



УДК 547.395+547.392.6+547.295+547.296

9-ХЛОР-5,9-ДИЕНОВЫЕ И ДРУГИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ИЗ МОРСКОЙ ГУБКИ *Penares* sp.¹

© 2024 г. Е. А. Санталова*,[#], С. А. Колесникова*

* Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, Россия, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 11.09.2023 г.

После доработки 24.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

Жирные кислоты (ЖК) и их этиловые эфиры из экстракта губки *Penares* sp. (Южно-Китайское море) были разделены с помощью ВЭЖХ и проанализированы методом ГЖХ-МС с использованием пирролидиновых, 4,4-диметилкоксазолиновых, диметилдисульфидных и гидрированных производных. В отдельных случаях для анализа структур ЖК применяли спектроскопию ¹H- и ¹³C-ЯМР. Была обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C₁₂ до C₂₈, в том числе 12 новых соединений: (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-пентакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновая, (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гептакозадиеновая, 6-хлор-20-метил-4-генэйкозеновая, 6-хлор-19-метил-4-генэйкозеновая, 6-хлор-20-метил-4-докозеновая, *цис*-17,18-метилен-тетракозановая, 16,21-диметилдокозановая, 18,23-диметилтетракозановая, 16,18,22-триметилтрикозановая и 18,20,24-триметилпентакозановая кислоты. Показаны особенности изученной смеси ЖК: высокое содержание компонентов с монометилированными цепями (>50%) и почти полное замещение обычных для губок демоспонгиевых кислот их хлорпроизводными – неизвестными ранее (5Z,9Z)-9-хлор-5,9-диеновыми кислотами. Обсуждено наличие аналогичных структурных фрагментов в ЖК *Penares* sp. и в некоторых биологически активных вторичных метаболитах губок этого рода. Полученные результаты могут быть использованы в структурных, сравнительных и биосинтетических исследованиях морских липидов.

Ключевые слова: губка, *Penares*, жирные кислоты, хлорированные жирные кислоты, демоспонгиевые кислоты, ГЖХ-МС

DOI: 10.31857/S0132342324020034, **EDN:** ONMVIP

ВВЕДЕНИЕ

Губки – древние и наиболее примитивные многоклеточные животные, являющиеся одним из богатейших природных источников различных уникальных метаболитов, в том числе необычных жирных кислот (ЖК). ЖК губок посвящено много экспериментальных и несколько обзорных статей (см., например, обзоры [1–5]). Несмотря на преобладание хлорид-

иона в морской воде, ранее известные галогенированные ЖК губок представлены 6-бромпроизводными 5-*цис*,9-*цис*-диеновых (или демоспонгиевых [6]) кислот, а также ацетиленовыми полиненасыщенными бромированными [7] и иодированными [8] кислотами. Что касается хлорированных ЖК, то их обнаруживали в некоторых более эволюционно развитых морских беспозвоночных, а также рыбах и водорослях [7].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324020034 для авторизованных пользователей. Сокращения: ЖК – жирные кислоты; ЭДЦ – эквивалентная длина цепи; ¹H,¹H-COSY – протон-протонная корреляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная многосвязная когерентность; HSQC – гетероядерная одноквантовая когерентность. #Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-11-68; эл. почта: santalova@piboc.dvo.ru).

При разделении этанольного экстракта губки рода *Penares* (Южно-Китайское море), наряду с фракциями тритерпеноидов [9] и бромированных индольных алкалоидов [10], мы получили фракцию этиловых эфиров демоспонгиевых кислот нового типа, содержащих винильный атом хлора. Эта необычная структурная черта побудила нас более подробно исследовать ЖК данной губки, что привело к обнаружению других неизвестных ранее кислот.

Губки *Penares* – продуценты многих липидов и липидоподобных соединений, обладающих разнообразными видами биологической активности. Так, пенарезидины А и В из *Penares* sp. активировали актин-зависимую АТФазу [11], а пеназетидин А из *Penares sollasi* ингибировал протеинкиназу С [12]. Кроме того, пенасульфат А из *Penares* sp. и шульцеины А–С из *Penares schulzei* ингибировали α -глюкозидазу [13, 14], а анкоринозиды В–D из *Penares sollasi* – мембранную матриксную металлопротеиназу (MT1-MMP) [15]. В дополнение к этому пенарамиды из *Penares aff. incrustans* ингибировали связывание ω -конотоксина GVIA с кальциевыми каналами N-типа [16], а пеназины А–Е из *Penares* sp. обладали цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток HeLa и P388 [17]. Несмотря на интерес к таким веществам, структурный анализ их потенциальных предшественников, а именно индивидуальных ЖК губок рода, ранее не проводили. Были опубликованы только скрининговые исследования ЖК двух образцов *Penares tylotaster*, в которых сравнивали относительное содержание кислот по длинам цепей, по наличию/отсутствию разветвлений, двойных связей и т.д. без установления положения заместителей и двойных связей [18, 19]. Целью данной работы стал более тщательный структурный анализ ЖК губки рода *Penares*, а также сравнение характерных структурных черт некоторых обнаруженных ЖК и известных вторичных метаболитов *Penares*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фракции ЖК и их этиловых эфиров выделили из этанольного экстракта *Penares* sp. с помощью колоночной хроматографии на сефадексе и силика-

геле и разделили методом ВЭЖХ на прямой и/или обращенной фазах. Полученные фракции анализировали с помощью ГЖХ-МС (ионизация электронным ударом) с использованием сложноэфирных, пирролидиновых, 4,4-диметилксазолиновых, диметилдисульфидных и гидрированных производных ЖК. В отдельных случаях для анализа структур применяли ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопию. Была обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C_{12} до C_{28} (табл. 1), включая 12 новых соединений: (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-пентакозадиеновую (I), (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновую (II), (5Z,9Z)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновую (III), (5Z,9Z)-9-хлор-25-метил-5,9-гептакозадиеновую (IV), 6-хлор-20-метил-4-генэйкозеновую (V), 6-хлор-19-метил-4-генэйкозеновую (VI), 6-хлор-20-метил-4-докозеновую (VII), *cis*-17,18-метилентетракозановую (VIII), 16,21-диметилдокозановую (IX), 18,23-диметилтетракозановую (X), 16,18,22-триметилтрикозановую (XI) и 18,20,24-триметилпентакозановую (XII) кислоты (рис. 1). Неизвестные ранее соединения (I–XII) присутствовали в следовых количествах (<0.1%) в исследованной сумме ЖК.

Структурный анализ новых ЖК. В масс-спектрах этиловых эфиров (Ia–IVa) хлорпроизводных демоспонгиевых кислот пик молекулярного иона $[M]^+$ либо отсутствовал, либо был очень малоинтенсивным из-за легкой потери этими соединениями Cl и HCl, как в масс-спектрах высших алифатических моногалогенидов [20]. Напротив, пики ионов $[M - \text{Cl}]^+$ / $[M - \text{HCl}]^+$ / $[M - \text{Cl} - \text{EtOH}]^+$ (m/z 419/418/373, 433/432/387 и 447/446/401 для этиловых эфиров C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот соответственно) были относительно интенсивными. Регистрировались также заметные количества ионов $[M - 88 - \text{Cl}]^+$, где фрагмент с m/z 88 образовывался за счет перегруппировки Мак-Лафферти [21]. В области малых ионных масс наблюдали большие пики при m/z 55, 67, 81 (100%), 95, 109 и некоторые другие, типичные для фрагментации этиловых эфиров диеновых ЖК [22]. Кроме характерного для масс-спектров этиловых эфиров $\Delta^5,9$ -кислот пика при m/z 155 [23], в масс-спектрах соединений (Ia–IVa) наблюдали чуть более интен-

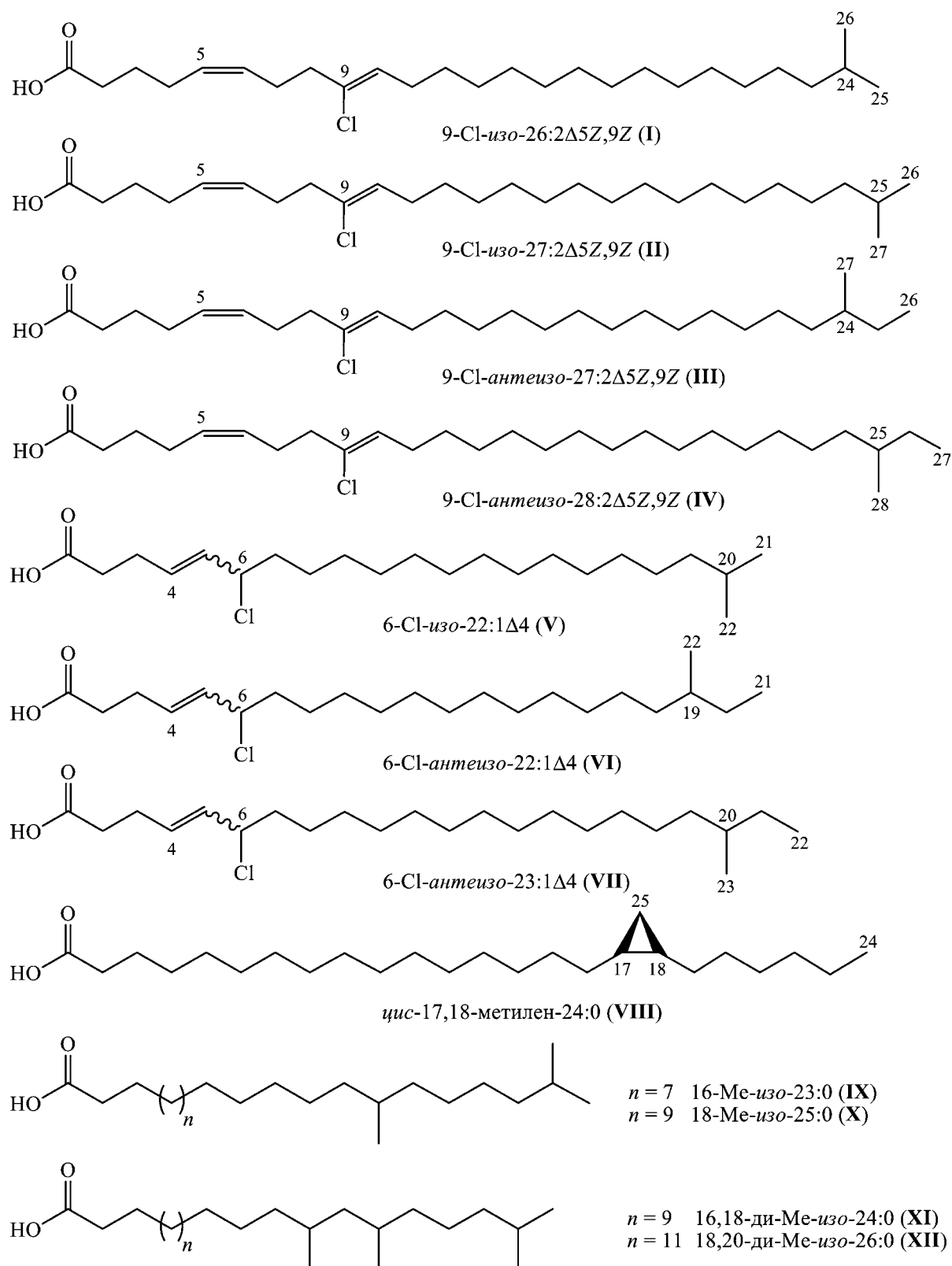
Рис. 1. Новые жирные кислоты (ЖК) из губки *Penares* sp.

Таблица 1. Жирные кислоты (ЖК) губки *Penares* sp.

ЖК	ЭДЦ	%	ЖК	ЭДЦ	%
14:0	14.00	1.4	18:0	18.00	8.4
<i>изо</i> -15:0	14.63	6.7	10-Ме-18:0	18.37	8.2
<i>антеизо</i> -15:0	14.71	2.7	11-Ме-18:0	18.39	8.2
15:0	15.00	1.6	<i>изо</i> -19:0	18.64	0.5
<i>изо</i> -16:0	15.63	1.9	<i>антеизо</i> -19:0	18.72	0.2
<i>антеизо</i> -16:0	15.72	1.6	11,12-Метилен-18:0	18.93	0.7
16:1Δ9	15.81	0.8	19:0	19.00	0.1
16:0	16.00	8.9	<i>антеизо</i> -20:0	19.72	0.9
9-Ме-16:0	16.40	3.2	20:0	20.00	0.3
10-Ме-16:0	16.44	5.1	<i>антеизо</i> -21:0	20.72	1.9
<i>изо</i> -17:0	16.64	2.0	<i>изо</i> -22:0	21.63	0.6
<i>антеизо</i> -17:0	16.72	2.1	16-Ме-22:0	22.42	1.8
9,10-Метилен-16:0	16.94	0.6	<i>изо</i> -23:0	22.63	0.7
17:0	17.00	1.1	<i>антеизо</i> -23:0	22.73	0.2
10-Ме-17:0	17.39	0.2	17-Ме-24:0	24.40	4.9
18:1Δ9	17.81	13.4	18-Ме-24:0	24.44	5.5

Состав общей фракции ЖК приведен согласно данным ГЖХ-МС-анализа их этиловых эфиров. Следовые компоненты, для которых точная процентная оценка была невозможной (<0.1%), указаны ниже (в скобках приведено значение эквивалентной длины цепи (ЭДЦ)): 12:0, 9-Ме-15:0 (15.44), 10-Ме-15:0 (15.47), *изо*-20:0 (19.63), 15-Ме-21:0 (21.43), *антеизо*-22:0 (21.72), 22:0, 14-Ме-22:0 (22.38), 16-Ме-*изо*-23:0 (22.97), 23:0, 15-Ме-23:0 (23.36), 16-Ме-23:0 (23.39), 17-Ме-23:0 (23.43), 18-Ме-23:0 (23.47), *изо*-24:0 (23.63), *антеизо*-24:0 (23.73), 24:0, 16,18-ди-Ме-*изо*-24:0 (24.53), *изо*-25:0 (24.63), *антеизо*-25:0 (24.73), *цис*-17,18-метилен-24:0 (24.94), 18-Ме-*изо*-25:0 (24.98), 25:0, 18-Ме-25:0 (25.38), 26:2Δ5Z,9Z (25.50), *изо*-26:0 (24.63), *антеизо*-26:0 (25.73), 26:0, 18-Ме-26:0 (26.37), 18,20-ди-Ме-*изо*-26:0 (26.53), *изо*-27:0 (26.63), *антеизо*-27:0 (26.73), 9-Cl-*изо*-26:2Δ5Z,9Z (27.00), 9-Cl-*изо*-27:2Δ5Z,9Z (28.00), 9-Cl-*антеизо*-27:2Δ5Z,9Z (28.11), 9-Cl-*антеизо*-28:2Δ5Z,9Z (29.12). Для 6-Cl-*изо*-22:1Δ4 (22.93), 6-Cl-*антеизо*-22:1Δ4 (23.06) и 6-Cl-*антеизо*-23:1Δ4 (24.07) величины ЭДЦ рассчитаны для пирролидиновых производных.

сивный пик при m/z 154. Двойной сигнал при m/z 154/155 сопровождался менее интенсивными сигналами двух длинноцепочечных изотопных ионов с ^{35}Cl и ^{37}Cl , тоже образованных в результате разрыва *бис*-аллильной связи $\text{CH}_2\text{-7-CH}_2\text{-8}$, но содержащих метильный конец молекулы (рис. 2а). Так, в масс-спектрах этиловых эфиров C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот наблюдали по два изотопных пика при m/z 298/300, 312/314 и 326/328 соответственно в характерном соотношении ~3 : 1. Сложение масс каждого из двух изотопных ионов со значением суммы 155 + 1 давало соответствующие молекулярные массы, например, 454/456 $[M]^+$ для соединения (Ia). Кроме того, сигналы вторичных ион-радикалов при m/z 403 ($[M-\text{HCl}-\text{CH}_3]^+$ для соединения (Ia) или $[M-\text{HCl}-\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (IIIa)) и при m/z 417 ($[M-\text{HCl}-\text{CH}_3]^+$ для соединения (IIa) или $[M-\text{HCl}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (IVa)) были более интенсивны, чем соседние сигналы гомологичных ионов, что подразумевало наличие *изо*- или *антеизо*-разветвлений в соответствующих структурах (см., например, рис. 2а).

Соединения (Ia–IVa) были превращены в диметилдисульфидные производные, при этом хлорзамещенная двойная связь не присоединяла диметилдисульфид. В масс-спектрах полученных аддуктов наблюдали значительный пик иона $[M-\text{Cl}]^+$ ($[M]^+$ не регистрировался) и интенсивные пики при m/z 129 (100%) и 175, указывающие на наличие двойной связи в положении 5 исходных соединений. Последние сигналы сопровождалась гораздо менее интенсивными сигналами изотопных ионов, также образующихся при разрыве связи $\text{C5-}/\text{-C6}$, например,

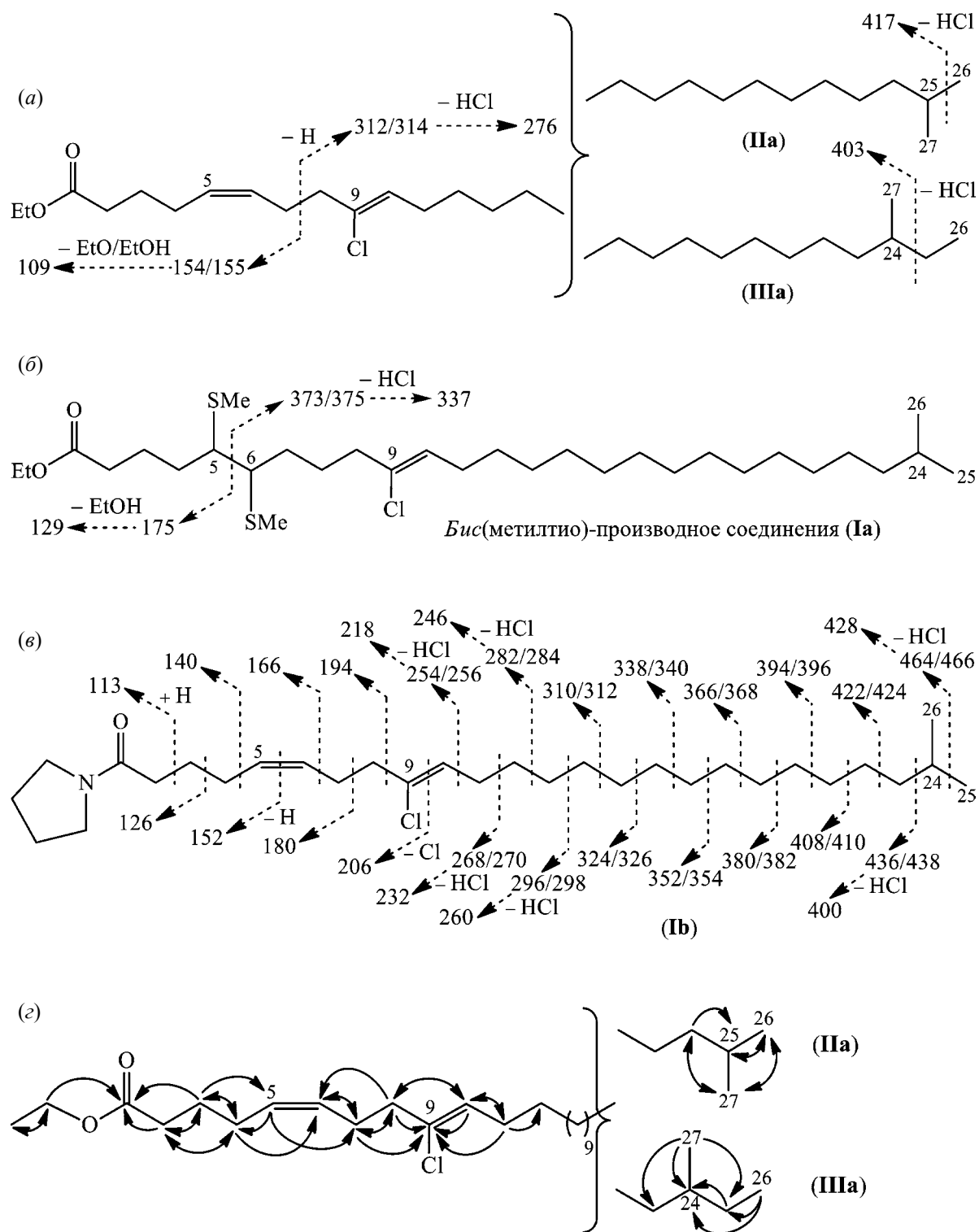


Рис. 2. (а) – Масс-спектрометрическая фрагментация изомерных этиловых эфиров (IIa) и (IIIa) (пик молекулярного иона при m/z 468 $[M]^+$ с ^{35}Cl был малоинтенсивен, минорный пик $[M]^+$ с ^{37}Cl не регистрировался); (б) – масс-спектрометрическая фрагментация бис(метилтио)-производного этилового эфира (Ia) ($513 [M - \text{Cl}]^+$); (в) – масс-спектрометрическая фрагментация пирролидида (Ib) ($479/481 [M]^+$); для упрощения схемы не показаны менее многочисленные ионы, соответствующие элиминированию HCl от изотопных фрагментов при m/z 310/312–422/424); (г) – ключевые HMBC-корреляции для соединений (IIa) и (IIIa).

ионов с m/z 373/375 при фрагментации бис(метилтио)-производного этилового эфира (**Ia**) (рис. 2б). Сложение массы изотопных ионов при m/z 373/375 с массой иона при m/z 175 позволяло вычислить значение 548/550 $[M]^+$ для диметилдисульфидного производного соединения (**Ia**).

Масс-спектры пирролидидов (**Ib–IVb**) и 4,4-диметилксазолинового производного кислоты (**I**) содержали заметные пики изотопных молекулярных ионов (m/z 479/481, 493/495 и 507/509 с $^{35}\text{C}1/^{37}\text{C}1$ для производных C_{26} -, C_{27} - и C_{28} -кислот соответственно) наряду с чуть более интенсивными пиками ионов $[M - \text{Cl}]^+$. Большой пик иона при m/z 180, образующегося в результате расщепления по центру бис-метилена-разделенной системы двух двойных связей (рис. 2в), однозначно указывал на присутствие $\Delta 5,9$ -фрагмента во всех анализированных *N*-содержащих производных [23, 24]. Положения метильных разветвлений в кислотах (**I–IV**) были определены соответственно пробелам во фрагментации их пирролидидов на основании сформулированного ранее правила [25]. Например, масс-спектры пирролидидов (**Ib**) и (**IIIb**) с метильной группой в положении 24 содержали пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 464/466 (соответствует иону $[M - \text{CH}_3]^+$ для соединения (**Ib**) и иону $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (**IIIb**)) и 436/438 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$ для соединения (**Ib**) и $[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для соединения (**IIIb**)). В результате фрагментации пирролидида (**IIb**) с метильной группой при СН-25 появлялся пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 478/480 ($[M - \text{CH}_3]^+$) и 450/452 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$). Сигнал вторичного ион-радикала при m/z 478/480 $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ в масс-спектре пирролидида (**IVa**) был также намного более интенсивен, чем соседние сигналы гомологичных ионов, что указывало на наличие метильной группы при СН-25. К сожалению, в масс-спектрах пирролидидов последовательная фрагментация обрывалась после СН₂-8 и возобновлялась на СН-10, как показано для соединения (**Ib**) (рис. 2в). То же наблюдали в масс-спектре 4,4-диметилксазолинового производного кислоты (**I**) (478/479/480/481, $[M - 1]^+/[M]^+$), изомерного пирролидида (**Ib**). Таким образом, масс-

спектрометрические данные свидетельствовали о том, что атом хлора в соединениях (**I–IV**) мог находиться либо при С9, либо при С10.

Гидрирование производных кислот (**I–IV**) над катализатором Адамса сопровождалось дегалогенированием, в результате чего эти вещества превращались в известные насыщенные соединения. Так, пирролидид (**Ib**) подвергался дегалогенированию до соответствующего производного 24-метилпентакозановой кислоты, чей масс-спектр содержал диагностический пробел (28 а.е.м.) между пиками при m/z 406 и 434 [26]. Этиловые эфиры (**IIa–IVa**) при гидрировании трансформировались в этиловые эфиры 25-метилгексакозановой (эквивалентная длина цепи (ЭДЦ) 26.63), 24-метилгексакозановой (ЭДЦ 26.72) и 25-метилгептакозановой (ЭДЦ 27.72) кислот соответственно (согласно данным ГЖХ-МС-анализа). Элиминирование С1 при гидрировании могло указывать на его винильное (как в соединениях (**I–IV**)) или аллильное (как в соединениях (**V–VII**)) положения, т.к. дегалогенирование насыщенных хлорированных жирных кислот в использованных нами условиях гидрирования не происходило.

С использованием ВЭЖХ на прямой и обращенной фазах нам удалось получить смесь близких по структуре изомеров (**IIa**) и (**IIIa**) (39 и 31% во фракции соответственно), которые не разделялись методами препаративной хроматографии. С помощью экспериментов ^1H , ^1H -COSY, HMBC и HSQC было подтверждено наличие 5,9-диенового фрагмента и установлено положение атома хлора при С9 в данных соединениях. Так, спектр ^1H , ^1H -COSY показал наличие линейных спиновых систем протонов от СН₂-2 (δ_{H} 2.30, т, J 7.5) до СН₂-8 (δ_{H} 2.325, т, J 7.3) и от СН-10 (δ_{H} 5.44, т, J 7.0) до СН₂-пула (δ_{H} 1.20–1.35, м). Спектр HMBC содержал соответствующие корреляции, показанные на рис. 2г. Значение константы спин-спиновой взаимодействия $J_{5,6}$ 10.9 Гц, установленное с помощью селективного гомоядерного декаплирования аллильных протонов [27], свидетельствовало о *Z*-конфигурации двойной связи при С5. *Z*-Конфигурация двойной связи при С9 была определена на основании сравнения наших спектров

^1H - и ^{13}C -ЯМР с соответствующими литературными спектрами известных винильно хлорированных *Z/E*-изомеров [28], а именно на основании присутствия характерных резонансов CH -10 (δ_{H} 5.44, т, J 7.0), CH_2 -11 (δ_{H} 2.145, м) и CH_2 -8 (δ_{C} 39.4). Кроме того, спектры ЯМР показывали сигналы двух эквивалентных терминальных метильных (δ_{H} 0.86, д, J 6.7; δ_{C} 22.6), одной метиновой (δ_{H} 1.515, м; δ_{C} 28.0) и одной метиленовой (δ_{H} 1.15, м; δ_{C} 39.0) групп, протоны которых образовывали спиновую систему *изо*-структуры компонента (**IIa**) согласно корреляциям ^1H , ^1H -COSY и HMBC. С помощью подобных корреляций была также подтверждена *анте*-*изо*-структура компонента (**IIIa**), которому принадлежали характеристичные сигналы двух метильных групп (δ_{H} 0.84, д, J 6.2; δ_{C} 19.2 и δ_{H} 0.85, т, J 7.1; δ_{C} 11.3) [29, 30].

Значения химических сдвигов и мультиплетности сигналов олефиновых протонов в спектрах ^1H -ЯМР ВЭЖХ-фракций, обогащенных кислотами (**I**) и (**IV**), были аналогичны соответствующим характеристикам протонов двойных связей этиловых эфиров кислот (**II**) и (**III**). Это в совокупности с данными масс-спектрометрических фрагментаций и химических трансформаций указывало на то, что соединения (**I–IV**) содержали одинаковую *5Z,9Z*-диеновую систему связей с атомом хлора при C9. Такой вывод подтверждали и значения ЭДЦ, равные 27.00 и 28.00 для *изо*-гомологов (**I**) и (**II**) соответственно и 28.11 и 29.12 для *анте*-*изо*-гомологов (**III**) и (**IV**) соответственно.

Известно, что аллилгалогениды легче теряют галоген, чем винилгалогениды. Эта закономерность проявлялась в условиях масс-спектрометрической фрагментации пирролидидов аллильно хлорированных кислот (**V–VII**), у которых элиминирование атома хлора происходило легче, чем у пирролидидов винильно хлорированных кислот (**I–IV**). Так, в масс-спектрах пирролидидов (**Vb–VIIb**) основным сигналом был пик иона $[M - \text{Cl}]^+$ (m/z 390, 390 и 404 соответственно), интенсивность которого в масс-спектрах пирролидидов (**Ib–IVb**) составляла только ~3.5%. В области молекулярного иона в масс-

спектрах соединений (**Vb–VIIb**) присутствовали кластеры малоинтенсивных пиков изотопных ионов $[M - 1]^+/[M]^+$ (m/z 424/425/426/427, 424/425/426/427 и 438/439/440/441 соответственно). В области малых ионных масс после пика при m/z 126 наблюдали гораздо менее интенсивные пики при m/z 138/139 и 152, что было признаком наличия двойной связи при C4 (рис. 3а). В то время как четкий сигнал аллильного разрыва при m/z 166 был характерен для масс-спектров пирролидидов известных Δ 4-кислот [26], масс-спектры пирролидидов Δ 4-кислот (**Vb–VIIb**) характеризовались сигналом повышенной интенсивности близкого по массе иона с m/z 165. Очевидно, этот ион формировался в результате отрыва атома хлора от истинных продуктов аллильного разрыва – изотопных ионов с m/z 200 и 202, которые, несмотря на легкость потери Cl при фрагментации, все же регистрировались в масс-спектре как менее интенсивные пики в соотношении 3 : 1. Такого рода характеристичное расщепление, происходящее после замещенного аллильного углерода и дающее значимые диагностические сигналы, мы наблюдали ранее при масс-спектрометрической фрагментации метиловых эфиров некоторых ЖК с аллильными гидроксильными или *S*-метиловыми группами [31]. Пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 374 (соответствует иону $[M - \text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**Vb**) и иону $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**VIIb**)) и 346 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**Vb**) и $[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$ для соединения (**VIIb**)) указывал на наличие в кислотах (**V**) и (**VII**) метильной группы при C20. Это подтверждалось повышенной интенсивностью пиков вторичных ион-радикалов при m/z 410/412, которые представляли собой фрагмент $[M - \text{CH}_3]^+$ для *изо*-метил-разветвленного соединения (**Vb**) и фрагмент $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ для *анте*-*изо*-метил-разветвленного соединения (**VIIb**). Пробел в 28 а.е.м. между пиками при m/z 360 ($[M - \text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$) и 332 ($[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{HCl}]^+$) и пик повышенной интенсивности вторичного ион-радикала при m/z 396/398 $[M - \text{CH}_2\text{CH}_3]^+$ в масс-спектре *анте*-*изо*-метил-разветвленного пирролидида (**Vlb**) были признаками наличия метильной группы

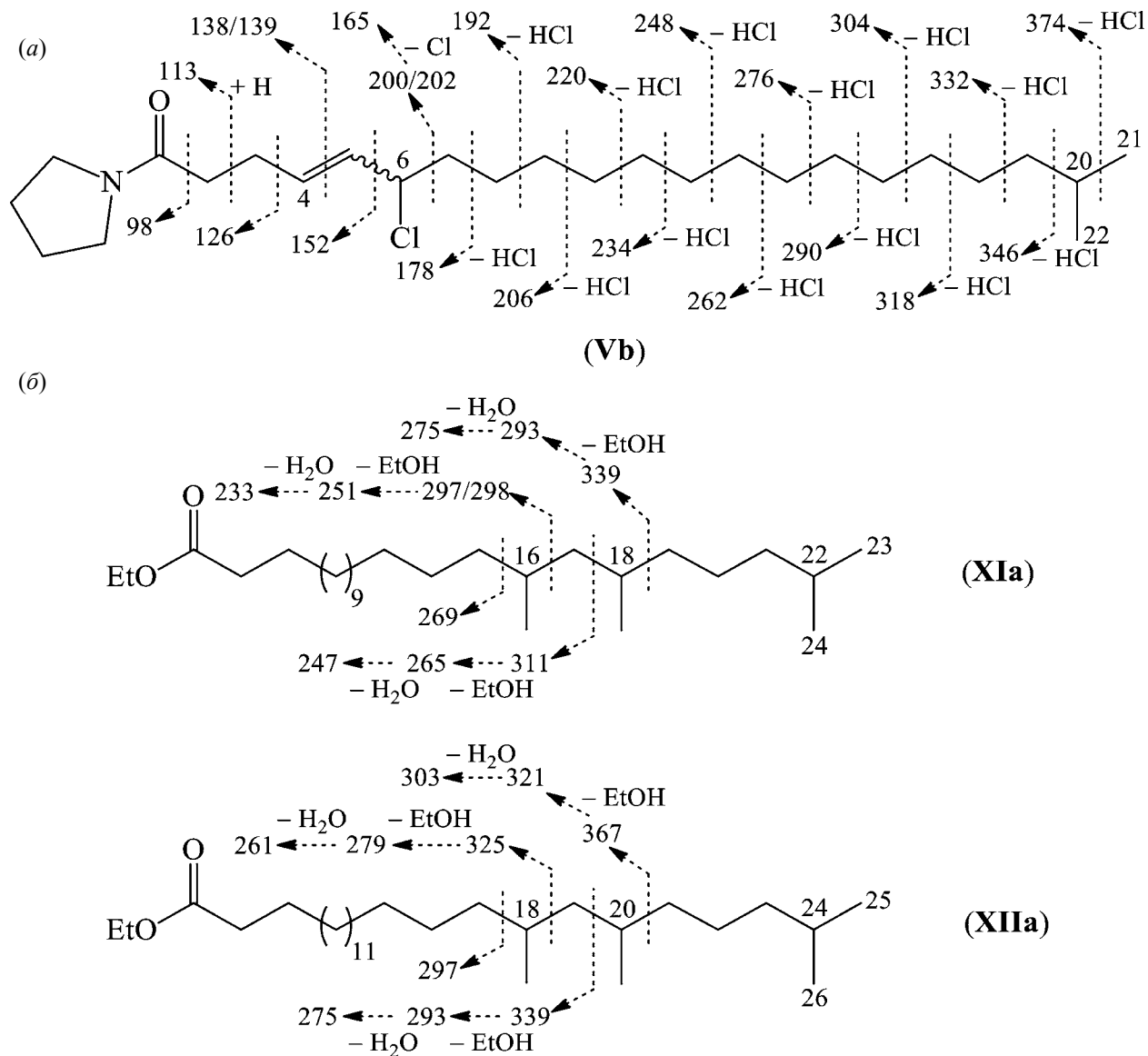


Рис. 3. (а) – Масс-спектрометрическая фрагментация пирролидида (Vb) (424/425/426/427 $[M - 1]^+/[M]^+$); (б) – масс-спектрометрическая фрагментация этиловых эфиров (XIa) и (XIIa).

при C19. Гидрирование соединений (Vb–VIIb) над катализатором Адамса ожидаемо протекало с дегалогенированием, что приводило к образованию пирролидидов известных 20-метилгенэйкозановой, 19-метилгенэйкозановой и 20-метилдокозановой кислот, также обнаруженных нами в *Penares* sp. К сожалению, низкое содержание аллильно хлорированных кислот (V–VII) не позволило получить спектр ¹H-ЯМР, который был бы достаточно информативен для установления конфигурации их двойной связи.

Как и в масс-спектре этилового эфира моноеновой C₂₅-кислоты, в масс-спектре этилового эфира циклопропан-содержащей кислоты (VIII) присутствовали пики ионов с m/z 408 $[M]^+$, 362 $[M - EtOH]^+$ и др. Однако неспособность этилового эфира соединения (VIII) присоединять диметилдисульфид и значение его ЭДЦ (24.94) подразумевали наличие циклопропанового кольца при (n - 7)- и (n - 8)-атомах углерода (n – номер терминального атома углерода линейной алифатической цепи), как в этиловых

эфирах гомологичных кислот 9,10-метилен-16:0 (ЭДЦ 16.94) и 11,12-метилен-18:0 (ЭДЦ 18.93) из *Penares* sp. (табл. 1). К масс-спектрометрическим признакам пирролидидов высших циклопропан-содержащих гомологов (C_{19} и более) таких кислот относятся интенсивный пик с нечетным значением m/z , образующийся в результате β -разрыва после циклопропанового кольца, и интервал в 12 а.е.м. между фрагментами, показывающими положение цикла [32, 33]. Соответственно, масс-спектр пирролидида кислоты (VIII) (m/z 433 $[M]^+$) демонстрировал интенсивный пик при m/z 363 (ион β -разрыва) и характерный интервал в 12 а.е.м. между пиками при m/z 322 (ион, содержащий C_{17} -фрагмент ЖК) и 334 (ион с C_{18} -фрагментом ЖК), что подтверждало наличие циклопропанового кольца в 17,18-положении. В спектре $^1H, ^1H$ -COSY протоны с $\delta_H -0.33$ (ддд, J4.3, 5.3, 5.3, 1H, H-25a), 0.56 (ддд, J4.3, 8.4, 8.4, 1H, H-25b) и 0.65 (м, 2H, H-17, H-18) кислоты (VIII) были связаны корреляциями в структуру трехчленного цикла, при этом значения химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия сигналов данных протонов соответствовали *цис*-ориентации кольца [33, 34]. Следует отметить, что масс-спектры изученных до сих пор 4,4-диметилноксазолиновых производных циклопропан-содержащих ЖК считаются почти неотличимыми от масс-спектров 4,4-диметилноксазолиновых производных, соответствующих им по молекулярной массе неразветвленных моноеновых ЖК из-за вероятной перегруппировки циклопропанов в моноены при фрагментации [35, 36]. Согласно этой закономерности, масс-спектр 4,4-диметилноксазолина кислоты (VIII) должен быть подобен масс-спектру 4,4-диметилноксазолина кислоты 25:1 Δ 17. Тем не менее фрагментация полученного нами 4,4-диметилноксазолина кислоты (VIII) (m/z 433 $[M]^+$) напоминала фрагментацию соответствующего производного кислоты 25:1 Δ 18, т.к. приводила к появлению интервала в 12 а.е.м. между пиками при m/z 322 (C_{17} -фрагмент) и 334 (C_{18} -фрагмент). При этом данные пики были даже чуть больше предшествующего пика при m/z 308, что не соответствовало относительной интенсивности

сигналов при фрагментации вблизи изолированной двойной связи. Таким образом, в полученном нами масс-спектре 4,4-диметилноксазолинового производного кислоты (VIII) характеристичные сигналы, между которыми существовал интервал в 12 а.е.м., были смещены и изменили свою интенсивность вопреки закономерности, ранее наблюдавшейся в масс-спектрах 4,4-диметилноксазолиновых производных более коротких циклопропан-содержащих ЖК. Аналогичные изменения диагностических сигналов с ростом длины алифатической цепи мы наблюдали ранее в масс-спектрах пирролидидов ряда гомологичных циклопропан-содержащих ЖК, которые так же, как и соединение (VIII), были формальными производными моноенов ($n - 7$)-семейства [33].

Этиловые эфиры двух насыщенных гомологичных *изо*-метил-разветвленных кислот (IX) (ЭДЦ 22.97) и (X) (ЭДЦ 24.98) с дополнительной метильной группой в ($n - 7$)-положении генерировали характеристичные ионы, образующиеся путем разрывов связей в α -положениях по отношению к ($n - 7$)-углероду, как было описано ранее для масс-спектрометрической фрагментации сложных эфиров ЖК с метильной группой в середине цепи [37]. Так, в отличие от этилового эфира стандартной неразветвленной кислоты 24:0 (m/z 396 $[M]^+$), этиловый эфир соединения (IX) (m/z 396 $[M]^+$) в результате α -разрывов продуцировал ионы при m/z 269 и 297 приблизительно в равном количестве, а также фрагменты при m/z 251 (потеря ионом при m/z 297 молекулы EtOH) и 233 (потеря ионом при m/z 297 молекул EtOH и H_2O). Этиловый эфир соединения (X) (m/z 424 $[M]^+$) генерировал большие количества ионов при m/z 325 и 297 по сравнению с соответствующим производным неразветвленной кислоты 26:0 (m/z 424 $[M]^+$), а также ионы при m/z 279 (потеря ионом при m/z 325 молекулы EtOH) и 261 (потеря ионом при m/z 325 молекул EtOH и H_2O). При этом сигналы фрагментов, указывающих на наличие концевых *изо*-структур в этиловых эфирах кислот (IX) и (X), были малоинтенсивными. Положения всех метильных разветвлений были однозначно определены на основании присутствия диагностических пробелов

в 28 а.е.м. между пиками при m/z 294 и 322 (потеря CH_2 с метильной группой) и пиками при m/z 378 и 406 (потеря CH_2 с метильной группой) в масс-спектре пирролидида 16,21-диметил-разветвленной кислоты (**IX**) (m/z 421 $[M]^+$), а также аналогичных пробелов между пиками при m/z 322 и 350 (потеря CH_2 с CH_3) и m/z 406 и 434 (потеря CH_2 с CH_3) в масс-спектре пирролидида 18,23-диметил-разветвленной кислоты (**X**) (m/z 449 $[M]^+$).

изо-Метил-разветвленные гомологичные кислоты (**XI**) (ЭДЦ 24.53) и (**XII**) (ЭДЦ 26.53) имели дополнительные метильные группы в положениях ($n - 6$) и ($n - 8$). Фрагментарные ионы, дававшие сигналы повышенной интенсивности в масс-спектрах этиловых эфиров (**XIa**) (m/z 424 $[M]^+$) и (**XIIa**) (m/z 452 $[M]^+$) по сравнению с масс-спектрами неразветвленных стандартов с аналогичными молекулярными массами, а также характеристичные ионы, отсутствовавшие в масс-спектрах стандартов, показаны на рис. 3б. Можно видеть, что фрагментация вблизи $\text{C}16$ в соединении (**XIa**) и $\text{C}18$ в соединении (**XIIa**) была аналогична фрагментации этиловых эфиров кислот (**IX**) и (**X**) соответственно. Обнаружение пробелов в 28 а.е.м. между пиками при m/z 294 и 322, 336 и 364, 406 и 434 в масс-спектре пирролидида кислоты (**XI**) (m/z 449 $[M]^+$) указывало на наличие метильных групп при $\text{C}16$, $\text{C}18$ и $\text{C}22$. Пробелы между пиками при m/z 322 и 350, 364 и 392, 434 и 462 в масс-спектре пирролидида кислоты (**XII**) (m/z 477 $[M]^+$) соответствовали положениям метильных разветвлений при $\text{C}18$, $\text{C}20$ и $\text{C}24$.

Особенности жирных кислот *Penares* sp. В живых тканях основная часть ЖК присутствует в связанной форме (как компоненты других липидов), а свободные или неэтерифицированные ЖК, обладающие вредоносными свойствами, являются минорными соединениями. Однако эти соединения легко генерируются из более сложных липидов при хранении (даже при -20°C), размораживании и экстракции биологических объектов в результате функционирования липаз [38], поэтому ЖК, выделенные из экстракта губки *Penares* sp., мы рассматриваем как продукты деятельности таких фер-

ментов. При этом этиловые эфиры ЖК являются, по нашему опыту, обычными составляющими этанольных экстрактов губок.

Смесь ЖК из *Penares* sp. (табл. 1) характеризуется высоким содержанием компонентов с разветвленными цепями (59.1%) – большим, чем у изученной ранее *Penares tylostaster* (38.1%) [19]. Разветвленные C_{15} – C_{28} -кислоты, обнаруженные в *Penares* sp., имеют моно-, ди- и три- метилированные цепи. Среди абсолютно доминирующих монометилированных ЖК присутствуют *изо/антеизо*-компоненты (12.4/9.6%) и компоненты со срединной метильной группой (37.1%), находящейся в положениях ($n - 5$), ($n - 8$), ($n - 6$) и ($n - 7$) алифатической цепи (в порядке увеличения содержания). Основные монометилированные кислоты имеют нечетное количество углеродных атомов: C_{19} (17.1%, преобладают изомерные 10-*Me*-18:0 и 11-*Me*-18:0), C_{17} (12.4%), C_{25} (10.4%) и C_{15} (9.4%). Ди- и триметилированные ЖК – следовые компоненты. Источником метил-разветвленных, а также циклопропан-содержащих ЖК губок считаются бактерии, которые служат пищей или населяют данное беспозвоночное [3, 39–41]. Некоторые губки, как “микробиальные ферментёры”, могут содержать такое большое количество бактерий на грамм массы, что их даже называли “бактериогубками” [42]. При этом ЖК бактерий и других ассоциированных микробов могут как в неизменном виде присутствовать в жирнокислотных фракциях губок, так и быть экзогенными предшественниками более длинных ЖК этих беспозвоночных (см. обзор Bergé et al. [3] и ссылки в нем). Следовательно, бактериальные кислоты 9,10-метил-16:0 или 11,12-метил-18:0, обнаруженные в минорных количествах в *Penares* sp., могли выступать в качестве субстрата элонгации при образовании соединения (**VIII**). Предшественниками диметилированных (**IX**, **X**) и триметилированных (**XI**, **XII**) соединений также могли быть более короткие гомологи бактериального происхождения, такие как кислоты 8-*Me*-*изо*-15:0 и 10,12-*ди*-*Me*-*изо*-18:0 соответственно, обнаруженные ранее в донных осадках [43]. Нужно заметить, что метильные разветвления характерны для алифатических цепей многих биологически актив-

ных липидов и липидоподобных соединений, выделенных из губок рода *Penares*, включая пенарезидины А и В (*изо*- и *антеизо*-разветвления) [11], пеназетидин А (метильная группа в ($n-7$)-положении) [12], пенасульфат А (метильная группа в положении ($n-7$)) [13], шульцеин А (метильная группа в положении ($n-9$)) [14], пенарамиды (*изо*-, *антеизо*-разветвления или метильная группа в положении ($n-7$)) [16], пеназины С–Е (метильные группы в положениях ($n-8$), ($n-9$) или ($n-10$)) [17] и анкоринозид С (метильная группа в середине гликозилированной цепи) [15]. Такие структурные черты могут не только подразумевать вовлеченность бактерий в биосинтез этих соединений, но и наводить на мысль о значительном количестве этих микроорганизмов в губках рода *Penares*.

Насыщенные ЖК линейного строения представлены в губке *Penares* sp. (табл. 1) C_{12} -, C_{14} – C_{20} - и C_{22} – C_{26} -компонентами (36.0% при доминировании кислот 16:0 (8.9%) и 18:0 (8.4%)). Линейные моноены (14.2%) составляют кислоты 18:1 Δ 9 (13.4%) и 16:1 Δ 9 (0.8%). Демоспонгиевая кислота с неразветвленным скелетом, 26:2 Δ 5 Z ,9 Z , присутствует в следовых количествах. Указанные насыщенные, моноеновые и диеновая ЖК типичны для многих губок [2, 5]. Остальные ненасыщенные ЖК, обнаруженные в *Penares* sp., включают неизвестные ранее хлорированные кислоты с метильным разветвлением в конце алифатической

цепи: моноены 6-Cl-*изо*-22:1 Δ 4 (V), 6-Cl-*антеизо*-22:1 Δ 4 (VI), 6-Cl-*антеизо*-23 (VII), а также диены 9-Cl-*изо*-26:2 Δ 5 Z ,9 Z (I), 9-Cl-*изо*-27:2 Δ 5 Z ,9 Z (II), 9-Cl-*антеизо*-27:2 Δ 5 Z ,9 Z (III) и 9-Cl-*антеизо*-28:2 Δ 5 Z ,9 Z (IV). Таким образом, демоспонгиевые кислоты, типичные для губок, оказались почти полностью замещены своими хлорпроизводными.

Хлорирование природных жирных кислот происходит при помощи галогенирующих ферментов, включая хлоропероксидазы и хлорирующие галогеназы [44]. В результате активности таких ферментов 5 Z ,9 Z -диеновые кислоты *Penares* sp. могли превратиться в соответствующие 9-хлор-кислоты (I–IV), являющиеся первыми представителями хлорированных демоспонгиевых кислот. Цитотоксичные пеназин А (XIII) и бис-метилен-разделенными *цис*-двойными связями и его хлорпроизводное, пеназин В (XIV) из японского образца губки рода *Penares* [17], могут рассматриваться как субстрат и продукт аналогичного хлорирования (рис. 4). Признаком функционирования галогенирующего фермента, приводящего к выработке хлорноватистой кислоты HClO, можно также считать одновременное присутствие в изученном нами образце *Penares* sp. тритерпеноида (XV) и его хлоргидринового производного (XVI) (рис. 4), структуры которых были установлены ранее [9]. Вероятно, катализируемое соответствующим фермен-

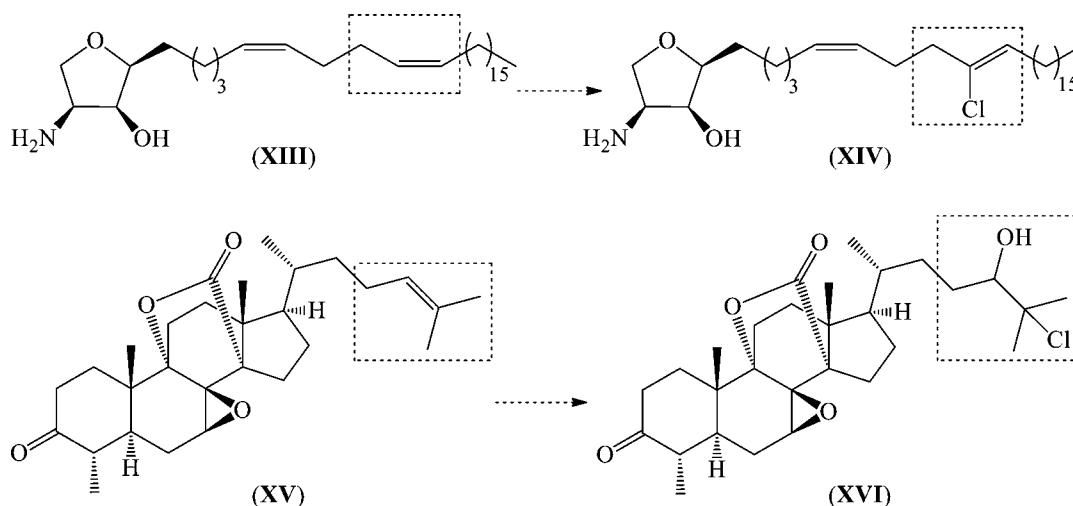


Рис. 4. Гипотетические пути образования хлорированных вторичных метаболитов (XIV) и (XVI), полученных из губок рода *Penares*.

том присоединение галогена к С6 Δ5-кислот, обычных для многих морских губок [2, 5], могло вызвать сдвиг двойной связи по аналогии с липоксигеназным гидропероксидированием и привести к образованию аллильно хлорированных Δ4-кислот (V–VII).

Галогенирующие ферменты в клетках губок не обнаруживали, зато гены галогеназ (в частности, по некоторым признакам принадлежащих ряду бактерий) были найдены в микробиальных метагеномах, полученных из губок с высоким содержанием микроорганизмов [45]. Судя по доле компонентов бактериального происхождения в изученной смеси ЖК из *Penares* sp., содержание бактерий в данной губке было действительно велико, что могло обеспечить галогенирование ЖК и других метаболитов. Не исключено также, что за данное галогенирование могли быть ответственны не только ассоциированные с губкой бактерии (включая цианобактерии или сине-зеленые водоросли), но и грибы [46]. В случае *Penares* sp. микробиальные хлорирующие ферменты, очевидно, “предпочитали” в качестве субстрата алифатические цепи с двойными связями, что привело к образованию кислот (I–VII). При этом активность бромлирующих ферментов также имела место в изученном нами образце *Penares* sp., т.к. из него, кроме тритерпеноидов [9], были прежде выделены индольные алкалоиды с бромом в ароматическом кольце [10]. Очевидно, несмотря на существование механизма бромирования, микробы *Penares* sp. использовали хлорирование, а не бромирование демоспонгиевых кислот в отличие от микроорганизмов, ассоциированных с другими губками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ^1H -ЯМР, ^1H , ^1H -COSY, HSQC и HMBC (CDCl_3) регистрировали на спектрометрах Avance III HD 500 (Bruker, Германия) и Avance III 700 (Bruker BioSpin, Германия) при 500.13 и 700.13 МГц соответственно с тетраметилсилианом в качестве внутреннего стандарта.

ГЖХ-МС-анализ выполняли на хромато-масс-спектрометре HP6890 GC System (Hewlett-Packard, США) с капиллярной колонкой HP-5MS (30.0 м × 0.25 мм; J&W Scientific, США), гелием в качестве

газа-носителя и ионизирующим потенциалом 70 eV. В большинстве случаев использовали программу 100°C (1 мин) – 10°C/мин – 280°C (30 мин) при температуре инжектора 270°C, однако для малолетучих пирролидидов длинноцепочечных ЖК применяли программу 200°C (1 мин) – 30°C/мин – 280°C (45 мин) при температуре инжектора 300°C. ВЭЖХ выполняли на жидкостных хроматографах: 1) Du Pont Series 8800 Instrument (DuPont, США) с рефрактометром RIDK-102 (Laboratni Pstroje, Чехословакия) и колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4 × 150 мм; Agilent Technologies, США) в 85%-ном этаноле; 2) Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, США) с дифференциальным рефрактометром RID-G1362A и колонками ULTRASPHERA™ Si (10 × 250 мм; Beckman Instruments, США) в смеси петролейного эфира и этилацетата (100 : 1) и YMC-Pack ODS-A (10 × 250 мм; YMC Co., Япония) в этаноле.

Колоночную хроматографию проводили на сефадексе LH-20 (Sigma Chemical Co., США) и силикагеле (50/100 или 50/160 мкм; Сорбполимер, Россия). Для качественного анализа использовали тонкослойную хроматографию на пластинках Sorbfil (Сорбполимер, Россия) с закрепленным на фольге слоем силикагеля СТХ-1А, пятна веществ проявляли опрыскиванием смесью EtOH–H₂SO₄ (1 : 1).

Биологический материал. Образец губки рода *Penares* был собран с помощью драгирования с глубины 95 м в Южно-Китайском море (16°07' N, 114°47' E) в январе 2005 г. в течение 30-го рейса НИС “Академик Опарин” во Вьетнам. Губка была идентифицирована В.Б. Красохиним (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия). Образец (PIBOS O30-271) находится на хранении в коллекции Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Экстракция губки и выделение фракций ЖК и их этиловых эфиров. Свежесобранную губку *Penares* sp. (400 г) замораживали и хранили при –20°C. Затем губку измельчали и экстрагировали этанолом при комнатной температуре. Этанольный экстракт концентрировали в вакууме до водного остатка, который экстрагировали гексаном (3 × 250 мл). Гексановый

экстракт (2.92 г), содержащий неполярные и мало-полярные соединения губки, разделяли на фракции на колонке с сефадексом LH-20 в CHCl_3 -EtOH (1 : 1), в результате получили фракцию (346.4 мг), содержащую близкие по размеру молекулы ЖК и их этиловых эфиров. Поскольку данные соединения различаются по полярности, для их разделения полученную фракцию хроматографировали на колонке с силикагелем. Сумму веществ (26.9 мг), которая элюировалась в гексане-этилацетате (70 : 1) с силикагеля, разделяли с помощью ВЭЖХ на прямой (петролейный эфир-этилацетат, 100 : 1) и обращенной (этанол) фазах. Получили 1.5 мг смеси этиловых эфиров (IIa) и (IIIa). Сумму веществ (147.9 мг), которая элюировалась в гексане-этилацетате (5 : 1 → 2 : 1) с силикагеля, разделили с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (85%-ный этанол) и получили фракции ЖК.

Этиловые эфиры (IIa) и (IIIa) (39 и 31% в ВЭЖХ-фракции соответственно). Бесцветное маслообразное вещество. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 700 МГц; δ , м.д. (*J*, Гц)): 5.44 (т, *J* 7.0, H-10), 5.37 (м, H-5), 5.36 (м, H-6), 4.13 (кв, *J* 7.1, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 2.325 (т, *J* 7.3, CH_2 -8), 2.30 (т, *J* 7.5, CH_2 -2), 2.27 (м, CH_2 -7), 2.145 (м, CH_2 -11), 2.09 (м, CH_2 -4), 1.69 (м, CH_2 -3), 1.515 (м, H-25, (IIa)), 1.35–1.20 (м, CH_2 -пул), 1.32 (м, H-25b, (IIIa)), 1.30 (м, H-24, (IIIa)), 1.26 (м, H-23b, (IIIa)), 1.255 (т, *J* 7.1, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 1.15 (м, CH_2 -24, (IIa)), 1.12 (м, H-25a, (IIIa)), 1.08 (м, H-23a, (IIIa)), 0.86 (д, *J* 6.7, CH_3 -27, 26, (IIa)), 0.85 (т, *J* 7.1, CH_3 -26, (IIIa)), 0.84 (д, *J* 6.2, CH_3 -27, (IIIa)). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3 ; значения δ , м.д., получены через C/H-корреляции в спектрах HSQC и HMBC): 173.8 (C-1), 134.1 (C-9), 129.6 (CH-5), 129.0 (CH-6), 126.05 (CH-10), 60.2 ($-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 39.4 (CH_2 -8), 39.0 (CH_2 -24, (IIa)), 36.6 (CH_2 -23, (IIIa)), 34.4 (CH-24, (IIIa)), 33.7 (CH_2 -2), 30.0–28.5 (CH_2 -пул), 29.4 (CH_2 -25, (IIIa)), 28.65 (CH_2 -12), 28.5 (CH_2 -11), 28.0 (CH-25, (IIa)), 26.6 (CH_2 -4), 25.25 (CH_2 -7), 24.85 (CH_2 -3), 22.6 (CH_3 -26, 27, (IIa)), 19.2 (CH_3 -27, (IIIa)), 14.2 ($-\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$), 11.3 (CH_3 -26, (IIIa)). Масс-спектр этилового эфира (5*Z*,9*Z*)-9-хлор-25-метил-5,9-гексакозадиеновой кислоты (IIa) (ЭУ, 70 эВ), *m/z* ($I_{\text{отн}}$, %): 468 [M]⁺ (0.04), 432/433 [$M - \text{HCl}/M - \text{Cl}$]⁺ (16/14), 422/424 [$M - \text{EtOH}$]⁺ (2/0.7),

417 [$M - \text{HCl} - \text{CH}_3$]⁺ (0.7), 405/407 [$M - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (0.7/0.2), 387 [$M - \text{Cl} - \text{EtOH}$]⁺ (16), 369 [$M - \text{HCl} - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (5), 345 [$M - 88 - \text{Cl}$]⁺ (6), 312/314 (6/2), 276 (3), 154/155 (51/45), 109 (61), 95 (28), 88 (24), 81 (100), 67 (54), 55/57 (36/34). Масс-спектр этилового эфира (5*Z*,9*Z*)-9-хлор-24-метил-5,9-гексакозадиеновой кислоты (IIIa) (ЭУ, 70 эВ), *m/z* ($I_{\text{отн}}$, %): 468 [M]⁺ (0.02), 432/433 [$M - \text{HCl}/M - \text{Cl}$]⁺ (16/14), 422/424 [$M - \text{EtOH}$]⁺ (2/0.7), 405/407 [$M - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (0.7/0.2), 403 [$M - \text{HCl} - \text{CH}_3$]⁺ (0.8), 387 [$M - \text{Cl} - \text{EtOH}$]⁺ (16), 369 [$M - \text{HCl} - \text{EtO} - \text{H}_2\text{O}$]⁺ (6), 345 [$M - 88 - \text{Cl}$]⁺ (6), 312/314 (5/1.7), 276 (4), 154/155 (52/44), 109 (61), 95 (29), 88 (24), 81 (100), 67 (56), 55/57 (39/49).

Получение производных ЖК. Пирролидиновые производные (пирролидины) были получены обработкой ЖК *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (Alfa Aesar, США) и пирролидином (Aldrich, Германия) при комнатной температуре [47], перед анализом реакционную смесь концентрировали в вакууме. Свободные ЖК этилировали *N*-нитрозо-*N*-этилмочевинной (Sigma, Германия). Для получения диметилдисульфидных аддуктов этиловые эфиры ЖК обрабатывали диметилдисульфидом (Sigma-Aldrich, Франция) по методике, описанной Christie [48], однако после остановки реакции водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ реакционную смесь экстрагировали гексаном (5 × 0.5 мл), гексановый экстракт перед анализом высушивали в вакууме. 4,4-Диметиллоксазолиновые производные получали реакцией с 2-амино-2-метил-1-пропанолом в пиридине в присутствии борогидрида натрия (все реагенты Sigma-Aldrich, Германия) [49]. Гидрирование (3–5.5 ч) проводили над катализатором Адамса в этаноле.

Масс-спектры производных новых ЖК приведены в дополнительных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием ГЖХ-МС и, в отдельных случаях, спектроскопии ^1H - и ^{13}C -ЯМР впервые выполнен структурный анализ жирных кислот губки рода *Penares*. Обнаружена 71 кислота с длиной цепи от C_{12} до C_{28} , в том числе 12 новых соединений. Неизвестные ранее (5*Z*,9*Z*)-9-хлор-5,9-диеновые кислоты представляют первые примеры хлорированных демо-

спонгиевых кислот. Особенности изученной смеси ЖК – высокое содержание компонентов с моно-метилированными цепями (>50%) и почти полное замещение обычных демоспонгиевых кислот их хлор-производными, предположительно, благодаря деятельности хлорирующих ферментов микроорганизмов, ассоциированных с губкой.

Данные анализа ЖК *Penares* sp. не только расширяют наши знания о разнообразии биомолекул, но и способствуют пониманию происхождения структурных особенностей некоторых вторичных метаболитов губок рода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЦСМИ) Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН (спектроскопия ЯМР и масс-спектрометрия).

Авторы выражают благодарность О.П. Моисеенко, к.х.н. Л.П. Пономаренко и Е.Г. Ляховой за помощь в анализе ГЖХ-МС и в выделении этиловых эфиров ЖК. Авторы признательны академику В.А. Стонику за полезное обсуждение ряда вопросов, изложенных в данной работе. Авторы также благодарны к.х.н. В.А. Денисенко и В.В. Исакову и операторам Н.В. Звягинцеву и Д.В. Денисенко за регистрацию спектров ЯМР.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-03-00014).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dembitsky V.M., Rezanka T., Srebnik M.* // Chem. Phys. Lipids. 2003. V. 123. P. 117–155.
[https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00020-3)
2. *Родькина С.А.* // Биол. моря. 2005. Т. 31. С. 387–397. [*Rodkina S.A.* // Russ. J. Mar. Biol. 2005. V. 31. P. S49–S60].
<https://doi.org/10.1007/s11179-006-0015-3>
3. *Bergé J.-P., Barnathan G.* // In: Marine Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology/ Eds. Ulber R., Le Gal Y. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. V. 96. P. 49–125.
<https://doi.org/10.1007/b135782>
4. *Řezanka T., Sigler K.* // Prog. Lipid Res. 2009. V. 48. P. 206–238.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.03.003>
5. *Manjari Mishra P., Sree A., Panda P.K.* // In: Springer Handbook of Marine Biotechnology / Ed. Kim S.K. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. P. 851–868.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_36
6. *Kornprobst J.-M., Barnathan G.* // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 2569–2577.
<https://doi.org/10.3390/md8102569>
7. *Dembitsky V.M., Srebnik M.* // Prog. Lipid Res. 2002. V. 41. P. 315–367.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00003-6)
8. *Hwang B.S., Lee K., Yang C., Jeong E.J., Rho J.-R.* // J. Nat. Prod. 2013. V. 76. P. 2355–2359.
<https://doi.org/10.1021/np400793r>
9. *Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Nam N.H., Stonik V.A.* // Steroids. 2015. V. 96. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.009>
10. *Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovskiy A.I., Afiyatulloev Sh.Sh., Dyshlovoy S.A., Krasokhin V.B., Minh Ch.V., Stonik V.A.* // Tetrahedron Lett. 2012. V. 53. P. 6119–6122.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.08.148>
11. *Kobayashi J., Cheng J.-F., Ishibashi M., Wälchli M.R., Yamamura Sh., Ohizumi Y.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1991. P. 1135–1137.
<https://doi.org/10.1039/P19910001135>
12. *Alvi Kh.A., Jaspars M., Crews Ph., Strulovici B., Oto E.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 2447–2450.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80407-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80407-8)
13. *Nakao Y., Maki T., Matsunaga Sh., van Soest R.W.M., Fusetani N.* // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 1346–1350.
<https://doi.org/10.1021/np049939e>

14. Takada K., Uehara T., Nakao Y., Matsunaga Sh., van Soest R.W.M., Fusetani N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 187–193.
<https://doi.org/10.1021/ja037368r>
15. Fujita M., Nakao Y., Matsunaga Sh., Seiki M., Itoh Y., van Soest R.W.M., Fusetani N. // *Tetrahedron*. 2001. V. 57. P. 1229–1234.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)01128-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01128-5)
16. Ushio-Sata N., Matsunaga Sh., Fusetani N., Honda K., Yasumuro K. // *Tetr. Lett.* 1996. V. 37. P. 225–228.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02134-5](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)02134-5)
17. Ando H., Ueoka R., Okada Sh., Fujita T., Iwashita T., Imai T., Yokoyama T., Matsumoto Y., van Soest R.W.M., Matsunaga Sh. // *J. Nat. Prod.* 2010. V. 73. P. 1947–1950.
<https://doi.org/10.1021/np1003565>
18. Bergquist P.R., Lawson M.P., Lavis A., Cambie R.C. // *Biochem. Syst. Ecol.* 1984. V. 12. P. 63–84.
[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(84\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90012-7)
19. Lawson M.P., Bergquist P.R., Cambie R.C. // *Biochem. Syst. Ecol.* 1984. V. 12. P. 375–393.
[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(84\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90070-X)
20. Будзикевич Г., Джерасси К., Уильямс Д. // Интерпретация масс-спектров органических соединений / Под ред. Вульфсона Н.С. Москва: Мир, 1966. 323 с.
21. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Alkyl Esters. Ethyl Esters of Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/others/others-arch/index.htm>
22. The LipidWeb. Mass Spectra of Fatty Acid Alkyl Esters – Archive. Ethyl esters of fatty acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/others/others-arch/index.htm>
23. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Fatty Acid Pyrrolidides. Dienoic fatty acids. Part 2. Conjugated and Bis- and Polymethylene-Interrupted Dienes.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/pyrrolidides/pyrrol-2db-2/index.htm>
24. The LipidWeb. Mass Spectrometry of DMOX Derivatives. Dienoic fatty acids. Part 2. Conjugated and Bis- and Polymethylene-Interrupted Dienes.
https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/dmox/dmox-2db-2/index.htm
25. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Fatty Acid Pyrrolidides. Saturated Branched-Chain Fatty Acids.
https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/pyrrolidides/pyrrol-sbr/index.htm
26. The LipidWeb. Pyrrolidine Derivatives of Fatty Acids. Archive of Mass Spectra.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/pyrrolidides/pyrrol-arch/index.htm>
27. Santalova E.A., Denisenko V.A. // *Nat. Prod. Commun.* 2017. V. 12. P. 1913–1916.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1701201225>
28. Dérien S., Klein H., Bruneau Ch. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V. 54. P. 12112–12115.
<https://doi.org/10.1002/anie.201505144>
29. Gunstone F.D. // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 65. P. 155–163.
[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90049-9)
30. Akasaka K., Shichijukari S., Meguro H., Ohru H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. V. 66. P. 1719–1722.
<https://doi.org/10.1271/bbb.66.1719>
31. Santalova E.A., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 6047.
<https://doi.org/10.3390/molecules25246047>
32. Andersson B.A. // *Prog. Chem. Fats Other Lipids.* 1978. V. 16. P. 279–308.
[https://doi.org/10.1016/0079-6832\(78\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0079-6832(78)90048-4)
33. Santalova E.A., Denisenko V.A. // *Lipids*. 2017. V. 52. P. 73–82.
<https://doi.org/10.1007/s11745-016-4214-1>
34. Knothe G. // *Lipids*. 2006. V. 41. P. 393–396.
<https://doi.org/10.1007/s11745-006-5110-x>
35. Zhang J.Y., Yu Q.T., Huang Z.H. // *J. Mass Spectrom. Soc. Japan.* 1987. V. 35. P. 23–30.
<https://doi.org/10.5702/massspec.35.23>
36. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Dimethylloxazoline and Pyrrolidine Derivatives. Cyclic Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/dmox/dmox-cyclic/index.htm>
37. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Methyl Esters. Saturated Branched-Chain Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-0dbbr/index.htm>

38. The LipidWeb. Unesterified (Free) Fatty Acids.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/simple/ffa/index.htm>
39. Thiel V., Jenisch A., Wörheide G., Löwenberg A., Reitner J., Michaelis W. // *Org. Geochem.* 1999. V. 30. P. 1–14.
[https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(98\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(98)00200-9)
40. The LipidWeb. Fatty Acids: Branched-Chain.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/fa-eic/fa-branc/index.htm>
41. The LipidWeb. Fatty Acids: Natural Cyclic.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/fa-eic/fa-cycl/index.htm>
42. Reiswig H.M. // *Mar. Ecol.* 1981. V. 2. P. 273–293.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1981.tb00271.x>
43. Hedrick D.B., Peacock A.D., Long Ph., White D.C. // *Lipids.* 2008. V. 43. P. 843–851.
<https://doi.org/10.1007/s11745-008-3206-1>
44. Fejzagić A.V., Gebauer J., Huwa N., Classen T. // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 4008.
<https://doi.org/10.3390/molecules24214008>
45. Bayer K., Scheuermayer M., Fieseler L., Hentschel U. // *Mar. Biotechnol.* 2013. V. 15. P. 63–72.
<https://doi.org/10.1007/s10126-012-9455-2>
46. Wang J., Pang X., Chen Ch., Gao Ch., Zhou X., Liu Y., Luo X. // *Chin. J. Chem.* 2022. V. 40. P. 1729–1750.
<https://doi.org/10.1002/cjoc.202200064>
47. Vetter W., Walther W. // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 513. P. 405–407.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89466-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89466-8)
48. The LipidWeb. Mass Spectrometry of Methyl Esters. Derivatization of Double Bonds in Fatty Acids for Structural Analysis.
<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-dbderivs/index.htm>
49. Santalova E.A., Svetashev V.I. // *Nat. Prod. Commun.* 2022. V. 17. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1177/1934578X221131408>

9-Chloro-5,9-dienoic and Other Fatty Acids from Marine Sponge *Penares* sp.

E. A. Santalova*,[#] and S. A. Kolesnikova*

[#]Phone: +7 (423) 231-11-68; e-mail: santalova@piboc.dvo.ru

* G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

The fatty acids and their ethyl esters from an extract of a sponge *Penares* sp. (South China Sea) were fractionated by high-performance liquid chromatography and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry using pyrrolidine, 4,4-dimethyloxazoline, dimethyl disulfide, and hydrogenated derivatives. In some cases, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy was applied for the structural analysis of fatty acids. 71 C₁₂–C₂₈ acids, including 12 new compounds, were found. The new compounds were shown to be (5Z,9Z)-9-chloro-24-methyl-5,9-pentacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-25-methyl-5,9-hexacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-24-methyl-5,9-hexacosadienoic, (5Z,9Z)-9-chloro-25-methyl-5,9-heptacosadienoic, 6-chloro-20-methyl-4-heneicosenoic, 6-chloro-19-methyl-4-heneicosenoic, 6-chloro-20-methyl-4-docosenoic, *cis*-17,18-methylene-tetracosanoic, 16,21-dimethyldocosanoic, 18,23-dimethyltetracosanoic, 16,18,22-trimethyltricosanoic, and 18,20,24-trimethylpentacosanoic acids. It was shown that the characteristic features of the fatty acid mixture were a high level of constituents with monomethylated chains (over 50%) and the nearly total substitution of common demospongiac acids for their chloro-derivatives, previously unknown (5Z,9Z)-9-chloro-5,9-dienoic acids. The presence of analogous structural fragments in the fatty acids from *Penares* sp. and in some biologically active secondary metabolites from *Penares* sponges was discussed. The results of this work may be used for the structural, comparative and biosynthetic studies of marine lipids.

Keywords: sponge, *Penares*, fatty acids, chlorinated fatty acids, demospongiac acids, GC-MS