

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Yleisimmät orgaaniset väriainemolekyylit biomolekyylien
kuvantamisessa**

Kandidaatintutkielma ja tutkimusprojekti
06.05.2024
Viena Niemelä



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tämän kandidaatintutkielman kirjallisessa osiossa käsitellään orgaanisia väriaineita ja niiden käyttöä biomolekyylien kuvantamisessa. Tutkielmassa syvennytään tarkemmin erityisesti syaniiniväriaineiden, mutta myös BODIPY-yhdisteiden biokuvantamiseen liittyviin ominaisuuksiin, rakenteeseen ja synteisiin.

Tutkielman kokeellinen osa liittyy BODIPY-johdannaisen synteisiin. Työssä valmistettiin orgaanisin synteesimenetelmin EtBODIPYOAc-väriainetta, jota voidaan käyttää tulevilla tutkimuksilla. Synteesin jälkeen valmistetusta väriaineesta mitattiin ^1H , sekä ^{13}C NMR-spektrit ja tuotteelle suoritettiin sulamispistemittaus, joiden avulla pohdittiin synteesin onnistumista ja tutkittiin syntetisoidun aineen ominaisuuksia.

Esipuhe

Tämä kandidaatintutkielma tehtiin keväällä 2024 Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella. Kirjallisuuslähteiden etsiminen tutkielmaan aloitettiin tammikuussa 2024 ja kirjoittaminen helmikuun alussa. Tiedonhakupälineinä käytettiin JYKDOK-, Scopus, sekä Web of Science -tietokantoja. Tutkielma valmistui toukokuun alussa 2024. Kandidaatintutkielman ohjaajana toimi yliopistonlehtori Tanja Lahtinen. Kokeellinen osuus aloitettiin maaliskuussa 2024 ja se kesti kaksi viikkoa. Kokeellisen osuuden ohjaajina toimivat Elsa Korhonen ja Johanna Alaranta.

Haluan kiittää yliopistonlehtori Tanja Lahtista mielenkiintoisesta aiheesta ja erinomaisesta ohjauksesta, sekä kokeellisen työskentelyn ohjaajia Elsa ja Johanna, joiden kanssa laboratoriotyöskentely oli erityisen mukavaa ja opettavaista. Kiitokset kuuluvat myös vertaistukea ja kannustusta tarjonneille ystäville.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo	v
Käytetyt lyhenteet	vi
1 Johdanto	1
2 Fluoresoivat koettimet	2
3 Yleisimmät orgaaniset väriainemolekyylit	4
4 Syaniiniväriaineiden ominaisuudet ja rakenne	5
5 Syaniiniväriaineiden synteesi	8
5.1 Monometiinisyaniiniväriaineiden synteesi	8
5.2 Polymetiinisyaniiniväriaineiden synteesi	10
6 BODIPY-väriaineiden rakenne ja synteesi	11
7 Orgaanisten väriaineiden käyttö biomolekyylien kuvantamisessa	13
8 Yhteenveto	15
KOKEELLINEN OSA	17
9 EtBODIPYOAc-yhdisteen synteesi	18
9.1 Työn tarkoitus ja suoritus	18
9.2 Synteesitulokset	20
9.3 Kokeellisen työn yhteenveto	21
Kirjallisuusluettelo	21
Liitteet	25

Käytetyt lyhenteet

<i>in vivo</i>	Koejärjestely elollisessa ympäristössä
<i>in vitro</i>	Koejärjestely elottomassa ympäristössä
UV-vis	Ultravioletin ja näkyvän valon alue
NIR	Lähi-infrapuna
ICG	Indosyaaniivihreä
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diatsa-s-indaseeni
PAI	Fotoakustinen kuvantaminen
PDT	Fotodynaaminen terapia
DBU	1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni
DDQ	2,3-dikloori-5,6-disyan-1,4-bentsokinoni
ROS	Reaktiivinen happiradikaali
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
TO	Tiatsolioranssi
YO	Oksatsolikeltainen
PCR	Polymeraasiketjureaktio

1 Johdanto

Biomolekyylien kuvantamisella eli biokuvantamisella tarkoitetaan biologisten rakenteiden ja molekyylien visualisointia ja tutkimista elävissä tai eristetyissä organismeissa. Ala on kehittynyt kuvantamistekniikoiden kehittymisen myötä, ja sen avulla voidaan tutkia elävien järjestelmien ominaisuuksia eri resoluutiotasoilla makroskooppisesta molekyylylasoon. Biologisissa mikroympäristöissä tapahtuvien muutosten havaitsemisella ja kuvantamisella on keskeinen rooli monilla aloilla, kuten biologisten mekanismien tutkimuksessa, lääkeaineiden seulonnassa, sairauksien, kuten syövän diagnosoinnissa ja hoidossa, sekä hoitovasteiden seurannassa.¹ Biomolekyylien kuvantamista hyödynnetäänkin paljon sovelluksissa lääketieteen alalla.

Lähes kaikki väriaineet ovat aromaattisia orgaanisia yhdisteitä, joita voidaan pitää bentseenijohdannaisina.² Monet näistä väriaineista tuottavat voimakasta fluoresenssia, jolloin niitä voidaan käyttää fluoresoivina markkereina biokuvantamisessa paikantamaan tietty alue näytteestä. Tavanomaisiin biologisiin kuvantamismenetelmiin verrattuna fluoresoivilla koettimilla on monia etuja, kuten korkea resoluutio, biologisten näytteiden vähäisempi vaurioituminen, suuri muunneltavuus ja reaaliaikainen seurantakuvantaminen.³

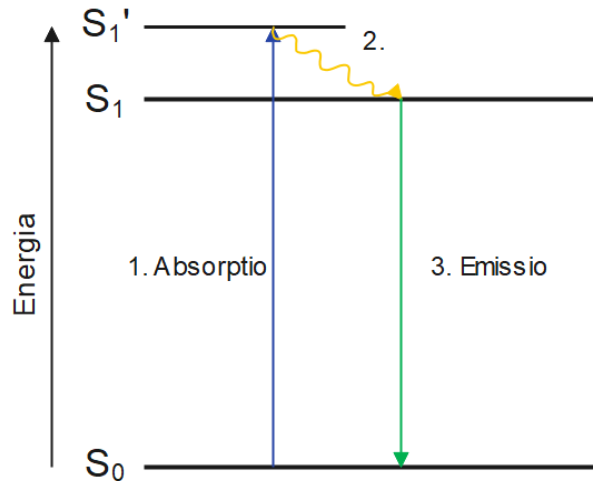
Orgaanisia väriaineita on pitkään käytetty kontrastin parantamiseen biologisten näytteiden kuvantamisessa, ja ne ovat olleet keskeisessä roolissa fluoresenssimikroskopiassa.⁴ Myös kultananopartikkeleita on käytetty kontrastina kuvantamisessa korvaamaan perinteisiä orgaanisia väriaineita niiden mahdollisten puutteiden, kuten heikon fotostabiilisuuden vuoksi.⁵ Tässä tutkielmassa orgaanisia väriaineita käsitellään biomolekyylien kuvantamisen näkökulmasta.

2 Fluoresoivat koettimet

Orgaaniset väriainemolekyylit koostuvat yleensä suurista aromaattisista ja usein heterosyklisistä järjestelmistä. Näiden rakenteellisten ominaisuuksien takia molekyyleillä on delokalisoituneita π -elektroneja, jotka pystyvät absorboimaan näkyvän valon sähkömagneettisen spektrin fotoneja. Absorptiossa elektroni virittyy perustilasta korkeammalle energiatasolle. Orgaanisen väriaineen kanssa vuorovaikutuksessa olevan fotonin energian on vastattava kahden elektronisen tilan välistä energiaeroa, jotta absorptio tapahtuisi. Tämän vuoksi kukin molekyyli voi absorboida vain tietyn aallonpituuden fotoneja, mikä antaa kullekin väriaineelle tietyn värin.⁶

Fluoresenssiksi kutsutaan spontaania tilannetta, jossa virittynyt molekyyli relaxoituu takaisin perustilaan emittoimalla fotonin. Fluoresenssia esiintyy ainoastaan tietynlaisilla molekyyleillä, kuten polyaromaattisilla hiilivedyillä ja heterosykleillä. Näitä fluoresoivia molekyyliä kutsutaan fluoroforeiksi eli fluoresoiviksi väriaineiksi. Fluoresoiva koetin on fluorofori, joka on suunniteltu reagoimaan tiettyyn ärsykkeeseen tai paikantamaan biologisesta näytteestä tietty alue.⁷

Fluoresenssiin liittyy kolme vaihetta, joista ensimmäinen on absorptio. Absorptiossa molekyyliä altistetaan tietylle valon aallonpituudelle, joka vie molekyylin virittyneeseen elektroniseen tilaan (S_1'). Toisessa vaiheessa aineen konformaatio muuttuu ja se altistuu törmäyksille ympäröivien molekyylien kanssa luovuttaen energiaa säteilemättömästi. Kun näin tapahtuu, se laskeutuu värähtelytasolla alaspäin virittyneen tilan alimmalle värähtelytasolle (S_1). Viimeisessä vaiheessa fotoni emittoituu, jolloin fluorofori palaa takaisin perustilaan (S_0). Emissio tapahtuu hyvin nopeasti, muutaman nanosekunnin kuluessa viritystilän syntymisestä. Molekyylin emittoiman valon aallonpituus on suurempi kuin sen absorboima aallonpituus. Fluoresenssia kuvataan usein Jablonskin diagrammilla (Kuva 1).⁷⁻⁹



Kuva 1. Fluoresenssi Jablonskin diagrammissa.

Fluoresenssilla ja sen voimakkuudella on merkittävä rooli väriaineiden käytössä biokuvantamisessa. Kvanttisaanto on keskeinen tapa arvioida fluoresoivia koettimia. Se kertoo, kuinka suuri osa absorboituneista fotoneista emittoituu, ja näin ollen osoittaa, mitkä väriaineet voivat olla voimakkaasti fluoresoivia.¹⁰ Se, että yksi fluorofori voi tuottaa useita tuhansia havaittavia fotoneja, on fluoresenssikuvantamismenetelmien suuren herkkyyden perusedellytys.⁷ Fluoresoivat koettimet ovat saavuttaneet korvaamattoman aseman biokuvantamisessa, kuten biologisten aineiden havaitsemisessa, solujen kuvantamisessa, *in vivo* -biokemiallisten reaktioprosessien seurannassa ja sairauksien biomarkkereiden seurannassa.³

UV-vis-alueen koettimia on kehitetty voimakkaasti fluoresoivien koettimien tutkimuksen alkuaikoina niiden yksinkertaisen synteesin, helpon saatavuuden, hyvän vesiliukoisuuden, sekä suuren kvanttisaannon vuoksi. Alan kehityksen myötä kaikki UV-vis-alueen koettimet eivät kuitenkaan enää täytä biologisen kuvantamisen ja diagnostiikan vaatimuksia. Lyhyen aallonpituuden ja UV-vis-valon heikon läpäisevyyden vuoksi fluoresenssin taustaemissio *in vivo* -kuvantamisessa on voimakas ja vaste on heikko, kun sitä käytetään syvien kudosten kuvantamiseen. Tämä heikentää kykyä tunnistaa ja merkitä biomolekyyliä syvissä kudoksissa, mikä rajoittaa kliinistä käyttöä. UV-vis-alueella fluoresoiviin koettimiin verrattuna lähi-infrapuna-alueella (NIR) fluoresoivilla koettimilla on monia etuja, kuten mahdollisuus syvälle kudokseen tunkeutumiseen vahingoittamatta ympäröiviä soluja.^{2,3}

Viime aikoina on tullut saataville uusia NIR-I- ja NIR-II-säteilyä lähettäviä pienimolekyylisiä koettimia, joilla voidaan kuvata syvällä kudoksessa ja reaaliaikaisesti erilaisia biologisia prosesseja ja aineita erittäin herkästi. Koettimilla on siis kyky havaita hyvin pieniä määriä tai muutoksia biologisissa aineissa ja reagoida niihin vaikuttamatta kudokseen. Lähi-infrapuna-alueen fluoresenssikuvauksen kehitys on keskittynyt pääasiassa ensimmäiseen NIR-ikkunaan (NIR-I), joka esiintyy aallonpituuksilla 650–900 nm, mutta sitä on laajennettu myös toiseen NIR-ikkunaan (NIR-II) aallonpituuksille 1000–1700 nm.¹¹

Kuvannettaessa isommilla NIR-aallonpituuksilla tapahtuu vähemmän taustakohinaa aiheuttavaa autofluoresenssia. Autofluoresenssilla tarkoitetaan biomolekyylien luonnollista valon emissiota, kun niitä viritetään sopivan aallonpituuden omaavalla säteilyllä. Tämä fluoresenssiemissio on solujen ja kudosten luontainen ominaisuus, ja se eroaa fluoresoivista signaaleista, jotka saadaan eksogeenisistä koettimista.¹¹

Valitessa sopivaa väriainetta *in vivo* -kuvantamiseen, on otettava huomioon useita tekijöitä. Fluoroforilla on hyvä olla voimakas eksitaatio- ja fluoresenssiemissio NIR-alueella, jotta se voidaan havaita tehokkaasti. Lisäksi fluoresenssispektrin tulisi olla stabiili eri pH-arvoilla, koska sairaisissa kudoksissa pH voi vaihdella. Väriaineella ei tulisi olla juurikaan photobleaching-ilmiötä eli fluoresointikyvyn heikkenemistä valon aiheuttaman rakenteen vaurioitumisen vuoksi, eikä sen tulisi aiheuttaa fototoksisia vaikutuksia, jotka ovat haitallisia soluille tai kudoksille. Funktionaalisten ryhmien olisi oltava sellaisia, että ne voidaan helposti liittää proteiineihin, vasta-aineisiin, peptideihin ja muihin biopolymeereihin, jotta voidaan muodostaa fluoresoivia konjugaatteja.¹²

3 Yleisimmät orgaaniset väriainemolekyylit

Kumariinit, ksanteenit, BODIPY:t ja syaniinit ovat yleisiä kirjallisuudessa esiintyviä biokuvantamiseen käytettyjä orgaanisia väriaineita, joiden erilaisia johdannaisia on kaupallisesti saatavilla.¹³ Jokaisella fluoroforilla on omat etunsa ja havaittavasta aineesta riippuen eri fluoroforeja sisältävien koettimien käytöllä voidaan hyödyntää niiden vahvuuksia ja välttää heikkouksia, jolloin saadaan tarkempia havainnontituloksia.

Orgaanisista väriaineista syaniini- ja BODIPY-väriaineet erottautuvat voimakkaan fluoresenssin ja kemiallinen stabiilisuuden vuoksi ja ne ovat ominaisuuksiltaan erinomaisia vaihtoehtoja monissa biologisissa ja kemiallisissa sovelluksissa. Syaniiniväriaineet, sekä BODIPY-yhdisteet soveltuvat molemmat solun- ja kudostutkimuksiin merkkiaineina solujen ja biologisten rakenteiden visualisoimiseksi.

BODIPY:t ovat on poly- ja heterosyklisiä aromaattisia yhdisteitä, joilla on kemiallisen stabiilisuuden lisäksi erinomainen valonkestävyys ja korkea molaarinen absorptiokerroin, eivätkä ne myöskään ole herkkiä pH:n muutoksille.^{3,14} Heikko vesiliukoisuus kuitenkin rajoittaa BODIPY-fluoroforien käyttöä elävien solujen kuvantamisessa.³ BODIPY-väriaineita on kuitenkin käytetty laajalti erilaisten bioaktiivisten aineiden havaitsemisessa, fluoresenssiokuvantamisessa, fotoakustisessa kuvantamisessa (PAI), fototermisessä ja fotodynaamisessa terapiassa (PDT) monien muiden kohteiden lisäksi.¹⁴

Syaniiniväriaineiden kemiaan on kiinnitetty yhä enemmän huomiota, sillä näitä väriaineita käytetään ja sovelletaan useilla tieteen, tekniikan, farmakologian ja lääketieteen aloilla. Lukemattomista kaupallisesti saatavista syaniiniväriaineista esimerkiksi indosyaniinivihreä (ICG) on myös Yhdysvaltojen Food and Drug Administrationin (FDA) kliinisesti hyväksymä fluoresoiva kontrastiaine NIR-I-alueella, ja siten tärkeä väriaine.¹⁵

Seuraavaksi keskitytään tarkastelemaan enemmän syaniiniväriaineiden, sekä BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksia ja synteisiä.

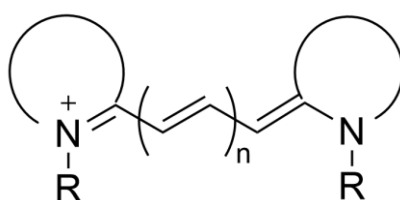
4 Syaniiniväriaineiden ominaisuudet ja rakenne

Syaniinivärit ovat yleisesti käytettyjä koettimia nukleiinihappojen tutkimiseen. Ne ovat erinomaisia NIR-väriaineita, joilla on korkea molaarinen absorptiokyky, voimakas fluoresenssi ja hyvä fotostabiilisuus. Niiden luontaisesti pienet Stokesin siirtymät eli erot eksitaatio- ja emissiomaksimien välillä voivat kuitenkin aiheuttaa eksitaatio- ja sirontainterferenssejä, mutta väriaineita on funktionalisoitu siirtymien suurentamiseksi.¹⁶

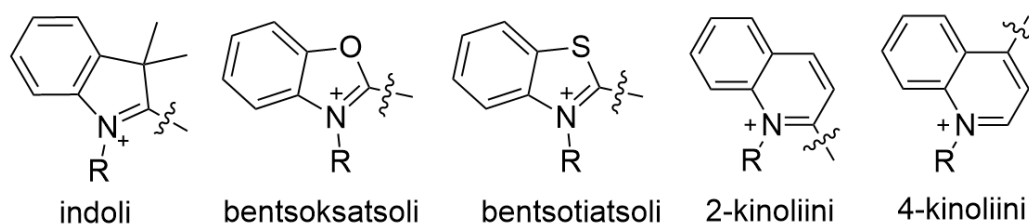
Vaikka olemassa olevien väriaineiden runkojen muokkaaminen sopivilla funktionaalisilla ryhmillä on parantanut niiden fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia¹⁰, se voi kuitenkin johtaa uusiin ongelmiin, jotka on otettava huomioon. Synteettisten haasteiden lisäksi väriaineiden molekyyllipainon kasvattaminen voi johtaa biomolekyylien toiminnan häiriintymiseen tai saostumiseen.¹⁶

Syaniiniväriaineilla on suhteellisen korkea absorptiokerroin ja modifioidut kemialliset ryhmät mahdollistavat kemiallisten, sekä optisten ominaisuuksien kehittämisen yhä pidemmälle. Syyaniiniväriaineiden synteettinen muunneltavuus on osoittautunut erittäin hyödylliseksi suunniteltaessa uusia fluoroforeja. Syyaniiniväriaineilla on myös erinomainen biohyhteensopivuus ja vähäinen myrkyllisyys biologisille näytteille, mikä on olennainen edellytys lääketieteellisessä kuvantamisessa.¹⁵ Syyaniiniväriaineiden luokkiin kuuluu kuitenkin monenlaisia rakenteita ja myrkyllisyyteen mahdollisesti vaikuttavat ominaisuudet vaihtelevat suuresti.

Klassisen syyaniiniväriaineen kemialliseen rakenteeseen kuuluu kaksi typpiä, jotka on yhdistetty π -konjugoidulla mono- tai polymetiiniketjulla. Molemmat typpiätomit ovat itsenäisesti osa heteroaromaattista kokonaisuutta, kuten pyrroolia, imidatsolia, tiatsolia, pyridiiniä, kinoliinia, bentsotiatsolia tai indolia. Syyaniiniväriaineiden yksinkertaistettu kemiallinen rakenne on kuvassa 2 ja kuvassa 3 on esitetty erilaisia yleisesti käytettyjä heterosyklisiä ryhmiä. Konjugoituneessa polymetiinirakenteessa on pariton määrä hiilivetyjä.¹⁵



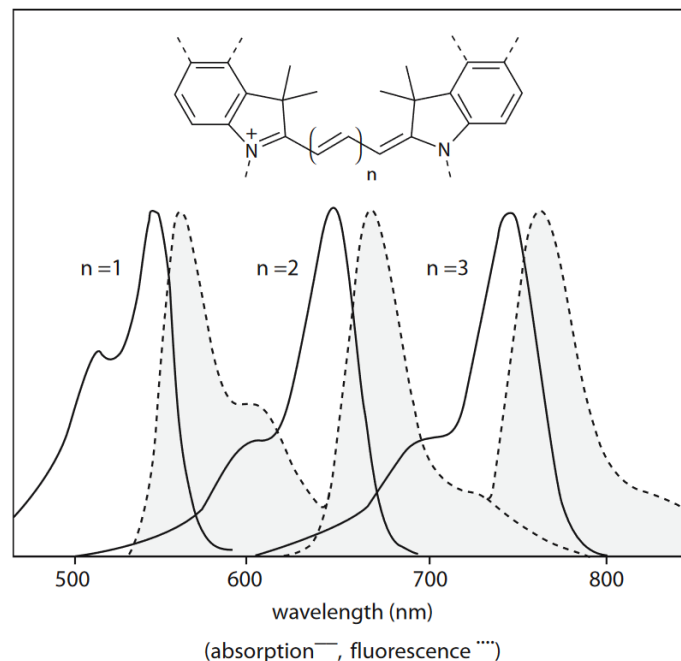
Kuva 2. Syyaniiniväriaineiden yleinen kemiallinen rakenne ($n=0, 1, 2, 3$).



Kuva 3. Esimerkkejä yleisistä syyaniiniväriaineissa käytetyistä terminaalisisista heterosyklisistä ryhmistä.

Syaniinivärit luokitellaan sen mukaan, kuinka monta metiiniryhmää (-CH=) on kahden rengasjärjestelmän välisessä ketjussa ja minkälainen rengasosa on kyseessä. Yhden hiiliatomin kautta yhdistettyjä väriaineita kutsutaan monometiinisyaaniväriaineiksi ($n=0$). Vastaavasti kolme hiiliatomia sisältävä ketju on trimetiinisyaaniväriaine ($n=1$) ja viisi hiiliatomia sisältävä ketju luokitellaan pentametiiniväriaineeksi ($n=2$). Kaksi typpiatomia voi olla molekyylin pääteasemassa tai osana heterosyklistä rengasta. Streptosyaaneissa molemmat typpiyhdisteet ovat molekyylin pääteasemassa, kun taas hemisyaaneissa toinen typpi on osa heterosykliä. Näissä väriaineissa esiintyy yleisesti monenlaisia heteroaromaattisia osia, joko toisessa tai molemmissa päissä. Jos substituentit ovat väriaineen metiinisillan eri päissä ovat samat, väriaineen katsotaan olevan symmetrisen.^{6,17}

Polymetiiniketjun pituus ja aromaattisten järjestelmien, useimmiten bentsoindoli- tai indolihdisteiden, luonne määräävät eksitaatio- ja fluoresenssiemission aallonpituusalueen. Esimerkiksi ylimääräisen CH-CH-sidoksen lisääminen voi aiheuttaa noin 100 nm:n punasiirtymän (Kuva 4). Näin saadaan molekyyliä, joiden eksitaatio- ja fluoresenssiemissiospektrit ovat säädettävissä 500–1000 nm:n spektrialueella.^{12,18}



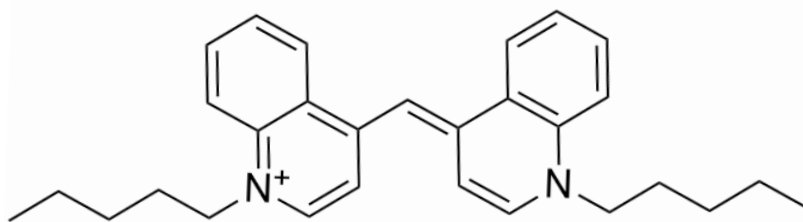
Kuva 4. Syaniiniväriaineiden tyypilliset molekyylikrakenteen määräämät absorptio- ja fluoresenssiemissiospektrit. Sidosten lisäys voi aiheuttaa n. 100 nm:n punasiirtymän, kuten huomataan verrattaessa trimetiini- ($n = 1$), pentametiini- ($n = 2$) ja heptametiinisiltojen ($n = 3$) aallonpituusmaksimeja.¹² [Reproduced with permission from Springer Nature.](#)

Syaniiniväriaineiden käyttöä biologisissa sovelluksissa, kuten *in vivo* fluoresenssikuvantamisessa, rajoittaa sen hydrofobinen luonne. Syaniiniväriaineen molempiin päihin voidaan kuitenkin lisätä hydrofiilisiä ryhmiä ja funktionaalisia ryhmiä, jotta syaniiniväriaineilla olisi paremmat edellytykset biologisiin sovelluksiin.¹⁴

5 Syaniiniväriaineiden synteesi

5.1 Monometiinisyaniiniväriaineiden synteesi

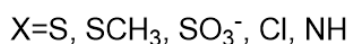
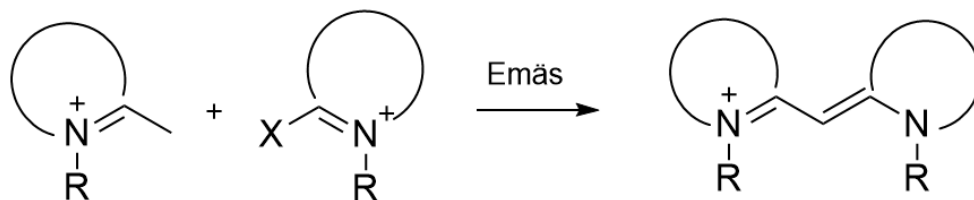
Ensimmäisen syaniiniväriaineen valmisti C.H.G. Williams vuonna 1856.¹⁹ Väriaine oli Kinoliini-sininen (Quinoline Blue), joka kuuluu monometiinisyaniiniväriaineisiin ja jota on käytetty mm. valokuvauksessa valoherkistimenä (Kuva 5).¹⁷ Vaikka nimi syaniini tarkoitti Williamsin väriaineen syvänsinistä väriä, syaniinivärit kattavat nykyään lähes koko värivalikoiman. Laaja monometiinisyaniinivärien käyttö alkoi vasta 1990-luvun alkupuolelta lähtien, kun niitä alettiin käyttää nukleiinihappokoettimina. Ensimmäisenä tällaisena koettimena käytetty monometiinisyaniiniväriaine oli epäsymmetrinen tiatsolioranssi (TO).²⁰ Tähän mennessä on kehitetty runsaasti synteesimenetelmiä, joiden avulla voidaan tuottaa molekyyliarakenteeltaan erilaisia syaniiniväriaineita erilaisiin käyttötarkoituksiin.²¹



Kuva 5. Ensimmäisen syntetisoidun syaniiniväriaineen rakenne.

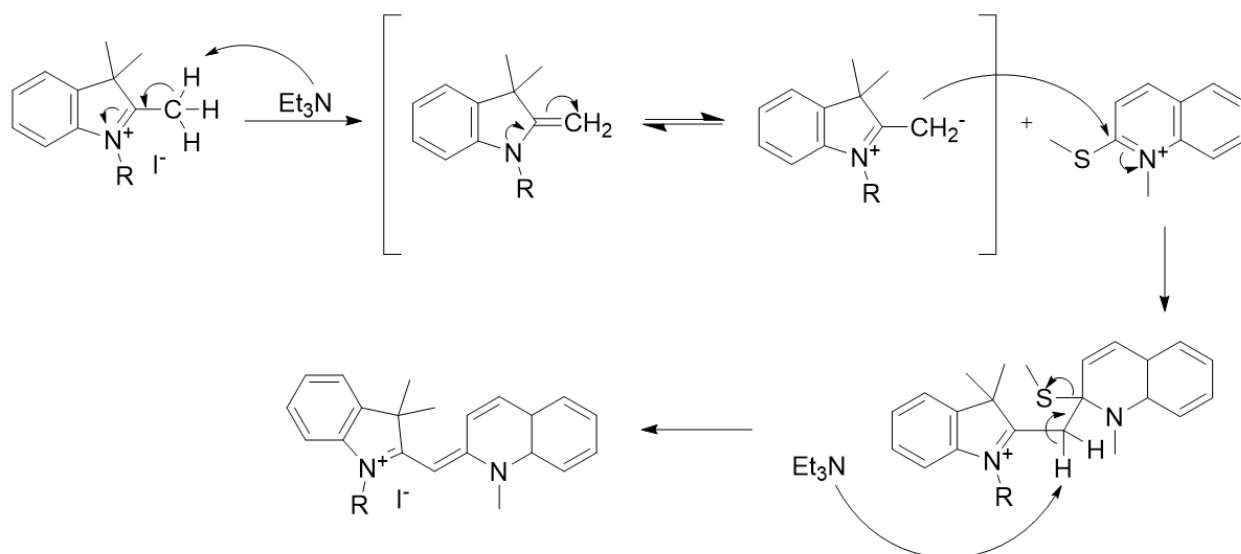
Yleinen tapa syntetisoida monometiiniväriaineita on kahden kvarternäärisen ammoniumsuolan välisellä kondensaatioreaktiolla. Monometiiniosan valmistamiseksi synteessissä käytetään reagenssien yhdistelmää, jossa joko esim. bentsatsoliumsuolassa tai pyridiniumsuolassa on metyyliiryhmä ja toisessa niistä on reaktiivinen lähtevä ryhmä, joka on tyypillisesti kloridi-, sulfonaatti tai metyylioliolaattiryhmä. Suurin osa syntetisoiduista monometiiniväriaineista on

epäsymmetrisiä, joten heterosykliset osat ovat yleensä erilaisia. Reaktiota edistetään usein toteuttamalla se emäksisissä olosuhteissa käyttämällä orgaanisia emäksiä, kuten triallyyliamiineja tai pyridiiniä. Monometiinisyaniiniväriaineiden yleinen synteesi, jossa X on poistuva ryhmä, on esitetty kuvassa 6.^{17,22}



Kuva 6. Monometiinisyaniiniväriaineiden synteesi kondensaatioreaktiolla kahdesta kvarternäärisestä suolasta.¹⁷

Uudemmissa tutkimuksissa on keskitytty synteesimenetelmiin, jotka tehdään mikroaaltoavusteisesti ilman liuotinta.^{23,24} Verrattuna liuottimen kanssa tehtyyn refluksointimenetelmään mikroaaltosäteilytekniikalla on saavutettu parempi saanto ja lyhyempi reaktioaika. Fu *et al.* on esittänyt mikroaaltojen avulla syntetisoiduille monometiinisyaniiniväreille kuvan 7 kaltaista menetelmää.²⁴ Ensimmäisessä vaiheessa katalyyttinä toimiva emäs deprotonoi metyyli ryhmän. Jälkimmäisessä vaiheessa karbanioni reagoi nukleofiilisellä additioreaktiolla toisen reagenssin lähtevän ryhmän viereisen hiilen kanssa, jota seuraa eliminaatio haluttujen väriaineiden tuottamiseksi. Kationinen tyyppi vastaanottaa elektroniparin, minkä jälkeen lähtevä ryhmä poistuu ja metiinisillan deprotonointi muodostaa lopullisen rakenteen.



Kuva 7. Mahdollinen reaktiomekanismi mikroaltoavusteisesti syntetisoiduille monometiinisyaniiniväriaineille.²⁴

5.2 Polymetiinisyaniiniväriaineiden synteesi

Polymetiinisyaniiniväriaineiden tapauksessa synteesi voidaan tehdä lähes samalla periaatteella kuin monometiinijohdannaisien valmistuksessa, eli tuote saadaan kahden kvaternäärisen ammoniumsuolan syaniinikondensaation kautta. Trimetiiniväriaineiden synteessissä molemmilla lähtöaineissa on metyyliiryhmä. Tällöin on käytettävä sopivaa reagenssia, kuten N-metyyliformanilidia tai etyyliortoformiaattia ylimääräisen metiinihiilen muodostamiseksi.^{22,25}

Tietyissä reaktio-olosuhteissa reagenssit voivat tuottaa helposti symmetrisiä syaniiniväriaineita, joissa on kaksi moolia yhtä kvaternääristä suolaa. Siksi on tärkeää valita sopivat synteettiset olosuhteet ja oikea suhde hiiltä antavan reagenssin ja ensimmäisen kvaternäärisen suolan välillä, jotta saadaan muodostettua haluttu välituote. Välituotetta käsitellään joko ennen puhdistusta tai sen jälkeen toisen kvaternäärisen suolan kanssa, jolloin saadaan aikaan epäsymmetrinen syaniiniväriaine.²² Kaksi yleisintä asymmetristä trimetiinisyaniinia ovat TO-3, jonka molekyyli-runko perustuu tiatsolioranssiin (TO), ja YO-3, jonka molekyyli-runko perustuu oksatsolikeltaiseen (YO).¹⁷

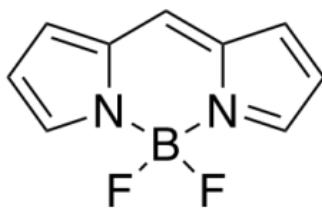
Myös pentametiiniväriaineiden synteesissä on huomioitava edellä mainitut seikat, jos halutaan muodostaa epäsymmetrinen välituote. Pentametiinisyaniiniväriaineen metiinisiltaan tarvittava kolmen hiilen ryhmä saadaan sopivasta malonaldehydi-molekyylistä, joka toimii lähtöaineena, kuten 1,1,3,3-tetrametoksipropanista tai 1,1,3-trimetoksipropeenista.^{22,25} Penta- ja heptametiinjohdannaisten syntetisointi on monimutkaisempi ja vaatii mutkikkaampia reagensseja tai lisää reaktiovaiheita.

Heptametiinisyaniiniväriaineilla on yleensä substituentteja ketjun eri kohdissa. Niiden tarkoitus on parantaa fotofysikaalisia ja fotokemiallisia ominaisuuksia. On esimerkiksi havaittu, että lisäämällä kloorisykloheksenyylirengas polymetiiniketjun keskiosaan voidaan parantaa fotostabiilisuutta ja siksi useimpien syntetisoitujen heptametiinisyaniiniväriaineiden ketjussa onkin kuuden hiilen sisältävä rengasosa. Symmetriset klooriheptametiinisyaniinivärit on perinteisesti syntetisoitu kvaternaarisen ammoniumsuolan ja bis-aldehydin tai sen ekvivalentin kondensaatiolla, jonka jälkeen on lisätty toinen ekvivalentti suolaa. Prosessi tapahtuu yleensä etikkahappoanhydridissä tai etanolissa natriumasetaanin, trietyyliamiinin, piperidiinin tai pyridiinin kanssa.¹⁷

Myös polymetiinisyaniiniväriaineiden reaktioita voidaan tehdä ilman liuotinta käyttäen mikroaaltosäteilytystä. Tämän menetelmän on todettu johtavan lyhyempiin reaktioaikoihin ja yksinkertaisempiin tuotteiden eristysmenetelmiin, jotka eivät ole myrkyllisiä tai haitallisia.¹⁷

6 BODIPY-väriaineiden rakenne ja synteesi

BODIPY eli 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diatsa-s-indaseeni on suhteellisen pienimolekyylinen väriaine, joka koostuu booridifluoridiryhmästä (BF_2), joka on kiinnittyneenä dipyrrometeeniryhmään ($\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2$) (Kuva 8). Molekyylissä on kaksi pyrroliryhmää, jotka ovat yhdistyneet meteenisillalla ja booriatomilla. Pyrroliryhmien typpiatomit ovat koordinoituneena booriatomiin ja myös booriatomiin yhdistyneet kaksi fluoriatomia sijaitsevat tasomaisen kolmirengsrakenteen molemmin puolin.²⁶

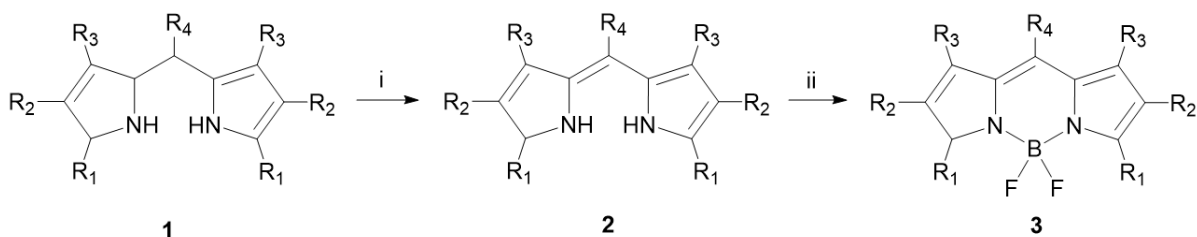


Kuva 8. BODIPY:n molekyyli rakenne.

Heteroatomien vuoksi molekyylin rakenne on heikosti polarisoitunut, minkä seurauksena molekyyliässä esiintyy nukleofiilisiä ja elektrofiilisiä reaktiokohtia. Reaktiokohdat mahdollistavat substituutiot BODIPY-molekyyli rakenteen hiilirunkoon, mikä on johtanut lukuisiin BODIPY-johdannaisiin. BODIPY:ssä on mahdollista modifioida sekä boori-, pyrroli- ja keskusosaa, ja eri osien muokkaamisella on omat etunsa eri sovelluksissa. Erialaisten substituuttien lisääminen BODIPY-perusrunkoon mahdollistaa yhdisteiden ominaisuuksien laajentamisen ja muokkaamisen, mikä lisää niiden käyttökohteita väriaineina.^{3,14,26}

Ensimmäisen BODIPY-väriaineen synteessin tekivät Treibs ja Kreuzer vuonna 1968.²⁷ BODIPY-väriaineita voidaan valmistaa erilaisten reaktioreittien kautta, mutta kaikki näistä perustuvat pyrrolikondensaatioon aldehydien kanssa. Halutut symmetriset tai epäsymmetriset substituutorakenteet aiheuttavat eroavaisuuksia synteessireiteissä.²⁶

BODIPY-johdannaisten synteessissä dipyrrometeeni käsitellään booritrifluoridietyylieetteraattilla tertiäärisen amiinin, kuten trietyyliamiinin tai 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eenin (DBU) kanssa. Menetelmän avulla voidaan syntetisoida monenlaisia BODIPY-johdannaista, sillä dipyrrometeenien valmistus on helppoa hapettamalla dipyrrometaaneja käyttämällä hapettimena p-kloorianiilia tai 2,3-dikloori-5,6-disyano-1,4-bentsokinonia (DDQ) (Kuva 9).²⁸



Kuva 9. Symmetristen BODIPY-johdannaisten synteessireitti. i) DDQ tai p-kloorianiili, ii) $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ ja trietyyliamiini tai DBU.²⁸

7 Orgaanisten väriaineiden käyttö biomolekyylien kuvantamisessa

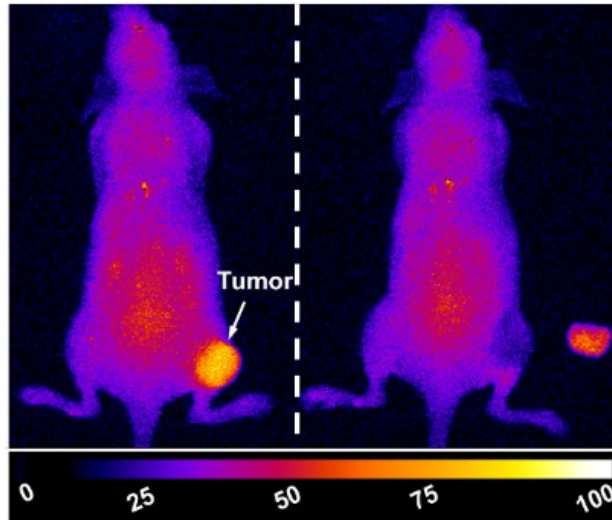
Biokuvantamisen tarkoituksena on tarkastella biologisia toimintoja reaaliajassa siten, että elimistön prosessit häiriintyisivät mahdollisimman vähän. Biokuvantamisella tarkoitetaan tekniikoita, joilla voidaan tarkastella seuranta varten määrättyjä biologisia aineita. Lääketieteessä biokuvantamista voidaan käyttää anatomian ja fysiologian tutkimiseen ja tutkimustiedon keräämiseen.

Pienet, orgaanisiin molekyyliin perustuvat fluoresoivat koettimet tarjoavat dynaamista tietoa siitä, missä kiinnostuksen kohteena olevat molekyylit sijaitsevat ja kuinka paljon niitä on näytteessä, ilman että näytettä tarvitsee muokata geneettisesti.²⁹ Tietoa saadaan siis jatkuvasti päivittyvänä reaaliajassa, jolloin voidaan havaita biologiseen ympäristöön liittyviä muuttuvia tekijöitä. Aanutlaatuisten ominaisuuksien vuoksi orgaanisia fluoresoivia väriainekoettimia käytetään laajalti biokuvantamisessa ja erilaisia koettimia käytetään havainnoimaan erilaisia aineita elimistössä.³ Orgaanisten fluoroforien laajan käytön biomolekyylien kuvantamisessa mahdollistaa niiden helppo saatavuus, laaja erilaisten johdannaisien kirjo, suhteellisen pieni koko ja erinomaiset emissiiviset ominaisuudet.³⁰

Fluoresenssikuvaukseen liittyy biologisten aineiden havaitseminen, mittaaminen ja havainnointi molekyyalitasolla. Fluoresenssikuvauksella on viime vuosina lisääntynyt voimakkaasti, koska sillä voidaan tehdä *in vitro* ja *in vivo* -seuranta yksinkertaisesti ja nopeasti reaaliajassa.³¹ Yleensä fluoresenssimikroskopiassa biologinen näyte merkitään fluoresoivilla merkkiaineilla, jotka ovat spesifisiä tietyille näytteen osille. Fluoresoivien väriaineiden lähettämiä fotoneja käytetään kuvien luomiseen soluista ja biomolekyyleistä. Menetelmä perustuu fluoroforeilla merkittyjen proteiinien tai muiden solunsisäisten molekyylien valaisemiseen tietyllä valon aallonpituudella, joka on lähellä fluoresenssin eksitaatio-spektrin huippua, ja pidemmällä aallonpituudella emittoituvan valon havaitsemiseen.³² Emissiofluoresenssi vastaanotetaan detektorilla, joka on herkkä tutkimukseen tarkoitettu kamera. Useimmat sovellukset edellyttävät spesifien fluoresoivien merkkiaineiden lisäksi kehittyneitä mikroskooppilaitteita.

Paikantamalla fluoroforit tutkittavalle alueelle voidaan ottaa kuva mistä tahansa solun osasta, mikä tekee fluoresenssimikroskopiasta tehokkaan työkalun biotieteissä. Smith *et al.*³³ ovat

tutkineet erilaisten heptametiinisyaniiniväriaineiden leviämistä elävissä soluissa NIR-fluoresenssikuvantamisella. Esimerkiksi hiirelle, jolla oli kasvain (ihmisen A549 soluja), annettiin laskimonsisäinen injektio erästä fluoresoivaa, steerisesti suojattua heptametiinisyaniiniväriainetta (s775z-RGD, 10 nmol). Kuvantamisen avulla saatiin havaittua selkeä kertymä sairaiden solujen kohdalla (Kuva 10).³³



Kuva 10. NIR-fluoresenssikuvat kasvaimen omaavasta hiirestä. Kuva otettiin kolme tuntia väriaineinjektion jälkeen ennen leikkausta ja sen jälkeen, kun kasvain oli poistettu kokonaan. (Fluoresenssin voimakkuuden asteikko mielivaltaisina yksikköinä).³³ Used with permission of John Wiley and Sons, from Sterically Shielded Heptamethine Cyanine Dyes for Bioconjugation and High Performance Near-Infrared Fluorescence Imaging, Smith, B. D.; Li, D.-H. ja Schreiber, C. L. 2020; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Orgaanisia fluoroforeja voidaan käyttää mm. epäorgaanisten ionien, nukleiinihappojen, hydratsiinien, kysteiinin³⁴, reaktiivisten happiyhdisteiden (ROS), ATP:n, entsyymien, proteiinien, sekä aminohappojen ja muiden pienten molekyylien ilmaisemiseen.³ Lisäksi niitä voidaan käyttää myös solunsisäisen pH:n muutosten seurantaan.³ Solukomponenttien kuvantaminen mahdollistaa erilaisten soluprosessien visualisoinnin ja myös suurempien molekyylien, kuten vasta-aineiden ja lääkkeiden merkitsemisen, jolloin saadaan tietoa niiden vaikutuksesta solutoimintaan.³⁰ Elimistön biomolekyylien kuvantaminen on tärkeää erityisesti lääketieteellisestä näkökulmasta, sillä esimerkiksi kysteiinipitoisuuden liiallinen ilmentyminen elimistössä voi aiheuttaa syöpää, Alzheimerin tautia ja Parkinsonin tautia.³⁴

Hydrofobisen luonteen ja tyypillisesti erinomaisen solunläpäisevyyden ansiosta BODIPY-johdannaiset ovat ihanteellisia kuvaamaan vähemmän poolisia ympäristöjä, kuten lipidejä ja

solukalvoja.¹³ Solujen kuvantaminen ja nukleiinihappojen, eli DNA:n sekä RNA:n värjääminen ovat sen sijaan keskeisiä sovelluksia syaniiniväriaineille. Kaupallisesti saatavilla on useita syaniinipohjaisia fluoresoivia väriaineita nukleiinihapoille, pääasiassa tiatsolioranssia (TO) ja sen johdannaisia (kuten SYBR Green II) ja niitä käytetään laajalti mm. geelielektroforeesissa, kvantitatiivisessa PCR:ssä, virtausytometriassa ja fluoresenssimikroskopiassa.¹⁵

Värjätessä näytettä syaniiniväriaineella muodostuu ns. nukleiinihappo-väriainekompleksi, joka kattaa nukleiinihappopolymeerin ja siihen ei-kovalenttisesti sitoutuneen yhden tai useamman väriainemolekyylin. Väriaineen ja nukleiinihapon yhdistelmä johtaa fluoresenssisignaaliin, joka on huomattavasti voimakkaampi kuin pelkän väriaineen fluoresenssi. Näyte viritetään yleensä valonlähteellä, joka pystyy tuottamaan valoa fluoresenssikompleksin maksimaalisen absorption aallonpituudella tai sen lähellä, kuten UV- tai näkyvän aallonpituuden emissiolampulla. Kompleksin fluoresenssi havaitaan detektoimalla tuloksena oleva valon emissio fluoroforille ominaisella aallonpituudella. Emissio on mahdollista havaita erilaisin keinoin, joihin voi kuulua muun muassa fluorometrien, epifluoresenssimikroskooppien, skannausmikroskooppien, konfokaalimikroskooppien, virtausytometrien ja kapillaarielektroforeesidetektorien käyttö. Monet tällaiset laitteet pystyvät käyttämään fluoresenssisignaalia solujen tai nukleiinihappojen lajitteluun ja kvantifointiin.²²

8 Yhteenveto

Biomolekyylien kuvantaminen on kehittynyt merkittävästi viime vuosina, ja sen merkitys erityisesti lääketieteen sovelluksissa on kasvanut. Uusien kuvantamistekniikoiden ansiosta voimme tutkia elävien organismien rakenteita ja molekyyliä entistä tarkemmin ja monipuolisemmin. Alan kehittyminen tarjoaa esimerkiksi mahdollisuuksia erilaisten sairauksien parempaan diagnoosiin ja hoitoon, missä tärkeänä osana on biomolekyylien toiminnan ja vuorovaikutusten ymmärtäminen.

Fluoresoivat väriaineet ovat olennainen osa biokuvantamista, ja niitä käytetään laajasti paitsi solujen kuvantamisessa, myös nukleiinihappojen värjäämisessä. Näitä väriaineita voidaan

käyttää myös merkkiaineina esimerkiksi proteiinien ja muiden biomolekyylien paikantamisessa näytteessä. Niiden avulla saadaan tarkkaa tietoa solujen toiminnasta ja vuorovaikutuksista.

Orgaaniset väriaineet, erityisesti syaniini- ja BODIPY-väriaineet, ovat tärkeitä työkaluja biomolekyylien kuvantamisessa. Näitä väriaineita käytetään laajasti solujen ja kudosten tutkimuksessa, erityisesti solurakenteiden, DNA:n ja RNA:n visualisoinnissa sekä solujen toiminnan seurannassa. Syaniini- ja BODIPY-väriaineiden kyky sitoutua spesifisesti biomolekyyliin ja fluoresoida voimakkaasti tekee niistä tehokkaita ja monipuolisia työkaluja biologisissa tutkimuksissa. Syaniini- ja BODIPY-väriaineet ovatkin motivoineet lukuisia tutkijoita selvittämään niiden kuvantamisominaisuuksia erilaisilla rakenteellisilla modifiointi- ja funktionalisointistrategioilla. Tulevaisuudessa syaniiniväriaineiden rooli lääketieteellisissä sovelluksissa, erityisesti syövän hoidossa tulee kasvamaan.

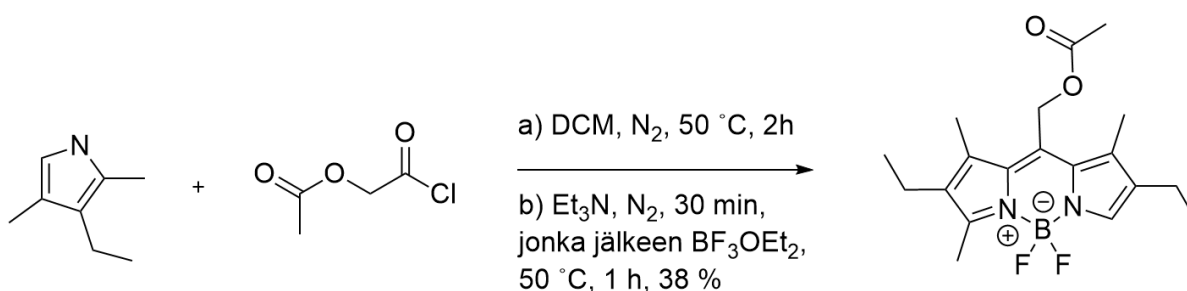
On oletettavissa, että biokuvantamisen tutkimusalue laajenee edelleen esimerkiksi kehittämällä uusia NIR-koettimia, joita voidaan käyttää ei-invasiivisina diagnoosivälineinä lääketieteellisessä kuvantamisessa. Vaikka uusien NIR-aktiivisten koettimien suunnittelussa on edistytty nopealla vauhdilla¹⁶, myös UV-vis-alueen koettimia uudentlaisilla rakenteilla ja erinomaisilla kuvantamisominaisuuksilla kehitetään ja sovelletaan edelleen, ja ne ovat fluoresoivien koettimien alalla yhä valtavirtaa.³ Vaikka esimerkiksi NIR-pienimolekyylikoettimien hyödyllisyys on laajalti tunnustettu, ilmeisesti ainoa kliinisesti hyväksytty materiaali tähän mennessä on indosyaniinivihreä.¹⁶ Käytännön koettimet biolääketieteellisen kuvantamisen laajentamiseen ovat siis vielä rajallisia, mikä edellyttää lisää ponnisteluja alan haasteiden ja rajoitusten ratkaisemiseksi.

KOKEELLINEN OSA

9 EtBODIPYOAc-yhdisteen synteesi

9.1 Työn tarkoitus ja suoritus

Kokeellisessa osassa syntetisoitiin BODIPY-väriaineen johdannainen EtBODIPYOAc. Tarkoituksena oli alun perin tehdä syaniiniväriaineisiin liittyvää synteisiä, mutta käytännön järjestelyiden vuoksi kokeellinen työ tehtiin BODIPY-väriaineisiin liittyen. Synteesi tehtiin Pettersson *et al.*:n artikkelin mukaan.³⁵ Kuvassa 11 on esitetty valmistetun BODIPY-johdannaisen synteesisireitti.



Kuva 11. EtBODIPYOAc-yhdisteen synteesi.

EtBODIPYOAc:n valmistuksessa käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Käytetyt reagenssit

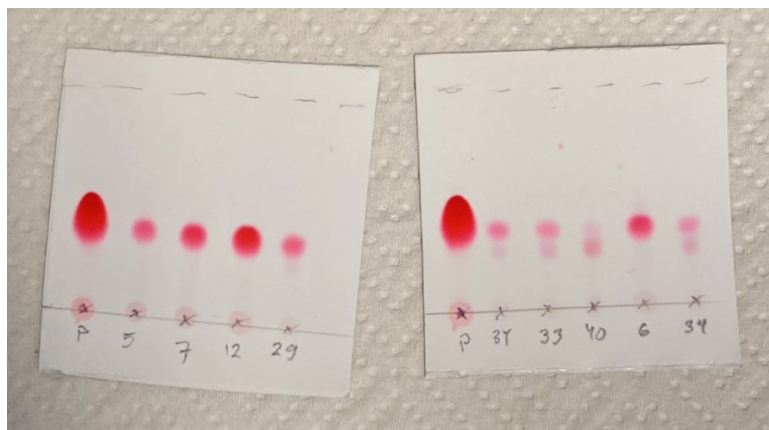
Reagenssi	M (g/mol)	ekv	n (mmol)	m (g)	V (ml)	ρ (g/ml)
EtMe ₂ pyrroli	123.20	2.0	16.0	1.9712	2.159	0.913
AcOAcCl	136.53	1.0	8.0	1.0923	0.860	1.27
Et ₃ N	101.19	4.8	38.0	3.845	5.296	0.726
BF ₃ OEt ₂	141.93	6.9	55.0	7.806	6.8	1.15

Synteesi aloitettiin valmistelemalla typpiolosuhteet reaktiota varten ja liuottamalla 2,159 ml 2,4-dimetyyli-3-etyylypyrroliä kuivaan DCM:ään, jolloin liuos muuttui vaalean keltaiseksi. Asetoksiasetyylikloridi (0,860 ml) lisättiin liuokseen ruiskulla tipoittain 10 minuutin aikana koko ajan sekoittaen, jolloin seoksesta tuli punaista. Reaktioseoksen annettiin sekoittua pimeässä 50 °C:ssa öljyhauteessa refluksoituen kaksi tuntia, jonka jälkeen sen annettiin jäähtyä ja lämpötila laskettiin 0 °C:seen jäähauteen avulla. Liuoksen väri muuttui hyvin tummaksi punaiseksi. Liuokseen lisättiin trietyyliamiinia sekoittaen 0 °C:ssa, mikä muutti värin oranssiksi

ja sen jälkeen liuoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä ja pimeässä vielä 30 minuuttia, jolloin siitä tuli hyvin tumman punaista/violettiä. Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin 6,8 ml booritrifluorididietyylieetteriä ja sekoitettiin tunti 50 °C:ssa pimeässä.

Reaktioseos uutettiin ionivaihdetulla vedellä (90 ml) ja vesifaasi DCM:llä. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin 2 M NaHCO₃:lla (90 ml) ja kylläisellä suolaliuoksella (90 ml) ja vesifaasit uutettiin DCM:llä kunkin pesun välillä. Orgaaniseen faasiin lisättiin kuivausaineeksi MgSO₄ ja liuos suodatettiin suodatinpaperin läpi kolviin, jonka jälkeen liuottimet haihdutettiin rotavaporilla ja kuivattiin vakuuissa.

Raakatuotetta saatiin 5,2444 g, joka liuotettiin DCM:ään ja lisättiin 20,95 g silikageeliä (noin nelinkertainen määrä raakatuotteeseen verrattuna), jonka jälkeen liuotin haihdutettiin rotavaporilla ja puhdistettiin flash-kromatografialla. TLC:n avulla verrattiin puhdasta tuotetta puhdistuksesta saatuihin fraktioihin, jotta osattiin ottaa mahdollisimman puhdas tuote talteen (Kuva 12). Myös raakatuotetta verrattiin puhtaaseen tuotteeseen. Eluenttina käytettiin 95 % DCM ja 5 % petroliumeetteriä (kiehumispiste 40–60°C). TLC-levyjä katsottiin myös UV-valon alla, mutta uusia pisteitä ei siinä ilmennyt. Tiedot pylväskromatografiassa käytetyistä liuottimista ja muista tiedoista CombiFlash-laitteelta löytyy liitteestä 1.



Kuva 12. Puhdas tuote (P) ja CombiFlashista valitut koeputkinäytteet TLC-levyillä.

TLC-tulosten perusteella kerättiin talteen putket 5–29. Valitut koeputket tyhjennettiin ja huuhdeltiin DCM:n avulla 1000 ml kolviin, haihdutettiin rotavaporilla, siirrettiin pienempään kolviin ja jatkettiin haihduttamista. Lähes kuiva tuote jätettiin yöksi vakuuiliinjan kuivumaan. Kuivauksen jälkeen tuotetta oli 0,8905 g. Jäännös uudelleen kiteytettiin

metanolista, jota käytettiin n. 60 ml. Liuenneen seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämmössä, jonka jälkeen se jätettiin pakastimeen (-20 °C) kiteytymään yön yli. Tuote imusuodatettiin käyttäen huuhteluun kylmää metanolia ja lopuksi kuivattiin vakuuissa, jolloin saatiin tuote tumman violetinvihreänä jauheena. Tuotetta saatiin 0,7311 g.

Tuotteelle tehtiin ^1H ja ^{13}C NMR-mittaukset käyttäen liuottimena deuteroitua kloroformia (CDCl_3). Tuotteelle mitattiin myös sulamispiste.

9.2 Synteesitulokset

Tuotetta valmistettiin 0,7311 g, jolloin saantoprosentti on 24 %, mikä on jonkin verran alhaisempi reaktioyhtälössä esitettyyn arvioituun kokeelliseen saantoon 38 % verrattuna.

Tuotteen ^1H ja ^{13}C NMR-mittauksista saadut spektrit ovat liitteissä 2 ja 3. Spektrien perusteella tuotteessa ei ole juurikaan epäpuhtauksia, sillä ylimääräisiä piikkejä ei ole. ^1H NMR-spektristä kuitenkin huomataan, että joko tuote tai liuottimena käytetty CDCl_3 on sisältänyt hieman vettä. ^1H NMR-spektrissä multipletit eivät jostain syystä ole selkeästi näkyvissä, mutta se ei vaikeuttanut spektrin tulkintaa.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.30 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 2.49 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 2.43 – 2.33 (m, 2H), 2.24 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 2.12 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 1.03 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.87, 155.24, 136.73, 133.81, 132.49, 131.80, 58.60, 20.86, 17.37, 14.90, 12.85.

Tuotteen sulamispisteeksi mitattiin 187,1–187,6 °C. Teoreettinen sulamispiste olisi 173,2–179,9 °C välillä³⁵, johon verrattuna saatu tulos on jonkin verran suurempi. Vaikka tuotetta saatiin aikaiseksi hieman odotettua vähemmän, sulamispisteen vaihteluvälin perusteella tuote on kuitenkin puhtaampaa kuin kirjallisuudessa syntetisoitu. Myös NMR-spektrien perusteella tuote oli hyvin puhdasta, lukuun ottamatta pientä määrää kosteutta, joka on voinut olla myös NMR-liuottimessa.

9.3 Kokeellisen työn yhteenveto

Työ onnistui kokonaisuudessaan hyvin ja laboratoriokokemus oli opettavainen. Orgaanisen kemian tekniikoiden parissa työskennellessä palautui mieleen se, että huolellisuudella on paljon merkitystä lopputuloksen kannalta.

BODIPY-yhdisteiden tutkiminen ja syntetisointi on tärkeää, koska ne tarjoavat monipuolisia työkaluja biologisissa, kemiallisissa, lääketieteellisissä ja valokemiallisissa sovelluksissa. Väriaineiden erityiset ominaisuudet tekevät niistä hyödyllisiä välineitä monissa eri sovelluksissa ja jatkotutkimus näiden yhdisteiden kehittämisessä voi johtaa uusien innovaatioiden, sekä sovellusten löytämiseen.

Kirjallisuusluettelo

1. Koo, H.; Huh, M. S.; Ryu, J. H.; Lee, D.-E.; Sun, I.-C.; Choi, K.; Kim, K. ja Kwon, I. C., Nanoprobes for biomedical imaging in living systems, *Nano Today*, **2011**, *6*, 204–220.
2. Yaneva, Z.; Ivanova, D.; Nikolova, N. ja Toneva, M., Organic dyes in contemporary medicinal chemistry and biomedicine. I. From the chromophore to the bioimaging/bioassay agent, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2022**, *36*, 1–14.
3. Li, Y.; Chen, Q.; Pan, X.; Lu, W. ja Zhang, J., Development and Challenge of Fluorescent Probes for Bioimaging Applications: From Visualization to Diagnosis, *Top Curr Chem (Z)*, **2022**, *380*, 22.
4. Strack, R., Organic dyes for live imaging, *Nat Methods*, **2021**, *18*, 30.
5. Sowmiya, P.; Dhas, T. S.; Inbakandan, D.; Anandakumar, N.; Nalini, S.; Suganya, K. S. U.; Remya, R. R.; Karthick, V. ja Kumar, C. M. V., Optically active organic and inorganic nanomaterials for biological imaging applications: A review, *Micron*, **2023**, *172*, 103486.
6. Saarnio, V., *Fluorescent probes, noble metal nanoparticles and their nanocomposites: detection of nucleic acids and other biological targets*, väitöskirja, Jyväskylän yliopisto, matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta, Jyväskylä, 2021.

7. Johnson, I. ja Spence, M., *Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11. painos, Life Technologies Corporation, 2010.
8. Tkachenko, N. V., *Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentations*, Elsevier, 2006.
9. Atkins, P. ja Paula, J. de, *Atkins' physical chemistry*, 8th ed, Oxford University Press, Oxford, 2006.
10. Lahtinen, T. M.; Alaranta, J. M.; Truong, K.-N.; Matus, M. F.; Malola, S. A.; Rissanen, K. T.; Shroff, S. S.; Marjomäki, V. S. ja Häkkinen, H. J., Optimizing the SYBR green related cyanine dye structure to aim for brighter nucleic acid visualization, *Dyes and Pigments*, **2023**, *208*, 110844.
11. Li, J.-B.; Liu, H.-W.; Fu, T.; Wang, R.; Zhang, X.-B. ja Tan, W., Recent Progress in Small-Molecule Near-IR Probes for Bioimaging, *Trends Chem*, **2019**, *1*, 224–234.
12. Klohs, J.; Wunder, A. ja Licha, K., Near-infrared fluorescent probes for imaging vascular pathophysiology, *Basic Res Cardiol*, **2008**, *103*, 144–151.
13. Colas, K.; Doloczki, S.; Posada Urrutia, M. ja Dyrager, C., Prevalent Bioimaging Scaffolds: Synthesis, Photophysical Properties and Applications, *European Journal of Organic Chemistry*, **2021**, *2021*, 2133–2144.
14. Yao, C.; Li, L.; Huang, W.; Wu, J.; Shi, Z.; Zhu, L.; Li, J.; Han, X.; Xu, M.; Hao, S.; Fan, Y.; Shao, T.; Bai, H.; Peng, B.; Hu, W. ja Liu, X., The Design and Bioimaging Applications of NIR Fluorescent Organic Dyes with High Brightness, *Advanced Optical Materials*, **2022**, *10*, 2102514.
15. Li, Y.; Zhou, Y.; Yue, X. ja Dai, Z., Cyanine Conjugate-Based Biomedical Imaging Probes, *Advanced Healthcare Materials*, **2020**, *9*, 2001327.
16. Escobedo, J. O.; Rusin, O.; Lim, S. ja Strongin, R. M., NIR dyes for bioimaging applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**, *14*, 64–70.
17. Ilina, K. ja Henary, M., Cyanine Dyes Containing Quinoline Moieties: History, Synthesis, Optical Properties, and Applications, *Chemistry – A European Journal*, **2021**, *27*, 4230–4248.
18. Mojzych, M. ja Henary, M., Synthesis of Cyanine Dyes. Teoksessa: Strekowski, L. (toim.), *Heterocyclic Polymethine Dyes: Synthesis, Properties and Applications*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, ss. 1–9.
19. Williams, C. G., XXVI.—Researches on Chinoline and its Homologues, *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, **1857**, *21*, 377–401.

20. Pronkin, P. G. ja Tatikolov, A. S., Fluorescent Probes for Biomacromolecules Based on Monomethine Cyanine Dyes, *Chemosensors*, **2023**, *11*, 280.
21. Jędrzejewska, B. ja Rudnicki, A., The synthesis and spectroscopic investigation of dichromophoric hemicyanine dyes, *Dyes and Pigments*, **2009**, *80*, 297–306.
22. Yue, S. T.; Singer, V. L.; Roth, B. L.; Mozer, T. J.; Millard, P. J.; Jones, L. J.; Jin, X. ja Haugland, R. P., Substituted unsymmetrical cyanine dyes with selected permeability, US5658751A, 19.8.1997.
23. Elgemeie, G. H. ja Mohamed, R. A., Microwave synthesis of fluorescent and luminescent dyes (1990–2017), *Journal of Molecular Structure*, **2018**, *1173*, 707–742.
24. Fu, Y.-L.; 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, *Dyes and Pigments*, **2009**, *82*, 409–415.
25. Haugland, R. P.; Yue, S. T.; Millard, P. J. ja Roth, B. L., Cyclic-substituted unsymmetrical cyanine dyes, US5436134A, 25.7.1995.
26. Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M. ja Jung, G., Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene, *J Fluoresc*, **2009**, *19*, 755–758.
27. Treibs, A. ja Kreuzer, F.-H., Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1968**, *718*, 208–223.
28. Tram, K.; Yan, H.; Jenkins, H. A.; Vassiliev, S. ja Bruce, D., The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacene (BODIPY), *Dyes and Pigments*, **2009**, *82*, 392–395.
29. Terai, T. ja Nagano, T., Fluorescent probes for bioimaging applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2008**, *12*, 515–521.
30. Hickey, S. M.; Ung, B.; Bader, C.; Brooks, R.; Lazniewska, J.; Johnson, I. R. D.; Sorvina, A.; Logan, J.; Martini, C.; Moore, C. R.; Karageorgos, L.; Sweetman, M. J. ja Brooks, D. A., Fluorescence Microscopy—An Outline of Hardware, Biological Handling, and Fluorophore Considerations, *Cells*, **2021**, *11*, 35.
31. Fang, H.; Chen, Y.; Jiang, Z.; He, W. ja Guo, Z., Fluorescent Probes for Biological Species and Microenvironments: from Rational Design to Bioimaging Applications, *Acc. Chem. Res.*, **2023**, *56*, 258–269.
32. Ettinger, A. ja Wittmann, T., Fluorescence Live Cell Imaging, *Methods Cell Biol*, **2014**, *123*, 77–94.

33. Smith, B. D.; Li, D.-H. ja Schreiber, C. L., Sterically Shielded Heptamethine Cyanine Dyes for Bioconjugation and High Performance Near-Infrared Fluorescence Imaging, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2020**, *59*, 12154–12161.
34. Liu, L.; Shi, L.; Liu, J.; Yang, D.; Fu, Y.; Ma, X.; Zhang, B. ja Zhang, X., A cysteine and Hg²⁺ detection method based on transformation supramolecular assembly of cyanine dye by AGRO100, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2022**, *270*, 120779.
35. Pettersson, M.; See, E.; Korhonen, E. ja Nissinen, M., Non-covalent attachment of BODIPY-caged amines to graphene and their localized photocleavage, *New Journal of Chemistry*, **2024**, *48*, 21–25.

Liitteet

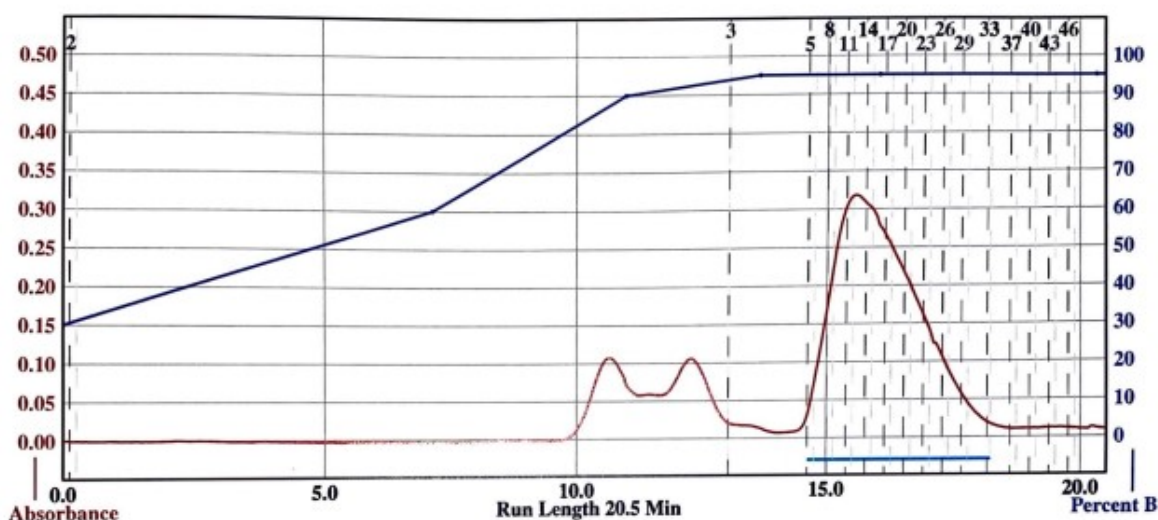
Liite 1: Tiedot Combiflash-laitteelta

Liite 2: ^1H NMR-spektri

Liite 3: ^{13}C NMR-spektri

Sample: OII-60 **CombiFlash NEXTGEN** **Monday 25 March 2024 02:08PM**
Column: Silica 220g **Peak Tube Volume: Max.**
Flow Rate: 150 ml/min **Non-Peak Tube Volume: Max.**
Equilibration Volume: 948.0 ml **Loading Type: Solid**
Initial Waste: 0.0 ml **Wavelength 1 (red): 254nm**
Air Purge: 2.0 min **Peak Width: 2 min**
Solvent A: Pet Ether **Threshold: 0.20 AU**
Solvent B: Dichloromethane

Run Notes:

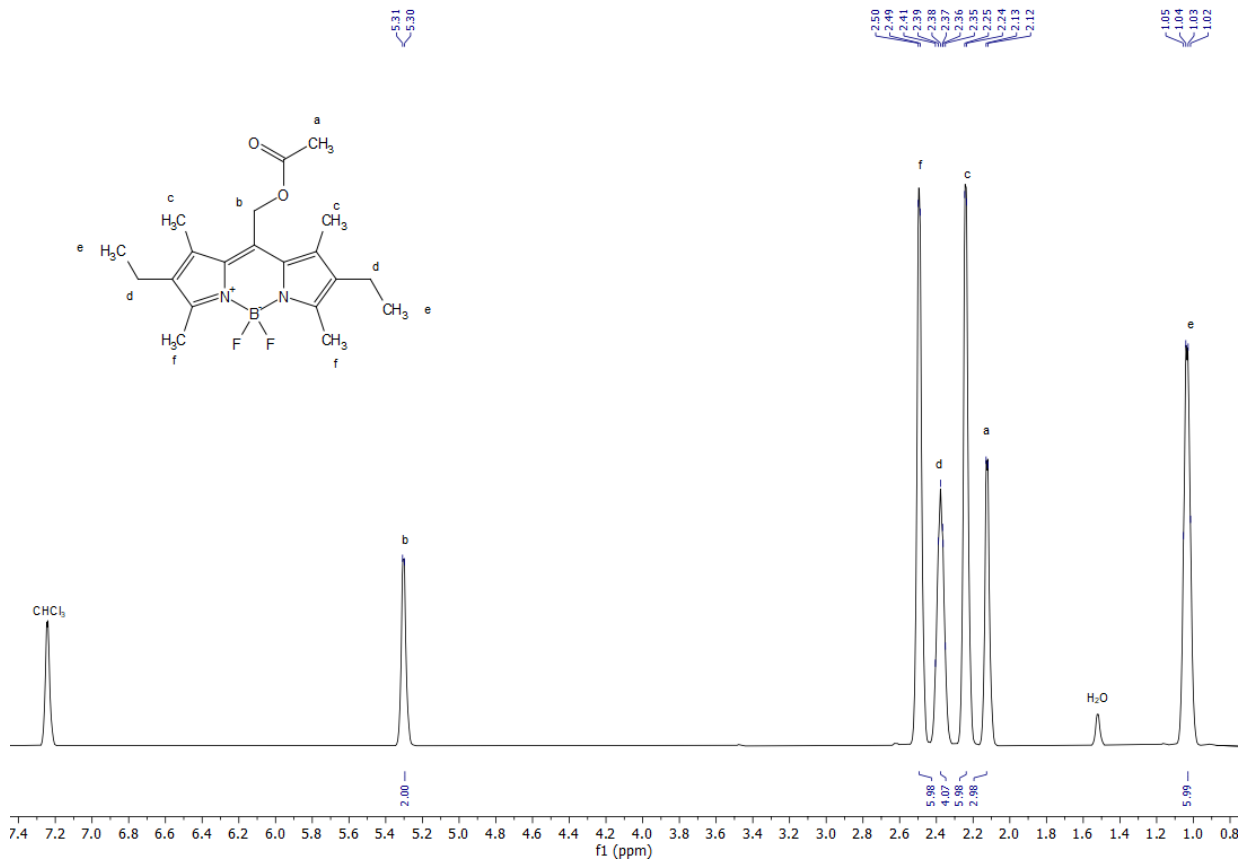


Rack A	Peak #	Start Tube	End Tube																																																																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>71</td><td>72</td><td>73</td><td>74</td><td>75</td></tr> <tr><td>70</td><td>69</td><td>68</td><td>67</td><td>66</td></tr> <tr><td>61</td><td>62</td><td>63</td><td>64</td><td>65</td></tr> <tr><td>60</td><td>59</td><td>58</td><td>57</td><td>56</td></tr> <tr><td>51</td><td>52</td><td>53</td><td>54</td><td>55</td></tr> <tr><td>50</td><td>49</td><td>48</td><td>47</td><td>46</td></tr> <tr><td>41</td><td>42</td><td>43</td><td>44</td><td>45</td></tr> <tr><td>40</td><td>39</td><td>38</td><td>37</td><td>36</td></tr> <tr><td>31</td><td>32</td><td>33</td><td>34</td><td>35</td></tr> <tr><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td><td>25</td></tr> <tr><td>20</td><td>19</td><td>18</td><td>17</td><td>16</td></tr> <tr><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td></tr> <tr><td>10</td><td>9</td><td>8</td><td>7</td><td>6</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr> </table>	71	72	73	74	75	70	69	68	67	66	61	62	63	64	65	60	59	58	57	56	51	52	53	54	55	50	49	48	47	46	41	42	43	44	45	40	39	38	37	36	31	32	33	34	35	21	22	23	24	25	20	19	18	17	16	11	12	13	14	15	10	9	8	7	6	1	2	3	4	5	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>1</td><td>A:3</td><td>A:3</td></tr> <tr><td>2</td><td>A:5</td><td>A:33</td></tr> </table>	1	A:3	A:3	2	A:5	A:33		
71	72	73	74	75																																																																											
70	69	68	67	66																																																																											
61	62	63	64	65																																																																											
60	59	58	57	56																																																																											
51	52	53	54	55																																																																											
50	49	48	47	46																																																																											
41	42	43	44	45																																																																											
40	39	38	37	36																																																																											
31	32	33	34	35																																																																											
21	22	23	24	25																																																																											
20	19	18	17	16																																																																											
11	12	13	14	15																																																																											
10	9	8	7	6																																																																											
1	2	3	4	5																																																																											
1	A:3	A:3																																																																													
2	A:5	A:33																																																																													
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Duration</th> <th>%B</th> <th>Solvent A</th> <th>Solvent B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>30.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>7.1</td><td>60.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>3.9</td><td>90.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>2.7</td><td>95.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>2.4</td><td>95.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>4.3</td><td>95.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> <tr><td>0.2</td><td>95.0</td><td>Pet Ether</td><td>Dichloromethane</td></tr> </tbody> </table>	Duration	%B	Solvent A	Solvent B	0.0	30.0	Pet Ether	Dichloromethane	7.1	60.0	Pet Ether	Dichloromethane	3.9	90.0	Pet Ether	Dichloromethane	2.7	95.0	Pet Ether	Dichloromethane	2.4	95.0	Pet Ether	Dichloromethane	4.3	95.0	Pet Ether	Dichloromethane	0.2	95.0	Pet Ether	Dichloromethane																																														
Duration	%B	Solvent A	Solvent B																																																																												
0.0	30.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
7.1	60.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
3.9	90.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
2.7	95.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
2.4	95.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
4.3	95.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												
0.2	95.0	Pet Ether	Dichloromethane																																																																												

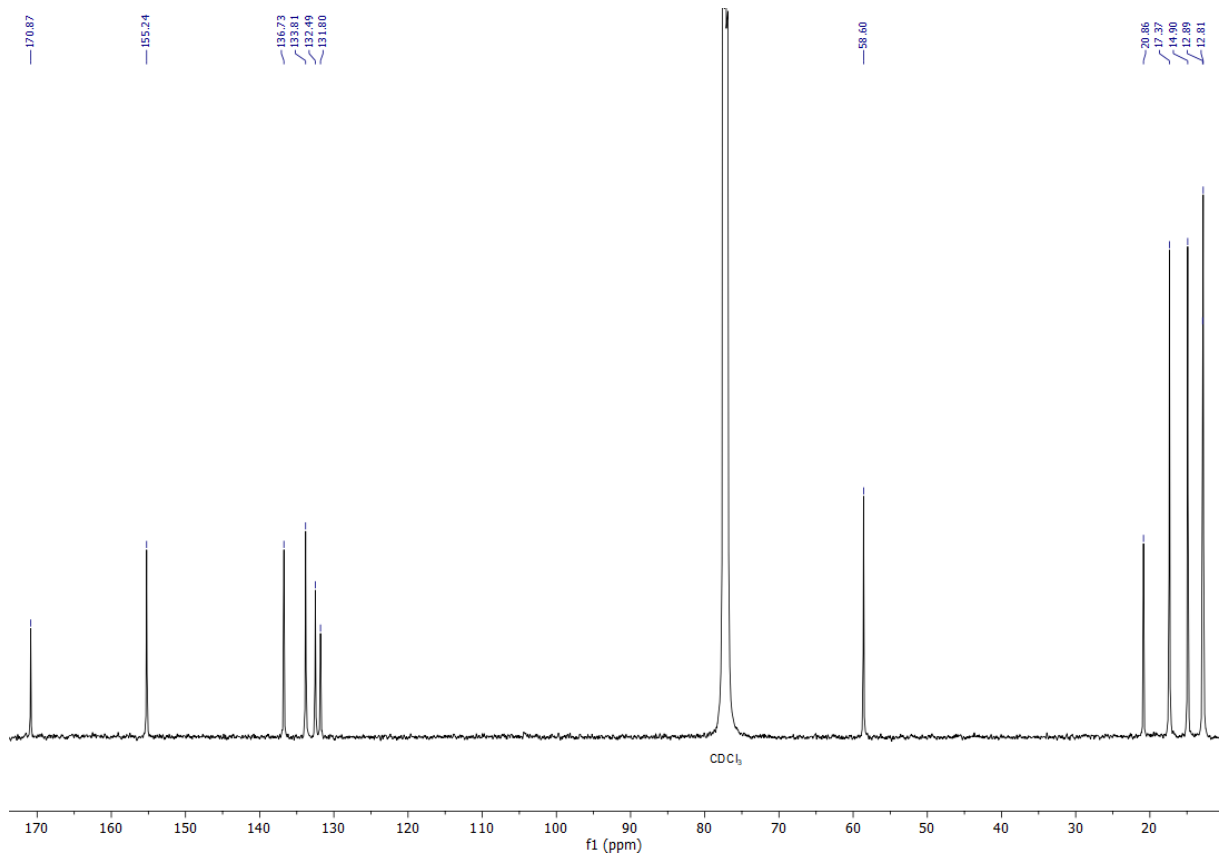
16 mm x 150 mm Tubes

Kuva L1. Tiedot Combiflash-laitteelta.

LIITE 2



Kuva L1. ^1H NMR-spektri, sekä protoneja vastaavat piikit numeroituina.

Kuva L3. ^{13}C NMR-spektri.