

На правах рукописи



**Гирич Елена Валерьевна**

**Низкомолекулярные вторичные метаболиты грибов Южно-Китайского моря**

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии  
им. Г. Б. Елякова ДВО РАН

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук  
**Юрченко Антон Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Жидков Максим Евгеньевич**  
кандидат химических наук, доцент,  
Дальневосточный федеральный  
университет,  
заведующий кафедрой органической химии  
ШЕН ДВФУ

**Яровая Ольга Ивановна**

доктор химических наук, доцент,  
Новосибирский институт органической  
химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
физиологически активных соединений  
НИОХ СО РАН

**Ведущая организация:**

Всероссийский научно-исследовательский  
институт защиты растений РАН,  
г. Санкт-Петербург

Защита состоится 29 ноября 2021 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета 24.1.213.01 в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423)231-40-50, e-mail: [dissovet@piboc.dvo.ru](mailto:dissovet@piboc.dvo.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН).

Текст диссертации и автореферата размещен на сайте [www.piboc.dvo.ru](http://www.piboc.dvo.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Чингизова Е. А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из наиболее богатых источников биологически активных соединений с самого начала их поиска являются микроорганизмы, в частности грибы. Наземные экоформы грибов стали источниками нескольких десятков лекарственных средств от пенициллина и других антибиотиков, до ловастатина, первого коммерческого статина, и финголимода, первого перорального препарата для терапии рассеянного склероза, относительно недавно одобренного FDA и EMA. Однако, в настоящее время из грибов обычных наземных экосистем выделяются в основном известные метаболиты. При этом известно, что экстремальные условия обитания побуждают микроскопические грибы продуцировать наиболее необычные соединения. Одним из вариантов экосистем с экстремальными условиями является морская среда. Физические факторы, воздействующие на морские грибы – это высокое содержание ионов натрия, низкие температуры, олиготрофный тип питания, высокое гидростатическое давление – обуславливают способность морских грибов к синтезу необычных по структуре метаболитов, которые часто обладают разнообразной биологической активностью. Так, из морских грибов были выделены уникальные по структуре биологически активные соединения, которые не были обнаружены у наземных экоформ, несмотря на более чем 70-летнюю историю таких исследований. К таким соединениям относятся большое количество хлорсодержащих метаболитов, макролиды и пептиды с высокой антивирусной активностью. Среди морских грибов были найдены продуценты соединений с фермент-ингибирующей, противовоспалительной, антифунгальной и антибактериальной активностью, в том числе в отношении лекарственно устойчивых штаммов бактерий.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось выделение и установление строения вторичных метаболитов факультативных морских грибов, изолированных из различных субстратов, собранных у вьетнамского побережья Южно-Китайского моря.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести отбор новых перспективных грибов-продуцентов, выделенных из различных субстратов, собранных у вьетнамского побережья Южно-Китайского моря;
- 2) выделить индивидуальные природные соединения из экстрактов изолятов отобранных грибов;
- 3) установить строение новых метаболитов и идентифицировать ранее известные соединения;
- 4) исследовать биологическую активность выделенных соединений.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Из экстрактов штаммов *Penicillium* sp. КММ 4672, *Aspergillus flocculosus* 01NT.1.12.3, *A. niveoglaucus* 01NT.1.10.4 и *A. terreus* LM.1.5, выделенных из различных субстратов Южно-Китайского моря, в результате хроматографического разделения было выделено 61 индивидуальное соединение различной химической природы. При помощи спектральных методов анализа и химических превращений установлено строение 17 новых соединений: четырех дикетопиперазиновых, трех эпидитиодикетопиперазиновых, одного бисиндолбензофуранового и одного триптаминового алкалоидов, меросесквитерпеноида, трех поликетидных производных, двух сесквитерпеноидов, трех циклотрипептидных производных. Идентифицированы структуры 44 ранее описанных соединений.

Впервые исследована цитотоксическая активность и влияние на рост колоний опухолевых клеток ряда метаболитов морских грибов. Впервые изучена нейропротекторная активность ряда известных соединений.

Практическое значение данного исследования состоит в обнаружении штаммов морских грибов - продуцентов противоопухолевых и нейропротекторных низкомолекулярных метаболитов. Новые и известные соединения с высокой биологической активностью являются перспективными для дальнейшего исследования в качестве лекарственных препаратов.

**Положения, выносимые на защиту.**

1) Морской гриб *Penicillium* sp. КММ 4672 является богатым источником дикетопиперазиновых алкалоидов и поликетидных соединений.

2) Морской гриб *Aspergillus niveoglaucus* 01NT.1.10.4 продуцирует новые поликетидные производные нивеоглауцины А и В, а также ряд известных пренилированных индолдикетопиперазиновых алкалоидов, среди которых (+)- и (-)-криптоэхинулины В, впервые выделенные из рацематной смеси как индивидуальные соединения.

3) Предложена возможная схема биосинтеза новых метаболитов гриба *A. niveoglaucus* 01NT.1.10.4 из общего предшественника – ауроглауцина.

4) Морской гриб *A. terreus* LM.1.5 продуцирует новые трипептидные производные, содержащие фрагмент коричной кислоты, а также является богатым источником бисиндолбензохиноновых алкалоидов.

5) Морской гриб *A. flocculosus* 01NT.1.12.3 является источником новых биологически активных дримановых сесквитерпеноидов и их нитробензоильных эфиров, а также тетрациклических меротерпеноидов.

**Апробация работы.** Материалы работы были представлены на III Всероссийской студенческой конференции с международным участием «Химия и химическое образование XXI века» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), 1st Russian-Vietnamese Workshop on Marine Fungal Metabolites and Their Bioactivities (Нячанг, Вьетнам, 2017 г.), международном симпозиуме 3rd International Symposium on Life Science (г. Владивосток, 2018 г.), Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019 г.), международном симпозиуме XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI European Conference on Marine Natural Products (г. Пенише, Португалия, 2019 г.) и XVII Всероссийской молодежной онлайн школы-конференции ТИБОХ ДВО РАН «Актуальные проблемы химии и биологии» (г. Владивосток, 2020 г.)

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России.

**Личный вклад автора в проведение исследования.** Автором был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, получена основная часть результатов, написаны статьи и сделаны доклады на конференциях. На защиту вынесены только те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного некоторым классам вторичных метаболитов морских грибов, выделенных из различных субстратов Южно-Китайского моря, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, включающего 221 цитируемую работу. Работа изложена на 171 странице, содержит 24 таблицы и 47 рисунков.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.х.н. Юрченко А.Н. Также автор благодарит Сметанину О.Ф. за бесценную помощь в работе, сотрудников Нячангского научного института прикладных технологий (г. Нячанг, Вьетнам) Phan Thi Noai Trinh, Ngo Thi Duy Ngoc, д.б.н. Пивкина М.В., к.б.н. Худякову Ю.В., к.б.н. Киричук Н.Н. за выделение, наращивание и определение исследованных штаммов грибов и исследование антибактериальной активности выделенных соединений, д.х.н. Калиновского А.И. и Расина А.Б. за получение ЯМР-спектров, к.х.н. Попова Р.С. за получение масс-спектров, к.х.н. Журавлеву О.И., к.х.н. Колесникову С.А. и к.х.н. Ляхову Е.Г. за полезные научные консультации, к.ф.-м.н. Глазунова В.П. и Ким Н.Ю. за получение ИК, УФ и КД-спектров, Бердышева Д.В. за полный конформационный анализ выделенных соединений расчетными методами, к.б.н. Юрченко Е.А., к.б.н. Менчинскую Е.С., к.б.н. Пислягина Е.А., к.б.н. Чингизову Е.А., д.б.н. Дышлогого С.А., и сотрудников лаборатории экспериментальной онкологии Университетского медицинского центра Гамбург-Эппендорф (г. Гамбург,

Германия) Gunhild von Amsberg и Jessica Hauschild за проведение испытаний биологической активности выделенных соединений.

**Некоторые используемые сокращения:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ТСХ – тонкослойная хроматография; HRESIMS – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением; COSY – корреляционная спектроскопия; DEPT – неискаженное улучшение переносом поляризации; HMBC – гетероядерная корреляция через несколько связей; HSQC – гетероядерная одноквантовая когерентность; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; ИК-спектроскопия – спектроскопия в инфракрасных лучах; КД – круговой дихроизм; КССВ – константа спин-спинового взаимодействия РСА – рентгеноструктурный анализ; УФ-спектроскопия – спектроскопия в ультрафиолетовой (УФ) области электромагнитного спектра; МТРА –  $\alpha$ -метокси- $\alpha$ -(трифторметил)фенилуксусная кислота; 3-ГИМК – 3-гидроксиизомаляновая кислота; ДФПГ – дифенилпикрилгидразил; 6-ГД – 6-гидроксидофамин; ЮКМ – Южно-Китайское море.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Скрининг

Для поиска перспективных источников биологически активных соединений был выделен 451 изолят морских микроскопических грибов из различных субстратов вьетнамского побережья ЮКМ. Далее были получены этилацетатные экстракты каждого гриба и протестированы методом ТСХ. На основании полученных данных для дальнейшей работы были выбраны следующие штаммы: *Penicillium* sp. KMM 4672, *Aspergillus niveoglaucus* 01NT.1.10.4, *A. flocculosus* 01NT.1.12.3 и *A. terreus* LM.1.5.

### Установление строения индивидуальных соединений из *Penicillium* sp. KMM 4672

Гриб был выделен с поверхности бурой водоросли *Padina* sp., собранной в заливе Ванфонг, Южно-Китайское море.

Из этилацетатного экстракта гриба *Penicillium* sp., культивируемого на рисовой среде, были получены новые спиробензофурандикетопиперазины цитриперазины А-D (1-4), новые эпидитиодикетопиперазиновые производные претриходермамиды D-F (5-7) вместе с двумя известными аналогами претриходермамидом С и N-метилпретриходермамидом В, новым оксотриптаминовым алкалоидом 6-гидрокси-N-ацетил- $\beta$ -оксотриптамином (8), а также другие известные соединения: 4-гидроксисциталон, 4-гидрокси-6-дегидроксисциталон, деметилцитреовиранол, 6-метилкурвулиновая кислота, бензохиноны ансеринон В и (+)-формилансеринон В, 3,5-диметил-8-метокси-3,4-дигидро-1Н-изохромен-6-ол, хинолинпирилизинный алкалоид хинолактаид, 4-гидрокси-3,6-диметил-2-пирон, 4-метоксиизохинолин-1(2Н)-он, N,N-диэтил-3-метилбензамид (ДЭТА) и 3-О-метилорселиновая кислота.

Брутто-формула соединения 1 была определена как  $C_{13}H_{16}N_2O_2S_2$  с помощью данных HRESIMS (пик катионированной молекулы  $[M+Na]^+$  при  $m/z$  319.0551), что соответствовало данным спектра  $^{13}C$  ЯМР. Тщательный анализ данных спектров  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР соединения 1, а также спектров DEPT и HSQC, показал наличие двух амидных протонов ( $\delta_H$  8.97, 8.73), двух S-метильных ( $\delta_C$  15.0, 13.3,  $\delta_H$  2.21, 2.27), одной метиленовой ( $\delta_C$  42.9,  $\delta_H$  3.50, 2.96), шести олефиновых метиновых ( $\delta_C$  130.5, 2C, 127.8, 2C, 126.8, 57.9,  $\delta_H$  7.26, 2H, 7.23, 3H, 4.52) групп. Остальные функциональные группы, соответствующие сигналам углерода при  $\delta_C$  165.0 (C), 164.4 (C), 135.2 (C) и 65.3 (C) предполагают наличие двух амидных групп, полностью замещенного  $sp^2$ -гибризованного и одного четвертичного  $sp^3$ -гибризованного атомов углерода.

HMBC-корреляции (рисунок 1) от Н-1 ( $\delta_H$  8.97) к С-3 ( $\delta_C$  57.9) и С-5 ( $\delta_C$  164.4), от Н-4 ( $\delta_H$  8.73) к С-2 ( $\delta_C$  165.0) и С-6 ( $\delta_C$  65.3), а также от Н-3 ( $\delta_H$  4.52) к С-2 позволяют установить структуру дикетопиперазинового кольца. Положение S-метильных групп С-15 ( $\delta_C$  13.3) и С-14 ( $\delta_C$  15.0) при С-3 и С-6 соответственно, было выявлено взаимными HMBC-корреляциями

НС-3/Н<sub>3</sub>C-14 и НМВС-корреляциями от Н<sub>3</sub>-15 к С-6. Группа мультиплетов в протонном спектре при 7.19–7.27 м.д. общей интенсивностью в пять протонов характерна для монозамещенного бензольного кольца, что подтверждается данными спектра <sup>13</sup>С ЯМР и эксперимента HSQC. НМВС-взаимодействия от Н<sub>2</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2.96, 3.50) к С-5, С-6 и С-8 и от Н-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7.26) и Н-13 ( $\delta_{\text{H}}$  7.26) к С-7 ( $\delta_{\text{C}}$  42.9) позволяют установить полную структуру соединения **1**.

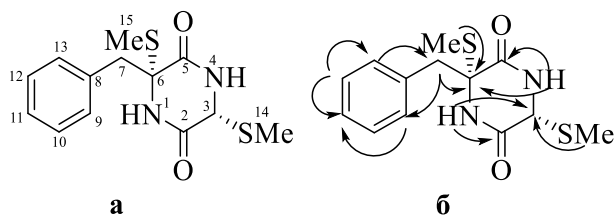


Рисунок 1 – Структура (а) и основные НМВС-взаимодействия (б) цитриперазина А (1)

Величина КССВ Н-3 и Н-4 ( $^3J = 3.4$  Гц) и величина химических сдвигов тиометильных групп позволили установить относительную конфигурацию стереоцентров дикетопиперазинового кольца.

Сравнение данных <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР соединения **1** и известного дикетопиперазинового алкалоида фузаперазина А демонстрирует их близкое сходство, за исключением сигналов бензольного фрагмента. Отличие молекулярной массы на 16 единиц между **1** и фузаперазином А, а также различие в значении химсдвигов в ароматической части позволяют предположить, что соединение **1** является дегидроксилированным производным фузаперазина А. Соединение **1** было названо цитриперазином А.

Абсолютные конфигурации всех стереоцентров известного фузаперазина А ранее были опубликованы как 3*S*, 6*S*. Сходство данных ЯМР соединения **1** и фузаперазина А вместе с разницей значений величин оптического вращения ( $[\alpha]_D^{20}$  +47.1 и –110.8 соответственно) позволило предположить конфигурации 3*R*, 6*R* для цитриперазина А. Это было подтверждено данными КД-спектроскопии и конформационным анализом с использованием нестационарной теории функционала плотности. Сравнение экспериментального и статистически усредненного теоретического спектров КД соединения **1** представлено на рисунке 2.

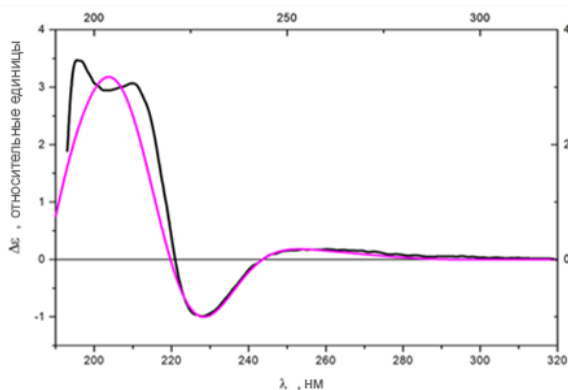


Рисунок 2 – Нормализованные экспериментальный (черный) и расчетный (розовый) спектры КД соединения **1**

HRESIMS соединения **2** содержал пик катионированной молекулы  $[M+Na]^+$  при  $m/z$  319.0551, что позволило определить его брутто-формулу как C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, соответствующую пяти степеням ненасыщенности. Анализ спектров <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С ЯМР выявил наличие двух S-метильных ( $\delta_{\text{H}}$  1.13,  $\delta_{\text{C}}$  9.2;  $\delta_{\text{H}}$  2.16,  $\delta_{\text{C}}$  12.6), одной метиленовой ( $\delta_{\text{H}}$  2.90, 3.48, 42.0  $\delta_{\text{C}}$ ), четырех метиновых ( $\delta_{\text{H}}$  5.02,  $\delta_{\text{C}}$  57.3;  $\delta_{\text{H}}$  7.23,  $\delta_{\text{C}}$  126.9;  $\delta_{\text{H}}$  7.26,  $\delta_{\text{C}}$  127.8;  $\delta_{\text{H}}$  7.23,  $\delta_{\text{C}}$  130.8) и двух амидных карбонильных групп ( $\delta_{\text{C}}$  163.7, 164.3). Оставшиеся сигналы указывают на наличие замещенного ароматического ( $\delta_{\text{C}}$  135.1) и четвертичного ( $\delta_{\text{C}}$  67.5) атомов углерода.

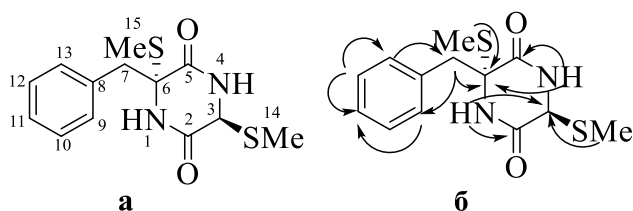


Рисунок 3 – Структура (а) и основные НМВС-корреляции (б) цитриперазина В (2)

Сравнение спектральных характеристик соединения **2** с цитриперазином А (**1**) показало их близкое сходство, за исключением сигналов СН-3 ( $\delta_{\text{C}} 57.3$ ,  $\delta_{\text{H}} 5.02$ ) и СН<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{C}} 9.2$ ,  $\delta_{\text{H}} 1.13$ ) и значительной разницы вицинальных КССВ  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}$  в соединениях **2** (1.7 Гц) и **1** (3.4 Гц), что, в совокупности с литературными данными для фузаперазинов А и В, позволило предположить стереоизомерность этих соединений по С-3. Таким образом, стереоконфигурации хиральных центров **2** были определены как 3*S*,6*R* (рисунок 3). Соединение **2** было названо цитриперазином В.

Цитриперазин С (**3**) был выделен как аморфное бесцветное соединение. Брутто-формула соединения **3** была установлена как C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S на основании данных HRESIMS (пик катионированной молекулы [M+Na]<sup>+</sup> при  $m/z$  409.0832) и подтверждена данными <sup>13</sup>C ЯМР.

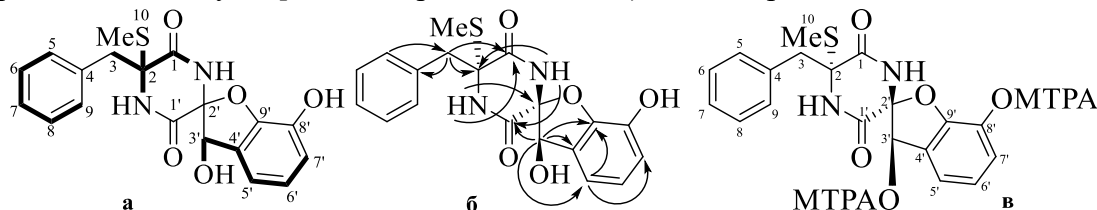


Рисунок 4 – Основные <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (а), основные НМВС взаимодействия (б) и структура МТРА-эфиров (в) цитриперазина С (3)

Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР соединения **3** содержат сигналы двух амидных протонов ( $\delta_{\text{H}} 9.32$ , 8.18), протона гидроксигруппы ( $\delta_{\text{H}} 5.50$ ), S-метильной ( $\delta_{\text{C}} 13.1$ ,  $\delta_{\text{H}} 2.32$ ), метиленовой ( $\delta_{\text{C}} 43.1$ ,  $\delta_{\text{H}} 3.54$ , 3.03), оксигенированной метиновой ( $\delta_{\text{C}} 73.5$ ,  $\delta_{\text{H}} 4.88$ ) и двух амидных карбонильных ( $\delta_{\text{C}} 165.2$ , 164.3) групп, а также двух четвертичных *sp*<sup>3</sup>-гибридизованных атомов углерода ( $\delta_{\text{C}} 90.7$ , 66.1). Оставшиеся сигналы были отнесены к моно- ( $\delta_{\text{C}} 130.3$ , 2C, 127.9, 2C, 126.9;  $\delta_{\text{H}} 7.20$ -7.29, 5H-мультиплет) и тризамещенному бензольным кольцам ( $\delta_{\text{C}} 121.6$ , 116.7, 115.4;  $\delta_{\text{H}} 6.65$ -6.71, 3H-мультиплет). НМВС-корреляции (рисунок 4б) от Н<sub>2</sub>-3 ( $\delta_{\text{H}} 3.54$ , 3.03) к С-7 ( $\delta_{\text{C}} 126.9$ ) и С-5/9, от Н-6/8 ( $\delta_{\text{H}} 7.24$ ) к С-4 ( $\delta_{\text{C}} 134.7$ ) к С-8/6 ( $\delta_{\text{C}} 127.9$ ), и от Н<sub>3</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}} 2.32$ ) к С-2 позволяют определить остаток β-фенилаланина с S-метилом в качестве α-заместителя. Другая часть 2,5-дикетопиперазинового кольца была установлена с помощью анализа НМВС-корреляций от 2-NH ( $\delta_{\text{H}} 9.32$ ) к С-1 ( $\delta_{\text{C}} 165.2$ ) и С-2' ( $\delta_{\text{C}} 90.7$ ) и от 2'-NH ( $\delta_{\text{H}} 8.18$ ) к С-2 ( $\delta_{\text{C}} 66.1$ ) и С-1' ( $\delta_{\text{C}} 164.3$ ). НМВС-корреляции от Н-3' ( $\delta_{\text{H}} 4.88$ ) к С-1', С-2' ( $\delta_{\text{C}} 90.7$ ), С-4' ( $\delta_{\text{C}} 129.3$ ), С-5' ( $\delta_{\text{C}} 115.4$ ) и С-9' ( $\delta_{\text{C}} 144.5$ ), от 2'-NH к С-3' ( $\delta_{\text{C}} 73.5$ ), от Н-5' ( $\delta_{\text{H}} 6.67$ ) к С-3', С-7' ( $\delta_{\text{C}} 116.7$ ) и С-9', вместе с слабополярными химсдвигами атомов С-2', С-6', С-7', С-8' ( $\delta_{\text{C}} 141.1$ ) и С-9' выявили структуру замещенного дигидробензофуранового фрагмента со спиросоединением с дикетопиперазиновым кольцом при С-2'. Наличие двух гидроксигрупп при С-3' и при ароматическом С-8' было предположено на основании характерных значений химических сдвигов атомов углерода, связанных с гидроксильными группами. Кроме того, расположение ОН-группы при С-3' было подтверждено <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY взаимодействиями (рисунок 4а) между 3'-ОН ( $\delta_{\text{H}} 5.51$ ) и Н-3' и вицинальной КССВ ( $^3J_{\text{HH}} 8.0$  Гц). К сожалению, взаимное перекрытие двух сигналов ароматических протонов в бензофурановой части не позволило точно отнести сигналы ароматических протонов и атомов углерода в положениях С-6', С-7' и С-8'.

Спектр ROESY соединения **3** не содержит каких-либо корреляций, которые можно использовать для установления его стереохимии. Тем не менее, была предпринята попытка применить модифицированный метод Мошера для определения абсолютной конфигурации стереоцентра С-3'. Соединение **3** обработали (R)- и (S)-МТРА-хлорангидридами, что привело

к получению соответствующих 3',8'-МТРА-диэфиров (рисунок 4в). Структура бензофуранового фрагмента была точно установлена анализом КССВ (для (*S*)-МТРА-эфира) Н-5' ( $\delta_{\text{H}}$  7.30, уш.д, 7.7 Гц), Н-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.06, т, 7.7 Гц) и Н-7' ( $\delta_{\text{H}}$  7.21, д, 7.7 Гц) вместе с НМВС взаимодействиями от Н-5' к С-7' ( $\delta_{\text{C}}$  124.1), С-9' ( $\delta_{\text{C}}$  148.2), от Н-7' к С-9', и от Н-6' к С-4' ( $\delta_{\text{C}}$  124.9) и С-8' ( $\delta_{\text{C}}$  132.1). К сожалению, разница химических сдвигов в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР указывала на неприменимость метода Мошера к данному соединению.

Молекулярная формула цитриперазина D (**4**) была определена  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$  на основании данных HRESIMS (пик депротонированной молекулы  $[\text{M}-\text{H}]^-$  при  $m/z$  355.0936) и подтверждена данными  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Общие характеристики спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР соединения **4** напоминали таковые у цитриперазина С (**3**), за исключением отсутствия S-метильного сигнала и различий химических сдвигов при С-2 и его ближайшем окружении (2-NH, С-1 и С-3). НМВС-корреляции от Н-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.41, 2.91) к С-1 ( $\delta_{\text{C}}$  167.1), С-2 ( $\delta_{\text{C}}$  81.9), С-4 ( $\delta_{\text{C}}$  134.7) и С-5/9 ( $\delta_{\text{C}}$  130.4), от 2-NH ( $\delta_{\text{H}}$  9.13) к С-1 и С-2' ( $\delta_{\text{C}}$  90.8), и от 2'-NH ( $\delta_{\text{H}}$  8.00) к С-2 и С-1' ( $\delta_{\text{C}}$  164.8) (рисунок 5б) были идентичны таковым у соединения **3** и позволили предположить, что соединение **4** является 2-гидрокси-2-детиометильным производным цитриперазина С (**3**).

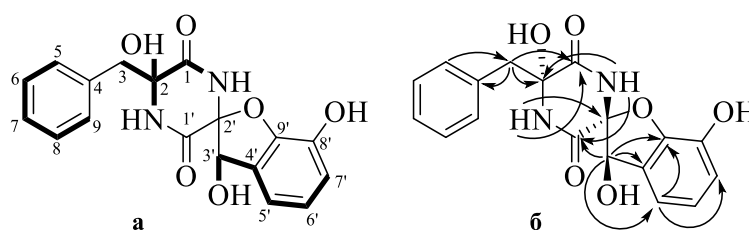


Рисунок 5 – Основные  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (а) и ключевые НМВС взаимодействия (б) цитриперазина D (**4**)

Все возможные конформации цитриперазина D (**4**) были исследованы *in silico*, и полученные результаты были сопоставлены с экспериментальными данными. Полный конформационный анализ всех возможных стереоизомеров соединения **4** был выполнен с использованием нестационарной теории функционала плотности и последующих расчетов спектров КД для отдельных конформеров.

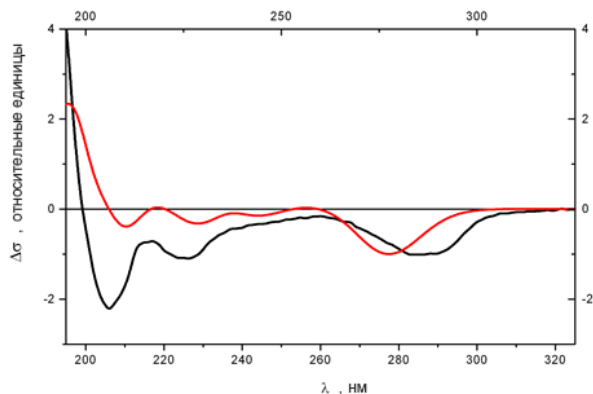
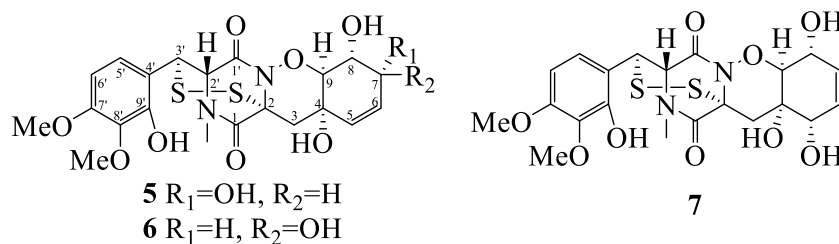


Рисунок 6 – Сравнение экспериментального (черный) и расчетного (красный) КД спектров соединения **4**

Также было выполнено моделирование реальных сольватных оболочек для стереоизомера *RRR*. В результате была определена конформация молекулы, при которой в коротковолновой части спектра ( $200 \text{ nm} < \lambda < 240 \text{ nm}$ ) расчетные спектры КД (рисунок 6) хорошо накладывались на экспериментальные. Более того, для всех возможных стереоизомеров была рассчитана величина угла удельного оптического вращения ( $[\alpha]_D^{20}$ ). Полученные  $[\alpha]_D^{20}$   $-85.7$  для стереоизомера *RRR* соответствовали экспериментальным  $[\alpha]_D^{20}$   $-65.6$ . Таким образом, полученные данные однозначно подтвердили абсолютные конфигурации *2R2'R3'R* для соединения **4**.



Основываясь на аналогичных значениях оптического вращения и данных КД цитриперазинов С ( $[\alpha]_D^{20} -59.6$ ) и D ( $[\alpha]_D^{20} -65.6$ ), мы предложили идентичные абсолютные конфигурации для **3** и **4**.



Спектр HRESIMS соединения **5** содержит пик депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$  511.0857, соответствующий брутто-формуле  $C_{21}H_{24}N_2O_9S_2$ , которая хорошо согласуется с данными  $^{13}C$  ЯМР. Спектры  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР содержат сигналы двух метоксильных групп ( $\delta_C$  60.2, 55.6;  $\delta_H$  3.78, 3.68), одной N-метильной ( $\delta_C$  32.5;  $\delta_H$  2.99), одной метиленовой ( $\delta_C$  38.4;  $\delta_H$  2.33, 2.17) групп, восьми метиновых групп ( $\delta_C$  133.8, 127.4, 81.9, 66.9, 66.2, 66.0, 65.8, 41.4;  $\delta_H$  5.60, 5.56, 5.26, 4.56, 4.55, 4.12, 4.03, 3.74) и двух  $sp^3$ -гибридизованных четвертичных атомов углерода ( $\delta_C$  68.0, 66.9). Остальные функциональные группы, соответствующие углеродным сигналам при  $\delta_C$  165.4, 164.2, 153.0, 147.6, 135.9 и 116.3, позволяют предположить наличие двух амидных карбонильных атомов углерода, трех оксигенированных и одного C-замещенного  $sp^2$ -гибридизованного атомов углерода.

Прямое сравнение  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР-спектров **5** со спектрами претриходермаида С показало их близкое сходство, включая сигналы двух метоксильных ( $\delta_H$  3.68, 3.78;  $\delta_C$  55.7, 60.2), N-метильной ( $\delta_H$  2.96;  $\delta_C$  32.6), фенольной гидроксильной ( $\delta_H$  9.43), двух ароматических метиновых ( $\delta_H$  6.55, 7.32;  $\delta_C$  103.3, 122.6) и двух амидных карбонильных ( $\delta_C$  164.2, 165.4) групп. Таким образом, было сделано предположение, что **5** имеет структуру, аналогичную претриходермаиду С.

НМВС-корреляции от H-3 ( $\delta_H$  2.17, 2.33) к C-4 ( $\delta_C$  66.9), C-5 ( $\delta_C$  133.8) и C-9 ( $\delta_C$  81.9), от 4-OH ( $\delta_H$  5.26) к C-3 ( $\delta_C$  38.4), C-4, C-5 и C-9, от H-9 ( $\delta_H$  4.12) к C-8 ( $\delta_C$  66.2), и от H-7 ( $\delta_H$  4.03) к C-5, C-6 ( $\delta_C$  127.4) и C-8 позволили установить наличие циклогексанового кольца с двойной связью C-5–C-6. Расположение вторичных гидроксильных групп при C-7 и C-8 было подтверждено НМВС-корреляциями от 7-OH ( $\delta_H$  4.89) к C-7 и от 8-OH ( $\delta_H$  4.35) к C-8. Таким образом была установлена «плоская» структура соединения **5**.

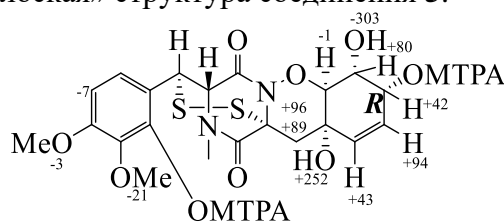


Рисунок 7 – Значения  $\Delta\delta$  ( $\delta_S - \delta_R$ ) (в Гц) для МТРА-эфиров соединения **5**

Обработка соединения **5** хлорангидридами (*R*)- и (*S*)-МТРА привела к этерификации гидроксильных групп при C-7 и C-9' и образованию (*S*)- и (*R*)-бис-МТРА эфиров соответственно. Наблюдаемые химические сдвиги  $\Delta\delta$  ( $\delta_S - \delta_R$ ) (рисунок 7) указывают на конфигурацию 7*R*. Абсолютные конфигурации оставшихся стереоцентров в циклогексановом кольце были установлены как 4*S*,8*R*,9*S* так же, как в адаметизине В (претриходермаиде С) и адаметизине А (N-метилпретриходермаиде В) на основании ROESY взаимодействий (рисунок 19) 7-OH с H-9 и H-9 с 4-OH и 8-OH, а также величин КССВ  $^3J_{H8-H9}$  (9.4 Гц) и  $^3J_{H7-H8}$  (4.6 Гц), которые соответствовали рассчитанным двугранным углам ( $177^\circ$  и  $46^\circ$  соответственно). Абсолютные конфигурации при C-2, C-2' и C-3' были определены как такие же, что и у известных адаметизина А и адаметизина В, на основе совпадения химических сдвигов C-2, C-2' и C-3' для этих, очевидно, биогенетически родственных соединений. Соединение **5** было названо претриходермаидом D.

Брутто-формула соединения **6** была определена как  $C_{21}H_{24}N_2O_9C_2$  на основании HRESIMS пика депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$  511.0869 и данным  $^{13}C$  ЯМР. Основные спектральные характеристики  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР соединения **6** соответствовали таковым для соединения **5**, за исключением протонных и углеродных сигналов C-7 и C-8. HMBC-корреляции от H-7 ( $\delta_H$  3.96) к C-6 ( $\delta_C$  129.7) и C-8 ( $\delta_C$  71.0), от H-9 ( $\delta_H$  3.83) к C-4 ( $\delta_C$  67.0) и C-8 и от 4-OH ( $\delta_H$  5.29) к C-3 ( $\delta_C$  39.0), C-5 ( $\delta_C$  131.8) и C-9 ( $\delta_C$  83.4) позволили доказать, что «плоская» структура соединения **6** идентична структуре претриходермамида D (**5**). Вицинальные КССВ  $J_{H7-H8}$  (7.7 Гц) и  $J_{H8-H9}$  (10.7 Гц) в соответствии с уравнением Карплуса (рассчитанные двугранные углы составляют  $168^\circ$  и  $174^\circ$  соответственно) указывают на аксиальное расположение протонов H-7, H-8 ( $\delta_H$  3.56) и H-9. Такие относительные конфигурации были также подтверждены ROESY-взаимодействиями между H-7 и 8-OH ( $\delta_H$  4.64) и H-9. Абсолютные конфигурации стереоцентров соединения **6** на основании биогенетических соображений были определены такими же, как и для претриходермамида D. Таким образом, соединение **6** является эписмером претриходермамида D по C-7 и было названо претриходермамидом E.

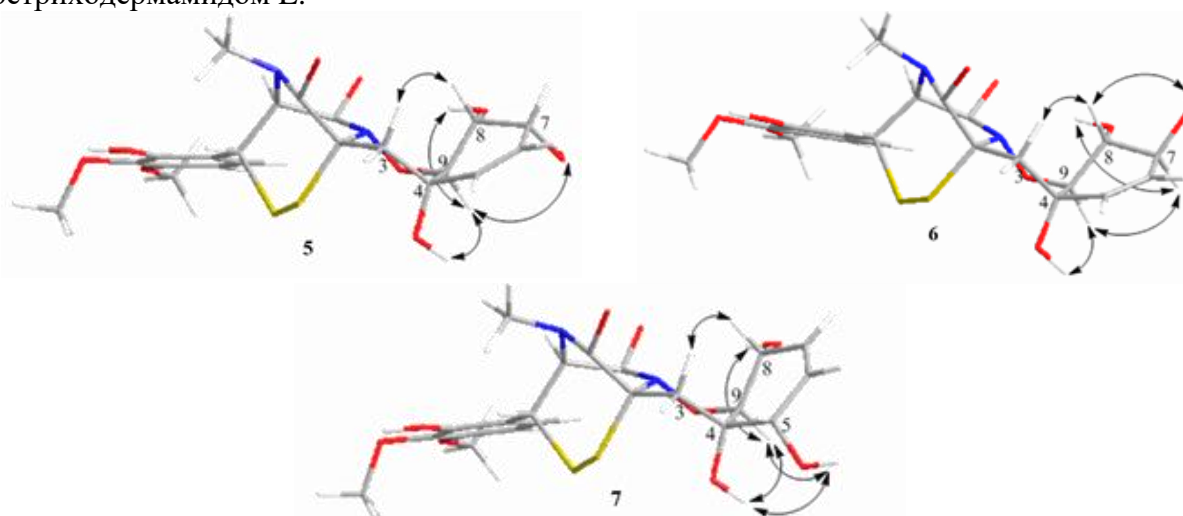


Рисунок 8 – Энергетически минимизированные 3D-модели соединений **5–7**. Ключевые ROESY корреляции показаны стрелками

Молекулярная формула соединения **7** была определена как  $C_{21}H_{24}N_2O_9S_2$  (идентично соединениям **5** и **6**) на основании данных HRESIMS и  $^{13}C$  ЯМР. Данные ЯМР для этого соединения были очень похожи на данные, полученные для претриходермамида C, за исключением сигналов протонов и атомов углерода при C-3, C-4, C-5, C-6 и C-9. HMBC-корреляции от H-5 ( $\delta_H$  3.69) к C-3 ( $\delta_C$  35.6), C-4 ( $\delta_C$  67.4), C-6 ( $\delta_C$  126.9) и C-7 ( $\delta_C$  131.2), от H-8 ( $\delta_H$  4.16) к C-7 и C-9 ( $\delta_C$  83.5), а также от H-9 ( $\delta_H$  3.97) к C-4 и C-8 ( $\delta_C$  64.6) позволяют установить плоскостную структуру циклогексенового кольца с двойной связью между C-6 и C-7. Взаимные ROESY-корреляции (рисунок 8) от H-9 к 4-OH ( $\delta_H$  4.96), 5-OH ( $\delta_H$  5.19) и 8-OH ( $\delta_H$  5.15) доказывают  $\alpha$ -ориентацию 4-OH, таким образом, соединение **7** является эписмером претриходермамида C по C-4. Соединение **7** было названо претриходермамидом F.

Помимо новых претриходермамидов D–F (**5–7**), из этого гриба также были выделены известные претриходермамид C и N-метилпретриходермамид B. Впервые эти соединения были выделены из египетского штамма *Penicillium* sp., изолированного из вод соленого озера, и позже были выделены из *Penicillium adametzioides*, ассоциированного с губкой, и опубликованы под названием адаметизины A и B соответственно. Претриходермамид C также был опубликован как метаболит эндофитного гриба *Penicillium raciborskii*, ассоциированного с багульником болотным (*Rhododendron tomentosum*) под названием оутовирин B. Абсолютная стереохимия для адаметизинов была определена на основе данных PCA и КД.

6-Гидрокси-N-ацетил- $\beta$ -оксотриптамин (**8**) был выделен в виде белого твердого вещества. Спектр HRESIMS соединения **8** содержит пик депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$

231.0772, который указывает на молекулярную формулу  $C_{12}H_{12}N_2O_3$ , соответствующую шести эквивалентам двойной связи. Тщательный анализ данных ЯМР соединения **8** выявил присутствие одной ацетатной метильной ( $\delta_C$  22.4;  $\delta_H$  1.90), одной метиленовой ( $\delta_C$  45.4;  $\delta_H$  4.38 (2H)), четырех метиновых ( $\delta_C$  131.9, 121.5, 111.9, 97.1;  $\delta_H$  8.17, 7.89, 6.80, 6.68) групп, четырех четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода ( $\delta_C$  154.0, 137.6, 118.3, 114.1), одной кетогруппы ( $\delta_C$  189.9) и одного амидного карбонила ( $\delta_C$  169.3). Кроме того, спектр ЯМР  $^1H$  содержит сигнал трех гетероатомных протонов ( $\delta_H$  11.55, 9.14, 8.06).

Значения КССВ NH-1 ( $\delta_H$  11.55, д,  $J = 2.9$  Гц), Н-2 ( $\delta_H$  8.17, д,  $J = 2.9$  Гц), Н-4 ( $\delta_H$  7.89, д,  $J = 8.6$  Гц), Н-5 ( $\delta_H$  6.68, дд,  $J = 8.6, 1.7$  Гц) и Н-7 ( $\delta_H$  6.80, д,  $J = 1.7$  Гц) вместе с HMBC корреляциями (рисунок 9б) от NH-1 к С-3а ( $\delta_C$  118.3), от Н-2 к С-3а и С-7а ( $\delta_C$  137.6), от Н-4 к С-3 ( $\delta_C$  114.1), С-6 ( $\delta_C$  154.0) и С-7а, от Н-5 до С-3а и С-7 ( $\delta_C$  97.1), от Н-7 к С-3а и С-5 и от 6-OH ( $\delta_H$  9.14) к С-5, С-6 и С-7 указывают на присутствие индольного фрагмента с OH-группой при С-6. Это предположение дополнительно подтверждается ROESY взаимодействиями между Н-1/Н-7. HMBC корреляции от метиленовых Н-2' ( $\delta_H$  4.38) к С-1' ( $\delta_C$  189.9) и С-4' ( $\delta_C$  169.3), от NH-3' ( $\delta_H$  8.06) к С-4' и от Н-5' ( $\delta_H$  1.90) к С-4' позволили определить структуру боковой цепи. Расположение боковой цепи у С-3 было установлено с помощью ROESY взаимодействий от Н-2' к Н-2 и Н-4. Таким образом, выяснилось, что структура **8** очень близка к структуре известного N-ацетил- $\beta$ -оксотриптамина, отличаясь наличием гидроксильной группы при С-6.

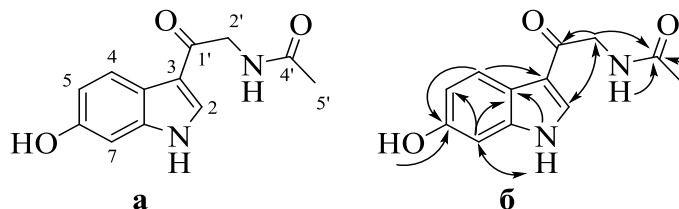


Рисунок 9 – Структура (а) и ключевые HMBC (стрелки) и ROESY (двойные стрелки) (б) корреляции соединения **8**

Мелатониноподобные соединения, близкие по структуре к 6-гидрокси-N-ацетил- $\beta$ -оксотриптамину (**8**), являются характерными метаболитами некоторых видов бактерий, но в грибах практически не встречаются. Это второй случай выделения триптаминовых алкалоидов из микроскопических грибов.

Также из гриба *Penicillium* sp. КММ 4672 выделен ряд известных метаболитов: 6-метилкурвулиновая кислота, ансеринон В, (+)-формилансеринон В, 3,5-диметил-8-метокси-3,4-дигидро-1H-изохромен-6-ол, хинолактаид, 4-гидрокси-3,6-диметил-2-пирон, 4-метоксиизохинолин-1(2H)-он, N,N-диэтил-3-метилбензамид (ДЭТА), 3-O-метилорселиновая кислота, 4-гидроксисциталон, 4-гидрокси-6-дегидроксисциталон и деметилцитреовиранол.

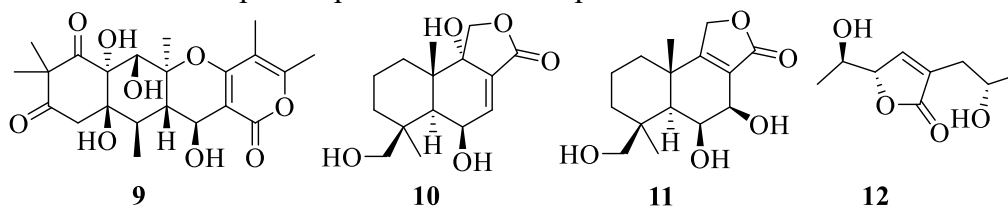
Стоит отметить, что метилкурвулиновая кислота и 4-гидрокси-3,6-диметил-2-пирон впервые описаны как метаболиты морского гриба. Бензохиноны ансеринон В и (+)-формилансеринон В впервые выделены из морского гриба, ассоциированного с водорослями. 4-Метоксиизохинолин-1(2H)-он и ДЭТА являются известными синтетическими производными, но в качестве природных описаны впервые.

#### Установление строения индивидуальных соединений из *Aspergillus flocculosus*

Изолят гриба *A. flocculosus* 01NT.1.12.3 был выделен из образца донных осадков (провинция Кхань Хоа, Вьетнам, Южно-Китайское море).

Из гриба *A. flocculosus* 01NT.1.12.3, культивированного на рисовой среде, были выделены новый меротерпеноид 12-эпи-аспертетранон D (**9**), вместе с известными аспертетранонами А и D, два новых сесквитерпеноида 9 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,14-тригидроксициннамолид (**10**) и 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,14-тригидроксицертифолин (**11**) и их известные *n*-нитробензоильные производные инсуликолид А и 7 $\alpha$ -14-дигидрокси-6 $\beta$ -*n*-нитробензоилцертифолин, известный тетракетид

аспилактонол F вместе со своим новым диастереоизомером аспилактонолом G (**12**), а также известные соединения дигидроаспирион и дикетопиперазиновый алкалоид мактанамид.



Брутто-формула соединения **9** была определена как  $C_{22}H_{28}O_9$  на основании данных HRESIMS (пик катионированной молекулы  $[M+Na]^+$  при  $m/z$  459.1628), что соответствовало данным  $^{13}C$  ЯМР спектров. Детальный анализ  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР-спектров показал наличие шести метильных ( $\delta_C$  25.1, 24.0, 18.5, 17.3, 10.8, 9.5;  $\delta_H$  2.24, 1.89, 1.43, 1.41, 1.39, 1.31), метиленовой ( $\delta_C$  45.6;  $\delta_H$  2.86, 2.76), двух метиновых ( $\delta_C$  39.5, 39.3;  $\delta_H$  2.32, 2.00), двух оксигенированных метиновых ( $\delta_C$  75.15, 63.5;  $\delta_H$  4.63, 4.36) групп, одного четвертичного  $sp^3$ -гибридизованного ( $\delta_C$  55.5), трех оксигенированных четвертичных  $sp^3$ -гибридизованных ( $\delta_C$  83.0, 76.5, 75.07), двух четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных ( $\delta_C$  107.3, 102.2) и трех оксигенированных четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода ( $\delta_C$  164.4, 162.5, 157.9), а также двух кето-групп ( $\delta_C$  211.4, 209.1).

НМВС-корреляции соединения **9** (рисунок 9) показывают наличие линейной тетрациклической структуры, подобной известным меросесквитерпеноидам аспертетранонам А-Д. Основные сигналы в спектре  $^{13}C$  ЯМР соединения **9** были близки к таковым для аспертетранона D, за исключением сигналов C-6, C-11, C-11a, C-12, C-15 и C-18 атомов углерода. Основные эффекты Коттона в экспериментальном спектре КД соединения **9** в метаноле соответствовали таковым для аспертетранона D.

Значение вицинальной КССВ между H-11a и H-12 (9.4 Гц) в соединении **9** (вместо  $^3J_{H_{11a}-H_{12}} = 3.9$  Гц в аспертетраноне D) указывает на  $\beta$ -ориентацию гидроксильной группы при C-12. Таким образом, абсолютная конфигурация хиральных центров в соединении **9** была установлена как 5a*S*, 6*R*, 6a*R*, 10a*R*, 11*R*, 11a*S*, 12*S*. Соединение **9** было названо 12-эпи-асперианон D.

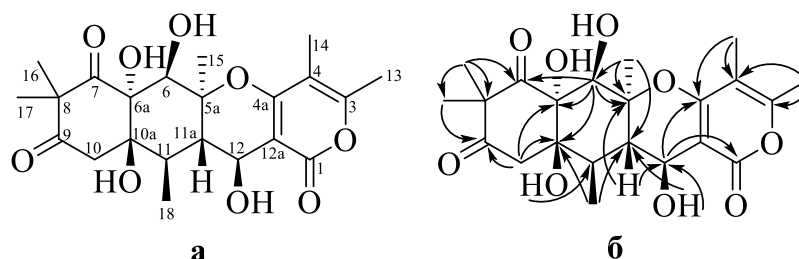


Рисунок 9 – Структура (а) и ключевые НМВС взаимодействия (б) соединения **9**

Молекулярная формула соединения **10** была установлена как  $C_{15}H_{22}O_5$  на основании пика катионированной молекулы при  $m/z$  305.1361  $[M+Na]^+$  в спектре HRESIMS и подтверждена данными  $^{13}C$  ЯМР. Спектры  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР содержат сигналы двух метильных ( $\delta_C$  26.8, 20.8;  $\delta_H$  1.23, 1.15), пяти метиленовых ( $\delta_C$  75.0, 68.4, 42.0, 32.6, 17.6;  $\delta_H$  4.44, 4.41, 4.24, 3.42, 2.13, 1.63, 1.50, 1.50, 1.38, 1.24), трех метиновых ( $\delta_C$  139.1, 63.5, 47.1;  $\delta_H$  6.96, 4.62, 2.00), одной карбонильной ( $\delta_C$  169.6) групп, трех четвертичных  $sp^3$ -гибридизованных ( $\delta_C$  77.5, 39.0, 38.3) и одного четвертичного  $sp^2$ -гибридизованного атома углерода ( $\delta_C$  130.1).

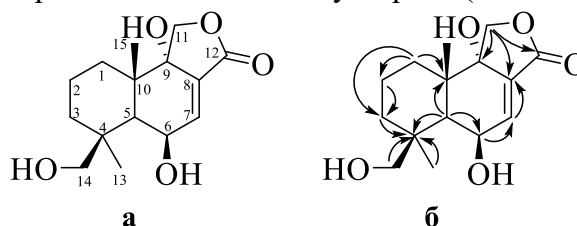


Рисунок 10 – Структура (а) и основные НМВС корреляции (б) соединения **10**

Тщательный анализ  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР данных соединения **10** выявил близкое сходство с данными ЯМР дримановой части известного инсуликолида А, за исключением сигналов С-3 ( $\delta_{\text{C}}$  42.0), С-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.5), С-7 ( $\delta_{\text{C}}$  139.1), С-8 ( $\delta_{\text{C}}$  130.1) и С-14 ( $\delta_{\text{C}}$  68.4). НМВС взаимодействия (рисунок 10б) от Н-1а ( $\delta_{\text{H}}$  1.24) к С-13 ( $\delta_{\text{C}}$  26.8), от Н-1б ( $\delta_{\text{H}}$  2.13) к С-2 ( $\delta_{\text{C}}$  17.6), С-3 ( $\delta_{\text{C}}$  42.0), С-5 ( $\delta_{\text{C}}$  47.1), С-9 ( $\delta_{\text{C}}$  77.5), С-10 ( $\delta_{\text{C}}$  39.0) и С-15 ( $\delta_{\text{C}}$  20.8), от Н-2а ( $\delta_{\text{H}}$  1.50) к С-1 ( $\delta_{\text{C}}$  32.6), С-3, С-4 ( $\delta_{\text{C}}$  38.3), С-9, от Н-2б ( $\delta_{\text{H}}$  1.50) к С-1, С-3, С-4, С-9, от Н-3а ( $\delta_{\text{H}}$  1.38) к С-2, С-4, С-13 ( $\delta_{\text{C}}$  26.8), С-14 ( $\delta_{\text{C}}$  68.4), от Н-3б ( $\delta_{\text{H}}$  1.63) к С-1, С-2, С-3, С-4, С-5 и С-14, от Н-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2.00) к С-4, С-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.5), С-9, С-13, С-14 и С-15, от Н-6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.62) к С-7, С-8 и С-10, от Н-7 ( $\delta_{\text{H}}$  6.96) к С-5, С-9 и С-12 ( $\delta_{\text{C}}$  169.6), от Н-11а ( $\delta_{\text{H}}$  4.24) к С-8, С-9 и С-12, от Н-11б ( $\delta_{\text{H}}$  4.44) к С-9, от Н<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.15) к С-4 и С-14, от Н-14а ( $\delta_{\text{H}}$  3.42) к С-3, С-4 и С-5, от Н-14б ( $\delta_{\text{H}}$  4.41) к С-13, от Н<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1.23) к С-4 и С-13 подтвердили дримановый скелет соединения **10** (рисунок 10а), идентичный таковому в инсуликолиде А.

ROESY взаимодействия Н<sub>3</sub>-13 с Н-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2.00) и Н-6, COSY корреляция W-типа Н<sub>3</sub>-15/Н-5, а также вицинальная КССВ  $^3J_{\text{H}_5\text{-H}_6} = 4.4$  Гц позволили установить относительные конфигурации стереоцентров С-4, С-5, С-6 и С-10. Абсолютные конфигурации хиральных центров соединения **10** были предложены на основании сходства спектров КД и очевидного биогенетического родства с инсуликолидом А, абсолютные стереоконфигурации которого были определены ранее методом РСА. Соединение **10** было названо 6 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,14-тригидроксидриманолоидом.

Молекулярная формула соединения **11** была установлена как  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$  на основании пика катионированной молекулы при  $m/z$  305.1361  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  в спектре HRESIMS, и подтверждена данными ЯМР. Спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР соединения **11** содержат сигналы двух метильных ( $\delta_{\text{C}}$  27.9, 21.6;  $\delta_{\text{H}}$  1.40, 0.97), пяти метиленовых ( $\delta_{\text{C}}$  68.1, 65.6, 37.8, 37.8, 18.0;  $\delta_{\text{H}}$  4.94, 4.79, 3.94, 3.26, 1.71, 1.59, 1.54, 1.45, 1.32, 1.10), трех метиновых групп ( $\delta_{\text{C}}$  70.0, 64.1, 48.6;  $\delta_{\text{H}}$  6.96, 4.62, 2.00), двух четвертичных  $sp^3$ -гибридизованных ( $\delta_{\text{C}}$  38.3, 36.3), двух четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода ( $\delta_{\text{C}}$  173.1, 122.1), трех гидроксильных ( $\delta_{\text{H}}$  5.37, 5.34, 5.23) и одной карбонильной группы ( $\delta_{\text{C}}$  173.4).

НМВС взаимодействия от Н-1а ( $\delta_{\text{H}}$  1.24) к С-13 ( $\delta_{\text{C}}$  26.8), от Н-1б ( $\delta_{\text{H}}$  2.13) к С-2 ( $\delta_{\text{C}}$  17.6), С-3 ( $\delta_{\text{C}}$  42.0), С-5 ( $\delta_{\text{C}}$  47.1), С-9 ( $\delta_{\text{C}}$  77.5), С-10 ( $\delta_{\text{C}}$  39.0) и С-15 ( $\delta_{\text{C}}$  20.8), от Н-2а ( $\delta_{\text{H}}$  1.50) к С-1 ( $\delta_{\text{C}}$  32.6), С-3, С-4 ( $\delta_{\text{C}}$  38.3), С-9, от Н-2б ( $\delta_{\text{H}}$  1.50) к С-1, С-3, С-4, С-9, от Н-3а ( $\delta_{\text{H}}$  1.38) к С-2, С-4, С-13 ( $\delta_{\text{C}}$  26.8), С-14 ( $\delta_{\text{C}}$  68.4), от Н-3б ( $\delta_{\text{H}}$  1.63) к С-1, С-2, С-3, С-4, С-5 и С-14, от Н-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2.00) к С-4, С-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.5), С-9, С-13, С-14 и С-15, от Н-6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.62) к С-7, С-8 и С-10, от Н-7 ( $\delta_{\text{H}}$  6.96) к С-5, С-9 и С-12 ( $\delta_{\text{C}}$  169.6), от Н-11а ( $\delta_{\text{H}}$  4.24) к С-8, С-9 и С-12, от Н-11б ( $\delta_{\text{H}}$  4.44) к С-9, от Н<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.15) к С-4 и С-14, от Н-14а ( $\delta_{\text{H}}$  3.42) к С-3, С-4 и С-5, от Н-14б ( $\delta_{\text{H}}$  4.41) к С-13, от Н<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1.23) к С-4 и С-13 указывают на наличие дриманового ядра в молекуле соединения **11**. Сравнение данных ЯМР соединения **11** с литературными показало его близкое сходство с сесквитерпеноидной частью известного грибного метаболита 7 $\alpha$ ,14-дигидрокси-6 $\beta$ -*n*-нитробензоилконфертифолина.

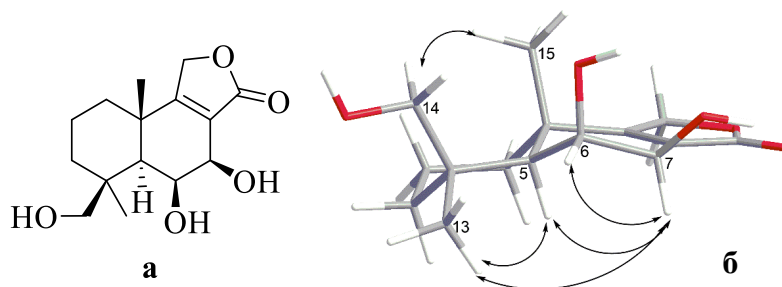


Рисунок 11 – Структура (а) и ключевые ROESY взаимодействия (б) в соединении **11**

ROESY взаимодействия и КССВ  $^3J_{\text{H}_6\text{-H}_7} = 2.1$  Гц указывали на относительные стереоконфигурации в соединении **11**, как показано на рисунке 11б. На основании этих данных был сделан вывод об обратной конфигурации стереоцентра при С-7 в соединении **11**

в сравнении с 7 $\alpha$ ,14-дигидрокси-6 $\beta$ -*n*-нитробензоилконфертифолином. Соединение было названо 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,14-тригидроксиконфертифолином.

Брутто-формула соединения **12** была установлена как C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> на основании данных HRESIMS и подтверждена данными <sup>13</sup>C ЯМР-спектров. Данные ЯМР для соединения **12** были близки к таковым для аспилактонола F. Таким образом, «плоская» структура соединения **12** была предположена такой же как для аспилактонола F.

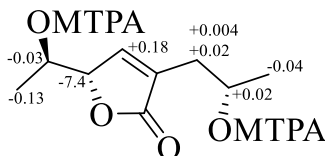


Рисунок 12 – Значения  $\Delta\delta$  ( $\delta_S - \delta_R$ ) (в м.д.) для МТРА-эфиров соединения **12**

Этерификация гидроксильных групп С-6 и С-9 (*R*)- и (*S*)-МТРА хлоридами привела к получению (*S*)- и (*R*)-ди-МТРА-эфиров соответственно. Наблюдаемые разницы химических сдвигов  $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$  (рисунок 12) указывают на 6*R*, 9*S* конфигурации. Абсолютная конфигурация стереоцентра при С-5 была доказана как *S* на основании сильного негативного характеристического эффекта Коттона при  $\lambda_{216} -11.51$  в КД спектре соединения **12** (рисунок 13). Соединение **12** было названо аспилактонол G. Аспилактонол G является новым представителем класса аспиرون-подобных пентакетидов, довольно распространённых в грибах родственных *Aspergillus flocculosus*.

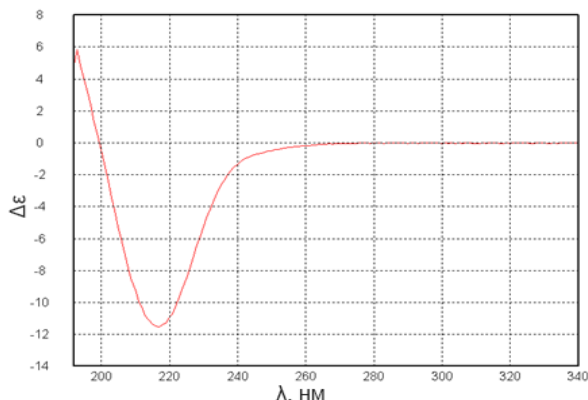


Рисунок 13 – Спектр КД аспилактонола G (**12**) в метаноле

Также были выделены известное родственное аспилактонолу G соединения аспилактонол F и дигидроаспирон, известные *n*-нитробензоильные дримановые производные инсуликолид A и 7 $\alpha$ ,14-дигидрокси-6 $\beta$ -*n*-нитробензоилконфертифолин, а также известный diketopiperazine алкалоид мактанамид.

#### Установление строения индивидуальных соединений из *Aspergillus niveoglaucus*

Штамм гриба *Aspergillus niveoglaucus* 01NT.1.10.4 был выделен из образца донных осадков, отобранного в бухте Нячанг (Вьетнам, Южно-Китайское море).

Из гриба *A. niveoglaucus* в результате культивирования на рисовой среде были получены новые поликетидные производные niveоглауцины A (**13**) и B (**14**), известные пренилированные алкалоиды криптоэхинулины B и D, известные родственные ауруглауцину 5-гидрокси-6-(3-метилбут-2-енил)-2-(пент-1-енил)бензофуран-4-карбальдегид, флавоглауцин, аспергин и изодигидроауруглауцин, а также известные алкалоиды эхинулинового ряда: эхинулин, неоэхинулины B, C, E и неоэхинулин.

Молекулярная формула соединения **13** была установлена как C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> на основании данных HRESIMS и подтверждена данными <sup>13</sup>C ЯМР. Анализ спектров <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР показал наличие метоксильной ( $\delta_C$  56.1;  $\delta_H$  4.80) и семи метиновых ( $\delta_C$  146.7, 139.4, 129.8, 129.3, 122.6, 118.5, 116.8;  $\delta_H$  7.46, 7.36, 7.15, 7.11, 6.91, 6.78, 5.99) групп, трех четвертичных *sp*<sup>2</sup>-

гибридизованных атомов углерода ( $\delta_C$  157.5, 138.4, 126.3) и одной карбоксильной группы ( $\delta_C$  170.7).

Значения КССВ между Н-3 ( $\delta_H$  6.78, дд,  $J=7.9, 0.9$  Hz), Н-4 ( $\delta_H$  7.11; т;  $J=7.9$  Hz) и Н-5 ( $\delta_H$  7.15; дд;  $J=7.9, 0.9$  Hz) вместе с НМВС-корреляциями (рисунок 14б) от Н-3 к С-1 ( $\delta_C$  126.3), С-5 ( $\delta_C$  118.5) и С-1' ( $\delta_C$  139.4), от Н-4 к С-2 ( $\delta_C$  138.4) и С-6 ( $\delta_C$  157.5) и от Н-5 к С-1 и С-3 ( $\delta_C$  116.8) указывают на наличие в структуре тризамещенного (при С-1, С-2 и С-6) бензольного кольца. Структура 2,4-пентадиеновой кислоты в качестве боковой цепи и ее положение при С-2 были однозначно установлены на основании НМВС-корреляций от Н-3 к С-1' ( $\delta_C$  139.4), от Н-1' ( $\delta_H$  7.36) к С-1, С-3 и С-3' ( $\delta_C$  146.7), от Н-2' ( $\delta_H$  6.91) к С-2, и С-4' ( $\delta_C$  122.6), от Н-3' ( $\delta_H$  7.46) к С-1' и С-5' ( $\delta_C$  170.7), и от Н-4' ( $\delta_H$  5.99) к С-2. НМВС взаимодействия от 1-ОМе ( $\delta_C$  56.1,  $\delta_H$  4.80) к С-1, С-2 и С-6, а также ROESY корреляции между 1-ОМе и Н-1' позволяют установить положение метоксигруппы при С-1. Положение гидроксильной группы при С-6 было определено согласно характерному значению химического сдвига у атома С-6 в сочетании с данными HRESIMS. Таким образом, структура соединения **13** была установлена (рисунок 14а), и оно было названо niveoglaucinom A.

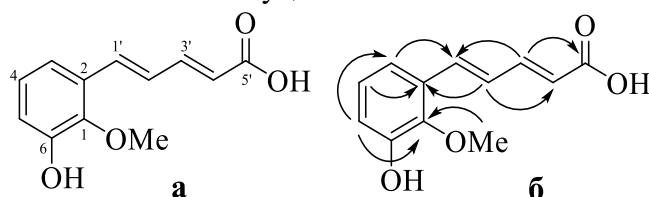


Рисунок 14 – Структура (а) и ключевые НМВС взаимодействия (б) niveоглауцина А (**13**)

HRESIMS соединения **14** содержит пик депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$  279.0872. Это позволило определить брутто-формулу соединения **14** как  $C_{14}H_{16}O_6$ , что соответствует семи эквивалентам двойных связей. Анализ спектров  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР, DEPT и HSQC экспериментов показал наличие одной метильной ( $\delta_C$  14.0;  $\delta_H$  1.13), трех  $sp^3$ -гибридизованных метиленовых атомов углерода ( $\delta_C$  71.7, 65.2, 42.5), двух  $sp^3$ -гибридизованных ( $\delta_C$  82.3, 43.5) и трех  $sp^2$ -гибридизованных метиновых ( $\delta_C$  130.3, 115.2, 113.2), а также трех четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода ( $\delta_C$  152.9, 144.1, 126.1) и двух карбоксильных групп ( $\delta_C$  178.8, 174.5).

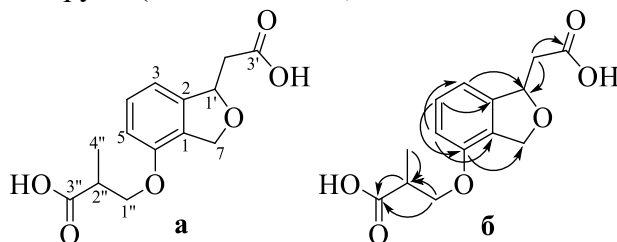


Рисунок 15 – Структура (а) и ключевые НМВС взаимодействия (б) niveоглауцина В (**14**)

Сравнение ЯМР спектров соединения **14** и niveоглауцина А (**13**) показало сходства и позволило предположить наличие подобного тризамещенного бензольного кольца в структуре соединения **14**. Эти предположения подтверждаются НМВС-корреляциями (рисунок 15б) от Н-3 ( $\delta_H$  6.72) к С-1 ( $\delta_C$  126.1) и С-5 ( $\delta_C$  115.2), от Н-4 ( $\delta_H$  7.10) к С-2 ( $\delta_C$  144.1) и С-6 ( $\delta_C$  152.9) и от Н-5 ( $\delta_H$  6.67) к С-1 и С-3 ( $\delta_C$  113.2). В свою очередь, НМВС-корреляции от Н-3 к С-1' ( $\delta_C$  82.3), от Н-5 к С-7 ( $\delta_C$  71.7), от Н<sub>2</sub>-7 ( $\delta_H$  5.06, 4.96) к С-1, С-2, С-6 и С-1', от Н<sub>2</sub>-2' ( $\delta_H$  2.77, 2.59) к С-2, С-1' и С-3' ( $\delta_C$  174.5) доказывают наличие фуранового цикла в положениях С-1/С-2 бензольного кольца с боковой цепью при С-1'. Еще одна боковая цепь была определена как остаток 3-ГИМК на основании данных ESIMS (пик при  $m/z$  193.0506, соответствующий  $[M-C_4H_6O_2]^-$ ) и данным НМВС от Н<sub>2</sub>-1'' ( $\delta_H$  3.71, 3.58) к С-2'' ( $\delta_C$  43.5), С-3'' ( $\delta_C$  178.8) и С-4'' ( $\delta_C$  14.0), от Н-2'' ( $\delta_H$  2.56) к С-1'' ( $\delta_C$  65.2), С-3'' и С-4'', а также от Н<sub>3</sub>-4'' ( $\delta_H$  1.13) к С-1'', С-2'' и С-3''. Положение этого заместителя при С-6 определено в соответствии с характерным значением химсдвига атома С-6 ( $\delta_C$  152.9) и слабых дальних COSY взаимодействий между Н<sub>2</sub>-1'' и Н-5. К сожалению, конфигурации хиральных центров



соединения **14** установлены не были ввиду малых количеств и лабильности вещества. Соединение **14** было названо нивеоглауцином В.

### Предполагаемый путь биосинтеза нивеоглауцинов А (**13**) и В (**14**)

Нами была предложена возможная схема биосинтеза нивеоглауцинов А (**13**) и В (**14**) (рисунок 16). По-видимому, они, как и ближайшие родственные им соединения (флавоглауцин, аспергин и изодигидроауроглауцин), образуются из ауроглауцина, который после частичного восстановления бензольного кольца превращается в прекурсор **i-1** для обоих соединений. Окисление альдегидной группы и частичная окислительная дегградация боковой цепи **i-1** приводит к образованию дигидроксикарбоновой кислоты **i-2**, которая после метилирования превращается в нивеоглауцин А (**13**). Нивеоглауцин В (**14**), вероятно, образуется через восстановление альдегидной группы предшественника **i-1** и последующей частичной окислительной дегградации боковой цепи интермедиата **i-3**, приводящей к получению интермедиата **i-4**. Внутримолекулярная циклизация гидроксиметильной группы с двойной цепью боковой цепи в молекуле промежуточного продукта **i-4** приводит к образованию изобензофурана **i-5**. Далее происходит этерификация интермедиата **i-5** 3-ГИМК с получением нивеоглауцина В (**14**).

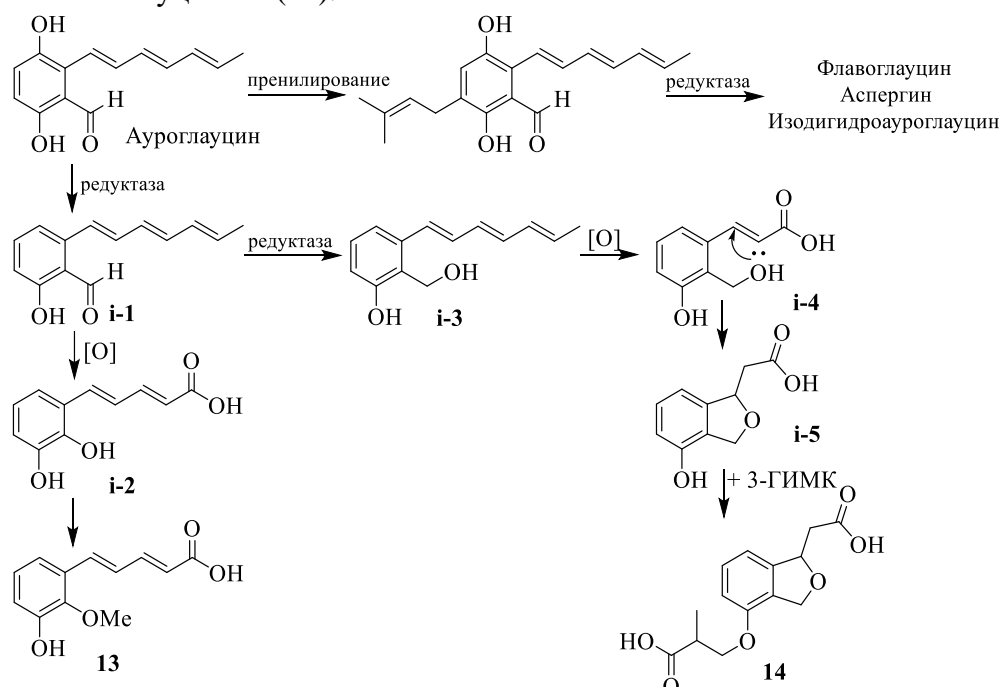


Рисунок 16 – Возможный путь биосинтеза нивеоглауцинов А и В

### Установление строения индивидуальных соединений из *Aspergillus terreus*

Изолят гриба *Aspergillus terreus* LM.1.5 был выделен с поверхности листьев мангрового дерева *Kandelia candel* (провинция Кхань Хоа, Вьетнам, Южно-Китайское море).

Сухой остаток, полученный после упаривания этилацетатного экстракта культуры, делили на колонках с силикагелем, сефадексом LH-20 и методами прямо- и обращенно-фазовой ВЭЖХ. В результате были получены новые трипептиды астеррипептиды А-С (**15-17**) и бисиндолбензохиноновый алкалоид астеррихинон F (**18**), и 10 известных метаболитов: бисиндолбензохиноновые алкалоиды астеррихиноны А3, В4, С1, С2 и D, поликетидные производные 1,2,5-тригидрокси-7-метил-9,10-антрахинон, 4-гидрокси-3-(3-метилбут-2-енил)бензальдегид и квестин, сесквитерпеноид квадрон и производное эргостерина β-гидроксиэргоста-4,7,22-триен-3-он.

Брутто-формула соединения **15** была определена как C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на основании HRESIMS (пик депротонированной молекулы [M-H]<sup>-</sup> при m/z 486.2399) и подтверждена данными спектра <sup>13</sup>C ЯМР. Анализ спектров <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР данного соединения показал наличие двух метильных (δ<sub>H</sub> 0.85, 0.89; δ<sub>C</sub> 12.1, 15.7), пяти метиленовых (δ<sub>H</sub> 1.24, 1.40, 2.09, 2.14, 2.17, 2.50,



3.28, 3.33, 3.79, 3.93;  $\delta_C$  24.1, 24.4, 29.7, 38.5, 47.6), пяти алифатических метиновых ( $\delta_H$  1.97, 2.54, 5.10, 5.22;  $\delta_C$  38.2, 58.2, 59.4, 61.7) и 12 ароматических метиновых ( $\delta_H$  6.73, 7.10 (2H), 7.29 (2H), 7.30, 7.35, 7.36 (2H), 7.51 (2H), 7.66;  $\delta_C$  117.9, 127.8, 127.9 (2C), 128.7 (2C), 128.8 (2C), 129.7, 130.5 (2C), 142.8) групп, двух  $sp^2$ -гибридизованных четвертичных атомов углерода ( $\delta_C$  135.0, 135.1), четырех амидных карбонильных групп ( $\delta_C$  164.6, 168.2, 170.1, 174.7) и одной NH-группы ( $\delta_H$  5.57).

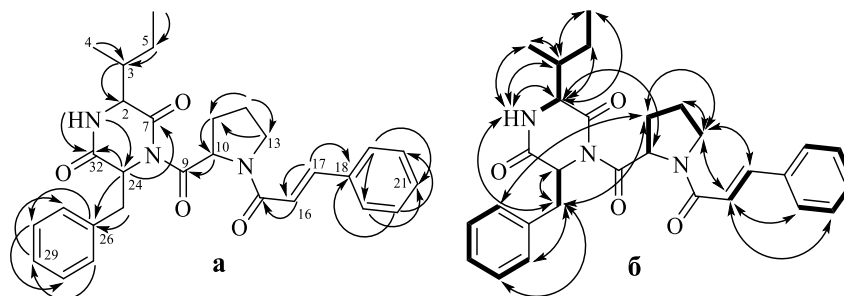


Рисунок 17 – Ключевые HMBC корреляции (а),  $^1H$ - $^1H$  COSY (жирные линии) и  $^1H$ - $^1H$  ROESY (двойные стрелки) взаимодействия (б) соединения **15**

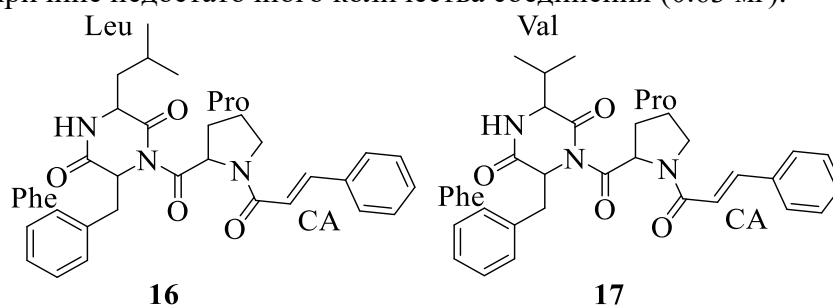
Детальный анализ HMBC,  $^1H$ - $^1H$  COSY и ROESY спектров (рисунок 17) позволил идентифицировать три аминокислотных остатка, включая изолейцин (Ile), пролин (Pro) и фенилаланин (Phe). HMBC-корреляции (рисунок 17а) от H-1 ( $\delta_H$  5.57) к C-2 ( $\delta_C$  59.4), C-7 ( $\delta_C$  170.1), C-24 ( $\delta_C$  58.2) и C-32 ( $\delta_C$  168.2), от H-2 ( $\delta_H$  2.54) к C-7 и C-32, от H-24 ( $\delta_H$  5.57) к C-7 и C-32 указывали на присутствие дикетопиперазинового кольца, сформированного из остатков изолейцина и фенилаланина. HMBC-взаимодействия (рисунок 17а) от H-16 ( $\delta_H$  6.73) к C-15 ( $\delta_C$  164.6), C-17 ( $\delta_C$  142.8) и C-18 ( $\delta_C$  135.1), от H-17 ( $\delta_H$  6.73) к C-16 ( $\delta_C$  117.9), C-18 и C-19 ( $\delta_C$  127.9), от H-19 ( $\delta_H$  7.51) к C-17, C-21 ( $\delta_C$  129.7) и C-23 ( $\delta_C$  127.9), от H-20 ( $\delta_H$  7.36) к C-22 ( $\delta_C$  128.8) и C-18, от H-21 ( $\delta_H$  7.35) к C-19 и C-23, от H-23 ( $\delta_H$  7.51) к C-21, C-19 и C-17, а также данные HRESIMS (пики при  $m/z$  486.2399 [ $M-H$ ] $^-$ ) и 345.1611 [ $M-H-C_9H_7O$ ] $^-$ ) позволили определить структуру остатка коричной кислоты. Положение этого фрагмента при аминогруппе пролина было установлено на основании данных спектра ROESY (рисунок 17б), содержащего взаимодействия между H-13а ( $\delta_H$  3.93) и H-16 ( $\delta_H$  6.73), H-13б ( $\delta_H$  3.79) и H-16, а также между H-13а/б и H-17 ( $\delta_H$  7.66). Таким образом, «плоская» структура соединения **15** была установлена.

Абсолютные конфигурации соединения **15** были установлены методом Мерфи. В результате анализа *L*-FDAА-производные аминокислотных остатков, полученных в результате гидролиза соединения **15**, были производным стандартных образцов *L*-Ile, *L*-Pro и *D*-Phe. Таким образом, конфигурации асимметрических центров при C-2, C-10 и C-24 были установлены как 2*S*, 10*S*, 24*R*. Соединение **15** было названо астеррипептидом А.

Брутто-формула соединения **16** была установлена как  $C_{29}H_{33}N_3O_4$  на основании HRESIMS (пик депротонированной молекулы  $m/z$  486.2399 [ $M-H$ ] $^-$ ) и была подтверждена данными спектра  $^{13}C$  ЯМР. Анализ спектров  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР соединения **16** показал наличие двух метильных ( $\delta_H$  0.70, 0.88;  $\delta_C$  20.7, 23.1), пяти метиленовых ( $\delta_H$  1.52, 1.67, 2.09, 2.12, 2.17, 2.48, 3.28, 3.33, 3.79, 3.90;  $\delta_C$  29.6, 29.7, 38.5, 40.7, 47.6), четырех алифатических метиновых ( $\delta_H$  2.07, 2.48, 5.17, 5.22;  $\delta_C$  24.4, 52.6, 58.2, 61.8) и 12 ароматических метиновых ( $\delta_H$  6.73, 7.10 (2H), 7.29 (2H), 7.30, 7.35, 7.36 (2H), 7.51 (2H), 7.66;  $\delta_C$  117.9, 127.8, 127.9 (2C), 128.7 (2C), 128.8 (2C), 129.7, 130.5 (2C), 142.8) групп, двух  $sp^2$ -гибридизованных четвертичных атома углерода ( $\delta_C$  135.1, 135.2), четырех амидных карбонильных групп ( $\delta_C$  164.6, 168.2, 170.8, 175.0), и одной NH-группы ( $\delta_H$  5.62).

Детальное сравнение данных  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР-спектров соединений **15** и **16** показало их близкое сходство, за исключением сигналов в дикетопиперазиновом кольце, а именно C-3 ( $\delta_C$  40.7), C-4 ( $\delta_C$  24.4), C-5 ( $\delta_C$  23.1) и C-6 ( $\delta_C$  20.7), а также характера расщепления сигналов протонов при этих атомах. Эти данные совместно с HMBC-взаимодействиями от H-4 ( $\delta_H$  2.07) к C-2, C-3, от H-5 ( $\delta_H$  0.88) к C-2 и C-3, а также от H-6 ( $\delta_H$  0.70) к C-3 свидетельствуют о наличии остатка лейцина в дикетопиперазиновом кольце соединения **16** вместо изолейцина в

соединении **15**. Таким образом, соединение **16** является изомером соединения **15**. Соединение **16** было названо астеррипептидом В. Абсолютные конфигурации астеррипептида В не были установлены по причине недостаточного количества соединения (0.63 мг).



Брутто-формула соединения **17** была установлена как  $C_{28}H_{31}N_3O_4$  на основании HRESIMS (пик депротонированной молекулы  $m/z$  472.2238  $[M-H]^-$ ) и была подтверждена данными спектра  $^{13}C$  ЯМР. Детальный анализ спектров  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР соединения **17** показал наличие двух метильных ( $\delta_H$  0.90, 0.93;  $\delta_C$  15.8, 18.9), четырех метиленовых ( $\delta_H$  1.24, 1.40, 2.08, 2.14, 2.18, 2.49, 3.28, 3.34, 3.79, 3.94;  $\delta_C$  24.4, 29.7, 38.6, 47.6), четырех алифатических ( $\delta_H$  2.31, 2.60, 5.11, 5.22;  $\delta_C$  31.7, 58.0, 59.8, 61.6) и двенадцати ароматических метиновых ( $\delta_H$  6.72, 7.10 (2H), 7.29 (3H), 7.34, 7.35 (2H), 7.51 (2H), 7.66;  $\delta_C$  117.8, 127.8, 127.9 (2C), 128.7 (2C), 128.8 (2C), 129.7, 130.6 (2C), 142.9) групп, двух  $sp^2$ -гибридизованных четвертичных атома углерода ( $\delta_C$  134.9, 135.1), четырех амидных карбонильных групп ( $\delta_C$  164.6, 168.2, 170.2, 174.6) и одной NH-группы ( $\delta_H$  5.67).

Детальный анализ НМВС,  $^1H$ - $^1H$  COSY и ROESY спектров показал, что соединение **17** является близким по структуре к астеррипептидам А (**15**) и В (**16**), но содержит остаток валина в дикетопиперазиновом фрагменте вместо изолейцина/лейцина в случае соединений **15** и **16**. Аналогично астеррипептиду В соединение **17** было получено в очень малых количествах (0.51 мг), что не позволило установить абсолютные конфигурации хиральных центров соединения. Соединение **17** было названо астеррипептидом С.

Стоит отметить, что это первый случай выделения метаболитов морских грибов, содержащих в своей структуре остаток коричной кислоты.

Пик катионированной молекулы  $[M+Na]^+$  при  $m/z$  439.1257 в HRESIMS соединения **18** соответствует молекулярной формуле  $C_{24}H_{20}N_2O_5$  (рассчитано для  $C_{24}H_{20}N_2O_5Na$ , 439.1264), что подтверждается данными спектра  $^{13}C$  ЯМР. Тщательный анализ спектров  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР вместе с экспериментами DEPT и HSQC показал наличие десяти метиновых групп ( $\delta_C$  130.1, 125.0, 124.8, 122.7, 120.4, 120.3, 120.1, 111.4, 109.9, 104.6;  $\delta_H$  7.78, 7.47, 7.43, 7.29, 7.24, 7.18, 7.14, 6.88, 6.70, 6.24), одного четвертичного  $sp^3$ -гибридизованного ( $\delta_C$  90.3) и 11 четвертичных  $sp^2$ -гибридизованных атомов углерода ( $\delta_C$  148.6, 144.9, 141.3, 139.1, 138.3, 136.2, 129.7, 126.5, 121.6, 116.7, 106.7), двух метоксильных групп ( $\delta_C$  61.5, 60.4;  $\delta_H$  4.12, 3.58), а также двух протонов, связанных с гетероатомами ( $\delta_H$  8.44, 5.06).

НМВС корреляции (рисунок 18а) от  $1''$ -NH ( $\delta_H$  8.44) к C-3'' ( $\delta_C$  106.7), C-3a'' ( $\delta_C$  126.5), от H-2'' ( $\delta_H$  7.29) к C-3'' ( $\delta_C$  106.7), C-3a'' и C-7a'' ( $\delta_C$  136.2), от H-4'' ( $\delta_H$  7.47) к C-3'', C-6'' ( $\delta_C$  122.7) и C-7a'', от H-5'' ( $\delta_H$  7.14) к C-3a'' и C-7'' ( $\delta_C$  111.4), от H-6'' ( $\delta_H$  7.24) к C-4'' ( $\delta_C$  120.3) и C-7a'', от H-7'' ( $\delta_H$  7.43) к C-3a'' и C-5'' ( $\delta_C$  120.4), а также  $^1H$ - $^1H$  COSY корреляции (рисунок 18б)  $1''$ -NH/H-2'', H-4''/H-5'', H-5''/H-6'' и H-6''/H-7'' позволяют установить структуру монозамещенного индольного фрагмента. НМВС корреляции (рисунок 18в) от H-2' ( $\delta_H$  6.24) к C-3' ( $\delta_C$  90.3), C-3a' ( $\delta_C$  129.7) и C-7a' ( $\delta_C$  148.6), от H-4' ( $\delta_H$  7.78) к C-3', C-7a' и C-6' ( $\delta_C$  130.1), от H-5' ( $\delta_H$  6.88) к C-3a', C-7' ( $\delta_C$  109.9), от H-6' ( $\delta_H$  7.18) к C-4' ( $\delta_C$  125.0) и C-7a'', от H-7' ( $\delta_H$  6.70) к C-3a' и C-5' ( $\delta_C$  120.1),  $^1H$ - $^1H$  COSY корреляции (рисунок 18б) H-4'/H-5', H-5'/H-6', и H-6'/H-7', а также величины химических сдвигов атомов C-2' ( $\delta_C$  104.6) и C-3' показывают наличие дизамещенного индолинового фрагмента. Гексазамещенное бензольное кольцо с гидроксильной группой при C-1 и метоксильными группами при C-3 и C-6 было установлено на основании НМВС корреляций (рисунок 18в) от 6-OMe ( $\delta_H$  4.12) к C-6 ( $\delta_C$  139.1), от 3-OMe ( $\delta_H$  3.58) к C-3 ( $\delta_C$  138.4), от 1-OH ( $\delta_C$  5.06) к C-1, C-2 ( $\delta_C$  116.7) и C-6, были отнесены к 3,6-

диметокси-1-гидроксибензольному кольцу. Соединение индолинового и бензольного фрагментов было однозначно доказано НМВС взаимодействиями от Н-2' к С-2 и С-3, и значениями химических сдвигов атомов С-2, С-3, С-2' и С-3'. Таким образом, установлена структура тетрациклической системы, состоящей из индолин-бензофуранового фрагмента. Соединение индолинового и бензольного фрагментов было однозначно доказано НМВС взаимодействиями (рисунок 18г) от Н-2" к С-2 и С-3, и значениями химических сдвигов атомов С-2, С-2" и С-3".

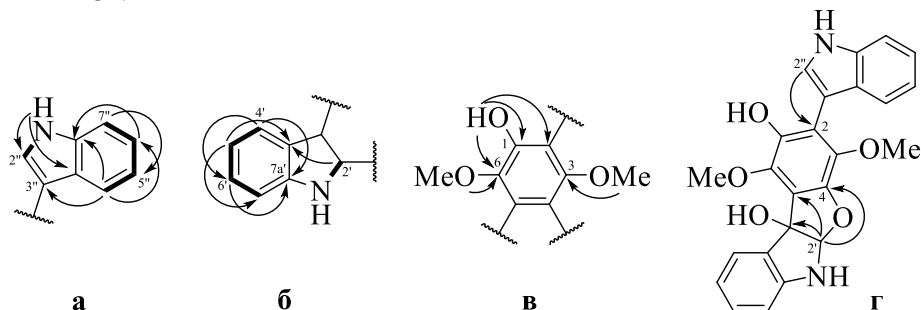


Рисунок 18 – Ключевые НМВС (показаны стрелками) и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (показаны жирными линиями) корреляции в различных фрагментах молекулы **18** (а, б – индолиновый и индолиновый фрагменты, в – гидрохиноновый фрагмент, г – вся молекула целиком)

Прямое сравнение данных спектров ЯМР соединения **18** с литературными данными для известного соединения вариолоида D выявило близкое сходство, за исключением сигналов С-1, С-2, С-4, С-6 С-3" в соединении **18**. Эти данные доказывают наличие тетрациклической системы, образованной восстановлением С-2' и С-3' в индолиновой части с последующей циклизацией по С-4 и С-2'. Таким образом, соединение **18** имеет «плоскую» структуру 3-(1Н-индол-3-ил)-1,4-диметокси-5а,6-дигидро-10bН-бензофурано[2,3-б]индол-2,10b-диола.

Абсолютные конфигурации стереоцентров С-2' и С-3' в соединении **18** были определены на основе сравнения экспериментальных данных КД соединения **18** с таковыми для близкородственного известного вариолоида С. Соединение **18** было названо астеррихиномом F. Следует отметить, что соединение с такой плоской структурой уже было описано Араи и Ямамото как неназванное производное астеррихинона D. Тем не менее, эти авторы не представили надежных доказательств установления структуры. Сходство значений  $[\alpha]_D^{20}$  астеррихинона F (**18**) и безымянного соединения из статьи Араи и Ямамото (+47 и +39 соответственно) может указывать на идентичность этих соединений.

Помимо новых соединений, из гриба *Aspergillus terreus* были выделены известные бисиндолбензохиноновые алкалоиды астеррихиноны АЗ, В4, С1, С2 и D, поликетидные производные 1,2,5-тригидрокси-7-метил-9,10-антрахинон, 4-гидрокси-3-(3-метилбут-2-енил)бензальдегид и квестин, сесквитерпеноид квадрон и производное эргостерина β-гидроксиэргоста-4,7,22-триен-3-он. Это первый случай описания 1,2,5-тригидрокси-7-метил-9,10-антрахинона как природного соединения, а 4-гидрокси-3-(3-метилбут-2-енил)бензальдегида – как метаболита морского микроскопического гриба.

### Биологическая активность выделенных соединений

#### Биологическая активность метаболитов *Penicillium* sp. КММ 4672

Показано, что N-метилпретриходермамид В обладает высокой токсичностью в отношении клеток рака предстательной железы 22Rv1, PC-3 и LNCaP линий с ИК<sub>50</sub> 0.51, 5.11 и 1.76 мкМ соответственно. Также было показано, что это соединение в концентрации 1 мкМ вызывает апоптоз в 31.3 % клеток рака предстательной железы человека 22Rv1 в течение 48 ч.

Впервые была показана токсичность ансеринона и (+)-формилансеринона В в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха с ЭД<sub>50</sub> 46.1 и 35.7 мкМ соответственно. Была показана слабая антиоксидантная активность 3,5-диметил-8-метокси-3,4-дигидро-1Н-

изохромен-6-ола, который в концентрации 100 мкМ связывал 35% свободных радикалов ДФПГ.

#### **Биологическая активность метаболитов *Aspergillus niveoglaucus***

Была показана умеренная токсичность неоэхинолинов В (ИК<sub>50</sub> 50.9 мкМ) и С (ИК<sub>50</sub> 40.6 мкМ) в отношении клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a.

Была показана умеренная токсичность в отношении клеток рака предстательной железы человека, резистентных к лекарственным средствам (22Rv1, PC-3) и чувствительных к лекарственным средствам (LNCaP) эхинолина (ИК<sub>50</sub> 63.2, 41.7 и 25.9 мкМ соответственно) и неоэхинолина (ИК<sub>50</sub> 49.9, 63.8 и 38.9 мкМ соответственно). Впервые было показано, что неоэхинолин связывает свободные радикалы ДФПГ с ИК<sub>50</sub> 62.6 мкМ.

Впервые показана нейропротекторная активность для (+)- и (-)-криптоэхинолинов В в отношении клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a, подвергнутых действию токсинов паракватом, 6-ГД и ротеноном. Оба соединения повышали жизнеспособность клеток, инкубированных с паракватом, на 21.6% и 54.4% соответственно. При этом показано, что в случае использования 6-ГД только (+)-криптоэхинолин В повышал жизнеспособность клеток на 40.7%, тогда как в случае использования ротенона только (-)-криптоэхинолин В повышал жизнеспособность клеток на 79.6%.

#### **Биологическая активность метаболитов *Aspergillus flocculosus***

Показано, что соединение **10** его *n*-нитробензоильное производное 9α,14-дигидрокси-β-*n*-нитробензоилциннамолид проявляли цитотоксическую активность в отношении клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a с ИК<sub>50</sub> 24.1 мкМ и 4.9 мкМ соответственно. Было показано, что эти два соединения также были токсичны в отношении лекарственно-устойчивых клеток рака простаты 22Rv1 с ИК<sub>50</sub> 31.5 и 3.0 мкМ, соответственно. Была показана слабая цитотоксическая активность *n*-нитробензоильного производного соединения **10** в отношении клеток рака молочной железы MCF-7 (ИК<sub>50</sub> 59.6 мкМ).

Было показано, что соединения **9** и **11** при 100 мкМ способны ингибировать образование колоний клеток рака простаты линии 22Rv1 на 41% и 36% соответственно.

#### **Биологическая активность метаболитов *Aspergillus terreus***

Показана умеренная и слабая токсичность астеррихинонов В4, С1 и С2 в отношении лекарственно-устойчивых клеток рака простаты 22Rv1 (ИК<sub>50</sub> 21.5, 14.7 и 28.6 мкМ соответственно) и нормальных клеток рака простаты PNT-2 (ИК<sub>50</sub> 63.4, 37.4 и 37.4 мкМ соответственно). Также для астеррихинонов В4 и С1 показана умеренная и слабая токсичность в отношении клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a (ИК<sub>50</sub> 91.5 и 42.3 мкМ соответственно).

Соединение **18** проявило антиоксидантные свойства, ингибируя свободные радикалы ДФПГ с ЭД<sub>50</sub> 3.0 мкМ. Показано, что астеррихинон В4 повышает жизнеспособность клеток Neuro-2a при действии 6-ГД на 36.3%, параквата (на 18.4%) и ротенона (на 34.8%).

### **Выводы**

1. Из грибов-микровицетов, выделенных из различных субстратов, собранных у Вьетнамского побережья Южно-Китайского моря, отобраны четыре перспективных штамма-продуцента вторичных метаболитов: *Penicillium* sp. КММ 4672, *Aspergillus flocculosus*, *A. niveoglaucus* и *A. terreus*.

2. Выделено 61 индивидуальное соединение различной химической природы. Установлено строение 18 новых низкомолекулярных вторичных метаболитов. Проведена структурная идентификация 43 метаболитов с известными веществами.

3. Установлено строение четырех новых дикетопиперазиновых алкалоидов цитриперазинов А-С и трех новых эпидитиодикетопиперазиновых алкалоидов претриходермамидов D-F из гриба *Penicillium* sp. КММ 4672. Показано наличие редкого спирибензофуранового фрагмента в структуре цитриперазинов С и D.

4. Установлено строение нового меросесквитерпеноида 12-эпи-аспертетранона D, двух новых сесквитерпеноидов 9 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,14-тригидроксициннамолида и 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,14-тригидроксиCONFERTIFOLIINA, а также нового тетракетид аспилактонола G из *Aspergillus flocculosus*.

5. Установлено строение двух новых ауруглауцин-подобных соединений нивеоглауцинов A и B из *A. niveoglaucus*. Впервые проведено успешное хроматографическое разделение (+)- и (-)-криптоэхинулинов B.

6. Установлено строение трех новых циклотрипептидных производных астеррипептидов A-C и нового бисиндолбензофуранового алкалоида астеррихинона F из *A. terreus*. Показано, что астеррипептиды содержат в своей структуре остаток коричной кислоты.

7. Установлено, что N-метилпретриходермамид B обладает высокой токсичностью в отношении клеток рака предстательной железы 22Rv1, PC-3 и LNCaP и вызывает апоптоз клеток 22Rv1 в наномолярных концентрациях.

8. Впервые показана нейропротекторная активность для (+)- и (-)-криптоэхинулинов B и астеррихинона B4 при действии токсинов параквата, 6-гидроксидофамина и ротенона.

#### Основные публикации по теме диссертации

1. О.Ф. Сметанина, А.Н. Юрченко, **Е.В. Иванец**, Н.Н. Киричук, Ю.В. Худякова, Е.А. Юрченко, Ш.Ш. Афиятуллово. Метаболиты морского гриба *Penicillium citrinum*, ассоциированного с бурой водорослью *Padina* sp. // Химия природ. соединений. 2016, № 1, С. 100-101.

2. Yurchenko, A.N.; Smetanina, O.F.; **Ivanets, E.V.**; Kalinovsky, A.I.; Khudyakova, Y.V.; Kirichuk, N.N.; Popov, R.S.; Bokemeyer, C.; von Amsberg, G.; Chingizova, E.A.; Afiyatullovo, S.S.; Dyshlovoy, S.A. Pretrichodermamides D–F from a Marine Algicolous Fungus *Penicillium* sp. KMM 4672. // Mar. Drugs. 2016. Vol. 14, № 7. P. 122.

3. О. Ф. Сметанина, А.Н. Юрченко, **Е.В. Иванец**, А.В. Герасименко, Р.Т.Н. Trinh, В.М.Лу, Т.Т.Т. Van, Е.А. Юрченко, Ш. Ш. Афиятуллово. Ароматические метаболиты морского гриба *Penicillium* sp., ассоциированного с бурой водорослью *Padina* sp. // Химия природ. соединений. 2017, № 3, С. 507-508.

4. Yurchenko E.A., Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Trinh P.T.H., **Ivanets E.V.**, Smetanina O.F., Yurchenko A.N. Neuroprotective Activity of Some Marine Fungal Metabolites in the 6-Hydroxydopamin- and Paraquat-Induced Parkinson's Disease Models // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16, № 11. P. 457.

5. **Ivanets E.V.**, Yurchenko A.N., Trinh P.T.H., Afiyatullovo Sh.Sh. Polyketides and echinulin-derivatives from Vietnamese strain of marine fungus *Eurotium niveoglaucum* // Вестник ДВО РАН. 2018. № 6S. P. 86-87.

6. Menchinskaya E.S., Dyshlovoy S.A., **Ivanets E.V.**, Yurchenko E.A. Cytotoxicity of some marine fungi metabolites against cancer cells // Вестник ДВО РАН. 2018. № 6S. P. 116

7. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., **Ivanets E.V.**, Phan T.T.H., Ngo N.T.D., Zhuravleva O.I., Rasin A.B., Dyshlovoy S.A., Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., von Amsberg G., Afiyatullovo S.S., Yurchenko E.A. Auroglauцин-related neuroprotective compounds from Vietnamese marine sediment-derived fungus *Aspergillus niveoglaucus* // Nat. Prod. Res. 2020. Vol. 34, № 18. P. 2589-2594.

8. Yurchenko A.N., Berdyshev D.V., Smetanina O.F., **Ivanets E.V.**, Zhuravleva O.I., Rasin A.B., Khudyakova Y.V., Popov R.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Afiyatullovo S.S. Citriperazines A-D produced by a marine algae-derived fungus *Penicillium* sp. KMM 4672 // Nat. Prod. Res. 2020. Vol. 34, № 8. P. 1118-1123.

9. Yurchenko A.N., Trinh P.T.H., **Girich E.V.**, Smetanina O.F., Rasin A.B., Popov R.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Menchinskaya E.S., Van T.T.T., Afiyatullovo S.S. Biologically Active Metabolites from the Marine Sediment-Derived Fungus *Aspergillus flocculosus* // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, № 10. P. 579.

10. Smetanina O.F., Yurchenko A.N., **Girich (Ivanets) E.V.**, Trinh P.T., Antonov A.S., Dyshlovoy S.A., Von Amsberg G., Kim N.Y., Chingizova E.A., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S., Yurchenko E.A., Van T.T., Afiyatullof S.S. Biologically active echinulin-related indole-diketopiperazines from the marine sediment-derived fungus *Aspergillus niveoglaucus* // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 1. P. 61.

11. **Girich, E.V.**; Yurchenko, A.N.; Smetanina, O.F.; Trinh, P.T.; Ngoc, N.T.; Pivkin, M.V.; Popov, R.S.; Pisyagin, E.A.; Menchinskaya, E.S.; Chingizova, E.A., *et al.* Neuroprotective Metabolites from Vietnamese Marine Derived Fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* Genera. *Mar. Drugs* 2020, Vol. 18, № 12. P. 608.

12. Yurchenko, A.N.; **Girich, E.V.**; Yurchenko, E.A. Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies. *Mar. Drugs* 2021, Vol. 19, № 2. P. 88.

#### Тезисы докладов:

1. **Иванец Е.В.**, Юрченко А.Н. Метаболиты факультативного морского гриба *Penicillium citrinum* // III Всероссийская студенческая конференция с международным участием «Химия и химическое образование XXI века». Санкт-Петербург, 14-17 апреля 2015г.: сборник материалов. СПб.: Астерион, 2015. С. 33

2. Yurchenko A.N., Trinh P.T.H., Ngoc N.T.D., **Ivanets E.V.**, Smetanina O.F., Nhut N.D., Afiyatullof Sh.Sh. Low-molecular secondary metabolites of sediment-derived fungi from Vietnamese coastal waters // *Marine Fungal Metabolites and Their Bioactivities [Electronic Resource]* : 1<sup>st</sup> Russian-Vietnamese Workshop, Nha Trang, October 31, 2017 : book of abstract / ed.: Dr. Shamil Sh. Afiyatullof and Dr. Anton N. Yurchenko. Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2017.

3. **Ivanets E.V.**, Yurchenko A.N., Trinh P.T.H., Afiyatullof Sh.Sh. Polyketides and echinulin-derivatives from Vietnamese strain of marine fungus *Eurotium niveoglaucum* [Электронный ресурс] // The 3<sup>rd</sup> International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, Sept. 4–8, 2018 : proc. and abstrs. – Vladivostok, 2018. – P. 86-87.

4. Menchinskaya E.S., Dyshlovoy S.A., **Ivanets E.V.**, Yurchenko E.A. Cytotoxicity of some marine fungi metabolites against cancer cells [Электронный ресурс] // The 3<sup>rd</sup> International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, Sept. 4–8, 2018 : proc. and abstrs. – Vladivostok, 2018. – P. 116.

5. Юрченко А.Н., Юрченко Е.А., Ефимова Е.Г., **Иванец Е.В.** Биологически активные метаболиты гриба *Penicillium* sp. КММ 4672 // Научная конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова, Владивосток, 11-15 сентября 2019: материалы конференции. Владивосток, ТИБОХ ДВО РАН. 2019. С. 31

6. **Ivanets E.V.**, Smetanina O.F., Menchinskaya E.S., Trinh P.T.H., Yurchenko A. N. Secondary Metabolites from Vietnamese Strain of Marine-Derived Fungus *Aspergillus flocculosus* XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI European Conference on Marine Natural Products, Portugal, Peniche, September 1-5, 2019: Book of abstract. Peniche, Portugal. 2019. P.108-109

7. **Гирич Е.В.**, Дышловой С.А., Юрченко Е.А., Юрченко А.Н. Трипептидные и бисиндолбензохиноновые производные из вьетнамского штамма микроскопического гриба *Aspergillus terreus*. XVII Всероссийская молодежная онлайн школа-конференция ТИБОХ ДВО РАН «Актуальные проблемы химии и биологии», г. Владивосток, 6-10 сентября 2020 г.

Гирич Елена Валерьевна

Низкомолекулярные вторичные метаболиты грибов Южно-Китайского моря

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук