

**Nitroksyyli­radikaalit ja niiden käyttö lääketieteellisessä
kuvantamisessa**

Maiju-Lotta Soikkeli

Pro Gradu – tutkielma

Orgaanisen kemian laboratorio, kemian laitos

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

11.11.2013



Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen		Laitos – Institution – Department Kemian laitos	
Tekijä – Författare – Author Maiju-Lotta Soikkeli			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Nitroksyyliiradikaalit ja niiden käyttö lääketieteellisessä kuvantamisessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Orgaaninen kemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year marraskuu 2013	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 93
Tiivistelmä – Referat – Abstract Nitroksyyliiradikaalit ovat stabiileja, paramagneettisia yhdisteitä. Nämä ominaisuudet luovat erinomaiset lähtökohdat niiden tutkimiseksi mahdollisina kontrastaineina magneettikuvantamisessa (MRI), joka on yksi yleisimmistä lääketieteellisistä kuvantamismenetelmistä. Nitroksyyliiradikaalit voisivat olla lisänä nykyisin käytössä oleville gadolinium-pohjaisille kontrastaineille. Gadolinium on muiden siirtymämetallien tapaan ihmiskehoon vapautuessaan myrkyllistä, vaikkakin sen vapautuminen kompleksisesta muodostaan on epätodennäköistä. Tässä tutkielmassa esitellään nitroksyyliiradikaalien ominaisuuksia ja erityisesti niiden stabiiliuteen vaikuttavia seikkoja. Nitroksyyliiradikaalit eroavat monella tapaa reaktiivisista radikaaliyhdisteistä niin fysikaalisilta ominaisuuksiltaan kuin biologisilta vaikutuksiltaan. Ne voivat toimia muun muassa antioksidanteina, SOD-jäljittelijöinä (superoksididismutaasi) ja säteilysuoja-aineina. Tutkielmassa käsitellään myös nitroksyyliiradikaalien valmistusta ja yleisimpiä käyttökohteita syntetiikassa. Lisäksi tutkielmassa tulevat ilmi niiden sovellukset spin-leimauksessa, pH-indikaattoreina ja elektroninsiirtoreaktioiden tutkimuksessa. Yksi tärkeimmistä menetelmistä radikaalien tutkimuksessa on elektronin paramagneettinen resonanssispektroskopia (EPR). Menetelmällä voidaan tutkia radikaalien rakenteita ja arvioida niiden stabiiliutta esimerkiksi mittaamalla niiden pelkistymisreaktioiden kineetiikkaa. Tutkielman loppupuolella keskitytään esittelemään edellä mainittujen spektroskopisten menetelmien teoriaa ja nitroksyyliiradikaalien käyttöä kyseisiin menetelmiin pohjautuvissa sovelluksissa. Tutkielman kokeellinen osio koostuu nitroksyyliiradikaalipohjaisen kontrastaineen TEE-PO-Glc:n (2,2,6,6-tetraetyylipiperidiini-1-oksyli- β -D-glukopyranosidi) valmistuksesta ja alustavista <i>in vitro</i> NMR-kokeista. Alustavien tutkimusten perusteella kyseinen yhdiste on erittäin stabiili ja lyhentää merkittävästi veden T ₁ - ja T ₂ -relaksaatioaikoja. Ominaisuuksiensa vuoksi yhdiste on potentiaalinen MRI-kontrastaine ja sen tutkimuksia tullaan jatkamaan magneettikuvauslaitteella.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords nitroksyyliiradikaalit, MRS, MRI, kontrastaineet			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Orgaanisen kemian laboratorio ja Kumpulan tiedekirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

LYHENNELUETTELO

I. KIRJALLISUUSOSIO	1
1. Johdanto	1
2. Radikaalit	3
2.1 Historia	3
2.2 Radikaalien ominaisuudet	4
2.3 Nitroksyyli-radikaalit	5
2.3.1 Stabiilius	8
2.3.2 Valmistus	11
2.3.3 Reaktiot	16
2.4 Radikaalien biologiset vaikutukset	20
3. Elektronin paramagneettinen resonanssispektroskopia (EPR)	23
3.1 Teoria	24
3.2 Sovellettuja EPR-tekniikoita	27
3.3 Spin-leimaus	28
3.4 Elektronin paramagneettinen resonanssikuvantaminen (EPRI)	29
4. Ydinmagneettinen resonanssi (NMR)	30
4.1 Magneettikuvantaminen (MRI)	31
4.1.1 Kontrastiaineet magneettikuvauksessa	32
4.1.2 Relaksaatioteoria ja paramagneettinen relaksaation vahvistus	34
5. Nitroksyyli-radikaalit kontrastiaineina	38
5.1 Fantomikokeet	40
5.2 Nitroksyyli-radikaalikontrastiaineiden rakenteiden muokkaus	41
5.3. Sovellukset lääketieteellisissä tutkimuksissa	43
5.1 Kehon hapettumis-pelkistymistilan tutkimus	43
5.2 Veri-aivoesteen läpäisevyyteen liittyvä tutkimus	44
5.3 Nitroksyyli-radikaalien biologisten ominaisuuksien tutkimus MRI:lla	45
6. Johtopäätökset	46

II. KOKEELLINEN OSIO	47
7. Johdanto	47
8. Tulokset ja niiden tarkastelu	49
8.1 TEEPO-glukoosikonjugaatin valmistus.....	49
8.1.1 Synteesireitti A: dispiro-välituotteen kautta.....	49
8.1.2 Synteesireitti B: karbonyyli-välituotteen kautta	52
8.1.3 Synteesireitti C: happokloridin olefinaation kautta	53
8.1.4 Synteesireitti D: ditiokarbamaatti-välituotteen kautta	55
8.1.5 Synteesireitti E: monivaiheinen synteesi.....	56
8.1.6 TEEPOL:n glykosylointi.....	59
8.2 <i>In vitro</i> NMR testaus	62
9. Menetelmät	66
9.1 Synteesireitti A.....	66
9.2 Synteesireitti B	68
9.3 Synteesireitti C	70
9.4 Synteesireitti D	72
9.5 Synteesireitti E	74
9.6 Glykolysointireaktio ja suojaryhmien poisto	77
9.7 <i>In vitro</i> NMR-kokeet	79
10. Johtopäätökset	81
VIITTELUETTELO.....	82
LIITE	93

LYHENNELUETTELO

a	hyperhieno kytketymsvakio
B_0	ulkoisen magneettikentän voimakkuus
g	g-kerroin (spektroskopiassa)
I	spin-luku
k	Boltzmannin vakio
m_s	ulkoisessa magneettikentässä olevan elektronin energiatila
T	absoluuttinen lämpötila
τ_C	rotationaalinen korrelaatioaika <i>rotational correlation time</i>
τ_M	viipymisaika <i>residence time</i>
μ_B	Bohrin magnetoni
ν	taajuus
BBB	veri-aivoeste <i>Blood Brain Barrier</i>
BDPA	1,3-bisdifenyleeni-2-fenyyliallyyli
boc	di- <i>tert</i> -butyylidikarbonaatti
CCNU	1-(2-kloorietyyli)-3-sykloheksyyli-1-nitrosourea
CIDNP	kemiallisesti indusoitu dynaaminen ydinpolarisaatio <i>Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization</i>
CSI	kloorisulfonyyli-isosyanaatti
CT	tietokonetomografia
CW	jatkuvaherätteinen <i>Continuous Wave</i>
DCM	dikloorimetaani
DFT	tiheysfunktionaalinen teoria <i>Density Functional Theory</i>
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini
DME	dimetoksietaani
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DOTA	1,4,7,10-tetra-atsasyklododekaani-1,4,7,10-tetraetaanihappo
DOXYL	4,4-dimetyylioksoatsolidiini-1-oksyyli
DTPA	dietyleenitriamiinipentaetaanihappo
EMA	Euroopan lääkevirasto <i>European Medicines Agency</i>
EMR	elektronin magneettinen resonanssi

ENDOR	elektroni-ydin kaksoisresonanssi <i>Electron-Nuclear Double Resonance</i>
EPR	elektronin paramagneettinen resonanssi
EPRI	elektronin paramagneettinen resonanssi kuvantaminen
ESI	sähkösumutus-ionisaatio
ESR	elektronin spin-resonanssi
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto <i>Food and Drug administration</i>
Glc	glukoosi
IR	infrapuna
m-CPBA	<i>meta</i> -klooriperbentsoehappo
MRI	magneettikuvantaminen
MRS	magneettinen resonanssispektroskopia
MS	massaspektrometria
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
NOE	ytimen Overhauser efekti <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NSF	nefrogeeninen systeeminen fibroosi
PAMAM	polyamidoamiini
PCA	3-karboksyyli-2,2,5,5,-tetrametyylipyrrolidiini-1-oksyli
PEG	polyetyleeniglykoli
PELDOR	pulssitettu elektroni-elektroni kaksoisresonanssi <i>Pulsed Electron-Electron Double Resonance</i>
PEMB	5-etyyli-2-metyylipyridiini boraani
PET	positroniemissiotomografia
PRE	paramagneettinen relaksaation vahvistus, <i>Paramagnetic Relaxation Enhancement</i>
PROXYL	2,2,5,5-tetrametyylipyrrolidiini-1-oksyli
RF	radiotaajuus <i>radio frequency</i>
RGD	arginiini-glysiini-asparagiini
RNS	reaktiivinen typpiyhdiste
ROS	reaktiivinen happiyhdiste
SDSL	kohdennettu spin-leimaus <i>Site Directed Spin Labeling</i>
SOD	superoksididismutaasi
SOMO	yhden elektronin miehittämä molekyyliorbitaali, <i>Singly Occupied Molecular Orbital</i>
SPIO	pieni rautaoksidipartikkeli <i>Small Particles of Iron oxide</i>
T ₁	ytimen pitkittäinen / spin-hila relaksaatio

T ₂	ytimen poikittainen / spin-spin relaksaatio
T _{1e}	elektronin spin relaksaatio
TEEPO	2,2,6,6-tetraetyylipiperidiini-1-oksyli
TEEPOL	4-hydroksi-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiini-1-oksyli
TEMPO	2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyli
TEMPOL	4-hydroksi-2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyli
TES	2,2,6,6-tetrametyyli-1-oksido-4-piperidiini-1-sukkiinihappo
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutlevykromatografia
TMIO	1,1,3,3-tetrametyyli-isoindoliini-2-oksyli
TMSOTf	trifluorimetaanisulfonaatti
USPIO	ultrapieni rautaoksidipartikkeli <i>Ultra Small Particles of Iron Oxide</i>
UV	ultravioletti
Å	ångström (10 ⁻¹⁰ m)

I. KIRJALLISUUSOSIO

1. Johdanto

Radikaalit on laajalti tutkittu ja kiinnostusta herättänyt aihe kemian alalla. Niiden löytymisen ja olemassaolon yleinen hyväksyntä 1900-luvulla uudistivat vallalla olleen molekyyli-malliteorian ja saattoivat radikaalien tutkimuksen kukoistukseen. Radikaaleilla on varsin pitkä ja vaiherikas historia orgaanisen kemian tieteenalana ja niiden ominaisuuksia ja reaktioita on esitelty useissa teoksissa ja katsausartikkeleissa.¹

Radikaalit ovat atomeja tai yhdisteitä, joilla on pariton elektroni uloimmalla elektronikuorella. Pariton elektroni pyrkii pariutumaan toisen vapaan elektronin kanssa, minkä vuoksi radikaalit ovat useimmiten erittäin reaktiivisia. Ne ovat osallisina useissa prosesseissa niin teollisuudessa kuin ihmiskehossakin. Radikaalien reaktiivisuuden vuoksi ne esiintyvät usein niin kutsuttuina reaktiivisina välituotteina monissa reaktioissa niin orgaanisen- kuin polymeerikemiankin alalla, esimerkiksi radikaalipolymerisoinnissa. Ne ovatkin osallisena useiden eri materiaalien kuten muovien ja maalien valmistuksessa. Radikaalit voivat muodostua esimerkiksi lämmön vaikutuksesta, fotokemiallisen reaktion tuotteena, pelkistymällä tai hapettumalla. Merkittävä osa radikaaleista esiintyy myös täysin stabiileina yhdisteinä. Tässä tutkielmassa tutustutaan radikaaleihin ja perehdytään erityisesti niiden stabiileihin muotoihin, joista tärkein ja suurin on nitroksyyli-radikaalien ryhmä. Tutkielmassa esitellään niiden tärkeimmät ominaisuudet, valmistusmenetelmät, reaktiot ja biologiset vaikutukset.

Kirjallisuusosion toinen merkittävä osa koostuu katsauksesta nitroksyyli-radikaalien sovel-lukseen erilaisissa spektroskopisissa menetelmissä ja lääketieteellisessä spektroskopiassa. Eräs lääketieteen, erityisesti lääketieteellisen fysiikan, suurimmista tutkimusaiheista on nykyisten ja uusien kuvantamismenetelmien kehittäminen. Hoitokeinojen kehittyessä pyr-kimyksenä on ollut parantaa myös diagnostiikkaa. Yleisimmin käytössä olevat menetelmät ovat tehokkaita, mutta niihin liittyy useita puutteita, kuten haitallisen säteilyn tai radioak-tiivisten yhdisteiden käyttö. Yhdeksi tärkeimmistä kriteereistä kuvantamismenetelmien kehitykselle onkin muodostunut noninvasiivisuus.

Eräs yleisimmistä ja tehokkaimmista kuvantamismenetelmistä on magneettikuvantaminen (MRI). Ihmiskeho koostuu pääasiassa vedestä ja MRI perustuu veden ytimien ominaisuuksiin ja liikkeisiin.² Tarkemmin sanottuna nämä ominaisuudet aiheuttavat kontrastieroja eri

kudosten välillä. Näitä eroja voidaan parantaa käyttämällä kuvantamisessa kontrasti- eli varjoaineita. Suuri osa magneettikuvantamisesta suoritetaan käyttäen kontrastiaineita. Nykyisellään kliinisessä käytössä olevat kontrastiaineet voivat olla terveydelle haitallisia. Ne sisältävät gadoliniumia, joka on kehoon vapautuessaan myrkyllistä. Tutkielmassa esitellään nitroksyyli-radikaalit vartenotettavana mahdollisuutena uusiksi kontrastiaineiksi lääketieteelliseen kuvantamiseen. Orgaanisilla radikaaleilla voi olla tulevaisuudessa suuri rooli uusina vaarattomina kontrastiaineina.

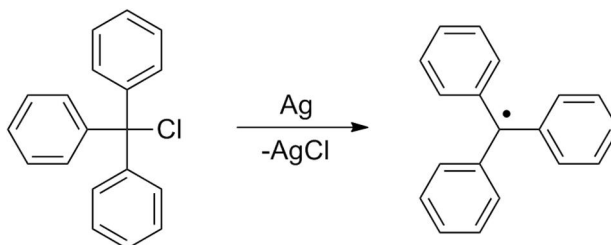
2. Radikaalit

Osiossa käydään lyhyesti läpi radikaalien historia. Reaktiivisten välituotteiden ja radikaali-reaktioiden sijaan keskitytään tarkastelemaan stabiileja radikaaleja ja niiden suurinta ryhmää, nitroksyyli-radikaaleja. Lisäksi pohditaan radikaalien stabiiliuteen vaikuttavia tekijöitä. Nitroksyyli-radikaalien stabiiliudella on tärkeä merkitys niiden lääketieteellisissä sovelluksissa sekä biologisten ominaisuuksien määrityksessä.

2.1 Historia

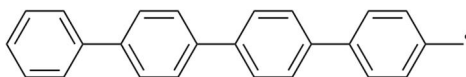
Käsite radikaali tunnettiin jo 1700-luvulla, tosin sen merkitys poikkesi nykyisestä melkoisesti. Nimitystä käytettiin atomia vastaavasta orgaanisesta analogista, kuten esimerkiksi metyylistä.^{1c} Orgaanisen kemian suurimpia oivalluksia 1800-luvulla olivat Couperin³ ja Kekulen⁴ hiilen sitoutumismallit ja van't Hoffin⁵ keksintö näiden yhdisteiden kolmiulotteisesta rakenteesta. Teorioiden mukaan hiilen valenssiluku oli neljä eli se muodosti aina neljä ekvivalenttia sidosta ja nämä neljä sidosta asettuivat niin, että molekyyli muodosti tetraedrin.

Näiden vallitsevien teorioiden vuoksi Gombergin⁶ valmistama ensimmäinen radikaaliyhdiste sai epäilevän vastaanoton sen poikkeavan rakenteen vuoksi. Gomberg valmisti ensimmäisen radikaalimolekyylin, trifenyylimetyylin, vuonna 1900. Se muodostui trifenyylimetyylikloridin ja hopeajauheen reaktiossa hapettomissa oloissa (kuva 1). Yhdiste esiintyi radikaalina vain liuoksissa, mikä ilmeni liuoksen keltaisena värinä. Gombergin radikaali ei kuitenkaan ollut niin stabiili, että se olisi voitu eristää liuoksesta.



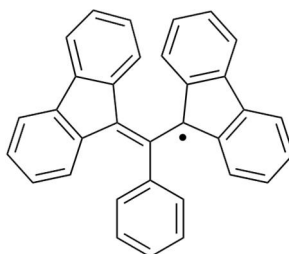
Kuva 1. Gombergin trifenyylimetyyli-radikaalin valmistus.

Gombergin löydöksen jälkeen radikaalitutkimus alkoi kiinnostaa useita tutkijoita orgaanisen kemian uutena tieteenalana. Tutkimus keskittyi trifenyyliradikaaleihin, ja Schlenkin⁷ vuonna 1910 syntetisoima tris(4-bifenylyyli)metyyli (kuva 2) poisti lopulta kaiken epäilyksen radikaalien olemassaolosta.



Kuva 2. Tris(4-bifenylyyli)metyylin rakenne.

Seuraava mullistus koettiin, kun pystyttiin osoittamaan stabiilien radikaalien olemassaolo. Tähän asti radikaaleja oli esiintynyt vain liuoksissa ja yritykset eristää niitä liuoksista johtivat yhdisteiden dimerisoitumiseen. Koelsch⁸ valmisti vuonna 1931 vinyyliradikaalin, 1,3-bisdifenyleeni-2-fenyyliallyylin (BDPA) (kuva 3), joka voitiin eristää ja käsitellä normaaliemien kemikaalien tapaan huoneenlämmössä ja normaali-ilmanpaineessa. Käsite ”stabiili radikaali” oli niin epäuskottava, että julkaisu hylättiin. Vasta 26 vuotta myöhemmin Koelschin tuotteen rakenne varmistettiin ESR-spektroskopian avulla ja alkuperäinen kirjoitus julkaistiin sellaisenaan.



Kuva 3. 1,3-bisdifenyleeni-2-fenyyliallyylin rakenne.

2.2 Radikaalien ominaisuudet

Yleisesti ottaen radikaalien perusominaisuudet ja niiden erot tavallisiin molekyyliin aiheutuvat niiden parittomasta elektronista. Radikaalien ominaisimpana piirteenä pidetään reaktiivisuutta. Kuitenkin radikaalien stabiiliuteen vaikuttavat useat eri tekijät ja stabiilien radikaalien kirjo on hyvinkin laaja. Tietyissä yhteyksissä ne on jaoteltu kahteen eri ryhmään: stabiilit (*stable*) ja pysyvät (*persistent*) radikaalit. Pysyviksi radikaaleiksi kutsutaan radikaaleja, joiden olemassaolo voidaan todeta esimerkiksi spektroskopisilla menetelmillä, mutta joita ei voida eristää tai käsitellä ilman hajoamista. Tällaiset yhdisteet voivat esiintyä

radikaaleina esimerkiksi liuoksissa, mutta eristämisen tuloksena ne yleensä muodostavat dimeerin. Stabiilit radikaalit taas ovat niin stabiileja, että niitä todella voidaan eristää, puhdistaa ja käsitellä huoneenlämmössä ja normaali-ilmanpaineessa kuten tavallisia kemikaaleja. Yleisimmät stabiilien radikaalien ryhmät ovat fenyyl-, hydratsyyli- ja nitroksyyli-radikaalit. Näistä tärkein ja tutkituin on nitroksyyli-radikaalien ryhmä.

Radikaalien pariton elektroni aiheuttaa toisen niiden merkittävistä ominaisuuksista: radikaalit ovat siirtymämetallien tavoin paramagneettisia. Paramagneettisilla aineilla on pysyvä magneettinen dipoli. Radikaalien paramagneettisilla ominaisuuksilla on suuri merkitys useissa sovelluksissa, erityisesti EPR eli elektronin paramagneettinen resonanssi – spektroskopiassa, kuten myöhemmin kappaleessa 3 tullaan näkemään.

Radikaalit voivat reagoida pääasiassa neljällä eri tavalla.^{1a} Kolme yleisintä tapaa ovat substituutioreaktio, additio kaksoissidokseen ja reaktio toisen radikaalin kanssa. Neljäs ja harvinaisin tapa on disproportioatioreaktio. Radikaalin reagoidessa toisen radikaalin kanssa syntyy varaukseton molekyyli. Elektronin additio taas tuottaa anionin ja elektronin poistaminen kationin. Nämä voivat edelleen toimia vastaavasti nukleofiilinä tai elektrofiilinä seuraavissa reaktioissa. Radikaalien on myös mahdollista reagoida niin, että radikaalikeskus pysyy koskemattomana.⁹ Tämä on mahdollista stabiileimmilla radikaaleilla, esimerkiksi spin-leimojen valmistuksessa.

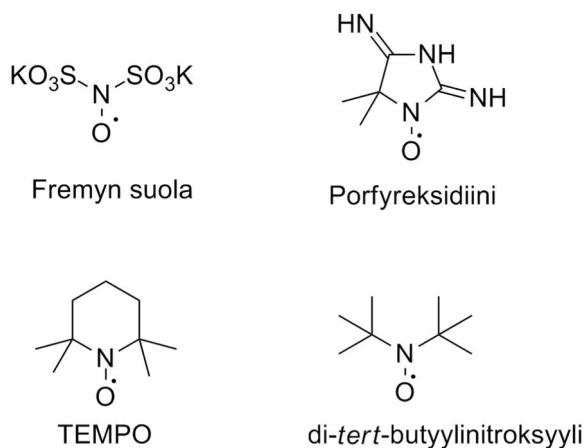
2.3 Nitroksyyli-radikaalit

Nitroksyyli-radikaalit ovat tunnetuin stabiilien radikaalien ryhmä. Niiden perusrakenne on esitetty kuvassa 4. Olennaisinta niiden rakenteessa on radikaalikeskuksena toimiva nitrosidi-ryhmä, joka on sitoutunut kovalenttisesti kahteen sivuryhmään. Yleisesti niiden rakennetta kuvaillaan *N,N*-disubstituoiduiksi NO-radikaaleiksi. Muita nimityksiä ryhmälle ovat nitrosidit ja harvoin käytetty aminoksyylit. Sivuryhmät voivat olla joko orgaanisia tai epäorgaanisia substituentteja. Alkyyli-sivuryhmät voivat olla primäärisiä, sekundäärisiä tai tertiäärisiä, vaikkakin kaksi ensin mainittua ovat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta hyvin epästabiileja. Nitroksyyli-radikaalien stabiiliutta on käsitelty erikseen luvussa 2.3.1.



Kuva 4. Nitroksyyli-radikaalin perusrakenne.

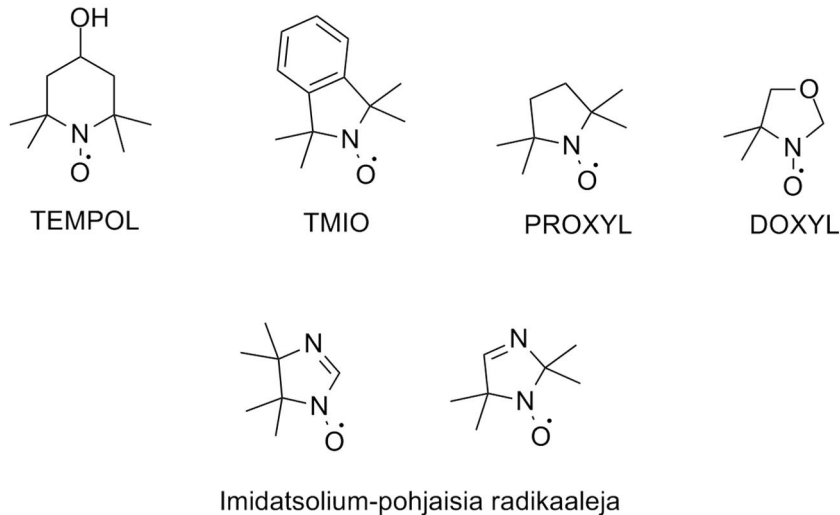
Epäorgaaninen Fremyn suola oli ensimmäinen löydetty nitroksyyli-radikaali.¹⁰ Yhdistettä käytetään hapettimena orgaanisessa synteesissä. Ensimmäisen orgaanisen nitroksyyli-radikaalin, porfyreksidiinin, eristivät Piloty ja Schwerin¹¹ vuonna 1901. Kuvassa 5 on esitetty näiden aikaisimpien nitroksyyli-radikaalien rakenteet. Lebedevin ja Kazarnovskiin¹² sekä Hoffmannin¹³ julkaisut mullistivat stabiilien radikaalien tutkimuksen 60-luvulla julkaisemalla TEMPO:n ja di-*tert*-butyyli-nitroksyylin rakenteet (kuva 5).



Kuva 5. Ensimmäisten nitroksyyli-radikaalien rakenteita.

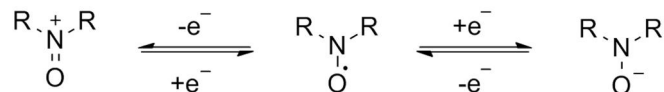
Nitroksyyli-radikaalien yleisimmät käyttökohteet ovat orgaanisessa synteesissä, materiaalikemialla, biofysiikassa ja biolääketieteessä.¹⁴ Materiaalikemian alalla niitä on sovellettu muun muassa molekyyli-magneeteissa¹⁵ ja paristoissa¹⁶. Nitroksyyli-radikaalit ovat poolisia, pääasiassa kiinteitä tai nestemäisiä aineita. Niiden ominaisuuksiin kuuluu kyky muodostaa vetysidoksia, pH-herkkyys ja muiden radikaalien tapaan paramagneettisuus. Nitroksyyli-radikaalit kuuluvat π -radikaalien ryhmään. Niiden vapaa elektroni sijaitsee hajottavalla π^* -SOMO-rajaorbitaalilla (yhden elektronin miehittämä molekyyli-orbitaali, *singly occupied molecular orbital*). Koska vapaan elektronin delokalisaatioenergia on suhteellisen suuri (noin 120 kJ/mol), N-O – sidosta voidaan kuvata kolmen elektronin sidokseksi ja sen sidosluku on 1,5. N-O sidoksen pituus nitroksyyli-radikaalissa on noin 1,23-1,29 Å, eli se muistuttaa ominaisuuksiltaan enemmän N-O kaksoissidosta, jonka sidospituus on 1,20 Å, kuin yksinkertaista N-O sidosta (1,44 Å). Nitroksyyli-radikaalit ovat neutraaleja yhdisteitä ja protonoidun TEMPO:n pK_a -arvo on -5,8.¹⁷ Nitroksyyli-radikaalit, kuten radikaalit yleensä, absorboivat valoa sellaisella aallonpituusalueella, joka saa aikaan niille ominaisen kirkkaan värin. Esimerkiksi yksi yleisimmistä nitroksyyleistä, TEMPO, on väritään oranssi ja di-*tert*-butyyli-nitroksyyli punaoranssi.

Useilla nitroksyyli-radikaaleilla on käytössään vakiintuneita lyhenteitä. TEMPO:n lisäksi yleisimpiä niistä ovat TEMPOL (4-hydroksi-2,2,6,6-tetrametyylipiperidin-1-oksyyli) PROXYL (2,2,5,5-tetrametyylipyrrolidiini-1-oksyyli) ja DOXYL (4,4-dimetyylioksoatsolidiini-1-oksyyli). Kuvassa 6 on esitetty muutamien yleisimpien nitroksyyli-radikaalien rakenteita.



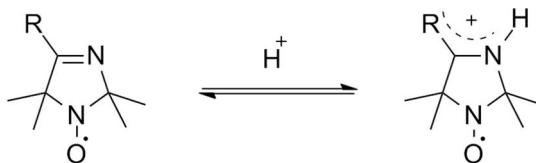
Kuva 6. Nitroksyyli-radikaalien rakenteita.

Nitroksyyli-radikaalit voivat hapettua tai pelkistyä vastaavasti oksoammoniumkationiksi tai hydroksyyliamiinianioniksi (kuva 7). Tällöin ne muodostavat diamagneettisia yhdisteitä menettäen paramagneettisuutensa. Tätä ilmiötä voidaan yhdessä EPR-spektroskopian kanssa hyödyntää elektroninsiirtoreaktioiden tutkimuksissa.¹⁸ Elektroninsiirtoreaktioiden reaktionopeuksia on pystytty tutkimaan hapettamalla nitroksyyli-radikaaleja rutenium-komplekseilla, mikä voidaan havaita EPR-signaalin heikkenemisenä. Reaktionopeudet on pystytty määrittämään sekä liuksissa että spin-leimoissa.



Kuva 7. Nitroksyyli-radikaalien hapettuminen ja pelkistyminen.

Imidatsolipohjaiset nitroksyyli-radikaalit ovat pH-sensitiivisiä ja ne ovatkin osoittautuneet hyväksi pH-indikaattoreiksi EPR-menetelmällä.¹⁹ Yhdisteiden pH-sensitiivisyys perustuu asemassa kolme olevan typen protonoitumiseen (kuva 8).

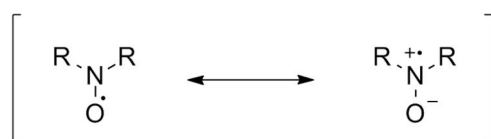


Kuva 8. Imidatsoliumpohjaisten nitroksyyli-radikaalien protonoitumismekanismi.²⁰

Protonoituminen saa vastaavasti aikaan muutoksen yhdisteen EPR-spektrissä, mikä havaitaan hyperhienon kytkeymisvakion (a) ja g -kertoimen muutoksina. Nämä muutokset on helppo havaita mittaamalla EPR-spektri pK -arvoa vastaavassa pH:ssa. Tällöin puolet yhdisteestä esiintyy protonoituneessa muodossa ja puolet perustilassa ja spektrissä voidaan havaita kaksi signaalia, jotka vastaavat yhdisteen eri muotoja. Varsinkin suuritaajuuksisilla ESR-laitteistoilla mitattaessa signaalien erottuminen on hyvä.

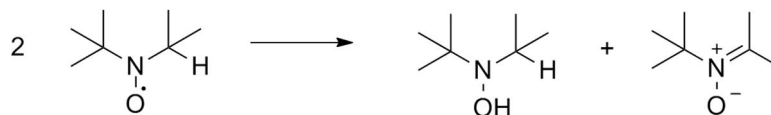
2.3.1 Stabiilius

Nitroksyyli-radikaalien tärkein ominaisuus on niiden stabiilius. Radikaalien stabiilius koostuu useista eri tekijöistä. Näiden tekijöiden joukosta voidaan kuitenkin osoittaa kaksi pääseikkaa, jotka vaikuttavat radikaalien rakenteiden stabiiliuteen: delokalisaatio ja steerisyys. Kun tarkastellaan tunnettujen stabiilien radikaalien rakenteita, kuten Gombergin trifenyylimetyyliä, huomataan, että sen rakenne on steerisesti hyvin estynyt. Lisäksi se sisältää kolme fenyylirengasta, jotka muodostavat π -systeemin, johon vapaa elektroni voi delokalisoitua. Myös nitroksyyli-radikaalien stabiilius perustuu näihin kahteen seikkaan. Pariton elektroni delokalisoituu π -systeemin sijaan typen ja hapen väliseen sidokseen (kuva 9). Elektronin delokalisaatioenergian suuruus dialkyylinitroksyyli-radikaaleissa on noin 125 kJ/mol.²¹



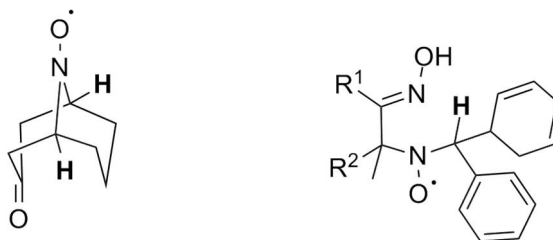
Kuva 9. Nitroksyyli-radikaalin resonanssimuodot.

Vielä merkittävämmässä asemassa on N-O•-ryhmään sitoutuneiden sivuryhmien tarjoama steerinen suoja. Rakenteet, jotka sisältävät α -protonin ovat huomattavasti reaktiivisempia kuin rakenteet, joilla α -asemassaan on liittynyt esimerkiksi kaksi hiiliketjua. Nitroksyyli-radikaali reagoi itsensä kanssa muodostaen hydroksyyliamiinin ja nitronin.²²



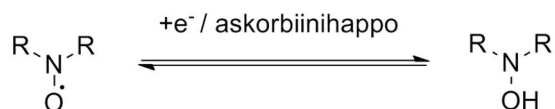
Kuva 10. α -protoni-nitroksyyli-radikaalien dispropoitoituminen.²³

Muutamaa kuvassa 11 esitettyä poikkeusta²⁴ lukuun ottamatta nitroksyyli-radikaalit, joilla on α -asemassa protoni, ovat erittäin reaktiivisia. Yhdiste on stabiili, sillä se on estynyt muodostamaan nitronia Bredt'n säännön mukaisesti.



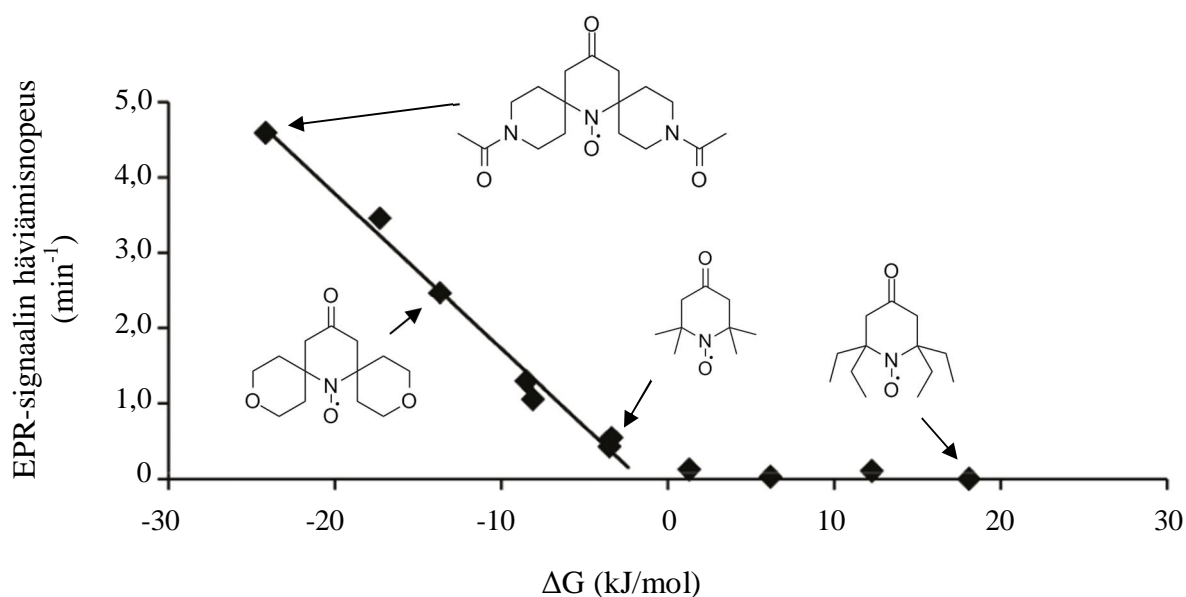
Kuva 11. Stabiilien α -protoni-nitroksyyli-radikaalien rakenteet.

Nitroksyyli-radikaalien stabiiliutta mitataan yleisesti tutkimalla niiden kemiallista tai elektrokemiallista pelkistymistä hydroksyyliamiineiksi (kuva 12). Usein menetelmiä käytetäänkin rinnakkain parantamaan tulosten tarkkuutta. Kemiallisena pelkistimenä käytetään yleensä askorbiinihappoa tai sen suolaa, askorbaattia. Joissain tapauksissa askorbaatti on ainoa toimiva pelkistin.²⁵ Eräs askorbaatin käytön hyödyistä on se, että se esiintyy pelkistävänä komponenttina usein myös biologisissa matriiseissa kuten veressä.



Kuva 12. Nitroksyyli-radikaalien pelkistys elektrokemiallisesti yhden elektronin pelkistyksellä tai kemiallisesti askorbiinihapolla.

Nitroksyyli-radikaalien pelkistymispotentiaaleista on suoritettu kattavia mittauksia elektroanalyttisillä menetelmillä.²⁶ Lisäksi niiden stabiiliutta on arvioitu mittaamalla niiden pelkistymisreaktioiden kinetiikkaa.²⁷ Yksi parhaista menetelmistä on kuitenkin seurata nitroksyyli-radikaalien pelkistymisreaktioita EPR-spektroskopian avulla. Pelkistyessään nitroksyyli-radikaalit menettävät paramagneettisuutensa, mikä havaitaan EPR-signaalin häviämisenä. Muun muassa Yamasaki *et al.*²⁸ ovat tutkineet nitroksyyli-radikaalien rakenne-reaktiivisuussuhdetta. Tutkimuksien perusteella voitiin päätellä, että suurikokoisemmat sivuryhmät suojaavat radikaalikeskusta (kuva 13). Kuvasta voidaan kuitenkin huomata, että spiro-rengas-sivuryhmät eivät suuresta koostaan huolimatta stabiloi nitroksyyli-radikaalien rakenteita yhtä tehokkaasti kuin pienikokoisemmat metyyli- ja etyyli-sivuryhmät. Tämä selittyy sivuryhmien heterosyklisestä rakenteesta. Happi- ja typpiatomit tekevät sivuryhmistä elektroneja puoleensavetäviä. Elektroneja puoleensavetävät ryhmät, kuten heterosyklit ja karbonyyli destabiloivat nitroksyylien rakennetta. Näiden lisäksi fenyylisivuryhmät destabiloivat nitroksyyli-radikaalien rakenteita, sillä tällöin elektroni voi delokalisoitua typhen ja hapen välisen sidoksen sijaan aromaattiseen renkaaseen.

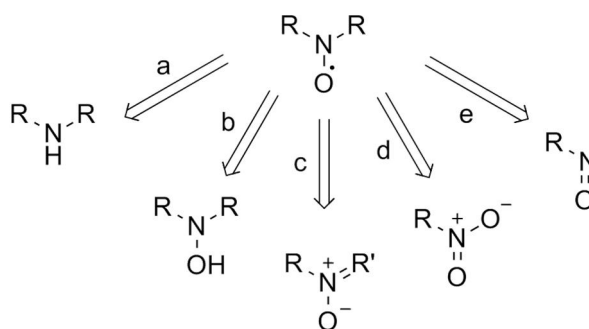


Kuva 13. Nitroksyyli-radikaalien rakenteiden vaikutus radikaalin EPR-signaalin häviämisenopeuteen.²⁸

Malliesimerkki sivuryhmien koon vaikutuksesta yhdisteen stabiiliuteen on myös kuvassa 13 esitettyjen TEMPO:n vertailu TEEPO:n kanssa.²⁹ Askorbiinihapon ja radikaalin välisen reaktion vapaan Gibbsin energian suuruus on metyyliiversiolla negatiivinen, kun taas etyyliiversiolla se on positiivinen.³⁰ Myös renkaan koko vaikuttaa yhdisteen stabiiliuteen. Viisirenkaiset nitroksyyli-radikaalit ovat osoittautuneet stabiilimmiksi kuin kuusirenkaiset yhdisteet.¹⁹ Viisirenkaisiin yhdisteisiin kuuluvat muun muassa pyrrolidiini- ja imidatsoliiniyhdisteet, jotka ovat osoittautuneet erittäin stabiileiksi.³¹ Kuitenkin etyyliiryhmällä substituoitu kuusirenkainen piperidiinioksyyli ylittää lähes samalle stabiiliustasolle viisirenkaisten kanssa.³² Metyyliiryhmien korvaaminen etyyliiryhmillä parantaa myös viisirenkaisten rakenteiden, jo valmiiksi stabiilia luonnetta.^{20, 33} Renkaan kokojen aiheuttamat erot yhdisteiden stabiiliudessa ovat vaikeasti selitettävissä. Renkaiden elektrokemiallisilla pelkistymispotentialleilla ei ole merkittäviä eroja, joten erot saattavat johtua nitroksyyliiryhmän steerisistä lähestyttävyydestä.^{27b}

2.3.2 Valmistus

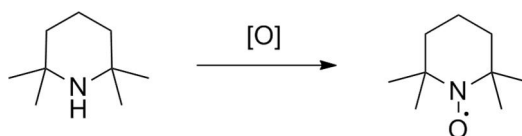
Rozantsev ja Sholle³⁴ ovat kirjoittaneet kattavan katsausartikkelin nitroksyyli-radikaalien valmistuksesta. Yleisin tapa valmistaa nitroksyyli-radikaaleja on hapettaa vastaava disubstituoitu amiini. Hapettimena voidaan käyttää muun muassa peroksiedeja ja peroksihappoja. Kuvassa 14 on havainnollistettu retrosynteettisellä analyysillä eri valmistusmenetelmiä.



Kuva 14. Nitroksyyli-radikaalien valmistus a) amiinien hapetuksella, b) hydroksyyliamiineista, c) nitroneista d) nitroyhdisteistä, e) nitrosoyhdisteistä.

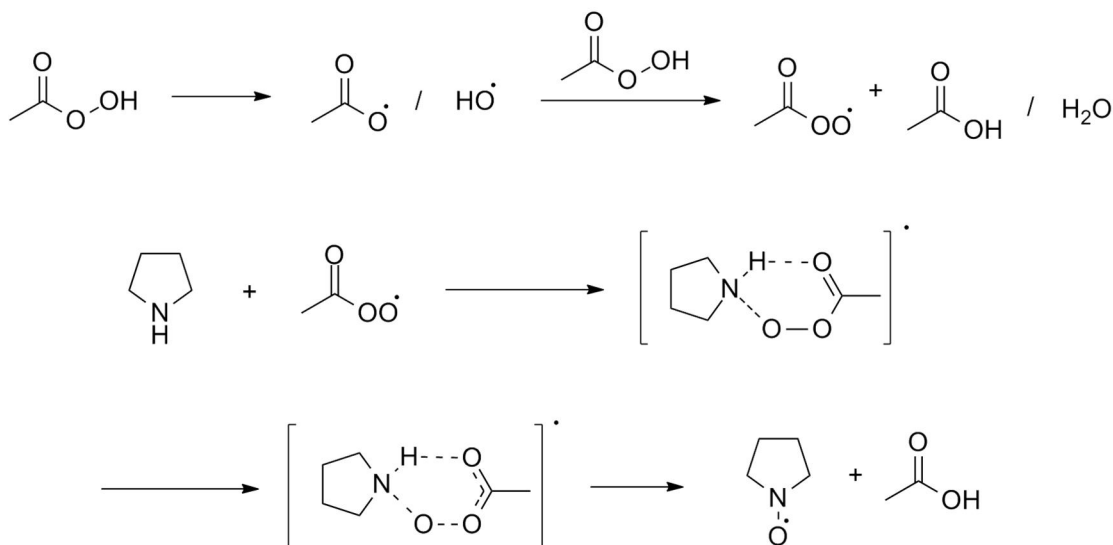
2.3.2.1 Amiinien hapetuksella

Vastaavan amiinin hapetus on ylivoimaisesti tutkituin ja käytetyin menetelmä nitroksyyli-radikaalien valmistuksessa (kuva 15). Hapettimena voidaan käyttää hydroperoksidea, vetyperoksidia useiden katalyyttien läsnä ollessa, hopea- tai lyijyoksidia, perhappoja, perwolfraamateja tai bentsooyliperoksidia. Käytetyimmät hapetusmenetelmät ovat kuitenkin vetyperoksidi volframaatin läsnä ollessa³⁴ ja perhapot, etenkin *m*-klooriperbentsoehappo (*m*-CPBA)³⁵. Vetyperoksidia käytettäessä ongelmaksi saattaa muodostua sekundääristen ja tertiääristen amiinien huono vesiliukoisuus.³⁶



Kuva 15. Esimerkki TEMPO:n valmistuksesta 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiinin hapetuksella

Hapettumisreaktion mekanismi pysyi kauan epäselvänä tutkijoille. Shi ja Li³⁷ tutkivat amiinien hapetusta perhappoilla käyttäen EPR- ja DFT- (tiheysfunktioaalinen teoria, *density function theory*) -tekniikoita. He selvittivät muun muassa reaktion mekanismin, reaktiivisen välituotteen ja transiitilojen rakenteet sekä aktivoitumisenergioiden suuruudet. Kuvassa 16 on esitetty mekanismi pyrrolidiinioksyylin muodostumiselle pyrrolidiinistä peretikkahapon vaikutuksesta.

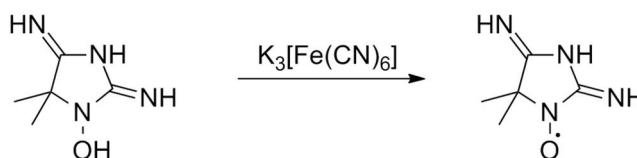


Kuva 16. Reaktiomekanismi pyrrolidiinioksyylin muodostumiselle pyrrolidiinin reagoissa peretikkahapon kanssa.³⁷

Reaktiossa peretikkahappo muodostaa reaktiivisen peroksyyliradikaaliväliuotteen, joka reagoi spontaanisti amiinin kanssa muodostaen vastaavan nitroksyyliiradikaalin. Reaktion nopeutta rajoittava vaihe on karboksyyliradikaalin muodostuminen. Reaktiossa amiinin kanssa peroksyyliradikaalin terminaalin happi siirtyy amiinin typpelle. Tätä seuraa vedynsiirtoreaktio, jossa vety siirtyy amiinilta karbonyylin hapelle. Lopputuotteena saadaan nitroksyyliiradikaali.

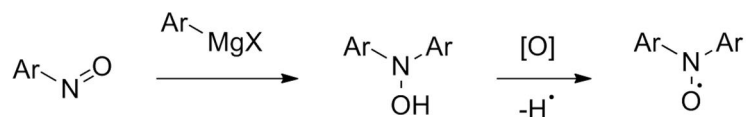
2.3.2.2 Hydroksyyliamiineista

Hydroksyyliamiinien hapetus oli yksi aikaisimmista menetelmistä nitroksyyliiradikaalien valmistuksessa. Menetelmään soveltuvat miedommat hapettimet kuten kaliumpermanganaatti, fluori, (elo)hopeaoksidi, lyijy(IV)oksidi ja nikkelperoksidi. Ensimmäinen orgaaninen nitroksyyliiradikaali, porfyreksidiini, valmistettiin hydroksyyliamiinin hapetuksella. Reaktiossa käytettiin hapettimena kaliumferrisyaniidia (kuva 17).



Kuva 17. Nitroksyyliiradikaali porfyrexidin valmistus 1-hydroksy-2,4-di-imino-5,5-dimetyyli-imidatsoliinistä.

Yleinen menetelmä aromaattisten nitroksyylien valmistukselle on synteisi, jonka ensimmäisessä vaiheessa hydroksyyliamiini valmistetaan nitrosoyhdisteestä Grignardin reaktiolla (kuva 18). Toisen vaiheen hapetuksessa yleisin hapetin on hopeaoksidi.

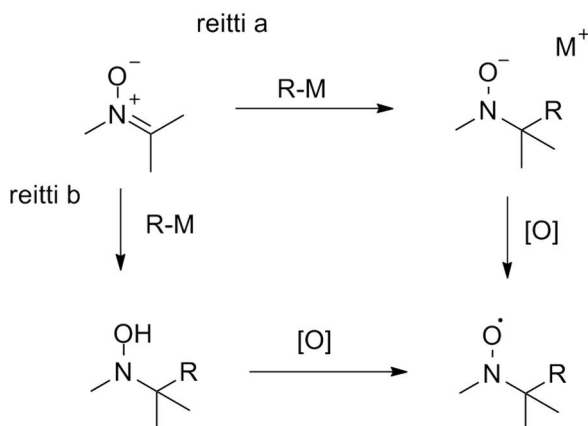


Kuva 18. Aromaattisten nitroksyyliiradikaalien valmistus.

Alifaattiset nitroksyyliiradikaalit ovat varsin lyhytikäisiä, mutta niitä voidaan valmistaa tällä menetelmällä tai vaihtoehtoisesti fotolyysillä. Menetelmää voidaan soveltaa myös syklisten nitroksyyliiradikaalien valmistuksessa.

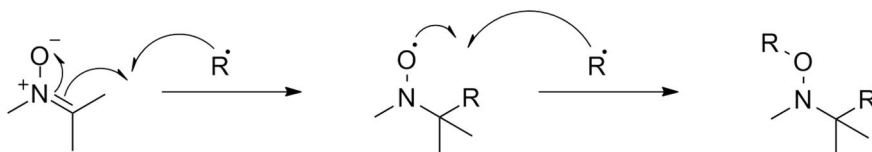
2.3.2.3 Nitroni-, nitro- ja nitrosoyhdisteistä

Nitroksyyli-radikaaleja voidaan valmistaa nitroneista.³⁸ Reaktiossa käytetään organometal-lyyhdisteitä, yleisimmin Grignardin reagenssia tai organolitiumyhdisteitä. Kuvassa 19 on esitetty reaktiolle kaksi vaihtoehtoista reittiä. Nitronin reagoidessa organometal-lyyhdisteen kanssa syntyy deprotonoitu hydroksyyliamiini, joka hapetetaan edelleen nitroksyyli-radikaaliksi (reitti a). Vaihtoehtoinen reitti kulkee hydroksyyliamiinin kautta (reitti b).



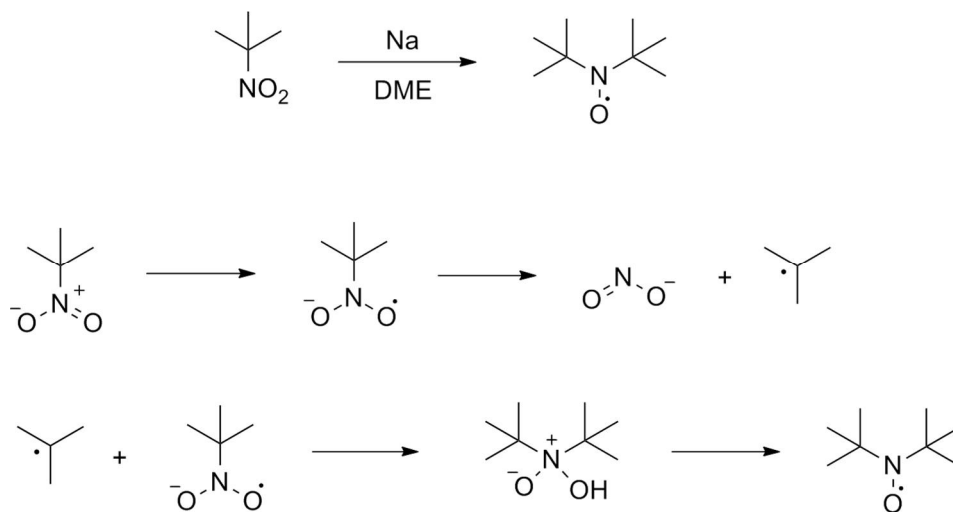
Kuva 19. Nitroksyylien valmistus nitroneista organometaalien kanssa; reitti a: deprotonoidun hydroksyyliamiinin; reitti b: hydroksyyliamiinin kautta.³⁸

Nitronit ovat hyviä radikaaliloukkuja, mikä tarjoaa hyvät lähtökohdat nitroksyylien valmistukselle.³⁹ Reaktiossa tapahtuu radikaalin additio hiilen ja typen väliseen kaksoissidokseen. Tällöin on kuitenkin vaarana, että reaktion tuotteena syntyvä nitroksyyli-radikaali reagoi radikaalin kanssa muodostaen alkoksiamiinin (kuva 20).



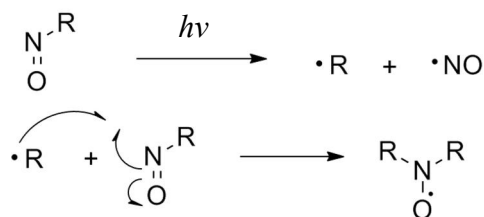
Kuva 20. Nitroksyyli-radikaalien valmistus nitronien toimiessa radikaaliloukkuna sekä nitroksyylin mahdollinen jatkoreaktio radikaalin R• kanssa.

Nitroksyyli- ja nitroksyyli- radikaaleja voidaan valmistaa myös nitroyhdisteistä pelkistämällä. Hoffmann ja Kentaro¹³ käyttivät menetelmää valmistaessaan ensimmäisinä di-*tert*-butyylinitroksyyli- radikaalin. Menetelmässä käytettiin pelkistimenä metallista natriumia. Pelkistymisreaktion mekanismi on esitetty kuvassa 21.⁴⁰ Kyseinen menetelmä ei kuitenkaan ole yleisessä käytössä. Muita sopivia pelkistimiä ovat alkyylili- ja aryyllilitium ja – natriumyhdisteet, litiumalumiinihydridi, *t*-butyyli- magnesiumkloridi tai Grignardin reagenssi.



Kuva 21. Nitroksyyli- radikaalien valmistus nitroyhdisteistä.⁴⁰

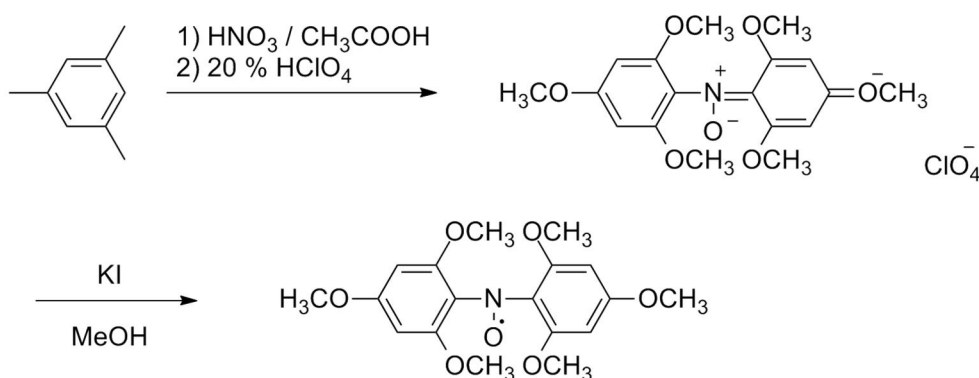
Nitroksyyli- ja nitroksyyli- radikaaleja voidaan valmistaa myös nitroso- yhdisteiden pelkistyksellä. Initiaatioreaktio- na tapahtuu fotolyysi, minkä tuloksena muodostunut radikaali reagoi nitroson kanssa (kuva 22).



Kuva 22. Nitroksyyli- radikaalin valmistus nitrosoyhdisteestä.³⁴

2.3.2.4 Muut menetelmät

Nitroksyyliiradikaaleja voidaan valmistaa myös nitroniyhdisteistä reaktiolla vapaiden radikaalien kanssa. Meyerin menetelmässä alkyylifenyylietteri reagoi typpihapon kanssa, minkä jälkeen reaktio perkloorihapon kanssa tuottaa diaryyli-immoniumoksidiperklooraatin, joka pelkistetään jodidilla nitroksyyliksi (kuva 23).



Kuva 23. Meyerin menetelmä.³⁴

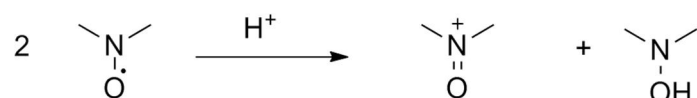
2.3.3 Reaktiot

Nitroksyyliiradikaalien stabiilin luonteen vuoksi niille ovat ominaisia reaktiot, joissa radikaalikeskus ei osallistu itse reaktioon.⁹ Rozantsevin ja Shollen⁴¹ katsausartikkelin toisessa osassa on esitelty useita nitroksyyliiradikaalien reaktioita. Lisäksi nitroksyyliiradikaalien yleisintä käyttökohdetta syntetiikassa, alkoholien hapetusta, käsitellään kattavasti useissa katsausartikkeleissa.^{23, 39, 42} Muita mahdollisia kohteita hapetusreaktioille ovat amiinit, fosfiinit ja sulfidit. Tässä kappaleessa käsitellään ainoastaan menetelmistä merkittävien, alkoholien hapetus. Muita nitroksyyliiradikaaleja voidaan käyttää myös inhibiittoreina hapettumis- ja polymerisoinireaktioissa, sillä ne voivat reagoida muiden radikaalien kanssa muodostaen neutraaleja yhdisteitä.

2.3.3.1 Alkoholien hapetus

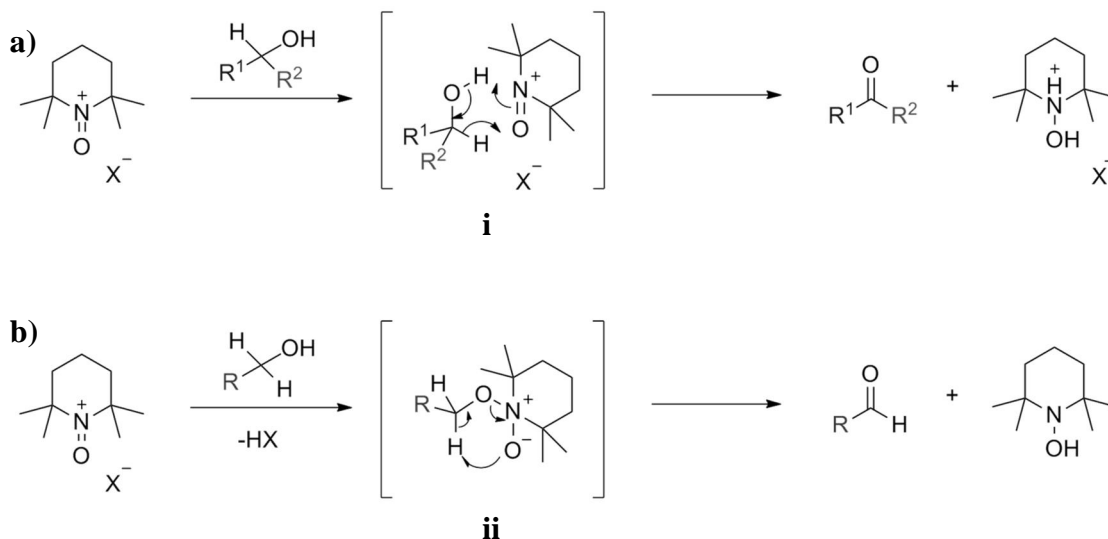
Nitroksyyliiradikaalien yleisin käyttökohde orgaanisessa synteesissä on primääristen ja sekundääristen alkoholien hapetus vastaaviksi ketoneiksi, aldehydeiksi ja karboksyylihapoiksi.^{23, 42} Menetelmä on mieto, yksinkertainen ja selektiivinen. Nitroksyyliiradikaalit ovat poikkeuksellisia hapettimia, sillä ne voivat toimia myös antioksidanteina pelkistysreaktioissa. Nitroksyyliiradikaalit voivat toimia hapetusreaktioissa joko katalyyttinä tai suoraan

hapettimina. Tällöin hapettimen aktiivinen muoto on oksoammonium-ioni. Oksoammoniumioni on nitroksyyli-radikaalin hapettunut muoto ja se voi muodostua disproportionaatio-reaktiolla hapon vaikutuksesta, kuten kuvassa 24 on esitetty. Reaktiossa käytetty happo, tarkemmin sanottuna haposta muodostuva vastaioni, määrittää muodostuvan oksoammoniumin stabiiliuden. Yksi yleisimmin käytetyistä hapoista on HBF_4 , jolloin vastaionina toimii BF_4^- . Muita yleisesti käytettyjä vastaioneja ovat kloridi (Cl^-), bromidi (Br^-) ja perkloraatti (ClO_4^-).



Kuva 24. Nitroksyyli-radikaalin disproportionaatio oksoammoniumioniksi ja hydroksyyliamiiniksi hapon vaikutuksesta.⁴³

Happamat olosuhteet suosivat sekundääristen alkoholien hapettumista. Tällöin hapettuminen on myös hidasta. Korkea pH taas suosii primäärisiä alkoholeja, ja reaktio on nopea. Nopeusero on selitettävissä kuvassa 25 esitetyillä mekanismeilla.

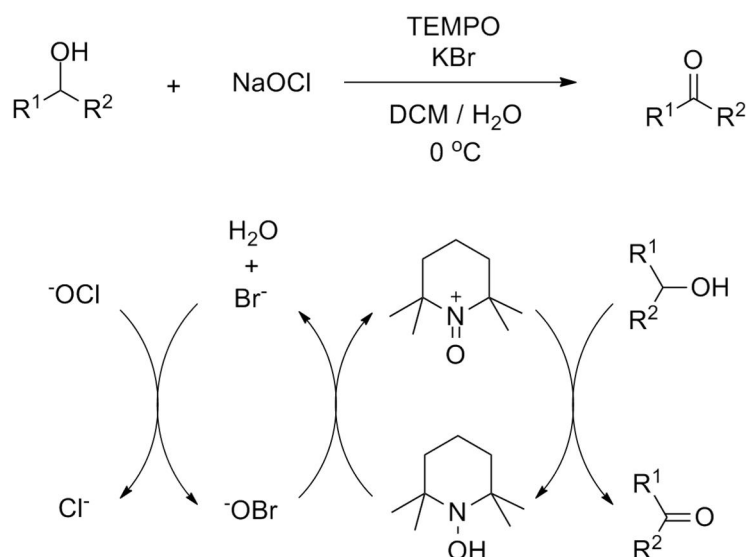


Kuva 25. Alkoholien hapetus **a)** happamissa³⁹ **b)** emäksisissä⁴² olosuhteissa TEMPO:n avulla.

Reaktiossa (a) tapahtuu hydridin siirto alkoholilta oksoammoniumille, ja sekundääriset alkoholit ovat parempia hydridin luovuttajia kuin primääriset alkoholit. Emäksisissä olosuhteissa (b) reaktio on selektiivinen primääristen alkoholien hapetukselle, myös sekundää-

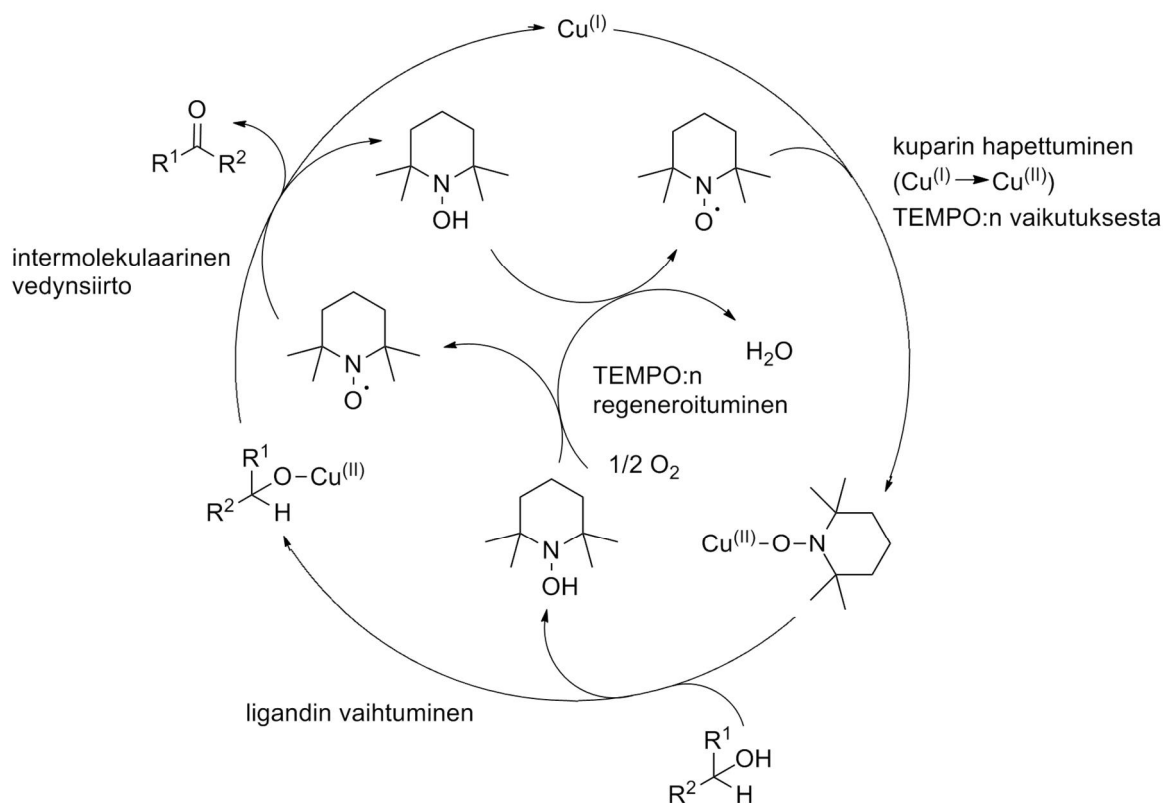
risten alkoholien läsnä ollessa.⁴³ Reaktiion selektiivisyys perustuu reaktiossa muodostuvan intermediaatin (ii) rakenteeseen. Elektrofiilistä typpiä on suojaamassa neljä metyyli-ryhmää, ja kookkaat sivuryhmät alkoholilla aiheuttaisivat steerisen esteen reaktiolle.

Yllä esitetyissä esimerkeissä TEMPO:a on käytetty stoikiometrinen määrä. Tällöin oksoammoniumioni joudutaan yleensä valmistamaan erikseen, mikä voi olla hankalaa sen epästabiiliuden vuoksi. Käytännöllisempää onkin käyttää nitroksyyli-radikaalia katalyyttinä. Tällöin reaktiossa on mukana stoikiometrinen määrä kohapetintaa, joka palauttaa nitroksyyli-katalyytin takaisin aktiiviseen muotoonsa *in situ*. Yleisesti käytetään Anellin olosuhteita, jolloin hapettimena toimii natriumhypokloriitti dikloorimetaanissa.⁴⁴ Bromidi toimii reaktiossa kokatalyyttinä (kuva 26).



Kuva 26. Katalyyttinen sykli alkoholin hapetusreaktiolle natriumhypokloriitilla TEMPO-katalyytin läsnä ollessa.

Kokatalyyttinä voidaan käyttää myös siirtymämetalleja. Esimerkiksi kuparikatalyytit ovat yleisesti tutkittuja ja käytettyjä kokatalyyttejä nitroksyyli-radikaalien katalysoimissa alkoholien hapetusreaktioissa. Kuvassa 27 on esitetty katalyyttinen sykli alkoholin hapettumiselle TEMPO:n ja kuparin katalysoimana. Toisin kuin aiemmissa menetelmissä, kyseisessä reaktiossa hapettuminen ei ole oksoammoniumionin vaan kuparin katalysoima.⁴⁵ Lisäksi menetelmässä ei tarvita erillistä kohapetintaa. Lisäksi huomattavaa reaktiossa on TEMPO:n regenoituminen hapen vaikutuksesta.

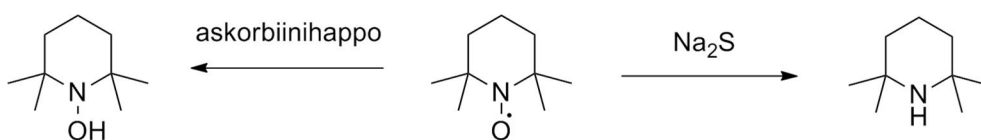


Kuva 27. Katalyyttinen sykli kuparin ja TEMPO:n katalysoimalle alkoholin hapetukselle.⁴⁵

Edellä mainittujen menetelmien lisäksi hapetuksissa tarvittavan oksoammoniumin valmistuksessa on hyödynnetty elektro-⁴⁶ ja valokemialla⁴⁷. Myös kiraalisia⁴⁸ ja immobilisoituja⁴⁹ nitroksyyli-radikaaleja on testattu katalyytteinä alkoholien hapetusreaktioissa.

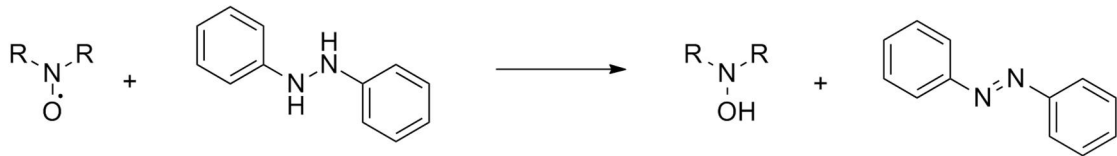
2.3.3.2 Pelkistymisreaktiot

Nitroksyyli-radikaalien pelkistymistä hyödynnetään muun muassa tutkittaessa niiden stabiiliutta. Yleisin pelkistin on askorbiinihappo, jolloin nitroksyyli-radikaalit pelkistyvät hydroksyyliamiineiksi.⁵⁰ Käytettäessä voimakkaampaa pelkistintä kuten natriumsulfidia saadaan pelkistymistuotteeksi sekundäärinen amiini.⁵¹



Kuva 28. Nitroksyyli-radikaalien pelkistyminen hydroksyyliamiineiksi ja sekundäärisiksi amiineiksi.

Nitroksyyli-radikaalit pelkistyvät myös esimerkiksi hydratsobentseenillä (kuva 29).⁵² Menetelmä on hyödyllinen, kun halutaan tutkia nitroksyyli-radikaalien rakenteita NMR-spektroskopiolla (ydinmagneettinen resonanssispektroskopia). Reaktio voidaan suorittaa yksinkertaisesti NMR-näyteputkessa ja pelkistymisreaktio on erittäin nopea.



Kuva 29. Nitroksyyli-radikaalin pelkistys hydratsobentseenillä.

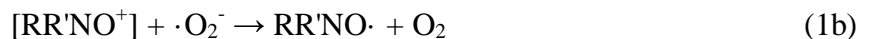
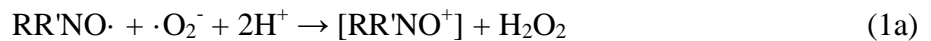
2.4 Radikaalien biologiset vaikutukset

Nitroksyyli-radikaalien biologisista vaikutuksista on tehty useita tutkimuksia. Kiinnostus tutkimusta kohtaan sai alkunsa 1960-luvulla, kun nitroksyyli-radikaalien havaittiin herkistävän bakteereja tuhoavalle säteilylle.⁵³ Tätä seurasivat niiden sovellukset spin-leimoina⁵⁴ ja verenpainetta alentavina aineina⁵⁵.

Vapaita radikaaleja esiintyy kehossa luonnollisesti ja ne ovat välttämättömiä muun muassa tulehduksien ja taudinaiheuttajien torjunnassa.⁵⁶ Radikaaleja syntyy muun muassa aineenvaihdunnan sivutuotteina, kuten soluhengityksessä ja entsyymien toiminnassa. Lisäksi ne ovat osallisina solujen välisissä viestintämekanismiessa, jotka säätelevät esimerkiksi solujen kasvua. Vääränlainen ravinto, elämäntavat ja ilmansaasteet voivat laukaista radikaalien tuotannon. Liiallista vapaiden radikaalien määrää pidetään terveydelle haitallisena, sillä se voi aiheuttaa tilan nimeltä oksidatiivinen stressi. Oksidatiivinen stressi aiheutuu kehon hapettumis-pelkistymis-tasapainosuhteen vääristymisestä. Kyseisessä tilassa suhde on kallistunut hapettuneelle puolelle johtuen joko antioksidanttien puutteesta tai hapettavien aineiden liikaesiintymästä. Tällaisia hapettavia aineita ovat pääasiassa reaktiiviset happi- (*reactive oxygen species*, ROS) ja typpiyhdisteet (*reactive nitrogen species*, RNS), kuten superoksidi ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroksyyli ($\bullet\text{OH}$), nitroksidi ($\bullet\text{NO}$) sekä alkoksyyli ($\bullet\text{OR}$) ja peroksyylit ($\bullet\text{OOR}$). Niitä muodostuu lähinnä ihmisen hapenottoon liittyvissä prosesseissa. Radikaalit voivat aiheuttaa rasvahappojen härskiintymistä, proteiinivaurioita ja DNA-mutaatiota. Edellä mainitut seikat taas voivat aiheuttaa solujen toimintahäiriöiden kautta muun muassa sydänsairauksia, neurologisia ongelmia ja syöpää.

Keholla on oma entsyymeistä koostuva antioksidatiivinen puolustusmekanismi oksidatiivista stressiä vastaan. Lisäksi ravinnon kautta saatavat antioksidantit inaktivoivat radikaaleja. Varsin uutena löydöksenä on todettu, että myös reduktiivinen stressi on mahdollinen.⁵⁷ Reduktiivinen stressi on vastine oksidatiiviselle stressille. Reduktiivisessa stressissä pelkistävien aineiden lisääntynyt osuus aiheuttaa hapetus-pelkistystasapainon siirtymän pelkistyneelle puolelle. Ilmiöillä on keskenään hyvin samankaltaiset vaikutukset.

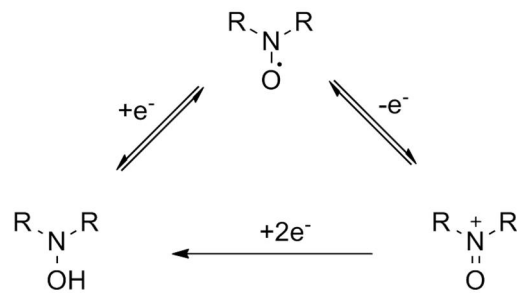
Nitroksyyli-radikaalien on osoitettu vähentävän oksidatiivisen stressin vaurioita. Tämän vuoksi nitroksyyli-radikaaleja pidetään niin kutsuttuina superoksididismutaasin (SOD) jäljittelijöinä.⁵⁶ Entsyymi SOD on antioksidantti, joka katalysoi superoksidin hajoamista vetyperoksidiksi ja hapeksi. Entsyymi on suurikokoinen molekyyli, eikä näin ollen pysty läpäisemään solumembraaneja, mikä estää sen akkumuloitumisen solujen sisään. Nitroksyyli-radikaalit sitä vastoin voivat toimia antioksidanteina myös solunsisäisesti. Nitroksyyli-radikaalit jäljittelevät entsyymin toimintaa seuraavasti:



Nitroksyyli-radikaalien kyky toimia antioksidanteina perustuu hydroksyyliamiinien kykyyn luovuttaa protoni. Kuten ylläolevista kaavoista huomataan, nitroksyyli-radikaali toimii prosessissa katalyyttinä, eli se ei kulu reaktiossa ja palaa lopuksi takaisin aktiiviseen muotoonsa. Nitroksyyli-radikaalit ehkäisevät hapettavia vaurioita myös muilla tavoilla. Ne reagoivat vapaiden radikaalien kanssa muodostaen neutraaleja, reagoimattomia yhdisteitä.



Lisäksi nitroksyyli-radikaalit ovat hapettumis-pelkistymis-aktiivisia.⁵⁸ Ihmiskehossa ne voivat esiintyä kaikissa kuvassa 30 esitetyissä muodoissa.



Kuva 30. Nitroksyyli-radikaali sekä sen hapettunut ja pelkistynyt muoto.

Nitroksyyli-radikaaleja voidaan käyttää malliaineina tutkittaessa oksidatiivista stressiä. Näissä tutkimuksissa nitroksyyli-radikaalien voidaan olettaa vastaavan reaktiivisia radikaaleja, vaikka ovatkin stabiileja. Käytännössä tutkimuksissa mitataan radikaalien pelkistymisestä tai hapettumisesta johtuvaa signaalin häviämistä yleisimmin *in vivo* EPR:lla. Oksidatiivista stressiä voidaan tutkia myös EPR-kuvantamisella.

Nitroksyyli-radikaalit voivat toimia ihmiskehossa myös säteilysuoja-aineina (*radioprotector*).⁵⁹ Ne ovat aineita, jotka suojaavat soluja haitalliselta, ionisoivalta säteilyltä. Tällaiset aineet voivat olla tarpeellisia esimerkiksi ydinonnettomuuksien yhteydessä tai sädehoitopotilailla niin kutsuttuina kliinisinä säteilysuoja-aineina. Merkittävin tutkimus aiheesta on TEMPOL:n kaljuuntumista vähentävä vaikutus potilailla, jotka ovat saaneet sädehoitoa aivoihin.⁶⁰ Ionisoivan säteilyn haitallisuus perustuu pääosin DNA-vaurioihin. Suuri osa näistä DNA-vaurioista aiheutuu vapaiden radikaalien vaikutuksesta. Nitroksyyli-radikaalien toiminta säteilysuoja-aineina perustuu muun muassa niiden reagoitokykyyn vapaiden radikaalien kanssa, mikä näin ollen välillisesti vähentää DNA-vaurioita.

3. Elektronin paramagneettinen resonanssispektroskopia (EPR)

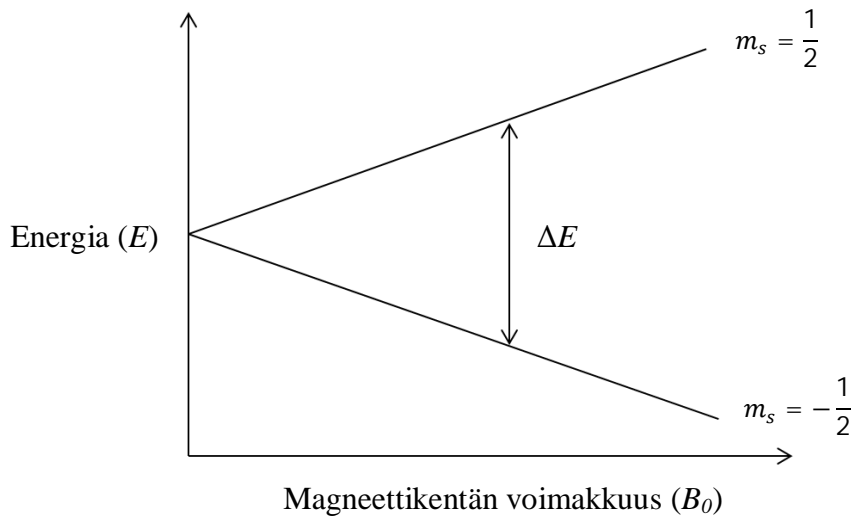
Radikaalien havaitseminen ja analysointi vaatii erityismenetelmiä niiden ainutlaatuisen rakenteen vuoksi. Eräs orgaanisen kemian käytetyimmistä analyysimenetelmistä, NMR-spektroskopia, ei sellaisenaan sovellu radikaalien rakenteiden tutkimukseen johtuen niiden paramagneettisuudesta. Radikaalien rakennetta voidaan kuitenkin muokata kemiallisesti. Yleisin keino on pelkistää nitroksyyli-radikaali vastaavaksi hydroksyyliamiiniksi. Menetelmä on helppo ja reaktio voidaan suorittaa nopeasti suoraan NMR-näyteputkessa.⁵² Tämän lisäksi on olemassa kehittyneitä NMR-tekniikoita, kuten CIDNP (kemiallisesti induoitu dynaaminen ydinpolarisaatio, *Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization*), joilla voidaan mitata paramagneettisia molekyyliä. Dynaaminen ydinpolarisaatiomenetelmä perustuu polarisaation siirtämiseen parittomalta elektronilta ytimelle.⁶¹ Stabiileja radikaaleja voidaan analysoida yksinkertaisesti myös massa- (MS) tai infrapunaspektrometrialla (IR). MS-ionisaatiotekniikoista paras vaihtoehto radikaaleille on sähkösumu-ionisaatio (ESI), sillä se on erittäin hellävarainen menetelmä.⁶²

Radikaalien tutkimiseen on kehitetty ainutlaatuinen analyysimenetelmä, elektronin paramagneettinen resonanssi (EPR) –spektroskopia. EPR-spektroskopiasta käytetään yleisesti myös nimitystä elektronin spin resonanssi (ESR) –spektroskopia. Se on ylivoimaisesti käytetyin menetelmä paramagneettisten aineiden tutkimuksessa. EPR-spektroskopiaa, sen teoriaa ja sovelluksia, on käsitelty useissa teoksissa.⁶³ Menetelmä kehitettiin Neuvostoliitossa Zavoiskyn tutkimusryhmässä vuonna 1945 siirtymämetallikompleksien analyysimenetelmäksi. Menetelmän tutkimusta vauhditti mikroaaltotekniikan kehittyminen toisen maailmansodan aikaan. Sittemmin menetelmän herkkyyttä ja resoluutiota on parannettu lukuisin uusin sovelluksin.

EPR-menetelmä soveltuu ainoastaan paramagneettisten aineiden tutkimiseen sekä neste-mäisessä että kiinteässä muodossa oleville näytteille.⁵² EPR-spektroskopiaa hyödynnetään muihin tekniikoihin yhdistettynä niin fysiikan, kemian, biokemian kuin lääketieteenkin aloilla. Menetelmä soveltuu paramagneettisten yhdisteiden analysoinnin lisäksi radikaali-reaktioiden seurantaan ja niiden reaktiomekanismien selvittämiseen. Radikaalit esiintyvät reaktiivisina välituotteina esimerkiksi monissa elektroninsiirtoreaktioissa, jotka ovat osallisia muun muassa useissa biologisissa prosesseissa kuten fotosynteesissä.

3.1 Teoria

EPR-spektroskopia on verrattavissa NMR-spektroskopiaan, sillä teoria ilmiöiden takana on periaatteiltaan sama. Oleellisin ero menetelmien välillä on se, että EPR-spektroskopiassa seurataan elektronien ja NMR-spektroskopiassa ytimien käyttäytymistä. Elektronit ja protonit ovat kvanttimekaanisilta ominaisuuksiltaan erittäin samankaltaisia ja näin ollen ne käyttäytyvät lähes identtisesti. Kummallakin on pysyvä magneettinen dipolimomentti. Elektronin magneettinen dipolimomentti on kuitenkin 10^3 kertaa suurempi kuin protonin. Elektroneilla magneettinen dipolimomentti aiheutuu elektronin spin- ja rataimpulssimomenteista, jotka ovat seurausta niiden liikkeestä ytimen ympärillä. Elektronin tai protonin joutuessa ulkoiseen magneettikenttään, sen spinit toimivat sauvamagneettien tavoin ja asettuvat joko magneettikentän suuntaisesti vai vastaisesti. Tämä aiheuttaa elektronien energiatilojen jakaantumisen kahteen eri energiatilaan (kuva 31). Ilmiötä kutsutaan Zeemanin-ilmioiksi.



Kuva 31. Zeemanin-ilmion mukainen elektronin energiatasojen jakautuminen magneettikentässä.

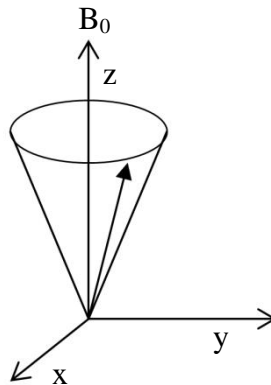
Korkea energiatila vastaa elektroneja, joiden spinit ovat suuntautuneet magneettikentän vastaisesti ja matalampi taas elektroneja, joiden spinit ovat asettuneet magneettikentän suuntaisesti. Tiloja kuvataan EPR:ssa suureilla $m_s = \pm 1/2$. Elektronien jakautuminen energiatilojen välillä noudattaa Boltzmannin lakia:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-h\nu/(kT)} \quad (3)$$

Kaavassa esiintyvät h , ν , k ja T ovat vastaavasti Planckin vakio, säteilyn taajuus, Boltzmannin vakio ja absoluuttinen lämpötila. Kun näytteeseen kohdistetaan tietyn taajuuden, ν , omaavaa monokromaattista elektromagneettista säteilyä, elektronit siirtyvät alemmalta energiatasolta ylemmälle. Siirtymiseen tarvittava energia vastaa absorboidun säteilyn taajuutta:

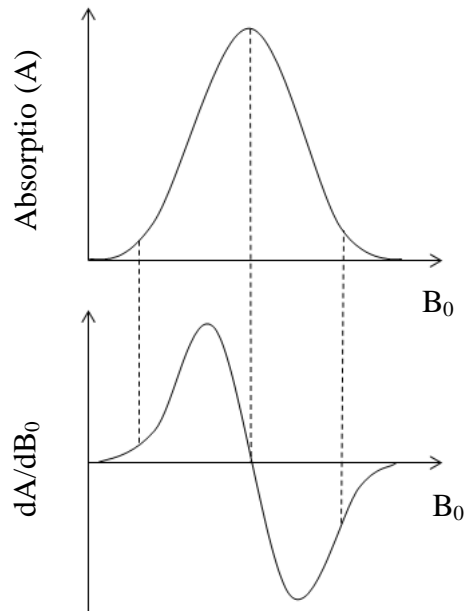
$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0 \quad (4)$$

Kaavassa g on g -kerroin, μ_B Bohrin magnetoni ja B_0 magneettikentän voimakkuus. Näihin käsitteisiin palataan tarkemmin hieman myöhemmin. Käytännössä säteilyn taajuus pidetään yleensä vakiona, ja muuttamalla magneettikentän voimakkuutta energiatilojen ero saadaan vastaamaan säteilyn taajuutta. Tämä taajuus taas vastaa elektronien spinien prekessiotaajuutta. Prekessiota kutsutaan Larmorin prekessioksi ja ilmiö on havainnollistettu kuvassa 32.



Kuva 32. Larmorin prekessio.

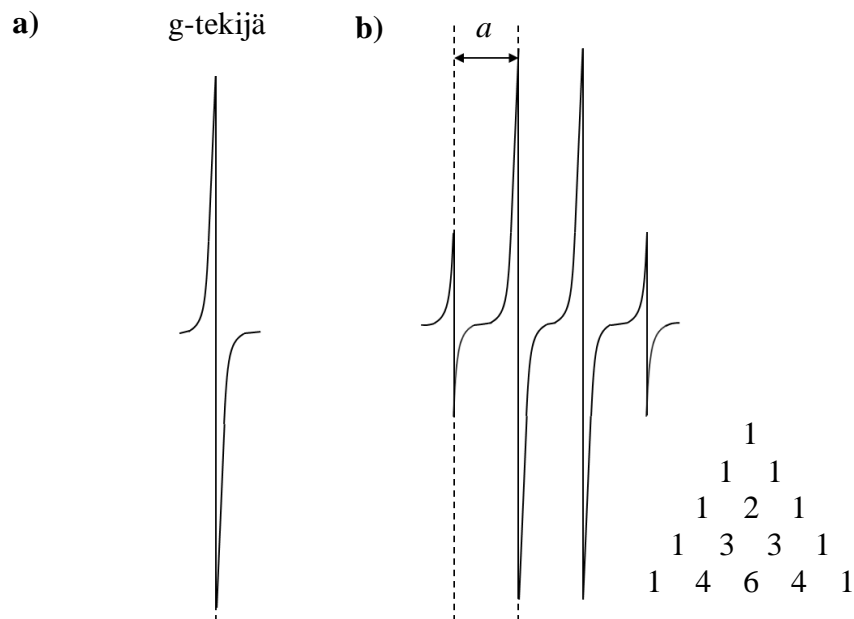
Toisin sanoen ilmiössä spinin pyörimisakseli kiertyy ulkoisen magneettikentän suuntaisesti. Kaiken kaikkiaan edellä mainituissa olosuhteissa elektronit alkavat liikkua energiatilojen välillä. Detektointi tapahtuu seuraamalla absorptiokäyrän kulmakerrointa. Itse spektri muodostuu absorptiokäyrän ensimmäisestä derivaatasta (kuva 33).



Kuva 33. EPR absorptiokäyrä ja sen ensimmäinen derivaatta.

Kuten kuvasta nähdään, jokaista absorptiovyötä vastaa kaksi signaalia, positiivinen ja negatiivinen. Nollakohta niiden välissä vastaa taas absorptiokäyrän maksimikohtaa. Elektronin magneettisen momentin suuruuden vuoksi EPR-spektroskopiassa käytetään mikroaaltoja vastaavaa säteilytaajuutta. Näistä säteilytaajuuksista EPR-spektroskopiassa yleisimmin käytetty on X-kaista.

Tärkeimpiä käsitteitä EPR-spektroskopiassa ovat g -kerroin (g -factor) ja ylihieno kytketyminen (*hyperfine coupling*). Ne vastaavat NMR-spektroskopian kemiallista siirtymää ja kytkentävakiota J . Kuvassa 34 on esitetty kaksi yksinkertaista EPR-spektriä, joilla on pyritty havainnollistamaan näitä käsitteitä.



Kuva 34. Esimerkkejä yksinkertaisista EPR-spektreistä **a)** Signaalin g-tekijä. **b)** Metyyli-
radikaalin ($\bullet\text{CH}_3$) EPR-spektri, ja hyperhieno kytkeytymisvakio a .

Nämä tekijät ovat riippuvaisia elektronien kemiallisesta ja fysikaalisesta ympäristöstä. Ylihieno kytkeytyminen aiheutuu ytimen spinien vuorovaikutuksesta elektronien spinien kanssa. Nämä vuorovaikutukset saavat aikaan lisäenergiatasoja, joiden välillä spinit voivat myös liikkua. Tämän johdosta signaalit pilkkoutuvat multipleteiksi, joiden intensiteettija-kaumat noudattavat Pascalin kolmiota. Signaalin pilkkoutuminen määräytyy ytimen spinluvun (I) perusteella kaavan $2I+1$ mukaisesti. Kytkeytymisvakio a ilmoitetaan magneettikentän voimakkuuden yksikkönä, joko gausseina (G) tai millitesloina (mT).

Vapaan elektronin g-tekijä on 2,0023. Myös orgaanisilla ja epäorgaanisilla radikaaleilla g-tekijä on aina noin kaksi, siirtymämetallikomplekseilla taas arvo voi vaihdella nollan ja kuuden välillä. Pelkästään g-tekijän ja hyperhienon kytkeytymisvakion perusteella voidaan jo päätellä paljon radikaalin rakenteesta.

3.2 Sovellettuja EPR-tekniikoita

EPR-spektroskopiolla on useita sovelluksia molekyyli- ja polymeerikemian, ympäristötieteiden ja katalyyssin tutkimuksessa. Sovelletuilla EPR-tekniikoilla on pystytty parantamaan esimerkiksi spektrien resoluutiota.^{63e} Tällaisia tekniikoita ovat muun muassa multi-resonanssi- ja pulssitetut EPR-tekniikat. Multiresonanssitekniikoista yleisin on ENDOR (elektroni-ydin kaksoisresonanssi, *electron-nuclear double resonance*) -menetelmä. Pulssi-

tetuista tekniikoista taas yleisessä käytössä on PELDOR (pulssitettu elektroni-elektroni kaksoisresonanssi, *pulsed electron-electron double resonance*). Menetelmällä mitataan etäisyyksiä perustuen dipolaarisiin elektroni-elektroni kytkeytymisiin.⁶⁴ Lisäksi sillä voidaan selvittää yhdisteiden konformaatiojakaumia, monomeerien lukumääriä ja spinien suuntautumista toisiinsa nähden.

Lyhytikäisten radikaalien tutkimuksessa voidaan käyttää menetelmää nimeltään spin trapping.⁶⁵ Siinä lyhytikäinen radikaali reagoi toisen yhdisteen, kuten nitronin, kanssa muodostaen pidempi-ikäisen radikaalin, esimerkkitapauksessa nitroksyyli-radikaalin. Näin muodostunutta radikaalia kutsutaan sekundääriseksi radikaaliksi.

3.3 Spin-leimaus

Spin-leimaus on menetelmä, jolla voidaan tutkia bioaktiivisten membraanien tai suurten makromolekyylien rakenteita ja dynamiikkaa EPR-spektroskopiolla.^{63d} Yleensä tutkittavat molekyylit eivät itsessään sisällä paramagneettista keskusta. Spin-leimat ovat molekyylejä, jotka antavat vasteen paramagneettisessa mittauksessa. Leimoina käytetään yleisimmin nitroksyyli-radikaaleja, sillä ne ovat stabiileja ja ne voidaan liittää kovalenttisesti tutkittaviin makromolekyyliin niin, että radikaalikeskus säilyy muuttumattomana. Spin-leimat toimivat ikään kuin biofysikaaliset antennit. Spin-leimoja voidaan liittää spesifiseen kohtaan tutkittavaa molekyyliä, mikä mahdollistaa varsinkin makromolekyylejä tutkittaessa niiden eri osien toiminnallisuuden määrittämisen. Näin ollen EPR-spektroskopian avulla voidaan tutkia muun muassa biomolekyylien rakenteita ja dynamiikkaa tai mitata niiden välisiä etäisyyksiä. Spin-leima voi olla myös osa ligandia, joka liitetään tutkittavaan makromolekyyliin.

Kohdennettu spin-leimaus (*site-directed spin labeling, SDSL*) on varsin käyttökelpoinen menetelmä proteiinien tutkimuksissa.⁶⁶ Menetelmää sovelletaan, kun tutkittava proteiini ei sisällä reaktiivista kohtaa halutussa asemassa. Tällöin proteiinin rakennetta voidaan muokata lisäämällä proteiiniin aminohapposekvenssi, jolla on jokin reaktiivinen ryhmä. Yleensä sekvenssinä käytetään kysteiniä, sillä se sisältää tioliryhmän, joka voidaan helposti liittää useisiin eri spin-leimoihin. Lisätty sekvenssi ei kuitenkaan saa muuttaa proteiinin rakennetta tai toiminnallisuutta liikaa.

3.4 Elektronin paramagneettinen resonanssikuvantaminen (EPRI)

EPR-menetelmää voidaan käyttää myös kuvantamismenetelmänä. Tällöin menetelmästä käytetään nimitystä EPRI (EPR-kuvantaminen, *EPR-imaging*) tai *in vivo* EPR. Vaikka kuvantamismenetelmä onkin tunnettu jo 80-luvulta⁶⁷ asti, se ei ole yleisessä kliinisessä käytössä. EPRI-menetelmällä voidaan suorittaa useita erilaisia mittauksia ja määrittäyksiä.⁶⁸ Hyviä esimerkkejä ovat farmakokineettiset mittaukset, kuten radikaalien metabolian ja levinneisyyden tutkiminen kudoksissa. Lisäksi menetelmällä voidaan seurata spinleimattujen lääkkeiden kulkeutumista kehossa.⁶⁹

EPRI on varteenotettava vaihtoehto kehon hapettumis-pelkistymistilan tutkimuksissa.⁵⁸ Tällöin nitroksyyli-radikaaleja voidaan käyttää kontrastiaineina. Menetelmä on esitelty kappaleessa 5 tarkemmin, mutta lyhyesti sanottuna se perustuu nitroksyyli-radikaalin ja sen hapettuneen muodon, oksoammonium-ionin väliseen tasapainoon. Diamagneettinen oksoammonium ei anna vastetta EPR-spektroskopiassa. Näin ollen ympäristössä, joka sisältää paljon hapettavia tekijöitä, oksoammoniumin osuus kasvaa nitroksyyli-radikaalin osuuden pienentyessä. Toisin sanoen EPR-detektoitavan aineen osuus laskee eli EPR-signaalin intensiteetti pienenee. Muun muassa kasvaimen ympäristön hapetus-pelkistystilaa on tutkittu vertaamalla sitä normaalin kudoksen tilaan käyttäen nitroksyyli-radikaaleja kontrastiaineina. EPRI-menetelmän heikkous on se, ettei se tuota korkearesoluutioisia anatomisia kuvia.

4. Ydinmagneettinen resonanssi (NMR)

Yksi nykylääketieteen tärkeimmistä alueista on kudosten noninvasiivinen kuvantaminen. Tässä luvussa esitetään lyhyt katsaus ydinmagneettiseen resonanssiin ja sen tärkeimpään lääketieteelliseen sovellukseen, magneettikuvaukseen. Lisäksi keskitytään magneettikuvauksessa käytettyihin kontrastiaineisiin, erityisesti uusiin nitroksyyliiradikaalipohjaisiin kontrastiaineisiin ja niiden etuihin yleisesti käytössä oleviin metallikomplekseihin verrattuna.

NMR-spektroskopia kehitettiin 30- ja 40-lukujen vaihteessa. Vaikka menetelmä on jo yli 70 vuotta vanha, kehitetään parempia ja nopeampia menetelmiä edelleen. Lisäksi sen käyttökohteiden kirjo laajenee jatkuvasti. Ilmiötä voidaan soveltaa molekyylien rakennetutkimuksen lisäksi lääketieteellisessä kuvantamisessa. Menetelmää alettiin kehittää kuvantamiseen 70-luvun alussa⁷⁰ ja sitä alettiin soveltaa ihmiskehon kuvantamisessa vuosikymmenen loppupuolella⁷¹.

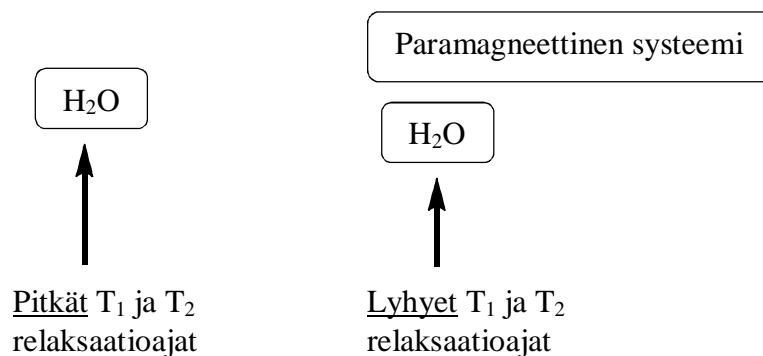
NMR:ssa spinit, jotka altistetaan ulkoiselle magneettikentälle toimivat sauvamagneettien tavoin kohdistuen itsensä joko magneettikentän suuntaisesti tai vastaisesti. Tästä johtuen ytimille, joiden spin on $\frac{1}{2}$, kuten ^1H , ^{13}C , ^{19}F ja ^{31}P , syntyy kaksi energiatilaa, joiden välillä tapahtuu siirtymiä alemmalta ylemmälle energiatilalle. Lisäksi relaksaatioksi kutsutussa ilmiössä spinit luovuttavat energiansa ympäröivään hilaan ja palaavat takaisin alemmalle energiatilalle. Ilmiön nopeutta kuvataan pitkittäisillä (T_1) ja poikittaisilla (T_2) relaksaatioajoilla.

Tässä kappaleessa esitellään tärkein NMR:n tärkein lääketieteellinen sovellus, magneettikuvaus, joka on yksi yleisimmistä kuvantamismenetelmistä nykylääketieteessä. Toinen tärkeä NMR:n lääketieteellinen sovellus on MRS (magneettinen resonanssispektroskopia), jossa tutkitaan kudosten metaboliaa mittaamalla kudoksesta NMR-spektrejä. Lisäksi esitellään kuvanlaadun parantamisessa tärkeässä osassa olevien paramagneettisten kontrastiaineiden toimintaa sekä hieman relaksaatioteoriaa niiden takana. Esimerkkeinä käytetään gadolini-um(III)komplekseja, jotka ovat yleisimpiä kliinisessä käytössä olevia kontrastiaineita.

4.1 Magneettikuvantaminen (MRI)

Magneettikuvaus (MRI, *magnetic resonance imaging*) on noninvasiivinen ja erittäin tehokas kuvantamismenetelmä, joka on ollut käytössä 1980-luvulta lähtien. Menetelmä perustuu ydinmagneettiseen resonanssiin, eli magneettisen momentin vuorovaikutuksiin ulkoisen magneettikentän kanssa. Alan pioneereja ovat Raymond Damadian⁷², Richard Lauterbur⁷⁰ ja Peter Mansfield⁷³, joista kaksi viimeksi mainittua saivat MRI-tutkimuksistaan Nobelin-palkinnon.

Magneettikuvauksella on hyvä avaruudellinen ja ajallinen resoluutio. Sillä voidaan niin diagnosoida sairauksia kuin arvioida hoitokeinojen vaikutusta ja tehokkuutta. MRI eroaa MRS:sta siten, että MRI kuvaa tarkasti kehon anatomisia rakenteita perustuen protonien avaruudellisiin sijainteihin, kun taas MRS:n toiminta perustuu mitattavien kohteiden kemiallisiin koostumuksiin.² MRI mittaa veden protonien intensiteettiä niiden avaruudellisen sijainnin funktiona. Signaalin intensiteetti riippuu kuvattavan kudoksen vesipitoisuudesta ja vesimolekyylin protonien relaksaatioajoista. Eri kudosten välistä kontrastia voidaan parantaa vaikuttamalla relaksaatioaikoihin kontrastiaineiden avulla. Kontrastiaineina käytetään paramagneettisia molekyylejä, jotka lyhentävät lähistöllä olevien ytimien relaksaatioaikoja. Toisin kuin esimerkiksi röntgenkuvauksessa, jossa jodikontrastiaineet antavat suoran visuaalisen vasteen absorboimalla ja sirottamalla röntgensäteitä, magneettikuvauksessa kontrastiaineet antavat vasteen epäsuorasti vaikuttamalla relaksaatioaikoihin.⁷⁴ Parittoman elektronin gyromagneettinen vakio on yli 600 kertaa suurempi kuin protonin. Kuvassa 35 on esitetty havainnollistava kuva kontrastiaineiden toiminnasta. Ilmiö perustuu paramagneettiseen relaksaatiomekanismiin.



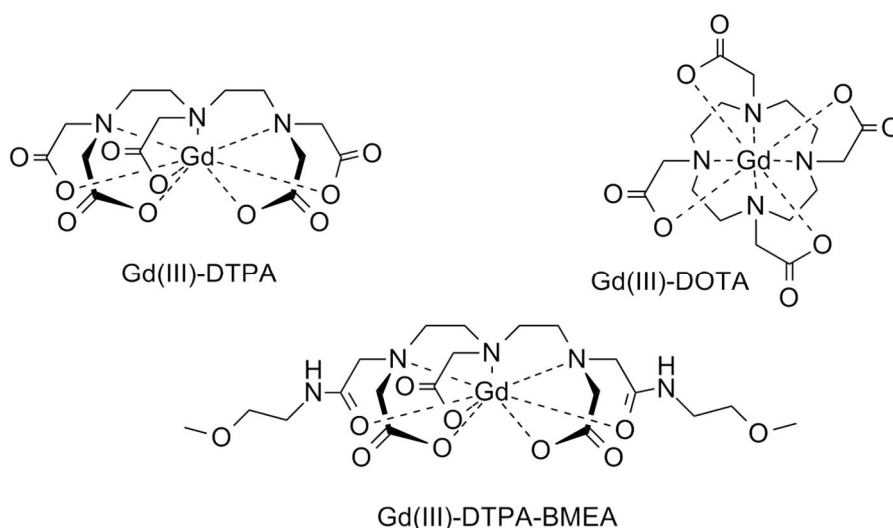
Kuva 35. Paramagneettisen relaksaatiomekanismin vuoksi paramagneettisen systeemin lähistöllä sijaitsevien vesimolekyylin T₁ ja T₂ relaksaatioajat ovat lyhyet.

Pehmytkudosten kuvantamisen lisäksi MRI on erittäin hyödyllinen verenkiertoelimistön ja keskushermoston virtausnopeuksien, liikkeiden ja fysikokemiallisten ominaisuuksien tutkimuksessa. Magneettikuvauksella voidaan myös korostaa joko T_1 tai T_2 -muutoksia, jolloin menetelmää kutsutaan T_1 - tai T_2 -painotetuksi kuvantamiseksi. T_1 -painotettu magneettikuvantaminen on yleisempää kuin T_2 -painotettu, sillä pitkittäisen relaksaation muutos on voimakkaampaa. Yleensä T_2 -painotettua kuvantamista käytetään ainoastaan rautaoksidikontrastiaineiden yhteydessä, sillä rautapartikkelit aiheuttavat suuremman muutoksen poikittaiseen relaksaatioaikaan.

4.1.1 Kontrastiaineet magneettikuvauksessa

Kuten aiemmin mainittiin, magneettikuvauksessa käytettävät kontrasti- eli varjoaineet ovat paramagneettisia aineita. Vapaiden radikaalien lisäksi siirtymämetallit ovat paramagneettisia, sillä niillä on myös pariton määrä elektroneja. Optimaalinen kontrastiaine on yhdiste, jolla on korkea magneettinen momentti ja pitkä elektronin spinrelaksaatioaika T_{1e} . Lisäksi kontrastiaineiden tulee olla myrkyttömiä, vesiliukoisia, hyvin relaksoivia ja stabiileja ihmiskehossa. Lisäksi suotavia ominaisuuksia olisi solujen läpäisevyys, mikä asettaa rajoituksia yhdisteiden koolle.

Nykyisin merkittävä osa magneettikuvauksista suoritetaan hyödyntäen kontrastiaineita.⁷⁵ Aikaisimmat kontrastiaineet olivat mangaani(II)suoloja. Nykyään kontrastiaineina käytetään yleisimmin gadolinium(III)komplekseja. Edellämäinittujen lisäksi myös lantanidikomplekseja on tutkittu. Lisäksi joitain pienhiukkasia, tarkemmin sanottuna superparamagneettisia materiaaleja, kuten pieniä – ja ultrapieniä rautaoksidipartikkeleja (SPIO, *Small Particles of Iron oxide*, USPIO, *Ultra Small Particles of Iron Oxide*) on hyödynnetty kontrastiaineina. Kuvassa 36 on esitetty muutamien kliinisessä käytössä olevien Gd(III)-kontrastiaineiden rakenteita. Gd(III)-DTPA (dietyleenitriamiinipentaetaanihappo), kauppanimeltään MagnevistTM, oli ensimmäinen FDA:n (*Federal Drug Agency*) vuonna 1988 hyväksymä kontrastiaine magneettikuvantamiseen.⁷⁶ Muita esimerkkejä FDA:n ja EMA:n (*European Medicines Agency*) hyväksymistä Gd(III)-kontrastiaineista ovat kuvassa esitetyt Gd(III)-DOTA (1,4,7,10-tetra-atsasyklododekaani-1,4,7,10-tetraetaanihappo, DotaremTM) ja Gd(III)-DTPA-BMEA (bis(metoksietyyliamidi))⁷⁷.



Kuva 36. Gd(III)-DTPA:n, Gd(III)-DOTA:n ja Gd(III)-DTPA-BMEA:n rakenteet.

Gadolinium(III):lla on seitsemän paritonta elektronia ja sen T_{1e} on pitkä, eli sillä on erinomainen relaksaatiokyky. Vapaat siirtymämetallit ovat kuitenkin erittäin myrkyllisiä. Ne sitoutuvat seerumin proteiineihin ja keräytyvät lopulta pysyvästi luukudokseen. Vapaan gadoliniumin (III) LD_{50} -arvo on $0,2 \text{ mmol kg}^{-1}$.⁷⁸ Tämän vuoksi Gd-pohjaiset kontrastiaineet ovat vahvasti kelatoituja ja suurikokoisia. Kokonsa vuoksi ne eivät läpäise veriaivoestettä (BBB, *Blood-Brain Barrier*). Suuri kelatointiaste huonontaa Gd-kontrastiaineiden kontrastitehokkuutta ja nopeuttaa niiden häviämistä kehosta, jolloin kontrastiainetta on annettava kuvattavalle potilaalle suhteellisen suuria määriä. Annostuksen määrää on kuitenkin pyritty pienentämään parantamalla kontrastiaineiden stabiiliutta ja relaksaatioominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia on pyritty parantamaan muun muassa liittämällä paramagneettinen keskus dendrimeereihin⁷⁹ tai proteiineihin⁸⁰. Gd-kompleksit ovat epäspesifisiä, eli eivät kohdennu mihinkään tiettyyn kudokseen.

Yleisesti ottaen magneettikuvauksessa käytetyt kontrastiaineet ovat turvallisia, mutta gadoliniumkelaattien on todettu aiheuttavan munuaisten vajaatoimintaa sairastavilla potilailla nefrogeenistä systeemistä fibroosia (NSF).⁸¹ NSF aiheuttaa muun muassa sidekudoksen muodostumista ihoon näin ollen paksuntaen ja kovettaen ihoa. Lisäksi se voi aiheuttaa muiden kudosten, kuten keuhkojen ja sydämen vajaatoimintaa. Käytännössä riski sairastumiseen on varsin pieni johtuen kontrastiaineiden korkeasta kelatointiasteesta, jolloin ne kulkeutuvat kehosta nopeasti pois aineenvaihdunnan kautta. Lisäksi kohdespesifisiä kontrastiaineita on tutkittu hiukan.⁸²

Kontrastiaineet voidaan luokitella T_1 - ja T_2 -kontrastiaineiksi sen mukaan, kumpaan relaksaatioaikaan niillä on suurempi vaikutus.⁸⁰ Useimmat kontrastiaineet ovat T_1 -painotteisia kontrastiaineita. Ne eivät vaikuta millään lailla kudosten omaan magneettiseen susceptibiliteettiin, jolloin esimerkiksi potentiaalisten artefaktien mahdollisuus pienenee.

4.1.2 Relaksaatioteoria ja paramagneettinen relaksaation vahvistus

Magneettikuvauksen perusta on kontrastin luominen eri kudosten välille. Kontrastin syntyminen koostuu useasta eri tekijästä, kuten T_1 - ja T_2 -relaksaatioaikojen suuruuksista, kuvattavien kudosten protonitiheyksistä sekä laitteen parametreista.⁸³ Suurin merkitys näistä on kuitenkin relaksaatioajoilla ja kontrastiaineiden vaikutuksilla niihin. Perusta relaksaatioteorialle luotiin 40-luvun loppupuolella.⁸⁴ NMR relaksaatioteorian varsinaisia kehittäjiä olivat Solomon⁸⁵ ja Bloembergen⁸⁶ 50-luvulla. Hieman myöhemmin julkaistiin tutkimus paramagneettisen metalli-ionin kiinnittämisestä DNA:han, minkä huomattiin nopeuttavan lähistöllä olevan veden protonien relaksaatiota.⁸⁷ Ilmiötä kutsutaan paramagneettiseksi relaksaation vahvistukseksi (PRE, *Paramagnetic Relaxation Enhancement*).

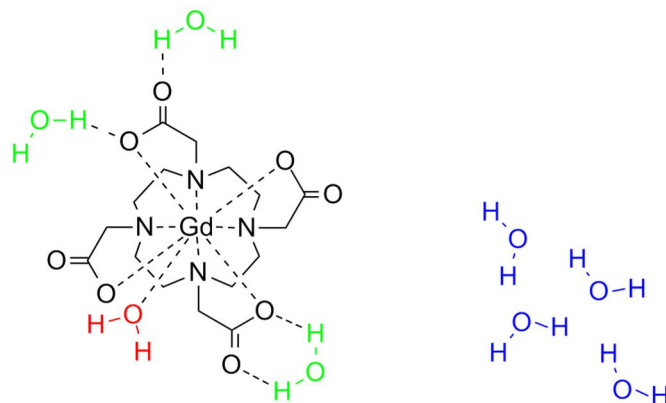
Paramagneettisten systeemien pariton elektroni aiheuttaa positiivisen magneettisen susceptibiliteetin, eli paramagneettiset aineet vahvistavat ulkoisen magneettikentän voimakkuutta. Paramagneettisilla aineilla on myös suuri magneettinen momentti, mikä aiheuttaa kemiallisten siirtymien asteikon laajentumisen, jolloin ^1H -siirtymiä voidaan havaita jopa yli 100 ppm:ssa. Ne myös vahvistavat lähistöllä olevien ytimien relaksaatiota, nopeuttamalla T_1 ja T_2 relaksaatioaikoja. Tämän vuoksi NMR-spektroskopia ei sovi radikaalien rakennetutkimukseen, sillä se aiheuttaa vapaan elektronin spinin lähistöllä olevien ydinspinien NMR resonanssisignaalit levenevät ja lopulta häviävät.

Paramagneettinen relaksaation vahvistus aiheutuu ytimen ja parittoman elektronin välisistä magneettisista dipolaarisista vuorovaikutuksista.⁸⁸ Juuri tämä ilmenee ytimen relaksaatioaikojen lyhenemisenä. Ilmiö on verrattavissa NOE-efektiin (*Nuclear Overhauser Effect*), joka kuvaa kahden ytimen välisiä vuorovaikutuksia. Kuitenkin PRE:n vaikutus on suurempi ja kattaa jopa 35 Å:n etäisyyksillä olevien hiukkasten vuorovaikutukset NOE:n vaikutusten yltäessä vain 5-6 Å:n etäisyyteen. PRE-ilmiöllä on useita sovelluksia myös NMR:ssä. Ilmiön avulla on mahdollista tutkia muun muassa makromolekyylien dynaamisia ominaisuuksia spin-leimaus menetelmällä. Menetelmä antaa tietoa muun muassa etäisyyksistä tutkitun ytimen ja paramagneettisella yksiköllä leimatun aseman välillä.

Yksinkertaisimmillaan relaksaatiokyky r_i voidaan ilmaista relaksaationopeuden muutoksena kontrastiaineen pitoisuutta kohti.

$$r_i = \frac{1}{T_i \times c} \quad (5)$$

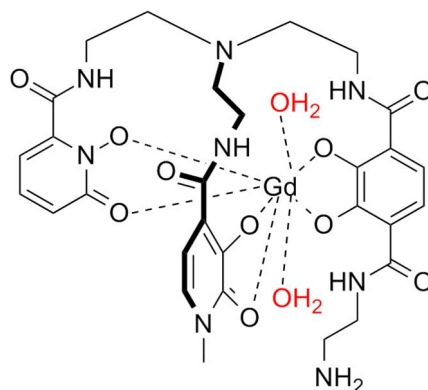
Relaksaation suuruuteen vaikuttavat ominaisuudet koostuvat useista eri parametreista, joiden avulla voidaan johtaa kaavoja relaksaation laskemiseksi.⁸⁵⁻⁸⁶ Kyseiset parametrit voidaan jakaa karkeasti kontrastiaineen rakenteellisista ja dynaamisista ominaisuuksista johdettuun ja elektroni-spin relaksaation aiheuttamiin tekijöihin.⁸⁹ Laufferin⁷⁴ katsausartikkeli paramagneettisten metallien relaksointiominaisuuksista vesimolekyylejä kohtaan esittelee kattavasti ilmiön teorian. Yksi tärkeimmistä tekijöistä relaksaatiota määritettäessä on kontrastiaineen pitoisuus tutkittavassa kudoksessa. Toinen merkittävässä asemassa oleva tekijä on paramagneettisen keskuksen etäisyys (r) veden protonista. Vesi voi sekä koordinoitua suoraan metallikeskukseen että vetysitoutua kompleksin ligandiin (kuva).⁷⁶



Kuva 37. Vesi voi olla vuorovaikutuksissa Gd(III)-kompleksin kanssa kahdella eri tavalla: koordinoitumalla metalliin (punainen) ja vetysitoutumalla ligandiin (vihreä).

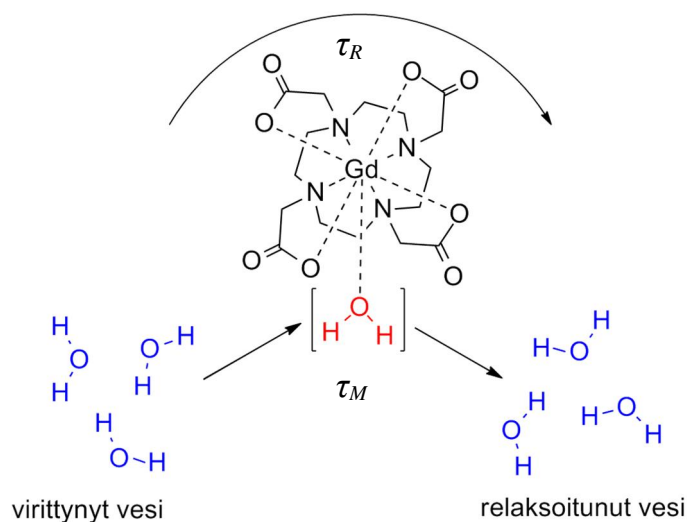
Vetysitoutuneen veden relaksaatio on huomattavasti pienempi ja merkityksettömämpi kuin metalliin koordinoituneen veden ja jätetäänkin usein huomiotta.³¹ Metalliin koordinoituneen veden määrää kuvataan muuttujalla q . Nykyisin käytössä olevien kontrastiaineiden rakenteet sallivat vain yhden metalliin koordinoituneen vesimolekyylin, toisin sanoen $q=1$. Uusien Gd-kontrastiaineiden relaksaatiota on pyritty parantamana kehittämällä uusia ligandeja, jotka sallivat useamman vesimolekyylin koordinoitumisen metallikeskukseen.

Esimerkki tällaisesta kontrastiaineesta on kuvassa 38 esitetty Gd(III)-TREN-bis(1,2-HOPO)-TAM (tris(2-aminoetyyli)amiini-1,2-hydroksipyridinoni -2,3-dihydroksiterpeftalamidi) – etyyliamiinikompleksi.⁹⁰



Kuva 38. Gd(III)-TREN-bis(1,2-HOPO)-TAM-etyyliamiinikompleksin rakenne.

Kontrastiaineiden dynaamisista ominaisuuksista merkittävimmät ovat rotaatiokorrelaatio-aika τ_R , sekä viipymisaika τ_M . Rotaatiokorrelaatioaika kuvaa kompleksin pyörimisliikettä ja viipymisvakio vesimolekyylin vaihtumisnopeutta systeemissä (kuva 39).



Kuva 39. Gd(III)-kontrastiaineen dynaamisia ominaisuuksia.³¹

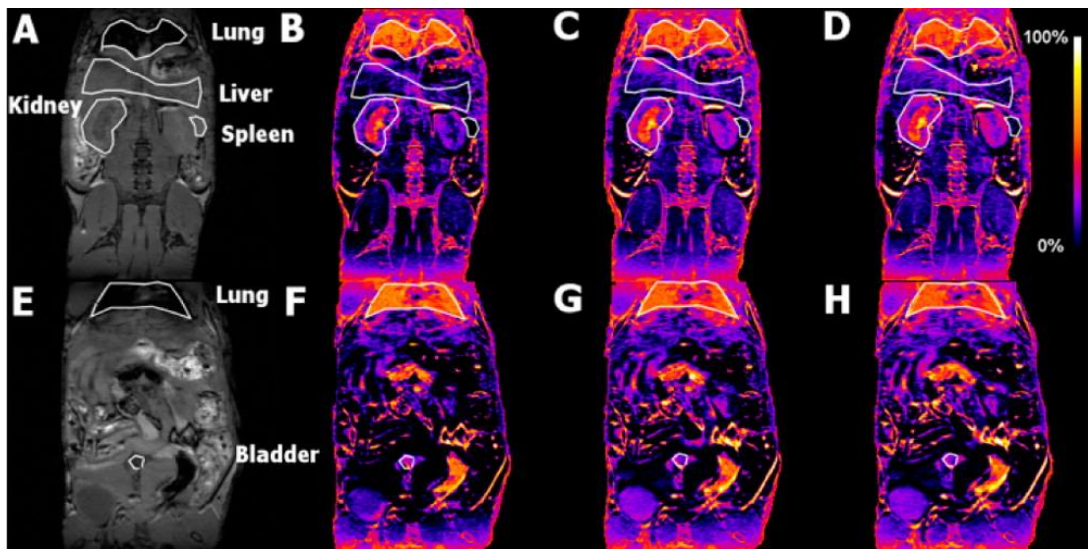
Lyhyt viipymisaika ja hidas rotaatio tai ylipäänsä kontrastiainemolekyylin liikkumattomuus parantavat relaksaatiovaikutuksen tehokkuutta. Molekyylien liikettä on pyritty vähentämään suurentamalla ligandien kokoa liittämällä paramagneettinen metalli esimerkiksi makromolekyyliin. Toisaalta kuitenkin kontrastiainemolekyylin koon suurentamisen on

todettu pidentävän vesimolekyylien viipymisaikaa, jolloin niiden vaihtuvuus harvenee. Muutos on niin suuri, että se huonontaa kuvauksen laatua merkittävästi. Tähän on pyritty löytämään parannus muun muassa lisäämällä molekyyliin useita paramagneettisia keskuk-
sia. Esimerkiksi aiemmassa kappaleessakin mainittuun dendrimeeriliitännäinen mahdollis-
taa sekä useiden metallikeskusten liittämisen että molekyylikokoon kasvattamisen saman-
aikaisesti.⁷⁹ Edellä mainittujen parametrien lisäksi systeemistä riippuen relaksaation suu-
ruus koostuu lukemattomista eri seikoista.⁸⁹ Relaksaatiota kuvaavia yhtälöitä voidaan
muodostaa lukuisin eri tavoin mutta niitä ei ole tarkoitus käsitellä tässä tutkielmassa.

5. Nitroksyyliiradikaalit kontrastiaineina

Metallipohjaisten kontrastiaineiden rinnalle on kehitetty uusi kontrastiaineryhmä: radikaalipohjaiset kontrastiaineet. Radikaaleina käytetään nitroksyyliiradikaaleja niiden erinomaisen stabiiliuden vuoksi. Nitroksyyliiradikaaleja voidaan käyttää kontrastin parantajina MRI:n lisäksi myös EPRI:ssa.

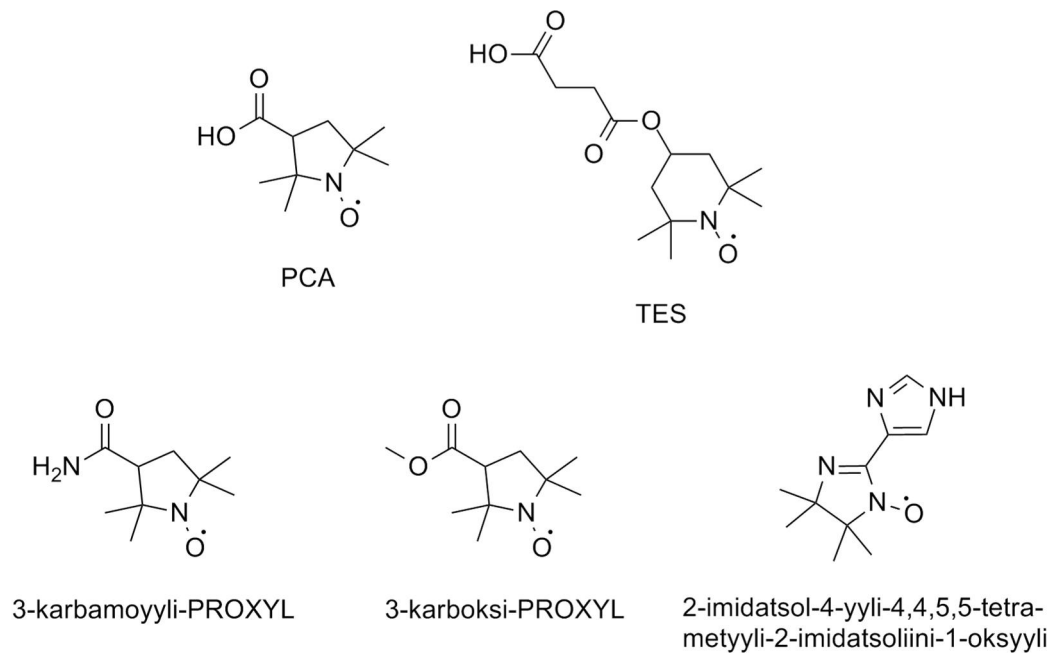
Nitroksyyliiradikaalien tutkiminen MRI kontrastiaineina alkoi 1980-luvulla. Braschn *et al.*⁹¹ julkaisivat useita raportteja niiden relaksaatio-ominaisuuksista. Tuolloin tutkimus keskittyi munuaisten toimintaan ja veriaivoesteen läpäisevyyteen. Useimpien radikaalien kuitenkin havaittiin pelkistyvän liian nopeasti *in vivo* entsyymien tai kehossa olevien pelkistimien vaikutuksesta. Lisäksi niiden relaksaatiota aiheuttavat ominaisuudet olivat heikompia kuin yleisessä käytössä olevien gadoliniumkompleksien, sillä radikaaleilla on ainoastaan yksi vapaa elektroni, kun taas Gd^{3+} -ionilla niitä on seitsemän. Kuitenkin MRI-laitteiden ja pulssisarjojen kehittyttyä 80-luvun jälkeen, stabiilimpien radikaalien kontrastinetutkimus lähti uuteen nousuun 1990- ja 2000-luvuilla. Esimerkiksi kuvassa 42 esitettyssä hiiren MRI-kuvassa on käytetty kontrastiaineena nitroksyyliiradikaalipohjaista kontrastiainetta.



Kuva 40. MRI-kuvat ilman kontrastiainetta(A, E) ja annostelun jälkeen (B-D, F-H) vaihtuvina ajanjaksoina.⁹² (Kuvan julkaisemiseen saatu lupa American Chemical Societylta)

Kuten kuvasta 40 voidaan havaita, nitroksyyliiradikaalit toimivat kontrastin parantajina MRI:ssa ja tarjoavat varteenotettavan vaihtoehdon nykyisin käytössä oleville kontrastiaineille. Kuten aiemmin todettiin, gadoliniumpohjaiset kontrastiaineet altistavat NSF-taudille. Nitroksyyliiradikaalit taas ovat täysin orgaanisia, metallivapaita yhdisteitä, mikä tarjoaa ratkaisun Gd-kontrastiaineiden haitallisiin ominaisuuksiin. Nitroksyyliiradikaalien toksisuutta on tutkittu paljon, ja ne on todettu useissa tutkimuksissa turvallisiksi.⁹³ Kuitenkin jokaista rakennetta tulee tarkastella erikseen, sillä nitroksyyliiradikaalien toksisuuksissa on havaittu eroja ja osa yhdisteistä on osoittautunut muutamissa testeissä haitallisiksi erityisesti suurina pitoisuuksina. Eräs nitroksyyliiradikaalien eduista gadoliniumkomplekseihin verrattuna on myös niiden kyky läpäistä solumembraaneja. Tämän johdosta niiden tiheysjakauma kudoksissa on suuri, mikä kompensoi niiden heikompaa relaxointikykyä Gd-kontrastiaineisiin verrattuna. Radikaalikontrastiaineita on toistaiseksi tutkittu ainoastaan eläinkokein.

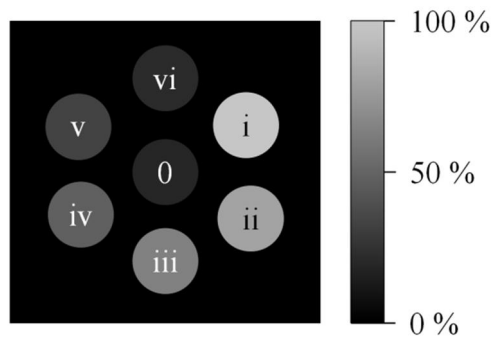
Kuvassa 41 on esitetty muutamia kontrastiaineina tutkittuja nitroksyyliiradikaaleja. Kontrastiainetutkimuksissa on käytetty yleisimmin pyrrolidiini- ja piperidiininitroksyylejä mutta myös imidatsoliumnitroksideja.⁹⁴ Imidatsoliumnitroksideja kehitettiin, koska ne ovat stabiileja pH:n vaihteluille ja näin ollen annosteltavissa sekä suonensisäisesti että suun kautta.⁹⁵ Ensimmäiset raportoidut radikaalikontrastiaineet olivat 2,2,5,5,-tetrametyyli-1-pyrrolidinyloksi-3-karboksyylihappo (PCA) ja 2,2,6,6-tetrametyyli-1-oksido-4-piperidinyli-1-sukkiinihappo (TES) 80-luvulla.^{91d}



Kuva 41. Kontrastiaineina käytettyjen nitroksyyli-radikaalien rakenteita.

5.1 Fantomikokeet

Kontrastiaineiden toimivuutta ja tehokkuutta voidaan mitata niin kutsutuilla fantomikokeilla.^{58, 96} Fantomikokeita käytetään myös kuvauslaitteiden kalibroinnissa, pulssisarjojen kehityksessä ja laitteenkäyttäjien koulutuksessa.⁹⁷ Fantomit voivat olla geelipohjaisia, ihmiskudosta muistuttavia, tai vesipohjaisia näytteitä. Kontrastiaineita tutkittaessa fantomiko-
keessa valmistetaan näytteitä, jotka sisältävät tutkittavaa kontrastiainetta eri pitoisuuksina. Nitroksyylikontrastiainenäytteet valmistetaan yleensä PBS- eli fosfaatti puskuroituun suolaliuokseen (*phosphate-buffered saline*). Kuvassa 42 on esitetty hypoteettinen esimerkki fantomikokeesta, jossa on mitattu sarja näytteitä, jotka sisältävät tutkittavaa kontrastiainetta eri pitoisuuksina. Ensimmäinen näyte on niin sanottu nollanäyte, ja loput sisältävät kontrastiainetta vähenevässä määrin näytteestä *i* näytteeseen *vi*. Kuvassa esitetty väri havainnoi signaalin intensiteettiä, joka on suurin näytteelle *i*, jonka nitroksyyli-radikaalipitoisuus on suurin.



Kuva 42. Hahmotelma fantomikokeesta.^{58, 96}

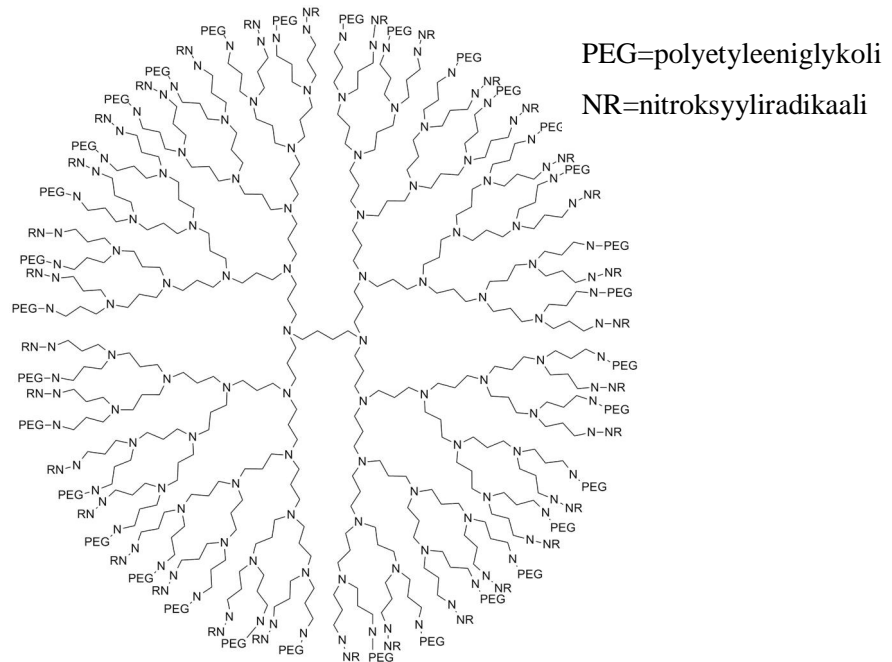
Fantomikokeiden avulla voidaan myös kartoittaa nitroksyyli-radikaalien pelkistymistä. Stabiilisuutta on tutkittu EPR- ja magneettikuvantamisella. Kokeissa näytteiden joukkoon lisätään pelkistävää yhdistettä kuten askorbaattia, jolloin nitroksyyli-radikaalien pelkistymistä voidaan seurata ajan funktiona.

Fantomikokeet tarjoavat myös käytännöllisen tavan vertailla eri kuvantamismenetelmiä kuten ERPI:a ja MRI:a.⁹⁸ EPRI:a on käytetty useissa yhteyksissä muun muassa hapettumis-pelkistymistilan tutkimuksissa. Vertailujen perusteella kummallakin menetelmällä saadaan aikaan nitroksyyli-radikaalien relaksaatiota parantava vaikutus, mutta magneettikuvantamisen edut tulivat ilmi menetelmän helppoutena. EPRI asettaa suuria vaatimuksia spektrien laadulle, kuten signaalin leveydelle ja signaali-kohina – suhteelle, ja näin ollen rajoituksia kontrastiaineen rakenteelle. Toisaalta EPRI:n herkkyys paramagneettisten yhdisteiden detektointille tukee MRI:tä kehon hapettumis-pelkistymistilan tutkimuksissa.

5.2 Nitroksyyli-radikaalikontrastiaineiden rakenteiden muokkaus

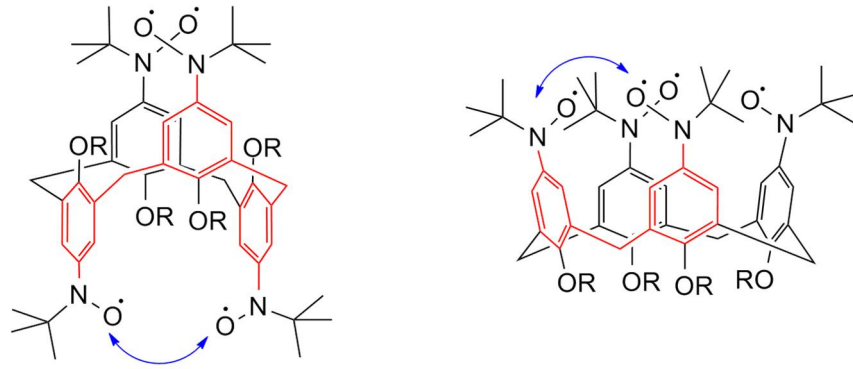
Nitroksyyli-radikaalikontrastiaineiden ominaisuuksia on pyritty parantamaan muokkaamalla niiden rakennetta. Nitroksyyli-radikaaleja on muun muassa liitetty polymeereihin,⁹⁹ nanoputkiin¹⁰⁰ sekä lukuisiin eri biomolekyyleihin kuten esimerkiksi DNA oligomeereihin,¹⁰¹ albumiiniin ja arabinogalaktaniin¹⁰². Näillä operaatioilla on pyritty sekä parantamaan aineiden relaksoivuutta että luomaan spesifisyyttä tiettyjä kudoksia kohtaan. Kontrastiaineiden relaksaatio-ominaisuuksiin on pyritty vaikuttamaan liittämällä kontrastiaineyksikköön useita paramagneettisia keskuksia. Hyviä menetelmiä ovat esimerkiksi radikaalien liittämisen dendriimeereihin¹⁰³ tai polyradikaaleihin¹⁰⁴. Kuvassa 43 on esitetty polyamidoamiini

(PAMAM) – dendrimeerirakenteeseen perustuva nitroksyyli-radikaalikontrastiaine.⁹² Nitroksyyli-radikaaleilla päällystetty dendrimeeri on hyvin hydrofobinen, joten sen pinnalle liitettiin polyetyleeniglykoli (PEG) – ketjuja lisäämään sen vesiliukoisuutta.



Kuva 43. Orgaaninen dendrimeeri-radikaalikontrastiaine.⁹²

Lisäksi dendrimeerin rakenne tarjoaa steeristä suojaa radikaalille, jolloin sen stabiilius paranee. Menetelmää on käytetty myös parantamaan gadoliniumpohjaisten kontrastiaineiden relaksaatiota, jolloin perustana on ollut jäykistää kontrastiainemolekyylin rakennetta ja vähentää sen liikehtimistä (*tumbling*).¹⁰⁵ Relaksaatiohan on riippuvainen molekyylin asemasta vesimolekyyliin nähden. Lisäksi kontrastiaineen sitominen dendrimeeriin pidentää sen puoliintumisaikaa. Tutkimuksessa pelkistymisnopeusmittaukset osoittivat, että dendrimeerikontrastiaine pelkistyi noin 20 kertaa hitaammin kuin verrokkina käytetty 3-karboksi-PROXYL. Samalla periaatteella polyradikaalit voivat toimia tehokkaina kontrastiaineina useiden radikaalikeskusten parantamien relaksointiominaisuuksiensa vuoksi.¹⁰⁴ Polyradikaalien rakenteissa käytetään yleisimmin kaliks[4]areeneja, sillä ne muistuttavat proteiini-rakenteita. Lisäksi niiden jäykkä rakenne parantaa relaksaatio-ominaisuuksia. Kytkeytyminen voi polyradikaaleilla tapahtua sidosten kautta tai avaruuden kautta (kuva 44). Sidosten kautta tapahtuva kytkeytyminen on tehokkaampaa, erityisesti ristikonjugoituneen π -systemin kautta.



Kuva 44. Kaliks[4]areeni pohjaisia polyradikaalikontrastiaineita. Kuvassa on havainnollistettu sidosten kautta tapahtuva kytkeytyminen punaisella ja avaruuden kautta sinisellä.

5.3. Sovellukset lääketieteellisissä tutkimuksissa

5.1 Kehon hapettumis-pelkistymistilan tutkimus

Suuri osa nitroksyyli-radikaalikontrastiaineiden tutkimuksesta on keskittynyt kudosten hapettumis-pelkistymistilan (redox-tila) kartoitukseen.^{58, 106} Redox-tila on riippuvainen useista biokemiallisista tekijöistä kuten eri entsyymien ja luonnollisten pelkistimien toiminnasta. Poikkeavuudet tilassa voivat olla merkki oksidatiivisesta stressistä tai aineenvaihdunnallisesta häiriöstä. Nitroksyyli-radikaalien sovellettavuus tutkimuksissa perustuu sen kykyyn pelkistyä stressitilaa aiheuttavien pelkistimien toimesta. Toisin sanoen nitroksyyli-radikaaleja voidaan kuvailla hapettumis-pelkistymis sensoreiksi: prosessia voidaan seurata tarkkailemalla paramagneettisen vasteen katoamista niin EPR- ja MRS- kuin magneettikuvantamisellakin. MRI:n etu muihin menetelmiin nähden on kuvien anatomisen resoluution ylivoimaisuus. Redox-tilan arvioinnin lisäksi menetelmällä voitaisiin helposti seurata hoitoa saavan potilaan tilaa ja edelleen hoidon tehokkuutta.

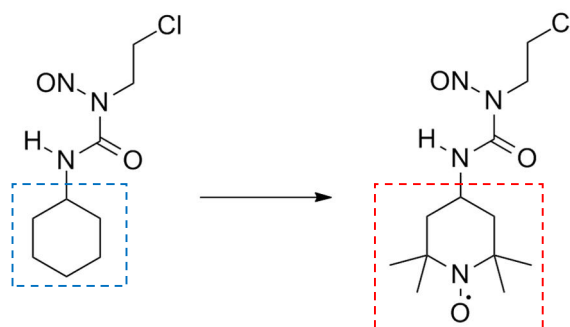
Oksidatiivisen stressin todentamisen lisäksi kehon redox-tilan tutkiminen yhdistettynä anatomiseen kuvantamiseen voi antaa viitteitä kasvainten sijainnista.¹⁰⁷ Kasvainten ympäristön on todettu olevan erittäin pelkistävä ja hypoksinen eli vähähappinen. Tällöin nitroksyyli-radikaalien pelkistyminen kasvainkudoksissa on nopeampaa kuin muualla kehossa, mikä ilmenee paramagneettisuuden menetyksenä ja edelleen signaalin häviämisenä. Nitroksyyli-radikaalikontrastiaineissa yhdistyykin sekä kontrastin parantaminen että redox-tilan raportointi. Redox-tilan kuvantaminen on yleistä EPRI ja OMRI menetelmillä. OMRI:ssa eli overhauser magneettikuvantamisessa yhdistyvät MRI:n korkea resoluutio ja EPRI:n herk-

kyys. Ilmiötä on tukittu muun muassa vertailemalla eri nitroksyyli-radikaalikontrastiaineiden pelkistymisnopeuksia kasvainten läheisyydessä ja muualla kehossa.^{96a}

Tutkimukset osoittivat, että nitroksyyli-radikaalit jakautuivat tasaisesti sekä terveeseen että kasvainkudokseen. Nitroksyylien pelkistyminen kasvaimen alueella on nopeampaa kuin normaalissa kudoksessa, mikä ilmenee nopeana signaalin intensiteetin laskuna. Signaalin häviämisen tapahtuminen pelkistymisen vaikutuksesta varmistettiin toisessa tutkimuksessa vertailemalla kolmen eri nitroksyyli-radikaalikontrastiaineen, joista yksi oli solua läpäisemättömän, vaikutuksia. Solua läpäisemättömän yhdisteen antaman signaalin intensiteetti ei laskenut kuten kahden muun kontrastiaineen. Tämän perusteella tutkimuksessa pääteltiin, että kahden muun kontrastiaineen signaalien pieneneminen aiheutui solunsisäisestä pelkistymisestä, eikä kontrastiaineen häviämisestä tutkittavalta alueelta.

5.2 Veri-aivoesteen läpäisevyyteen liittyvä tutkimus

Myös veri-aivoesteen läpäisevyyttä on tutkittu. Jos kontrastiaine antaa vasteen terveessä aivokudoksessa, se on BBB-läpäisevä. Kontrastiaineiden lisäksi nitroksyyli-radikaaleja voidaan hyödyntää magneettikuvauksessa myös spin-leimoina. Menetelmällä voidaan tutkia muun muassa nitroksyyli-radikaalien BBB-läpäisevyyttä lääkkeiden kuljetusta varten.¹⁰⁸ Lääkkeiden läpäisevyyden tietäminen on tärkeää annostuksen ja kohdespesifisen vaikutuksen ennustuksen määrittämisessä. BBB-läpäisevyyden määrittäminen on yleisesti hankalaa. Se on invasiivista, kallista, aikavievää ja vaatii koe-eläintutkimuksia. Nitroksyyli-radikaalit, kuten aiemmin todettu, ovat BBB-läpäiseviä. Syöpälääkeaineen BBB-läpäisevyyttutkimuksessa lomustiini eli CCNU (1-(2-kloorietyyli)-3-sykloheksyyli-1-nitroso-urea) leimattiin MRI-vasteen antavalla nitroksyyli-radikaalilla. Samalla syöpälääkevaikutuksen sisältävä nitroso-ureapoolisko pystyttiin säilyttämään koskemattomana. Kuvassa 45 on esitetty lomustiinin ja SLENU:n rakenteet.

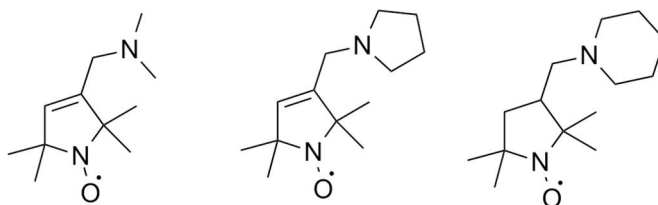


Kuva 45. Lomustiinin ja SLENU:n rakenteet.

Kuvassa sinisellä rajattu sykloheksyyli korvattiin punaisella rajatulla TEMPO-derivaatalla. Näin saatu spin-leimattu tuote muistutti suuresti tutkittavaa lääkeainetta, minkä lisäksi se ei osoittautunut haitalliseksi toksikologisuustutkimuksissa. Spin-leimatulla tuotteella pystyttiin seuraamaan sen lokalisaatiota *in vivo* magneettikuvantamisella.

5.3 Nitroksyyli-radikaalien biologisten ominaisuuksien tutkimus MRI:lla

Magneettikuvantamisella voidaan tutkia myös nitroksyyli-radikaalien säteilysuojaineominaisuuksia.¹⁰⁹ Tätä voidaan tutkia käsittelemällä soluja *in vitro* tai koe-eläimiä *in vivo* valituilla nitroksyyli-radikaaleilla ja säteilyttämällä niitä ionisoivalla säteilyllä. Solujen ja eläinten elinikä on huomattavasti korkeampi yksilöillä, joita on käsitelty nitroksyyli-radikaaleilla. Nitroksyyli-radikaalien toiminta säteilysuojaineina perustuu muun muassa niiden reagointikykyyn ionisoivan säteilyn vaikutuksesta syntyvien vapaiden radikaalien kanssa. Kysymys siitä, suojaavatko säteilysuojaineet myös pahanlaatuista kudosta, on selitettävissä tarkastelemalla kasvaimen hapetuspelkistymistilatutkimuksien tuloksia. Tulosten mukaan nitroksyyli-radikaalien pelkistyminen on nopeampaa kasvainkudoksessa normaaliin, terveeseen kudokseen verrattuna. Nitroksyyli-radikaalien pelkistynyt muoto, hydroksyyliamiini ei taas omaa säteilysuojaineominaisuuksia. Näin ollen tutkimuksessa todettiin epätodennäköiseksi, että nitroksyyli-radikaalit suojaisivat myös säteilytettävää kudosta.



Kuva 46. Säteilysuojaineina tutkittujen nitroksyyli-radikaalien rakenteet.

6. Johtopäätökset

Nitroksyyli-radikaalit ovat vakiinnuttaneet asemansa orgaanisessa synteessissä primääristen ja sekundääristen alkoholien hapetusreaktioissa. Lisäksi niiden biologiset ominaisuudet antioksidanteina, SOD-jäljittelijöinä ja radiosuoja-aineina ovat saaneet runsaasti huomiota useissa tutkimuksissa. Nämä ominaisuudet ovat poikkeuksellisia, sillä yleensä ottaen vapaat radikaalit voivat aiheuttaa kehossa ongelmia, esimerkiksi oksidatiivisen stressin muodossa. Sitä vastoin nitroksyyli-radikaalien biologiset vaikutukset ovat lähes poikkeuksetta positiivisia. Nämä ominaisuudet ovat mahdollisia lähinnä nitroksyyli-radikaalien erittäin stabiilin rakenteen vuoksi. Kaksi merkittävintä radikaalien stabiilisuuteen vaikuttavaa tekijää ovat elektronien delokalisaatio ja molekyylin parittomalle elektronille tarjoama steerinen suoja. Nitroksyyli-radikaaleilla vapaa elektroni delokalisoituu N-O –sidokseen. Lisäksi niiden rakenne mahdollistaa kookkaiden sivuryhmien liittäminen molekyyliin, mikä luo suojan radikaalikeskukselle.

Nitroksyyli-radikaalien stabiilisuus yhdessä paramagneettisuuden kanssa ovat mahdollistaneet niiden sovellukset useissa spektroskopisissa menetelmissä. Yleisimpiä näistä ovat EPR-spektroskopiassa käytetyt spin-leimaus ja spin-trapping. Varsin kiinnostava ja mullistava sovellus on myös nitroksyyli-radikaalien käyttö kontrastiaineina lääketieteellisissä kuvantamismenetelmissä, erityisesti MRI:ssa. Kontrastiaineiden käyttö on hyvin yleistä kuvantamisessa. Nykyisin käytössä olevat kontrastiaineet sisältävät siirtymämetalleja, jotka ovat kehoon vapautuessaan erittäin myrkyllisiä. Kontrastiaineiden toiminta perustuu niiden kykyyn relaksoida tehokkaasti ympärillä olevia vesimolekyylejä. Nitroksyyli-radikaalikontrastiaineita on testattu useissa kuvantamissovelluksissa, kuten kehon hapettumis-pelkistymis-tilan seurannassa ja veri-aivoesteen läpäisevyyden tutkimuksessa. Tulevaisuudessa voidaan odottaa lisätutkimuksia ja uusia sovelluksia tältä lupaavalta alalta.

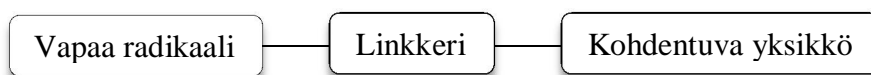
II. KOKEELLINEN OSIO

7. Johdanto

Ennen lääketieteellisiä kuvantamismenetelmiä kasvaimet pystyttiin havaitsemaan ainoastaan kirurgisilla operaatioilla eli leikkauksilla tai koepaloilla.¹¹⁰ Nykyään syövän kuvantamisessa käytetään yleisimmin positroniemissiotomografiaa (PET) yhdistettynä tietokonetomografiaan (CT). Varjoaineita on arvioitu katsausartikkelissa¹¹¹. PET-CT:n haittavaikutuksia ovat CT:ssä käytettävän röntgensäteilyn ja PET:ssä käytettävien radioleimattujen merkkiaineiden haitallisuus. Lisäksi PET-CT-laitteet ovat kalliita ja käytettävissä suhteellisen harvoissa sairaaloissa.

Magneetikuvauksesta (MRI) on tullut yksi tärkeimmistä kuvantamismenetelmistä sen erinomaisen kuvanlaadun ja vaarattomuuden vuoksi. Sen käyttö tarjoaa monia etuja verrattuna muihin kuvantamismenetelmiin.⁶⁰ Menetelmä ei altista ionisoivalle säteilylle tai radioaktiivisille aineille. Lisäksi MRI-laitteita on saatavilla useimmissa sairaaloissa ja laitoksissa. Tärkeä apuväline MRI:ssä ovat kontrastiaineet. Yleisin MRI:ssä käytetty kontrastiaaine on dietyleenitriamiinipentaetaanin gadolinium (III) kompleksi (Gd-DTPA), kauppanimeltään MagnevistTM. Gd-DTPA ei kuitenkaan ole spesifinen mitään kudosta kohtaan eikä suuren kokonsa vuoksi läpäise veriaivoestettä. Lisäksi vapaat siirtymämetallit ovat erittäin myrkyllisiä.

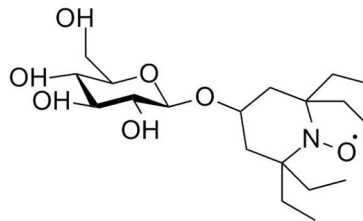
Vapaat radikaalit ovat siirtymämetallien tavoin paramagneettisia. Niitä käyttäen voidaan valmistaa metallivapaa, täysin orgaaninen molekyyli, joka voidaan edelleen liittää kovalenttisesti spesifiseen kohdentuvaan yksikköön kuvan 47 tavoin.



Kuva 47. Suuntaa-antava kuva kontrastiaineen rakenteesta.

Orgaaniset radikaalit ovat usein erittäin reaktiivisia mutta niiden stabiilisuutta voidaan lisätä muokkaamalla niiden rakennetta suojaamaan paritonta elektronia. Nitroksyyli-radikaalit ovat esimerkki tällaisesta ryhmästä. Yksi yleisimmistä nitroksyyli-radikaaleista on 4-okso-TEMPO. Se on stabiili kovissakin olosuhteissa ja sitä on tutkittu kontrastiaineena MRI:ssä.¹⁰⁸ Korvaamalla molekyylin metyyli- ja silyyliryhmät kookkaamalla etyyli- ja propyyli-

kaalin stabiilisuutta voidaan lisätä huomattavasti (kuva 13). Tetraetyylisubstituoidun yhdisteen on useissa julkaisuissa todettu olevan resistiivinen pelkistymistä kohtaan, näin ollen kuului stabiileimpien nitroksyyli-radikaalien ryhmään.^{28-30, 32} Lisäksi sen on todettu olevan tietyissä olosuhteissa vähemmän myrkyllinen.³⁰ Tuloksena saatava 4-okso-TEEPO (4-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidin-1-oksyyl) voidaan edelleen liittää esimerkiksi syöpään kohdentuvaan yksikköön, kuten glukoosimolekyylisiin (kuva 48). Syöpäkudos kuluttaa normaalia enemmän glukoosia sen nopean kasvamisen ja leviämisen vuoksi. Näin ollen glukoosimolekyylit kohdistuu syöpäkudokseen.



Kuva 48. TEEPO-Glc:n rakenne.

Tämän erikoistyön tavoitteena oli valmistaa näin saatava molekyyli, 4-hydroksi-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiini-1-oksyyl glukoosi konjugaatti, TEEPO-Glc, ja testata sen ominaisuuksia mahdollisena syöpään kohdentuvana kontrastiaineena MRI:ssä. Radikaalipohjainen kohdespesifinen kontrastiaine on varsin vähän tutkittu aihe, eikä kirjallisuudessa esiinny vastaavan rakenteen tutkimusta MRI-kontrastiaineena.

8. Tulokset ja niiden tarkastelu

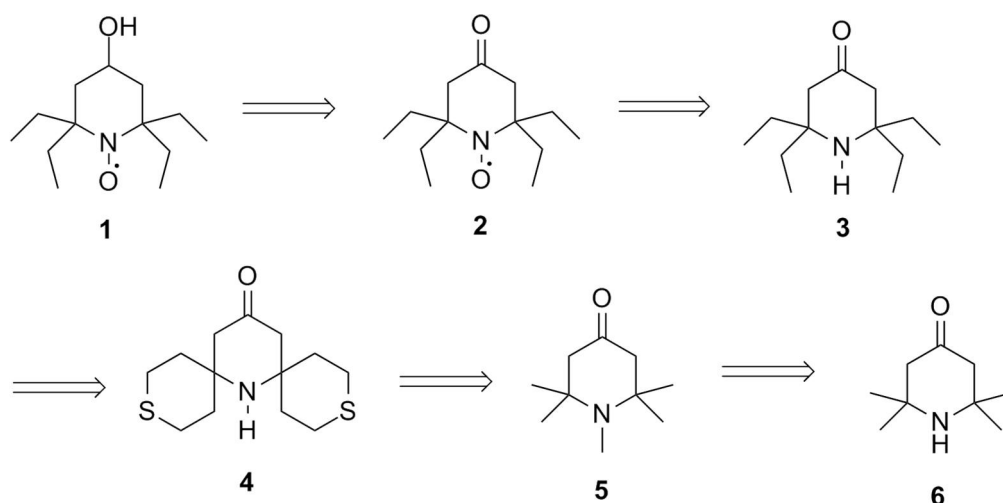
Työ koostui kahdesta osiosta: mahdollisena kontrastiaineena toimivan nitroksyyli-radikaalin syntetisoinnista ja sen relaxointikykyjen testauksesta. Tulosten tarkastelun ensimmäisessä osiossa käydään läpi TEEPO-glukoosikonjugaatin valmistuksessa käytetyt synteesireitit. Toisessa osiossa esitellään *in vitro* NMR-kokeiden tulokset, jotka koostuivat veden T_1 - ja T_2 -relaksaatioaikojen mittauksista yhdisteen konsentraation funktiona sekä molekyylin stabilisuustesteistä.

8.1 TEEPO-glukoosikonjugaatin valmistus

Synteesin tavoitteena oli valmistaa stabiili nitroksyyli-radikaali, TEEPOL, ja liittää se syöpäkudokseen kohdentavana yksikkönä toimivaan glukoosiin. Toisin kuin TEMPOL, joka on yleinen ja helposti kaupallisesti saatavissa oleva yhdiste, TEEPOL täytyi valmistaa itse. Radikaalin valmistuksessa kokeiltiin useita kirjallisuudessa esitettyjä menetelmiä (synteesireitit A, C ja D) sekä kehitettiin itse yksi (synteesireitti B). Useiden menetelmien osoittauduttua huonoiksi tai toimimattomiksi kirjallisuudessa esitetty synteesireitti E antoi halutun lopputuloksen. Glykosylointireaktio optimoitiin hakemalla parhaiten toimivat donori ja promoottori.

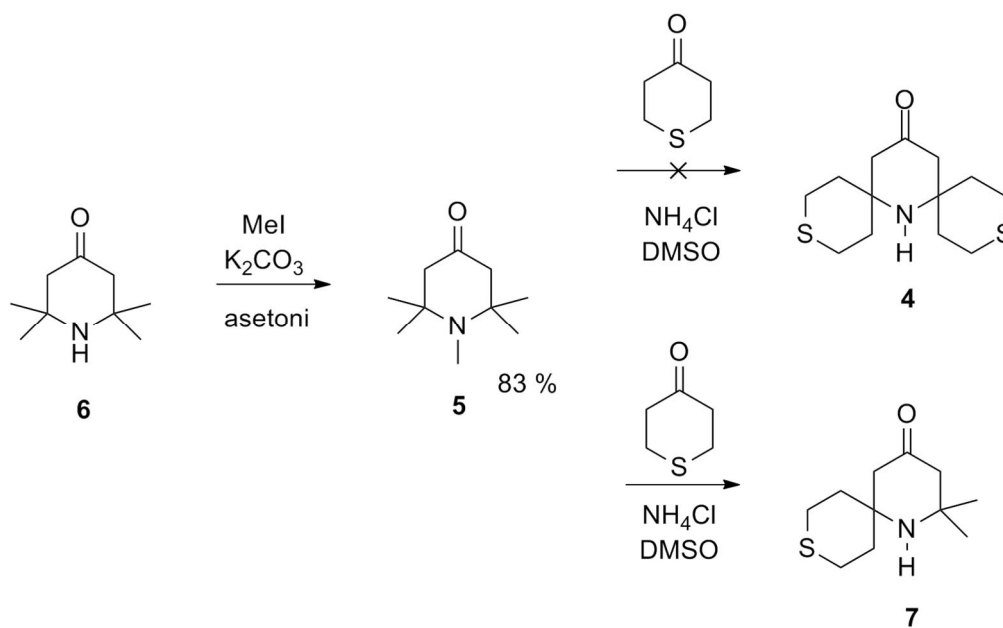
8.1.1 Synteesireitti A: dispiro-välituotteen kautta

Synteesireitti A¹¹² koostui TEEPOL:n valmistuksesta ditiadispiro-välituotteen kautta. Reitin retrosyntettinen analyysi on esitetty kuvassa 49. Kirjallisuudessa esitetty menetelmä koostui metyloidun 4-okso-TEMPO:n (**5**) 2,6-substituoinnista tetrahydro-4*H*-tiopyran-4-onilla, minkä tuotteena syntynyt tetraetyylipiperidinoni (**3**) voitiin hapetuttaa 4-okso-TEMPO:ksi ja pelkistetään edelleen TEMPOL:ksi. Synteesireitin heikkoudeksi ilmeni sen huono kokonaissaanto, jonka raportoitiin olevan alle neljä prosenttia.



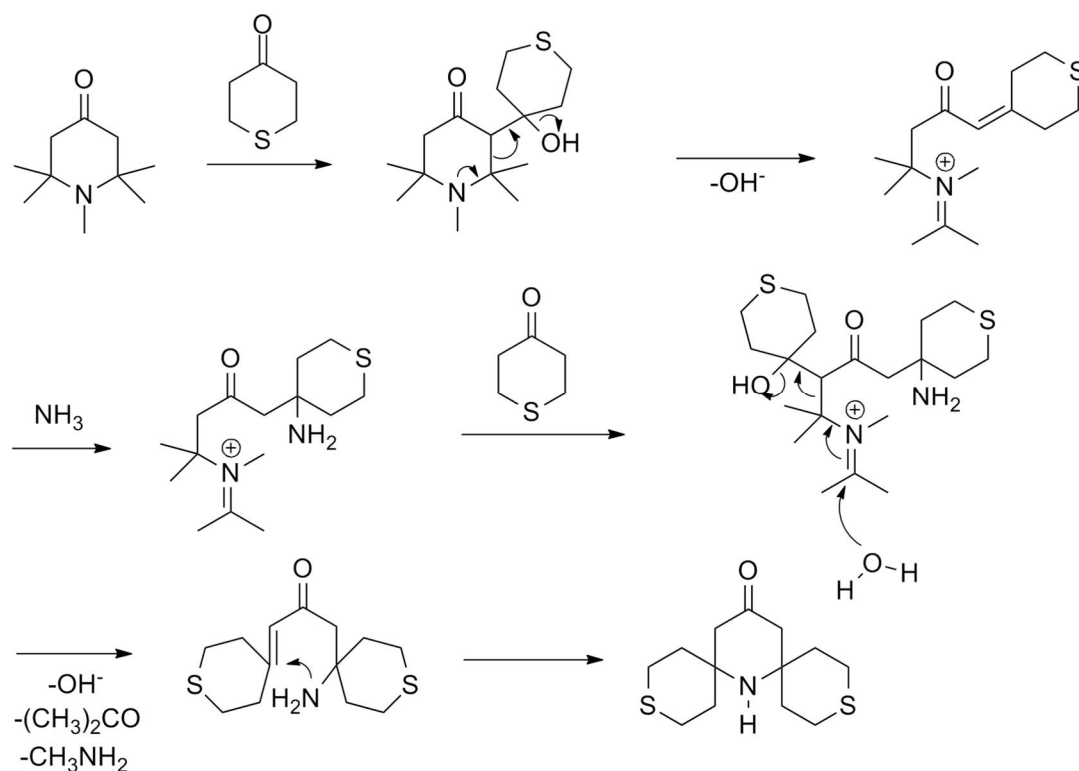
Kuva 49. Retrosynteettinen analyysi synteesireitistä A.¹¹²

Reaktiosarjan ensimmäisessä vaiheessa 4-okso-TEMPO (**6**) metyloitiin käyttäen reagenssina metyyljodidia. Tätä seurasi pentametyylipiperidinonin (**5**) reaktio tetrahydro-4*H*-tiopyran-4-onin kanssa tavoitteena muodostaa disubstituoitu dispirovälituote (**4**) (kuva 50).



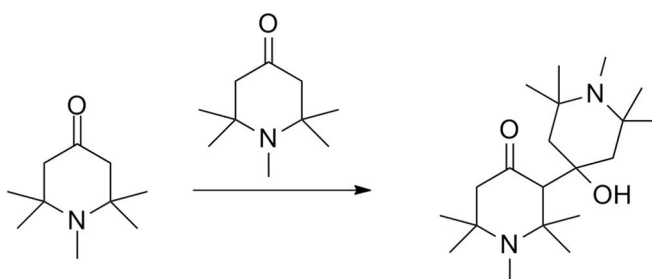
Kuva 50. Synteesireitti A.

Reaktiossa ei kuitenkaan syntynyt haluttua tuotetta vaan tuotteen analysoinnin perusteella reaktio oli kesken. Näytteen NMR- ja massaspektrien perusteella (liite, sivu 2, kuvat L3-L4) substituutio oli tapahtunut vain toiselle puolelle molekyyliä ja tuotteena saatiin 1-atsa-2,2-dimetyyli-9-tiaspiro[5.5]undekan-4-oni (**7**). Synteesireitin 2,6-substituutioreaktion mekanismi on esitetty kuvassa 51.



Kuva 51. 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidin-4-onin 2,6-substituutioreaktion mekanismi.¹¹²

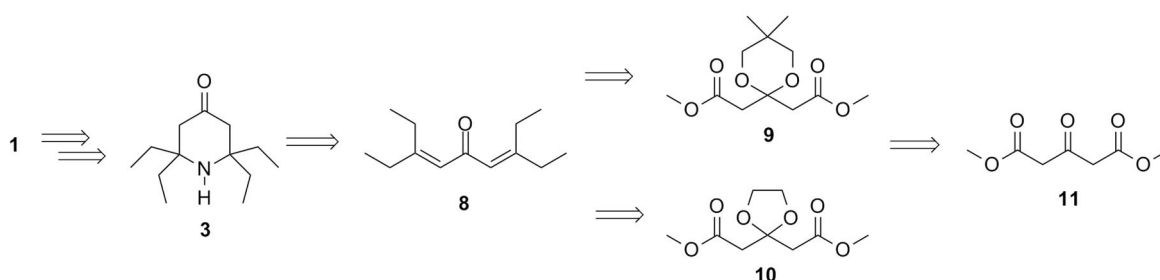
Reaktio tapahtuu aldolireaktion mekanismin mukaisesti, mikä voi aiheuttaa ongelmia reaktion spesifisyyden kanssa. Lähtötuote voi kondensoitua reagenssina käytetyn karbonyyliyhdisteen lisäksi itsensä kanssa (kuva 52). Tämä voi ilmetä halutun lopputuotteen huonona saantona.



Kuva 52. Aldolireaktion vaihtoehtoinen reitti.

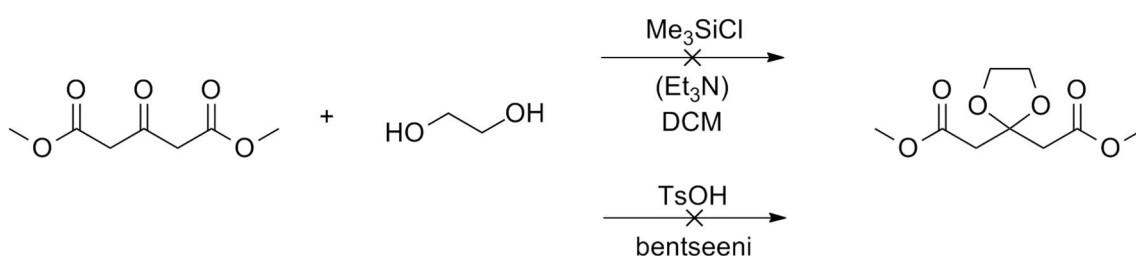
8.1.2 Synteesireitti B: karbonyyli-väliuotteen kautta

Synteesireitti A:n osoittauduttua huonoksi, seuraava reitti suunniteltiin kirjallisuudessa esitetyn syklistointireaktion¹¹³ pohjalta. Julkaisussa on esitetty tetraetyylipiperidinonin (**3**) muodostus avoketjuisesta karbonyyliyhdysaineesta (**8**). Kyseisen karbonyyliyhdysaineen (**8**) valmistuksessa päätettiin käyttää Grignardin reaktiota. Retrosynteettisessä analyysissä kuvassa 53 on esitetty lähtöaineena käytetty karbonyyliasetaatyiyhdysaine (**11**), joka suojattiin ketaalisuojauksella ennen Grignardin reaktiota.



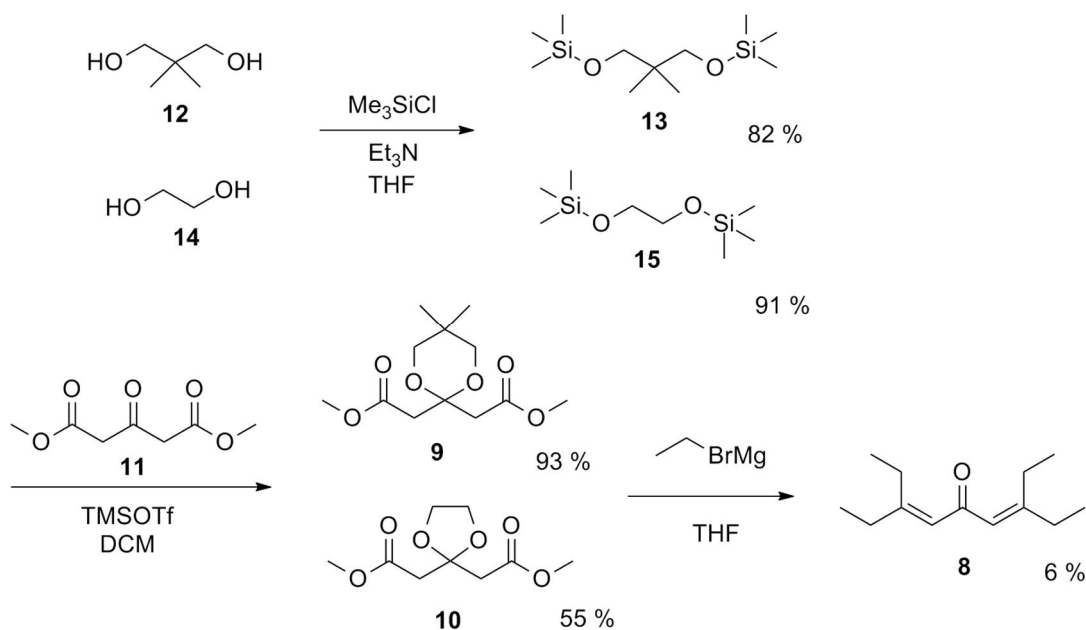
Kuva 53. Retrosynteettinen analyysi synteesireitistä B.

Reaktion ensimmäisessä vaiheessa lähtöaineen (**11**) keskimmäinen karbonyyliryhmä suojattiin ketaalisuojauksella. Suojauksessa kokeiltiin useita perinteisiä asetylointimenetelmiä, kuten refluksointia klooritrimetyylisilaanin kanssa¹¹⁴ ja atseotroopista tislausta *p*-tolueenisulfonihapon ja bentseenin kanssa¹¹⁵ (kuva 54). Kaikki edellä mainitut menetelmät kuitenkin epäonnistuivat.



Kuva 54. Perinteisiä menetelmiä karbonyylien asetaalisuojauksessa.¹¹⁴⁻¹¹⁵

Arnott *et al.*¹¹⁶ olivat havainneet saman ongelman ja onnistuneet suojauksessa Noyorin¹¹⁷ menetelmällä. Menetelmässä valmistettiin aluksi bis(trimetyylisilyliokso)alkyyli (**13,14**), joka reagoi lähtöaineen (**11**) kanssa muodostaen ketaalisuojatun diasetaatin. Suojauksen jälkeen suoritettiin nelinkertainen Grignardin reaktio, missä reagenssina käytettiin etyyli-bromidia (kuva 55).

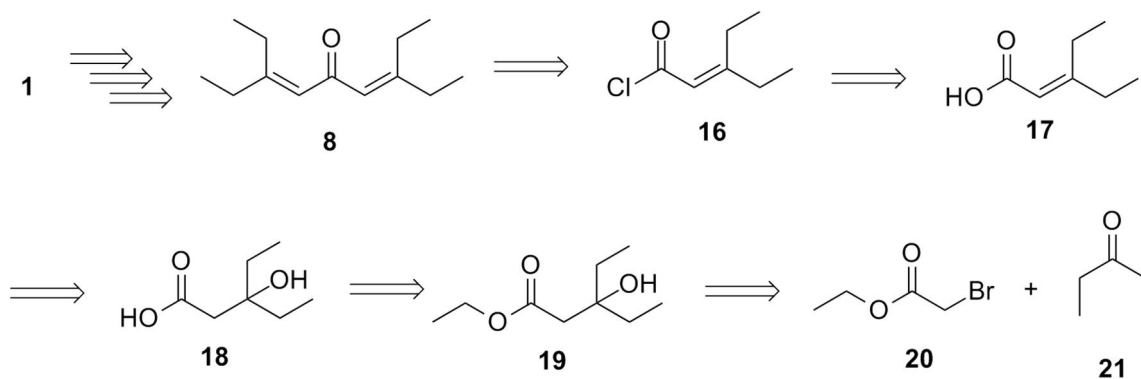


Kuva 55. Synteesireitti B.

Synteesireitin heikkoudeksi kuitenkin osoittautui Grignardin reaktion huono saanto. Tämä saattoi johtua siitä, että Grignardin reagenssia tarvittiin neljä ekvivalenttia, ja ongelmaksi saattoi muodostua steerisyys.

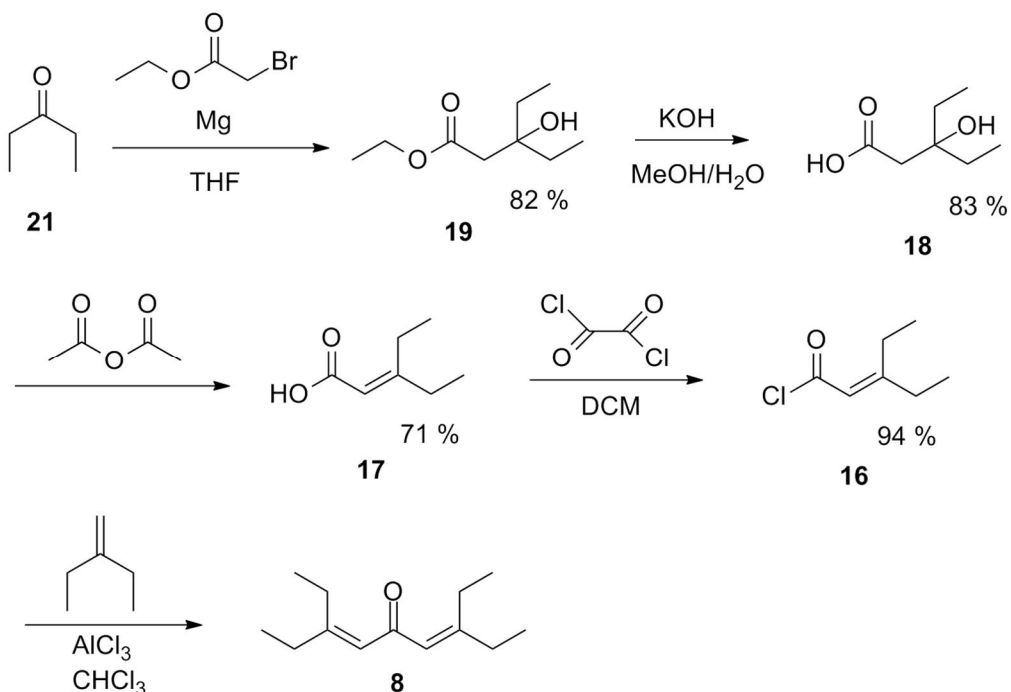
8.1.3 Synteesireitti C: happokloridin olefinaation kautta

Synteesireitti C¹¹⁸ perustui samaan syklisointireaktioon kuin reitti B. Tavoitteena oli valmistaa karbonyyliväliuotetta (8) paremmalla saannolla. Reitin retrosynteettinen analyysi on esitetty kuvassa 56. Se perustui happokloridin (16) valmistukseen sekä sen olefinointiin 2-etyylibuteenilla tuottaen karbonyylin 8. Happokloridi (16) valmistettiin vastaavasta karboksyylihaposta (17) oksalyylidikloridilla¹¹⁹. Karboksyylihappo (17) taas muodostettiin β -hydroksiesterin (19) hydrolyysin ja näin muodostuneen β -hydroksihapon (18) dehydraation kautta.



Kuva 56. Retrosynteettinen analyysi synteeseistä C.¹¹⁸⁻¹¹⁹

Kuvassa 57 esitetyn synteeseitin ensimmäinen vaihe koostui etyylibromiasetaatin reaktiosta 3-pentanonin (**21**) kanssa. Reaktio noudatti Reformansky-mekanismia, kuitenkin eroten perinteisestä menetelmästä siten, että metallina käytettiin sinkin sijaan magnesiumia. Reaktion tuotteena saatu β -hydroksiesteri (**19**) hydrolysoitiin kaliumhydroksidilla ja β -hydroksihappo (**18**) dehydratisoitiin etikkahapon anhydridillä. Happokloridin (**16**) muodostuksen jälkeen sen annettiin reagoida 2-etyylibuteenin kanssa Lewisin hapon läsnä ollessa¹²⁰.

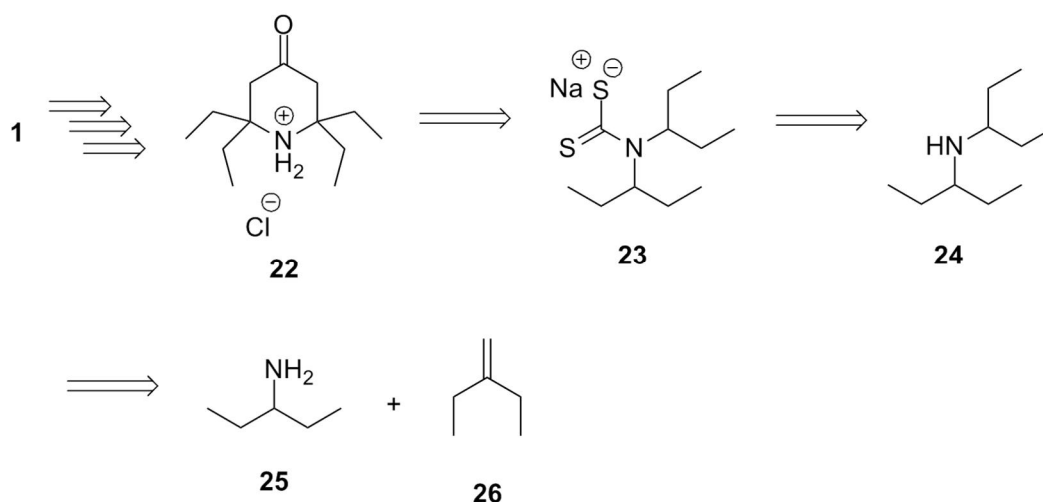


Kuva 57. Synteeseitti C.

Tuotteeksi saadun yhdisteen massapetri (liite, sivu 10, kuva L18) ja DOSY-NMR-kokeen tulokset kuitenkin osoittivat, että tuote oli muodostanut polymeerin. Kuitenkin reaktioseoksesta ajatun massaspektrin perusteella reaktiossa muodostui oikeaa tuotetta (liite, sivu 10, kuva L19). Tästä voitiin päätellä, että tuote ei ole stabiili ja polymerisoituu joko puhdistuksen, ajan tai jonkin muun tekijän vaikutuksesta.

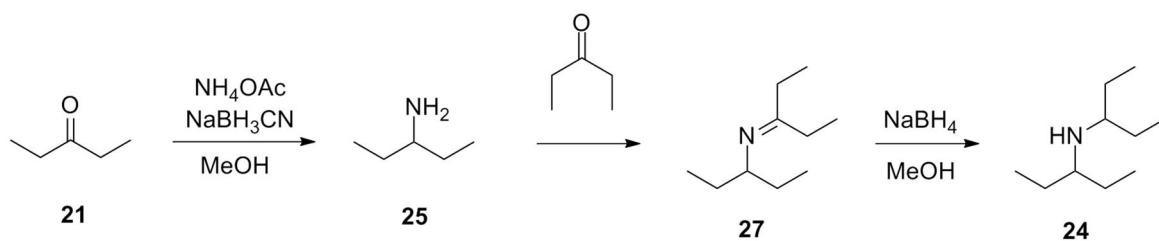
8.1.4 Synteesireitti D: ditiokarbamaatti-väliuotteen kautta

Synteesireitti D¹²¹ koostui ditiokarbamaatti-väliuotteen (**23**) valmistuksesta. Kirjallisuudessa on raportoitu menetelmä tetraetyylipiperidinonin (**22**) valmistukselle ditiokarbamaatin (**23**) reaktiolla asetonin kanssa Lewisin hapon läsnä ollessa. Reitin retrosynteettinen analyysi on esitetty kuvassa 58. Väliuote ditiokarbamaatti (**23**) valmistettiin sekundäärisestä amiinista (**24**), joka muodostettiin primäärisen amiinin (**25**) pelkistävällä substituutilla¹²².



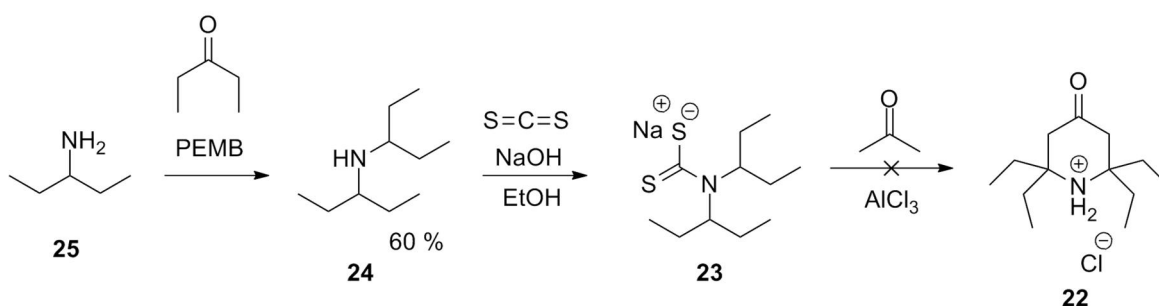
Kuva 58. Retrosynteettinen analyysi synteesireitille D.¹²¹⁻¹²²

Synteesisuunnitelma (kuva 59) sisälsi sekundäärisen amiinin valmistuksen vastaavan imiinin (**27**) pelkistyksellä. Imiinin valmistuksessa kokeiltiin niin atseotrooppista tislausta trifluoretikkahapon ja tolueenin kanssa¹²³ kuin reaktiota Ti_4Cl_n kanssa¹²⁴, mutta reaktion loppuunsaattaminen osoittautui ongelmalliseksi.



Kuva 59. Synteesisuunnitelma sekundäärisen amiinin muodostukselle imiinin kautta.

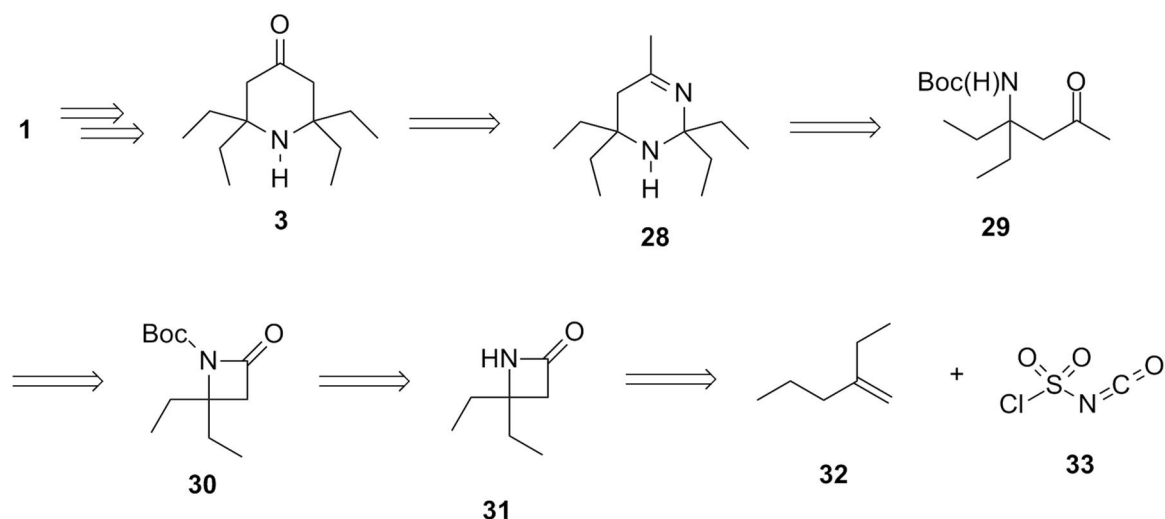
Helpompi ja käytännöllisempi menetelmä sekundäärisen amiinin valmistukselle löytyi kirjallisuudesta.¹²² Menetelmän synteesireitti on esitetty kuvassa 60. Synteesissä sekundääri-amiini (**24**) muodostettiin suoraan primäärisestä amiinista (**24**) pelkistävällä aminoinnilla. Reagenssina käytettiin 5-etyyli-2-metyylipyridiini boraania (PEMB). Ditiokarbamaatti (**23**) valmistettiin sekundäärisen amiinin (**24**) reaktiolla rikkihiilen kanssa NaOH-etanoli-liuoksessa.¹²⁵ Kirjallisuudessa esitetty menetelmä piperidinonin (**22**) valmistukselle ditiokarbamaatista (**23**) osoittautui kuitenkin toimimattomaksi.



Kuva 60. Synteesireitti D.

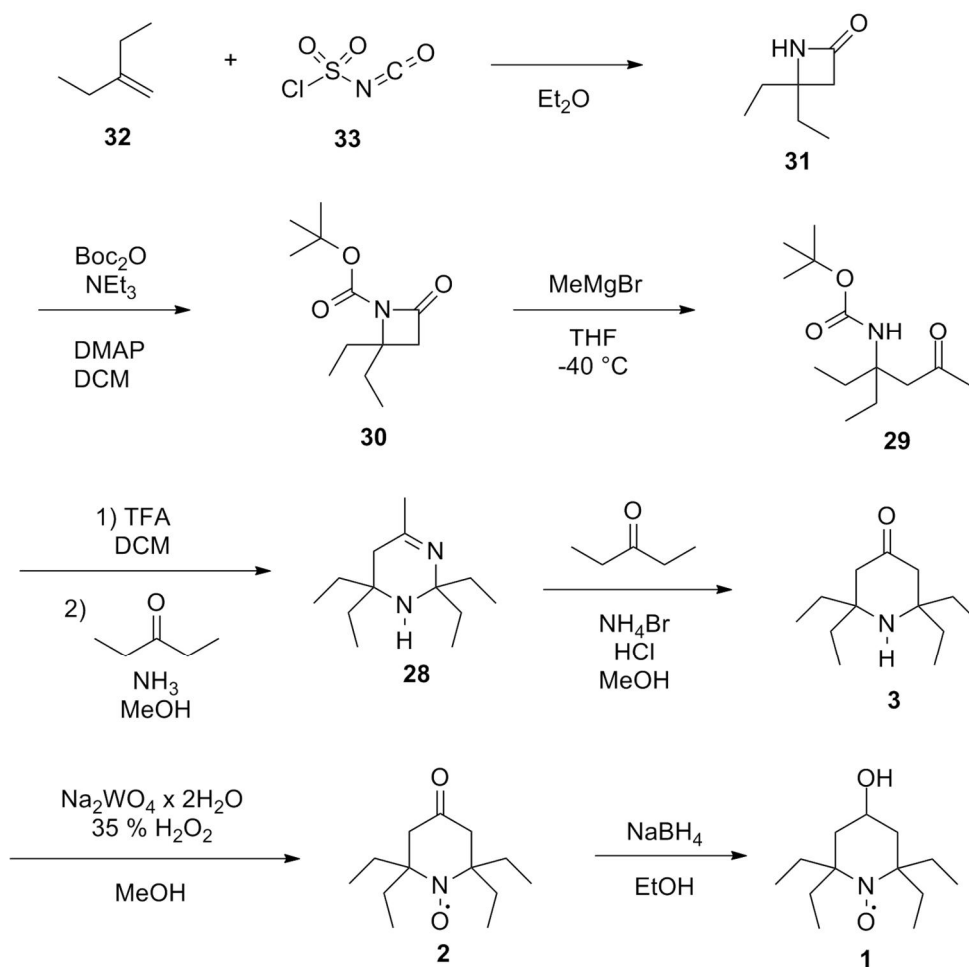
8.1.5 Synteesireitti E: monivaiheinen synteesi

Synteesireitti E¹²⁶ koostui useasta vaiheesta. Reitin retrosynteettinen analyysi on esitetty kuvassa 61. Menetelmässä piperidinoni (**3**) muodostettiin pyrimidiinistä (**28**), joka sykli-soitiin β -aminoketonista (**29**). β -aminoketoni (**29**) valmistettiin syklisestä amidista eli β -laktaamista (**31**), joka oli suojattu di-*tert*-butyylidikarbonaatti (boc) -suojuksella (**30**). β -laktaami (**31**) valmistettiin 2-etyylibuteenin (**32**) reaktiolla kloorisulfonyyli-isosyanaatin (CSI) (**33**) kanssa.



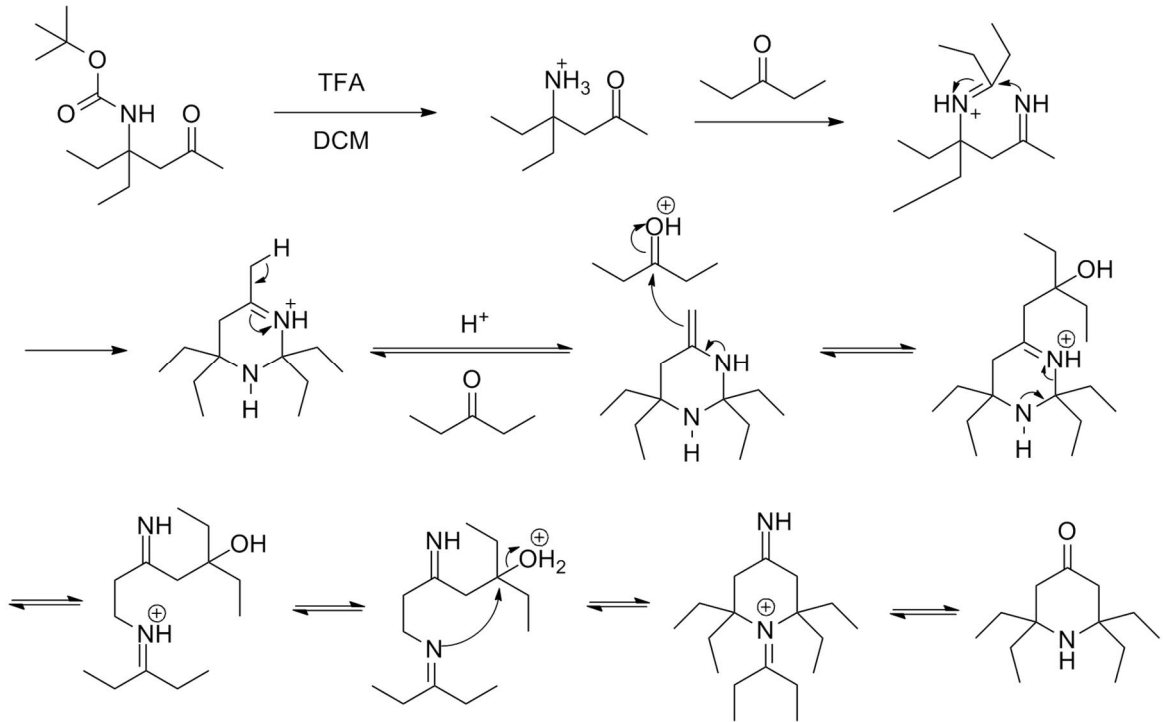
Kuva 61. Retrosynteettinen analyysi synteisireitille E.

Reaktion ensimmäisessä vaiheessa muodostettiin β -laktaami (**31**), joka suojattiin perinteisellä Boc-suojauksella. Seuraavaksi muodostettiin β -aminoketoni (**29**) Grignardin reaktiolla, jossa reagenssina toimi metyylibromidi. Boc-suojaus poistettiin trifluoretikkahapolla, ja β -aminoketoni (**29**) reagoi ammoniakkin kanssa muodostaen pyrimidiinin (**28**). Pyrimidiini (**28**) taas reagoi 3-pentanonin kanssa, jolloin tuotteksi saatiin piperidinoni (**3**). Radikaali 4-okso-TEEPO (**2**) muodostettiin hapettamalla piperidinoni (**3**) vetyperoksidilla volframaattikatalyytin läsnä ollessa. Lopuksi 4-okso-TEEPO (**2**) pelkistettiin TEEPOL:ksi (**1**) NaBH_4 :lla. Synteisireitti on esitetty kuvassa 62.



Kuva 62. Synteesireitti E.

Synteesireitti E osoittautui toimivaksi ja TEEPOL saatiin valmistettua. Mekanismi piperidinonin (**3**) valmistukselle Boc-suojatusta β -aminoketonista (**29**) on esitetty kuvassa 63.¹²⁷ Pääpiirteissään mekanismi koostuu pyrimidiinin (**28**) muodostumisesta iminiväliuotteen kautta ja sen purkautumisesta ja uudelleenkokoonontumisesta piperidiniumiksi (**3**).



Kuva 63. Reaktiomekanismi piperidinonin valmistukselle Boc-suojatusta aminoketonista pyrimidiinin kautta.¹²⁷

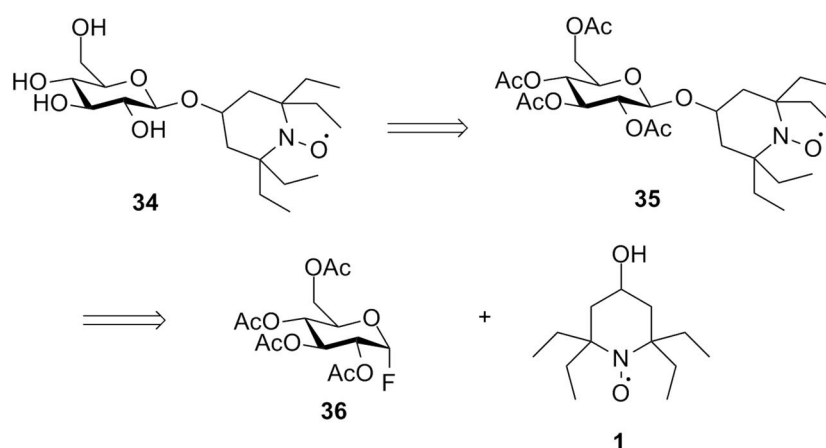
8.1.6 TEEPOL:n glykosylointi

Lopullinen TEEPO-glukoosikonjugaatti valmistettiin TEEPOL:n glykolysoinnilla. Kirjallisuudessa on esitetty runsaasti eri menetelmiä glykosylointireaktioille.¹²⁸ Reaktiossa sokeri toimii elektrofiilinä (donori) ja alkoholi nukleofiilinä (akseptori). Lisäksi tarvitaan promootori, joka toimii reaktiossa aktivaattorina. Donorin rakennetta muunneltiin vaihtelemalla sen lähtevää ryhmää. Lähtevä ryhmä voi olla esimerkiksi halogeeni- tai rikkiyhdiste. Koska TEEPOL:n valmistus oli aikaavievää ja vaati useita eri synteesivaiheita, oli ainetta käytettävissä niukalti. Näin ollen glykolysointireaktion optimoinnissa käytettiin malliaineena TEMPOL:a. Taulukossa 1 on esitetty menetelmät, joita kokeiltiin synteesissä.

Talukko 1. Testatut glykosylointimenetelmät.^{128b, 129}

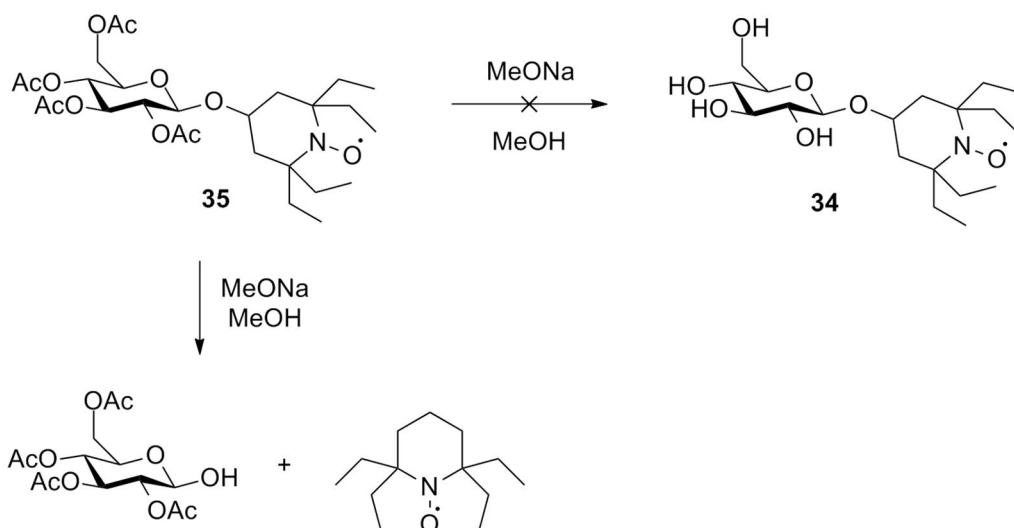
Donori	Promoottori	Emäs	Liutotin
Glc-Br	AgOTf	-	CHCl ₃
Glc-Br	AgOTf	2,4,6-kollidiini	DCM
Glc-Br	AgCO ₃	-	DCM
Glc-Br	AgOTf	-	MeCN
Glc-F	BF ₃ ·Et ₂ O	-	DCM

Parhaiten toimiva menetelmä oli asetofluori- α -D-glukoosin reaktio BF₃·Et₂O-promoottorin kanssa.^{129b} Kuvassa on esitetty glykosylointireaktion retrosynteettinen analyysi. Synteesireitin viimeisessä vaiheessa poistettiin asetaalisuojaryhmät.



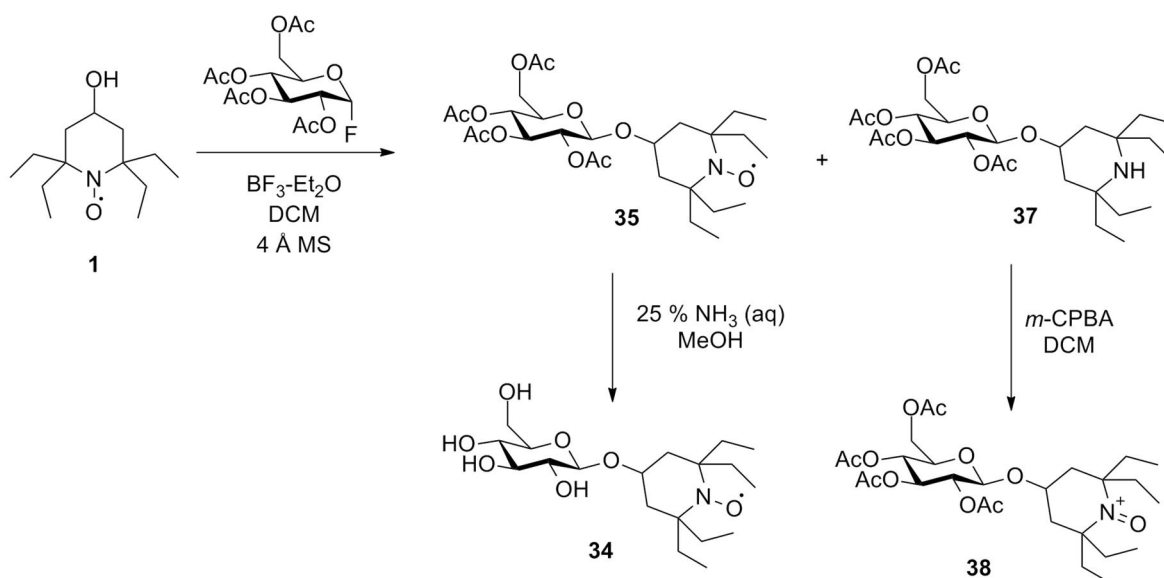
Kuva 64. Retrosynteettinen analyysi glykolysointireaktiolle.

Glykosylointireaktiossa muodostui haluttu tetra-asetyloitu TEEPO-Glc (**35**) ja sivutuotteena muodostui tetraetyylipiperidiini-Glc (**37**). Sivutuotteena syntynyt amiini yritettiin kiertää takaisin radikaaliksi hapettamalla *m*-CPBA:lla, mutta yhdiste ylihapettui oksopiperidiniumioniksi (**38**). Yhdisteen **38** IR-spektrissä voitiin havaita ryhmälle ominainen signaali taajuudella 1534 cm⁻¹ (liite, s. 34, kuva 63).¹³⁰ Suojaryhmien poistoon testattiin myös eri vaihtoehtoja, kuten Zemplén de-*O*-asetylaatiota^{129a}, kaliumsyanaattia etanolissa¹³¹ ja kaliumkarbonaattia metanolissa¹³². Nämä menetelmät joko eivät aiheuttaneet mitään muutoksia yhdisteessä tai hajottivat yhdisteen glukoosiksi ja amiiniksi (kuva 65).



Kuva 65. Tetra-asetyloidun TEEPO-Glc:n käsittely natrium-metoksilla.

Parhaiten toimiva menetelmä oli kuitenkin yhdisteen käsittely ammoniakkin vesiliuoksella¹³³. Glykosylointimenetelmän koko synteesireitti on esitetty kuvassa 66.



Kuva 66. Synteesireitti E:n suoritus.

Tuotteet **35-38** analysoitiin NMR-spektroskopiolla pelkistämällä ne aluksi hydrazobentseenillä vastaavaksi hydroksiamiiniksi.⁵² Analyysin mukaan lopputuote **36** sisälsi suojarühmien poiston yhteydessä sivutuotteena muodostunutta asetamidia, mikä täytyi ottaa huomioon jatkokokeissa. Lisäksi NMR-spektriin perusteella selvitettiin yhdisteen stereorakenne perustuen anomeerisen protonin (*H-1'*) ja protonin *H-2'* välisen visinaalisen kytketymsvakiön ($^3J_{HH}$) suuruuteen. Mitattua arvoa (8,0 Hz) verrattiin kirjallisuusarvoon (7,9 Hz)^{129b} ja vertailun perusteella tuotteen todettiin olevan β -muotoa.

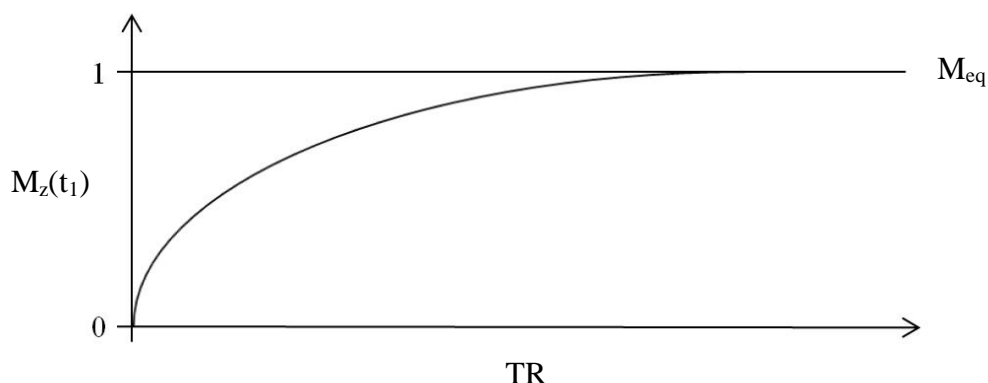
8.2 *In vitro* NMR testaus

Työn toinen osio koostui TEEPO-glukoosikonjugaatin *in vitro* NMR testauksesta. Mittaukset koostuivat veriplasman veden T_1 - ja T_2 -relaksaatioaikojen mittauksista TEEPO-Gl-konjugaatin konsentraation funktiona. T_1 -mittauksiin käytettiin kyllästys-palautumiskoetta (*saturation-recovery*) perinteisen kääntämis-palautumiskokeen (*inversion-recovery*) sijaan johtuen suuren vesisignaalin aiheuttamasta niin kutsutusta radiation damping-ilmiöstä. Ilmiön vuoksi kääntämis-palautumiskokeessa tarvittavaa riittävän tarkkaa 180° -pulsia ei ole mahdollista saavuttaa. Kyllästymis-palautumiskoe toteutettiin mitaten sarja normaaleja ^1H -spektrejä erilaisilla toistoväleillä TR (TR=relaksaatioviive (D_1) + keräysaika (AT)).

Kyllästymis-palautumiskokeessa magnetisaatio noudattaa yhtälöä:

$$M_z(t_1) = M_{eq} \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \quad (6)$$

Kaavan 5 mukaan voidaan piirtää kuvassa 68 esitetty kehittymiskäyrä.

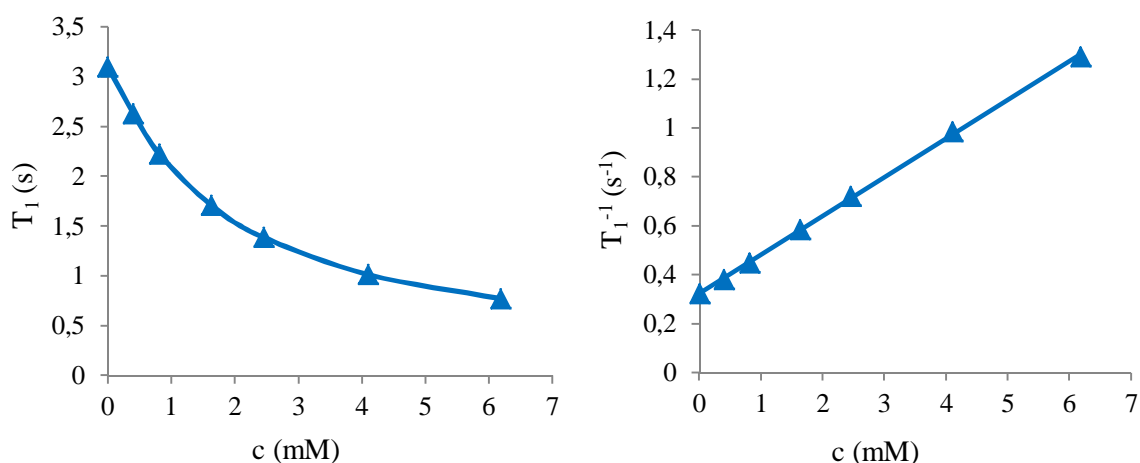


Kuva 68. Kyllästymis-palautumissequenssikokeen kehittymiskäyrä.

Taulukoissa 2 ja on esitetty relaksaatiomittauksissa käytettyjen näytteiden konsentraatiot ja niitä vastaavat T_1 ja T_2 –relaksaatioajat ja -nopeudet. Kuvissa 69 ja 70 on esitetty vastavasti näytteiden T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat ja -nopeudet konsentraatioin funktiona. Kuvista havaitaan, että valmistettu TEEPO-Glc-konjugaatti lyhentää veden protonin relaksaatioaikaa huomattavasti. Toisin sanoen yhdiste käyttäytyy MRI-kontrastiaineiden tavoin. Lisäksi kuvista nähdään, että relaksaatioajat lyhenevät eksponentiaalisesti näytteiden konsentraatioiden suhteen.

Taulukko 2. Relaksaatiomittauksissa käytetyt konsentraatiot ja niitä vastaavat T_1 -relaksaatioajat ja –relaksaationopeudet.

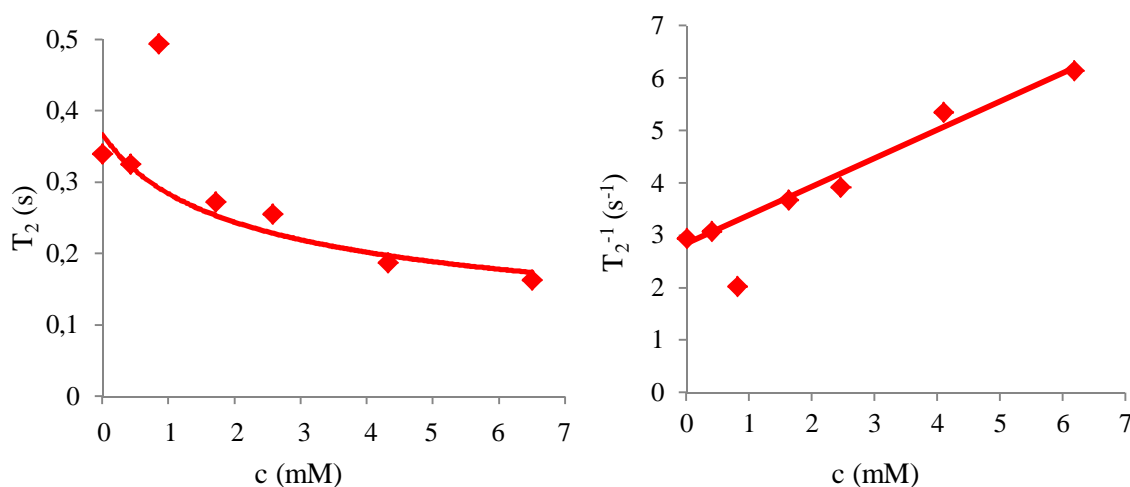
c (mM)	T_1 (s)	T_1^{-1} (s^{-1})
0	3,1000	0,3226
0,4	2,6320	0,3799
0,8	2,2220	0,4500
1,6	1,7070	0,5858
2,5	1,3880	0,7205
4,1	1,0140	0,9862
6,2	0,7738	1,2923



Kuva 69. Veden **a)** T_1 -relaksaatioajat (s) **b)** T_1 -relaksaationopeudet (s^{-1}) TEEPO-Glc:n konsentraation (mM) suhteen.

Taulukko 3. Relaksaatiomittauksissa käytetyt konsentraatiot ja niitä vastaavat T_2 -relaksaatioajat ja $-$ relaksaationopeudet.

c (mM)	T_2 (s)	T_2^{-1} (s^{-1})
0	0,3399	2,9420
0,4	0,3253	3,0741
0,8	0,4943	2,0231
1,6	0,2724	3,6711
2,5	0,2556	3,9124
4,1	0,1872	5,3419
6,2	0,1630	6,1350

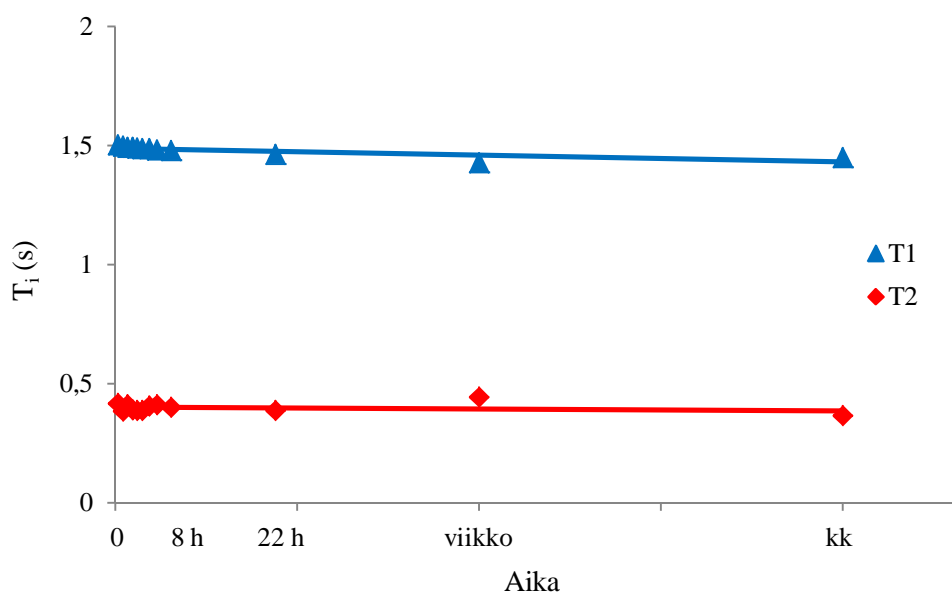


Kuva 70. Veden **a)** T_2 -relaksaatioajat (s) **b)** T_2 -relaksaationopeudet (s^{-1}) TEEPO-Glc:n konsentraation (mM) suhteen.

Relaksaatiotitrausten lisäksi testattiin TEEPO-Glc:n stabiiliutta veri-plasmassa 37 °C:ssa. Näytteestä mitattiin relaksaatioajat tasaisin väliajoin. Yhdiste osoittautui erittäin stabiiliksi. Näytteen relaksointiominaisuudet eivät olleet muuttuneet lainkaan, kun näytettä oli säilytetty 37 °C:ssa viikko. Taulukossa 4 on esitetty näytteen säilytysajat ja niitä vastaavat T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat. Kuvassa 71 on esitetty relaksaatioaikojen muutos ajan funktiona.

Taulukko 4. TEEPO-Glc-näytteen (2,5 mM) T_1 ja T_2 relaksaatioajat, kun näytettä on säilytetty 37 °C:ssa tietty aika.

aika	T_1 (s)	T_2 (s)
20 min	1,505	0,4188
60 min	1,498	0,3852
100 min	1,494	0,4133
140 min	1,492	0,3898
180 min	1,490	0,3871
220 min	1,489	0,3867
280 min	1,487	0,4078
340 min	1,483	0,4134
460 min	1,480	0,4004
22 h	1,464	0,3868
viikko	1,428	0,4451
kk	1,451	0,3658



Kuva 71. Relaksaatioaikojen (T_1 ja T_2) muutos ajan funktiona.

9. Menetelmät

Yleiset menetelmät: Reagenssit hankittiin kaupallisista lähteistä (Sigma Aldrich, TCI) ja käytettiin ilman erillistä esipuhdistusta lukuunottamatta trietyyliamiinia, joka tislattiin. Veriplasma hankittiin Suomen Punaisen Ristin veripalvelusta.

Laitteistot kuivattiin tarpeen vaatiessa säilyttämällä niitä yön yli lämpökaapissa (100 °C) tai vaihtoehtoisesti liekittämällä. Jäähdytys suoritettiin argon-virrassa tai vakuumissa. Liuottimet kuivattiin tarvittaessa siten, että niiden joukkoon lisättiin Na-lastuja, minkä jälkeen niiden annettiin kuivua yön yli CaCl₂-putkella varustetussa kolvissa. Lopuksi liuottimet tislattiin natriumin päältä kuivatulla tisluslaitteistolla.

Reaktioiden etenemistä seurattiin Merckin Silicagel 60 F₂₅₄ TLC-levyillä, ja visualisoitiin UV-valolla tai värjäämällä. Värjäysaineina käytettiin *p*-anisaldehydi-, ninhydriini- tai KMnO₄-värjäysliuosta. Anisaldehydiliuos sisälsi etikkahappoa, *p*-anisaldehydiä ja rikkihappoa etanolissa, ninhydriiniliuos ninhydriiniä ja etikkahappoa *n*-butanolissa ja KMnO₄-liuos KMnO₄:a, K₂CO₃:a ja NaOH:a vedessä. Tuotteet puhdistettiin kromatografisesti käyttäen Merckin Silicagel 60 silikageeliä.

¹H- ja ¹³C-NMR-spektrit mitattiin Varian Mercury 300 MHz tai Varian Unity Inova 500 MHz NMR-spektrometreillä. Liuottimina käytettiin CDCl₃:a, D₂O:a tai CD₃OD:a. Radikaalien NMR-analyysiä varten yhdisteet pelkistettiin liuottamalla näytteet sopivaan deuteoituun liuottimeen ja lisäämällä joukkoon ylimäärä hydratsobentseeniä. NMR-spektrit prosessoitiin MestReNova-ohjelmalla. Yhdisteiden **7**, **24**, **29** ja **28** ¹H- ja ¹³C-NMR-spektreille tehtiin spektriparametrien (kemialliset siirtymät ja ¹H¹H–kytkentävakiot) ratkaisemiseksi spektrianalyysi käyttäen Perch-analyysiohjelmaa.

MS-spektrit mitattiin Applied BioSystems Mariner ESI-TOF – spektrometrilla tai JEOL JMS-700 MStation EI-MS – spektrometrilla. IR-spektrit mitattiin Brukerin Alpha ATR-FTIR –spektrometrilla.

9.1 Synteesireitti A

1,2,2,6,6-pentametyylipiperidin-4-oni (5): 2,2,6,6-tetrametyylipiperidin-4-oni (10 g; 64,4 mmol) liuotettiin 25 ml:aan asetonia ja seokseen lisättiin 4,5 g (32,6 mmol) K₂CO₃. Metyylijodidi (4,45 ml; 71,5 mmol) lisättiin hitaasti tipoittain huoneenlämmössä sekoitta-

en. Reaktioseoksen väri muuttui lisäyksen aikana punertavaksi. Sekoitusta jatkettiin yön yli. Yön aikana seoksen väri oli muuttunut ruskeaksi ja reaktioastian pohjalle oli muodostunut valkoinen saostuma. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun reaktio oli valmis, seos siirrettiin erotussuppiloon ja reaktioastia huuhdottiin huolellisesti etyyliasetaatilla ja vedellä. Seokseen lisättiin 1 M NaOH- liuosta, ja emäksistä vesifaasia uutettiin kolme kertaa etyyliasetaatilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin vedellä ja kyllästetyllä NaCl-liuoksella. Liuos kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote ajettiin ohuen silikakerroksen läpi alipaineella käyttäen eluenttina heksaani-etyyli-asetaatiseosta (1:1). Tuotteeksi saatiin punertavan ruskea neste. Reaktion saanto oli 83 %.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 2,37 (s, 4 H, CH₂), 2,32 (s, 3 H, CH₃), 1,13 (s, 12 H, CH₃). ¹³C NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 210,12 (CO), 58,84 (C), 55,78 (CH₂), 28,70 (CH₃), 27,35 (CH₃). MS (ESI) C₁₀H₁₉NO: laskettu: 170,26 [M+H]⁺, 192,26 [M+Na]⁺ havaittu: 170,2 [M+H]⁺, 192,2 [M+Na]⁺.

7-atsa-3,11-ditiadispiro[5.1.5.3]heksadekan-15-oni (4): 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidin-4-oni (**5**; 1,69 g; 10,0 mmol) ja tetrahydro-4*H*-tiopyran-4-oni (3,49 g; 30,0 mmol) liuotettiin DMSO:iin (15 ml). Ammoniumkloridi (3,21 g; 60,0 mmol) lisättiin seokseen pienissä erissä huoneenlämmössä sekoittaen. Reaktioseosta sekoitettiin 60 °C:ssa viisi tuntia. Reaktion aikana seoksen väri oli muuttunut punaisesta ruskeaksi. Seos siirrettiin erotussuppiloon, laimennettiin vedellä (40 ml) ja joukkoon lisättiin 10 ml 7 % HCl-vesiliuosta. Hapan vesiliuos uutettiin eetterillä kolme kertaa (30 ml). Vesifaasi tehtiin emäksiseksi 10 % K₂CO₃-vesiliuoksella ja uutettiin neljä kertaa etyyliasetaatilla (30 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella, kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Ruskea tuote puhdistettiin flash-kromatografialla käyttäen eluenttina heksaani/etyyliasetaatia (1:1) – seosta. Massaspektrin mukaan tuote ei ollut kuitenkaan oikea. MS- ja NMR -spektrien perusteella reaktion tuotteeksi saatiin 2,2-dimetyyli-9-tia-1-1-atsaspiro[5.5]undekan-4-oni (**7**).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 3,00 (m, ³J=2,70 Hz; 10,74 Hz, ²J=13,24 Hz, 1 H, CH₂), 3,00 (m, ³J=2,64 Hz; 10,79 Hz, ²J=14,03 Hz, 1 H, CH₂), 2,28 (s, 2 H, CH₂), 2,23 (s, 2 H, CH₂), 1,93 (m, ³J=2,70 Hz; 5,96 Hz, ²J=13,61 Hz, 1 H, CH₂), 1,92 (m, ³J=2,64 Hz; 5,78 Hz, ²J=14,15 Hz, 1 H, CH₂), 1,23 (s, 6 H, 2xCH₃). MS (ESI) C₁₁H₁₉NOS: laskettu: 214,34 [M+H]⁺, 236,34 [M+Na]⁺ havaittu: 214,2 [M+H]⁺, 236,1 [M+Na]⁺.

9.2 Synteesireitti B

1,3-bis(trimetyylisilylioksi)-2,2-dimetyylipropaani (13): Neopentyyliglykoli (1 g; 9,6 mmol) ja THF mitattiin kaksikaulakolviin. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja toinen kaula suljettiin septumilla. Seokseen lisättiin septumin läpi ruiskulla klooritrimetyylisilaani (2,7 ml; 21,3 mmol) ja trietyyliamiini (2,9 ml; 20,8 mmol). Seokseen muodostui valkoinen saostuma. Sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä yön yli, minkä jälkeen seos siirrettiin erotussuppiloon, laimennettiin eetterillä ja pestiin vedellä kaksi kertaa. Lopuksi orgaaninen faasi pestiin kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihduutettiin kuiviin. Reaktio saanto oli 82 %. Tuotteeksi saatiin vaalean kellertävä kirkas liuos.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 3,28 (s, 4 H, CH₂), 0,80 (s, 6 H, 2xCH₃), 0,08 (s, 18 H, 6xCH₃).

Dimetyyli-2,2'-(5,5-dimetyyli-1,3-dioksaani-2,2-diyyli)diasetaatti (9): Kuivaan kolviin mitattiin 8 ml dikloorimetaania ja 0,05 ml (0,3 mmol) trimetyylisilyyli trifluorimetaanisulfonaattia (TMSOTf). Seos asetettiin NaCl-jäähauteseen ja joukkoon lisättiin hitaasti 5,1 g (20,5 mmol) 1,3-bis(trimetyylisilylioksi)-2,2-dimetyylipropaania (13). Dimetyyliasetonidikarboksylaatti (2,5 ml; 17,2 mmol) liuotettiin 6 ml:aan dikloorimetaania ja lisättiin reaktioseokseen. Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:n avulla. Kun reaktio oli valmis, kolvi asetettiin jäähauteseen ja seokseen lisättiin 0,6 ml pyridiiniä. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja joukkoon lisättiin 60 ml kyllästettyä NaHCO₃-vesiliuosta. Vesifaasi uutettiin kolme kertaa etyyliasetaatilla (50 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihduutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiolla käyttäen eluenttina heksaani/etyyliasetaatia (7:3) – seosta. Reaktio saanto oli 93 %.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 3,69 (s, 6 H, 2xCH₃), 3,55 (s, 4 H, 2xCH₂), 3,07 (s, 4 H, 2xCH₂), 0,95 (s, 6 H, 2xCH₃).

3,7-dietyliinona-3,6-dien-5-oni (8): Kuivaan kolmikaulakolviin mitattiin 0,58 g (23,9 mmol) magnesiumia, 10 ml kuivattua THF:a ja jodikide. Kolvin päälle asetettiin pystyjäähdytin ja CaCl-putki. Kolvin toiseen kaulaan asetettiin tiputussuppilo, johon mitattiin 10 ml THF:a ja 1,72 ml (23,0 mmol) etyylibromidia. Reagenssiliuosta laskettiin pieni määrä reaktiokolviin, ja samalla reaktioseosta alettiin sekoittaa varovasti. Reaktio käynnistyminen havaittiin värimuutoksella (punertavasta harmaaksi) ja kolvin lämpenemisellä. Tiputussup-

piloon lisättiin vielä 10 ml kuivattua THF:a ja loput reagenssiliuoksesta lisättiin hitaasti reaktioseoksen joukkoon. Lisäyksen jälkeen seosta refluksoitettiin 10 minuuttia. Seos jäähdytettiin asettamalla kolvi jäähauteeseen. Tipustussuppiloon mitattiin 10 ml THF:a ja 1 g (3,8 mmol) dimetyyli-2,2'-(5,5-dimetyyli-1,3-dioksaani-2,2-di-yyli)diasetaattia (**9**). Liuos lisättiin reaktioseokseen tipoitain. Lisäyksen aikana seoksen väri muuttui aluksi kellertäväksi ja lopulta punertavaksi. Lähtöaineen lisäyksen jälkeen seosta refluksoitettiin puoli tuntia. Kolvi asetettiin jäähauteeseen ja jäähtyneeseen seokseen lisättiin 40 ml 2 M HCl-vesiliuosta pienissä erissä. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja uutettiin neljä kertaa 40 ml:lla dietyylieetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin vedellä ja kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Ruskea tuote ajettiin lyhyen silikapylvään läpi käyttäen eluenttina heksaania. Tuoteeksi saatiin keltainen neste ja reaktion saanto oli 6 %.

MS (ESI) C₁₃H₂₂O: laskettu: 195,31 [M+H]⁺, havaittu: 195,2 [M+H]⁺.

1,3-bis(trimetyylisilylioksi)propaani (15): Reaktio noudatti yhdisteen **13** valmistuksessa kuvailtuja menetelmiä. Kuiva etyleeniglykoli (0,9 ml; 16,1 mmol) liuotettiin 30 ml:aan THF:a. Seokseen lisättiin 4,5 ml (35,5 mmol) klooritrimetyylisilanaa ja 4,9 ml (35,2 mmol) trietyyliamiinia. Tuote oli vaalean kellertävä kirkas liuos ja reaktion saanto oli 91 % (3,02 g).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 3,65 (s, 4 H, 2xCH₂), 0,12 (s, 18 H, 6xCH₃).

Dimetyyli-2,2'-(1,3-dioksolaani-2,2-diyyli)diasetaatti (10): Reaktio suoritettiin kuten yhdisteen **9** valmistuksessa. Kolviin mitattiin 3 ml dikloorimetaania ja 0,02 ml (0,1 mmol) trimetyylisilyyli trifluorimetaanisulfonaattia (TMSOTf). 1,3-bis(trimetyylisilylioksi)propaania (**15**) lisättiin 1,42 g (6,9 mmol) ja dimetyyliasetonidikarboksylaattia 0,83 ml (5,7 mmol) 2 ml:ssa dikloorimetaania. Tuote puhdistettiin flash-kromatografialla käyttäen eluenttina heksaani-etyyliasettaatti (3:1) – seosta. Reaktion saanto oli 55 %.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 4,00 (s, 4 H, 2xCH₂), 3,68 (s, 6 H, 2xCH₃), 2,94 (s, 4 H, 2xCH₂).

3,7-dietyliinona-3,6-dien-5-oni (8): Reaktio suoritettiin kuten aiemmin kuvailtiin, mutta tällä kertaa liuottimena käytettiin dietyylieetteriä. Kuivaan kolmikaulakolviin mitattiin 0,8 g (32,9 mmol) magnesiumia, 5 ml kuivattua dietyylieetteriä ja jodikide. Kolvin päälle ase-

tettiin pystyjäähdytin ja CaCl₂-putki. Kolvin toiseen kaulaan asetettiin tiputussuppilo, johon mitattiin 5 ml dietyylieetteriä ja 2,05 ml (27,5 mmol) etyylibromidia. Reagenssiliuosta laskettiin hiukan tiputussuppilosta reaktiokolviin ja seosta alettiin sekoittaa varovasti. Reaktion käynnistyminen havaittiin värimuutoksella (punertavasta harmaaksi) ja eetterin refluksoitumisen alkamisena. Tiputussuppiloon lisättiin vielä 5 ml kuivattua dietyylieetteriä ja loput reagenssiseoksesta lisättiin hitaasti niin, että reaktio-olosuhteet pysyivät hillittyinä. Lisäyksen jälkeen seosta refluksoitiin 10 minuuttia. Seos jäähdytettiin asettamalla kolvi jäähauteeseen ja tiputussuppiloon mitattiin 5 ml dietyylieetteriä ja 1 g (4,6 mmol) dime-tyyli-2,2'-(1,3-dioksolaani-2,2-diyylidiasetaattia (**10**). Liuos lisättiin reaktioseokseen tipoittain. Lisäyksen aikana seoksen väri muuttui vaalean kellertäväksi ja seokseen muodostui vaalea saostuma. Lähtöaineen lisäyksen jälkeen seosta refluksoitiin puoli tuntia. Kolvi asetettiin jäähauteeseen ja jäähtynyt seokseen lisättiin aluksi 0,1 M ja lopuksi 2 M HCl-vesiliuosta niin, että saatiin aikaan hapan liuos, joka ei sisältänyt kiinteitä aineita. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja uutettiin neljä kertaa 50 ml:lla dietyylieetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin vedellä ja kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Keltainen tuote ajettiin lyhyen silikapylvään läpi käyttäen eluenttina heksaania. Tuotteeksi saatiin keltainen neste ja reaktion saanto oli 6 %.

MS (ESI) C₁₃H₂₂O: laskettu: 195,31 [M+H]⁺, havaittu: 195,2 [M+H]⁺.

9.3 Synteesireitti C

3-etyyli-3-hydroksypentaanihapon etyyliesteri (19): Kuivaan 250 ml:n kolmikaulakolviin mitattiin 50 ml kuivattua THF:a, 12,3 ml, 3,10 g (127,5 mmol) magnesiumia ja jodide. Kolvin päälle asetettiin peräkkäin kaksi pystyjäädäytinjää ja CaCl-putki. Kolviin lisättiin hitaasti (116,1 mmol) dietyyliketonia ja 11,6 ml (104,5 mmol) etyylibromiasetaattia. Seosta alettiin sekoittaa varovasti huoneenlämmössä. Reaktion käynnistyttyä seoksen väri muuttui punaisesta keltaiseksi ja THF alkoi refluksoitua kiivaasti, mitä hillittiin jäähauteella. Seosta refluksoitiin tunti, minkä jälkeen se jäähdytettiin jäähauteella. Jäähtyneeseen seokseen lisättiin 200 ml kylmää 10 % rikkihappoa. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja laimennettiin 100 ml:lla eetteriä. Faasit erotettiin ja hapan vesifaasi uutettiin kaksi kertaa 50 ml:lla eetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kolme kertaa 100 ml:lla vettä, kuusi kertaa 100 ml:lla 10 % NaOH-vesiliuosta ja kaksi kertaa 100 ml:lla kyllästettyä NaCl-

vesiliuosta. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteeksi saatiin keltainen neste ja reaktion saanto oli 82 % (14,9 g).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 4,18 (q, $^3J=7,2$ Hz, 2 H, CH_2), 2,45 (s, 2 H, CH_2), 1,55 (q, $^3J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 1,54 (q, $^3J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 1,28 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3), 0,89 (t, $^3J=7,5$ Hz, 6 H, $2\times\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 173,15 (C), 73,20 (C), 60,46 (CH_2), 42,16 (CH_2), 31,09 (CH_2), 14,08 (CH_3), 7,86 (CH_3). MS (ESI) $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3$: laskettu: 197,24 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, havaittu: 196,9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-etyyli-3-hydroksipentaanihappo (18): 3-etyyli-3-hydroksipentaanihapon etyyliesteri (**19**; 13,66 g; 78,4 mmol), 60 ml metanolia ja 12 ml vettä mitattiin 250 ml:n kolviin. Seokseen lisättiin kaliumhydroksidi (6,6 g; 117,6 mmol) ja seosta refluksoitettiin yön yli. Suurin osa metanolista haihdutettiin pöyröhaihduttimella pois. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja reaktiokolvi huuhdottiin huolellisesti eetterillä ja vedellä. Erotussuppiloon lisättiin vettä yhteensä 200 ml, ja vesiliuos uutettiin kuusi kertaa 70 ml:lla eetteriä. Vesifaasi tehtiin happamaksi (pH 2-3) kylmällä väkevällä suolahappoliuoksella, ja uutettiin neljä kertaa 100 ml:lla eetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kaksi kertaa 100 ml:lla kyllästettyä NaCl -liuosta. Eetteriliuos kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteeksi saatiin kiinteä, tummankeltainen aine ja reaktion saanto oli 83 % (9,5 g).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 2,53 (s, 2H, CH_2), 1,60 (q, $^3J=7,5$ Hz, 4H, CH_2), 1,59 (q, $^3J=7,5$ Hz, 4H, CH_2), 0,91 (t, $^3J=7,5$ Hz, 6 H, $2\times\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 177,64 (C) 74,02 (C), 42,21 (CH_2), 31,15 (CH_2), 8,03 (CH_3). MS (ESI) $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_3$: laskettu: 169,18 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, havaittu: 168,9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-etyyli-2-penteenihappo (17): 3-etyyli-3-hydroksipentaanihappo (**18**; 9,5 g; 65,0 mmol) ja etikkahappoanhydridi (18,4 ml; 195 mmol) mitattiin 250 ml:n kolviin. Seosta refluksoitettiin yön yli. Seos vesihöyrytislattiin ja tislettä kerättiin kunnes se ei ollut enää sameaa vaan kirkasta, noin 250 ml. Tisle kyllästettiin NaCl :lla ja siirrettiin erotussuppiloon. Vesiliuos uutettiin neljä kertaa 100 ml:lla eetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin MgSO_4 :lla. Liuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös fraktiotislattiin alipaineessa ja tuotteeksi saatiin kirkas väritön neste (5,9 g). Tuotteen kiehumispiste oli $130\text{ }^\circ\text{C}$ 30 mmHg:ssa ja reaktion saanto 71 %.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 5,63 (s, 1H, CH), 2,63 (q, $^3J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,23 (q, $^3J=7,5$ Hz, $^4J_{\text{allyl}}=1,2$ Hz, 2 H, CH_2), 1,08 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3), 1,09 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 172,64 (C), 170,56 (C), 113,46 (CH), 31,15 (CH_2), 25,67 (CH_2), 13,02 (CH_3), 11,97 (CH_3). MS (ESI) $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$: laskettu: 129,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$, havaittu: 128,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-etyyli-2-pentenooylikloridi (16): 3-etyyli-2-penteenihappo (**17**; 5,6 g; 43,7 mmol) liuotettiin 30 ml:aan dikloorimetaania. Reaktiokolvi asetettiin jäähauteeseen ja seokseen lisättiin hitaasti 5,72 ml (65,6 mmol) oksalylylikloridia. Seosta sekoitettiin hetki jäähauteessa, sitten huoneenlämmössä yhteensä viisi tuntia. Reaktion aikana seos oli muuttunut värittömästä vaalean ruskeaksi. Seos haihdutettiin kuiviin ja jäännös tislattiin alipaineessa. Tuotteeksi saatiin kirkas kellertävä neste, jonka kiehumispiste oli 76 °C 20 mmHg:ssa. Reaktiion saanto oli 94 % (6,01 g).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 5,97 (s, 1 H, CH), 2,53 (q, $^3J=7,5$ Hz, 2 H, CH_2), 2,27 (q, $^3J=7,5$ Hz, $^4J_{\text{allyl}}=0,9$ Hz, 2 H, CH_2), 1,11 (t, $^3J=7,2$ Hz, 3 H, CH_3), 1,08 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 175,06 (C), 163,35 (C), 120,35 (CH), 31,23 (CH_2), 26,91 (CH_2), 12,48 (CH_3), 11,67 (CH_3).

3,7-dietyliinona-3,6-dien-5-oni (8): Kuivaan kaksikaulakolviin mitattiin 3-etyyli-2-pentanooylikloridi (**16**; 5,78 g; 39,4 mmol), 30 ml kloroformia ja 10,5 g (78,7 mmol) alumiinitrikloridia. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja toinen kaula suljettiin septumilla. Seokseen lisättiin hitaasti 9,61 ml (78,8 mmol) 2-etyyli-1-buteenia. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä 1,5 h ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun reaktio oli valmis, seos siirrettiin erotussuppiloon ja laimennettiin 200 ml:lla kloroformia. Orgaanista faasia pestiin vedellä, kunnes pesuvesi oli neutraalia. Lopuksi se pestiin vielä kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella, kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tumman ruskea tuote puhdistettiin flash-kromatografiolla käyttäen eluenttina heksaani/etyyliasettaatti (100:1) – seosta. Tuotteeksi saatiin keltainen neste, jonka havaittiin massaspektrin perusteella olevan polymeeri.

9.4 Synteesireitti D

Dipentan-3-yyliamiini (24): Kuivattuun kaksikaulakolviin mitattiin 4 ml (34,4 mmol) 3-aminopentaania, 4,01 ml (37,9 mmol) 3-pentanonaa ja 2,5 ml etikkahappoa. Seosta sekoitettiin

tettiin 15 minuuttia, mikä jälkeen sen joukkoon lisättiin 2,56 ml (17,2 mmol) PEMB:a. Seosta lämmitettiin yön yli 50 °C:ssa. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Koska reaktio ei ollut mennyt loppuun, seokseen lisättiin 1 ml 3-pentanonia ja lämmitystä jatkettiin kunnes reaktio oli valmis. Kolvi nostettiin huoneenlämpöön jäähtymään. Jäähtynyt seos liuotettiin 100 ml vettä ja vesiliuoksen pH säädettiin seitsemään 2 M NaOH-vesiliuoksella. Vesifaasi uutettiin kaksi kertaa dietyylieetterillä (100 ml). PEMB-reagenssin sisältävä orgaaninen faasi heitettiin pois ja vesifaasi tehtiin emäksiseksi 2 M NaOH-vesiliuoksella. Vesiliuos uutettiin kolme kertaa dietyylieetterillä (100 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kaksi kertaa 100 ml:lla vettä ja kerran 100 ml:lla kyllästettyä NaCl-vesiliuosta. Liuos kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteeksi saatiin keltainen neste ja reaktion saanto oli 60 %.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 2,32 (p, ³J=5,7 Hz, 1H, CH), 1,32 (qd, ³J=7,5 Hz; 5,4 Hz, 2 H, CH₂), 1,30 (qd, ³J=7,5 Hz; 5,4 Hz, 2 H, CH₂), 0,80 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, 2xCH₃)
¹³C NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 57,10 (CH), 26,47 (CH₂), 9,88 (CH₃)

***N,N*-dipentan-3-yyliditiokarbamaatin Na-suola (23):** Kaksikaulakolviin mitattiin 20 ml etanolia ja 0,89 (22,3 mmol) NaOH:a. Seoksen lisättiin hukan vettä, kunnes kaikki NaOH oli liuennut. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja toiseen kaulaan septumi. Septumin läpi ruiskutettiin 1,87 ml (31,1 mmol) rikkihiiltä ja hitaasti 3,25 g (20,7 mmol) di-(pentan-3-yyli)amiinia (24). Keltaista seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Lopuksi reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja tuotteeksi saatiin vaalean keltainen kiinteä aine.

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 1464 (C–NR₂), 1090 (C–S), 1046 (C=S), 443 (Na–S)

2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidonin AlCl₄⁻suola (22): *N,N*-dipentan-3-yyliditiokarbamaatin Na-suola (23) liuotettiin asetoniin. Seokseen lisättiin AlCl₃ ja refluksoitettiin yön yli. Seos siirrettiin erotussuppiloon, johon lisättiin 100 ml 2 M NaOH-vesiliuosta. Vesiliuos uutettiin dietyylieetterillä; kerran 100 ml:lla ja kaksi kertaa 50 ml:lla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kaksi kertaa vedellä (50 ml) ja kerran kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella. Seos kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Reaktiota ei ollut onnistunut, sillä tuote sisälsi massaspektrin mukaan lähtöainetta, joka oli osittain hajonnut dipentan-3-yyliamiiniksi. Lisäksi spektrissä havaittiin muita tuntemattomia aineita (liite, s.13, kuva 24).

9.5 Synteesireitti E

4,4-dietyyliatsetidin-2-oni (31): Kaksikaulakolviin mitattiin 80 ml dietyylieetteriä ja 15 ml (172,3 mmol) kloorisulfonyyli-isosyanaattia. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja toinen kaula suljettiin septumilla. Kolvi asetettiin vesihauteeseen ja seokseen lisättiin 2-etyylibuteeni (20 ml; 163,7 mmol) hitaasti ruiskulla septumin läpi. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion aikana seoksen väri oli muuttunut värittömästä keltaiseksi. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun reaktio oli valmis, seokseen lisättiin 160 ml kyllästettyä NaSO₃-vesiliuosta ja sekoitusta jatkettiin kaksi tuntia. Seoksen pH säädettiin neutraaliksi lisäämällä kiinteää NaHCO₃:a. Seos siirrettiin erotussuppiloon ja faasit erotettiin. Vesifaasia uutettiin kaksi kertaa 100 ml:lla dikloorimetaania. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteeksi saatiin kirkas, vaaleankeltainen viskoottinen neste. Reaktion saanto oli 65 % (13,4 g).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 5,29 (s, 1 H, NH), 2,62 (s, 2 H, CH₂), 1,68 (q, ³J=7,5 Hz, 4 H, 2xCH₂), 0,91 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, 2xCH₃). ¹³C NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 168,37 (CO), 57,98 (C), 46,16 (CH₂), 29,64 (CH₂), 8,75 (CH₃).

N-(tert-butoksikarboxyyli)-4,4-dietyyliatsetidin-2-oni (30): Kolviin mitattiin 13,43 g (105,57 mmol) 4,4-dietyyliatsetidin-2-onia (31) ja 100 ml dikloorimetaania. Seokseen lisättiin 17,7 ml (127,0 mmol) trietyyliamiinia ja katalyyttinen määrä dimetyyliamonipyridiiniä. Di-tert-butyylidikarbonaatti (27,7 g; 126,9 mmol) liuotettiin 50 ml:n dikloorimetaania ja liuos lisättiin reaktioseoksen joukkoon. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Seoksen väri oli muuttunut reaktion aikana keltaisesta oranssiksi. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun reaktio oli valmis, seos siirrettiin erotussuppiloon, pestiin kaksi kertaa kyllästetyllä ammoniumkloridi-vesiliuoksella ja vedellä sekä kerran kyllästetyllä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Punertavan ruskea tuote suodatettiin siliikalla täytetyn sintterin läpi käyttäen eluenttina heksaani-etyyliasetatti-seosta (1:1). Tuotteeksi saatiin keltainen viskoottinen neste ja reaktion saanto oli 93 % (22,3 g).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 2,69 (s, 2 H, CH₂), 1,87 (q, ³J=7,5 Hz, 4 H, 2xCH₂), 1,50 (s, 9 H, 3xCH₃), 0,93 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, 2xCH₃). ¹³C NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 165,16 (CO), 148,09 (CO), 82,78 (C), 63,27 (C), 43,48 (CH₂), 28,77 (CH₂), 28,19 (CH₃), 8,22 (CH₃).

(1,1-dietyyli-3-oksobutyli)-karbamiinihapon *tert*-butyyliesteri (29): Kuivattuun kak-sikaula-kolviin mitattiin 8 g (35,2 mmol) *N*-(*tert*-butoksikarbonyyli)-4,4-dietyyli-atsetidin-2-onia (30) ja 120 ml kuivaa THF:a. Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja toiseen kaulaan septumi. Kolvi asetettiin -40 °C hauteeseen (asetonitriili-hiilihappo) ja seokseen lisättiin hitaasti septumin läpi ruiskuttaen 15 ml (45,0 mmol) 3 M MeMgBr-dietyylieetteriliuosta samalla sekoittaen. Sekoitusta jatkettiin -40 °C:ssa kaksi tuntia, ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun lähtöainetta ei ollut enää jäljellä, tumman harmaan seoksen joukkoon lisättiin runsaasti kyllästettyä ammoniumkloridi-vesiliuosta ja kolvi nostettiin pois kylmäs-tä hauteesta. Kun seos oli huoneenlämpöinen, se siirrettiin erotussuppiloon. Faasit erotet-tiin toisistaan ja vesifaasi uutettiin kaksi kertaa 100 ml:lla dikloorimetaania. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotteeksi saatiin keltainen viskoottinen neste. Reaktio saanto oli 97 % (8,3 g).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 2,84 (s, 2 H, CH₂), 2,14 (s, 3 H, CH₃), 1,56-1,83 (m, ³J=7,5 Hz, ²J=14,7 Hz; 7,8 Hz, 4 H, 2xCH₂) 1,41 (s, 9 H, 3xCH₃), 0,80 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, 2xCH₃). ¹³C NMR (300 MHz; CDCl₃): δ (ppm): 208,48 (CO), 154,69 (CO), 78,96 (C), 57,27 (C), 47,09 (CH₂), 32,11 (CH₃), 28,50 (CH₂), 27,88 (CH₃), 7,64 (CH₃).

2,2,6,6-tetraetyyli-1,2,5,6-tetrahydro-4-metyylipyrimidiini (28): (1,1-dietyyli-3-okso-butyli)-karbamiinihapon *tert*-butyyliesteri (29; 9,85 g; 40,5 mmol) liuotettiin dikloorimetaanin (20 ml). Seokseen lisättiin trifluorietikkahappo (20 ml). Kolvin päälle asetettiin Ar-pallo ja seoksen annettiin reagoida kaksi tuntia huoneenlämmössä sekoittaen. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:lla, ja kun lähtöainetta ei ollut enää jäljellä, seos haih-dutettiin kuiviin. Jäljelle jäänyt keltainen amiinin trifluoroasettaattisuola siirrettiin metalli-reaktoriin ja liuotettiin metanoliin (10 ml). Reaktoriin lisättiin 21 ml 3-pentanonia ja reak-tori asetettiin -78 °C asetoni-hiilihappohauteeseen. Seokseen lisättiin noin 50 ml nesteytet-tyä ammoniakkaa. Reaktori suljettiin tiiviisti ja nostettiin huoneenlämpöön. Seosta sekoitet-tiin yön yli huoneenlämmössä. Reaktori asetettiin uudelleen asetoni-hiilihappohauteeseen ja seoksen annettiin jäähtyä. Jäähtynyt reaktori avattiin ja seosta sekoitettiin avonaisena huoneenlämmössä kunnes kaikki reagoimaton ammoniakki oli haihtunut. Jäljelle jäänyt seos laimennettiin dikloorimetaanilla, siirrettiin erotussuppiloon ja pestiin kaksi kertaa kyl-lästetyllä NaHCO₃-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiolla käyttäen eluenttina dikloo-

rimetaani/asetoni (1:1) –seosta. Tuotteeksi saatiin keltainen neste, ja reaktion saanto oli 66 % (5,58 g).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 1,97 (s, 2 H, CH_2), 1,81 (s, 3 H, CH_3), 1,47-1,61 (m, $^3J=7,5$, $^2J=21,0$ Hz; 16,0 Hz, 4 H, $2\times\text{CH}_2$), 1,16-1,41 (m, $^3J=7,5$ Hz, $^2J=7,0$ Hz, 4 H, $2\times\text{CH}_2$), 0,83 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3), 0,79 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 164,53 (C), 74,21 (C), 51,99 (C), 39,14 (CH_2), 33,46 (CH_2), 31,39 (CH_2), 28,46 (CH_3), 8,16 (CH_3), 7,57 (CH_3).

2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidoni (3): 2,2,6,6-tetraetyyli-1,2,5,6-tetrahydro-4-metyyli-pyrimidiini (**28**; 1,36 g; 6,5 mmol), ammoniumbromidi (0,03 g; 0,3 mmol) ja dietyyliketoni (3,4 ml; 32,1 mmol) liuotettiin metanoliin (13 ml). Seos asetettiin jää-hauteeseen ja sen joukkoon lisättiin 0,5 ml väkevää suolahappoa hitaasti tipoittain. Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Yön aikana seoksen väri oli muuttunut keltaisesta ruskeaksi. Seos asetettiin jäähauteeseen ja siihen lisättiin noin 18 % suolahappoliuosta. Seosta lämmitettiin noin 60 °C:ssa kaksi päivää. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:n avulla. Kun lähtöainetta ei ollut enää jäljellä, seokseen lisättiin 2 M NaOH-liuosta ja metanoli haihdutettiin pois. Seos uutettiin kolme kertaa dikloorimetaanilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin K_2CO_3 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Ruskea tuote ajettiin silikan läpi imu-suodatuksella käyttäen eluenttina 1:1 heksaani/etyyliasettaatti – seosta. Tuotteeksi saatiin tummankeltainen öljy, ja reaktion saanto oli 53 % (0,72 g).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 2,23 (s, 4 H, $2\times\text{CH}_2$), 1,30-1,60 (m, $^3J=7,5$ Hz, $^2J=14,0$ Hz, 8 H, $4\times\text{CH}_2$), 0,83 (t, $^3J=7,5$ Hz, 12 H, $4\times\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (300 MHz; CDCl_3): δ (ppm): 212,25 (CO), 58,54 (C), 49,89 (CH_2), 33,16 (CH_2), 8,13 (CH_3).

2,2,6,6-tetraetyylipiperidin-4-oni-1-oksyli (2): 2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidoni (**3**; 1,27 g; 6,0 mmol) liuotettiin metanoliin (12 ml). Seokseen lisättiin katalyyttinen määrä natriumvolframaatti dihydraattia ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) ja 5 ml 30 % vetyperoksidia hitaasti tipoittain. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä. Reaktion etenemistä seurattiin tasaisin väliajoin TLC:lla ja reaktioseoksen joukkoon lisättiin pieniä määriä vetyperoksidia, kunnes reaktio oli valmis. Seokseen lisättiin kyllästettyä K_2CO_3 -liuosta ja se uutettiin kaksi kertaa dietyylieetterillä. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Oranssi tuote puhdistettiin kahdesti flash-kromatografialla, ensin käyttäen eluenttina 10:1 heksaani/etyyliasettaatti –seosta ja toisen kerran käyttäen eluenttina puhdas-

ta dikloorimetaania. Tuotteeksi saatiin ruskeanoranssi kiinteä aine. Reaktio saanto oli 44 % (0,59 g).

MS (ESI) $C_{13}H_{24}NO_2$: laskettu: 227,34 $[M+H]^+$, havaittu: 227,2 $[M+H]^+$.

4-hydroksi-2,2,6,6-tetraetylipiperidini-1-oksyli (1): 2,2,6,6-tetraetylipiperidin-4-oni-1-oksyli (2; 0,59 g; 2,6 mmol) liuotettiin 10 ml:aan etanolia. Seos asetettiin jäähauteeseen ja joukkoon lisättiin 0,15 g (4,0 mmol) $NaBH_4$:a. Seosta sekoitettiin jäähauteessa kaksi tuntia. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:lla, ja kun lähtöainetta ei enää havaittu, seos siirrettiin erotussuppiloon, johon lisättiin 40 ml kyllästettyä $NaCl$ -vesiliuosta. Seos uutettiin kaksi kertaa 20 ml:lla dietyylieetteriä. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin $MgSO_4$:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote uudelleenkiteytettiin heksaanista. Tuotteeksi saatiin kirkkaanoranssi kiinteä tuote, ja reaktio saanto oli 91 % (0,54 g).

MS (ESI) $C_{13}H_{26}NO_2$: laskettu: 229,35 $[M+H]^+$, havaittu: 229,2 $[M+H]^+$.

9.6 Glykolysointireaktio ja suojarahmien poisto

2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-glukopyranosyylioksi-TEEPO (35). TEEPOL **1** (103,7 mg, 0,45 mmol), Glc α-F (193,7 mg, 0,55 mmol) ja murskatut 4 Å molekyylliseulat (50 mg) liuotettiin dikloorimetaaniin (1 ml). Reaktioseos jäädytettiin 0 °C:een ja joukkoon lisättiin $BF_3 \cdot Et_2O$ (0,11 ml, 0,89 mmol) hitaasti. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa argonin alla kuusi tuntia. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:lla. Kun reaktio oli valmis, seokseen kaadettiin kylmää vettä ja se suodatettiin Celite®:n läpi. Celite® pestiin etyyli-asetaatilla ja seos siirrettiin erotussuppiloon. Orgaaninen faasi pestiin kyllästetyllä $NaCl$ -vesiliuoksella, kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin flash-kromatografiolla käyttäen eluentina aluksi *n*-heksaani/etyyliasetatti 1:1 seosta, ja lopuksi 10 % metanoli/dikloorimetaaniseosta. Tuotteeksi saatiin vaalenoranssi, kiinteä 2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-glukopyranosyylioksi-TEEPO (**35**) (57,1 mg, 23 %) ja sivutuotteeksi keltainen, kiinteä 2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetylipiperidiini **37** (152,2 mg; 62 %).

35: 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ + hydratsobentseeni): δ (ppm): 5,21 (t, $^3J=9,5$ Hz, 1 H, *H*-3'), 5,06 (t, $^3J=9,5$ Hz, 1 H, *H*-4'), 4,95 (t, $^3J=9,5$ Hz, 1 H, *H*-2'), 4,57 (d, $^3J=8,0$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4,24 (dd, $^3J=5,0$ Hz, $^2J=12,0$ Hz, 1 H, *H*-6b'), 4,14 (dd, $^3J=2,0$ Hz, $^2J=12,0$ Hz, 1 H, *H*-6a'), 3,81-3,88 (m, 1 *H*-4), 3,68-3,73 (m, 1 H, *H*-5'), 2,07 (s, 3 H, OAc), 2,05 (s, 3 H,

OAc), 2,02 (s, 3 H, OAc), 2,00 (s, 3 H, OAc), 1,88-1,97 (m, 2 H, CH₂), 1,83-1,85 (m, 1 H, CH₂), 1,68-1,71 (m, 1 H, CH₂), 1,58-1,67 (m, 4 H, CH₂), 1,48-1,48 (m, 1 H, CH₂), 1,27-1,37 (m, 2 H, CH₂), 1,23-1,25 (m, 1 H, CH₂), 0,86 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, CH₃), 0,84 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, CH₃); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃ + hydratsobentseeni): δ (ppm): 170,64 (C=O), 170,32 (C=O), 169,41 (C=O), 169,23 (C=O), 100,05 (C-1), 72,82 (C-3'), 72,54 (C-4), 71,90 (C-5'), 71,47 (C-2'), 68,57 (C-4'), 62,31 (C-6'), 36,86 (CH₂), 35,79 (CH₂), 29,97 (CH₂), 26,71 (CH₂), 20,70 (OAc), 20,67 (OAc), 20,62 (OAc), 20,60 (OAc), 9,81 (C), 8,13 (CH₃); IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2966, 1747 (C=O), 1464 (N-O•), 1364 (N-O•), 1217 (N-O•), 1166, 1036.

37: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 5,32 (d, ³J=8,0 Hz, 1 H, H-1'), 5,23-5,29 (m, 1 H, H-3'), 4,99-5,06 (m, 1 H, H-4'), 4,88 (m, 1 H, H-2'), 4,22-4,27 (m, 1 H, H-6a'), 4,16-4,22 (m, 1 H, H-4), 4,07-4,16 (m, 1 H, H-6b'), 3,89-3,93 (m, 1 H, H-5'), 2,88-3,01 (m, 2 H, CH₂), 2,64-2,76 (m, 2 H, CH₂), 2,47-2,59 (m, 4 H, CH₂), 2,11-2,25 (m, 1 H, CH₂), 1,97-2,06 (m, 1 H, CH₂), 2,05 (s, 3 H, OAc), 2,02 (s, 3 H, OAc), 1,99 (s, 3 H, OAc), 1,97 (s, 3 H, OAc), 1,76-1,86 (m, 1 H, CH₂), 1,62-1,71 (m, 1 H, CH₂), 1,01 (t, ³J=7,5 Hz, 6 H, CH₃), 0,90 (t, ³J=7,5 Hz, 3 H, CH₃), 0,80 (t, ³J=7,5 Hz, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃ + hydratsobentseeni): δ (ppm): 172,17 (C=O), 171,64 (C=O), 171,59 (C=O), 171,22 (C=O), 95,88 (C-1), 74,22 (C-3'), 73,02 (C-2'), 71,49 (C-5'), 69,77 (C-4'), 63,47 (C-6'), 63,14 (C-4), 35,98 (CH₂) 35,01 (CH₂), 32,64 (CH₂), 31,74 (CH₂), 26,74 (CH₂), 20,53 (OAc), 9,18 (C), 8,29 (CH₃), 8,23 (CH₃), 8,13 (CH₃); IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2925, 1743 (C=O), 1366, 1213, 1030, 599.

2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetylipiperidinium (38). 2,3,4,6-tetra-O-asetyyli-β-D-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetylipiperidiini (**37**; 155,2 mg 0,29 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (1,5 ml). Seokseen lisättiin *m*-klooriperbentsoehappo (79,0 mg, 0,46 mmol) jäähauteessa. Reaktioseosta sekoitettiin kolme tuntia antaen sen samalla lämmitä huoneenlämpöön. Seoksen joukkoon lisättiin 5 % Na₂CO₃-liuosta ja vesifaasi uutettiin etyyliasetaatilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na₂SO₄:lla. Seos haihdutettiin kuiviin ja tuote puhdistettiin flash kromatografialla. Eluenttina käytettiin *n*-heksaani/etyyliasetaatiseosta (1:1). Tuote **38** oli valkoinen kiinteä aine(59,5 mg; 37%)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 5,19 (d, $^3J=8,0$ Hz, 1 H, $H-1'$), 5,11-5,19 (m, 1 H, $H-3'$), 4,83-5,02 (m, 1 H, $H-4'$), 4,74-4,78 (m, 1 H, $H-2'$), 4,16-4,27 (m, 1 $H-6a'$), 4,10-4,16 (m, 1 $H-4$), 4,02-4,05 (m, 1 H, $H-6b'$), 3,76-3,80 (m, 1 H, $H-5'$), 3,08-3,15 (m, 1 H, CH_2), 2,70-2,82 (m, 2 H, CH_2), 2,45-2,51 (m, 2 H, CH_2), 2,34-2,39 (m, 1 H, CH_2), 2,00-2,28 (m, 4 H, CH_2), 1,91-2,00 (m, 2 H, CH_2), 2,11 (s, 3 H, OAc), 2,05 (s, 3 H, OAc), 2,00 (s, 3 H, OAc), 1,94 (s, 3 H, OAc), 1,14 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3), 0,92 (t, $^3J=7,5$ Hz, 6 H, CH_3), 0,91 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3), 0,84 (t, $^3J=7,5$ Hz, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 + hydratsobentseeni): δ (ppm): 172,13 (C=O), 171,62 (C=O), 171,45 (C=O), 171,19 (C=O), 94,57 (C-1), 74,76 (C-3'), 73,07 (C-2'), 72,84 (C-5'), 69,50 (C-4'), 63,48 (C-6'), 62,75 (C-4), 50,37 (CH_2), 41,82 (CH_2), 37,17 (CH_2), 30,49 (CH_2), 27,40 (CH_2), 20,67 (OAc), 20,63 (OAc), 20,56 (OAc), 20,52 (OAc), 8,49 (C), 8,35 (CH_3), 8,22 (CH_3), 8,05 (CH_3), 7,80 (CH_3); IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}): 2976, 1744 (C=O), 1534 (N-O⁺), 1365, 1212, 1032, 907, 826, 599.

TEEPO- β -D-glukopyranosidi (34). 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -D-glukopyranosyylioksi-TEEPO (**35**; 50 mg; 0,09 mmol) liuotettiin metanoliin (1 ml) ja seoksen joukkoon lisättiin 1 ml 25 % NH_3 -liuosta. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä kaksi tuntia. Seos haihdutettiin kuiviin ja tuotteeksi saatiin lopputuote **4** oranssina kiinteänä aineena. Lisäksi tuote sisälsi sivutuotteena muodostunutta asetamidia.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD + D_2O + hydratsobentseeni): δ (ppm): 4,40 (d, $^3J=8,0$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4,10-4,13 (m, 1 H, $H-4$), 4,01-4,09 (m, 1 H, $H-6'$), 3,86-3,99 (m, 1 H, $H-4'$), 3,69-3,84 (m, 1 H, $H-3'$) 3,39-3,45 (m, 1 H, $H-2'$) 3,31-3,38 (m, 1 H, $H-5'$), 1,84-1,90 (m, 2 H, CH_2), 1,58-1,70 (m, 4 H, CH_2), 1,42-1,47 (m, 2 H, CH_2), 1,31-1,40 (m, 2 H, CH_2), 1,23-1,25 (m, 2 H, CH_2), 0,89 (t, $^3J=7,5$ Hz, 6 H, CH_3), 0,85 (t, $^3J=7,5$ Hz, 6 H, CH_3). ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 + hydratsobentseeni): δ (ppm): 101,64 (C-1), 76,31 (C-3'), 75,32 (C-5'), 73,45 (C-2'), 71,48 (C-4), 69,75 (C-4'), 61,80 (C-6') 37,62 (CH_2), 30,04 (CH_2), 26,36 (CH_2), 9,68 (C), 8,22 (CH_3); IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}): 3346 (OH), 2964, 1381 (N-O•), 1019 (N-O•).

9.7 *In vitro* NMR-kokeet

Kaikki *in vitro* NMR-mittaukset suoritettiin Varian Unity Inova (^1H -taajuus 500 MHz) NMR-spektrometrillä 37 °C:ssa.

Titraussarja: NMR-näyte valmistettiin mittaamalla NMR-putkeen 540 μl veri-plasmaa ja 60 μl D_2O :a. Kantaliuos valmistettiin liuottamalla 3,8 mg TEEPO-Glc:a 500 μl :aan veri-

plasmaa. Näytteen kokonaismassasta vähennettiin epäpuhtautena olleen asetamidin osuus, joka arvioitiin $^1\text{H-NMR}$ -spektrin perusteella. Näin kantaliuoksen konsentraatioksi saatiin 16 mM. Näytteestä mitattiin T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat eri konsentraatioissa siten, että jokaisen mittauksen jälkeen putkeen lisättiin tietty tilavuus kantaliuosta. Lisäysten tilavuudet ja näytteen loppukonsentraatiot on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. *In vitro* NMR-titraussarjan muuttujat.

c (mM)	kantaliuoksen lisäys (μl)	kokonaistilavuus (μl)
0	0	600
0,4	15,5	615,5
0,8	16,5	632,0
1,6	36,0	668,0
2,5	40,0	708,0
4,1	98,0	806,0
6,2	169,0	975,0

Mittaukset ja lisäykset suoritettiin siten, että eri mittausten välillä aikaa kului 40 minuuttia.

Stabiilisuusmittaukset: Näyte valmistettiin mittaamalla NMR-putkeen 540 μl veri-plasmaa, 60 μl D_2O :a ja 108 μl TEEPO-Glc:n sisältävää 16 mM kantaliuosta. Näytteestä mitattiin T_1 - ja T_2 -relaksaatioajat 40 minuutin välein ensimmäisten viiden tunnin ajan, sitten tunnin välein ja lopuksi 22 tunnin ja viikon päästä. Mittausten välillä näytettä säilytettiin 37 °C:ssa.

10. Johtopäätökset

Mahdollisen nitroksyyli-radikaaliin pohjautuvan kasvaimen kohdistuvan MRI-kontrastiaineen, TEEPO-Glc:n, onnistunut synteesi suoritettiin kirjallisuudessa tunnetun monivaiheisen synteesireitin ja kirjallisuuden pohjalta kehitettyjen menetelmien mukaan. Yhdiste osoittautui *in vitro* NMR-kokeissa relaksaatiota parantavaksi yhdisteeksi hyvin tuloksin. Tämän perusteella yhdisteellä voi olla potentiaalia mahdollisena kontrastiaineena magneettikuvauksessa. Jatkossa yhdisteestä on tarkoitus valmistaa konsentraatiosarja MRI-fantomikokeita varten, minkä jälkeen voidaan tehdä lisäpäätelmiä yhdisteen mahdollisuuksista kliinisenä kontrastiaineena ja suunnitella mahdollisia lisätestejä.

TEEPO-nitroksyyli-radikaali voidaan liittää moniin eri rakenteisiin vapaan hydroksyyli-ryhmän kautta. Tämä tarjoaa mahdollisuuden rakentaa kontrastiainealusta kytkemällä TEEPO erilaisiin kohdentuviin yksiköihin kuten nukleiniemäksiin,¹³⁴ peptideihin¹³⁵ ja folaatteihin¹³⁶ sekä dopamiinireseptoreihin ja –kuljettajiin kuten spiperoniin⁹⁷ ja kokaiiniin¹³⁷. Onnistuessaan nämä uudet MRI-kontrastiaineet voisivat tuoda arvokkaan lisän lääketieteelliseen kuvantamiseen ja diagnostiikkaan.

VIITELUETTELO

1. (a) Parsons, A. F., *An Introduction to Free Radical Chemistry*. Blackwell Science: 2000; (b) Forrester, A. R.; Hay, J. M.; Thomson, R. H., *Organic chemistry of stable free radicals*. Academic: London, 1968; p xi, 405 s; (c) Perkins, M. J., *Radical chemistry : the fundamentals*. Oxford University Press: Oxford, 2000; p 92 s; (d) Tidwell, T. T., The Gomberg century: free radicals 1900-2000. *Advances in Physical Organic Chemistry* **2001**, *36*, 1-58; (e) Waters, W. A., *The Chemistry of Free Radicals*. Clarendon: Oxford, 1946; p 295 s.
2. McRobbie, D. W., *MRI from Picture to Proton*. Cambridge University Press: 2007.
3. Couper, A. S., Sur une nouvelle theorie chimique. *Annales de chimie et de physique* **1958**, *53*, 469-489.
4. Kekulé, A., Ueber die Constitution und die Metamorphosen der chemischen Verbindungen und über die chemische Natur des Kohlenstoffs. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1858**, *106* (2), 129-159.
5. van 't Hoff, J. H., Voorstel tot Uitbreiding der Tegenwoordige in de Scheikunde gebruikte Structuurformules in de Ruimte, benevens een daarmee samenhangende Opmerking omtrent het Verband tusschen Optisch Actief Vermogen en chemische Constitutie van Organische Verbindingen. *Archives neerlandaises des sciences exactes et naturelles* **1874**, *9*, 445-454.
6. Gomberg, M., An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society* **1900**, *22* (11), 757-71.
7. Schlenk, W.; Weickel, T.; Herzenstein, A., Triarylmethyls. II. Triphenylmethyl and Analogs of Triphenylmethyl in the Biphenyl Series. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1910**, *372*, 1-20.
8. Koelsch, C. F., Syntheses with triarylvinylmagnesium bromides, $\hat{I}^{\pm}, \hat{I}^{\pm 3}$ -Bisdiphenylene- \hat{I}^2 -phenylallyl, a stable free radical. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79*, 4439-41.
9. Neiman, M. B.; Rozantze, E. G.; Mamedova, Y. G., Free Radical Reactions Involving no Unpaired Electrons. *Nature* **1962**, *196* (4853), 472-&.
10. Fremy, E., Sur une nouvelle série d'acides formés d'oxygène, de soufre, d'hydrogène et d'azote. *Ann. Chim. Phys.* **1845**, *15*, 408.
11. Piloty, O.; Schwerin, B. G., Nitrosoisobutyronitrile and its derivatives. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 1863-70.
12. Lebedev, O. L.; Kazarnovskii, S. N., Oxidation of amines with pertungstate. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1960**, *30*, 3105-7.
13. Hoffmann, A. K.; Henderson, A. T., A new stable free radical: di-tert-Butylnitroxide. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 4671.
14. Novak, I.; Harrison, L. J.; Kovač, B.; Pratt, L. M., Electronic Structure of Persistent Radicals: Nitroxides. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (22), 7628-7634.
15. Nakatsuji, S.; Anzai, H., Recent progress in the development of organomagnetic materials based on neutral nitroxide radicals and charge transfer complexes derived from nitroxide radicals. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, *7* (11), 2161-2174.

16. (a) Janoschka, T.; Hager, M. D.; Schubert, U. S., Powering up the Future: Radical Polymers for Battery Applications. *Advanced Materials* **2012**, *24* (48), 6397-6409; (b) Nishide, H.; Oyaizu, K., Toward Flexible Batteries. *Science* **2008**, *319* (5864), 737-738.
17. Sen, V. D.; Golubev, V. A., Kinetics and mechanism for acid-catalyzed disproportionation of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22* (2), 138-143.
18. Eliash, T.; Barbon, A.; Brustolon, M.; Sheves, M.; Bilkis, I.; Weiner, L., Nitroxyl Radicals for Studying Electron Transfer. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (33), 8689-8692.
19. Khramtsov, V. V.; Weiner, L. M.; Grigoriev, I. A.; Volodarsky, L. B., Proton exchange in stable nitroxyl radicals. EPR study of the pH of aqueous solutions. *Chemical Physics Letters* **1982**, *91* (1), 69-72.
20. Kirilyuk, I. A.; Bobko, A. A.; Grigor'ev, I. A.; Khramtsov, V. V., Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2* (7), 1025-1030.
21. Rozantsev, E. G.; Hazzard, B. J.; Ulrich, H., *Free nitroxyl radicals*. Plenum: New York, NY, 1970; p xiv, 249 s.
22. Bowman, D. F.; Gillan, T.; Ingold, K. U., Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. III. Self-reactions of dialkyl nitroxide radicals. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (24), 6555-6561.
23. de Nooy, A. E. J.; Besemer, A. C.; van Bekkum, H., On the Use of Stable Organic Nitroxyl Radicals for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Synthesis* **1996**, *1996* (10), 1153-1176.
24. (a) Dupeyre, R.-M.; Rassa, A., Nitroxides. XIX. Norpseudopelletierine-N-oxyl, a New, Stable, Unhindered Free Radical. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88* (13), 3180-3181; (b) Reznikov, V. A.; Volodarsky, L. B., Stable nitroxides with hydrogen at α -carbon of the nitroxyl group. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (14), 2239-2240.
25. Saphier, O.; Silberstein, T.; Shames, A. I.; Likhtenshtein, G. I.; Maimon, E.; Mankuta, D.; Mazor, M.; Katz, M.; Meyerstein, D.; Meyerstein, N., The Reduction of a Nitroxide Spin Label as a Probe of Human Blood Antioxidant Properties. *Free Radic Res* **2003**, *37* (3), 301-308.
26. Blinco, J. P.; Hodgson, J. L.; Morrow, B. J.; Walker, J. R.; Will, G. D.; Coote, M. L.; Bottle, S. E., Experimental and Theoretical Studies of the Redox Potentials of Cyclic Nitroxides. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (17), 6763-6771.
27. (a) Malievskii, A. D.; Shapiro, A. B., Mutual Effect of Functional Groups and the Radical Center on the Reactivity of Nitroxyl Radicals. *Kinet Catal* **2005**, *46* (4), 472-494; (b) Morris, S.; Sosnovsky, G.; Hui, B.; Huber, C. O.; Rao, N. U. M.; Swartz, H. M., Chemical and Electrochemical Reduction Rates of Cyclic Nitroxides (Nitroxyls). *Journal of pharmaceutical sciences* **1991**, *80* (2), 149-152.
28. Yamasaki, T.; Mito, F.; Ito, Y.; Pandian, S.; Kinoshita, Y.; Nakano, K.; Murugesan, R.; Sakai, K.; Utsumi, H.; Yamada, K.-i., Structure-Reactivity Relationship of

- Piperidine Nitroxide: Electrochemical, ESR and Computational Studies. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76 (2), 435-440.
29. Kinoshita, Y.; Yamada, K.-I.; Yamasaki, T.; Sadasue, H.; Sakai, K.; Utsumi, H., Development of novel nitroxyl radicals for controlling reactivity with ascorbic acid. *Free radical research* **2009**, 43 (6), 565-571.
 30. Kinoshita, Y.; Yamada, K.-i.; Yamasaki, T.; Mito, F.; Yamato, M.; Kosem, N.; Deguchi, H.; Shirahama, C.; Ito, Y.; Kitagawa, K.; Okukado, N.; Sakai, K.; Utsumi, H., In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, 49 (11), 1703-1709.
 31. Yelinova, V.; Krainev, A.; Savelov, A.; Grigor'ev, I., Comparative study of the reduction rates of various types of imidazoline radicals in tissues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, (11), 2053-5.
 32. Paletta, J. T.; Pink, M.; Foley, B.; Rajca, S.; Rajca, A., Synthesis and Reduction Kinetics of Sterically Shielded Pyrrolidine Nitroxides. *Organic Letters* **2012**, 14 (20), 5322-5325.
 33. Marx, L.; Chiarelli, R.; Guiberteau, T.; Rassat, A., A comparative study of the reduction by ascorbate of 1,1,3,3-tetraethylisindolin-2-yloxyl and of 1,1,3,3-tetramethylisindolin-2-yloxyl. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I* **2000**, (8), 1181-1182.
 34. Rozantse, E. G.; Sholle, V. D., Synthesis and Reactions of Stable Nitroxyl Radicals .1. Synthesis. *Synthesis-International Journal of Methods in Synthetic Organic Chemistry* **1971**, (4), 190-&.
 35. (a) Cella, J. A.; Kelley, J. A.; Kenehan, E. F., Nitroxide-catalyzed oxidation of alcohols using m-chloroperbenzoic acid. New method. *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, 40 (12), 1860-1862; (b) Cella, J. A.; Kelley, J. A.; Kenehan, E. F., Oxidation of nitroxides by m-chloroperbenzoic acid. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16 (33), 2869-2872; (c) Cella, J. A.; Kelley, J. A.; Kenehan, E. F., Unexpected oxidation of a nitroxide alcohol with m-chloroperbenzoic acid. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1974**, (22), 943a-943a.
 36. Rauckman, E. J.; Rosen, G. M.; Abou-donia, M. B., Improved Methods for the Oxidation of Secondary Amines to Nitroxides. *Synthetic Communications* **1975**, 5 (6), 409-413.
 37. Shi, H.-C.; Li, Y., Formation of nitroxide radicals from secondary amines and peracids: A peroxy radical oxidation pathway derived from electron spin resonance detection and density functional theory calculation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, 271 (1-2), 32-41.
 38. Lee, T. D.; Keana, J. F. W., Nitrones and nitroxides derived from oxazolines and dihydrooxazines. *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, 41 (20), 3237-3241.
 39. Tebben, L.; Studer, A., Nitroxides: Applications in Synthesis and in Polymer Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (22), 5034-5068.
 40. Hoffmann, A. K.; Feldman, A. M.; Gelblum, E.; Hodgson, W. G., Mechanism of the formation of Di-tert-butyl nitroxide from tert-nitrobutane and sodium. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86 (4), 639-46.

41. Rozantse.Eg; Sholle, V. D., Synthesis and Reactions of Stable Nitroxyl Radicals .2. Reactions. *Synthesis-International Journal of Methods in Synthetic Organic Chemistry* **1971**, (8), 401-&.
42. Vogler, T.; Studer, A., Applications of TEMPO in Synthesis. *Synthesis* **2008**, 2008 (EFirst), 1979-1993.
43. Bailey, W. F.; Bobbitt, J. M.; Wiberg, K. B., Mechanism of the Oxidation of Alcohols by Oxoammonium Cations. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72 (12), 4504-4509.
44. Lucio Anelli, P.; Biffi, C.; Montanari, F.; Quici, S., Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52 (12), 2559-2562.
45. Dijkman, A.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A., Cu(ii)-nitroxyl radicals as catalytic galactose oxidase mimics. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1 (18), 3232-3237.
46. Semmelhack, M. F.; Chou, C. S.; Cortes, D. A., Nitroxyl-mediated electrooxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, 105 (13), 4492-4494.
47. Zhang, M.; Chen, C.; Ma, W.; Zhao, J., Visible-Light-Induced Aerobic Oxidation of Alcohols in a Coupled Photocatalytic System of Dye-Sensitized TiO₂ and TEMPO. *Angewandte Chemie* **2008**, 120 (50), 9876-9879.
48. Naik, N.; Braslau, R., Synthesis and applications of optically active nitroxides. *Tetrahedron* **1998**, 54 (5-6), 667-696.
49. Fey, T.; Fischer, H.; Bachmann, S.; Albert, K.; Bolm, C., Silica-Supported TEMPO Catalysts: Synthesis and Application in the Anelli Oxidation of Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66 (24), 8154-8159.
50. Paleos, C. M.; Dais, P., Ready reduction of some nitroxide free radicals with ascorbic acid. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1977**, (10), 345-346.
51. Kornblum, N.; Pinnick, H. W., Reduction of nitroxides to amines by sodium sulfide. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37 (12), 2050-2051.
52. Li, Y.; Lei, X.; Li, X.; Lawler, R. G.; Murata, Y.; Komatsu, K.; Turro, N. J., Indirect ¹H NMR characterization of H₂@C₆₀ nitroxide derivatives and their nuclear spin relaxation. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2011**, 47 (46), 12527-12529.
53. Emmerson, P. T.; Howard-Flanders, P., Preferential Sensitization of Anoxic Bacteria to X-Rays by Organic Nitroxide-Free Radicals. *Radiation research* **1965**, 26 (1), 54-62.
54. Griffith, O. H.; McConnell, H. M., A Nitroxide-maleimide spin label. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1966**, 55 (1), 8-11.
55. (a) Schnackenberg, C. G.; Welch, W. J.; Wilcox, C. S., Normalization of Blood Pressure and Renal Vascular Resistance in SHR With a Membrane-Permeable Superoxide Dismutase Mimetic: Role of Nitric Oxide. *Hypertension* **1998**, 32 (1), 59-64; (b) Schnackenberg, C. G.; Wilcox, C. S., Two-Week Administration of

- Tempol Attenuates Both Hypertension and Renal Excretion of 8-Iso Prostaglandin F2 α . *Hypertension* **1999**, 33 (1), 424-428.
56. Soule, B. P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.-i.; Simone, N. L.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, 42 (11), 1632-1650.
 57. Zhang, X.; Min, X.; Li, C.; Benjamin, I. J.; Qian, B.; Zhang, X.; Ding, Z.; Gao, X.; Yao, Y.; Ma, Y.; Cheng, Y.; Liu, L., Involvement of Reductive Stress in the Cardiomyopathy in Transgenic Mice With Cardiac-Specific Overexpression of Heat Shock Protein 27. *Hypertension* **2010**, 55 (6), 1412-1417.
 58. Hyodo, F.; Soule, B. P.; Matsumoto, K.-i.; Matusmoto, S.; Cook, J. A.; Hyodo, E.; Sowers, A. L.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., Assessment of tissue redox status using metabolic responsive contrast agents and magnetic resonance imaging. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, 60 (8), 1049-1060.
 59. Hahn, S. M.; Tochner, Z.; Krishna, C. M.; Glass, J.; Wilson, L.; Samuni, A.; Sprague, M.; Venzon, D.; Glatstein, E.; Mitchell, J. B.; Russo, A., Tempol, a Stable Free Radical, Is a Novel Murine Radiation Protector. *Cancer Research* **1992**, 52 (7), 1750-1753.
 60. Weissleder, R.; Pittet, M. J., Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, 452 (7187), 580-589.
 61. Zagdoun, A.; Casano, G.; Ouari, O.; Lapadula, G.; Rossini, A. J.; Lelli, M.; Baffert, M.; Gajan, D.; Veyre, L.; Maas, W. E.; Rosay, M.; Weber, R. T.; Thieuleux, C.; Coperet, C.; Lesage, A.; Tordo, P.; Emsley, L., A Slowly Relaxing Rigid Biradical for Efficient Dynamic Nuclear Polarization Surface-Enhanced NMR Spectroscopy: Expeditious Characterization of Functional Group Manipulation in Hybrid Materials. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 134 (4), 2284-2291.
 62. Metzger, J. O.; Griep-Raming, J., Electrospray ionization and atmospheric pressure ionization mass spectrometry of stable organic radicals. *European Mass Spectrometry* **1999**, 5 (3), 157-163.
 63. (a) Rieger, P. H., *Electron Spin Resonance - Analysis and Interpretation*. Royal Society of Chemistry; (b) Lund, A.; Shimada, S.; Shiotani, M., *Principles and applications of ESR spectroscopy*. Springer: Dordrecht, 2010; p 1 online resource; (c) Atherton, N. M., *Electron spin resonance : theory and applications*. New York ;, 1973; p X, 438 s; (d) Creighton, T. E., *Physical and Chemical Basis of Molecular Biology*. Helvetian Press; (e) Lund, A.; Shimada, S.; Shiotani, M., *Principles and applications of ESR spectroscopy*. Springer: Dordrecht ;, 2010; p 1 online resource.
 64. Reginsson, G. W.; Schiemann, O., Pulsed electron-electron double resonance: beyond nanometre distance measurements on biomacromolecules. *Biochemical Journal* **2011**, 434 (3), 353-363.
 65. Janzen, E. G., Spin trapping. *Accounts of Chemical Research* **1971**, 4 (1), 31-40.
 66. Hubbell, W. L.; Cafiso, D. S.; Altenbach, C., Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nature Structural Biology* **2000**, 7 (9), 735.
 67. Berliner, J.; Fujii, H., Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels. *Science* **1985**, 227 (4686), 517-519.

68. Swartz, H. M.; Khan, N.; Buckey, J.; Comi, R.; Gould, L.; Grinberg, O.; Hartford, A.; Hopf, H.; Hou, H.; Hug, E.; Iwasaki, A.; Lesniewski, P.; Salikhov, I.; Walczak, T., Clinical applications of EPR: overview and perspectives. *NMR in Biomedicine* **2004**, *17* (5), 335-351.
69. Kempe, S.; Metz, H.; Mäder, K., Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research – Chances and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2010**, *74* (1), 55-66.
70. Lauterbur, P. C., Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature (London)* **1973**, *242* (5394), 190-1.
71. Andrew, E. R.; Bottomley, P. A.; Hinshaw, W. S.; Holland, G. N.; Moore, W. S.; Simaraj, C., NMR images by the multiple sensitive point method: application to larger biological systems. *Phys Med Biol* **1977**, *22* (5), 971-4.
72. (a) Damadian, R., Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science* **1971**, *171* (3976), 1151-1153; (b) Damadian, R. V. Apparatus and method for detecting cancer in tissue. 1974.
73. Mansfield, P.; Maudsley, A. A., Medical imaging by NMR. *British Journal of Radiology* **1977**, *50* (591), 188-194.
74. Lauffer, R. B., Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chemical Reviews* **1987**, *87* (5), 901-927.
75. Merbach, A. E.; Toth, E. v., *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. John Wiley: Chichester, 2001; p 471 s.
76. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (9), 2293-2352.
77. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5330/> 14.05.2013.
78. Werner, E. J.; Datta, A.; Jocher, C. J.; Raymond, K. N., High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (45), 8568-8580.
79. Villaraza, A. J.; Bumb, A.; Brechbiel, M. W., Macromolecules, Dendrimers, and Nanomaterials in Magnetic Resonance Imaging: The Interplay between Size, Function, and Pharmacokinetics. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (5), 2921-2959.
80. Caravan, P., Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (6), 512-523.
81. Braverman, I. M.; Cowper, S., Nephrogenic systemic fibrosis. *F1000 medicine reports* **2010**, *2*, 84.
82. (a) Jacques, V.; Desreux, J., New Classes of MRI Contrast Agents. In *Contrast Agents I*, Krause, W., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2002; Vol. 221, pp 123-164; (b) Zech, S. G.; Sun, W.-C.; Jacques, V.; Caravan, P.; Astashkin, A. V.; Raitsimring, A. M., Probing the Water Coordination of Protein-Targeted MRI Contrast Agents by Pulsed ENDOR Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (12), 2570-2577.

83. Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Crich, S. G.; Terreno, E., H-1 and O-17-NMR relaxometric investigations of paramagnetic contrast agents for MRI. Clues for higher relaxivities RID E-9049-2011 RID A-7100-2008. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, 185-6, 321-333.
84. (a) Bloch, F., Nuclear Induction. *Physical Review* **1946**, 70 (7-8), 460-474; (b) Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M., The Nuclear Induction Experiment. *Physical Review* **1946**, 70 (7-8), 474-485.
85. Solomon, I., Relaxation processes in a system of two spins. *Physical Review* **1955**, 99, 559-65.
86. (a) Bloembergen, N., Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *Journal of Chemical Physics* **1957**, 27 (2), 572-573; (b) Bloembergen, N.; Morgan, L. O., Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions Effects of Electron Spin Relaxation. *Journal of Chemical Physics* **1961**, 34 (3), 842-&.
87. Eisinger, J.; Shulman, R. G.; Blumberg, W. E., Relaxation Enhancement by Paramagnetic Ion Binding in Deoxyribonucleic Acid Solutions. *Nature* **1961**, 192 (4806), 963-964.
88. Clore, G. M.; Iwahara, J., Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes. *Chemical Reviews* **2009**, 109 (9), 4108-4139.
89. Yazyev, O. V.; Helm, L., Nuclear Spin Relaxation Parameters of MRI Contrast Agents – Insight from Quantum Mechanical Calculations. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2008**, 2008 (2), 201-211.
90. Floyd, W. C.; Klemm, P. J.; Smiles, D. E.; Kohlgruber, A. C.; Pierre, V. C.; Mynar, J. L.; Fréchet, J. M. J.; Raymond, K. N., Conjugation Effects of Various Linkers on Gd(III) MRI Contrast Agents with Dendrimers: Optimizing the Hydroxypyridinonate (HOPO) Ligands with Nontoxic, Degradable Esteramide (EA) Dendrimers for High Relaxivity. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (8), 2390-2393.
91. (a) Brasch, R. C., Work in progress: methods of contrast enhancement for NMR imaging and potential applications. *Radiology (Oak Brook, IL, United States)* **1983**, 147 (3), 781-8; (b) Brasch, R. C.; London, D. A.; Wesbey, G. E.; Tozer, T. N.; Nitecki, D. E.; Williams, R. D.; Doemeny, J.; Tuck, L. D.; Lallemand, D. P., Work in progress: nuclear magnetic resonance study of a paramagnetic nitroxide contrast agent for enhancement of renal structures in experimental animals. *Radiology (Oak Brook, IL, United States)* **1983**, 147 (3), 773-9; (c) Brasch, R. C.; Nitecki, D. E.; Brantzawadzki, M.; Enzmann, D. R.; Wesbey, G. E.; Tozer, T. N.; Tuck, L. D.; Cann, C. E.; Fike, J. R.; Sheldon, P., Brain Nuclear Magnetic-Resonance Imaging Enhanced by a Paramagnetic Nitroxide Contrast Agent - Preliminary-Report. *American Journal of Neuroradiology* **1983**, 4 (5), 1035-1039; (d) Afzal, V.; Brasch, R. C.; Nitecki, D. E.; Wolff, S., Nitroxyl Spin Label Contrast Enhancers for Magnetic-Resonance Imaging - Studies of Acute Toxicity and Mutagenesis. *Investigative radiology* **1984**, 19 (6), 549-552.
92. Rajca, A.; Wang, Y.; Boska, M.; Paletta, J. T.; Olankitwanit, A.; Swanson, M. A.; Mitchell, D. G.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Rajca, S., Organic Radical Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (38), 15724-15727.

93. Wilcox, C. S.; Pearlman, A., Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. *Pharmacological Reviews* **2008**, *60* (4), 418-469.
94. Savelov, A. A.; Kokorin, D. A.; Fursova, E. Y.; Ovcharenko, V. I., A stable nitroxide radical as a contrast agent for magnetic resonance imaging. *Doklady Chemistry* **2007**, *416*, 241-243.
95. Ovcharenko, V. I.; Fursova, E. Y.; Tolstikova, T. G.; Sorokina, K. N.; Letyagin, A. Y.; Savelov, A. A., Imidazol-4-yl 2-imidazoline nitroxide radicals, a new class of promising contrast agents for magnetic resonance imaging. *Doklady Chemistry* **2005**, *404*, 171-173.
96. (a) Hyodo, F.; Matsumoto, K.-i.; Matsumoto, A.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C., Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer research* **2006**, *66* (20), 9921-9928; (b) Matsumoto, K.; Hyodo, F.; Matsumoto, A.; Koretsky, A. P.; Sowers, A. L.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C., High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. *Clinical Cancer Research* **2006**, *12* (8), 2455-2462; (c) Hyodo, F.; Chuang, K.-H.; Goloshevsky, A. G.; Sulima, A.; Griffiths, G. L.; Mitchell, J. B.; Koretsky, A. P.; Krishna, M. C., Brain redox imaging using blood-brain barrier-permeable nitroxide MRI contrast agent. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2008**, *28* (6), 1165-1174.
97. Zigelboim, I.; Weissberg, A.; Cohen, Y., Target-Specific Ligands and Gadolinium-Based Complexes for Imaging of Dopamine Receptors: Synthesis, Binding Affinity, and Relaxivity. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**.
98. Matsumoto, K.-i.; Narazaki, M.; Ikehira, H.; Anzai, K.; Ikota, N., Comparisons of EPR imaging and T1-weighted MRI for efficient imaging of nitroxyl contrast agents. *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *187* (1), 155-162.
99. Huang, Y.; Nan, A.; Rosen, G. M.; Winalski, C. S.; Schneider, E.; Tsai, P.; Ghandehari, H., N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) Copolymer-Linked Nitroxides: Potential Magnetic Resonance Contrast Agents. *Macromolecular Bioscience* **2003**, *3* (11), 647-652.
100. Rivera, E. J.; Sethi, R.; Qu, F.; Krishnamurthy, R.; Muthupillai, R.; Alford, M.; Swanson, M. A.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Wilson, L. J., Nitroxide Radicals@US-Tubes: New Spin Labels for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22* (17), 3691-3698.
101. Sato, Y.; Hayashi, H.; Okazaki, M.; Aso, M.; Karasawa, S.; Ueki, S.; Suemune, H.; Koga, N., Water-proton relaxivities of DNA oligomers carrying TEMPO radicals. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**, *46* (11), 1055-1058.
102. Gallez, B.; Lacour, V.; Demeure, R.; Debuyst, R.; Dejehet, F.; Dekeyser, J. L.; Dumont, P., Spin-Labeled Arabinogalactan as Mri Contrast Agent. *Magnetic resonance imaging* **1994**, *12* (1), 61-69.
103. (a) Langereis, S.; Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; van Genderen, M. H. P.; Meijer, E. W., Dendrimers and magnetic resonance imaging. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31* (7), 1152-1160; (b) Winalski, C. S.; Shortkroff, S.; Mulkern, R. V.; Schneider, E.;

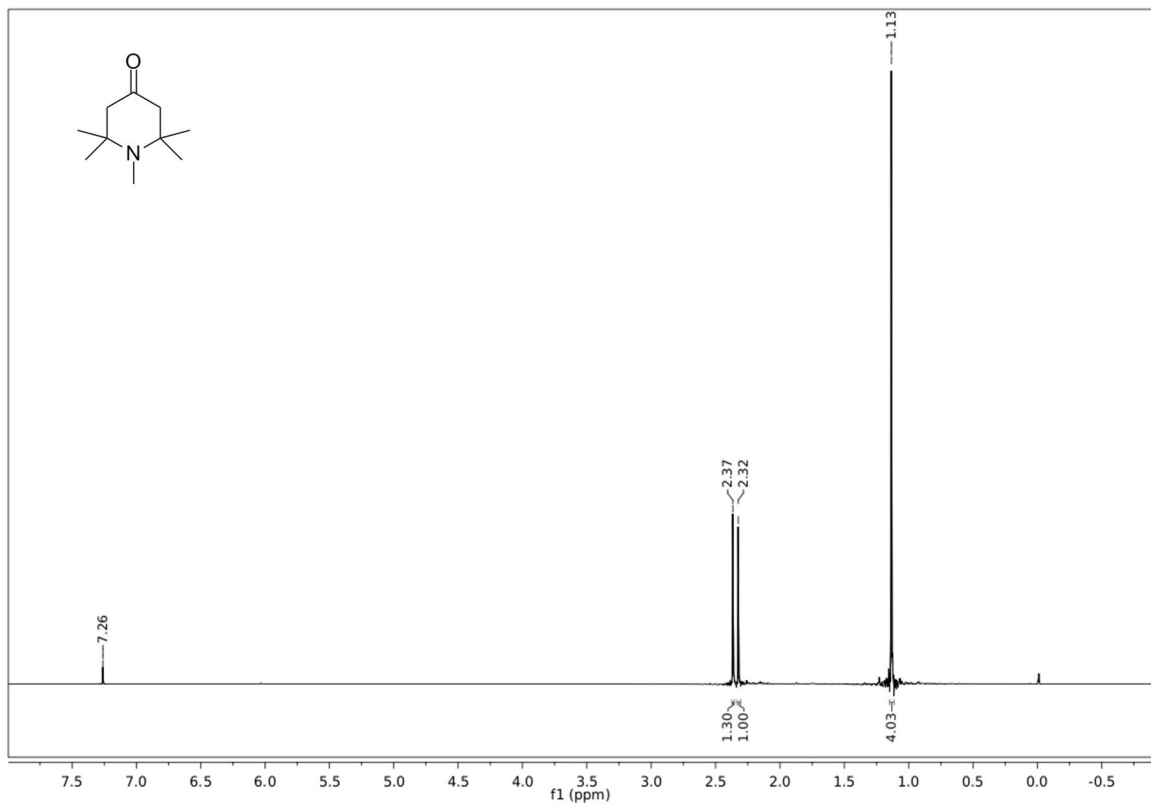
- Rosen, G. M., Magnetic resonance relaxivity of dendrimer-linked nitroxides. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *48* (6), 965-972.
104. Olankitwanit, A.; Kathirvelu, V.; Rajca, S.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Rajca, A., Calix[4]arene nitroxide tetradical and octaradical. *Chemical Communications* **2011**, *47* (22), 6443-6445.
 105. Nicolle, G. M.; Tóth, É.; Schmitt-Willich, H.; Radüchel, B.; Merbach, A. E., The Impact of Rigidity and Water Exchange on the Relaxivity of a Dendritic MRI Contrast Agent. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8* (5), 1040-1048.
 106. Davis, R. M.; Matsumoto, S.; Bernardo, M.; Sowers, A.; Matsumoto, K.-I.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., Magnetic resonance imaging of organic contrast agents in mice: capturing the whole-body redox landscape. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50* (3), 459-468.
 107. Hyodo, F.; Murugesan, R.; Matsumoto, K.-i.; Hyodo, E.; Subramanian, S.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C., Monitoring redox-sensitive paramagnetic contrast agent by EPRI, OMRI and MRI. *Journal of Magnetic Resonance* **2008**, *190* (1), 105-112.
 108. Zhelev, Z.; Bakalova, R.; Aoki, I.; Matsumoto, K.-i.; Gadjeva, V.; Anzai, K.; Kanno, I., Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics RID G-2529-2011 RID C-8577-2009. *Chemical Communications* **2009**, (1), 53-55.
 109. (a) Davis, R. M.; Sowers, A. L.; DeGraff, W.; Bernardo, M.; Thetford, A.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., A novel nitroxide is an effective brain redox imaging contrast agent and in vivo radioprotector. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *51* (3), 780-790; (b) Cotrim, A. P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.-I.; Sowers, A. L.; Cook, J. A.; Baum, B. J.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B., Differential Radiation Protection of Salivary Glands versus Tumor by Tempol with Accompanying Tissue Assessment of Tempol by Magnetic Resonance Imaging. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13* (16), 4928-4933.
 110. Weissleder, R., Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (1), 11-18.
 111. Ribeiro, M. G.; Falconer, R. A.; Santos, I., Carbohydrate-Based Molecules for Molecular Imaging in Nuclear Medicine. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013* (8), 1401-1414.
 112. Sakai, K.; Yamada, K.-i.; Yamasaki, T.; Kinoshita, Y.; Mito, F.; Utsumi, H., Effective 2,6-substitution of piperidine nitroxyl radical by carbonyl compound. *Tetrahedron* **2010**, *66* (13), 2311-2315.
 113. Wetter, C.; Gierlich, J.; Knoop, C. A.; Muller, C.; Schulte, T.; Studer, A., Steric and electronic effects in cyclic alkoxyamines - Synthesis and applications as regulators for controlled/living radical polymerization. *Chemistry-a European Journal* **2004**, *10* (5), 1156-1166.
 114. Chan, T. H.; Brook, M. A.; Chaly, T., A simple procedure for the acetalization of carbonyl compounds. *Synthesis* **1983**, (3), 203-5.
 115. Davenport, R. J.; Regan, A. C., Synthesis of a C1–C9 fragment of rhizoxin. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (40), 7619-7622.

116. Arnott, G.; Heaney, H.; Hunter, R.; Page, P. C. B., Synthesis of the first chiral, functionalised-bridged resorcinarenes in asymmetric catalysis: Evidence for intracavity asymmetric catalysis. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, (24), 5126-5134.
117. Tsunoda, T.; Suzuki, M.; Noyori, R., Trialkylsilyl triflates. VI. A facile procedure for acetalization under aprotic conditions. *Tetrahedron letters* **1980**, 21 (14), 1357-8.
118. Rosen, G. M.; Turner, M. J., Synthesis of Spin Traps Specific for Hydroxyl Radical. *Journal of medicinal chemistry* **1988**, 31 (2), 428-432.
119. Jung, M. E.; Min, S.-J., Intramolecular Diels-Alder reactions of optically active allenic ketones: chirality transfer in the preparation of substituted oxa-bridged octalones. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (31), 10834-10835.
120. Colonge, J.; Dumont, P., The action of ethylenic acid chlorides on olefins. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1947**, 38-46.
121. Chaturvedi, J.; Bhattacharya, S.; Nethaji, M., A new reaction of dithiocarbamates: CS₂ elimination and two C–C bond formations leading to formation of cyclic ammonium salts. *Inorganic Chemistry Communications* **2008**, 11 (7), 720-722.
122. Burkhardt, E. R.; Coleridge, B. M., Reductive amination with 5-ethyl-2-methylpyridine borane. *Tetrahedron letters* **2008**, 49 (35), 5152-5155.
123. Meyers, A. I.; Williams, D. R.; White, S.; Erickson, G. W., An asymmetric synthesis of acyclic and macrocyclic α -alkyl ketones. The role of (e)- and (z)-lithioenamines. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103 (11), 3088-3093.
124. Verniest, G.; Van Hende, E.; Surmont, R.; De Kimpe, N., Direct Electrophilic α -Fluorination of Imines: Efficient Synthesis of Mono- and Difluoroimines. *Organic Letters* **2006**, 8 (21), 4767-4770.
125. Bailey, J. H. E.; Drake, J. E.; Sarkar, A. B.; Wong, M. L. Y., Preparation and characterization of diphenylbis(N,N-dialkyldithiocarbamato)tellurium (IV) and chlorodiphenyl(N,N-dialkyldithiocarbamato)tellurium(IV). Crystal structures of Ph₂Te[S₂CNMe₂]₂, Ph₂TeCl[S₂CNEt₂], and Ph₂TeCl[S₂CN(i-Pr)₂]. *Canadian Journal of Chemistry* **1989**, 67 (11), 1735-1743.
126. Schulte, T.; Siegenthaler, K. O.; Luftmann, H.; Letzel, M.; Studer, A., Nitroxide-mediated polymerization of N-isopropylacrylamide: Electrospray ionization mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, and multiple-angle laser light scattering studies on nitroxide-terminated poly-N-isopropylacrylamides. *Macromolecules* **2005**, 38 (16), 6833-6840.
127. Ma, Z.; Huang, Q.; Bobbitt, J. M., Oxoammonium salts. 5. A new synthesis of hindered piperidines leading to unsymmetrical TEMPO-type nitroxides. Synthesis and enantioselective oxidations with chiral nitroxides and chiral oxoammonium salts. *The Journal of organic chemistry* **1993**, 58 (18), 4837-4843.
128. (a) Mukaiyama, T., Explorations into New Reaction Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (42), 5590-5614; (b) Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Robina, I., Glycosylation methods in oligosaccharide synthesis. Part 1. *Curr. Org. Synth.* **2008**, 5 (1), 33-60; (c) Kamat, M. N.; Rath, N. P.; Demchenko, A. V., Versatile Synthesis and Mechanism of Activation of S-Benzoxazolyl Glycosides. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72 (18), 6938-6946.

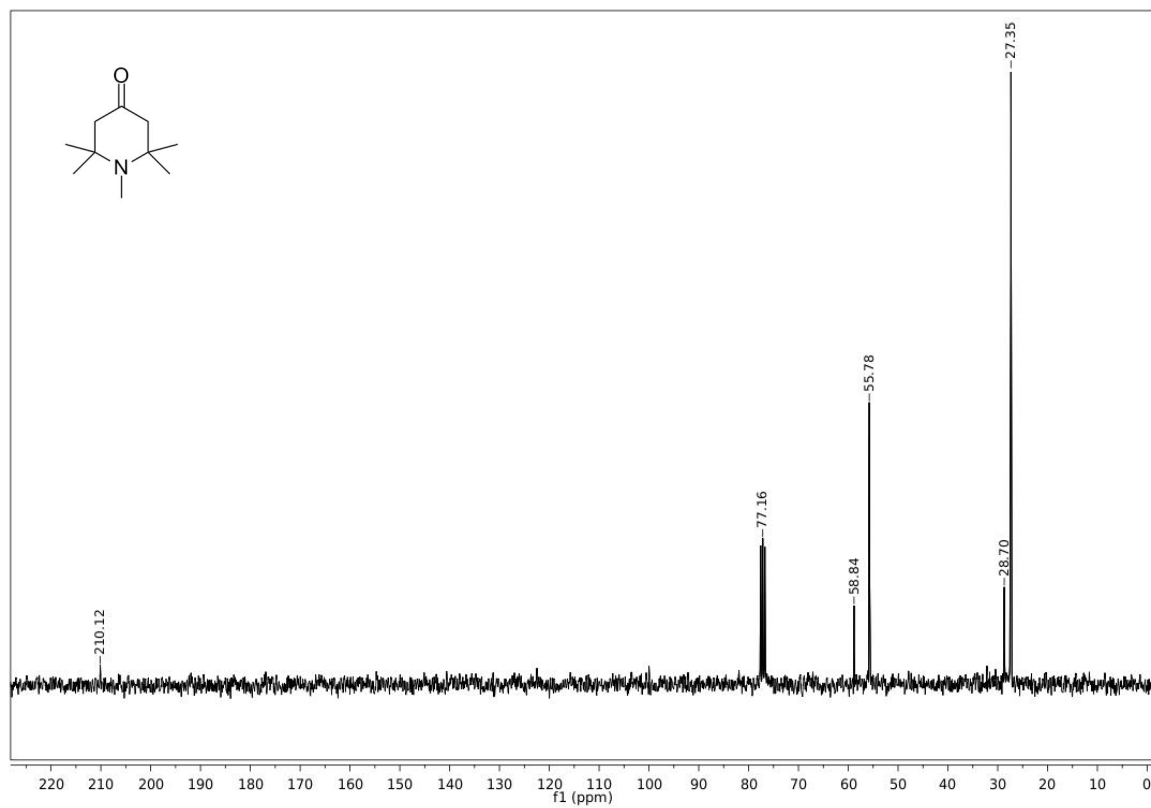
129. (a) Cinget, F.; Gagnaire, D.; Vottero, P. J. A., Nouvelle Synthèse du β -D-Glucopyranoside de 2,2,6,6-Tetraméthylpiperidin-1-Oxyl-4-Yle et de Son Derive Peracetylé. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1992**, *11* (7), 921-931; (b) Sato, S.; Kumazawa, T.; Matsuba, S.; Onodera, J.-i.; Aoyama, M.; Obara, H.; Kamada, H., Novel glycosylation of the nitroxyl radicals with peracetylated glycosyl fluorides using a combination of $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ and an amine base as promoters. *Carbohydrate Research* **2001**, *334* (3), 215-222; (c) Yajima, A.; Oono, Y.; Nakagawa, R.; Nukada, T.; Yabuta, G., A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (1), 189-194.
130. Grampp, G.; Rasmussen, K., Solvent dynamical effects on the electron self-exchange rate of the TEMPO radical dot/TEMPO⁺ couple (TEMPO = 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radical) Part I. ESR-linebroadening measurements at T = 298 K. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4* (22), 5546-5549.
131. Mori, K.; Tominaga, M.; Takigawa, T.; Matsui, M., A Mild Transesterification Method. *Synthesis* **1973**, *1973* (12), 790-791.
132. Plattner, J. J.; Gless, R. D.; Cooper, G. K.; Rapoport, H., Synthesis of some DE and CDE ring analogs of camptothecin. *The Journal of Organic Chemistry* **1974**, *39* (3), 303-311.
133. Neilson, T.; Werstiuk, E. S., Oligoribonucleotide Synthesis. II. Preparation of 2'-O-tetrahydropyranyl Derivatives of Adenosine and Cytidine Necessary for Insertion in Stepwise Synthesis. *Canadian Journal of Chemistry* **1971**, *49* (3), 493-499.
134. (a) Chen, W.; Cloughesy, T.; Kamdar, N.; Satyamurthy, N.; Bergsneider, M.; Liao, L.; Mischel, P.; Czernin, J.; Phelps, M. E.; Silverman, D. H. S., Imaging Proliferation in Brain Tumors with ¹⁸F-FLT PET: Comparison with ¹⁸F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine* **2005**, *46* (6), 945-952; (b) Bar-Shir, A.; Liu, G.; Liang, Y.; Yadav, N. N.; McMahon, M. T.; Walczak, P.; Nimmagadda, S.; Pomper, M. G.; Tallman, K. A.; Greenberg, M. M.; van Zijl, P. C. M.; Bulte, J. W. M.; Gilad, A. A., Transforming Thymidine into a Magnetic Resonance Imaging Probe for Monitoring Gene Expression. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (4), 1617-1624.
135. (a) Yu, Z.; Schmaltz, R. M.; Bozeman, T. C.; Paul, R.; Rishel, M. J.; Tsosie, K. S.; Hecht, S. M., Selective Tumor Cell Targeting by the Disaccharide Moiety of Bleomycin. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (8), 2883-2886; (b) Park, J.-A.; Lee, J.-J.; Jung, J.-C.; Yu, D.-Y.; Oh, C.; Ha, S.; Kim, T.-J.; Chang, Y., Gd-DOTA Conjugate of RGD as a Potential Tumor-Targeting MRI Contrast Agent. *ChemBioChem* **2008**, *9* (17), 2811-2813.
136. Rolla, G. A.; Botta, M.; Tei, L.; Cabella, C.; Ghiani, S.; Brioschi, C.; Maiocchi, A., Paramagnetic Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Platform for the Development of Molecular MRI Probes. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (34), 11189-11193.
137. Bois, F.; Baldwin, R. M.; Amici, L.; Al-Tikriti, M. S.; Kula, N.; Baldessarini, R.; Innis, R. B.; Staley, J. K.; Tamagnan, G. D., Synthesis, radiolabeling and baboon SPECT imaging of 2 β -carbomethoxy-3 β -(3'-[¹²³I]iodophenyl)tropine ([¹²³I]YP256) as a serotonin transporter radiotracer. *Nuclear Medicine and Biology* **2008**, *35* (1), 53-59.

LIITE

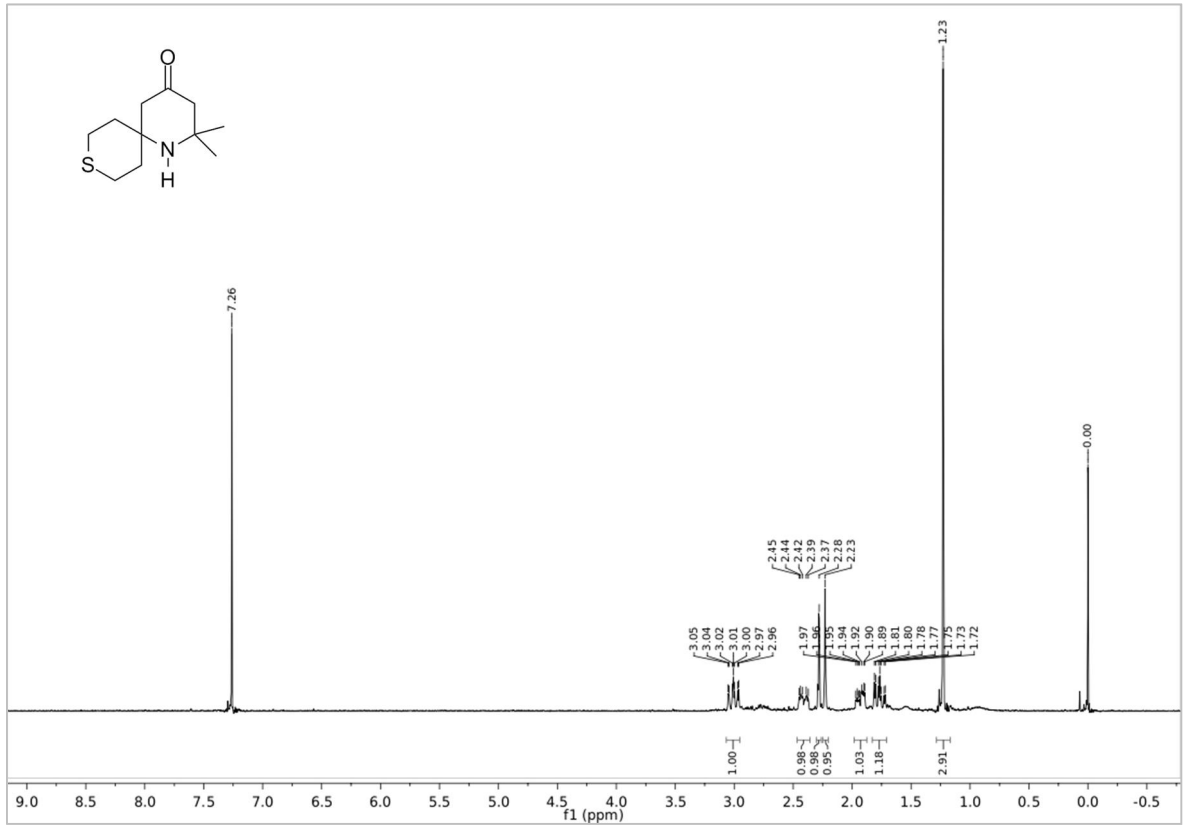
Kokeellisen osion reaktiotuotteiden spektrit



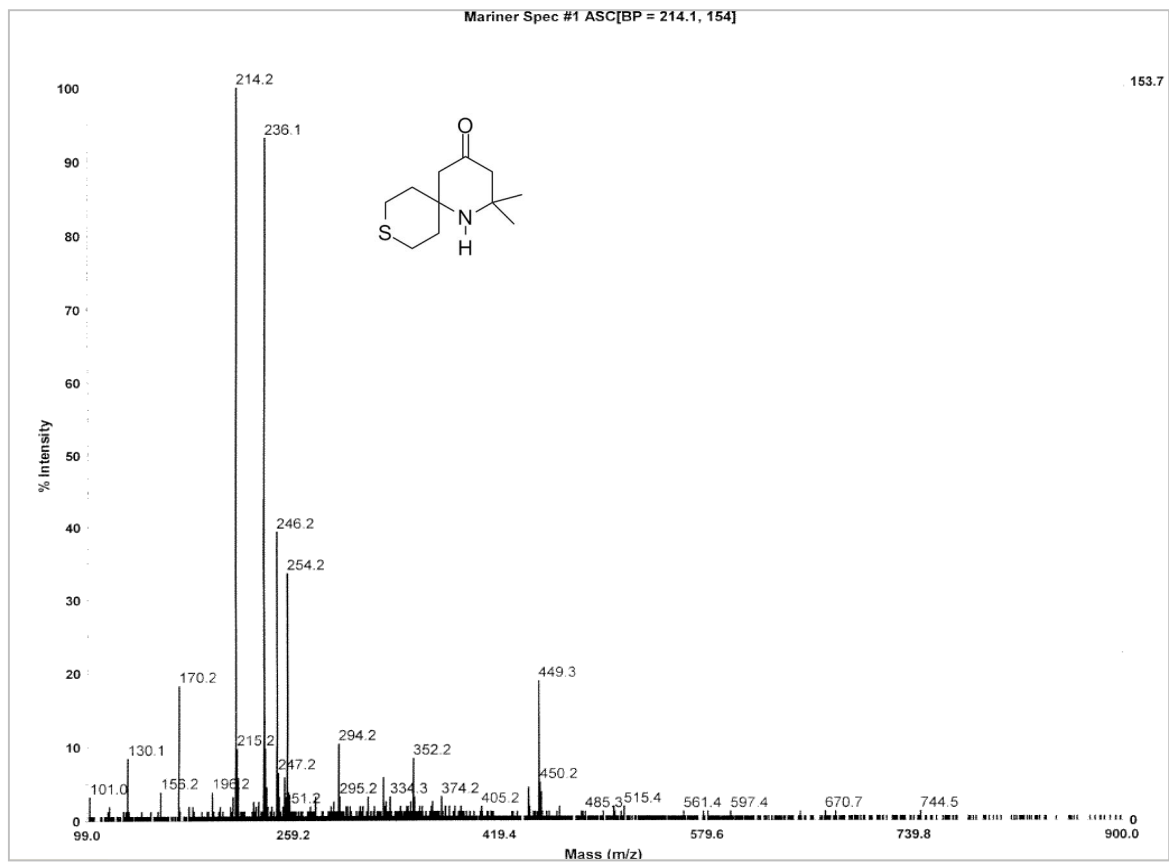
Kuva L1. 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidin-4-onin (5) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



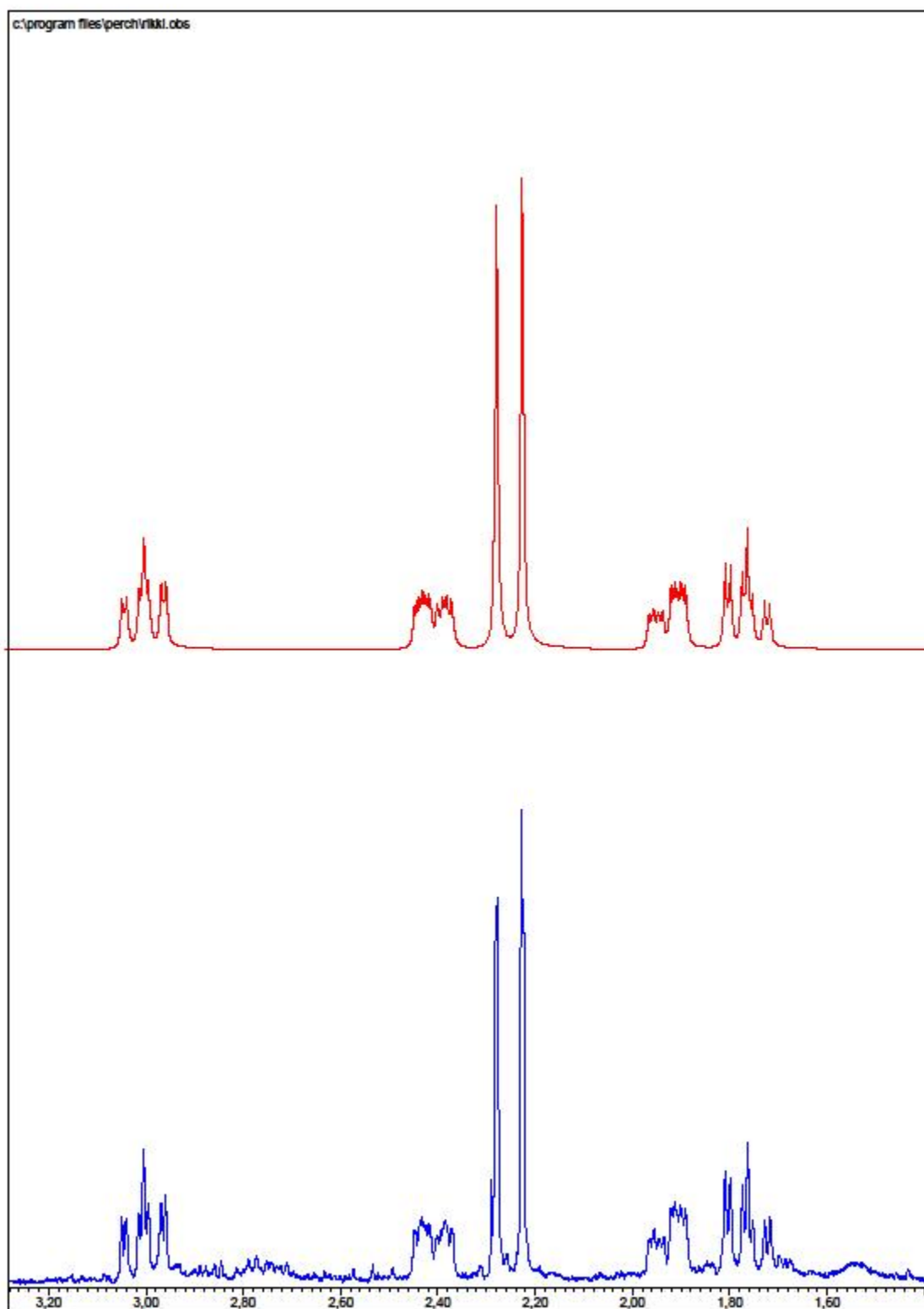
Kuva L2. 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidin-4-onin (5) ^{13}C -spektri CDCl_3 :ssa.



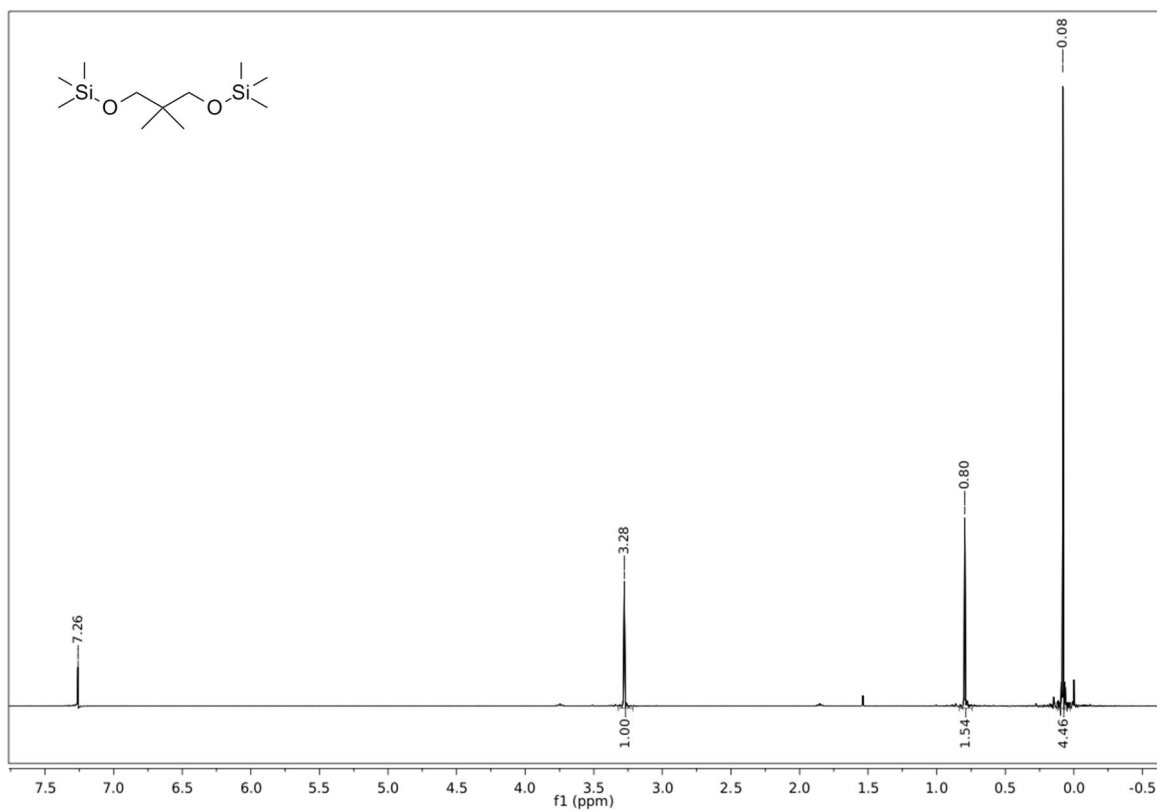
Kuva L3. 2,2-dimetyyli-9-tia-1-λ1-atsaspiro[5.5]undekan-4-onin (7) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



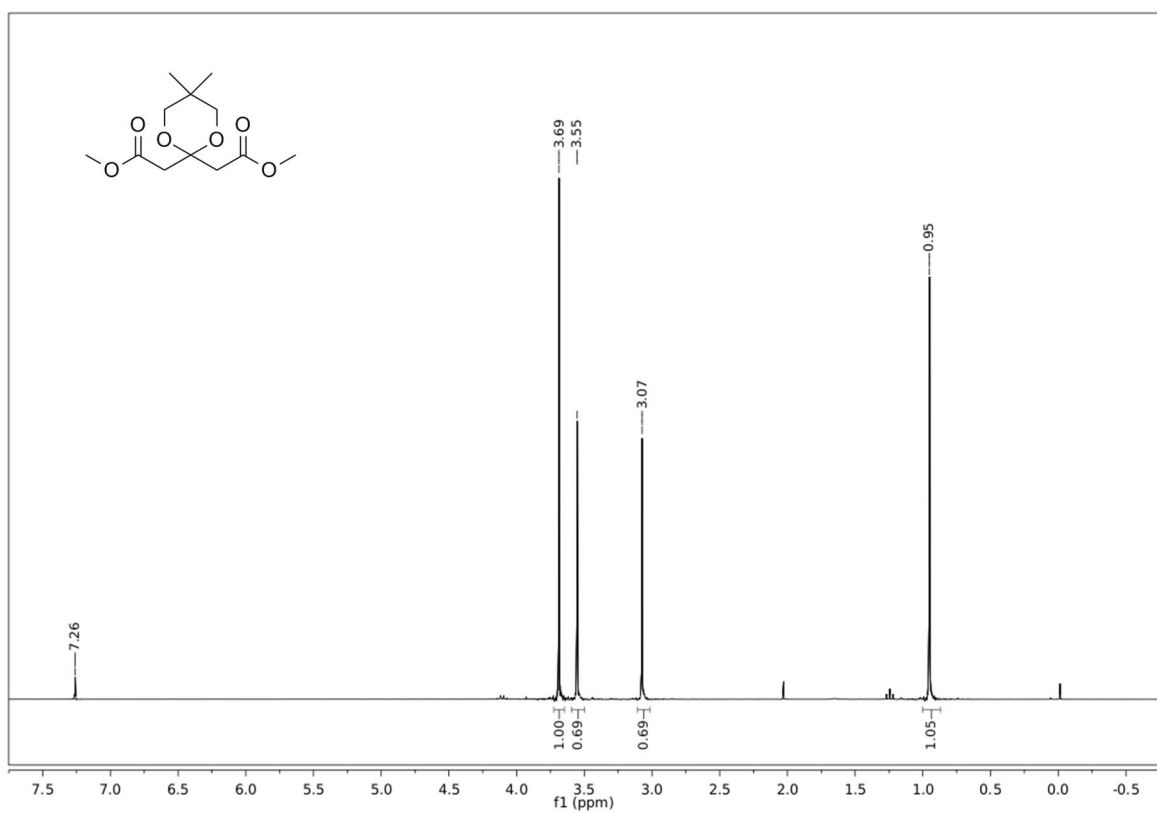
Kuva L4. 2,2-dimetyyli-9-tia-1-λ1-atsaspiro[5.5]undekan-4-onin (7) massaspektri



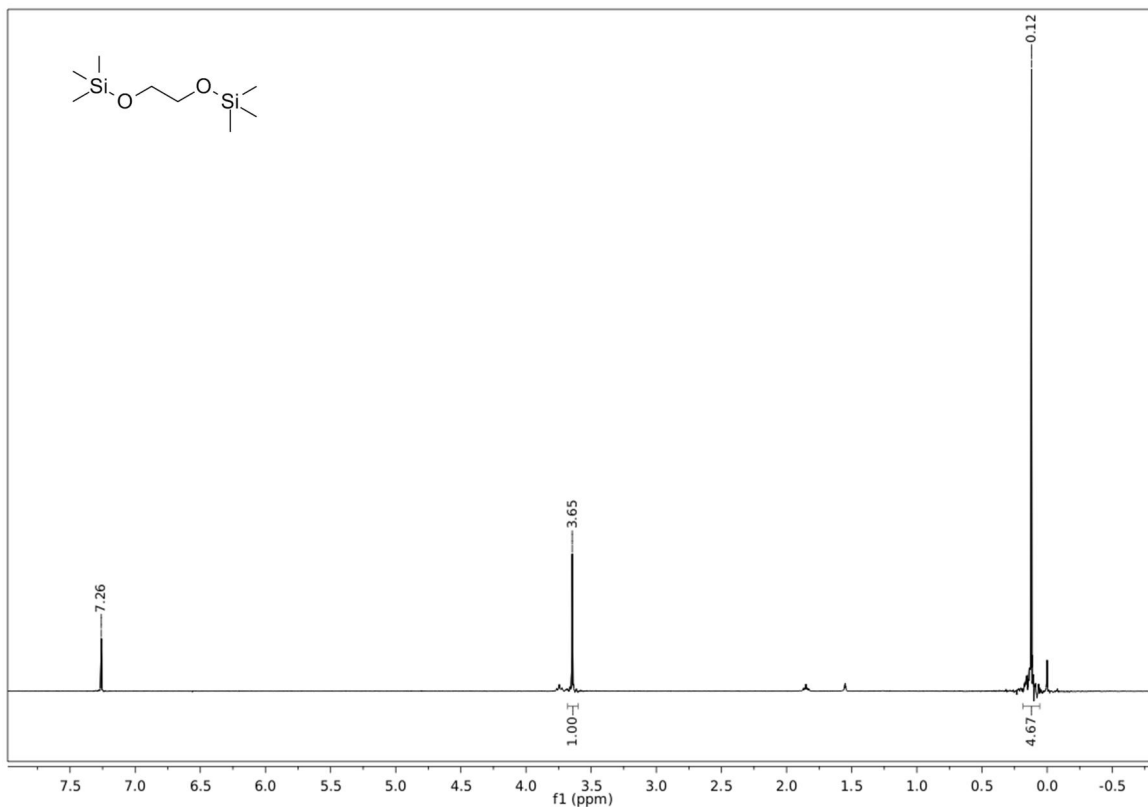
Kuva L5. 2,2-dimetyyli-9-tia-1-1-atsapiro[5.5]undekan-4-onin (**7**) kokeellinen (sinisellä) ja laskettu (punaisella) ^1H -spektri.



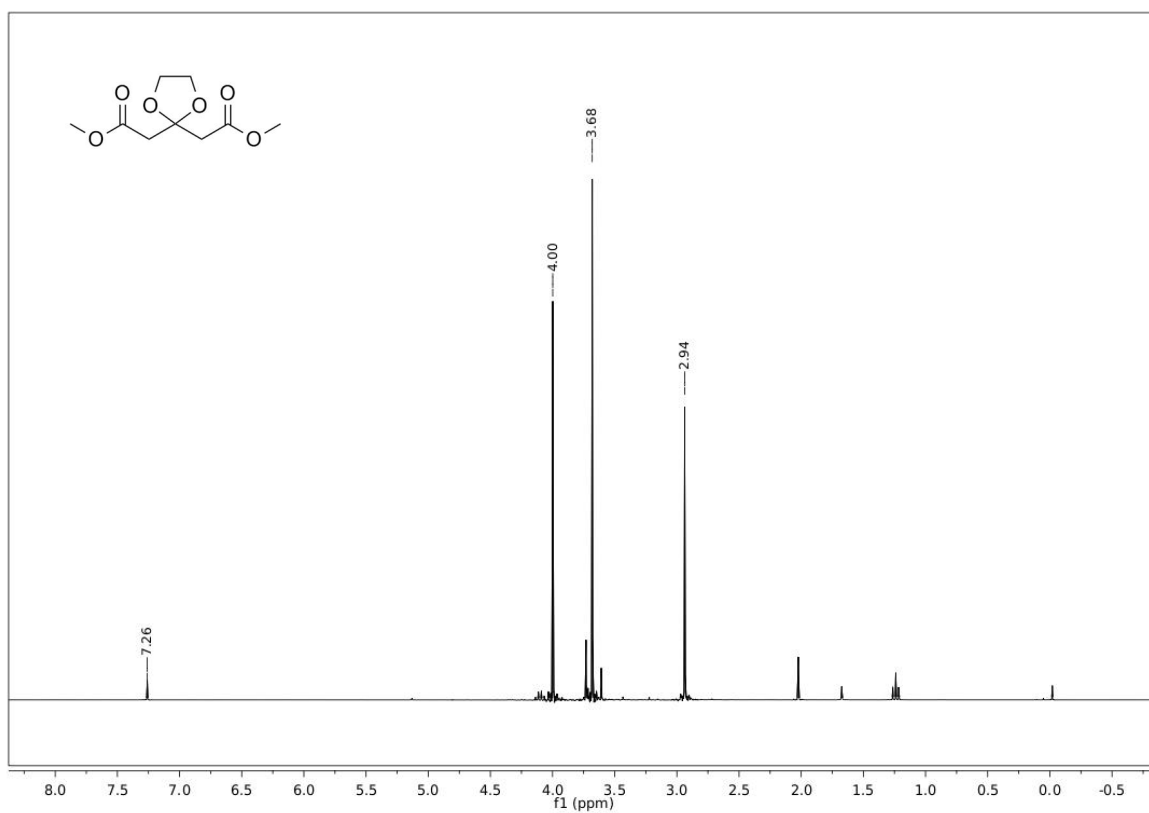
Kuva L6. 1,3-bis(trimetyylisilyyloksi)-2,2-dimetyylipropaanin (**13**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



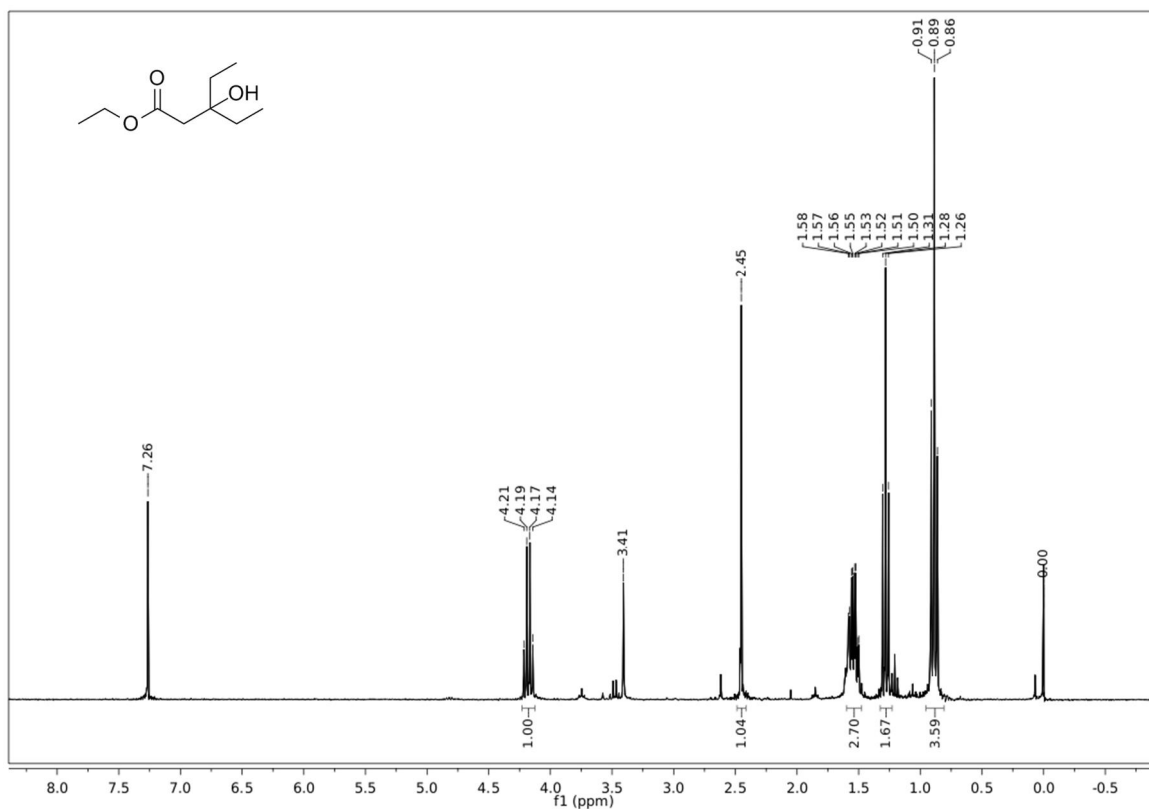
Kuva L7. Dimetyyli-2,2'-(5,5-dimetyyli-1,3-dioksaani-2,2-diyylidi)asetatin (**9**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



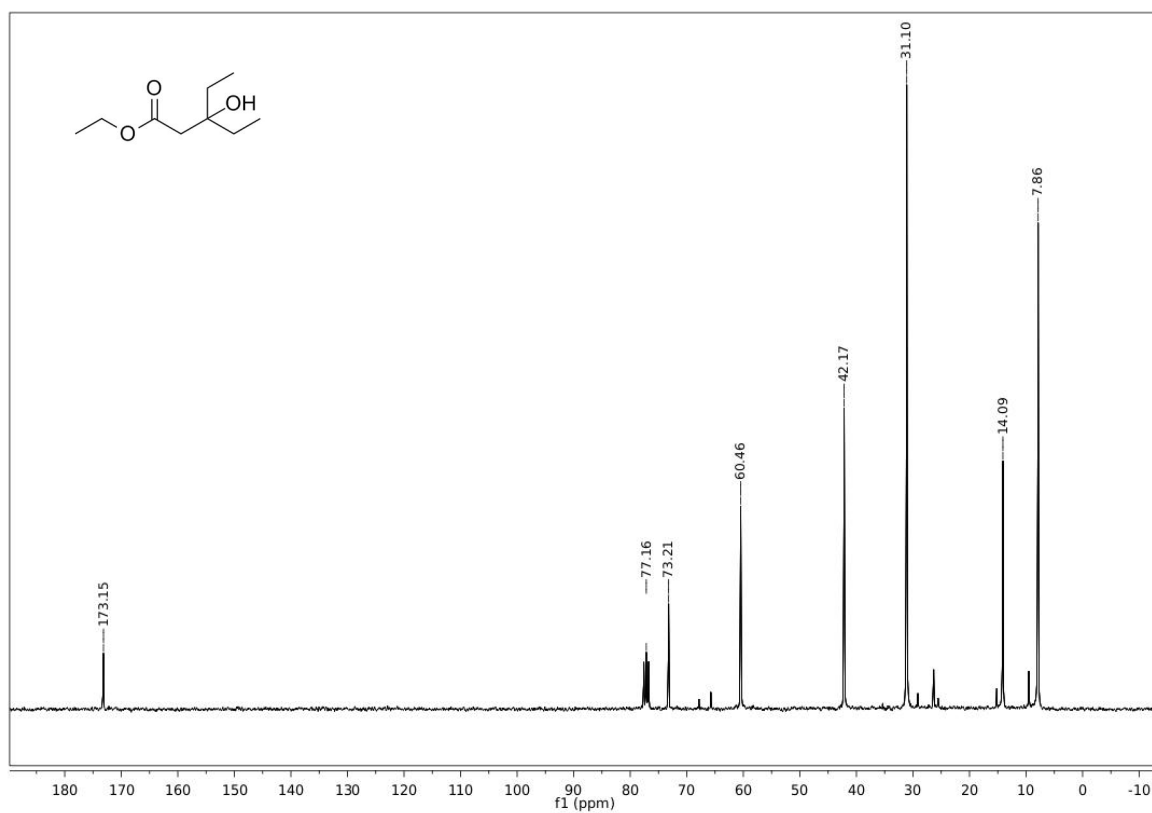
Kuva L8. 1,3-bis(trimetyylisilyylioksi)propanin (**15**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



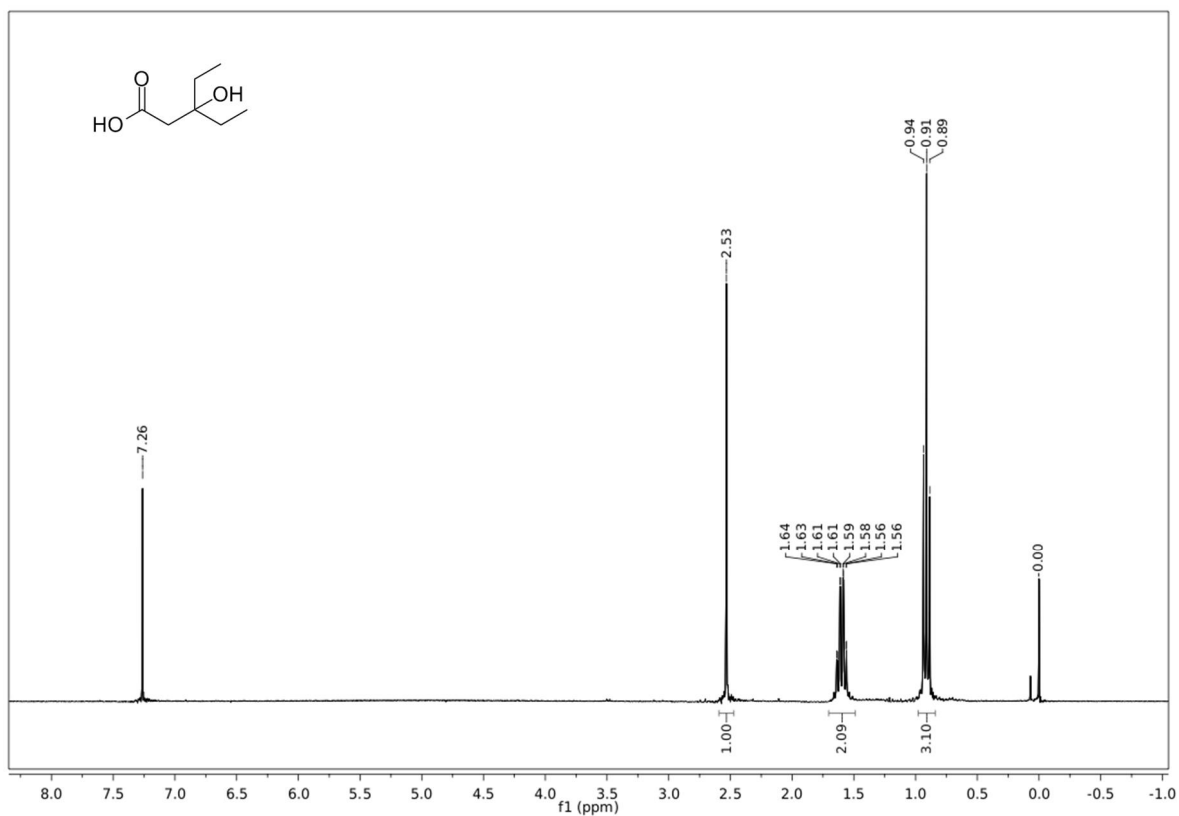
Kuva L9. Dimetyyli-2,2'-(1,3-dioksolaani-2,2-diiyli)diasetaatin (**10**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



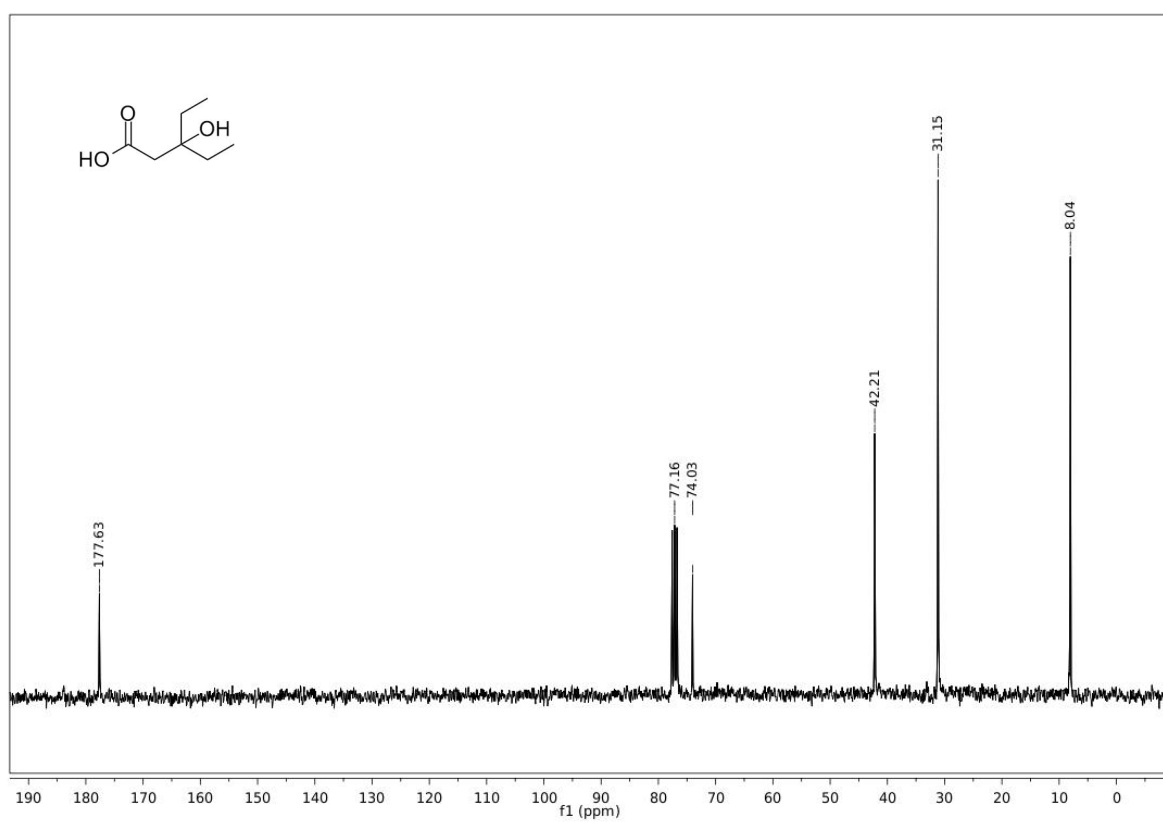
Kuva L10. 3-etyyli-3-hydroksypentaanihapon etyyliesterin (**19**) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



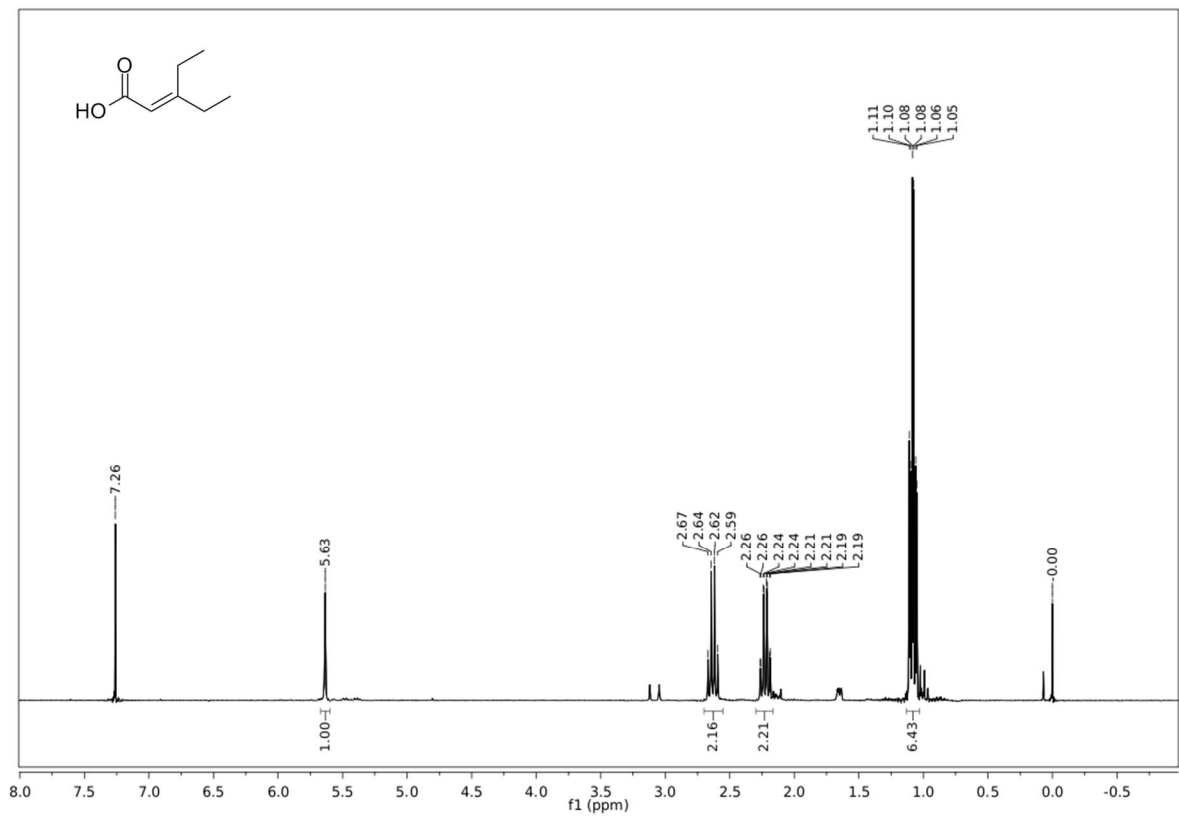
Kuva L11. 3-etyyli-3-hydroksypentaanihapon etyyliesterin (**19**) ¹³C-spektri CDCl₃:ssa.



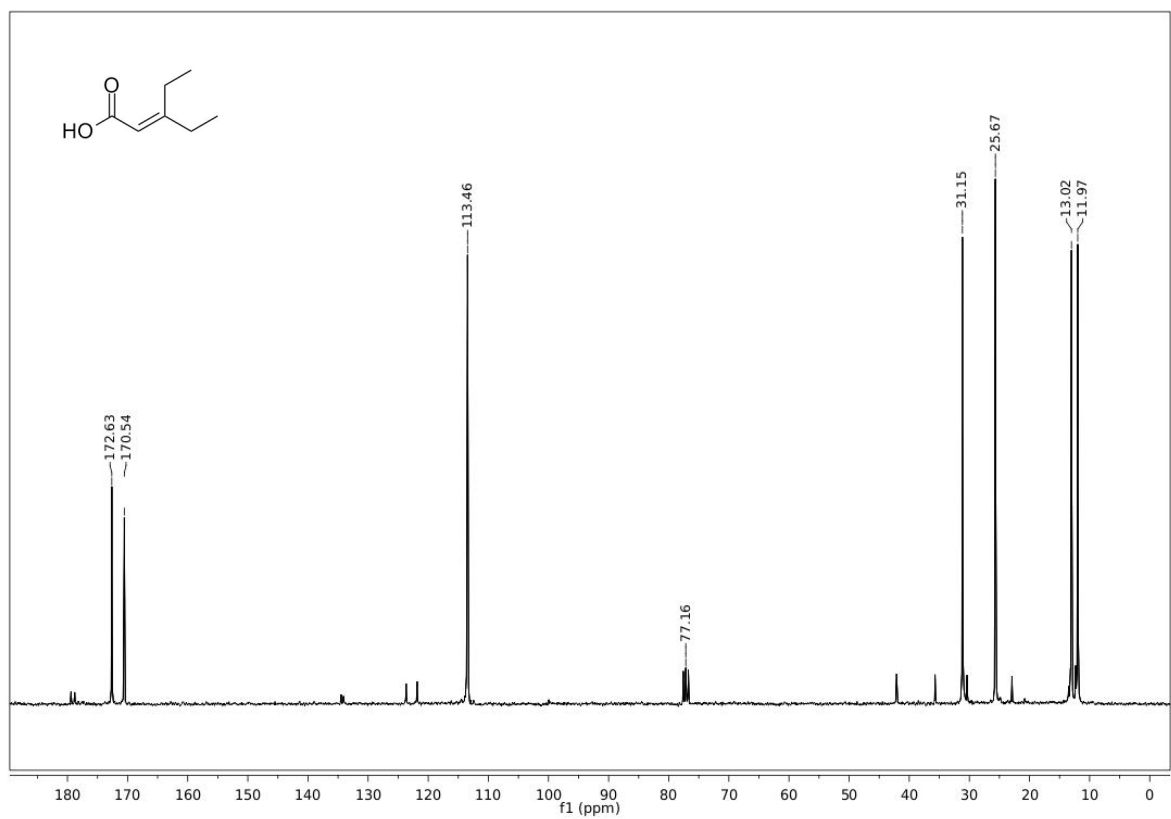
Kuva L12. 3-etyyli-3-hydroksipentaanihapon (18) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



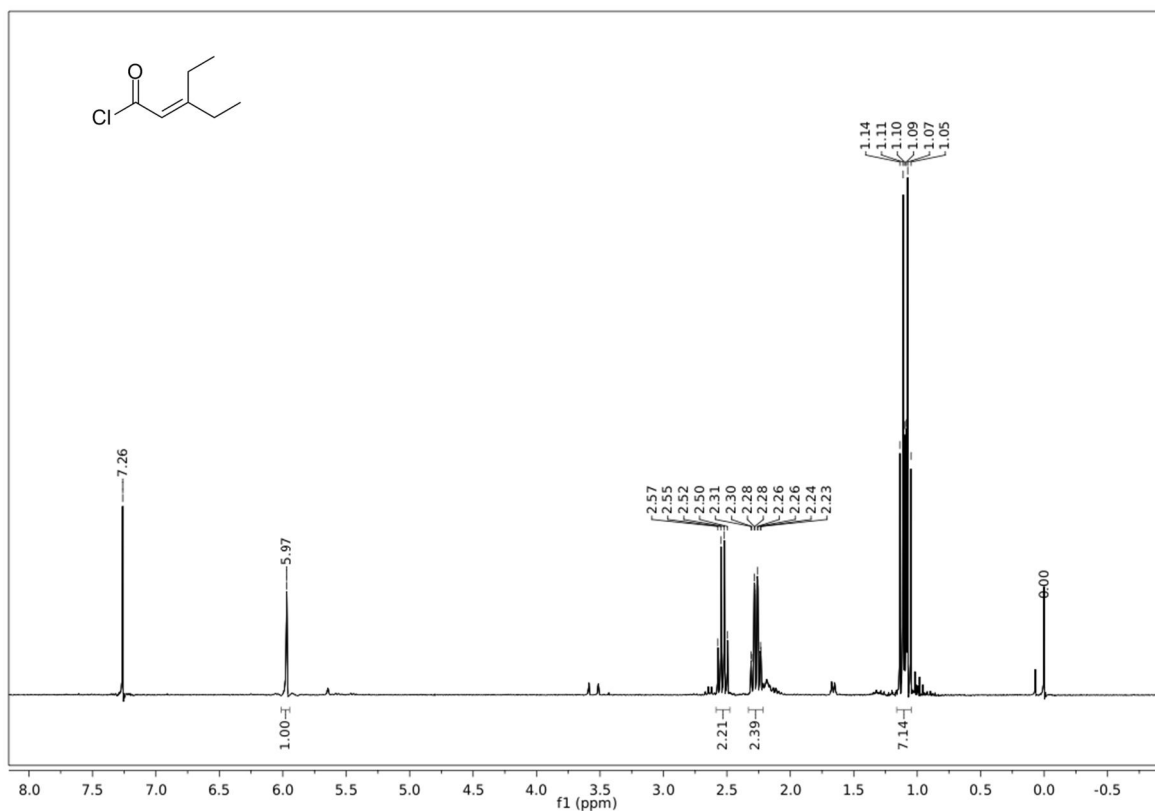
Kuva L13. 3-etyyli-3-hydroksipentaanihapon (18) ^{13}C -spektri CDCl_3 :ssa.



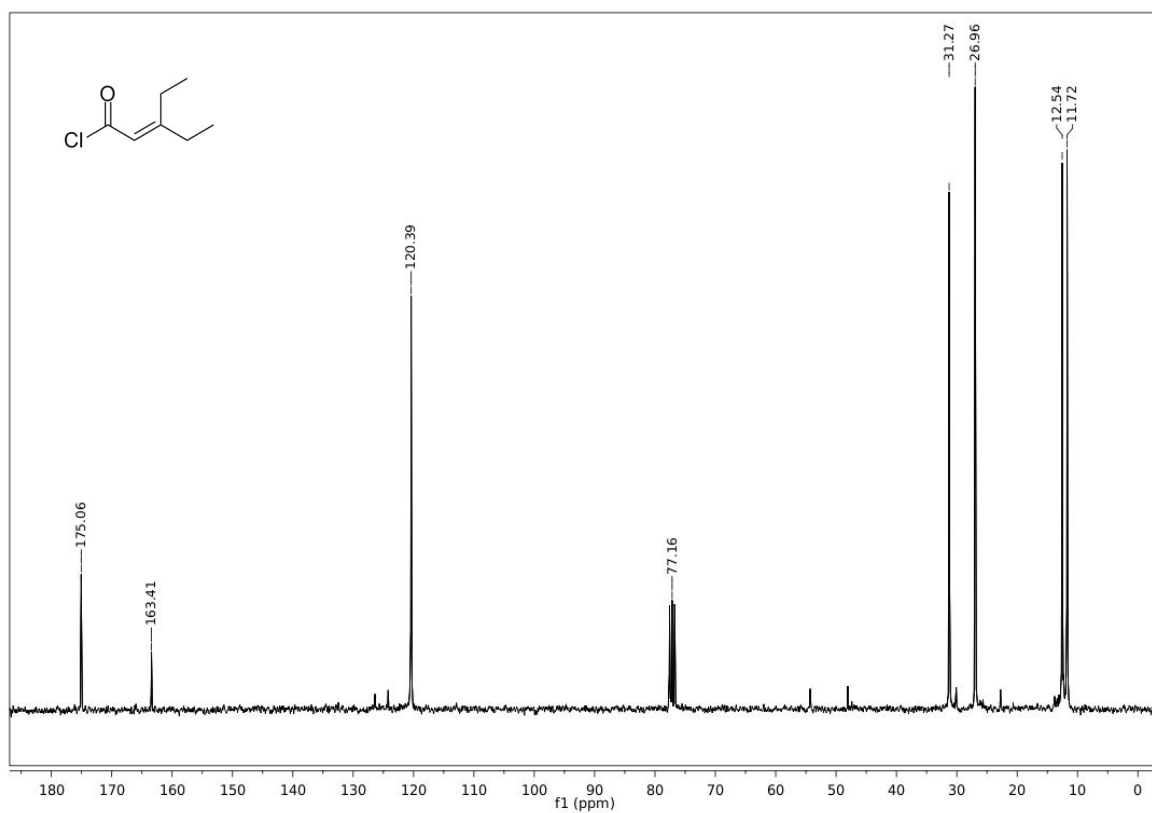
Kuva L14. 3-etyyli-2-penteenihapon (17) ^1H -spektri CDCl₃:ssa.



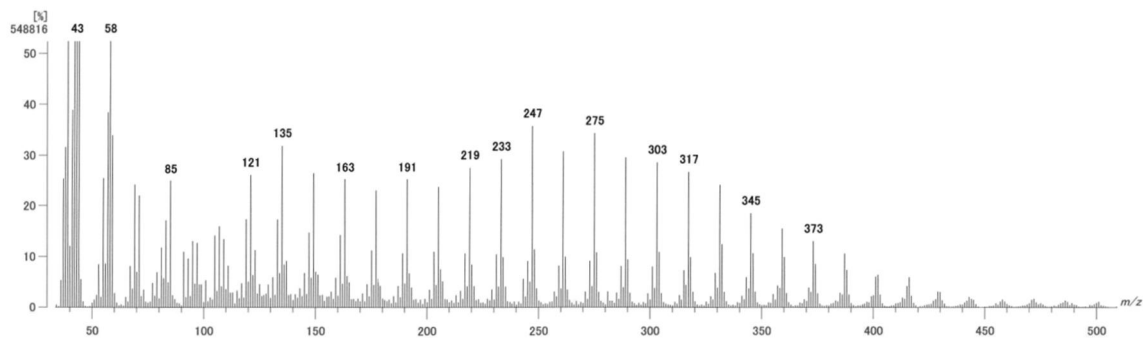
Kuva L15. 3-etyyli-2-penteenihapon (17) ^{13}C -spektri CDCl₃:ssa.



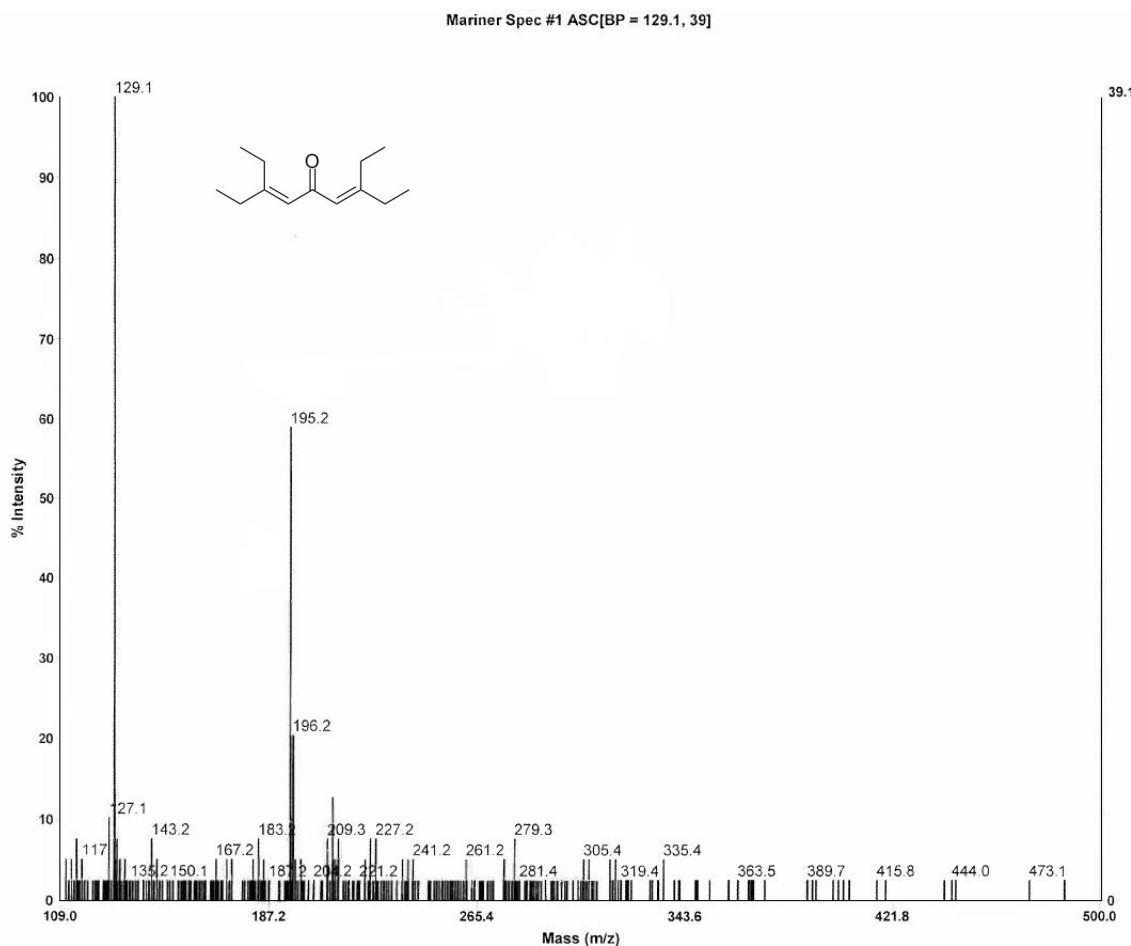
Kuva L16. 3-etyyli-2-pentenoyylikloridin (**16**) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



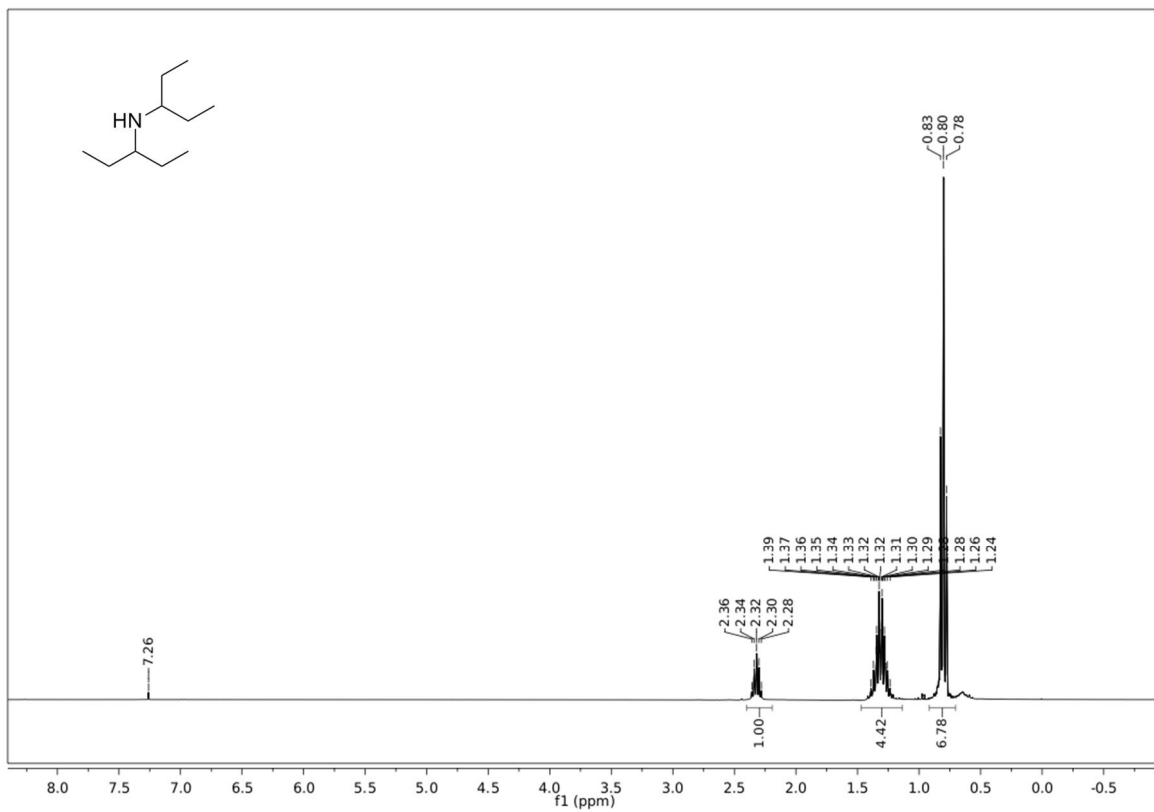
Kuva L17. 3-etyyli-2-pentenoyylikloridin (**16**) ¹³C-spektri CDCl₃:ssa.



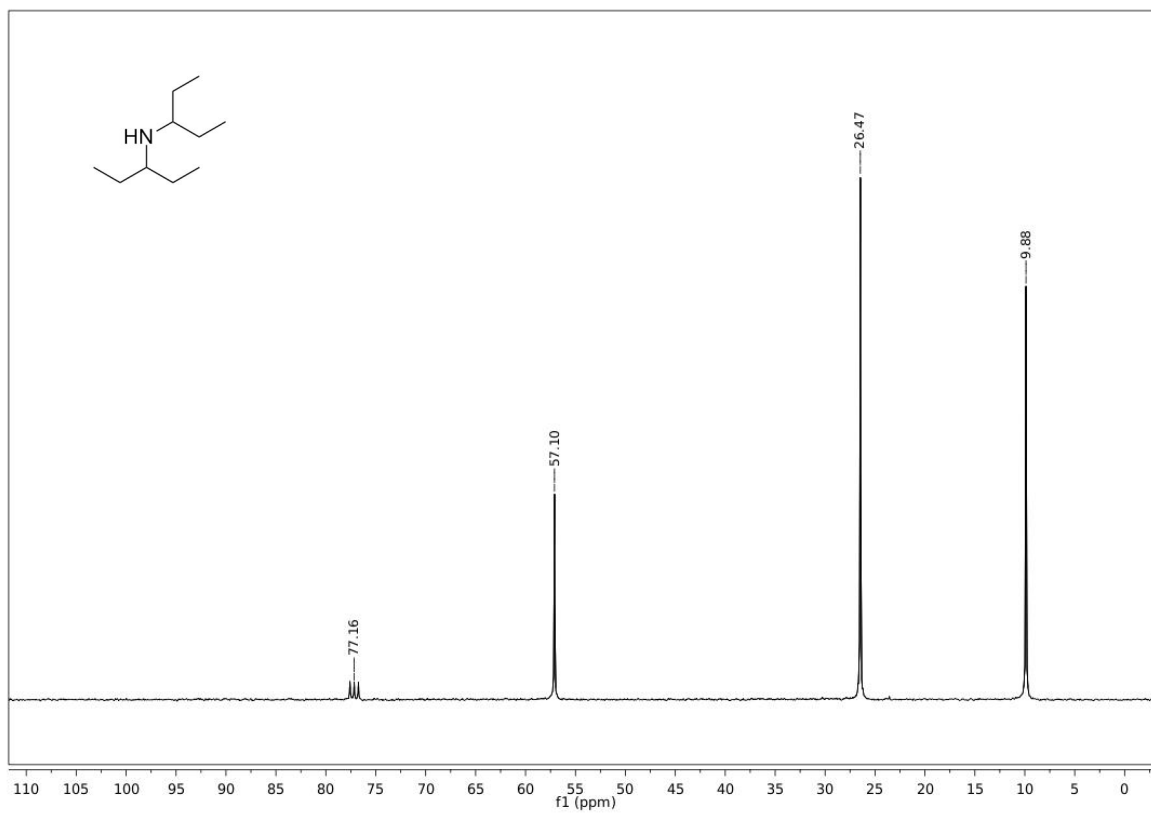
Kuva L18. 3,7-dietyylinona-3,6-dien-5-onin (**8**) synteesissä muodostuneen polymeerin massaspektri



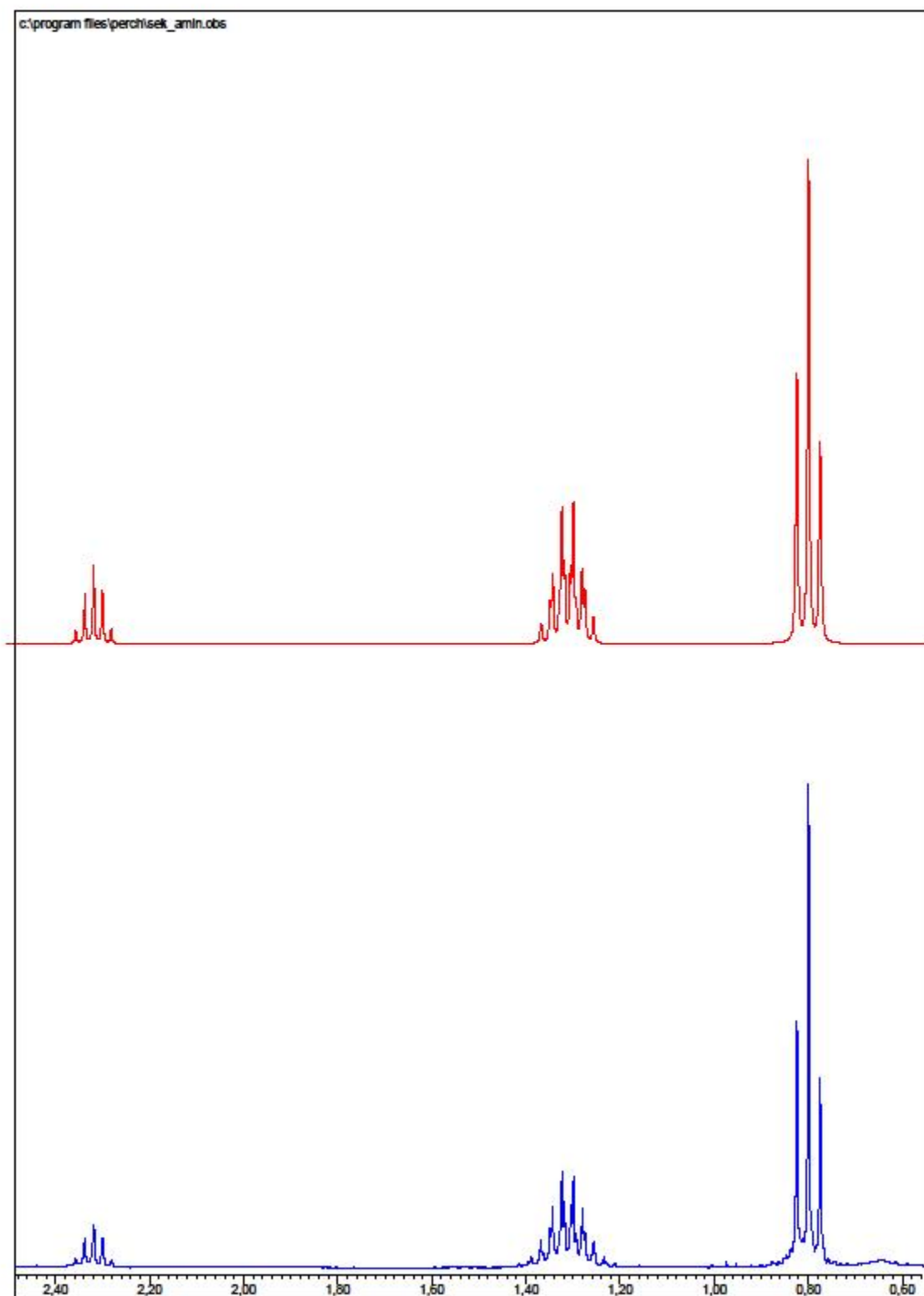
Kuva L19. 3,7-dietyylinona-3,6-dien-5-onin (**8**) synteesin reaktioseoksesta mitattu massaspektri



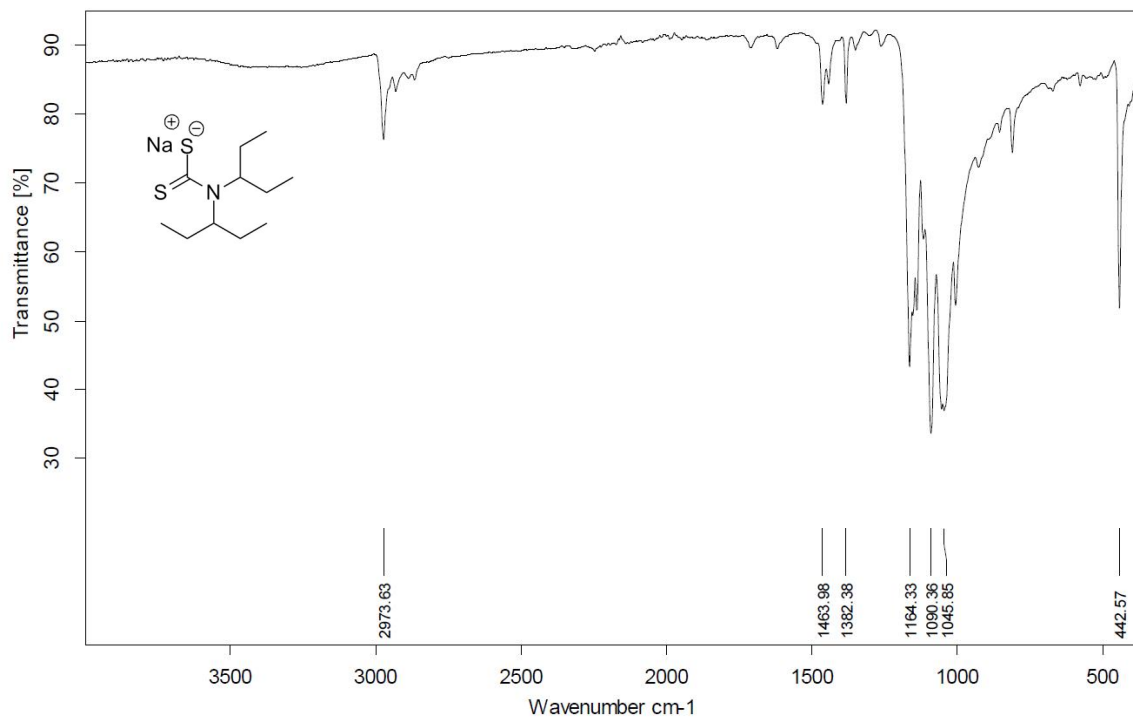
Kuva L20. Dipentan-3-yyliamiinin (**24**) ^1H -spektri CDCl₃:ssa.



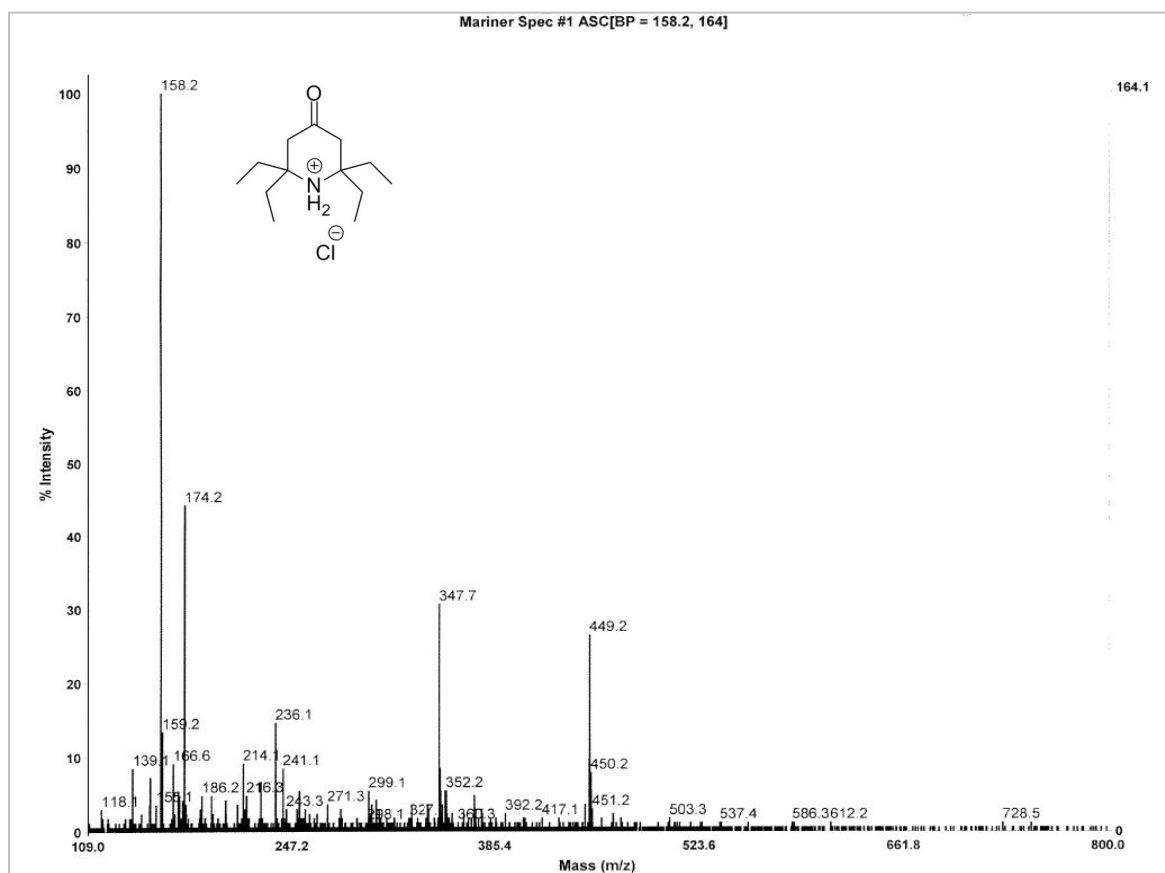
Kuva L21. Dipentan-3-yyliamiinin (**24**) ^{13}C -spektri CDCl₃:ssa.



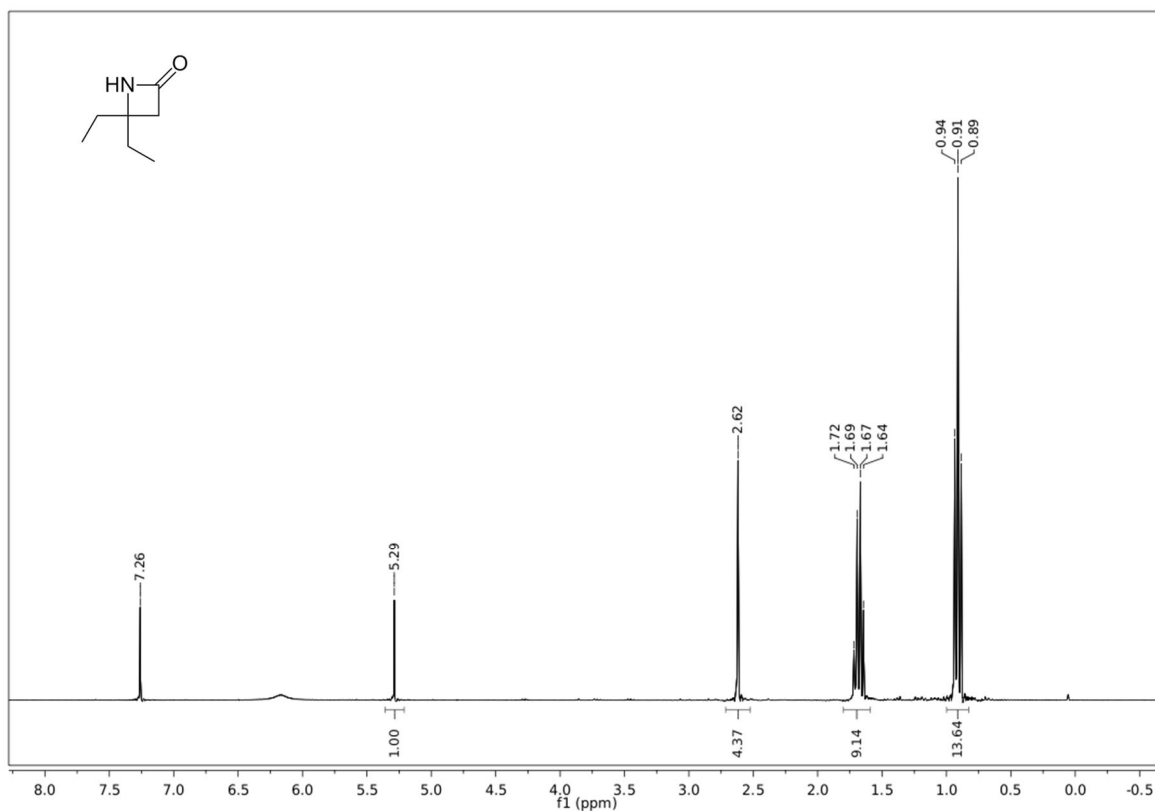
Kuva L22. Dipentan-3-yliamiinin (**24**) kokeellinen (sinisellä) ja laskettu (punaisella) ¹H-spektri



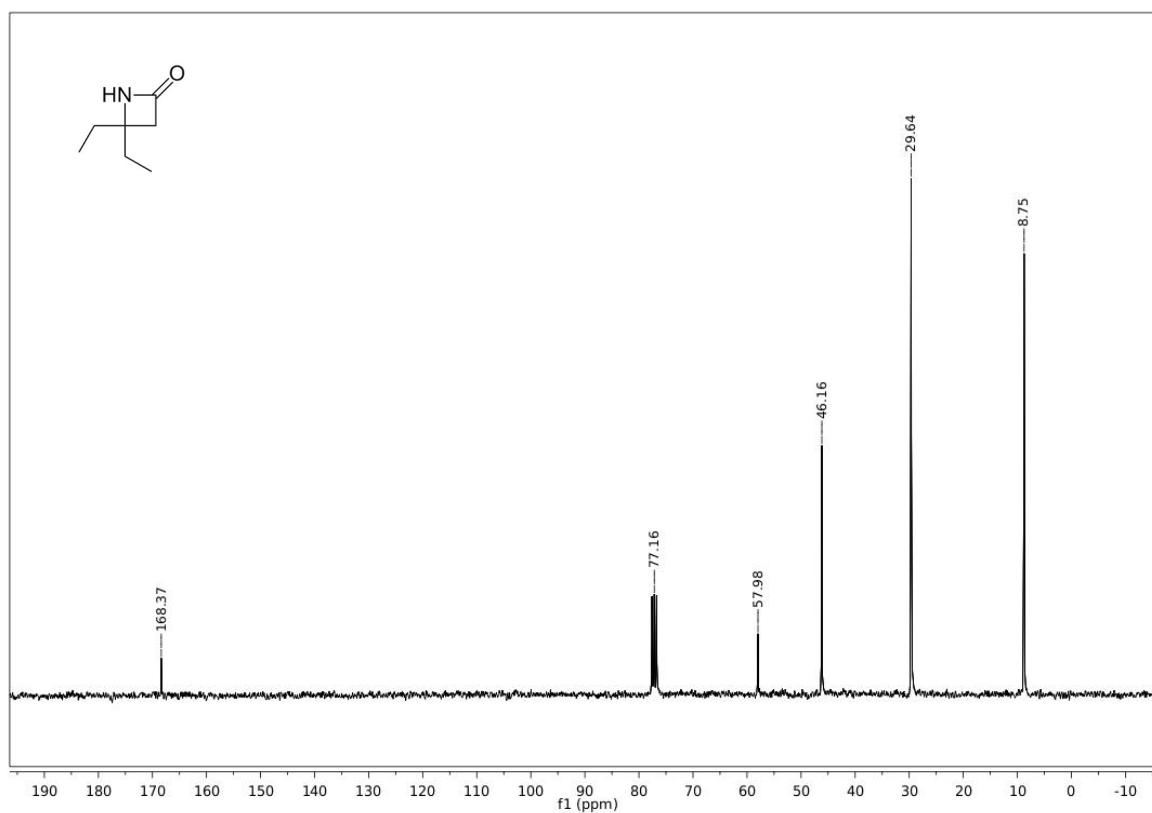
Kuva L23. N,N-dipentan-3-yliditiokarbamaatin Na-suolan (**23**) IR-spektri



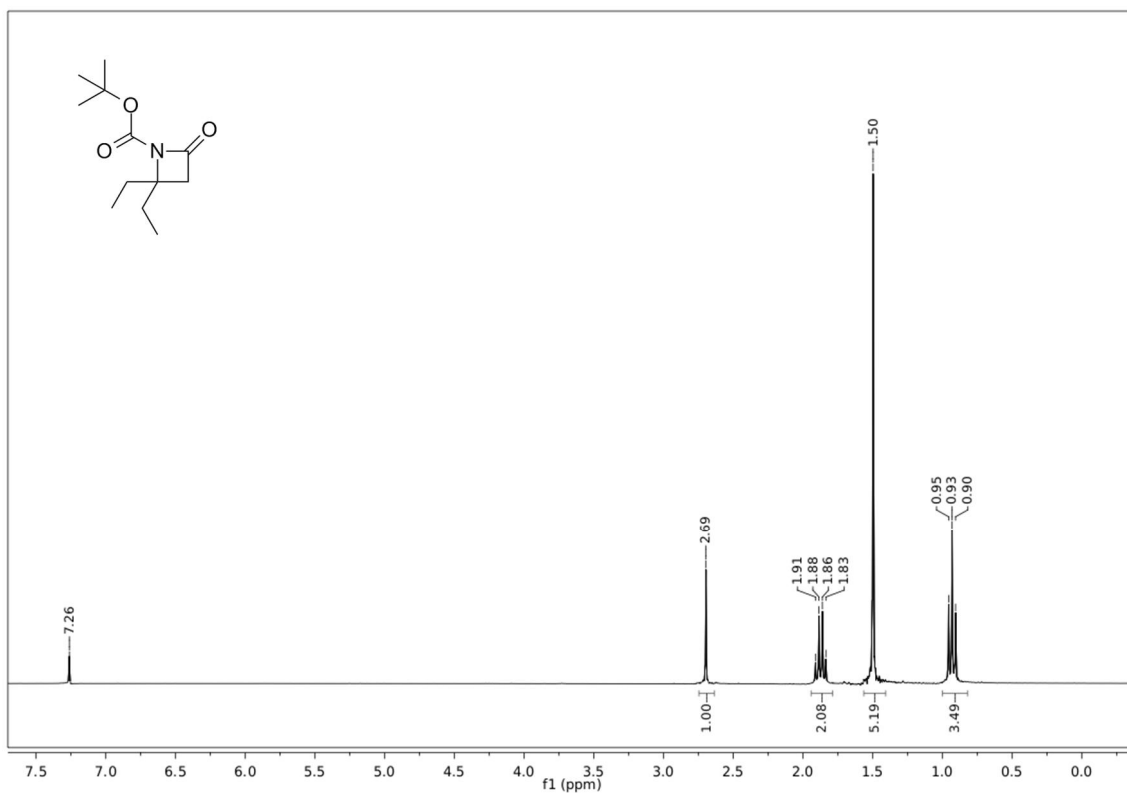
Kuva L24. 2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidinonin AlCl₄-suolan massaspektri



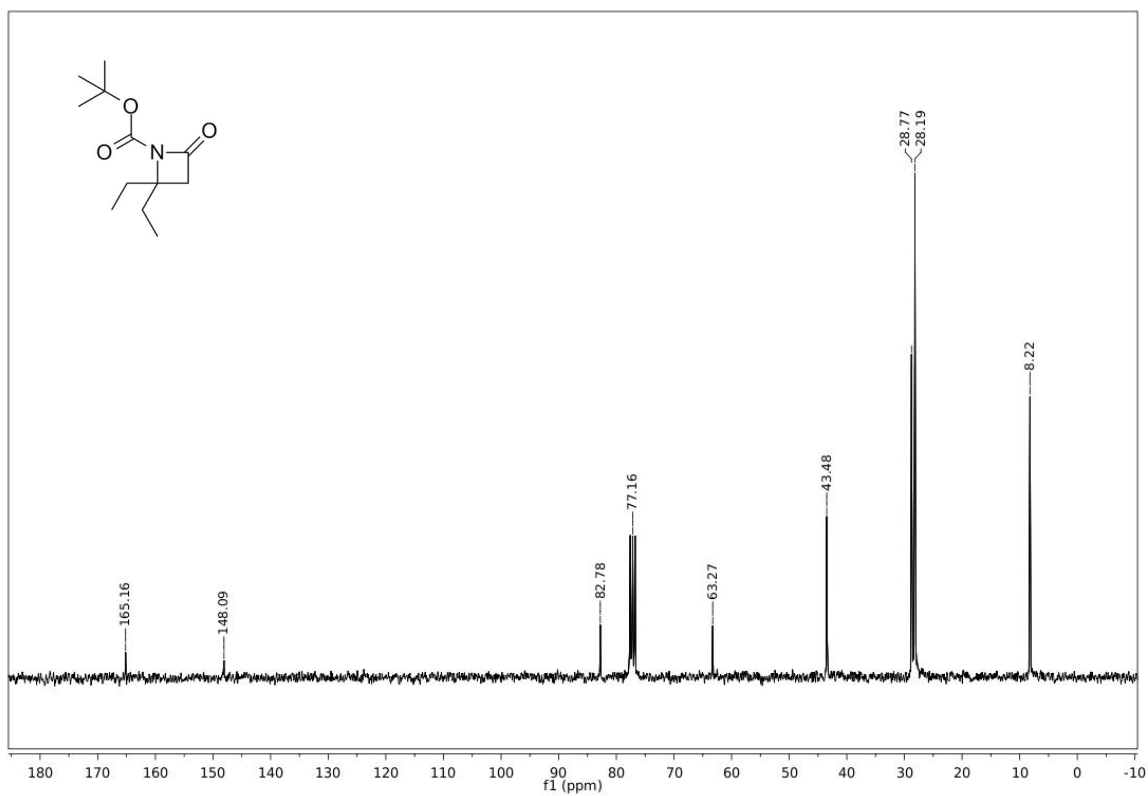
Kuva L25. 4,4-dietyliatsetidin-2-onin (**31**) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



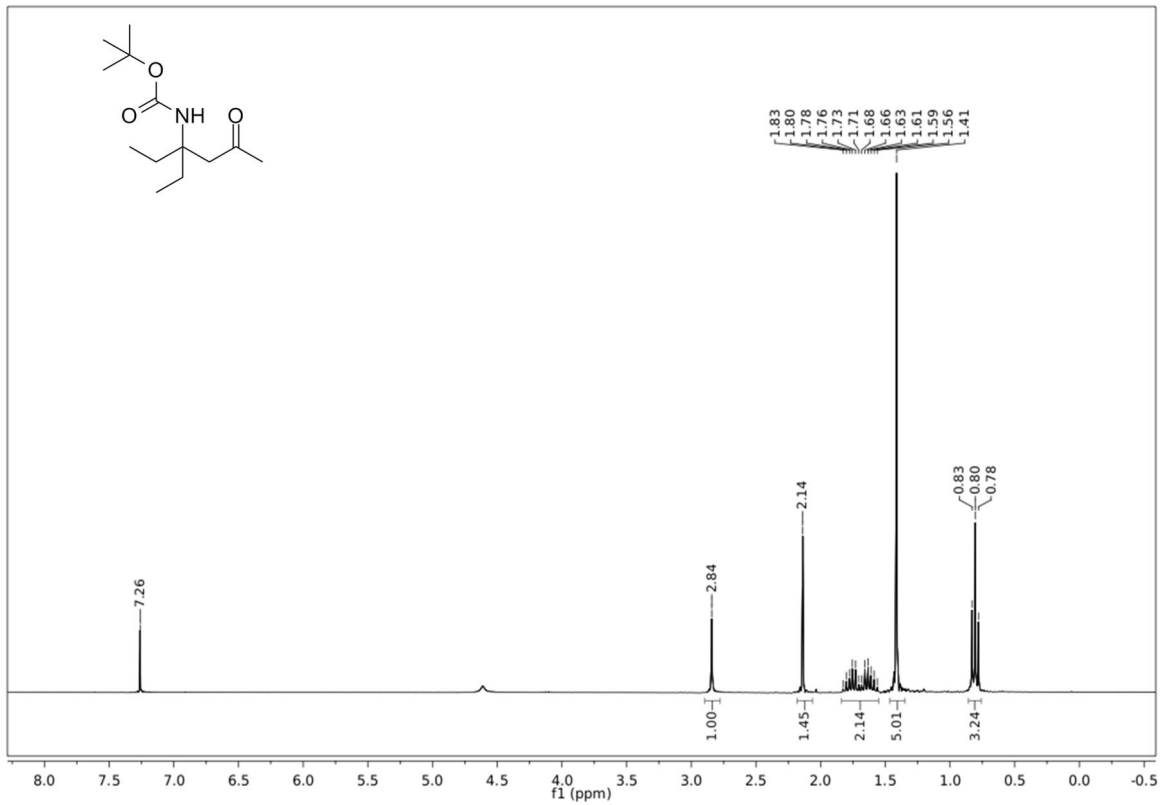
Kuva L26. 4,4-dietyliatsetidin-2-onin (**31**) ¹³C-spektri CDCl₃:ssa.



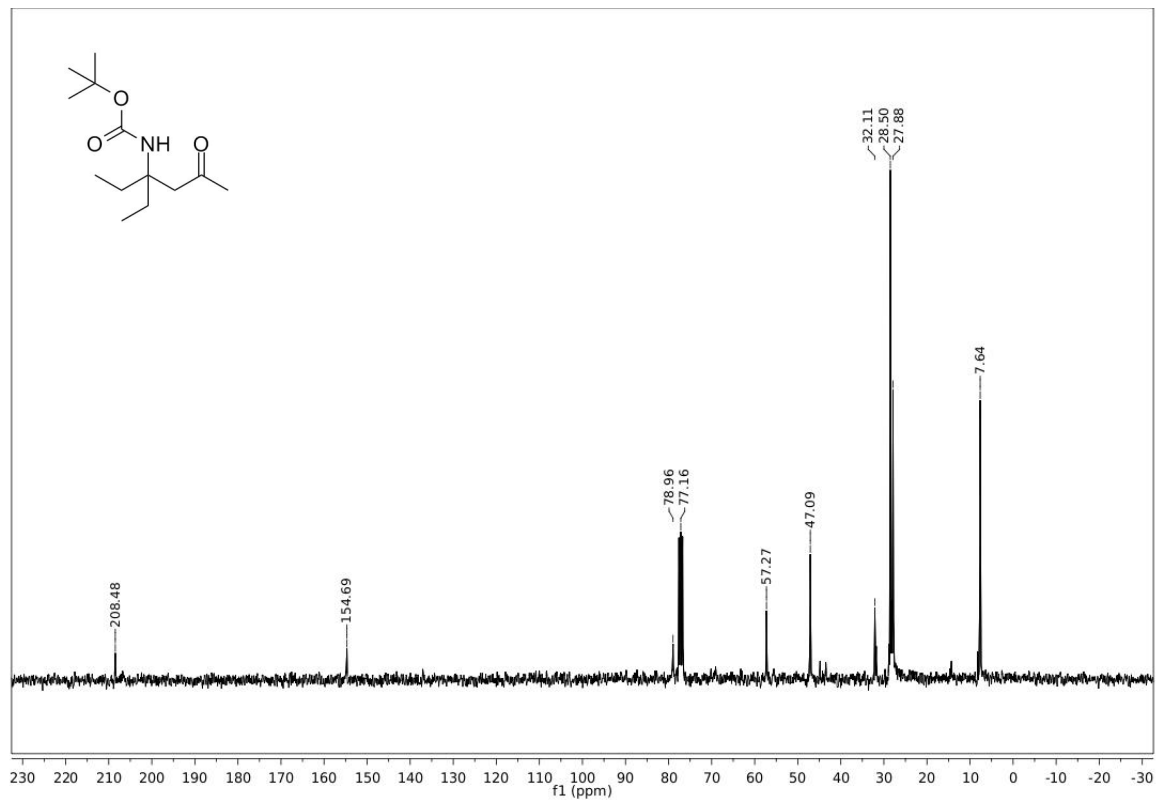
Kuva L27. *N*-(*tert*-butoksidikarbonyyli)-4,4-dietyyliatsetidin-2-onin (**30**) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



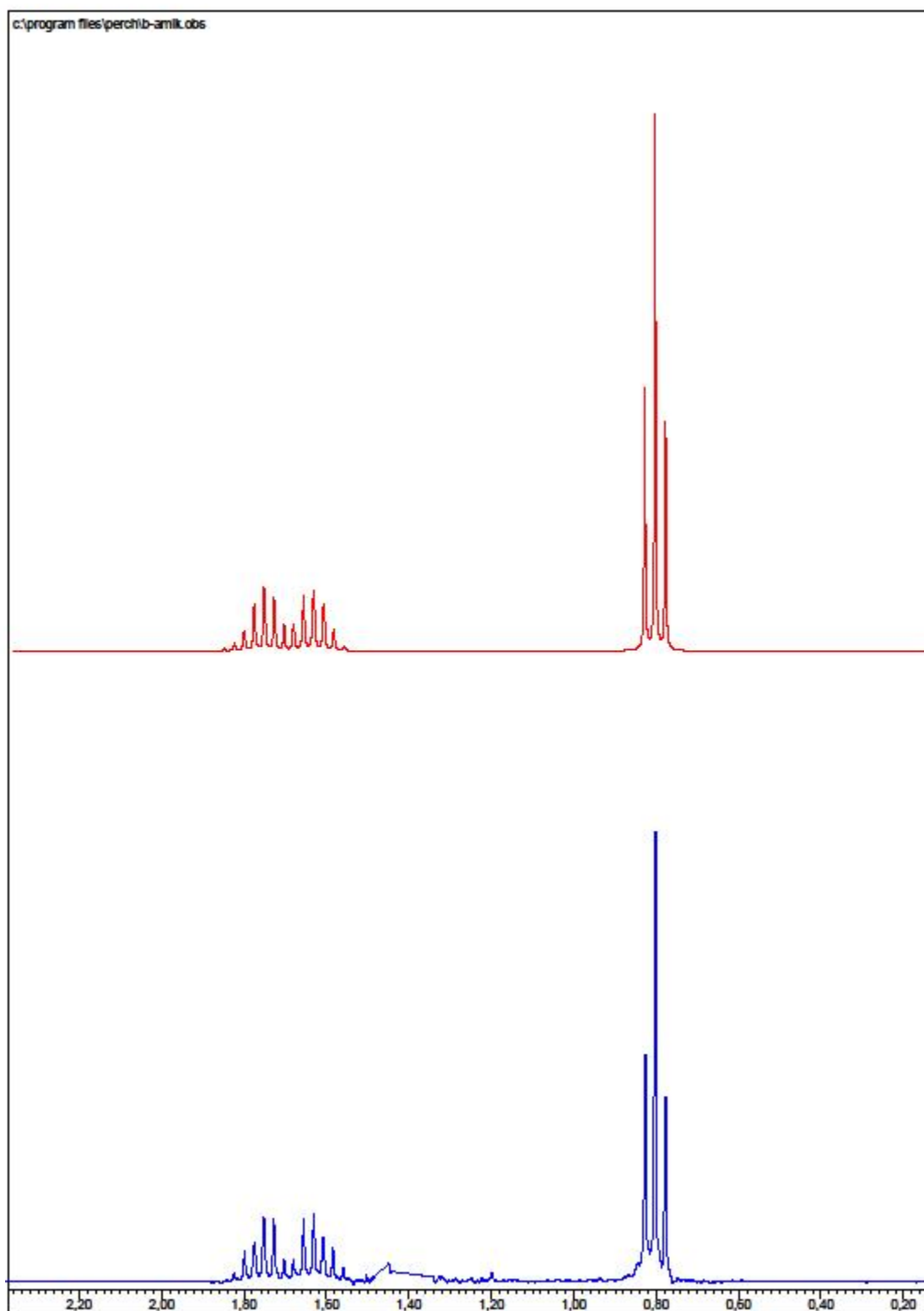
Kuva L28. *N*-(*tert*-butoksidikarbonyyli)-4,4-dietyyliatsetidin-2-onin (**30**) ¹³C-spektri CDCl₃:ssa.



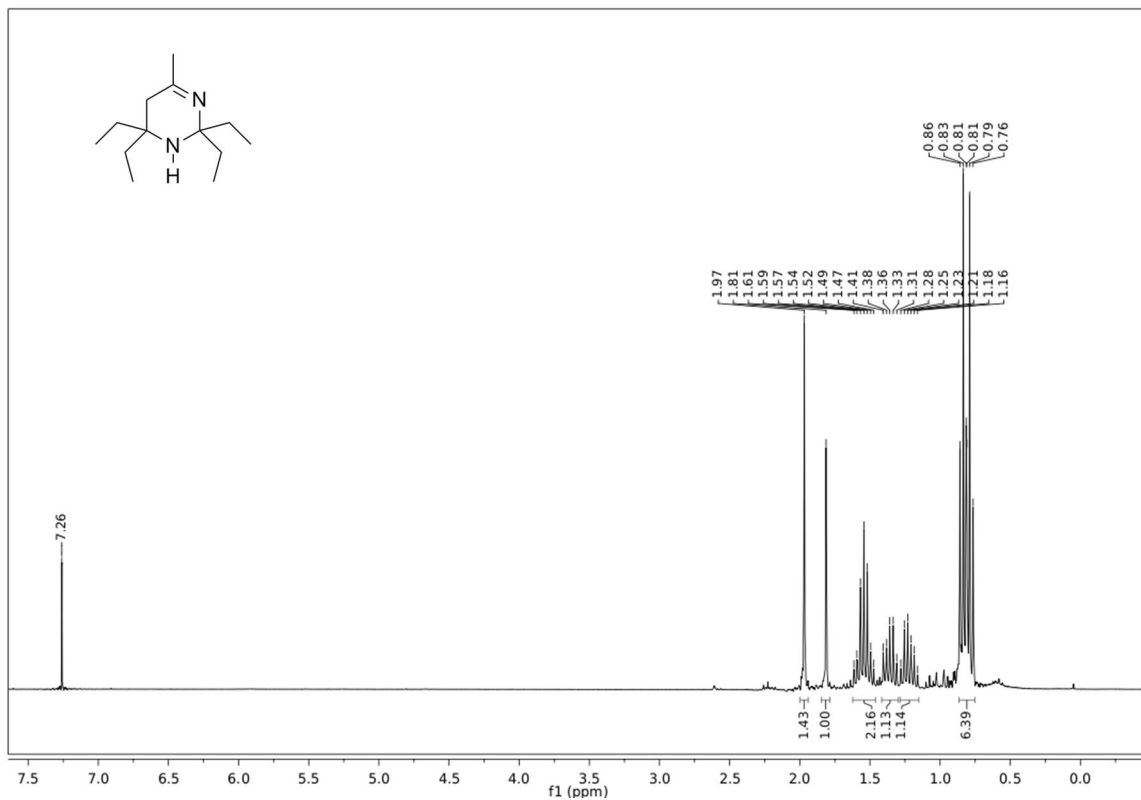
Kuva L29. (1,1-dietyyli-3-oksobutyyli)-karbamiinihapon *tert*-butyyliesterin (**29**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



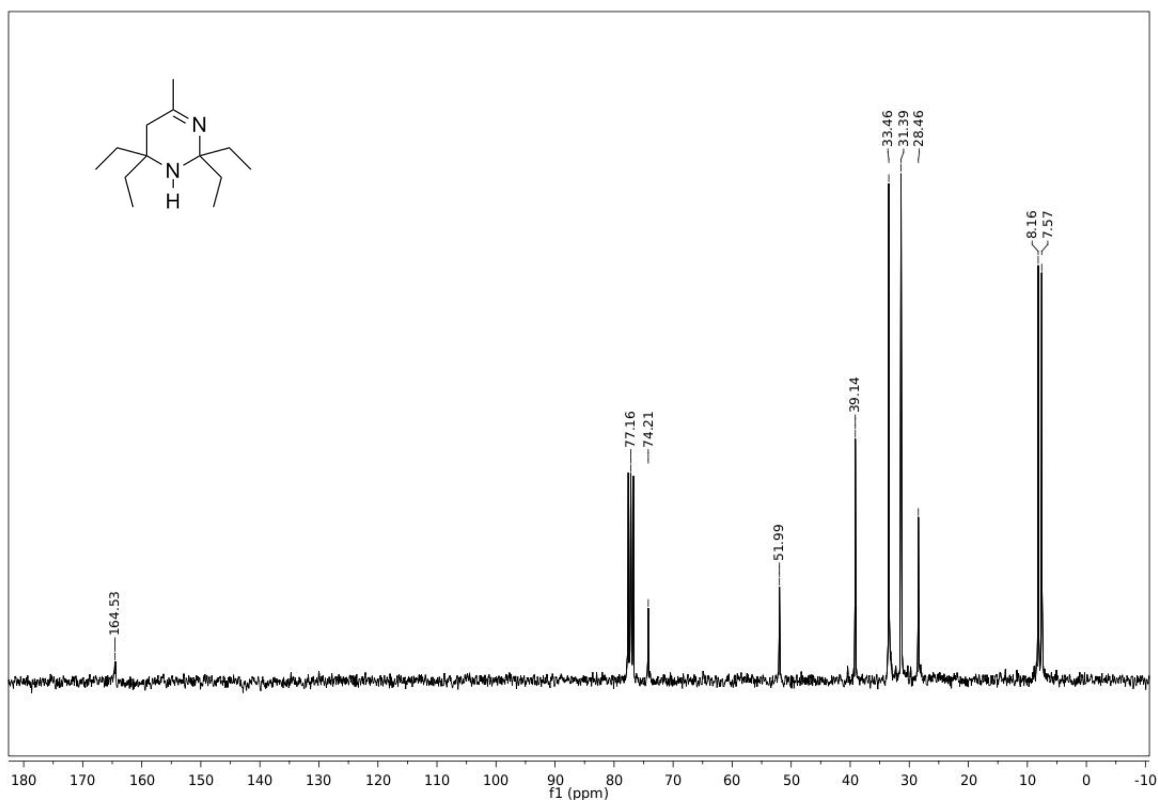
Kuva L30. (1,1-dietyyli-3-oksobutyyli)-karbamiinihapon *tert*-butyyliesterin (**29**) ^{13}C -spektri CDCl_3 :ssa.



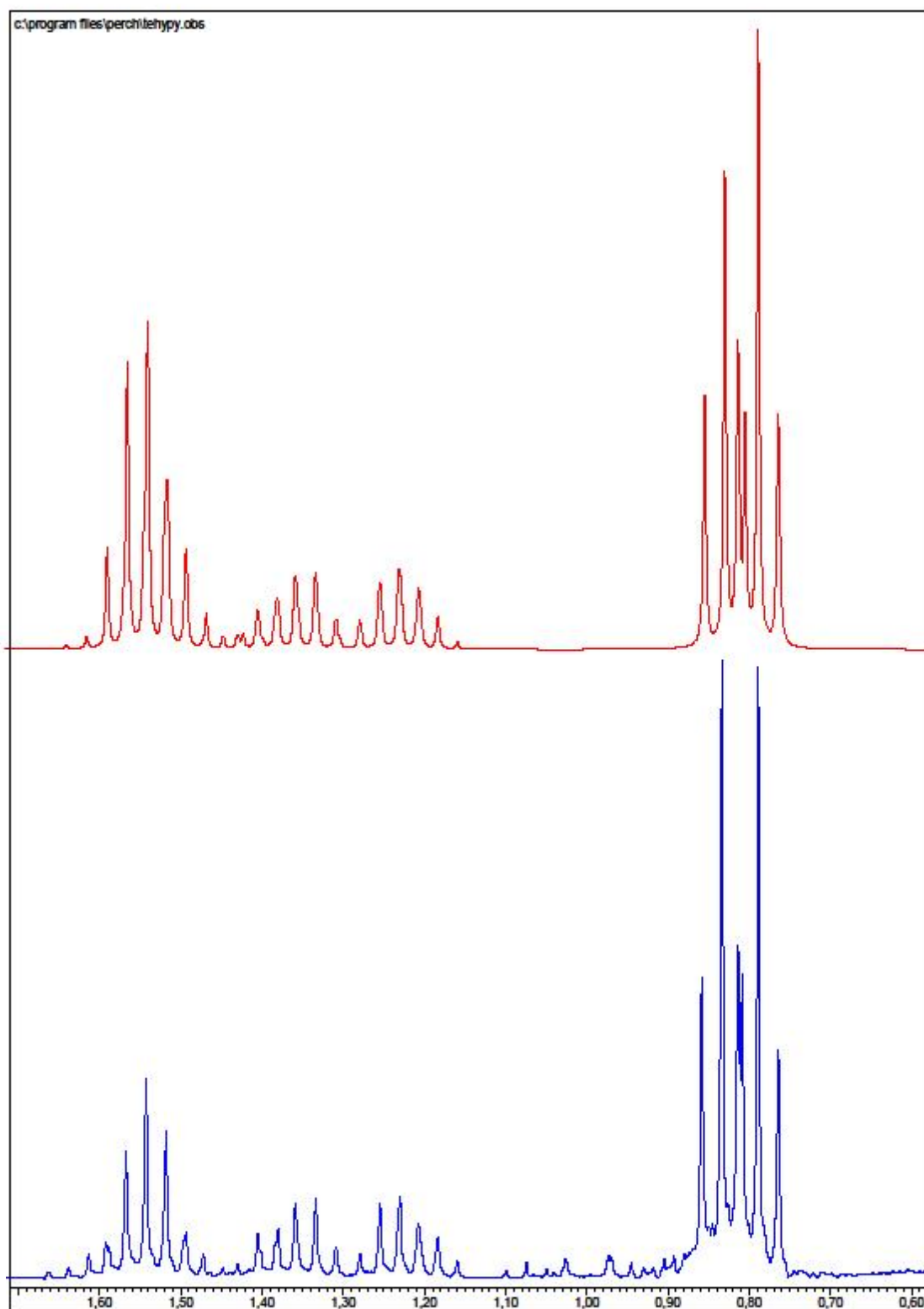
Kuva L31. (1,1-dietyyli-3-oksobutyli)-karbamiinihapon *tert*-butyyliesterin (**29**) kokeellinen (sinisellä) ja laskettu (punaisella) ¹H-spektri.



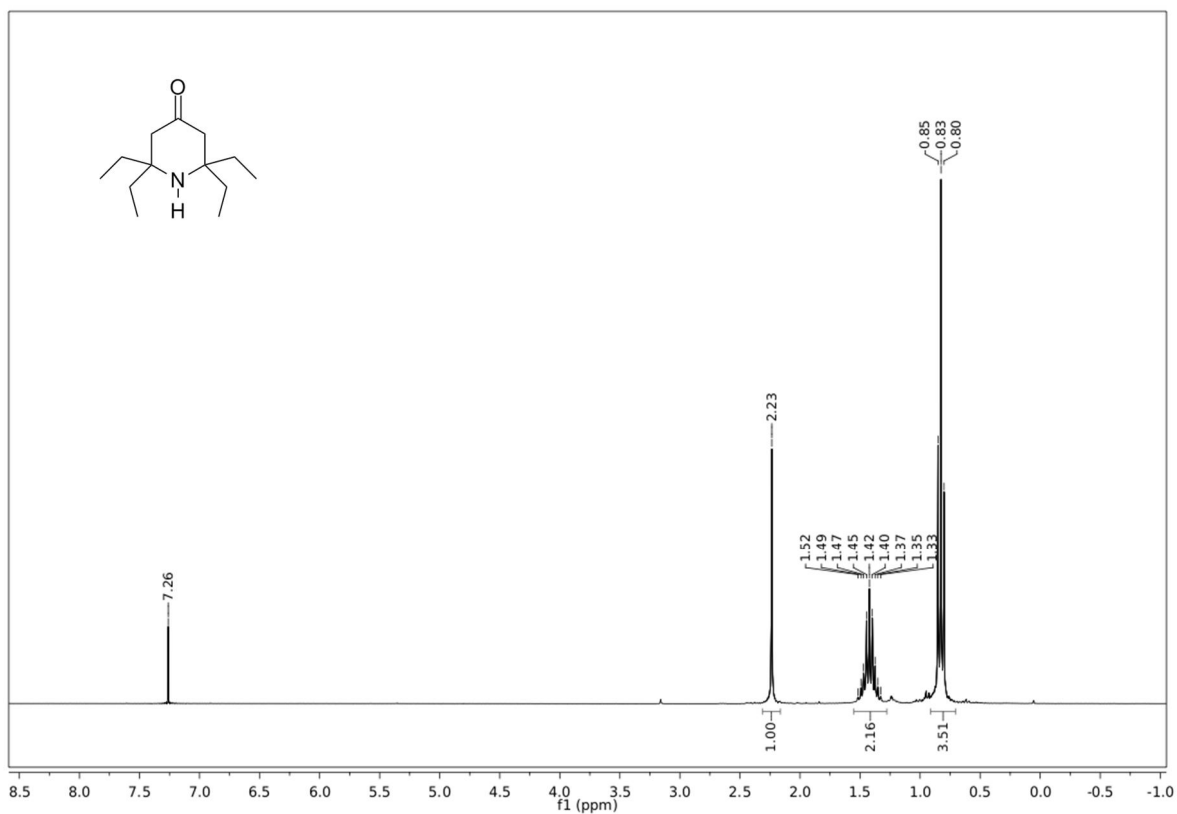
Kuva L32. 2,2,6,6-tetraetyyli-1,2,5,6-tetrahydro-4-metyyliprimidiinin (**28**) ¹H-spektri CDCl₃:ssa.



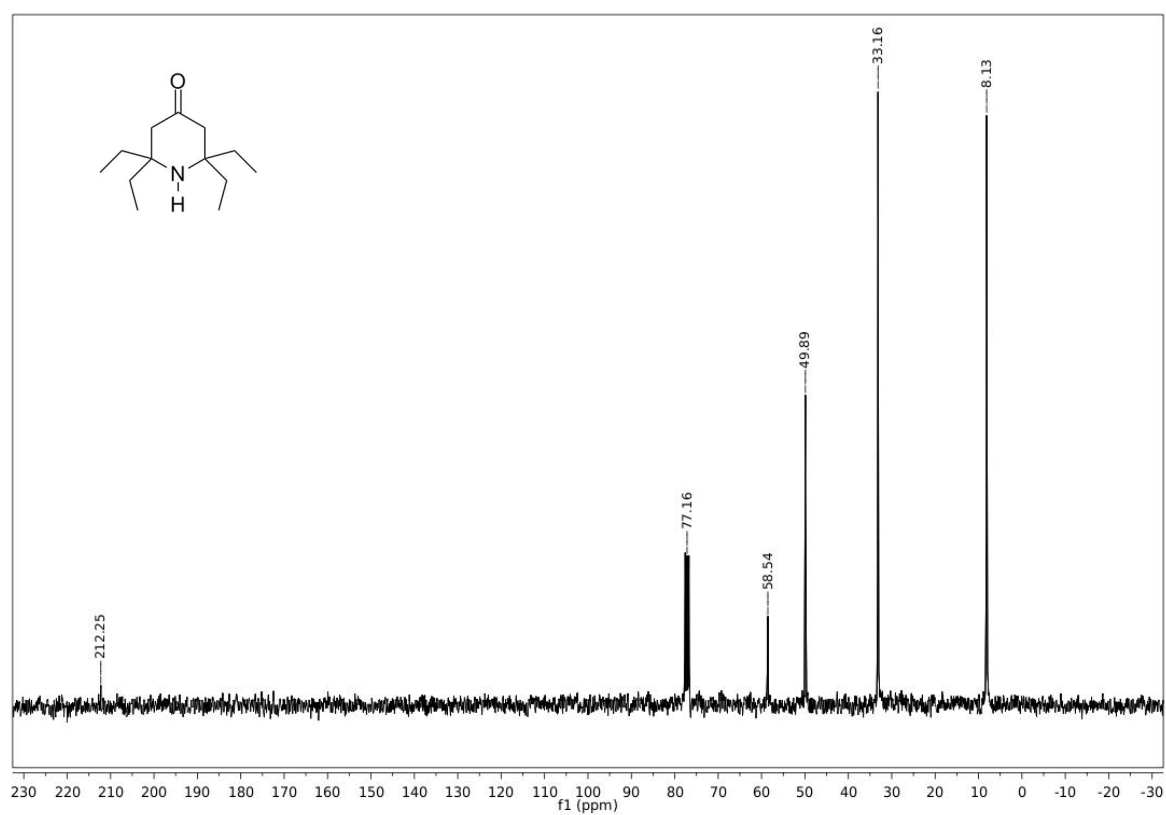
Kuva L33. 2,2,6,6-tetraetyyli-1,2,5,6-tetrahydro-4-metyyliprimidiinin (**28**) ¹³C-spektri CDCl₃:ssa.



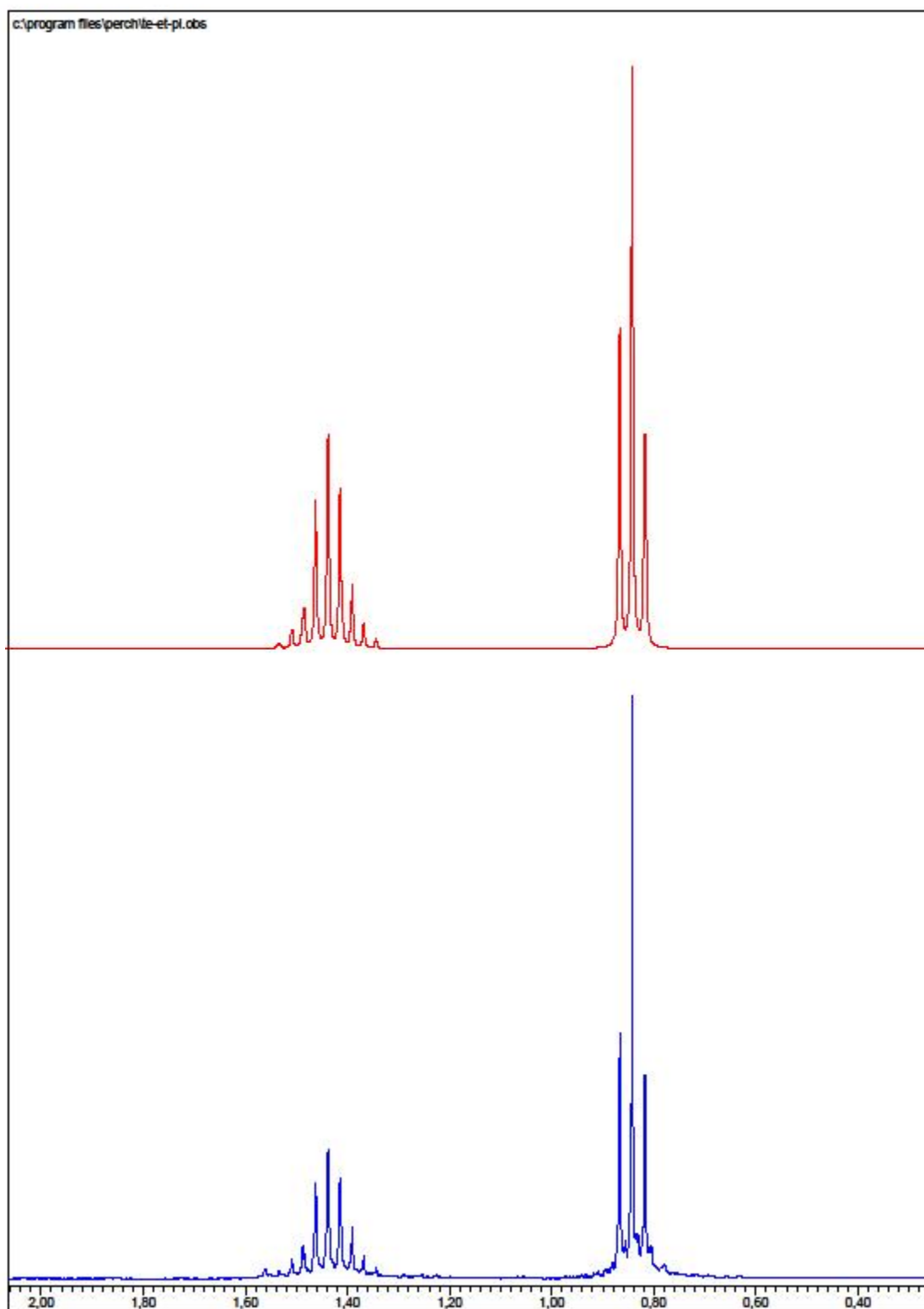
Kuva L34. 2,2,6,6-tetraetyyli-1,2,5,6-tetrahydro-4-metyyliprimidiinin (**28**) kokeellinen (sinisellä) ja laskettu (punaisella) ^1H -spektri.



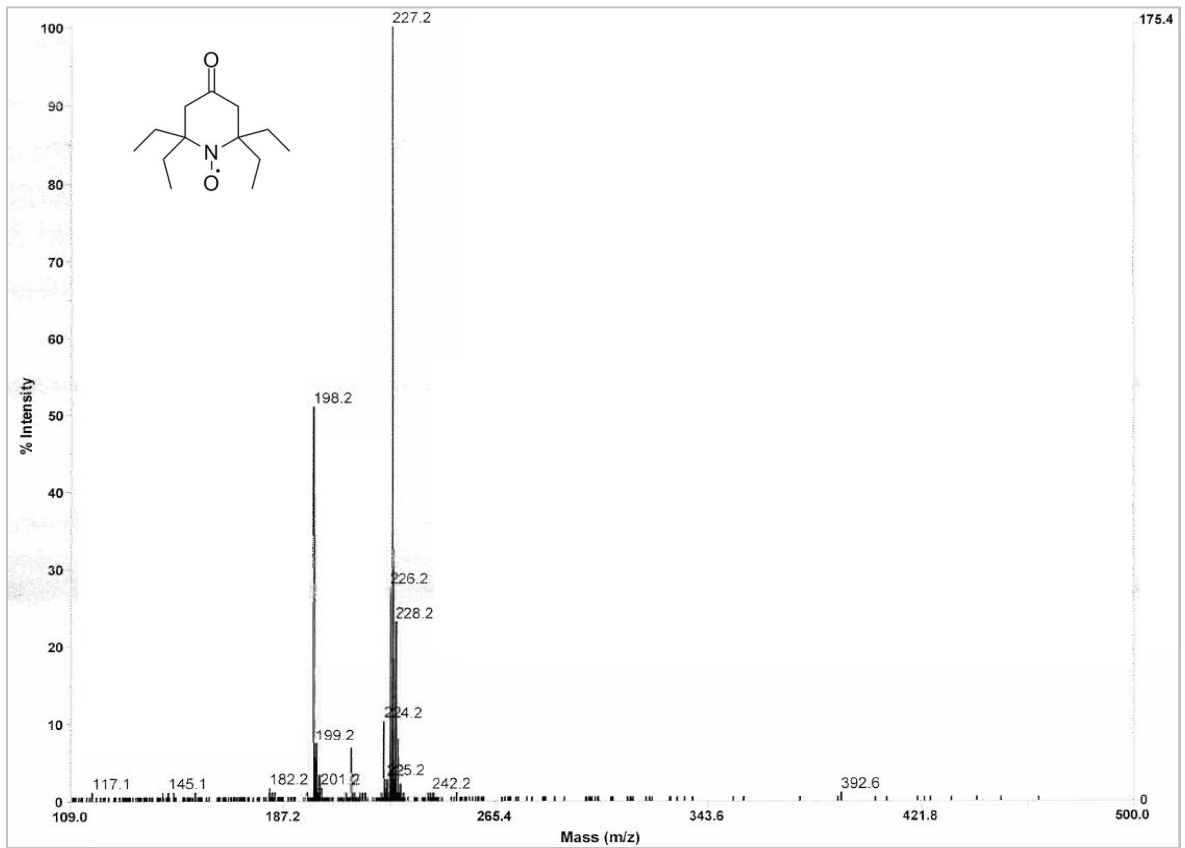
Kuva L35. 2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidonin (**3**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



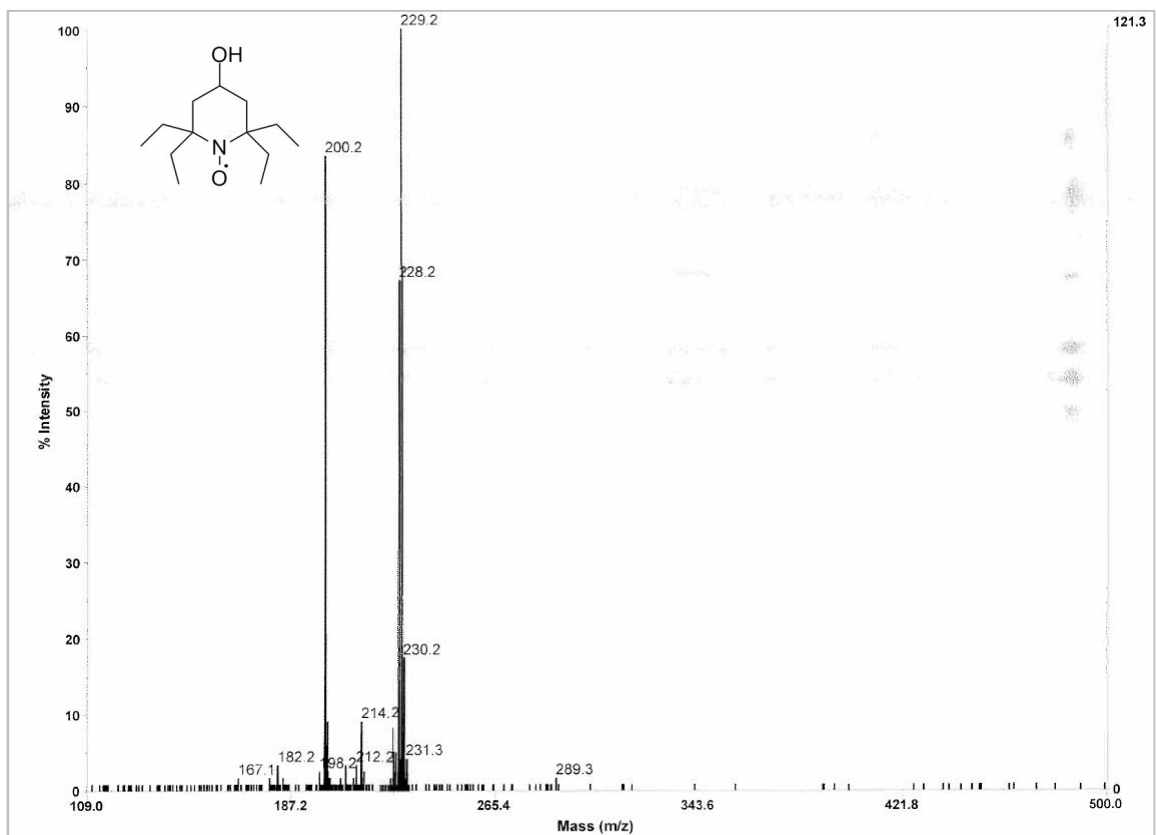
Kuva L36. 2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidonin (**3**) ^{13}C -spektri CDCl_3 :ssa.



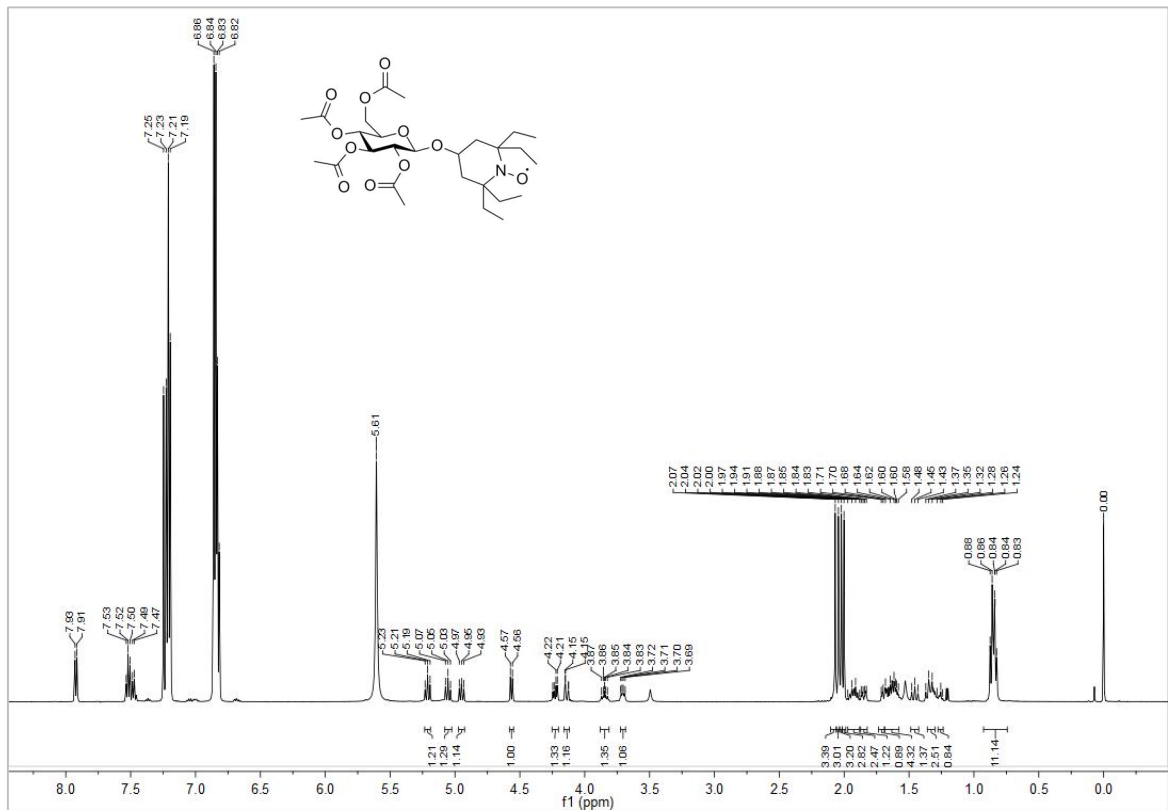
Kuva L37. 2,2,6,6-tetraetyyli-4-piperidonin (**3**) kokeellinen (sinisellä) ja laskettu (punaisella) ¹H-spektri.



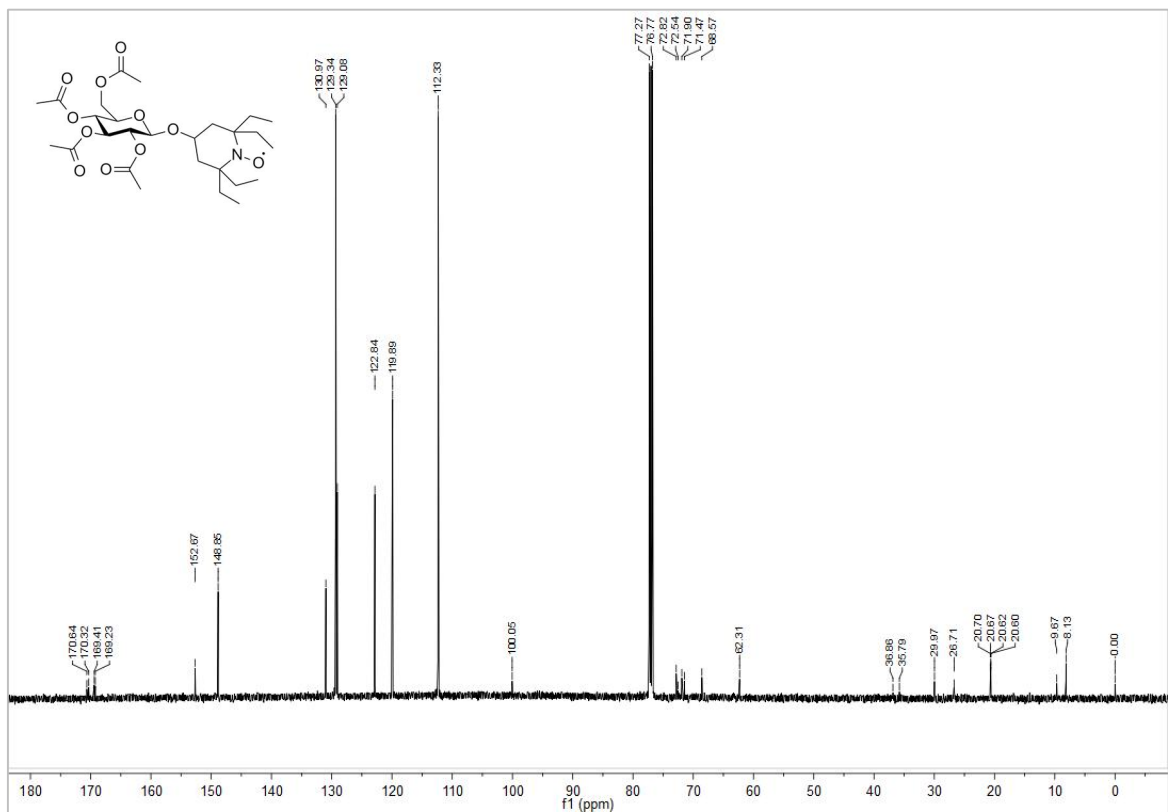
Kuva L38. 2,2,6,6-tetraetyylipiperidin-4-oni-1-oksyilin (2) massaspektri.



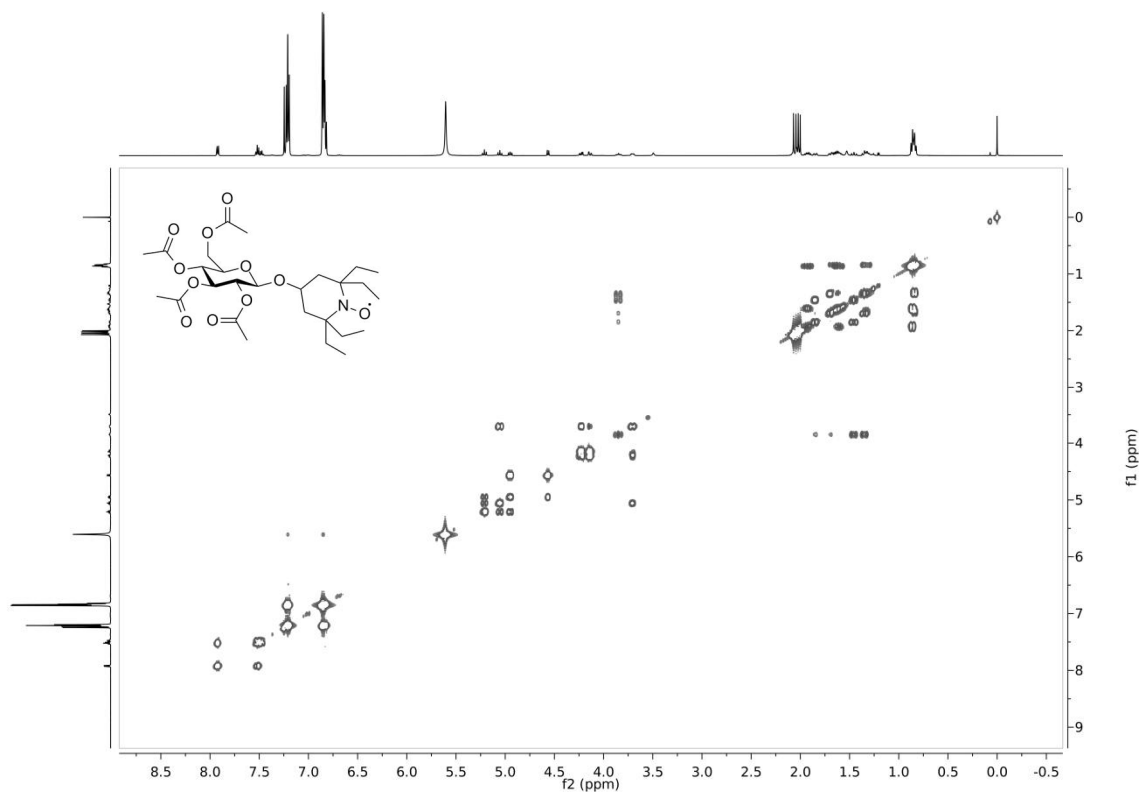
Kuva L39. 4-hydroksi-2,2,6,6-tetraetyylipiperidini-1-oksyilin (1) massaspektri.



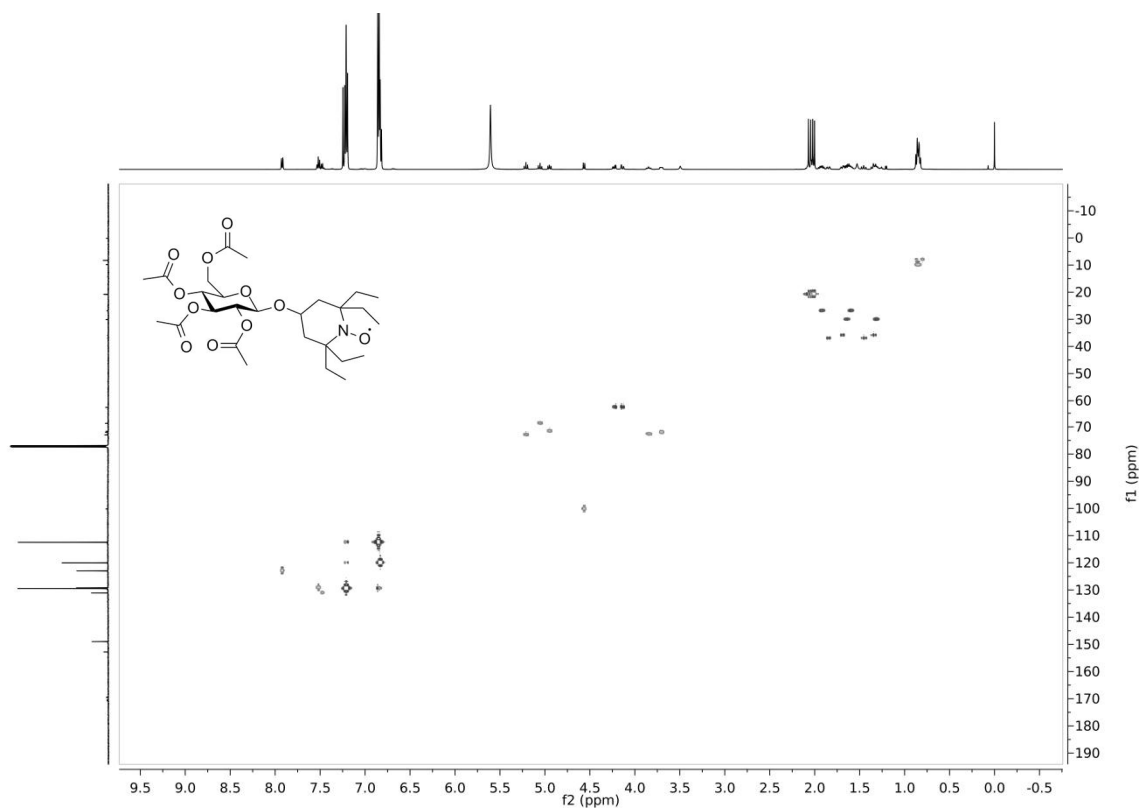
Kuva L40. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (**35**) ^1H -spektri CDCl_3 :ssa.



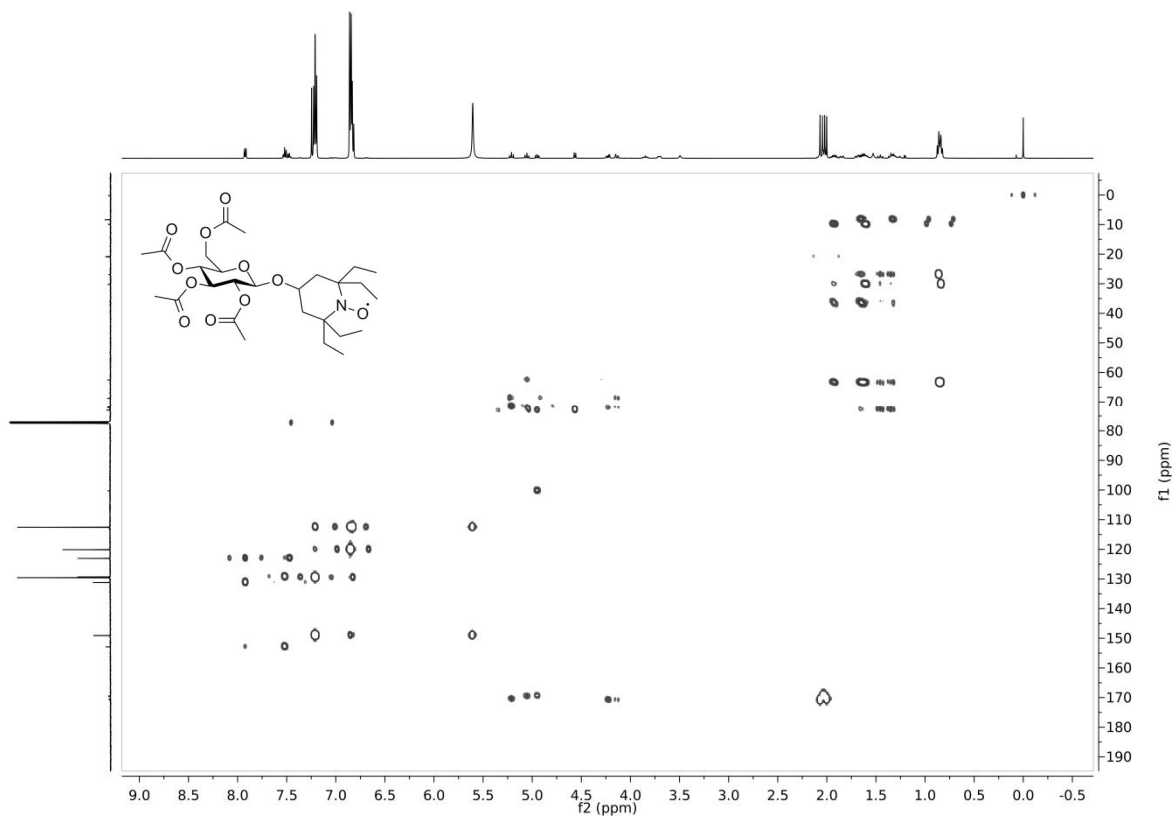
Kuva L41. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (**35**) ^{13}C -spektri CDCl_3 :ssa.



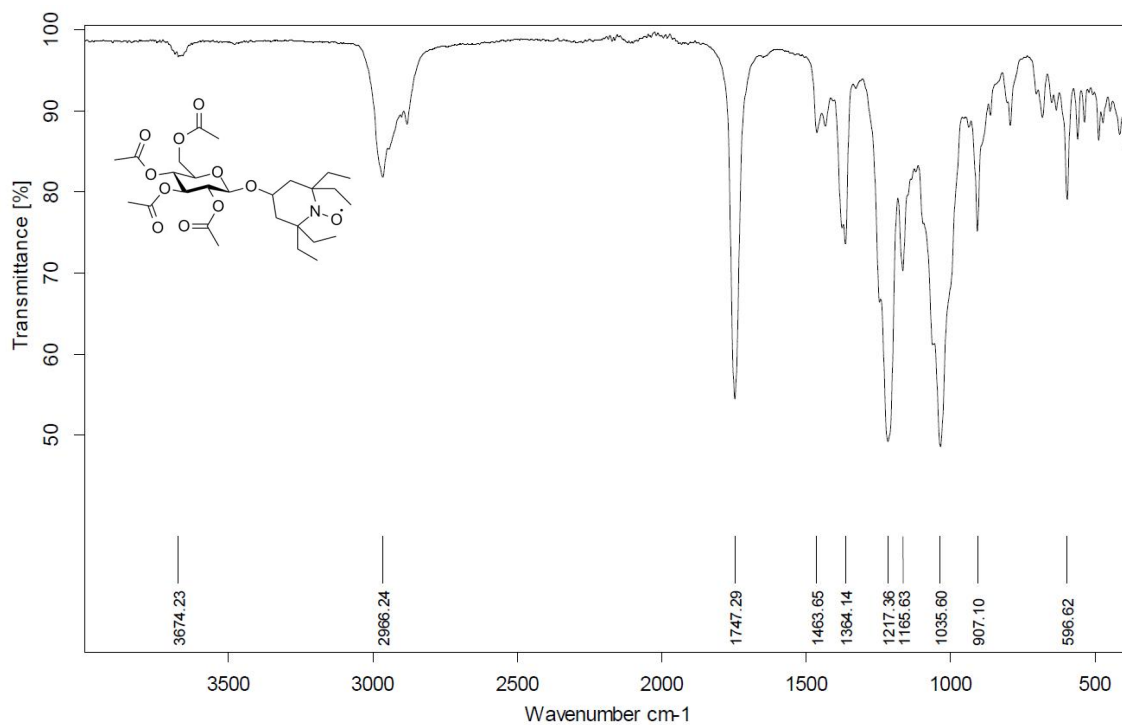
Kuva L42. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (**35**) 2D COSY-spektri CDCl_3 :ssa.



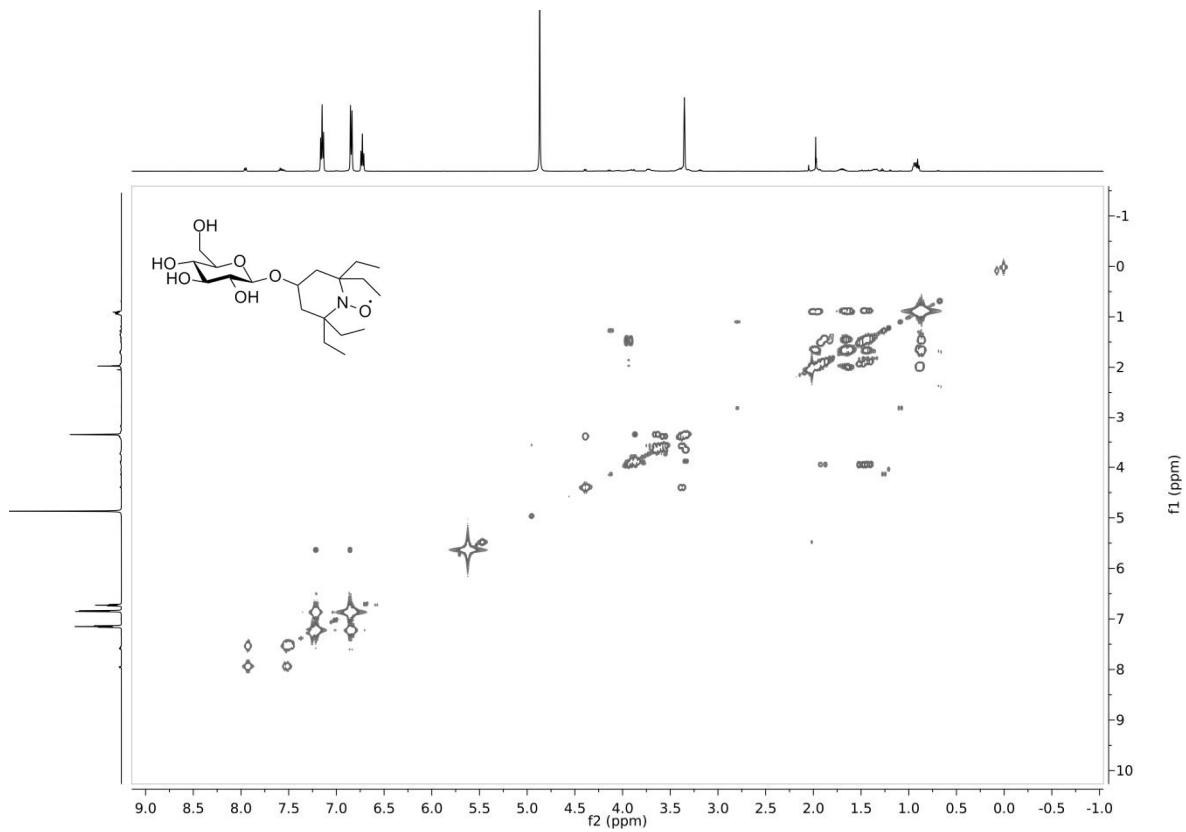
Kuva L43. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (**35**) HSQC-spektri CDCl_3 :ssa.



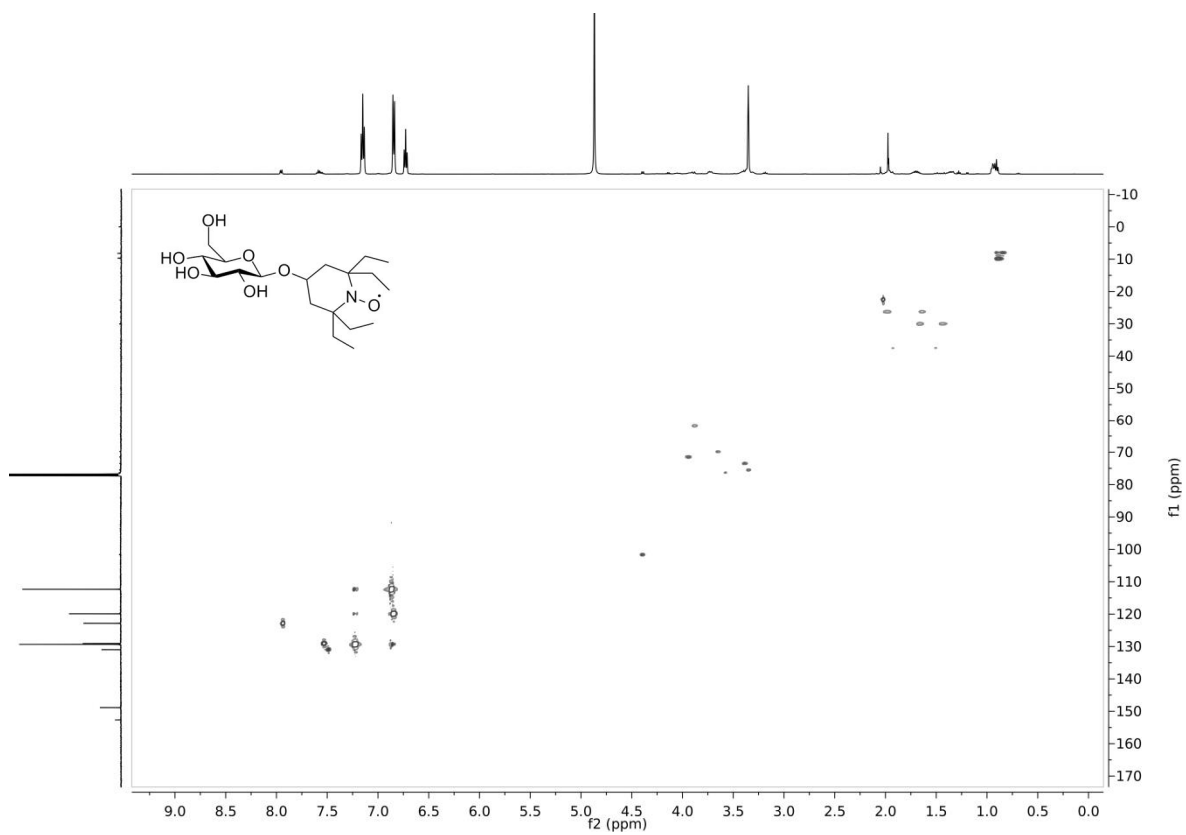
Kuva L44. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (35) HMBC-spektri CDCl₃:ssa.



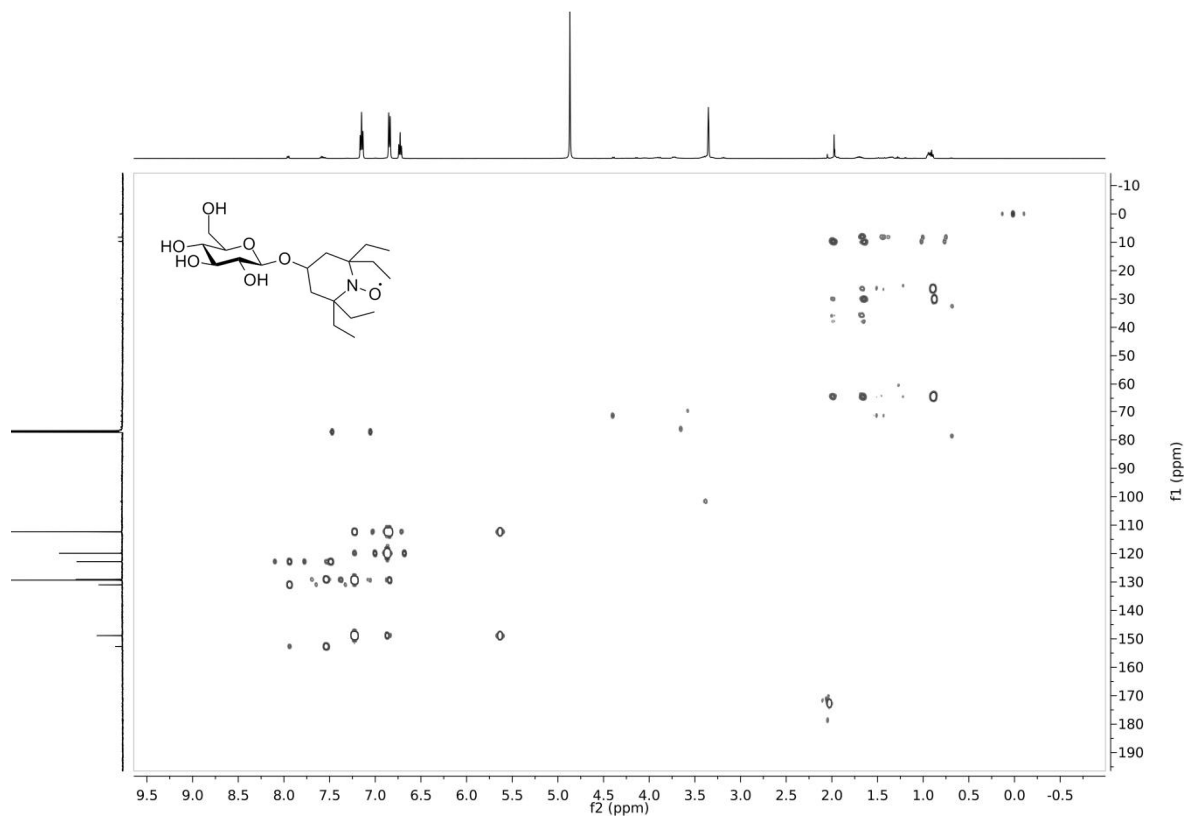
Kuva L45. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-TEEPO:n (35) IR-spektri.



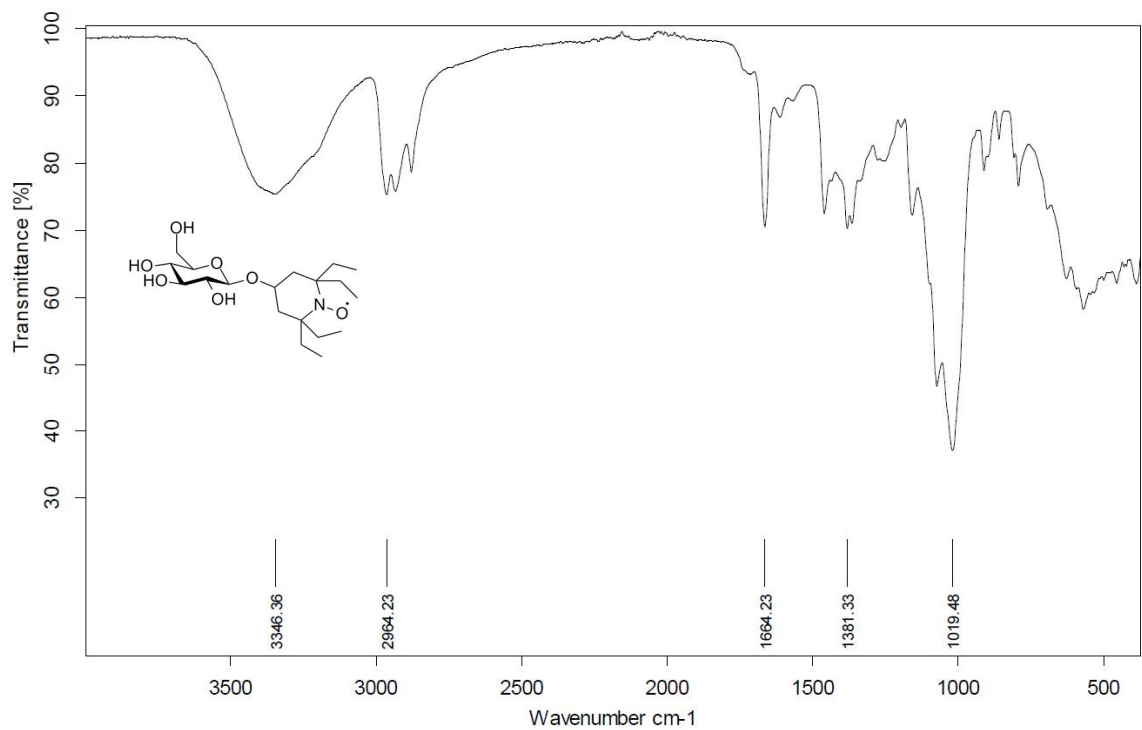
Kuva L48. TEEPO- β -D-glukopyranosidin (**34**) 2D COSY-spektri CDCl_3 :ssa.



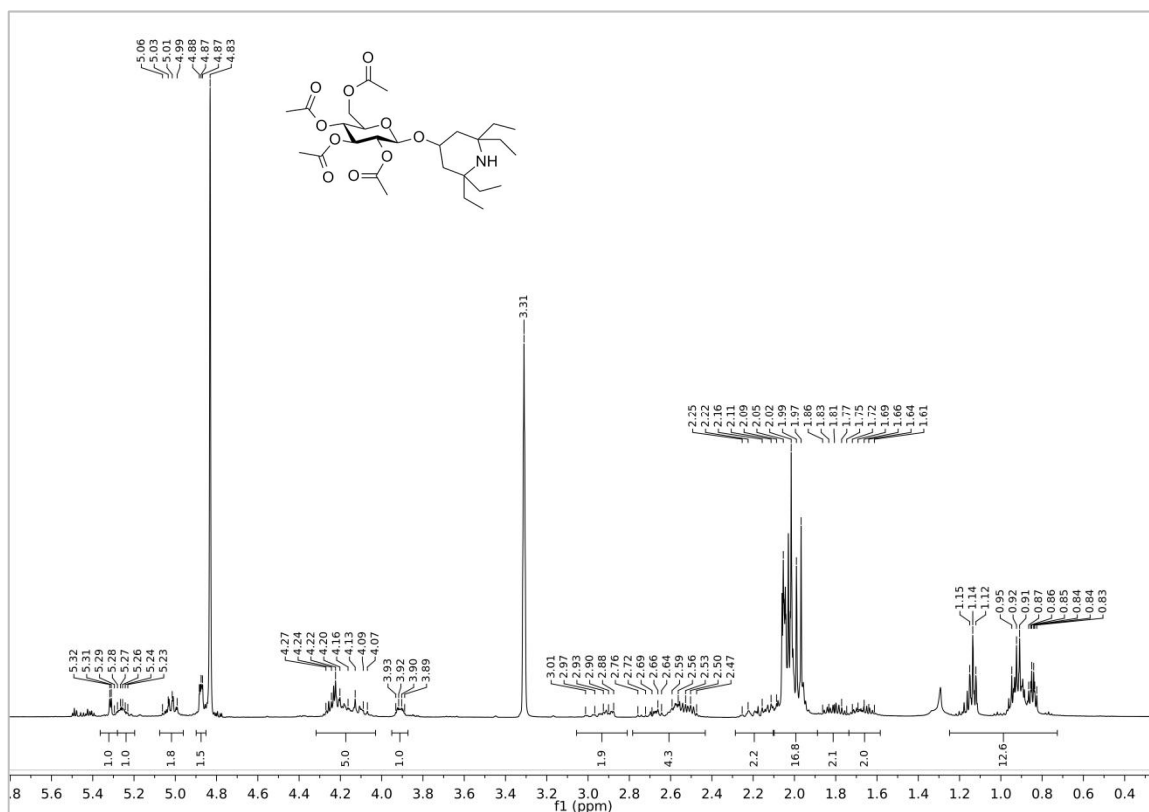
Kuva L49. TEEPO- β -D-glukopyranosidin (**34**) HSQC-spektri CDCl_3 :ssa.



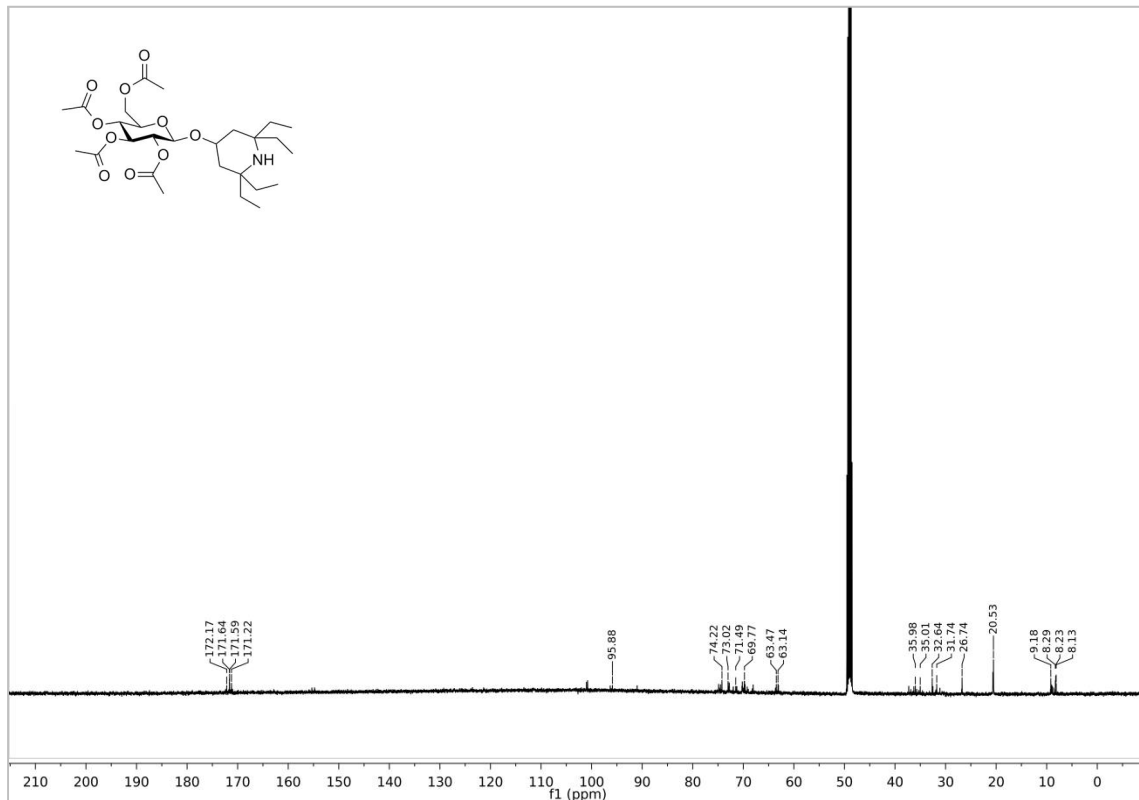
Kuva L50. TEEPO- β -*D*-glukopyranosidin (**34**) HMBC-spektri CDCl_3 :ssa.



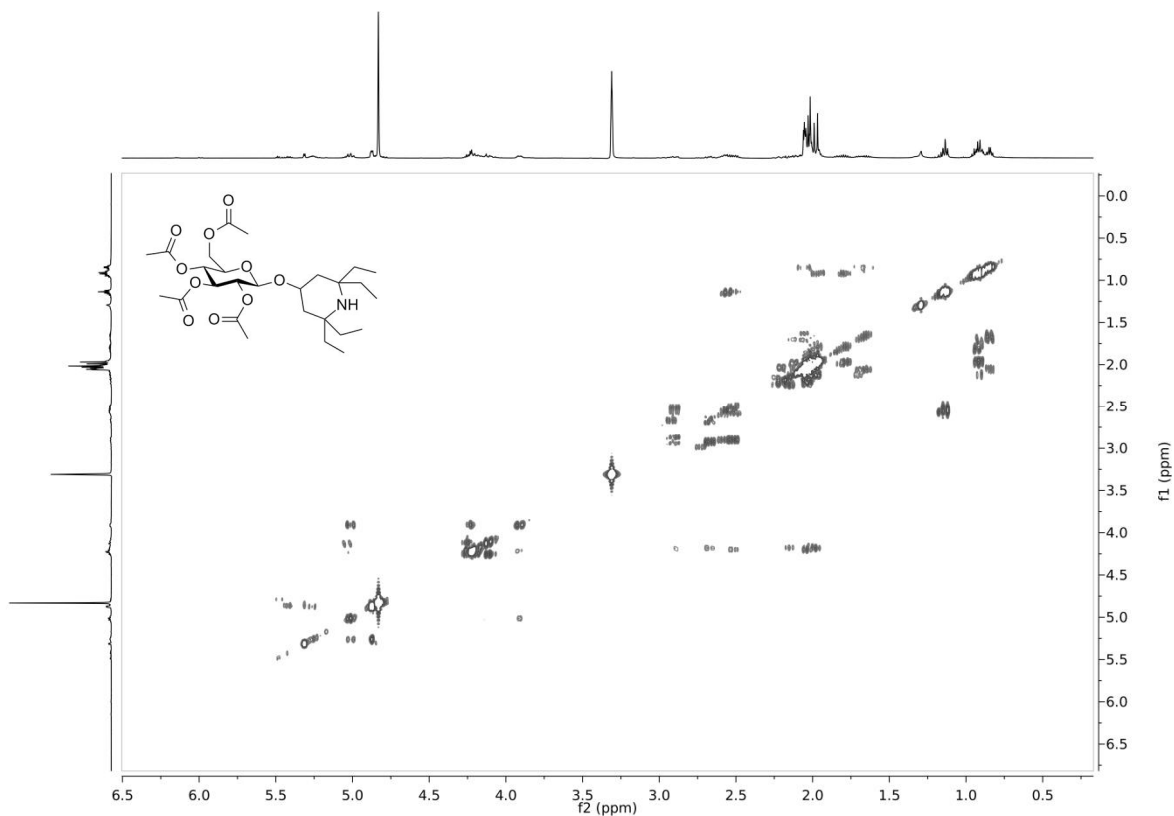
Kuva L51. TEEPO- β -*D*-glukopyranosidin (**34**) IR-spektri.



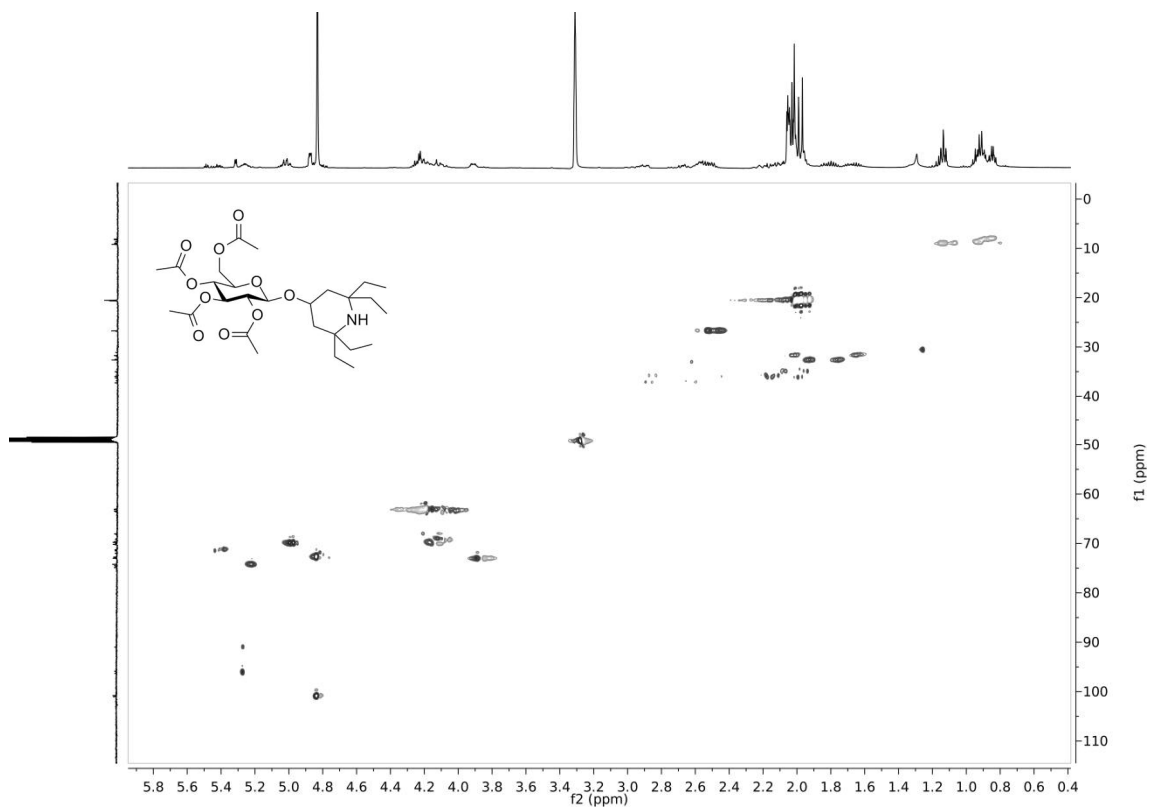
Kuva L52. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetylipiperidiinin (**37**) ^1H -spektri CD_3OD :ssa.



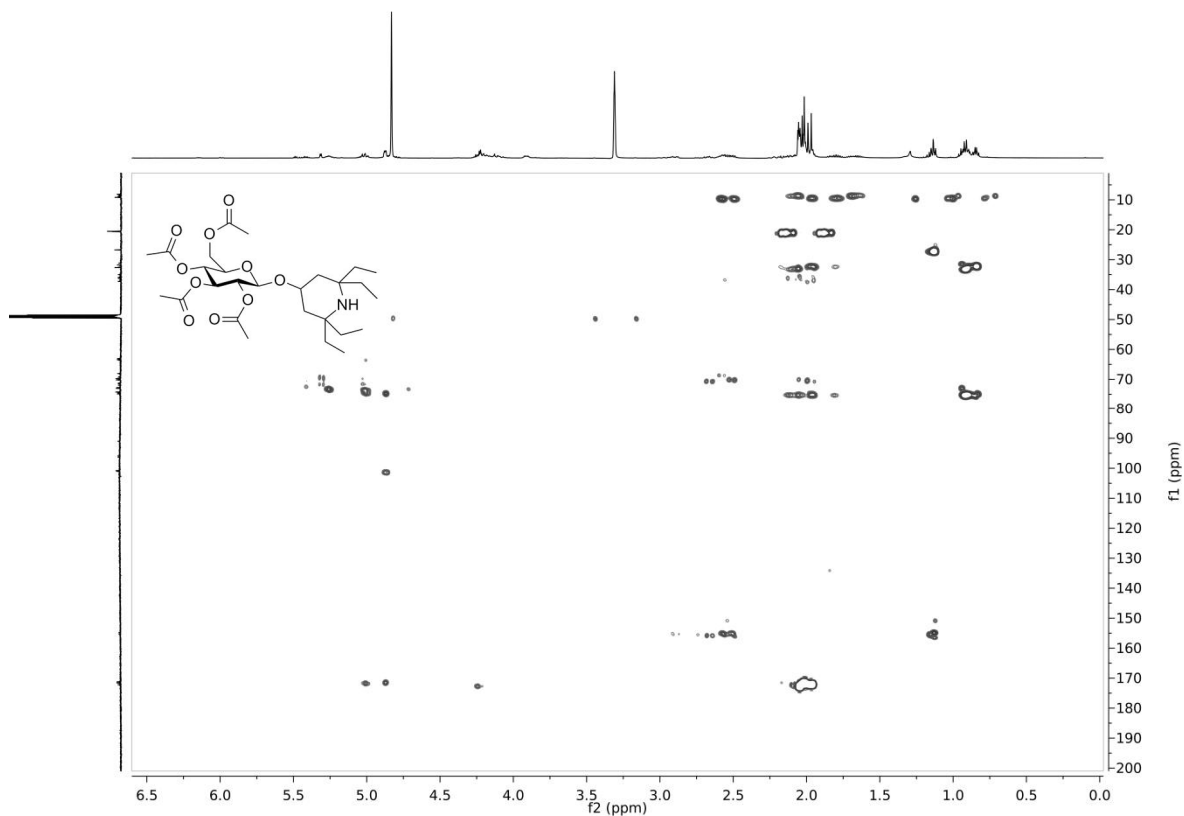
Kuva L53. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetylipiperidiinin (**37**) ^{13}C -spektri CD_3OD :ssa.



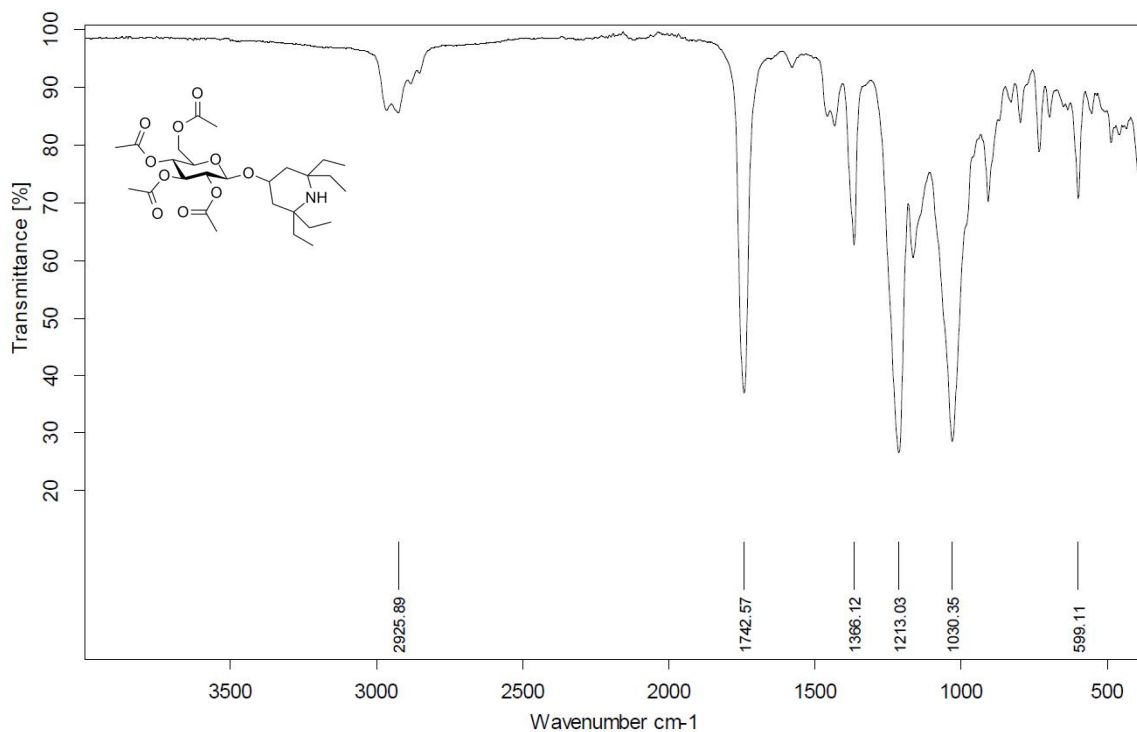
Kuva L54. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetyylipiperidiinin (**37**) 2D COSY-spektri CD₃OD:ssa.



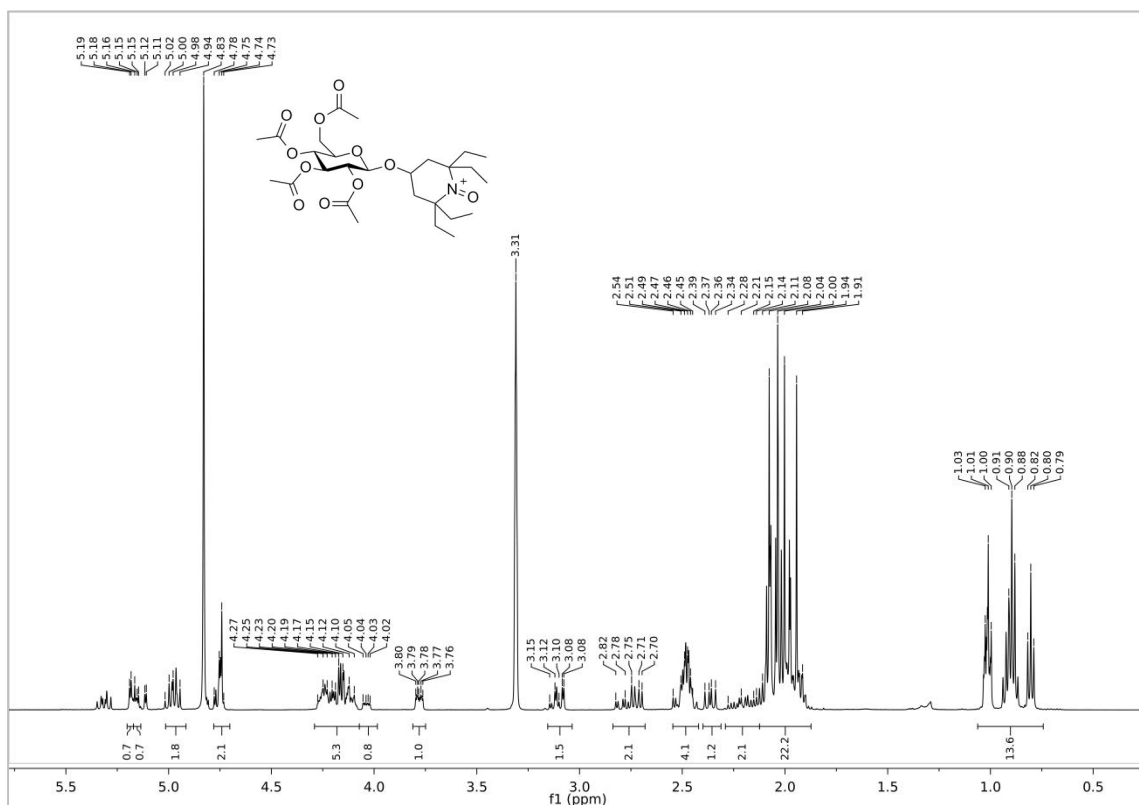
Kuva L55. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetyylipiperidiinin (**37**) HSQC-spektri CD₃OD:ssa.



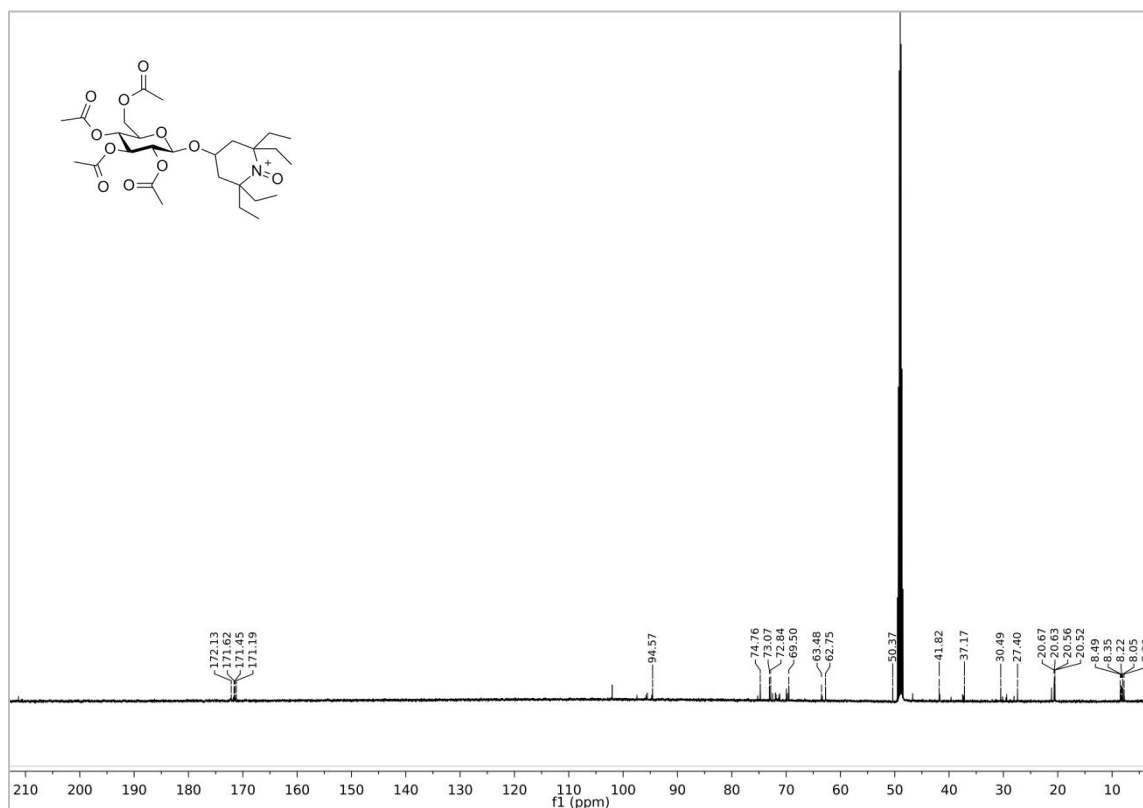
Kuva L56. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetyylipiperidiinin (**37**) HMBC-spektri CD₃OD:ssa.



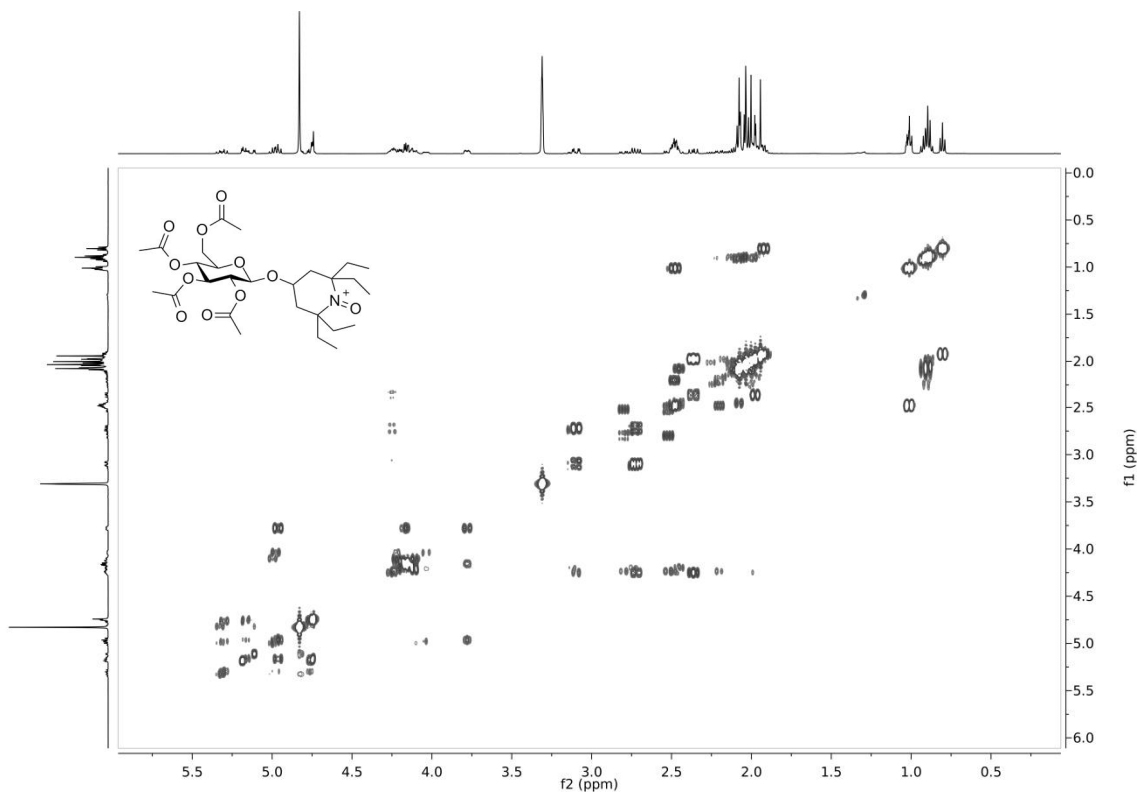
Kuva L57. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyylioksi-2,2,4,4-tetraetyylipiperidiinin (**37**) IR-spektri.



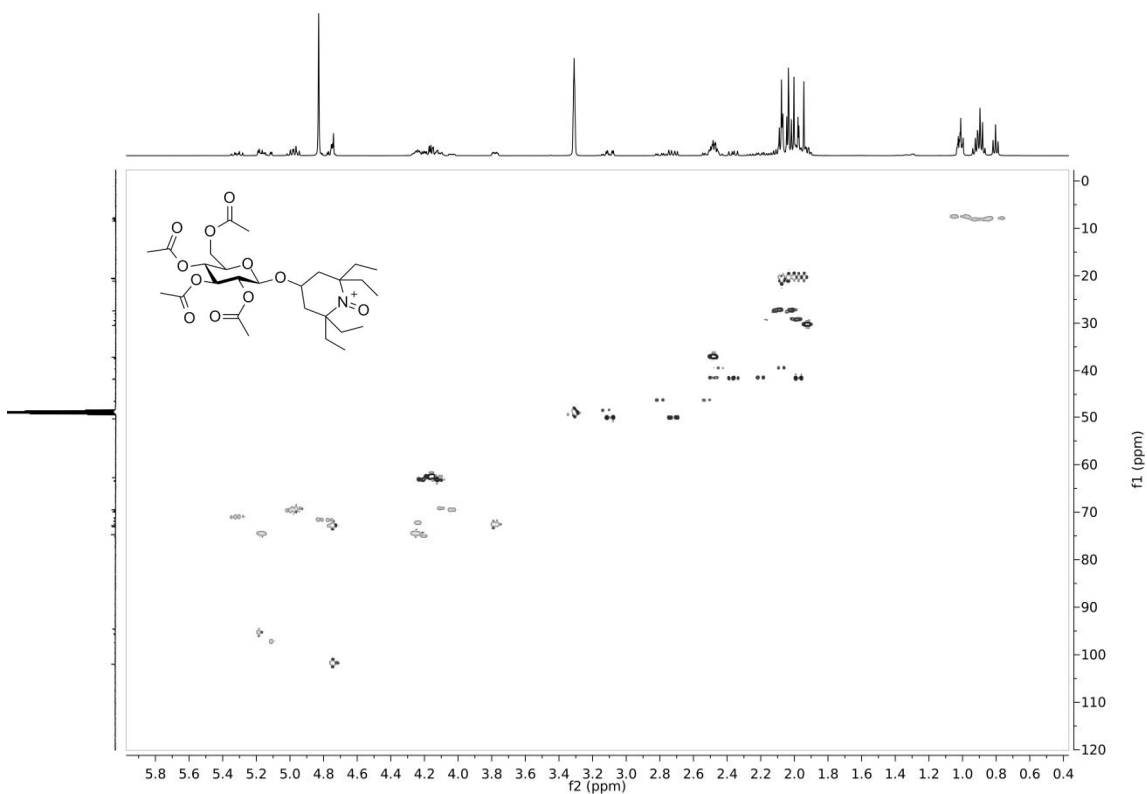
Kuva L58. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli-β-*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiniumin (38) ¹H-spektri CD₃OD:ssa.



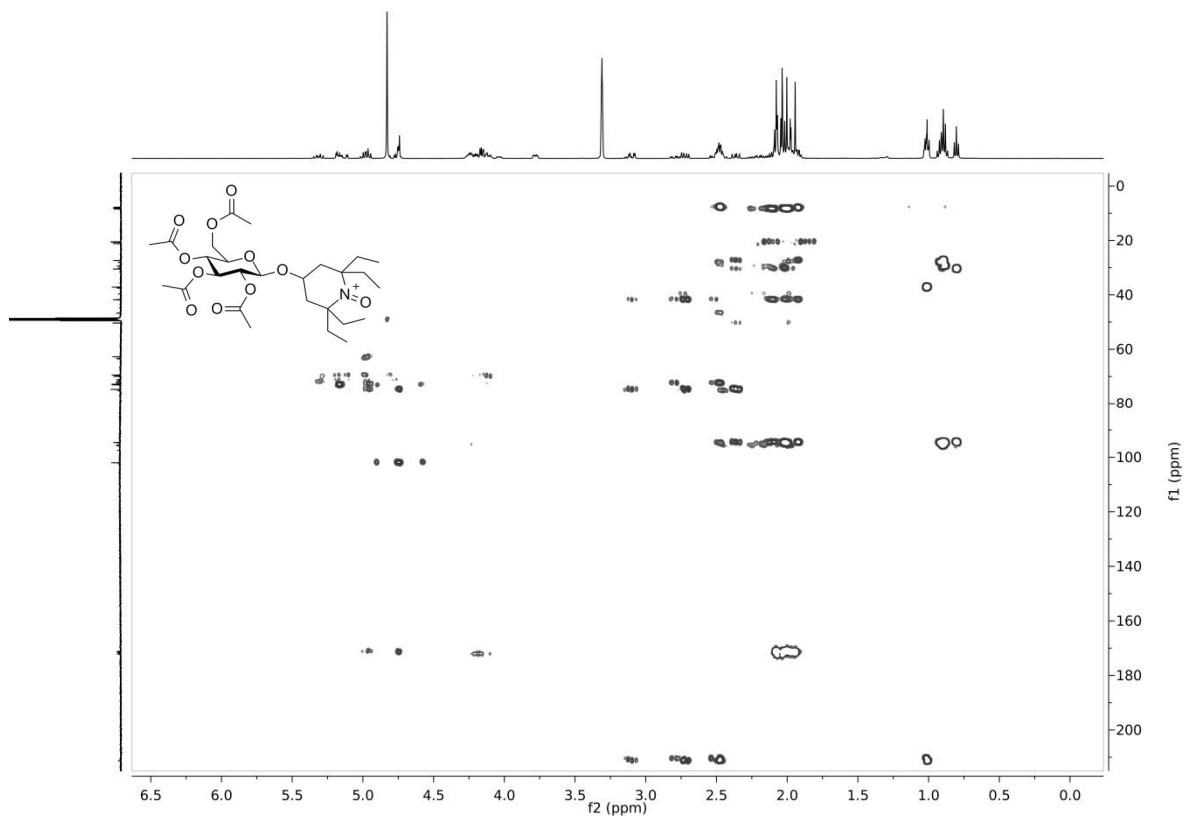
Kuva L59. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli-β-*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiniumin (38) ¹³C-spektri CD₃OD:ssa.



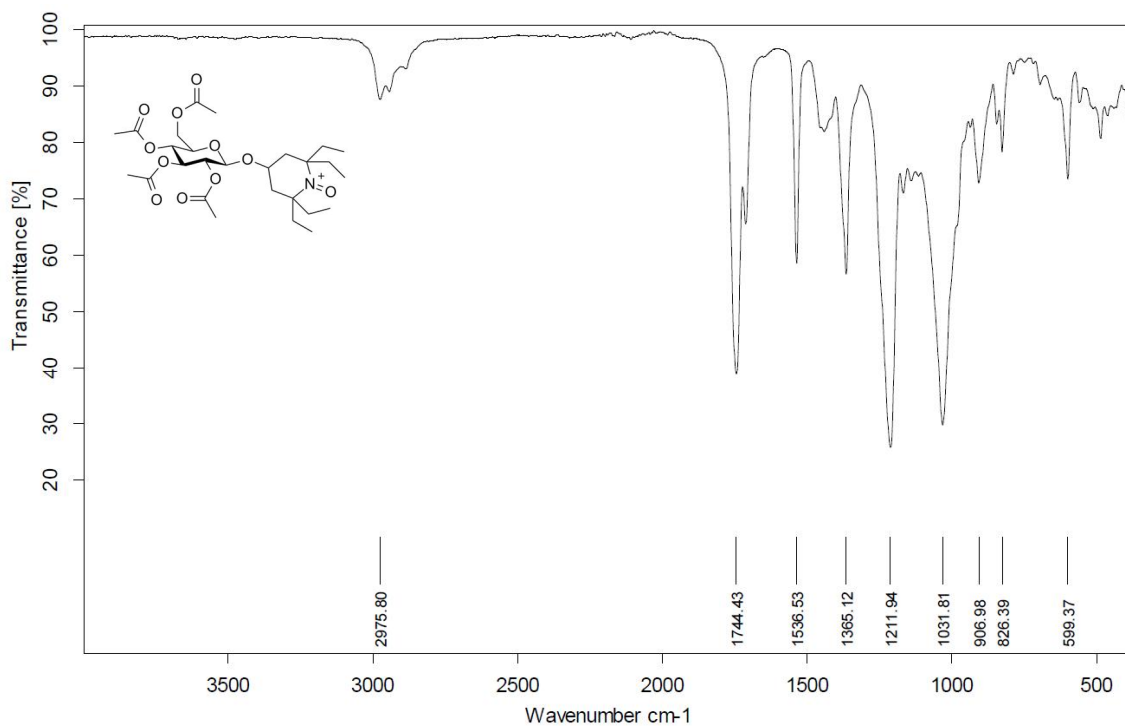
Kuva L60. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiniumin (**38**) 2D COSY-spektri CD₃OD:ssa.



Kuva L61. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidiniumin (**38**) HSQC-spektri CD₃OD:ssa.



Kuva L62. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidinium (**38**) HMBC-spektri CD₃OD:ssa.



Kuva L63. 2,3,4,6-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranosyyli-1-okso-2,2,6,6-tetraetyylipiperidinium (**38**) IR-spektri.