



**SAPPIHAPOT
AIHIOLÄÄKESYNTETIIKASSA
Farmakologisesti kiinnostavien
sappihappojen amidijohdosten
valmistaminen**

Minna Tolonen

**Opinnäytetyö
Lokakuu 2007**



**JYVÄSKYLÄN
AMMATTIKORKEAKOULU**

*Tekniikka ja liikenne
Laboratorioalan koulutusohjelma*

Tekijä(t) TOLONEN, MINNA	Julkaisun laji Opinnäytetyö	
	Sivumäärä 84	Julkaisun kieli suomi
	Luottamuksellisuus <input type="checkbox"/> Opinnäytetyö on salainen _____saakka	
Työn nimi SAPPIHAPOT AIHIOLÄÄKESYNTETIIKASSA Farmakologisesti kiinnostavien sappihappojen amidijohdosten valmistaminen		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) MAURANEN, Ritva, lehtori		
Toimeksiantaja(t) Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, orgaanisen kemian osasto SIEVÄNEN, Elina, dosentti		
Tiivistelmä <p>Sappihapot ovat välttämättömiä ruoansulatuksen ja varsinkin rasvojen ja rasvaliukoisten vitamiinien imeytymisen kannalta. Koska sappihapot ovat kolesterolin metaboliitteja eli hajoamistuotteita, niiden rakenne on elimistölle tuttu. Tästä johtuen sappihappoja pidetään potentiaalisina kantamolekyyleinä lääkeaineille.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa potentiaalisia aihiolääkkeitä konjugoimalla sappihapon sivuketjuun siltamolekyylin välityksellä erityyppisiä lääkeaineita. Käytetyt lääkeaineet olivat valproiinihappo, klorambusiili, nikotiinihappo ja isonikotiinihappo. Työssä käytettiin normaaleja orgaanisen kemian työmenetelmiä. Synteesituotteiden karakterisointiin käytettiin NMR-spektroskopiaa ja massaspektrometriaa.</p> <p>Tuloksena saatiin viisi potentiaalista aihiolääkettä, joiden jatkotutkimus Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen kanssa on vireillä.</p>		
Avainsanat (asiasanat) lääkeaineet, tutkimus, syöpätaudit, epilepsia, kolesteroli, spektroskopia		
Toimeksiantajan myöntämä raportin julkaisulupa		
Paikka	Aika	Allekirjoitus
		Nimenselvennös

Date

Author(s) MINNA TOLONEN	Type of Publication Bachelor's thesis	
	Pages 84	Language finnish
	Confidential until <input type="checkbox"/>	
Title BILE ACIDS IN PRODRUG DESIGN Syntheses of pharmacologically interesting bile amides		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) MAURANEN, Ritva, lector		
Assigned by University of Jyväskylä, Department of Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry SIEVÄNEN, Elina, docent		
Abstract Bile acids are essential for the digestion and absorption of lipids and lipid-soluble vitamins. They are products of cholesterol catabolism, which makes them pharmacologically interesting, for example, as potential drug-carriers. Bile acids have developed as important building blocks in medicinal chemistry. The aim of prodrug technology is to mask undesirable properties of a drug, such as side effects or poor solubility or stability. Recently, the prodrug design has shifted towards targeting specific enzymes or membrane transporters resulting in organ-specific or absorption enhancing applications. The idea of the bachelor's thesis was to synthesize potential bile acid-containing prodrugs. The conjugates were prepared by attaching a drug molecule to a modified bile acid via an amide bond. The drug molecules used in the syntheses were valproic acid, chlorambucil, nicotinic acid, and isonicotinic acid. The obtained products were characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry.		
Keywords medicine, research, cancer, epilepsy, cholesterol, spectroscopy		
Commissioner's permission to publish this report		
Place	Date	Signature
		Clarification

SISÄLTÖ

1. OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT	7
2. LÄÄKE, LÄÄKEAINE JA KOHDEMOLEKYYLIT.....	8
3. AIHIOLÄÄKKEET	9
4. SYNTEESEISSÄ KÄYTETYT LÄÄKEAINEET.....	10
4.1. Valproiinihappo eli 2-propyylipentaanihappo	10
4.2. Klorambusiili eli 4-N,N-[bis(kloorietyyli)amino]fenyyli- butaanihappo.....	12
4.3. Nikotiinihappo eli pyridiini-3-karboksylihappo ja isonikotiinihappo eli pyridiini-4-karboksylihappo	12
5. RUOANSULATUSKANAVA	13
5.1. Lääkeaineiden imeytyminen.....	14
5.2. Maksan rakenne	15
5.3. Sapen koostumus	16
5.4. Enterohepaattinen kierto.....	17
6. SAPPIHAPOT	17
7. SPEKTROMETRIA.....	19
7.1. NMR-spektroskopia	19
7.2. Massaspektrometria.....	21
7.2.1. Sähkösumutus-ionisaatio	21
7.2.2. Lentoaika-analysaattori	23
8. SYNTEESIT	23
8.1. Reaktiomekanismit sekä käytetyt työmenetelmät ja -laitteet	23
8.2. N-(N'-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24- amidi	26
Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti	26
N-(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	28
2-propyylipentaanihappokloridi	29

N-(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi .	30
<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -(2-propyylipentylioksi)-5 β - kolan-24-amidi.....	32
8.3. <i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli- 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	33
Metyyli 3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-oaatti.....	33
<i>N</i> -(aminoetyyli)-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-amidi	34
4-(<i>p</i> -[<i>N,N</i> -bis-2-kloorietyyli]fenyyli)butaanihappokloridi)	35
<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α - hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.....	35
<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α - hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.....	36
8.4. <i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	39
Pyridiini-3-karboksylihappokloridi	39
<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	40
8.5. <i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.....	42
Pyridiini-4-karboksylihappokloridi	42
<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	43
9. LOPPUPÄÄTELMÄT	45
LÄHTEET	47
LIITTEET	51
Liite 1 Synteesituotteiden hiiliatomien numerointi	51
Liite 2 Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaattin ¹ H NMR spektri	55

Liite 3	<i>N</i> -(2-aminoetyyli)3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^1H NMR spektri 56
	<i>N</i> -(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR -spektri.. 57
	<i>N</i> -(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR ja ^{15}N NMR -siirtymät..... 58
Liite 4	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -spektri..... 59
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^{13}C NMR -spektri..... 60
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, massaspektri 61
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR ja ^{15}N NMR -siirtymät..... 62
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -spektri..... 63
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi. ^{13}C NMR -spektri..... 64
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi. massaspektri..... 65
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C ja ^{15}N siirtymät..... 66
Liite 5	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli} fenylyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^1H NMR -spektri 67
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli} fenylyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR -spektri 68
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli} fenylyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin massaspektri..... 69
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4-{ <i>p-N''</i> , <i>N''</i> - bis-2-kloorietyyli} fenylyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR-siirtymät..... 70
Liite 6	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^1H NMR spektri..... 71
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR -spektri 73
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin massaspektri 73

	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[pyridiini-3-amidi]etyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³ C NMR – siirtymät.....	74
Liite 7	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ¹ H NMR - spektri.....	75
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ¹³ C NMR - spektri.....	76
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, massaspektri	77
Liite 8	SYNTEESIOHJEET	79
	Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti	79
	<i>N</i> -(2-aminoetyyli) -3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	79
	2-Propyyli-pentaanihappoklorid	80
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi .	80
	Metyyli 3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-oaatti.....	81
	<i>N</i> -(aminoetyyli)-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-amidi	81
	4-(<i>p</i> -[<i>N,N</i> -bis-2-kloorietyyli]fenyyli)butaanihappokloridi.....	82
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4- { <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloori-etyyli} fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α - hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.....	82
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -[4- { <i>p-N''</i> , <i>N''</i> -bis-2-kloorietyyli} fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α - hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.....	82
	Pyridiini-3-karboksylihappokloridi	83
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	83
	Pyridiini-4-karboksylihappokloridi	84
	<i>N</i> -(<i>N'</i> -pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi	84

KÄYTETTYJÄ LYHENTEITÄ

CA	koolihappo
CDCA	kenodeoksikoolihappo
DCA	deoksikoolihappo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer = mittausmenetelmä, joka erottelee primääriset ja tertiääriset hiiliatomit sekundäärisistä hiiliatomeista
ESI	Electrospray Ionization = sähkösumutusionisaatio
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation = mittausmenetelmä, joka näyttää useamman sidoksen yli tapahtuvat heteroydinten väliset kytkennät
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence = mittausmenetelmä, joka näyttää yhden sidoksen yli tapahtuvat heteroydinten väliset kytkennät
LCA	litokoolihappo
MeLCA	metyylilitokolaatti
MeOH	metanoli CH ₃ OH
Mutageeninen	mutaatioita aiheuttava
NMR	Nuclear Magnetic Resonance = ydinmagneettinen resonanssi
pH	vetyionien konsentraatio liuoksessa
pK _a -arvo	hapon tasapainovakio
ppm	Parts Per Million = 1/1 000 000
Refl.	refluksointi
Rt	huoneenlämpö
Teratogeeninen	sikiöepämuodostumia aiheuttava
THF	tetrahydrofuraani C ₄ H ₈ O
TLC	Thin Layer Chromatography = ohutlevykromatografia
TOF	Time of Flight = lentoaika-analysaattori
UDCA	ursodeoksikoolihappo

ESIPUHE

Tässä opinnäytetyössä esitetyt synteesit on tehty Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla tammi-maaliskuussa 2007.

Kiinnostuin sappihapoista kesällä 2006 tehdessäni ammattikorkeakouluopintoihini kuuluvaa työharjoittelua Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella. Kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla toimii professori Erkki Kolehmaisena johtama sappihappojen ja niiden johdosten tutkimukseen keskittynyt tutkimusryhmä, jonka toimintaan pääsin tuolloin osallistumaan.

Saatuani tämän opinnäytetyöaiheen pääsin perehtymään sappihappojen rooliin aihiolääkesyntetiikassa entistäkin tarkemmin, ja käytännön vaiheen aikana havaitsin sappihapot paitsi mielenkiintoisiksi myös haastaviksi rakenneosiksi, jotka eivät aina toimineet teoriassa esitetyllä tavalla.

Opinnäytetyöni ohjaajana toimi dosentti Elina Sievänen, jota haluan kiittää mielenkiintoisesta aiheesta, asiantuntevista neuvoista ja ohjauksesta sekä kritiikistä ja kannustuksesta. Lisäksi haluan kiittää professori Kolehmaista hyvistä neuvoista. Lisäksi kiitokset ansaitsee erikoislaboratoriomestari Reijo Kauppinen NMR-spektreistä.

Kiitokset kuuluvat myös Pekalle, perheelleni ja ystäväilleni, jotka ovat jaksaneet kannustaa minua opintojeni aikana.

Jyväskylässä 4.10.2007

Minna Tolonen

1. OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Sappihapot ovat välttämättömiä ruoansulatuksen ja varsinkin ravinnon rasvojen ja rasvaliukoisten vitamiinien imeytymisessä. Koska sappihapot ovat elimistössä luonnostaan esiintyvän kolesterolin hajoamistuotteita, niiden rakenne on elimistölle tuttu. Tämän takia sappihappoja pidetään potentiaalisina lääkeaineiden kantajamolekyyleinä. Aihiolääkkeet ovat lääkeaineen biologisesti inaktiivisia johdoksia, jotka elimistö muuttaa vaikuttavaan muotoon. Aktiivinen aine vapautuu kontrolloidusti joko kemiallisen tai entsyymattisen reaktion kautta. Aihiolääketeknologialla ei valmisteta täysin uusia lääkeaineita, vaan modifioidaan jo olemassa olevia, farmakologisen vasteen omaavia lääkeaineita.

Työn tarkoituksena oli kehitellä potentiaalisia aihiolääkkeitä konjugoimalla sappihapon sivuketjuun siltamolekyylin välityksellä erityyppisiä lääkeaineita. Lääkeaineina käytettiin valproiinihappoa, klorambusiilia sekä nikotiinihappoa ja sen isomeeriä, isonikotiinihappoa. Sappihappoja käytetään kantajamolekyyleinä, koska ne ovat elimistölle tuttuja aineita. Lisäksi niiden käyttöä puoltavat niiden jäykkä steroidirunkorakenne ja erityyppiset hydroksyyli-ryhmät (-OH) sekä sivuketjun karboksyylihapporyhmä. Näiden ominaisuuksien lisäksi sappihapot ovat enantiomeerisesti puhtaita, amfiifiilisiä (= sisältävät hydrofiilisen ja hydrofobisen puolen) ja kaupallisesti suhteellisen halpoja sekä helposti saatavia. Sappihapoista litokoolihappoa LCA, (3 α -hydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo) käytetään usein malliaineena, koska siinä on vain yksi synteessissä reagoiva hydroksyyli-ryhmä. Tämä helpottaa mm. suojausten tekoa.

Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla toimii professori Erkki Kolehmainen johtama sappihappojen ja niiden johdosten tutkimukseen keskittynyt tutkimusryhmä. Tämän opinnäytetyön aihe on osa tämän tutkimusryhmän työtä.

2. LÄÄKE, LÄÄKEAINE JA KOHDEMOLEKYYLIT

Lääkkeellä ja lääkeaineella on selvä ero: lääkeaine on rakenteeltaan yleensä tunnettu kemiallinen yhdiste, joka on valmistettu synteettisesti laboratoriossa tai se on peräisin luonnosta. Lääke on yhtä tai useampaa lääkeainetta sisältävä valmiste. Lähes kaikki lääkeaineiden vaikutukset elimistössä perustuvat elimistöön tuotujen lääkeainemolekyylien ja elimistön omien molekyylien vuorovaikutukseen. Useimmat nykyisin käytettävien lääkeaineiden kohdemolekyylit ovat solujen toiminnalle tärkeitä proteiineja (= valkuaisaineita), mutta myös nukleiinihapot voivat välittää lääkeaineiden vaikutuksia. (Scheinin 1998, 27.)

Lääkeaineiden ensisijaisia kohdemolekyyliä ovat

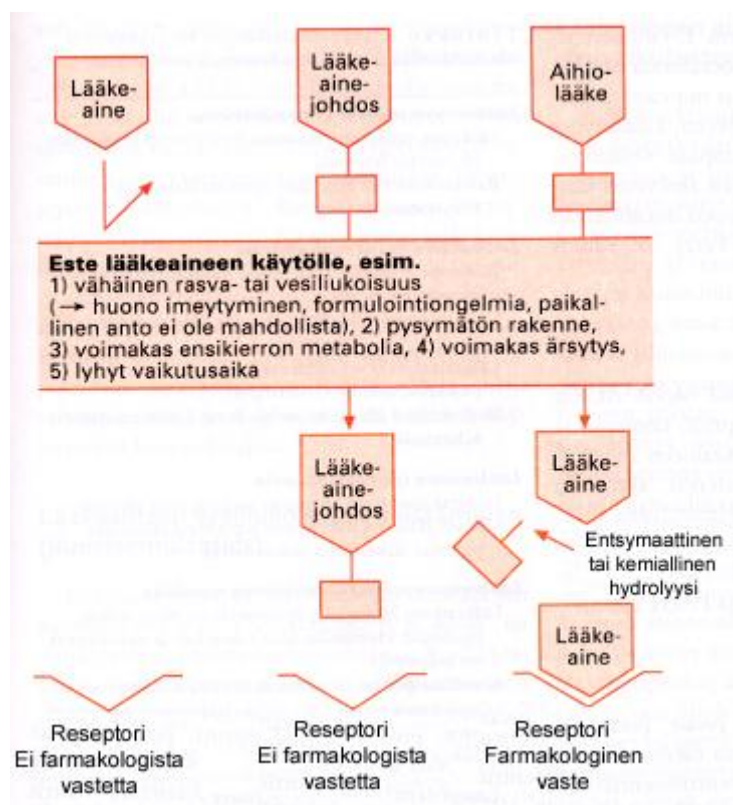
- reseptoriproteiinit
- aineenvaihduntaa ja välittäjäaineita säätelevät entsyymit
- kuljettajaproteiinit
- rakenneproteiinit
- nukleiinihapot.

Monet syöpä- ja virussairauksien hoidossa käytettävät lääkeaineet sitoutuvat kohdesolujen nukleiinihappoihin ja muuttavat solujen perimäaineksen toimintaa.

Hermosolujen välittäjäaineiden soluunotosta vastaavat kuljettajaproteiinit, mahalaukun limakalvon solujen protonipumppu ja useat solukalvojen kuljettajaproteiinit ovat tärkeitä lääkevaikutusten kohdemolekyyliä. Myös solukalvojen jännitteen säätelemät ionikanavat ovat monen tärkeän lääkeaineryhmän (mm. paikallispuudutteen) vaikutuksen kohteena. Entsyymeihin ja kuljettajaproteiineihin vaikuttavat lääkeaineet ovat useimmiten yhdisteitä, jotka estävät kohdeproteiiniensa fysiologista toimintaa sitoutumalla niiden aktiivisiin keskuksiin ja estämällä fysiologisten substraattien pääsyä niihin. (Scheinin 1998, 27.)

3. AIHIOLÄÄKKEET

Jotta lääkeaine toimisi tehokkaasti, sen tulee saavuttaa kohdekudos tai -elin ja aiheuttaa kudoksessa haluttu reaktio. Joskus halutun vaikutuksen aikaansaava lääkeaine voi olla tehoton, esimerkiksi jos se ei kykene saavuttamaan vaikutuskohtaansa. Lääkeainesyntetiikassa on perinteisesti käytetty menetelmiä, jossa lääkeaineiden ominaisuuksia on yritetty parantaa syntetisoimalla johdoksia, joilla on alkuperäistä lääkeainetta paremmat fysikokemialliset ominaisuudet. Siinä vaarana on farmakologisen vaikutuksen häviäminen ja mahdollisten lisähaittavaikutusten ilmeneminen kemiallisen rakenteen muuttumisen myötä. Ongelma voidaan useissa tapauksissa välttää juuri aihiolääketeknologialla. (Järvinen, Rautio & Niemi, 1997, 2564.) Kuviossa 1 esitetään aihiolääkkeen (*prodrug*) toimintaperiaate.



KUVIO 1. Aihiolääkkeen toimintaperiaate (Järvinen ym. 1997, 2564)

Aihiolääkesyntetiikassa ei valmisteta uusia lääkeaineita, vaan modifioidaan eli muokataan ja parannellaan jo tunnettujen ja toimiviksi havaittujen farmakologisen vasteen

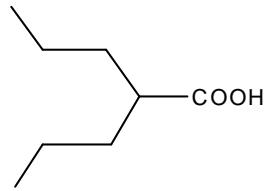
omaavien lääkeaineiden ominaisuuksia. Aihiolääketeknologialla voidaan parantaa lääkkeen imeytymistä muuttamalla sen rasva- ja/tai vesiliukoisuutta, pidentää lääkeaineen vaikutusaikaa tai kohdentaa lääkeaine tiettyyn elimeen tai soluihin, esim. syöpäsoluihin. Aihiolääkkeet ovat itse biologisesti inaktiivisia johdoksia, jotka elimistö muuttaa vaikuttavaan muotoon. Aktiivinen aine vapautuu kontrolloidusti joko kemiallisen tai entsyymattisen reaktion kautta. Lääkeaine voi vapautua aihio-osastaan ennen imeytymistä, imeytymisen aikana tai imeytymisen jälkeen. Useimmat aihiolääkkeet ovat erilaisia lääkeaineiden (esim. happojen tai alkoholien) estereitä, jotka muodostetaan liittämällä lääkeaineeseen tietty kemiallinen ryhmä, esim. alkoholi tai karboksyylihapo. Näissä tapauksissa aktiivinen lääkeaine vapautuu epäspesifisten esteraasien vaikutuksesta. Näitä esteraaseja esiintyy luonnostaan esim. suolen seinämässä, maksassa ja silmän sarveiskalvossa. (Turhanen 1997, 3.)

Idealisella aihiolääkkeellä on optimaaliset fysikokemialliset ominaisuudet (rasvaliukoisuus, vesiliukoisuus, pK_a -arvo), se on pysyvä ja vapauttaa aktiivista lääkeainetta terapeuttisesti sopivalla nopeudella. Aihiolääkkeen ei tulisi myöskään sisältää myrkyllisiä aihio-osia. Jotta sen käyttäminen ei olisi epämiellyttävää, sen pitäisi lisäksi olla hajuton ja mauton. Aihiolääketeknologiaa voidaan soveltaa kaikilla tavoilla (enteraalinen = ruoansulatuskanavan kautta, parenteraalinen = ei ruoansulatuskanavan kautta) annosteltuihin lääkeaineisiin. (Turhanen 1997, 3.)

4. SYNTEESEISSÄ KÄYTETYT LÄÄKEAINEET

4.1. Valproiinihapo eli 2-Propyylipentaanihapto

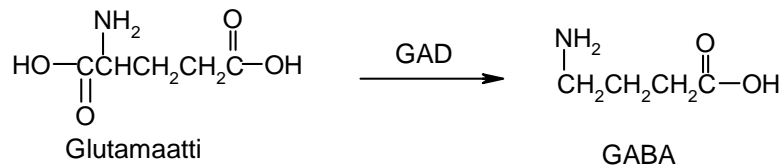
Valproiinihapoa käytetään kouristusten estolääkkeenä epilepsiassa sekä mielialalääkkeenä kaksisuuntaisessa mielialahäiriössä (*bipolar disorder*). Sitä käytetään myös migreenin ja skitsofrenian hoidossa. Valproiinihapo on suhteellisen laaja-alainen antikonvulsiivinen (= kouristuksia ehkäisevä) aine, koska sen vaikutus perustuu useaan mekanismiin. Se estää ionien virtausta Na^+ -kanavien kautta ja isompina pitoisuuksina myös Ca^{2+} -kanavien kautta, jolloin aktiopotentiaalien syntyminen hidastuu. Valproiinihapon rakenne on esitetty kuviossa 2.



Valproiinihappo (VAc)
Moolimassa = 144,22g/mol

KUVIO 2. Valproiinihapon rakenne

Valproiinihapon natriumsuolat muodostavat Na-valproaatin, jonka oletetaan vaikuttavan GABA:n (gamma-aminovoihappo **G**amma-**A**mino **B**utyric **A**cid) toimintaan. Useilla aminohapoilla on joko hermoston toimintaa estävä tai kiihdyttävä vaikutus. GABA on eräs aminohappojohdannainen (derivaatta), joka muodostuu, kun glutamaattia lohkeaa karboksyylihapporyhmä glutamaattidekarboksylaasi-entsyymin (GAD) katalysoimassa reaktiossa (kuvio 3).



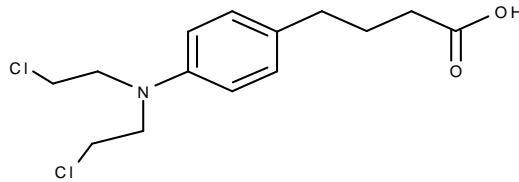
KUVIO 3. GABA:n muodostuminen

Selkärankaisilla GABA toimii aivojen synapseissa inhibiittorina (hillitsevä välittäjäaine), joka sitoutuu tiettyjen kudossolujen reseptoreihin. Tämä sitoutuminen avaa solujen välisen ionikanavan, josta pääsee virtaamaan joko negatiivisesti varautuneita kloridi-ioneja solun sisälle tai positiivisesti varautuneita kaliumioneja solusta pois. Tämä nostaa solun ärsytyskynnystä.

Valproiinihapon kiinnostavuutta lisää se, että nykyään tutkitaan myös sen soveltuvuutta HIV-lääkkeeksi ja nuoruusiän leukemian hoitoon. (Tuomisto 1998, 444.)

4.2. Klorambusiili eli 4-*N,N*-[bis(2-kloorietyyli)amino]fenyylibutaanihappo

Klorambusiilia käytetään kemoterapialääkkeenä, varsinkin kroonisen lymfaattisen leukemian (*chronic lymphatic leukemia* CLL) hoidossa, yhdessä leikkaushoidon ja sädehoidon kanssa. Klorambusiili on alkyloiva aine, joka sitoutuu DNA:n guaniiniin. Aine lisää metyyli- tai muun alkyyliryhmän molekyyliin, johon se ei kuulu. Se estää syöpäsolujen DNA:n juosteiden kaksoiskierrettä avautumasta, jolloin replikaatio ei onnistu ja tämän seurauksena solut kuolevat. Alkyloivat aineet ovat sukua ensimmäisessä maailmansodassa käytetylle sinappikaasulle ja ne ovat teratogeenisiä ja mutageenisia. Lääke voi myös estää muita solun toiminnan kannalta tärkeitä biokemiallisia reaktioita ja jopa katkaista DNA-juosteen. Klorambusiilin rakenne on esitetty kuviossa 4.



Klorambusiili

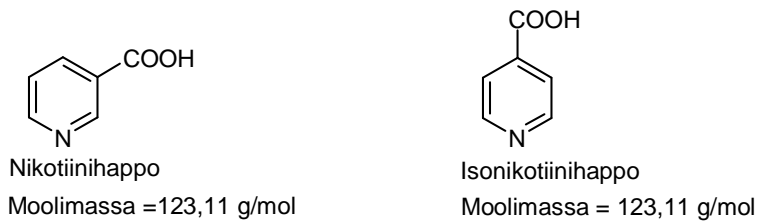
Moolimassa = 304,22 g/mol

KUVIO 4. Klorambusiilin rakenne

Klorambusiilia käytetään myös nivelreuman hoitoon. Sivuvaikutuksena lääke voi häiritä luuytimen toimintaa. (Elonen 1998, 955.)

4.3. Nikotiinihappo eli pyridiini-3-karboksyylihappo ja isonikotiinihappo eli pyridiini-4-karboksyylihappo

Nikotiinihappoa ja sen isomeeria isonikotiinihappoa, joiden rakenteet esitetään kuviossa 5, käytetään jonkin verran verisuonia laajentavina lääkeaineina sekä seerumin HDL-kolesterolipitoisuutta kasvattavina aineina. Niiden vaikutus on kuitenkin heikko verrattuna esim. statiineihin. (McGovern 2005, 117; Paakkari 1998, 547.)

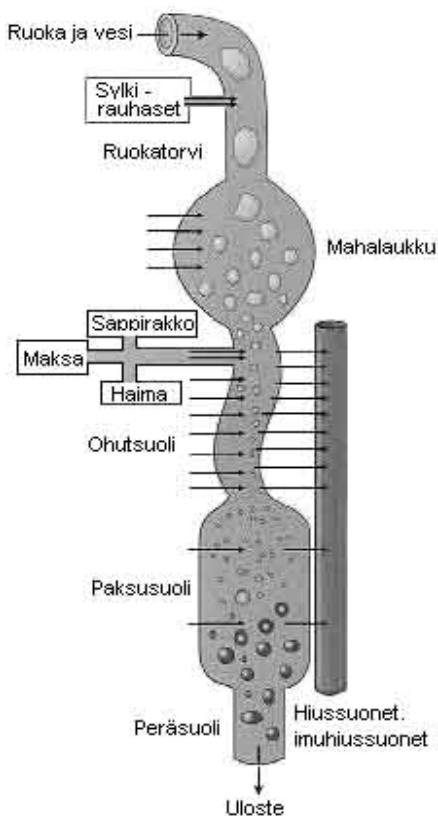


KUVIO 5. Nikotiinihapon ja isonikotiinihapon rakenteet

Nikotiinihappo tunnetaan paremmin vesiliukoisena B3- vitamiinina eli niasiinina, jota tarvitaan energiantuotantoon hiilihydraateista, proteiineista sekä lipideistä ja edelleen kudosten kasvuun. Elimistö saa tarvitsemansa niasiinin lihasta, maitotaloustuotteista ja viljatuotteista, mutta se valmistaa niasiinia myös tryptofaanista, joka on ns. välttämätön aminohappo. Niasiinin puutos aiheuttaa Pellagra-nimisen ihosairauden, joka on Suomessa melko harvinainen. (Himberg 1998, 765.)

5. RUOANSULATUSKANAVA

Ruoansulatuskanava on periaatteessa pitkä letku, joka alkaa suusta ja päättyy peräaukkoon (kuvio 6).



KUVIO 6. Ruoansulatuskanava (Nienstedt, Hänninen, Arstila, Björkqvist 1995, 295.)

Ruoka kulkee suusta nielun kautta ruokatorveen ja sieltä edelleen mahalaukkuun. Mahasta lähtee ohutsuoli, jonka alkuosaa kutsutaan pohjukaissuoleksi (*duodenum*). Hai-matiehyt ja sappitiehyt avautuvat pohjukaissuoleen. Loppuosa ohutsuolesta koostuu tyhjäsuolesta (*jejunum*) ja sykkyräsuolesta (*ileum*). Vatsaontelon alaosassa ohutsuoli muuttuu paksusuoleksi (*colon*). Suoliston viimeinen osa on peräsuoli (*rectum*) ja se päättyy peräaukkoon (*anus*). Kun suun kautta nautittu lääkeaine kulkeutuu ruoansulatuskanavan eri osien läpi, se joutuu vaihteleviin olosuhteisiin mm. pH:n, entsyymien, elektrolyyttien, liukoisuuden ja kanavan pinnanmuotojen osalta. Kaikki em. seikat vaikuttavat lääkeaineen imeytymiseen ruoansulatuskanavasta. (Nienstedt ym., 1995, 295; Haug, Sjaastad & Öysten. 1999, 256)

Suurimmassa osassa ruoansulatuskanavaa on lähes sama yleisrakenne. Sisältä ulospäin siirryttäessä on ensin limakalvo (*mucosa*). Limakalvon jälkeen sijaitsevat limakalvonalaiskudos (*submucosa*) ja pitkittäiset ja rengasmaiset sileälihaskerrokset sekä uloimpana herakalvo (*serosa*). Limakalvon poimuisuus suurentaa imeytymispinta-alaa. Poimuja on eniten ohutsuolessa, jossa myös imeytyminen tapahtuu nopeimmin. (Nienstedt ym. 1995, 295; Haug ym. 1999, 256.)

5.1. Lääkeaineiden imeytyminen

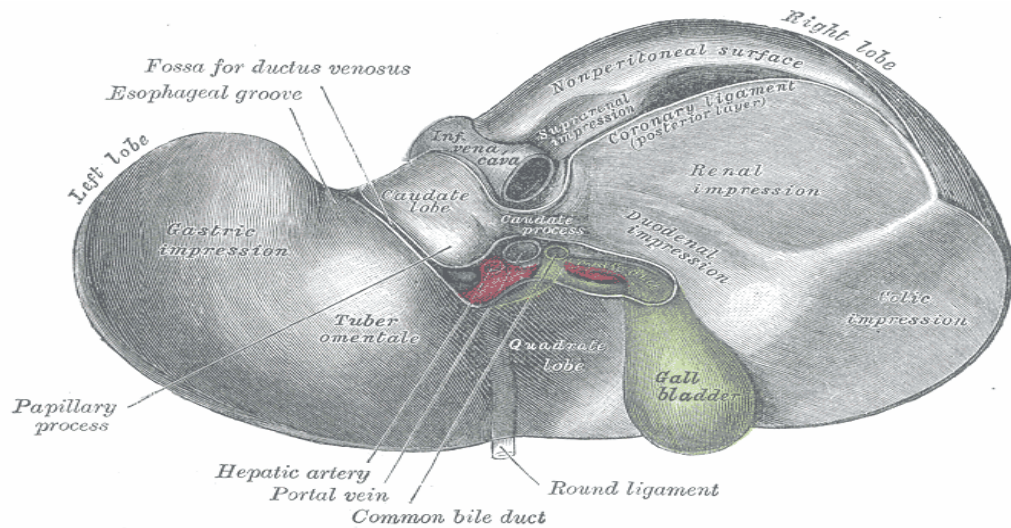
Tärkein este lääkeaineen pääsyyllä elimistöön on solukalvo. Aineet kulkevat solukalvon läpi joko passiivisen (filtraatio eli suodattuminen tai diffuusio) tai aktiivisen kuljetuksen avulla. Aktiivisen ja passiivisen kuljetuksen erona on, että passiivisessa kuljetuksessa aine voi kulkea vain suuremmasta konsentraatiosta pienempään, eikä näin kuluta energiaa. Filtraation edellytys on pieni molekyylikoko, mistä johtuen harvat lääkeaineet pystyvät suodattumaan solukalvon läpi. Diffuusiosta molekyylit pyrkivät siirtymään väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan pitoisuuteen siten, että konsentraatioerot tasoittuvat. Diffuusiosta aineen kyky kulkeutua solukalvon läpi on suoraan verrannollinen sen lipidiliukoisuuteen; mitä parempi lipidiliukoisuus on, sitä enemmän ainetta on kerrallaan solukalvossa siirtymisvaiheessa ja sitä nopeampi on diffuusio. Poolittomilla yhdisteillä on paras lipidiliukoisuus. (Kivistö & Neuvonen 1998, 75.)

Mikäli imeytyvä aine on vahvasti poolinen tai sen molekyylikoko on suuri, tarvitaan aktiivista kuljetusta. Aktiivisessa kuljetuksessa tärkein tekijä on kuljettajamolekyylit. Kuljettajamolekyylit ovat solukalvon proteiineja, joiden pääosin hydrofobisista aminohapoista muodostuvat osat lävistävät solukalvon yhden tai useampia kertoja. Aihiolääketekniikassa lääkeaineeseen liitetään kantajamolekyylit, joka muistuttaa solukalvon reseptorien substraatteja. Tutkimukset ovat osoittaneet, että sappihappojen liittäminen lääkeaineisiin parantaa niiden imeytymistä, sillä elimistön erityiset sappihappojen kuljettajaproteiinit vastaavat sappihappojen siirtämisestä solukalvon läpi. (Kivistö & Neuvonen 1998, 75.)

5.2. Maksan rakenne

Maksa (*hepar*) sijaitsee vatsaontelon yläosan oikealla puolella pallean alla. Se jää lähes kokonaan kylkiluiden suojaan. Maksa säätelee veren sokeripitoisuutta, aminohappopitoisuutta sekä osallistuu ruoansulatukseen tuottamalla sappea, joka sisältää sappihappoja, elektrolyyttejä, bilirubiinia, kolesterolia ja fosfolipidejä. Sappien sisältämät sappihappojen suolat toimivat ruoan sisältämien rasvojen emulgaattoreina. Niiden avustuksella rasvat muuttuvat emulsioksi. Haiman erittämä lipaasientsyymi pilkkoo emulsion sisältämistä rasvoista triglyseridejä. Sappea erittäessään maksa poistaa samalla elimistön kuona-aineita kuten bilirubiinia (punasolujen hajoamistuote). (Haug ym. 1999; Nienstedt ym. 1995, 295.)

Keskellä maksan alapintaa on maksaportti, jonka kautta kulkevat maksaan verta tuovat porttilaskimo (*portal vein*) ja maksavaltimo (*hepatic artery*) sekä sappitiet (*common bile duct*) (kuvio 7). Porttilaskimoon tulee mahalaukussa, suolistossa, haimassa ja pernan hiussuonissa kierrellyttä niukkahappista laskimoverta. Sappitiet kuljettavat sappea maksasta pois sappirakkoon (*gall bladder*). (Haug ym. 1999; Nienstedt ym. 1995, 295.)



KUVIO 7. Maksan rakenne (Gray, 1918)

Vuorokaudessa maksasta erittyy 0,5- 1 litraa sappea, joka varastoituu ensin sappirakkoon. Sappirakon tilavuus on noin 50 ml, mutta se pystyy väkevöimällä varastoimaan 5- 20 kertaa niin suuren määrän sappea. Väkevöinnissä limakalvon läpi verenkiertoon imeytyy natriumkloridia (NaCl) ja vettä. Sappirakosta johtaa sappitiehyt pohjukais-suoleen. Aterioiden välillä sappitiehyen suussa oleva kurojalihakas on supistuneena. Rasvaa ja valkuaisaineita sisältävän ruokamassan tulo suoleen stimuloi limakalvon erittämään pankreotsyymiä eli kolekystokiniiniensyymiä, joka saa aikaan sappirakon tyhjenemisen. (Nienstedt ym. 1995, 295; Haug ym. 1999.)

5.3. Sapen koostumus

Sappisuolat ovat sappihappojen konjugoituneita natrium- ja kaliumsuoloja. Maksa valmistaa primaarisia sappisuoloja kolesterolista. Sappisuolat ovat välttämättömiä rasvojen imeytymiselle. Rasvat eivät liukene sellaisenaan veteen, mutta rasvamolekyylien ja sappisuolojen muodostamat misellit sekoittuvat suolen vesipitoiseen sisältöön emulsioksi. Näin rasvojen pilkkoutuminen ja imeytyminen suolessa tehostuu. Rasvojen pilkkoutumistuotteet imeytyvät suurimmaksi osaksi ohutsuolen alkuosassa. Sappisuolat itse imeytyvät vasta ohutsuolen loppuosasta. Osan paksusuoleen pääsevästä sappihapoista bakteerit muuttavat sekundaarisiksi sappihapoiksi.. Sappihappojen kokonaismäärä elimistössä on noin 3,5 g. Sappihappoja poistetaan elimistöstä virtsan ja ulosteen mukana noin 0,2 g päivässä. (Nienstedt ym., 1995, 314; Tamminen, 1996, 3.)

5.4. Enterohepaattinen kierto

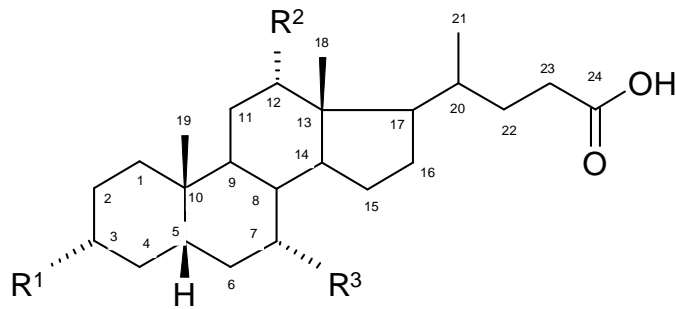
Yli 90 prosenttia sappisuoloista imeytyy ohutsuolesta ja kulkeutuu porttilaskimon kautta maksaan ja sieltä takaisin sappeen. Tätä kiertokulkua kutsutaan enterohepaattiseksi kierroksi. Suolistosta sappihapot imeytyvät lähes kokonaan passiivisen diffuusion ja aktiivisten siirtoprosessien (kuljettajaproteiinien) kautta, palautuen lopulta takaisin maksaan. Elimistö voi siis käyttää toistakymmentä kertaa samaa molekyyliä, ennen kuin molekyyli poistuu elimistöstä.

Lääkeaineiden kuljetusmekanismeista tärkein on passiivinen diffuusio. Diffuusio tarkoittaa itsestään tapahtuvaa aineiden sekoittumista, joka on seurausta molekyylien lämpöliikkeestä. Sekoittumista tapahtuu vain konsentraatioeron suuntaan eikä se kuluta energiaa. Suolen bakteeritoiminnan tuloksena glukuronidikonjugaatit hydrolysoituvat, jolloin lääkeaine tai hapettunut metaboliitti (= hajoamistuote) vapautuu ja voi imeytyä takaisin elimistöön. Tästä syystä sappeen runsaasti erittyvien lääkeaineiden imeytymiskokeissa voidaan ruokailun jälkeen havaita selvä veren lääkeainepitoisuuden nousu, vaikka muista syistä sen tulisi olla jo laskeva. (Nienstedt ym., 1995, 314; Haug ym., 1999.)

6. SAPPIHAPOT

Sappihapot ovat maksassa muodostuvia steroidirunkoisia kolesterolin aineenvaihduntatuotteita, jotka sisältävät syklopentanofenantreeni rungon ja 3-9 hiiliatomista muodostuneen sivuketjun, joka päättyy karboksyylihapporyhmään (-COOH). Selkärankaisilla sappihapot ovat 24 hiiltä sisältävän kolaanihapon johdannaisia. (Tamminen 1996, 3.)

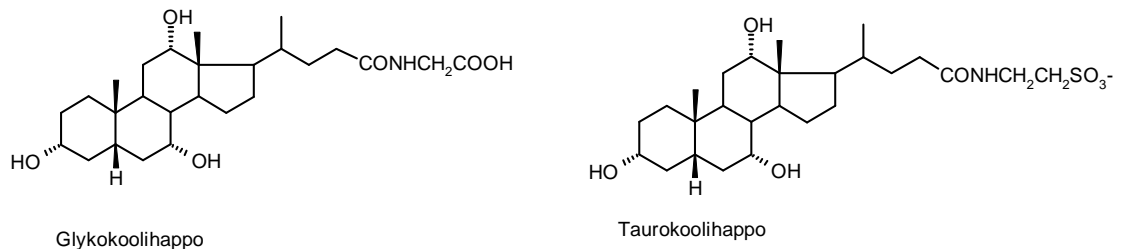
Yleisimpiä sappihappoja (kuvio 8) ovat litokoolihappo (3 α -hydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo), kenodeoksikoolihappo (3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo), deoksikoolihappo (3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo) sekä koolihappo (3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo). Näiden lisäksi farmakologiassa käytetään synteettistä ursodeoksikoolihappoa (3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo). Luonnossa se esiintyy vain karhun sapessa. (Tamminen 1996, 3.)



	R ¹	R ²	R ³
litokoolihappo (LCA)	OH	H	H
ursodeoksikoolihappo (UDCA)	OH	H	β-OH
kenodeoksikoolihappo (CDCA)	OH	H	α-OH
deoksikoolihappo (DCA)	OH	OH	H
koolihappo (CA)	OH	OH	α-OH

KUVIO 8. Sappihappojen rakenne (Virtanen 2004, 4.)

Sappihapot eivät esiinny sapessa vapaina, vaan glysiiniin (NH₂CH₂COOH) tai tauriiniin (NH₂CH₂CH₂SO₃H) peptidisidoksella sitoutuneina konjugaatteina (kuvio 9).



KUVIO 9. Koolihapon glysiini- ja tauriini-konjugaatit (Tamminen 1996,3)

Sappihappojen lääketieteellisiä ja synteettisiä sovelluksia tutkitaan paljon.

Sappihappoja voidaan käyttää monipuolisina rakenneosina. Niiden johdosten on havaittu toimivan mm. organogelaattoreina, joita käytetään mm. lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa. Lisäksi sappihappoja voidaan käyttää myös materiaalikemiassa ja ympäristön puhdistukseen liittyvissä sovelluksissa. Sappihappoja käytetään rakenneosina supramolekyylikemiassa, jossa niiden taipumusta muodostaa rengasmaisia (*head-to-tail* tai *head-to-head*) rakenteita käytetään hyväksi. Rengasrakenteita käytetään isäntämolekyyleinä mm. molekyyli-tunnistuksessa.

Lääketieteessä sappihappojen mahdollisuuksia tutkitaan mm. maksasairauksien ja sappikivien hoidossa. Lisäksi kiinnostusta herättää mahdollisuus käyttää sappihappoja geeniterapiassa. Sappihappojen käyttöä Gram-negatiivisten bakteerien herkistämiseen antibiooteille on tutkittu. (Li, Peters, Meredith, Allman & Savage, 1998, 2961; Virtanen 2004, 3385.)

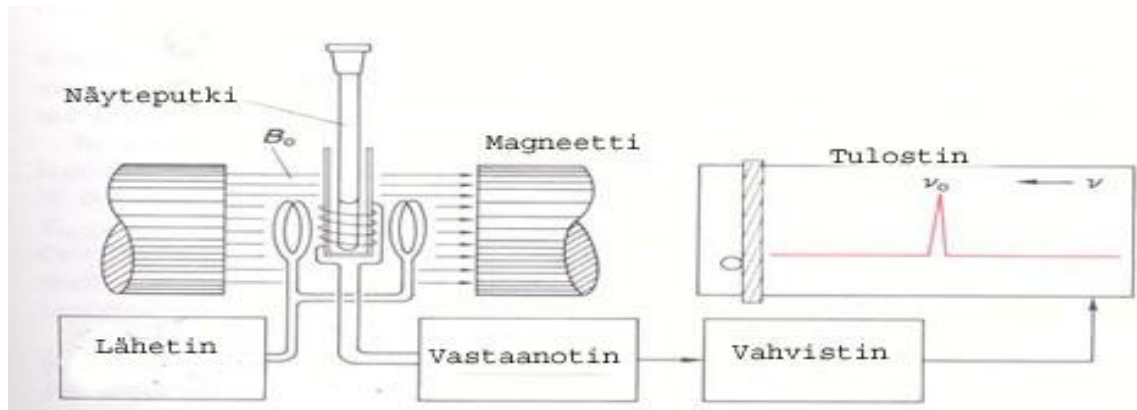
Sappihappoja käytetään myös aihiolääkkeissä. Mm. herpes-viruksen hoitoon käytetyn asykloviiri-lääkkeen oraalisen biosaatavuuden parantamiseksi on käytetty sappihappoa. (Tolle-Sander, Lentz, Maeda, Coop & Polli, 2003, 40.)

7. SPEKTROMETRIA

Spektroskopiassa tutkittava kohde usein säteilee, absorboi tai heijastaa samaansa säteilyä. Kohteeseen saapuva säteily aiheuttaa, tai kohteessa itsessään tapahtuu muutoksia, jotka näkyvät spektrissä. Nämä muutokset ovat esimerkiksi elektronien ja kemiallisten sidosten siirtymiä. Spektroskopiolla on useita osa-alueita, mm. IR-, UV-, NMR- ja röntgenspektroskopia. (Simonen 2001.)

7.1. NMR-spektroskopia

NMR-spektroskopia (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance) eli ydinmagneettinen resonanssi on molekyylien rakennetutkimuksen perusväline. Se on ainoa menetelmä, jolla voidaan ratkaista rakenne sekä kiinteästä, nestemäisestä että kaasumaisesta näytteestä. Yleensä näytteistä ajetaan ^1H ja ^{13}C NMR -spektrit. NMR-laitteen tärkeimmät osat ovat magneetti, lähetin, vastaanotin ja tulostin (kuvio 10). Tutkittava näyte asetetaan ~15 cm pitkään, 5 tai 10 mm halkaisijaltaan olevaan lasiseen näyteputkeen, joka saateetaan voimakkaan magneettikentän vaikutuksen alaiseksi (Günther 1998, 7; Sievänen 2005).



KUVIO 10. NMR -spektrometrin rakenne (Günther 1998, 7)

NMR-spektrometria perustuu aineen magneettisiin ominaisuuksiin. Useimmilla atomityimillä on magneettinen ominaisuus, jota kutsutaan spiniksi (+/-). Ulkoinen magneettikenttä suuntaa nämä spinin vastaamaan energiatasoja. Kaikkein yksinkertaisimmassa tapauksessa suuntia ja energiatasoja on kaksi (spin $-\frac{1}{2}$ -ytimet). Ulkoisessa magneettikentässä spinin saadaan nostettua alemmalta energiatasolta ylemmälle tasolle, kun virittävä energia on yhtä suuri kuin tasojen välinen energiaero. Virittävän energian sanotaan olevan resonanssissa spinsysteemin energiaeron kanssa. Jokaisella ytimellä on sille ominainen, ulkoisesta magneettikentästä riippuva resonanssitaajuus. Kaikki nämä taajuudet ovat radiotaajuusalueella, jolloin virittävä energia saadaan aikaan rf- eli radiotaajuuspulsilla. (Virtanen, 2000, 31.)

Spinsysteemi palautuu aikaisempaan tasapainotilaansa pulssin jälkeen ja indusoi näytteen ympärillä olevaan kelaan jännitteen. Tämä jännite vahvistetaan ja havaitaan. Havaittua NMR-signaalia kutsutaan FIDiksi (**F**ree **I**nduction **D**ecay). Kun tähän signaalin tehdään Fourier-muunnos, saadaan värähtelyn spektrikomponentit. Spinsysteemissä jokainen spin on voimakkaan ulkoisen magneettikentän lisäksi vuorovaikutuksessa myös viereisten spinien magneettikenttien kanssa, jolloin jokainen magneettisesti eikvivalentti spin resonoi hieman eri taajuudella. Tämän seurauksena NMR-spektri kuvaa molekyylin rakennetta ja ympäristöä. NMR-signaalin tuottamiseen tarvitaan voimakas magneetti, joka nykyään on yleensä suprajohdemagneetti. Lisäksi tarvitaan lähetin rf-taajuuksille sekä vastaanotin tuleville taajuuksille. NMR-laitteisto on tietokoneohjattu. (Sievänen, 2005.)

^1H NMR-spektroskopiassa käytetään yleensä deuteroituja liuottimia, sillä niiden signaalit eivät näy spektrissä. Tällöin liuottimen signaalit eivät peitä näytteen mahdollisia

signaaleja. Lisäksi spektrometrin resonanssin ja taajuuden suhde pidetään vakioina mittauksen ajan ns. lukkokanavan avulla. Modernien spektrometrioiden heterolukkosysteemi käyttää deuteroidun liuottimen ^2H NMR-signaalia. (Sievänen, 2005.)

NMR-laitteiston hankintahinta on melko korkea, hinta vaihtelee 200000-350000 €-vä-
lillä laitteen tehokkuuden ja varustetason mukaan. Jyväskylän yliopisto myy NMR-
mittauksia ulkopuolisille hintaan ~100 €/h. Koska mittaus on suhteellisen nopea, yk-
sittäisen näytteen protonispektrin mittaus ei tule asiakkaalle kohtuuttoman kalliiksi,
varsinkin jos liuottimena käytetään deuteroitua kloroformia, joka on deuteroiduista
liuottimista halvin. (Kauppinen, 2007.)

7.2. Massaspektrometria

Massaspektrometriassa (MS) mitataan ionin massan ja varauksen suhdetta (m/z) (Vai-
niotalo, 2006). Massaspektrometriassa käytetään useita eri ionisaatiomenetelmiä mm.
elektroni-ionisaatio (EI), kemiallinen ionisaatio (CI), matriisiavusteinen laserdesorp-
tioionisaatio (MALDI) ja sähkösumutusionisaatio (ESI). Lisäksi käytössä on useita
analysointilaitteita, kuten lentoaika-analysointilaitteet (TOF) ja kvadrupoolilaitteet. Usein
käytetään näiden menetelmien yhdistelmiä kuten esim. ESI-TOF tai MALDI-TOF.
(Virtanen 2000, 6; Siuzdak 2003, 13.)

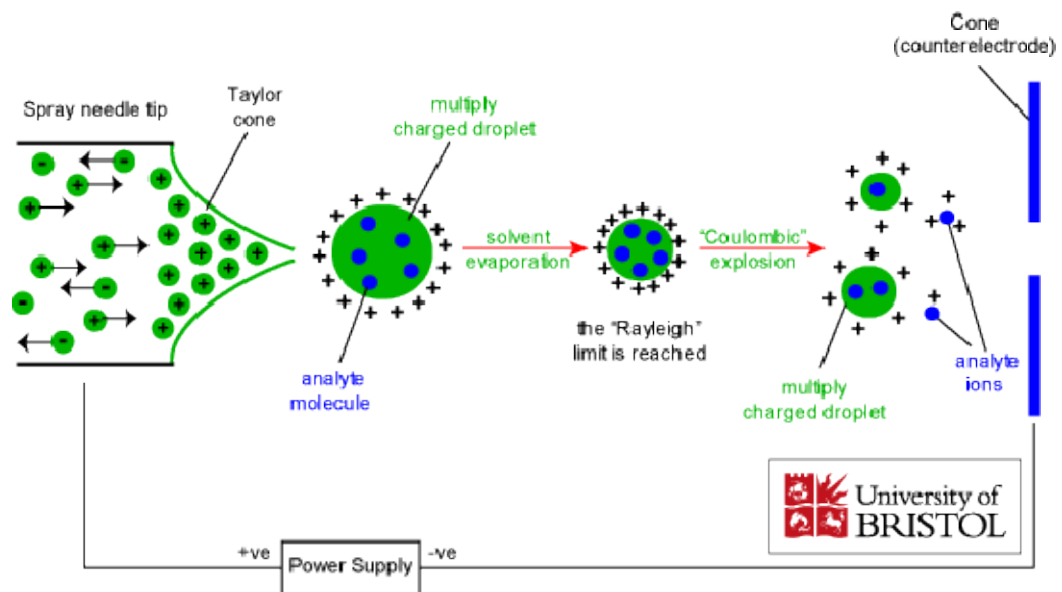
Koska käyttämäni menetelmä oli ESI-TOF, käsitelen tässä vain sitä.

7.2.1. Sähkösumutusionisaatio

Sähkösumutusionisaatio (*Electrospray ionization*, ESI) sopii menetelmänä parhaiten
yhdisteille, jotka ovat liuoksessa ioneina. Parhaiten ionisoituvat yhdisteet, jotka kyke-
nevät luovuttamaan (happo) tai vastaanottamaan protonin (emäs). Menetelmässä nes-
temäinen näyte saatetaan kaasumaiseen muotoon, jossa se ionisoituu voimakkaassa
sähkökentässä. Kantokaasuna käytetään typpeä. Näytteen valmistukseen käytetään
liuotinta, johon 1) näyte liukenee hyvin 2) joka haihtuu 3) joka kykenee luovuttamaan
protonin. Usein käytetään metanolia. Veden höyrynpaine on suhteellisen alhainen,

mikä voi vaikuttaa tarkkuuteen. Tämän takia veden käyttöä liuottimena ei suositella. Myös puskurit, kuten natrium- ja kaliumfosfaatit, aiheuttavat ongelmia tarkkuudessa. ESI:llä voidaan mitata sekä positiivisia että negatiivisia ioneja. Mittauksesta riippuen yhdisteestä joko poistuu tai siihen tulee lisää yksi tai useampi protoni tai kationi/anioni ja samalla näytteen varaus muuttuu. Yleensä varausten lukumäärä kasvaa tutkittavan yhdisteen molekyylipainon kasvaessa. (Kostiainen, 2006.)

ESI:ssä näyte ajetaan virtausnopeudella 1 - 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ kapillaariin, jossa on 3-6 kV:n jännite. Jännitteen vaikutuksesta yhdiste varautuu joko positiivisesti tai negatiivisesti. Kun varautunut pisara (kuvio 11) on muodostunut, siitä haihtuu liuotinta ja sen varaustiheys kasvaa. Tämän seurauksena repulsio (= hylkimisvoima) kasvaa. Kun repulsio kasvaa suuremmaksi kuin pisan pintajännitys, pisara hajoaa pienemmiksi pisaroiksi (Rayleighin raja-arvo). Prosessi toistuu, kunnes varaustiheys on niin suuri, että pisara alkaa emittoida kaasufaasi-ioneja. Kaasufaasi-ionit kerätään erilaisten (elektrodi)linssien avulla massaspektrometriin, jossa tapahtuu varsinainen ionin analysointi. (Vainiotalo, 2006.)



KUVIO 11. ESI:n toimintaperiaate (Gates, Santos, Gobbo-Neto, Carollo, Crotti, Vessecchi, Lopes, 2006.)

7.2.2. Lentoaika-analysointilaitteisto

Lentoaika-analysointilaitteisto (*Time of flight*, TOF) on yksinkertainen massa-analysointilaitteisto. Siinä ionilähteessä muodostuneet ionit emittoitetaan analysointilaitteeseen ja kiihdytetään mahdollisimman yhtäaikaaisesti. Kiihdytyksessä ionit saavat saman kineettisen energian. Massojensa perusteella ne muodostavat nopeutensa mukaisia ryhmiä. Ionien m/z - arvot määritellään detektorille saapumisaikojen mukaan. Mitä pienempi (= kevyempi) ioni on, sen nopeammin se saavuttaa detektorin. Suuri (painava) ioni puolestaan tulee detektorille myöhemmin. (Virtanen, 2000, 19).

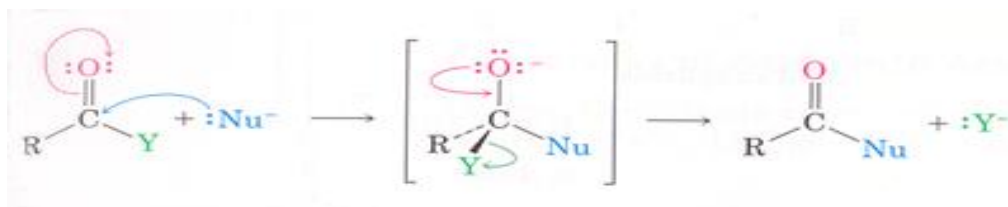
8. SYNTEESIT

8.1 Reaktiomekanismit sekä käytetyt työmenetelmät ja -laitteet

Synteesit perustuivat esteröintireaktioon (Fischerin esteröintireaktio) sekä karboksyylihapojen nukleofiiliseen asyyli-substituutioreaktioon.

Esteröintireaktiossa karboksyylihapo ja alkoholi reagoivat keskenään happokatalyytin avustamina muodostaen esterin.

Toinen ja oikeastaan tärkeämpi reaktio oli karboksyylihapojen nukleofiilinen asyyli-substituutioreaktio. Reaktiossa nukleofiili pyrkii luovuttamaan oman vapaan elektroniparin ja muodostamaan kovalenttisen sidoksen elektrofiilin kanssa. Nukleofiilisen reaktion tärkeimmät reaktiomekanismit ovat S_N1 ja S_N2 . Poolisen karbonyyliryhmän osittain positiivisesti varautuneeseen hiiliatomiin liittyy nukleofiili, muodostaen väli- tuotteena alkoksidin. Muodostunut alkoksidi muodostaa uuden karbonyyliyhdisteen. (kuviot 12).



KUVIO 12. Nukleofiilinen asyylisubstituutioreaktio (McMurry, 2003, 315)

Työssä käytettiin normaaleja orgaanisen kemian työmenetelmiä, kuten tislausta, refluksointia, evaporointia sekä vakuumikuivausta. Tuotteita puhdistettiin ohutlevy- ja pylväskromatografisesti. Synteeseissä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 1. Ohutlevyinä käytettiin Merckin Silica gel 60 F 254 -ohutlevyjä (koko 20 * 20 cm) sekä Macherey-Nagelin Alugram Sil G/UV 254 -ohutlevyjä (koko 20 * 20 cm). Pylväskromatografiassa käytettiin Merckin Silica gel 60 -geeliä, jonka partikkelikoko oli 0,040–0,063 mm. Synteesituotteista ajettiin ¹H NMR spektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osaston Bruker Avance DPX 250 NMR -spektrometrillä. Joistakin tuotteista mitattiin spektrit käyttäen Bruker Avance DRX 500 NMR -spektrometriä. Osasta tuotteita mitattiin myös Bruker Avance DRX 500 NMR -spektrometrillä ¹³C NMR -spektri sekä spektrit ¹³C DEPT-135, ¹H, ¹³C HMQC sekä ¹H, ¹³C HMBC NMR -spektrit. Referenssiaineena käytettiin ¹H- ja ¹³C NMR -mittauksissa TMS (tetrametyylisilaani) ja ¹⁵N NMR -mittauksissa CH₃NO₂ (nitrometaani). Spektrien tulkinnassa käytettiin apuna synteesiohjeina käytettyjä julkaisuja, julkaisua sappihappojen ja niiden johdannaisten hiilisiirtymistä (Dias, Gao & Kolehmainen 2000, 53) sekä Internetin SDBS-tietokantaa. Lisäksi spektrejä verrattiin mitattuihin mallispektreihin. Synteesituotteista mitattiin myös massaspektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osaston Micromass LCT ESI-TOF-massaspektrometrillä.

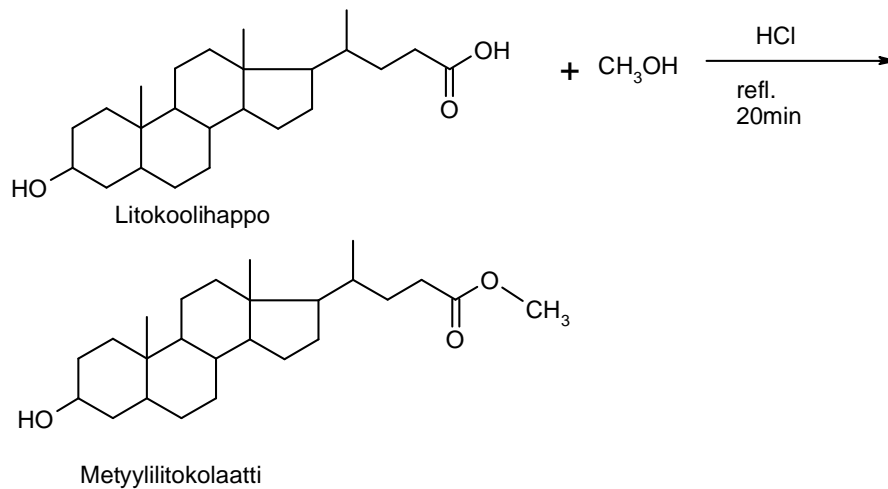
TAULUKKO 1. Synteeseissä käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus
Asetanhydridi	J. T. Baker	99 %
Asetoni	1. VWR 2. Mallinckrodt	99,9 % HPLC
Dietyylieetteri	VWR	99,7 %
Dikloorimetaani	Fluka	99,9 %
Etyleenidiamiini	Fluka	98 %
Etyyliasetatti	LabScan	99,8 %
Etyyliklooriformiaatti	Merck	97 %
Heksaani	Rathburn	HPLC
Hiilitetrakloridi	J. T. Baker	p.a.
Isonikotiinihappo	Acros	99 %
Klorambusiili	Fluka	98 %
Kloroformi	VWR	p.a.
Litokoolihappo	Sigma-Aldrich	97 %
Magnesiumsulfaatti	Riedel de Haën	p.a.
Metanoli	Merck	99,8 %
Natriumkloridi	J. T. Baker	p.a.
Nikotiinihappo	Sigma-Aldrich	98 %
Pyridiini	BDH	99,5 %
Rikkihappo	Fluka	95–97 %
Tetrahydrofuraani	LabScan	99,8 %
Tionyylikloridi	Riedel de Haën	98 %
Trietyyliamiini	Riedel de Haën	99 %
Valproiinihappo	Sigma	>99,8 %
Vetykloridihappo	J. T. Baker	37–38 %

8.2. N-(N'-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti(n valmistaminen)

Litokoolihaposta, LCA (3 α -hydroksi-5 β -kolaani-24-karboksyylihappo) valmistettiin metyyliesteri refluksioimalla sitä metanolin kanssa 20 min ajan. (kuvio 13.) Metanolia käytettiin ylimäärin. Reaktiossa käytettiin väkevää suolahappoa katalyyttina joka käynnisti reaktion. (Fieser & Rajagopalan, 1950, 5530.)



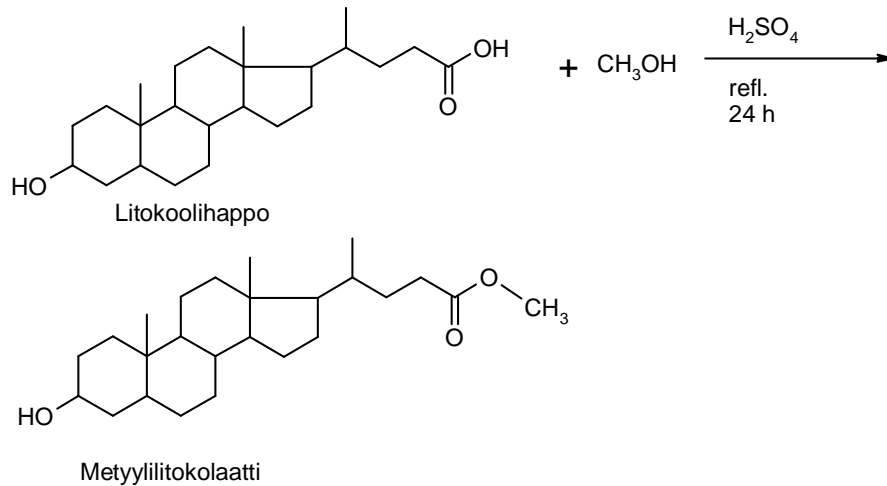
KUVIO 13. Metyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatin valmistus(Fieser, ym.1950)

Refluksionin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja kiteytettiin pakastimessa -20 °C lämpötilassa noin 1,5 h ajan. Kiteet suodatettiin sintterin ja imupulpon avulla ja tuotetta kuivattiin vakuuminjassa yön yli. Tuotteen puhtaus tarkistettiin ¹H NMR- mittauksella. Metyylilitokolaatin steroidirungon numerointi esitetään liitteessä 1. ¹H NMR spektri esitetään liitteenä 2. Spektreistä saadut kemialliset siirtymät ja integraalit ovat: ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): δ 18-CH₃ (0,63 (s), 3,00); 21-CH₃ ja 19-CH₃(0,88 (d, overl.), 0,90 (s), 6,55; 3 β -H (~3,6 (m, overl.) 0,84); 25-CH₃ (3,64 (s), 3,05).

Näistä tuloksista metyyliesterin muodostuminen nähtiin 25-CH₃-protonien signaalista, jonka kemiallisen siirtymän arvo $\delta = 3,64$ ppm (s). Integraali on lähellä 3, kuten metyyli ryhmällä tuleekin olla. Saanto oli 5,52 g (89 % teoreettisesta saannosta).

Metyylilitokolaatin valmistuksessa käytettiin myös pidemmän refluksointiajan vaativaa menetelmää. Litokoolihaposta valmistettiin metyyliesteri refluksoimalla sitä metanolin kanssa 24 tunnin ajan. (kuvio 14.) (Tamminen, Kolehmainen, Haapala ja Linnanto, 2000, 1464).

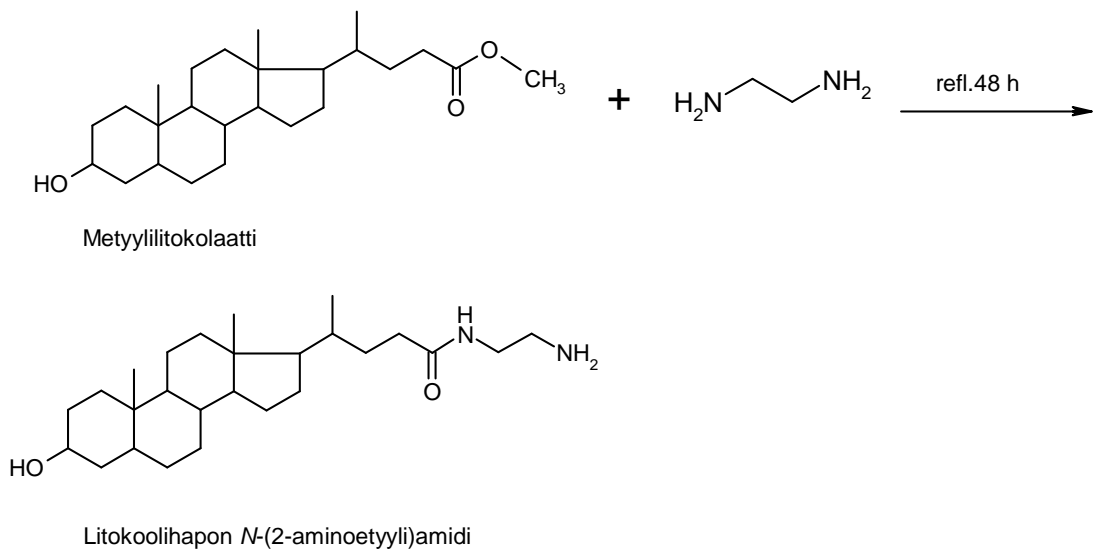
Metanolia käytettiin ylimäärin ja katalyyttina oli väkevä rikkihappo. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä ensin huoneen lämpöön, minkä jälkeen sitä jäähdytettiin jäähauteessa. Orgaanista kerrosta pestiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella reagoimattoman hapon poistamiseksi, kuivattiin ja evaporoitiin. Tuotetta kuivattiin vaakuumilinjassa 2 tunnin ajan ja puhtaus tarkistettiin ^1H NMR- mittauksella. Saanto oli 5,4 g (52 % teoreettisesta saannosta).



KUVIO 14. Metyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaattin valmistus (Tamminen ym. 2000)

N-(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Metyylilitokolaatin karbonyyliryhmään liitettiin etyleenidiamiini (Pandey & Singh 1997, 5045; Tamminen ym., 2000), joka toimi siltamolekyylinä konjugoitaville lääkeaineille. Reaktiossa metyyllitokolaattia ja ylimäärää etyleenidiamiinia refluksoitiin metanolin läsnä ollessa 48 tuntia (kuvio 15.)



KUVIO 15. *N*-(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin valmistaminen (Pandey ym. 1997; Tamminen ym. 2000)

Litokoolihapon *N*-(2-aminoetyyli)amidia käytettiin lähtöaineena kaikissa seuraavissa lääkeainekonjugaateissa. Saanto oli 2,53 g (94 % teoreettisesta saannosta). Tuotteen puhtaus tarkistettiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR- sekä MS-mittauksilla. Litokoolihapon *N*-(2-aminoetyyli)amidin hiilien numerointi esitetään liitteessä 1.

^1H NMR- ja ^{13}C NMR- spektrit sekä taulukoidut ^{13}C NMR- siirtymät esitetään liitteessä 3.

Protonien kemialliset siirtymät ja integraalit ovat:

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, ppm): δ 18- CH_3 (0,64 (s),3,00); 19- CH_3 ,21- CH_3 (0,92 (s),0,93(d),6,12); 26- CH_2 (2,83(t),1,94), 25- CH_2 (3,30 (q),1,94); 3 β -H (~3,6 (m), 1,11); CONH(~5,85 (br), 0,95)

MS m/z ESI-TOF⁺: 419,23 [M+H]⁺, C₂₆H₄₆N₂O₂H: 419,36; 837,58 [2M+H]⁺, C₅₂H₉₂N₄O₄H:837,72; 859,56 [2M+Na]⁺, C₅₂H₉₂N₄O₄Na:859,70; 1255,83 [3M+H]⁺, C₇₈H₁₃₈N₆O₆H:1256,08;1277,86 [3M+Na]⁺, C₇₈H₁₃₈N₆O₆Na: 1278,06;1293,85[3M+K]⁺, C₇₈H₁₃₈N₆O₆K:1294,03

¹H NMR- spektristä nähdään 26-CH₂ ja 25-CH₂-protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 2,83(t)$ ja $\delta = 3,30$ ppm(q); integraali ~2 ja 2. Amidiprotonin signaali kemiallisen siirtymän arvolla $\delta = \sim 5,85$ ppm(s); integraali ~1.

MS m/z ESI-TOF⁺ spektrien avulla voidaan vertaamalla mitattua ja laskennallista m/z arvoa todeta että haluttua tuotetta on syntynyt.

¹³C ja ¹⁵N NMR -siirtymät on raportoitu aikaisemmin J.Tamminen, E. Kolehmainen, J.Linnanto, P.Vainiontalo, S.Vuorikoski, R.Kauppinen, ¹³C, ¹⁵N and ¹¹³Cd NMR and molecular orbital studies of novel bile acid *N*-(2-aminoethyl)amides and their Cd²⁺-complexes, J.Inclusion Phenom.Macrocyclic Chem., 2000, 37, 121-130. Siirtymät on taulukoitu liitteessä 3.

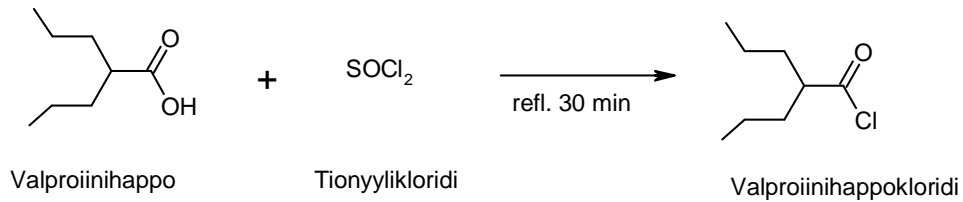
2-propyyliipentaanihappokloridi(n valmistaminen)

Valproiinihaposta valmistettiin happokloridi (kuvio 16) refluksoimalla sitä tionyylikloridin kanssa. (Kolehmainen, Tamminen, Lappalainen, Torkkel, Seppälä, 1996, 1082.) Lääkeaineesta valmistettiin happokloridi, jotta se reagoisi herkemmin LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidin vapaan aminoryhmän kanssa ja lääkeaine saataisiin liitettyä kantajamolekyylisiin. Ennen synteessin aloittamista tionyylikloridi tislattiin. Saanto oli 0,98 g (95 % teoreettisesta saannosta).

Tuotteesta mitattiin protonispektri. Tuotteen kemialliset siirtymät ja integraalit ovat:

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): δ e-CH₃ (0,94(t), 6,00); d-CH₂,c-CH₂(~1,3-1,8,8,02); b-CH(2,79(m), 0,95)

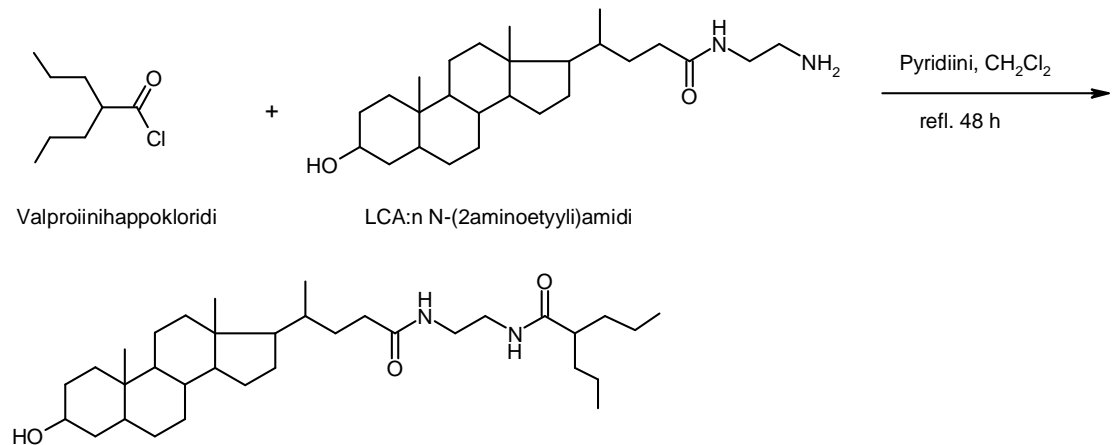
Verrattaessa tuotteen ¹H NMR –spektriä valproiinihapon spektriin hapon – COOH protonin signaali puuttuu ja myös b-CH-protonin signaali on siirtynyt huomattavasti alakentälle päin (~2,4 → 2,8 ppm). Tämän perusteella haposta on muodostunut happokloridi.



KUVIO 16. 2-propyylipentaanihappokloridin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996).

***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)**

Valproiinihappokloridia refluksoitin aikaisemmin valmistetun LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidin kanssa 48 tuntia. (Tamminen ym., 2000). Liuottimena käytettiin dikloorimetaania (kuvio 17). Lisäksi reaktioseokseen lisättiin pyridiiniä, joka sitoo reaktiossa vapautuvan HCl:n ammoniumsuolakseen. Muodostunut ammoniumsuola on vesiliukoinen, joten se saadaan poistettua refluksionnin jälkeen tehtävillä pesuilla.



KUVIO 17. *N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996).

Refluksionnin jälkeen synteetitöiden annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Evaporoitu tuote liuotettiin kloroformiin. Orgaanista kerrosta pestiin erotussupplissa kylläisellä NaHCO_3 -liuksella ja lopuksi vedellä. NaHCO_3 -käsittelyllä poistettiin tuotteeseen mahdollisesti jäänyt reagoimaton valproiinihappo muut-

tamalla se Na-suolaksi, joka on vesiliukoinen ja saadaan siten poistettua reaktioseoksesta.

Raakatuotteen puhtaus tutkittiin mittaamalla siitä ^1H NMR -spektri. Lisäksi tuotteesta mitattiin massaspektri. Mittausten perusteella voitiin todeta, että reaktiossa oli syntynyt haluttua tuotetta sekä dimeeri, jossa valproiinihappoklorid oli liittynyt myös 3α -asemaan. Raakatuotteen joukossa oli myös reagoimatonta lähtöainetta.

Tämän jälkeen etsittiin TLC:n (= Thin Layer Chromatography = ohutlevykromatografia) avulla eluentti pylväskromatografista puhdistusta varten.

Ohutlevykromatografian perusteella eluentiksi valittiin dikloorimetaani:asetoni (80:20). Kromatografiapylväs rakennettiin silicasta jonka raekoko oli 0,040-0,06mm, saatu synteesituote imeytettiin pylvääseen ja eluentti kerättiin koeputkiin. Jostain syystä tuote ei liikkunut pylväässä minkä vuoksi eluentiksi vaihdettiin dikloorimetaani:asetoni (40:60). Fraktioiden keräystä jatkettiin. TLC:lla tehdyn tarkastelun jälkeen samaa tuotetta sisältävät koeputket yhdisteltiin kolveihin ja evaporoitii. Tämän jälkeen tuotteet karakterisoitiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Tuotteista mitattiin myös massaspektri. Tuotteen hiilien numerointi esitetään liitteessä 1. Tuotteiden ^1H NMR-, ^{13}C NMR- ja MS-spektrit sekä taulukoidut ^{13}C - ja ^{15}N NMR -siirtymät esitetään liitteessä 4. Yhdisteiden kemialliset siirtymät ja integraalit ovat:

N-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3α -hydroksi- 5β -kolan-24-amidi

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, ppm): δ 18- CH_3 (0,60 (s), 3,00); 19- CH_3 , 21- CH_3 , 2^*31CH_3 (0,83–0,88,12,09); 23- $\text{CH}\beta$, 28- CH (~2,06 (m, overl.), 1,98); 23- $\text{CH}\alpha$ (2,20(m),0,95); 25- CH_2 ,26- CH_2 (3,31,(br.), 3β -H (~3,57(m), 1,02); 27-CONH, 24-CONH (6,82,6,89 (br.), 2,14)

^{13}C NMR -siirtymät esitetään liitteessä 4.

^{15}N NMR (CDCl_3 , 500 MHz, ppm): 24-CONH -266,6; 27-CONH -265,0.

MS m/z ESI-TOF⁺ : 545,39[M+H]⁺, $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_3\text{H}$: 545,47 ; 567,30[M+Na]⁺, $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$:567,45;583,33[M+K]⁺, $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_3\text{K}$:583,42; 1089,77[2M+H]⁺, $\text{C}_{68}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_6\text{H}$:1089,93;1111,72[2M+Na]⁺ ; $\text{C}_{68}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$:1111,91;1127,72[2M+K]⁺ $\text{C}_{68}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_6\text{K}$:1127,88

Protonispektristä nähdään, että 3 β -protoni ei ole esteröitynyt, vaan sen integraali on 1,02. Tarkasteltaessa 19-CH₃, 21-CH₃ sekä 2*31-CH₃ integraaleja, voidaan todeta niiden olevan lähellä 12,0. Tämä kertoo tuotteen onnistumisesta.

N-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, ppm): δ 18-CH₃ (0,58(s), 3,00); 19-CH₃,21-CH₃, 2*31CH₃ 2*31'-CH₃ (0,81–0,87,18,06); 25-CH₂,26-CH₂(3,30,(br.),3 β -H (~3,68(m).1,18); 27-CONH, 24-CONH (6,96, 7,01(br.),2,20)

MS *m/z* ESI-TOF⁺ : 549,35?, 671,45[M+H]⁺, C₄₂H₇₄N₂O₄H: 671,57 ; 693,42[M+Na]⁺, C₄₂H₇₄N₂O₄Na:693,55; 709,41[M+K]⁺, C₄₂H₇₄N₂O₄K:709,53; 1341,93[2M+H]⁺, C₈₄H₁₄₈N₄O₈H:1342,14; 1363,95[2M+Na]⁺ C₈₄H₁₄₈N₄O₈Na:1364,12; 1379,91[2M+K]⁺ C₈₄H₁₄₈N₄O₈K:1380,09

¹³C ja ¹⁵N NMR-siirtymät taulukoitu liitteessä 4.

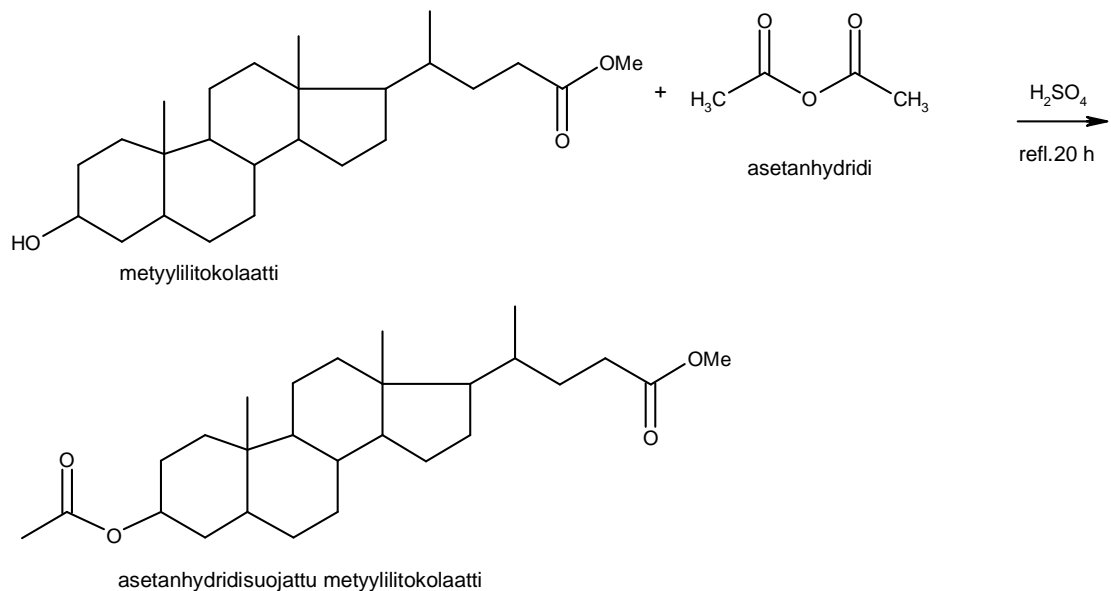
Protonispektristä voidaan todeta 19-CH₃, 21-CH₃, 2*31-CH₃ sekä 2*31'-CH₃ integraaleja tarkasteltaessa, että ne ovat lähellä 18. Tästä voidaan päätellä, että valproiinihappo on konjugoitunut sappihapossa sekä C3 että C24 päihin. Protonispektristä nähdään myös että 3 β -protoni on esteröitynyt, ja sen kemiallisen siirtymän arvo on δ = ~4,09.

Puhdistusten jälkeen LCA:n *N*-(2-amonoetyyli)amidin ja valproiinihappokloridin konjugaatin saannoksi tuli 0,39 g (12 % teoreettisesta saannosta) ja dimeerin saanto oli 0,14 g.

8.3. *N*-(*N'*-[4-{*p*-*N''*,*N'''*-bis-2-kloorietyyli]fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Metyyli 3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-oaatti(n valmistaminen)

Lähtöaineena käytettiin metyylilitokolaattia, jonka valmistus on kuvattu kappaleessa 8.2. Metyylilitokolaatin 3 α - asema haluttiin suojata asetyylioksiesterinä (Kolehmainen ym., 1996), koska klorambusiilin ei haluttu liittyvän kyseiseen hydroksyyliiryhmään. Reaktiossa metyylilitokolaatin 3 α - asemassa oleva hydroksyyliiryhmä reagoi anhydridin kanssa muodostaen esterisidoksen. Synteesi aloitettiin tislaamalla asetanhidridi. Metyylilitokolaattia ja vastatislattua asetanhidridiä refluksoitettiin yön yli väkevän rikkihapon toimiessa katalyyttinä (kuvio 18).

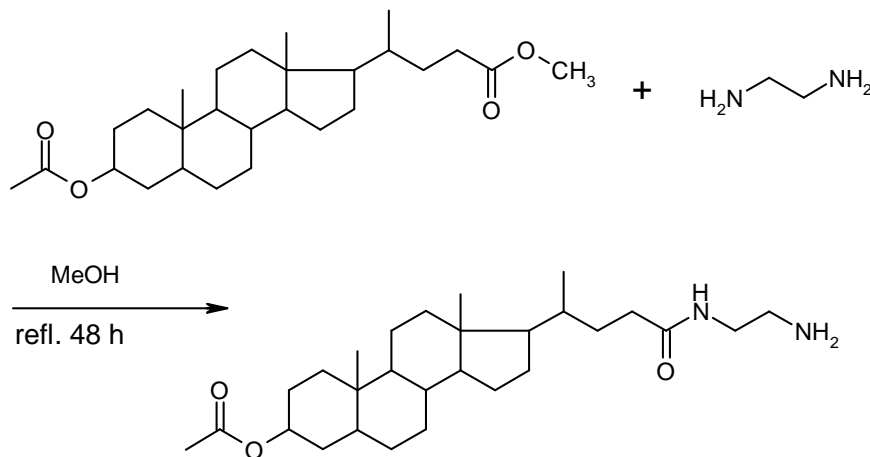


KUVIO 18. Metyyli-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-oaattin valmistus (Kolehmainen ym., 1996).

Refluksionin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä ensin huoneen lämpöön, minkä jälkeen sitä jäähdytettiin jäähauteessa. Kylmä tuote kaadettiin eetteri-jää seokseen. Tuotteen tuli olla kylmää, koska eetteri on erittäin herkästi syttyvää. Organista kerrosta pestiin erotussupplissa vedellä ja kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella niin kauan, että vesifaasin pH oli emäksinen. Reaktioseokseen lisättiin kylläistä NaCl -liuosta, tuote kuivattiin, suodatettiin ja evaporoitiin. ^1H NMR -spektroskopian avulla todettiin että asetyylioksisuojaus oli onnistunut. Saanto oli 1,62 g (48 % teoreettisesta saannosta).

***N*-(aminoetyyli)-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)**

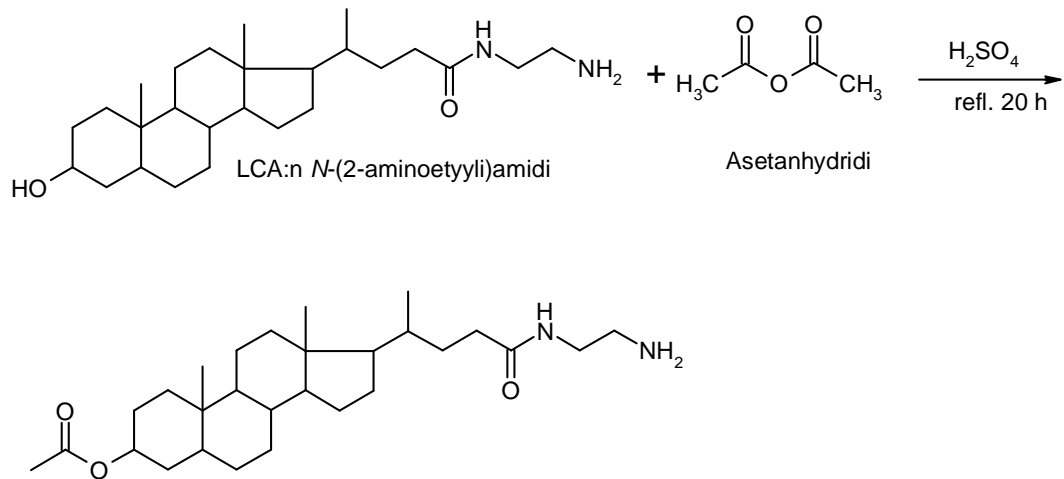
Seuraavaksi metyyli-3 α -asetyylioksisilitokolaattiin haluttiin liittää etyleenidiamiini refluksoimalla yhdistettä metanolissa 48 tunnin ajan (Kolehmainen ym.1996). Etyleenidiamiinin oli tarkoitus toimia siltamolekyylinä lääkeaineelle (klorambusiili) (kuvio19).



KUVIO 19. *N*-(aminoetyyli)-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen) (Kolehmainen ym. 1996)

Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Tämän jälkeen tuote liuotettiin kloroformiin ja annettiin kiteytyä jäähauteessa. Kiteytyminen oli heikkoa ja saanto oli 3,58 g. ¹H NMR -spektroskopian perusteella voitiin todeta, että asetyylioksisuojaus oli hydrolysoitunut. Syynä tähän oli mahdollisesti liuottimena käytetty metanoli. Samalla kuitenkin etyleenidiamiinin liittäminen amidisidoksella C24-karbonyyliin oli onnistunut.

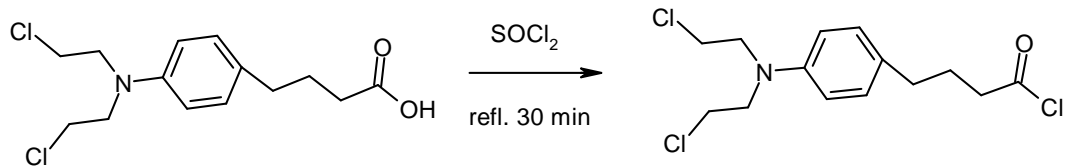
Synteesiä jatkettiin suojaamalla LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidin 3 α -hydroksyyliiryhmä (kuvio 20) uudelleen asetyylioksiesterinä (Kolehmainen, ym., 1996). Synteesi tehtiin kuten edellä. ¹H NMR -spektroskopian avulla voitiin todeta asetyylioksisuojauksen onnistuneen. Samalla kuitenkin C24-karbonyylin ja etyleenidiamiinin välinen sidos oli hydrolysoitunut.



KUVIO 20. LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidin anhydridisuojaus (Kolehmainen, 1996).

4-(*p*-[*N,N*-bis-2-kloorietyyli]fenyyli)butaanihappokloridi(n valmistaminen)

Klorambusiilista valmistettiin happokloridi refluksioimalla sitä tionyylikloridin kanssa 30 minuutin ajan (kuvio 21) (Kolehmainen, 1996). Refluksionin jälkeen tionyylikloridi tislattiin pois ja tuote liuotettiin hiilitetrakloridiin. Liuotinseos evaporoitiin pois, minkä jälkeen tuotteesta mitattiin $^1\text{HNMR}$ -spektri. Saanto oli 1,32 g (98,5 % teoreettisesta saannosta).

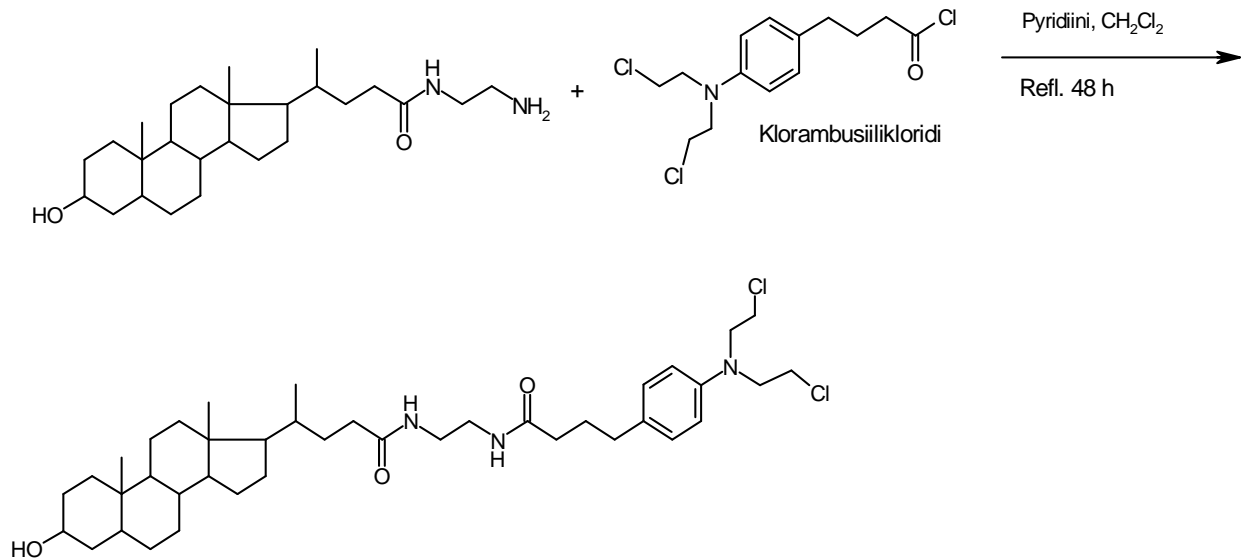


KUVIO 21. 4-(*p*-[*N,N*-bis-2-kloorietyyli]fenyyli)butaanihappokloridin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996).

N-(*N'*-[4-{*p-N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli]fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Seuraavaksi synteesistä 8.3. saadun tuotteen, jonka 3 α -asetyylioksisuojaus oli hydrolysoitunut, annettiin reagoida klorambusiilikloridin kanssa.

Saatu happokloridia ja LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidia refluksoitii CaCl_2 -putkellisen pystyjäädyttäjän alla 48 tuntia. Seokseen lisättiin pyridiiniä vapautuvan HCl :n sitomiseksi (kuvio 22) (Kolehmainen ym., 1996.)



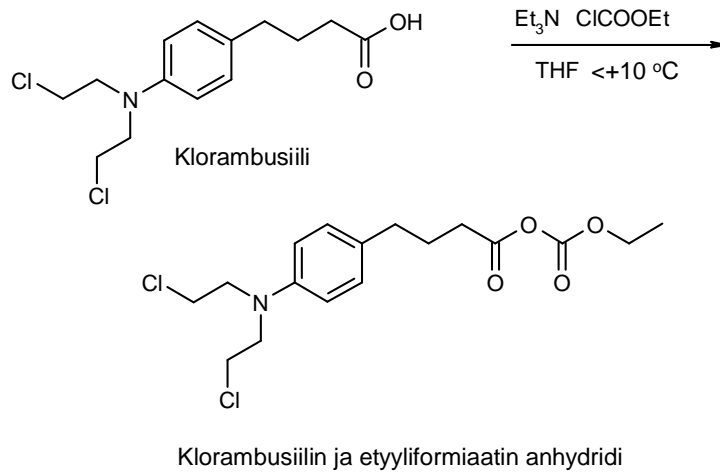
KUVIO 22. *N*-(*N'*-[4-{*p-N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996).

Refluksionin jälkeen raakatuotteen annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Raakatuote liuotettiin kloroformiin ja orgaanista kerrosta pestiin kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella ja vedellä. Tämän jälkeen tuote kuivattiin, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin pois. Mitattiin ^1H NMR-, ^{13}C NMR- sekä massaspektit. Spektrien perusteella todettiin, että synteesi ei ollut onnistunut.

***N*-(*N'*-[4-{*p-N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen seka-anhydridimenetelmää käyttäen)**

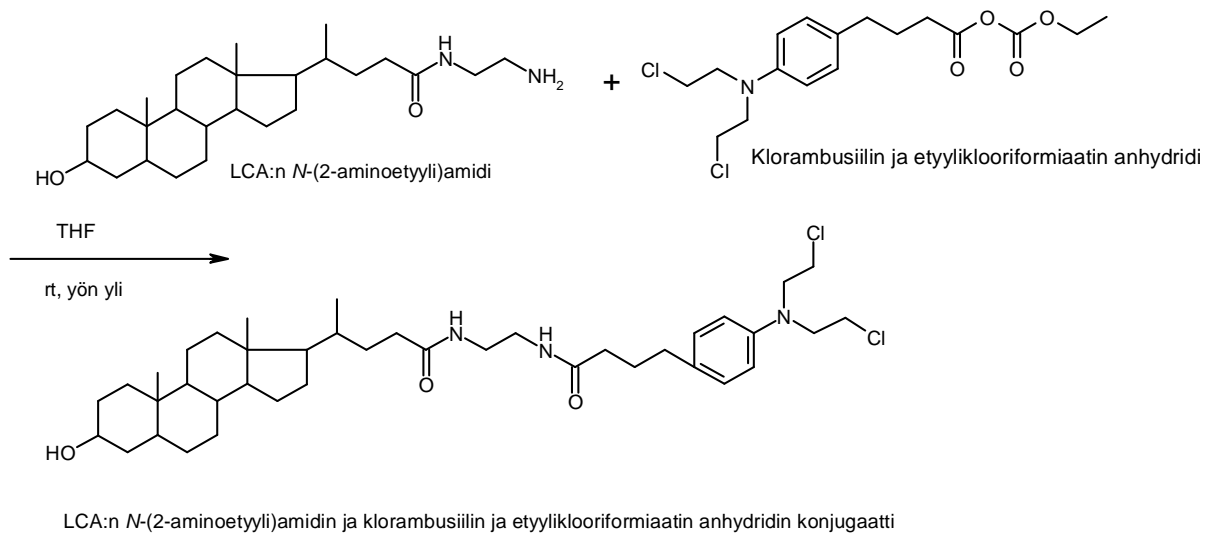
Klorambusiilista valmistettiin seka-anhydridi antamalla sen reagoida etyylidiklooriformiaatin kanssa. Anhydridi on vähemmän reaktiivinen kuin happokloridi, mutta reaktiivisempi kuin karboksyylihappo. Synteesissä käytettiin liuottimena kuivaa tetrahydrofuraania (THF), joka tislattiin tyypiatmosfäärissä ennen synteesin aloittamista. Synteesi tehtiin jää-suola-hauteessa, jotta reaktion lämpötila pysyisi alle $+10$ °C:ssa. Klorambusiili liuotettiin tetrahydrofuraaniin, minkä jälkeen tiputussuppilon kautta lisättiin hitaasti trietyyliamiini sekä etyylidiklooriformiaatti. Sekoitusta jatkettiin jää-suola-

hauteessa 30 minuutin ajan (kuvio 23). (Virtanen, Tamminen, Linnanto, Mänttari, Vainiotalo, Kolehmainen, 2002, 319.)



KUVIO 23. Klorambusiilin ja etyylikloriformiaatin anhydridi (Virtanen ym., 2002)

Synteisiä jatkettiin lisäämällä reaktioseokseen THF:iin liuotettu LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidi, joka oli valmistettu synteesiohjeen 8.2 mukaisesti (Tamminen ym., 2000). Sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä yön yli. (kuvio 24) (Virtanen ym., 2002).



KUVIO 24. *N*-(*N'*-[4-{ *p*-*N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin valmistaminen seka-anhydridimenetelmää käyttäen (Virtanen ym., 2002)

Refluksoinnin jälkeen liuotin evaporoitiin pois ja raakatuote liuotettiin kloroformiin. Orgaanista kerrosta pestiin kylläisellä NaHCO₃ – liuoksella ja vedellä, kuivattiin

MgSO₄:lla ja liuotin evaporoitiin pois. Tuotteesta mitattiin ¹H NMR- spektri. Raaka-tuotteen saanto oli 2,42 g.

Eluenttikokeilujen perusteella pylväskromatografiapuhdistuksessa käytettäväksi eluentiksi valittiin dikloorimetaani:metanoli (90:10). Kromatografiapylväs valmistettiin silicageelistä, jonka raekoko oli 0,040–0,063 mm. Tuote imeytettiin pylvääseen ja fraktioita eluoiitiin 25 ml:n koeputkiin. TLC:lla tehdyn tarkastelun jälkeen samaa ainetta sisältävät koeputket yhdisteltiin kolveihin, evaporoitiin ja niistä mitattiin ¹H NMR -spektrit. Spektrien perusteella lupaavimmista fraktioista mitattiin massa-spektrit sekä ¹³C NMR -spektrit. Mittausten perusteella puhdistusta jatkettiin edelleen.

Toisen pylväskromatografisen puhdistuksen eluentiksi valittiin TLC:n perusteella CH₂Cl₂:asetoni:metanoli (48:50:2). Valmistettiin uusi kromatografiapylväs, johon näyte imeytettiin. Fraktiot eluoiitiin 5 ml:n koeputkiin. Fraktioiden yhdistely kolveihin tapahtui TLC:n perusteella. Fraktioista mitattiin ¹H NMR –spektrit, joiden perusteella voitiin todeta, että haluttua tuotetta oli muodostunut. Tuotteen hiiliatomien numerointi esitetään liitteessä 1. ¹H NMR-, ¹³C NMR- ja massaspektrit sekä taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 5.

Valmistetun tuotteen kemialliset siirtymät ja integraalit ovat:

¹H NMR (CDCl₃, 500MHz, ppm): δ 18-CH₃ (0,63 s,3,00); 21-CH₃, 19-CH₃ (0,91, 0,92 d,overl.,s, 6,11); 28-CH₂ (2,18 t,1,81); 30-CH₂ 2,55 (t,2,04); 23-CH_α, 23CH_β (2,01-2,31, m,overl.):25-CH₂, 26-CH₂ (3,38br., 3,90); 35-CH₂, 36-CH₂, 3β-H, 58–3,74 (m, overl., 9,46); 24-CONH, 27-CONH (6,11 br., 1,84); 33-CH 6,62 (AA'BB',2,08); 32-CH 7,06 (AA',BB', 2,08).

MS *m/z* ESI-TOF⁺ 664,57 [M-C₂H₅Cl+H+Na]⁺, C₃₈H₆₀ClN₃O₃Na 664,43; 726,58 [M+Na]⁺, C₄₀H₆₃Cl₂N₃O₃Na, 726,41; 742,53 [M+K]⁺ C₄₀H₆₃Cl₂N₃O₃K, 742,39.

¹³C ja ¹⁵N NMR –siirtymät esitetään liitteessä 5.

Protonispektristä nähdään 18-CH₃- protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvolla δ = 0,63 ja integraali on ~3. 21-CH₃ ja 19-CH₃ protonien signaalit havaitaan kemiallisen siirtymän arvoilla δ = 0,91 ja 0,92 integraalin ollessa ~6.

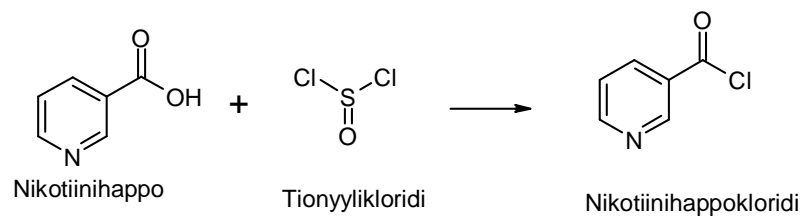
2*35-CH₂, 2*36-CH₂ ja 3β-H – protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvolla δ~3,58–3,74 (m, overl.); integraali ~9,5 (pitäisi olla 9); 3α-OH ei ole esteröitynyt. 27-CONH ja 24-CONH amidiprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvolla δ = 6,11 integraalin ollessa ~2 ja aromaattiset protonit kemiallisen siirtymän arvoilla δ = 6,62 ja 7,06; integraalien ollessa yhteensä ~4 kertovat haluttua tuotetta muodostuneen.

Saanto oli puhdistusten jälkeen 0,91 g (30 % teoreettisesta saannosta).

8.4. N-(N'-pyridiini-3-amidi)etyyli-3α-hydroksi-5β-kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Pyridiini-3-karboksylihappokloridi(n valmistaminen)

Nikotiinihaposta valmistettiin happokloridi refluksoimalla nikotiinihappoa tionyylikloridin kanssa 30 minuutin ajan (kuvio 25) (Kolehmainen ym., 1996).



KUVIO 25. Pyridiini-3-karboksylihappokloridin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996)

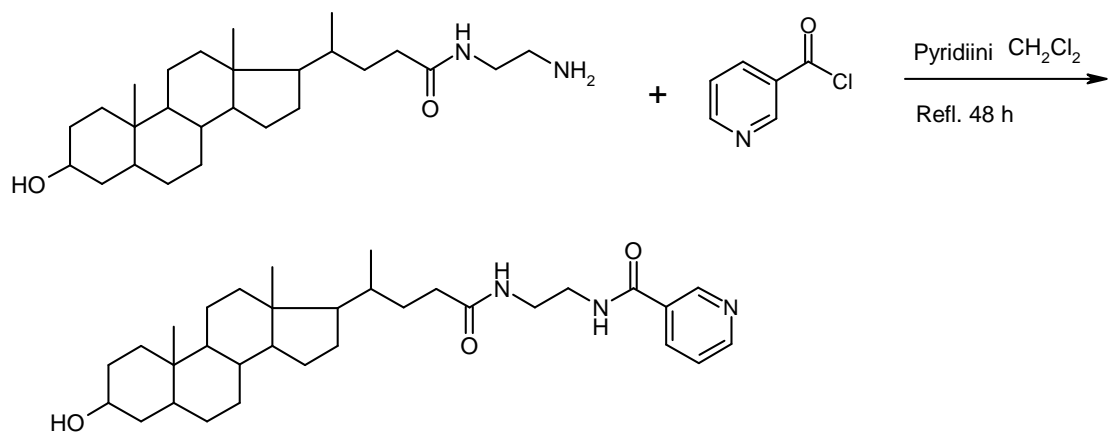
Refluksoinnin jälkeen tionyylikloridi tislattiin pois, lisättiin 50 ml CCl₄:a ja liuotin evaporoitiin alipaineessa. Tuotteesta mitattiin ¹H NMR- spektri. Tuotteen kemialliset siirtymät ja integraalit ovat:

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, ppm): δ e-CH (1,00(s), 7,54); d-CH(0,99(s), 8,41); c-CH₂(1,0(s)8,44); b-CH(1,00(s),9,32)

Verrattaessa tuotteen ¹H NMR -spektriä valproiinihapon spektriin hapon – COOH protonin signaali puuttuu. Tästä voitiin päätellä happokloridin muodostuminen. Saanto oli 0,57 g (95 % teoreettisesta saannosta).

N-(*N'*-pyridiini-3-amidi)etyyli-3α-hydroksi-5β-kolan-24-amidi(n valmistaminen)

Synteesin toisena lähtöaineena käytettiin metylilitokolaatista ja etyleenidiamiinista valmistettua *N*-(2-aminoetyyli)amidia, jonka valmistus on kuvattu luvussa 8.2. Litokoolihapon *N*-(2-aminoetyyli)amidi liuotettiin dikloorimetaaniin ja seokseen lisättiin nikotiinihappokloridia sekä pyridiiniä. Seosta refluksoitiin öljyhauteella 48 tuntia (kuvio 26).



KUVIO 26. *N*-(*N'*-pyridiini-3-amidi)etyyli-3α-hydroksi-5β-kolan-24-amidin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996.)

Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön, minkä jälkeen liuotin evaporoitiin pois. Evaporoitu raakatuote liuotettiin kloroformiin ja orgaanista kerrosta pestiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella ja vedellä. Raakatuote kuivattiin

MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin (Kolehmainen ym., 1996.) Tämän jälkeen siitä mitattiin ¹H NMR- ja massaspektrit, joiden perusteella todettiin raakatuotteen sisältävän halutun tuotteen lisäksi myös reagoimatonta lähtöainetta. Tämän vuoksi tuote päätettiin puhdistaa pylväskromatografisesti. Eluentti etsittiin TLC:n avulla. Eluentiksi valittiin dikloorimetaani:metanoli (90:10). Pylväskromatografiassa käytettiin silicageeliä, jonka raekoko oli 0,040-0,063mm. Näyte imeytettiin pylvääseen ja noin 1 ml:n fraktiot eluoiattiin koeputkiin. TLC:llä tehdyn tarkastelun jälkeen samaa ainetta sisältävät koeputket yhdisteltiin kolveihin, liuotin evaporoitiin ja raakatuotteesta mitattiin ¹H NMR- spektrit. ¹H NMR-, ¹³C NMR- ja massaspektrit sekä taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 6. Tuotteen hiilien numerointi esitetään liitteessä 1.

Spektreistä saadut kemiallisen siirtymän arvot ja integraalit ovat:

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, ppm): δ 18-CH₃ 0,58 (s, 2,98); 21-CH₃, 19-CH₃ 0,89, 0,90 (d, s, 7,0: sis. epäpuhtautta- liuotin?); 23-CH_α 2,25 (m, 1,01); 23-CH_β 2,10 (m, 0,99); MeOH? 3,48 (s); 25-CH₃ 3,53(m, 2,10); 26-CH₂, 3β-H 3,60 (m, 3,02); CH₂Cl₂? 5,29(s); 24-CONH 6,25(br.,1,02);31-CH 7,37(dd,1,03); 27-CONH 7,76 (br.,0,95); 32-CH 8,13 (dt, 1,00); 30-CH 8,72 (d,1,01); 29-CH 9,08 (s, 1,00)

Spektristä nähdään 18-CH₃ -protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvolla δ = 0,58 integraalin ollessa lähellä 3. 21-CH₃ ja 19-CH₃ -protonien signaalit esiintyvät kemiallisen siirtymän arvoilla δ= 0,89 ja 0,90 integraalin ollessa ~7. Tämä kertoo tuotteessa olevan jotain epäpuhtautta. 26-CH₂ ja 3βH- protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla δ= 3,60 integraalin ollessa lähellä 3, kertovat että 3α-OH ei ole esteröitynyt. Myös 24-CONH ja 27-CONH amidiprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 6,25 ja 7,76 integraalien ollessa lähellä 1, kertovat halutun tuotteen muodostumisesta.

MS *m/z* ESI-TOF⁺ 506,32 (<10%); 524,29 [M+H]⁺, C₃₂H₄₉N₃O₃H: 524,39;546,30 [M+Na]⁺, C₃₂H₄₉N₃O₃Na:546,37; 625,43? (<10 %); 1047,59 [2M+H]⁺, C₆₄H₉₈N₆O₆H:1047,76; 1069 [2M+Na]⁺, C₆₄H₉₈N₆O₆Na: 1069,74
Spektrissä havaittavissa myös [3M+H]⁺ ja [3M+Na]⁺ -adduktit, joiden intensiteetit olivat kuitenkin <10 %.

Spektrien perusteella lupaavimmasta fraktiosta mitattiin ^{13}C NMR- spektri. Se osoitti että haluttua tuotetta oli syntynyt. Tuotetta ei kuitenkaan saatu täysin puhtaaksi. Tuotteesta mitattiin edelleen massaspektri, ^{13}C DEPT-135, ^1H , ^{13}C HMBC sekä ^1H , ^{13}C HMQC -spektrit. Saanto oli $< 1\%$ teoreettisesta saannosta.

8.5. *N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)

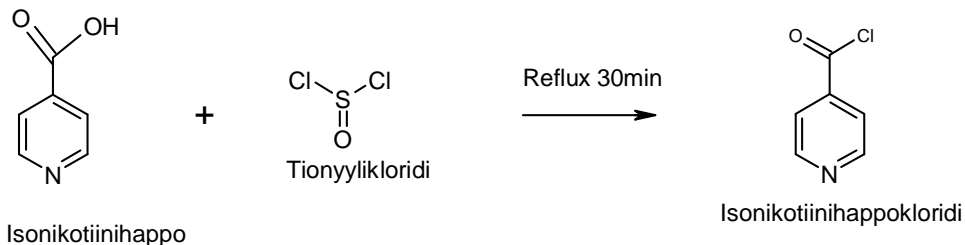
Pyridiini-4-karboksylihappokloridi(n valmistaminen)

Isonikotiinihaposta valmistettiin happokloridi tionyylikloridin avulla (kuvio 27.) (Kolehmainen ym., 1996). Tuotteen puhtaus varmistettiin mittaamalla protonispektri.

Tuotteen kemiallisen siirtymän arvot ja integraalit ovat:

^1H -NMR (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): δ c-CH (2,00 (s), 8,03); b-CH(1,96(s), 8,94)

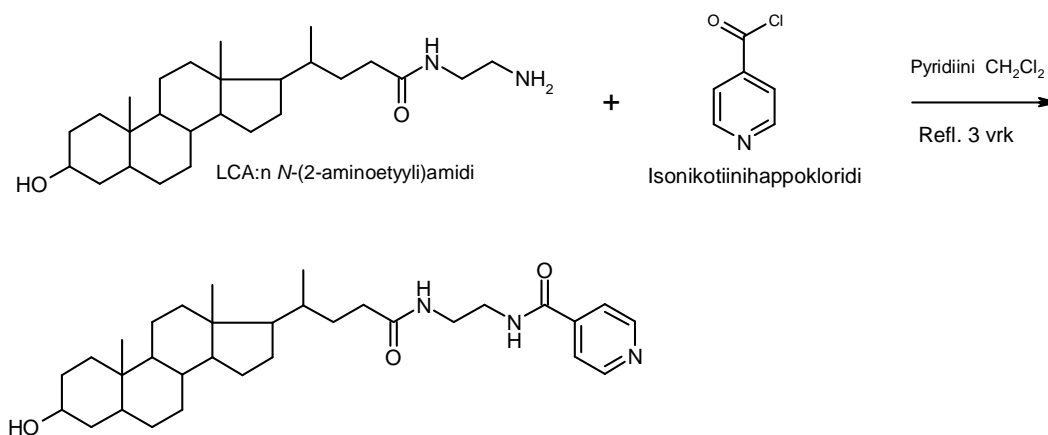
Mallispektriin verrattaessa hapon –COOH protonin signaali puuttuu. Tästä voitiin päätellä happokloridin muodostuminen. Saanto oli 0,57 g (95 % teoreettisesta saannosta).



KUVIO 27. Pyridiini-4-karboksylihappokloridin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996)

***N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi(n valmistaminen)**

N-(2-aminoetyyli)amidi liuotettiin dikloorimetaaniin ja reaktioseokseen lisättiin isonikotiinihappokloridi ja pyridiiniä Seosta refluksoitettiin 48 tuntia. (Kuvio 28) (Kolehmainen ym., 1996.)



KUVIO 28. *N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin valmistaminen (Kolehmainen ym., 1996).

Refluksion aikana reaktiokolvista oli haihtunut liuotin (CH₂Cl₂). Raakatuotteen puhdistusta jatkettiin liuottamalla se kloroformiin ja pesemällä orgaanista kerrosta kylläisellä NaHCO₃-liuoksella ja vedellä. Raakatuote kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. Tämän jälkeen mitattiin ¹H NMR- ja massaspektrit, joiden perusteella todettiin tuotteen sisältävän halutun tuotteen lisäksi sivutuotteena syntyneitä dimeeriä. Koska joukossa oli haluttua tuotetta, päätettiin seos puhdistaa pylväskromatografisesti. Eluentti etsittiin TLC:n avulla. Eluentiksi valittiin dikloorimetaani:metanoli (85:15). Pylväskromatografiassa käytettiin silicageeliä, jonka raekoko oli 0,040 – 0,063 mm. Koeputkien oltua vetokaapissa viikonlopun yli, niistä oli haihtunut liuotin, joten kaikkiin koeputkiin lisättiin eluenttia 200 µl ennen ohutlevykromatografiaa. TLC:n perusteella fraktiot yhdistettiin ja liuotin evaporoitiin ja jäännöksestä mitattiin ¹H NMR -spektri. Koska spektrissä oli liuotinjäämiä, tuotetta kuivattiin vakuumininjassa yön yli ja siitä mitattiin uudelleen ¹H NMR -spektri. Tuotteen hiilien numerointi esitetään liitteessä 1. ¹H, ¹³C NMR ja massaspektrit sekä taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 7.

Tuotteen kemiallisen siirtymän arvot ja integraalit ovat:

^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz, ppm): δ 18- CH_3 0,59 (s, 2,05); 21- CH_3 , 19- CH_3 0,~90 (d, overl.), s, 6,04); 23- CH_α 2,27 (m); 23- CH_β 2,15 (m); ?2,16 (s); 25- CH_2 , 26- CH_2 , 3 β -H~3,49–3,69 (m, (overl.), 4,79); 24-CONH 6,00 (br., 0,83); 29-CH 7,69 (AA'BB', 1,84); 27-CONH~ 7,84 (br., (overl. sis. epäpuhtautta), 1,07); 30-CH 8,75 (AA'BB', 2,00)

MS m/z ESI-TOF⁺: 528,26? ; 546,26[M+Na]⁺, $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$: 546,37; 562,23 [M+K]⁺, $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_3\text{K}$: 562,34; 651,26 ?; 726,26?; 1069,55[2M+Na]⁺, $\text{C}_{64}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_6\text{Na}$: 1069,74; 1085,72 [2M+K]⁺ $\text{C}_{64}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_6\text{K}$: 1085,72; 1174,55 ?

Protonispektristä nähdään 18- CH_3 protonien signaali kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 0,59$ integraalin ollessa ~2. Tästä voidaan päätellä tuotteen olevan epäpuhdasta. 21- CH_3 ja 19- CH_3 protonien signaalit esiintyvät kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta \sim 0,90$ integraalin ollessa ~6. 23- CH_α ja 23- CH_β protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta \sim 2,28$ ja 2,15. 25- CH_2 , 26- CH_2 ja 3 β -H- protonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta \sim 3,49$ –3,69 integraalin ollessa ~5 kertovat, että 3 α -OH ei ole esteröitynyt. 24-CONH ja 27-CONH amidiprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta \sim 6$ ja $\delta \sim 7,84$ integraalien ollessa ~0,8 ja ~1. Spektristä nähdään myös aromaattiset protonit kemiallisen siirtymän arvoilla $\delta = 7,69$ ja 8,75 integraalien ollessa yhteensä 4. Integraalien arvo johtuu siitä, että kyseessä on symmetrinen rakenne.

Tuotteesta mitattiin lisäksi massaspektri sekä ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT-135, ^1H , ^{13}C HMQC ja ^1H , ^{13}C HMBC- spektrit. ^{13}C NMR -siirtymät esitetään liitteessä 7. Saanto oli < 1 % teoreettisesta saannosta. Tuotetta ei saatu täysin puhtaaksi.

9. LOPPUPÄÄTELMÄT

Käytännön osuuden aikana perehdyttiin erilaisten lääkeaineiden liittämiseen sappihappoon siltamolekyylin välityksellä. Työn aikana kokeiltiin erilaisia synteesimenetelmiä ja olosuhteita, jotta reaktiot saatiin tapahtumaan. Työn aikana tutustuttiin myös erilaisiin molekyylien karakterisoinnissa tarvittaviin laitteisiin.

Synteseissä työohjeita muokattiin esim. liuottimien sekä reaktioaikojen ja lämpötilojen osalta. Tämä vaikutti mm. saantoprosenttiin. Joissakin työohjeissa myös lähtöaineita korvattiin toisilla, vähemmän haitallisilla reagensseilla.

Käytännön osuuden aikana saatiin valmistettua viisi potentiaalista aihiolääkemolekyyliä. Nämä ovat:

- *N*-(*N'*-[4-{*p-N''*,*N''*-bis-2-kloori-etyyli}]fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi,
- *N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi,
- 3 α -(2-propyyli)pentoksi-5 β -kolaani-24-karboksylihapon *N*-(2-[*N*-{2-propyyli}pentaani]amidietyyli)amidi,
- *N*-(*N'*-pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi,
- *N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi.

Valmistettujen lääkeainekonjugaattien jatkotutkimukset yhdessä Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen kanssa ovat vireillä.

Edellä nimettyjen molekyylien valmistuksessa ei suurempia ongelmia esiintynyt. Ainoastaan yritys suojata sappihapon 3 α -hydroksyyli-ryhmä asetyylioksiesterinään ei onnistunut. Koska työn tarkoituksena oli saada lääkeaine liitettyä nimenomaan sappihapon sivuketjuun siltamolekyylin välityksellä, yritettiin sappihapon 3 α -hydroksyyli-ryhmä suojata asetyylioksiesterinään. Suojaus kuitenkin purkautui jatkoreaktion (etyleenidiamiinin liittäminen) aikana. Syynä tähän oli mahdollisesti liuottimena käytetty metanoli sekä mahdollisesti asetanihydridisidoksen ja amidisidoksen haluttomuus toimia samassa molekyyli-rakenteessa. Etyleenidiamiinin liittäminen amidisidoksella

C24-karbonyyliin oli kuitenkin onnistunut. Aiemmin litokoolihapon 3 α -OH-ryhmän suojauksessa on käytetty trifluorietikkahappoanhydridiä, joka nyt vaihdettiin vähemmän haitalliseen asetanhydridiin. Mikäli suojaus olisi tehty käyttäen trifluorietikkahappoanhydridiä, suojaus olisi saattanut onnistua.

Sappihapot osoittautuivat mielenkiintoisiksi rakenneosiksi aihiolääkesyntetiikassa.

Käytännön työ osoittautui erittäin mielenkiintoiseksi ja haastavaksi, mutta samalla se oli myös antoisa kokemus. Lisäksi työskentely asiantuntevassa ja innostavassa ohjauksessa teki työskentelystä entistäkin kiinnostavampaa.

LÄHTEET

Dias, J.R., Gao, H., Kolehmainen, E. 2000. ^{13}C nuclear magnetic resonance data of bile acid derivatives. *Spectrochim. Acta A52*, 53–77.

Elonen, E. 1998. Kasvainten kemoterapia. Teoksessa: *Farmakologia ja toksikologia*, 6. painos, Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho, Vammala: Kustannus Oy Duodecim, 931–959.

Fieser, L.T., Rajagopalan, S. 1950. Oxidation of steroids III. Selective oxidations and acylations in the bile acid series. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 5530–5536.

Gates, P.J., Santos, M.D., Gobbo-Neto, L., Carollo, C.A., Crotti, A.E.M., Vessecchi, R., Lopes, N.P. 2006. Mass spectrometry ionization techniques and applications for the analysis of organic compounds; Current methods in medicinal chemistry and biological physics, Research Signpost, Kerala, India.

Gray, H. 1918. *Gray's Anatomy of the Human Body*. 20th edition, USA: Lea & Febiger.

Günther, H. 1998. *NMR spectroscopy*. 2nd edition, England: John Wiley & Sons Ltd.

Haug, E., Sjaastad, O., Öysten, V. 1999. *Ihmisen fysiologia*. Helsinki: WSOY.

Himberg, J.-J. 1998. Vitamiinit. Teoksessa: *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*, 6. painos, Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho, Vammala: Kustannus Oy Duodecim, 755–768.

Järvinen, T., Rautio, J., Niemi, R. 1997. *Aihiolääkkeet*. Duodecim 113, 2564.

Kauppinen, R. 2007. Erikoislaboratoriomestari, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, orgaanisen kemian osasto. Haastattelu 16.4.2007.

- Kivistö, K., Neuvonen, P. 1998. Farmakokinetiikka. Teoksessa: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia, 6. painos, Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho, Vammala: Kustannus Oy Duodecim, 75–94.
- Kolehmainen, E., Tamminen, J., Lappalainen, K., Torkkel, T., Seppälä, R. 1996. Substitued methyl 5 β -cholan24-oates; Part III Synthesis: Synthesis of a novel cholaphane from ethylene glycol diester of lithocholic acid by cyclization with terephthalic acid, Synthesis, 1082–1084.
- Kostiainen, R. 2006. Sähkösumutuksen ja ilmanpaine kemiallisen sumutuksen periaatteet. Luentomateriaali. Helsingin yliopisto.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1993, Principles of biochemistry. 2nd edition, Worth Publishers, USA.
- Li, A., Peters, A., Meredith, L., Allman, G.W., Savage, P.B. 1998. Design and synthesis of potent sensitizers of gram-negative bacteria based on a cholic acid scaffolding. J. Am. Chem. Soc. 120, 2961–2962.
- McGovern, M. 2005. Taking aim at HDL-C. Postgrad. Med. 4, 117.
- McMurry, J. 2003. Fundamentals of organic chemistry 5th edition, Thomson Learning- Brooks/Cole, USA.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., Björqvist, S-E., 1995. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 10 painos. Porvoo: WSOY. 295–320.
- Paakkari, I. 1998. Verisuonia laajentavat lääkkeet. Teoksessa: Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia, 6. painos. Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho. Vammala: Kustannus Oy Duodecim. 531–548.
- Pandey, P.S., Singh R.B. 1997. Synthesis of a head to head cholaphane, Tetrahedron Letters 38, (28): 5045–5046.

Scheinin, M. 1998. Lääkeaineiden vaikutusmekanismit, reseptorit. Teoksessa Farmakologia ja toksikologia 6. painos. Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho. Vammala: Kustannus Oy Duodecim, 27–66.

Sievänen, E. 2005. NMR-spektroskopia. Luentomuistiinpanot, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos.

Simonen, T. 2001. Orgaanisen kemian synteettiset työmenetelmät 3. painos. Helsinki: Opetushallitus.

Siuzdak, G. 2003. Expanding role of mass spectrometry in biotechnology. MCC-Press, USA, 13–20.

Tamminen, J. 1996. Sappihappojen ja niiden johdannaisten lääketieteellinen käyttö. Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, 2–6.

Tamminen, J., Kolehmainen, E., Haapala, M., Linnanto, J. 2000. Bile acid- piperazine diamides: Novel steroidal templates in syntheses of supramolecular hosts: Isomeric pyridine *n*- carboxy containing dimers and a cholaphane. *Synthesis*, 1464–1466.

Tamminen, J., Kolehmainen, E., Haapala, M., Salo, H., Linnanto, J. 2000. Synthesis and ¹³C NMR chemical shift assignments of 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylates of bile acid methyl esters. *ARKIVOC* 1, 1, 80–86.

Tamminen, J., Kolehmainen, E., Linnanto, J., Vainiotalo, P., Vuorikoski, S., Kauppinen, R. 2000. ¹³C, ¹⁵N and ¹¹³Cd NMR and molecular orbital studies of novel bile acid *N*-(2-aminoethyl)amides and their Cd²⁺ complexes. *J.Incl.Phenom. Macrocyclic Chem.* 37, 121–130.

Tolle-Sander, S., Lentz, K.A., Maeda, D.Y., Coop, A., Polli, J.E. 2003. Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate. *Mol. Pharm.* 1, 40–48.

Tuomisto, L. 1998. Epilepsialääkkeet. Teoksessa: Farmakologia ja toksikologia, 6. painos. Toim. O. Pelkonen, H. Ruskoaho. Vammala: Kustannus Oy Duodecim, 435–454.

Turhanen, P. 1997. Esterisidoksen hyväksikäytettävyys aihiolääkeaineissa. Pro gradu - tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos.

Vainiotalo, P. 2006. New ionization techniques in mass spectrometry. Luentomateriaalit, Jyväskylän yliopisto.

Virtanen, E. 2000. Sappihappojen molekyyli-spektroskopia ja mallitus. Pro gradu - tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos.

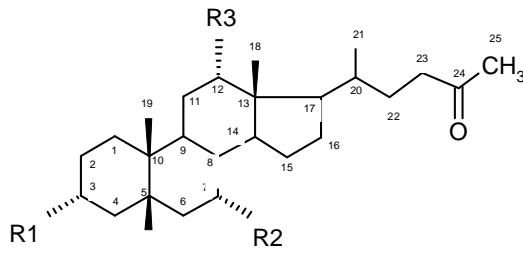
Virtanen, E. Kolehmainen, E. 2004 Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications; *Eur. J. Org. Chem.*, 16, 3385–3399.

Virtanen, E., Tamminen, J., Linnanto, J., Mänttari, P., Vainiotalo, P., Kolehmainen, E. 2002 Synthesis, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , and ^{113}Cd NMR, EST-TOF MS, semiempirical MO (PM3) *ab initio*/HF and Cation/anion binding studies of *N*-deoxycholylyl-L-tryptophan. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 43, 319–327.

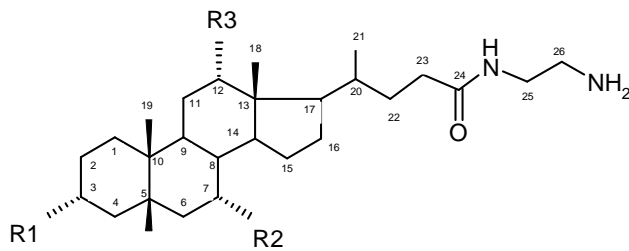
Yang, C., Tirucherai, G.S., Mitra, A.K. 2001. Prodrug based optimal drug delivery via membrane transporter/receptor. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 1, 159–175.

LIIKTEET

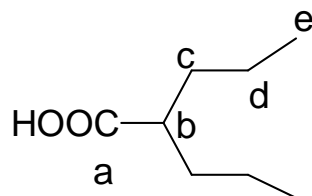
liite 1 Synteesituotteiden hiiliatomien numerointi



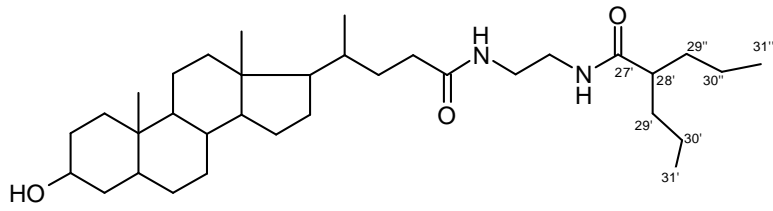
Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatin hiilien numerointi



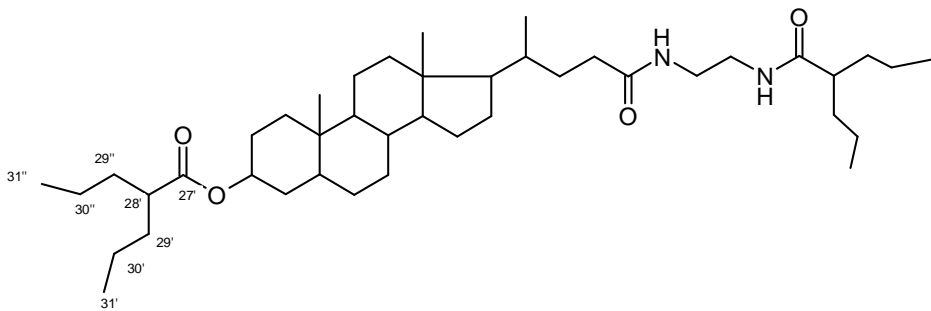
N-(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin hiilien numerointi



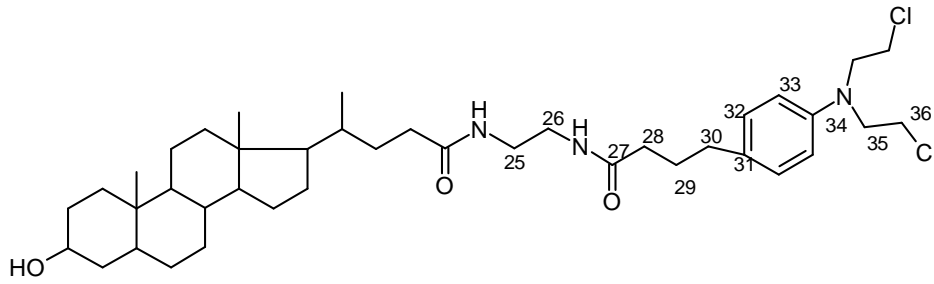
Valproiinihapon hiilien merkitseminen



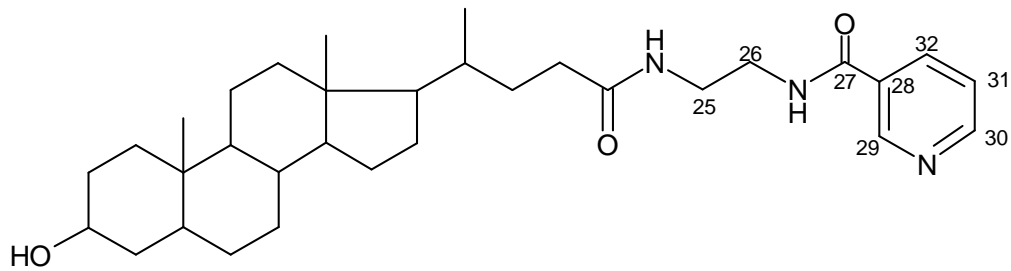
***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin hiilien numerointi**



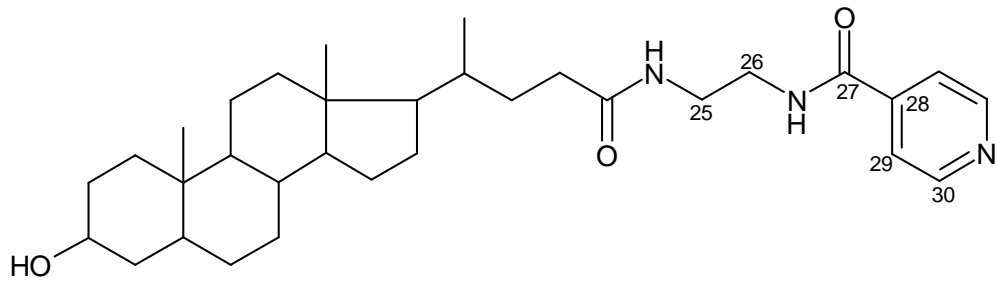
***N*-(*N'*-[2-Propyyli]pentaaniamidi) etyyli-3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24- amidin hiilien numerointi**



***N*-(*N'*-[4-{ *p*-*N''*,*N''*-di-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi) etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin hiilien numerointi**

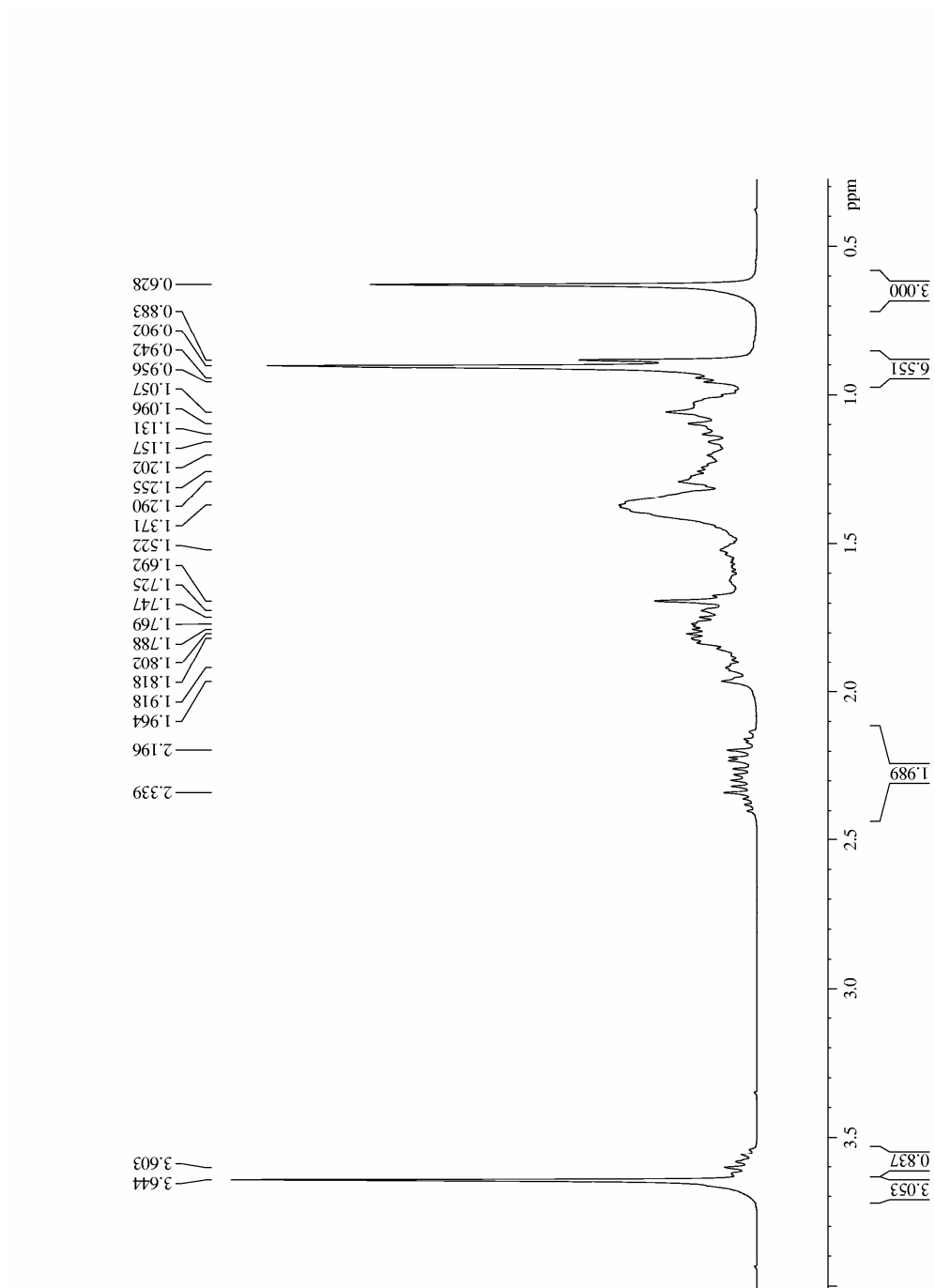


***N*-(*N'*-pyridiini-3-amidi) etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin hiilien numerointi**

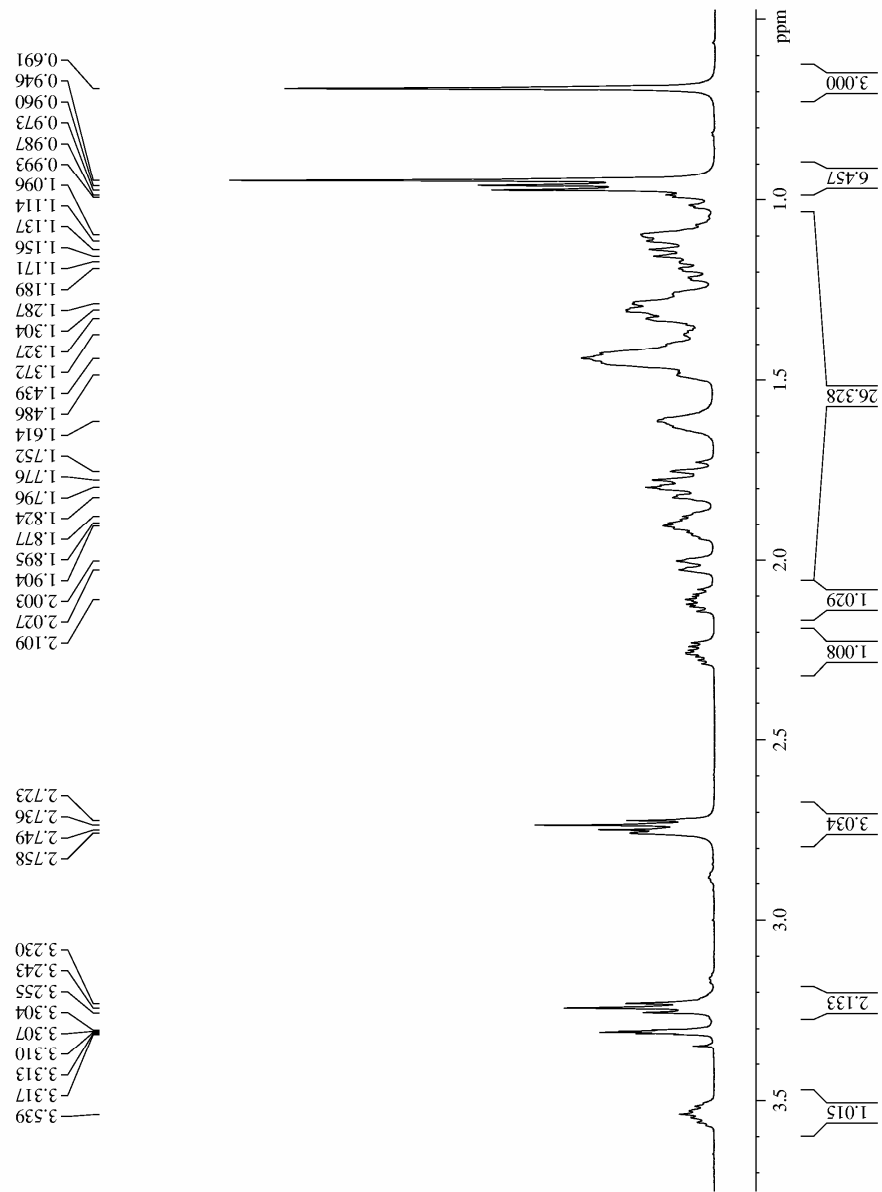


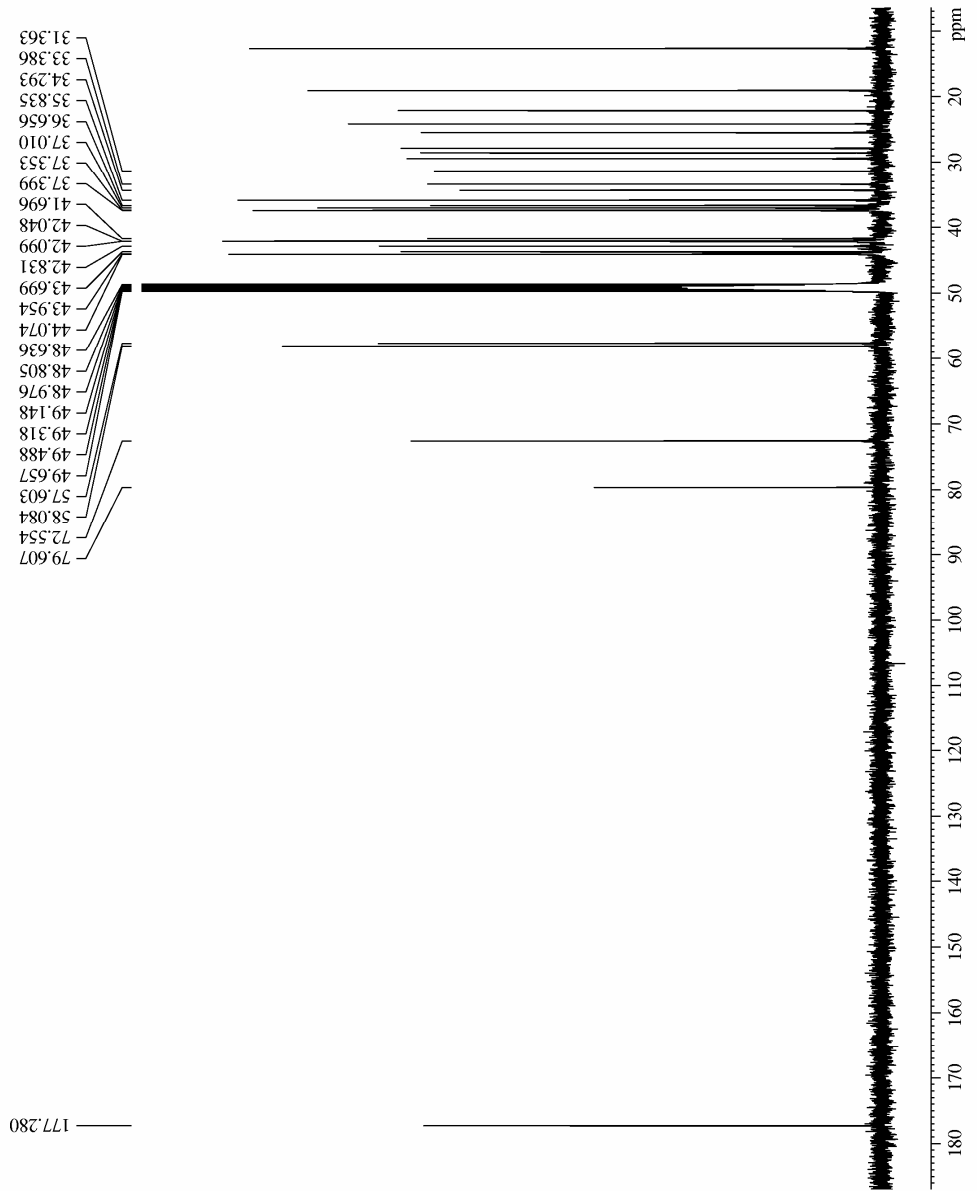
***N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin hiilien numeroin-
ti**

Liite 2

Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaattin ^1H NMR spektri

Liite 3

N-(2-aminoetyyli)3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^1H NMR spektri

***N*-(2-aminoetyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³C NMR -spektri**

***N*-(2-aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR ja ^{15}N NMR -siirtymät**

^{13}C NMR (CD₃OD, 500 MHz, ppm)

C	δ (ppm)	δ ppm) ^a
1	36,66	36,52
2	31,36	31,22
3	72,55	72,37
4	37,35	37,20
5	43,70	43,53
6	28,52	28,38
7	27,81	27,67
8	37,39	37,23
9	42,05	41,88
10	35,84	35,68
11	22,11	21,97
12	41,69	41,54
13	44,07	43,91
14	58,08	57,91
15	25,42	25,29
16	29,40	29,26
17	57,60	57,43
18	12,67	12,57
19	24,11	24,01
20	37,01	36,86
21	19,05	18,94
22	33,39	34,15
23	34,29	33,26
24	177,28	176,98
25	42,83	43,02
26	42,10	42,03

^a Tamminen et al mukaan

^{15}N NMR

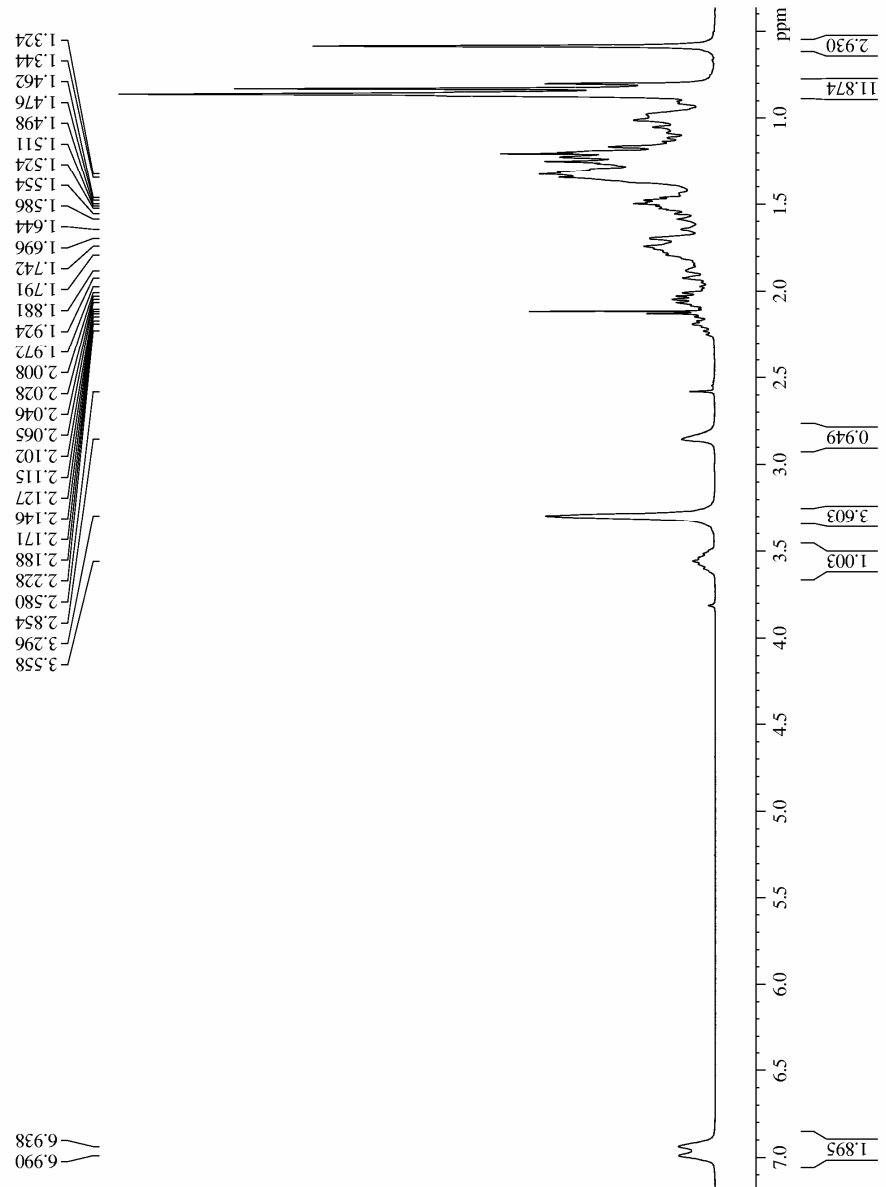
(CD₃OD, 50MHz, ppm from ext. CH₃NO₂)

N	δ (ppm)	δ ppm) ^a
24CONH	- 265,6	-268,0
26NH ₂	-364,7	-362,0

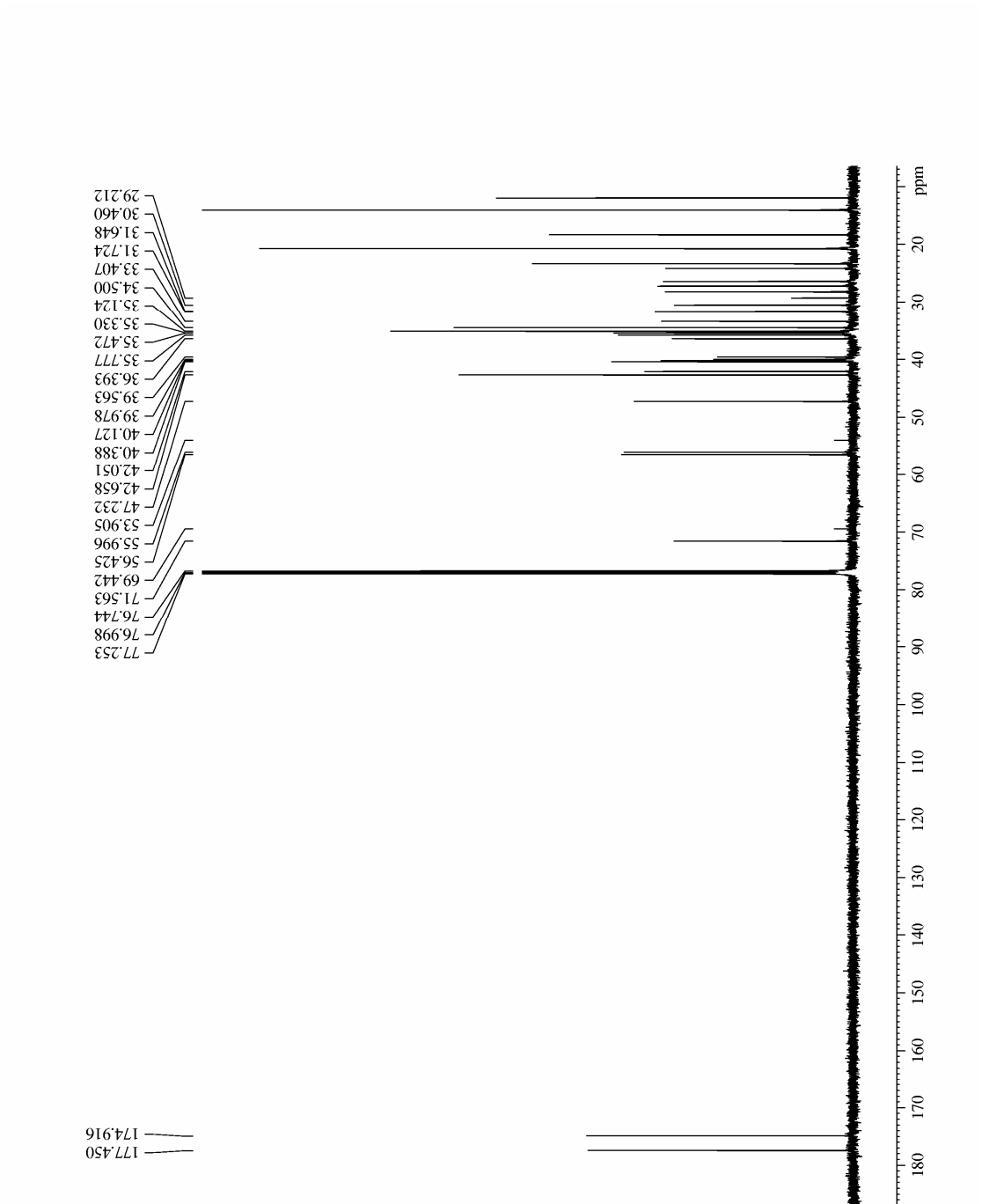
^a Tamminen et al. mukaan (measured in CDCl₃)

Liite 4

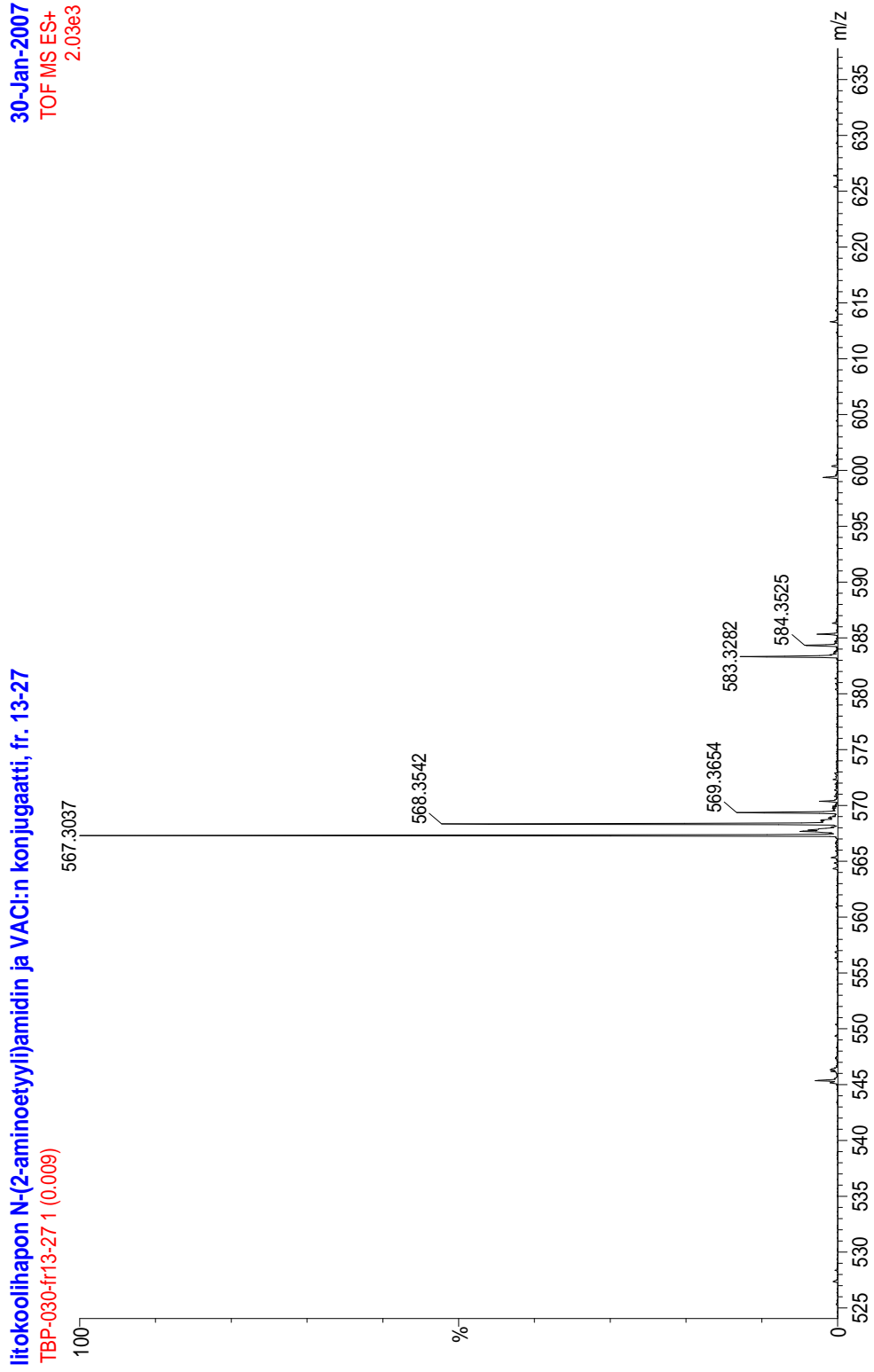
N-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^1H
NMR -spektri



N-(*N'*-[2-propyyli]pentaanimidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^{13}C
NMR -spektri



***N*-(*N*'-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, massa-
spektri**



***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³C**

NMR ja ¹⁵N NMR -siirtymät

¹³C NMR (CDCl₃, 500MHz, ppm)

1	35,13
2	30,46
3	71,56
4	35,33
5	42,05
6	27,14
7	26,36
8	35,77
9	40,38
10	34,50
11	20,74 ^a
12	40,13
13	42,66
14	56,43
15	24,12
16	28,15
17	56,00
18	11,96
19	23,31
20	35,48
21	18,33
22	31,72
23	33,41
24	174,92
25	39,56
26	39,98
27	177,45
28	47,23
29	36,39
30	20,63 ^a
31	14,05

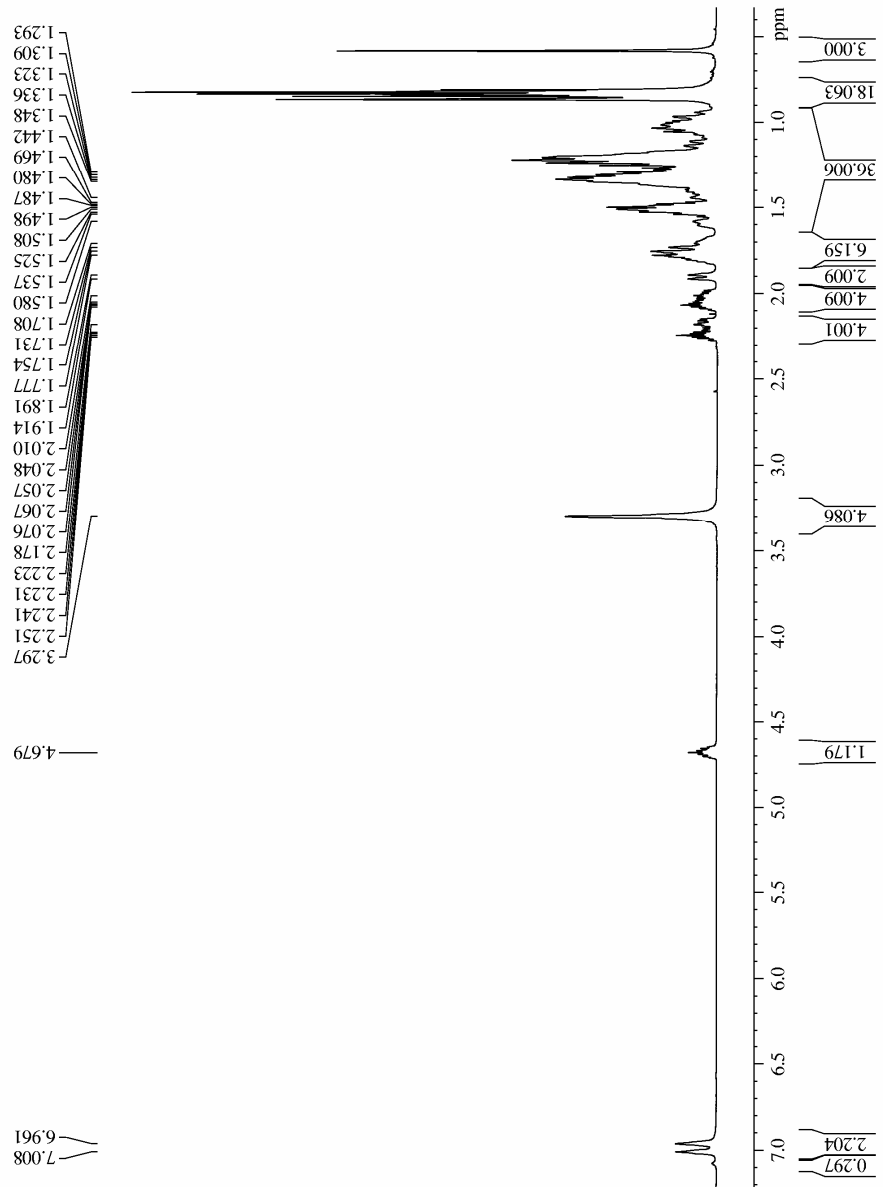
^a Voivat olla myös toisin päin

¹⁵N NMR

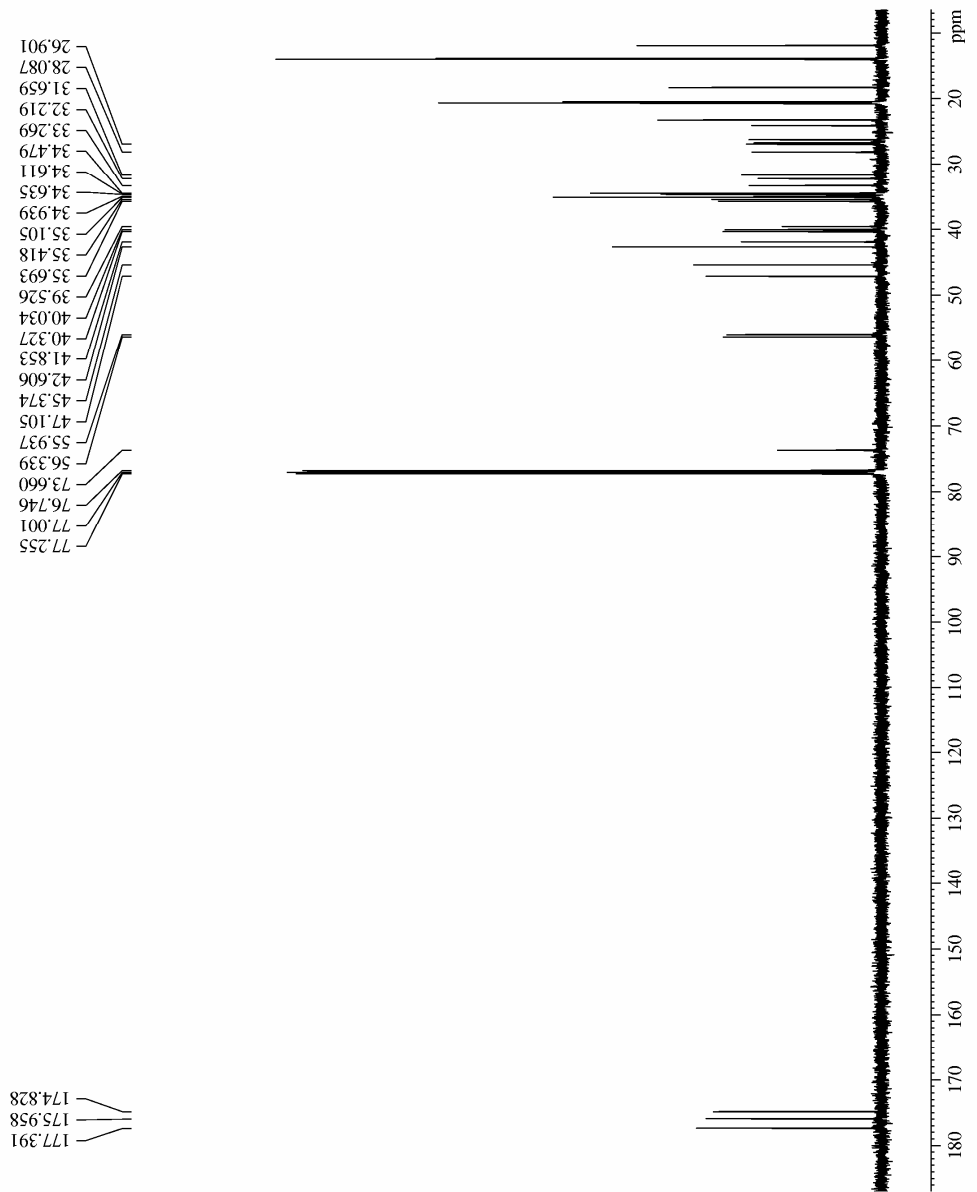
¹H, ¹⁵N HMBC (CDCl₃, 50MHz, ppm from ext. CH₃NO₂)

N	δ (ppm)	J _{N,H} (Hz)
24CONH	- 266,6	91,2
27CONH	-265,0	92,2

N-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyyli)pentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -spektri



***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi. ^{13}C NMR -spektri**

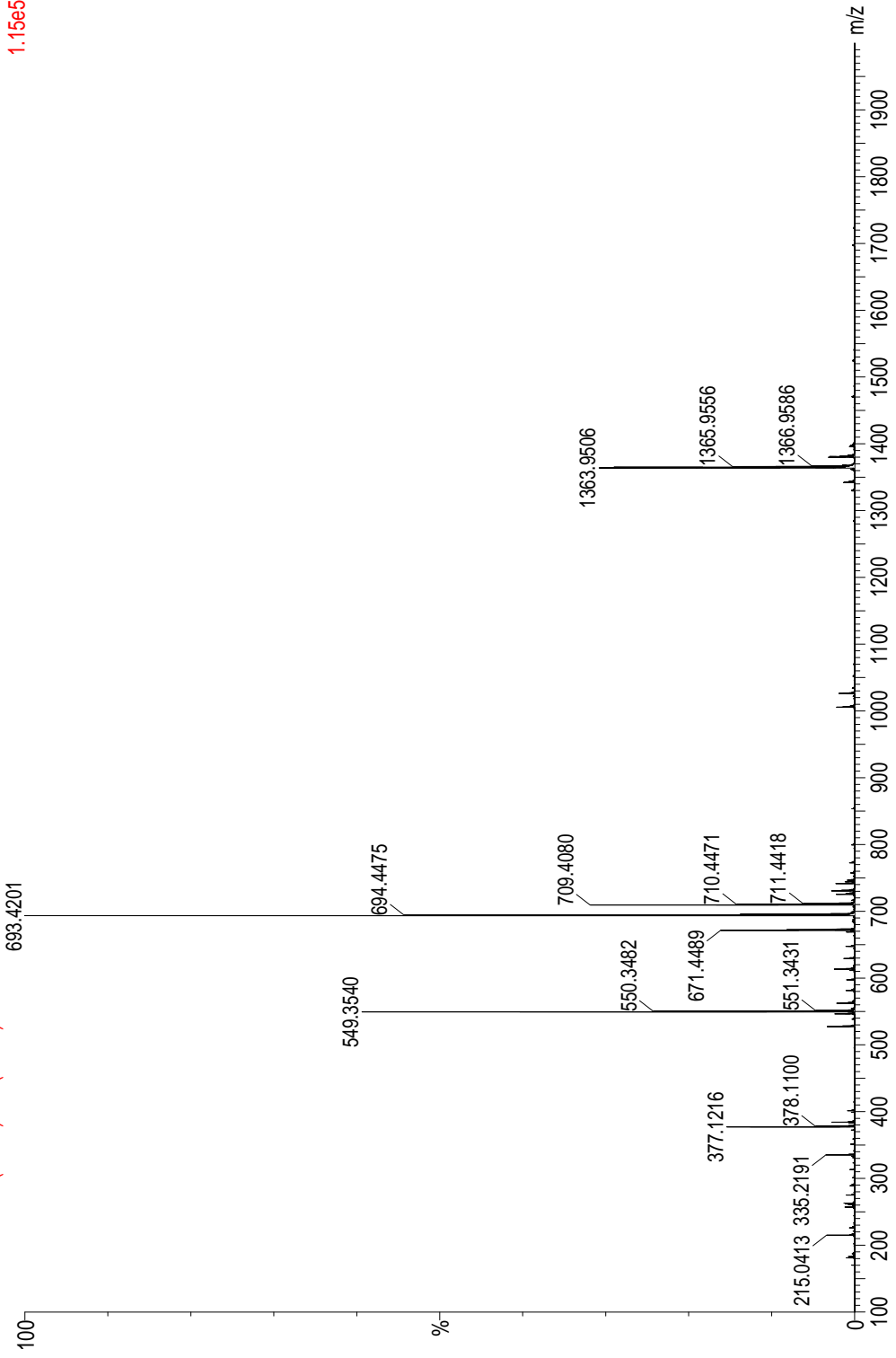


***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyyli)pentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidi. Massaspektri**

30-Jan-2007
TOF MS ES+
1.15e5

litokoolihapon N-(2-aminoetyyli)amidin ja VACI:n konjugaatti, fr. 23-37

TBP-030-fr23-37 167 (1.670) Cm (5:187)



***N*-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli 3 α -(2-propyylipentyylioksi)-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C ja ^{15}N siirtymät**

^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, ppm)

C	δ (ppm)
1	34,94
2	26,69
3	73,66
4	32,22
5	41,86
6	26,90
7	26,22
8	35,96
9	40,33
10	34,48
11	20,73
12	39,53
13	42,61
14	56,34
15	24,05
16	28,09
17	55,94
18	11,90
19	23,21
20	35,42
21	18,26
22	31,66
23	33,27
24	174,83
25	40,01 ^a
26	40,04 ^a
27	175,96
28	47,11
29	34,94
30	20,63
31	14,05 ^b
27'	177,39
28'	45,37
29',29''	34,62, 34,64
30',30''	20,46, 20,47
31',31''	13,99 ^b , 13,98 ^b

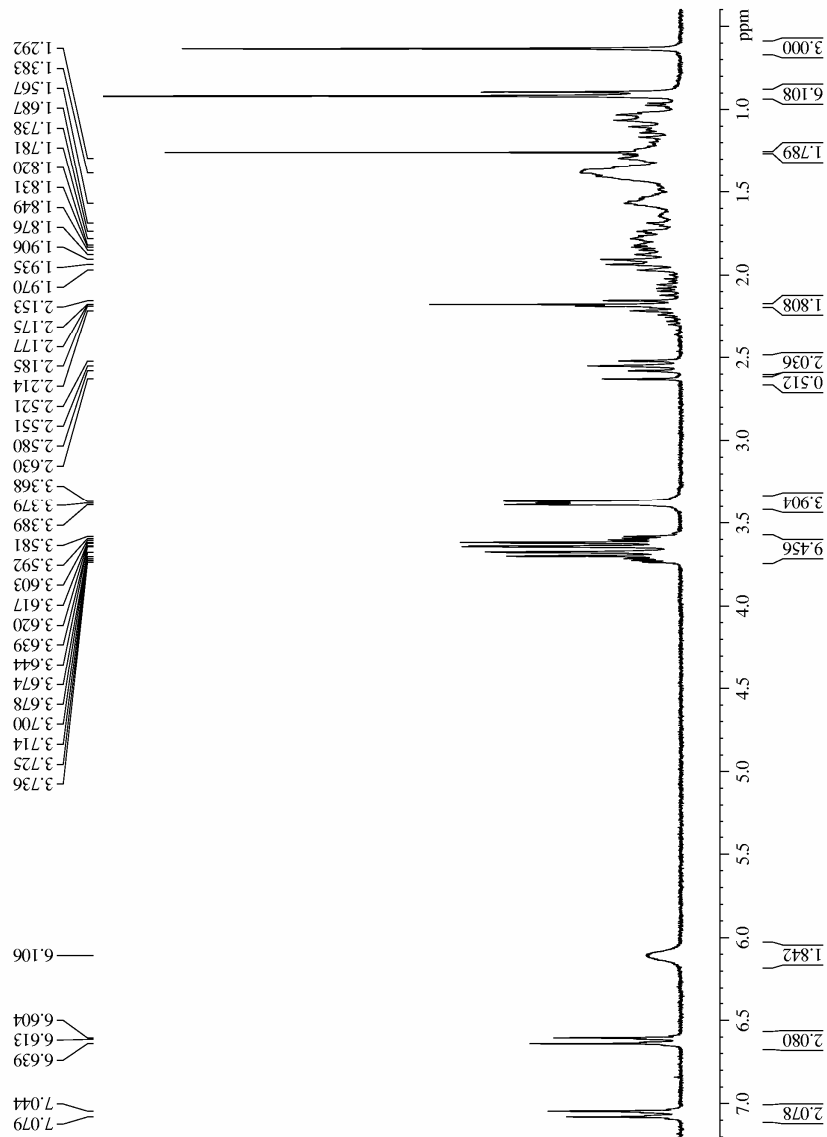
^{a,b} voivat olla myös toisin päin

^1H , ^{15}N NMR (CDCl_3 , 50 MHz, ppm from ext. CH_3NO_2)

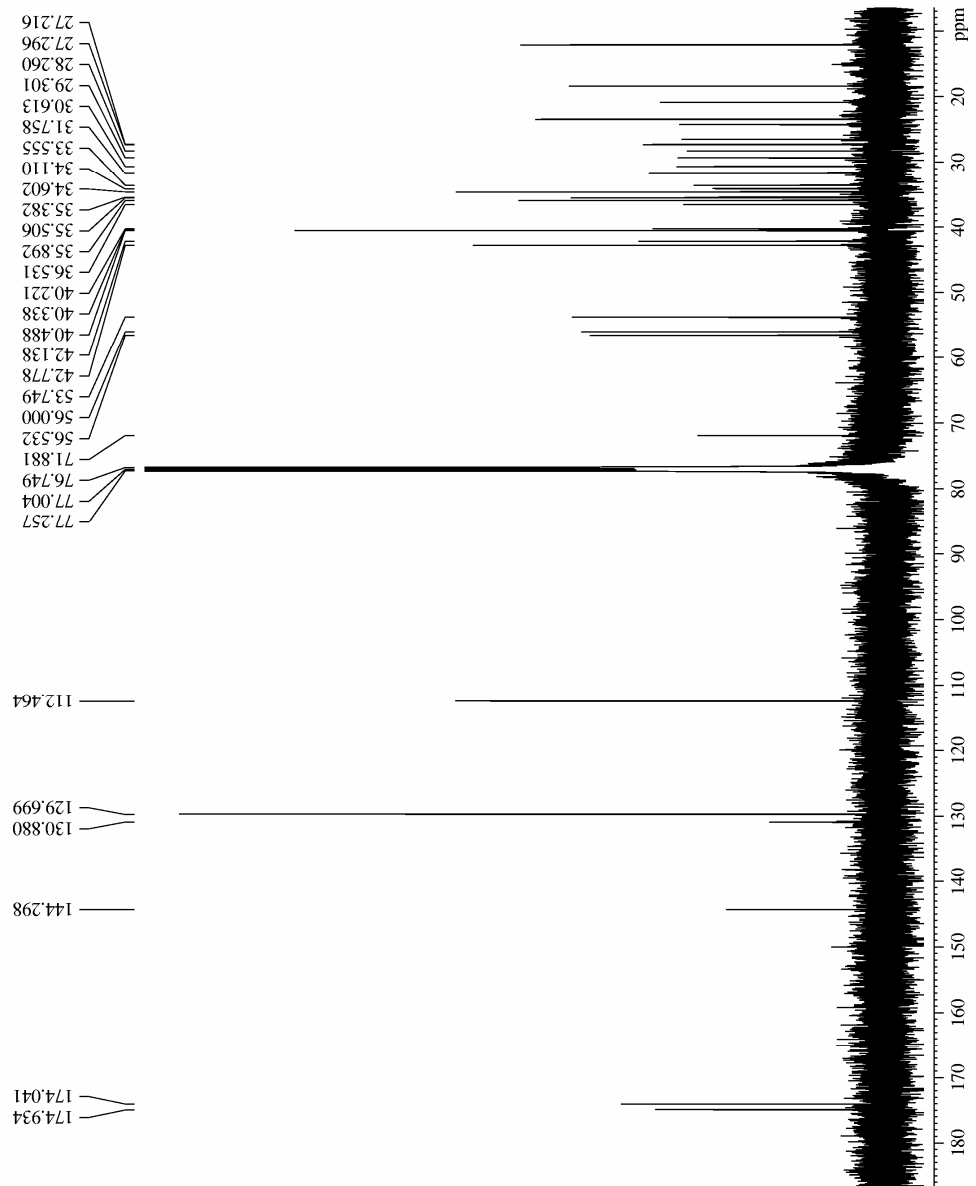
N	δ (ppm)	$^1\text{J}_{\text{N,H}}$ (Hz)
24CONH	-266,6	91,1
27CONH	-264,9	91,6

Liite 5

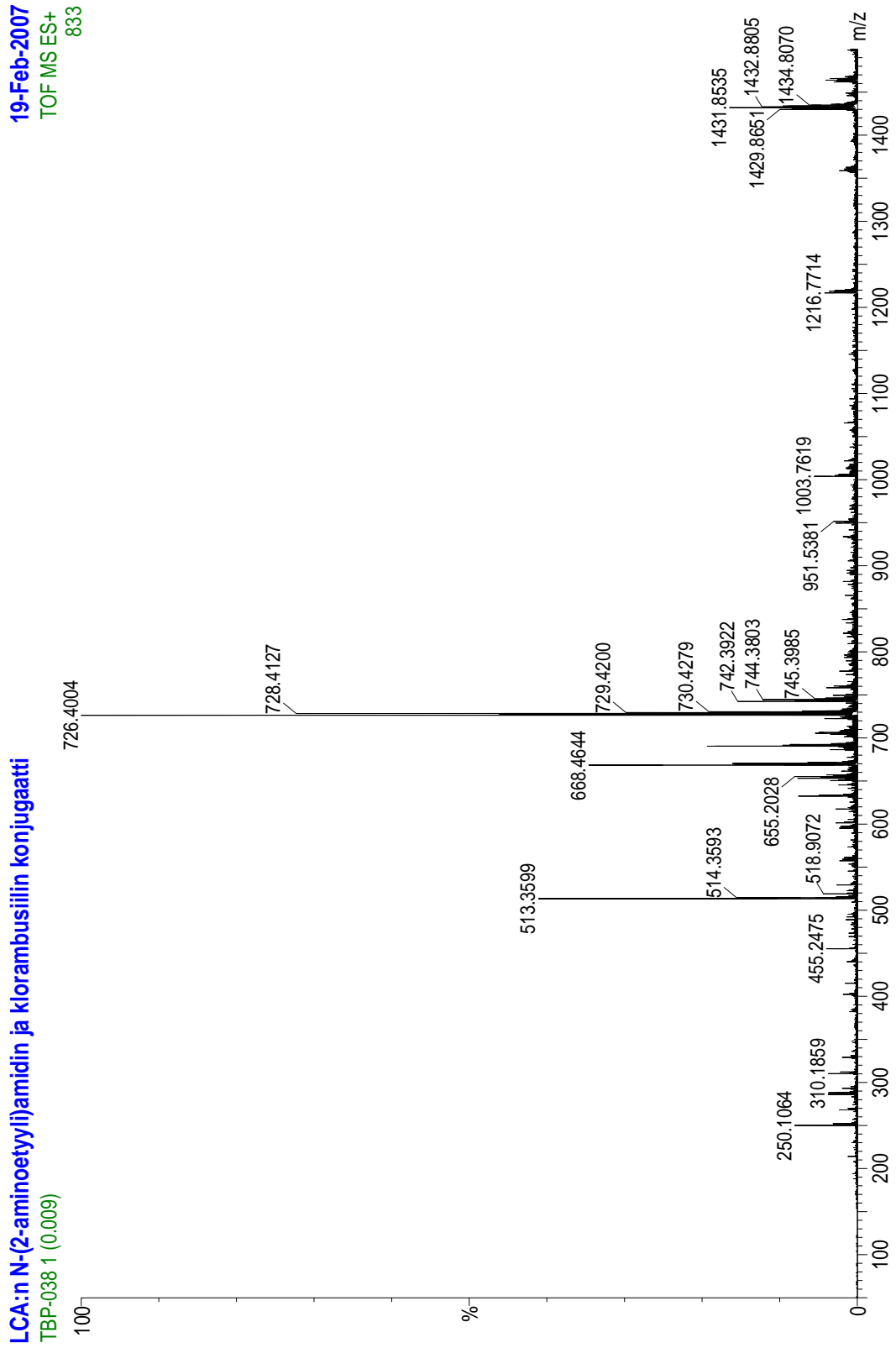
N-(*N'*-[4-{*p*-*N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -spektri



N-(*N'*-[4-{*p*-*N''*,*N''*-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^{13}C NMR -spektri



N-(*N'*-[4-{*p*-*N''*,*N''*'-bis-2-kloorietyyli]fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi. Massaspektri



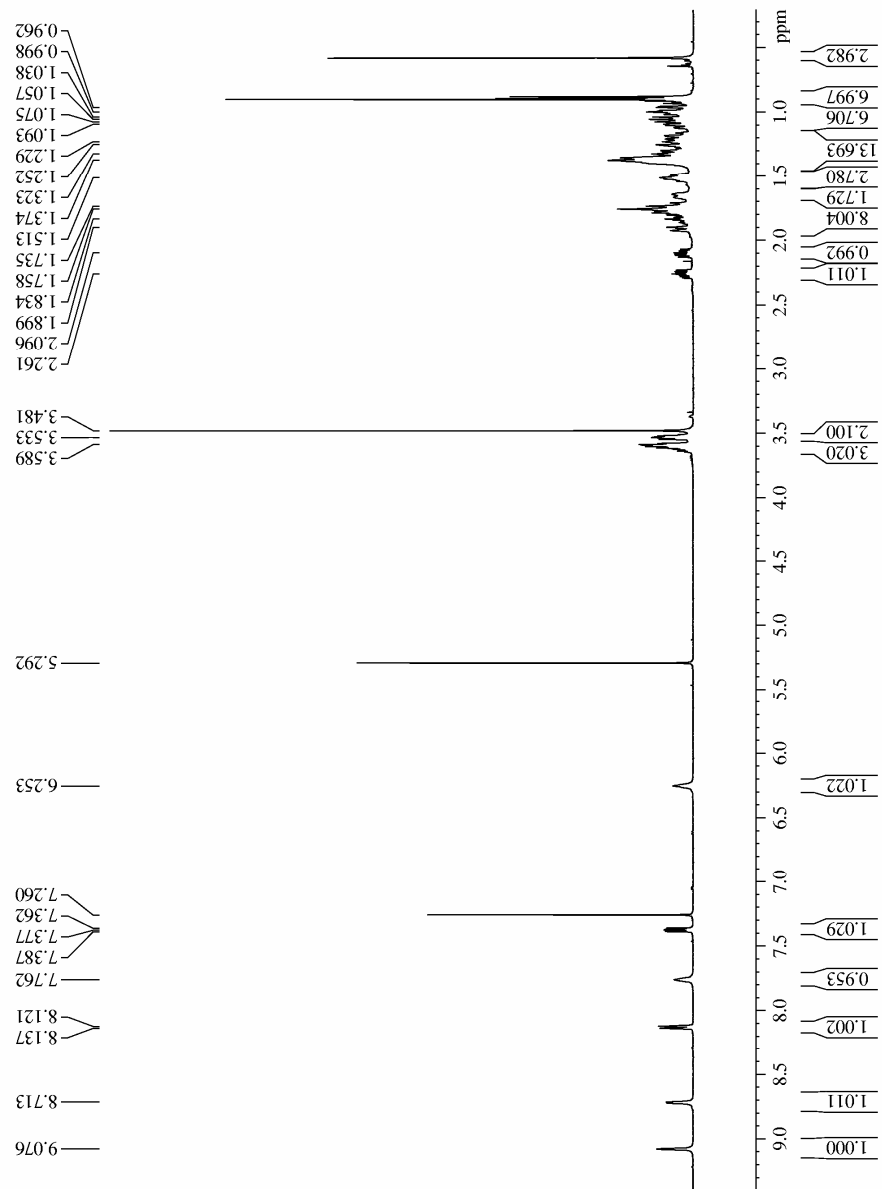
***N*-(*N'*-[4-{*p*-*N''*,*N''*- bis-2-kloorietyyli]fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³C NMR-siirtymät**

¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz, ppm)

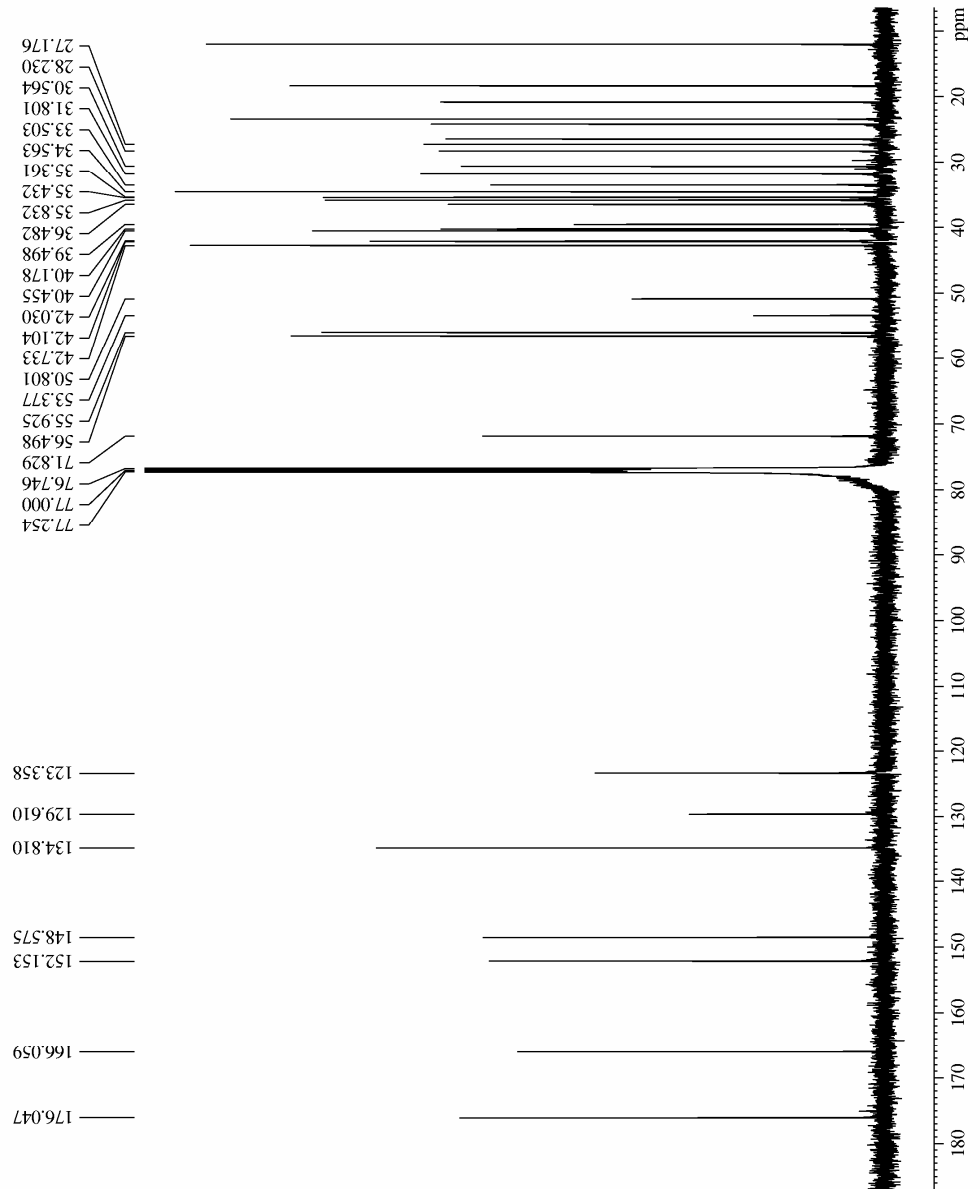
C	δ ppm
1	35,38
2	30,61
3	71,89
4	36,53
5	42,14
6	27,22
7	26,45
8	35,89
9	40,41
10	34,60
11	20,85
12	39,90*
13	42,78
14	56,53
15	24,23
16	28,26
17	56,00
18	12,08
19	23,34
20	35,51
21	18,39
22	31,76
23	33,56
24	174,94
25	39,98*
26	40,15*
27	174,04
28	35,91
29	27,30
30	34,11
31	130,88
32	129,70
33	112,46
34	144,30
35	53,75
36	40,50

* voivat olla myös toisin päin

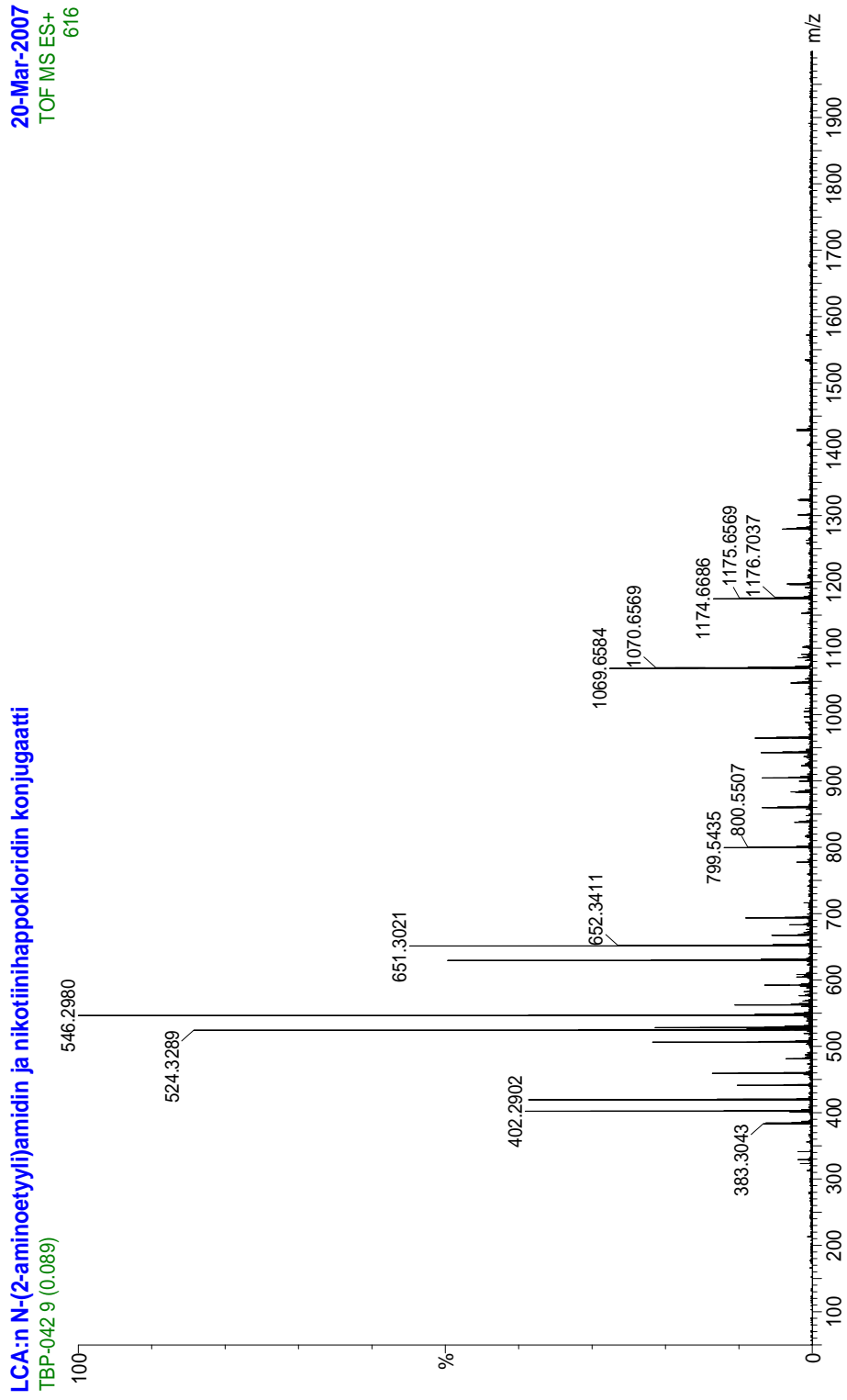
Liite 6

N-(*N'*-pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -spektri

**N-(N'-pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ^{13}C NMR -
spektri**



N-(*N*'-pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin massaspektri



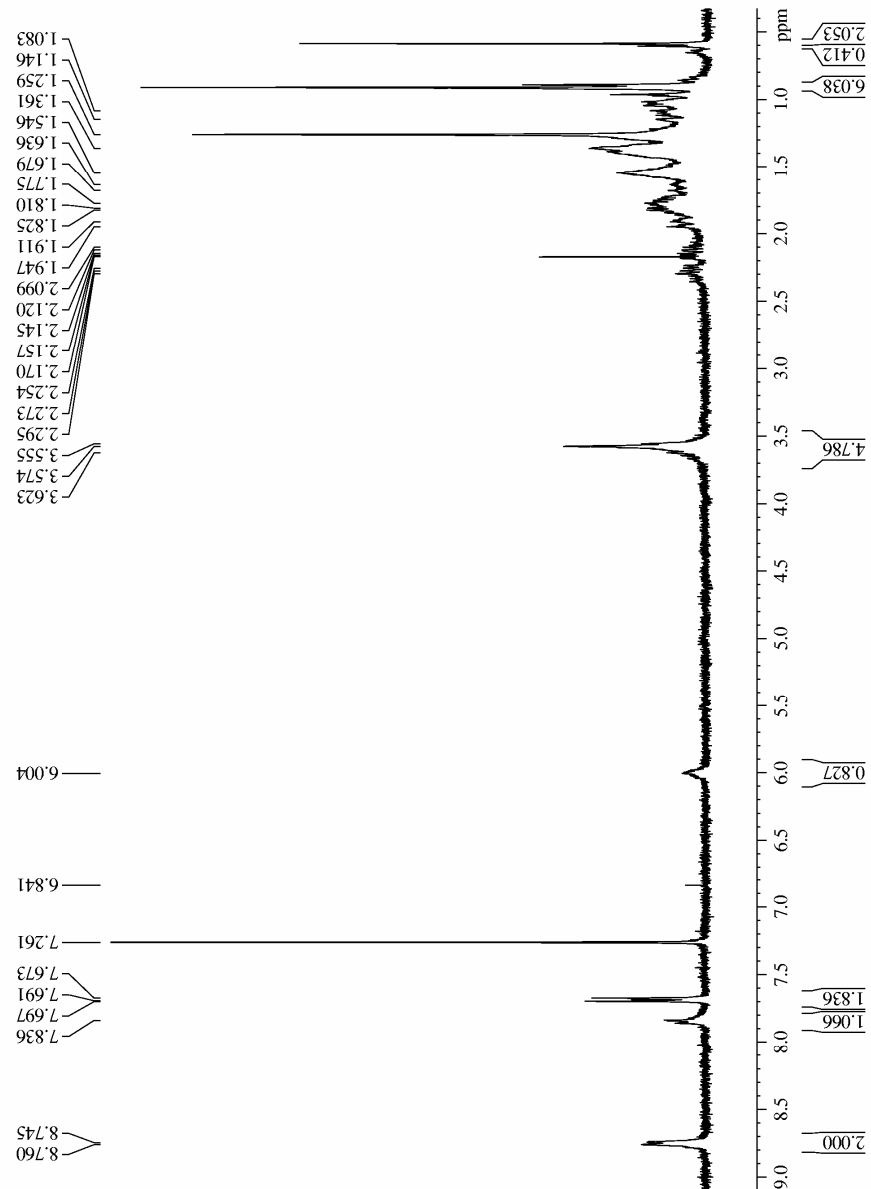
***N*-(*N'*-[pyridiini-3-amidi]etyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³C NMR –
siirtymät**

¹³C NMR (CDCl₃, 500MHz, ppm)

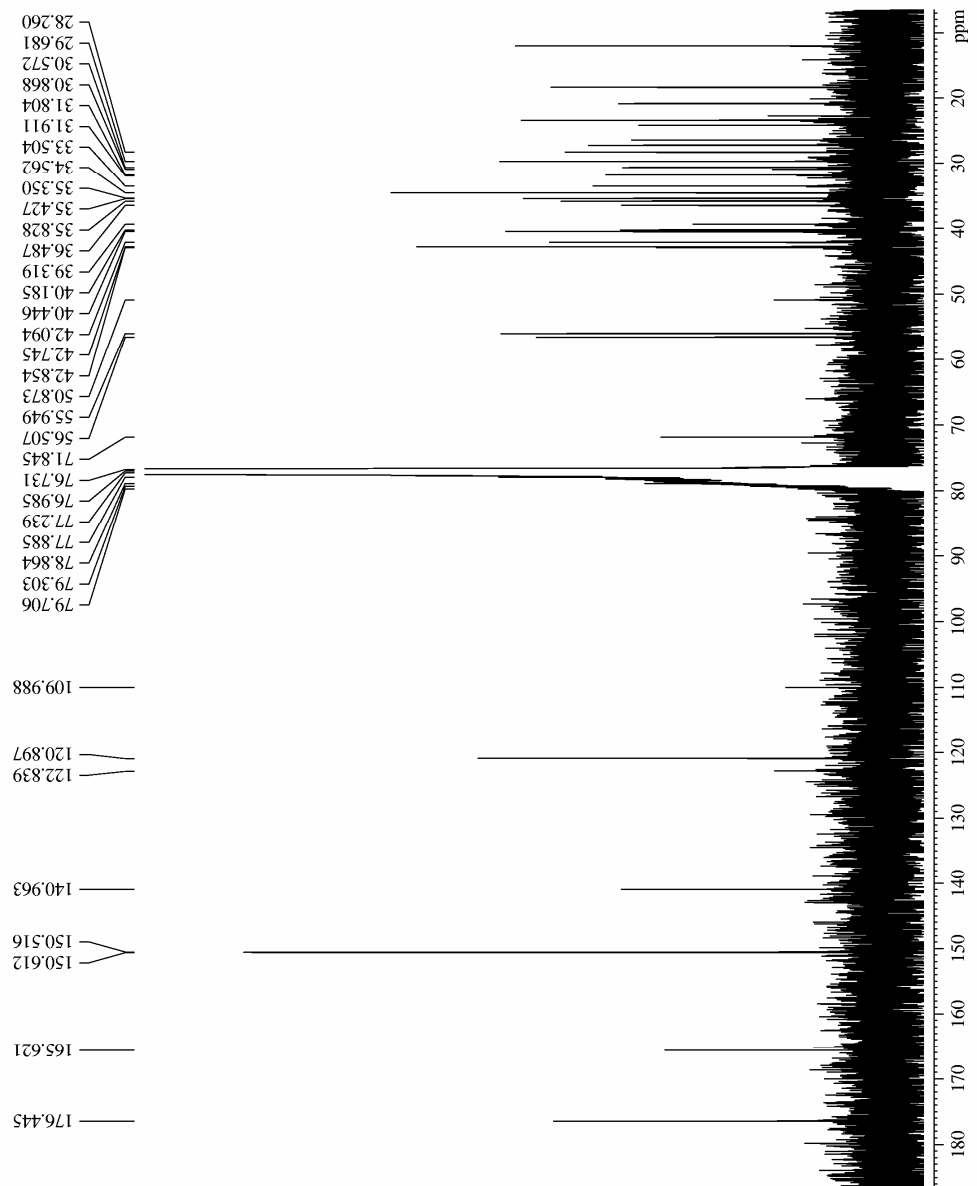
C	δ (ppm)
1	35,35
2	30,57
3	71,84
4	36,48
5	42,10
6	27,17
7	26,39
8	35,83
9	40,44
10	34,56
11	20,80
12	40,17
13	42,73
14	56,49
15	24,14
16	28,24
17	55,92
18	11,99
19	23,34
20	35,43
21	18,33
22	31,79
23	33,51
24	176,05
25	39,50
26	42,21
27	166,06
28	129,61
29	148,60
30	152,19
31	123,35
32	134,74

Liite 7

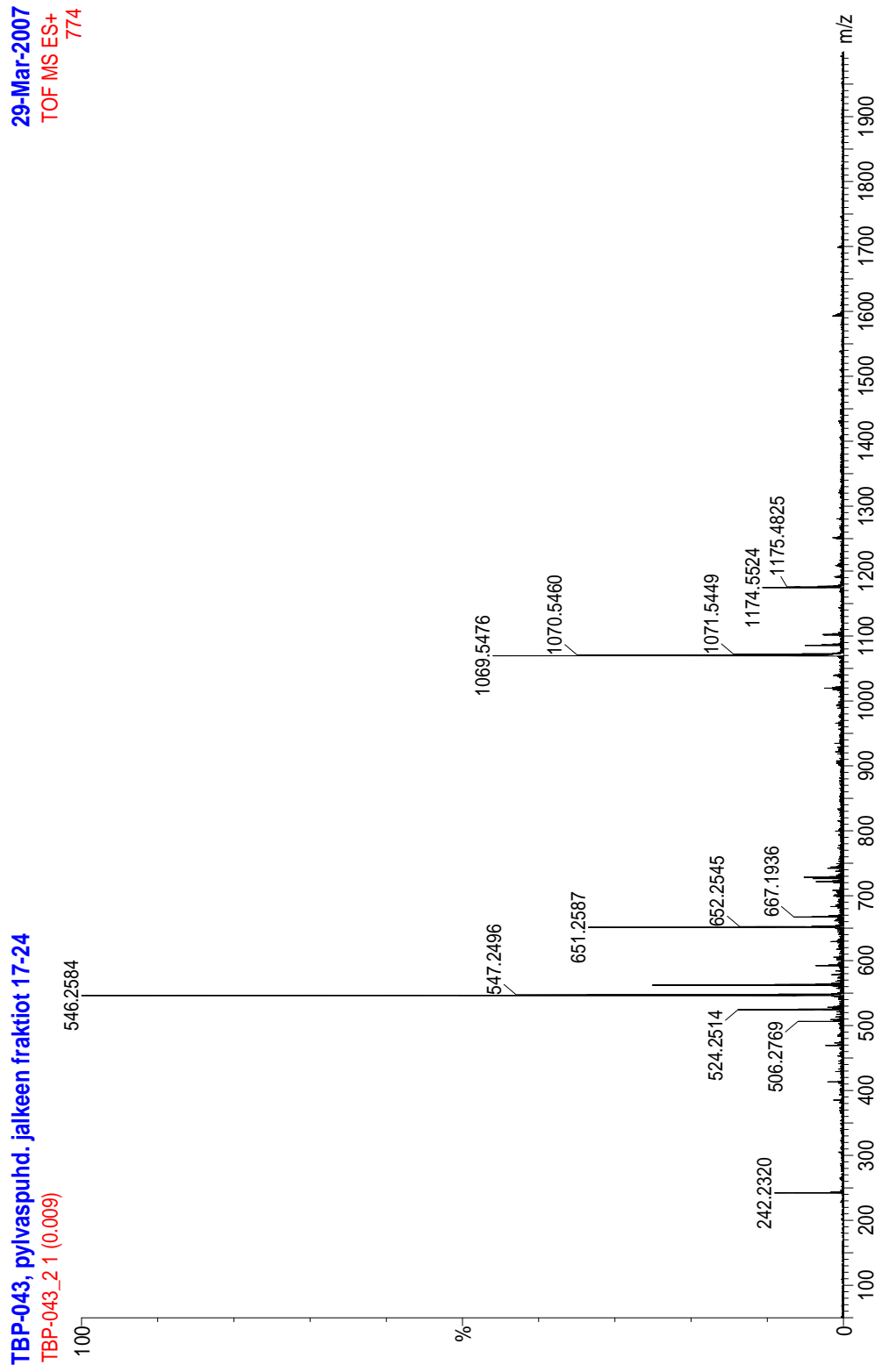
N-(*N*'-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^1H NMR -
spektri



N-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, ^{13}C NMR -
spektri



N-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi, massaspektri



N-(*N'*-[pyridiini-4-amidi]etyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidin ¹³C NMR siirtymät (CDCl₃, 500MHz, ppm)

C	δ ppm
1	35,35
2	30,57
3	71,85
4	36,49
5	42,09
6	27,17
7	26,39
8	35,83
9	40,44
10	34,56
11	20,81
12	40,19
13	42,75
14	56,51
15	24,13
16	28,26
17	55,95
18	12,00
19	23,34
20	35,43
21	18,33
22	31,81
23	33,50
24	176,45
25	39,32
26	42,86
27	165,62
28	140,96
29	120,90
30	150,62
?	29,69

Liite 8

SYNTEESIOHJEET

Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti

100 ml kolviin punnittiin 6,0 g (15,59 mmol) litokoolihappoa. Kolviin lisättiin 50 ml metanolia sekä 1,2 ml (32,64 mmol) väkevää suolahappoa. Reaktioseosta refluksoitiin öljyhauteella CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla n. 20 min ajan, jäähdytettiin ensin huoneen lämpöön ja kiteytettiin sitten pakastimessa -20 °C:ssä 1,5 h ajan. Tämän jälkeen kiteet suodatettiin sintterin ja imupullon avulla ja saatua tuotetta kuivattiin vakuuminlinjassa yön yli. Puhtaus varmistettiin ¹H NMR -mittauksella.

Saanto oli 5,52 g (89 % teoreettisesta saannosta). Steroidirungon numerointi on esitetty liitteessä 1. ¹H NMR -spektri liitteessä 2.

N-(2-aminoetyyli) -3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi

Synteesi suoritettiin 250 ml kolvissa. Reaktiokolviin lisättiin 2,5 g (6,47 mmol) metyyliitokolaattia liuotettuna metanoliin (V = 30 ml). 19,5 g (324,45 mmol) etyleenidiamiinia liuotettuna metanoliin (V = 70 ml) lisättiin reaktiokolviin ja seosta refluksoitiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 h. Refluksoinnin jälkeen seoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Raakatuote liuotettiin CHCl₃:iin (V = 30 ml) ja orgaanista kerrosta pestiin 2*10 ml CHCl₃. Sakka imettiin sintterin ja imupullon avulla kuivaksi. Koska tuotetta jäi liuottimeen, suodos siirrettiin dekantterilasiin ja suodosta pestiin 4*20 ml vettä. Tuote saostui vedestä. Sakka suodatettiin ja kuivattiin sintterin avulla. Kiteitä kuivattiin vakuuminlinjassa yön yli. Puhtaus varmistettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Saanto oli 2,53 g (94 % teoreettisesta saannosta). Molekyylin hiilien numerointi on esitetty liitteessä 1. ¹H ja ¹³C NMR -spektrit liitteenä 3.

2-Propyylipentaanihappoklorid

Tionyylikloridi tislattiin ennen synteessin aloittamista. 0,92 g (6,38 mmol) valproiinihappoa liuotettiin 10 ml:aan (137,09 mmol) vastatislattua tionyylikloridia ja seosta refluksoitettiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 30 min ajan. Tionyylikloridi tislattiin pois ja tuotteeseen lisättiin 50 ml CCl₄. Liuotin evaporoitiin pyöröhaihduttimella. Saanto 0,98 g (95 % teoreettisesta saannosta) Tuotteesta mitattiin ¹H NMR -spektri. Valproiinihapon hiilien numerointi esitetty liitteessä 1

N-(*N'*-[2-propyyli]pentaaniamidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi

2,43 g (5,50 mmol) LCA:n *N*-(2-aminoetyyli)amidia liuotettiin CH₂Cl₂:iin (V = 50 ml), lisättiin 0,98 g (6,02 mmol) valproiinihappokloridia ja 0,5 g (6,32 mmol) pyridiiniä ja seosta refluksoitettiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 tuntia. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä huoneen lämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Raakatuote liuotettiin kloroformiin ja orgaanista kerrosta pestiin 3*40 ml kylläistä NaHCO₃ -liuosta ja 1*40 ml vettä, kuivattiin MgSO₄:llä, suodatettiin, evaporoitiin ja kuivattiin vakuumininjassa yön yli. Pylväskromatografiapuhdistuksessa eluenttina käytettiin CH₂Cl₂:asetoni 80: 20 ja 40: 60 -seoksia. Puhdistuksen jälkeen tuotteista mitattiin ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N NMR ja massaspektrit, joiden perusteella haluttua tuotetta todettiin muodostuneen. Spektrit esitetään liitteenä 4. Saanto oli 0,53 g (17 % teoreettisesta saannosta.) Tuotteiden hiilien numerointi on esitetty liitteessä 1.

Metyyli 3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-oaatti

100 ml kolviin punnittiin 3,05 g (7,80 mmol) metyyllitokolaattia. Lisättiin 21,6 g (199,70 mmol) tislattua asetanhydridiä sekä 4 tippaa väkevää rikkihappoa. Refluksoitiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 20 tunnin ajan. Refluksoinnin jälkeen raakatuotetta jäähdytettiin jäähauteessa ja kaadettiin eetterijääseokseen (120 ml: 30 g). Orgaanista kerrosta pestiin 1*60 ml vettä ja kylläistä NaHCO₃-liuosta, kunnes vesifaasin pH oli emäksinen. Eetterikerrosta pestiin 60 ml:lla kylläistä NaCl-liuosta, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. Saanto oli 1,62 g (48 % teoreettisesta saannosta).

***N*-(aminoetyyli)-3 α -asetyylioksi-5 β -kolan-24-amidi**

250 ml kolviin punnittiin 1,62 g (3,74 mmol) metyyli 3 α -asetyylioksilitokolaattia joka liuotettiin metanoliin (V = 70 ml). Lisättiin 11,20 g (186,35 mmol) etyleenidiamiinia ja refluksoitiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 tunnin ajan. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja liuotin evaporoitiin pois. Raakatuote liuotettiin CHCl₃:iin (V = 30 ml) ja tuotetta yritettiin kiteyttää vedestä (V = 60 ml). Kiteytymisen tehostamiseksi kolvia pidettiin jäähauteessa. Kiteytyminen oli heikkoa. ¹H NMR- spektrin perusteella todettiin että amidisidos oli muodostunut, mutta asetyylioksisuojaus oli hydrolysoitunut.

Tämän jälkeen 100 ml:n kolviin punnittiin 1,80 g (4,29 mmol) LCA:n *N*-(2- aminoetyyli)amidia ja lisättiin 8,60 g (79,90 mmol) tislattua asetanhydridiä. Refluksoitiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 20 tuntia. Refluksoinnin jälkeen raakatuote jäähdytettiin jäähauteessa ja kaadettiin eetteri-jääseokseen (60 ml:15 g). Orgaanista kerrosta pestiin 1*30 ml:lla vettä ja kylläistä NaHCO₃ - liuoksella kunnes vesifaasin pH oli emäksinen. Eetterikerrosta pestiin 30 ml:lla kylläistä NaCl- liuosta, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. Tuote epäonnistui.

4-(p-[N,N-bis-2-kloorietyyli]fenyyli)butaanihappokloridi

100 ml kolviin punnittiin 1,27 g (4,17 mmol) klorambusiilia ja 32,6 g (274,01 mmol) tislattua tionyylikloridia. Seosta refluksottiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 30 min. Refluksoinnin jälkeen tionyylikloridi tislattiin pois. Raakatuotteen lisättiin 22 ml (390,11 mmol) hiilitetrakloridia ja liuotin evaporoitiin. Saanto oli 1,33 g (98 % teoreettisesta saannosta)

N-(N'-[4-{p-N'',N''-bis-2-kloori-etyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli-3α-hydroksi-5β-kolan-24-amidi

100 ml kolviin punnittiin 1,80 g (4,29 mmol) metyyli-3α-asetyylioksilokolaattia, jonka 3α-asetussa oleva suojaus oli hydrolysoitunut. Lisättiin 1,33 g (4,17 mmol) klorambusiilikloridia ja 0,3 g (4,25 mmol) pyridiiniä. Liuottimena käytettiin CH₂Cl₂:a (V = 40 ml). Refluksottiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 tuntia. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä ja liuotin evaporoitiin. Raakatuote liuotettiin CHCl₃:iin (V = 30 ml) ja orgaanista kerrosta pestiin 3*30 ml kylläistä NaHCO₃-liuosta ja 1*30 ml vettä. Kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. ¹H NMR, ¹³C NMR ja massaspektrien perusteella synteesin todettiin epäonnistuneen.

N-(N'-[4-{p-N'',N''-bis-2-kloorietyyli}fenyyli]butaaniamidi)etyyli 3α-hydroksi-5β-kolan-24-amidi

100 ml 3-kaulakolviin mitattiin tislattu THF (V = 40 ml) sekä 1,32 g (4,37 mmol) klorambusiilia. Sekoitettiin jää-suolahauteessa CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla n.10 min. Lisättiin tiputussuppilon kautta hitaasti 0,48 g (4,80 mmol) trietyyliaminiä ja 0,51 g (4,80 mmol) etyyliklooriformiaattia. Sekoitusta jatkettiin jää-suolahauteessa CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla 30 min. Kolviin lisättiin 1,80 g (4,37 mmol) LCA:n N-(2-aminoetyyli)amidia joka oli liuotettu THF:iin (V = 20 ml) ja sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla yön yli. Sekoituksen jälkeen liuotin evaporoitiin pois, tuote liuotettiin CHCl₃:iin

(V = 80 ml) ja orgaanista kerrosta pestiin 3*50 ml kylläistä NaHCO₃ -liuosta ja 1*45 ml vettä, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin.

Ensimmäisessä pylväskromatografispuhdistuksessa eluenttina käytettiin CH₂Cl₂:metanoli- seosta (90:10) ja toisessa pylväskromatografispuhdistuksessa CH₂Cl₂:asetoni:metanoli -seosta (48:50:2). Saanto oli 0,91 g (30 % teoreettisesta saannosta). Tuotteen hiilien numerointi on esitetty liitteessä 1. ¹H NMR- ja ¹³C NMR- ja massaspektrit ja taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 5.

Pyridiini-3-karboksylihappokloridi

100 ml kolviin punnittiin 0,57 g (4,20 mmol) nikotiinihappoa ja 16,30 g (137,09 mmol) tislattua tionyylikloridia. Seosta refluksottiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 30 min. Refluksoinnin jälkeen tionyylikloridi tislattiin pois ja kolviin lisättiin 50 ml CCl₄:ia, joka evaporoitiin pois.

Saanto oli 0,57 g (95 % teoreettisesta saannosta). Nikotiinihapon hiilien numerointi on esitetty liitteessä 1.

***N*-(*N'*-pyridiini-3-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi**

100 ml kolviin punnittiin 1,80 g (4,29 mmol) LCA:n *N*-(2- aminoetyyli)amidia, joka liuotettiin CH₂Cl₂:iin (V= 50 ml). Lisättiin 0,57 g (4,20 mmol)nikotiinihappokloridia ja 0,37 g (4,27 mmol) pyridiiniä. Seosta refluksottiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 tunnin ajan. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä ja liuotin evaporoitiin. Raakatuote liuotettiin CHCl₃:iin (V= 40 ml) ja orgaanista kerrosta pestiin 3*40 ml kylläisellä NaHCO₃ -liuoksella ja 1*40 ml vettä, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. Pylväskromatografiapuhdistuksessa eluenttina käytettiin CH₂Cl₂:metanoli (90:10) -seosta. Saanto <1 %.

¹H NMR ja ¹³C NMR spektrit sekä taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 6.

Pyridiini-4-karboksyylihappokloridi

100 ml kolviin punnittiin 0,50 g (4,29 mmol) isonikotiinihappoa ja 16,30 g (137,09 mmol) tislattua tionyylikloridia. Seosta refluksotiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 30 min. Refluksoinnin jälkeen tionyylikloridi tislattiin pois. Kolviin lisättiin 75 g (487,60 mmol) CCl₄:a, joka evaporoitiin pois. Saanto oli 0,57 g (95 % teoreettisesta saannosta). Isonikotiinihapon hiilien numerointi on esitetty liitteessä 1.

***N*-(*N'*-pyridiini-4-amidi)etyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi**

100 ml kolviin punnittiin 1,80 g (4,29 mmol) LCA:n *N*-(2- aminoetyyli)amidia joka liuotettiin CH₂Cl₂:iin (V = 50 ml). Lisättiin 0,57 g (4,20 mmol) isonikotiinihappokloridia ja 0,37 g (4,27 mmol) pyridiiniä. Refluksotiin CaCl₂-putkellisen pystyjäähdyttäjän alla öljyhauteella 48 h. Refluksoinnin jälkeen tuotteen annettiin jäähtyä ja liuotin evaporoitiin. Raakatuote liuotettiin CHCl₃:iin (V= 40 ml) ja orgaanista kerrosta pestiin 3*40 ml kylläistä NaHCO₃ -liuosta ja 1*40 ml vettä, kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin. Pylväskromatografiapuhdistuksessa eluentina käytettiin CH₂Cl₂:metanoli (85:15)-seosta. Saanto < 1 %.

¹H NMR ja ¹³C NMR spektrit sekä taulukoidut ¹³C NMR siirtymät esitetään liitteessä 7.