

Дмитренко Павел Сергеевич

**Применение масс-спектрометрии в исследованиях биологически активных
вторичных метаболитов морских беспозвоночных**

1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация в виде научного доклада на соискание учёной степени
доктора химических наук

Новосибирск –2023

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

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор
Стоник Валентин Аронович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор РАН
Волчо Константин Петрович
доктор химических наук, профессор
Гречкин Александр Николаевич
доктор биологических наук, профессор
Костецкий Эдуард Яковлевич

Защита состоится « » 2023 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте по адресу: www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.х.н., доцент

Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение структур и биологических активностей вторичных метаболитов морского происхождения началось в 60-х годах прошлого века, и не теряет своей актуальности по сей день. Ежегодно из морских организмов выделяется несколько сотен новых низкомолекулярных природных соединений, имеющих редкие и уникальные структурные фрагменты, в том числе веществ, принадлежащих к новым структурным классам. Разнообразие структур морских метаболитов связано с условиями обитания и таксономическим разнообразием организмов-продуцентов. Известно, что в морской среде обитают представители большего числа крупных таксонов, чем в наземной. Характерные особенности химического состава морской среды оказывают влияние на биосинтез вторичных метаболитов морских организмов, что выражается, в частности, в присутствии большого числа галогенированных и сульфатированных соединений. Значительное число изученных морских биомолекул относятся к полярным соединениям, что связано с необходимостью их функционирования в водной среде. Актуальность изучения веществ морского происхождения связана не только со своеобразием их химических структур, но и с проявляемой ими биологической активностью, включая противовирусное, цитотоксическое, противогрибковое, противобактериальное, противовоспалительное, противоопухолевое и другие физиологические действия. Часто вещества из морских источников проявляют гораздо более высокую активность, чем родственные им метаболиты наземных организмов. Некоторые морские природные соединения перспективны для дальнейшего применения в качестве лекарственных средств или для создания на их основе функциональных продуктов питания. Такие биопрепараты уже были созданы в разных странах, в том числе в России. Для понимания взаимосвязи «структура-активность» необходимо знание полных структур исследуемых соединений, поэтому применение современных физико-химических методов в исследованиях структур данных метаболитов является актуальной фундаментальной и практической задачей. Следует отметить, что некоторые классы морских природных соединений являются хемотаксономическими маркерами организмов-продуцентов, как, например, тритерпеновые гликозиды голотурий или полярные стероиды морских звезд, что, вероятно, связано с особенностями биосинтеза этих молекул и их продуцентов. Все это объясняет интерес химиков-биооргаников, биохимиков и фармакологов к изучению метаболитов морского генеза.

Исследования структур морских вторичных метаболитов является непростой задачей. Одна из проблем, как правило, заключается в небольших количествах исследуемых веществ, что связано как с трудностью сбора большого количества биологического материала, так и с невысоким содержанием целевых веществ в организмах-продуцентах. Кроме того, многие группы метаболитов присутствуют в их продуцентах в виде очень сложных смесей близких по химическому строению веществ, а их представители часто имеют беспрецедентное химическое строение. Поэтому при установлении структур новых соединений применяются современные методы, такие как ЯМР спектроскопия, включая 2D ЯМР, и масс-спектрометрия (МС) с различными типами ионизации. Применение масс-спектрометрии для изучения морских природных метаболитов – основное направление этой работы. Впервые разнообразные современные МС методы были применены для изучения большого количества морских природных соединений различных структурных классов. Современная масс-спектрометрия – это мощная аналитическая наука (методология) с глубоко проработанной фундаментальной базой, являющаяся одним из главных инструментов в области наук о жизни, включающих биоорганическую химию, молекулярную биологию, биотехнологию, биомедицину. Развитие масс-спектрометрии идет по двум основным направлениям: 1) поиск и применение новых приложений, новых сочетаний с другими аналитическими методами, усовершенствование процедур подготовки проб и т.д. и 2) фундаментальные исследования теоретических основ механизмов ионизации, процессов фрагментации

образующихся ионов, изучение влияния матриц и модификаторов, применение физико-химических расчетов к этим процессам. Все более широкое применение масс-спектрометрии при установлении структур природных веществ, связано, в первую очередь с высокой селективностью и чувствительностью МС методов, а также быстротой анализа. МС анализ исследуемых веществ позволяет не только с высокой точностью устанавливать молекулярные формулы метаболитов, но также дает ценную информацию о структурных фрагментах исследуемых молекул и позволяет предположить их химические структуры.

Совершенствование масс-спектрометрической техники привело к появлению и развитию метаболомного подхода, основанного на изучении низкомолекулярных метаболических профилей различных организмов. Полный анализ низкомолекулярных вторичных метаболитов в биологических объектах проводят сочетанием современных методов масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и программ обработки больших массивов данных, что позволяет изучать сложнейшие смеси веществ природного происхождения, содержащие десятки и сотни метаболитов. Такие подходы позволяют провести быстрый и селективный скрининг метаболома, определить качественный и количественный составы метаболитов, выявить наличие ранее неизвестных соединений и изучить влияние на организм патологических процессов, различных стрессов и изменений условий среды обитания.

Целью настоящей работы являлось установление структур ряда биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных с помощью современных методов масс-спектрометрии. Применение современных разработок в области масс-спектрометрии для метаболомных исследований морских беспозвоночных с целью поиска новых перспективных для медицины биологически активных соединений, установления особенностей их биосинтеза и определения их биологических функций.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Используя современные методы масс-спектрометрии исследовать структурные особенности и закономерности масс-спектрометрической фрагментации вторичных метаболитов морских беспозвоночных;
2. Выявить структурные особенности, влияющие на масс-спектрометрическое поведение исследованных молекул в условиях тандемной масс-спектрометрии;
3. Разработать новые подходы для исследования как индивидуальных соединений, так и составов смесей вторичных метаболитов морских звезд и голотурий, на основе использования методов ВЭЖХ-ИЭР масс-спектрометрии, отработать методы пробоподготовки, подобрать условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического анализа сумм метаболитов;
4. Исследовать стероидные метаболомы морских звезд *Aphelasterias japonica*, *Patiria pectinifera* и *Lethasterias fusca*, а также метаболомный профиль тритерпеновых гликозидов голотурии *Eupentacta fraudatrix*;
5. Провести изучение распределения целевых метаболитов в различных органах организмов-продуцентов с целью прояснения их возможной биологической роли;
6. Оценить с помощью метаболомного подхода влияние различных факторов окружающей среды на состав метаболитов в организмах-продуцентах на примере влияния этих факторов на состав полярных стероидных метаболитов морской звезды *P. pectinifera*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Применение масс-спектрометрии высокого разрешения с различными методами ионизации позволяет однозначно установить брутто-формулы и определить основные фрагменты структур новых вторичных метаболитов различных структурных классов, выделенных из морских беспозвоночных. Всего МС применена при установлении структур более 300 ранее неизвестных морских природных соединений;

2. Методы тандемной ИЭР масс-спектрометрии оказались наиболее результативными при изучении гликозидов морских беспозвоночных, с их помощью можно определять состав и строение углеводных цепей, типы структур агликонных частей их молекул;

3. Особенности фрагментации в условиях тандемной масс-спектрометрии открывают возможность различать некоторые стереоизомеры полигидроксистероидных соединений;

4. Применение метаболомных подходов, основанных на сочетании методов ИЭР масс-спектрометрии с высокоэффективной жидкостной хроматографией, позволяет выполнять анализ метаболомов морских беспозвоночных без выделения индивидуальных соединений, в том числе идентифицировать ранее известные соединения и устанавливать структурные особенности новых метаболитов;

5. Метаболомные подходы позволяют исследовать распределение исследуемых метаболитов по органам животных, что проясняет их биологическую роль в организмах-продуцентах;

6. Анализ влияния факторов окружающей среды на метаболомы организмов-продуцентов может проводиться с помощью масс-спектрометрических подходов. Показано, что ряд факторов окружающей среды изменяют стероидный метаболом морской звезды *P. pectinifera*.

Научная новизна и практическая ценность работы.

С помощью современных методов масс-спектрометрии изучено более 300 новых вторичных метаболитов, выделенных из морских беспозвоночных, в том числе: полигидроксилированные стероиды, родственные им гликозиды, астеросапонины и циклические гликозиды морских звезд; тритерпеновые гликозиды голотурий; стероидные и тритерпеновые гликозиды, сульфатированные стероиды, биполярные липиды и гуанидиновые алкалоиды морских губок. В результате для всех соединений были установлены их молекулярные формулы и определены особенности их строения, включая присутствие функциональных групп в молекулах (гидроксильные, сульфатные, ацетатные группы), для гликозидов – особенности строения агликонов и типы структур углеводных цепей (количество и природа моносахаридных остатков, общая архитектура углеводных цепей). Это внесло весомый вклад в установление их полного химического строения. При помощи тандемной ИЭР масс-спектрометрии впервые показана возможность идентификации стереоизомеров полигидроксистероидных соединений морских звезд.

Впервые метаболомный подход, включающий в себя сочетание методов масс-спектрометрии с высокоэффективной жидкостной хроматографией, был применен для исследования метаболомных профилей иглокожих. Были изучены составы метаболомов полярных стероидных соединений морских звезд *A. japonica* и *P. pectinifera* и тритерпеновых гликозидов голотурии *E. fraudatrix*, идентифицированы известные метаболиты и предложены структуры для ряда новых соединений. Применение сочетания ИЭР МС с наноВЭЖХ для исследования метаболома полярных стероидных соединений морской звезды *L. fusca* позволило увеличить число обнаруженных метаболитов более чем в три раза. В целом, показана перспективность использования метаболомного подхода для поиска новых природных соединений и понимания путей их биосинтеза.

С помощью ВЭЖХ-ИЭР МС было исследовано распределение целевых метаболитов по различным органам организмов-продуцентов для полигидроксистероидов и астеросапонинов морской звезды *L. fusca* и тритерпеновых гликозидов голотурии *E. fraudatrix*. Полученные данные в целом подтвердили некоторые предполагаемые биологические роли этих классов веществ – защитную функцию, участие в пищеварительных процессах и процессах репродукции.

Метод ВЭЖХ-ИЭР МС с последующим статистическим анализом был применен для изучения влияния различных факторов окружающей среды на стероидный метаболом морской звезды *P. pectinifera*. Полученные данные позволили предположить, что изменения в составе фракций полярных стероидов связаны с многофункциональной биологической ролью этих метаболитов в организмах морских звезд.

Практическое значение данного исследования состоит в развитии современных методов масс-спектрометрического изучения новых вторичных метаболитов морских беспозвоночных. Полученные в ходе исследования данные могут использоваться для структурного анализа новых вторичных метаболитов морских беспозвоночных, поиска новых источников биологически активных природных соединений, при решении метаболомных задач, проведении сравнительного изучения различных видов и популяций иглокожих и других морских беспозвоночных, исследованиях биологической роли и биосинтеза целевых метаболитов.

Публикации. Основные результаты данных исследований опубликованы в рецензируемых научных журналах: Organic Letters, Journal of Natural Products, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Metabolomics, Marine Drugs, Tetrahedron, Tetrahedron Letters, Steroids, Molecules, Carbohydrate Research, Natural Product Communications, Natural Product Research, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Chemistry & Biodiversity, Известия Академии наук, серия химическая, Биоорганическая химия, Химия природных соединений, Масс-спектрометрия. Всего автором опубликовано 420 (РИНЦ), 320 (WOS) статей, а по теме диссертации - 93 статьи и 11 тезисов докладов, 60 из которых, опубликованных в рецензируемых журналах, приведены в конце автореферата.

Апробация работы Материалы диссертации были представлены на Symposium on mass spectrometry and allied topics in honor of Max Deinzer 36-year career in mass spectrometry at OSU (Corvallis, Oregon, USA, 2009); 5-м Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2011); XIV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, Владивосток, 2012); 2nd International symposium on Life Sciences (Vladivostok, Russia, 2013); VII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев – 2013» (Санкт-Петербург, 2013); VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев – 2014» (Санкт-Петербург, 2014); III Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, 2016); 65th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Indianapolis, Indiana, USA, 2017); Конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2019); Future of biomedicine 2019 conference (Russky Island, Vladivostok, Russia, 2019).

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории физико-химических методов исследований ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Автором самостоятельно были осуществлены планирование, дизайн и координирование всех экспериментов. При непосредственном участии автора были получены масс-спектры природных соединений, проведен анализ их фрагментации, предположены структуры исследуемых веществ. Образцы природных соединений для этого исследования были предоставлены сотрудниками Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ. Выделение и установление структур изученных соединений было выполнено д.х.н. Макарьевой Т.Н., д.х.н. Кича А.А., к.х.н. Иванчиной Н.В., к.х.н. Маляренко Т.В., д.б.н. Калинин В.И., д.х.н. Авиловым С.А., д.х.н. Сильченко А.С., к.х.н. Шубиной Л.К., к.х.н. Гузий А.Г., к.х.н. Табакмахер К.М. и другими сотрудниками Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН. При непосредственном участии и под руководством автора к.х.н. Поповым Р.С. были получены данные о метаболитических профилях полярных стероидов морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий, распределении целевых метаболитов по органам организмов-продуцентов, проведен анализ метаболитических изменений под действием факторов окружающей среды. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту академику Стонику В.А. за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении диссертационной работы. Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику Лаборатории физико-химических методов исследований к.х.н. Попову Р.С. за помощь в выполнении экспериментальной работы и анализе полученных данных. Также автор благодарит сотрудников Лаборатории химии морских природных соединений д.х.н. Макарьеву Т.Н., д.х.н. Кича А.А., к.х.н. Иванчину Н.В., к.х.н. Маляренко Т.В., д.б.н. Калинина В.И., д.х.н. Авилова С.А., д.х.н. Сильченко А.С., к.х.н. Шубину Л.К., к.х.н. Гузий А.Г., к.х.н. Табакмахер К.М. за предоставление образцов исследуемых соединений, чл-корр. РАН Долматова И.Ю. (ННЦМБ ДВО РАН) и инженера Гребнева Б.Б. за помощь в проведении экспериментов с иглокожими, а также весь коллектив Лаборатории физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН.

Некоторые используемых сокращения и обозначения: ББИ/ББА – бомбардировка быстрыми ионами/атомами; ВР – высокое разрешение; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ГК – главная компонента; Да – Дальтон (масса, рассчитанная с использованием шкалы ^{12}C ; 1 Да = $1,660539040(20) \times 10^{-27}$ кг); ДИС – диссоциация, индуцированная столкновением; ИЭР МС – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением; МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МГК – метод главных компонент; МС/МС – тандемная масс-спектрометрия; ТФЭ – твердофазная экстракция; ФИАД МС – масс-спектрометрия с фотоионизацией при атмосферном давлении; ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса; dHex – дезоксигексоза; Hex – гексоза; Pent – пентоза.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Масс-спектрометрия является важнейшим методом, используемым при установлении структур природных соединений. В первую очередь масс-спектрометрическое изучение молекул вторичных метаболитов связано с получением точных значений масс молекулярных ионов в масс-спектрах высокого разрешения, позволяющих определить молекулярные формулы исследуемых соединений. Использование разных режимов регистрации получаемых ионов дает информацию о заряде и количестве функциональных групп, присутствующих в молекулах. МС/МС спектры природных соединений, в частности соединений гликозидной природы, как правило, характеризуются большим количеством фрагментных ионов, образованных в результате разрыва связей как агликонной части, так и углеводного фрагмента. Поскольку в данной работе описывается масс-спектрометрическая фрагментация природных веществ, то нужно отметить, что в настоящий момент нет единой устоявшейся масс-спектрометрической номенклатуры, описывающей основные типы образующихся фрагментных ионов. Наиболее часто используется комбинация номенклатуры, описывающей основные типы ионов, образующихся в результате распада агликона, предложенная Гриффитсом [Griffiths W.J. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10, N. 10. P. 1169–1174], и номенклатуры ионов, образующихся в результате разрыва связей углеводного фрагмента, разработанная Домоном и Костелло [Domon B., Costello C.E. *Glycoconj. J.* 1988. V. 5, N. 4. P. 397-409].

В ходе данной работы было проведено масс-спектрометрическое изучение более чем 300 новых индивидуальных низкомолекулярных вторичных метаболитов различных структурных классов из морских звезд, голотурий и морских губок. Отличительной особенностью метаболомов морских звезд является высокое содержание разнообразных по структуре стероидных соединений, включая стероидные гормоны, свободные стерины и полярные стероидные соединения, такие как полигидроксистероиды, родственные моно-, би- и редкие триозиды, гликозиды с циклическими углеводными цепями и

олигогликозиды, называемые астеросапонинами. Каждая из основных групп полярных стероидов имеет свои структурные особенности: 1) для полигидроксистероидов характерно присутствие от четырех до девяти гидроксильных групп в тетрациклическом ядре и боковой цепи; 2) родственные им гликозиды имеют полигидроксилированное стероидное ядро и, как правило, одну или две моносахаридные единицы, расположенные либо в стероидном фрагменте, либо в боковой цепи, либо в стероидном ядре и боковой цепи одновременно; 3) астеросапонины характеризуются присутствием $\Delta^{9(11)}$ - $3\beta,6\alpha$ -дигидроксистероидного ядра с сульфатной группой при С-3 и олигосахаридной цепью, имеющей, как правило, от четырех до шести моносахаридных остатков с разветвлением на втором звене.

Метаболиты голотурий характеризуются высоким содержанием тритерпеновых гликозидов, которые можно считать хемотаксономическими маркерами этих животных. Общий план строения тритерпеновых гликозидов голотурий достаточно консервативен, в то же время для них характерна широкая вариабельность по отдельным структурным фрагментам. Большинство тритерпеновых гликозидов голотурий имеют агликон ланостанового типа с 18(20)-лактоном. Обычно агликон имеет 7(8)- или 9(11)-двойную связь и кислородсодержащие заместители в тетрациклической части, а боковые цепи агликонов могут иметь одну или несколько двойных связей, гидроксильные или ацетатные группы и другие заместители. Углеводные цепи гликозидов голотурий могут включать до шести моносахаридных звеньев и присоединены к С-3 агликона. Гликозиды с углеводными цепями, состоящими от двух до четырех моносахаридных остатков, обычно имеют линейное строение углеводной цепи, в то время как пента- и гексаозиды содержат разветвление на первом или втором моносахаридном звене.

Среди метаболитов морских губок встречаются стероидные и тритерпеновые гликозиды, сульфатированные стероиды, алкалоиды, необычные липиды и другие структурные классы веществ. Представители каждой из этих структурных групп были изучены нами с применением масс-спектрометрии.

Разнообразие исследуемых молекул требует для анализа их структур сочетания различных структурных методов исследования, среди которых масс-спектрометрия, наряду с ЯМР-спектроскопией, имеет решающее значение. В настоящее время основными методами масс-спектрометрии, применяемыми в химии природных соединений, являются масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС) и масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ МС). В ранних исследованиях нами активно применялась масс-спектрометрия с ионизацией бомбардировкой быстрыми ионами (ББИ).

В данной работе в большинстве случаев использовались следующие условия получения спектров. Масс-спектры ИЭР получали с использованием гибридных квадрупольно-времяпролетных масс-спектрометров Agilent 6510 Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США), оснащенного источниками ионизации электрораспылением и фотоионизации, и Bruker Impact II Q-TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного источниками ионизации электрораспылением и CaptiveSpray. При работе в режиме прямого ввода изучаемый образец растворяли в метаноле в концентрации 0,1 мг/мл и вводили в источник ионизации через шприцевой насос со скоростью потока 5 мкл/мин. Детектирование отрицательных и положительных ионов в ИЭР МС производилось в диапазоне 70–1500 m/z . Напряжение на капилляре распылителя составляло ± 4 кВ, в качестве газа-осушителя применялся азот. ИЭР МС/МС эксперименты проводились с помощью метода диссоциации, индуцированной столкновениями (ДИС), в качестве газа для столкновительной активации использовался азот. Энергия активации выбиралась в зависимости от массы иона-предшественника и составляла от 30 до 150 эВ. Калибровка масс-спектрометров выполнялась с использованием стандартного калибровочного раствора (ESI-L Low Concentration Tuning Mix, Agilent Technologies, США) и референсного раствора (API-TOF Reference Mass Solution Agilent Technologies, США).

Условия МАЛДИ МС экспериментов. Исследуемые вещества растворяли в метаноле в концентрации 10–50 мкг/мл. Матрицы, 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (2,5-DHB) и/или α -цианокоричную кислоту (HCCA), растворяли в смеси вода–ацетонитрил (1/1) с 0.1% ТФУ в концентрации 10 мг/мл. На мишень МАЛДИ наносили 0.5 мкл раствора анализируемого соединения, а затем к мишени добавляли 0.5 мкл раствора матрицы. После интенсивного перемешивания смеси давали высохнуть на воздухе при комнатной температуре. Масс-спектры МАЛДИ получали с использованием времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного твердотельным лазером (длина волны 355 нм, ширина импульса 4 нс, частота импульсов 200 Гц). Ионы, генерируемые в условиях МАЛДИ, ускорялись потенциалом 25 кВ с задержкой экстракции. Спектры получали в режиме рефлектрона и в линейном режиме. Каждый масс-спектр усреднялся как минимум по 500 лазерным импульсам.

1 Масс-спектрометрическое изучение биологически активных метаболитов морских беспозвоночных

1.1 Исследования полярных стероидных метаболитов морских звезд

Полярность многих метаболитов морских звезд, связанная с наличием моносакхаридных остатков и сульфатных групп, делает особенно продуктивным их масс-спектрометрическое изучение. Анализ данных масс-спектрометрии высокого разрешения позволил установить молекулярные формулы метаболитов. Характерные пути фрагментации в МС/МС спектрах позволили определить основные структурные особенности новых полярных стероидов, такие как наличие сульфатных групп или специфических заместителей, последовательность и состав моносакхаридных звеньев в олигосакхаридных цепях гликозидов и строение агликонов. Как правило, сульфатированные стероиды морских звезд обнаруживаются в виде ионов $[M+Na]^+$ и $[M-Na]^-$ в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов соответственно. Несульфатированные полигидроксистероиды и родственные им гликозиды обычно обнаруживаются в виде ионов $[M-H]^-$ и $[M+Cl]^-$ в (–)МС и в виде ионов $[M+Na]^+$ в режиме (+)МС. Хотя оба режима регистрации подходят для характеристики всех типов полярных стероидов, режим регистрации отрицательных ионов содержит пики более высокой интенсивности и больше подходит для анализа сульфатированных соединений, в то время как несульфатированные соединения анализируются в режиме регистрации положительных ионов. В данной работе было проанализировано масс-спектрометрическое поведение более 125 индивидуальных полярных стероидных соединений морских звезд, принадлежащих к различным структурным классам. Ниже приведены некоторые наиболее характерные из полученных результатов.

Исследование фрагментации полигидроксистероидов морских звезд

Было изучено масс-спектрометрическое поведение более 20 полигидроксилированных стероидов из морских звезд *Archaster typicus*, *Hippasterias kurilensis* и *Asteropsis carinifera*, включая 9 новых соединений [1–3]. Во всех случаях масс-спектры высокого разрешения (точность до 5 ppm) позволили установить брутто-формулы молекул. Установлено, что тандемные масс-спектры полигидроксистероидных соединений содержат фрагменты, позволяющие определить присутствие гидроксильных групп и структуры боковых цепей и ядер стероидов. В целом полигидроксистероидные соединения в условиях МС/МС склонны терять молекулы H_2O . Так, например, полигидроксистероиды **1** и **2** из *A. typicus* в спектрах (–)ИЭР МС/МС показали пики фрагментных ионов, соответствующие последовательной потере остатков H_2O : для гептаола **1** при m/z 451 $[(M-H)-H_2O]^-$, 433 $[(M-H)-2H_2O]^-$, 415 $[(M-H)-3H_2O]^-$, 397 $[(M-H)-4H_2O]^-$ и 379 $[(M-H)-5H_2O]^-$; и для нонаола **2** при m/z 497 $[(M-H)-H_2O]^-$, 479 $[(M-H)-2H_2O]^-$, 461 $[(M-H)-3H_2O]^-$, 443 $[(M-H)-4H_2O]^-$, 425 $[(M-H)-5H_2O]^-$ и 407 $[(M-H)-6H_2O]^-$. В спектре сульфатированного пентаола **3** из *A. typicus* с уникальной 27-

нор-25-оксо-холест-23-ен боковой цепью наблюдались пики, соответствующие потере остатка воды при m/z 511 $[(M-Na)-H_2O]^-$, пик иона f при m/z 445 $[(M-Na)-C_5H_7OH]^-$, соответствующий потере фрагмента боковой цепи, и пики, указывающие на присутствие сульфатной группы при m/z 97 $[HSO_4]^-$ и 80 $[SO_3]^-$. Как правило, в спектрах сульфатированных стероидов наблюдаются пики, соответствующие потере сульфатной группы, как, например, в случае стероида **4** из *H. kurilensis*, в (+)ББИ МС спектре которого наблюдались пик при m/z 607 $[M+Na]^+$, и характерные пики потерь нейтральных фрагментов в 102 и 120 Да при m/z 505 $[(M+Na)-NaSO_3+H]^+$ и 487 $[(M+Na)-NaHSO_4]^+$ соответственно (рисунок 1).

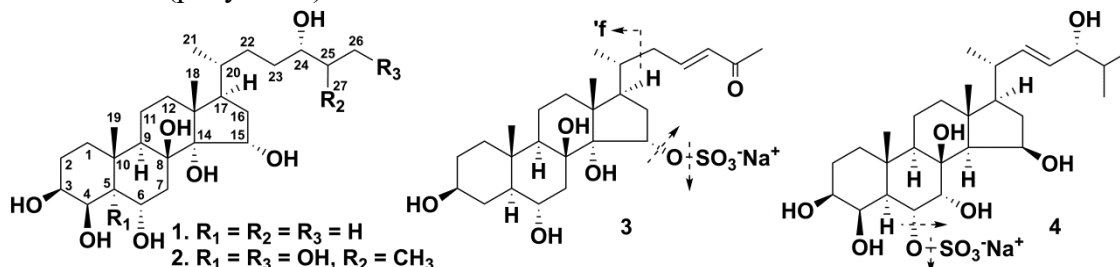


Рисунок 1 – Структуры соединений 1–4 и некоторые направления их фрагментации

Сравнительное изучение ИЭР масс-спектров пяти полигидроксистероидов 5–9, отличающихся количеством гидроксильных групп и конфигурациями ОН-группы при С-15 показало, что можно определить ориентацию гидроксильной группы в стероидном ядре с помощью тандемной МС [4]. В МС/МС спектрах протонированных и депротонированных молекул полигидроксистероидов обнаружены интенсивные серии пиков фрагментных ионов, соответствующие продуктам последовательной дегидратации $[M-H-nH_2O]^-$ и $[M-H-nH_2O-2H]^-$. Установлено, что в спектрах 15α -производных интенсивности фрагментных ионов $[M-H-nH_2O-2H]^-$ ($n = 1, 2, 3$) превышают интенсивности соответствующих фрагментных ионов $[M-H-nH_2O]^-$, тогда как для 15β -производных характерны более интенсивные пики ионов $[M-H-nH_2O]^-$ (рисунок 2).

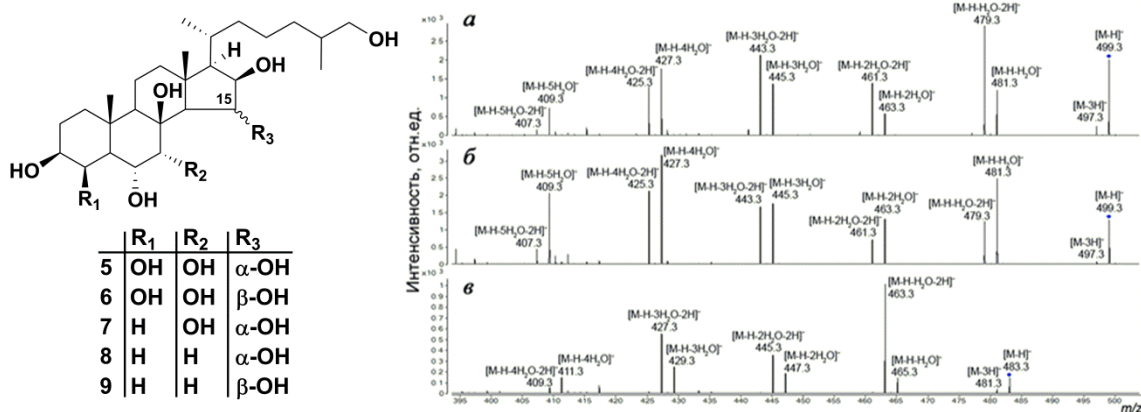


Рисунок 2 – Фрагменты (–)ИЭР МС/МС спектров ионов $[M-H]^-$ полигидроксистероидных соединений **5** (а), **6** (б) и **7** (в)

Исследование фрагментации гликозидов полигидроксистероидов морских звезд

Были исследованы более 70 гликозидов полигидроксистероидов, включая 46 новых соединений, выделенных из 9 видов морских звезд [2,5–12]. Тандемные масс-спектры полигидроксистероидных гликозидов с сульфатированным моносахаридным звеном содержали диагностические ионы B_0 при m/z 241 $[C_6H_9O_8S]^-$, 225 $[C_6H_9O_7S]^-$ или 211 $[C_5H_7O_7S]^-$, которые характерны для сульфатированных гексозных, метилированных пентозных или пентозных звеньев соответственно, тогда как присутствие интенсивных ионов Y-типа было связано с несulfатированными соединениями или сульфатированным агликоном. В некоторых случаях также были обнаружены фрагментные ионы А- и Х-типов, образующиеся при разрыве связей циклов

сульфатированных моносахаридов, что потенциально может позволить различать изомерные моносахариды с различным положением сульфатной группы. На рисунке 3 показан пример фрагментации нового гликозида афеластерозида E (**10**) из *Aphelasterias japonica* [5]. Локализация заряда на конце боковой цепи позволяет полностью последовательно «прочитать» структуру боковой цепи и однозначно определить локализацию и химическую природу моносахаридного остатка.

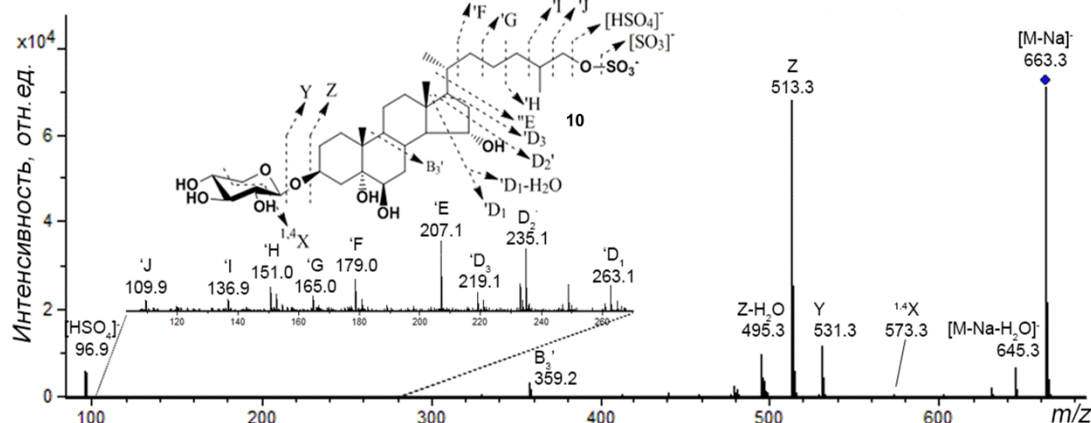


Рисунок 3 – (–)ИЭР МС/МС спектр иона $[M-Na]^+$ афеластерозида E (**10**)

В большинстве случаев для масс-спектрометрического описания веществ достаточно аннотации основных фрагментных ионов. Так, были изучены 11 новых гликозидов полигидроксистероидов из дальневосточной морской звезды *Hippasterias kurilensis*, включая четыре новых полигидроксистероидных триозида, впервые найденные в морских звездах [2,6]. Выделенные соединения отличаются разнообразием структур агликонов, причем большинство гликозидов *H. kurilensis* имеют 2-О-метил-β-D-ксилопиранозу при С-3 и дисахаридные фрагменты в боковой цепи при С-24. Масс-спектрометрическое исследование этих гликозидов проводили с помощью МАЛДИ, ББИ и ИЭР МС. Молекулярная формула куриленсозида A (**11**) была определена исходя из значений пика иона катионизированной молекулы $[M+Na]^+$ при m/z 1003.4223 в ВР (+)МАЛДИ МС и пика иона декатионизированной молекулы $[M-Na]^+$ при m/z 957 в (–)МАЛДИ МС. Пик фрагментного иона при m/z 901 $[(M+Na)-SO_3Na+H]^+$ в (+)МАЛДИ МС/МС указывал на присутствие сульфатной группы в гликозиде. Также на спектре наблюдались пики фрагментных ионов, соответствующих потере остатка арабинозы при m/z 871 $[(M+Na)-C_5H_8O_4]^+$ (Y_{1a}), остатка 2-О-метилксилозы при m/z 857 $[(M+Na)-C_6H_{10}O_4]^+$ (Y_{0b}) и совместной потере сульфатной группы и остатка арабинозы при m/z 769 $[(M+Na)-SO_3Na-C_5H_8O_4+H]^+$. В (–)МАЛДИ и ИЭР МС/МС также наблюдались пики фрагментных ионов, соответствующие потере остатка арабинозы при m/z 825 $[(M-Na)-C_5H_8O_4]^-$ (Y_{1a}), остатка 2-О-метилксилозы при m/z 811 $[(M-Na)-C_6H_{10}O_4]^-$ (Y_{0b}) и совместной потере остатков арабинозы и 2-О-метилксилозы при m/z 679 $[(M-Na)-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_4]^-$ (Y_{1a}/Y_{0b}). Масс-спектрометрическое изучение остальных гликозидов *H. kurilensis* выполняли по аналогичной схеме и полностью подтвердили предложенные структуры (рисунок 4).

Кариниферозиды А–F, 6 новых биозидов полигидроксистероидов из тропической морской звезды *Asteropsis carinifera*, были изучены с помощью (+) и (–)ВР ИЭР МС и МС/МС [7]. Все выделенные гликозиды являлись одноцепочечными биозидами полигидроксистероидов, их масс-спектры содержали характерные ионы, соответствующие потере гидроксильных групп и последовательной потере двух моносахаридных остатков. Так, например, молекулярная формула кариниферозида С (**12**) была установлена на основании значения иона $[M+Na]^+$ при m/z 827.4767. МС/МС спектр содержал пики фрагментных ионов при m/z 809 $[(M+Na)-H_2O]^+$, 681 $[(M+Na)-C_6H_{10}O_4]^+$ (Y_1), 663 $[(M+Na)-C_6H_{10}O_4-H_2O]^+$ и 549 $[(M+Na)-C_6H_{10}O_4-C_5H_8O_4]^+$ (Y_0) (рисунок 4).

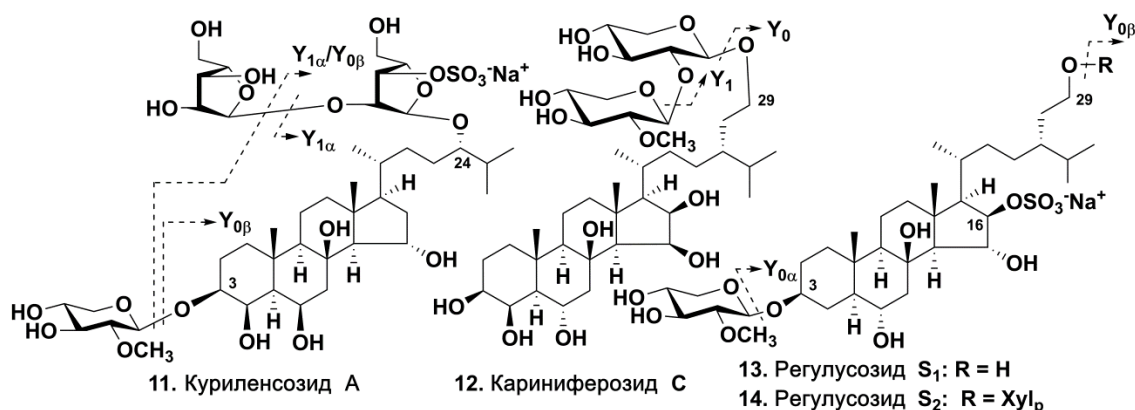


Рисунок 4 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 11–14

Три новых стероидных биозиды, регулусозиды А–С, из морской звезды *Pentaceraster regulus* также являлись одноцепочечными биозидами с агликоном (24S)-5α-холестан-3β,5,6β,8,15α,24-гексаолом и дисахаридными цепочками, присоединенными к С-24 агликона [8]. ИЭР МС/МС спектры показали характерные отрывы молекул воды и фрагментные ионы, образованные при разрыве гликозидных связей. Из фракции сульфатированных гликозидов были получены два новых гликозида, регулусозиды S₁ и S₂ (13,14), имеющие одинаковый стероидный агликон с необычным сульфатированием по С-16 и остаток 2-ОМеХул при С-3, но отличающиеся присутствием дополнительного остатка ксилозы при С-29 боковой цепи [9]. Для них было характерно наличие ионов Y_{0α} и Y_{0β} (рисунок 4).

Структура нового гликозида фишерииозид А (15) из *Lethasterias fisheri*, как натриевой соли (22E,24S,25S)-3-O-(β-D-ксилопиранозил)-24-метил-3β,6β,8,15α,16β-пентагидрокси-5α-холест-4,22-диен-26-овой кислоты N-(2-сульфоэтил)амида, была подтверждена присутствием в (+)ИЭР МС/МС фрагментных ионов при m/z 126 [SO₃Na₂]⁺, 153 [C₂H₃O₃SNa₂]⁺, 225 [C₅H₉NO₄SNa₂]⁺, а в (–)ИЭР МС/МС – фрагментных пиков при m/z 80 [SO₃][–], 108 [C₂H₄O₃S][–] ('L), 123 [C₂H₅NO₃S][–] ('K), 151 [C₃H₅NO₄S][–] ('J), 179 [C₅H₉NO₄S][–] ('T), 207 [C₇H₁₃NO₄S][–] ('H), 246 [C₁₀H₁₆NO₄S][–], соответствующих последовательному отщеплению фрагментов боковой цепи агликона (рисунок 5) [10].

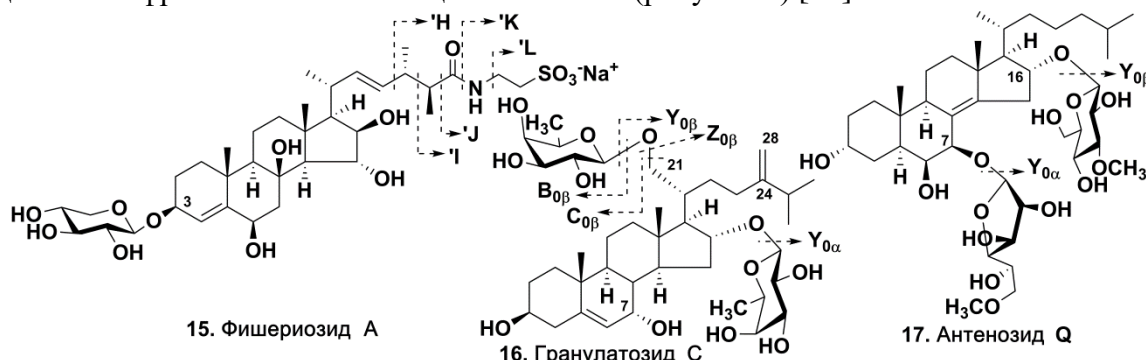


Рисунок 5 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 15–17

Структура уникального стероидного гликозида морских звезд – гранулатозид А (16) из *Choriaster granulatus*, имеющего необычные структурные фрагменты, а именно, Δ⁵-3β,7α,16α-тригидроксистероидное ядро, Δ²⁴⁽²⁸⁾-21-гидрокси-24-метилхолестановую боковую цепь, гликозилирование по положению С-21 и β-D-фукопиранозильные остатки, была установлена с помощью ИЭР МС (пик иона [M+Na]⁺ при m/z 761.4448 в ВР (+)ИЭР МС, пик иона [M+Cl][–] при m/z 773.4244 в ВР (–)ИЭР МС) [11]. МС/МС спектр содержал пики фрагментных ионов, соответствующие потере остатка дезоксигексозы при m/z 615 [(M+Na)–C₆H₁₀O₄]⁺ и 597 [(M+Na)–C₆H₁₂O₅]⁺, одновременной потере двух дезоксигексоз

при m/z 469 $[(M+Na)-2C_6H_{10}O_4]^+$ и пики моносахаридных остатков при m/z 169 $[C_6H_{10}O_4+Na]^+$ и 187 $[C_6H_{12}O_5+Na]^+$ (рисунок 5).

Был выполнен МС анализ 18 новых антенозидов из морских звезд *Anthea aspera* и *A. sibogae*, имеющих ряд необычных структурных фрагментов: $\Delta^{8,14}$ -3 α ,6 β ,7 β ,16 α -тетрагидроксилированное стероидное ядро, неокисленные боковые цепи в агликоне, остатки галактофуранозы, 3-ОМе- и/или 6-ОМе-галактофуранозы, 3-ОМе-глюкопиранозы, а также нетипичное место присоединения углеводных фрагментов по положению С-16 или одновременно по положениям С-16 и С-7 стероидного ядра (например, антенозид Q (17), рисунок 5) [12]. Выделенные антенозиды были исследованы в основном с помощью (+)ИЭР МС. В масс-спектрах наблюдались типичные для гликозидов полигидроксистероидов пики фрагментных ионов, связанные с отрывом молекул воды и моносахаридных остатков, а также пики катионизированных углеводных остатков, подтверждающие присутствие метилированных моносахаридов.

Исследование фрагментации астеросапонинов морских звезд

Были изучены масс-спектры более 30 астеросапонинов, включая 20 новых гликозидов, выделенных из 7 видов морских звезд [13–17]. Масс-спектрометрический анализ астеросапонинов проводили преимущественно методами ИЭР масс-спектрометрии. Масс-спектры высокого разрешения в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов позволили установить брутто-формулы молекул. Тандемные масс-спектры показали пики характерных фрагментов, указывающие на сульфатную группу (пик при m/z 97 в (–)МС режиме, потерю нейтральной молекулы массой 120 Да и пик при m/z 143 в (+)МС режиме). В (–)ИЭР МС/МС спектрах наблюдалась интенсивная серия ионов Y-типа, связанная с разрывами гликозидных связей и соответствующими последовательными потерями моносахаридных остатков. Аналогичные серии фрагментных ионов Y-типа, соответствующие потерям моносахаридных звеньев, а также серии фрагментных ионов B- и C-типа наблюдались в (+)ИЭР МС/МС спектрах этих олигогликозидов. Фрагментация некоторых астеросапонинов в условиях диссоциации, индуцированной столкновением (ДИС), давала очень интенсивный характерный ряд фрагментных ионов, образующихся одновременно с потерей нейтрального фрагмента боковой цепи. Например, в спектрах многих астеросапонинов наблюдалась нейтральная потеря фрагмента в 100 Да, а также серия фрагментных ионов Y–100. Эта фрагментация соответствует потере молекулы $C_6H_{12}O$, образующейся при разрыве связи C-20–C-22 и переносе 1H, что характерно для астеросапонинов, содержащих агликон с боковой цепью 20-гидроксихолестан-23-онового типа. Аналогичные серии ионов-продуктов Y–114 и Y–128 указывают на агликоны с боковыми цепями 20-гидрокси-24-метилхолестан-23-она и 20-гидрокси-24-этилхолестан-23-она. На рисунке 6 показана фрагментация в (–)ИЭР МС/МС спектре иона $[M-Na]^+$ офидианозида **F (18)**, выделенного из морской звезды *Aphelasterias japonica* [13].

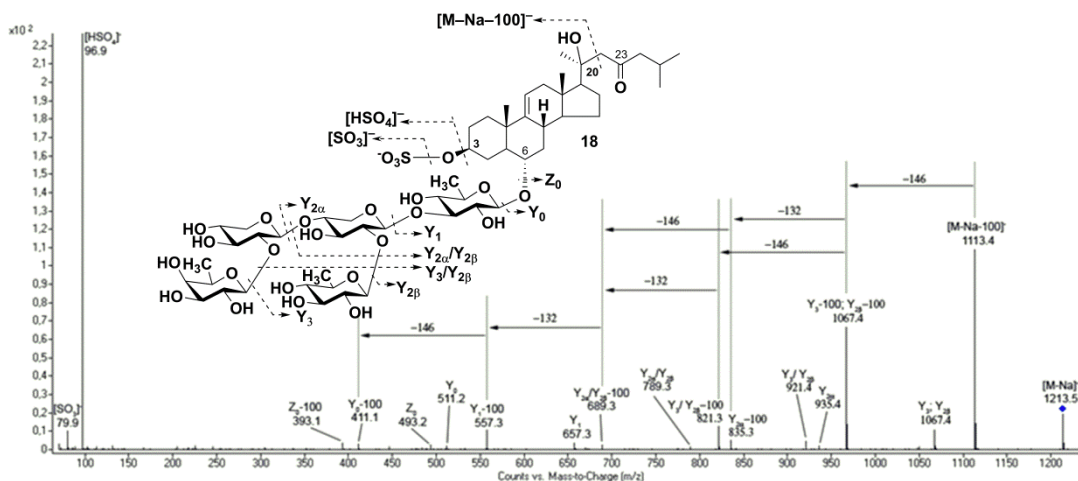


Рисунок 6 – (–)ИЭР МС/МС спектр иона $[M-Na]^-$ офидианозида **F (18)**

Общую схему МС анализа астеросапонинов можно представить на примере нового афеластерозида F (**19**) из *A. japonica* (рисунок 7) [13]. Молекулярная формула гликозида **19** была определена как $C_{57}H_{93}O_{29}SNa$ на основании значений пиков ионов катионизированной молекулы $[M+Na]^+$ при m/z 1319.5289 в ВР (+)ИЭР масс-спектре и декатионизированной молекулы $[M-Na]^-$ при m/z 1273.5517 в ВР (-)ИЭР МС. Пики фрагментных ионов при m/z 1199 $[(M+Na)-NaHSO_4]^+$ в (+)ИЭР МС/МС иона при m/z 1319 и при m/z 97 $[HSO_4]^-$ в (-)ИЭР МС/МС иона при m/z 1273 указывали на присутствие сульфатной группы в **19**. Последовательность моносахаридных звеньев в углеводной цепи была подтверждена данными тандемной МС. Так, в (-)ИЭР МС/МС спектре иона $[M-Na]^-$ при m/z 1273 наблюдалась серия пиков фрагментных ионов, соответствующая последовательной потере моносахаридных звеньев: при m/z 1127 $[(M-Na)-C_6H_{10}O_4]^-$ – потеря дезоксигексозы; 965 $[(M-Na)-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^-$ – потеря дезоксигексозы и гексозы; 981 $[(M-Na)-2C_6H_{10}O_4]^-$ – потеря двух дезоксигексоз; 819 $[(M-Na)-2C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^-$ – потеря двух дезоксигексоз и гексозы; 657 $[(M-Na)-2C_6H_{10}O_4-2C_6H_{10}O_5]^-$ – потеря двух дезоксигексоз и двух гексоз; и 511 $[(M-Na)-3C_6H_{10}O_4-2C_6H_{10}O_5]^-$ – потеря углеводной цепи. В (+)ИЭР МС/МС спектре иона при m/z 1319, также, помимо пика при m/z 1199 $[(M+Na)-NaHSO_4]^+$, присутствовала серия пиков фрагментов, возникающих при потере моносахаридных звеньев при m/z : 1053 $[(M+Na)-NaHSO_4-146]^+$, 907 $[(M+Na)-NaHSO_4-2C_6H_{10}O_4]^+$, 891 $[(M+Na)-NaHSO_4-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^+$, а также пиков фрагментов углеводной цепи при m/z : 803 $[3C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+H_2O+Na]^+$, 785 $[3C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+Na]^+$, 657 $[2C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+H_2O+Na]^+$, 639 $[2C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+Na]^+$, 511 $[C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+H_2O+Na]^+$, 493 $[C_6H_{10}O_4+2C_6H_{10}O_5+Na]^+$, 477 $[2C_6H_{10}O_4+C_6H_{10}O_5+Na]^+$, 347 $[2C_6H_{10}O_5+Na]^+$, 331 $[C_6H_{10}O_4+C_6H_{10}O_5+Na]^+$, и пик сульфатного остатка при m/z 143 $[Na_2HSO_4]^+$. Таким образом, тандемные масс-спектры астеросапонинов весьма информативны и позволяют установить последовательности моносахаридных остатков в углеводных цепях и предположить строение боковой цепи.

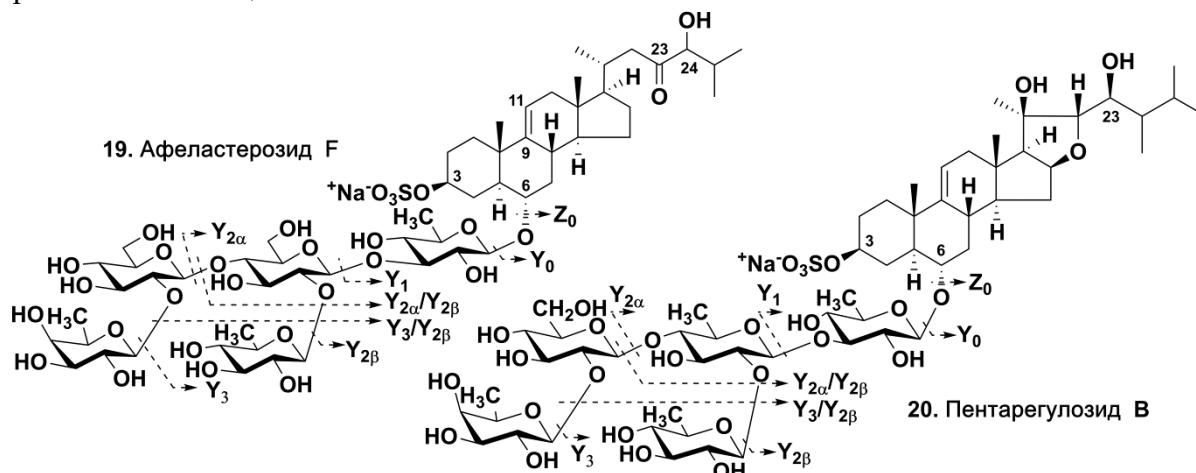


Рисунок 7 – Структуры и основные направления фрагментации соединений **19** и **20**

Из тропической морской звезды *Pentaceraster regulus* были выделены 7 новых астеросапонинов, пентарегулозиды А–Г, включающих 2 стероидных олигозида с 5α-фураностановым скелетом (например, пентарегулозид В (**20**), рисунок 7) [14]. Все найденные астеросапонины имели сходную архитектуру пентасахаридных углеводных цепей с разветвлением у второго моносахаридного остатка, при этом первый и третий моносахаридные остатки являлись остатками хиновозы, терминальный моносахарид являлся фукозой, отличия наблюдались по второму остатку (хиновоза или ксилоза) и третьему моносахариду (глюкоза или хиновоза). Кроме того, выделенные гликозиды отличались друг от друга строением боковых цепей, большинство из которых редко встречаются в стероидах морских звезд.

Аналогично методом ИЭР МС были изучены 4 новых гиппастериозида А–D из морской звезды *Hippasterias kurilensis* [15]. Показано, что эти астеросапонины имеют одинаковую гексасахаридную углеводную цепь с разветвлением при втором моносахаридном остатке и отличаются только строением боковых цепей агликонов. Было выполнено МС исследование трех новых астеросапонинов архастерозидов А–С из *Archaster typicus*, имеющих пентасахаридные углеводные цепи с разветвлением на втором моносахариде [16]. Архастерозиды В и С имеют уникальные олигосахаридные цепи, состоящие только из остатков 6-дезоксигексоз. Был исследован новый астеропсизид А из тропической морской звезды *Asteropsis carinifera*, установлено, что он имеет пентасахаридную углеводную цепь с разветвлением на втором остатке ксилозы и редкий агликон, боковая цепь которого содержит 20(22)-двойную связь и карбонильную группу при С-23 [17]. Изучение антарктической морской звезды *Diplasterias brucei* привело к установлению строения двух новых дипластериозидов А и В, эти соединения имеют одинаковую пентасахаридную углеводную цепь, не встречавшуюся в ранее изученных астеросапонины, и отличаются друг от друга присутствием дополнительной метильной группы при С-24 боковой цепи агликона 3-О-сульфоторнастерина А. Анализ фрагментации двух новых астеросапонинов, летастериозидов А и В из *Lethasterias fusca*, позволил установить, что они имеют идентичное строение углеводных пентасахаридных цепей и отличаются строением боковых цепей агликонов.

Исследование фрагментации циклических гликозидов морских звезд

Было проведено МС исследование 5 новых стероидных гликозидов, лузоникиозидов В–F из тропической морской звезды *Echinaster luzonicus*, являющихся представителями уникальной структурной группы циклических стероидных гликозидов морских звезд, имеющих стероидное ядро с 3 β ,6 β -диольной группой и 7(8)-двойной связью и углеводную цепь с тремя моносахаридными остатками, присоединенную гликозидной связью к С-3 и простой эфирной связью к С-6 агликона [18]. Эти вещества (например, лузоникиозид С (21)) содержат редкий для гликозидов иглокожих остаток глюкуроновой кислоты. Присутствие остатка глюкуроновой кислоты подтверждалось наличием в масс-спектрах, полученных в режиме регистрации положительных ионов, интенсивных пиков катионизированных молекул $[M_H+Na]^+$, тогда как масс-спектры сульфатированных астеросапонинов содержат только ионы $[M_{Na}+Na]^+$. Также было обнаружено, что циклические гликозиды склонны легко образовывать димеры и тримеры в условиях низкоэнергетической МС. Характерными особенностями tandem масс-спектров было наличие, помимо фрагментов, образованных при разрыве гликозидных связей, пиков фрагментных ионов, образованных путем разрыва связей внутри моносахаридных звеньев. Так, в МС/МС спектрах стероидных гликозидов с циклической углеводной цепью в режиме регистрации отрицательных ионов наблюдались интенсивные пики, связанные с потерей нейтральных частиц $C_2H_4O_2$ (60 Да), $C_3H_6O_3$ (90 Да) и $C_4H_8O_4$ (134 Да) (рисунок 8). В области низких масс наблюдался характерный пик при m/z 157 $[GlcA-2H_2O-H]^-$, связанный с отрывом остатка глюкуроновой кислоты.

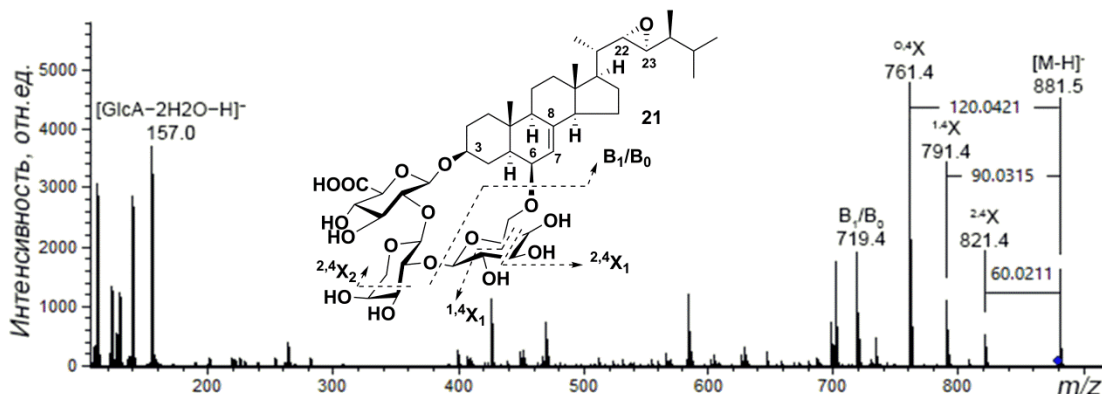


Рисунок 8 – (–)ИЭР МС/МС спектр иона $[M-Na]^-$ лузоникиозида С (21)

1.2 Масс-спектрометрическое изучение тритерпеновых гликозидов голотурий

В ходе данной работы методами МАЛДИ, ББИ и ИЭР масс-спектрометрии было изучено масс-спектрометрическое поведение более 200 тритерпеновых гликозидов из 13 видов голотурий, включая 153 новых соединений [19–38]. Для всех этих гликозидов масс-спектры высокого разрешения были получены с точностью до 5 ppm, что позволило установить брутто-формулы молекул. Было установлено, что тритерпеновые гликозиды голотурий имеют большое число возможных путей фрагментации их молекулярных ионов, которое определяется конкретной структурой каждой индивидуальной молекулы, однако основные направления фрагментации являются общими для всех соединений этого класса. Большинство тритерпеновых гликозидов, обнаруживаемых в диапазоне m/z от 1000 до 1600, в режиме регистрации положительных ионов детектируются как ионы $[M_{Na}+Na]^+$. Моносulfатированные и дисulfатированные тритерпеновые гликозиды в большинстве случаев обнаруживаются в режиме отрицательных ионов в виде ионов $[M_{Na}-Na]^-$ и $[M_{2Na}-2Na]^{2-}$ соответственно, тогда как несulfатированные соединения выявляются в виде ионов $[M-H]^-$. Присутствие трисульфатированных гликозидов можно определить по образованию ионов $[M_{3Na}-Na]^-$, $[M_{3Na}-2Na]^{2-}$ и $[M_{3Na}-3Na]^{3-}$. Образование фрагментных ионов в tandemных масс-спектрах в первую очередь связано с разрывом гликозидных связей как между углеводным фрагментом и агликоном, так и между моносахаридными остатками, что проявляется в виде серий фрагментных ионов B-, C-, Y- и Z-типов. Эти характеристические серии дают информацию о последовательности моносахаридных остатков в углеводных цепях. Направление фрагментации во многом зависит как от способа инициирования фрагментации, так и от типа иона-предшественника. В частности, для протонированных ионов вероятнее фрагментация с разрывом гликозидной связи; для аддуктов с катионами металлов повышается вероятность образования ионов A- или X-типов с разрывом связей моносахаридных колец.

Сульфатированные соединения в tandemных масс-спектрах дают характерные пики фрагментных ионов при m/z 80 $[SO_3]^-$ и 97 $[HSO_4]^-$ в режиме регистрации отрицательных ионов и при m/z 143 $[Na_2HSO_4]^+$ в режиме регистрации положительных ионов, где также наблюдается интенсивный пик фрагментного иона $[M+Na-NaHSO_4]^+$, связанный с отрывом сульфатной группы от катионизированной молекулы с сохранением заряда на агликоне. Tandемные масс-спектры многих тритерпеновых гликозидов показывают типичные потери нейтральных масс, связанных с фрагментацией агликона, и предоставляют информацию о структуре ядра и боковой цепи. Так, присутствие в tandemных масс-спектрах некоторых гликозидов интенсивного пика фрагментного иона, возникающего при отрыве нейтральной молекулы массой 60 Да ($C_2H_4O_2$), характерно для гликозидов, содержащих ацетоксигруппу. Интенсивный фрагментный ион, связанный с потерей фрагмента массой 104 Да ($C_2H_4O_2+CO_2$), наблюдается в MC/MC спектрах соединений с ацетоксигруппой и 18(20)-лактонным циклом. На рисунке 9 показан типичный (–)ИЭР MC/MC спектр тритерпеновых гликозидов голотурий на примере кукумариозида F₂ (22) из *Eupentacta fraudatrix*.

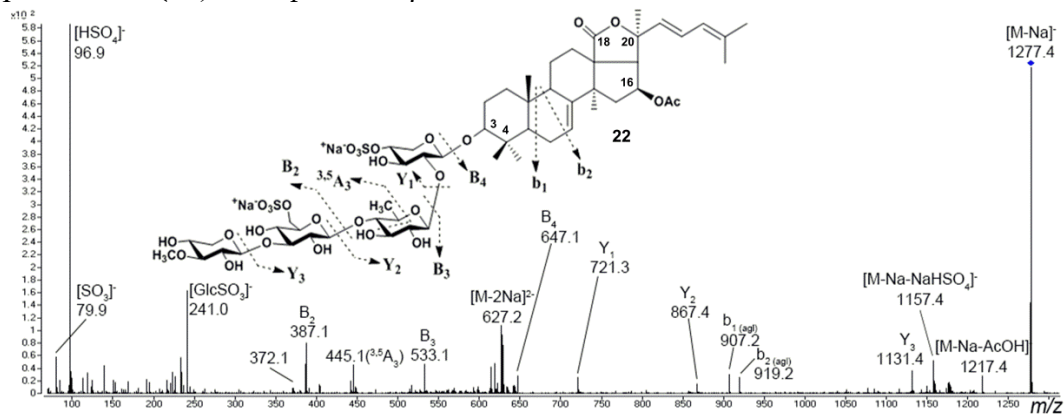


Рисунок 9 – (–)ИЭР MC/MC спектр иона $[M-Na]^-$ кукумариозида F₂ (22)

Были изучены ИЭР масс-спектры двух новых тритерпеновых голостановых несультрированных пентаозидов, колгаозидов А (23) и В (24), выделенных из экстракта арктической глубоководной голотурии *Kolga hyalina* [19]. Эти гликозиды имеют одинаковые углеводные цепи с разветвлением на первом остатке ксилиты и различаются структурами боковых цепей агликонов. Поскольку углеводные цепи этих гликозидов несультрированы, то вся структурная информация была получена исходя из данных масс-спектров в режиме регистрации положительных ионов (рисунок 10, таблица 1).

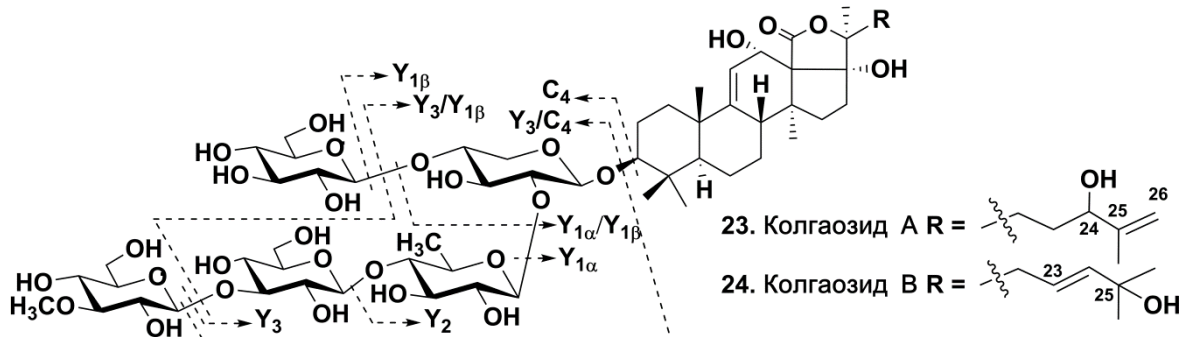


Рисунок 10 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 23 и 24

Таблица 1 – (+)ИЭР МС спектры колгаозидов А и В (23, 24).

№	Брутто-формула	m/z								
		[M+Na] ⁺	Y ₃	Y ₃ /Y _{1β} , Y _{2α}	Y _{1α}	C ₄	Y _{1α} /Y _{1β}	C ₄ /Y ₃	C ₄ /Y _{2α} , C ₄ /Y ₃ /Y _{1β}	C ₄ /Y _{1α}
23	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉	1303.5951	1127.5	965.5	819.5	819.3	657.4	643.2	481.2	335.2
24	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉	1303.5962	1127.5	965.5	819.5	819.3		643.3	481.2	335.2

Новые охотозиды В₁, В₂ и В₃ (25–27), выделенные из гликозидной фракции дальневосточной голотурии *Cucumaria okhotensis*, были изучены с помощью (–) и (+)МАЛДИ и ББИ масс-спектрометрии [20]. Эти тетраозиды содержат нетипичную для гликозидов голотурий рода *Cucumaria* новую углеводную цепь с остатком глюкозы в качестве второй моносахаридной единицы. Углеводная цепь охотозидов В₁ содержит одну сульфатную группу, а охотозиды В₂ и В₃ имеют дисульфатированные углеводные цепи, отличающиеся присутствием сульфатных групп в первом и терминальном моносахаридных остатках (рисунок 11, таблица 2).

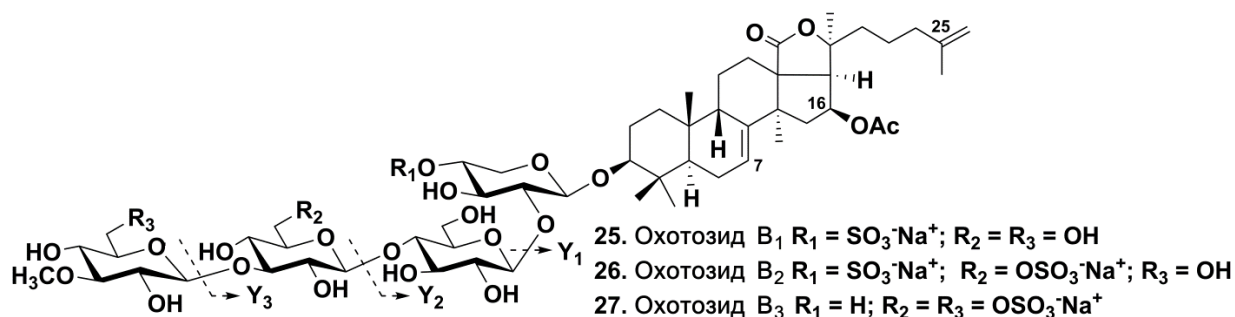


Рисунок 11 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 25–27

Таблица 2 – (–) и (+)МАЛДИ МС спектры охотозидов В₁, В₂ и В₃ (25–27).

№	Брутто-формула	m/z								
		[M–Na] [–]	[M–2Na] ^{2–}	[M–Na–102] [–]	Y ₃ –102	Y ₃	Y ₂	Y ₁	[HSO ₄] [–]	[SO ₃] [–]
25	C ₅₆ H ₈₇ O ₂₇ SNa	1223.5				1047.5	885.4	723.4	97	80
26	C ₅₆ H ₈₆ O ₃₀ S ₂ Na ₂	1325.4	651.2	1223.4	1047.4		885.4	723.3	97	80
27	C ₅₆ H ₈₆ O ₃₀ S ₂ Na ₂	1325.4	651.2	1223.4		1047.4			97	80
		[M+Na] ⁺	[M+Na–102] ⁺	[M+Na–120] ⁺	[M+Na–2×102] ⁺	Y ₃ –102	Y ₃ –2×102	Y ₃	Y ₂	Y ₁
25	C ₅₆ H ₈₇ O ₂₇ SNa	1269.4817	1167.4	1149.4				1093.4	931.4	769.3
26	C ₅₆ H ₈₆ O ₃₀ S ₂ Na ₂	1371.4428	1269.4	1251.4	1167.4		991.4			
27	C ₅₆ H ₈₆ O ₃₀ S ₂ Na ₂	1371.4339	1269.4		1167.4	991.4		991.4	829.4	667.4

Новые виолацеусозиды С, D, E и G (28–31) из тропической голотурии *Pseudocolochirus violaceus* были изучены в режиме (–)ИЭР МС (рисунок 12, таблица 3) [21]. Показано, что они имеют агликоны голостанового типа и линейные тетрасахаридные углеводные цепи, различающиеся моносахаридным составом, а также количеством (от одной до трех) и положением сульфатных групп. Виолацеусозиды E и G имеют редкое положение сульфатной группы при C-3 остатка хиновозы. Можно отметить разнообразный набор образующихся фрагментных ионов, зависящий от структур молекул.

28. Виолацеусозид С Δ^{24} $R_1 = O$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$

29. Виолацеусозид D Δ^{24} $R_1 = \beta OAc$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = CH_2OSO_3^-Na^+$

30. Виолацеусозид E Δ^{25} $R_1 = O$, $R_2 = SO_3^-Na^+$, $R_3 = R_4 = H$

31. Виолацеусозид G Δ^{24} $R_1 = \beta OAc$, $R_2 = R_4 = SO_3^-Na^+$, $R_3 = H$

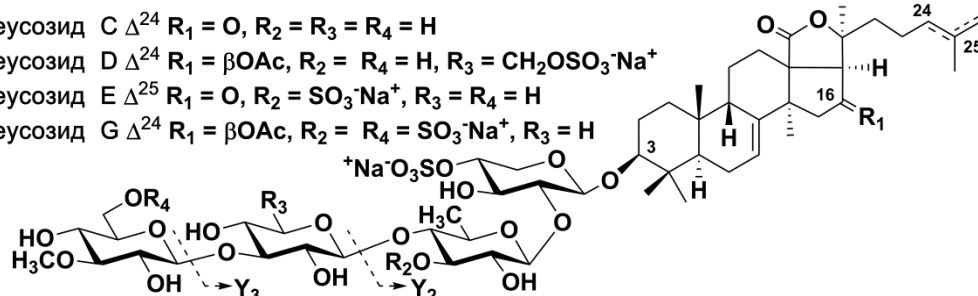


Рисунок 12 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 28–31

Таблица 3 – (–)ИЭР МС спектры виолацеусозидов С, D, E и G (28–31)

№	Брутто-формула	m/z							
		[M–Na] [–]	[M–2Na] ^{2–}	[M–Na–60] [–]	[M–Na–102] [–]	[M–Na–120] [–]	Y ₃ –102	Y ₃	Y ₂
28	C ₅₃ H ₈₁ O ₂₄ SNa	1133.4826						957.4	825.4
29	C ₅₆ H ₈₆ O ₂₆ S ₂ Na ₂	1309.4608	643.2402	1249.5	1207.5		1031.4		869.4
30	C ₅₃ H ₈₀ O ₂₇ S ₂ Na ₂	1235.4238	606.2192		1133.4	1115.4	957.4		
31	C ₅₅ H ₈₃ O ₃₁ S ₃ Na ₃	1381.3860	679.1999			1261.4			
продолжение									
	Y ₂ –102	Y ₁	Z ₁	C ₄	B ₃	B ₂	C ₂	[HSO ₄] [–]	[SO ₃] [–]
28		679.4		683.2				97	80
29		723.4			563.2	417.2		97	80
30	825.4		661.3					97	80
31		723.3			635.2		405.2	97	80

Голотурия *Eupentacta fraudatrix* много лет является предметом поиска новых тритерпеновых гликозидов, ранее из нее было выделено 7 соединений. В последние годы при помощи современных хроматографических методов был выделен 31 индивидуальный новый гликозид, принадлежащих к 6 структурным группам (A, B, D, F, I, H), которые различаются строением углеводных цепей. Масс-спектрометрический анализ выделенных гликозидов проводился методами МАЛДИ, ББИ и ИЭР масс-спектрометрии [22,23]. Установлено строение всех выделенных из *E. fraudatrix* гликозидов, включая 15 несulfатированных тетраозидов (кукумариозиды A₁–A₁₅), 2 несulfатированных триозидов (кукумариозиды B₁ и B₂), 2 несulfатированных пентаозидов (кукумариозиды C₁ и C₂), 4 sulfатированных тетраозидов (кукумариозиды G₁–G₄), 8 sulfатированных пентаозидов (кукумариозиды H, H₂–H₈), 2 дисulfатированных тетраозидов (кукумариозиды F₁ и F₂), 4 дисulfатированных пентаозидов (кукумариозиды I₁–I₄), а также минорного несulfатированного пентаозид кукумариозид D, впервые обнаруженного в экстракте *E. fraudatrix* при метаболическом профилировании с помощью ВЭЖХ-ИЭР МС. Установлено, что большинство гликозидов *E. fraudatrix* характеризуются наличием остатка 3-О-метилсилилозы в качестве терминального звена в углеводной цепи, который рассматривается как хемотаксономический маркер голотурий рода *Eupentacta*. Структуры тритерпеновых гликозидов *E. fraudatrix* описаны далее в разделе 2.4.

Аналогично с помощью МАЛДИ и ИЭР масс-спектрометрии были изучены 116 новых тритерпеновых гликозидов из голотурий *Synapta maculata*, *Actinocucumis typical*, *Colochirus robustus*, *Neothyonidium (=Massinium) magnum*, *Cucumaria fallax*, *Colochirus quadrangularis*, *Psolus fabricii* и *Cladolabes schmeltzii* [24–38]. Описана масс-

спектрометрическая фрагментации для 52 ранее не найденных в гликозидах голотурий типах углеводных цепей, включая несulfатированные и моно-, ди- и трисульфатированные ди-, три-, тетра-, пента- и гексасахаридные цепи, отличающиеся моносахаридным составом, положениями сульфатных групп и архитектурой олигосахаридных цепей (линейные и разветвленные углеводные цепи). Найдены углеводные цепи с уникальным для гликозидов голотурий остатком 3-О-метилглюкуроновой кислоты, необычными сульфатированным по С-4 остатком 3-О-метилглюкозы и дисульфатированным по положениям С-2 и С-4, С-2 и С-6 или С-4 и С-6 остатком глюкозы. Изучены гликозиды с редкими негостановыми агликонами, агликонами, имеющими пероксидную группу, а также с ранее неописанными типами скелетных систем. В целом, накоплена большая база данных масс-спектров, дающая обильную информацию зависимости масс-спектрометрического поведения молекул тритерпеновых гликозидов голотурий от их структурных особенностей.

1.3 Масс-спектрометрическое изучение вторичных метаболитов морских губок

Были проанализированы масс-спектры более 100 вторичных метаболитов морских губок, принадлежащих к различным структурным классам, включая 70 ранее неизвестных соединений. Например, губки рода *Erylus* являются богатым источником тритерпеновых гликозидов. Были изучены 7 новых гликозидов, эрилозиды R₁ и T₁–T₆ из карибской губки *E. formosus* [39]. Все выделенные эрилозиды были изучены с помощью (+)ИЭР МС. Во всех спектрах наблюдались потеря CO₂, указывающая на присутствие карбоксильной группы, а также пики ионов Y-типа, соответствующие потере углеводных остатков и пики фрагментов углеводных цепей (например, эрилозид T₁ (32), рисунок 13). Показано, что выделенные гликозиды имеют карбоксилированные по С-14 ланостановые агликоны, эрилозид R₁ является триозидом, а остальные являются гексаозидами. Обнаружены 3 новых типа углеводных цепей. Все эти тритерпеновые гликозиды содержат α-L-арабинопиранозу в качестве первого моносахаридного остатка, разветвление на первом моносахариде и отличаются строением боковых цепей, а также вторым и пятым (терминальным) моносахаридами, что подтверждено их масс-спектрами. Аналогично с помощью (–) и (+)ИЭР МС были изучены 7 новых тритерпеновых гликозидов, эрилозиды F₈, V₁–V₃, W, W₁ и W₂, из карибской губки *E. goffrilleri* [40]. Установлено, что они содержат подобные 14-карбоксиланостановые агликоны, 6 гликозидов имеют ацетоксигруппу в боковой цепи. Эрилозид F₈ является биозидом, эрилозиды V₁–V₃ – триозидами, а эрилозиды W, W₁ и W₂ – тетраозидами и содержат Gal, GalNAc, Aра_п и Xyl в качестве моносахаридных остатков. Все выделенные эрилозиды были изучены с помощью (–) и (+)ИЭР МС. В условиях тандемной МС наблюдалась потеря CO₂, указывающая на присутствие карбоксильной группы, а также фрагментные ионы, образованные при разрыве гликозидных связей.

Были исследованы два новых стероидных гликозида микалозиды J и K из карибской морской губки *Mycale laxissima*. Эти гликозиды являются тетраозидами и отличаются строением агликонов и присутствием ацетатной группы в остатке глюкopiранозы. Фрагментация этих гликозидов в (+)ИЭР МС подтвердила разветвленное строение углеводной цепи, и присутствие ацетатной группы в остатке глюкозы.

Двухголовые (биполярные) сфинголипиды некоторых губок являются необычными, соединенными «хвост к хвосту», димерными природными соединениями, в которых длинная углеводородная цепь заканчивается с обеих сторон полярными фрагментами (α- и ω-концы). Нами были исследованы несколько соединений этого структурного класса, выделенные из морских губок *Rhizochalina incrustata* и *Oceanapia* sp., а именно, различные ризохалины и океаналины А (33) и В (34) (рисунок 13) [41]. Океаналины – уникальные соединения, в которых один из концов содержит изохинолиновую циклическую систему, а другой подобен, но не идентичен полярному концу сфинголипидов. ВР ИЭР масс-спектрометрия была использована не только для

установления брутто-формулы исследуемых соединений, но также для анализа продуктов реакции восстановительного озонлиза, что стало критически важным для определения положения функциональной группы при С-18.

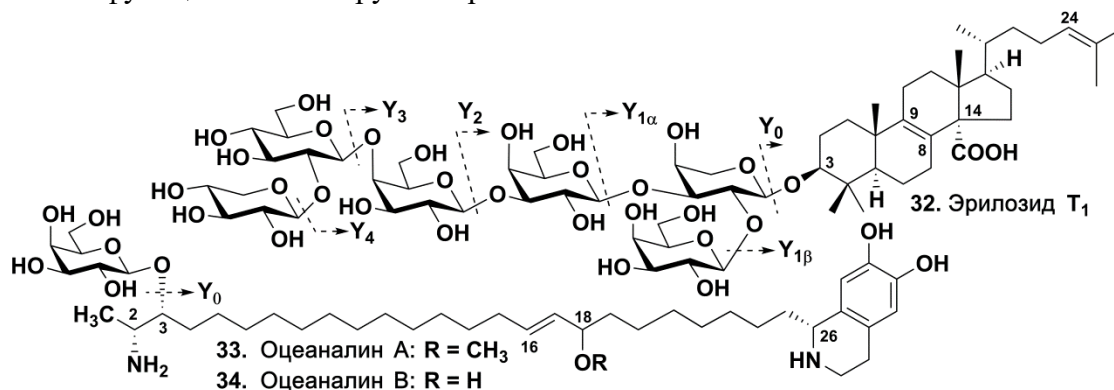


Рисунок 13 – Структуры и основные направления фрагментации соединений 32–34

Изучение двух популяций дальневосточной морской губки *Melononchora kobjakovae* привело к выделению первых представителей нового структурного класса ω-О-гликозилированных полиоксигенированных амидов жирных кислот мелонозида А и его изомера мелонозида В, а также их негликозилированных аналогов мелонозинов А и В [42,43]. Точное положение кетогрупп и двойных связей было установлено с помощью химических трансформаций и подробного анализа полученных производных с помощью ВР ИЭР МС/МС в режимах регистрации отрицательных и положительных ионов. На рисунке 14 (а) в качестве примера приведена фрагментация полученного из мелонозида В (35) метоксигидропероксида (36).

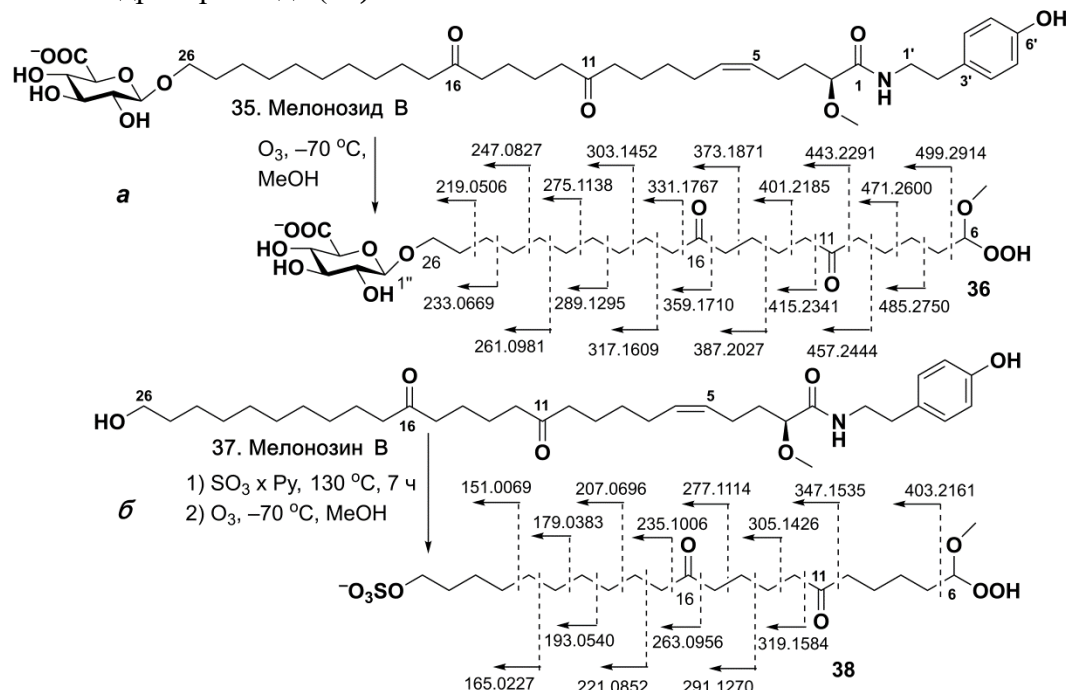


Рисунок 14 – Структуры и основные направления фрагментации: а) мелонозида В (35) и полученного из него метоксигидропероксида (36), б) мелонозина В (37) и полученного из него сульфатированного метоксигидропероксида (38)

ВР ИЭР МС и МС/МС спектры мелонозина В (37) практически не показали наличие фрагментных ионов, образованных при α или β разрывах ковалентных связей около карбонильных групп. Поэтому для установления позиции карбонильных групп в 37 был синтезирован метоксигидропероксид 38 с отрицательно заряженной сульфатной группой на ω-конце. Тандемные масс-спектры производного 38, полученные в режиме

регистрации отрицательных ионов, содержали серию пиков фрагментных ионов, образованных при последовательном разрыве ковалентных связей, что позволило точно определить местонахождение карбонильных групп в соединении **37** (рисунок 14, б).

Изучение различных коллекций дальневосточной морской губки *Monanchora pulchra* привело к выделению серий различных гуанидиновых алкалоидов. В том числе, были изучены уникальные пентациклические гуанидиновые алкалоиды, монанхоцидины А–Е, монанхомикалины А–С и нормонанхоцидины А, В и D [44–47]. Их структуры можно условно разделить на три структурных блока, таких как: «корабельная» часть, «якорная» часть и полиметиленовая цепь. Структуры найденных соединений представляют собой сочетание двух вариантов «корабельных» частей и трех вариантов «якорных» частей с полиметиленовыми цепями различной длины (рисунок 15, соединения **39–44**). Все алкалоиды выделялись в виде солей трифторуксусной кислоты. Масс-спектрометрическое изучение выделенных молекул проводили с помощью ВР МАЛДИ и ВР ИЭР МС в режиме регистрации положительных ионов. Интересно, что для монанхоцидинов А–Е в (+)МАЛДИ МС наблюдались пики метастабильных ионов при m/z 773, 745, 759, 745 и 759, соответственно, при этом форма пиков которых почти не отличалась от пиков нормальных ионов. Наличие метастабильных ионов, подтверждалось МАЛДИ МС/МС спектрами (LIFT) родительских ионов $[M+H]^+$, в которых наблюдались фрагментные пики $[M+H-101]^+$ при m/z 758, 730, 744, 730 и 744, соответственно, вместо пиков метастабильных ионов. Отсутствие пиков при m/z 773, 745, 759, 745 и 759 в линейном режиме подтверждало их метастабильную природу. Упомянутые пики метастабильных ионов в режиме рефлектрона можно рассматривать как следствие расщеплений связей О–С-43 и N–С-42 с переносом 2H на заряженные фрагменты. Это показывает, что следует соблюдать осторожность при интерпретации МАЛДИ спектров для этой группы природных соединений. Можно отметить, что для монанхомикалинов А–С и нормонанхоцидинов А, В и D основным пиком в ВР (+)ИЭР МС являлся пик $[M+2H]^{2+}$.

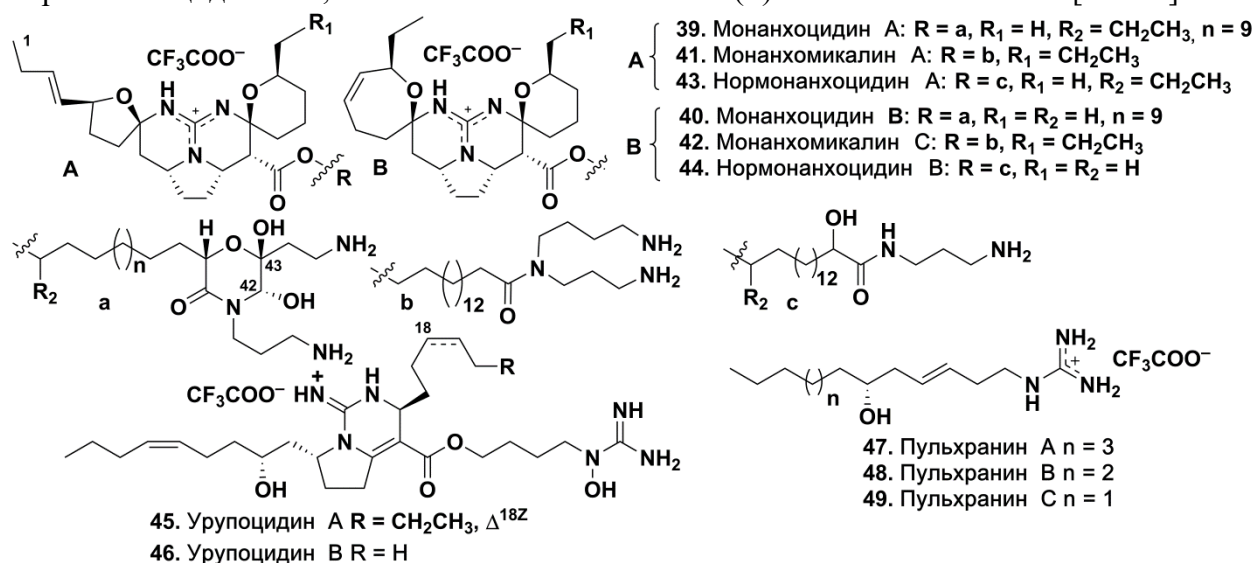


Рисунок 15 – Структуры соединений **39–49**

Кроме того, из *M. pulchra* были получены уникальные бициклические гуанидиновые алкалоиды, урупацидины А и В (**45** и **46**) [48]. Данные ВР (+)ИЭР МС позволили установить брутто-формулы молекул, при этом в масс-спектре соединения **45** основным являлся пик $[M+2H]^{2+}$. Новые ациклические гуанидиновые алкалоиды пульхранины А–С (**47–49**) из *M. pulchra* были изучены с помощью (+)МАЛДИ и (+)ИЭР МС [49]. Эти вещества являются гомологами, что было подтверждено значениями пиков ионов протонированных молекул.

Роль масс-спектрометрии высокого разрешения чрезвычайно важна в исследованиях небольших молекул, особенно в случае соединений, содержащих

гетероатомы. Три новых производных дибромтирозина **50**, **51** и **52** были обнаружены при изучении губки *Aplysina* sp. [50]. Брутто-формула $C_{24}H_{32}O_8N_2^{79}Br_4$ соединений **50** и **51** определена на основании наличия в их ВР (+)МАЛДИ масс-спектрах пика молекулярного иона $[M+Na]^+$ при m/z 814.8755, входящего в изотопный кластер из пяти пиков (соотношение интенсивностей 1:4:6:4:1). Фрагментация иона $[M+Na]^+$, соответствующего центральному пику кластера $C_{24}H_{32}O_8N_2^{79}Br_2^{81}Br_2Na$, показала интенсивные пики дочерних ионов при m/z 407.654 и 433.680, образующихся в результате разрывов связи между атомом углерода С-9 и одним из атомов азота. Брутто-формулу $C_{15}H_{23}O_5N^{79}Br_2$ соединения **52** установили по наличию пиков молекулярных ионов (компонентов изотопного кластера из трех пиков в соотношении интенсивностей 1:2:1) при m/z 477.9831 $[M+Na]^+$ в ВР (+)ИЭР масс-спектре и при m/z 453.9875 $[M-H]^-$ в ВР (-)ИЭР МС. МС/МС спектры этих ионов показали пики фрагментных ионов $[(M+Na)-EtOH]^+$ и $[(M-H)-EtOH]^-$ соответственно (рисунок 16).

Из морских губок *Topsentia* sp. и *Halichondria vansoesti* были выделены 9 новых стероидов, имеющих трисульфатированное стероидное ядро и отличающихся строением боковых цепей [51]. Брутто-формулы выделенных веществ были установлены на основании пиков ионов $[M_3Na-Na]^-$, а также пиков двух- и трехзарядных ионов $[M_3Na-2Na]^{2-}$ и $[M_3Na-3Na]^{3-}$. Большинство выделенных стероидов имеют в составе атомы галогенов, поэтому для подтверждения брутто-формул значения интенсивностей изотопных пиков кластера молекулярных ионов сравнивались с расчетными значениями, что, например, позволило различить молекулы хлор-, йод- и бромтопсентиастерин сульфатов **53–55** (рисунок 16).

Из морской губки *Guitarra imbriata* были выделены первые природные 5-азаиндолы гуитаррины А–Е, и уникальный алюмогуитаррин А (**56**), первое алюминийсодержащее соединение, найденное в морских беспозвоночных [52]. Брутто-формулы выделенных соединений были установлены с помощью ВР (+)ИЭР МС. Молекулярная формула алюмогуитаррина А (**56**) была установлена как $C_{24}H_{15}AlN_6O_6$ исходя из значения пиков $[M+H]^+$ при m/z 511.0945 (рассчит. для $[C_{24}H_{16}AlN_6O_6]^+$, 511.0941) и при m/z 533.0761 $[M+Na]^+$ (рассчит. для $[C_{24}H_{15}AlN_6O_6Na]^+$, 533.0761). Исследование новых неопетрозидов А (**57**) и В из губки *Neopetrosia* sp., являющихся пиридиновыми нуклеозидами α -рибозидами с ацильным заместителем при С-5' в углеводном остатке, проводилось методами ВР ИЭР МС, tandemные масс-спектры этих соединений содержали фрагментный ион, образованный при отрыве никотиновой кислоты, и пик фрагментного иона, соответствующего остатку *para*-гидроксibenзойной кислоты (рисунок 16) [53].

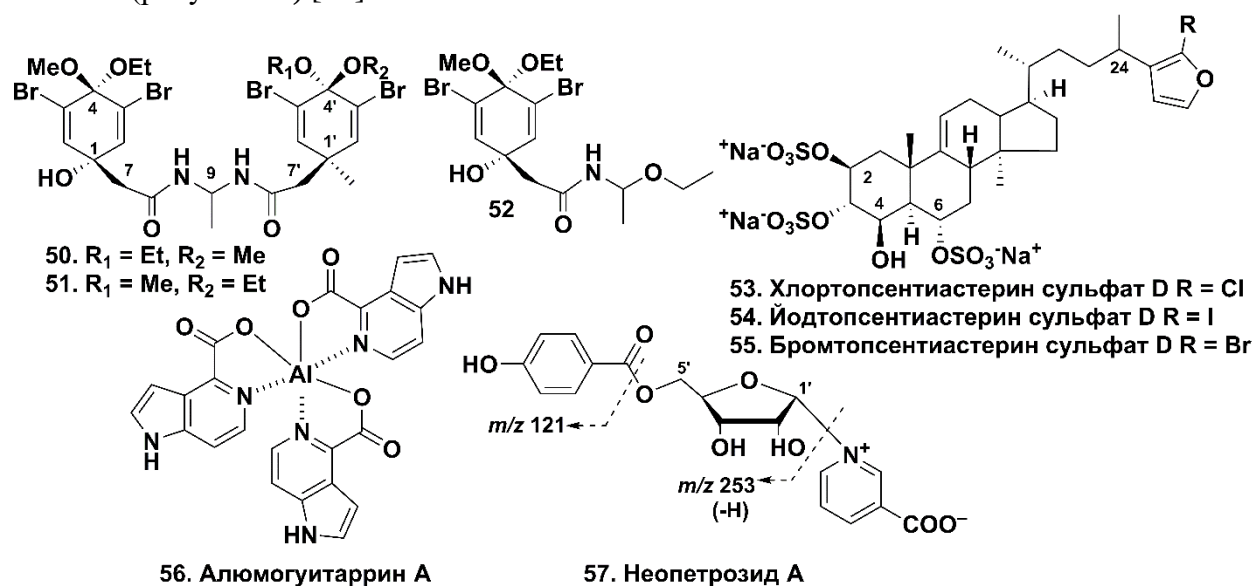


Рисунок 16 – Структуры соединений **50–57**

2 Исследование метаболомных профилей морских звезд и голотурий

Метаболомика является быстро развивающейся областью исследований, основанной на изучении состава низкомолекулярных метаболитов различных организмов, органов, тканей. Получение метаболических отпечатков и метаболическое профилирование (получение метаболических профилей соединений определенного класса) являются основными методами метаболомного подхода. Метаболическое профилирование проводится с целью исследования целевых групп метаболитов, поиска новых соединений, установления или уточнения путей биосинтеза, поиска биомаркеров, для изучения влияния на организмы факторов окружающей среды. Современная метаболомика характеризуется широким применением методов, основанных на сочетании масс-спектрометрии с различными хроматографическими техниками: высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-МС), газовой хроматографией (ГХ-МС), капиллярным электрофорезом (КЭ-МС). Следует подчеркнуть, что методы ВЭЖХ-МС имеют высокую чувствительность и не требуют сложной процедуры пробоподготовки или предварительной химической дериватизации, что делает возможным одновременный анализ широкого набора первичных и/или вторичных метаболитов. Метаболическое профилирование, включающее в себя анализ низкомолекулярных вторичных метаболитов в биологических объектах современными методами ВЭЖХ-МС, в последние годы интенсивно используется для изучения метаболитов наземных растений и животных, однако количество работ, посвящённых метаболомным исследованиям морских беспозвоночных, весьма ограничено. В ходе данной работы нами впервые применены метаболомные подходы для метаболического профилирования морских звезд и голотурий [54–60].

2.1 Исследование метаболомного профиля полярных стероидных соединений дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* методом ВЭЖХ-ИЭР МС/МС

Как было показано, стероидные метаболиты в экстрактах морских звезд образуют очень сложные смеси, которые трудно поддаются разделению на чистые соединения хроматографическими методами. Многие метаболиты остаются в значительной степени неизученными. Нами впервые был применен метаболомный подход, включающий применение сочетания жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ИЭР МС/МС), для профилирования и характеристики полярных стероидов дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* [55].

Предыдущие исследования морской звезды *A. japonica* привели к выделению 17 стероидных соединений, в том числе 8 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов, 3 астеросапонинов и 6 сульфатированных полигидроксистероидов. Однако ИЭР масс-спектры в режиме регистрации отрицательных и положительных ионов суммарного этанольного экстракта *A. japonica* показали присутствие гораздо большего количества различных сульфатированных стероидных гликозидов и родственных им соединений. Масс-спектры, полученные в режиме регистрации отрицательных ионов содержали характерные пики в диапазоне m/z от 1100 до 1450, соответствующие ионам $[M-Na]^-$ астеросапонинов, а также пики ионов полигидроксилированных стероидов, включая их моно- и биозиды, в диапазоне m/z от 400 до 800. Кроме того, в масс-спектрах были обнаружены пики двухзарядных ионов при m/z 368 и 318. В режиме регистрации положительных ионов наблюдаемые ионы были в основном координированы натрием.

В результате анализа методом ВЭЖХ-ИЭР МС в режиме регистрации отрицательных ионов этанольного экстракта *A. japonica* была получена хроматограмма, включающая 68 компонентов – 33 астеросапонины, 28 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и 7 сульфатированных полигидроксилированных стероидов (рисунки 17 и 18, таблица 4, номера соединений соответствуют номерам пиков на хроматограмме). Аннотация обнаруженных метаболитов была проведена на основе

данных ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС, полученных в режимах регистрации как отрицательных, так и положительных ионов. Элементный состав, определенный на основании данных МС высокого разрешения, фрагментация в условиях тандемной МС, а также хроматографическое поведение соответствующих соединений позволили предположить их строение.

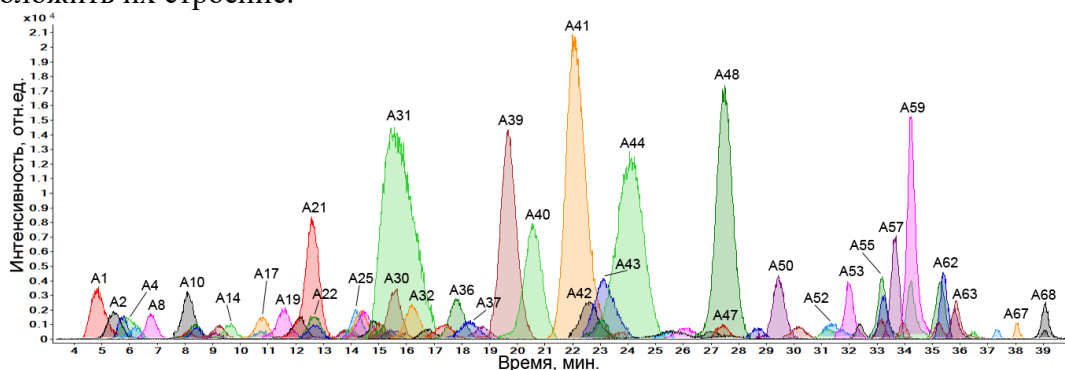


Рисунок 17 – (–)ВЭЖХ-ИЭР МС хроматограмма обнаруженных в экстракте *A. japonica* стероидных соединений

Полученные результаты ВЭЖХ-МС анализа указали на наличие в исследуемой смеси метаболитов изомерных и/или изобарных соединений. Например, на хроматограмме, построенной по току ионов с m/z 1241 наблюдалось несколько пиков, четыре из которых соответствовали разным изомерным астеросапонинам (соединения A52, A53, A62 и A63). Различия в структурах изомерных соединений, касающиеся как строения углеводных фрагментов, так и их стероидных агликонов, были определены на основании данных ВЭЖХ-МС/МС.

Профилирование стероидных метаболитов позволило обнаружить не менее 33 астеросапонина, в том числе 31 пентаозид и 2 гексаозиды (A30 и A36). Астеросапонины обнаруживали по пикам $[M-Na]^-$ и $[M+Na]^+$ в (–) и (+)ИЭР МС соответственно. Аннотация обнаруженных астеросапонина проводилась на основании данных тандемной МС (таблица 4). Как известно, различные эпимерные моносахариды, как и типы гликозидных связей, не могут быть однозначно определены только на основании данных МС. Однако, принимая во внимание, что ранее выделенные и изученные астеросапонины имеют единую архитектуру углеводных фрагментов с последовательностью β -1,3, β -1,4 и β -1,2 гликозидных связей в линейной части и β -1,2-связью в разветвлении у второго моносахарида, а также биогенетическую связь углеводных цепей этих соединений, можно предположить, что обнаруженные астеросапонины имеют аналогичное строение углеводных цепей. Так, значительное количество ранее изученных астеросапонина имеют хиновозу и ксилозу, в качестве первого и второго моносахаридных звеньев, соответственно, которые соединены между собой β -1,3 гликозидной связью. Подобный структурный мотив может быть предположен для ряда углеводных фрагментов обнаруженных в *A. japonica* астеросапонина, которые по данным тандемной МС содержат дезоксигексозу и пентозу в качестве первой и второй моносахаридных единиц (соединения A30, A39, A43, A45, A49 и A60). Некоторые из этих соединений отличались друг от друга лишь строением боковых цепей агликонов.

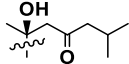
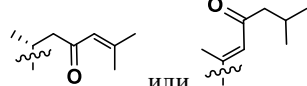
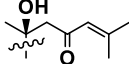
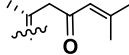
В тандемных масс-спектрах, полученных в условиях регистрации отрицательных ионов, наблюдались серии типичных фрагментных ионов, на основании которых можно сделать предположения касательно структур обнаруженных астеросапонина. Серии фрагментных ионов Y-типа давали информацию о последовательности моносахаридных звеньев в углеводных цепях. Ионы Y_0 и Z_0 указывали на элементный состав агликона, а наличие и интенсивности характерных серий ионов $[M-Na-X]^-$ (где $X = 98, 100$) в некоторых случаях помогали определить строение боковых цепей агликонов. (+)МС/МС спектры астеросапонина использовали для проверки данных, полученных с помощью (–)МС/МС.

Таблица 4 – Некоторые астросапонины, обнаруженные методом ВЭЖХ-ИЭР МС в экстракте морской звезды *A. japonica*.

№ ^a	R _t	Элементный состав	Углеводные цепи и агликоны ^b	<i>m/z</i> ^{c, d}								
				[M–Na] [–]	[M–Na–X] ^{–e}	Y ₃ или Y _{2β}	Y _{2α}	Y ₃ /Y _{2β}	Y _{2α} /Y _{2β}	Y ₁	Y ₀	Z ₀
A3	5.7	C ₅₀ H ₇₉ O ₂₇ SNa	dHex–Pent–Hex(–dHex)–dHex–AGL _A I	1143.4519	–	997.4	865.3	851.3	719.3	557.2	411.1	393.1
A5	6.2	C ₄₉ H ₇₇ O ₂₆ SNa	Fuc–Xyl–Xyl(–Qui)–Qui–AGL _A I	1113.4408	–	967.4	835.3	821.3	689.3	557.2	411.1	393.1
A26	14.3	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₈ SNa	dHex–dHex–Hex(–dHex)–dHex–AGL _A III	1255.5430	1157.5	1011.4	865.3	865.3	719.3	557.2	509.2; 411.1	393.1
A30 ^{жс}	15.5	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₃ SNa	Hex–dHex–Hex–Pent(–dHex)–dHex–AGL _A II	1405.5908	1305.5; 1243.5 (Y ₄); 1143.5 (Y ₄ –100)	1097.4 (Y ₃ , Y ₄ /Y _{2β}); 997.4 (Y ₃ –100, Y ₄ /Y _{2β} –100); 1159.5 (Y _{2β})	835.3	851.3	689.3	557.2	411.1	393.1
A32	16.1	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₈ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–DXU–AG III	1255.5400	1157.5; 1139.4	1011.4; 993.4	865.3; 847.3	865.3; 847.3	701.3	573.2; 555.2	411.1	393.1
A36 ^{жс}	17.7	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₃ SNa	Hex–dHex–Hex–Pent(–dHex)–dHex–AGL _A IV	1405.5935	1243.5 (Y ₄)	1097.4 (Y ₃ , Y ₄ /Y _{2β}); 1259.5 (Y _{2β})	935.4	951.4	789.3	657.3	511.1	493.1
A39	19.6	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ SNa	dHex–Hex–Pent(–dHex)–dHex–AGL _A II	1243.5422	1143.5	1097.4; 997.4	935.4; 835.3	951.4; 851.3	789.3; 689.3	657.3; 557.2	511.2; 411.1	493.2; 393.1
A41	22.1	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₉ SNa	dHex–Hex–Hex(–dHex)–dHex–AGL _A IV	1273.5525	–	1127.5	965.4	981.4	819.3	657.3	511.2	493.2
A42	22.6	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₇ SNa	Fuc–Xyl–Xyl(–Qui)–Qui–AGL _A II	1213.5296	1113.4	1067.4; 967.4	935.4; 835.3	921.4; 821.3	789.3; 689.3	657.3; 557.2	511.2; 411.1	493.2; 393.1
A48	27.4	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–DXU–AGL _A II	1257.5560	1239.5; 1157.5; 1139.5	1111.5; 1093.4; 993.4	965.4; 947.4; 847.3	965.4; 947.4; 847.3	819.3; 801.3; 701.3	673.3; 655.3; 555.3	511.2; 411.1	493.2; 393.1
A54	32.3	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₆ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–126–AGL _A II	1221.5365	1121.5	976.4	829.3	829.3	–	637.2; 537.2	411.2	393.1
A55	33.1	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₈ SNa	dHex–Hex–dHex(–dHex)–DXU–AGL _A VI	1255.5415	1237.5	1109.5; 1091.5	947.4; 929.4	963.4; 945.4	801.3; 783.3	655.3; 637.3	493.2	475.2
A56	33.2	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₆ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–126–AGL _A IV	1221.5358	–	1075.4	929.4	929.4	–	637.3	511.2	493.2
A57	33.6	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₇ SNa	dHex–dHex–Hex(–dHex)–dHex–AGL _A VI	1239.545	–	1093.5	947.4	947.4	801.3	639.3	493.2	475.2
A58	34.2	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₇ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–DXU–AGL _A VII	1237.5301	1219.5	1091.5; 1073.4	945.4; 927.4	945.4; 927.4	781.3	653.3; 635.3	491.2	473.2
A60	35.2	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ SNa	dHex–Hex–Pent(–dHex)–dHex–AGL _A V	1227.5457	–	1081.4	919.4	935.4	773.3	641.3	495.2	477.2
A61	35.2	C ₅₈ H ₉₂ NO ₂₇ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–171–AGL _A II	1266.5564	1239.5; 1166.5; 1139.5	1120.5; 1093.5; 1020.4; 993.4	974.4; 947.4; 874.3; 847.3	974.4; 947.4; 874.3; 847.3	828.3; 801.3; 728.3; 701.3	682.3; 655.3; 582.2; 555.2	511.2; 411.1	493.2; 393.1
A63	35.8	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–DXU–AGL _A V	1241.5605	1223.5	1095.5; 1077.4	949.4; 931.4	949.4; 931.4	803.3; 785.3	657.3; 639.3	495.2	477.2
A67	38.1	C ₅₈ H ₉₀ NO ₂₆ SNa	dHex–dHex–dHex(–dHex)–171–AGL _A VI	1248.5462	1221.5	1102.5; 1075.4	956.4; 929.4	956.4; 929.4	810.4; 783.4	664.3; 637.3	493.2	475.2

^a Номера соединений соответствуют пикам на (–)ВЭЖХ-МС хроматограмме. ^b AGL_A = агликон, AGL_A I для агликонов группы I, AGL_A II для агликонов группы II и т.д. ^c Наиболее интенсивные серии ионов выделены жирным шрифтом. ^d Y-ионы, соответствующие потерям моносахаридных остатков от [M–Na]⁺ или [M–Na–X]⁺ ионов. ^e Во всех спектрах присутствовали сигналы [HSO₄]⁺ и [SO₃]⁺ при *m/z* 96.9 и 79.9 соответственно ^f [M–Na–X]⁺ обозначает фрагментные ионы, где X = 18 (H₂O) для соединений **A55**, **A58** и **A63**; X = 98 для соединения **A26**; X = 100 для соединений **A30**, **A39**, **A42**, **A54** и **A61**; X = 118 (100+H₂O) для соединения **A48**; X = 27 для соединений **A61** и **A67**. ^ж Y₄ ионы, соответствующие потерям пятого сахарного звена олигосахаридной цепи гексаозидов **A30** и **A36**

Следует отметить, что большинство обнаруженных астеросапонинов образовывали на хроматограммах кластеры со схожими временами удерживания в соответствии со структурами их агликонов. Изменения в углеводных цепях оказывают небольшое влияние на время удерживания, тогда как модификация боковых цепей агликона значительно влияет на время удерживания. Например, астеросапонины **A5** и **A42** по данным tandemной MS имеют одинаковые олигосахаридные цепи, но **A42** содержит более длинную боковую цепь в агликоне, что значительно увеличивает его гидрофобность (R_t **A5** составляет 6.2 мин, а R_t **A42** – 22.6 мин). В соответствии полученными данными все астеросапонины были разделены на семь групп (I–VII) по типу фрагментации агликонов (таблица 5).

Группы агликонов	Масса фрагментного иона Y_0 в МС/МС спектрах, m/z	Возможные структуры боковых цепей агликонов	Группы агликонов	Масса фрагментного иона Y_0 в МС/МС спектрах, m/z	Возможные структуры боковых цепей агликонов
AGL _A I	411.1		AGL _A V	495.2	
AGL _A II	511.2		AGL _A VI	493.2	
AGL _A III	509.2		AGL _A VII	491.2	
AGL _A IV	511.2				

Среди полярных стероидных метаболитов этого вида морских звезд также обнаружено 28 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и 7 сульфатированных полигидроксистероидных соединений. 29 из этих соединений были охарактеризованы тандемной МС. В спектрах МС/МС гликозидов полигидроксистероидов обнаружены фрагментные ионы, связанные с отщеплением моносахаридных звеньев и сульфатной группы. Некоторые соединения показали фрагментные ионы, соответствующие сульфатированным моносахаридным единицам: сульфатированной пентозе (фрагментный ион при m/z 211 в спектрах МС/МС **A11**, **A14**, **A21**, **A25** и **A29**), сульфатированной гексозе (фрагментный ион при m/z 225 в МС/МС-спектрах **A22**, **A27** и **A35**) и сульфатированной дезоксигексозе (фрагментный ион при m/z 241 в МС/МС-спектрах **A1** и **A31**). Гликозиды **A1** и **A31** с сульфатированным дезоксигексозным звеном дополнительно имеют сульфатную группу в стероидном ядре. Эти соединения показали интенсивные двухзарядные пики молекулярных ионов $[M-2Na]^{2-}$ при m/z 318 и 368, тогда

как интенсивности пиков однозарядных ионов $[M_{Na+H}-Na]^-$ и $[M_{2Na}-Na]^-$ были значительно ниже.

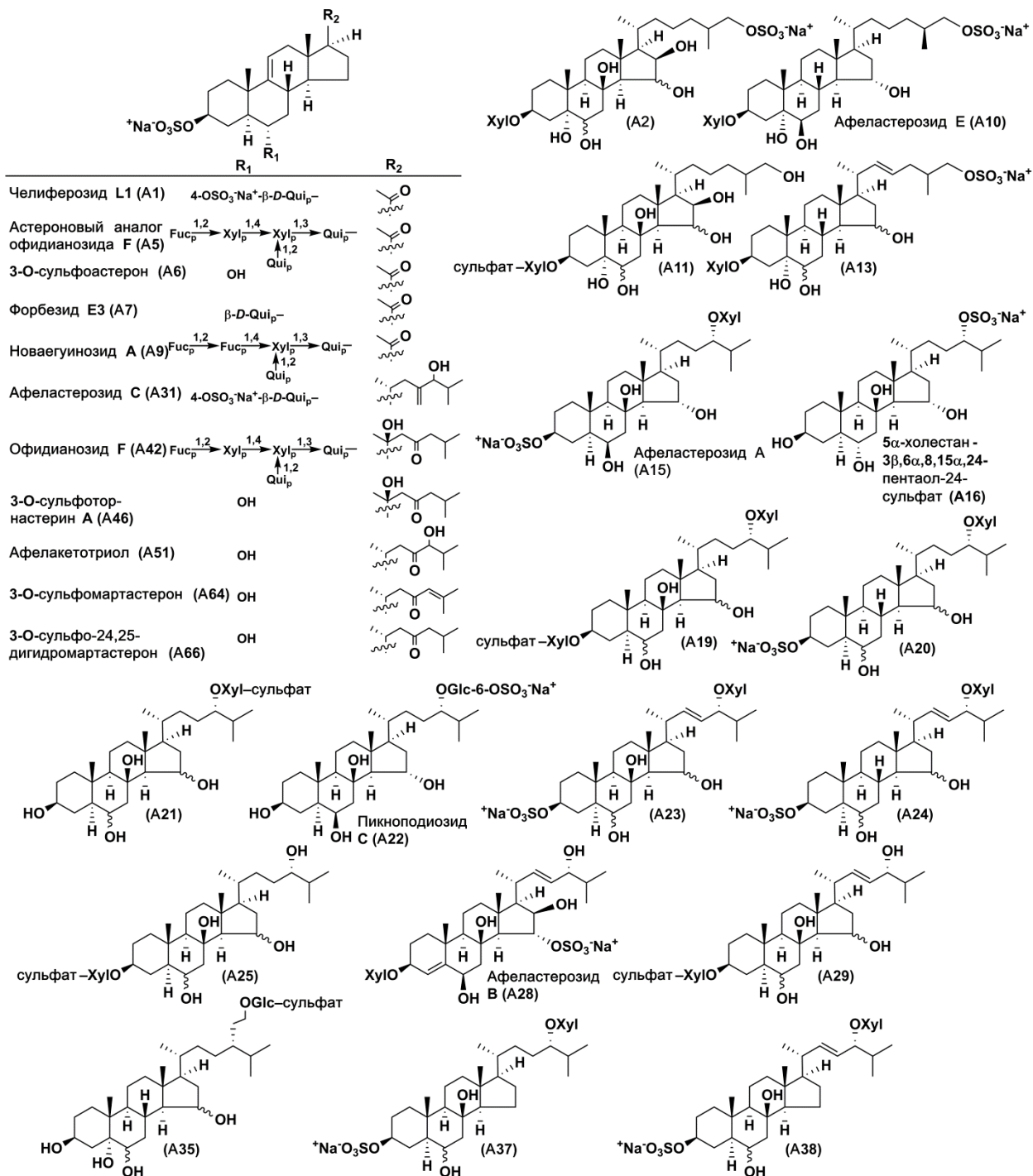


Рисунок 18 – Структуры идентифицированных (A1, A5, A6, A7, A9, A10, A15, A16, A22, A28, A31, A42, A46, A51, A64 и A66) и предположенных (A2, A11, A13, A19, A20, A21, A23, A24, A25, A29, A35, A37 и A38) стероидных соединений, найденных в *A. japonica* с помощью ВЭЖХ-ИЭР МС

В некоторых случаях в тандемных спектрах гликозидов, содержащих сульфатированные моносахаридные звенья, были обнаружены фрагментные ионы А-типа, образованные в результате разрыва связей внутри сульфатированного моносахаридного кольца. В тандемных масс-спектрах гликозидов, имеющих сульфатную группу на агликоне (A2, A10, A13, A15, A17, A20, A23, A24, A34, A37, A38 и A47), наблюдались фрагментные ионы Y₀ и Z₀, соответствующие отрыву моносахаридного звена с сохранением заряда на агликоне. Следует отметить, что все эти гликозиды имеют пентозу

в качестве углеводного фрагмента. Только одно соединение (**A19**, ион $[M-Na]^-$ при m/z 795) имеет углеводный фрагмент, состоящий из двух моносахаридов – пентозы и сульфатированной пентозы, на что указывают фрагментные ионы при m/z 663 $[M-Na-Pent]^-$ и 211 $[PentSO_3]^-$ в спектрах (–)МС/МС.

Часть обнаруженных стероидных метаболитов была идентифицирована с помощью сравнения их времен удерживания и полученных масс-спектрометрических данных с таковыми для стандартных соединений, выделенных ранее из этой морской звезды. Детальное изучение хроматографического поведения компонентов анализируемой смеси также облегчило их аннотацию. Как известно, более полярные компоненты имеют меньшее время удерживания в режиме обращено-фазной хроматографии, однако полученные результаты указали на то, что вклад различных структурных фрагментов в хроматографическое поведение весьма различен. Сульфатная группа и остаток ксилозы сокращают время удерживания почти в равной степени и значительно больше, чем введение дополнительной гидроксильной группы. Введение сульфатной группы в положение C-26 (C-29 для стероидов стигмастанового ряда) влияет на время удерживания больше, чем в положение C-3 или C-24, что, в свою очередь, больше сокращает время удерживания по сравнению с сульфатированием по другим положениям стероидного кора. Введение двойных связей и особенно удлинение боковой цепи увеличивает время удерживания. На основании установленных особенностей биосинтеза, полученных масс-спектрометрических данных и анализа хроматографического поведения были предположены структуры для большинства обнаруженных в экстракте *A. japonica* полигидроксистероидных соединений (рисунок 18).

На основании полученных результатов нами был сделан вывод о том, что метаболомный подход применим для профилирования стероидных соединений в таких сложных смесях, как экстракты морских звезд, и может быть использован для сравнения метаболитических стероидных профилей различных видов и популяций морских звезд в ходе экологических, диетических и биосинтетических исследований и изучения их участия в пищевых цепях в морских биосистемах.

2.2 Исследование метаболомного профиля полярных стероидных соединений дальневосточной морской звезды *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* методом ВЭЖХ-ИЭР МС/МС

Морская звезда *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* является массовым видом в северо-западной части Тихого океана. Многолетние исследования этой морской звезды российской, японской и итальянской группами исследователей привели к выделению 22 стероидных соединений включая 9 полигидроксистероидов, 5 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и 8 астеросапонинов. Профилирование стероидных соединений морской звезды *P. pectinifera* с использованием метода ВЭЖХ-МС позволило охарактеризовать 72 метаболита – 35 астеросапонинов, 15 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и 22 полигидроксильированных стероида (рисунок 19) [56].

Проанализированный профиль метаболитов выявил не менее 35 астеросапонинов, в том числе 21 пентаозид, 13 гексаозидов и один тетраозид. Астеросапонины выявляли по пикам $[M-Na]^-$ и $[M+Na]^+$ в диапазоне m/z от 1120 до 1470 в масс-спектрах (–) и (+)ИЭР МС соответственно. Обнаруженные астеросапонины были охарактеризованы на основании данных ВЭЖХ-МС/МС. В tandemных масс-спектрах астеросапонинов, полученных в режиме регистрации отрицательных ионов, содержались фрагментные ионы, указывающие на присутствие сульфатной группы, и серии интенсивных фрагментных ионов Y-типа, возникающих в результате разрыва гликозидных связей с сохранением заряда на агликоне. В (+)МС/МС спектрах астеросапонинов наблюдались аналогичные серии фрагментных ионов Y-типа, соответствующие потерям моносахаридных звеньев, а также серии фрагментных ионов B- и C-типов, возникающие при разрывах гликозидных связей с сохранением заряда на углеводном фрагменте.

Выводы о структурах найденных астеросапонинов основывались как на информации об общей структурной архитектуре гликозидов этого класса, так и на основании характерных структурных особенностей ранее изученных астеросапонинов *P. pectinifera*. Принимая во внимание то, что все ранее выделенные астеросапонины этого вида содержат фукозу в качестве терминальной дезоксигексозы, галактозу в качестве терминальной гексозы и глюкозу в качестве третьего моносахаридного звена в основной цепи, а также то, что большинство астеросапонинов имеют хиновозу в качестве первого моносахаридного звена, для обнаруженных соединений были предположены структуры их углеводных фрагментов. Так, было найдено, что 27 астеросапонинов содержат дезоксигексозу (хиновозу) в качестве первого моносахарида и звена боковой цепи и пентозу или дезоксигексозу (ксилозу или хиновозу) в качестве второго моносахарида. Мы полагаем, что гликозиды без хиновозы в первом положении являются продуктами дальнейшего биологического окисления остатка Qui I в их углеводных цепях. Интересно, что 19 астеросапонинов содержат гексозу (глюкозу) в качестве третьего моносахаридного звена, как и ранее выделенные из этого вида гликозиды.

Ранее в *P. pectinifera* были найдены гексаозиды двух типов, в одном из них олигосахаридные цепи имеют два разветвления на втором и третьем моносахаридных звеньях, а в другом присутствует основная линейная олигосахаридная цепь с пятью моносахаридными звеньями и одним разветвлением на втором моносахаридном звене. Полученные данные подтвердили присутствие гексаозидов обоих типов. В каждом случае тип углеводного фрагмента гексаозида был определен с использованием комплементарных данных (+) и (-)МС/МС. Спектры (-)МС/МС астеросапонинов с разветвлениями на втором и третьем моносахаридных звеньях включают пики фрагментных ионов, связанных с потерями терминального моносахаридного звена ($Y_{3\alpha}$, $Y_{3\beta}$, $Y_{2\beta}$), но в случаях, когда такие концевые моносахаридные звенья однотипны, фрагментные ионы $Y_{3\alpha}$, $Y_{3\beta}$, $Y_{2\beta}$ совпадают и представлены в спектрах одним пиком, что делает их неотличимыми от спектров с фрагментным ионом Y_4 гексаозида с линейным участком углеводных цепей, содержащим пять моносахаридных звеньев. В то же время, в спектрах (+)МС/МС присутствуют пики ионов В- и С-типов, которые помогают в таких случаях установить строение олигосахаридного фрагмента. Например, присутствие фрагментных ионов $[2C_6H_{10}O_4+Na]^+$ в спектрах (+)МС/МС соединений **P5**, **P31**, **P48**, **P62**, наряду с присутствием фрагментных ионов $[M-Na-C_6H_{10}O_4]^-$ в спектрах (-)МС/МС, указывает на то, что эти соединения имеют основную олигосахаридную цепь с пятью моносахаридами, несущими одно разветвление. Напротив, соединения **P7** и **P38** имеют олигосахаридные цепи с двумя разветвлениями, на что указывают фрагментные ионы $[C_5H_8O_4+C_6H_{10}O_5+Na]^+$ в (+)МС/МС и ионы $[M-Na-C_6H_{10}O_4]^-$, $[M-Na-2C_6H_{10}O_4]^-$ и $[M-Na-C_5H_8O_4]^-$ в (-)МС/МС, а также отсутствие фрагментного иона $[C_5H_8O_4+C_6H_{10}O_4+Na]^+$.

Как уже было отмечено ранее, структура боковых цепей агликонов оказывает существенное влияние на время удерживания астеросапонинов. В соответствии с хроматографическим поведением и характером фрагментации все обнаруженные астеросапонины *P. pectinifera* можно разделить на восемь групп по типам агликонов (AGL_P I–AGL_P VIII). Помимо этого, анализ тандемных масс-спектров астеросапонинов выявил соединения с редкими моносахаридными звеньями, такими как DXU и моносахарид, являющийся продуктом дегидратации DXU.

Среди полярных стероидных метаболитов этого вида также обнаружены 22 полигидроксистероидных соединения и 15 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов, которые были охарактеризованы при помощи тандемной МС. Спектры (-)ИЭР МС/МС некоторых несulfатированных полигидроксистероидных соединений были малоинформативными, демонстрируя только нейтральные потери молекул HCl или H₂O от исходных ионов $[M+Cl]^-$. Поэтому для изучения несulfатированных полигидроксистероидов был применен метод ВЭЖХ-ФИАД МС.

ФИАД в режиме регистрации положительных ионов показала осколочные ионы $[M+H-nH_2O]^+$ ($n=2, 3, 4$) вместо молекулярных ионов, однако в режиме ФИАД при регистрации отрицательных ионов наблюдались интенсивные пики ионов $[M+Cl]^-$, тандемные масс-спектры которых содержали пики фрагментных ионов, связанные с последовательным отрывом молекул воды и разрывом связей стероидного ядра и боковой цепи. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее при изучении фрагментации полигидроксистероидов в условиях ионизации электронами.

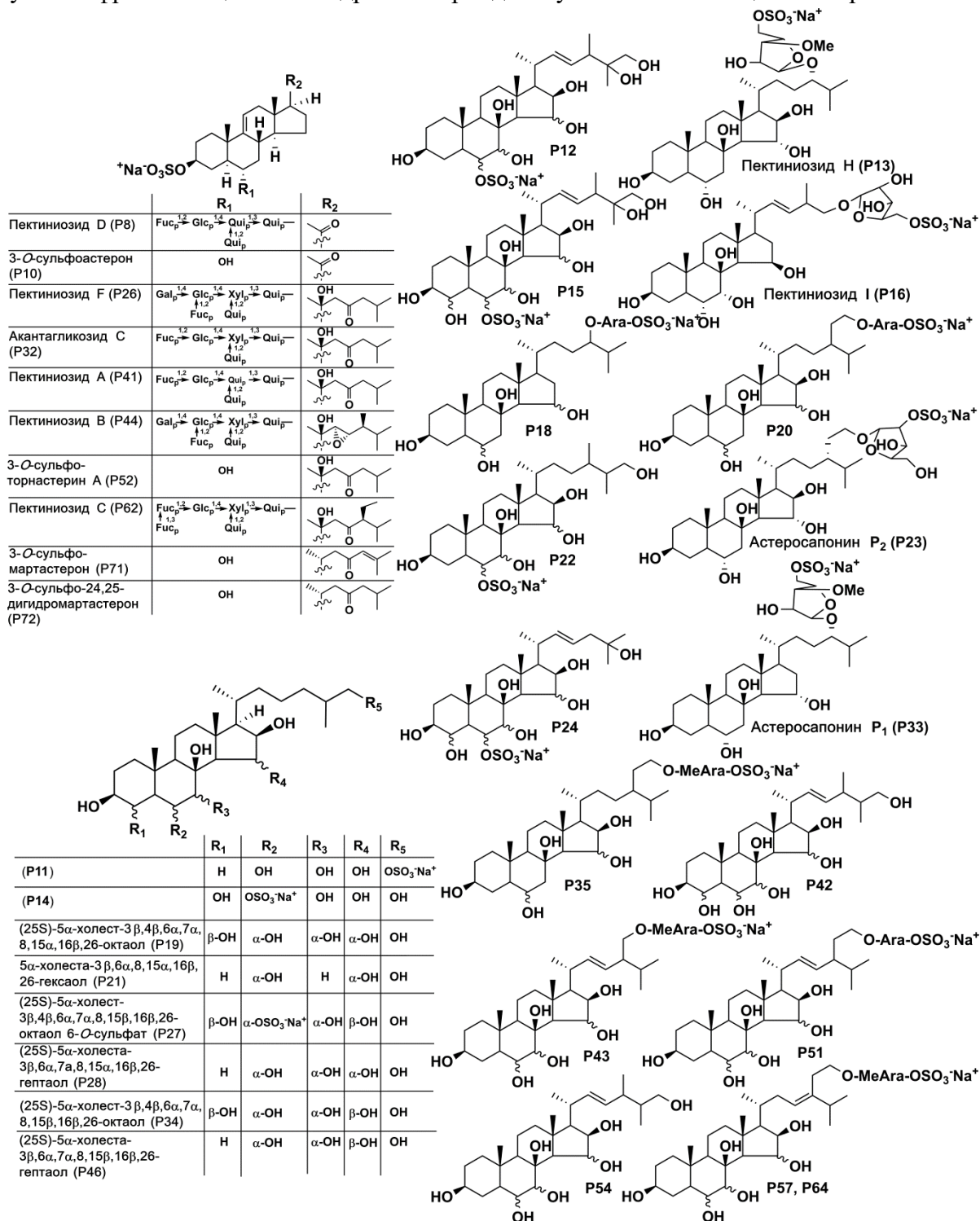


Рисунок 19 – Структуры идентифицированных (P8, P10, P13, P16, P19, P21, P23, P26, P27, P28, P32, P33, P34, P41, P44, P46, P52, P62, P71 и P72) и предположенных стероидных соединений (P11, P12, P14, P15, P18, P20, P22, P24, P35, P42, P43, P51, P54, P57 и P64), найденных в морской звезде *P. pectinifera* методом ВЭЖХ-ИЭР МС/МС

В спектрах (–)ИЭР МС/МС гликозидов полигидроксистероидов наблюдались ионы, обусловленные отщеплением моносахаридных звеньев и сульфатной группы. Все обнаруженные гликозиды показали фрагментные ионы, соответствующие сульфатированным моносахаридным звеньям. Так, в спектрах соединений **P16, P18, P20, P23, P25** и **P51** наблюдался пик фрагментного иона при m/z 211 $[C_5H_7O_7S]^-$, соответствующий сульфатированной пентозе, а спектры соединений **P13, P17, P33, P35, P43, P49, P57, P64** имели пик фрагментного иона при m/z 225 $[C_6H_9O_7S]^-$, соответствующий сульфатированной метилпентозе. В tandemных масс-спектрах гликозидов также были обнаружены ионы А-типа, образующиеся при разрыве связей сульфатированных моносахаридов. Поскольку гликозиды, выделенные ранее из этой морской звезды, содержали арабинозу или метилированную арабинозу в качестве моносахаридного звена, мы предположили, что обнаруженные гликозиды также содержат арабинозу или метилированную арабинозу.

Идентификация 14 ранее известных полигидроксистероидов и сульфатированных агликонов астеросапонинов была подтверждена с помощью сравнения их хроматографических и масс-спектрометрических данных с таковыми для выделенных ранее соединений с установленными структурами. Структуры других соединений были предложены на основе анализа полученных масс-спектрометрических данных и хроматографического поведения, а также литературных данных.

Сравнение стероидных компонентов морских звезд *P. pectinifera* и *A. japonica* выявило ряд значительных различий. Метаболический профиль полигидроксилированных стероидов *P. pectinifera* характеризуется наличием большого количества высокоокисленных соединений (6 и более гидроксильных групп). Полигидроксистероиды *P. pectinifera* присутствуют как в сульфатированных, так и в несulfатированных формах, в отличие от полигидроксистероидов *A. japonica*, которые встречаются только в сульфатированных формах. Все гликозиды полигидроксистероидов *P. pectinifera* имеют сульфатные группы в моносахаридных звеньях. Более того, в *A. japonica* нами обнаружены только полярные стероиды с холестановой скелетной системой, тогда как в *P. pectinifera* также присутствуют стероидные соединения с эргостановой и стигмастановой скелетными системами, что свидетельствует о возможном биосинтезе полярных стероидов из пищевых стероидов не только животного, но и растительного происхождения.

2.3 Исследование метаболомного профиля полярных стероидных соединений дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca* методом наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС

Для изучения метаболомного профиля полярных стероидов дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca* использовали нанопоточную жидкостную хроматографию в сочетании с tandemной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением в режиме нанопотоков (наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС) [57]. Использование данного метода повышало чувствительность и снижало уровень шума по сравнению с предыдущими исследованиями, в которых использовался обычный метод ВЭЖХ-ИЭР МС. Профилирование стероидных соединений морской звезды *L. fusca* позволило обнаружить множество различных стероидов. На основании точных масс молекулярных ионов были предложены брутто-формулы для 207 обнаруженных соединений, в числе которых 106 астеросапонинов, 6 нативных агликонов астеросапонинов, 81 полигидроксистероидный гликозид и 14 полигидроксилированных стероидов, а МС/МС эксперименты обеспечили обширную структурную информацию. Для изучения закономерностей фрагментации и хроматографического поведения в условиях данного эксперимента были проанализированы 43 полярных стероида, в том числе 5 астеросапонинов, 28 гликозидов полигидроксистероидов и 10 полигидроксистероидов, выделенных ранее из *L. fusca* и других видов.

Полученные данные позволили обнаружить не менее 95 полигидроксистероидов и родственных им гликозидов. Обнаруженные соединения были охарактеризованы методом

тандемной МС, по данным которой предложены структуры 91 соединения. Среди несulfатированных полигидроксистероидных соединений было обнаружено 5 полигидроксистероидов и 9 гликозидов полигидроксистероидов, часть из которых была однозначно идентифицирована с использованием аутентичных стандартов. Остальные соединения содержали сульфатные группы, в большинстве случаев находящиеся на углеводном фрагменте. Предполагаемые структуры найденных стероидов и основные направления их фрагментации показаны на рисунке 20.

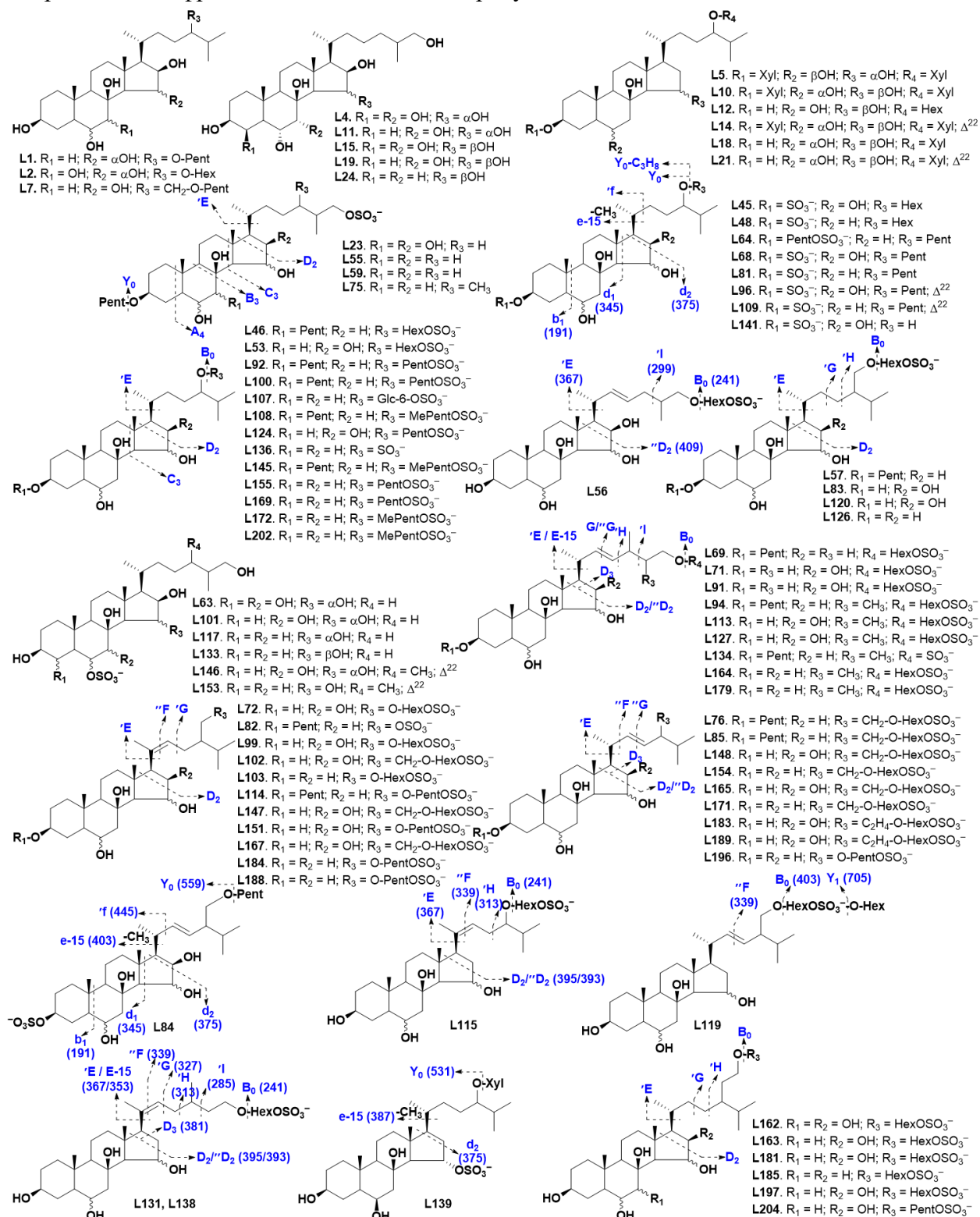


Рисунок 20 – Структуры полигидроксистероидов и родственных им гликозидов морской звезды *L. fusca*, охарактеризованных методом наноВЭЖХ/ИЭР МС/МС

Кроме того, проанализированный образец *L. fusca* показал наличие не менее 112 астеросапонинов, в том числе 28 гексаозидов, 66 пентаозидов, 7 триозидов, 5 «укороченных» астеросапонинов с моносахаридными звеньями в положении С-6, а также 6 нативных агликонов астеросапонинов. Обнаруженные астеросапонины были охарактеризованы tandemной МС. Среди них летастериозид А (**L198**), летастериозид В (**L159**), торнастерозид А (**L118**), анастерозид А (**L166**) и луидиахиновозид (**L122**) были однозначно идентифицированы с использованием аутентичных стандартов, ранее выделенных из *L. fusca*.

Анализируемый образец этой морской звезды содержал 28 гексаозидов, причем абсолютное большинство из них имеют концевые дезоксигексозные и гексозные звенья. В случае гексаозидов из *L. fusca* спектры не содержат характерных фрагментных ионов $[M-Na-2C_6H_{10}O_4]^-$ что указывает на то, что все гексаозиды из *L. fusca* имеют основную олигосахаридную цепь с пятью моносахаридами и одним разветвлением. Большинство обнаруженных гексаозидов *L. fusca* имеют олигосахаридные цепи схожей архитектуры. Все гексаозиды несут дезоксигексозу в качестве четвертого сахара и разветвленную моносахаридную единицу, и большинство из них содержат гексозу в качестве пятого, пентозу (ксилозу) в качестве второго сахара и дезоксигексозу (хиновозу) в качестве первого сахара. 19 гексаозидов содержат Hex-dHex-(3-е звено)-Xyl(-Qui)-Qui-углеводные цепи, 11 из них имеют одинаковые Hex-dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-углеводные цепи и различные агликоны.

Интересно, что из 66 обнаруженных пентаозидов 38 соединений имеют дезоксигексозу в качестве второго моносахарида и 42 соединения содержат дезоксигексозу в качестве третьего моносахарида, тогда как большинство известных астеросапонинов имеют пентозу в качестве второго и гексозу в качестве третьего звена. Часто первым сахаром была дезоксигексоза (хиновоза) или гексоза, но также были обнаружены некоторые астеросапонины с редкими и нетипичными моносахаридными звеньями в этом положении. Так, были найдены астеросапонины с редкими моносахаридными фрагментами в качестве первого моносахаридного звена, такими как 6-дезоксидеокси-ксило-4-гексулоза (DXU) (**L32**, **L33**, **L35**, **L74**, **L77**, **L135**, **L190**, **L191**, **L195** и **L203**), фрагмент $C_6H_6O_3$, описанный как ненасыщенный сахар с 4-кетогруппой и 2(3)-двойной связью (**L180** и **L187**). Кроме того, обнаружены астеросапонины с моносахаридными фрагментами $C_7H_9NO_4$ (**L61**, **L89**, **L156**, **L186** и **L199**) и $C_6H_9NO_3$ (**L8**), ранее не описанными из морских источников.

Согласно полученным МС данным соединения **L6**, **L9**, **L26**, **L42** и **L54** представляют собой «укороченные» астеросапонины с одним или двумя моносахаридными звеньями, а астеросапонины **L28**, **L31**, **L38**, **L39**, **L51**, **L86** и **L161** являются триозидами. Астеросапонины с трисахаридными углеводными цепями редко находили в морских звездах. Высказано предположение, что стероидные триозиды, а также «укороченные» астеросапонины могут быть биосинтетическими предшественниками астеросапонинов с более длинными углеводными цепями.

Особенности фрагментации астеросапонинов в условиях ДИС использовали для характеристики агликонов. По предполагаемым структурам агликонов все обнаруженные астеросапонины *L. fusca* можно разделить на двадцать три группы по типам агликонов (AGL_L I – AGL_L XXIII). Были обнаружены агликоны с 8,12-дигидрокси и 12-гидроксистероидными ядрами, большинство боковых цепей агликонов относилось к окисленному холестановому производному, но также найдены астеросапонины с эргостановыми и стигмастановыми скелетами, а также астерон и астерогенол с прегнановыми агликонами.

В отличие от стероидного метаболома ранее изученной морской звезды *A. japonica*, полярные стероидные соединения *L. fusca* обнаружены в сульфатированной и несulfатированной формах. Однако, по сравнению с *P. pectinifera*, где также обнаружены несulfатированные соединения, количество несulfатированных

соединений у *L. fusca* очень ограничено. Присутствие соединений с холестановыми, эргостановыми и стигмастановыми боковыми цепями указывает на то, что *L. fusca* использует как пищевые фитостерины, так и пищевой холестерин животного происхождения для биосинтеза своих полярных стероидов.

2.4 Исследование метаболомного профиля тритерпеновых гликозидов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* методом ВЭЖХ-ИЭР МС/МС

Дальневосточная голотурия *E. fraudatrix* является типичным обитателем мелководья южной части Японского моря и представляет собой удобную модель для проведения аквариальных экспериментов. Как было сказано ранее, это животное является интересным и богатым источником тритерпеновых гликозидов с уникальными химическими структурами и различной биологической активностью. Нами был впервые применен метаболомный подход для профилирования и выяснения структур тритерпеновых гликозидов *E. fraudatrix* [58]. Всего было обнаружено и описано 54 соединения, в том числе 26 сульфатированных, 18 несulfатированных и 10 дисульфатированных гликозидов (рисунок 21).

В режиме регистрации положительных ионов большинство тритерпеновых гликозидов детектировались в виде ионов $[M+Na]^+$ в диапазоне m/z от 1000 до 1400. Однако стабильные пики ионов $[M+Na]^+$ для дисульфатированных гликозидов в этих условиях не наблюдались. В режиме регистрации отрицательных ионов сульфатированные и дисульфатированные гликозиды детектировались как пики ионов $[M-Na]^-$ и $[M-2Na]^{2-}$ соответственно, тогда как несulfатированные соединения детектировались в виде ионов $[M-H]^-$.

Элементный состав, определенный на основе данных высокого разрешения, данные тандемной МС, а также хроматографическое поведение соответствующих соединений и биосинтетические соображения позволили предложить их структуры. Известно, что большинство тритерпеновых гликозидов имеют ксилозу при С-3 агликаона в качестве первой моносахаридной единицы, хиновозу в качестве второй моносахаридной единицы и глюкозу (или ксилозу) в качестве третьей моносахаридной единицы в основной цепи. Метилированные моносахариды всегда являются концевыми звеньями. Как было нами обсуждено ранее, олигосахаридные цепи выделенных тритерпеновых гликозидов из *E. fraudatrix* близки между собой и имеют общую архитектуру: 3-О-метил-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-β-D-хиновопиранозил-(1→2)-β-D-ксилопиранозил в линейной части углеводных цепей и могут иметь β-D-ксилопиранозил-(1→2) в разветвлении как второй моносахаридный остаток. Кроме того, большинство ранее выделенных гликозидов *E. fraudatrix* содержат агликон 16β-ацетоксиглост-7-ен. Учитывая биогенетическое родство структур, подобное строение олигосахаридных цепей и агликонов может быть предположено для ряда неизвестных к моменту нашего исследования гликозидов этой голотурии.

Структуры обнаруженных гликозидов были охарактеризованы (–)ИЭР МС/МС, в спектрах наблюдались серии фрагментных ионов, возникающих в результате разрыва как гликозидных связей, так и связей боковой цепи агликаона. (+)ИЭР МС/МС спектры содержали интенсивные серии фрагментных ионов В- и С-типов, возникающие в результате разрыва гликозидных связей сохранением заряда на углеводном фрагменте. Так, МС/МС спектр иона $[M+Na]^+$ при m/z 1251.5776 (соединение **E41**) продемонстрировал обширную фрагментацию, а именно пики при m/z 169.0 $[MeXyl+Na]^+$, 331.1 $[MeXyl+Glc+Na]^+$, 349.1 $[MeXyl+Glc+H_2O+Na]^+$, 389.1 $[MeXyl+Glc+C_3H_6O+Na]^+$, 417.1 $[MeXyl+Glc+C_4H_6O_2+Na]^+$, 477.1 $[MeXyl+Glc+Qui+Na]^+$, 537.2 $[MeXyl+Glc+Qui+C_2H_4O_2+Na]^+$, 609.2 $[MeXyl+Glc+Qui+Xyl+Na]^+$, 627.2 $[MeXyl+Glc+Qui+Xyl+H_2O+Na]^+$, 669.2 $[MeXyl+Glc+Qui+Xyl+C_2H_4O_2+Na]^+$, 741.2 $[MeXyl+Glc+Qui+2\times Xyl+Na]^+$ и 759.3 $[MeXyl+Glc+Qui+2\times Xyl+H_2O+Na]^+$. Эта картина фрагментации соответствовала разветвленной несulfатированной олигосахаридной

цепи, состоящей из пяти моносахаридных единиц, на основании чего соединение **E41** было идентифицировано как кукумариозид C₂.

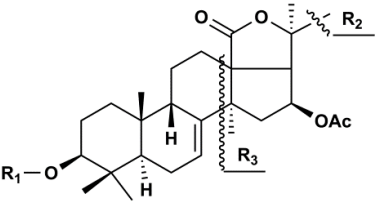
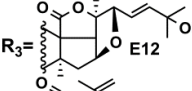
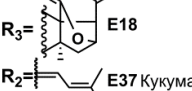
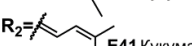
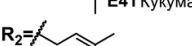
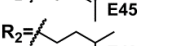
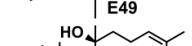
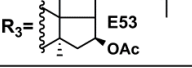
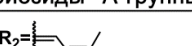
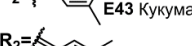
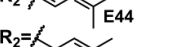
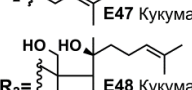
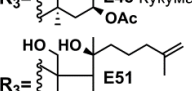
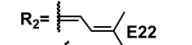
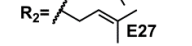
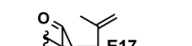
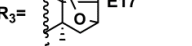
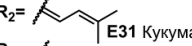
		R ₁	R ₁ или R ₂
		<i>Группа III</i>	
		$3\text{-OMe-Glc} \xrightarrow{1,3} \text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} \text{Xyl}$ $\uparrow 1,2$ Xyl	R ₂ =  R ₂ = 
		<i>Группа IV</i>	
R ₁	R ₁ или R ₂	$\text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} \text{Xyl}$ $\uparrow 1,2$ Xyl	R ₂ =  R ₂ = 
<i>Группа I (кукумариозиды C-группы)</i>		<i>Группа V (кукумариозиды H-группы)</i>	
$3\text{-OMe-Xyl} \xrightarrow{1,3} \text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} \text{Xyl}$ $\uparrow 1,2$ Xyl	E9 - агликон не определен    Кукумариозид C ₁  Кукумариозид C ₂   	$\text{Xyl} \xrightarrow{1,2} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$ $\uparrow 1,4$ Glc $\uparrow 1,3$ 3-OMe-Xyl	E3, E4 - агликон не определен R ₂ =  Кукумариозид H ₂  Кукумариозид H ₃  Кукумариозид H ₅  Кукумариозид H  Кукумариозид H ₆
<i>Группа II (кукумариозиды A-группы)</i>		<i>Группа VI (кукумариозиды G-группы)</i>	
$3\text{-OMe-Xyl} \xrightarrow{1,3} \text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} \text{Xyl}$	 Кукумариозид A ₅   Кукумариозид A ₁  Кукумариозид A ₈ 	$\text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$ $\uparrow 1,3$ 3-OMe-Xyl	E6 - агликон не определен R ₂ =  Кукумариозид G ₄  Кукумариозид G ₂  Кукумариозид G ₃   Кукумариозид G ₁  
<i>Группа VII</i>		<i>Группа IX (кукумариозиды I-группы)</i>	
$\text{Xyl} \xrightarrow{1,2} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$ $\uparrow 1,4$ Glc $\uparrow 1,3$ 3-OMe-Glc	 	$\text{Xyl} \xrightarrow{1,2} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$ $\downarrow 1,4$ 4-OSO ₃ Na-Glc $\downarrow 1,3$ 3-OMe-Xyl	 Кукумариозид I ₃  Кукумариозид I ₄  Кукумариозид I ₂  Кукумариозид I ₁
<i>Группа VIII (кукумариозиды F-группы)</i>		<i>Группа X</i>	
$\text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$ $\uparrow 1,4$ 4-OSO ₃ Na-Glc $\uparrow 1,3$ 3-OMe-Xyl	  Кукумариозид F ₂  Кукумариозид F ₁ E52 - агликон не определен	$\text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$	
		<i>Группа XI</i>	
		$\text{Xyl} \xrightarrow{1,2} \text{Qui} \xrightarrow{1,2} 4\text{-OSO}_3\text{Na-Xyl}$	

Рисунок 21 – Структуры идентифицированных тритерпеновых гликозидов (**E10**, **E11**, **E13**, **E14**, **E15**, **E16**, **E21**, **E23**, **E25**, **E26**, **E28**, **E29**, **E31**, **E32**, **E37**, **E38**, **E41**, **E43**, **E47** и **E48**) и предложенные структуры ранее не выделявшихся гликозидов (**E12**, **E17**, **E18**, **E22**, **E27**, **E30**, **E33**, **E34**, **E35**, **E36**, **E39**, **E40**, **E42**, **E44**, **E45**, **E49**, **E50**, **E51** и **E53**) из голотурии *E. fraudatrix*, определенные с помощью ВЭЖХ-ИЭР МС/МС

Тандемные масс-спектры некоторых гликозидов содержали характерные потери нейтральных молекул, которые предоставили информацию о строении полициклического кора и боковой цепи. Так, отрыв нейтрального фрагмента массой 60 Да ($C_2H_4O_2$), наблюдаемый в спектрах МС/МС большинства гликозидов, указал на наличие ацетоксигруппы в агликоне. Фрагментация с потерей молекулы массой 104 Да ($C_2H_4O_2 + CO_2$) характерна для гликозидов, содержащих ацетоксигруппу и 18(20)-лактонный цикл. Анализ МС/МС спектров ряда выделенных ранее тритерпеновых гликозидов позволил выявить характерные пути фрагментации боковых цепей агликонов. Например, (+)ИЭР МС/МС спектры кукумариозида A_1 с 24-еновой боковой цепью содержали фрагментные ионы, соответствующие отщеплению фрагмента $C_{12}H_{20}O_4$, тогда как в спектрах гликозидов с 22,24-диеновой системой в боковой цепи наблюдался отрыв фрагмента $C_{11}H_{17}O_4$. В то же время тандемные масс-спектры кукумариозида A_{15} с насыщенной боковой цепью демонстрировали характерные потери нейтральных молекул $C_{12}H_{22}O_4$ и $C_{10}H_{10}O_4$. Анализ этих и других закономерностей распада ионов тритерпеновых гликозидов в условия тандемной МС дали возможность предложить структуры агликонов для впервые обнаруженных гликозидов.

В соответствии со строением олигосахаридных цепей все обнаруженные гликозиды *E. fraudatrix* можно разделить на одиннадцать групп (I–XI) по строению их углеводных цепей. Соединения группы I (**E9**, **E12**, **E18**, **E37**, **E41**, **E45**, **E49** и **E53**) имели разветвленную несulfатированную олигосахаридную цепь, состоящую из пяти моносакхаридных единиц – метилированной ксилозы, глюкозы, хиновозы, и ксилозы в основной цепи и ксилозы в разветвлении у второго моносакарида. Такой тип олигосахаридной цепи соответствует известным кукумариозидам группы С. Соединения группы II (**E43**, **E44**, **E47**, **E48** и **E51**) имеют линейную несulfатированную олигосахаридную цепь с четырьмя моносакхаридными остатками – метилированной ксилозой, глюкозой, хиновозой и ксилозой. Такой тип олигосахаридной цепи соответствует известным кукумариозидам группы А.

Характер фрагментации олигосахаридной цепи гликозидов группы III (**E34** и **E39**) был аналогичен распаду в условиях тандемной МС олигосахаридной цепи гликозидов группы I, но все пики фрагментов в спектрах были сдвинуты на 30 Да. Это может быть связано с заменой концевой метилированной ксилозы на остаток метилированной глюкозы. Таким образом, группа III включает соединения, имеющие несulfатированную главную олигосахаридную цепь, состоящую из метилированной глюкозы, глюкозы, хиновозы, ксилозы и ксилозы в разветвлении у второго моносакхаридного звена. На основании полученных МС данных была предложена структура гликозида **E34**, названного кукумариозидом D, которая была полностью подтверждена после выделения его как индивидуального соединения и анализа полученных 2D ЯМР спектров. Гликозиды группы IV (**E40** и **E36**) имеют несulfатированную олигосахаридную цепь, состоящую из глюкозы, хиновозы и двух ксилоз. Присутствие двух пиков фрагментных ионов Y-типа при m/z 973.5 $[M+Na-Xyl]^+$ и 943.5 $[M+Na-Glc]^+$ в МС/МС **E40** указывает на олигосахаридную цепь с двумя терминальными неметилированными моносакаридами. Таким образом, структура олигосахаридной цепи гликозидов IV группы была аналогична структуре олигосахаридной цепи гликозидов I или III групп, не имеющих терминального метилированного моносакхаридного остатка.

Группа V (**E3**, **E4**, **E10**, **E13**, **E21**, **E25** и **E29**) включает гликозиды с разветвленной пентасакхаридной цепью, имеющие одну сульфатную группу на первом моносакхаридном остатке ксилозы и 3-О-метил-ксилозу в качестве терминального моносакхаридного звена, и относятся к группе кукумариозидов Н. Структура углеводных фрагментов была подтверждена тандемной масс-спектрометрией. Анализ фрагментации олигосахаридных цепей гликозидов группы V в условиях ДИС позволил выявить характерные направления фрагментации. Так, МС/МС спектры содержали фрагментные ионы S_4 , V_4 и A_4 , которые наблюдались в основном в десульфатированной форме, а также специфический ион $^{1,5}A_4$,

возникающий в результате разрыва связей моносахаридного кольца сульфатированной ксилозы. Гликозиды группы VI (**E6**, **E14**, **E16**, **E26**, **E30**, **E32**, **E42** и **E50**) принадлежат к группе кукумариозидов G, имеющих линейную тетрасахаридную цепь с одной сульфатной группой на первом моносахаридном остатке ксилозы, и 3-О-метилксилозу в качестве терминального моносахаридного звена.

Соединения группы VII (**E22** и **E27**) имеют разветвленную олигосахаридную цепь, состоящую из пяти моносахаридных единиц: терминальной 3-О-метилглюкозы, глюкозы, хиновозы и сульфатированной ксилозы в основной цепи и ксилозы в разветвлении при втором моносахариде. Группа VIII (**E17**, **E31**, **E38** и **E52**) включает соединения с линейной тетрасахаридной цепью, содержащие терминальную 3-О-метилксилозу, сульфатированную глюкозу, хиновозу и сульфатированную ксилозу. Эти гликозиды принадлежат к группе кукумариозидов F. Следует отметить, что в режиме регистрации положительных ионов не удалось получить стабильные ионы $[M+Na]^+$ для дисульфатированных гликозидов, поэтому в спектрах (–)ИЭР МС/МС для анализа использовали ионы $[M-2Na]^{2-}$. Фрагментация олигосахаридной цепи иона $[M-2Na]^{2-}$ дисульфатированных гликозидов в условиях ДИС дала характерные серии фрагментных ионов А-, В- и Y-типов, которые в основном наблюдались в десульфатированной форме. Олигосахаридная цепь гликозидов группы IX (**E11**, **E15**, **E23** и **E28**), принадлежащих к группе кукумариозидов I и имеет основную цепь с терминальной 3-О-метилксилозой, сульфатированной глюкозой, хиновозой и сульфатированной ксилозой, а также ксилозу в разветвлении.

Помимо описанных групп, в анализируемом образце присутствовали два гликозида с трисахаридными цепями. В (–)ИЭР МС/МС спектрах **E33** (группа X) были обнаружены пики фрагментов при m/z 519.1 $[Glc+Qui+XylSO_3]^-$, 867.4 $[M-Na-Glc]^-$ и 721.3 $[M-Na-Glc-Qui]^-$. В (–)ИЭР МС/МС спектрах **E35** (группа XI) были обнаружены пики фрагментов при m/z 489.1 $[Xyl+Qui+XylSO_3]^-$ и 867.4 $[M-Na-Xyl]^-$. Оба гликозида, вероятно, имеют один и тот же агликон холестерина типа с 16β-ОАс и двумя двойными связями в боковых цепях (вероятно, 22E,24-диен).

Таким образом, все гликозиды *E. fraudatrix* можно разделить на одиннадцать групп в соответствии со строением олигосахаридных цепей. Соединения пяти описанных групп ранее не обнаруживались в этой голотурии. Согласно литературным данным, большинство тритерпеновых гликозидов *E. fraudatrix* имеют 3-О-МеХyl в качестве терминальной моносахаридной единицы. В данной работе были обнаружены новые гликозиды с терминальным остатком 3-О-МеGlc (**E22**, **E27**, **E34** и **E39**). Тот факт, что не все выделенные ранее гликозиды *E. fraudatrix* были обнаружены в данном исследовании можно объяснить изменениями количественного и качественного состава гликозидной фракции, вызванные влиянием места обитания и сезона. Кроме того, некоторые ранее выделенные кукумариозиды А-группы могут быть артефактами, образовавшимися в процессе выделения индивидуальных соединений.

Полученные данные позволили обнаружить «недостающие звенья», ранее не найденные при химическом исследовании *E. fraudatrix*, и предложить путь биосинтеза олигосахаридных цепей в этой голотурии (рисунок 22). Вероятно, удлинение олигосахаридной цепи происходит за счет присоединения моносахаридных остатков в различные положения исходной дисахаридной цепи. Это приводит к образованию гликозидов с разными углеводными фрагментами. Сульфатирование тритерпеновых гликозидов может происходить на разных стадиях образования углеводных цепей, приводя к появлению сульфатированных олигосахаридных фрагментов, содержащих от двух до шести моносахаридных единиц. С этой точки зрения кукумариозид В₂, имеющий ту же несulfатированную углеводную цепь, что и **E35**, представляет собой биосинтетический предшественник нового гликозида **E35**. Аналогичные взаимосвязи наблюдаются в серии других гликозидов *E. fraudatrix*: кукумариозиды С-группы (I) → кукумариозиды Н-группы (V) → кукумариозиды I-группы (IX); кукумариозиды А-группы

(II) → кукумариозиды G-группы (VI) → кукумариозиды F-группы (VIII); а также в группах III–VII, обнаруженных методом ИЭР МС.

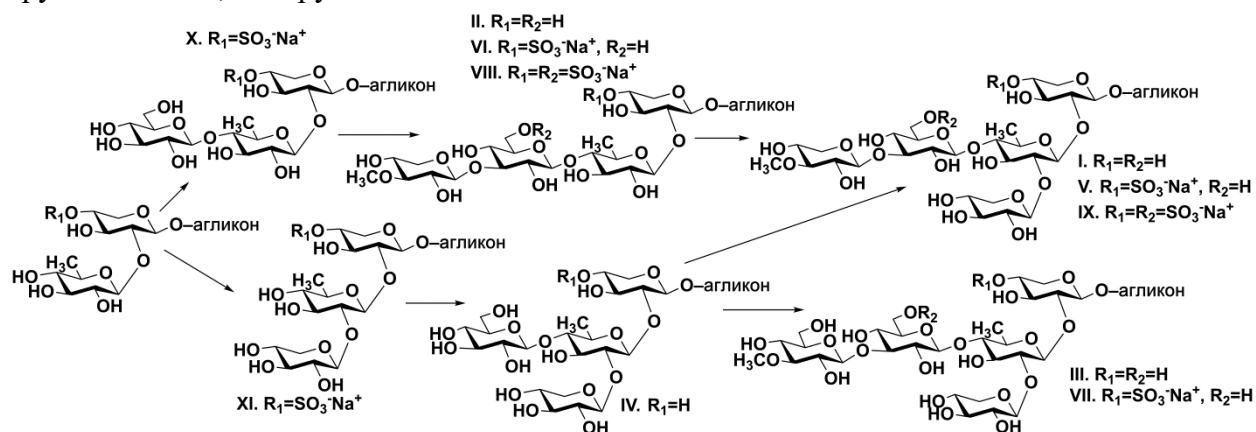


Рисунок 22 – Гипотетическая схема биосинтеза олигосахаридных цепей в *E. fraudatrix*

3 Исследование распределения метаболитов в различных органах животных

3.1 Изучение распределения астеросапонинов, полигидроксистероидов и родственных им гликозидов в различных компонентах тела *L. fusca*

Для изучения распределения полярных стероидных соединений в различных компонентах тела морской звезды *L. fusca* были отдельно экстрагированы полярные стероиды из стенок тела (СТ), гонад (Г), желудка (Ж) и пилорических выростов (ПВ) пяти животных [59]. Кроме того, собирали и анализировали целомическую жидкость (ЦЖ) морских звезд, контактирующую со всеми внутренними органами. Для получения очищенной фракции полярных стероидных соединений из сложных спиртовых экстрактов использовали двухстадийную жидкостно-жидкостную экстракцию с последующим обессоливанием методом твердофазной экстракции. Качество экстракции метаболитов полярных стероидов контролировали с помощью ИЭР МС и ВЭЖХ-ИЭР МС на каждом этапе. Полярные стероидные метаболиты из различных компонентов тела морской звезды *L. fusca* были проанализированы качественно и полуколичественно с помощью наноВЭЖХ-ИЭР МС. На основании результатов предыдущих исследований масс-спектры записывали в режиме регистрации отрицательных ионов. Концентрации каждого соединения были полуколичественно определены с использованием летастериозида А в качестве эталонного стандарта для астеросапонинов, фусказида А в качестве эталонного стандарта для сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и сульфатированных полигидроксистероидов и 5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-октаола в качестве эталонного стандарта для несulfатированных полигидроксистероидных соединений и несulfатированных полигидроксистероидных гликозидов и показаны как мкг/г массы сырых органов.

Профилирование полярных стероидов, выделенных из различных органов, показало, что распределение этих соединений качественно и количественно различается (рисунок 23). Максимальное содержание суммы всех полярных стероидов наблюдалось в желудке при сравнении с другими компонентами тела *L. fusca* (577.5 мкг/г). Доказано, что основную часть полярных стероидов в желудке составляют астеросапонины и нативные агликоны астеросапонинов (97% всего содержания полярных стероидов в желудке). Можно предположить, что астеросапонины в желудке выполняют такую же защитную функцию от хищников, как и в стенках тела. В самом деле, желудок морских звезд уязвим для атак хищников, так при переваривании пищи он вываливается наружу и охватывают добычу со всех сторон (т.н. «внешнее пищеварение»).

Содержание полярных стероидов в пилорических выростах (по-видимому, они выполняют приблизительно такую же роль при пищеварении как печень у позвоночных) составило 314.4 мкг/г. Основными соединениями в ПВ были гликозиды

полигидроксистероидов (85%), астеросапонины и полигидроксистероиды представляли менее значительную часть (оба около 7%) (рисунок 23). Эти данные хорошо согласуются с ранее предполагаемой пищеварительной ролью полигидроксистероидов и родственных им гликозидов. Стенки тела и гонады содержали меньшие концентрации полярных стероидных соединений (66.5 и 78.9 мкг/г соответственно). Основной составляющей стероидной фракции обоих органов были астеросапонины (90% для СТ и 87% для Г), менее существенная часть представлена полигидроксистероидными гликозидами (9% для СТ и 12% для Г).

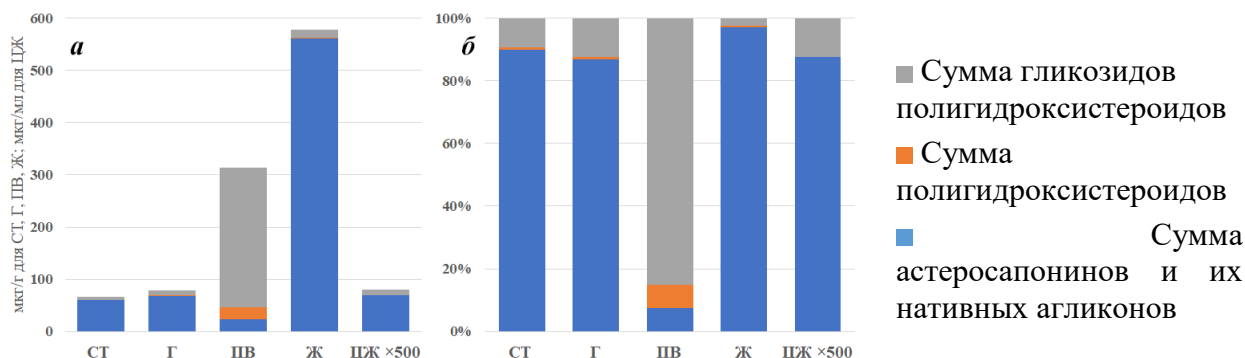


Рисунок 23 – (а) концентрации астеросапонинов, полигидроксистероидов и родственных гликозидов в различных органах и целомической жидкости морской звезды *L. fusca* (мкг/г сырой массы органов для стенок тела (СТ), гонад (Г), пилорических выростов (ПВ) и желудка (Ж) и мкг/мл целомической жидкости (ЦЖ), значения ЦЖ умножены в 500 раз); (б) – соотношения концентраций астеросапонинов, полигидроксистероидов и родственных им гликозидов в различных органах и целомической жидкости морской звезды *L. fusca*

Астеросапонины были обнаружены во всех исследованных частях тела. В стенках тела, гонадах и желудке астеросапонины были основным классом обнаруженных полярных стероидов, но максимальная концентрация этих соединений наблюдалась в желудке (561.1, 68.4 и 59.7 мкг/г в желудке, гонадах и стенках тела соответственно). Кроме того, каждый орган характеризовался своей специфической смесью астеросапонинов. Большинство астеросапонинов присутствовало в максимальной концентрации в желудке, однако некоторые астеросапонины были более характерны для стенок тела или половых желез. Статистический анализ с использованием ANOVA и апостериорного теста Тьюки показал, что концентрации сорока двух астеросапонинов статистически различаются в изучаемых органах, содержание других семидесяти астеросапонинов имело большую межиндивидуальную изменчивость. Часто локализация астеросапонинов была связана с типом агликона (рисунок 24), в то же время структура олигосахаридных цепей астеросапонинов не имела влияния на локализацию. Эти данные могут свидетельствовать о существовании, наряду с защитной, специфической биологической функции отдельных астеросапонинов у морских звезд.

Самые высокие концентрации как несulfатированных, так и sulfатированных полигидроксистероидных соединений наблюдались в экстрактах пилорических выростов (23.1 мкг/г) (рисунок 23). Концентрация полигидроксистероидов в желудке примерно в 10 раз меньше (около 2 мкг/г), чем в пилорических выростах, а анализ экстрактов стенок тела и гонад показал еще более низкие концентрации этих соединений (0.5 и 0.7 мкг/г соответственно). Кроме того, статистический анализ показал, что концентрации четырех несulfатированных и тридцати четырех sulfатированных гликозидов значительно отличались и были существенно выше в пилорических выростах по сравнению с другими органами. Концентрации других гликозидов этой структурной группы также были выше в образцах пилорических выростов, однако для них наблюдалась большая

межиндивидуальная изменчивость. Для сульфатированных гликозидов наблюдалось аналогичное распределение.

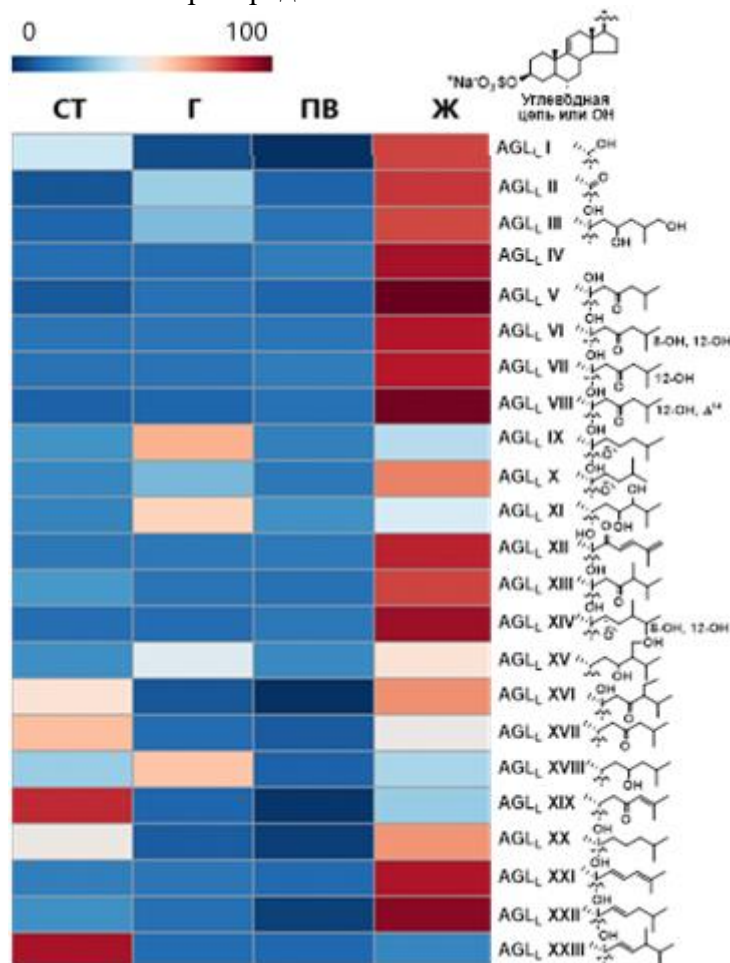


Рисунок 24 – Тепловая карта относительного содержания астросапонинов в различных органах морской звезды *L. fusca*. Каждая строка представляет собой суммарное содержание астросапонинов с одним и тем же типом агликона (AGL I–AGL XXIII). Цветные столбцы отображают относительное содержание групп астросапонинов в автоматическом масштабе, от меньшего (синий) к большему (красный)

Локализация полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов в пилорических выростах *L. fusca* хорошо согласовалась с полученными ранее данными по распределению полярных стероидов в *P. pectinifera* и подтвердила пищеварительную функцию соединений этого класса. Полученные нами данные также указывают, что различные соотношения полигидроксистероидов и родственных гликозидов у отдельных животных могут быть связаны с их рационом. Некоторые гликозиды с определенными структурами боковых цепей агликонов концентрируются в гонадах, что подтверждает их участие в репродукционных процессах, таких как созревание гонад.

2.2 Изучение распределения тритерпеновых гликозидов в различных органах голотурии *E. fraudatrix*

Нами был проведен количественный и качественный анализ обнаруженных в ходе профилирования тритерпеновых гликозидов в различных органах голотурии *E. fraudatrix* [58]. Для этого суммарные фракции тритерпеновых гликозидов были экстрагированы из стенок тела (СТ), гонад (Г), кишечника (К), водных легких (ВЛ) и аквафарингеального комплекса (АК), и полученные образцы были проанализированы с помощью метода ВЭЖХ-ИЭР МС. Метаболическое профилирование показало, что все тритерпеновые гликозиды, обнаруженные в экстракте целой голотурии, также присутствовали во всех изученных частях тела.

Максимальные концентрации подавляющего большинства анализируемых гликозидов наблюдались в стенках тела голотурии, что подтверждает защитную роль тритерпеновых гликозидов. Поскольку *E. fraudatrix* не имеет Кювьеровых трубочек, которые являются основным защитным органом голотурий, она, вероятно, накапливает тритерпеновые гликозиды в стенках тела, повышая таким образом их токсичность для

потенциальных хищников. В стенках тела преобладают основные компоненты гликозидной фракции – кукумариозиды C₁ (E37) и C₂ (E41), соединения E39 и E45, а также кукумариозиды F₁ (E38) и G₁ (E32). Эти соединения содержат несulfатированные пентасахаридные или тетрасахаридные моно- или дисulfатированные углеводные цепи, что делает их высокогидрофильными веществами и ускоряет их диффузию в окружающую водную среду. Более того, известно, что такие соединения обычно проявляют высокую мембранолитическую активность. Все эти данные также подтверждают предположение об основной внешней биологической функции гликозидов как системы химической защиты.

Также метаболическое профилирование экстрактов из различных органов *E. fraudatrix* показало, что относительные количества (нормализованные по сумме) большинства соединений были примерно одинаковыми. Однако некоторые второстепенные соединения были более специфичны для отдельных органов (рисунок 25). Так, относительные количества соединений E12, E15, E17 и некоторых других были значительно выше в гонадах, чем в стенках тела или других органах. Анализ их структур показал, что соединения E15 и E17 имеют негостановые агликоны с укороченными боковыми цепями, что дает некоторое структурное сходство со стероидными гормонами позвоночных. Гликозид E12 содержит кислородсодержащий заместитель в положении C-22, а также окисленное положение C-20, являясь предполагаемым биосинтетическим предшественником агликонов с укороченными боковыми цепями, такими как в E15 и E17. Таким образом, полученные данные подтверждают предполагаемую ранее внутреннюю биологическую функцию тритерпеновых гликозидов – регуляцию созревания ооцитов голотурии.

Содержание гликозидов группы IV (E36 и E40), имеющих своеобразные разветвленные тетрасахаридные цепи, не несущие терминального метилированного моносахарида, было максимальным в экстрактах кишечника. Их биологическая роль в настоящее время не установлена. Помимо этого, наблюдаемая корреляция между содержанием ряда гликозидов в аквафарингеальном комплексе и водных легких (соединения E1, E2, E4, E5, E7, E8 и E9) может указывать на дополнительные биологические функции отдельных тритерпеновых гликозидов в организме-продуcente.

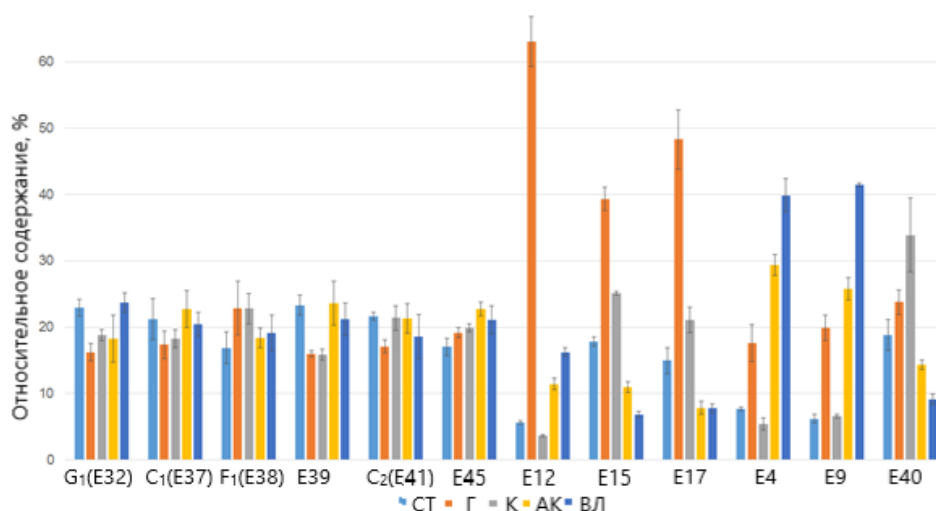


Рисунок 25 – Относительные количества тритерпеновых гликозидов кукумариозидов G₁ (E32), C₁ (E37), F₁ (E38) и C₂ (E41), а также соединений E39, E45, E12, E15, E17, E4, E9 и E40 в водных легких (ВЛ), гонадах (Г), аквафарингеальном комплексе (АК), кишечнике (К), и стенках тела (СТ)

Таким образом, результаты качественного и количественного анализа содержания гликозидов в различных органах голотурии может указывать на то, что для тритерпеновых гликозидов, наряду с известной защитной функцией, существуют

дополнительные внешние и внутренние биологические функции. Преобладание в стенках тела основных высокогидрофильных и мембранолитических гликозидов *E. fraudatrix* подтверждает их защитную роль. Наличие гликозидов во всех компонентах тела свидетельствует об их многофункциональности.

4 Метаболомный анализ воздействия различных факторов на содержание полярных стероидных метаболитов морской звезды *P. pectinifera*

Для исследования влияния различных факторов окружающей среды на содержание полярных стероидов в морской звезде *P. pectinifera* был применен целевой метаболомный подход с использованием метода ВЭЖХ-ИЭР МС [60]. Экстракты контрольной группы морских звезд и морских звезд, активно питавшихся (две группы животных – через 10 мин и 1 ч после приема пищи), получивших повреждения (две группы – через 3 и 5 дней после ранения), живших в условиях недостатка кислорода в воде (одна группа), в условиях изменения температуры воды (одна группа) и солености (три группы – 19, 27 и 40 ‰), очищали методом ТФЭ и анализировали с помощью ВЭЖХ-ИЭР МС. Для идентификации метаболитов использовалась библиотека, содержащая хроматографические и МС данные, полученные ранее в ходе профилирования полярных стероидных соединений *P. pectinifera*. Одномерный и многомерный статистический анализ методом главных компонент (МГК) полученного набора данных показал наличие значимых изменений концентраций стероидных метаболитов в результате влияния изучаемых факторов. Различия между контрольной и экспериментальными группами лучше всего описывались младшими компонентами ГК1 и ГК2 (рисунок 26). Для дополнительной оценки метаболического влияния стресса, вызванного в каждой конкретной группе морских звезд, был применен статистический анализ с использованием МГК и метода частных наименьших квадратов в сочетании с дискриминантным анализом (PLS-DA).

Анализ влияния кормления. Из 26 метаболитов, которые показали статистически значимые различия, 14 являлись астеросапонинами, причем концентрация большинства из них уменьшалась в ответ на кормление. Наиболее сильно снижались концентрации нативного агликона 3-О-сульфоастерона (**P10**) и астеросапонин, имеющих 3-О-сульфоастерон в качестве агликона (**P3**, **P5**, **P6**, **P7**). Концентрации пяти гликозидов полигидроксистероидов (**P20**, астеросапонин **P2** (**P23**), **P49**, **P57**, **P64**) и двух сульфатированных полигидроксистероидов (**P12**, **P15**) увеличились по сравнению с контрольной группой. Гликозиды **P20**, **P23**, **P57** и **P64** имели стигмастановый скелет и сульфатированную арабинозу или метилированную арабинозу в качестве моносахаридного остатка (рисунок 19). Концентрации двух метаболитов, имеющих холестановый скелет (5 α -холеста-3 β ,6 α ,8,15 α ,16 β ,26-гексаол (**P21**) и (25S)-5 α -холеста-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-октаол (**P34**)), уменьшились, а уровень полиола **P54** с эргостановым скелетом увеличился по сравнению уровнем этого соединения в животных контрольной группы. Таким образом, можно заметить, что концентрации соединений, имеющих эргостановый или стигмастановый скелет, увеличивались в ответ на кормление, тогда как уровень метаболитов, имеющих холестановые боковые цепи, уменьшался или изменялся незначительно.

Анализ влияния повреждения. Полученные результаты показали, что для 24 метаболитов наблюдались статистически значимые различия в изменениях концентраций, 13 из них являлись астеросапонинами. Как и в случае влияния кормления, концентрации большинства астеросапонин уменьшались в ответ на повреждение, однако концентрация пектиниозида **B** (**P44**) увеличилась. Концентрации астеросапонина **P68**, агликона **P69** и 3-О-сульфо-24,25-дигидромартастерона (**P72**) были наибольшими через 3 дня после ранения, однако к пятому дню они резко снижались. Все астеросапонины, имеющие максимальную концентрацию в контрольной группе, являлись пентаозидами, тогда как астеросапонин, уровень которого увеличивался в ответ на повреждение, являлся гексаозидом. Концентрации сульфатированных полигидроксистероидов **P12** и **P15**,

гликозидов пектиниозида I (**P16**), **P20**, астеросапонина P_2 (**P23**), **P35**, **P49**, **P57**, **P64** были выше в экстрактах раненых морских звезд, а концентрация 5 α -холеста-3 β ,6 α ,8,15 α ,16 β ,26-гексаола (**P21**) уменьшилась в ответ на повреждение.

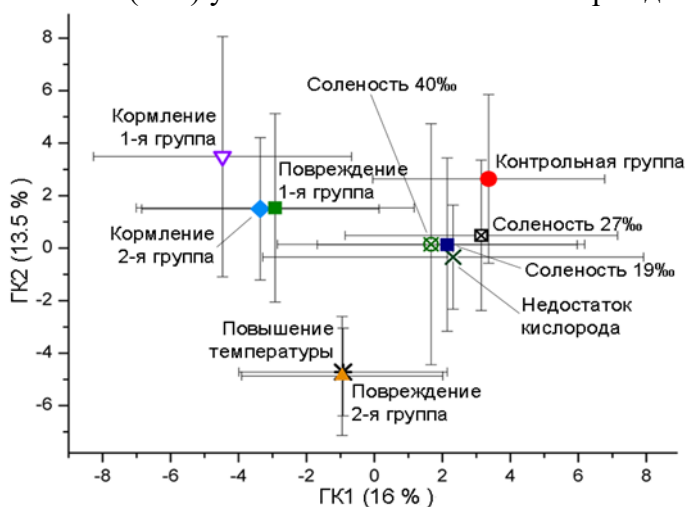


Рисунок 26 – График счетов (ГК1 – ГК2) МГК-модели метаболомных данных, полученных для животных контрольной группы и групп, находящихся под воздействием различных факторов. Данные по группам образцов представлены в виде среднего значения $\pm$ 2 стандартных отклонения

Анализ влияния повышения температуры. Статистически значимые различия наблюдались для концентраций 24 метаболитов. Концентрации большинства астеросапонинов снижались по сравнению с контрольной группой, и только уровень пектиниозида В (**P44**) увеличивался в ответ на повышение температуры. Как и в случае влияния повреждения, все астеросапонины, концентрации которых были выше в контрольной группе, являлись пентаозидами, тогда как астеросапонин, концентрация которого была ниже в контрольной группе, являлся гексаозидом. Концентрации большинства полигидроксистероидов и гликозидов увеличивались в ответ на повышение температуры воды (сульфатированные полигидроксистероиды **P12**, **P15**, **P24** и гликозиды пектиниозид I (**P16**), **P20**, астеросапонин P_2 (**P23**), **P64**), тогда как концентрация 5 α -холеста-3 β ,6 α ,8,15 α ,16 β ,26-гексаола (**P21**) уменьшилась. В целом, метаболический ответ на повышение температуры воды оказался похожим на таковой при изучении влияния повреждения.

Анализ влияния недостатка кислорода. Статистически значимые различия наблюдались для 10 метаболитов, 8 из них являлись астеросапонинами. Концентрации большинства этих гликозидов (астеросапонины **P50**, **P52**, **P55**, **P63**, **P67** и агликоны 3-О-сульфоастерон (**P10**), 3-О-сульфоторнастерин А (**P52**), 3-О-сульфо-24,25-дигидромартастерон (**P72**)) увеличивались при данном эксперименте. В отличие от влияния кормления и повреждения, содержание морских звезд в условиях недостатка кислорода вызывало понижение концентрации пектиниозида В (**P44**). Концентрации сульфатированного полигидроксистероида **P24** и гликозида **P57** снижались в результате действия стресса. Содержание несulfатированных полигидроксистероидов изменилось незначительно.

Анализ влияния изменения солености. Исходя из результатов МГК, группа, которая содержалась при 40 ‰, была исключена при дальнейшем анализе методом PLS-DA. В соответствии со значениями VIP (важность независимой переменной в проекции) и q -уровнями значимости, 12 метаболитов показали наиболее выраженные различия. Концентрации большинства астеросапонинов (**P6**, **P8**, **P40**, **P50**, **P55**, **P67**) и агликона 3-О-сульфоастерона (**P10**) снижались в ответ на понижение солености, однако эти изменения были значительно менее выражены, чем в случаях влияния повреждения, кормления или повышения температуры воды. Концентрации гексаозидов **P3** и **P44** оказались выше в группе, которая содержалась при 27 ‰. Концентрации несulfатированного полигидроксистероида (25S)-5 α -холеста-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-октаола (**P19**), сульфатированного полигидроксистероида **P11** и гликозида **P57** также увеличивались по сравнению с контрольной группой. Несмотря на наличие общей тенденции,

метаболический ответ на понижение солености оказался намного слабее, чем ответ на повреждение, кормление или повышение температуры воды.

Таким образом, полученные результаты показали, что различия, вызванные кормлением, повреждением и повышением температуры, были больше, чем в других группах морских звезд. Эти состояния имели сходство в своем влиянии на стероидный метаболит морских звезд. В результате влияния этих факторов концентрации большинства астеросапонинов снизились, в то время как концентрации большинства полигидроксистероидных соединений увеличились. Снижение содержания астеросапонинов может быть связано с тем, что их биосинтез под влиянием данных факторов прекращается и/или с тем, что морская звезда выделяет часть астеросапонинов в окружающую среду. Увеличение концентрации полигидроксистероидных соединений вероятно связано с их пищеварительными функциями. С другой стороны, увеличение концентрации сульфатированных полигидроксистероидов и гликозидов в ответ на повреждение может говорить о том, что эти соединения принимают участие и в других процессах. Содержание морских звезд в условиях недостатка кислорода и пониженной солености оказали слабое влияние на стероидный метаболит. Метаболический ответ в случае недостатка кислорода был противоположен результатам действия других факторов. Эффект, оказанный уменьшением солености воды, оказался близок результатам воздействия повреждения, кормления и повышения температуры воды, однако выражен он был более слабо. В целом можно сделать вывод о биологической многофункциональности полярных стероидов морских звезд.

ВЫВОДЫ

1. Выполнено масс-спектрометрическое изучение более 300 новых вторичных метаболитов, выделенных из морских звезд, голотурий и губок, принадлежащих к различным структурным классам, включая полярные стероиды морских звезд, тритерпеновые гликозиды голотурий, стероиды, гликозиды, алкалоиды, необычные липиды из морских губок. На основании данных масс-спектрометрии высокого разрешения установлены брутто-формулы для всех исследованных метаболитов, а с помощью тандемной масс-спектрометрии изучены основные направления масс-спектрометрической фрагментации изученных веществ. Полученные данные внесли существенный вклад в установление их полного строения.
2. Установлено, что применение тандемной масс-спектрометрии при изучении олигогликозидов морских звезд, голотурий и губок позволяет получить наибольшую структурную информацию, включающую данные о структуре агликона, а также строении углеводных цепей, а именно, количестве и природе моносахаридных остатков, информацию о местах разветвления и присутствии функциональных групп.
3. Показана возможность идентификации стереоизомеров с различной ориентацией гидроксильной группы в положении C-15 в стероидном ядре полигидроксистероидных соединений морских звезд при помощи тандемной ИЭР масс-спектрометрии.
4. Разработаны подходы ВЭЖХ-ИЭР МС для исследования состава смесей вторичных метаболитов морских звезд и голотурий, отработаны методы пробоподготовки, подобраны условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического анализа сумм метаболитов. Исследовано хроматографическое и масс-спектрометрическое поведение нескольких десятков индивидуальных метаболитов в условиях ВЭЖХ-ИЭР МС, сделаны выводы о закономерностях их поведения в условиях ВЭЖХ-МС в зависимости от структур молекул.
5. Методом ВЭЖХ-ИЭР МС исследованы стероидные метаболиты дальневосточных морских звезд *Aphelasterias japonica* и *Patiria pectinifera*, в результате в экстрактах обнаружено 68 и 72 полярных стероидных метаболитов соответственно.

Идентифицированы известные соединения и предложены структуры для ранее не найденных в этих морских звездах веществ.

6. С помощью ВЭЖХ-ИЭР МС изучен метаболомный профиль тритерпеновых гликозидов голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Анализируемый профиль выявил не менее 54 соединений, идентифицированы известные гликозиды, предложены структуры для ранее неизвестных соединений. В соответствии со строением олигосахаридных цепей все проанализированные гликозиды *E. fraudatrix* были разделены на одиннадцать групп, пять из которых ранее не были обнаружены при изучении *E. fraudatrix*. Нахождение гликозидов с ранее неизвестными углеводными цепями позволило прояснить этапы биосинтеза олигосахаридных цепей в данном виде голотурий.
7. На примере исследования метаболома полярных стероидов морской звезды *Lethasterias fusca* показано, что применение нанопоточной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с ИЭР масс-спектрометрией более, чем в три раза увеличивает число детектируемых метаболитов, при этом были найдены метаболиты со структурными фрагментами, ранее не описанными в стероидах морских звезд.
8. Применение метаболомных подходов позволило исследовать распределение целевых метаболитов в различных органах организмов-продуцентов на примерах морской звезды *L. fusca* и голотурии *E. fraudatrix*, полученная информация прояснила или подтвердила возможные биологические роли этих соединений. Подтверждены высказанные ранее гипотезы о пищеварительной функции полигидроксистероидов и защитной роли астеросапонинов в морских звездах. Присутствие максимального количественного содержания большинства анализируемых гликозидов в стенках тела *E. fraudatrix* указывает на участие тритерпеновых гликозидов в защите голотурий от хищников.
9. С помощью метаболомного подхода изучено влияние различных факторов окружающей среды на метаболом полярных стероидных соединений морской звезды *P. pectinifera*. Установлено, что наибольшие метаболические изменения вызываются кормлением, повреждением морских звезд и повышением температуры воды. Показано, что содержание большинства астеросапонинов снижалось, а содержание большинства полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов увеличивалось. Полученные данные указывают на многофункциональные биологические роли различных классов полярных стероидов в организмах морских звезд.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Agafonova I.G., Long P.Q., Stonik V.A. Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters // *Steroids*. 2010. V. 75, N 12. P. 897–904.
2. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Agafonova I.G., Stonik V.A. Steroidal triglycosides, kurilensosides A, B, and C, and other polar steroids from the far-eastern starfish *Hippasteria kurilensis* // *J. Nat. Prod.* 2008. V. 71, N 5. P. 793–798.
3. Маляренко Т.В., Кича А.А., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., **Дмитренко П.С.**, Смирнов А.В. Три новых полигидроксистероида из звезды *Asteropsis carinifera* // *Биоорганич. химия*. 2010. Т. 36, № 6. С. 825–831.
4. Попов Р.С., **Дмитренко П.С.** Стереоспецифичная фрагментация полигидроксистероидов морских звезд в условиях масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением // *Масс-спектрометрия*. 2016. Т. 13, № 1. С. 44–51.
5. Попов Р.С., Иванчина Н.В., Кича А.А., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., **Дмитренко П.С.** Минорные стероидные гликозиды из дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* // *Химия природ. соедин.* 2013. № 2. С. 243–247.

6. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Stonik V.A. Steroidal monoglycosides from the Far Eastern starfish *Hippasteria kurilensis* and hypothetic pathways of polyhydroxysteroid biosynthesis in starfish // *Steroids*. 2009. V. 74, N 2. P. 238–244.
7. Malyarenko T.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Ermakova S.P., Stonik V.A. Cariniferosides A–F and other steroidal biglycosides from the starfish *Asteropsis carinifera* // *Steroids*. 2011. V. 76, N 12. P. 1280–1287.
8. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Pislyagin E.A., Yurchenko E.A. Regulosides A, B, and C, three new polyhydroxysteroid glycosides from the starfish *Pentaceraster regulus* // *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11, N 9. P. 1243–1246.
9. Кича А.А., Иванчина Н.В., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Сульфатированные стероидные гликозиды, регулусозиды S1 и S2, из тропической морской звезды *Pentaceraster regulus* // *Химия природ. соедин.* 2017. № 1. С. 75–79.
10. Кича А.А., Иванчина Н.В., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., **Дмитренко П.С.** Фишерииозид А – новый стероидный гликозид из морской звезды *Leptasterias fisheri* // *Химия природ. соедин.* 2012. № 5. С. 719–721.
11. Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kicha A.A., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Stonik V. A. A new steroidal glycoside granulatoside C from the starfish *Choriaster granulatus*, unexpectedly combining structural features of polar steroids from several different marine invertebrate phyla // *Nat. Prod. Commun.* 2017. V. 12, N 10. P. 1585–1588.
12. Malyarenko T.V., Kharchenko S.D., Kicha A.A., Ivanchina N.V., **Dmitrenok P.S.**, Chingizova E.A., Pislyagin E.A., Evtushenko E.V., Antokhina T.I., Minh C.V., Stonik V.A. Anthenosides L–U, steroidal glycosides with unusual structural features from the starfish *Anthenea aspera* // *J. Nat. Prod.* 2016. V. 79, N 12. P. 3047–3056.
13. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Popov R.S., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Kharchenko S.D., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Ermakova S.P., **Dmitrenok P.S.** Aphelasteroside F, a new asterosaponin from the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* // *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11, N 9. P. 1247–1250.
14. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., **Dmitrenok P.S.**, Kuzmich A.S., Sokolova E.V., Stonik V.A. Furostane series asterosaponins and other unusual steroid oligoglycosides from the tropical starfish *Pentaceraster regulus* // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80, N 10. P. 2761–2770.
15. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., **Dmitrenok P.S.**, Ermakova S.P., Stonik V.A. Four new asterosaponins, hippasteriosides A–D, from the Far Eastern starfish *Hippasteria kurilensis* // *Chem. Biodiver.* 2011. V. 8, N 1. P. 166–175.
16. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Fedorov S.N., Dyshlovoy S.A., Long P.Q., Stonik V.A. Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the Vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20, N 12. P. 3826–3830.
17. Маляренко Т.В., Кича А.А., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., **Дмитренко П.С.**, Ермакова С.П., Минх Ч.В. Астеропсизид А и другие астеросапонины из морской звезды *Asteropsis carinifera* // *Известия АН. Серия химия.* 2012. № 10. С. 1969–1973.
18. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Malyarenko T.V., Ivanchina N.V., **Dmitrenok P.S.**, Menchinskaya E.S., Yurchenko E.A., Pislyagin E.A., Aminin D.L., Huong T.T.T., Long P.Q., Stonik V.A. Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities // *J. Nat. Prod.* 2015. V. 78, N 6. P. 1397–1405.
19. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjashchenko P.V., Fedorov S.N., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A., Kalinin V.I., Rogacheva A.V., Gebruk A.V. Kolgaosides A and B, two new triterpene glycosides from the Arctic deep water sea cucumber *Kolga hyalina* (Elasipodida: Elpidiidae) // *Nat. Prod. Commun.* 2014. V. 9, N 9. P. 1259–1264.

20. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., **Dmitrenok P.S.**, Fedorov S.N., Stepanov V.G., Dong Z., Stonik V.A. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of okhotosides B₁-B₃ and cytotoxic activities of some glycosides from this species // J. Nat. Prod. 2008. V. 71, N 3. P. 351–356.
21. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Yurchenko E.A., Dautov S.S. Structures of violaceosides C, D, E and G, sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Pseudocolochirus violaceus* (Cucumariidae, Dendrochirotida) // Nat. Prod. Commun. 2014. V. 9, N 3. P. 391–399.
22. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Martyyas E.A., Kalinin V.I. Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentactia fraudatrix*. Structure and biological action of cucumariosides A₁, A₃, A₄, A₅, A₆, A₁₂ and A₁₅, seven new minor non-sulfated tetraosides and unprecedented 25-keto, 27-norholostane aglycone // Nat. Prod. Commun. 2012. V. 7, N 4. P. 517–525.
23. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A., Kalinin V.I. Structures and cytotoxic properties of cucumariosides H₂, H₃ and H₄ from the sea cucumber *Eupentactia fraudatrix* // Nat. Prod. Res. 2012. V. 26, N 19. P. 1765–1774.
24. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Martyyas E.A., Kalinin V.I., Jayasandhya P., Rajan G.C., Padmakumar K.P. Structures and biological activities of typicosides A₁, A₂, B₁, C₁ and C₂, triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinocucumis typical* // Nat. Prod. Commun. 2013. V. 8, N 3. P. 301–310.
25. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A., Dolmatov I.Yu., Kalinin V.I., Stonik V.A. Structure and biological action of cladolosides B₁, B₂, C, C₁, C₂ and D, six new triterpene glycosides from the sea cucumber *Cladolabes schmeltzii* // Nat. Prod. Commun. 2013. V. 8, N 11. P. 1527–1534.
26. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A., Dolmatov I.Yu., Kalinin V.I. Structures and biological activities of cladolosides C₃, E₁, E₂, F₁, F₂, G, H₁ and H₂, eight triterpene glycosides from the sea cucumber *Cladolabes schmeltzii* with one known and four new carbohydrate chains // Carbohydr. Res. 2015. V. 414. P. 22–31.
27. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Chingizova E.A., Dolmatov I.Yu., Kalinin V.I. Cladolosides I₁, I₂, J₁, K₁, K₂ and L₁, monosulfated triterpene glycosides with new carbohydrate chains from the sea cucumber *Cladolabes schmeltzii* // Carbohydr. Res. 2017. V. 445. P. 80–87.
28. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dolmatov I.Yu., Kalinin V.I. Cladolosides C₄, D₁, D₂, M, M₁, M₂, N and Q, new triterpene glycosides with diverse carbohydrate chains from sea cucumber *Cladolabes schmeltzii*. An uncommon 20,21,22,23,24,25,26,27-okta-nor-lanostane aglycone. The synergism of inhibitory action of non-toxic dose of the glycosides and radioactive irradiation on colony formation of HT-29 cancer cells // Carbohydr. Res. 2018. V. 468. P. 36–44.
29. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Yurchenko E.A., Dolmatov Y.Yu. Colochirosides B₁, B₂, B₃ and C, novel sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Colochirus robustus* (Cucumariidae, Dendrochirotida) // Nat. Prod. Commun. 2015. V. 10, N 10. P. 1687–1694.
30. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Yurchenko E.A., Dolmatov I.Yu. Colochirosides A₁, A₂, A₃, and D, four novel sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Colochirus robustus* (Cucumariidae, Dendrochirotida) // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11, N 3. P. 381–387.
31. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Chingizova E.A., Minin K.V., Stonik V.A. Structures and biogenesis of

- fallaxosides D₄, D₅, D₆ and D₇, trisulfated non-holostane triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria fallax* // *Molecules*. 2016. V. 21, N 7. P. 939[1–12].
32. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Berdyshev D.V., Chingizova E.A., Andrijaschenko P.V., Minin K.V., Stonik V.A. Fallaxosides B₁ and D₃, triterpene glycosides with novel skeleton types of aglycones from the sea cucumber *Cucumaria fallax* // *Tetrahedron*. 2017. V. 73, N 17. P. 2335–2341.
 33. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Kalinin V.I., Andrijaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Chingizova E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dautova T.N. Nine new triterpene glycosides, magnumosides A₁–A₄, B₁, B₂, C₁, C₂ and C₄, from the Vietnamese sea cucumber *Neothyonidium* (= *Massinium*) *magnum*: structures and activities against tumor cells independently and in synergy with radioactive irradiation // *Mar. Drugs*. 2017. V. 15, N 8. P. 256[1–22].
 34. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Kalinin V.I., Andrijaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.** Psolusosides C₁, C₂, and D₁, novel triterpene hexaosides from the sea cucumber *Psolus fabricii* (Psolidae, Dendrochirotida) // *Nat. Prod. Commun.* 2018. V. 13, N 12. P. 1623–1628.
 35. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Kalinin V.I., Andrijaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Popov R.S., Chingizova E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S. Structures and bioactivities of six new triterpene glycosides, psolusosides E, F, G, H, H₁, and I and the corrected structure of psolusoside B from the sea cucumber *Psolus fabricii* // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17, N 6. P. 358[1–24].
 36. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Kalinin V.I., Andrijaschenko P.V., **Dmitrenok P.S.**, Popov R.S., Chingizova E.A. Structures and bioactivities of psolusosides B₁, B₂, J, K, L, M, N, O, P, and Q from the sea cucumber *Psolus fabricii*. The first finding of tetrasulfated marine low molecular weight metabolites // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 631[1–24].
 37. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., **Dmitrenok P.S.**, Chingizova E.A., Kalinin V.I. Kurilosides A₁, A₂, C₁, D, E and F – triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Thyonidium* (= *Duasmodactyla*) *kurilensis* (Levin): structures with unusual non-holostane aglycones and cytotoxicities // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18, N 11. P. 551[1–21].
 38. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andrijaschenko P.V., Popov R.S., **Dmitrenok P.S.**, Chingizova E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dautov S.Sh., Kalinin V.I. Structures and bioactivities of quadrangularisosides A, A₁, B, B₁, B₂, C, C₁, D, D₁–D₄, and E from the sea cucumber *Colochirus quadrangularis*: the first discovery of the glycosides, sulfated by C-4 of the terminal 3-O-methylglucose residue. Synergetic effect on colony formation of tumor HT-29 cells of these glycosides with radioactive irradiation // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18, N 8. P. 94[1–35].
 39. Antonov A.S., Kalinovsky A.I., **Dmitrenok P.S.**, Kalinin V.I., Stonik V.A., Mollo E., Cimino G. New triterpene oligoglycosides from the Caribbean sponge *Erylus formosus* // *Carbohydr. Res.* 2011. V. 346, N 14. P. 2182–2196.
 40. Antonov A.S., Kalinovsky A.I., Afiyatullo Sh.Sh., Leshchenko E.V., **Dmitrenok P.S.**, Yurchenko E.A. Kalinin V.I., Stonik V.A. Erylosides F₈, V₁–V₃ and W–W₂ – new triterpene oligoglycosides from the Caribbean sponge *Erylus goffrilleri* // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 449. P. 153–159.
 41. Makarieva T.N., Ivanchina N.V., **Dmitrenok P.S.**, Guzii A.G., Stonik V.A., Dalisay D.S., Molinski T.F. Oceanalin B, a hybrid α,ω -bifunctionalized sphingoid tetrahydroisoquinoline β -glycoside from the marine sponge *Oceanapia* sp. // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19, N 11. P. 635[1–9].
 42. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Kuzmich A.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Melonoside A: an ω -glycosylated fatty

- acid amide from the Far Eastern marine sponge *Melonanchora kobjakovae* // Org. Lett. 2016. V. 18, N 14. P. 3478–3481.
43. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Popov R.S., Kuzmich A.S., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Kim N.Yu., Stonik V.A. Melonoside B and melonosins A and B, lipids containing multifunctionalized ω -hydroxy fatty acid amides from the far eastern marine sponge *Melonanchora kobjakovae* // J. Nat. Prod. 2018. V. 81, N 12. P. 2763–2767.
 44. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Kuzmich A.S., Dyshlovoy S.A., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // Org. Lett. 2010. V. 12, N 19. P. 4292–4295.
 45. Makarieva T.N., Tabakmaher K.M., Guzii A.G., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Shubina L.K., Kuzmich A.S., Lee H.-S., Stonik V.A. Monanchocidins B–C: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra* // J. Nat. Prod. 2011. V. 74, N 9. P. 1952–1958.
 46. Makarieva T.N., Tabakmaher K.M., Guzii A.G., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Kuzmich A.S., Lee H.-S., Stonik V.A. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra* // Tetrahedron Lett. 2012. V. 53, N 32. P. 4228–4231.
 47. Tabakmakher K.M., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Guzii A.G., **Dmitrenok P.S.**, Kuzmich A.S., Stonik V.A. Normonanchocidins A, B and D, a new pentacyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra* // Nat. Prod. Commun. 2015. V. 10, N 6. P. 913–916.
 48. Makarieva T.N., Ogurtsova E.K., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Tabakmakher K.M., Guzii A.G., Pislyagin E.A., Es'kov A.A., Kozhemyako V.B., Aminin D.L., Wang Y.-M., Stonik V.A. Urupocidin A: a new, inducing iNOS expression bicyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // Org. Lett. 2014. V. 16, N 16. P. 4292–4295.
 49. Guzii A.G., Makarieva T.N., Korolkova Y.V., Andreev Y.A., Mosharova I.V., Tabakmaher K.M., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Ogurtsova E.K., Antonov A.S., Lee H.-S., Grishin E.V. Pulchranin A, isolated from the Far-Eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: the first marine nonpeptide inhibitor of TRPV-1 channels // Tetrahedron Lett. 2013. V. 54, N 10. P. 1247–1250.
 50. Санталова Е.А., Денисенко В.А., **Дмитренко П.С.** Минорные бромсодержащие соединения из экстракта губки *Aplysina* sp. // Химия природ. соедин. 2013. № 1. С. 67–70.
 51. Tabakmakher K.M., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Popov R.S., **Dmitrenok P.S.**, Dyshlovoy S.A., Grebnev B.B., Bokemeyer C., von Amsberg G., Cuong N.X. New trisulfated steroids from the Vietnamese marine sponge *Halichondria vansomesti* and their PSA expression and glucose uptake inhibitory activities // Mar. Drugs. 2019. V. 17, N 8. P. 445[1–14].
 52. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Gerasimenko A.V., Udovenko A.A., Popov R.S., **Dmitrenok P.S.**, Golotin V.A., Fedorov S.N., Grebnev B.B., Stonik V.A. Guitarrins A–E and aluminumguitarrin A: 5-azaindoles from the Northwestern Pacific marine sponge *Guitarra fimbriata* // J. Nat. Prod. 2019. V. 82, N 6. P. 1704–1709.
 53. Shubina L.K., Makarieva T.N., Yashunsky D.V., Nifantiev N.E., Denisenko V.A., **Dmitrenok P.S.**, Dyshlovoy S.A., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Jeong S.H., Han J., Stonik V.A. Pyridine nucleosides neopetrosides A and B from a marine *Neopetrosia* sp. sponge. Synthesis of neopetroside A and its β -riboside analogue // J. Nat. Prod. 2015. V. 78, N 6. P. 1383–1389.
 54. Popov R.S., Ivanchina N.V., **Dmitrenok P.S.** Application of MS-based metabolomic approaches in analysis of starfish and sea cucumber bioactive compounds // Mar. Drugs. 2022. V. 20, N 5. P. 320[1–34].

55. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., **Dmitrenok P.S.**, Stonik V.A. Metabolite profiling of polar steroid constituents in the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* using LC–ESI MS/MS // *Metabolomics*. 2014. V. 10, N 6. P. 1152–1168.
56. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., **Dmitrenok P.S.**, Stonik V.A. LC-ESI MS/MS profiling of polar steroid metabolites of the Far Eastern starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* // *Metabolomics*. 2016. V. 12, N 2. P. 21 [1–18].
57. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., **Dmitrenok P.S.** Structural characterization of polar steroid compounds of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* by nanoflow liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2019. V. 30, N 5. P. 743–764.
58. Popov R.S., Ivanchina N.V., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Dolmatov I.Yu., Stonik V.A., **Dmitrenok P.S.** Metabolite profiling of triterpene glycosides of the Far Eastern sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* and their distribution in various body components using LC-ESI QTOF-MS // *Mar. Drugs*. 2017. V. 15, N 10. P. 302[1–17].
59. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., Stonik V.A., **Dmitrenok P.S.** The distribution of asterosaponins, polyhydroxysteroids and related glycosides in different body components of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17, N. 9. P. 523[1–14].
60. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., **Dmitrenok P.S.**, Stonik V.A. LC–MS-based metabolome analysis on steroid metabolites from the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* in conditions of active feeding and stresses // *Metabolomics*. 2016. V. 12, N 6. P. 106 [1–17].