



УДК 577.150.2.111*110'135:547.741

© 1992 г. В. Н. Бурдъ, К.-Х. ван Пе*, Ф. Лингенс*,
А. И. ВоскобоевФЕРМЕНТАТИВНОЕ ХЛОРИРОВАНИЕ
2-(3,5-ДИБРОМ-2-МЕТОКСИФЕНИЛ)ПИРРОЛАГродненский государственный университет им. Я. Купалы, Республика Беларусь;
* Институт микробиологии университета Хойзхайм, Штуттгарт, ФРГ

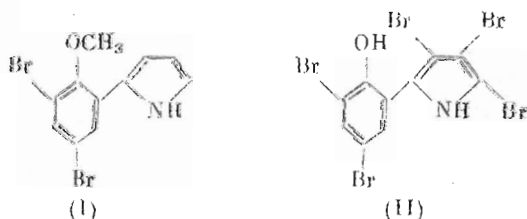
Проведено ферментативное хлорирование 2-(3,5-дибром-2-метоксифенил)пиррола (I), структурного аналога антибиотика пентабромпсойдиллина, катализируемого хлорпероксидазой из *Pseudomonas pyrocinia*. Методом ТСХ из реакционной смеси выделены три монохлор- и три дихлорпроизводные соединения (I), содержащие атомы хлора в пиррольном цикле. Структура синтезированных соединений подтверждена данными ¹H-ЯМР- и масс-спектров.

Галопероксидазы, катализирующие реакцию галогенирования и являющиеся в последнее время объектом интенсивного исследования [1–7], представляют достаточно перспективный класс ферментов. На их основе возможна разработка путей синтеза ряда полезных галогенсодержащих соединений, и в первую очередь, применяемых в медицине; открываются перспективы создания экологически более чистых, исключаящих применение свободных галогенов, технологий. В этом отношении особый интерес вызывают галопероксидазы, выделенные из бактерий [7, 8].

В работе [9] описано выделение и дана характеристика хлорпероксидазы из бактерий *Pseudomonas pyrocinia*. Позже [10] было осуществлено успешное клонирование ее гена в клетки *Escherichia coli*, позволившее создать штамм, продуцирующий фермент в preparативных количествах. Несмотря на заметные успехи в изучении биохимии галогенирующих ферментов, их синтетические возможности и области практического приложения остаются почти неизученными.

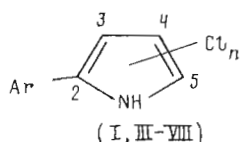
В настоящей работе проведено хлорирование 2-(3,5-дибром-2-метоксифенил)пиррола (I), катализируемое хлорпероксидазой из *P. pyrocinia* (КФ 1.11.1.10: $2RH + 2Cl^- + H_2O_2 = 2RCl + 2H_2O$).

Соединение (I) представляет собой структурный аналог антибиотика пентабромпсойдиллина (II), одного из наиболее активных антибиотиков группы пиррола [11]. Попытка химического хлорирования замещенного пиррола (I) привела к сложной смеси продуктов реакции, среди которых установлены только продукты раскрытия гетероцикла [12].



Ферментативное хлорирование соединения (I) осуществляли в среде натрий-ацетатного буферного раствора (рН 5,5) при ~20° С. В качестве катализатора использовали частично очищенный экстракт клеток субклона *E. coli* [10]. В этих условиях реакция протекала стабильно с

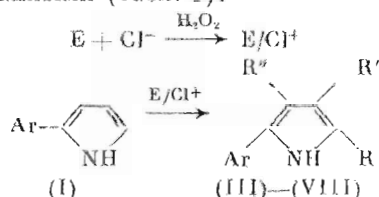
Относительное содержание (%) соединений (I), (III)–(VIII) в реакционной смеси в зависимости от времени реакции



Номер соединения	n	Положение атомов Cl	Время, ч			
			23	72	96	192
(I)	—	—	27,6	4,1	2,5	3,8
(III)	1	5	35,5	55,8	59,2	75,2
(IV)	1	3	25,5	17,2	11,9	2,2
(V)	1	4	2,3	2,4	1,1	0,0
(VI)	2	4, 5	2,4	5,7	7,4	4,1
(VII)	2	3, 4	2,5	3,6	3,1	2,0
(VIII)	2	3, 5	4,1	11,1	14,8	12,7

практически количественным выходом. В реакционной смеси зарегистрированы и методом препаративной ТСХ выделены три монохлор- (III–V) и три дихлорпроизводных (VI–VIII) соединения (I), содержащие атом(ы) хлора в пиррольном цикле. Трихлорпроизводное замещенного пиррола (I) обнаружено не было. Попытки изменением условий реакции (увеличение концентрации перекиси водорода и времени реакции) добиться введения третьего атома хлора в цикл оказались безуспешными.

В присутствии перекиси водорода под действием фермента, вероятно, происходит окисление иона хлора Cl^- со степени окисления -1 до степени окисления $+1$. Образующийся при этом комплекс фермент/ Cl^+ атакует активный к реакциям электрофильного замещения гетероцикл. Введение атома галогена, хлора в особенности, существенно снижает реакционную способность пиррольного цикла к реакциям S_E -типа. Этим, очевидно, и объясняется отсутствие в реакционной смеси аддукта, содержащего три атома хлора. Хорошим подтверждением вышесказанному является соотношение соединений (III–VIII) в реакционной смеси в зависимости от времени реакции (табл. 1). Как показывает анализ резонансных структур промежуточных карбокатионов, для реакции монохлорирования наиболее вероятное соотношение между изомерами описывается неравенством (III) > (IV) > (V) (см. табл. 1 и 2). Реакционная способность этих соединений для включения следующего атома хлора образует обратный ряд: (V) > (IV) > (III). А соотношение между дигалогенсодержащими изомерами, каждый из которых может образовываться при галогенировании двух монохлорпроизводных, будет изменяться в порядке (VIII) > (VI) > (VII). Все приведенные неравенства хорошо согласуются с экспериментальными данными (табл. 1).



(III) $\text{R} = \text{Cl}$, $\text{R}' = \text{R}'' = \text{H}$; (IV) $\text{R} = \text{R}' = \text{H}$, $\text{R}'' = \text{Cl}$; (V) $\text{R} = \text{R}'' = \text{H}$, $\text{R}' = \text{Cl}$; (VI) $\text{R} = \text{R}' = \text{Cl}$, $\text{R}'' = \text{H}$; (VII) $\text{R} = \text{H}$, $\text{R}' = \text{R}'' = \text{Cl}$; (VIII) $\text{R} = \text{R}'' = \text{Cl}$, $\text{R}' = \text{H}$.

Данные ^1H -ЯМР* и масс-спектров соединений (I), (III) — (VIII)

Номер соед.	Выход, %	^1H -ЯМР, δ , м. д. (J, Гц)	m/z (I) [характеристика иона] [†]
(I) *	—	9,62 ушпр. с (1H, NH); 7,62, 7,47 (AB, 2H, H4', H6', J 2,5); 6,85 дд (1H, H5, $J_{5,4} = J_{5,\text{NH}} = 2,8$, $J_{5,3} 1,5$); 6,54 дд (1H, 3H, $J_{3,4} = J_{3,\text{NH}} = 3,8$, $J_{3,2} 1,5$); 6,23 дд (1H, H4, $J_{4,3} = J_{4,\text{NH}} = 3,8$, $J_{4,5} 2,8$); 3,73 с (3H, OCH ₃)	333, 331, 329 (51, 100, 49) [M] ⁺ ; 318, 316, 314 (30, 56, 27) [M - CH ₃] ⁺ ; 237, 235 (25, 26) [M - CH ₃ - Br] ⁺
(III)	55	9,58 ушпр. с (1H, NH); 7,63, 7,53 (AB, 2H, H4', H6', J 2,4); 6,54 дд (1H, H4, $J_{4,\text{NH}} 2,9$, $J_{4,3} 3,8$); 6,14 дд (1H, H3, $J_{3,4} 3,8$, $J_{3,\text{NH}} 2,8$); 3,77 с (3H, OCH ₃)	363, 365, 367, 369 (22, 9, 48, 9, 33, 3, 6, 2) [M] ⁺ ; 348, 350, 352, 354 (19, 1, 42, 2, 29, 8, 5, 5) [M - CH ₃] ⁺ ; 321, 323, 325, 327 (36, 9, 78, 4, 50, 7, 12, 7) [M - CH ₃ - HCN] ⁺ ; 313, 315, 317 (4, 7, 6, 7, 3, 2) [M - CH ₃ - Cl] ⁺
(IV)	17	9,42 ушпр. с (1H, NH); 8,06, 7,60 (AB, 2H, H4', H6', J 2,3); 6,87 дд (1H, H3, $J_{3,\text{NH}} = J_{3,4} = 3,0$); 6,27 дд (1H, H4, $J_{4,\text{NH}} = J_{4,5} = 3,0$); 3,60 с (3H, OCH ₃)	363, 365, 367, 369 (25, 1, 55, 6, 36, 0, 6, 7) [M] ⁺ ; 348, 350, 352, 354 (21, 3, 47, 1, 33, 1, 5, 6) [M - CH ₃] ⁺ ; 328, 330, 332 (16, 8, 26, 0, 12, 7) [M - Cl] ⁺ ; 321, 323, 325, 327 (8, 2, 15, 6, 10, 0, 0, 8) [M - CH ₃ - HCN] ⁺ ; 313, 315, 317 (34, 2, 63, 3, 30, 0) [M - CH ₃ - Cl] ⁺
(V)	3	9,49 ушпр. с (1H, NH); 7,58, 7,54 (AB, 2H, H4', H6', J 2,3); 6,87 дд (1H, H2, $J_{2,4} 1,7$, $J_{2,\text{NH}} 4,5$); 6,52 дд (1H, H4, $J_{4,3} 1,7$, $J_{4,\text{NH}} 2,9$); 3,75 с (3H, OCH ₃)	363, 365, 367, 369 (20, 4, 43, 3, 28, 4, 4, 9) [M] ⁺ ; 348, 350, 352, 354 (12, 4, 28, 4, 19, 1, 2, 7) [M - CH ₃] ⁺ ; 328, 330, 342 (12, 9, 18, 2, 8, 5) [M - Cl] ⁺ ; 321, 323, 325, 327 (20, 9, 44, 4, 28, 9, 2, 3) [M - CH ₃ - HCN] ⁺ ; 313, 315, 317 (8, 9, 17, 3, 8, 0) [M - CH ₃ - Cl] ⁺
(VI)	6	9,53 ушпр. с (1H, NH); 7,55, 7,53 (AB, 2H, H4', H6', J 2,3); 6,52 д (1H, H4, $J_{4,\text{NH}} 1,6$); 3,65 с (3H, OCH ₃)	397, 399, 401, 403, 405 (10, 0, 24, 9, 22, 2, 6, 7, 0, 8) [M] ⁺ ; 382, 384, 386, 388, 390 (10, 0, 26, 0, 22, 7, 7, 8, 0, 9) [M - CH ₃] ⁺ ; 355, 357, 359, 361, 363 (9, 1, 24, 4, 21, 3, 8, 0, 1, 0) [M - CH ₃ - HCN] ⁺ ; 347, 349, 351, 353 (4, 0, 8, 0, 4, 5, 1, 0) [M - CH ₃ - Cl] ⁺
(VII)	4	9,46 ушпр. с (1H, NH); 8,03, 7,67 (AB, 2H, H4', H6', J 2,3); 6,93 д (1H, H5, $J_{5,\text{NH}} 3,3$); 3,62 с (3H, OCH ₃)	397, 399, 401, 403, 405 (9, 3, 25, 7, 19, 9, 6, 7, 1, 2) [M] ⁺ ; 382, 384, 386, 388, 390 (11, 1, 25, 8, 22, 0, 5, 6, 1, 2) [M - CH ₃] ⁺ ; 362, 364, 366, 368 (4, 2, 9, 6, 7, 1, 3) [M - Cl] ⁺ ; 347, 349, 351, 353 (8, 5, 19, 1, 15, 1, 2, 7) [M - CH ₃ - Cl] ⁺
(VIII)	14	9,44 ушпр. с (1H, NH); 8,02, 7,65 (AB, 2H, H4', H6', J 2,3); 6,17 с (1H, H3); 3,65 с (3H, OCH ₃)	397, 399, 401, 403, 405 (7, 8, 20, 9, 18, 0, 5, 6, 0, 7) [M] ⁺ ; 382, 384, 386, 388, 390 (4, 4, 14, 0, 11, 6, 4, 0, 0, 4) [M - CH ₃] ⁺ ; 355, 357, 359, 361, 363 (12, 2, 31, 1, 27, 3, 10, 2, 1, 3) [M - CH ₃ - HCN] ⁺ ; 347, 349, 351, 353 (4, 4, 9, 1, 6, 7, 1, 2) [M - CH ₃ - Cl] ⁺

* По данным работы [31].

Строение синтезированных соединений (III)–(VIII) подтверждено данными ¹H-ЯМР- и масс-спектров (табл. 2). Положения атомов хлора в молекуле определены по химическим сдвигам незамещенных атомов водорода пиррольного цикла. Как видно из данных табл. 2, введение атома хлора в пиррольный цикл незначительно влияет на величины химических сдвигов оставшихся протонов. Аналогичное явление отмечается при галогенировании не только пиррольного, а также фуранового и тиафенового циклов [13].

В масс-спектрах (табл. 2) присутствуют пики молекулярных ионов с характерным изотопным расщеплением 1.00:2.28:1.59:0.31 для монохлорзамещенных изомеров (III)–(V) и 1.00:2.60:2.33:0.83:0.10 для дихлорзамещенных соединений (VI)–(VIII).

Биологическая активность синтезированных соединений (III)–(VIII) исследуется.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H-ЯМР (360 МГц) сняты на спектрометре Bruker WM 250 (Bruker, Karlsruhe – Forchheim, ФРГ) в CDCl₃ с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектры (70 эВ) получены на приборе Varian 3700 (Varian, Bremen, ФРГ). Индивидуальность синтезированных соединений установлена методами ТСХ и ГЖХ на стеклянной капиллярной колонке (25 м, SE-30, расход азота 2,5 л/ч, 120 → 240° С, 10° С/мин).

Ферментный препарат хлорпероксидазы получали следующим образом: биомассу сверхпродукента *Escherichia coli* [10], выращенную в течение 1 сут при 37° С на среде, содержащей бактотриптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), хлористый натрий (5 г/л) и ампициллин (0,1 г/л), суспендировали в 0,1 М растворе ацетата натрия (рН 5,5) и обрабатывали ультразвуком при 0° С в течение 5 мин с периодом в 30 с. Гомогенат центрифугировали (15 000 g, 10 мин) и супернатант подвергали очистке методом частичной денатурации (50° С, 10 мин). Дальнейшую очистку фермента осуществляли с помощью колоночной хроматографии (носитель – DEAE-Sephacel, элюент – градиент 0 → 0,6 М NaCl на фоне 10 мМ буферного раствора ацетата натрия). Активность фермента определяли по методу Хагера [14]. Полученный раствор имел активность 33 ммоль/мл·мин.

Хлорирование 2-(3,5-дихлор-2-метоксифенил)пиррола (I). Реакционную смесь, состоящую из 4 л 1 М буферного раствора ацетата натрия (рН 5,5), 450 мл 1 М раствора хлорида натрия, 55 мл 30% раствора перекиси водорода, раствора 110 мг соединения (I) в 110 мл метанола и 10 мл раствора фермента, инкубировали при ~20° С в течение 24–48 ч. По окончании реакции (ГЖХ) реакционную смесь экстрагировали этилацетатом. Экстракт промывали водой, сушили сульфатом натрия и упаривали. Из остатка выделяли соединения (III)–(VIII) методом препаративной ТСХ на пластинках Silica gel C/U₂₅₄ (Macherey-Nagel). Для первичного разделения в качестве элюента использовали толуол – гексан (1:1), а затем гексан – диэтиламин (8:1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dumontet C., Roussel B. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 14166-14172.
2. Olsen R. L., Little C. // Biochem. J. 1984. V. 209. P. 781-787.
3. Deits T., Farrance M., Kay E. S., Medill L., Turner E. E., Weidman P. J., Shapiro B. M. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 13525-13533.
4. Hewson W. D., Hager L. P. // J. Phycology. 1980. V. 16. P. 340-345.
5. De Boer E., Tromp M. G. M., Plat H., Krenn G. E., Wever R. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 872. P. 104-115.
6. Liu T.-N. E., M'Timkulu T., Geigert J., Wolf B., Neidleman S. L., Silva D., Hunter-Cevera J. C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 142. P. 329-333.
7. Van Pee K.-H. // Biocatalysis. 1990. V. 4. P. 4-9.
8. Van Pee K.-H. // Kontakte. Darmstadt. 1990. N 1. S. 41-47.
9. Wiesner W., van Pee K.-H., Lingens F. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 13725-13732.
10. Wolfram C., van Pee K.-H., Lingens F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 325-328.
11. Andersen R. J., Wolfe M. S., Faulkner D. J. // Marine Biology. 1974. V. 27. P. 281-285.
12. ApSimon J. W., Durham D. G., Rees A. H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1978. P. 1588-1594.
13. Pudeiner H. Synthese sterisch fixierter Phenylpyrrole und Struktur-Wirkungs-Beziehungen am Pentabrompseudilin. Diss. zur Erlangung des Doctorgrades. Göttingen, 1988.
14. Hager L. P., Morris D. R., Brown F. S., Eberwein H. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 1769-1777.

Поступила в редакцию

18.XII.1991

После доработки

21.II.1992

V. N. BURD, K.-H. VAN PEE*, F. LINGENS*, A. I. VOSKOBEOV

ENZYMATIC CHLORINATION OF 2-(3,5-DIBROMO-2-METHOXYPHENYL)PYRROLE

I. Kupala Grodno State University, Republic of Byelarus, Grodno;

*Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart

2-(3,5-Dibromo-2-methoxyphenyl)pyrrole was used as substrate in the enzymatic chlorination by chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. Three monochlorinated and three dichlorinated products were obtained by TLC on silica gel and their structures were elucidated by GC-MS and ¹H NMR. Chlorination always occurred in the pyrrole moiety of the substrate.

Технический редактор Н. Н. Беляева

Сдано в набор 28.04.92	Подписано к печати 19.05.92	Формат бумаги 70×100/32
Офсетная печать	Усл. печ. л. 10,4	Усл. кр.-отт. 12,1 тыс.
	Тираж 678 экз.	Зак. 2736
		Цена 2 р. 60 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Милыуго-Маклая, 18/19, корп. 32, комн. 306
Телефон: 338-60-38

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6