**Лабораторна робота 5**

**Тема: Методология твердофазного синтеза с использованием «Билл-борда»**

Задача состоит из четырех этапов: (1) алкилирование СH2-группы аминокислоты, иммобилизованной на смоле Ванга (W); (2) удаление защитной группы; (3) ацилирование NH2-группы аминокислоты; (4) удаление дважды модифицированной аминокислоты с подложки



***Реактивы:*** смола 1 (защищенный глицин на смоле Ванга) 2 г, фосфазеновое основание ВЕМР (Aldrich-79432, см. формулу на схеме 1) 5 мл, диизопропилэтиламин (DIEA) 100 мл, трифторуксусная кислота (TFA) (99%) 100 г, водная НСl (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 бензилбромида (расход от 1 до 5 г): незамещенный бензилбромид, мета-бром- и пара-трифторметилпроизводные. В качестве ацилирующих агентов рекомендованы вещества с большим молекулярным весом — 9-флуоренилхлороформиат (Fmoc-Cl) и 2-нафтоилхлорид (по 5 г).

***Хід роботи:***

***Алкирование глицина, иммобилизированного на полимерном носителе***

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 удается 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.

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. 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 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 — ближайшие к впаянным фильтрам) каждого реакционного сосуда.

4. Подготовить три калибровочных пипетки Бераля для добавления бензилирующих агентов 1R1–Br, 2R1–Br и 3R1–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 1R1–Br добавить к смоле в реакционные сосуды первой вертикальной колонки (А1 и В1); 2R1–Br — в сосуды второй вертикальной колонки А2 и В2, 3R1–Br — в сосуды А3 и В3. Добавить по 0,5 мл 0,2 М раствора основания BЕМР в NMP (100 ммоль, 2 экв.) в каждый из шести реакционных сосудов. Завинтить верхние крышки Билл-борда и поместить Билл-борд во вращающий аппарат. 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.

***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.

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 1R2–COCl в NMP (100 ммоль, 2 экв.) к смоле 3 в трех реакционных сосудах, расположенных в первом горизонтальном ряду (А1, А2 и А3). Затем добавить 0,5 мл 0,2 М раствора второго ацилирующего агента 2R2–COCl в NMP (100 ммоль, 2 экв.) к смоле 3 в трех реакционных сосудах, расположенных во втором горизонтальном ряду (В1, В2 и В3). 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.

***Снятие N,C-замещенной аминокислоты с подложки***

12. Вынуть Билл-борд из вращающего аппарата, открыть крышки.

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..

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 CF3COOH-H2O (95:5) и 1 раз 2 мл CH2Cl2, 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. 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.

***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.) Фактический 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 CHCl3/THF/CH3COOH (85/15/2). Хроматограммы наблюдать сначала в лучах УФ лампы, затем проявить йодом. В обоих случаях записать значение Rf.