

УДК 542.95(075.5)

Твердофазный синтез для начинающих: выбор инструментария и техника проведения многостадийных превращений

Е. В. Бабаев

ЕВГЕНИЙ ВЕНИАМИНОВИЧ БАБАЕВ — доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: методология органического синтеза, химия гетероциклов.

119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, тел. (495)939-30-20, E-mail babaev@org.chem.msu.ru

В статье [1] мы вспомнили «азбуку» твердофазного синтеза и подробно остановились на тех «неприятностях», с которыми сопряжена экспериментальная работа. Главным неудобством практической работы со смолами на полистирольной основе является их набухание в растворителях. Растворители (и реагенты) входят внутрь полимерной глобулы, резко увеличивая ее объем. Желатиноподобный характер смолы делает неудобными манипуляции переноса набухшего полимера из сосуда в сосуд или на фильтр. Анализ решения этих проблем и посвящена настоящая статья. На примере трех учебных задач, опробованных в спецпрактикуме по комбинаторной химии в МГУ, нами был приобретен определенный опыт, который может быть полезен преподавателям и органикам-синтетикам.

Ниже рассматриваются три примера различного инструментария, позволяющего упростить работу на полимерных носителях. В первом примере ряд проблем устраняется при использовании простого контейнера для смол и комплекта «Билл-борд», в котором реакционные сосуды совмещены с фильтрами. Химическое превращение представлено двукратной модификацией защищенного глицина, иммобилизованного на смоле (последовательное С-алкилирование и N-ацилирование). Во втором примере (метод «чайного пакетика») контейнером для смолы служит пористый пластиковый пакет, а химия представлена многостадийной цепочкой превращений. В третьем примере рассмотрена методология использования специальным образом модифицированных пластиковых штырьков из полипропилена (лантернов), новая «философия синтеза», в корне меняющая все привычные представления о современном органическом синтезе. Этот метод использован для многоступенчатого (5—6 стадийного) синтеза тиомочевин и гуанидинов. Все три примера представляют собой варианты учебных задач.

Инструментарий «Билл-борд»

Рассмотрим четырехстадийную модификацию глицина (содержащего в качестве защитной группы фраг-

мент бензофенона), иммобилизованного на смоле Ванга. Основной особенностью задачи является использование простого технического инструментария «Билл-борд» (Bill-Board kit) — специально спроектированного набора пробирок-фильтров и удобных пластиковых приспособлений, упрощающих перемешивание и фильтрование в нескольких реакционных сосудах. Этот недорогой набор (аналог которого, при желании, нетрудно изготовить) позволяет существенно упростить и ускорить манипуляции при параллельном проведении твердофазных реакций.

Предлагаемая задача была отработана группой студентов МГУ в спецпрактикуме по комбинаторной химии в 2005 г. Для выполнения задачи требуется три лабораторных занятия и итоговый семинар по анализу чистоты полученных продуктов (занятие 4).

Химический аспект задачи. Впервые возможность С-алкилирования N-защищенных аминокислот, иммобилизованных на подложке, была продемонстрирована более 10 лет назад [2] (схема 1).

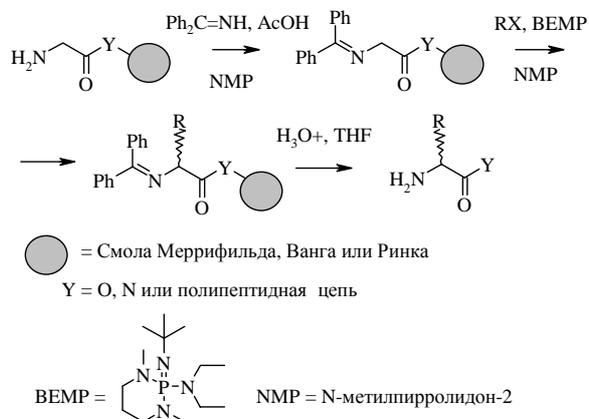


Схема 1.

Аминогруппу иммобилизованной на смоле молекулы глицина защищают с помощью фрагмента бензофенона. Группа CH_2 полученного имина приобретает достаточ-

ную кислотность, характерную для аза-аллильных систем, и под действием сильного основания, например, замещенного фосфазена (ВЕМР), удается осуществить ее депротонирование и последующее С-алкилирование.

Со времени первой публикации это направление исследований значительно расширилось, группой Скотта-О'Доннелла опубликована большая серия статей по методологии твердофазного синтеза с использованием этой реакции [3—7]. Удалось осуществить аналогичную реакцию с малоактивными алкилгалогенидами, а также алкенами (реакция Михаэля). В зависимости от природы смолы можно получать разные подклассы веществ: на основе смолы Ринка — амиды, а при использовании смолы Вайнреба — аминоальдегиды или аминокетоны. Выяснилось, что при использовании сильных оснований возможно получение и С-диалкилированных аминокислот. Получаемые иммобилизованные интермедиаты можно вводить в реакции с нуклеофилами или превращать в более сложные ациклические или циклические системы, например, производные пролина, лактамы или гидантоины.

Особенности комплекта Билл-борд. Простота и надежность химических превращений с участием иммобилизованных бензофенониминнов аминокислот побудили проф. Скотта адаптировать эти последовательности для практикума по твердофазному синтезу в университете Индианы (США). Для облегчения параллельных манипуляций со смолами был сконструирован учебный комплект оборудования Билл-борд.

Билл-борд представляет собой специально спроектированный набор пробирок-фильтров (рис. 1а) с герметично навинчивающимися с двух сторон пластиковыми пробками с тефлоновыми вкладышами (рис. 1б). В результате каждый сосуд выполняет роль либо контейнера для проведения реакций (когда крышки завинчены), либо фильтра (когда крышки удалены). Фильтр впаян несимметрично, и твердофазный носитель помещается в большую по размеру часть сосуда. Пробирки крепятся в специальном пластиковом держателе (собственно Билл-борд, рис. 1б, в), который можно использовать и как штатив (при добавлении реагентов, промывании содержимого сосудов и фильтровании), и как блок для одновременного вращения и перемешивания шести сосудов. Два удобных пластиковых приспособления (рис. 1в) служат приемниками для промывных жидкостей или стойкой для сбора конечных продуктов расщепления, соответственно. Для перемешивания нескольких Билл-бордов можно использовать простые приспособления (рис. 1г, см. также рис. 2д, е).

Полный комплект оборудования для синтеза стоит около 175 долларов США, предназначен для многократного использования и позволяет параллельно проводить 6 комбинаторных твердофазных реакций. Простота и дешевизна комплекта позволили успешно осуществлять эксперименты по твердофазному комбинаторному синтезу силами студентов и аспирантов не только в университете Индианы, но и в университетах Барселоны (Испания) и Люблина (Польша). В 2005 г.

комплект был приобретен спецпрактикумом по комбинаторной химии МГУ, и в рамках визита профессора Скотта в Москву была проведена практическая отработка задачи группой студентов и аспирантов Химического факультета.

Краткое описание задачи. Задача состоит из четырех этапов: (1) алкилирование CH_2 -группы аминокислоты, иммобилизованной на смоле Ванга (W); (2) уда-

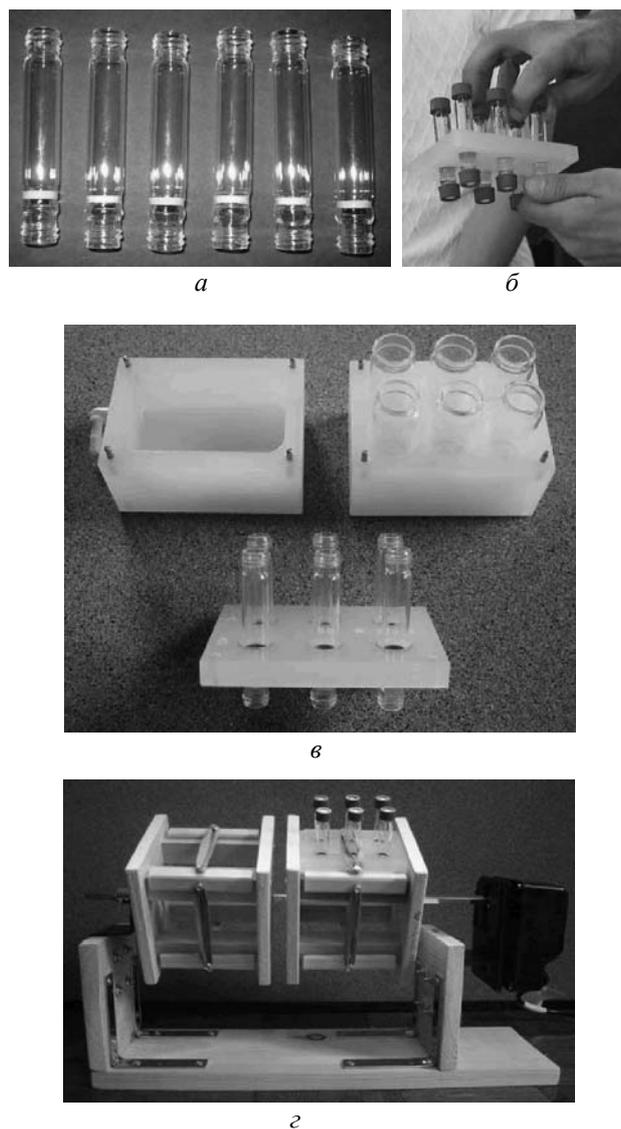


Рис. 1. Комплект Билл-борд

(а) Двусторонние реакционные сосуды-фильтры.

(б) Крепление реакционных сосудов.

(в) Дополнительные пластиковые коллекторы. Слева: для смыва жидкостей при промывании и фильтровании. Справа: для сбора конечных продуктов. Внизу: готовый к использованию крепеж с сосудами (Билл-борд)

(г) Вариант одновременного перемешивания шести реакционных сосудов. Простое устройство позволяет поместить восемь крепежей Билл-борд и перемешивать 48 сосудов одновременно.

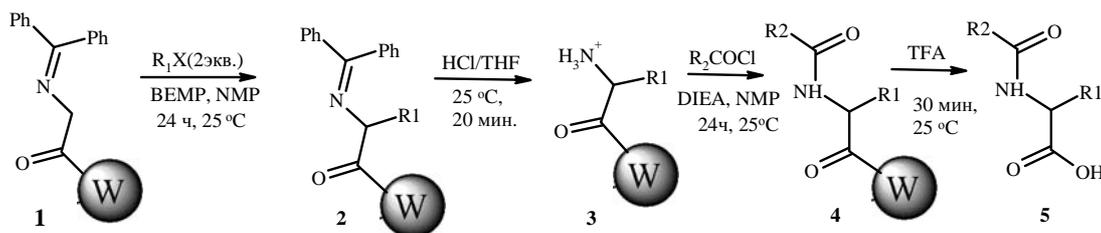


Схема 2. Общая цепочка превращений

ление защитной группы; (3) ацилирование NH_2 -группы аминокислоты; (4) удаление дважды модифицированной аминокислоты с подложки (схема 2).

Каждый студент одновременно выполняет шесть опытов, используя три бензилирующих агента и два ацилирующих, в одном Билл-борде с нанесенными разметками (А, В и 1, 2, 3), руководствуясь схемой 3.

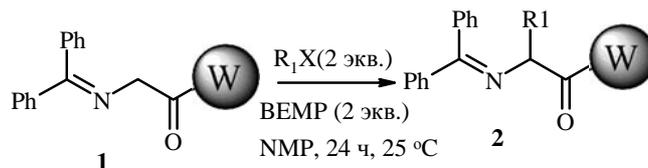


Схема 4. Алкилирование

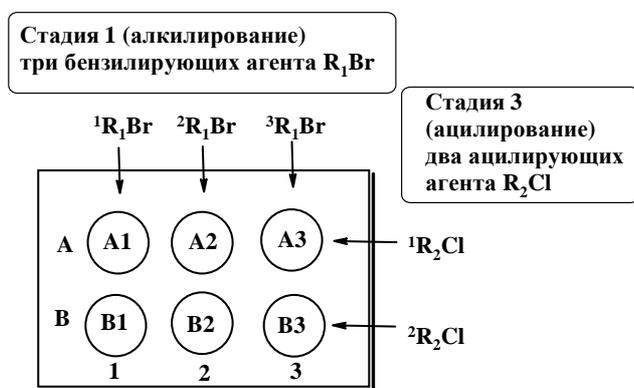


Схема 3. Вариация реагентов в синтезе мини-библиотеки

Требуемые реактивы: смола **1** (защищенный глицин на смоле Ванга) 2 г, фосфазеновое основание BEMP (Aldrich-79432, см. формулу на схеме 1) 5 мл, диизопропилэтиламин (DIEA) 100 мл, трифторуксусная кислота (TFA) (99%) 100 г, водная HCl (1N) 50 мл. Необходимые растворители: 1 л N-метилпирролидона-2 (NMP) и по 100 мл хлористого метилена (DCM), тетрагидрофурана (THF) и диметилформамида (DMF) (последний нужен для ополаскивания крышек реакционных сосудов).

В качестве алкилирующих реагентов используются три бензилбромид (расход от 1 до 5 г): незамещенный бензилбромид, *мета*-бром- и *пара*-трифторметилпроизводные; в опытах в МГУ дополнительно использовался пиридиновый аналог — 2-хлор-5-хлорметилпиридин. В качестве ацилирующих агентов рекомендованы вещества с большим молекулярным весом — 9-флуоренилхлороформиат (Fmoc-Cl) и 2-нафтоилхлорид (по 5 г).

Занятие 1. Алкилирование

1. Приготовление изопикнического раствора имина глицина **1**, иммобилизованного на смоле Ванга, из расчета 65 мг (50 ммоль) на один эксперимент (емкость смолы равна 0,77 ммоль/г).

К твердой смоле добавляются два растворителя с различной плотностью, например, тетрагидрофуран и хлористый метилен. Варьируя количества этих растворителей удастся достичь максимальной гомогенности геля, когда частицы смолы не всплывают и не оседают.

В начале первого лабораторного занятия студент получает 6 реакционных сосудов, помещенных в Билл-борд, и раствор смолы **1** (рис. 2а).

2. Требуемый объем изопикнического раствора распределяют по сосудам, после чего растворителю дают стечь. Для вытеснения остатков растворителя можно использовать простую помпу. Затем, пластиковой пипеткой Бераля (емк. 3,5 мл) промывают смолу в каждом реакционном сосуде (три раза по 3 мл NMP). На всех этапах выполнения работы необходимо выполнять следующие инструкции.

I. *Общая процедура промывания.* Промывания всегда должны выполняться строго в порядке, указанном в эксперименте. Жидкость для промывания ~3 мл (это примерно 80% от всего объема реакционного сосуда) добавляется с помощью пипетки объемом 3,5 мл. После добавления растворителя подождать 30 с, пока жидкость не просочится сквозь фильтр под действием силы тяжести. Затем смолу следует полностью просушить («продуть») с помощью помпы (рис. 2б). Обязательно подставить стакан под кран на поддоне, из которого стекает растворитель. В конце вылить жидкость из стакана в сливной контейнер.

II. *Использование воздушной помпы (груши).* «Помпа» — кусок резинового шланга, в один конец которого вставлена пластиковая пипетка Бераля, а второй конец присоединен к септе со сквозной прорезью. После того, как растворитель в сосуде стечет сквозь фильтр под действием силы тяжести (в течение 30 с), присоединить помпу (со стороны септы) к горлышку пузырька и нажать на уширенную часть пипетки. Чтобы избежать обратного всасывания растворителя из сосуда в шланг следует приподнять септу над горлышком и лишь затем разжать пальцы. Процедуру повторять, пока весь растворитель не протечет через фильтр.

III. *Манипуляции с крышками реакционных сосудов.* Перед тем, как закрыть крышку, нужно сначала удалить любые

остатки растворителя из зазора между крышкой и сосудом с помощью мягкой салфетки. Перед тем, как открыть крышку, нужно повернуть Билл-борд вверх той стороной, которую необходимо открыть. Отвинтить крышку, перевернуть Билл-борд и поместить его в поддон. Несколько раз встряхнуть Билл-борд, чтобы убедиться, что все остатки геля удалены с внутренней стороны крышки. Открыть верхние крышки всех реакционных сосудов и положить их в стакан для повторного использования.

3. Поместить Билл-борд в специальный держатель. Завинтить нижние крышки (по расположению — ближайšie к впаянным фильтрам) каждого реакционного сосуда (рис. 2в).

4. Подготовить три калибровочных пипетки Берала для добавления бензилирующих агентов $^1R_1\text{-Br}$, $^2R_1\text{-Br}$ и $^3R_1\text{-Br}$ (для каждого реагента своя пипетка). *Меры предосторожности: очки, перчатки!*

Добавить по 0,5 мл 0,2 М раствора алкилирующих агентов в NMP (100 ммоль, 2 экв.). Соответственно $^1R_1\text{-Br}$ добавить к смоле в реакционные сосуды первой вертикальной колонки (A1 и B1); $^2R_1\text{-Br}$ — в сосуды второй вертикальной колонки A2 и B2, $^3R_1\text{-Br}$ — в сосуды A3 и B3 (см. схему 3).

Добавить по 0,5 мл 0,2 М раствора основания ВЕМР в NMP (100 ммоль, 2 экв.) в каждый из шести реакционных сосудов. Завинтить верхние крышки Билл-борда и поместить Билл-борд во вращающий аппарат (рис. 2д, е). Записать время начала реакции и номер выданного Билл-борда. Время протекания реакции — 24 ч. Эту реакцию (и все последующие) проводят при комнатной температуре. Перед тем, как покинуть лабораторию, промыть поддон ацетоном над контейнером для слива.

Занятие 2. Снятие защитной группы и N-ацилирование

6. Записать время окончания реакции и вынуть Билл-борд из вращающего аппарата. Открыть крышки, как рекомендовано в инструкции III.

7. Смыть избыток реагентов со смолы. Промыть проалкилированную смолу (продукт 2) один раз 3 мл THF и высушить, используя помпу (инструкция II).

8. Поместить Билл-борд на подставку. Взять 12 чистых крышечек, закрыть нижние крышки каждого реакционного сосуда и добавить примерно 2,5 мл 1н водной смеси HCl-THF (1:2) в каждый сосуд. Закрыть верхние крышки и поставить во вращательный аппарат на 20 мин (схема 5).

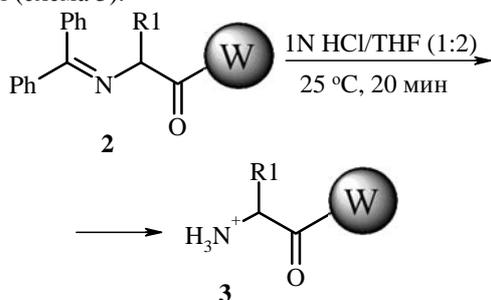


Схема 5. Стадия гидролиза (удаление защитной группы)

9. Открыть все крышки.

10. Отфильтровать и промыть полученный продукт 3 растворителями: 1 раз 3 мл THF, затем 1 раз 3 мл NMP.

11. Поместить Билл-борд на подставку. Взять 12 чистых крышек. Закрыть нижние крышки каждого реакционного сосуда. Добавить 0,5 мл 0,2 М раствора первого ацилирующего агента $^1R_2\text{-COCl}$ в NMP (100 ммоль, 2 экв.) к смоле 3 в трех реакционных сосудах, расположенных в первом горизонтальном ряду (A1, A2 и A3). Затем добавить 0,5 мл 0,2 М раствора второго ацилирующего агента $^2R_2\text{-COCl}$ в NMP (100 ммоль, 2 экв.) к смоле 3 в трех реакционных сосудах, расположенных во втором горизонтальном ряду (B1, B2 и B3). Затем добавить во все шесть реакционных сосудов по 0,5 мл 0,3 М раствора диизопропилэтиламина (DIEA) в NMP (150 ммоль, 3 экв.). Закрыть верхние крышки. Реакцию проводят 24 ч во вращающем аппарате (схема 6).

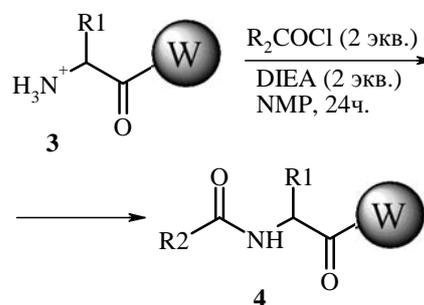


Схема 6. Стадия ацилирования аминогруппы

Занятие 3. Снятие N,C-замещенной аминокислоты с подложки

12. Вынуть Билл-борд из вращающего аппарата, открыть крышки (рис. 2г).

13. Отфильтровать и промыть полученный продукт 4, добавляя 2 раза по 3 мл NMP, затем 2 раза по 3 мл THF и 3 раза по 3 мл CH₂Cl₂.

14. Поставить Билл-борд на подставку. Закрыть дно чистыми крышками. Добавить в каждый сосуд по 2 мл смеси CF₃COOH/H₂O (95:5). *Работать осторожно!* Закрыть верхние крышки и поставить Билл-борд вращаться на 30 мин. (схема 7).

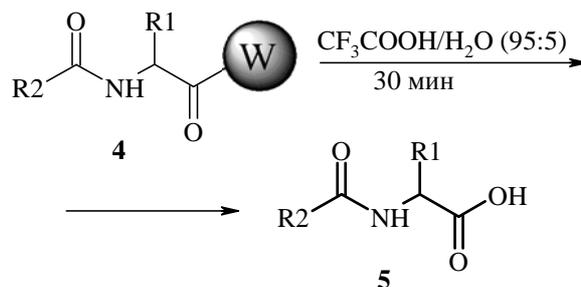
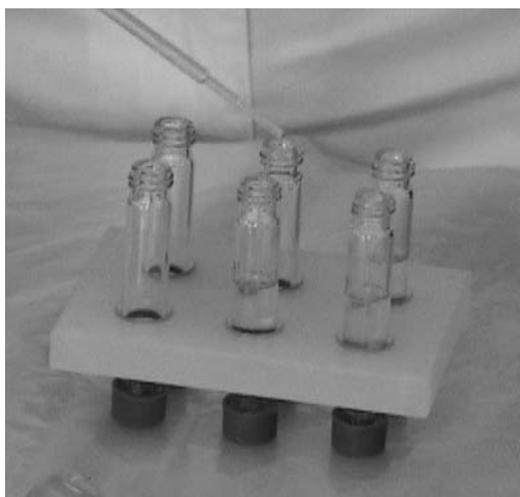
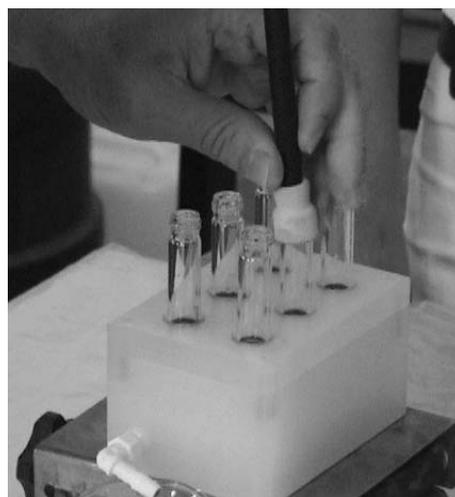


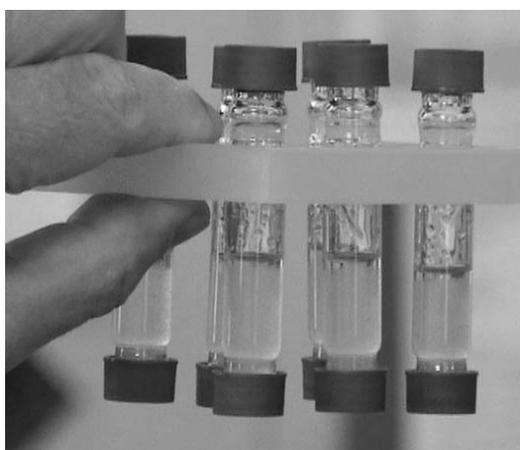
Схема 7. Стадия расщепления действием трифторуксусной кислоты.



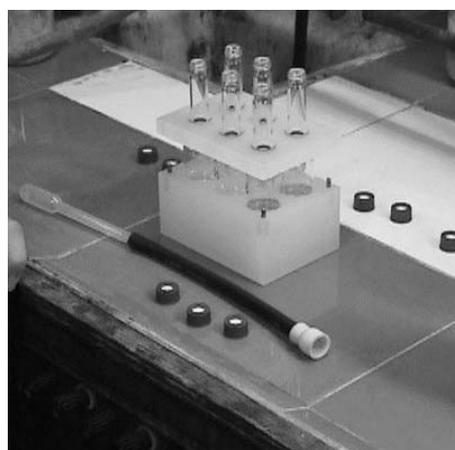
а



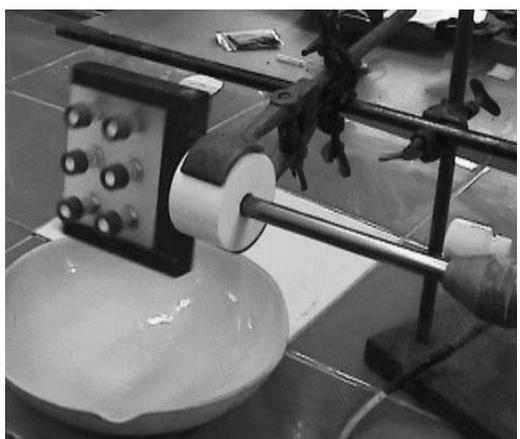
б



в



г



д



е

Рис. 2. Особенности практического выполнения задачи:

- а* — внесение реагентов на первой стадии (нижние крышки закрыты);
- б* — высушивание смол на фильтрах с применением помпы;
- в* — вид закрытого Билл-борда при проведении реакций;
- г* — последняя стадия — удаление продукта со смолы (под тягой!);
- д, е* — различные варианты перемешивания шести реакционных сосудов.

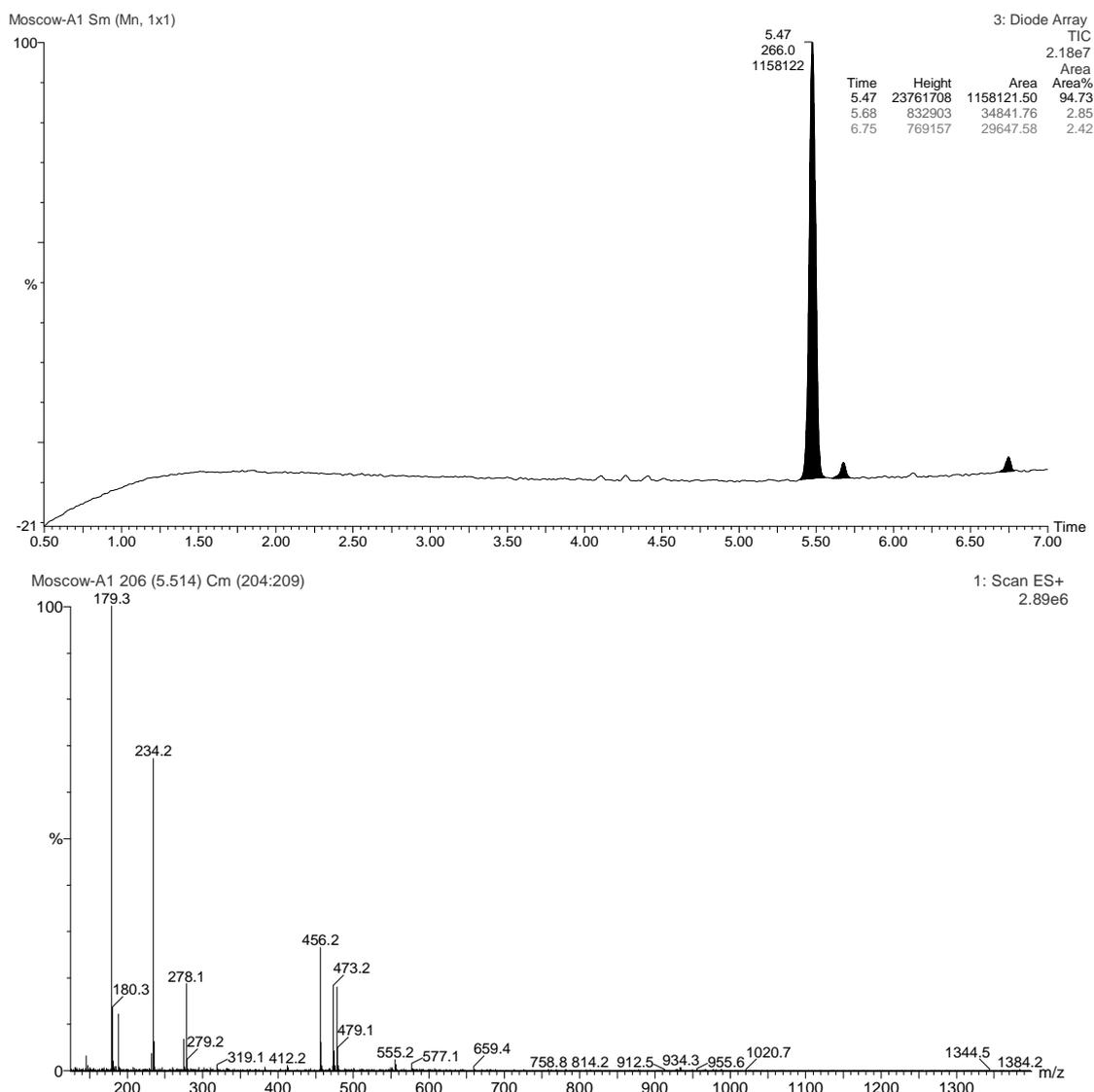


Рис. 3. Пример данных LC-MS для полученного образца А1 (чистота 95%, расчетное значение для $C_{25}H_{20}F_3NO_4$ $M=455$).

15. Пока протекает реакция расщепления, следует подготовить шесть взвешенных пузырьков, пометить их соответствующими кодами (А1В1, А1В2 и т.д.) и поставить в приемный штатив с шестью гнездами.

16. Продукты **5**, которые теперь находятся в *растворе* (поэтому необходимо сохранить *фильтрат*), перенести в пузырьки. Для этого надо перевернуть Билл-борд, нижними крышками вверх, открыть эти крышки и надеть приемные пузырьки на реакционные сосуды. Следить за соответствием кодов сосудов и пузырьков. После того, как все пузырьки размещены, поместить на них штатив с гнездами и *перевернуть всю конструкцию*. Открыть верхние крышки и собрать фильтрат в пузырьки, применяя помпу.

17. Промыть смолы 1 раз 2 мл смеси $CF_3COOH-H_2O$ (95:5) и 1 раз 2 мл CH_2Cl_2 , собирая смывные жидкости в

приемные пузырьки. Каждый раз тщательно продавливать растворитель с помощью помпы.

18. Снять Билл-борд с пузырьков. Перенести по 0,1 мл образца каждого продукта **5** в емкости для последующего LC/MS анализа (рис. 3). Пузырьки с конечными продуктами поместить для упаривания в вакуумный сушильный шкаф. (Упарить можно и на роторном испарителе в предварительно взвешенных колбах.)

19. Промыть поддон и Билл-борд ацетоном.

Занятие 4. Определение выходов конечных продуктов и ТСХ анализ

20. Взвесить все конечные продукты. (С учетом того, что реакции проводятся в шкале 50 мкмоль, а молекулярная масса продуктов варьирует в интервале 300—400 г/моль, теоретический выход для каждой реакции должен составлять 15—20 мг.) Реальный выход 10—15 мг.

21. Для тонкослойной хроматографии каждый продукт растворить в тетрагидрофуране (брать примерно 0,1 мл THF на 1 мг продукта) и использовать систему СНСІ₃/ТНF/СН₃СООН (85/15/2). Хроматограммы наблюдать сначала в лучах УФ лампы, затем проявить йодом. В обоих случаях записать значение R_f. В качестве реперов могут быть использованы образцы, синтезированные ранее.

Результаты, полученные при выполнении единой комбинаторной задачи в нескольких учебных центрах мира, послужили основой для весьма необычной концепции «Distributed Drug Discovery». Смысл ее в том, что путем выполнения одной и той же учебной задачи студенты разных университетов мира получают в итоге достаточно репрезентативную комбинаторную библиотеку потенциальных лекарств. Планирование синтеза и последующее тестирование осуществляется из единого центра [8]. Вклад в этот проект московской группы отражен в отдельной публикации [9].

Метод «чайного пакетика»

Данная разработка является примером долгого сотрудничества между лабораториями Исследовательско-

го института химического разнообразия (ИИХР, г. Химки) и вузами Москвы. В основу лабораторной работы положен практический опыт по твердофазному органическому синтезу, накопленный в ИИХР. Студенты МГУ, выполнявшие задачи спецпрактикума по комбинаторной химии, имели возможность познакомиться с методиками ИИХР в рамках экскурсий и дней открытых дверей (проводятся с 2004 г.). Предлагаемая работа является прописью для проведения учебных спецпрактикумов с участием студентов.

Лабораторная работа основана на широко распространенной технологии твердофазного синтеза, так называемом методе «чайного пакетика». В качестве контейнера для смолы используется пакетик из пористой пластиковой пленки, заплавленный по всему периметру (например, с использованием простого терморезака на рис. 4а). Такие пакетики (рис. 4б) можно быстро изготовить, разместить во множестве флаконов при добавлении однотипных реагентов (рис. 4в) или объединить и поместить в единую емкость (рис. 4г) для добавления одного и того же реагента или на повторяющихся стадиях промывания смол. Разумеется, эффект набухания смолы неизбежен, однако в этом случае удастся полно-



а



б



в



г

Рис.4. Метод «чайного пакетика»

Обозначения см. в тексте

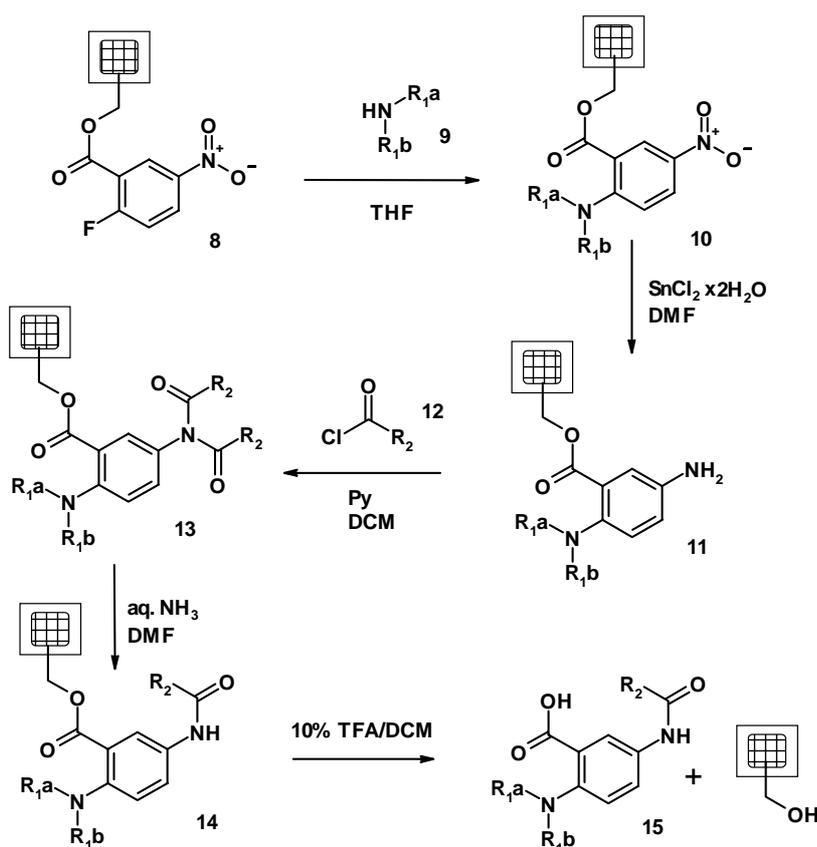


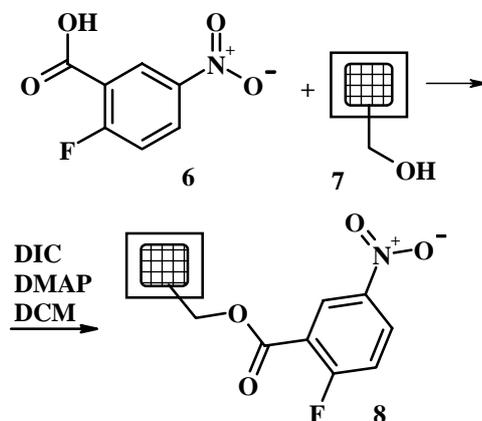
Схема 8

стью избежать прилипания смолы к стенкам стеклянного сосуда. Кроме того, пакетик выполняет функции сосуда и фильтра одновременно.

Последовательность реакций. В качестве модельной химической реакции была выбрана последовательность, приведенная на схеме 8. На смолу Ванга иммобилизуют 2-фтор-5-нитробензойную кислоту — соединение, содержащее активированный для нуклеофильного замещения галоген, а также нитрогруппу, которую легко восстановить, и далее проацилировать образующуюся аминную функцию. Теоретически исходная кислота — трехточечный темплат, поскольку третью функцию — карбоксильную — можно также успешно превратить, например, в амидную. В рассматриваемой задаче, однако, используется укороченная последовательность, и целевыми продуктами являются замещенные 2,5-диаминобензойные кислоты **15**.

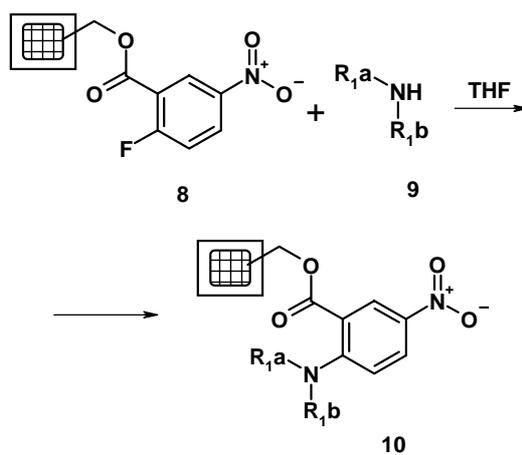
Требуемые реактивы и оборудование. Смолу Ванга, пленка для пакетиков и инструментарий для их изготовления. Требуется большой объем различных растворителей, серия вторичных алифатических аминов, а также хлорангидриды ароматических (в том числе гетероароматических) карбоновых кислот, SnCl₂, пиридин, уксусный ангидрид, трифтороуксусная кислота. Работа проводится на шейкере (обычно при комнатной температуре); в качестве резервуаров для пакетиков со смолами используются флаконы с крышками разного размера.

Этап 1. Иммобилизация 5-нитро-2-фторбензойной кислоты на смоле Ванга



Смолу Ванга **7** (50 г, емкость 2,0 ммоль/г) суспендируют в растворе, содержащем 0,2 моль 2-фтор-5-нитробензойной кислоты **6** (37,41 г) и 25 мг 4-диметиламинопиридина в 400 мл абсолютного хлористого метилена (DCM), затем осторожно добавляют 31,5 мл (0,2 моль) диизопропилкарбодиимида. Реакционную смесь встряхивают двое суток при комнатной температуре. Смолу отфильтровывают и промывают растворителями в следующем порядке 2×DCM, DMF, MeOH, 2×DCM, 2×MeOH, 2×DCM, 2×*n*-гексан и высушивают в вакууме. Смолы **8** готова к дальнейшему использованию.

Этап 2. Замещение фтора на диалкиламиногруппу



Смолу **8** расфасовывают в пористые пластиковые пакеты (рис. 4а, б), число которых равно числу конечных продуктов. Масса смолы в пакетике 250 мг (емкость из расчета 1,5 ммоль/г). В соответствии с техническим заданием (в котором указано, сколько опытов и с каким амином следует провести) распределяют паке-

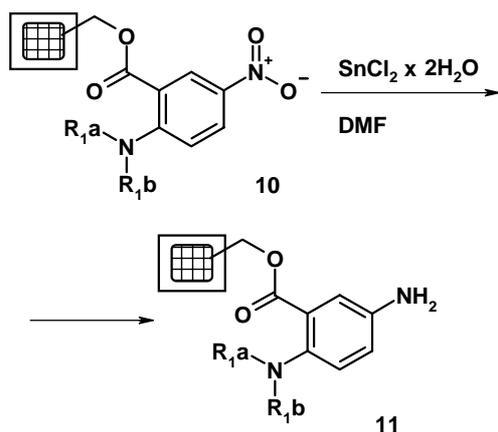
тики по флаконам, число которых соответствует числу взятых аминов (рис. 4в). Пакетики маркируются.

В каждый флакон добавляется требуемый амин в растворе тетрагидрофурана из расчета 5 экв. (1,9 ммоль) на одну порцию смолы. Флаконы помещают в шейкер на 18 ч. Пакетики промывают последовательно 2×THF, DMF, 2×MeOH, 2×DCM, 2×*n*-гексаном. В итоге атом фтора в смоле **8** замещается на соответствующую диалкиламиногруппу с образованием смол **10**.

На этой стадии используется одна важная операция (т.н. capping). Дело в том, что вторичный амин частично разрушает сложноэфирную связь, которой замещенная бензойная кислота крепится к полимеру. В итоге часть гидроксиметильных групп смолы обнажается и может выступать в качестве конкурентного центра на последующей стадии ацилирования. Поскольку для ацилирования на этапе 4 берутся производные ароматических кислот, то вводимые ацильные остатки сохраняются на смоле до последнего этапа, а на стадии расщепления линкера загрязняют конечный продукт. Для этого нужно прикрыть (защитить) гидроксиметильные группы «безобидным» остатком водорастворимой кислоты, например, уксусной.

На практике полученные смолы помещают в раствор пиридина, к которому добавляют уксусный ангидрид. Количество реагентов рассчитывают, исходя из соотношения 5 экв. (1,9 ммоль, 0,204 мл) пиридина в абс. DCM на один пакетик с последующим добавлением 5 экв. (1,9 ммоль) уксусного ангидрида. Флаконы помещают в шейкер и встряхивают 18 ч при комнатной температуре. Смолы промывают последовательно 2×THF, DMF, 2×MeOH, 2×DCM, затем дважды *n*-гексаном, высушивают в вакууме и получают продукты **10**.

Этап 3. Восстановление нитрогруппы



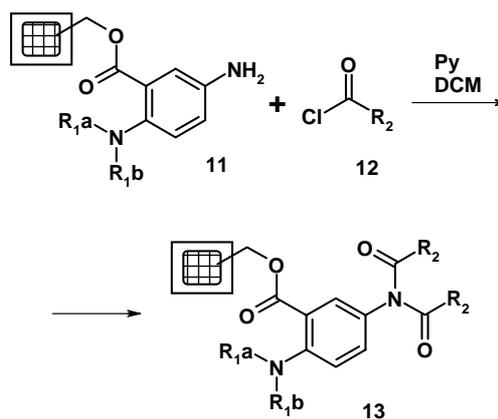
Поскольку реакция одна и та же для всех смол **10**, то помеченные пакетики помещают в единый реакционный сосуд (рис. 1з). К смолам **10** добавляют 2 М раствор SnCl₂×2H₂O в DMF (из расчета 50 мл раствора на 1 пакетик) и встряхивают при комнатной температуре 48 ч. Пакетики промывают последовательно 2×DMF, 2×DMF/H₂O (1:1 по объему), 2×H₂O, 2×DMF, 2×MeOH,

2×DCM, 2×MeOH, 2×DCM, дважды *n*-гексаном, высушивают в вакууме и получают смолы **11** со свободной аминогруппой.

Этап 4. Ацилирование аминогруппы

Операцию проводят в два этапа. Чтобы предотвратить неполное протекание реакции, подбирают такие условия, в которых идет двойное ацилирование аминогруппы анилинового фрагмента. На следующей стадии следует мягкое удаление одной из ацильных групп, не затрагивающее вторую.

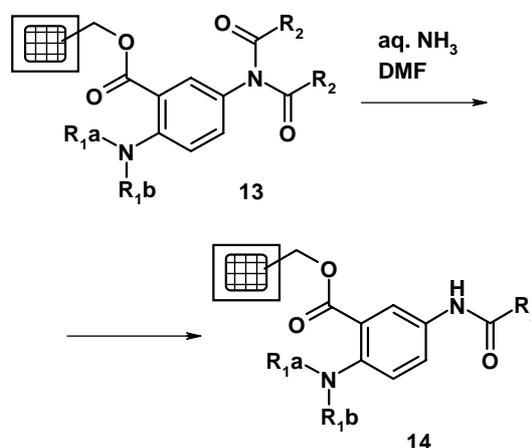
Двойное ацилирование



В соответствии с техническим заданием (в котором указано, сколько опытов и с каким ацилирующим агентом следует провести) вновь распределяют пакетики со смолами **6** по флаконам, число которых соответствует числу ацилхлоридов (рис. 4в). Пакетики вновь маркируются.

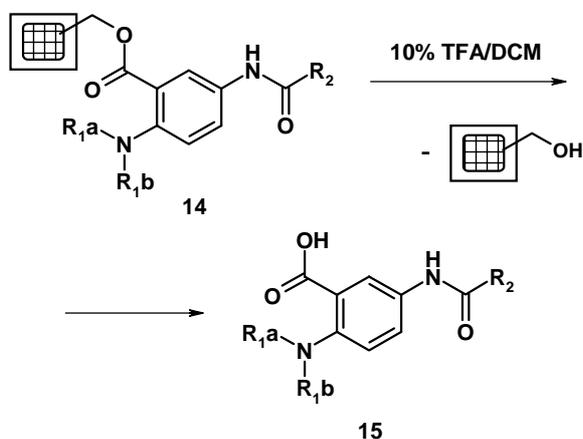
В каждый флакон добавляется 5 экв. (1,9 ммоль) пиридина в абс. DCM и требуемый ацилхлорид **7** из расчета 5 экв. (1,9 ммоль) на одну порцию смолы. Флаконы помещают в шейкер и встряхивают при комнатной температуре 6—18 ч. Пакетики промывают последовательно 2×DCM, 2×DMF, 2×MeOH, 2×DCM, 2×MeOH, 2×DCM, дважды *n*-гексаном и высушивают. Образуются диацилпроизводные **13**.

Удаление одной из ацильных групп



Пакетики со смолами **13** помещают в 25% раствор водного аммиака в DMF и встряхивают на шейкере при комнатной температуре в течение 18 ч. Промывают 2×DMF, 2×MeOH, 2×DCM, 2×MeOH, 2×DCM, дважды *n*-гексаном. Получают моноацильные производные **14**.

Этап 5. Снятие конечного продукта с подложки



Каждый пакетик помещают в индивидуальный флакон и обрабатывают 10% TFA/DCM, выдерживая при комнатной температуре 2 ч. Раствор декантируют, растворитель упаривают при пониженном давлении и получают конечные продукты **15**.

Выход и чистота получаемых продуктов. При использовании навески исходной смолы в 100 мг масса выделяемого продукта в среднем составляла 150 мг. Анализ конечных образцов **15**, проведенный методом LC-MS (UV-254 и ELSD детекторы) свидетельствовал об их чистоте > 90%.

Синтезы с использованием стержней типа Lantern

Проблема набухания полимера (делающая неудобным перенос смолы из сосуда в сосуд или на фильтр) успешно решается использованием «контейнера» пробирки-фильтра или «чайного пакетика». Между тем, имеется еще одно неудобство: для тщательного вымывания избыточного реагента из пор и внутреннего объема полимерной частицы требуется сравнительно большой расход растворителя. Идеальным решением было бы использование полимера, который не набухает, например, полипропилена. К сожалению, равномерно привить желаемые функциональные группы (и в требуемом количестве) на поверхность полипропилена затруднительно. (В случае полистирола это легко осуществимо, например, реакцией хлорметилирования.) Оригинальным решением является использование инертной полипропиленовой подложки, на поверхность которой нанесен тонкий слой полистирола. Именно этот принцип положен в основу технологии «лантернов» компании Mimotopes.

Лантерн представляет собой пластиковый цилиндр из полипропилена, покрытый химически модифицированным полистиролом. Для увеличения суммарного объема в поверхности цилиндра сделана внутренняя полость и прорези (это делает его похожим на восточ-

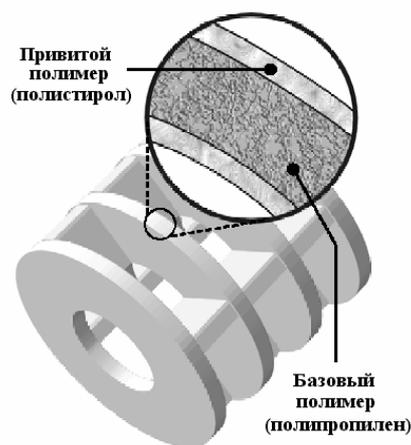


Рис. 5. Строение лантерна.

ный фонарик, англ. Lantern, рис. 5). Размеры лантерна подобраны таким образом, чтобы он был совместим с полостью стандартных пластиковых плашек (формата 8×12). В результате на поверхности цилиндра можно провести многостадийный синтез, опуская лантерн в различные реагенты (рис. 6б) и последовательно промывая его (рис. 6в) растворителем. Обычно лантерны используют однократно, и на последней стадии (после «срезания» сложного конечного продукта с подложки) отбрасывают.

Работа с лантернами (рис. 6) упрощает технику многостадийного синтеза больших комбинаторных библиотек, а количества веществ, выделяемых на заключительных этапах (5—50 мг) вполне достаточно для проведения биологических тестов. Главная проблема работы с лантернами — логистика, поскольку важно научиться правильно протоколировать «судьбу» каждого цилиндра (не перепутать их при проведении многостадийных синтезов). Для этого надо пометить каждый лантерн каким-либо способом. Существует три подхода. Наиболее надежной (и дорогой) является так называемая технология Irgo, когда каждый лантерн снабжается микрочипом (рис. 6г), и требуется специальное электронное устройство, записывающее и считывающее с микрочипа в какие именно реакции нужно вводить (или уже вводили) каждый лантерн. Более простой подход — закрепить лантерны в крышке плашки с пронумерованными гнездами (рис. 6ж) и вести протокол по номерам лантернов. И наконец, можно прикрепить к лантерну цветной пластиковый штырек и пометить разноцветными метками (кольцами) реагенты, которые были использованы для синтеза (рис. 6з, д, е). Этот путь удобен, если библиотека невелика.

Выбор модельной реакции. На веб-сайте www.mimotopes.com компании Mimotopes приведено большое число примеров эффективных методик использования лантернов для синтеза разнообразных библиотек. Наше внимание привлекла простая последовательность синтеза N,N'-диарилмочевин [10] (рис. 7А).

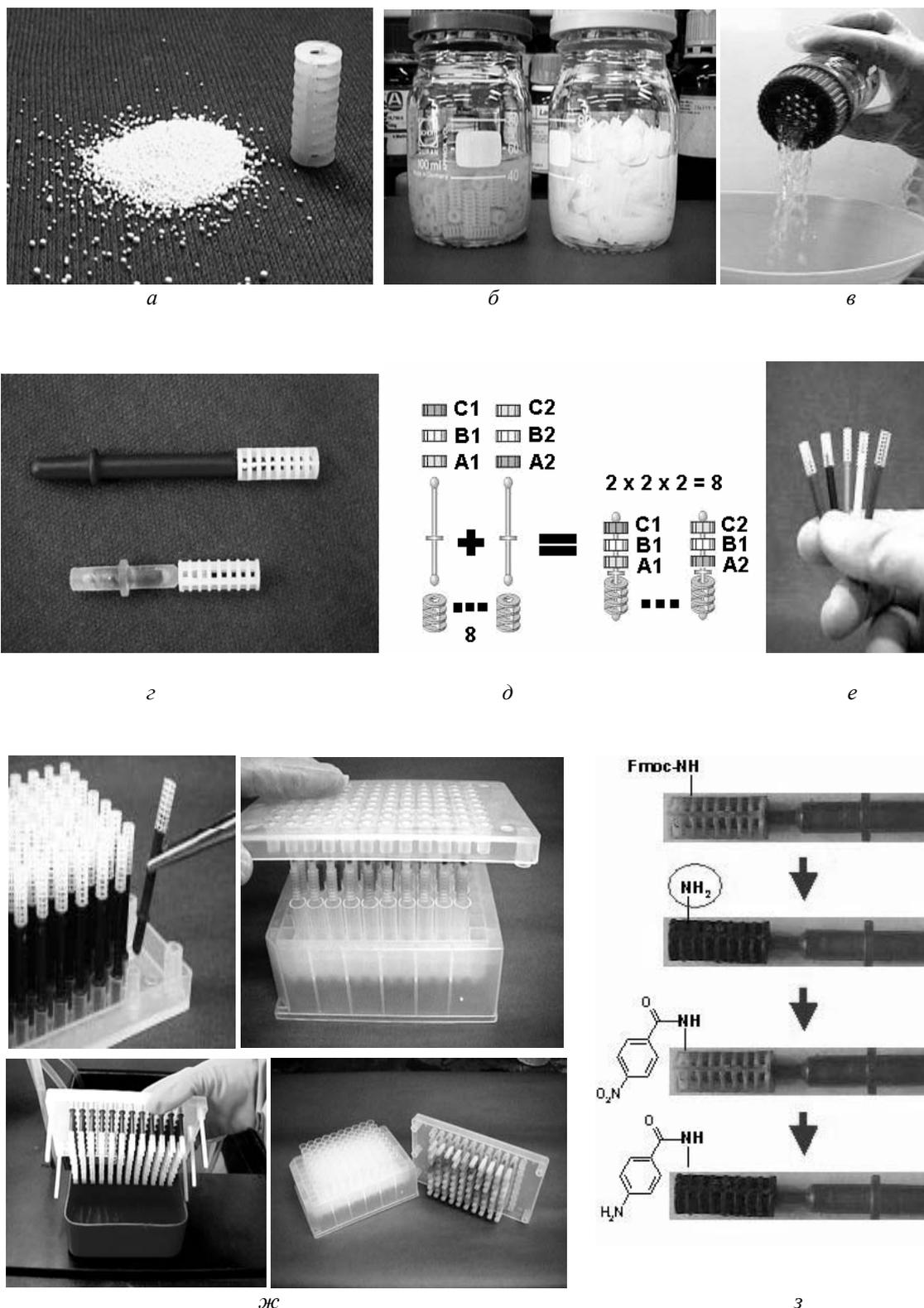


Рис. 6. Техника твердофазного синтеза при работе с лантернами.

Обозначения см. в тексте

Ключевые стадии этого процесса просты — на лантерн закрепляется остаток *мета*- (или *пара*-) нитробензойной кислоты, затем нитрогруппу восстанавливают, а анилиновый фрагмент вводят в реакцию с изоцианата-

ми. Пытаясь связать структуру будущих соединений с возможностью проявления ими биологической активности, мы обратили внимание на тот факт, что близкие структурные родственники диарилмочевин — диарил- и

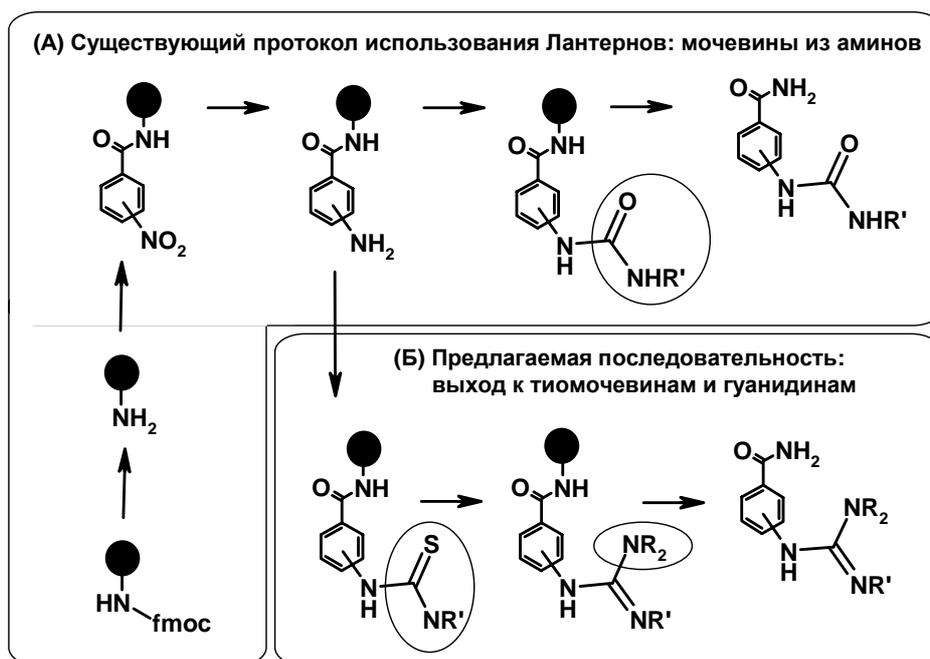


Рис. 7. (А) Рекомендованная производителем методика синтеза диарилмочевин. (Б) Последовательность синтеза тиомочевин и гуанидинов, оптимизированная в качестве учебной задачи для студентов.

TIMEGADINE ANTIINFLAMMATORIES	PHENODIANISYL LOCAL-ANESTHETICS	APTIGANEL NEUROPROTECTIVE

Рис. 8. Лекарственные препараты ряда ди(три)арилгуанидинов в Merck Index.

триарилгуанидины — представляют собой хорошо известные лекарственные препараты (рис. 8). (Отметим присутствие гуанидинового мотива и в структуре тиформина, и в структурах библиотек его аналогов.)

Не составило большого труда связать возможный путь синтеза гуанидинов с анилиновым интермедиатом на рис. 7А: достаточно заменить изоцианаты на изотиоцианаты, чтобы получить с высоким выходом остаток тиомочевин (рис. 7Б). Эта методика хорошо отработана в обычном жидкофазном варианте [11]. Тиомочевины, в свою очередь, легко превратить в гуанидины по хорошо отработанному (опять-таки для реакций в растворах) литературным методикам [12]. Именно эта последовательность (ранее, по-видимому, не реализованная в твердофазном варианте синтеза) и была положена в основу студенческой задачи в спецпрактикуме МГУ.

Требуемые реактивы и оборудование. Для выполнения работы требуются ланternы (7—11 шт.), пластиковые пробирки (типа эппендорф) объемом 1,5 мл (50 шт.) и запас пенициллиновых склянок. Для снятия защитной группы со смол готовится 20% (по объему) раствор пиперидина в диметилформамиде. Расход реактивов не высок, как правило, 1—5 г реактива вполне достаточно. Для стадии ацилирования необходим триэтиламин и изомерные *мета*- и *пара*-нитробензоилхлориды [наклейки на склянках — (А) и (Б)]. Для восстановления используется кристаллогидрат $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В качестве изотиоцианатов использованы *м*-хлоризотиоцианат (I) [13] и фуффурилизотиоцианат (II) [14], которые были получены заранее по известным методикам. Для превращения тиомочевин в гуанидины необходим NaIO_4 и три амина: морфолин (α), *мета*-толуидин (β) и бензи-

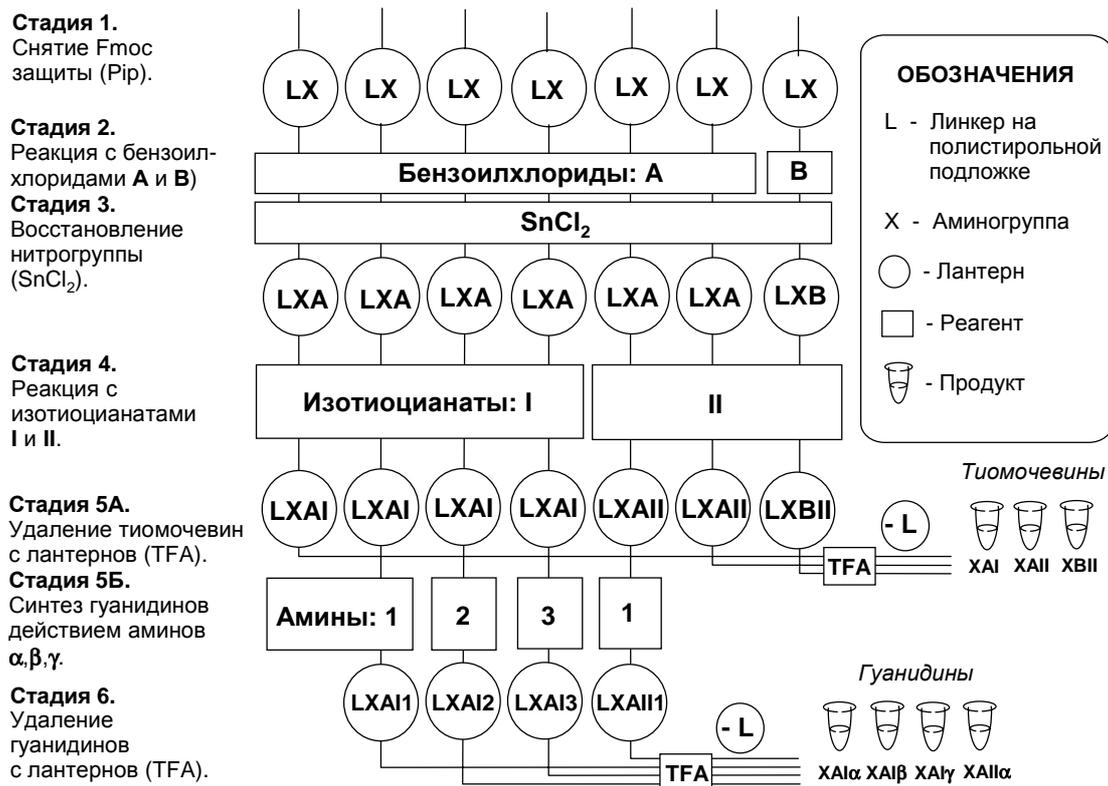


Схема 9

ламин (γ). Для стадии расщепления берется трифторуксусная кислота; промывание лантернов проводят метанолом и хлористым метиленом.

Последовательность превращений и методические замечания. При работе с лантернами наиболее рельефно выступает один из главных недостатков твердофазного синтеза — сложность контроля степени протекания многоступенчатых реакций. Спектральные методы не пригодны. (Действительно, пластиковый штырек затруднительно поместить в ампулу спектрометра или в спектральную кювету.) Между тем, накопление не до конца прореагировавших функциональных групп (при пяти-шести запланированных стадиях) может существенно повлиять на чистоту конечного вещества. Возможен поэтапный контроль чистоты химическим путем: «срезанием» полупродуктов с подложки после каждой стадии. Такой способ затруднен по другой причине: только в случае конечного вещества с большой молекулярной массой можно ожидать выделения *весомых* количеств продукта, тогда как массы низкомолекулярных интермедиатов будут ничтожно малы.

Оптимальным способом качественного (и притом, визуального) контроля протекания реакций оказался следующий. Обратим внимание (см. рис. 7), что на первых четырех стадиях аминогруппа либо имеется на поверхности смолы (первый раз — после снятия защиты, второй раз — после восстановления нитрогруппы), либо отсутствует (в начальном лантерне, в нитробензамидном фрагменте, в арилтиомочевине). Такое чередую-

щееся появление и исчезновение аминогруппы легко зафиксировать с помощью теста Кайзера*. Оказалось (см. рис. 6з), что эта проба весьма эффективна, т.е. на каждой стадии целесообразно использовать контрольный лантерн, проявляя его нингидрином, а затем отбрасывая. На практике лантерн опрыскивают раствором нингидрина и некоторое время нагревают в токе горячего воздуха (хит-ган или обычный фен). В случае диарилтиомочевин осуществлялось контрольное удаление полупродукта с подложки и оценка чистоты методом ЯМР. В случае конечных гуанидинов чистота продукта контролировалась методом ТСХ, а состав продукта — масс-спектрально (прямой ввод).

Общая последовательность и логистика превращений на 7 лантернах (плюс 4 лантерна для контроля) приведена на схеме 9. Рассмотрим стадии более подробно.

(1). Снятие защитной группы. Лантерны, содержащие смолу Ринка (R-CH₂-NH-Fmoc) подвергались снятию защитной группы действием раствора пиперидина. Нингидриновый тест на контрольном лантерне положительный.

(2). Ацилирование свободной аминогруппы лантерна LX (см. обозначения на схеме 9) *para*- и *meta*-нитробензоилхлоридами А и В приводит к смолам LXА и

* См. статью Е.В. Бабаева и Д.С. Ермольева в этом номере журнала.

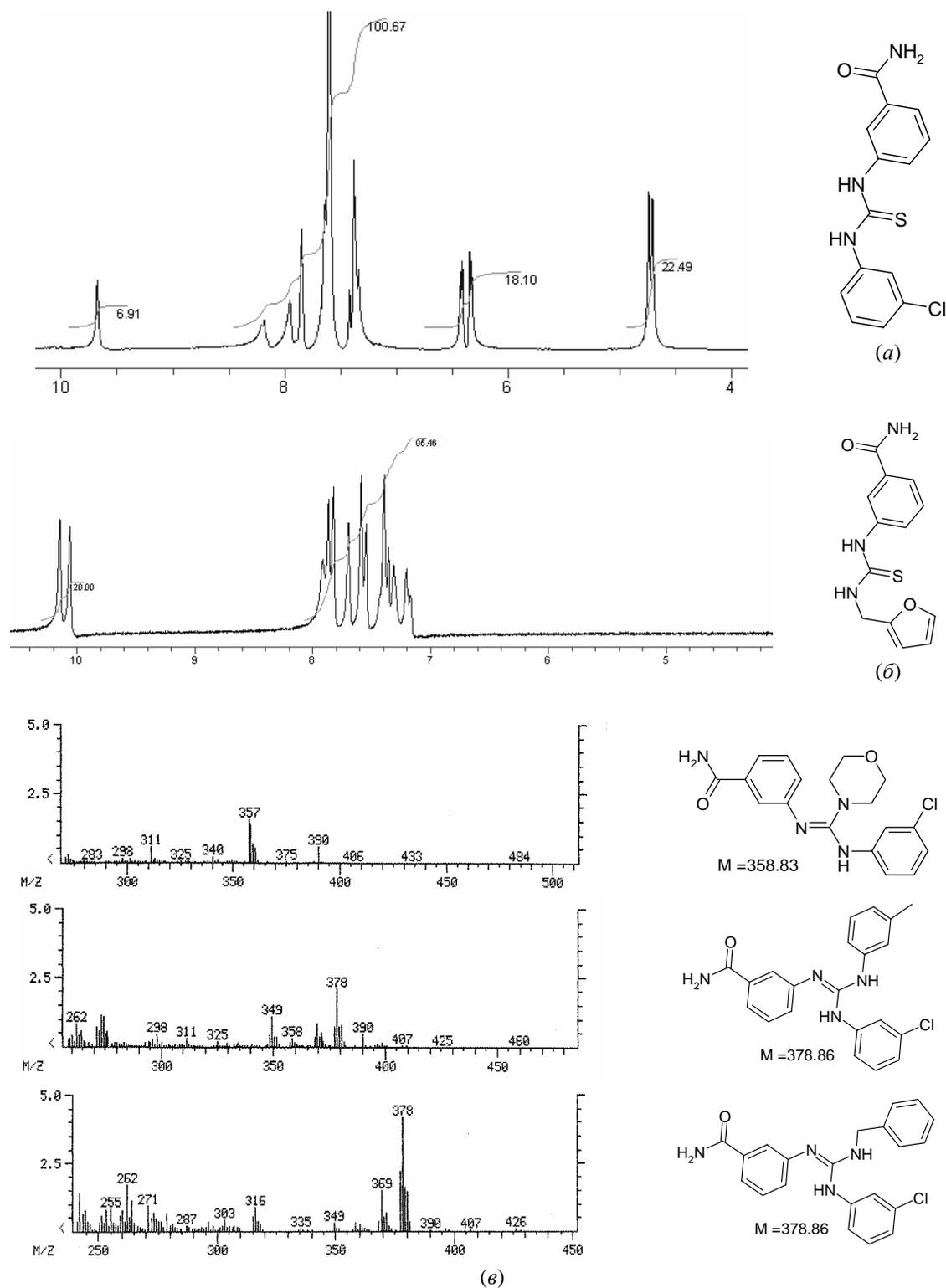


Рис. 9. Данные ПМР спектров (а) тиомочевины XAI и (б) тиомочевины XAIa. (в) Масс-спектры конечных гуанидинов XAIa, XAIb, XAIg.

LXB. Нингидриновый тест на контрольном лантерне отрицательный.

(3). Восстановление нитроарильной группы до анилиновой с помощью SnCl_2 . (Код получаемых веществ не

изменен.) Нингидриновый тест на контрольном лантерне положительный.

(4). Образование диарилтиомочевин LXAI, LXAI и LXVII реакцией аминогруппы с изотиоцианатами I и II.

Нингидриновый тест на контрольном лантерне отрицательный.

(5А). Срезание диарилтиомочевин XAI, XAIИ и XAIП трифторуксусной кислотой, определение выхода (около 10 мг) и съемка спектра ПМР.

(5Б). Действие аминов α , β , γ на лантерны из опыта (4). Получение гуанидинов LXAI1, LXAI2, LXAI3 и LXAIП.

(6). Срезание гуанидинов XAI α , XAI β , XAI γ и XAI α трифторуксусной кислотой, определение выхода (около 10 мг) и масс-спектральный анализ выделяемых продуктов.

На схеме 9 показаны последовательные шаги, которые предпринимались при *оптимизации* задачи. Теоретически можно было получить $2 \cdot 2 \cdot 3 = 12$ веществ. Отсутствие некоторых сочетаний обусловлено тем, что на раннем этапе контроля чистоты — при анализе тиомочевин — выяснилось, что *n*-нитробензоилхлорид В образует интермедиат неудовлетворительной чистоты. Для тиомочевины XAIП (на основе фурфурилизотиоцианата П) был зарегистрирован удовлетворительный спектр ПМР (рис. 9а), однако анализ получаемого из нее гуанидина показал наличие большого числа примесей (возможно, из-за побочных реакций с участием фуранового кольца).

В этой связи студентам для практического выполнения предлагается часть схемы 9, а именно использование одного бензоилхлорида (А), одного изотиоцианата (I) и трех аминов с целью получения одной тиомочевины XAI и трех гуанидинов XAI α , XAI β , XAI γ .

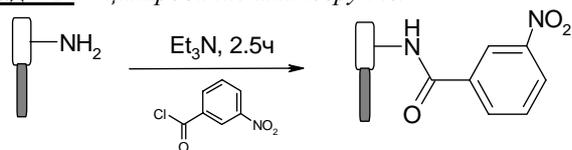
Получение *N, N', N''*-тризамещенных гуанидинов на лантернах. Перед началом занятия преподаватель демонстрирует отрицательный тест Кайзера для стандартного лантерна. Каждому студенту выдается 8 лантернов.

Стадия 1. Снятие Fmoc-защиты



Восемь лантернов помещают в пластиковые пробирки (эппендорфы) объемом 1,5 мл и добавляют по 1 мл 20% раствора пиперидина в диметилформамиде. Спустя 1 ч палочки последовательно промывают DMF (3×1 мл), метанолом (3×1 мл), дихлорметаном (3×1 мл) и переносят в новые пробирки. Контрольный лантерн демонстрирует положительную пробу Кайзера.

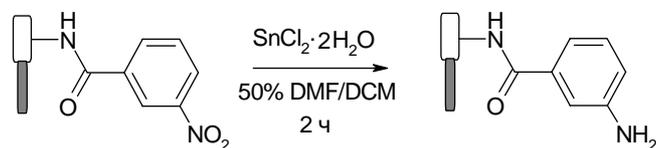
Стадия 2. Ацилирование аминогруппы



Семь лантернов помещают в пластиковые пробирки, и в каждую добавляют по 1 мл 1 М раствора *m*-нитробензоилхлорида (0,001 моль, 0,185 г, ~28 экв.) и триэтиламина (0,001 моль, 0,1 г, 0,14 мл, ~28 экв.) в

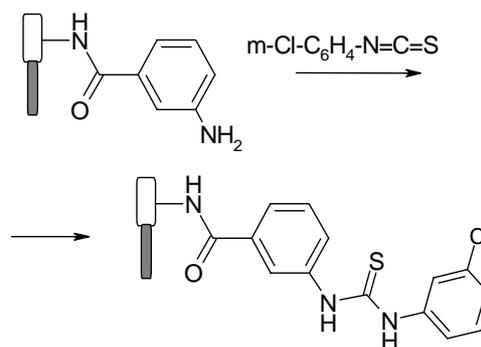
дихлорметане. Реакционную смесь оставляют на ночь, после чего лантерны последовательно промывают дихлорметаном (3×1 мл), метанолом (3×1 мл), DMF (3×1 мл). Проба Кайзера — отрицательная.

Стадия 3. Восстановление нитрогруппы



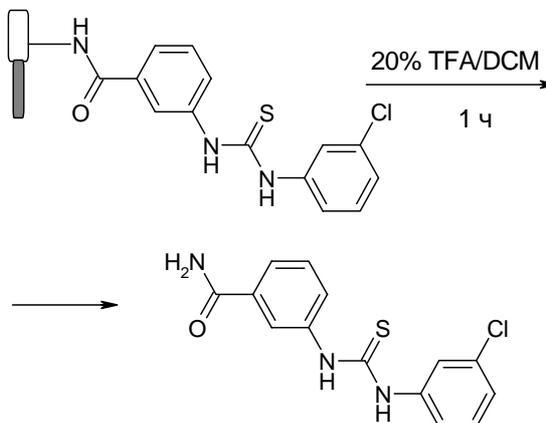
Шесть лантернов помещают в пластиковые пробирки и в каждую пробирку добавляют по 1 мл 1 М раствора $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в DMF (т.е. по 0,001 моль восстановителя). Спустя сутки лантерны последовательно промывают DMF (3×1 мл), дихлорметаном (3×1 мл), метанолом (3×1 мл). Проба Кайзера — положительная.

Стадия 4. Сочетание с изотиоцианатом



Пять лантернов помещают в пластиковые пробирки и в каждую пробирку добавляют по 1 мл 1 М раствора раствора *m*-хлорфенилизотиоцианата (0,001 моль, 0,169 г, 0,14 мл) в метаноле. Оставляют на ночь, после чего последовательно промывают метанолом (3×1 мл), DCM (3×1 мл), DMF (3×1 мл). Проба Кайзера — отрицательная.

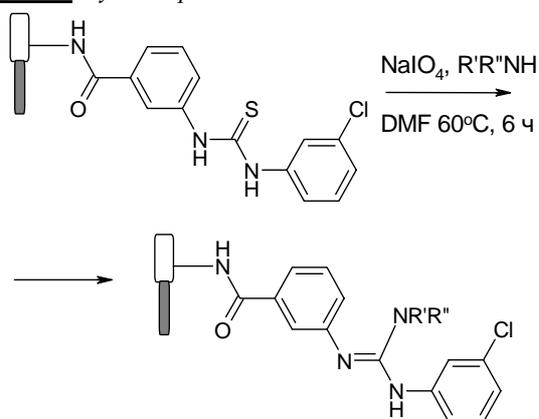
Стадия 5А. Расщепление амида, отделение конечной тиомочевины XAI



Один из лантернов помещают в пластиковую пробирку, добавляют 1 мл 20% (по объему) раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане к каждому лантерну и оставляют на 1 ч. Раствор переносят в пенициллиновую склянку, лантерн дополнительно промывают дихлорметаном (3×1 мл). Объединенные фракции концентрируют сначала на воздухе, а затем, перенеся в пробирку, в вакуумном сушильном шкафу.

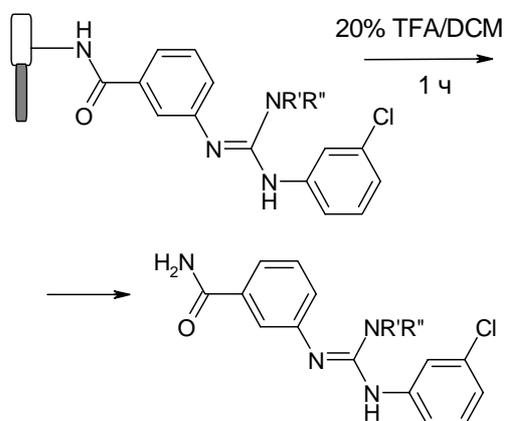
Выделяют около 10 мг N-(*m*-хлорфенил)-N'-(*m*-фенилкарбамид)-тиомочевины XAI. $R_f = 0,7$ (Silufol, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 8/2$). Согласно ТСХ лишние примесей не имеется. Спектр ПМР (рис. 9) не содержит лишних сигналов и полностью соответствует структуре.

Стадия 5Б. Гуанидирование



Три оставшихся лантерна помещают в пластиковые пробирки с номерами 1, 2, 3 и в каждую добавляют по 1 мл свежеприготовленного раствора NaIO_4 (0,1 г, 0,00046 моль), а затем добавляют раствор соответствующего амина **1—3** (0,0007 моль) в DMF. Реакционные смеси выдерживают 6 ч при температуре 60 °С, после чего оставляют на ночь при комнатной температуре. Во всех случаях наблюдается образование осадка. Затем лантерны промывают водой (5×1 мл), DMF (3×1 мл), метанолом (3×1 мл) и DCM (3×1 мл).

Стадия 6. Расщепление амида, отделение конечного гуанидина



В пробирки с лантернами добавляют по 1 мл 20% раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане и оставляют на 1 ч. Растворы переносят в пронумерованные пенициллиновые склянки, лантерны дополнительно промывают DCM (3×1 мл). Объединенные фракции концентрируют сначала на воздухе, а затем, перенеся в новые взвешенные пробирки, в вакуумном сушильном шкафу. Выделяют 8—12 мг конечного гуанидина. Значение $R_f \sim 0,4$ слабо различается для всех трех веществ (Silufol, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 8/2$). Согласно ТСХ имеется незначительная (5—10%) примесь с $R_f = 0,8$. Дополнительная очистка не производилась. В масс-спектрах наблюдаются пики молекулярных ионов, отвечающие расчетным значениям (рис. 9б).

Автор выражает признательность В. Скотту (США, Индиана) за консультации и методики, а также студентке А. Невской за помощь в их переводе. Пакетики со смолами, спектральный анализ продуктов и начальную методику (для адаптации к учебной задаче) любезно предоставил к. х. н. Ю. Сандуленко (ИИХР). Комплект лантернов предоставлен компанией Mimotopes, пробные эксперименты с которыми проводил аспирант А. Леонтьев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаев Е.В., Ермольев Д.С. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2009, т. 53, № 5, с. 42.
2. O'Donnell M.J., Zhou C., Scott, W.L. J. Am. Chem. Soc., 1996, v. 118, p. 6070—6071.
3. Scott W.L., Zhou C., Fang Z., O'Donnell M.J. Tetrahedron Lett., 1997, v. 38, p. 3695—3698.
4. O'Donnell M.J., Delgado F., Dominguez E., de Blas J., Scott W.L. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, v. 12, p. 821—828.
5. Scott W.L., O'Donnell M.J., Alsina J. J. Org. Chem., 2002, v. 67, p. 2960—2969.
6. Scott W.L., Alsina J., O'Donnell M.J. J. Comb. Chem., 2003, v. 5, p. 684.
7. Alsina J., Scott W.L., O'Donnell M.J. Tetrahedron Lett., 2005, v. 46, p. 3131—3135.
8. Scott W. L., O'Donnell, M. J. J. Comb. Chem., 2009, v. 11, p. 3—13.
9. Scott W.L., Alsina J., Audu C.O., Babaev E., Cook L., Dage J.L., Goodwin L.A., Martynow J.G., Matusiuk D., Royo M., Smith J.G., Strong A.T., Wickizer K., Woerly E.M., Zhou Z., O'Donnell M.J. Ibid., 2009, v. 11(1), p. 14—33.
10. <http://www.mimotopes.com/files/pdf/ChemNote2.pdf>.
11. Мозолус В. В., Йокубайтумте С. П. Успехи химии, 1973, т. 42, № 7, с. 1310.
12. Ramadas K., Janarthanan N., Pritha R. Synlett., 1997, № 9, p. 1053.
13. Radl S. Collect. Czech. Chem. Commun., 1992, v. 57(3), p. 656.
14. Spurlock L.A.; Fayter R.G. J. Org. Chem., 1969, v. 34(12), p. 4035.