

И. А. Паршиков, П. Б. Терентьев, Н. Ф. Пискунова,
Р. А. Грачева, Г. А. Булахов

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ФЕНИЛПИРРОЛИДОНА-2 МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

При микробиологической трансформации 4-фенилпирролидина растущими штаммами грибов *Cunninghamella*, *Beauveria* и *Penicillium* образуются его 1-этил- и 1-ацетилзамещенные, окисляемые далее в положении 2 и 3, тогда как 1-бензоил-4-фенилпирролидин те же культуры гидроксилируют в положения 3 и 5. 4-Фенилпирролидон-2 не трансформируется этими грибами, а 1-бензоилпирролидон-2 в тех же условиях гидролизует по бензамидной группе. Структуры продуктов трансформации определены методом масс-спектрометрии.

Среди производных пирролидина и пирролидона-2 [циклическая форма γ -аминомасляной кислоты (ГАМК)] найдено несколько биологически высокоактивных препаратов (например, «пирацетам» [1], «фенибут», β -фенил- γ -аминомасляная кислота [2, 3] и др.). С другой стороны, интерес вызывают и гидроксипирролидины [4], являющиеся циклическими аналогами этаноламина, играющего многогранную роль в организме человека.

Ранее нами было установлено [5, 6], что культура гриба *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 способна осуществлять энантиоселективное гидроксילирование N-бензоилпирролидина в положение 3.

В настоящей работе мы идентифицировали все образующиеся в культуральной жидкости азотсодержащие продукты трансформации 4-фенилпирролидина (I), 4-фенилпирролидона-2 (II), 1-бензоил-4-фенилпирролидина (III) и 1-бензоил-4-фенилпирролидона-2 (IV) культурами грибов *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 и *Penicillium simplicissimum* КМ-16.

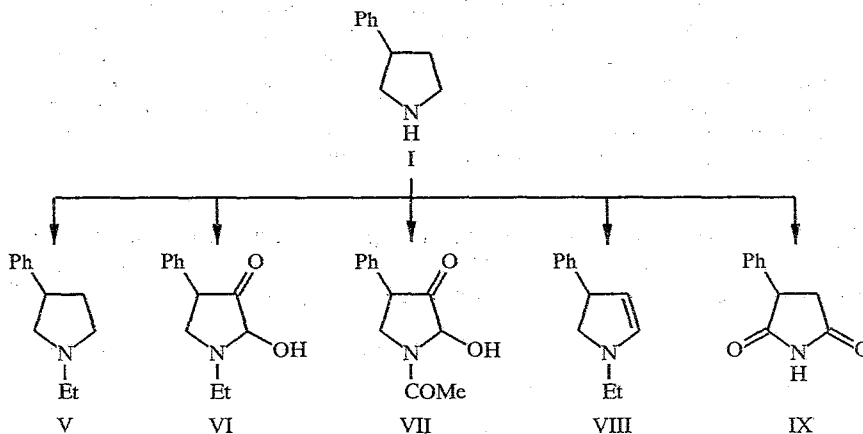
Трансформацию осуществляли в растущей культуре клеток указанных грибных штаммов при pH 5,0 по описанной ранее методике [7, 8]. Субстрат для трансформации вносил в количестве 100 мг/л. Продукты трансформации трехкратно экстрагировали хлороформом из культуральной жидкости при pH 10,0. Хлороформенные экстракты упаривали досуха, остаток растворяли в небольшом количестве метанола и анализировали на хромато-масс-спектрометре HP-5890 Series II/HP-5972, кварцевая капиллярная колонка 30 м \times 0,2 мм с неподвижной фазой HP-5MS с программированием температуры от 70 до 250 °C со скоростью 30 °C/мин. Проведенная газовая хроматография и масс-спектрометрический анализ культуральной жидкости позволил прийти к следующим выводам.

1. Все изученные штаммы в той или иной мере осуществляют трансформацию выбранных субстратов, однако ни в одном из опытов ферментальные ядра в бензильной группе и в положении 4 не затрагивались.

2. В случае 4-фенилпирролидина (I) с незамещенной группой NH последняя, как правило, метилировалась, этилировалась или ацетилировалась. Такие процессы наблюдались ранее на примерах других субстратов [9—11]. Образовавшиеся при этом N-замещенные производные пирролидина частично подвергались дальнейшему гидроксילированию. Так, в экстрактах культуральной жидкости гриба *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (субстрат I) были идентифицированы (схема I) [далее перечисляются: продукт трансформации, время удерживания (мин), масс-спектр: m/z

(относительная интенсивность пиков в %) и путь образования иона]: 4-фенил-1-этилпирролидин (V): 6,52; 175 (26) (M), 174 (15) (M-H), 160 (70) (M-CH₃), 131 (8) (M-C₂H₆N), 117 (14) (M-C₃H₇N), 91 (22) (C₇H₇), 71 (100) (M-C₆H₅CH=CH₂); 2-гидрокси-4-фенил-1-этилпирролидон-3 (VI): 8,11; 205 (22) (M), 190 (29) (M-CH₃), 131 (10) (M-C₂H₅NHCHOH), 130 (18) (M-C₂H₅NHCH₂OH), 118 (25) (C₆H₅CHCO), 117 (40) (C₆H₅C₂O), 101 (100) (M-C₆H₅C₂H₃), 91 (24) (C₇H₇), 77 (10) (C₆H₅); 1-ацетил-2-гидрокси-4-фенилпирролидон-3 (VII): 8,32; 219 (36) (M), 190 (100) (M-C₂H₅), 131 (12) (M-C₃H₇NHCHOH), 118 (22) (C₆H₅CHCO), 117 (35) (C₆H₅C₂O), 115 (70) (M-C₆H₅C₂H₃), 104 (17) (C₆H₅C₂H₃), 91 (27) (C₇H₇), 77 (12) (C₆H₅). Соотношение площадей хроматографических пиков: V—VI—VII 1 : 3 : 6.

Схема 1



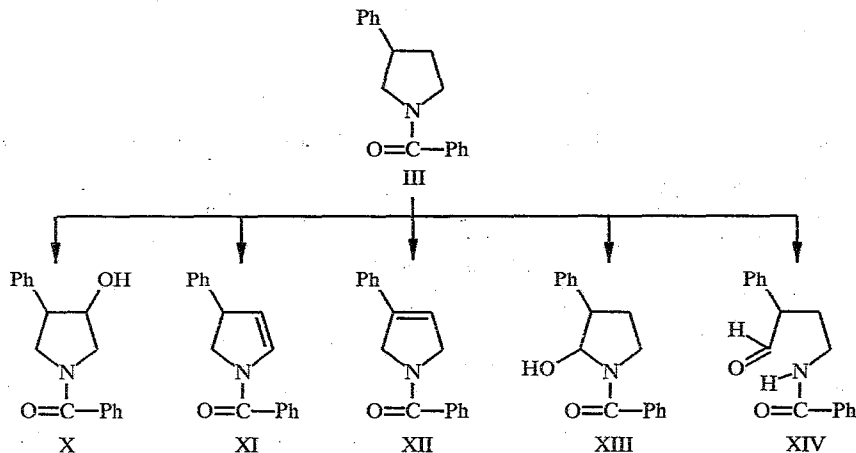
Среди продуктов трансформации пирролидина I штаммом *Penicillium simplicissimum* КМ-16 были найдены лишь следы соединения VII, заметное количество пирролидина V и исходный субстрат. Соотношение площадей хроматографических пиков: I—V—VII 15 : 14 : 1.

Штамм *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 трансформировал добавленный в среду субстрат примерно на 30...40%, а в реакционной смеси были идентифицированы не только соединение V, но и его дегидроаналог, вероятно, 4-фенил-1-этил-4,5-дигидропиррол (VIII): 7,32; 173 (52) (M), 172 (15) (M-H), 171 (16) (M-2H), 158 (100) (M-CH₃), 156 (17) (M-2H-CH₃), 144 (11) (M-H-C₂H₄), 143 (17) (M-3H-C₂H₄), 115 (32) (C₆H₅C₃H₂), 91 (22) (C₇H₇). Кроме того, в реакционной смеси было обнаружено соединение IX, изобарное пирролидину V, но имеющее большее время удерживания (8...10 мин) и резко отличающееся по характеру фрагментации, что позволило предложить для него структуру 4-фенилсукцинимид: 175 (100) (M), 174 (8) (M-H), 147 (5) (M-CO), 130 (30) (M-CH₃NO), 118 (28) (C₆H₅C₂HO), 117 (45) (C₆H₅C₂O), 115 (17) (C₆H₅C₃H₂), 104 (17) (C₆H₅C₂H₃), 71 (50) (C₂HNO₂). Соотношение площадей хроматографических пиков: I—V—VIII—IX 7 : 1 : 1 : 1. Представляет интерес тот факт, что пирролидон II оказался «не по зубам» всем трем штаммам исследуемых грибов и в культуральных жидкостях не удалось обнаружить даже следов каких-либо продуктов трансформации.

1-Бензоил-4-фенилпирролидин (III), в отличие от незамещенного в гетерокольце соединения [8], в заметно большей степени потребляется указанными грибами, в результате чего содержание исходного субстрата в смеси составляло 60...70%. Тем не менее два штамма — *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 и *Penicillium simplicissimum* КМ-16 — примерно в равной степени осуществляли гидроксирование пирролидинового кольца в положение 3 с образованием (схема 2) 1-бензоил-3-гидрокси-4-фенилпирролидина (X): 11,55; 267 (17) (M), 266 (30) (M-H), 162 (65)

(M-C₆H₅CO), 147 (8) (M-C₆H₅C₂H₂OH), 134 (12) (C₆H₅CONHCH₂), 133 (13) (C₆H₅CONCH₂), 105 (100) (C₆H₅CO), 77 (55) (C₆H₅). Наряду с этим соединением в реакционных смесях двух указанных выше грибов было доказано присутствие примерно в равных количествах двух изомерных соединений с молекулярной массой 249. По всей вероятности, эти вещества — 1-бензоил-4-фенил-4,5-дигидропиррол (XI) (*t* = 11,35 мин) и 1-бензоил-4-фенил-2,5-дигидропиррол (XII) (*t* = 1,20 мин) — являются продуктами дегидратации карбинола X. Фрагментация их молекулярных ионов была очень сходна и не давала возможности установить положение кратной связи. Соотношение площадей хроматографических пиков: III—X—XI—XII 8 : 2 : 1 : 1.

Схема 2



Ферментная система штамма *Beauveria bassiana* ATCC 7159 также осуществляла гидроксирование гетерокольца, однако наряду с исходным субстратом III, дигидропирролами XI, XII и гидроксипроизводным X в реакционной смеси были обнаружены два изомера гидроксипирролидана X: 1-бензоил-2-гидрокси-3-фенилпирролидин (XIII): 11,77; 267 (24) (M), 249 (5) (M-H₂O), 176 (5) (M-C₇H₇), 134 (4) (C₆H₅CONHCH₂), 117 (15) (C₆H₅C₃H₄), 105 (100) (C₆H₅CO), 104 (38) (C₆H₅C₂H₃), 91 (7) (C₂H₇), 77 (40) (C₆H₅) и его ациклическая таутомерная форма—4-бензоиламино-2-фенилбутаналь (XIV): 12,91; 267 (87) (M), 162 (7) (M-C₆H₅CO), 147 (8) (M-C₆H₅C₂H₂OH), 134 (25) (C₆H₅CONHCH₂), 120 (10) (C₆H₅C₂H₂OH), 105 (100) (C₆H₅CO), 77 (45) (C₆H₅). Соотношение хроматографических пиков основных соединений: III—(XI, XII)—X—XIII—XIV 22 : 1 : 11 : 8 : 3, т. е. основными продуктами трансформации являлись все же два гидроксисоединения.

Четвертый исследованный нами субстрат, содержащий карбонильные группы как в гетерокольце, так и в заместителе у атома азота, в наименьшей степени подвергался деградации выбранными нами штаммами грибов. Основной процесс бистрансформации был связан с отщеплением бензоильного остатка и образованием N-незамещенного пирролидона II. При этом гриб *Beauveria bassiana* ATCC 7159 осуществлял гидрогенолиз амидной связи с восстановлением группы C=O, поскольку в реакционной смеси были обнаружены бензиловый спирт. Кроме того, штамм *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 гидролитически расщеплял бензоиламидный фрагмент соединения IV и в реакционной смеси накапливалась бензойная кислота. Оценить характер трансформации субстрата IV клетками гриба *Penicillium simplicissimum* KM-16 не представилось возможным, поскольку процесс протекал в незначительной степени и в реакционной смеси были найдены лишь следы соединения II.

Мы намеренно не касались в этом сообщении вопросов стереохимии образовавшихся соединений, поскольку их выделение в индивидуальном виде, идентификация и доказательства тонкого строения требуют большого количества времени и усилий. Тем не менее, не следует исключать возможность того, что по крайней мере в случае последнего субстрата IV процесс расщепления амидной связи ферментными системами микроорганизмов может идти энантиоселективно. Надеемся, что дальнейшие исследования позволят нам подтвердить или опровергнуть эти предположения.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант 93-03-08887), которому авторы выражают глубокую благодарность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шарова Е. В., Потапов А. А., Куликов М. А. // Ж. невропатол. и психот. — 1988. — № 5. — С. 42.
2. Гольдблат Ю. В., Лапин И. П. // Ж. невропатол. и психот. — 1986. — № 8. — С. 1146.
3. Машиковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: Медицина, 1993. — Т. 1. — С. 138.
4. Flanagan D. M., Joullie M. M. // Heterocycles. — 1987. — Vol. 26. — P. 2247.
5. Паришков И. А., Терентьев П. Б., Модянова Л. В. // ХГС. — 1994. — № 11/12. — С. 1510.
6. Паришков И. А., Модянова Л. В., Довгилевич Е. В., Терентьев П. Б., Воробьева Л. И., Гришина Г. В. // ХГС. — 1992. — № 2. — С. 195.
7. А. с. 1789557 СССР / Паришков И. А., Воробьева Л. И., Модянова Л. В., Довгилевич Е. В., Терентьев П. Б. // Б. И. — 1993. — № 3.
8. Терентьев П. Б., Паришков И. А., Гришина Г. В., Пискункова Н. Ф., Чумаков Т. И., Булахов Г. А. // ХГС. — 1997. — № 5. — С. 711.
9. Schwarz G., Lingens F. // Biochemical and Microbial Degradation / Ed. C. Ratlege. — Netherland, Dordrecht, 1994. — P. 459.
10. Dovygilevich E. V., Parshikov I. A., Modyanova L. V., Terent'ev P. B., Bulakhov G. A. // Mendeleev Commun. — 1991. — N 2. — P. 42.
11. Wong C. H., Whitesides G. M. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. — N. Y.: Pergamon Press, 1994. — 360 p.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, химический
факультет, Москва 199899

Поступило в редакцию 11.02.97