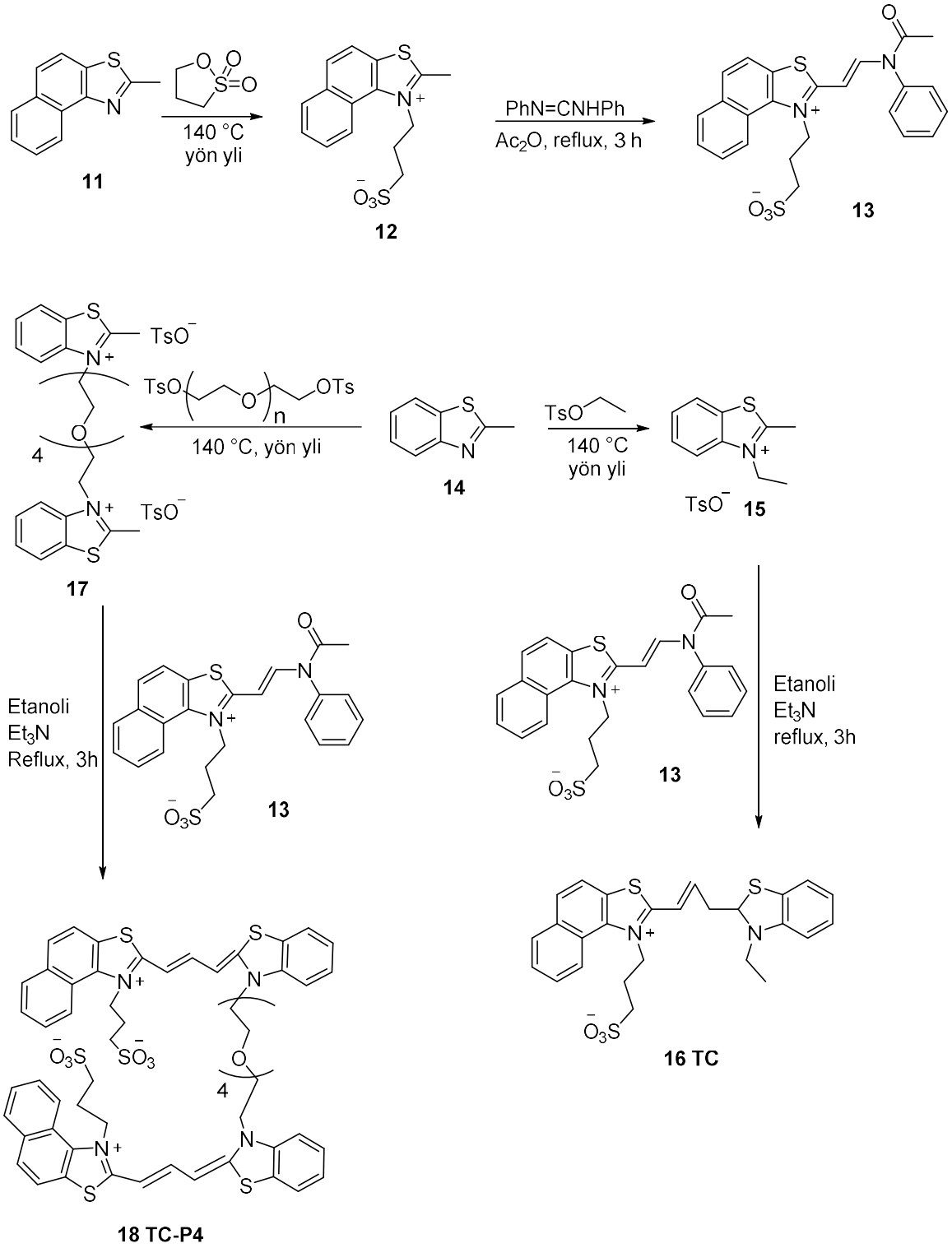
Kuva 5. Yleinen synteesikuvaus Funabikin *et al.*[16] esittämästä synteesistä

Funabikin *et al.*[16] esittämä synteesi vaikuttaa aluksi hyvin yksinkertaiselta ja sitä tämä viimeinen vaihe onkin, mutta lähtöaine **7** täytyy valmistaa erikseen ennen varsinaisen väriaineen synteesiä Morrison *et al.*[43] ohjeella. Tässä synteesissä ei ole mitään erikoisia vaiheita, mutta synteesin tekeminen vie melko kauan aikaa, koska synteesiin kuuluu kolme eri vaihetta. Näissä on pitkiä kuumennuksia ja edellinen tuote täytyy jokaisen vaiheen jälkeen puhdistaa ennen seuraavaan vaiheeseen siirtymistä.

Funabikin *et al.*[16] synteesissä on huonona puolena se, että siinä muodostuu kolmea eri synteesituotetta, jotka voidaan erottaa toisistaan, mutta synteesi ei tuota yksiselitteisesti vain yhtä. Tässä synteesissä haluttu tuote on väriaine **8**, ja tuotteet **9** ja **10** ovat sivutuotteita. Saannot vaihtelevat metyylitrifluorimetaanisulfonaatin (MeOTf) ja liuottimen määrän mukaan. Kun synteesi tehdään ilman liuotinta, saadaan vain tuotetta **10**. Kun liuotinta on 0,12 ml ja 5 ekvivalenttia MeOTf:ia, saadaan kaikkia kolmea tuotetta, mutta edelleen eniten tuotetta **10**. Liuottimen määrää vähentämällä tuotetta **10** ei enää saada. Tuotteen **8** saanto oli 56-70 % riippuen MeOTf:n määrästä ja liuottimesta. Paras saanto saatiin, kun liuottimena käytettiin puhtaan DMF:n sijaan DMF/PhMe suhteessa 1:1 ja MeOTf:ia 5 ekvivalenttia.

Edelliseen Štackován *et al.*[15] synteesiin verrattuna löytyy joitakin yhtäläisyyksiä. Vaiheita synteeseissä on yhtä monta ja molemmissa lähtöaine täytyy erikseen valmistaa ja puhdistaa ennen varsinaisen väriaineen synteesiä. Saannot olivat samaa luokkaa, joskin Štackován *et al.*[15] synteesissä saannot olivat hieman parempia. Tässä synteesissä on huonona puolena kolme eri tuotetta, mutta olosuhteet optimoimalla voidaan päästä eroon tuotteista, joita ei haluta.

Kuvassa 6 esitellään Sunin *et al.*[17] synteesireitti kahden erilaisen syaniiniväriaineen synteeseille.

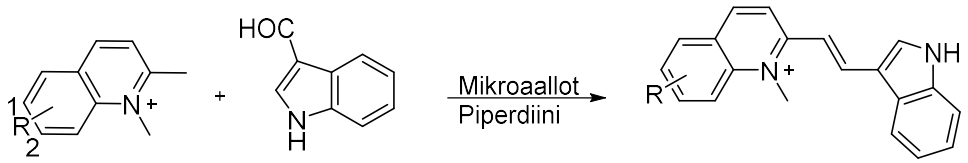


Kuva 6. Yleinen synteesikuvaus Sunin *et al.*[17] esittämästä synteesistä.

Sun *et al.*[17] esittivät vuonna 2015 synteesin uudelle väriaineelle **18 TC-P4**, jota voitaisiin käyttää lyijyn havaitsemiseen luonnonvesistä. Yu *et al.*[44,45] käyttivät Sunin *et al.*[17] synteesireittiä jatkotutkimuksissaan liittyen väriaineen **18 TC-P4** kykyyn muodostaa aggregaatteja. Tässä synteesireitissä saadaan kaksi hyvin erilaista väriainetta synteesin yhtä vaihetta muuttamalla. Vaiheita kummankin tuotteen saamiseen on neljä, niihin kuuluu jokaiseen vaiheeseen tuotteen puhdistaminen ja myös jotkut refluksoinnit ovat pitkiä, joten yksinkertaisimmasta päästä tämä synteesi ei ole. Saannot olivat tuotteelle **16 TC** 82,1 % ja tuotteelle **18 TC-P4** 38,9 %. Juuri tuon halutun tuotteen saanto oli siis heikompi.[17]

Vaiheita tässä Sunin *et al.*[17] synteesissä on yhtä monta kuin Funabikin *et al.*[16] ja Štackován *et al.*[15] esittämissä synteeseissä. Kahteen muuhun verrattuna tässä saadaan hyvin monimutkainen ja erikoinen tuote **18 TC-P4** syntetisoitua. Tässä syaniiniväriaineessa kromoforeja on yhden sijaan kaksi, koska molemmissa hiiliketjuissa on konjugoitunut hiiliketju kahden typpiatomin välissä.[17]

Zhang *et al.*[18] julkaisivat vuonna 2008 kuvassa 7 esiteltävän erittäin nopean ja helpon tavan syntetisoida syaniiniväriaineita käyttäen apuna mikroaaltoja



19 **20** **21**

R= **a**: H, **b**: 1-CH_3, **c**: 1-Cl, **d**: 1-Br, **e**: 2-CH_3, **f:** 2-Cl, **g**: 2-Br

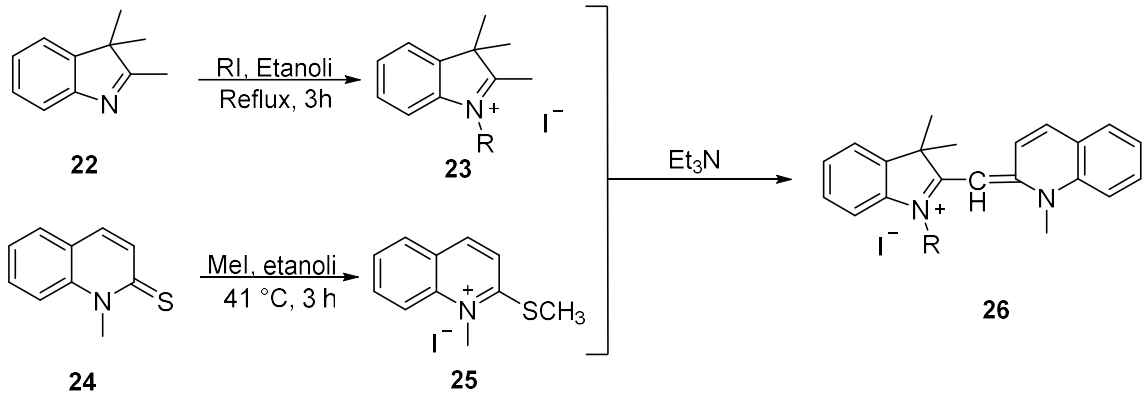
Kuva 7. Zhangin *et al.*[18] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Zhangin *et al.*[18] synteesi tehdään täysin ilman liuotinta; lähtöaineiden lisäksi reaktioon lisätään ainoastaan piperdiiniä katalyytiksi. Mikroaaltojen teho vaihteli 189-329 W välillä ja aika kahdesta viiteen minuuttiin. Täysin mikrossa tämä synteesi ei toimi, vaan heterosykli ja tätä vastaava suola **19** täytyy ensin valmistaa perinteisin synteesimenetelmin. Kinoliiniheterosyklin valmistaminen on suhteellisen yksinkertaista eikä se vaadi pitkiä refluksointeja, mutta suolan saaminen vaatii 15 tunnin refluksointia

metyylijodidin kanssa. Saannot olivat kaikissa tapauksissa todella hyviä, saannot vaihtelivat 89-98% välillä. [18]

Kolmeen aiempaan verrattuna kuitenkin tämä Zhangin *et al.*[18] synteesi on hyvin nopea eikä siinä tarvita liuotinta lainkaan, mikä etenkin Funabikin *et al.*[16] synteesin perusteella voi vaikuttaa hyvinkin radikaalisti siihen saadaanko haluttua tuotetta vai jotain aivan muuta.

Vuotta myöhemmin, 2009, Fu *et al.*[19] julkaisivat oman mikroaaltoavusteisen synteesinsä, joka esitellään kuvassa 8. Myös Fun *et al.*[19] synteesi toimii melko nopeasti ja ilman liuotinta. He tosin eivät päässeet yhtä hyviin saantoihin, saantojen ollessa parhaimmillaan 59,0 % kuin Zhang *et al.*[18], jotka saivat saannoksi yli 90 % lähes jokaisessa synteesissä.

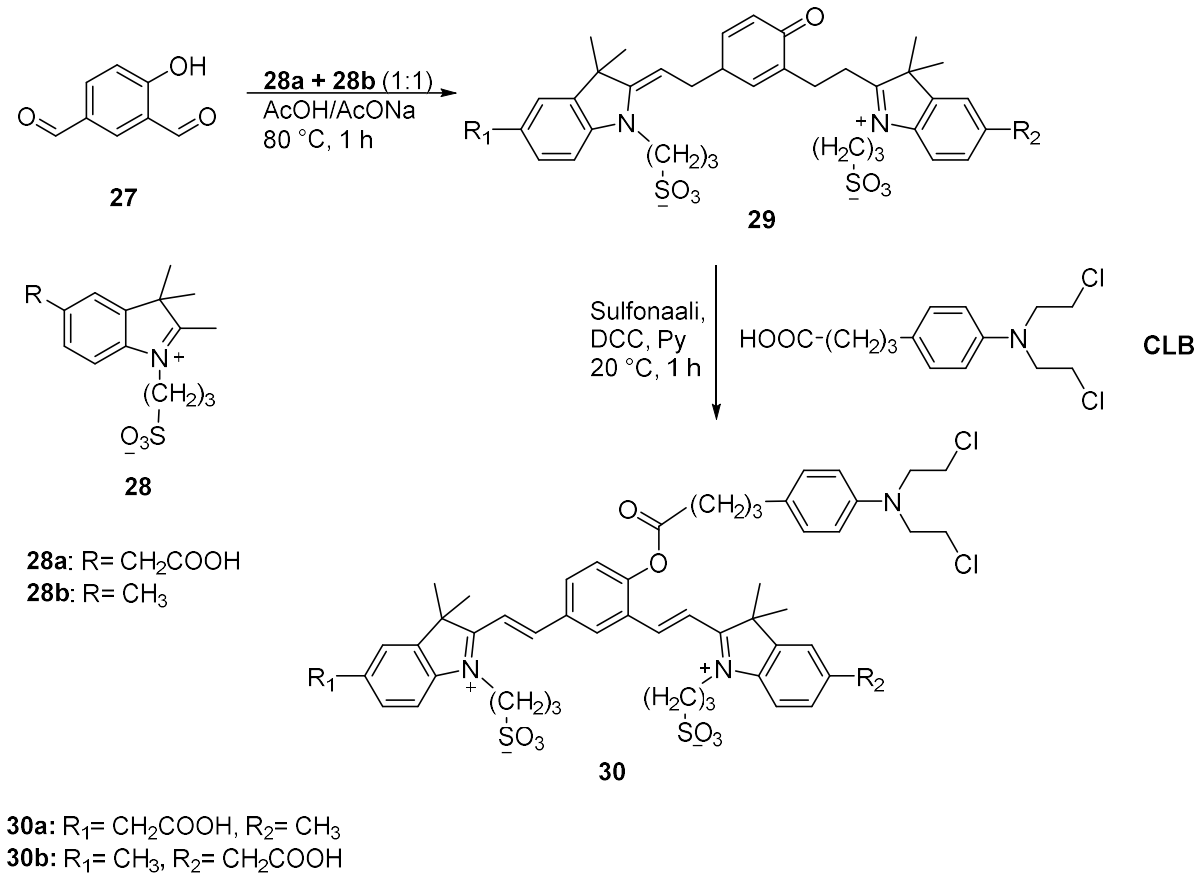


Kuva 8. Mikroaaltoavusteisen väriainesynteesin yleiskuvaus Fun *et al.*[19] mukaan.

Fun *et al.*[19] synteesissäkin alku tehtiin perinteisin synteesimenetelmin ilman mikroaaltoja. Toisessa reitissä refluksoitiin aluksi kaksi tuntia ja toisessa kuumennettiin 41 °C:ssa 3 tuntia. Synteesin toisessa osassa mikroaaltouunia käytettiin teholla 252 W ja katalyyttinä oli Et_3N:a. Mikrossa aikaa kului 15-18 minuuttia, mikä on paljon enemmän, kuin kuvassa 7 esitetyssä Zhangin *et al.*[18] synteesissä, jossa aikaa kului vain kahdesta viiteen minuuttiin. Kuitenkin verrattuna kaikkiin edellisiin synteeseihin tämä on kaikkein nopein ja yksinkertaisin tehdä. Lähtöaineet **22** ja **24** ovat kaupallisesti saatavia, joten niiden

tekemiseen ei kulu aikaa. Saannot olivat suurin piirtein samaa luokkaa kuin muissa aiemmin esitetyissä ilman mikroaaltoja toimivissa synteeseissä.

Bokan *et al.*[20] julkaisivat vuonna 2019 väriaineen, joka sitoutuu syöpälääkkeenä käytettyyn CLB:iin (klooriambusiiliin). Tämä synteesireitti esitellään kuvassa 9.

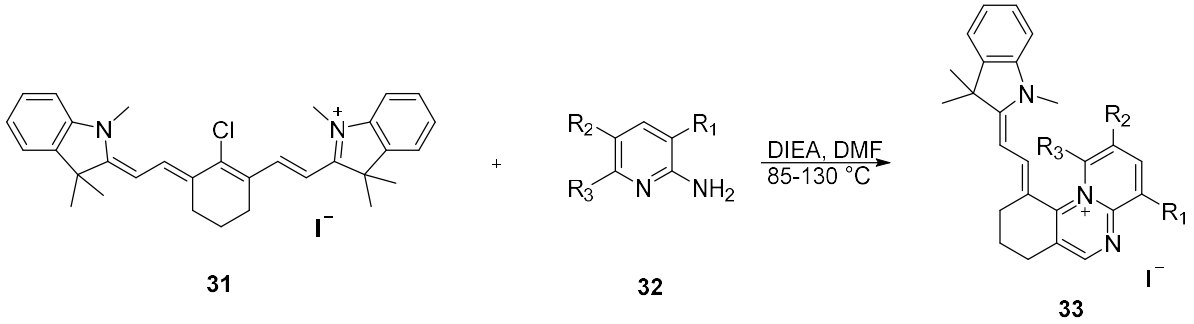


Kuva 9. Bokanin *et al.*[20] esittämän väriainesynteesin yleiskuvaus.

Bokanin *et al.*[20] synteesi erottuu muista aiemmin esitellyistä, koska tässä saadaan tuotettua kahta erilaista väriainetta yhdellä kertaa (**30a** ja **30b**). Nämä eri muodot voidaan erottaa toisistaan kromatografisesti käyttäen HPLC:tä. Tässäkin synteesissä lähtöaineet **28a** ja **28b** täytyy syntetisoida erikseen. Tässä tapauksessa molemmat synteesit ovat suhteellisen yksinkertaisia ja nopeita tehdä, mutta muutaman vaiheen ne tuovat lisää tähän synteesiin. Tässä synteesissä on siis suurin piirtein yhtä monta vaihetta kuin aiemmin esitetyissä ilman mikroaaltouunia toimivissa synteeseissä. Tässä kuitenkin

reaktioajat ovat hyvin lyhyitä. Saannot olivat kuitenkin melko huonoja, tuotteen **30a** saanto oli 23 % ja tuotteen **30b** 31% kun aiemmissa synteeseissä on päästy lähes aina yli 50 %. Tässä saantoa rajoittaa se, että synteesissä saadaan kaksi tuotetta, joista molemmat ovat käyttökelpoisia. Yhteensä näiden kahden saanto on reilu 50 % mikä on lähempänä aiemmin esiteltyjen synteesien saantoja.[20]

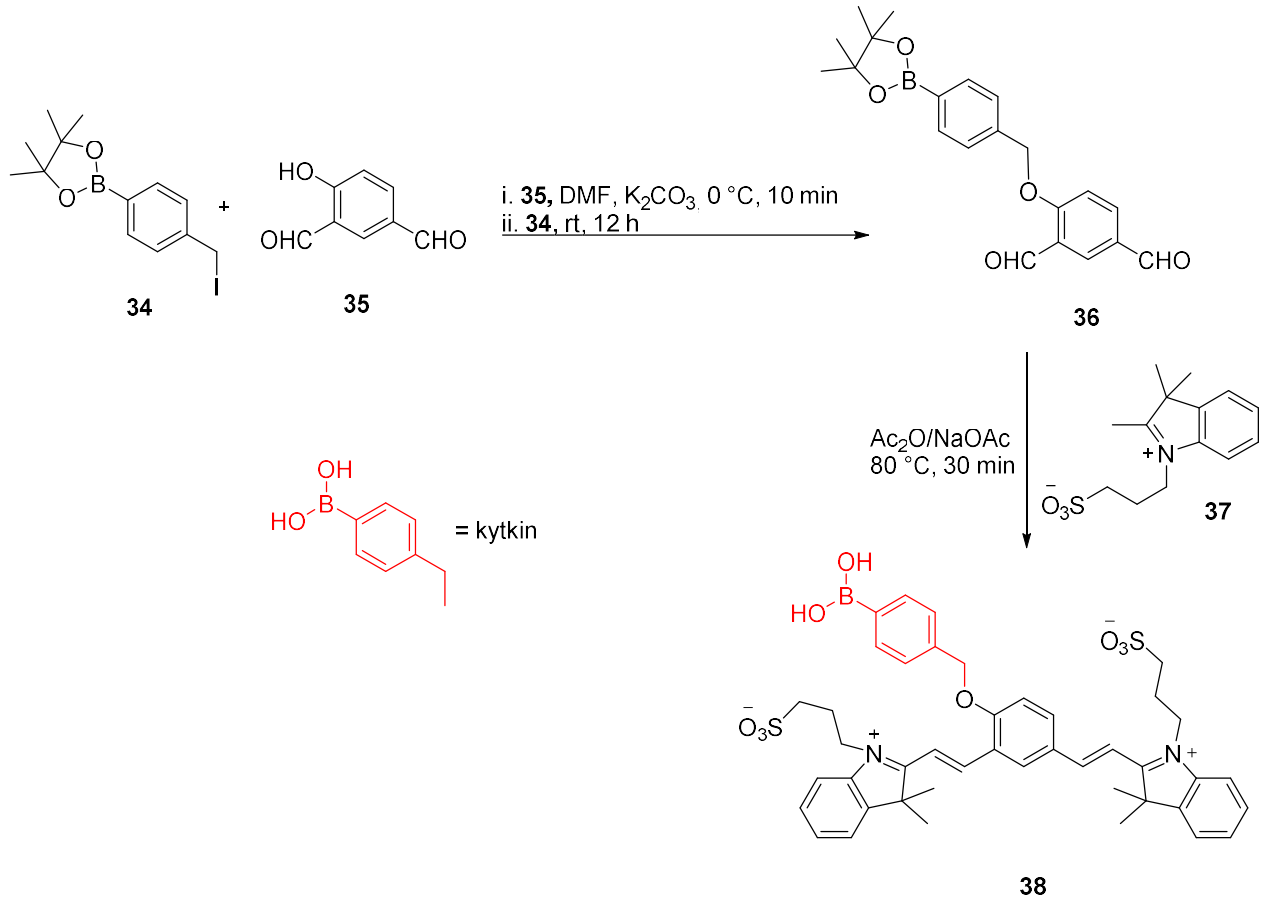
Kuvassa 10 esitellään Shan *et al.*[21] synteesireitti syaniinivériaineelle **33**.



Kuva 10. Shan *et al.*[21] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Sha *et al.*[21] tekivät ensimmäisen synteesin asetonitriilissä, mutta koska tämä ei toiminut isommille ja elektroneja vetäville ryhmille (e ja f), he vaihtoivat liuottimen DMF:ään ja käyttivät katalyyttinä myös hieman DIEA:ta. Reaktio tehtiin refluksoiden. Saannot tuotteille olivat kohtuullisia tai melko huonoja: **33a** 33%, **33b** 40 %, **33c** 41 %, **33d** 21 %, **33e** 16 % ja **33f** 33 %. Parhaiten siis toimi synteesi, jossa mukana oli –OH-ryhmä. Ensimmäisessä synteesissä, joka tehtiin käyttäen liuottimena asetonitriiliä, tuotteen **33a** saanto oli 30%, joten merkittävää eroa tässä mielessä kahdella liuottimella ei ole. Synteesinä tämä on varsin yksinkertainen, siinä on vain yksi vaihe, jossa lähtöaineita lämmitetään 12 tuntia typpi-ilmakehässä refluksoiden. Lähtöaine **31** on mahdollista ostaa valmiina, joten tämä synteesi on yhden vaiheen synteesi ja yksinkertaisin kaikista tähän asti esitetyistä synteeseistä. Synteesin kestoa ei kuitenkaan ilmoitettu. Saannot tässä synteesissä olivat melko huonoja aiempiin verrattuna.

Kuvassa 11 esitellään Karton-Lifshinin *et al.*[22] synteesireitti kytkimellä toimivalle vetyperoksidia tunnistavalle väriainekoettimelle.



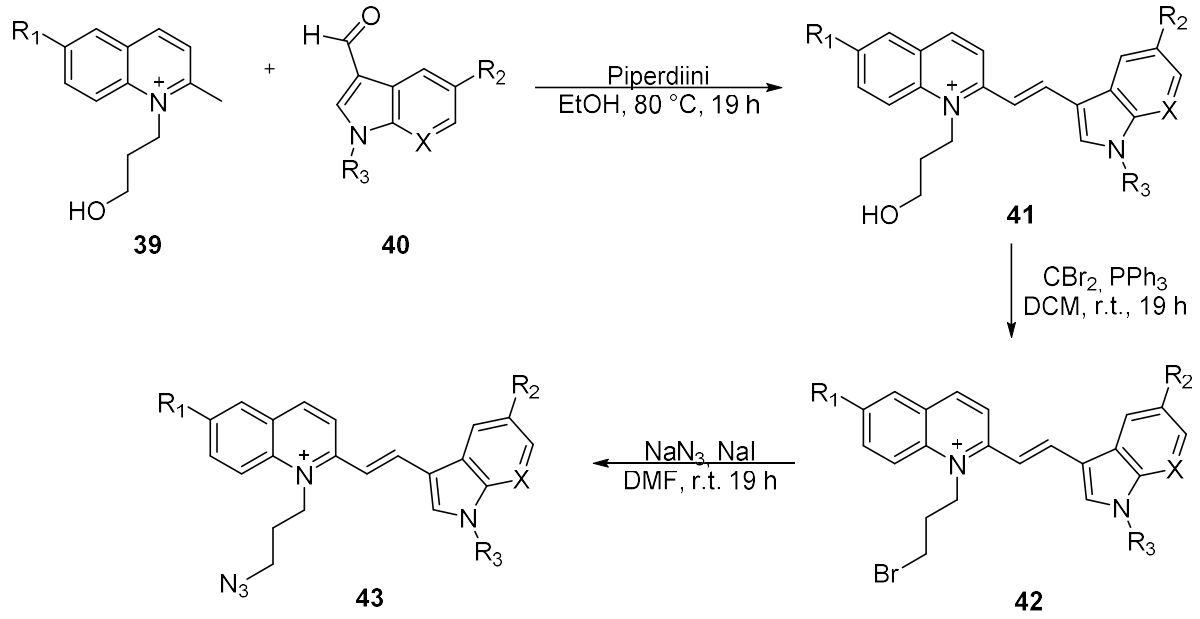
Kuva 11. Karton-Lifshinin *et al.*[22] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Karton-Lifshinin *et al.*[22] kehittämä synteesi on suhteellisen yksinkertainen, sillä siinä on vain kaksi vaihetta, jos lähtöaineet ovat valmiina. Aluksi yhdiste **35** täytyy jäähdyttää nollaan asteeseen liuottimen ja katalyytin kanssa, ja lisäksi seosta sekoitetaan 10 minuuttia ennen yhdisteen **34** lisäämistä. Tämän jälkeen seosta sekoitetaan yön yli huoneenlämmössä ja erotetaan ja puhdistetaan tuote **36**. Tämän lisäksi yhdisteet **34**[46] ja **37**[47] täytyy erikseen valmistaa aiempien ohjeiden mukaan. Lähtöaine **34** on nopea valmistaa, tähän vaiheeseen kuuluu vain noin puolen tunnin sekoitus nollassa asteessa ja reaktiota voidaan jatkaa tuotteen puhdistuksen jälkeen. Myös **37** on melko yksinkertainen syntetisoida ja siihen kuuluu vain yksi lämmitys, 18 tuntia 120 ºC:ssa. Seuraavassa vaiheessa synteesiä seosta kuumennettiin 80 ºC:ssa 30 minuuttia RP-HPLC-laitteella

reaktiota seuraten. Saanto oli 68 %, mikä on samaa luokkaa kuin monissa aiemmissa synteeseissä. Tässä reaktiossa selkeä ero muihin on, että sitä täytyy lopuksi seurata HPLC:llä ja synteesi tapahtuu myös suhteellisen nopeasti, jos yhdisteet **34** ja **37** ovat valmiina. Myöskin tässä synteesissä on lopulta yhtä monta vaihetta, kun monessa aiemmin esitetyssä synteesissä. Neljä vaihetta synteesissä näyttää olevan yleinen trendi tähän asti esitellyissä synteeseissä lukuun ottamatta Fun *et al.*[19] ja Shan *et al.*[21] synteesejä, joissa vaiheita oli huomattavasti vähemmän.[22]

Väriaineella **38** on myös muista hyvin poikkeava käyttökohde, koska sitä ei ole suunniteltu sitoutumaan nukleiinihappoihin vaan sen tarkoitus on tunnistaa, onko solussa vetyperoksidia kuvaan 12 punaisella merkityn kytkimen avulla. Kun solussa on vetyperoksidia, kytkin irtoaa väriaineesta, mikä nähdään kirkkaanpunaisena fluoresenssina. Kytkimen kanssa väriaine ei fluoresoi.[22]

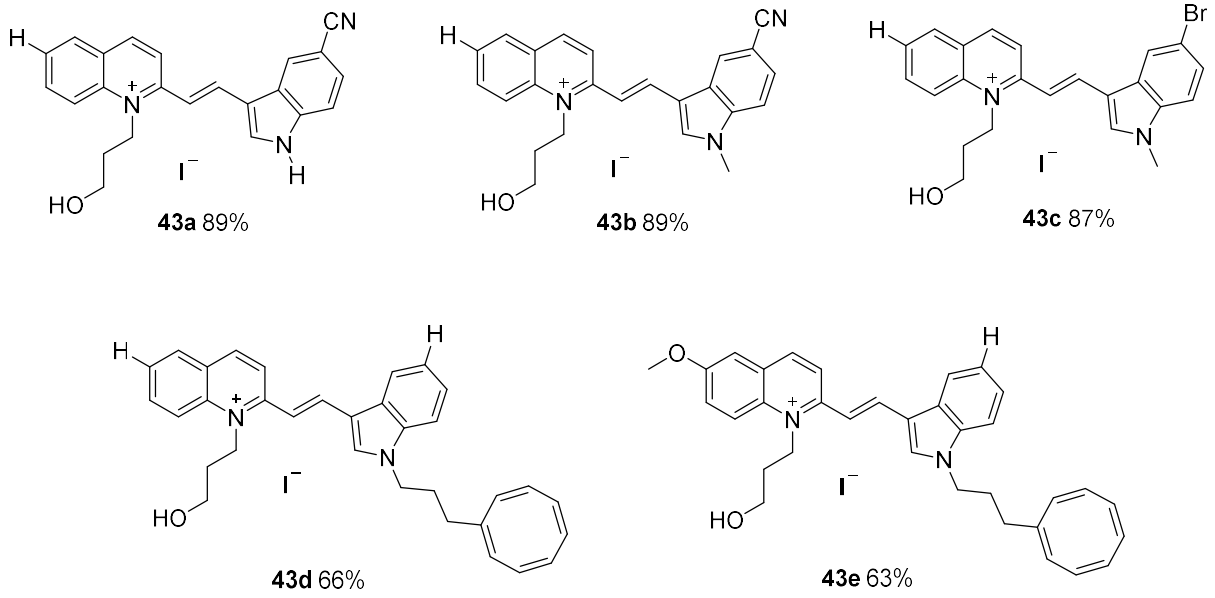
Kuvassa 12 esitellään Schwechheimerin *et al.*[23] synteesireitti syaniinivväriaineelle **43**.



Kuva 12. Schwechheimerin *et al.*[23] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Schwechheimerin *et al.*[23] synteesi noudattelee monin paikoin tuttua kaavaa. Varsinaisen väriaineen synteesi vaatii pitkiä sekoituksia, mutta tässä lämpötilaa ei tarvitse nostaa

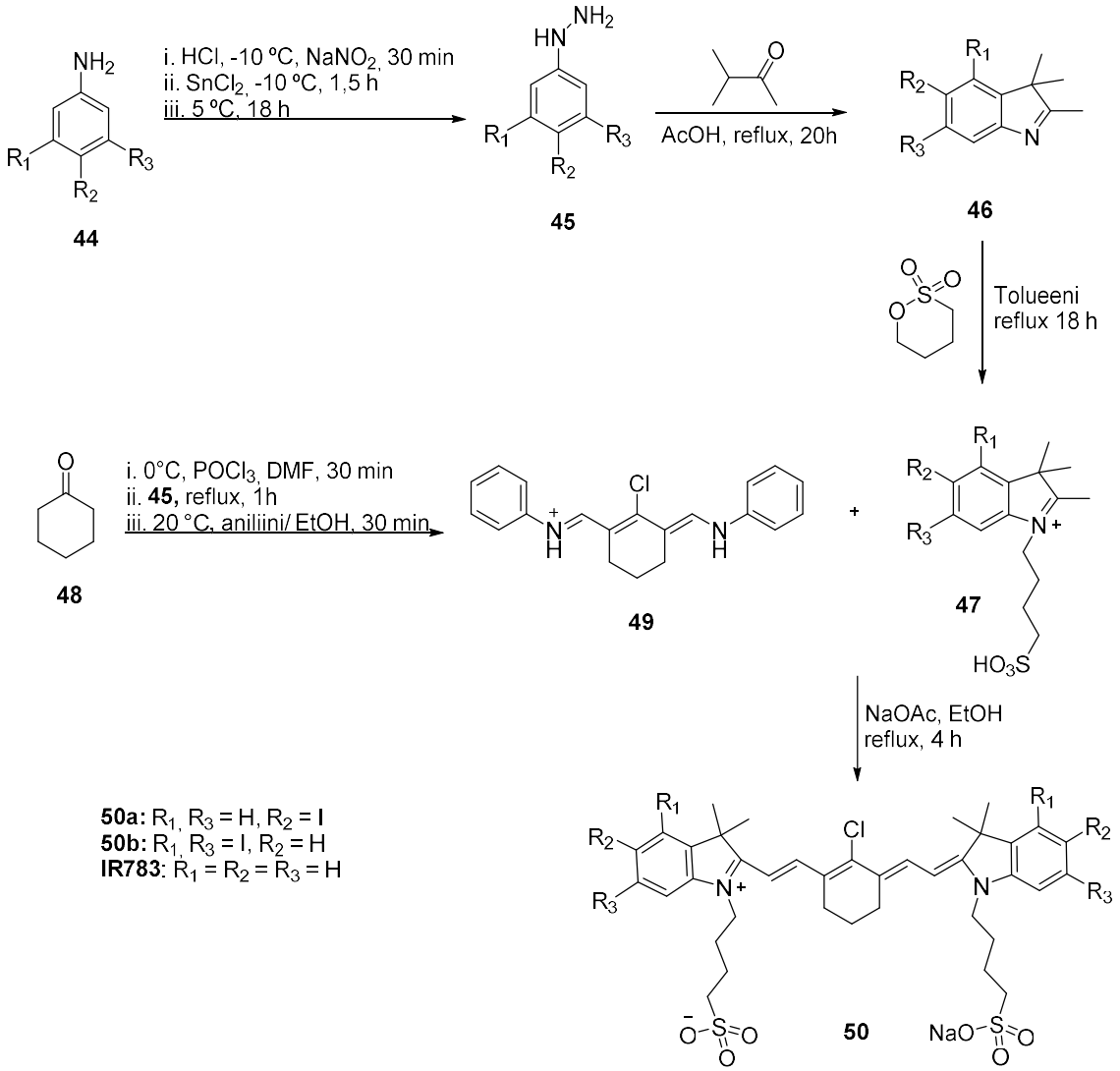
ollenkaan tai vain 80 ºC riittää. Lähtöaineiden **39** ja **40** synteesit alkavat samalla tavalla, molempia reaktioita lämmitetään 35 ºC:ssa tunti. Tämän jälkeen kinoliinisuola **39** on valmis käytettäväksi. Lähtöaineen **40** reaktiota jatketaan lämmittämällä vielä 130 ºC:ssa 19 tuntia. Tässä synteesissä on siis viisi vaihetta, jotka melkein kaikki ovat todella pitkäkestoisia. Aikaa siis tähän synteesiin kuluu paljon ja tämä onkin esitellyistä synteeseistä yksi pitkäkestoisimmista. Tässä synteesissä voidaan kuitenkin tehdä monia hyvin erilaisia tuotteita melko hyvillä saannoilla. Saannot vaihtelivat substituenteista riippuen välillä 63-89%. Kuvassa 13 on esitelty osa tämän synteesireitin tuotteista saantojen kanssa.[23]



Kuva 13. Schwechheimerin *et al.*[23] syntetisoimia väriaineita.

Yhdisteissä **43d** ja **43e** on erikoisuutena kahdeksan hiilen muodostama rengas, joka erottaa nämä väriaineet muista aiemmin esitetyistä syaniiniväriaineista. Ylärivillä esitetyissä tuotteissa **43a-c** on elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, jolla pyrittiin saamaan aikaan kirkkaampi fluoresenssi. Konjugoitunut kahdeksan hiilen rengas paransi väriaineen herkkyyttä valolle ja sen fluoresenssin kirkkautta, mutta tutkimuksissa huomattiin, että tämä ryhmä oli soluille myrkyllinen, joten sitä ei voida käyttää elävien solujen tutkimiseen. Parhaat ominaisuudet solujen kuvantamisen kannalta oli väriaineella **43b**, jolla myöskin on kirkas fluoresenssi ja se on stabiili myös valossa, mutta se ei ole soluille myrkyllinen. [23]

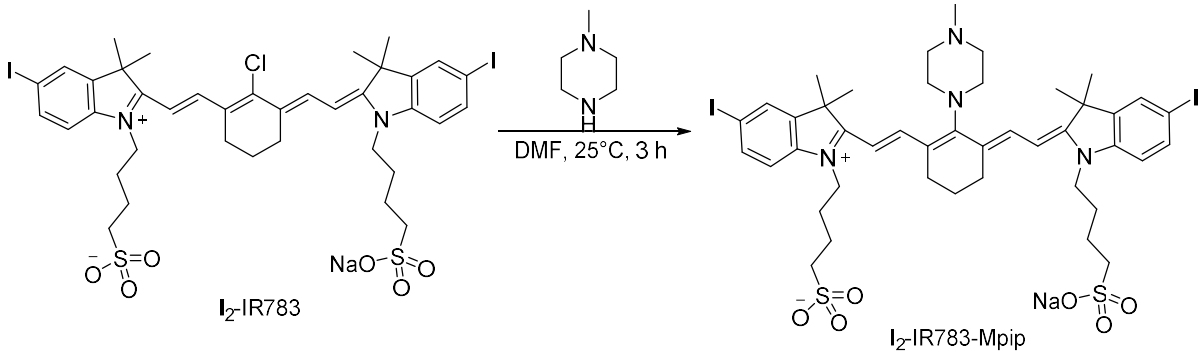
Kuvassa 14 esitellään Atchisonin *et al.*[24] esittämän syaniiniväriaineen synteesireitti.



Kuva 14. Atchisonin *et al.*[24] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Atchisonin *et al.*[24] synteesissä ensimmäinen vaihe vaatii jo melko radikaalia jäähdyttämistä, sillä reaktio aloitetaan -10 ºC:ssa, jonka jälkeen sitä sekoitetaan vielä 5 ºC:ssa 18 tuntia. Kaksi seuraavaa vaihetta vaativat myös hyvin pitkät refluksoinnit, 20 tuntia ja 18 tuntia. Viimeinen vaihe on näihin verrattuna varsin nopea, vain neljä tuntia refluksointia. Tässä synteesissä täytyy väriaineen runko **49** syntetisoida erikseen, mutta tämä synteesi on suhteellisen nopea tehdä, vaikka siinä onkin kolme eri vaihetta ja

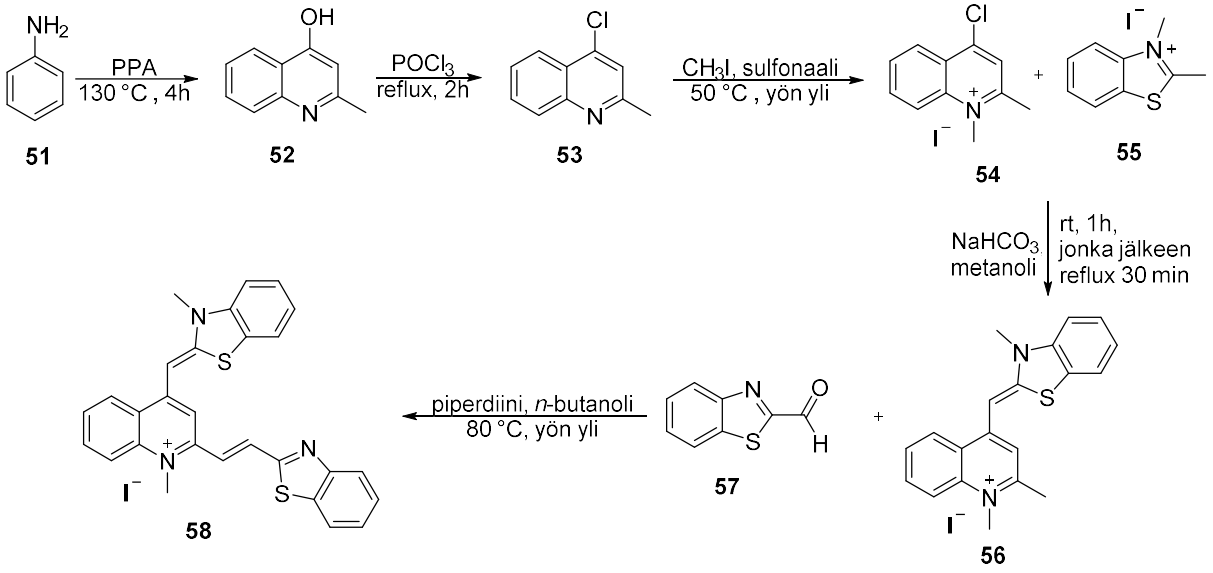
puhdistus, että reaktiota voidaan jatkaa. Jokaisessa välissä tuote täytyy puhdistaa ja kuivata ennen seuraavaan vaiheeseen siirtymistä, joten synteesiin kuluu aikaa. Tuotteen **50a** saanto oli 33% ja tuotteen **50b** 41%. Saannot olivat siis aiempiin synteeseihin verrattuna yksiä heikoimmista ja synteesi kuitenkin on hyvin monivaiheinen ja pitkäkestoinen muihin perinteisin synteesimenetelmin tehtyihin synteeseihin verrattuna.[24] Kuvassa 15 esitetään tuotteen **50a** (I_2-IR783) jatkosynteesi, jonka tuotteena saadaan väriainetta IR-783-Mpip.[25]



Kuva 15. Siriwiboolin *et al.*[25] esittivät seuraavan jatkoreaktion aiemmin syntetisoidulle väriaineelle I_2-IR783[24].

Siriwiboolin *et al.*[25] esittämä synteesi ei ole kovinkaan monipuolinen tai pitkä, koska he käyttivät mallina kuvassa 14 esitettyä Atchisonin *et al.*[24] synteesiä omansa pohjana ja lisäsivät siihen ainoastaan yhden vaiheen. Tässä siis lisätään ennestään pitkään synteesiin vielä yksi vaihe. Myös väriaineiden käyttötarkoitus oli sama. Molempien soveltuvuutta syövän fototerapiaan tutkittiin, mutta hieman eri näkökulmasta Atchison *et al.*[24] tutkivat väriaineen käyttöä haimasyövän hoidossa ja Siriwibool *et al.*[25] vertailivat väriaineen toimintaa happamissa ja emäksissä olosuhteissa, eivätkä keskittyneet tiettyyn syöpään. Siriwiboolin *et al.*[25] väriaine on eri värinen emäksisessä ja happamassa ympäristössä ja sen ominaisuudet happamassa ympäristössä voivat olla hyödyllisiä, koska syöpäsolujen lysosomit ovat normaalin solun lysosomeja happamampia.[25]

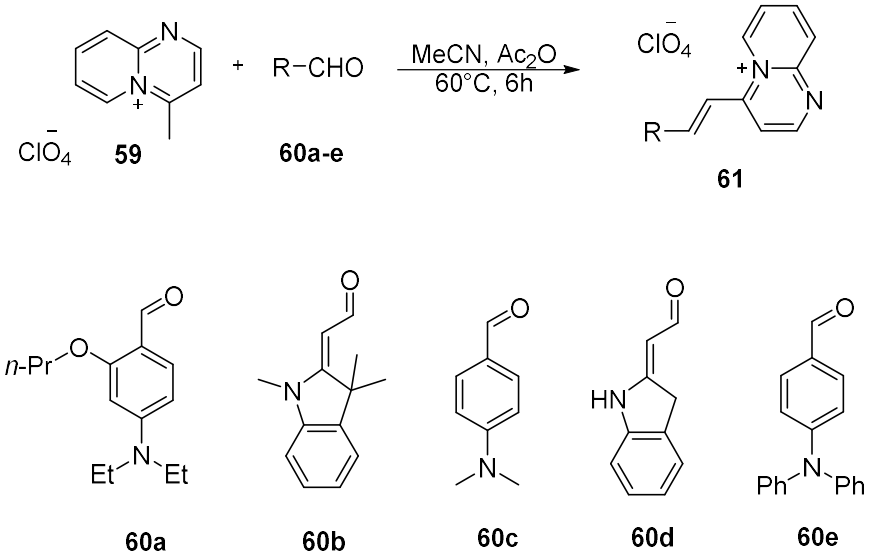
Kuvassa 16 esitellään Wangin *et al.*[26] julkaisema G-quadruplex DNA:han sitoutuvan väriaineen synteesireitti.



Kuva 16. Wangin *et al.*[26] esittämän väriainesynteesin yleiskuvaus.

Wangin *et al.*[26] esittämään synteesin kuuluu suhteellisen monta vaihetta, mutta vaiheet ovat kuitenkin yksinkertaisia. Synteesi kuitenkin vaati kaksi kuumennusta yön yli, joten aikaa tähän synteesiin kuluu ainakin kolme työpäivää, mikä tosin ei ole poikkeus muihin synteeseihin verrattuna. Lämpötilat ovat myös maltillisia ensimmäistä kuumennusta lukuun ottamatta. Paljon näkyy myös muissa synteeseissä käytettyjä kemikaaleja, kuten piperdiiniä, $POCl_3$:a ja jodimetaania. Tuotteen saanto oli 56%, mikä on melko keskiverto aiemmin esitettyihin synteeseihin verrattuna. Tuote **58** on aiempiin verrattuna siitä erikoinen, että siinä on kaksi bentsotiatsoliryhmää, mutta ne eivät ole asettuneet toisiinsa nähden symmetrisesti kuten esimerkiksi Bokanin *et al.*[20], Shan *et al.*[21], Karton-Lifshinin *et al.*[22], Atchisonin *et al.*[24] ja Siriwiboolin *et al.*[25] synteeseissä kuvissa 9, 10, 11, 14 ja 15. Väriaine **58** sitoutuukin hyvin spesifisti G-quarduplex DNA:han, useimpien väriaineiden sitoutuessa kaksi- tai yksijuosteiseen DNA:han tai RNA:han.[26]

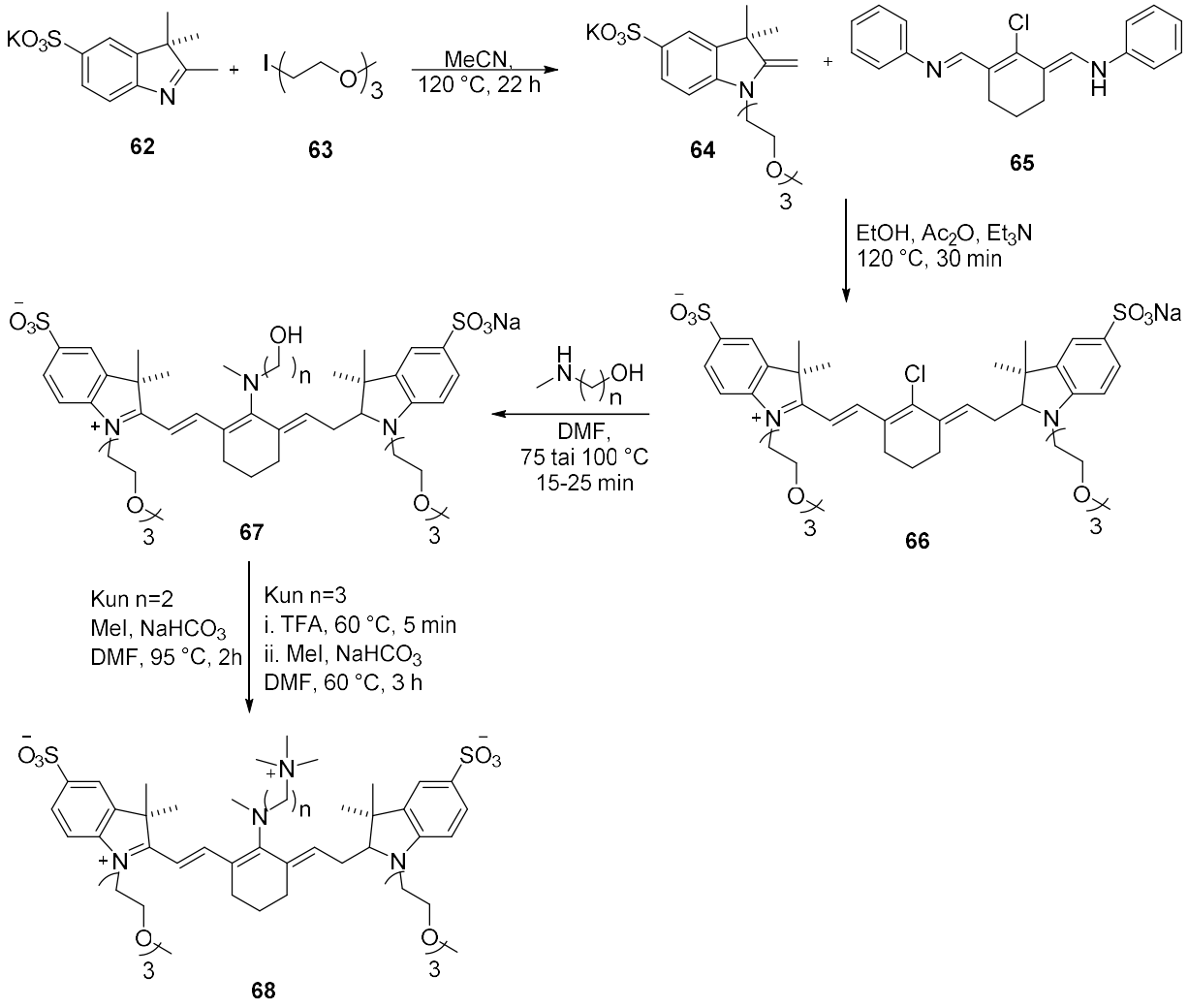
Kuvassa 17 esiteltävä Chenin *et al.*[27] synteesi on varsin yksinkertainen, sillä siinä on vain yksi lyhyt vaihe. Myös saatava tuote on hyvin yksinkertainen muihin tässä tutkielmassa esiteltyihin syaniiniväriaineisiin verrattuna.



Kuva 17. Chenin *et al.*[27] esittämän synteesin yleiskuvaus.

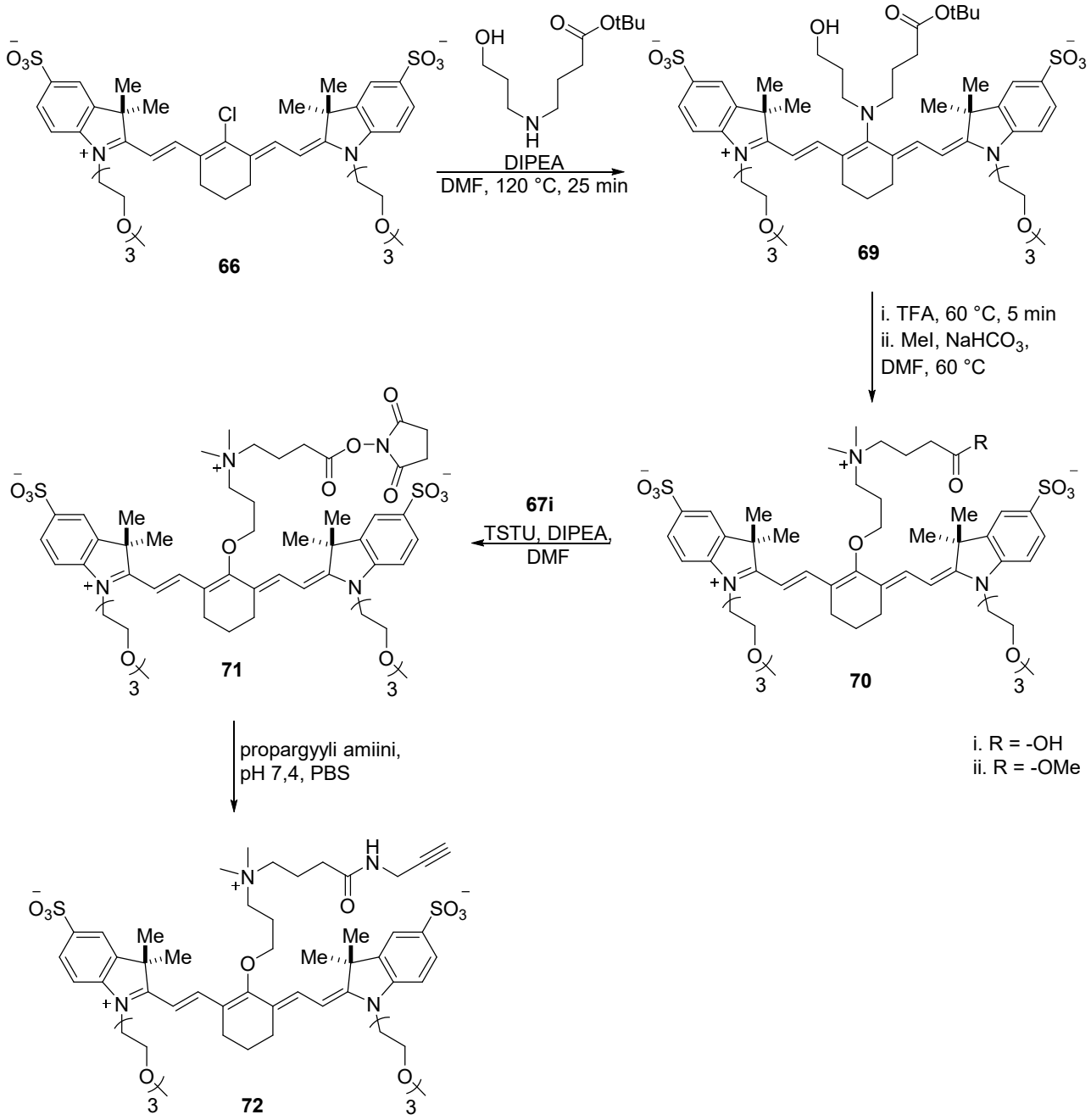
Chenin *et al.*[27] synteesiä varten lähtöaine **59** täytyy syntetisoida erikseen Barykina-Tassan ja Sniderin julkaiseman ohjeen mukaisesti.[48] Tämä vaihe ei ole monimutkainen, mutta vaatii 24 tuntia sekoittamista, joten aikaa siihen kuluu. Tämäkin vaihe mukaan luettuna tämä synteesi on yksi yksinkertaisimmista ja nopeimmista esitellyistä. Myös saannot ovat samaa luokkaa kuin aiemmin esitetyillä synteeseillä. Näiden tuotteiden saannot vaihtelivat 52,4-66,7 % välillä. Nämä väriaineet eroavat monista edellä esitetyistä siinä, että ne ovat melko yksinkertaisia ja pieniä moniin muihin nähden. Niissä on myös todella lyhyt konjugoitunut hiiliketju typpien välissä. Näiden käyttöä tutkittiin DNA:n ja RNA:n havaitsemiseen ja niillä onkin hyvin kirkas fluoresenssi, minkä lisäksi kestävät hyvin lämpöä ja valoa. Yksi hieman muista poikkeava mahdollinen ominaisuus oli väriaineella **61a**, joka pystyi sitoutumaan myös mitokondrioiden DNA:han, mikä ei ole yleistä syaniiniväriaineille.[27]

Kuvassa 18 esitellään Chan *et al.*[28] tutkimusryhmän kehittämän syaniiniväriaineen synteesireitin ensimmäinen versio, jota kehitettiin. Lucianon *et al.*[29] toimesta edelleen eteenpäin. Lopullinen synteesireitti esitetään kuvassa 19.



Kuva 18. Chan *et al.*[28] esittämän väriainesynteesin yleiskuvaus.

Chan *et al.*[28] synteesissä on paljon eri vaiheita, mutta ne ovat melko lyhyitä kestoltaan. Lähtöaineet **62**[28] ja **63**[28] täytyy myös syntetisoida erikseen erillisen ohjeen perusteella. Lähtöaineen **62** synteesi on yksinkertainen, mutta siihen kuluu aikaa 18 tuntia. Lähtöaineen **63** synteesi on kaksivaiheinen ja jälkimmäiseen vaiheeseen kuulu myös pitkä refluksointi. Chan *et al.*[28] synteesissä on melko monta vaihetta aiempiin synteeseihin verrattuna. Sama tutkimusryhmä jatkoi tämän synteesin kehittämistä ja tehdyt jatkoreaktiot on esitetty kuvassa 19. Kuvan 18 synteesillä saatiin tuotteita hyvällä saannolla. Kun n (hiiliketjun pituus) oli 2, tuotteen **68a** saanto oli 86 % ja kun n oli 3 tuotteen **68b** saanto oli 67%. Synteesi siis toimii hieman paremmin, kun substituentin hiiliketju on lyhyempi.[28]

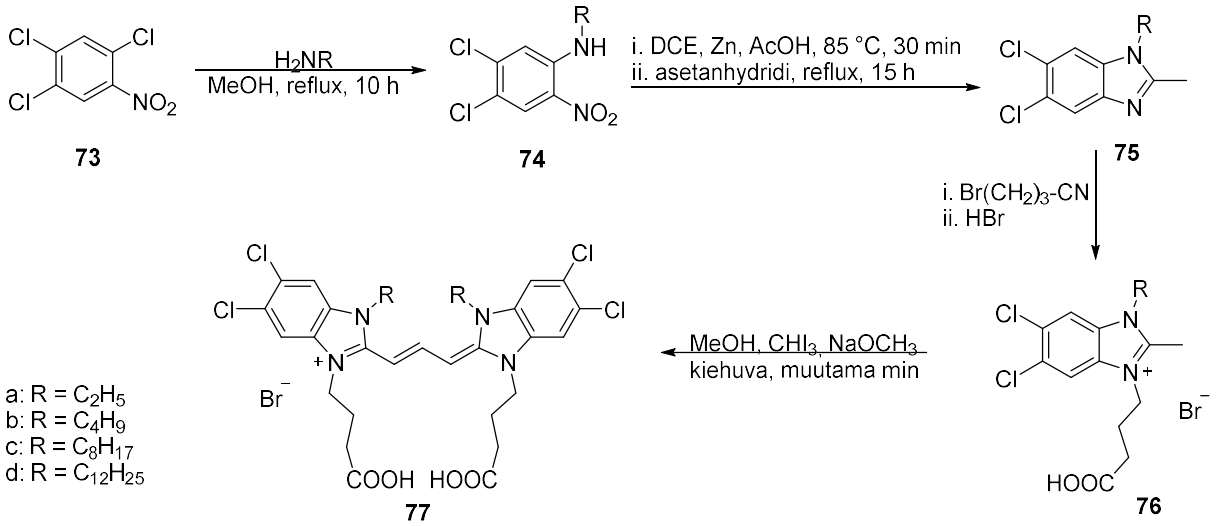


Kuva 19. Lucianon *et al.*[29] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Kuvassa 19 esitetty Lucianon *et al.*[29] synteesi on hyvin mielenkiintoinen, koska se jatkaa edellisen Chan *et al.*[28] esittämän syaniiniväriaineen synteesiä. Synteesi on hyvin nopea ainakin niiltä osin, mitä kuvauksessa mainitaan, vaiheet kestävät minuutteja tuntien sijaan. Mutta väriaine **66** täytyy valmistaa ennen tätä synteesiä ja myös ensimmäisessä vaiheessa käytettävä amiini täytyy erikseen valmistaa ennen synteesin aloittamista.

Toisaalta on hyvä muistaa, että tässä käytetty lähtöaine **66** on myös väriaine, mutta sen ominaisuuksia pyrittiin parantamaan jatkoreaktioilla, joten tätä ei voi suoraan verrata muihin aiemmin esiteltyihin synteeseihin. Joskin jos laskee yhteen kuvien 18 ja 19 synteesien kaikki vaiheet, on tuloksena todella pitkä ja monivaiheinen synteesireitti. Tuotteen **72** saanto oli edellisen synteesin tapaan melko hyvä, 71%. Tässä saadaan tuotteena todella monimutkaisen näköinen väriaine, joka muistuttaa osin jo aiemmin nähtyjä väriaineita, mutta sisältää paljon enemmän substituentteja. Näiden substituenttien ansioista väriaine ei muodosta aggregaatteja, jolloin sen fluoresenssi on kirkkaampi. Myöskin tutkimusryhmän aiemmassa tutkimuksessa[28] pyrittiin parantamaan väriaineen vesiliukoisuutta lisäämällä typpiin pitkät hiiliketjut. Tätä väriainetta tutkittiin kasvainten kuvantamisessa hiirissä, joten vesiliukoisuus ja kirkas fluoresenssi ovat kynnysehtoja tutkimuksen onnistumiselle ja luotettavien tulosten saamiselle.[29]

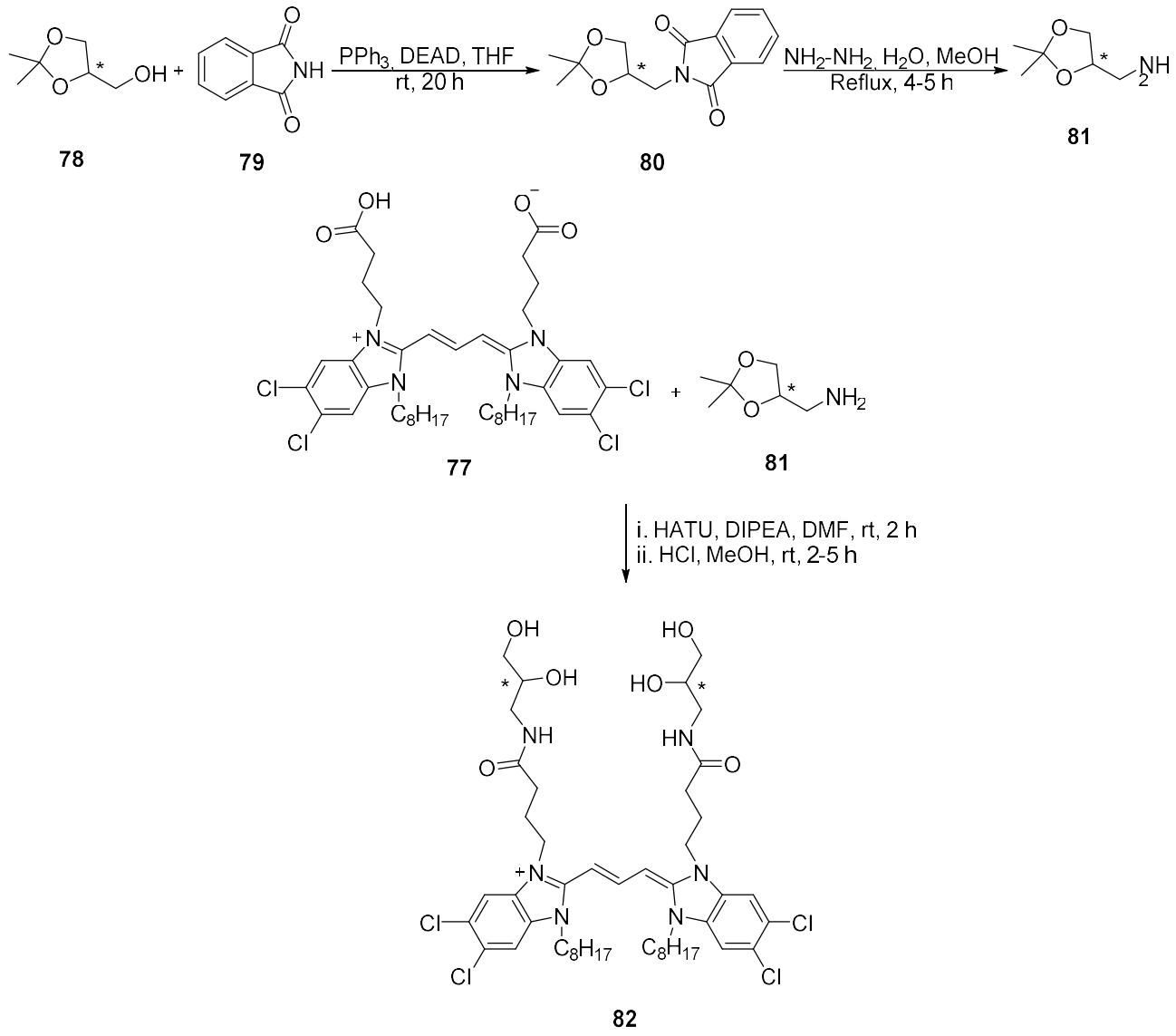
De Rossin *et al.*[30] esittämä synteesireitti esitellään kuvassa 20. Myös tämän väriaineen reaktiota on pyritty parantamaan myöhemmin. Schaden *et al.*[31] jatkoreaktiot väriainesynteesille esitellään kuvassa 21.



Kuva 20. De Rossin *et al.*[30] esittämän väriainesynteesin yleiskuvaus.

De Rossi *et al.*[30] esittivät vuonna 1995 tämän kuvan 20 varsin yksinkertaisen näköisen synteesin syaniini väriaineelle **77**. Tässä synteesissä lähtöaine **73** on kaupallisesti saatavilla, joten sen valmistamisesta ei tule lisävaiheita tähän synteesiin. Vaiheita tässä

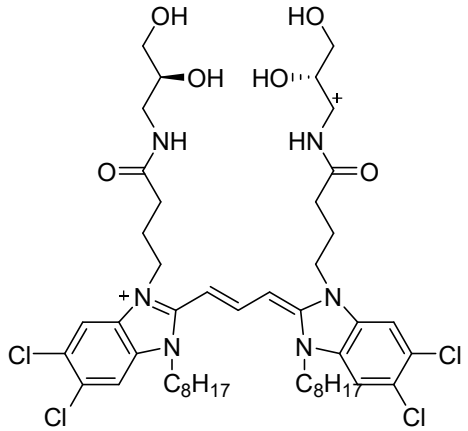
synteesissä on neljä, kuten monessa muussakin aiemmin esitetyissä synteeseissä ja kaksi ensimmäistä myös kestävät melko kauan. Kolmannen vaiheen kestosta ei ollut mainintaa, mutta erityisesti muista tämän erottaa se, että viimeinen vaihe tapahtuu minuuteissa tuntien sijaan. Saannot sen sijaan ovat selvästi muita synteesejä huonompia, tässä tuotteen **77** saannot vaihtelivat ryhmästä –R riippuen välillä 17-35 %. Schade *et al.*[31] julkaisivat vuonna 2020 oman jatkoreaktionsa väriaineelle **77**. Väriaineen liukoisuutta veteen pyrittiin parantamaan ja määrittämään tuotteen kiraalisuus. Tämä reaktio esitellään kuvassa 21.[30]



Kuva 21. Schade *et al.*[31] ovat myöskin tutkineet jo ennalta tuttua väriainetta **77**, jonka De Rossi *et al.*[30] valmistivat, ja tehneet sille erilaisia jatkoreaktioita.

Tämä Schade *et al.*[31] synteesireitti on melko yksinkertainen, koska väriaineen rungon synteesireitti on jo tunnettu. Mutta tässä synteesissä on kuitenkin melko pitkät vaiheet ja kun otetaan huomioon vielä väriaineen **77** synteesi De Rossin *et al.*[30] ohjeen mukaan, tässä on yksi pitkäkestoisimmista ja monivaiheisimmista tähän asti esitellyistä synteeseistä. Vaiheiden määrän perusteella ollaan lähellä Lucianon *et al.*[29] työryhmän esittämää synteesiä. Väriaineella **82** on hyvin mielenkiintoisia ominaisuuksia vesiliuoksissa, koska se muodostaa aggregaatteja. Nämä aggregaatit ovat levymäisiä tai

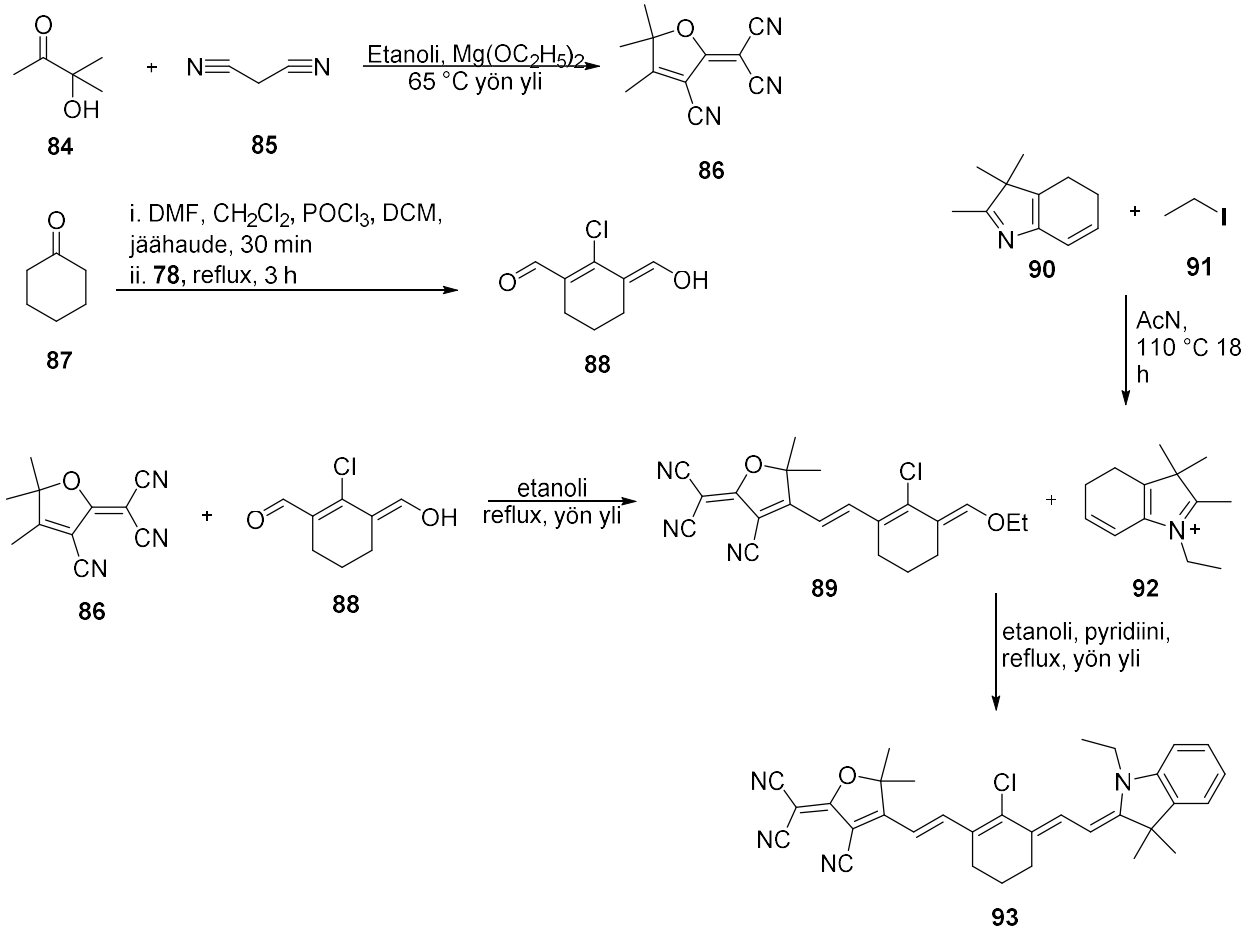
ne voivat muodostaa jopa nanoputkia. Nanoputkia muodostava väriaine **83** vaatii vielä hieman kuvasta 21 poikkeavan ja monivaiheisemman synteesireitin. Yhdisteen **83** rakenne esitellään kuvassa 22.[31]



83

Kuva 22. Schaden *et al.*[31] nanoputkia muodostava väriaine.

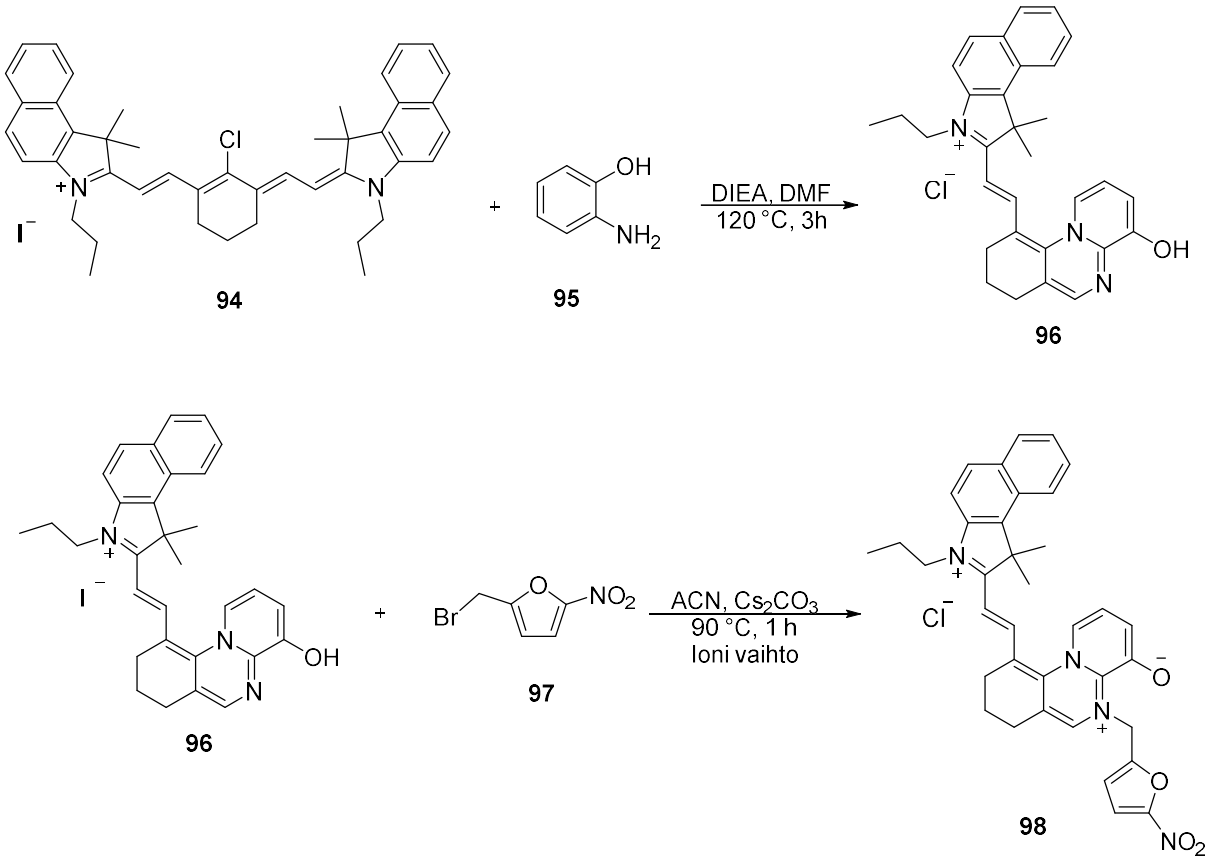
Kuvassa 23 esitellään Mun *et al.*[32] julkaisema synteesireitti. Tuote **93** ei ole syaniiniväriaine, koska siinä ei ole toista heterosyklistä typpeä. Tämä synteesi otettiin kuitenkin mukaan esiteltäväksi, koska se on syaniiniväriainejohdannainen ja sillä on hyvin mielenkiintoinen käyttökohde nanolääketieteessä.



Kuva 23. Mun *et al.*[32] esittämän väriaineen yleinen synteesikuvaus.

Mun *et al.*[32] synteesi noudattelee monilta osin aiemmin nähtyjen synteesien kanssa samaa kaavaa, vaikka tämä ei olekaan määritelmän mukaan syaniiniväriaine. Tuote **93** muodostaa vetysitoutumalla nanolevyjä, joita voidaan käyttää syöpäkasvainten hoidossa. Synteesissä on mukana paljon erilaisia renkaita ja lopputuote on myös hyvin saman näköinen esimerkiksi Atchisonin *et al.*[24] aiemmin esitellyn synteesituotteen kanssa. Tämä tuote kuitenkin eroaa muista erityisesti siinä, että se ei ole ioni, kuten syaniiniväriaineet usein ovat. Lisäksi tässä on mukana syaaniryhmiä, joita on tähänastisista synteeseistä ollut substituentteina ainoastaan tässä ja Schwechheimerin *et al.*[23] synteeseissä. Tämä synteesi on melko monivaiheinen ja vaatii myös kuivia olosuhteita. Aikaa myös kuluu ainakin viisi työpäivää, joten synteesi on siis yksi pisimmistä ja etenkin aikaa vaativista synteeseistä. Saanto tuotteelle **93** oli kuitenkin melko hyvä 65,5 %.[32]

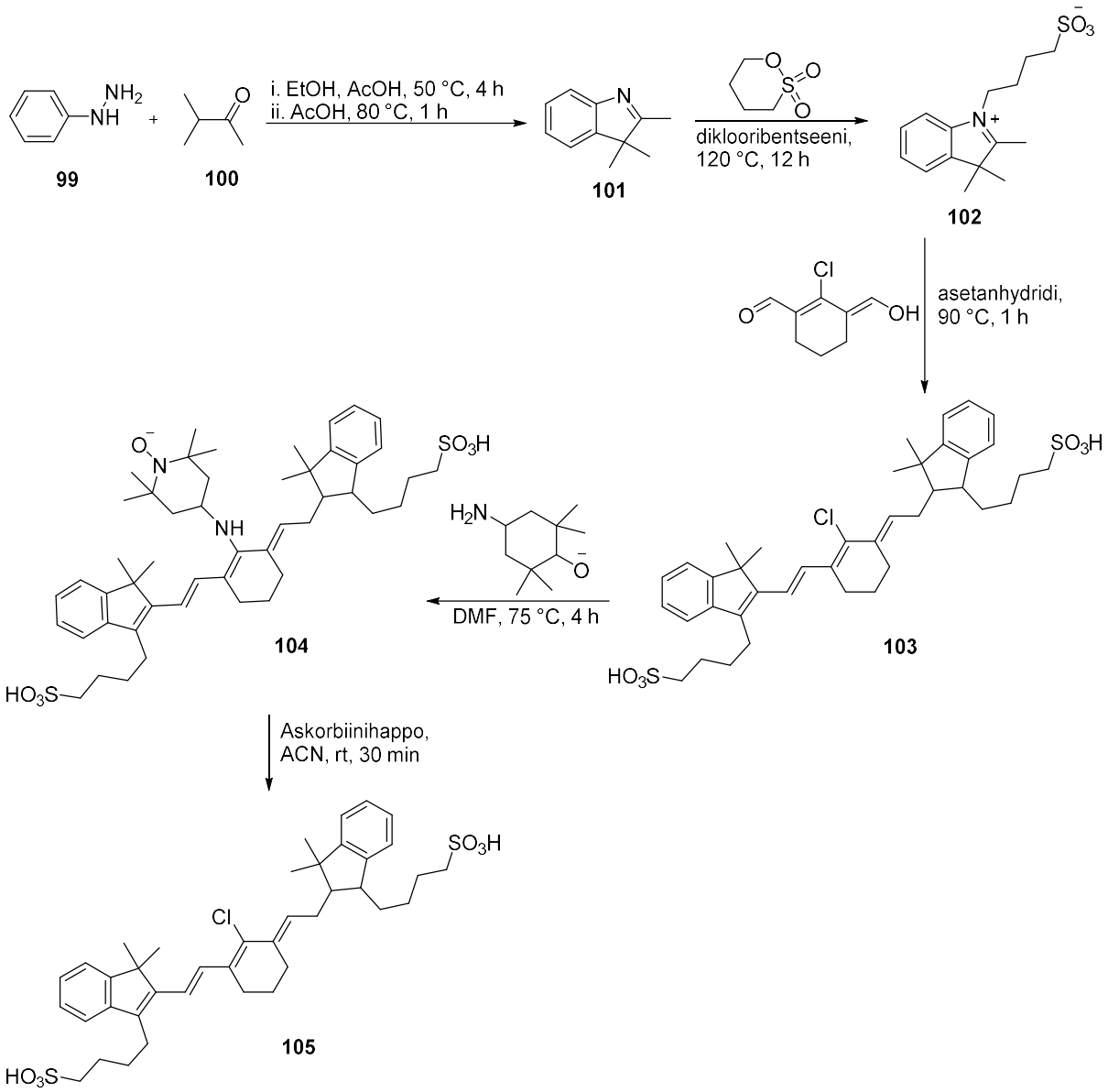
Kuvassa 24 esitellään Shan *et al.*[33] julkaisema synteesireitti valmiin syaniiniväriaineen jatkoreaktiolle.



Kuva 24. Shan *et al.*[33] esittämän väriaineen yleinen synteesireitti.

Shan *et al.*[33] synteesissä lähtöaineena on jo valmis väriaine **94**, mutta tässä esitetyllä jatkoreaktiolla siitä saadaan syntetisoitua väriaineet **96** ja **98**, jotka ovat ensimmäisiä väriaineita, joilla voidaan havaita nitroreduktaasi (NTR) yhtä aikaa lysosomeista ja mitokondrioista. Nämä jatkoreaktiot ovat nopeita ja yksinkertaisia. Lisäksi saannot olivat melko hyviä, tuotteelle **96** 56,9 % ja tuotteelle **98** 42,3 %. Tämä synteesi muistuttaa hyvin paljon aiemmin esitettyä saman tutkimusryhmän julkaisemaa synteesireittiä[21], joka on esitetty kuvassa 10. Kuvassa 10 esitetty synteesireitti oli hieman yksinkertaisempi kuin tämä myöhemmin julkaistu versio, mutta sen yhteydessä saatiin selville, että tällainen väriaine voi olla spesifi lysosomien kuvantamiseen. Kuvan 24 Shan *et al.*[33] synteesireitti onkin siis hyvin paranneltu versio aiemmasta synteesireitistä. Tässä synteesissä saannot olivat muihin tässä tutkielmassa esiteltyihin verrattuna keskivertoja.

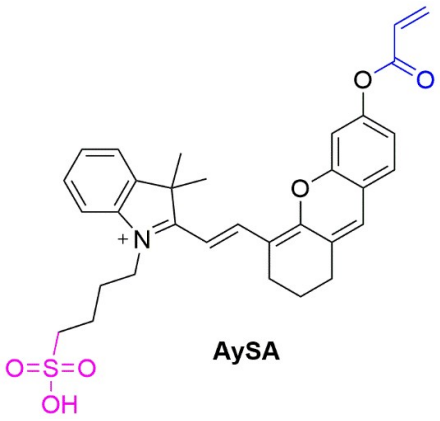
Kuvassa 25 esitellään Yangin *et al.*[34,35] julkaisema syaniiniväriaineen synteesireitti.



Kuva 25. Yangin *et al.*[34,35] esittämän väriaineen synteesireitti.

Yangin *et al.*[34,35] kuvassa 25 esitetty synteesi on hyvin monivaiheinen, mutta ajallisesti kuitenkin melko nopea, koska eri vaiheet kestävät korkeintaan muutamia tunteja. Tämä synteesi vaatii inertit olosuhteet monessa vaiheessa, joten reaktion käynnistämiseen ja valmisteluun voi kulua paljon aikaa, kuten myös välituotteiden puhdistamiseen. Ainoastaan välituotetta **102** voidaan käyttää suoraan synteesin jälkeen jatkoreaktiossa.

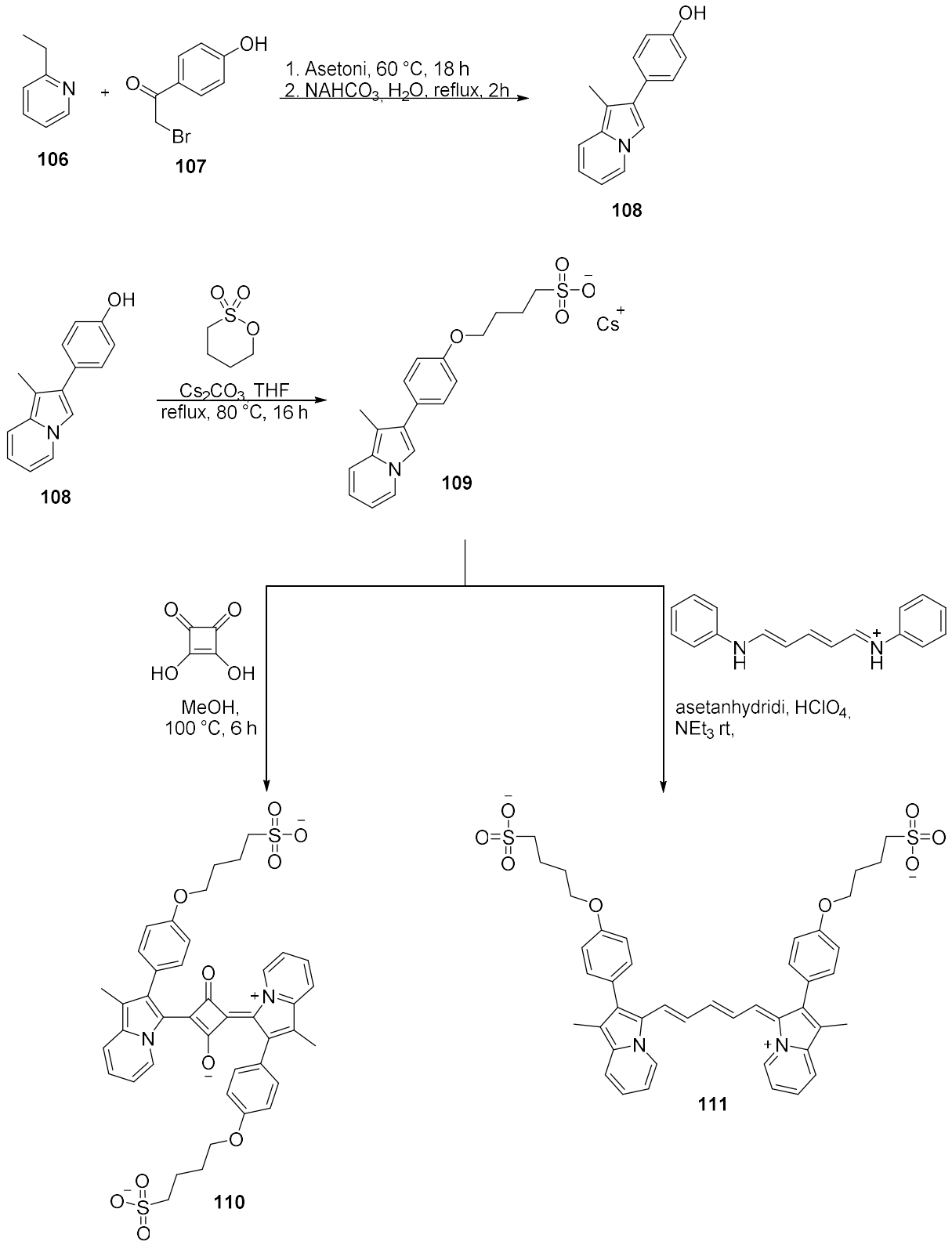
Tässä synteesissä on kuitenkin erinomainen saantoprosentti tuotteelle **105** 97,8 % Tämä on myös siitä poikkeuksellinen synteesi, että tässä esiintyvää välituotetta **103** käytettiin alun perin välivaiheena kehitettäessä fluoresenssisensoria, joka erottaisi kysteiinin homokysteiinistä ja glutationista. Tämä sensori on nimeltään AySa ja se itsessään ei ole syaniiniväriaine, koska siinä ei ole mukana kahden typpiatomin välissä konjugoitunutta hiiliketjua. AySA-sensorin rakenne esitellään kuvassa 26.[34,35]



Kuva 26. AySA-sensori.

AySA-sensorin rakenteesta voidaan nähdä yhtäläisyyksiä syaniiniväriaineisiin. Siinä on hemisyaniinin **103** runko, jota on jatkoreaktioissa muokattu haluttuun rakenteeseen. Tämä mahdollistaa sensorin emission ja absorption lähellä infrapuna-aallonpituutta. Rikkihapporyhmä hiiliketjun päässä (korostettu violetilla värillä) parantaa sensorin vesiliukoisuutta. Sinisellä värillä on merkitty sensorin reaktiivinen kohta. Tämän avulla voidaan havaita, onko liuoksessa kysteiiniä. Kysteiini ja sinisellä merkattu akrylaattiryhmä muodostavat ehdotetun mekanismin mukaan renkaan, joka irtoaa sensorista. Tämä voidaan havaita siirtymänä absorptiospektrissä sekä selvänä liuoksen värin muutoksena sinisestä punaiseen. Sensorin havaittiin olevan myös turvallinen soluille ja reagoivan nopeasti kysteiinin kanssa.[34]

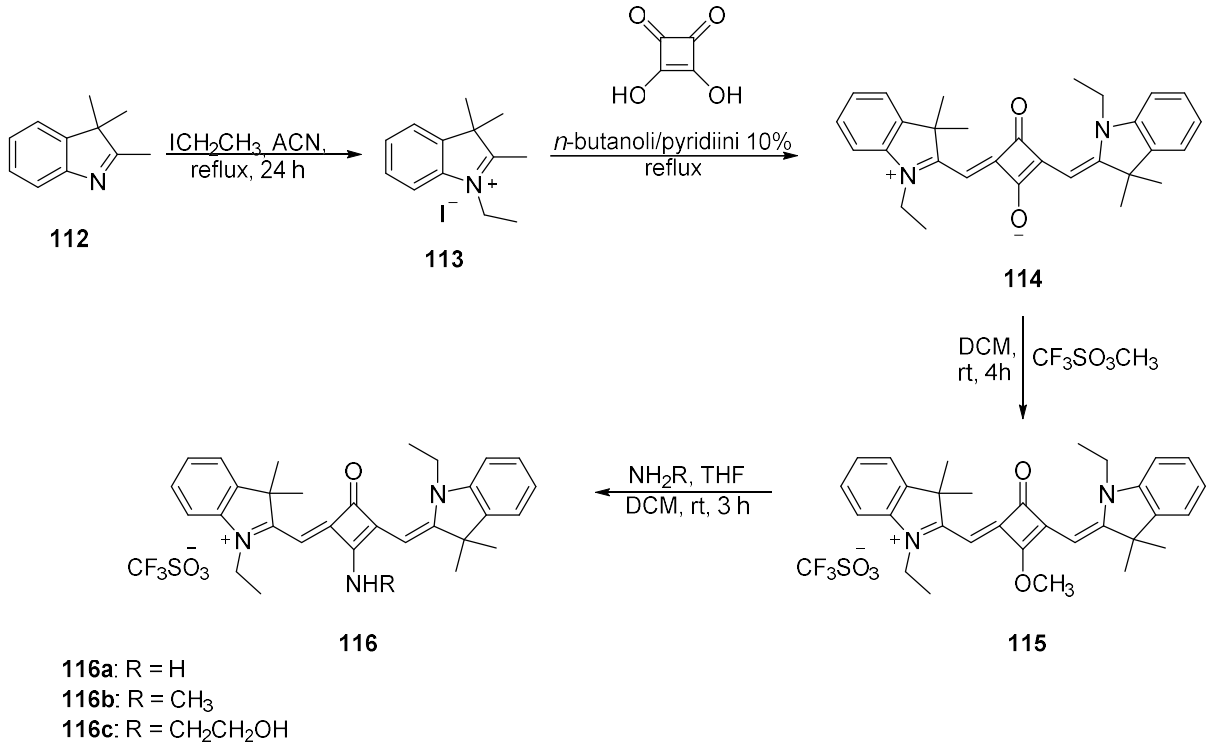
Kuvassa 27 esitellään Meadorin *et al.*[36] julkaisema synteesireitti kahden erilaisen syaniiniväriaineen valmistamiseksi.



Kuva 27. Meadorin *et al.*[36] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Meadorin *et al.*[36] esittämä synteesi on muista hyvin poikkeava, koska sillä saadaan aikaan kaksi täysin erilaista väriainetta yhtä kohtaa synteesissä muuttamalla. Tässä myöskin synteesituote **110** on muista väriaineista hyvin poikkeava, koska siinä on neljän hiilen muodostama rengas mukana. Tämä synteesi pohjautuu pitkälti McNamaran *et al.*[49] esittämään synteesiin. Tässä synteesissä kuitenkin parannettiin aiemmin huonosti veteen liukenevan neljän hiilen muodostaman renkaan sisältävän väriaineen liukoisuutta veteen. Meador *et al.*[36] synteesissä on yhteensä neljä vaihetta, kuten monessa aiemmin esitetyssä synteesissäkin on. Osa vaiheista on kuitenkin nopeita, joten synteesiin ei kulu aikaa kovin paljoa. Saannot olivat molemmille tuotteille samaa luokkaa kuin monessa aiemmassakin synteeissä, tuotteelle **110** 60 % ja tuotteelle **111** 53 %.[36]

Liman *et al.*[37] kuvassa 28 esiteltävällä synteesillä saadaan syntetisoitua neljän hiilen muodostaman renkaan sisältävä väriaine, kuten saatiin myös Meadorin *et al.*[36] esittämällä synteesillä.

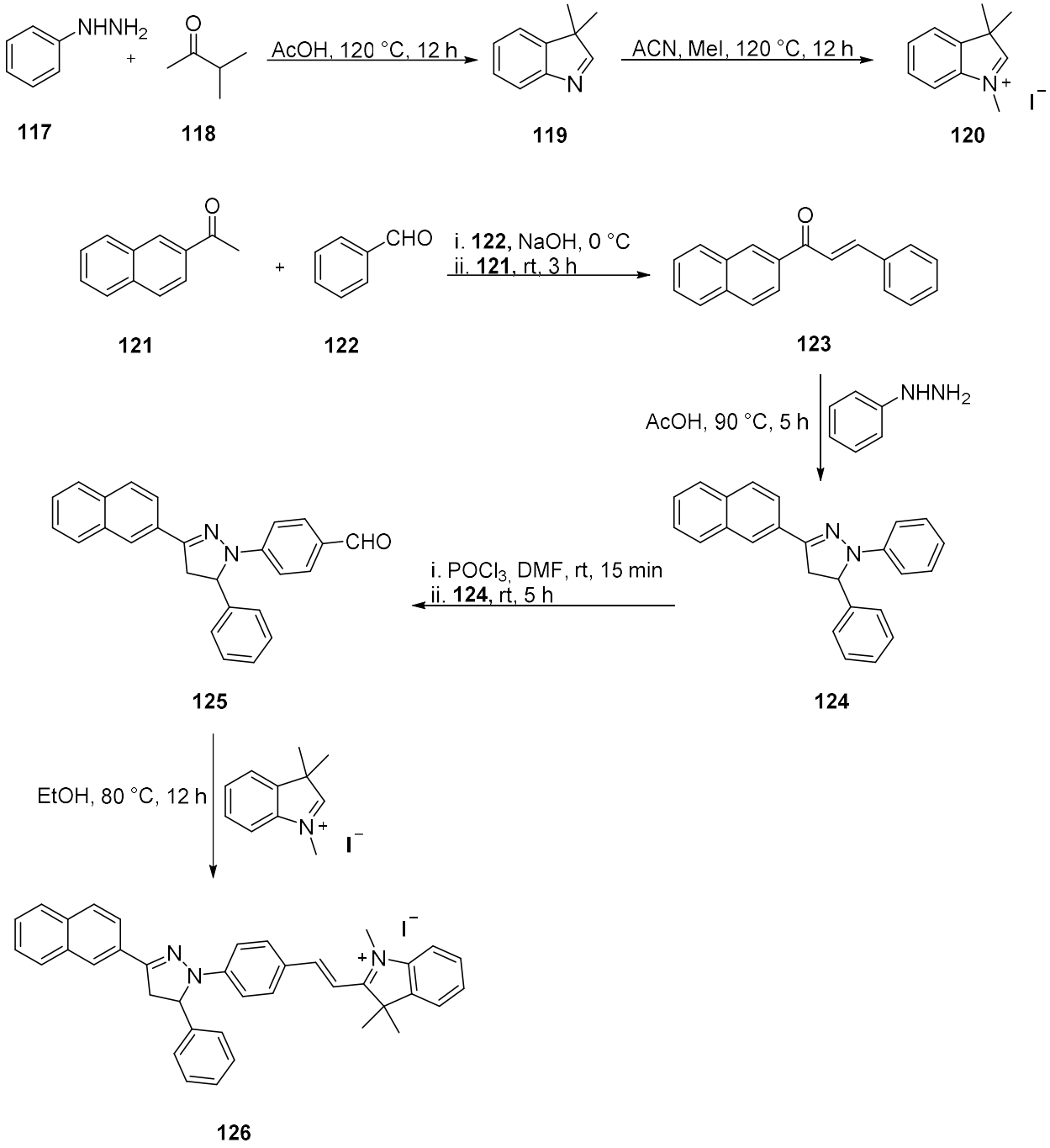


Kuva 28. Liman *et al.*[37] esittämän väriaineen synteesireitti.

Synteeseissä on kuitenkin merkittäviä eroja, esimerkiksi Lima *et al.*[37] valmistamassa väriaineessa neljän hiilen muodostaman renkaan ja muun rakenteen välissä on yksi hiili enemmän ja muutoin rakenne on paljon Meadorin *et al.*[36] väriainetta **110** yksinkertaisempi. Synteesin osalta näissä ei ole muita yhtäläisyyksiä kuin yhden saman lähtöaineen, neljän hiilen muodostaman renkaan, käyttö. Molemmat synteesit ovat kuitenkin melko nopeita tehdä, niissä on yhtä monta vaihetta ja ne vaativat inerttejä olosuhteita etenkin neljän hiilen renkaan lisäämisen jälkeen. Saannot vaihtelivat tässä synteesissä paljon, tuotteen **115** saanto oli 98 %, tuotteen **116a** saanto oli 78 %, tuotteen **116b** 54 % ja tuotteen **116c** 64%. Muihin synteeseihin verrattuna saannot siis vaihtelivat erinomaisesta keskivertoon.[37]

Meadorin *et al.*[36] synteesituotteen toimivuutta solujen kuvantamisessa tutkittiin ja sen todettiin toimivan tässä tarkoituksessa hyvin, kun vesiliukoisuutta parannettiin. Liman *et al.*[37] synteesituotteiden ominaisuuksia tutkittiin fototerapiassa syövän hoidon kannalta. Ne toimivat tässä tarkoituksessa tuottaen soluille haitallisia happimolekyylejä. Näissä väriaineissa on paljon samaa, mutta erilaisten substituenttien ansiosta niillä on täysin erilaiset käyttökohteet.

Wang *et al.*[38] kuvassa 29 esiteltävä synteesi on muista poikkeava ja mielenkiintoinen, koska sen tuote **126** on yhdistelmä syaniini- ja pyratsoliiniväriaineitta. Syaniiniväriaineelle ominaisesti siinä on kahden renkaassa oleva typpiatomin välillä konjugoitunut hiiliketju. Lisäksi siinä on pyratsoliinille ominainen rengas, jossa on kolme hiiltä ja kaksi typpeä vierekkäin.

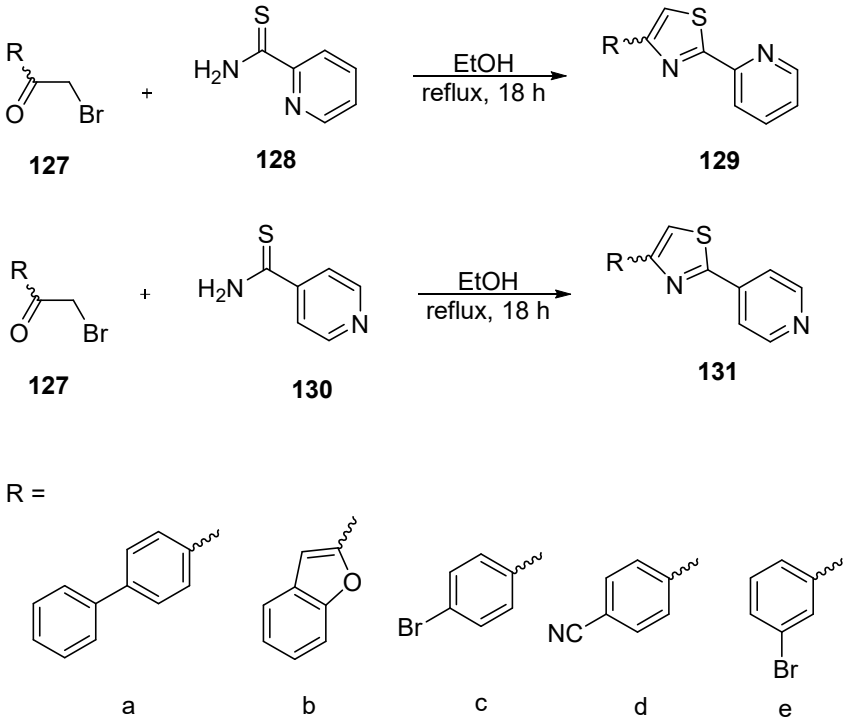


Kuva 29. Wangin *et al.*[38] esittämän väriaineen synteesireitti.

Eri vaiheiden kestot näyttävät noudattavan Wangin *et al.*[38] synteesissä yleistä trendiä, osa vaiheista on pitkiä ja osa muutaman tunnin kestäviä kuumennuksia. Tuotteen **126** saanto oli 63,9 %, mikä on melko keskiverto aiempiin synteeseihin verrattuna. Tuotteella on kuitenkin hyvin erilainen käyttökohde kuin monella muulla väriaineella. Karton-Lifshin

et al.[22] esittivät kuvassa 11 synteesireitin väriaineelle, jolla voidaan havaita vetyperoksidia liuoksesta. Tuote **126** toimii samanlaisessa sovelluksessa; sen avulla voidaan havaita rikkidioksidia. Rikkidioksidin liiallinen määrä voi johtaa vakaviin sairauksiin, joten sen havaitseminen soluissa on tärkeää.[38]

Kuvassa 30 esiteltävä Eryılmazin *et al.*[39] synteesi on hyvin yksinkertainen moneen aiempaan verrattuna; siihen kuuluu vain yksi vaihe. Myös synteesin lopputuotteet ovat yksinkertaisia ja pieniä aiempiin synteeseihin verrattuna.

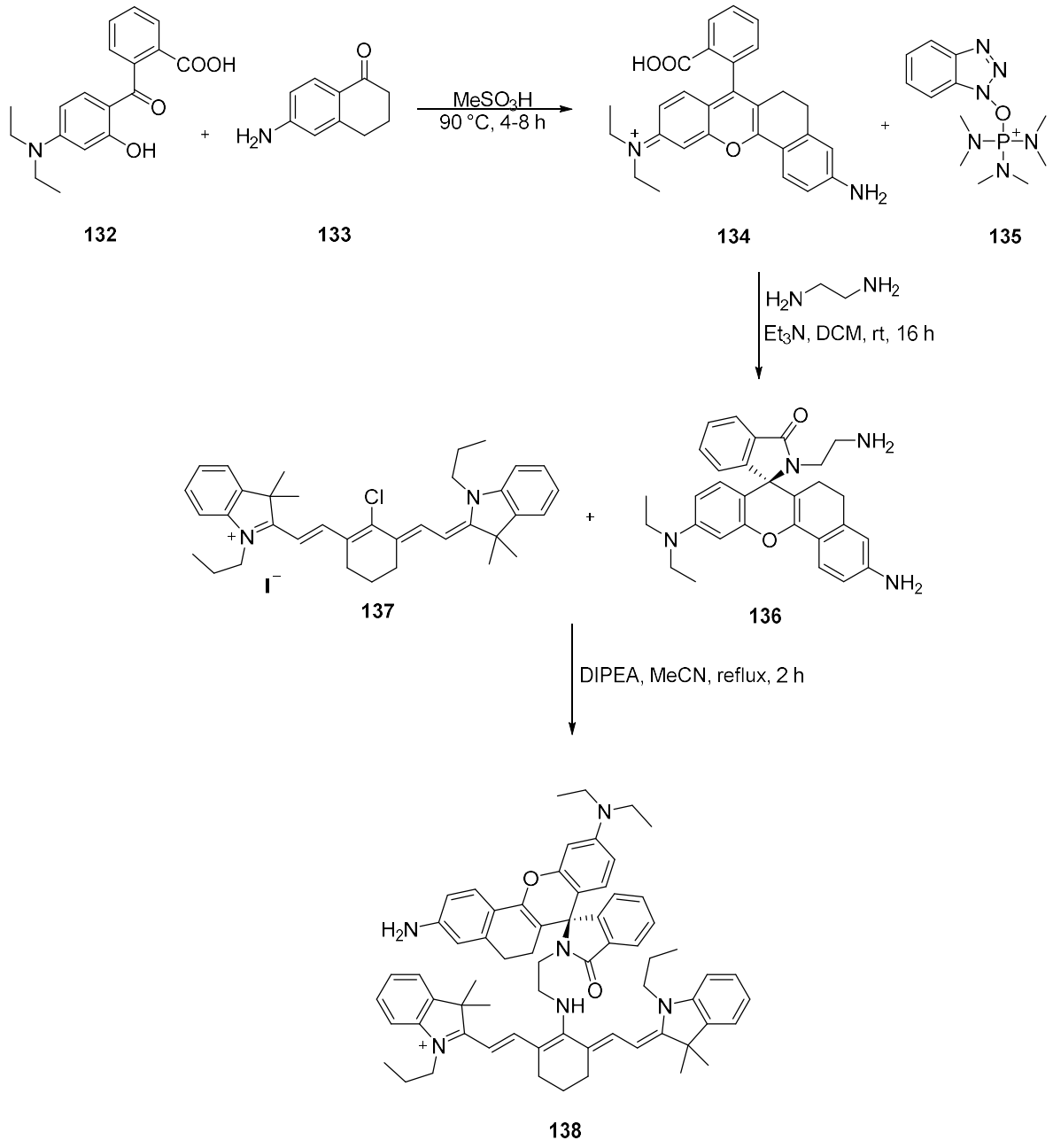


Kuva 30. Eryılmazin *et al.*[39] esittämän synteesin yleiskuvaus.

Saannot Eryılmazin *et al.*[39] synteesituotteille olivat melko hyviä; tuotteelle **129a** 72 %, tuotteelle **129b** 65 %, tuotteelle **129c** 75 %, tuotteelle **129d** 60 % ja tuotteelle **129e** 65 %. Vastaavasti tuotteiden **131** olivat hyviä, tuotteen **131a** saanto oli 69 %, tuotteen **131b** 60 %, tuotteen **131c** 72 %, tuotteen **131d** 55 % ja tuotteen **131e** 61 %. Typen asema renkaassa ei näytä vaikuttavan saantoprosenttiin. Muihin synteeseihin verrattuna tämä on yksinkertaisimpia synteesejä. Tässä on vain yksi vaihe, johon kuuluu vain yksi lämmitys. Myös saannot olivat melko hyviä, joten tämä on varsin tehokas synteesireitti. Myöskin

saatavat tuotteet ovat melko yksinkertaisia, mutta niiden mahdollinen käyttökohde eroaa yleisestä trendistä, koska niillä havaittiin olevan antimikrobisia ominaisuuksia.[39]

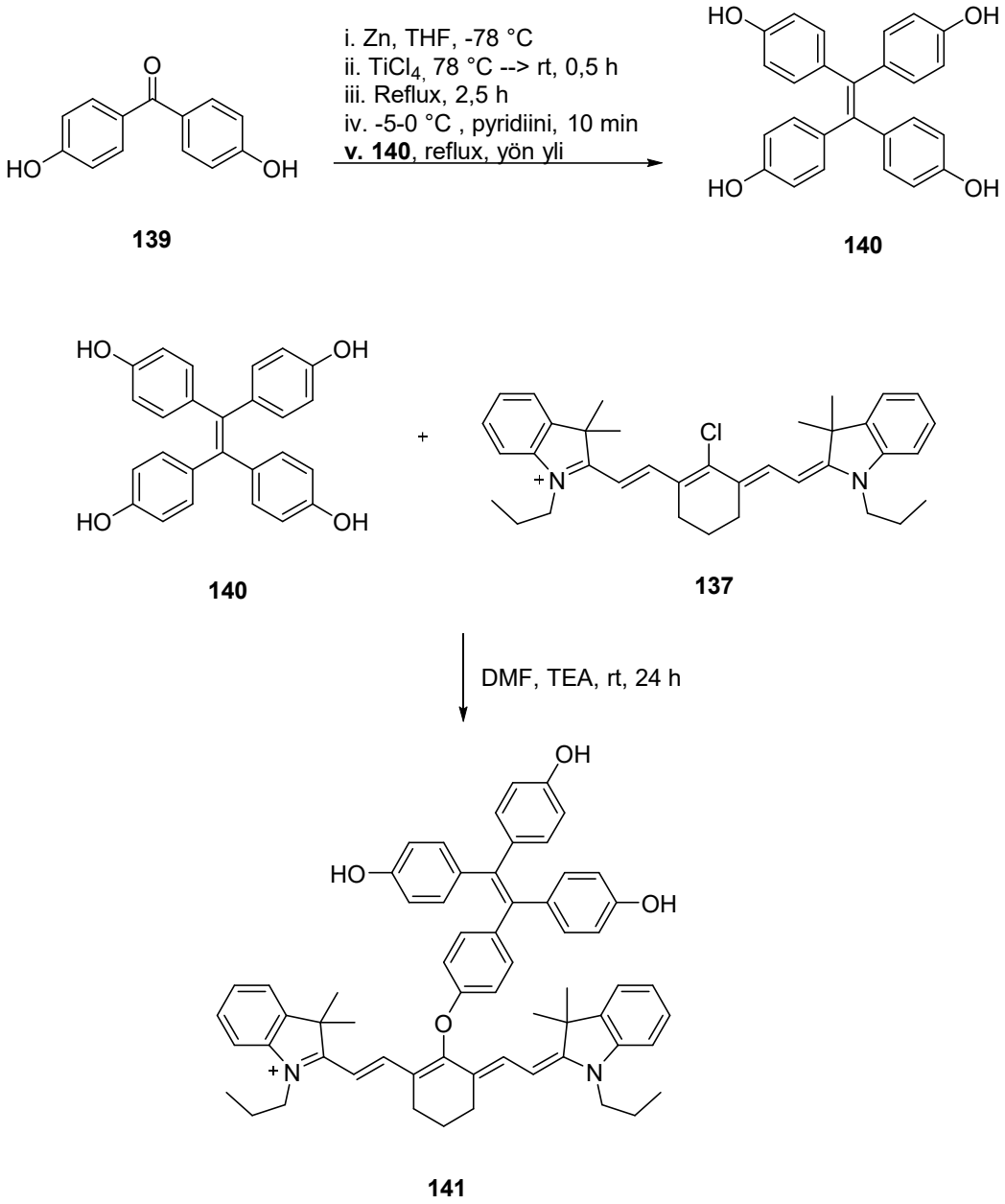
Kuvassa 31 esitellään Zhangin *et al.*[40] synteesireitti syaniiniväriainelle, jolla voidaan havaita pH:ta elävistä soluista.



Kuva 31. Zhangin *et al.*[40] esittämän syaniiniväriaineen synteesi.

Zhangin *et al.*[40] synteesissä valmistetaan ensin koetin **136**, joka yhdistetään kaupallisesti saatavan väriaineen **137** kanssa. Tässä ei siis varsinaisesti syntetisoida syaniiniväriaineen runkoa, minkä vuoksi tämä on hyvin erilainen synteesi moneen aiemmin esiteltyyn synteesiin verrattuna. Tämä on kuitenkin melko yksinkertainen synteesi, johon kuuluu vain kolme vaihetta, jotka ovat yhtä lukuun ottamatta lyhyitä. Saantoa tuotteelle ei ilmoitettu. Tuotetta voitaisiin käyttää mahdollisesti pH:n mittaamiseen fluoresenssin muutoksen avulla, joten tämän syaniiniväriaineen käyttökohde on hyvin erilainen aiemmin esiteltyjen väriaineiden kanssa.

Kuvassa 32 esiteltävä Fangin *et al.*[41] synteesituote **141** muistuttaa hieman kuvassa 31 esitettyä Zhang *et al.*[40] synteesissä saatavaa väriainetta **138**. Molemmissa kaupallisesti saatavilla olevalle syaniiniväriaineelle **137** tehdään jatkoreaktio sen ominaisuuksien muuttamiseksi. Molemmilla tuotteilla **138** ja **141** voidaan havainnoida pH:ta elävistä soluista.



Kuva 32. Fangin *et al.*[41] esittämän syaniiniväriaineen synteesi.

Muuten synteesit eroavat hyvin paljon toisistaan, koska synteesit keskittyvät pH:lle herkän osan syntetisoimiseen ja ne eroavat tuotteissa **138** ja **141** paljon. Molempia käytettään samaan tarkoitukseen erilaisesta rakenteesta huolimatta; näillä väriaineilla **138** ja **141** voidaan tutkia pH:ta elävissä soluissa. Synteesinä tämä eroaa kaikista muista edellisistä hyvin paljon, koska siinä ei tehdä varsinaista syaniiniväriaineen runkoa. Neljän bentseenirenkaan muodostaman systeemin synteesi on periaatteessa vain yksivaiheinen,

mutta tuohon vaiheeseen kuuluu useita jäähdytyksiä, lämmityksiä ja refluksointeja. Nämä osaset kuitenkin ovat viimeistä lukuun ottamatta nopeita, joten aikaa tähän ei kulu kovin kauaa. Viimeinen vaihe synteesistä on yksinkertainen, mutta aikaa vievä. Saanto tuotteelle **141** oli heikohko, 48 %, tässä tutkielmassa yleisesti esiteltyihin saantoihin verrattuna.[41]

Seuraavassa kappaleessa käydään läpi tässä kappaleessa esiteltyjen syaniiniväriaineiden käyttökohteita yksityiskohtaisemmin.

3. Syaniiniväriaineiden käyttökohteita ja sovelluksia

3.1 Nukleiinihappoihin sitoutuvat syaniiniväriaineet

Nukleiinihappoihin sitoutuvia väriaineita voidaan käyttää monissa erilaisissa biologisissa sovelluksissa, jotka osittain menevät päällekkäin lääketieteen käyttökohteiden kanssa.

Molekyylikuvantamista tarvitaan, kun halutaan tietää mitä erilaiset biomolekyylit tekevät luonnollisessa tilassaan solun sisällä. Tähän tarvitaan tehokkaita, kirkkaasti fluoresoivia väriaineita, jotka sitoutuvat tehokkaasti DNA:han tai RNA:han. Schwechheimer *et al.*[23] tutkivat uusia syntetisoimiaan kuvissa 12 ja 13 esitettyjä väriaineita solujen kuvantamisessa. Bromia tai kahdeksasta hiilestä koostuvan konjugoidun renkaan sisältävien väriaineiden havaittiin olevan soluille myrkyllisiä.

Tällaisen solujen kuvantamiseen soveltuvan väriaineen kehittivät myös Yang *et al.*[34,35] Kuvassa 25 esitetty väriaine on vesiliukoinen ja turvallinen soluille sellaisenaan. Se tuottaa happea, kun sitä aktivoidaan valolla, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää syöpäsolujen tuhoamiseen niiden kuvantamisen yhteydessä.

Wang *et al.*[26] kehittivät kuvassa 16 esitetyn väriaineen spesifisti sitoutumaan G-quardruplex DNA:han. Kiinnostus näitä DNA-sekvenssejä kohtaan on noussut viime aikoina, koska niillä saattaa olla hyvin merkittäviä rooleja erilaisissa biologisissa prosesseissa, joita haluttaisiin tutkia tarkemmin. Vielä ei kuitenkaan ole montaa juuri

näihin kiinnittyvää väriainetta, joten kehitystyö on tarpeen. Erittäin tärkeää olisi saada kehitettyä sellaisia fluoresoivia väriaineita, jotka sitoutuvat juuri tiettyyn sekvenssiin, jolloin saataisiin tietoa juuri halutusta G-quardruplex DNA:sta.

Chen *et al.*[27] kehittivät kuvassa 17 esitetyn synteesin, koska he halusivat uudenlaisen väriaineen, jolla voitaisiin kuvata mitokondrioiden nukleiinihappoja. Mitokondriot ovat tärkeitä organismeja, jotka ovat mukana esimerkiksi sairauksien kontrolloimisessa ja apoptoosissa. Niillä on omaa DNA:ta, jonka tutkimiseen tarvitaan oma spesifi väriaine. Syntetisoidut väriaineet olivat stabiileja valossa ja lämmössä, joten niitä voidaan hyvin käyttää kuvantamisen väriaineina. Niiden ominaisuuksia kuvantamisessa tutkittiin HeLa soluissa.

Sha *et al.*[33] kehittivät myös mitokondrioita ja lysosomeja varten väriaineita onnistuneesti. He kehittivät väriaineen, joka sitoutuu spesifisti nitroreduktaasiin (NTR) eli proteiiniin, joka katalysoi esimerkiksi nitroryhmän sisältävien molekyylien pelkistämistä. Väriaine toimi halutulla tavalla ja sen avulla saatiin värjättyä lysosomien ja mitokondrioiden sisältämät nitroreduktaasit yhtä aikaa. Tällaisen väriaineen kehittäminen on tärkeää, koska NTR on tärkeä entsyymi ihmisten terveyden kannalta ja lisäksi sitä hyödyntäen on kehitetty syöpää vastaan taistelevaa aihiolääkettä, joka NTR-entsyymin avulla muokkautuisi kehossa lääkkeeksi.[33]

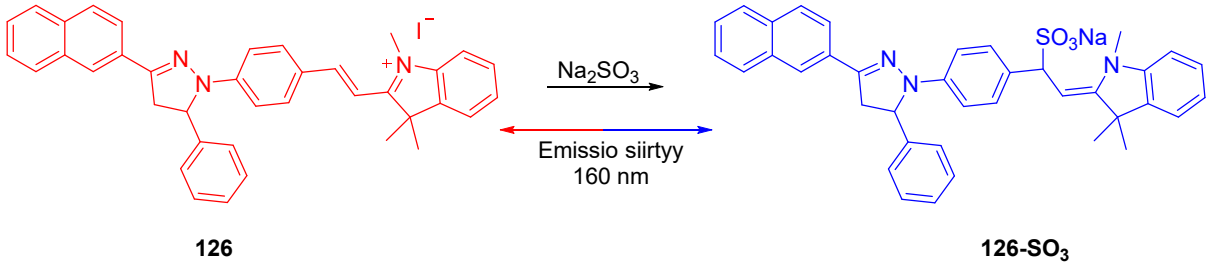
3.2 Syaniiniväriaineiden lääketieteelliset käyttökohteet

Syaniiniväriaineiden käyttöä myös lääketieteessä tutkitaan jatkuvasti lisää ja mahdollisia käyttökohteita on laajasti.

Bokan *et al.*[20] syntetisoivat kuvassa 9 esitetyn väriaineen, joka sitoutuu mahdollisesti syöpälääkkeenä käytettyyn kloroambusiliin (CLB). Muodostuva kompleksi ei yksin emittoi säteilyä, mutta kun CLB vapautuu, voidaan väriaineen havaita emittoivan säteilyä 720 nanometrin taajuudella. Väriainemolekyylissä on myös reaktiivinen karbonyyliryhmä, jonka avulla se voisi muodostaa kompleksin myös syöpäsoluihin erikoistuneen lääkettä kantavan molekyylin kanssa. Tällaisia molekyylejä ovat esimerkiksi tietyt peptidit, vasta-aineet ja nanopartikkelit.[20]

Karton-Lifshin *et al.*[22] kehittivät vuonna 2011 aiemmin kuvassa 11 esitetyn synteesin kytkimellä toimivaan koettimeen. Tätä voitaisiin käyttää vetyperoksidin havaitsemiseen. Molekyylin toiminta perustuu siihen, että väriaineeseen liitetään kytkinmolekyyli, joka voidaan olosuhteita muuttamalla irrottaa väriaineesta, jolloin se emittoi säteilyä lähellä infrapuna-aallonpituutta (NIR). Karton-Lifshin *et al.*[22] testasivat molekyylin toimivuutta ja saivat selville, että vetyperoksidi havaitaan luotettavasti alle 1 μM konsentraatioissa. Liuoksissa tehtyjen kokeiden jälkeen he testasivat väriaineen toimivuutta myös hiiressä olevan vetyperoksidin havaitsemiseen. He ruiskuttivat hiireen vetyperoksidia, väriainekoetinta (dye probe) ja puskuriliuosta (bufferia) sekä kontrollikokeessa vain koetinta tai puskuriliuosta. Puskuriliuos tai koetin yksin eivät emittoi säteilyä lainkaan, mutta puskuriliuoksen, väriainekoetin ja vetyperoksidi yhdessä emittoivat voimakasta punaista säteilyä. Vetyperoksidin konsentraatiolla oli merkitystä säteilyn intensiteettiin. Vetyperoksidia syntyy soluissa normaalisti jonkun verran, mutta liian isoina määrinä se on myrkyllistä soluille. Tämä kehitetty menetelmä vetyperoksidin havaitsemiseen voisi tulevaisuudessa toimia eläimissä ja myöhemmin myös ihmisissä erilaisten biologisten tekijöiden havaitsemiseen sairauksia tutkittaessa.[22]

Wang *et al.*[38] kehittivät hieman samanlaisen koettimen rikkidioksidin havaitsemiseen soluissa. Rikkidioksidi on tärkeä molekyyli solujen toiminalle, mutta jos sitä on soluissa liikaa, voi se saada aikaan vakavia sairauksia. Siksi sen tai sen johdannaisten havaitseminen soluista on tärkeää. Tämän koettimen emissio siirtyy selvästi, kun se sitoutuu rikkiä sisältävään molekyyliin. Koetin oli myös spesifi rikkiä sisältäville molekyyleille, eikä sitoutunut muihin ioneihin. Koettimella voitiin havaita johdannaisia myös mitokondrioiden soluissa. Kuvassa 33 on esitettynä Wang *et al.*[38] esittämän väriaineen toimintaperiaate. Emissio siirtyy huomattavasti punaisesta siniseen, kun liuoksessa on rikkiä sisältävää molekyyliä.

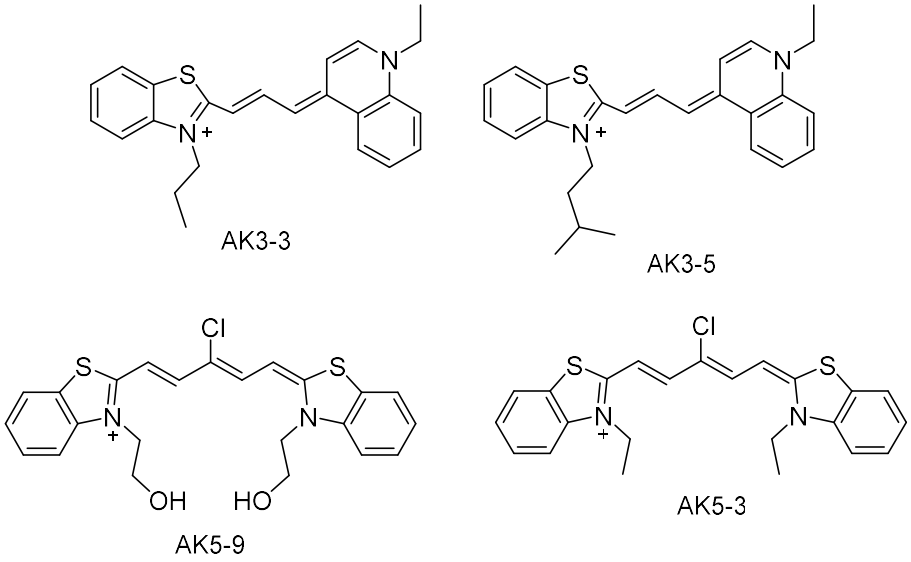


Kuva 33. Wangin *et al.*[38] väriaineen **126** toimintaperiaate.

Vus *et al.*[50] tutkivat miten syaniiniväriaineet vaikuttavat insuliiniamyloidin muodostumiseen. He tutkivat voivatko syaniiniväriaineet estää haitallisen aggregoitumisen. He huomasivat, että erilaiset väriaineet vaikuttivat prosessiin eri tavalla ja hiiliketjun pituudella oli suurta merkitystä insuliiniaggregaatin muodostumisen kannalta. Parhaiten aggregoitumisen estivät tri- ja pentametiinit, joita on esitetty kuvassa 34. Kuvassa ylärivillä on trimetiinejä ja alarivillä pentametiinejä. Huonoiten toimivat mono- ja heptametiinit. Tutkimuksessa käytetyt syaniiniväriaineet voisivat sopia hyvin käytettäväksi lääkkeenä, koska ne eivät ole soluille myrkyllisiä ja ne pystyvät lipofiilisyytensä ja pienen molekyylipainonsa ansioista siirtymään verestä aivoihin.

Monet sairaudet, kuten parantumattomat Alzheimerin[51] ja Parkinsonin[52] taudit sekä 2. tyypin diabetes liittyvät haitalliseen erilaisten proteiinien aggregaatioon kudoksissa ja elimissä. Vaikka Vus *et al.*[50] tutkimuksessa keskityttiinkin tutkimaan väriaineiden käyttöä insuliinin aggregoitumisen estämiseen, voitaisiin menetelmän toimiessa sen soveltamista myös muiden proteiinien aggregaation estämiseksi tutkia.[50]

Kuvassa 34 on esitetty Vusin *et al.*[50] tutkimuksessa käytetyn neljän parhaiten toimineen väriaineen rakenteet. Nämä neljä estivät lähes täydellisesti insuliinin aggregoitumisen. Syaniiniväriaineet sitoutuvat spesifisti tiettyyn osaan proteiinia, mikä estää aggregaatin muodostumisen.[50]



Kuva 34. Parhaiten insuliinin aggregoitumisen estäneet väriaineet.[50]

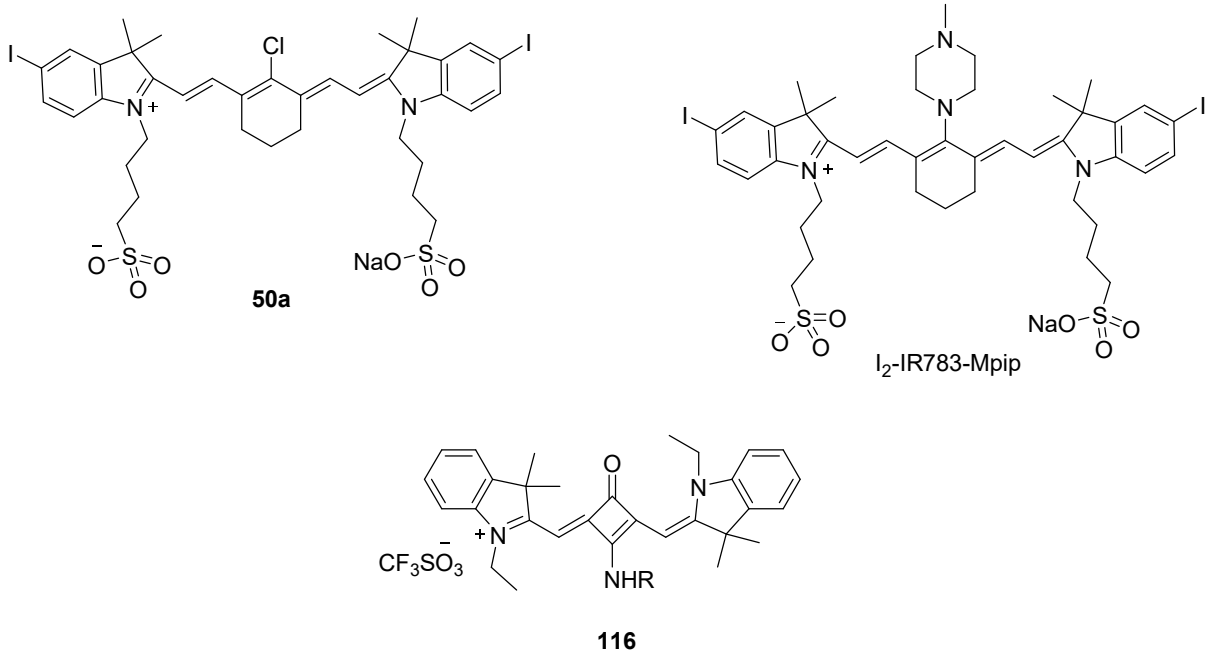
Syaniiniväriaineita on tutkittu myös syöpälääkkeinä. Fotodynaaminen hoito on yksi mahdollinen syöpähoitokeino, jossa käytetty lääke aktivoidaan valolla. Tällöin tapahtuu reaktioita, joissa muodostuu soluille myrkyllisiä reaktiivisia happijohdannaisia. Tämän tekniikan yksi merkittävimmistä eduista on se, että aktivoiva valo voidaan kohdentaa tiettyyn kohtaan kehoa, jolloin myrkyllisiä aineita ei leviä muualle kehoon ja terveisiin kudoksiin kovin paljon. Kuvissa 14 ja 15 aiemmin esitetyt Atchisonin *et al.*[24] ja Siriwiboolin *et al.*[25] synteesit on molemmat kehitetty tätä silmällä pitäen. Valmistetut väriaineet toimivat tutkimuksen mukaan myös paksun kudoksen läpi ja saavat syöpäsolut kuolemaan.[24,25]

Siriwibool *et al.*[25] julkaisivat vuonna 2020 väriaineen I_2-IR783-Mpip (kuva 15), joka emittoi happamissa oloissa voimakkaasti aallonpituudella 820-950 nm. Neutraaleissa tai emäksisissä olosuhteissa molekyyli emittoi sinisenä tai vihreänä. Syöpäsolujen lysosomeissa olosuhteet ovat happamammat kuin terveissä soluissa, joten väriaineen selektiivisyys happamammille olosuhteille on hyödyllistä.

Atchison *et al.*[24] puolestaan tutkivat väriaineidensa **50a** ja **50b** (kuva 14) toimivuutta haimasyövän hoidossa. Haimasyöpä on yksi vakavimmista syövistä ja yleistymässä

esimerkiksi Suomessa koko ajan. Haimasyöpä todetaan usein myöhään ja ennuste parantumisesta on huono. Yleisin hoitomuoto haimasyöpään on leikkaus, mutta aina se ei onnistu. Tällöin syöpää yritetään hoitaa sädehoidolla tai kemoterapialla tai näiden yhdistelmällä, mutta nämäkään eivät ole kovin tehokkaita keinoja. Siksi haimasyöpään yritetään jatkuvasti kehittää uutta hoitomuotoa.[53] Atchisonin *et al.*[24] kehittämä väriaine toimi tehokkaasti tutkimuksissa. Hiirellä ollut ihmisen haimasyöpäkasvaimen kasvu pysähtyi, minkä lisäksi se myös fluoresoi tehokkaasti mahdollistaen kasvaimen kasvun seurannan.

Myös kuvassa 28 esitetty Liman *et al.*[37] synteesireitin tuloksena saadut molekyylit **116a-116c** kehitettiin syövän valoterapiaa varten. Näiden väriaineiden rakenne on hyvin erilainen Atchisonin *et al.*[24] ja Siriwiboolin *et al.*[25] samaan käyttötarkoitukseen valmistettujen väriaineiden kanssa, koska niissä on mukana neljän hiilen muodostama rengas, mutta ne myös kiinnittyvät selektiivisesti syöpäsoluihin terveiden solujen sijaan. Nämä väriaineet kestävät hyvin säteilyä ja valolla aktivoituna tuottavat happea, joka aiheuttaa solujen kuoleman. Kuvassa 35 on esitetty Atchisonin *et al.*[24], Siriwiboolin *et al.*[25] ja Liman *et al.*[37] valmistamat väriaineet.



Kuva 35. Atchisonin *et al.*[24] väriaine **50a**, Siriwiboolin *et al.*[25] väriaine I_2-IR783-Mpip ja Liman *et al.*[37] esittämä väriaine **116**.

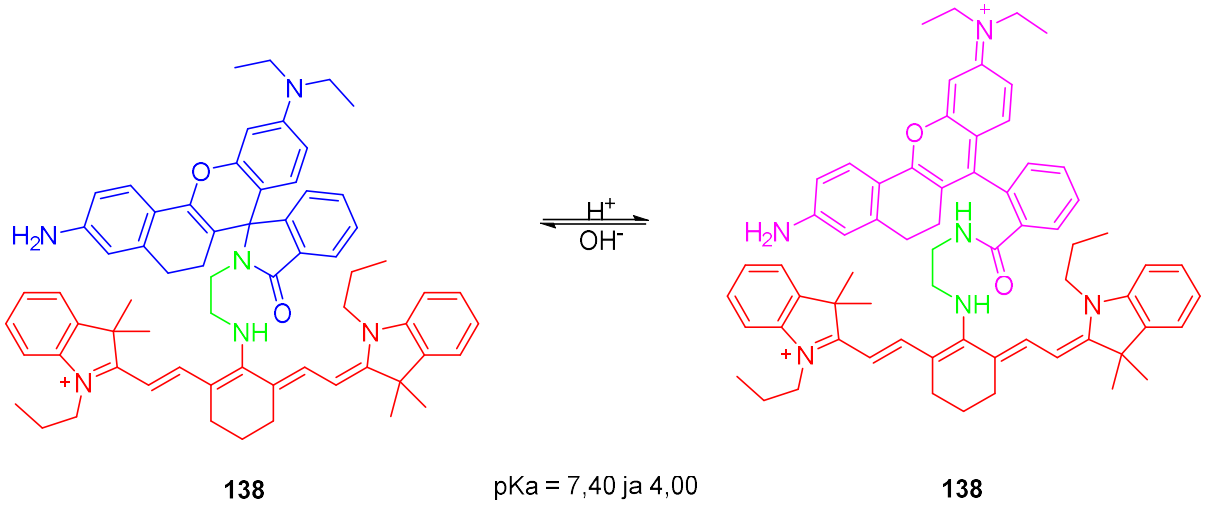
Monessa tapauksessa syaniiniväriaineiden ei haluta muodostavan aggregaatteja, koska aggregaatit usein heikentävät väriaineiden fluoresenssiä merkittävästi. Kasvainten kuvantamisessa voimakas fluoresenssi on erittäin tärkeää ja monet tähän tarkoitukseen käytettävät heptametiiniväriaineet, kuten kuvan 35 väriaine **50a**, muodostavat helposti aggregaatteja. Siksi Luciano *et al.*[29] lähtivätkin kehittämään väriainetta, joka ei aggregoituisi ja jolla saataisiin aikaan voimakas fluoresenssi. He kehittivät kuvassa 19 esitetyn synteesin, jonka tuote **72** toimii erinomaisesti kasvainten kuvantamisessa verrattuna aiemmin käytettyyn väriaineeseen, jonka fluoresenssi oli paljon heikompi.[29]

Kuvassa 30 esitetyn Eryılmazin *et al.*[39] synteesin tuotteita tutkittiin niiden antimikrobisten ominaisuuksien vuoksi. Tutkimuksessa huomattiin, että etenkin yhdiste **131c** voisi toimia tässä tarkoituksessa hyvin. Synteesillä saatiin tuotettua kahta erilaista syaniinivärinerunkoa näistä synteesituotteet **131a-e** toimivat antimikrobisissa sovelluksissa tuotteita **129a-e** paremmin. Väriaineiden antimikrobisia ominaisuuksia ei tarkasteltu suuremmassa mittakaavassa, mutta ne osoittivat aktiivisuutta esimerkiksi E.

colia vastaan. Tämän tiedon perusteella näitä väriaineita voitaisiin kehittää lääkkeeksi erilaisia bakteereja vastaan.[39]

Moniin sairauksiin, kuten Alzheimerin tautiin ja syöpään liitettään normaalista poikkeava pH solujen sisällä esimerkiksi lysosomeissa. Solujen pH:n määrittäminen on tärkeää, koska sen avulla voidaan saada tietoa solun toiminnasta normaaleissa ja sairaissa soluissa. Zhang *et al.*[40] kehittivätkin syaniiniväriaineen, jolla saadaan tietoa solun pH:sta sitä vahingoittamatta. Koettimen fluoresenssin intesiteetti muuttuu, kun pH muuttuu. Kun pH on lähellä kolmea, fluoresenssi on voimakkain. Kun lähestytään pH:ta yhdeksän, fluoresenssi häviää lähes kokonaan.

Koettimen **138** reaktiivinen kohta on kuvassa 36 vihreällä merkattu viisirenkaassa oleva typpi, joka voi ottaa vastaan vetyatomin. Tämän seurauksena rengas aukeaa, mikä vaikuttaa kromoforin fluoresenssiin, joka voidaan mittauksissa havaita.[40]

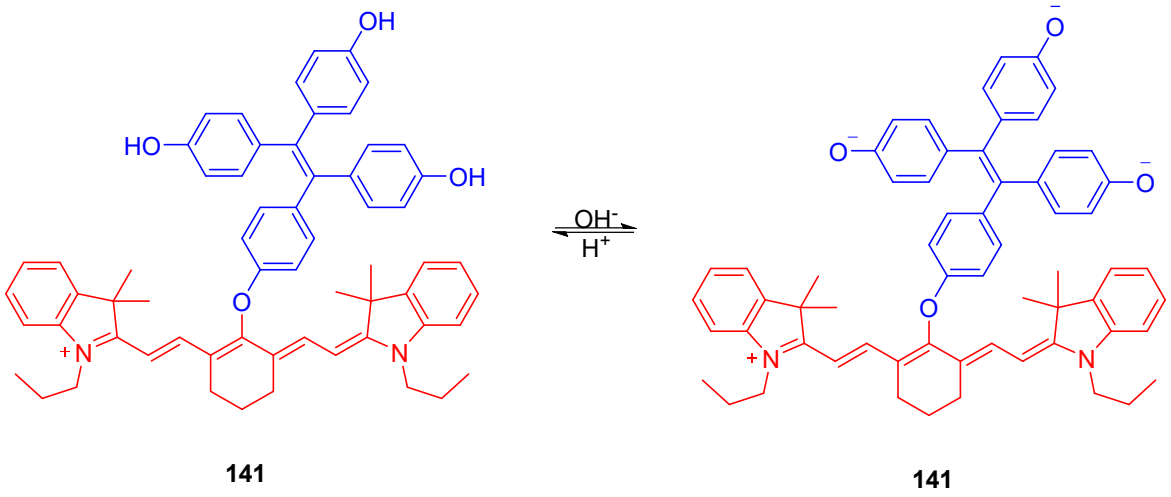


Kuva 36. Zhangin *et al.*[40] koettimen **138** toimintaperiaate.

Samana vuonna, kun Zhang *et al.*[40] julkaisivat oman synteesinsä, julkaisivat myös Fang *et al.*[41] samaan käyttötarkoitukseen soveltuvan syaniiniväriaineen. Molemmissa on mukana sama syaniiniväriaineen runko, mutta pH:lle herkkä osa on eri.

Kuvassa 37 on esitetty Fangin *et al.*[41] pH-koettimen toimintaperiaate. Fangin *et al.*[41] koettimella kirkkain fluoresenssi saadaan, kun pH on viisi. Koettimien intensiteetti katoaa

lähes täysin, kun pH on noin yhdeksän. Toiminta-alue on Zhangin *et al.*[40] koettimella siis hieman laajempi, sillä se toimii pH alueella 3-9.



Kuva 37. Fangin *et al.*[41] julkaiseman pH-koettimen toimintaperiaate.

3.3 Nanomateriaalit

Nanomateriaalit ovat jatkuvasti kehittyvä tutkimusala, jossa yhdistyy esimerkiksi biologia ja kemia. Kohle *et al.*[54] yhdistivät silikananopartikkelin ja syaniiniväriaineen. Tällä tavalla voidaan saada tietoa silikakeskusta ympäröivän ligandikerroksen paksuudesta, jonka huomattiin vaikuttavan kompleksin fluoresenssispektriin. Tulevaisuudessa voisi olla mahdollista hyödyntää tätä havaintoa esimerkiksi uusia lääkkeitä kehitettäessä.

Syaniiniväriaineita voidaan yhdistää myös kultananopartikkeleiden kanssa. Tällöin niitä voidaan käyttää esimerkiksi syövän havaitsemiseen. Kultananopartikkeli ja syaniiniväriaine voivat sitoutua toisiinsa kovalenttisesti. Tällainen uudenlainen nanokompleksi toimii sen jälkeen sekä syövän havaitsemisessa että sen mahdollisessa poistamisessa. Syöpäsolut voidaan väriaineen avulla havaita helposti, koska kompleksi kiinnittyy vain syöpäsoluihin ja huuhtoutuu nopeasti pois terveistä soluista. Aluetta, jolla syöpäsoluja epäillään olevan, säteilytetään lähes infrapunataajuudella olevalla valolla,

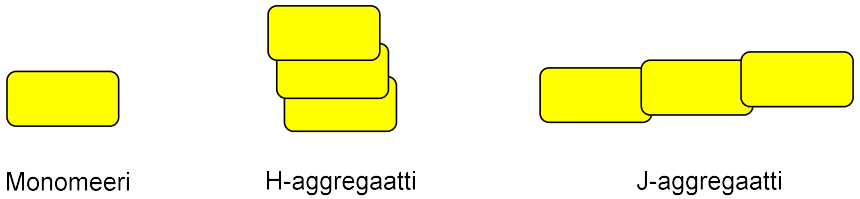
jolloin väriaine aktivoituu ja emittoi säteilyä. Tämä säteily mitataan ja sen avulla saadaan tietoa syöpäsolujen sijainnista. Syöpäsolujen tuhoutuminen saadaan aikaa säteilyttämällä niitä radiotaajuudella, joka aiheuttaa syöpäsoluille hypertermian eli ne kuolevat kuumuuteen.[55]

Väriaineet voivat muodostaa supramolekyylejä itsejärjestäytymällä uudenlaisiksi systeemeiksi. Mu *et al.*[32] tutkivat, miten kuvassa 23 esitetty väriaine itsejärjestäytyy erilaisissa liuottimissa. Orgaanisissa liuottimissa väriaine säilyy monomeerinä, mutta vesiliuoksessa se muodostaa itsejärjestäytymällä nanolevyjä hyvin matalissakin konsentraatioissa. Nanolevyt muodostuvat, kun väriainemolekyylit vetysitoutuvat toisiinsa. Nämä levyt lämpenevät hyvin voimakkaasti, kun niitä säteilytetään. Niiden lämpötila nousee 30 ºC:stä aina 80 ºC:een. Tutkimuksissa todettiinkin, että väriaineella voidaan paitsi havaita kasvaimet fluoresenssin avulla, myös tuhota ne aktivoimalla väriainelevyjä laserin avulla, jolloin muodostuva lämpö tuhoaa syöpäsoluja. Laserilla aktivointi kuitenkin vaatii sen, että tiedetään missä kasvain on ja että se ei ole juurikaan levinnyt, koska laser sai hiirillä aikaan palovammoja aktivointikohtaan. Palovammat kyllä paranivat ja kasvain hävisi. Väriaine poistuu muualta kehosta tehokkaasti, joten se on spesifi syöpäsoluille.[32]

Sun *et al.*[17] kehittivät kuvassa 6 esitetyn synteesin väriaineelle, jota voidaan käyttää lyijyionien havaitsemiseen esimerkiksi luonnonvesistä. Lyijyä käytetään paljon teollisuudessa, mutta se on hyvin myrkyllistä, joten sen havaitseminen esimerkiksi jätevesistä on todella tärkeää. Tämä metodi perustuu G-quadruplex ja väriaineen muodostamaan kompleksiin kaliumionien läsnä ollessa. Kun liuoksessa on syaniiniväriainetta, kaliumioneja ja tätä nelisäikeistä DNA:ta, ne muodostavat yhdessä kompleksin. Lyijyionit sitoutuvat DNA:han kaliumia paremmin, joten kaliumionit korvautuvat systeemistä samalla muuttaen sitä niin, että väriaine ei voi enää sitoutua siihen. Tämä voidaan huomata siirtymänä absorptiospektrissä. Absorptio oli myös riippuvainen liuoksen konsentraatiosta.[17]

3.4 Aggregaatit

Syaniiniväriaineet voivat muodostaa kahdenlaisia aggregaatteja. J-aggregaateissa väriaineet kiinnityvät toisiinsa ''pää-häntä'' muodostelmaan. H-aggregaateissa taas kiinnittyminen tapahtuu ''naama-naamaa'' vasten.[56] Kuvassa 38 on esitettynä yksinkertaistetut esimerkit H- ja J-aggregaateista.

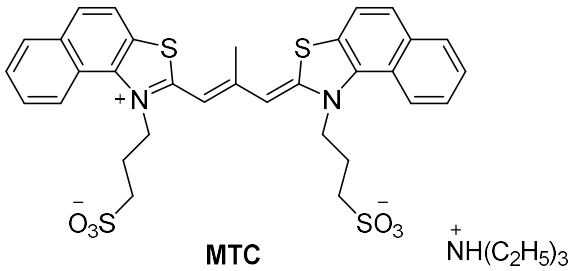


Kuva 38. H- ja J-aggregaattien kiinnittyminen toisiinsa esitettynä yksinkertaistettuna kuvana.[56]

Syaniiniväriaineiden kykyä sitoutua DNA:han voidaan käyttää hyödyksi myös aggregaattien muodostumisen ohjaamisessa. Wang *et al.*[56] tutkivat voisiko väriaine IR786 muodostaa H- tai J-aggregaattia halutun DNA-muotin mukaan. He käyttivät muottina DNA G-quadruplexejä (GC) testatakseen, voisiko muotilla tehdyllä väriaineella parantaa DNA-GC:n havaitsemista. He huomasivat, että aggregaatti syntyy ja sen avulla DNA-GC:n havaitseminen helpottuu. Uusi havaitsemismenetelmä säästi aikaa. Tämä johtui siitä, että IR786-DNA-GC-aggregaatti toimii on-off periaatteella. Kun GC sitoutuu aggregaattiin, väriaine sammuu. Myös seulonta-akseli suurenee. He kuitenkin huomasivat, että aggregaattia ei muodostu yksinkertaisesta tai kaksinkertaisesta DNA-juosteesta, vaan muodostuminen vaatii nimenomaan G-quadruplexin. GC:n rakenne on esitetty kuvassa 40.[56]

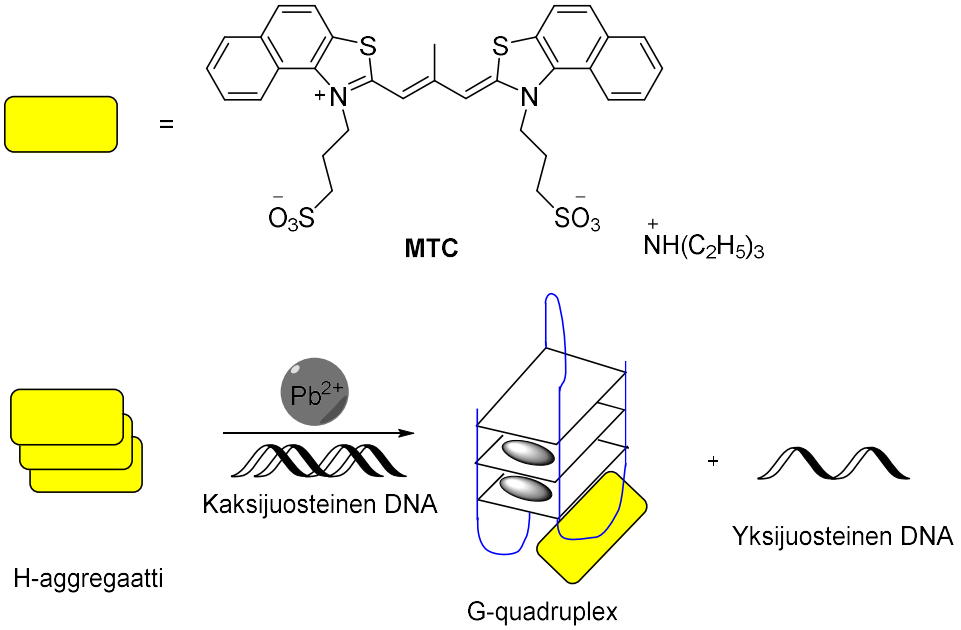
Syaniiniväriaineiden ei usein kuitenkaan haluta muodostavan aggregaatteja, koska ne eivät silloin enää toimi toivotulla tavalla. Yu *et al.*[44,45] tutkivatkin voidaanko tietynlaisella DNA-muotilla hajottaa jo syntyneet aggregaatit. He saivat selville, että väriaine **15 TC-P4** muodostaa H-aggregaatteja PBS:ssä. Aggregaatit voitiin kuitenkin hajottaa takaisin väriaineeksi **15 TC-P4** tai vastaavaksi monomeeriksi **13 TC**. Tämä onnistui käyttämällä GC-DNA:ta. Kaksi- tai yksijuosteinen DNA ei hajottanut aggregaatteja. Tätä havaintoa voitaisiin hyödyntää esimerkiksi tiettyjen GC-DNA ketjujen havaitsemiseen.

Yu *et al.*[57] tutkivat miten MTC-väriaineen avulla voitaisiin havaita lyijyä. Tämä kuvassa 39 esitetty väriaine muodostaa aggregaatteja, jotka voidaan hajottaa GC-DNA:lla. Aggregaatit eivät hajoa monomeereiksi pelkästään kaksijuosteisen DNA:n vaikutuksesta, vaan siihen vaaditaan myös ioneja. Tietty sekvenssi kaksijuosteista DNA:ta muodostaa GC-DNA:ta sitoutuessaan liuoksen lyijy-ioneihin. Kun väriaineaggregaatti hajoaa, se havaitaan absorption muutoksena. Tietyn DNA-sekvenssin ja väriaineen avulla voidaan siis havaita, onko liuoksessa lyijyä. Kuvassa 39 on esitetty Yu *et al.*[57] tutkimuksessa käytetyn väriaineen rakenne.



Kuva 39. Yun *et al.*[57] tutkimuksessa käytetty väriaine, joka on syntetisoitu Hamerin[58] ja Fickenin[59] metodeilla.

Kuvassa 40 esitetään mahdollinen toimintamekanismi lyijyn havaitsemiseksi.[57]



Kuva 40. Yun *et al.*[57] esittämän lyijyn havaitsemiseen tarkoitetun väriaineen mahdollinen toimintamekanismi.

Kuvassa 40 on esitetty, miten kaksijuosteinen DNA-ketju aukeaa oikeissa olosuhteissa muodostaen kuvassa esitetyn GC-DNA-kompleksin väriaineen ja lyijy-ionien kanssa. GC-DNA-kompleksissa neljä guaniinia vetysitoutuvat muodostaen tasomaisen systeemin, jonka keskellä on paikka ionille. Nämä tasot voivat edelleen muodostaa kuvassa 40 esitetyn kolmen tason muodostaman kompleksin. Ilman lyijy-ioneja tätä hajoamista ja GC-DNA:n muodostumista ei tapahdu. Väriaine on mukana tässä GC-DNA-kompleksissa monomeerinä. Väriaineen emissio siirtyy, kun se on mukana kompleksissa ja aggregaatti hajoaa. Tämä voidaan havaita, jolloin myös liuoksessa olevien lyijy-ionien läsnäolo voidaan todeta.[57]

4. Yhteenveto

Syaniiniväriaineilla on pitkä historia teollisuudessa erilaisten materiaalien värjäyksessä ja myöhemmin niiden tutkimus on levinnyt laajasti myös erilaisiin biologisiin ja lääketieteellisiin sovelluksiin. Tässä tutkielmassa käytiin läpi erilaisia uusimpia tai ominaisuuksiltaan erityisen mielenkiintoisia syaniiniväriaineita ja niiden synteesejä.

Suurin osa synteeseistä hyödyntää perinteisiä synteesimenetelmiä, mutta muutamassa käytettiin mikroaaltoja. Nämä mikroaaltoavusteiset synteesit olivat hyvin nopeita ja saannot olivat hyviä, joten niiden käyttöä voitaisiin tutkia enemmänkin. Toistaiseksi mikroaaltojen avulla valmistetut väriaineet ovat olleet melko yksinkertaisia, vaikka usein syaniiniväriaineet vaativat esimerkiksi tiettyjä substiuentteja toimiakseen halutulla tavalla.

Monessa synteesissä myös hyödynnettiin kaupallisesti saatavia tai jo julkaistuja syaniiniväriaineiden synteesejä uusien väriaineiden kehittämiseen. Tämä on viisas ja tehokas tapa, koska kaikissa tapauksissa tällä tavalla olemassa olevan syaniiniväriaineen ominaisuuksia parannettiin ja se saatiin toimimaan juuri halutulla tavalla tietyssä sovelluksessa.

Työssä käytiin läpi yhteensä 27 erilaista synteesiä. Niiden kestot vaihtelivat muutamista tunneista moniin päiviin. Myös saannoissa oli suurta vaihtelua; parhaimmillaan päästiin yli 90 % saantoihin ja huonoimmat jäivät alle 20 %. Suurimmassa osassa synteeseistä saannot olivat kuitenkin yli 60 %, mikä on hyvä saanto näin monimutkaisissa ja monivaiheisissa synteeseissä. Pelkästään saannon ja synteesin keston perusteella ei voi oikeastaan sanoa mikä synteesi oli hyvä ja mikä huonompi. Usein synteeseihin tuli paljon vaiheita lisää, mitä monimutkaisempi lopputuote oli. Erilaisilla substituenteilla on puolestaan suuri merkitys tuotteen ominaisuuksien kannalta, joten yksinkertaisempi synteesituote ei toimisi halutussa sovelluksessa oikein, jolloin lyhyempi kesto tai parempi saanto ei tuota haluttua tulosta.

Syaniiniväriaineiden käyttökohteet keskittyvät nykyään niiden fluoresenssin hyödyntämiseen. Erilaisten syöpäkasvainten kuvantaminen ja niiden hoitaminen fototerapialla on yksi eniten tutkituista lääketieteen sovelluksista. Syaniiniväriaineilla voidaan myös havaita soluista ioneja tai molekyylejä, jotka ovat niille haitallisia tai joita esiintyy paljon jonkun sairauden vuoksi. Yksi yleisimmistä syaniiniväriaineiden käyttökohteista on solujen kuvantaminen ja DNA:n ja RNA:n värjääminen. Näitä varten on saatavilla paljon myös kaupallisia syaniiniväriaineita, kuten esimerkiksi SYBR Green II.

Aggregoituminen voi olla iso haitta tai tavoiteltava ominaisuus riippuen väriaineen käyttökohteesta. Monesti aggregaatteja ei haluta, koska niiden muodostuessa väriaine ei enää toimi odotetulla tavalla. Joskus kuitenkin aggregaatteja voidaan hyödyntää esimerkiksi ionien havaitsemiseen tai juuri tietyn DNA-sekvenssin erottamiseen. Lääketieteessä on tutkittu syaniiniväriaineiden kykyä estää erilaisten proteiinien aggregaatiota, jonka on huomattu olevan tyypillistä tietyille sairauksille. Erilaiset nanomateriaalit ovat myös kasvava tutkimuskohde. Esimerkiksi erilaisia nanopartikkeleita on liitetty syaniiniväriaineisiin ja niitä on käytetty lääketieteen tutkimuksissa. Tämän lisäksi erilaisia itsejärjestäytyviä systeemejä on kehitetty ja syaniiniväriaineen ja DNA:n muodostamaa kompleksia on tutkittu ionien havaitsemiseen.

Syaniiniväriaineilla on paljon erilaisia käyttökohteita. Tulevaisuudessa niiden merkitys etenkin lääketieteen käyttökohteissa tulee kasvamaan, koska niiden ominaisuudet esimerkiksi syövän hoidossa vaikuttavat erittäin lupaavilta.

KOKEELLINEN OSA

5. Työn tarkoitus

Tämän työn tarkoituksena oli syntetisoida lähtöaineita syaniinirunkoisille väriaineille. Myös väriaineen synteesin ongelmia pyrittiin poistamaan ja syntetisoimaan uusia väriaineita käyttämällä näitä uusia lähtöaineita, joita työssä tehtiin.

6. Käytetyt laitteet ja reagenssit

Taulukossa 2. on esitetty kaikki synteeseissä käytetyt reagenssit.

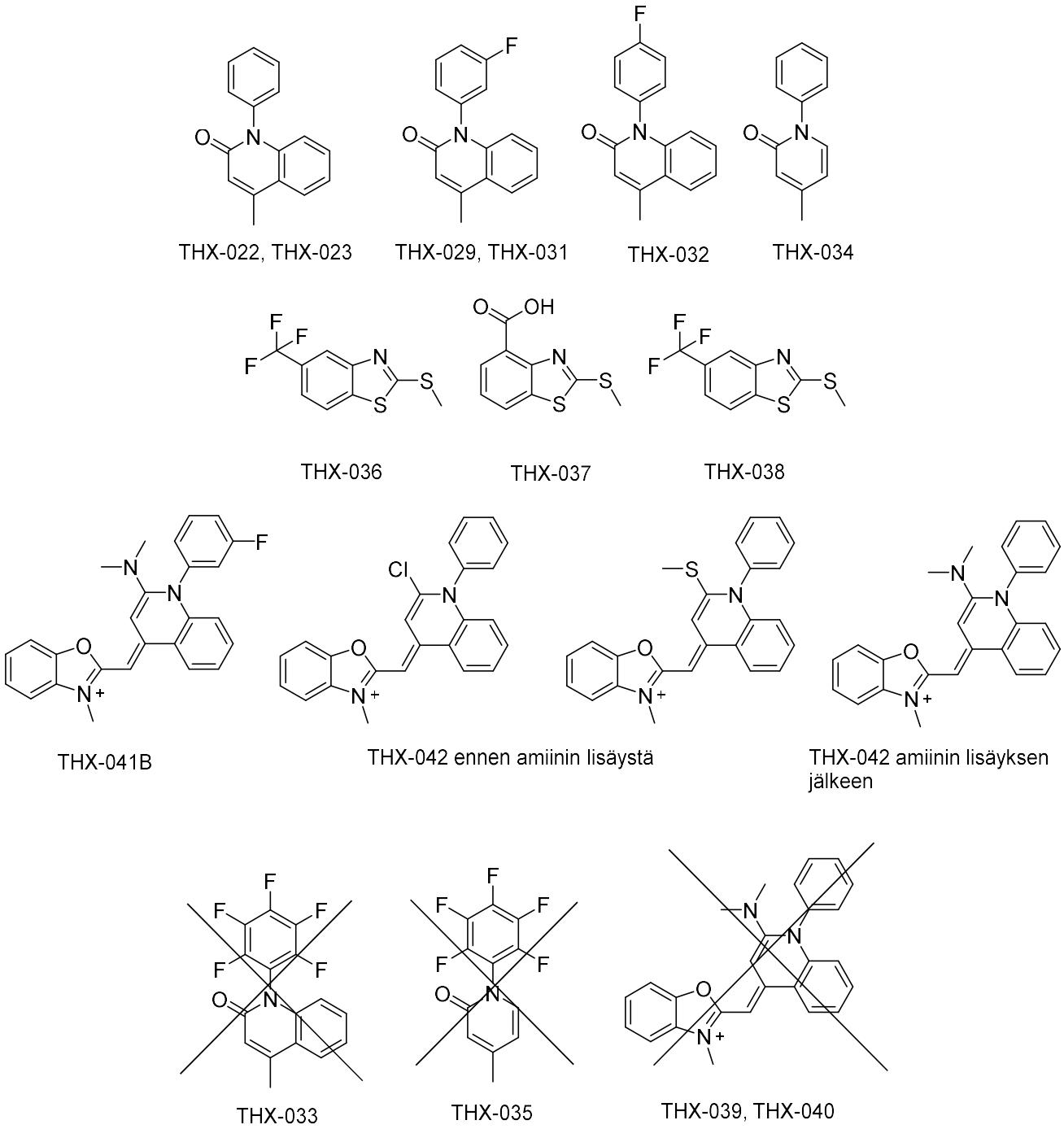
Taulukko 2. Käytetyt laitteet ja reagenssit

Laite/reagenssi	Valmistaja	Puhtaus
NMR AVANCE III HD 300 MHz	Bruker	
Rotavapori Laborota 4000 efficient	Heidolph	
Vaaka APX-200	Denver Instrument	
1,2- DCE	Sigma-Aldrich	>99,0 %
11-merkaptoundekaanihappo	Sigma-Aldrich	95 %
1-fluori-3-jodibentseeni	TCI	>99,0 %
1-fluori-4-jodibentseeni	TCI	>98,0 %
2-hydroksi-4-metyylikinoliini	Sigma-Aldrich	97 %
2-hydroksi-4-metyylipyridiini	TCI	>98,0 %
3-amino-4-klooribentsoehappo	TCI	>98,0 %
3-amino-4-klooribentsotrifluoridi	TCI	>98,0 %
Asetonitriili	J. T. Baker	HPLC
DCM	VWR	100,00 %
Dietyylieetteri	VWR	100,00 %
Dimetyyliamiini	Sigma-Aldrich	40 % wt. in H2O
DIPEA		
DMF	Fisher Chemical	99,97 %
DMF (kuiva)	Acros Organics	99,80 %

DMSO	Merck	>99,0 %
Etanoli	Altia	>99,5 %
Etyyliasetaatti	VWR	99,90 %
Fosforioksikloridi	Fluka	98 %
Heksaani	VWR	99 %
Jodibentseeni	Fluka	>99 %
Jodimetaani	Riedel-de Haën	99 %
Kaliumetyyliksantaatti	Fluka	>99 %
Kaliumkarbonaatti	J. T. Baker	99,0 %
Kuparijauhe	Merck	99,7 %
Metanoli	J. T. Baker	HPLC
Natriumsulfaatti	Sigma-Aldrich	>99,0 %
Pentafluorijodibentseeni	TCI	>99,0 %
Trietyyliamiini	Merck	99 %

7. Yleistä synteeseistä

Kaikkiin synteeseihin käytettiin edellä listattuja reagensseja ilman muuta käsittelyä, ellei toisin mainita. Työssä syntetisoitiin yhteensä viisi erilaista uutta lähtöainetta uusille väriaineille. THX-022, THX-023 ja THX-036 ovat jo entuudestaan tunnettuja synteesejä, joita käytettiin uusien lähtöaineiden mallina. Uusia reittejä väriaineiden synteesiin testattiin myös ja näiden tulokset on listattu seuraavassa kuvassa 41.



Kuva 41. Kaikki työssä käsiteltävät molekyylit synteesikoodeineen. Alarivi eli THX-033, THX-035, THX-039 ja THX-040 ovat epäonnistuneita synteesejä, joita ei saatu toimimaan.

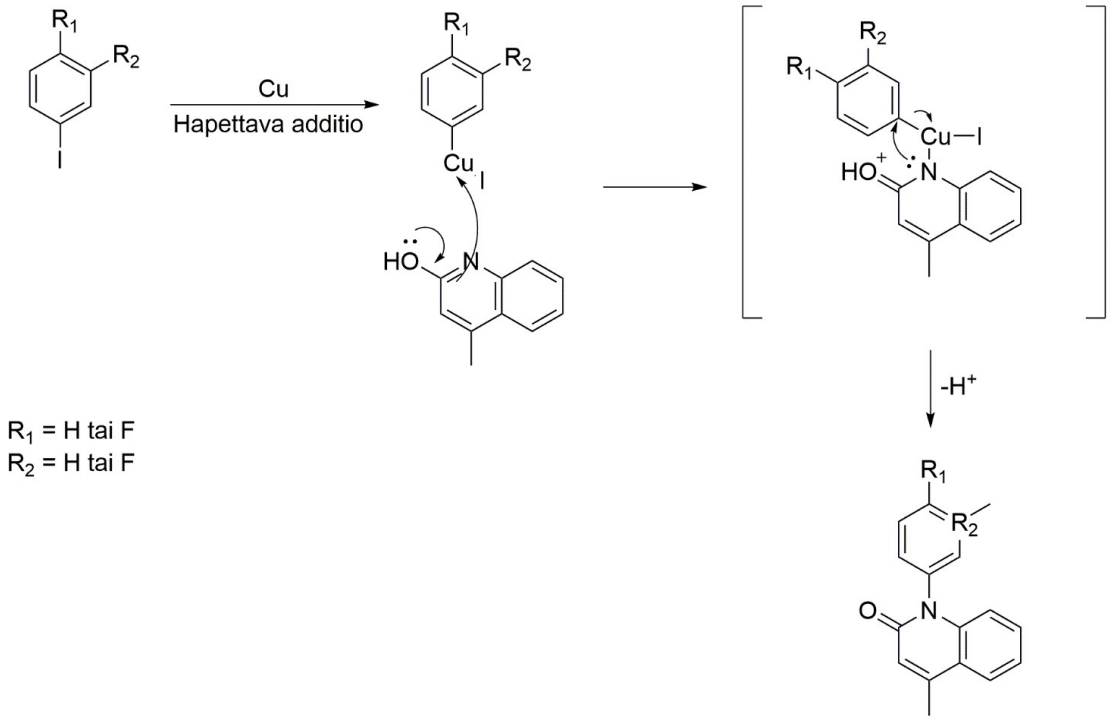
7.1 Kinoliinien ja pyridiinien synteesit

Pyridiini on bentseenirengas, josta yksi hiili on korvattu typellä. Pyridiinä käytetään liuottimena, mutta myös paljon erilaisissa synteeseissä, esimerkiksi lääkkeiden, vitamiinien tai väriaineiden synteeseissä. Luonnossa pyridiiniä esiintyy hajoamisprosesseissa.[60]

Kinoliinit ovat molekyylejä, joissa bentseenirengas ja pyridiini ovat kiinnittyneet toisiinsa pyridiinin toisesta ja kolmannesta hiilestä. Kinoliinia löytyy luonnostaan esimerkiksi viskistä, kaakaosta ja mustasta teestä. Synteeseissä sitä käytetään useimmiten rakennuspalikkana uusille yhdisteille, kuten esimerkiksi nyt sitä käytetään syaniiniväriaineiden runkona.[61]

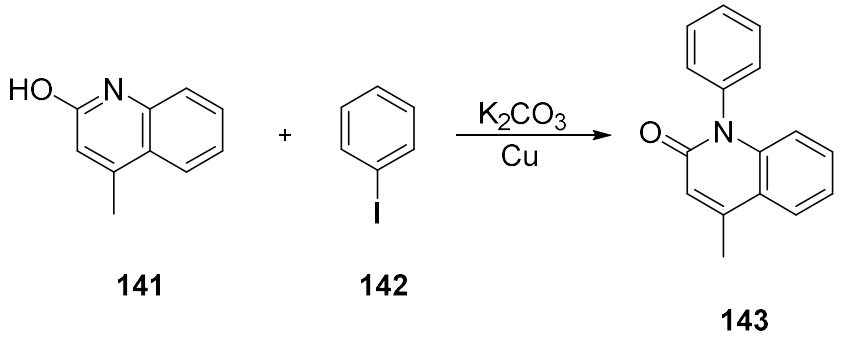
Molemmissa voi olla mukana myös muita substituentteja, kuten happea tai metyyliryhmiä, jotka vaikuttavat siihen, miten yhdistettä voidaan käyttää.

Kuvassa 42 on esitetty mahdollinen reaktiomekanismi kinoliinin synteesille. Kyseessä on Ullmann-tyyppinen reaktio, jota kupari katalysoi. Vastaava mekanismi on myös pyridiinillä synteeseissä THX-034 ja THX-035.



Kuva 42. Kinoliinisynteesin reaktiomekanismi.[62]

Kuvassa 43 esitetään substituoimattoman kinoliinin synteesireitti, jota käytettiin myös fluorattujen kinoliinien synteesien pohjana.



Kuva 43. Kinoliinin THX-022 (**143**) synteesireitti.

Yleinen synteesi uusille kinoliineille ja pyridiineille on kuvattu alla. Tästä tehdyt poikkeamat on esitetty taulukossa 3. Synteesi toteutettiin kuten on kuvattu Yingin[63] patentissa.

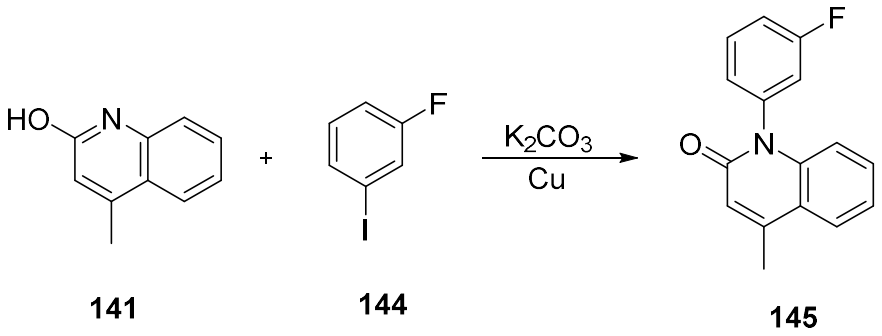
Kinoliini[a] liuotettiin yhdessä kuparijauheen, vedettömän kaliumkarbonaatin ja jodibentseenin[b] kanssa DMF:ään. Tätä punaruskeaa seosta kuumennettiin refluksointilaitteistossa 160 °C:ssa yön yli. Aamulla liuos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin. Lisättiin vettä ja etyyliasetaattia pesua varten, jolloin muodostui sakkaa, joka suodatettiin jälleen. Saatu liuos pestiin vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin natriumsulfaatilla ja liuotin haihdutettiin suodatuksen jälkeen. Erotettiin haluttu tuote käyttäen pylväskromatografiaa ja haihdutettiin eluentti.

Alkuperäisessä synteesissä THX-022 liuos oli synteesin alussa ja lämmittämisen loputtua punaruskeaa kuparin vuoksi. Suodatuksen jälkeen liuos oli vihertävän tumma. Liuotin haihdutettiin, jolloin saatiin musta öljy. Kun tähän lisättiin vettä ja etyyliasetaattia, muodostui vihreää sakkaa. Suodatuksen jälkeen liuos oli ruskea. Pesun jälkeen orgaaninen kerros oli kirkkaan oranssi. Uudelleenkiteytyksessä saatiin meripihkan väristä kiteistä tuotetta. Taulukossa 3 on esitetty poikkemat tästä yleisestä synteesistä.

Taulukko 3. Poikkeamat yleisestä synteesistä.

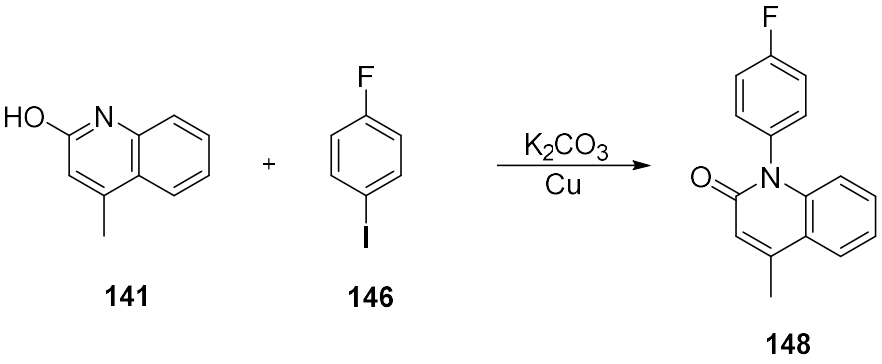
Synteesi	a: Kinoliini vai pyridiini	b: bentseenijohdannainen	Muuta
THX-024, THX-029, THX-031	Kinoliini	1-fluori-3-jodi-bentseeni	
THX-032	Kinoliini	1-fluori-4-jodibentseeni	Puolikkaat ainemäärät
THX-033	Kinoliini	Pentafluorijodibentseeni	Puolikkaat ainemäärät
THX-034	Pyridiini	Jodibentseeni	
THX-035	Pyridiini	Pentafluorijodibentseeni	Puolikkaat ainemäärät

Kuvassa 44 esitetään ensimmäinen fluorisubstituoitu kinoliinisynteesi.



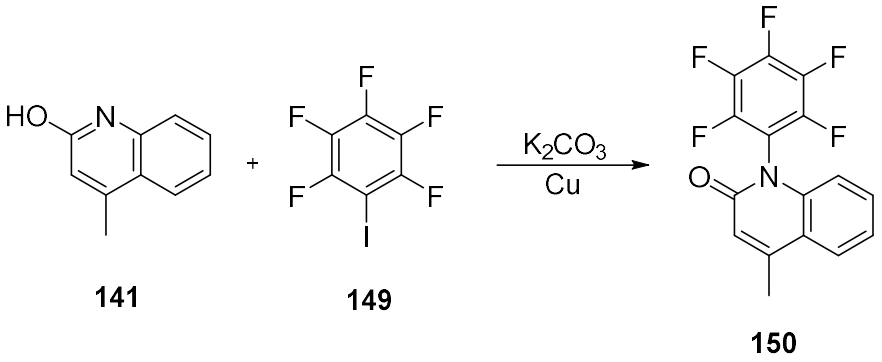
Kuva 44. Kinoliinin THX-024 synteesireitti.

Verrattuna synteesiin THX-022, merkittävin ero synteeseissä THX-024, THX-029 ja THX-031 oli etenkin liuosten väri. Synteesissä THX-022, liuos oli aluksi kuumennuksen jälkeen punaruskea ja eristysvaiheessa ruskeaa. Synteeseissä THX-024, THX-029 ja THX-031 väri oli musta lähes koko synteesin läpi. Kuvassa 45 esitellään kinoliini THX-032 synteesireitti, jossa fluori on para-asemassa.



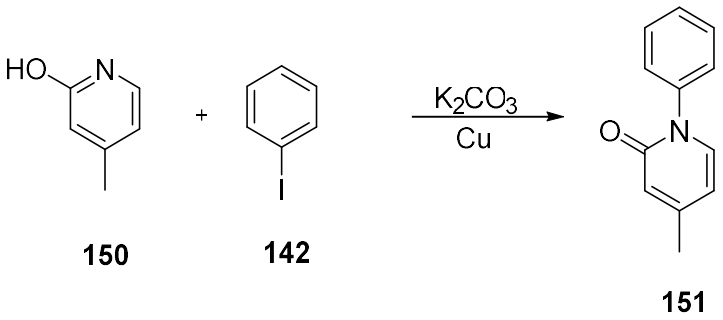
Kuva 45. Kinoliinin THX-032 synteesireitti.

Synteesissä THX-032 havainnot väristä olivat samanlaisia kuin synteeseissä THX-024, THX-029 ja THX-031. Saantoprosentti oli THX-029 ja THX-031 synteeseihin verrattuna lähes sama. Tämä synteesi kuitenkin tehtiin vain kerran, joten varsinaisia johtopäätöksiä fluorin paikan vaihtamisesta saantoon ei voida sanoa. Kuvassa 46 esitetään pentafluoratun kinoliinin synteesireitti.



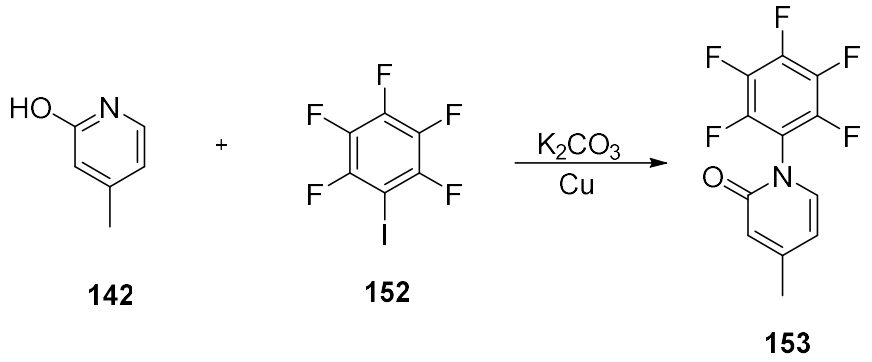
Kuva 46. Kinoliinin THX-033 synteesireitti.

THX-033 erosi aiemmista synteeseistä etenkin värin perusteella. Synteesin alussa lämmitystä tehdessä liuos muuttui mustaksi, mutta oli kuitenkin muuttunut yön aikana takaisin punaruskeaksi (kuten yleisessä synteesissä). Suodatusta tehdessä väri muuttui jälleen mustaksi. Uuttoa tehdessä vesifaasi jäi hyvin oranssiksi, kun aiemmin se oli lähes väritön. Haluttua tuotetta ei pystytty erottamaan. TLC:n perusteella mahdollinen tuote saattaa hajota NMR mittauksen yhteydessä. Kuvassa 47 esitetään yleiseen synteesiin pohjautuvan pyridiinin THX-034 synteesireitti.



Kuva 47. Pyridiinin THX-034 synteesireitti.

THX-034 erosi aiemmista synteeseistä värien perusteella, koska nyt lähtöaineena käytettiin kinoliinin sijaan pyridiiniä. Kuumennuksen jälkeen liuos oli vaalean ruskeaa, hieman oranssihtavaa. Suodatuksen jälkeen liuos oli vaalean keltainen, kuten myös pesuja tehdessä. Kuvassa 48 esitettään pentafluoratun kinoliinin synteesireitti.



Kuva 48. Pyridiinin THX-035 synteesireitti.

Synteesi THX-035 noudatteli koko ajan samaa kaavaa kuin vastaava kinoliinisynteesi THX-033. NMR-spektrissä näkyy paljon epäpuhtautta, eikä tuotetta ole saatu karakterisoitua.

7.2 Bentsotiatsolien synteesit

Tiatsoli on viisirengas, joka esiintyy monissa tärkeissä biologisissa systeemeissä ja esimerkiksi lääkkeissä. Sitä käytetäänkin sen vuoksi monissa synteeseissä rakennuspalikkana.[64] Tässä työssä syntetisoitiin bentsotiatsoleja, joissa on viisirenkaan lisäksi bentseenirengas.

Tiatsoleja tehtiin kolmea erilaista, joissa aina yhtä lähtöainetta muutettiin. Seuraavaksi esitellään yleinen synteesi, josta tehdyt poikkeamat on esitetty taulukossa 4. Tämä synteesi toteutettiin Lin *et al.*[65] ohjeen mukaan.

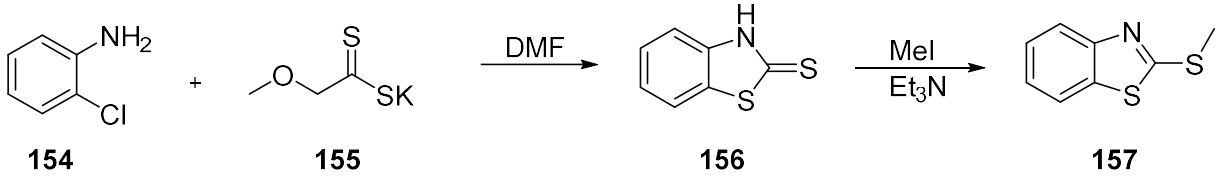
Kaliumetyyliksantaatti liuotettiin typpi-ilmakehässä kuivaan DMF:ään. Lisättiin aniliini[c] ja lämmitettiin liuosta 140 °C:ssa neljä tuntia. Kuumennuksen jälkeen seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja se kaadettiin noin 50 ml:aan jäävettä. Liuoksen pH säädettiin vastaamaan lukua yksi konsentroidulla HCl:llä. Muodostunut sakka suodatettiin imusuodatuksella ja annettiin kuivua. Reaktiota jatkettiin kuivissa olosuhteissa typpi-ilmakehässä ja sakka liuotettiin kuivaan etanoliin. Lisättiin metyylijodidi ja trietyyliamiini. Kuumennettiin liuosta 90 °C:ssa 1,5 tuntia. Erotettiin

tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Taulukossa 4 on esitetty THX-037 ja THX-038 synteesien poikkeamat yleisestä synteesistä.

Taulukko 4. Poikkeamat tiatsolin yleisestä synteesistä

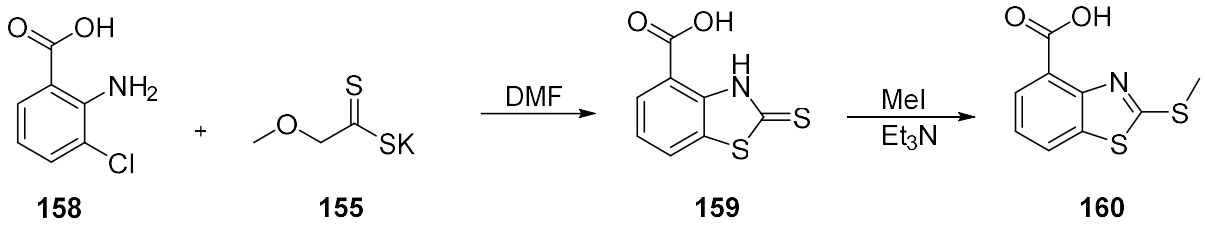
Synteesi	Poikkeama[c]
THX-037	3-amino-4-klorobentsoehappo
THX-038	3-amino-4-klorobentsotrifluoridi

Kuvassa 49 esitellään tiatsolien yleinen synteesireitti.



Kuva 49. Tiatsolin THX-036 (**157**) synteesireitti.

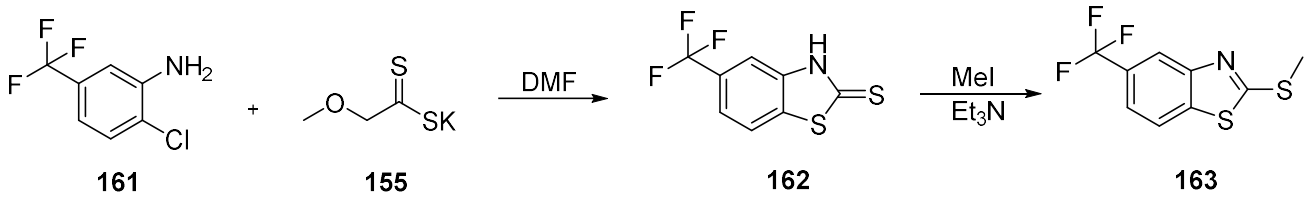
Synteesin THX-036 alussa liuos oli väriltään keltainen. Kuumennettaessa liuos muuttui keltaisesta kirkkaan oranssiksi. Jääveteen lisätessä muodostui heti keltainen sakka. Suolahappoa lisätessä muodostui oranssi sakka. Suodatuksen, yön yli kuumennuksen ja pylvään jälkeen saatiin keltainen liuos. Liuotin haihdutettiin, mutta haluttua kiinteää tuotetta ei havaittu. Kuvassa 50 esitellään tiatsolin THX-037 synteesireitti.



Kuva 50. Tiatsolin THX-037 (**160**) synteesireitti.

Synteesin THX-037 ensimmäisessä vaiheessa liuoksen väri oli kellertävän ruskea. Lämmityksen loppupuolella liuos oli musta. Jääveteen kaadettaessa liuos muuttui kirkkaan oranssiksi, mutta sakkaa ei muodostunut. Happoa lisätessä muodostui keltainen

sakka. Kun liuotin haihdutettiin kuumennuksen jälkeen, muodostui sakka, joka ei liuennut täysin eluenttiin (5 % EtOAc/Hex). Sakkaa pestiin eluentilla (9:1 DCM/MeOH). Tämä saatu liuos kuivattiin Na_2SO_4:llä, liuotin haihdutettiin ja muodostunut sakka liuotettiin uudelleen DCM/MeOH-eluenttiin. Tuote erotettiin käyttäen pylväskromatografiaa. Kuvassa 51 esitellään tiatsolin THX-038 synteesireitti.

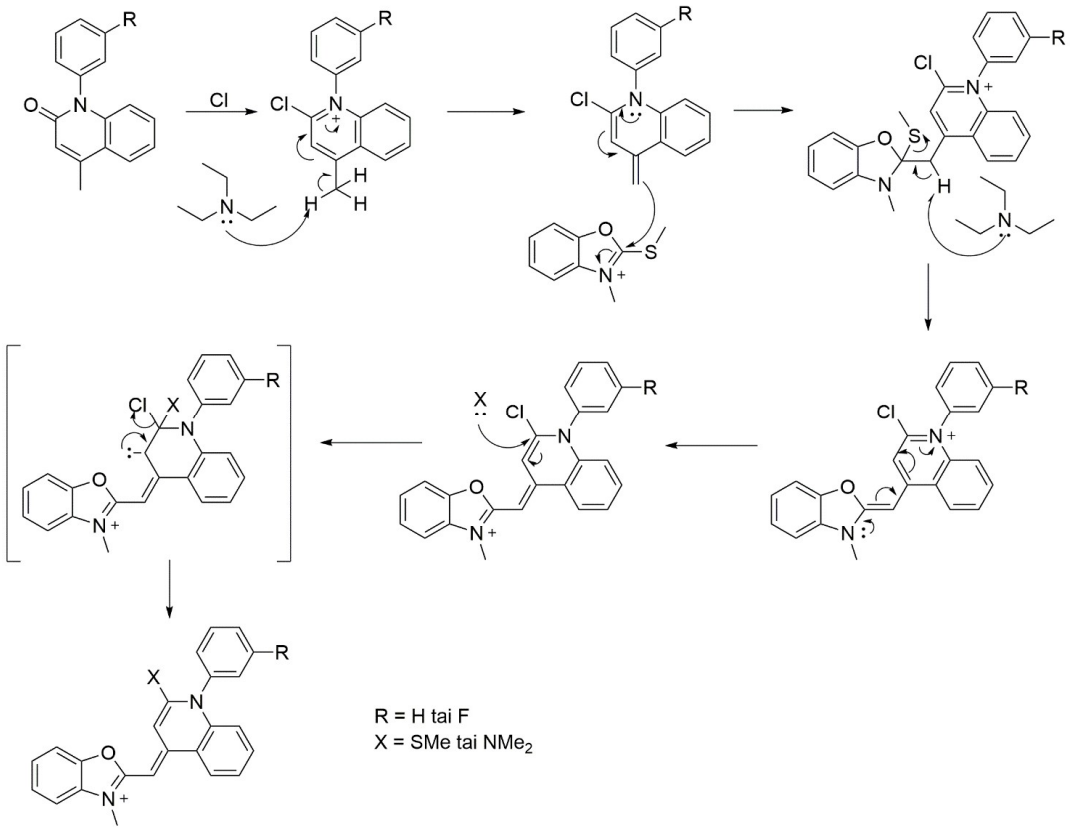


Kuva 51. Tiatsolin THX-038 (**163**) synteesireitti.

Synteesin THX-038 alussa liuoksen väri oli samean keltainen. Lämmityksen edetessä väri muuttui oranssiksi. Jääveteen lisätessä muodostui valkoista sakkaa, jota muodostui edelleen lisää, kun happoa lisättiin. Jälleen toista lämmitystä tehdessä väri oli aluksi samean keltainen, mutta lämmityksen edetessä väri muuttui ruskean kautta oranssiksi.

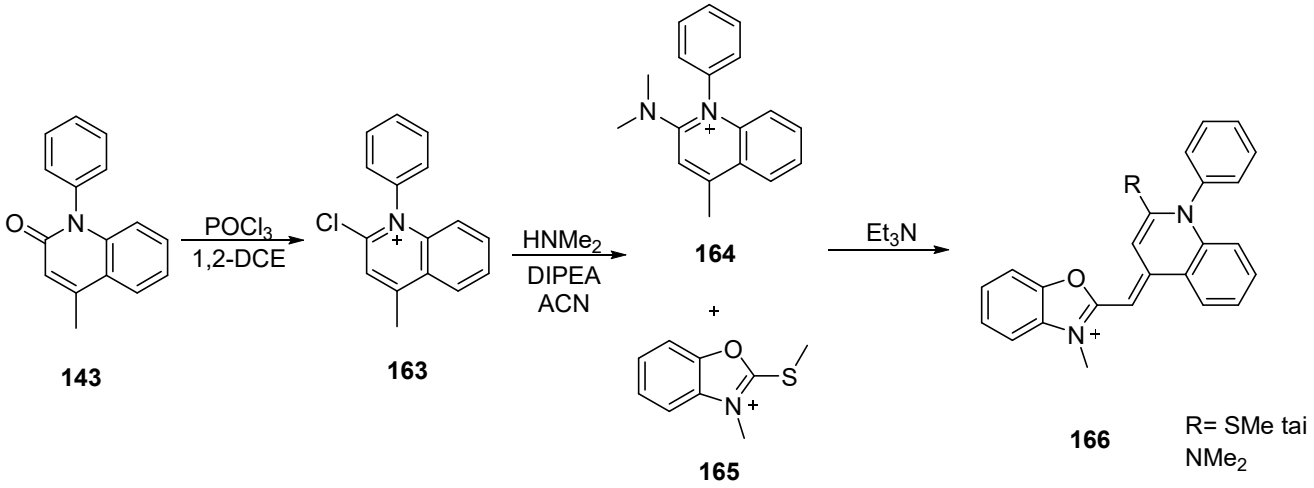
7.3 Syaniiniväriaineiden synteesit

Syaniinrunkoisia väriaineita tutkitaan jatkuvasti enemmän, koska niillä on todella laaja kirjo eri käyttökohteita. Sen lisäksi, että niitä voidaan käyttää DNA:n ja RNA:n leimaamiseen, kuten Jyväskylän yliopistossa tehdään, niitä voidaan käyttää esimerkiksi emäs-happoindikaattoreina, tekstiilien käsittelyssä ja lääkkeinä. Syaniinirunkoisissa väriaineissa on aina kaksi heterosykliä liittyneenä toisiinsa konjugoituneella hiilisillalla. Mukana voi olla tietysti muita komponentteja, mutta tämä konjugoitunut rengassysteemi on väriaineen perusta.[66] Kuvassa 52 esitellään väriainesynteesin mahdollinen reaktiomekanismi.



Kuva 52. Väriaineen muodostumisen mahdollinen reaktiomekanismi.[19]

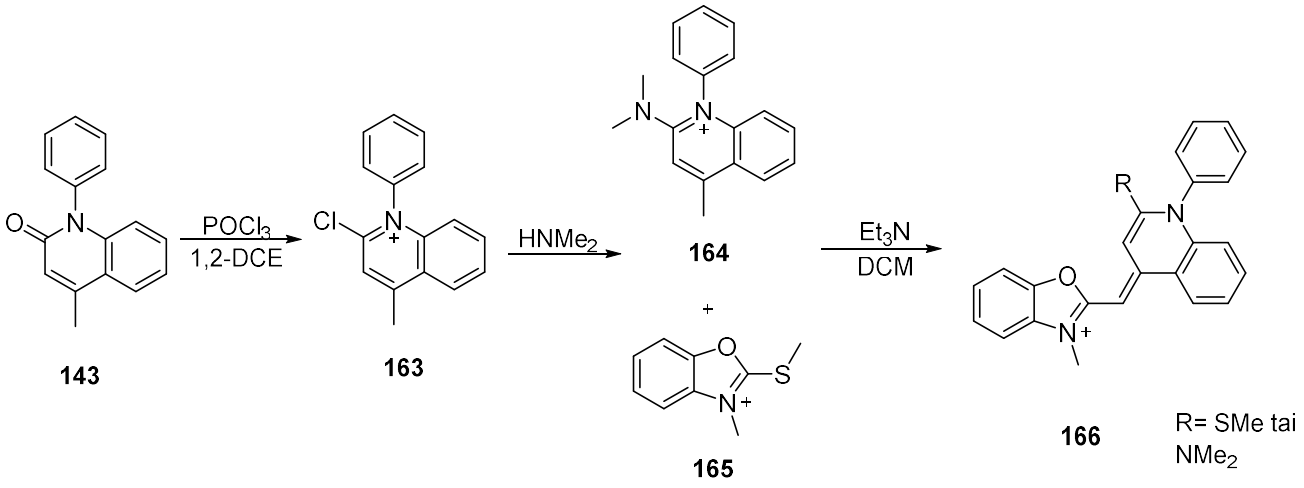
Kuvassa 53 esitellään syaniiniväriaineen THX-039 synteesireitti.



Kuva 53. Väriaineen THX-039 (**166**) synteesireitti.

Kinoliini liuotettiin typpi-ilmakehässä 1,2-DCE:hen ja lisättiin $POCl_3$. Kuumennettiin liuosta noin 80 °C:ssa yön yli. Annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja haihdutettiin liuotin. Liuotettiin saatu oranssi öljy asetonitriiliin[e] ja lisättiin $HNMe_2$. Sekoitettiin huoneenlämmössä noin 3 h ja lisättiin DIPEA, koska reaktio ei näyttänyt etenevän. Lisättiin noin tunnin sekoituksen jälkeen vielä $HNMe_2$ ja DIPEA. Sekoitettiin noin 14 h ja lisättiin bentsoksasoli ja trietyyliamiini ja sekoitettiin huoneenlämmössä 4 h. Yritettiin erottaa tuotetta käyttäen pylväskromatografiaa, mutta haluttua tuotetta ei havaittu NMR- tai massamittauksissa.

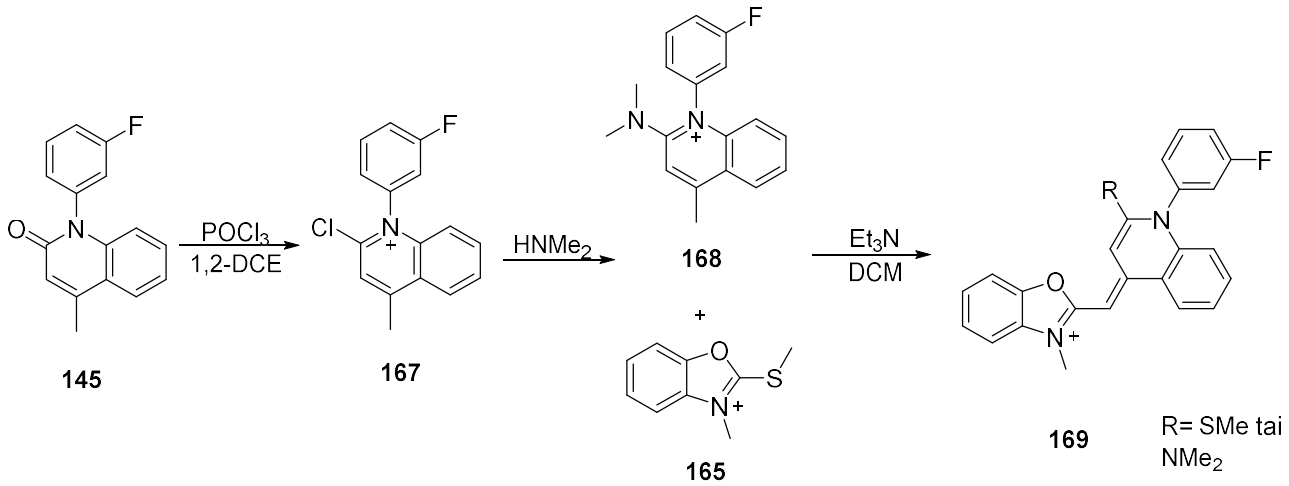
Synteesin alussa liuos oli väriltään kirkkaan oranssi. Noin tunnissa kuitenkin väri muuttui pinkiksi ja aamulla liuos oli punainen. Asetonitriiliin liuotettaessa liuos oli väriltään samean oranssi ja liuos muuttui $HNMe_2$ lisäyksen jälkeen pinkiksi. Reagenssien lisäys ei näyttänyt TLC:llä vaikuttavan reaktion kulkuun. Synteesin THX-040 perusteella asetonitriili häiritsee kondensaatiota, jolloin reaktio ei etene. Jatkossa reaktiossa tehtiin vesi/DCM-erottelu amiinin lisäyksen jälkeen, jolloin saatiin jatkettua reaktiota kuivissa olosuhteissa. Kuvassa 54 esitellään hieman muunneltu version kuvan 53 synteesireitistä.



Kuva 54. Väriaineen THX-040 synteesireitti.

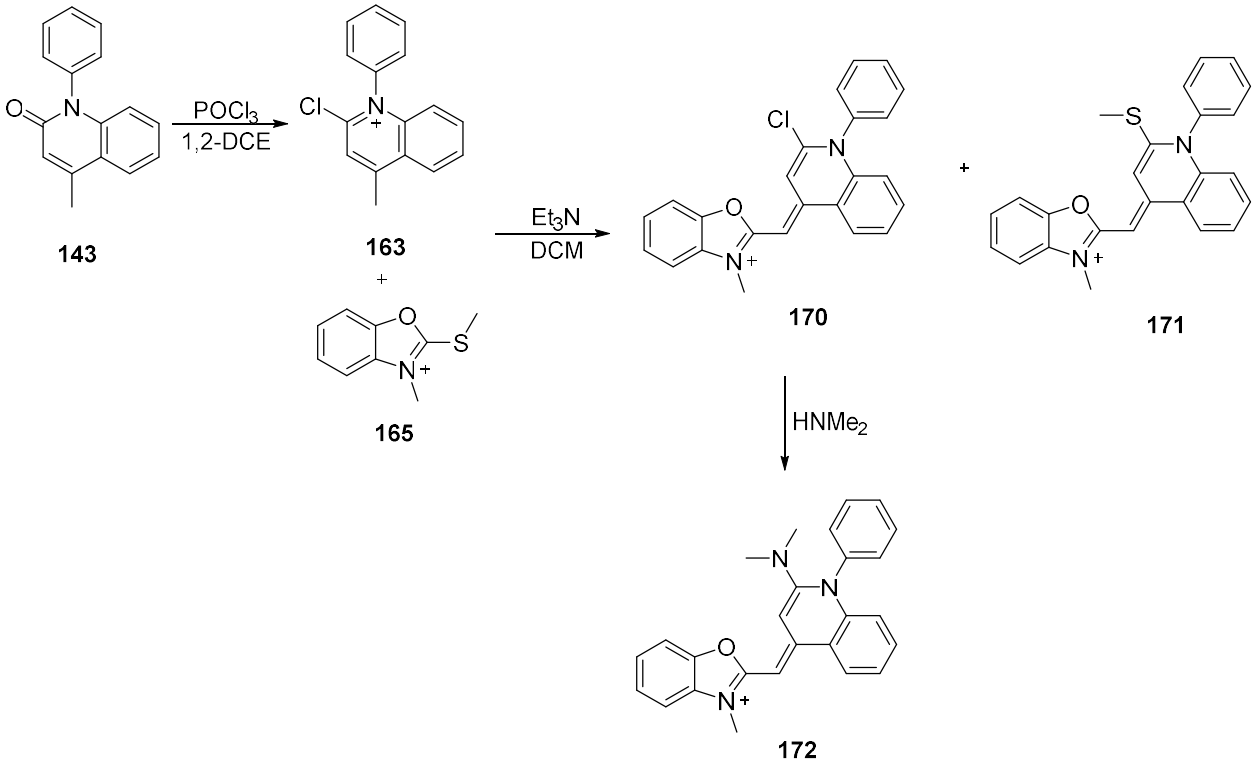
Seuraava synteesi aloitettiin samalla tavalla kuten aiemminkin eli kinoliini liuotettiin 1,2-DCE:hen ja lisättiin $POCl_3$, jonka jälkeen liuosta kuumennettiin noin 80 °C:ssa yön yli. Liuottimen haihduttamisen jälkeen oranssi öljy liuotettiin suoraan $HNMe_2$:iin. Muodostui pinkki liuos, jota sekoitettiin huoneenlämmössä noin 6 h. Tehtiin vesi/DCM-erotus ja pestiin orgaanista kerrosta vedellä. Kuivattiin orgaaninen kerros Na_2SO_4:lla yön yli,

minkä jälkeen haihdutettiin hieman liuotinta ja reaktiota jatkettiin kuivassa DCM:ssä. Lisättiin bentsoksaksoli ja trietyyliamiini. Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 4 h. TLC:llä näkyi lupaavia pisteitä aiempaan verrattuna, mutta jostain syystä tuotetta ei silti havaittu NMR- ja massamittaukssa. Kuvassa 55 esitellään ensimmäisen fluoratun syaniiniväriaineen synteesireitti.



Kuva 55. THX-041A ja THX-041B synteesireitti.

THX-041A ja THX-041B aloitettiin kuten THX-040, mutta tällä kertaa kinoliinina käytettiin THX-029, jossa on mukana fluori. Kinoliini ei liuennut kunnolla, joten liukenemista tehostettiin lisäämällä hieman asetonitriiliä. Muutaman tunnin sekoittamisen jälkeen huomatiin, ettei reaktiota ollut tapahtunut, joten liuos B päätettiin pestä vedellä ja DCM:llä asetonitriilin poistamiseksi. Saatu orgaaninen kerros kuivatiin Na_2SO_4:llä ja liuottimen haihdutuksen jälkeen aloitettiin reaktio uudelleen. Tällä kertaa $HNMe_2$:iin liuotuksessa käytettiin apuna DMSO:ta asetonitriilin sijaan. Tämän jälkeen THX-041B jatkettiin loppuun kuten THX-040. THX-041A jatkettiin myös loppuun synteesin THX-040 tapaan, vaikka sen saantoa epäiltiinkin. Synteesi THX-041B toimi, kun taas THX-041A:sta ei saatu haluttua tuotetta lainkaan. Kuvassa 56 esitellään syaniiniväriaineen THX-042 synteesireitti.



Kuva 56. Synteesin THX-042 yleiskuvaus.

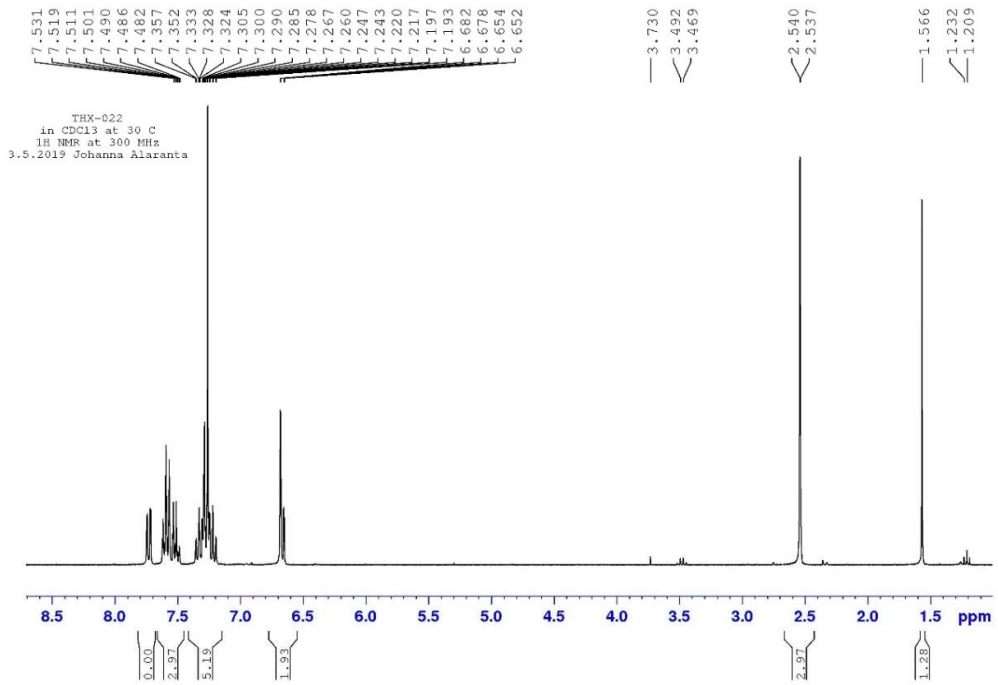
Synteesi THX-042 aloitettiin kuten aiemmatkin väriainesynteesit liuottamalla kinoliini 1,2-DCE:hen ja lisäämällä $POCl_3$. Kuumenettiin yön yli 80 °C:ssa ja haihdutettiin aamulla liuotin pois. Saatu keltainen öljy liuotettiin kuivaan DCM:ään typpi-ilmakehässä. Liuotettiin oksaksoli kuivaan DCM:ään ja lisättiin kolviin. Lisättiin Et_3N ja sekoitettiin 3 h huoneenlämmössä. Pestiin DCM:llä/vedellä ja kuivattiin orgaaninen kerros Na_2SO_4:llä yön yli. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin tuotteet pylväällä. Klorituotetta (**170**) liuotettiin $HNMe_2$ ja pieneen määrään DMSO:ta. Sekoitettiin huoneenlämmössä 3 h. Pestiin vedellä/DCM:llä ja kuivattiin Na_2SO_4 yön yli. Erotettiin tuotteet pylväällä.

8. Synteesiohjeet

8.1 THX-022 ja THX-023

2-Hydroksimetyylikinoliini (1,0 g, 6,3 mmol), jodibentseeni (1,05 ml, 9,4 mmol), vedetön K_2CO_3 (0,88 g, 6,4 mmol) ja kuparijauhe (2,3 g, 36,5 mmol) sekoitettiin kolvissa 15 ml:aan DMF:a. Seosta kuumennettiin 160 ºC:ssa yön yli. Annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja suodatettiin Hyflo Superilla. Haihdutettiin liuotin rotavaporilla. Mustaan öljyyn lisättiin vettä ja etyyliasetaattia, jolloin muodostui vihreä sakka. Suodatettiin Hyflo Superilla. Pestiin vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Kuivattiin yön yli $NaSO_4$:llä. Haihdutettiin liuotin rotavaporilla. Puhdistettiin käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin ensin 1:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta ja sen jälkeen 4:1 etyyliasetaatti/heksaani- liuotinseosta. Liuotin haihdutettiin ja tuote uudelleenkiteytettiin dietyylieetteristä jääkaapissa. Saanto THX-022 0,2019 g (0,86 mmol, 13,47 %) ja THX-023 0,258 g (1,1 mmol, 17,22 %) Sulamispiste oli 134,1-135,4 ºC. THX-022:n ^{1}H NMR-spektri esitellään kuvassa 57.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,60 (3H, d), 6,68 (1H, s), 7,22 (1H, m) 7,30 (1H, m) 7,35 (1H,m) 7,50 (1H, m), 7,55 (1H, m), 7,60 (1H, m), 7,75 (1H, d)*

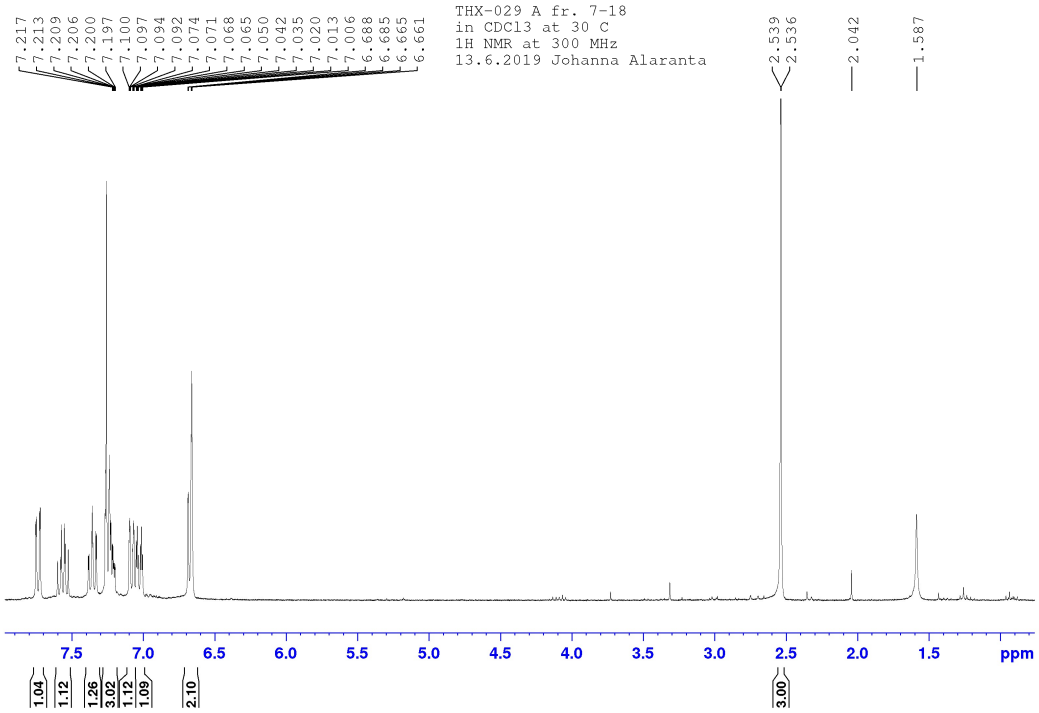


Kuva 57. THX-022:n ^{1}H NMR-spektri.

8.2 THX-024, THX-029 ja THX-031

2-Hydroksi-4-metyylikinoliini (1,0 g, 6,3 mmol), 1-fluori-3-jodibentseeni (1,10 ml, 9,4 mmol), vedetön K_2CO_3 (0,88 g, 6,4 mmol) ja kuparijauhe (2,3 g, 36,5 mmol) sekoitettiin kolvissa 15 ml:aan DMF:a. Seosta kuumennettiin 160 ºC:ssa yön yli. Annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja suodatettiin Hyflo Superilla. Haihdutettiin liuotin. Mustaan öljyyn lisättiin vettä ja etyyliasetaattia, jolloin muodostui vihreä sakka. Suodatettiin Hyflo Superilla. Pestiin vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Kuivattiin yön yli $NaSO_4$:llä. Pestiin ja erotettiin tuote käyttäen käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin ensin 1:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta ja sen jälkeen 4:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta. Liuotin haihdutettiin ja tuote uudelleenkiteytettiin etyyliasetaatista. Saanto THX-029 0,3641 g (1,4 mmol, 22,82 %) ja THX-031 0,3612 g (1,4 mmol, 22,64 %). Sulamispiste oli 107,4-108,7 ºC. (M+H) m/z 254,0947, teoreettinen m/z 254,0981. THX-029:n ^{1}H NMR-spektri esitellään kuvassa 58.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,54 (3H, d, J = 1,14 Hz), 6,66 (1H, s), 6,69 (1H, d, J = 0,81 Hz), 7,03 (1H, dt, J = 8,94 Hz, 2,16 Hz and 2,07 Hz), 7,08 (1H, ddd, J= 7,8 Hz, 0,93 Hz and 0,81 Hz), 7,21 (1H, m), 7,24 (1H, m), 7,36 (1H, m), 7,56 (1H, ddd, J = 6,27 Hz, 6,15 Hz and 1,86 Hz), 7,74 (1H, dd, J = 7,92 Hz and 1,41 Hz).*



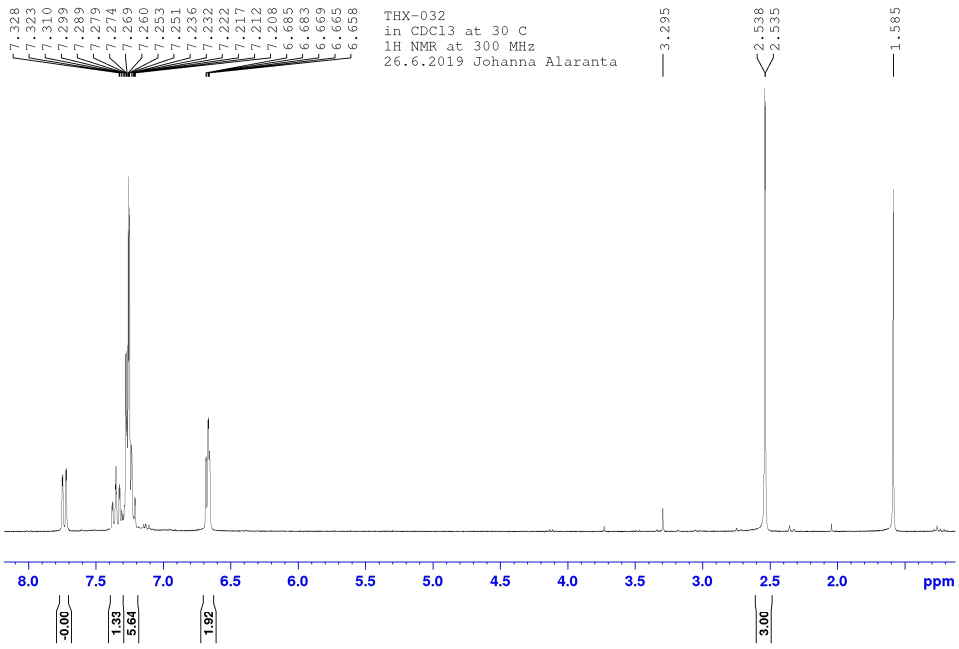
Kuva 58. THX-029:n ^{1}H NMR-spektri.

8.3 THX-032

2-Hydroksi-4-metyylikinoliini (0,50 g, 3,15 mmol), 1-fluori-4-jodibentseeni (540 µl, 4,7 mmol), vedetön K_2CO_3 (0,44 g, 3,2 mmol) ja kuparijauhe (1,15 g, 18,25 mmol) sekoitettiin kolvissa 15 ml:aan DMF:a. Seosta kuumennettiin 160 ºC:ssa yön yli. Annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja suodatettiin sakka. Haihdutettiin liuotin. Mustaan öljyyn lisättiin vettä ja etyyliasetaattia, jolloin muodostui vihreä sakka. Suodatettiin Hyflo Superilla ja pestiin orgaaninen kerros vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Kuivattiin yön yli $NaSO_4$:llä. Haihdutettiin liuotin. Puhdistettiin ja eristettiin tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin ensin 1:1

etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta ja sen jälkeen 4:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta. Saanto 0,191 g (0,75 mmol, 23,94 %). Sulamispiste oli 169,7-171,9 ºC. (M+H) m/z 254,0948, teoreettinen m/z 254.0981. Kuvassa 59 esitellään THX-032:n ^{1}H NMR-spektri.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,54 (3H, s), 6,67 (1H, m), 6,68 (1H, d, J = 0,78 Hz) 7,21 (2H, d, J = 1,17 Hz) 7,24 (1H, m), 7,27 (2H, m), 7,35 (1H, m), 7,74 (1H, d, J = 6,57 Hz and 1,38 Hz).*



Kuva 59. THX-032:n ^{1}H NMR-spektri.

8.4 THX-033

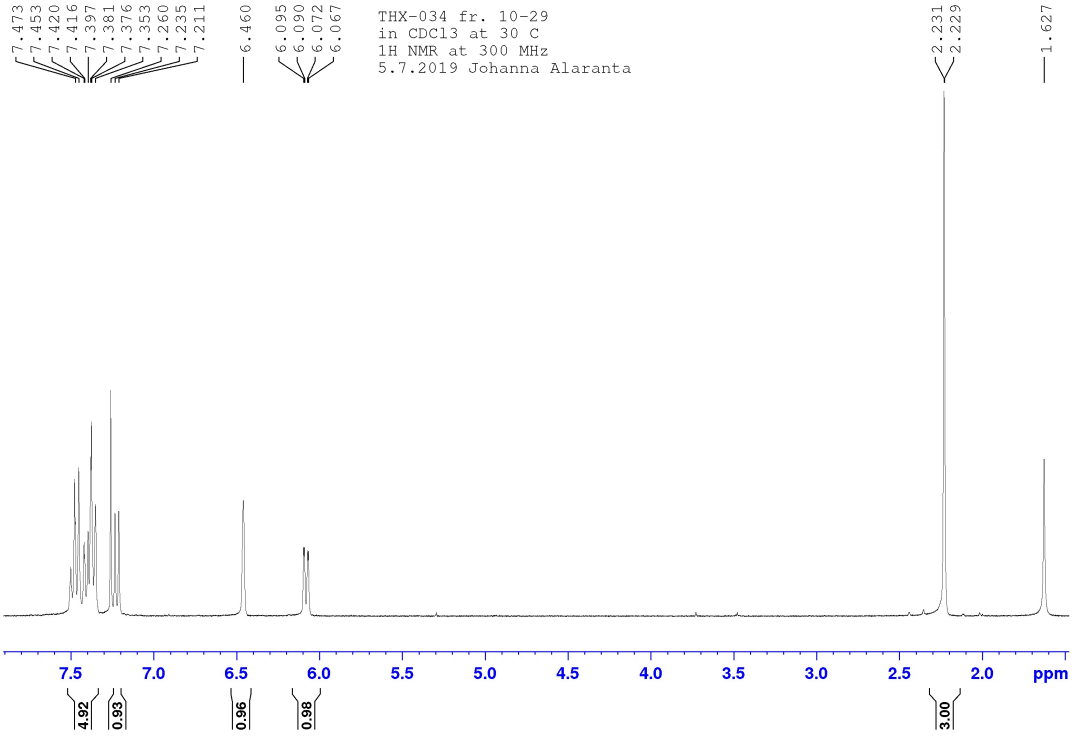
2-Hydroksi-4-metyylikinoliini (0,50 g, 3,15 mmol), pentafluorijodibentseeni (625 µl, 4,7 mmol), vedetön K_2CO_3 (0,44 g, 3,2 mmol) ja kuparijauhe (1,15 g, 18,25 mmol) sekoitettiin kolvissa 15 ml:aan DMF:a. Seosta kuumennettiin 160 ºC:ssa yön yli. Annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ja suodatettiin. Haihdutettiin liuotin. Mustaan öljyyn lisättiin vettä ja etyyliasetaattia, jolloin muodostui vihreä sakka. Suodatettiin Hyflo Superilla ja pestiin orgaaninen kerros vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Kuivattiin yön

yli $NaSO_4$:llä. Haihdutettiin liuotin. Puhdistettiin ja yritettiin erottaa tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin ensin 1:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta ja sen jälkeen 4:1 etyyliasetaatti/heksaani-liuotinseosta. Tuotteen muosostumista ei havaittu NMR- tai massamittausten perusteella.

8.5 THX-034

2-Hydroksi-4-metyylipyridiini (0,69 g, 6,3 mmol), jodibentseeni (1,05 ml, 9,4 mmol), K_2CO_3 (0,88 g, 6,4 mmol) ja kuparijauhe (2,3 g, 36,5 mmol) liuotettiin 15 ml:aan DMF:a. Kolvi kiinnitettiin pystyjäähdyttimeen ja liuosta kuumennettiin 160 ºC:ssa yön yli. Huoneenlämpöinen liuos suodatettin Hyflo Superilla. Haihdutettiin liuotin. Lisättiin liuokseen vettä ja etyyliasetaattia. Muodostunut sakka suodatettiin liuoksesta uudelleen Hyflo Superin läpi. Pestiin orgaaninen kerros vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Kuivattiin orgaanista kerrosta Na_2SO_4:llä yön yli. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin tuotteet käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin ensin 1:1 heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta ja sitten 4:1 heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta. Saanto oli 0,5993 g (3,2 mmol, 51,36 %). Sulamispiste oli 115,1-117,0 ºC. (M+Na) m/z 207,9113, teoreettinen m/z 208,0738. Kinoliinin THX-034.n ^{1}H NMR-spektri esitellään kuvassa 60.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,23 (3H, s), 6,08 (1H, dd, J = 7,0 Hz ja 1,56 Hz), 6,46 (1H, s), 7,22 (2H, d, J = 7,02 Hz), 7,38 (1H, m), 7,42 (2H, m), 7,47 (1H, d, J = 7,62).*



Kuva 60. THX-034.n ^{1}H NMR-spektri.

8.6 THX-035

2-Hydroksi-4-metyylipyridiini (0,34 g, 3,2 mmol), pentafluorijodibentseeni (625 µl, 4,7 mmol), K_2CO_3 (0,44 g, 3,2 mmol) ja kuparijauhe (1,15 g, 18,25 mmol) liuotettiin kolvissa 15 ml:aan DMF:a. Seosta kuumennettiin yön yli 160 ºC:ssa yön yli. Liuos suodatettiin Hyflo Superilla ja haihdutettiin liuotin. Lisättiin vettä ja etyyliasetaattia. Pestiin orgaaninen kerros vedellä ja kylläisellä suolaliuoksella. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin haluttu tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 1:1 heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta ja sitten 4:1 heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta. Tuotteen muodostumista ei todettu NMR- tai massamittausten avulla.

8.7 THX-036

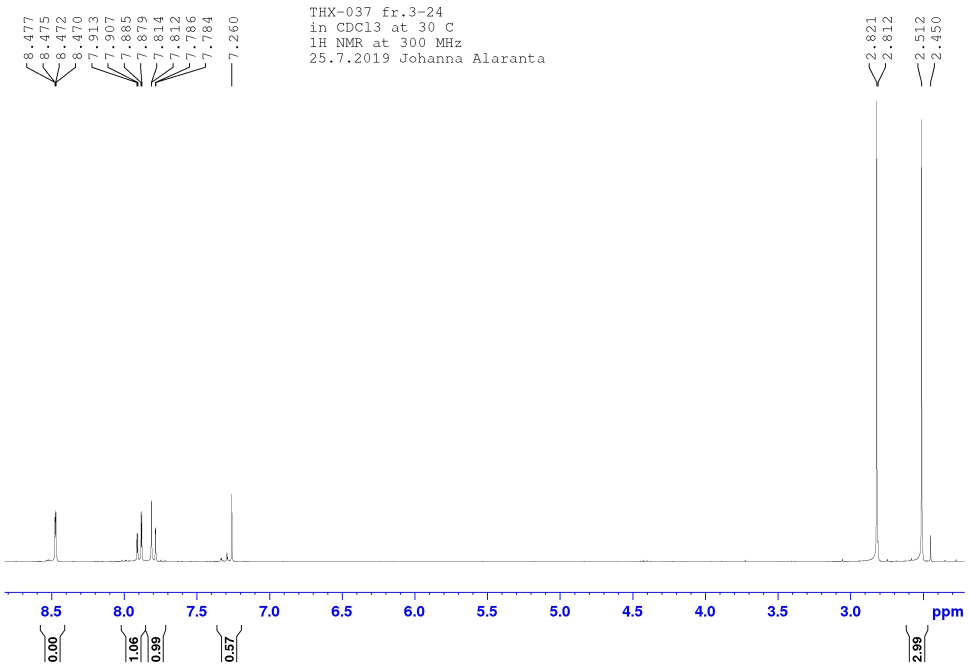
Kaliumetyyliksantaatti (3,53 g, 22 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:ään ja siirrettiin typpi-ilmakehään. Lisättiin 2-kloorianiliini (1,052 ml, 10 mmol). Seosta lämmitettiin 140 ºC:ssa neljä tuntia. Huoneenlämpöinen liuos yhdistettiin 50 ml:aan jäävettä. pH säädettiin konsentroidulla suolahapolla arvoon 1, jolloin muodostuin oranssi sakka. Se suodatettiin imusuodatuksella ja pestiin kylmällä vedellä. Sakan annettiin kuivua.

Sakka siirrettiin kuivaan kolviin ja liuotettiin kuivaan etanoliin typpi-ilmakehässä. Lisättiin metyylijodidi (0,747 ml, 12 mmol) ja trietyyliamiini (1,673 ml, 12 mmol). Liuosta kuumennettiin 90 ºC:ssa tunti. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 5 % heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta. Tuotetta ei karakterisoitu, koska kiinteää tuotetta ei muodostunut.

8.8 THX-037

3-Amino-4-klooribentsoehappo (1,72 g, 10 mmol) ja kaliumetyyliksantaatti (3,53 g, 22 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin ja siirrettiin typpi-ilmakehään. Liuosta lämmitettiin 140 ºC:ssa neljä tuntia. Liuos kaadettiin 50 ml:aan jäävettä. pH säädettiin arvoon 1 konsentroidulla suolahapolla, jolloin muodostui keltainen sakka. Sakka suodatettiin ja pestiin kylmällä vedellä. Sakan annettiin kuivua. Sakka siirrettiin kuivaan kolviin ja liuotettiin 15 ml:aan kuivaa etanolia. Kolvi kytkettiin typpi-ilmakehään. Lisättiin metyylijodidi (0,747 ml, 12 mmol) ja trietyyliamiini (1,673 ml, 12 mmol). Liuosta kuumennettiin 90 ºC:ssa noin tunti. Liuotin haihdutettiin ja tuote erotettiin käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 5 % heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta. Saanto 0,6281 g (3,03 mmol, 30,28 %). Sulamispiste oli 76,2-81,4 ºC. Kuvassa 61 esitellään tuotteen THX-037:n ^{1}H NMR-spektri.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,25 (3H, s), 7,80 (1H, dd, J = 8,37 Hz ja 0,54 Hz), 7,90 (1H, dd, J = 8,4 Hz ja 1,71 Hz), 8,47 (1H, dd, J = 1,68 Hz ja 0,54 Hz).*

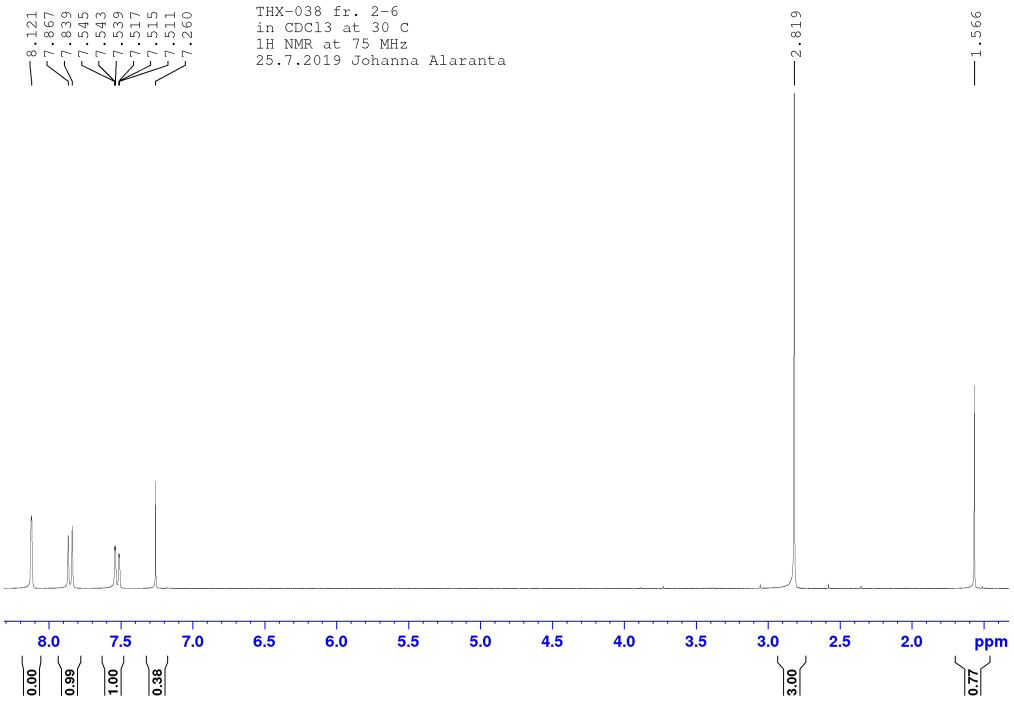


Kuva 61. THX-037:n ^{1}H NMR spektri.

8.9 THX-038

Kaliumetyyliksantaatti (3,53 g, 22 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:ään ja siirrettiin typpi-ilmakehään ja lisättiin 3-amino-4-klooribentsotrifluoridi (1,37 ml, 10 mmol). Kuumennettiin 140 ºC:ssa neljä tuntia. Huoneenlämpöinen liuos kaadettiin 50 ml:aan jäävettä. pH säädettiin arvoon 1 konsentroidulla suolahapolla, jolloin muodostui vaalea sakka. Sakka suodatettiin, pestiin ja kuivattiin. Kuiva sakka siirrettiin kolviin ja liuotettiin 15 ml:aan kuivaa etanolia typpi-ilmakehässä. Lisättiin metyylijodidi (0,747, 12 mmol) ja trietyyliamiini (1,673 ml, 12 mmol). Liuosta kuumennettiin 90 ºC:ssa tunti. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 5 % heksaani/etyyliasetaatti-liuotinseosta. Haihdutettiin liuotin, jolloin muodostui vaalea sakka. Saanto 1,7404 g (6,98 mmol, 69,81 %). Sulamispiste oli 66,2-68,9 ºC. Kuvassa 62 esitellään THX-038:n ^{1}H NMR-spektri.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,82 (3H, s), 7,53 (1H, dd, J = 8,37 Hz ja 0,54 Hz), 7,85 (1H, d, J = 8,37 Hz), 8,47 (1H, t, J = 0,69 Hz).*



Kuva 62. THX-038:n ^{1}H NMR-spektri.

8.10 THX-039

Aiemmin valmistettu kinoliini THX-023 (0,1030 g, 0,438 mmol) liuotettiin typpi-ilmakehässä 10 ml:aam 1,2-DCE:a. Lisättiin $POCl_3$ (123 µl, 1,31 mmol). Seosta kuumennettiin 70 ºC:ssa yön yli. Haihdutettiin liuotin ja liuotettiin oranssi öljy uudelleen asetonitriiliin, Lisättiin 387 µl $HNMe_2$ (0,31 mmol). Kolmen tunnin sekoituksen jälkeen lisättiin 540 µl DIPEA:a (3,1 mmol). Tunnin päästä lisättiin vielä 387 µl $HNMe_2$ ja 540 µl DIPEA:a. Seosta sekoitettiin yön yli. Lisättiin vettä ja DCM:a ja pestiin vesikerros. Erotettiin tuotteet käyttäen pylväskromatografiaa. Halutun tuotteen muodostumista ei havaittu NMR- tai massaspektreissä.

8.11 THX-040

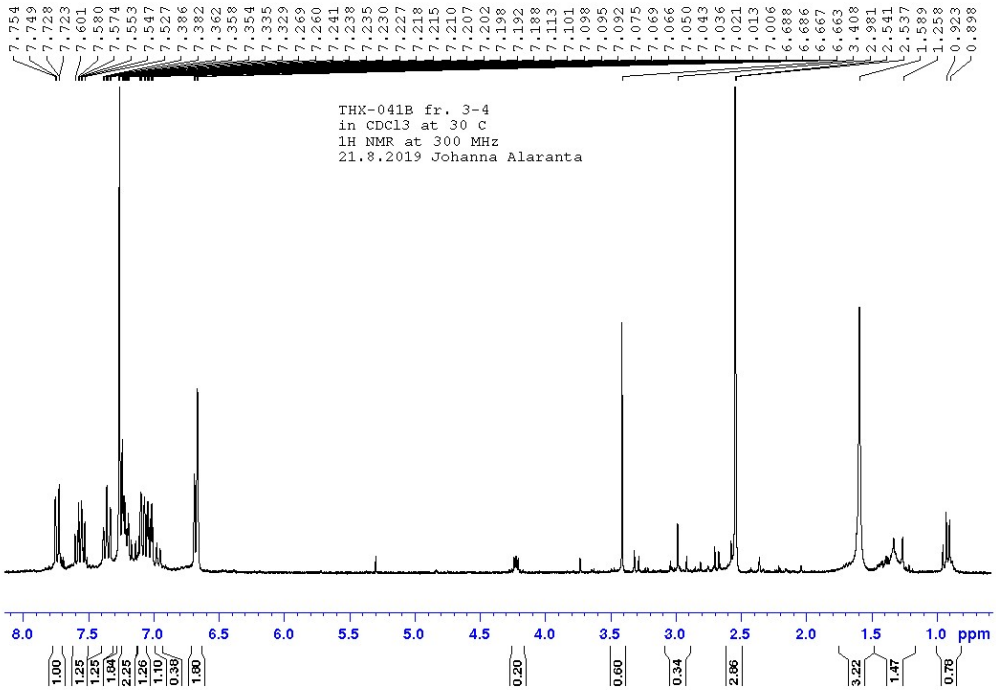
Synteesi aloitettiin kuten THX-039. Kinoliini TGC-052 (0,1030 g, 0,438 mmol) liuotettiin 10 ml:aan 1,2-DCE:a typpi-ilmakehässä. Lisättiin 123 µl (1,31 mmol) $POCl_3$. Seosta kuumennettiin 80 ºC:ssa yön yli. Haihdutettiin liuotin ja liuotettiin oranssi öljy uudelleen 5 ml:aan $HNMe_2$:a. Liuosta sekoitettiin 6 tuntia huoneenlämmössä. Lisätiin vettä ja DCM:a ja pestiin liuos. Kuivattiin orgaanista kerrosta Na_2SO_4:lla yön yli. Jatkettiin reaktiota DCM:sss ja lisättiin liuokseen typpi-ilmakehässä bentsoksaksoli TGC-054 (0,1407 g, 0,438 mmol, valmistanut Ville Saarnio Thompsonin[67] ohjeella) ja trietyyliamiini (97,6 ml, 0,7 mmol). Reaktion annettiin tapahtua 4 h ajan. Pestiin vedellä ja kuivattiin Na_2SO_4:lla yön yli. Erotettiin tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 1:9 Metanoli/DCM-liuotinseosta. Tuotetta ei havaittu NMR- tai massamittauksissa.

8.12 THX-041 A ja B

Synteesi aloitettiin kuten THX-040. Aiemmin valmistettu kinoliini THX-029 (0,1109 g, 0,438 mmol) liuotettiin 10 ml:aan 1,2-DCE:a typpi-ilmakehässä. Lisättiin 123 µl (1,31 mmol) $POCl_3$. Seosta kuumennettiin 80 ºC:ssa yön yli. Haihdutettiin liuotin ja ruskea öljy liuotettiin $HNMe_2$:iin ja asetonitriiliin (A) tai DMSO:iin (B). Sekoitettiin huoneenlämmössä noin 4 h. Lisättiin vettä ja DCM:a ja pestiin liuos. Kuivattiin yön yli. Jatkettiin reaktiota lisäämällä typpi-ilmakehässä bentsoksaksoli, TGC-054 (0,1405 g, 0,438 mmol) ja trietyyliamiini (97,6 ml, 0,7 mmol). Reaktion annettiin tapahtua 4h ajan. Pestiin vedellä ja kuivattiin yön yli. Erotettiin tuotteet käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 1:9 Metanoli/DCM-liuotinseosta. Saanto THX-041B oli 0,047 g (0,12 mmol, 26,9 %) (M) m/z 412,9814, teoreettinen m/z 412,1820. THX-041A tuotetta ei havaittu. Mitatut NMR-spektrit sisälsivät epäpuhtauksia eikä kaikkien protonien assignoiminen onnistunut piikkien päällekkäisyyksien vuoksi. Kuvassa 63 esitellään THX-041B:n ^{1}H NMR-spektri.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,54 (6H, d, J = 1,11 Hz), 3,41 (1H, s), 6,68 (3H, d, J = 5,64 Hz and J = 1,26 Hz), 7,03 (2H, m), 7,08 (1H, m), 7,15 (1H, dd, J = 6,9 Hz and J = 1,35 Hz), 7,19 (1H, m), 7,22 (1H, dd, J = 2,43 Hz and J = 0,9 Hz), 7,24 (1H, m), 7,36 (1H, m, J = 8,55*

Hz and J = 1,56 Hz), 7,56 (1H, td, J = 6,30 Hz and J = 1,95 Hz), 7,73 (1H, dd, J = 6,48 Hz and J = 1,44 Hz).



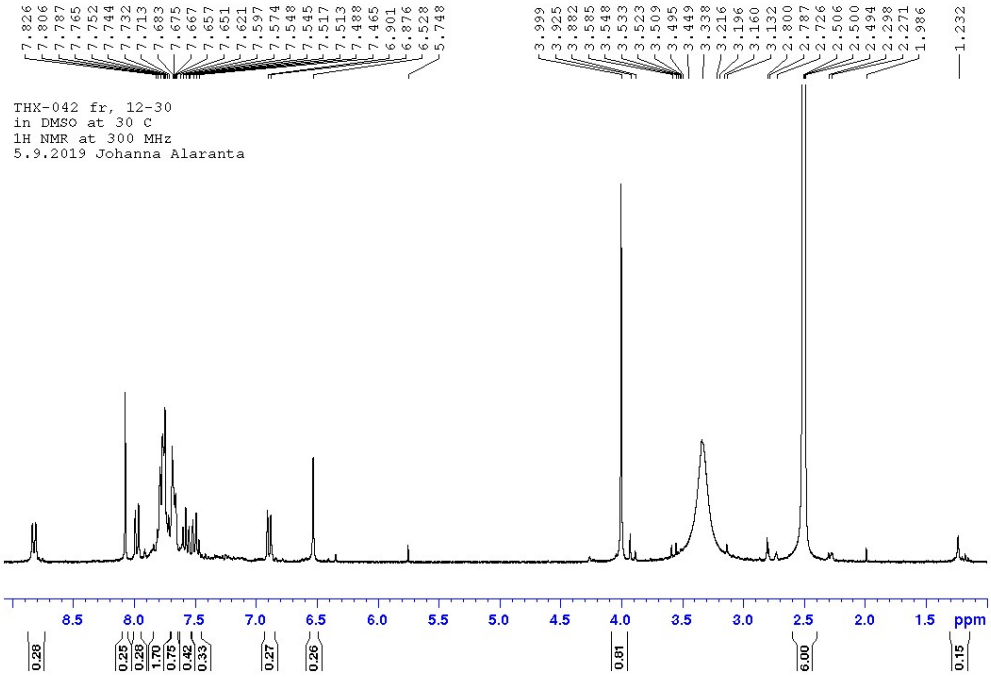
Kuva 63. THX-041B:n ^{1}H NMR-spektri.

8.13 THX-042

Kinoliini THX-022 (0,1032 g, 0,438 mmol) liuotiettiin typpi-ilmakehässä 10 ml:aan 1,2-DCE:a. Lisätiin 123 µl $POCl_3$ (1,31 mmol). Sekoitettiin yön yli noin 80 ºC:ssa. Haihdutettiin liuotin ja liuotettiin syntynyt keltainen öljy 5 ml:aan kuivaa DCM:a. Liuotettiin bentsoksaksoli (0,1405 g, 0,438 mmol) 10 ml:aan kuivaa DCM:a ja lisättiin kolviin typpi-ilmakehässä. Lisättiin 97,6 µl trietyyliamiinia (0,7 mmol). Sekoitettiin 4 tuntia huoneenlämmössä. Erotettiin tuote vedellä ja DCM:lla. Pestiin vedellä. Kuivattiin yön yli Na_2SO_4:lla. Haihdutettiin liuotin ja erotettiin haluttu tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 1:9 Metanoli/DCM-liuotinseosta. Tuotetta saatiin 0,049 g (0,13 mmol, 29,0 %). (M) m/z 384,7871, odotettu m/z 385,1102. Tuotteen **170** ^{1}H NMR-spektri esitetään kuvassa 64.

Tästä jatkettiin edelleen reaktiota eteenpäin. Liuotettiin 0,0203 g (0,0527 mmol) saatua tuotetta 2,5 ml:aan $HNMe_2$:a ja pieneen määrään DMSO:a. Sekoitettiin huoneenlämmössä 3 h. Erotettiin vedellä ja DCM:lla ja pestiin orgaanista kerrosta vedellä. Kuivattiin Na_2SO_4:lla yön yli. Erotettiin tuote käyttäen pylväskromatografiaa. Eluenttina käytettiin 1:9 Metanoli/DCM-liuotinseosta. Mitatut NMR-spektrit sisälsivät epäpuhtauksia.

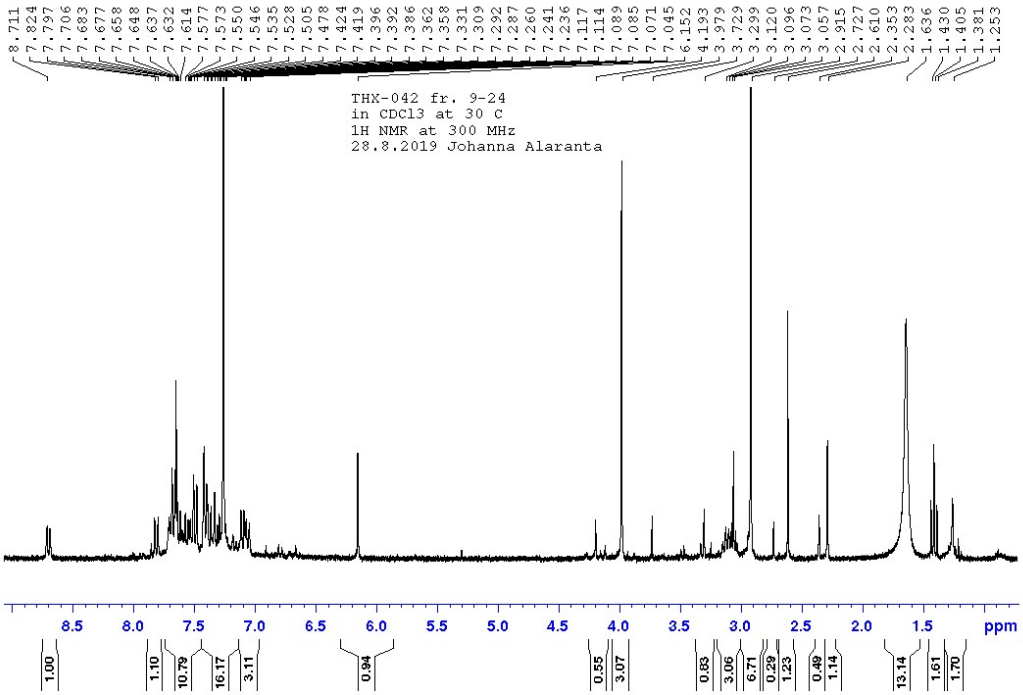
^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 3,34 (3H, s), 4,00 (3H, s), 6,53 (1H, s), 7,49 (1H, td, J = 6,84 Hz and J = 1,08 Hz), 7,57 (1H, td, J = 6,78 Hz and J = 1,08 Hz), 7,66 (1H, m), 7,68 (2H, m), 7,71 (1H, m), 7,74 (2H, m), 7,76 (1H, m), 7,79 (1H, m), 7,81 (1H, m), 7,97 (1H, d, J = 7,86 Hz), 8,82 (1H, d, J = 7,68 Hz).*



Kuva 64. THX-042:n ^{1}H NMR-spektri ennen amiinin lisäystä.

Amiinin lisäyksen jälkeen mitattiin myös NMR-spektri, joka esitetään kuvassa 65. Tuotetta ei havaittu massaspektrometrian avulla.

^{1}H NMR *δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2,92 (6H, s), 3,30 (1H, s), 4,00 (3H, s), 6,15 (1H, s), 7,10 (1H, dd, J = 7,41 Hz and J = 1,23 Hz), 7,30 (1H, m), 7,33 (1H, m), 7,41 (1H, m), 7,50 (1H, d, J = 8,22), 7,54 (2H, dd, J = 3,33 Hz and J = 1,35 Hz), 7,65 (1H, m), 7,68 (1H, m), 7,71 (1H, m), 7,81 (1H, d, J = 7,98 Hz), 8,70 (1H, d, J = 7,47 Hz).*



Kuva 65. THX-042:sta amiinin lisäyksen jälkeen mitattu ^{1}H NMR-spektri.

9. Tulokset

Kokeellisen työn aikana saatiin syntetisoitua uusia molekyylejä väriainesynteesejä varten ja ainakin yksi täysin uusi väriaine.

Suurin osa kinoliinisynteeseistä saatiin toimimaan; ainoastaan pentafluorijodibentseenillä tehty synteesi ei havaintojen perusteella toiminut. Tämä saattaa johtua siitä, että yksittäiset fluorit kaukana karbonyylistä eivät aiheuta steeristä estettä eivätkä myöskään elektronegatiivisuutensa takia aiheuta niin suurta repulsiota kuin pentafluorattu bentseeni aiheuttaa. Meta- ja parafluorattujen kinoliinien (THX-029, THX-031 ja THX-032) synteeseissä saantoprosentit olivat samaa luokkaa, 23-24 %, joten fluorin paikalla renkaassa ei näytä olevan merkitystä synteesin toimivuudelle. Para-asemassa olevan

fluoratun kinoliinin (THX-032) synteesi toistettiin vain kerran, joten johtopäätöksiä tästä ei voida luotettavasti tehdä.

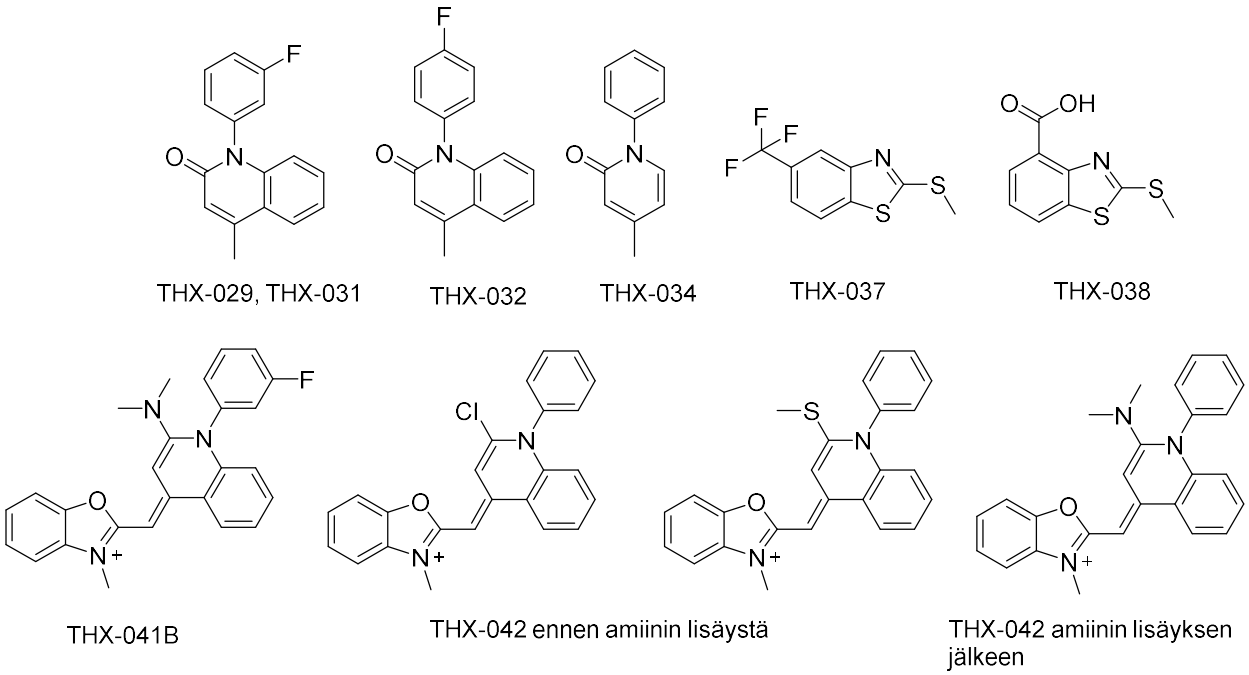
Kuten kinoliinien tapauksessa, myöskään pyridiinille tehty vastaava synteesi ei tuottanut tulosta pentafluorijodibentseenillä tehdyllä reaktiolla. Tämän luultavasti johtuu samoista syistä kuin kinoliinin tapauksessakin, koska systeemi on sama lukuun ottamatta toista bentseenirengasta. Jodibentseenillä tehty reaktio toimi ja sen saanto oli hyvä kinoliineihin verrattuna. Pyridiinin (THX-035) synteesissä saantoprosentti oli 51,36 %, kun taas niiden kinoliinien, joiden tapauksessa tuotetta saatiin, saantoprosentti vaihteli välillä 13-24 % (THX-022, THX-023, THX-029, THX-031, THX-032).

Molempien uusien tiatsolien (THX-037 ja THX-038) synteesit toimivat ja niitä saatiin syntetisoitua hyvällä saannolla. Etenkin trifluorisubstituoitu tiatsoli (THX-038) toimi erityisen hyvin; siinä saantoprosentti oli 69,81 %. Karboksyylisubstituoidulle tiatsolille (THX-037) saantoprosentti oli 30,28 %. Tämä ero voisi johtua esimerkiksi siitä, että sekä karboksyyli että trifluoridi ovat meta-ohjaavia ryhmiä. Nyt vain trifluoridi-substituoidussa synteesissä (THX-038), substituentti on meta-asemassa mahdolliseen reaktion aloituskohtaan nähden. Molemmat synteesit kuitenkin tehtiin vain kerran, joten mitään varmoja johtopäätöksiä ei voida tehdä.

Väriainesynteeseissä kohdattiin muutamia ongelmia. Asetonitriilin ja amiinin vähäisempi määrä estivät aminointia tapahtumasta. Ongelma ratkesi korvaamalla asetonitriili DMSO:lla ja käyttämällä amiinia liuottimen tapaan. Amiinia käytettiin siis ylimäärin ja tehostettiin liukenemista DMSO:n avuööa. Tämä näyttikin toimivan THX-040 synteesissä, mutta tuotetta ei kuitenkaan havaittu massa- eikä NMR-spektreissä. Edelleen synteesissä THX-041 havaittiin asetonitriilin haittaavan reaktiota. Kun kaksi synteesiä, joissa toisessa oli liuottimena DMSO (THX-041B) ja toisessa asetonitriili (THX-041A), tehtiin rinnakkain, vain THX-41B tuotti haluttua tuotetta. Synteesissä THX-042 kokeiltiin erilaista lähestymistapaa ja aminointia yritettiin tehdä viimeisenä vaiheena. NMR-spektroskopian perusteella reaktio saattoi onnistua, mutta valitettavasti massamittauksissa haluttua tuotetta ei havaittu.

10. Yhteenveto

Kaiken kaikkiaan työ laboratoriossa tuotti hyviä tuloksia, joista merkittävin oli täysin uuden fluorisubstituoidun kinoliinin sisältävän väriaineen, THX-041B:n synteesi. Vastaavaa väriainetta ilman fluoria ei kuitenkaan saatu valmistettua (THX-039, THX-040 ja THX-042). Myös uusia tiatsoleja saatiin tehtyä. Näitä voidaan jatkossa testata väriaineiden synteeseissä. Samoin myös uusia fluorattuja kinoliineja ja fluorattu pyridiini saatiin valmistettua. Myös näitä voidaan edelleen käyttää lähtöaineina tulevissa synteeseissä. Kuvassa 66 esitellään vielä kaikki valmistetut tuotteet.



Kuva 66. Kaikki työssä syntetisoidut uudet molekyylit.

11. Kirjallisuus

1. Chatwal, G. R. ja Arora, M., *Synthetic Dyes*, Global Media, Delhi, 2008.

2. Clark, M., *Handbook of Textile and Industrial Dyeing : Principles, Processes and Types of Dyes*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2011.

3. Raue, R. ja Corbett, J. F., Nitro and Nitroso Dyes. Teoksessa: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2000.

4. Ventura-Camargo, B. D. C. ja Marin-Morales, M. A., Azo Dyes: Characterization and Toxicity– A Review, *Text. Light Ind. Sci. Technol.*, **2013**, *2*, 85–103.

5. Sabnis, R. W., Phthalein Dyes. Teoksessa: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2010, ss. 1–21.

6. Nostrand, V., Xanthene Dyes, *Van Nostrand's Sci. Encycl.*, **2006**, 1–5.

7. Smith, R. E. ja Updated by Staff, Azine Dyes. Teoksessa: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013, ss. 1–10.

8. Tiffe, H. W.; Matzke, K. H. ja Thiessen, G., The acridine dyes: Their purification, physicochemical, and cytochemical properties, *Histochemistry*, **1977**, *53*, 63–77.

9. Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C. ja Donald, A. M., The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications, *J. Struct. Biol.*, **2005**, *149*, 30–37.

10. Lam, P.; Kan, C.; Yuen, M. C.; Cheung, S.; Gambari, R.; Lam, K.; Tang, J. C. ja Chui, C., Studies on quinoline type dyes and their characterisation studies on acrylic fabric, *Color. Technol.*, **2012**, *128*, 192–198.

11. Bien, H.-S.; Stawitz, J. ja Wunderlich, K., Anthraquinone Dyes and Intermediates. Teoksessa: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2000.

12. Gregory, P., Industrial applications of phthalocyanines, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2000**, *4*, 432–437.

13. Mariusz, M. ja Maged, H., Synthesis of Cyanine Dyes. Teoksessa: *Heterocyclic Polymethine Dyes*, 1993, vol. 14, ss. 1–11.

14. Saarnio, V. K.; Salorinne, K.; Ruokolainen, V. P.; Nilsson, J. R.; Tero, T. R.; Oikarinen, S.; Wilhelmsson, L. M.; Lahtinen, T. M. ja Marjomäki, V. S., Development of functionalized SYBR green II related cyanine dyes for viral RNA detection, *Dye. Pigment.*, **2020**, *177*, 1–10.

15. Štacková, L.; Štacko, P. ja Klán, P., Approach to a Substituted Heptamethine Cyanine Chain by the Ring Opening of Zincke Salts, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 7155–7162.

16. Funabiki, K.; Saito, Y.; Kikuchi, T.; Yagi, K.; Kubota, Y.; Inuzuka, T.; Miwa, Y.; Yoshida, M.; Sakurada, O. ja Kutsumizu, S., Aromatic fluorine-induced one-pot synthesis of ring-perfluorinated trimethine cyanine dye and its remarkable fluorescence properties, *J. Org. Chem.*, **2019**, *84*, 4372–4380.

17. Sun, H.; Yu, L.; Chen, H.; Xiang, J.; Zhang, X.; Shi, Y.; Yang, Q.; Guan, A.; Li, Q. ja Tang, Y., A colorimetric lead (II) ions sensor based on selective recognition of G-quadruplexes by a clip-like cyanine dye, *Talanta*, **2015**, *136*, 210–214.

18. Zhang, X.-H.; Wang, L.-Y.; Nan, Z.-X.; Tan, S.-H. ja Zhang, Z.-X., Microwave-assisted solvent-free synthesis and spectral properties of some dimethine cyanine dyes as fluorescent dyes for DNA detection, *Dye. Pigment.*, **2008**, *79*, 205–209.

19. Fu, Y. Le; Huang, W.; Li, C. L.; Wang, L. Y.; Wei, Y. S.; Huang, Y.; Zhang, X. H.; Wen, Z. Y. ja Zhang, Z. X., Monomethine cyanine dyes with an indole nucleus: Microwave-assisted solvent-free synthesis, spectral properties and theoretical studies, *Dye. Pigment.*, **2009**, *82*, 409–415.

20. Bokan, M.; Gellerman, G. ja Patsenker, L. D., Drug delivery platform comprising long-wavelength fluorogenic phenolo-cyanine dye for real-time monitoring of drug release, *Dye. Pigment.*, **2019**, *171*, 1–6.

21. Sha, X. L.; Niu, J. Y.; Sun, R.; Xu, Y. J. ja Ge, J. F., Synthesis and optical properties of cyanine dyes with an aromatic azonia skeleton, *Org. Chem. Front.*, **2018**, *5*, 555–560.

22. Karton-Lifshin, N.; Segal, E.; Omer, L.; Portnoy, M.; Satchi-Fainaro, R. ja Shabat, D., A unique paradigm for a turn-ON near-infrared cyanine-based probe: Noninvasive intravital optical imaging of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 10960–10965.

23. Schwechheimer, C.; Rönicke, F.; Schepers, U. ja Wagenknecht, H.-A., A new structure–activity relationship for cyanine dyes to improve photostability and fluorescence properties for live cell imaging, *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, 6557–6563.

24. Atchison, J.; Kamila, S.; Nesbitt, H.; Logan, K. A.; Nicholas, D. M.; Fowley, C.; Davis, J.;

Callan, B.; McHale, A. P. ja Callan, J. F., Iodinated cyanine dyes: a new class of sensitisers for use in NIR activated photodynamic therapy (PDT), *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2009–2012.

25. Siriwibool, S.; Kaekratoke, N.; Chansaenpak, K.; Siwawannapong, K.; Panajapo, P.; Sagarik, K.; Noisa, P.; Lai, R. Y. ja Kamkaew, A., Near-Infrared Fluorescent pH Responsive Probe for Targeted Photodynamic Cancer Therapy, *Sci. Rep.*, **2020**, *10*, 1–10.

26. Wang, Y.-Q.; Hu, M.-H.; Guo, R.-J.; Chen, S.-B.; Huang, Z.-S. ja Tan, J.-H., Tuning the selectivity of a commercial cyanine nucleic acid dye for preferential sensing of hybrid telomeric G-quadruplex DNA, *Sensors Actuators B Chem.*, **2018**, *266*, 187–194.

27. Chen, Y.; Wei, X.-R.; Sun, R.; Xu, Y.-J. ja Ge, J.-F., The application of azonia-cyanine dyes for nucleic acids imaging in mitochondria, *Sensors Actuators B Chem.*, **2019**, *281*, 499–506.

28. Cha, J.; Nani, R. R.; Luciano, M. P.; Kline, G.; Broch, A.; Kim, K.; Namgoong, J. M.; Kulkarni, R. A.; Meier, J. L.; Kim, P. ja Schnermann, M. J., A chemically stable fluorescent marker of the ureter, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2018**, *28*, 2741–2745.

29. Luciano, M. P.; Crooke, S. N.; Nourian, S.; Dingle, I.; Nani, R. R.; Kline, G.; Patel, N. L.; Robinson, C. M.; Difilippantonio, S.; Kalen, J. D.; Finn, M. G. ja Schnermann, M. J., A Nonaggregating Heptamethine Cyanine for Building Brighter Labeled Biomolecules, *ACS Chem. Biol.*, **2019**, *14*, 934–940.

30. De Rossi, U.; Moll, J.; Spieles, M.; Bach, G.; Dähne, S.; Kriwanek, J. ja Lisk, M., Control of the J-Aggregation Phenomenon by variation of the N-alkyl-substituents, *J. für Prakt. Chemie/Chemiker-Zeitung*, **1995**, *337*, 203–208.

31. Schade, B.; Singh, A.; Wycisk, V.; Cuellar-Camacho, J. L.; v. Berlepsch, H.; Haag, R. ja Böttcher, C., Stereochemistry controlled supramolecular architectures of novel tetrahydroxy functionalized amphiphilic carbocyanine dye, *Chem. – A Eur. J.*, **2020**, 1–34.

32. Mu, X.; Lu, Y.; Wu, F.; Wei, Y.; Ma, H.; Zhao, Y.; Sun, J.; Liu, S.; Zhou, X. ja Li, Z., Supramolecular Nanodiscs Self-Assembled from Non-Ionic Heptamethine Cyanine for Imaging-Guided Cancer Photothermal Therapy, *Adv. Mater.*, **2020**, *32*, 1–9.

33. Sha, X. L.; Yang, X. Z.; Wei, X. R.; Sun, R.; Xu, Y. J. ja Ge, J. F., A

mitochondria/lysosome-targeting fluorescence probe based on azonia-cyanine dye and its application in nitroreductase detection, *Sensors Actuators, B Chem.*, **2020**, *307*, 1–9.

34. Yang, X. ja Qian, Y., A near-infrared fluorescent probe for the discrimination of cysteine in pure aqueous solution and imaging of cysteine in hepatocellular carcinoma cells with facile cell-compatible ability †, *New J. Chem*, **2019**, *43*, 3725–3732.

35. Yang, X.; Bai, J. ja Qian, Y., The investigation of unique water-soluble heptamethine cyanine dye for use as NIR photosensitizer in photodynamic therapy of cancer cells, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2020**, *228*, 117702.

36. Meador, W. E.; Autry, S. A.; Bessetti, R. N.; Gayton, J. N.; Flynt, A. S.; Hammer, N. I. ja Delcamp, J. H., Water-Soluble NIR Absorbing and Emitting Indolizine Cyanine and Indolizine Squaraine Dyes for Biological Imaging, *J. Org. Chem.*, **2020**, *85*, 4089–4095.

37. Lima, E.; Ferreira, O.; Silva, J. F.; Santos, A. O.; Boto, R. E.; Fernandes, J. R.; Almeida, P.; Silvestre, S. M. ja Reis, L. V., Photodynamic activity of indolenine-based aminosquaraine cyanine dyes: Synthesis and in vitro photobiological evaluation, *Dye. Pigment.*, **2020**, *174*, 1–11.

38. Wang, X.-B.; Li, H.-J.; Chi, Z.; Zeng, X.; Wang, L.-J.; Cheng, Y.-F. ja Wu, Y.-C., A novel mitochondrial targeting fluorescent probe for ratiometric imaging SO 2 derivatives in living cells, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **2019**, *390*, 1–8.

39. Eryılmaz, S.; Türk Çelikoğlu, E.; İdil, Ö.; İnkaya, E.; Kozak, Z.; Mısır, E. ja Gül, M., Derivatives of pyridine and thiazole hybrid: Synthesis, DFT, biological evaluation via antimicrobial and DNA cleavage activity, *Bioorg. Chem.*, **2020**, *95*, 1–12.

40. Zhang, Y.; Bi, J.; Xia, S.; Mazi, W.; Wan, S.; Mikesell, L.; Luck, R. ja Liu, H., A Near-Infrared Fluorescent Probe Based on a FRET Rhodamine Donor Linked to a Cyanine Acceptor for Sensitive Detection of Intracellular pH Alternations, *Molecules*, **2018**, *23*, 1–15.

41. Fang, M.; Xia, S.; Bi, J.; Wigstrom, T. P.; Valenzano, L.; Wang, J.; Mazi, W.; Tanasova, M.; Luo, F. T. ja Liu, H., A cyanine-based fluorescent cassette with aggregation-induced emission for sensitive detection of pH changes in live cells, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 1133–1136.

42. Hamer, F. M., The Cyanine Dyes, *Notes Queries*, **1950**, *4*, 327–355.

43. Morrison, D. J.; Riegel, S. D.; Piers, W. E.; Parvez, M. ja McDonald, R., 2,2′-Disubstituted F12binaphthyl derivatives: Stannanes, boranes, and (R)-F12BINOL, *Chem. Commun.*, **2006**, *27*, 2875–2877.

44. Yu, L.; Yang, Q. ja Tang, Y., A comparative study of assembly and disassembly process of dimeric and monomeric cyanine dyes with DNA templates, *Chinese Chem. Lett.*, **2019**, *30*, 694–697.

45. Yu, L.; Zhang, Y.; Ding, C. ja Shi, X., Disassembly of dimeric cyanine dye supramolecular assembly by tetramolecular G-quadruplex dependence on linker length and layers of G-quartet, *Molecules*, **2019**, *24*, 1–8.

46. Sella, E. ja Shabat, D., Dendritic chain reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9934–9936.

47. Mason, S. J.; Hake, J. L.; Nairne, J.; Cummins, W. J. ja Balasubramanian, S., Solid-Phase Methods for the Synthesis of Cyanine Dyes, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 2939–2949.

48. Barykina-Tassa, O. V. ja Snider, B. B., Studies toward the synthesis of cinachyramine. An efficient route to 1,5-diazabicyclo[4.4.0]dec-5-enes Dedicated to the memory of Professor Harry H. Wasserman, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 3151–3154.

49. McNamara, L. E.; Rill, T. A.; Huckaba, A. J.; Ganeshraj, V.; Gayton, J.; Nelson, R. A.; Sharpe, E. A.; Dass, A.; Hammer, N. I. ja Delcamp, J. H., Indolizine-Squaraines: NIR Fluorescent Materials with Molecularly Engineered Stokes Shifts, *Chem. - A Eur. J.*, **2017**, *23*, 12494–12501.

50. Vus, K.; Girych, M.; Trusova, V.; Gorbenko, G.; Kurutos, A.; Vasilev, A.; Gadjev, N. ja Deligeorgiev, T., Cyanine dyes derived inhibition of insulin fibrillization, *J. Mol. Liq.*, **2019**, *276*, 541–552.

51. Juva, K., Terveyskirjasto - Duodecim, https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00699 (6.2.2020).

52. Atula, S., Terveyskirjasto - Duodecim, https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00055 (6.2.2020).

53. Pelttari, H., Terveyskirjasto - Duodecim, https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01070 (13.4.2020).

54. Kohle, F. F. E.; Hinckley, J. A. ja Wiesner, U. B., Dye Encapsulation in Fluorescent Core–Shell Silica Nanoparticles as Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **2019**, *123*, 9813–9823.

55. Krutak, J. J.; Small, L.; Henary, M. ja Patonay, G., METHOD AND DYES FOR DETECTING AND DESTROYING CANCER CELLS, US10030036B2, 2018.

56. Wang, B.-L. ja Jiang, C., DNA G-Quadruplexes as a Template To Direct Cyanine Dyes To Form H-Aggregates and Application of the Self-Assembly Entity as a New G-Quadruplexes Ligands Screening Platform, *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 1541–1547.

57. Yu, L.; Zhao, H.; Jing, N.; Shi, X.; Zhang, Y.; Ding, C.; Zhang, Y.; Fan, J. ja Tang, Y., A supramolecular probe of cyanine dye for Pb 2+ detection based on the recognition of a G-quadruplex from DNA duplexes, *Anal. Methods*, **2020**, *12*, 1182–1185.

58. Hamer, F. M., *The Cyanine Dyes and Related Compounds*, Johw Wiley & Sons, 1964.

59. Ficken, G. E., *The Chemistry of Synthetic Dyes*, Vol. 4, NY: Academic Press, 1971.

60. National Center for Biotechnology Information, Pyridine, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyridin (17.10.2019).

61. National Center for Biotechnology Information, Quinoline, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinoline (17.10.2019).

62. Monnier, F. ja Taillefer, M., Catalytic C-C, C-N, and C-O Ullmann-type coupling reactions, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2009**, 48, 6954–6971.

63. Ying, L., Nukcleic Acid Detections and Methods of Their Use, US 2013/0137875 A1, 2013.

64. Wu, Y.-J., Metalation of Azoles and Related Five-Membered Ring Heterocycles, *Top. Heterocycl. Chem.*, **2012**, *29*, 308–311.

65. Li, X.; Srinivasan, S. R.; Connarn, J.; Ahmad, A.; Young, Z. T.; Kabza, A. M.; Zuiderweg, E. R. P.; Sun, D. ja Gestwicki, J. E., Analogues of the Allosteric Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor, MKT-077, As Anti-Cancer Agents, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 1042–

1047.

66. Shindy, H. A., Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review, *Dye. Pigment.*, **2017**, *145*, 505–513.

67. Thompson, M., Synthesis, Photophysical Effects, and DNA Targeting Properties of Oxazole Yellow, *Bioconjug. Chem.*, **2006**, *17*, 507–513.