

УДК 547.9/022:632.937.14

© Г. В. Митина, О. С. Юзихин, Ф. Ш. Исангалин, А. П. Якимов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ТОКСИНА С ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ ГРИБА *LECANICILLIUM MUSCARIUM*

Установлена структура нового инсектицидного токсина, выделенного из мицелия микромицета *Lecanicillium muscarium*. В работе были использованы методы ИК, УФ, масс-спектрометрии, а также серия ЯМР-экспериментов. Выделенный токсин относится к терпеноидам и представляет интерес для практического использования.

Кл. сл.: токсины грибов, инсектицидная активность, химическая структура, ЯМР-спектроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Микробиологические средства защиты растений на основе грибов-гифомицетов, являющихся природными патогенами сосущих вредителей, становятся реальной альтернативой химическим инсектицидам. Энтомопатогенный гриб *Lecanicillium muscarium* (Zimmerm.) Zare & W.Gams (= *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas) входит в число наиболее изучаемых агентов микробиологической борьбы с белокрылками и тлями [1]. Патогенные свойства гриба определяются прежде всего способностью проникать через кутикулу насекомого с помощью механического давления и каскада кутикулдеградирующих ферментов. Кроме того, гриб способен синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов, обладающих инсектицидной активностью и ускоряющих гибель насекомого-хозяина. К инсектицидным соединениям с установленной структурой относятся дипептиды (афидиколин, боверицин, бассианол), органические кислоты (производные дипиколиновой кислоты и пентанорланост-7,9(11)-диеновые кислоты) [2, 3], аналоги фенопиколиновой кислоты (вертилеканины) [4], деструктины [5]. Практический интерес представляют неидентифицированные метаболиты, выделяемые с липидными экстрактами из мицелия гриба и отвечающие за контактную инсектицидную активность [6, 7]. Неоднократно предпринимались попытки выделить эти активные соединения [8, 9]. Гидролиз активной фракции и метилирование жирных кислот, входящих в ее состав, показали потерю активности и возможное присутствие в структуре токсина стеариновой кислоты [8], тем не менее химическая структура активных метаболитов так и не была установлена. Идентификация структуры

сложного природного соединения требует комплексных исследований с применением современных физико-аналитических методов, таких как ИК-фурье и электронной спектроскопии, масс-спектрометрии, одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии. Поэтому задачей работы является демонстрация того, как комплексное использование современных аналитических приборов и методов может быть применено для выделения и идентификации новых биологически активных соединений на примере токсина энтомопатогенного гриба *L. muscarium*, обладающего контактной инсектицидной активностью в отношении сосущих насекомых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биомассы гриба и определение инсектицидной активности

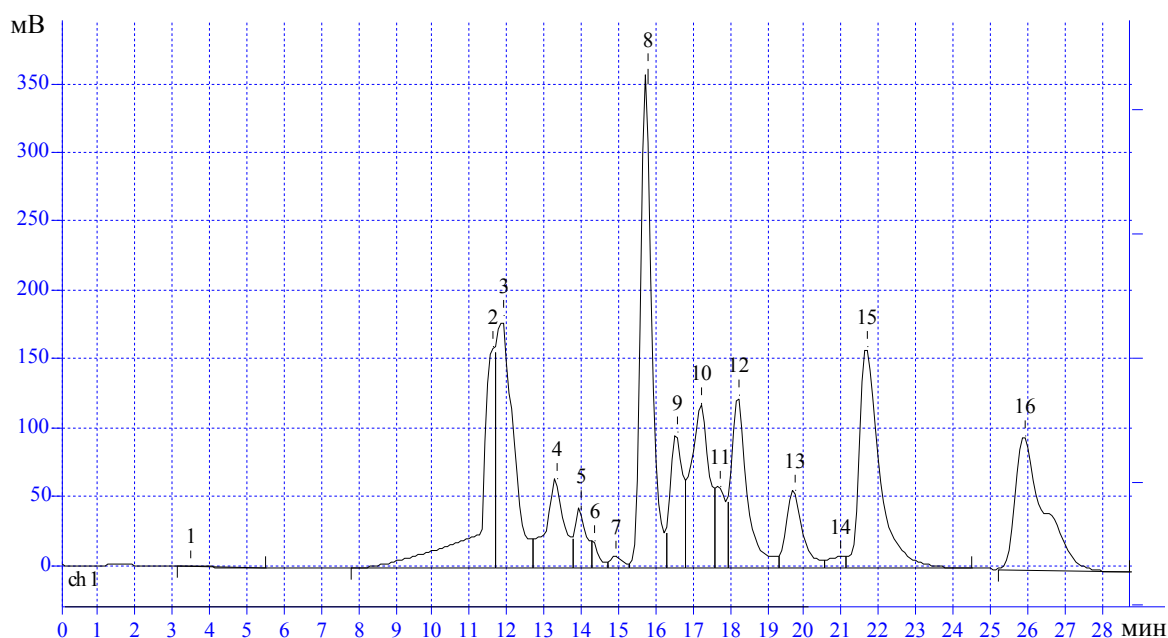
Lecanicillium muscarium (Zimmerm.) Zare & W.Gams штамм P-81 [10] выращивали на модифицированной среде с пептоном. Состав среды и условия выращивания описаны в [7]. Инсектицидную активность экстрактов определяли контактным методом путем помещения тест-насекомых (виковая тля *Megoura viciae*) на фильтровальные диски, смоченные 0.1–0.5 % экстрактами. Учет смертности насекомых проводили через 2 и 4 ч.

Получение экстракта и выделение инсектицидного токсина

Сухую биомассу гриба массой 30 г экстрагировали 300 мл смеси хлороформ—метанол 2 : 1 при комнатной температуре на встряхивателе

Табл. 1. Инсектицидная активность исходного экстракта и фракций в отношении виковой тли

Название тестируемого образца	Концентрация фракции в метаноле, мг/мл	Смертность тли, %	
		2 ч	4 ч
Исходный экстракт	10	43.0	55.0
Хлористометиленовая фракция	10	25.7	35.6
Ацетонитрильная фракция	10	53.5	100
Метанольная фракция	10	25.0	29.2
Контроль (вода)	—	0.0	0.0

**Рис. 1.** Хроматограмма ацетонитрильной фракции после первичного разделения на сорбенте С18

в течение 2 ч в режиме 200 об/мин дважды. Экстракт отделяли фильтрованием. Растворитель упаривали на ротонном испарителе при 40 °С. Полученный сухой остаток массой 1.35 г растворяли в 135 мл хлористого метилена (10 мг/мл) и наносили на сорбент С18, высушивали на воздухе, и промывали последовательно рядом растворителей: хлористым метиленом, ацетонитрилом и метанолом. После удаления растворителей проводили биооценку полученных фракций на тест-насекомых. Ацетонитрильная фракция проявила максимальную активность. 1 %-й раствор вызывал 53.5 % гибели тлей в течение 2 ч (табл. 1). Результаты анализа методом ВЭЖХ показали многокомпонентность этой фракции (рис. 1). Условия хроматографирования: Waters Alliance 2690, УФ-детек-

тор, колонка Luna 5 мкм С18 (2) 100А (10×250) мм, ацетонитрил—вода 88 : 12; скорость потока 1 мл/мин; $\lambda = 215$ нм.

Ацетонитрильный экстракт подвергали дальнейшему фракционированию на сорбенте с силикагелем. Для этого сухой остаток растворяли в 5 мл ацетонитрила, наносили на сорбент, высушивали на воздухе и промывали последовательно рядом растворителей: хлористым метиленом, ацетонитрилом и метанолом. Хлористометиленовая фракция в концентрации 5 мг/мл вызывала 80 % гибели тлей через 2 ч после контакта и 100 % через 4 ч. Активность ацетонитрильной фракции была в 2 раза ниже, метанольная не проявляла никакой активности. Анализ методом ВЭЖХ хлористометиленовой фракции показал

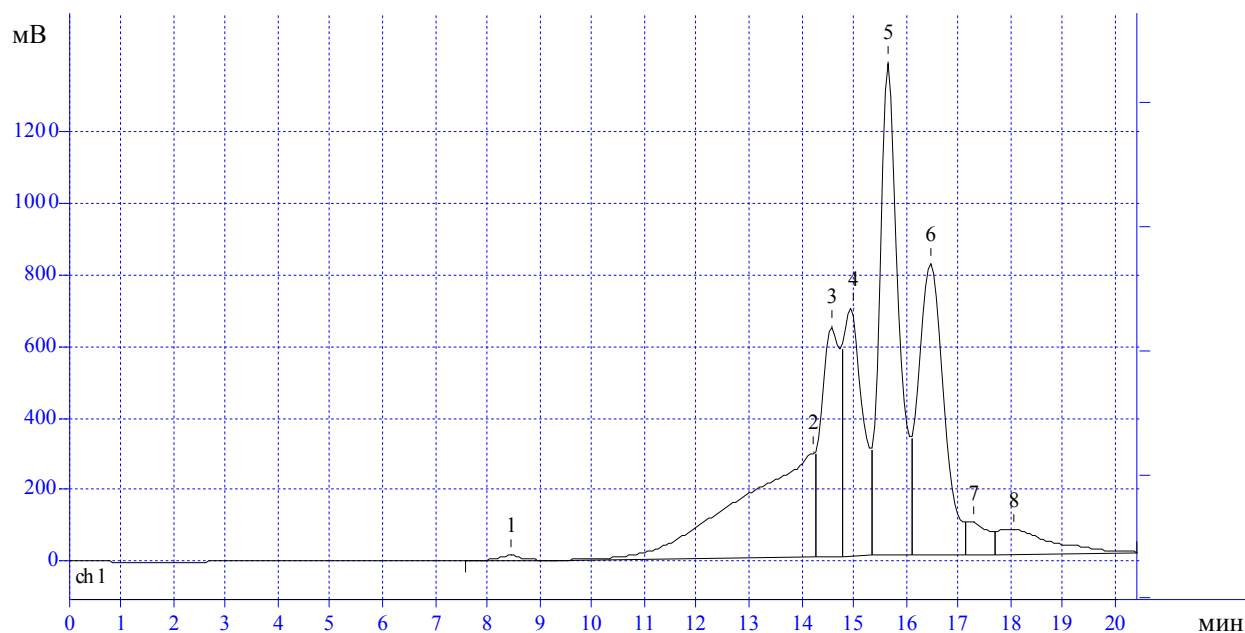


Рис. 2. Хроматограмма хлорометиленовой фракции после второй ступени очистки на сорбенте с силикагелем

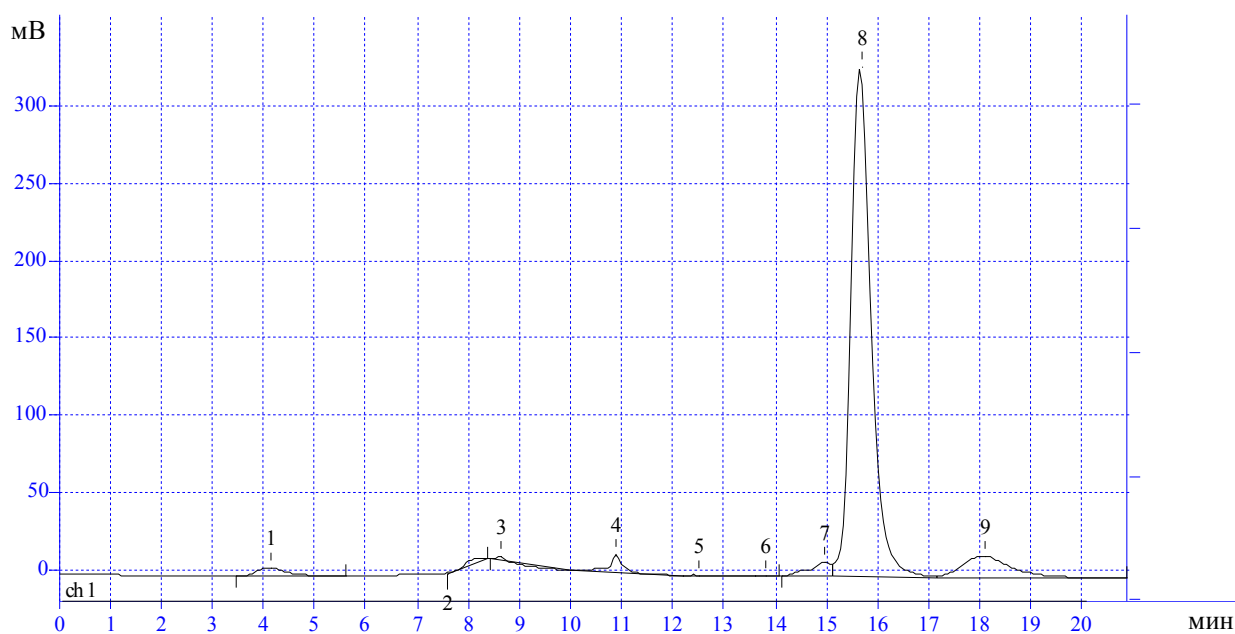


Рис. 3. Хроматограмма очищенного токсина после разделения методом ВЭЖХ

наличие в ней 8 компонентов (рис. 2). Дополнительную стадию хроматографического разделения с целью выделения индивидуальных активных компонентов проводили в следующих условиях: Waters Alliance 2690, УФ-детектор, колонка Luna

10 мкм Silica (2) 100А (10×250) мм, метанол, 1 мл/мин, 215 нм. Все основные фракции были проверены на инсектицидную активность, и только одна фракция показала активность. ВЭЖХ-анализ этой фракции на колонке С18 показал на-

личие одного компонента с временем удерживания 15.2–15.8 мин (рис. 3). При упаривании растворителя было получено белое кристаллическое вещество игольчатой формы массой 8 мг.

Изучение химической структуры токсина

Проверка чистоты выделенного токсина и съемка предварительного масс-спектра были осуществлены на жидкостном тандемном хромато-масс-спектрометре Shimadzu LCMS-IT-TOF с системой ввода образца электроспрей (ESI), квадрупольной ионной ловушкой и времяпролетным детектором. Масс-спектры регистрировали в интервале масс m/z 100–650 Да, напряжение на детекторе составляло 1.6 кВ.

Масс-спектрометрический анализ высокого разрешения образца проводился на ионно-циклотронном масс-спектрометре Varian 902-MS MALDI MassSpectrometer (ICR FTMS) со сверхпроводящим магнитом 9.4 Тл.

Съемка ИК-спектра осуществлялась в хлороформе на приборе ФСМ 1202. УФ-спектр был снят в метаноле на приборе Ultrospec II LKB Biochrom.

Все спектры ЯМР были записаны на спектрометре Varian DirectDrive NMR System 700 МГц, оборудованном 5 мм TXI (H/C/N) датчиком. Использовались стандартные импульсные последовательности из набора библиотеки Varian ChemPack 4.1: ^1H и ^{13}C ЯМР, DEPT, 2D-экспериментов (^1H - ^1H COSY, HMBC, HSQC).

Одномерные протонные ЯМР-спектры явились результатом усреднения 128 накоплений однократных измерений 16 384 комплексных точек, а углеродные ЯМР-спектры — 2048 накоплений однократных измерений 44 000 комплексных точек. ^{13}C ЯМР-спектры были получены при помощи импульсной последовательности с развязкой и усилением ЯЭО. Релаксационная задержка между накоплениями в одномерных экспериментах составляла 1 с. Гомоядерные COSY-спектры были получены при помощи градиентной импульсной последовательности как результат накопления 2048×256 комплексных точек; на каждый инкремент регистрировали с 8-кратным накоплением. Гетероядерные ^{13}C -HSQC ЯМР-эксперименты были получены при помощи импульсной последовательности HSQC с редактированием мультиплетности и развязкой во время наблюдения. Константа косвенного спин-спинового взаимодействия для пары спинов, взаимодействующих через одну химическую связь, принималась для ^1H - ^{13}C равной 146 Гц. Релаксационная задержка между накоплениями в экспериментах равнялась 1 с. Для получения этих спектров было осуществлено накопление 2048×400 комплексных точек; на каждый инкремент регистрировали с 64-кратным

накоплением. ЯМР-спектры HMBC были получены при помощи импульсной последовательности с подавлением гетероядерных взаимодействий через одну химическую связь. Константа косвенного дальнедействующего спин-спинового взаимодействия ^1H - ^{13}C принималась 4 или 8 Гц. HMBC-спектры явились результатом накопления 2048×400 комплексных точек; на каждый инкремент регистрировали с 8-кратным накоплением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления химической структуры выделенного соединения была осуществлена съемка ИК, УФ, масс-спектров, а также серия ЯМР-экспериментов.

Исследуемое соединение не показало поглощения в УФ-спектре при λ от 240 до 290 нм, что указывает на отсутствие ароматических групп. Полоса поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 218$ нм может свидетельствовать о наличии в структуре одной или нескольких несопряженных двойных связей. ИК-спектр подтвердил эти данные, а также показал присутствие в структуре молекулы ОН-группы.

Для разработки стратегии идентификации структуры токсина на первом этапе нами была осуществлена съемка спектров ПМР, ^{13}C ЯМР и DEPT. Анализ спектра ЯМР ^1H указал на принадлежность большинства протонов исследуемого соединения к алифатическому типу. Лишь 4 протона имели химические сдвиги δ_{H} , указывающие на их связывание с sp^2 -углеродными атомами: $\delta_{\text{H}} = 5.14, 5.21, 6.23, 6.49$ ppm (табл. 2). Это же подтвердил и спектр ЯМР ^{13}C : 4 атома углерода имели химические сдвиги δ_{C} , соответствующие кратным связям: $\delta_{\text{C}} = 133.4, 134.9, 137.8, 138.1$ ppm. Это может свидетельствовать о наличии в исследуемом соединении двух двойных связей. Кроме того, в спектре ЯМР ^1H присутствовал сигнал протона, соответствующего связыванию О-СН ($\delta_{\text{H}} = 3.95$ ppm). С другой стороны, в спектрах ЯМР ^{13}C и DEPT отсутствовали сигналы, соответствующие углеродным атомам карбонильных и карбоксильных групп.

В дальнейшем нам необходимо было найти последовательность связывания углеродных и водородных атомов в молекуле. С этой целью была осуществлена съемка двумерных спектров ЯМР ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H HSQC и ^{13}C - ^1H HMBC. При этом спектр ЯМР ^{13}C - ^1H HSQC позволил найти соответствие между углеродными атомами и связанными с ними протонами (табл. 2). Анализ кросс-пиков в спектре ЯМР ^1H - ^1H COSY, являющихся проявлением спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов в алифатических цепях, и ^{13}C - ^1H HMBC, характеризующих далее (для насыщенных соединений,

Табл. 2. ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры токсина, выделенного из мицелия гриба *Lecanicillium muscarium*

№ атома С	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm	Мультиплетность m_{H}	J , Гц	n_{H}	Группа
1	82.0	—	—	—	—	С _{ЧЕТВ}
2	133.4	6.49	δ	8.4	1	CH=
3	138.1	6.23	δ	8.4	1	CH=
4	84.8	—	—	—	—	С _{ЧЕТВ}
5	53.8	1.48	δ	14.0	1	CH
6	26.0	1.20	$\delta.\delta$	12.6; 2.8	1	CH ₂
		1.49	$\delta.\delta$	8.2; 14.1	1	
7	42.0	1.94	$\delta.\delta$	8.1; 8.0	1	CH ₂
		1.22	δ	9.8	1	
8	47.2	—	—	—	—	С _{ЧЕТВ}
9	54.3	1.54	$\delta.\delta$	—	1	CH
10	23.3	1.39	$\delta.\delta$	11.9; 17.5	1	CH ₂
		1.58	$\delta.\delta$	7.4; 9.1	1	
11	31.3	1.34	$\delta.\delta$	13.3; 3.5	1	CH ₂
		1.73	m	—	1	
12	58.9	1.21	$\delta.\delta$	—	1	CH
13	15.5	0.81	c	—	3	CH ₃
14	20.8	0.87	c	—	3	CH ₃
15	42.3	2.01	m	7.3	1	CH
16	23.5	0.99	δ	6.3	3	CH ₃
17	137.8	5.14	$\delta.\delta$	15.4; 7.7	1	CH=
18	134.9	5.21	$\delta.\delta$	15.4; 7.7	1	CH=
19	45.4	1.84	$\delta.\delta$	14.0; 7.0; 7.0	1	CH
20	20.2	0.89	δ	6.3	3	CH ₃
21	35.7	1.46	$\delta.m$	14.0; 7.0	1	CH
22	22.3	0.81	δ	7.0	3	CH ₃
23	22.6	0.82	δ	7.0	3	CH ₃
1'	69.0	3.95	$m.m$	11.2; 5.6	1.00	CH
2'	39.6	1.90	$\delta.\delta$	14.0; 11.2	2	2CH ₂
		2.10	$\delta.\delta.\delta$	14.0; 5.6; 1.4	2	
3'	37.4	1.94	$\delta.m$	14.0; 4.9	2	2CH ₂
		1.68	$\delta.m$	14.0; 3.5	2	
4'	32.8	1.82	$\delta.m$	14.0; 7.0	1	CH ₂
		1.52	m	—	1	

как правило, через 2–3 связи) взаимодействие углеродных атомов с протонами, позволил установить последовательность связывания углеродных атомов в молекуле. Нумерации атомов в структурной формуле соединения (рис. 4) и в табл. 2 не связаны с их нумерацией в названии соединения по ИЮПАК.

Так, взаимодействие протона H^{21} при δ 1.46 ppm в спектре ^1H — ^1H COSY с протонами метильных

групп при δ 0.81 ppm (H^{22}) и 0.82 ppm (H^{23}) указывает на наличие связи между углеродным атомом при δ 35.7 ppm метиновой группы CH-21 с этими метильными группами. Кроме того, протон H^{21} взаимодействует с протоном другой метиновой группы CH-19 (δ_{H} 1.84 ppm), что может свидетельствовать о связывании углеродных атомов при δ 45.4 и 35.7 ppm. Аналогичным образом было доказано связывание углеродного атома C-19 при

δ 45.4 ppm с метильной группой CH₃-20 и C-18 двойной связи через наличие спин-спинового взаимодействия протона H¹⁹ (δ_{H} 1.84 ppm) с тремя протонами H₂₀ (δ_{H} 0.89 ppm) метильной группы и протоном двойной связи H¹⁸ (δ_{H} 5.21 ppm) соответственно. Протоны двойной связи H¹⁸ (δ_{H} 5.21 ppm) и H¹⁷ (δ_{H} 5.14 ppm), проявляющиеся в виде дублета дублетов каждый, дают кросс-пик в спектре ¹H—¹H COSY. Константа $J = 15.4$ Гц спин-спинового взаимодействия этих протонов, найденная из спектра ЯМР ¹H, свидетельствует о *транс*-конфигурации двойной связи. Протон H¹⁵, дающий сложный мультиплетный сигнал при δ 2.01 ppm, взаимодействует с протоном H¹⁷ с константой $J = 7.7$ Гц, а также с протонами метильной группы CH₃-16 при δ 0.99 ppm и метиновым протоном H¹² при δ 1.21 ppm. Таким образом, было установлено связывание группы СН-15 (δ_{C} 42.3 ppm) с углеродным атомом двойной связи C¹⁷ (δ_{C} 58.9 ppm), метильной группой CH₃-16 и углеродным атомом C¹² (δ_{C} 58.9 ppm) цикла С (рис. 4).

В цикле С наблюдается слабое взаимодействие протонов H¹² (δ_{H} 1.21 ppm) и H¹¹ (δ_{H} 1.73 ppm), при этом кросс-пик между H¹² и вторым протоном с δ_{H} 1.34 ppm группы CH₂-11 в спектре ¹H—¹H COSY отсутствует. Однако на связывание CH₂-11 и СН-12 указывают кросс-пики между C¹² и протонами группы CH₂-11, а также между C¹¹ (δ_{C} 31.3 ppm) и H¹² в спектре ¹³C—¹H НМВС. Здесь же можно отметить взаимодействие C¹¹ с H¹⁰ (δ_{H} 1.39 ppm) и C¹⁰ (δ_{C} 23.3 ppm) с H¹¹ (δ_{H} 1.34 ppm). Наличие связи между группами CH₂-11 и CH₂-10 подтверждается кросс-пиком H¹⁰ (δ_{H} 1.58 ppm)—H¹¹ (δ_{H} 1.34 ppm) в спектре ¹H—¹H COSY. Аналогичным образом доказывается связывание СН-9—CH₂-10 (кросс-пики H¹⁰ (δ_{H} 1.39 ppm)—H⁹ (δ_{H} 1.54 ppm), C¹⁰ (δ_{C} 23.3 ppm)—H⁹ (δ_{H} 1.54 ppm), C⁹ (δ_{C} 54.3 ppm)—

H¹⁰ (δ_{H} 1.39 ppm)), C-8—CH-12 (кросс-пик C⁸ (δ_{C} 47.2 ppm)—H¹² (δ_{H} 1.21 ppm)) и C-8—CH-9 (кросс-пик C⁸ (δ_{C} 47.2 ppm)—H⁹ (δ_{H} 1.54 ppm)).

Далее последовательно будут изложены данные двумерных спектров ЯМР ¹H—¹H COSY и ¹³C—¹H НМВС, подтверждающие, на наш взгляд, порядок связывания в циклах А и В. C-8—CH₃-13: кросс-пик C⁸ (δ_{C} 47.2 ppm)—H¹³ (δ_{H} 0.81 ppm). C-8—CH₂-7: кросс-пик C⁸ (δ_{C} 47.2 ppm)—H⁷ (δ_{H} 1.22 ppm). CH₂-7—CH₂-6: кросс-пики C⁷ (δ_{C} 42.0 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.20 ppm), C⁷ (δ_{C} 42.0 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.49 ppm), C⁶ (δ_{C} 26.0 ppm)—H⁷ (δ_{H} 1.22 ppm), H⁶ (δ_{H} 1.20 ppm)—H⁷ (δ_{H} 1.94 ppm). CH₂-6—CH-5: кросс-пики C⁵ (δ_{C} 53.8 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.20 ppm), C⁵ (δ_{C} 53.8 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.49 ppm), C⁶ (δ_{C} 26.0 ppm)—H⁵ (δ_{H} 1.48 ppm), H⁵ (δ_{H} 1.48 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.20 ppm). C-1—CH-9: кросс-пик C¹ (δ_{C} 82.0 ppm)—H⁹ (δ_{H} 1.54 ppm). C-1—CH-5: кросс-пик C¹ (δ_{C} 82.0 ppm)—H⁵ (δ_{H} 1.48 ppm). C-1—CH₃-14: кросс-пик C¹ (δ_{C} 82.0 ppm)—H¹⁴ (δ_{H} 0.87 ppm). В спектре ¹³C—¹H НМВС отсутствует кросс-пик C⁵ (δ_{C} 53.8 ppm)—H⁶ (δ_{H} 1.20 ppm), однако на наличие связи C-4—CH-5 может косвенно указывать спин-спиновое взаимодействие углеродного атома C⁵ (δ_{C} 53.8 ppm) и протонов метильной группы CH₃-14 (δ_{H} 0.87 ppm), дающей в спектре синглетный сигнал и связанной с четвертичным углеродным атомом C⁴ (δ_{C} 84.8 ppm). Так как каждый из углеродных атомов C⁴ и C¹ взаимодействуют с обоими протонами двойной связи C²=C³, имеющими химические сдвиги при δ_{H} 6.23 и 6.49 ppm, это не позволяет провести точное отнесение сигналов этих атомов. Тем не менее кросс-пик углеродного атома при δ_{C} 133.4 ppm и протона H⁹ (δ_{H} 1.54 ppm) указывает на связывание именно атома C² (δ_{C} 133.4 ppm) с C¹ (δ_{C} 82.0 ppm).

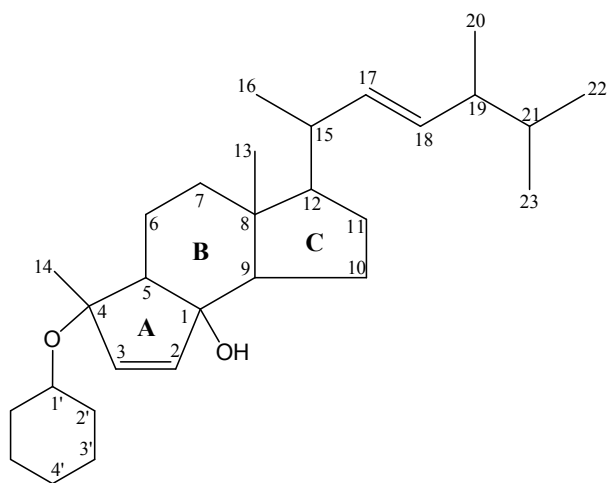


Рис. 4. Химическая структура токсина, выделенного из *Lecanicillium muscarium*

Таким образом, второй углеродный атом двойной связи при δ_C 138.1 ppm связан с C^4 (δ_C 84.8 ppm). Константа спин-спинового взаимодействия H^2-H^3 $J = 8.4$ Гц указывает на *цис*-конфигурацию двойной связи.

Обращает на себя внимание сильное разэкранирование четвертичных углеродных атомов $C1$ и $C4$, что можно объяснить связыванием этих атомов с атомами кислорода. Кроме того, в спектре ПМР присутствует сигнал протона H^1 с δ_H 3.95 ppm, который однозначно свидетельствует о его принадлежности к системе $CH-O$. Это же подтверждает химический сдвиг (δ_C 69.0) углеродного атома, с которым связан данный протон. Из спектра $^1H-^1H$ COSY следует, что рассматриваемый протон имеет спин-спиновое взаимодействие с протонами, имеющими δ_H 2.10 и 1.90 ppm и более слабое взаимодействие с протонами при δ_H 1.82 и 1.52 ppm. Первые принадлежат к группе CH_2-2' , вторые — к CH_2-4' . В свою очередь протон при δ_H 1.90 ppm имеет слабое взаимодействие с протоном при δ_H 1.68 ppm группы CH_2-3' . Протоны групп CH_2-3' (δ_H 1.68 и 1.94 ppm) и CH_2-4' (δ_H 1.82 и 1.52 ppm) других кросс-пиков, указывающих на их взаимодействие с протонами, не образуют.

В спектре НМВС наблюдаются следующие кросс-пики. Интенсивные $C^{1'}$ (δ_C 69.0 ppm)— H^2 (δ_H 1.90 ppm), $C^{1'}$ (δ_C 69.0 ppm)— $H^{2'}$ (δ_H 2.10 ppm) и более слабые $C^{1'}$ (δ_C 69.0 ppm)— H^3 (δ_H 1.68 ppm), $C^{1'}$ (δ_C 69.0 ppm)— H^4 (δ_H 1.52 ppm). Это может свидетельствовать о наличии связи между $C^{1'}$ (δ_C 69.0 ppm) и $C^{2'}$ (δ_C 39.6 ppm). Кросс-пик $C^{2'}$ (δ_C 39.6 ppm)— H^1 (δ_H 3.95 ppm) и протон-протонные взаимодействия в спектре $^1H-^1H$ COSY подтверждают это предположение. Взаимодействия $C^{2'}$ (δ_C 39.6 ppm)— H^3 (δ_H 1.68 ppm) и $C^{2'}$ (δ_C 39.6 ppm)— $H^{3'}$ (δ_H 1.94 ppm) в свою очередь указывают на связь $C^{2'}$ (δ_C 39.6 ppm)— C^3 (δ_C 37.4 ppm). Кросс-пики C^3 (δ_C 37.4 ppm)— H^4 (δ_H 1.52 ppm) и C^4 (δ_C 32.8 ppm)— H^3 (δ_H 1.68 ppm) могут свидетельствовать о наличии связывания C^3 (δ_C 37.4 ppm)— C^4 (δ_C 32.8 ppm). Также в спектре НМВС нами были обнаружены дальние (более чем через 2 связи) взаимодействия: $C^{4'}$ (δ_C 32.8 ppm)— H^2 (δ_H 2.10 ppm), $C^{4'}$ (δ_C 32.8 ppm)— $H^{2'}$ (δ_H 1.90 ppm), C^3 (δ_C 37.4 ppm)— H^{14} (δ_H 0.87 ppm), C^{14} (δ_C 20.8 ppm)— H^3 (δ_H 1.68 ppm), C^{14} (δ_C 20.8 ppm)— H^3 (δ_H 1.94 ppm), C^3 (δ_C 37.4 ppm)— H^5 (δ_H 1.48 ppm), C^2 (δ_C 39.6 ppm)— H^{14} (δ_H 0.87 ppm), C^2 (δ_C 39.6 ppm)— H^5 (δ_H 1.48 ppm), C^2 (δ_C 39.6 ppm)— H^3 (δ_H 6.23 ppm), C^2 (δ_C 39.6 ppm)— H^4 (δ_H 6.49 ppm), C^3 (δ_C 138.1 ppm)— H^2 (δ_H 1.90 ppm), C^3 (δ_C 138.1 ppm)— H^2 (δ_H 2.10 ppm). Это может указывать на пространственную сближенность этих групп. С другой стороны, сигнал H^1 представляет из себя триплет триплетов правильной формы, что указывает на симметричность структуры и его взаимодействие с двумя парами маг-

нитно эквивалентных протонов.

Масс-спектр высокого разрешения не показал пика молекулярного иона, что, вероятно, связано с нестабильностью образующегося катиона. Однако в спектре наблюдался пик с массой 411.367, который мы можем отнести к иону, образующемуся из молекулярного путем отщепления молекулы воды. Это позволяет подтвердить выводы, сделанные на основе анализа ЯМР-спектров.

Таким образом, для выделенного соединения была предложена структура, представленная на рис. 4:

10-(1.4.5-триметилгекс-2-енил)-5.9-диметил-5-циклогексилоситрицикло[7.3.0.0^{2.6}] додец-3-ен-2-ол

ИК (CCl_4) 3399 (ν OH), 2956 (ν CH_3), 2926 (ν CH_2), 2870 (ν Alk), 1739 (ν C=C), 1666 (ν C=C), 1458 (δ Alk), 1372 (δ Alk), 1168, 1070 (ν C-O), 969, 835, 726 cm^{-1} ; УФ (метанол) λ_{max} 218 нм; MALDI MS (ICR FTMS) m/e 411.367 [$M+H^+-H_2O$].

Полученные результаты подтверждаются имеющимися в литературе данными для химических структур близкого строения [11–14]. Следует отметить, что строение колец **B**, **C** и боковой цепи, аналогичное установленному для полученного нами токсина, является характерным для многих метаболитов терпеноидной природы, продуцируемых грибами. В дальнейшем планируется изучить стереохимическое строение выделенного соединения.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП "Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hall R.A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales // Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980 / H.D. Burges (ed.). N.Y.: Academic Press, 1981. P. 483–498.
2. Claudon N., Grove J.F. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii* // Journal of Invertebrate Pathology. 1982. V. 40, N 3. P. 413–418.
3. Grove J.F. 23,24,25,27-Pentanorlanost-8-En-3, 22-Diol from *Verticillium lecanii* // Phytochemistry. 1984. V. 23, N 8. P. 1721–1723.
4. Soman A.G., Gloer J.B., Angawi R.F., Wicklow D.T., Dowd P.F. Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii* // Journal of Natural Products. 2001. V. 64. P. 189–192.
5. Butt T.M., El Hadj N.B., Skropek A., et al. Mass spectrometry as a tool for the selective profiling of destruxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum* // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2009. V. 23, N 10. P. 1426–1434.

6. Митина Г.В. Энтомоцидные токсины гриба *Verticillium lecanii* (Zimm.) — продуцента биопрепарата вертициллин. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1992. 18 с.
7. Митина Г.В., Сокорнова С.В., Павлюшин В.А. Выделение и изучение спектра действия фосфолипидов с инсектицидной активностью из энтомопатогенного гриба *Lecanicillium lecanii* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36, № 6. С. 53–59.
8. Gindin G., Barash I., Harari N., Raccah B. Effect of endotoxin compounds isolated from *Verticillium lecanii* on the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* // Phytoparasitica. 1994. V. 22. P. 189–196.
9. Wang K.Q., Li X.M., Liu C.L. Preliminary study on the control of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* with toxin from *Verticillium lecanii* (Zimm) // Plant protection. 2000. V. 26. P. 44–45 (in Chinese).
10. Каталог государственных коллекций полезных и вредных организмов. Москва—С.-Петербург: РАСХН, отд. защиты растений, 2001. 76 с.
11. Takahashi M., Yasumasa S. Convenient synthesis of 1 α , 25-dihydroxivitamin D₃ from Vitamin D₂ // Bulletin of the Chemical Society of Japan. 1994. V. 67, N 9. P. 2494–2499.
12. Paaren H.E., Fivizzani M.A., Schnoes H.K., DeLuca H.F. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1981. V. 78. P. 6173.
13. Marino J.P., de Dios A., Anna L.J., de la Pradilla R.F. Highly stereocontrolled formal synthesis of brassinolide via chiral sulfoxide-directed S_N2 reactions // Journal of Organical Chemistry. 1996. V. 61. P. 109–117.
14. Piir E.A., Morozovich G.E., Drozdov F.V., et al. Δ^5 -7-ketosterols with modified side chain: The synthesis and the effects on viability and cholesterol biosynthesis in hep G2 cells // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2006. V. 32, N 5. P. 497–503.

Всероссийский НИИ защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург (Митина Г.В., Юзихин О.С.)

ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk, Московская обл. (Исангалин Ф.Ш.)

СПбГПУ, Санкт-Петербург (Якимов А.П.)

Контакты: Митина Галина Вадимовна,
galmit@rambler.ru;
Юзихин Олег Сергеевич,
yuzikhin@mail.ru

Материал поступил в редакцию 27.12.2011.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TOXIN WITH INSECTICIDAL ACTIVITY FROM FUNGUS *LECANICILLIUM MUSCARIUM*

G. V. Mitina¹, O. S. Yuzikhin¹, F. Sh. Isangalin², A. P. Yakimov³

¹All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow area

³SpbSPU (Saint Petersburg State Polytechnical University), Saint-Petersburg

The chemical structure of a new insecticidal toxin isolated from the mycelium of micromycete *Lecanicillium muscarium* was defined. IR-, UV-, mass-spectrometry methods as well as a set of NMR-experiments were used in the work. The isolated toxin is referred to terpenoids and is an interesting for practical use.

Keywords: toxins of fungi, insecticidal activity, chemical structure, NMR-spectroscopy