

Применение ВЭЖХ-МС ВР подходов групповой идентификации при *in vitro* исследованиях фотосенсибилизатора комбинированного действия

М. Н. Усачёв,[@] Е. С. Нерябова, П. В. Островерхов, Д. А. Минаков,
Д. Ю. Медведев, Ю. А. Ефимова, В. Ф. Таранченко, М. А. Грин

Институт тонких химических технологий, МИРЭА - Российский технологический университет, 119454 Москва, Российская Федерация

[@]E-mail: usachyov@mirea.ru

С использованием метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС ВР) разработан современный подход к идентификации продуктов деградации фотосенсибилизатора комбинированного действия (ФКД). Эти соединения представляют собой специфические конъюгаты производных хлорина e_6 с доксорубицином, включающие тиокетальный линкер, характеризующийся повышенной чувствительностью к воздействию активных форм кислорода (АФК). Подобного типа ФКД синтезируются посредством уникального процесса конъюгации тетрапиррольных компонентов с различными эффекторными молекулами, способными проявлять обезболивающие и/или цитотоксические свойства. Под влиянием излучения с длиной волны 660 нм происходит разрушение структурных связей, приводящее к образованию множества разнообразных продуктов деградации. Проведённый детальный анализ выявил формирование характерных ионных фрагментов с чётко зафиксированными значениями массового заряда (m/z) именно в тех соединениях, которые сохранили тетрапиррольное ядро. Параллельно были обнаружены ионы, свидетельствующие о присутствии доксорубина в структурах, лишённых тетрапиррольного фрагмента. Полученные экспериментально установленные закономерности послужили основой для разработки подхода группового распознавания исследуемых веществ. Данный подход групповой идентификации рекомендован для углубленного изучения перспективных антимикробных препаратов нового поколения, созданных на основе природных хлоринсодержащих фотосенсибилизаторов, обладающих мощным бактерицидным действием. Использование подобного современного подхода значительно повышает эффективность исследований сложных биомедицинских соединений и открывает новые возможности для разработки передовых лекарственных средств.

Ключевые слова: Жидкостная хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения (ВЭЖХ-МС ВР), фотосенсибилизаторы комбинированного действия, *in vitro* исследования.

Application of UHPLC-HRMS Group Identification Approaches in *in vitro* Studies of Photosensitizer with Combined Action

Maxim N. Usachev,[@] Ekaterina S. Neryabova, Petr V. Ostroverkhov,
Dmitriy A. Minakov, Dmitry Yu. Medvedev, Yulia A. Efimova,
Viktor F. Taranchenko, and Mikhail A. Grin

Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA - Russian Technological University, 119454 Moscow, Russian Federation

[@]Corresponding author E-mail: usachyov@mirea.ru

Using the method of ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS), a modern approach has been developed for identifying degradation products of a photosensitizer with combined action (FCAD). These compounds are specific conjugates of chlorin e_6 derivatives with doxorubicin,

including thioetheral linkers characterized by increased sensitivity to reactive oxygen species (ROS). FCADs of this type are synthesized through a unique process of conjugating tetrapyrrole components with various effector molecules capable of exhibiting analgesic and/or cytotoxic properties. Under the influence of radiation at a wavelength of 660 nm, structural bonds break down, leading to the formation of a variety of diverse degradation products. A detailed analysis revealed the formation of characteristic ion fragments with clearly defined mass-to-charge ratios (m/z) specifically in those compounds that retained their tetrapyrrole core. At the same time, ions were detected indicating the presence of doxorubicin in structures lacking the tetrapyrrole fragment. The experimentally established patterns formed the basis for developing an approach to group recognition of these substances. This group identification approach is recommended for further research into promising new-generation antimicrobial drugs based on naturally occurring chlorine-containing photosensitizers with potent bactericidal activity. Using such a contemporary approach significantly enhances the efficiency of studying complex biomedical compounds and opens up new opportunities for creating advanced pharmaceutical agents.

Keywords: High performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS), photosensitizers with combined action, *in vitro* studies.

Введение

Групповая идентификация соединений с использованием метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС ВР) является эффективным инструментом при анализе многокомпонентных образцов неизвестного состава.^[1] Использование ВЭЖХ-МС ВР подходов групповой идентификации необходимо при проведении исследований, направленных на получение новых фотосенсибилизаторов комбинированного действия (ФКД). ФКД представляют собой лекарственные препараты нового поколения, отличающиеся высокой селективностью к опухолевым клеткам и низкой токсичностью для здоровых тканей.^[2] ФКД получают путем конъюгации тетрапиррольных соединений с эффекторными молекулами, которые обладают обезболивающим и/или цитотоксическим эффектом.^[3-5] Как правило, тетрапиррольные соединения конъюгируют с эффекторными молекулами через линкеры, способные управляемо деградировать под воздействием различных стрессовых факторов, таких как действие клеточных ферментов, облучение электромагнитным излучением и т.д.^[6] Эффекторные молекулы, высвободившиеся внутри опухолевых клеток после деградации ФКД, должны сохранять способность селективно связываться с мишенями и оказывать терапевтический эффект. Применение ВЭЖХ-МС ВР подходов групповой идентификации позволяет устанавливать продукты деградации ФКД, образующиеся под действием стрессовых факторов.

Повышенный интерес разработчиков новых фотосенсибилизаторов обращён на модели ФКД, имеющие в своей структуре тиокетальный линкер, чувствительный к активным формам кислорода (АФК).^[7-8] Особенность таких ФКД заключается в том, что после накопления в опухоли, АФК, генерируемые тетрапиррольным кольцом при облучении светом фотодинамической терапии, разрушают конъюгат на эффекторную молекулу и тетрапиррольный фрагмент в области АФК-чувствительного линкера. Важно получить экспериментальное подтверждение образования предполагаемых продуктов деградации подобных ФКД с АФК-чувствительными линкерами.

В настоящей работе на примере *in vitro* исследований конъюгата производного хлорина e_6 с доксорубицином, содержащего АФК-лабильный тиокетальный линкер, продемонстрирована возможность применения ВЭЖХ-МС ВР подхода групповой идентификации продуктов деградации ФКД. Предложенный подход включает хроматографическое разделение компонентов раствора в обращённо-фазовом (ОФ) режиме, ионизацию соединений электростатическим распылением, запись масс-спектров первого и второго порядка в режиме информационно-зависимого способа регистрации данных, интеграцию хроматографических пиков продуктов деградации с использованием алгоритмов комплексной обработки масс-хроматограмм, выявление общих ионов-фрагментов и схожих паттернов фрагментации в масс-спектрах второго порядка образовавшихся продуктов деградации ФКД, выдвижение предположений об их структуре.

Экспериментальная часть

In vitro исследование ФКД проводили следующим образом. Навеску конъюгата (1,0 мг) растворяли в 10,0 мл смеси ацетонитрила с водой в объёмном соотношении 50:50, и выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. По 1,0 мл полученного раствора переносили в три прозрачные пробирки вместимостью 4,0 мл и четыре пробирки с затемнённым стеклом вместимостью 4,0 мл, герметично закрывали крышками. Одну пробирку с затемнённым стеклом сразу помещали в холодильник при +4 °C без доступа света и использовали в качестве исходного раствора сравнения (экспериментальная точка 0 ч.). Остальные три пробирки с затемнённым стеклом оставляли при комнатной температуре без доступа света. Три пробирки с прозрачным стеклом облучали при комнатной температуре светодиодным источником излучения с длиной волны 660 нм и плотностью мощности излучения 20 мВт/см². Через 0,5 ч, 1 ч, и 4 ч из каждой пробирки с затемнённым и прозрачным стеклом отбирали по 0,1 мл раствора, переносили в хроматографические флаконы вместимостью 2,0 мл и помещали в холодильник при +4 °C без доступа света. По окончании эксперимента все отобранные аликваты анализировали методом ВЭЖХ-МС ВР. Обобщённая информация о сериях аликвот, отобранных в рамках выполнения *in vitro* исследований приведена в Таблице 1.

Таблица 1. Серии аликут, отобранные при проведении *in vitro* исследований.

Условия выдерживания образца	Количество аликут, отобранных для анализа			
	0 ч	0,5 ч	1 ч	4 ч
Серия № 1. Выдерживание без доступа света	1	3	3	3
Серия № 2. Выдерживание при облучении электро-магнитным излучением с длиной волны 660 нм	0	3	3	3

В Таблице 2 приведена структура исходного конъюгата и его ожидаемых продуктов деградации, образование которых предполагается в рамках проведения *in vitro* исследований.

Таким образом, аликуты, отобранные в рамках проведения *in vitro* исследований должны содержать три типа соединений, образующихся из исходного конъюгата под действием АФК, генерируемых тетрапиррольным кольцом при облучении.

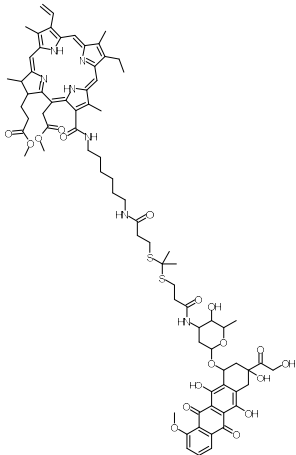
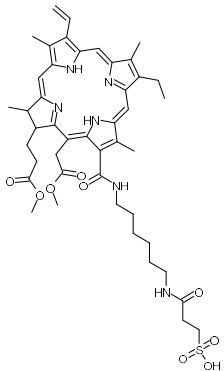
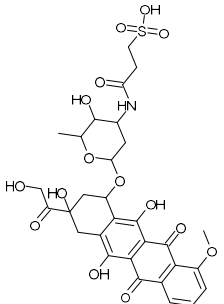
1. Исходный конъюгат, который включает в себя тетрапиррольное кольцо дитиокетальный линкер и доксорубин. Соединение обладает достаточно высокой липофильностью.

2. Первый прогнозируемый продукт разложения содержит в своей структуре тетрапиррольное кольцо и фрагмент линкера с полярной функциональной группой на конце, что придаёт фрагменту умеренную липофильность.

3. Второй прогнозируемый продукт разложения представляет собой доксорубин с небольшим фрагментом линкера, содержит в своей структуре большое количество полярных групп, что придаёт ему низкую липофильность.

Для возможности одновременного обнаружения исходного конъюгата и его ожидаемых продуктов деградации подобрали условия хроматографического элюирования, приемлемые для анализа соединений с коэффициентом липофильности в диапазоне значений от 0,6 до 12 у.е.

Таблица 2. Структура и физико-химические характеристики исходного конъюгата и ожидаемых продуктов деградации.

Соединение	Структура	Физико-химические характеристики
Исходный конъюгат		$C_{78}H_{95}N_7O_{18}S_2$ Моноизотопная молекулярная масса (М.И.М.М.) 1481,6175 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 1482,6248 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^{2+}$: 741,8160 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 1480,6102 Рассчитанный коэффициент липофильности $\log P = 11,78 \pm 1,73$ у.е.
Прогнозируемый продукт деградации 1		$C_{45}H_{58}N_6O_9S$ М.И.М.М. 858,3986 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 859,4059 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^{2+}$: 430,2065 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 857,3913 Рассчитанный коэффициент липофильности $\log P = 5,00 \pm 1,66$ у.е.
Прогнозируемый продукт деградации 2		$C_{30}H_{33}NO_{15}S$ М.И.М.М. 679,1571 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 680,1644 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 678,1498 Рассчитанный коэффициент липофильности $\log P = 0,62 \pm 1,35$ у.е.

Условия выполнения ВЭЖХ-МС анализа

Анализ образцов проводили с использованием УВЭЖХ-МС системы «Dionex UltiMate RS 3000», состоящей из бинарного насоса подвижной фазы, дегазатора растворителей, блока автоматического ввода проб (автосамплера) и термостата аналитических колонок. В качестве детектора использовали гибридный масс-спектрометр высокого разрешения «Q-Exactive HF-X», оснащённый нагреваемым источником

ионизации при электростатическом распылении «HESI-II», «Thermo Scientific», Германия. Управление хроматографической системой осуществляли с использованием программного обеспечения «Xcalibur» версии 4.7.

Хроматографическое разделение компонентов анализируемых образцов проводили на аналитической колонке с сорбентом «Nucleodur», привитой обращённой фазой C-18, длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,0 мм, размером частиц сорбента 1,8 мкм, «Masherey Nagel», Германия. Условия УВЭЖХ-МС анализа приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Условия проведения УВЭЖХ-МС анализа.

Параметры хроматографического разделения				
Подвижная фаза (ПФ)	– компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде; – компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в изопропиловом спирте			
Режим хроматографического элюирования	Градиентный			
	Время, мин.	Соотношение компонентов ПФ		Скорость потока, мл/мин.
		А, %	В, %	
	0,00	0	100	0,4
	2,00	0	100	
	15,00	95	5	
	18,00	95	5	
	18,01	0	100	
	21,00	0	100	
Температура термостата колонки	40 °С			
Температура термостата автосамплера	4 °С			
Объем ввода пробы	1,0 мкл			
Время анализа	21 мин			
Параметры работы источника ионизации HESI-II				
Скорость потока газа распылителя	45 у.е.			
Скорость потока вспомогательного газа	25 у.е.			
Скорость потока осушающего газа	5 у.е.			
Напряжение на распылителе	4,1 кВ (–3.5 кВ)			
Температура входного капилляра	350 °С			
Температура вспомогательного газа	150 °С			
Параметры регистрации масс-спектров				
Тип регистрируемых ионов	Регистрация положительно/ отрицательно заряженных ионов-предшественников и ионов-фрагментов второго порядка, полученных в информационно-зависимом режиме			
Условия регистрации положительно /отрицательно заряженных ионов-предшественников	разрешение 30000 отн.ед.			
	диапазон сканирования m/z : 250 – 2000 а.е.м.			
	напряжение на s линзе (%): 50 отн.ед.			
Условия информационно-зависимого способа регистрации масс-спектров второго порядка	режим динамического исключения ионов-предшественников – 20 с			
	заряды ионов, допускаемые для фрагментации в ячейке соударения 1–3			
	фрагментация до 5 наиболее интенсивных ионов в масс-спектре первого порядка			
	окно изоляции (m/z) иона-предшественника – 2 а.е.м.			
	Диапазон сканирования ионов-фрагментов – адаптивный, без ограничения нормализованная энергия фрагментации ячейки соударения ступенчатая со значениями 20 %, 25 %, 30 %			
	разрешение при регистрации ионов – фрагментов 15000 отн.ед.			

Очередность анализа аликвот обеих серий проводили случайным образом. Каждую аликвоту анализировали дважды, чередуя с бланковым раствором (смесь ацетонитрила с водой в объемном соотношении 50:50).

Комплексную обработку масс-хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения «Compound Discoverer» версии 3.3 SP3 отдельно для каждой серии аликвот. На этапе предварительной обработки масс-хроматограмм проводили «выравнивание» масс-хроматограмм анализируемой серии, разметку пиков соединений, группировку соединений по совпадению хромато-масс-спектрометрических характеристик, устанавливали молекулярные ионы соединений, удаляли системные сигналы, формировали матрицу признаков и проводили её нормировку. При проведении дисперсионного анализа проводили сравнение содержания соединений в аликвотах, отобранных через 0,5 ч, 1 ч, и 4 ч с аликвотой исходного раствора (0 ч). Оценку значимости изменения содержания соединений в исследуемых образцах проводили с использованием коэффициентов «Log2 Fold Change» и «Log10 p-value», где:

- коэффициент «Log2 Fold Change» характеризует отношение средних значений площадей пиков соединений в каждой экспериментальной точке (0,5 ч, 1 ч, и 4 ч) к среднему значению площадей пиков соединений в исходном растворе (точка 0 ч);

- коэффициент «Log10 p-value» характеризует статистическую значимость наблюдаемых различий площадей пиков соединений в каждой экспериментальной точке (0,5 ч, 1 ч, и 4 ч) по отношению к значениям площадей пиков соединений в исходном растворе (точка 0 ч).

Если для наблюдаемых соединений коэффициенты удовлетворяли условиям ($-2 < \text{«Log2 Fold Change»} < 2$) и ($\text{«Log10 p-value»} < 0,05$), то считали, что содержание соединений изменяется в течение эксперимента незначительно, и не рассматривали на дальнейших этапах обработки результатов. В противном случае полагали, что изменение содержания обнаруженных соединений в течение эксперимента является статистически значимым, эти соединения отбирали при дальнейшей обработке результатов.

Относительное содержание наблюдаемых соединений в проанализированных аликвотах оценивали методом нормировки площадей пиков, где за 100 % брали сумму всех наблюдаемых площадей пиков соединений на масс-хроматограмме.

Результаты и их обсуждение

При анализе аликвот первой серии *in vitro* эксперимента зарегистрировали 33 сигнала, соответствующие одному исходному конъюгату и пяти примесным соединениям. На Рисунке 1 приведён фрагмент масс-хроматограммы обнаруженных соединений в аликвотах первой серии *in vitro* эксперимента.

В Таблице 4 приведены объединённые результаты анализа образцов первой серии *in vitro* эксперимента при выдерживании аликвот растворов исходного конъюгата без доступа света.

Из Таблицы 4 следует, что при выдерживании раствора исследуемого ФКД при комнатной температуре без доступа света исходного конъюгата и его примеси остаются стабильными, их содержание статистически значимо не изменяется в течение эксперимента. На Рисунке 2 приведены графики изменения площадей пиков исходного конъюгата и примесей, обнаруженных в аликвотах первой серии *in vitro* эксперимента, выдержанных при комнатной температуре без доступа света.

Результаты обработки масс-хроматограмм образцов при выдерживании под электромагнитным облучением при 660 нм

При анализе аликвот второй серии *in vitro* эксперимента зарегистрировали 103 сигнала, которые соответствуют 27 соединениям. В число обнаруженных соединений входят исходный ФКД, пять примесных соединений, которые наблюдались при анализе аликвот первой серии *in vitro* эксперимента, и образовавшиеся продукты деградации конъюгата. На Рисунке 3 приведён фрагмент масс-хроматограммы обнаруженных соединений в аликвотах второй серии *in vitro* эксперимента при выдерживании исходного раствора конъюгата под электромагнитным облучением при 660 нм.

В Таблице 5 приведены объединённые результаты анализа образцов второй серии эксперимента при выдерживании аликвот исходного раствора конъюгата под электромагнитным излучением при 660 нм.

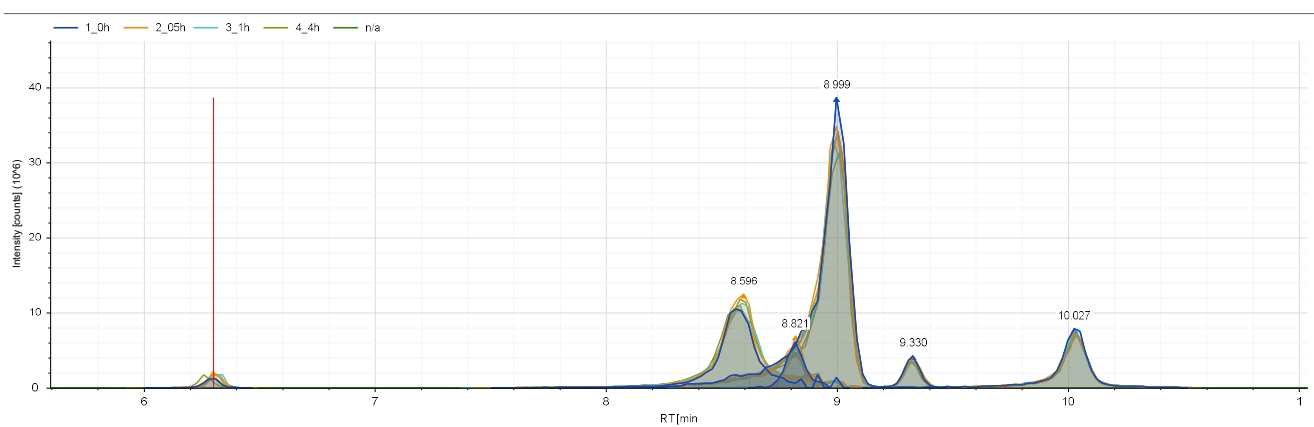


Рисунок 1. Фрагмент обобщённой масс-хроматограммы, полученной при анализе аликвот первой серии *in vitro* эксперимента (выдерживание растворов аликвот без доступа света).

Таблица 4. Обобщённые результаты анализа аликвот первой серии *in vitro* эксперимента.

Соединение	М.И.М.М., а.е.м.	Время удерживания, мин.	Относительное содержание, %			
			«Log ₂ Fold Change»		«Log ₁₀ p-value»	
			0 ч	0,5 ч	1 ч	4 ч
Исходный конъюгат	1481,6158	9,00	89	88	89	89
			-	-0,21	-0,19	0,01
			-	1,68E-01	2,00E-01	9,97E-01
Примесь 1	1497,6091	8,58	6	6	6	7
			-	-0,4	-0,37	-0,24
			-	3,96E-02	5,48E-02	1,74E-01
Примесь 2	1676,8520	10,03	3	3	2	2
			-	-0,18	-0,04	0,19
			-	1,10E-01	9,18E-01	9,94E-02
Примесь 3	1085,5309	8,82	1,9	1,8	1,5	1,4
			-	-0,14	0,09	0,38
			-	5,49E-01	7,72E-01	6,11E-02
Примесь 4	956,4529	9,33	0,82	0,78	0,70	0,71
			-	-0,14	0,04	0,22
			-	2,28E-01	8,91E-01	7,00E-02
Примесь 5	826,2393	6,30	0,23	0,31	0,30	0,27
			-	-0,62	-0,56	-0,22
			-	3,76E-02	5,16E-02	4,69E-01

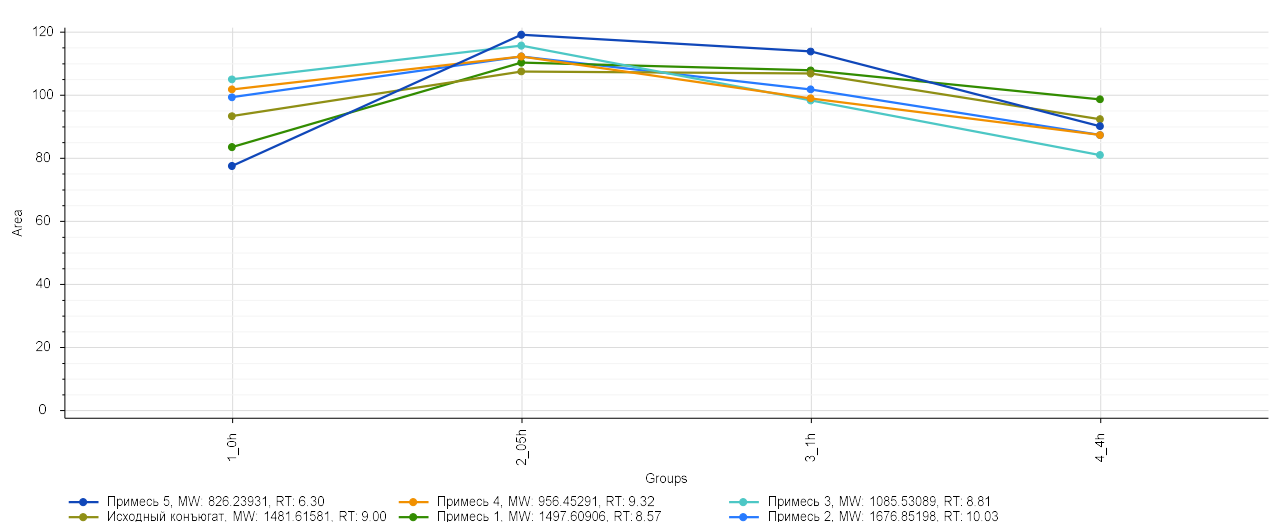
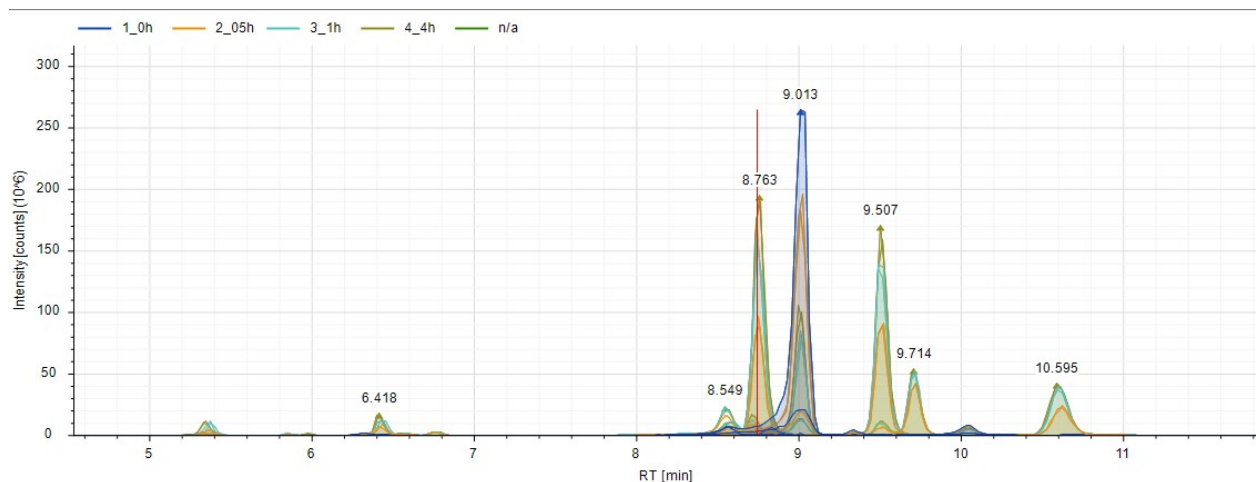
**Рисунок 2.** График изменения содержания исходного конъюгата и примесных компонентов в образцах без облучения электромагнитным излучением.**Рисунок 3.** Фрагмент обобщённой масс-хроматограммы, полученной при анализе аликвот второй серии *in vitro* эксперимента (выдерживание аликвот при облучении светом при 660 нм).

Таблица 5. Обобщённые результаты анализа аликвот второй серии *in vitro* эксперимента

Соединение	М.И.М.М., а.е.м.	Время удерживания мин.	Относительное содержание %			
			«Log ₂ Fold Change»			
			«Log ₁₀ p-value»			
			0 ч	0,5 ч	1 ч	4 ч
Исходный конъюгат	1481,6153	9,02	88	33	11	11
			-	0,87	2,33	2,01
			-	7,88E-04	1,93E-05	4,17E-05
Примесь 1	1497,6094	8,59	5,6	7,7	8,5	7,1
			-	-0,98	-1,28	-1,17
			-	1,12E-04	4,37E-05	6,36E-05
Примесь 2	1676,8518	10,05	2,57	1,28	0,65	0,70
			-	0,49	1,3	1,03
			-	1,44E-03	4,40E-05	1,01E-04
Примесь 3	1085,5307	8,83	1,84	0,78	0,32	0,32
			-	0,72	1,84	1,67
			-	2,85E-03	9,72E-05	1,30E-04
Примесь 4	956,4525	9,34	0,81	0,24	0,07	0,06
			-	1,26	2,83	2,83
			-	1,57E-04	2,12E-06	2,10E-06
Продукт деградации - 1	850,4439	9,51	0,00	13,84	18,39	18,37
			-	-6	-6,57	-6,73
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 2	850,4440	9,71	0,0	5,22	5,54	4,84
			-	-4,99	-5,23	-5,2
			-	9,70E-14	9,39E-14	9,41E-14
Примесь 5	826,2394	6,32	0,23	0,10	0,03	0,03
			-	0,73	2,27	2,12
			-	3,49E-03	5,83E-05	7,53E-05
Прогнозируемый продукт деградации 1	858,3977	10,61	0,00	7,63	10,84	10,20
			-	-5,94	-6,6	-6,68
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 3	725,2094	6,43	0,08	0,75	1,08	1,14
			-	-3,8	-4,48	-4,71
			-	2,77E-10	1,19E-12	2,32E-13
Продукт деградации 4	856,4178	8,75	0,00	11,30	16,80	18,29
			-	-7,85	-8,58	-8,86
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 5	842,4026	9,91	0,00	0,24	0,33	0,34
			-	-2,7	-3,29	-3,52
			-	3,51E-06	3,25E-07	1,14E-07
Продукт деградации 6	824,3915	8,75	0,00	12,19	17,64	19,29
			-	-8,51	-9,2	-9,49
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 7	866,4384	8,88	0,00	0,23	0,46	0,35
			-	-2,92	-4,11	-3,86
			-	4,46E-06	4,81E-08	1,41E-07
Продукт деградации 8	1618,8104	10,34	0,00	0,30	0,28	0,35
			-	-3,86	-3,88	-4,39
			-	9,20E-06	8,97E-06	2,97E-06
Продукт деградации 9	872,4121	8,82	0,00	1,31	2,07	1,67
			-	-6,4	-7,22	-7,07
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 10	693,1843	6,77	0,00	0,20	0,21	0,18
			-	-4,41	-4,67	-4,58
			-	1,18E-09	2,51E-10	4,38E-10

Таблица 5. Продолжение.

Продукт деградации 11	1477,5444	8,50	0,00	1,64	1,98	1,51
			-	-8,04	-8,47	-8,24
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 12	852,4232	9,18	0,00	0,56	1,98	1,38
			-	-6,75	-8,74	-8,38
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 13	856,3823	10,74	0,00	0,13	0,18	0,17
			-	-5,2	-5,83	-5,92
			-	7,11E-08	7,55E-09	5,44E-09
Продукт деградации 14	970,4686	9,80	0,00	0,15	0,22	0,23
			-	-5,58	-6,25	-6,47
			-	2,61E-13	9,46E-14	9,39E-14
Продукт деградации 15	731,0949	5,35	0,00	0,10	0,14	0,16
			-	-8,15	-8,83	-9,2
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 16	699,1577	5,36	0,00	0,40	0,76	0,77
			-	-10,31	-11,41	-11,57
			-	9,37E-14	9,37E-14	9,37E-14
Продукт деградации 17	695,1634	5,89	0,00	0,02	0,10	0,05
			-	-6,64	-8,98	-8,22
			-	4,70E-06	1,06E-07	4,24E-07
Прогнозируемый продукт деградации 2	679,1594	6,57	0,00	0,07	0,16	0,14
			-	-8,98	-10,3	-10,28
			-	1,06E-07	7,64E-09	8,23E-09

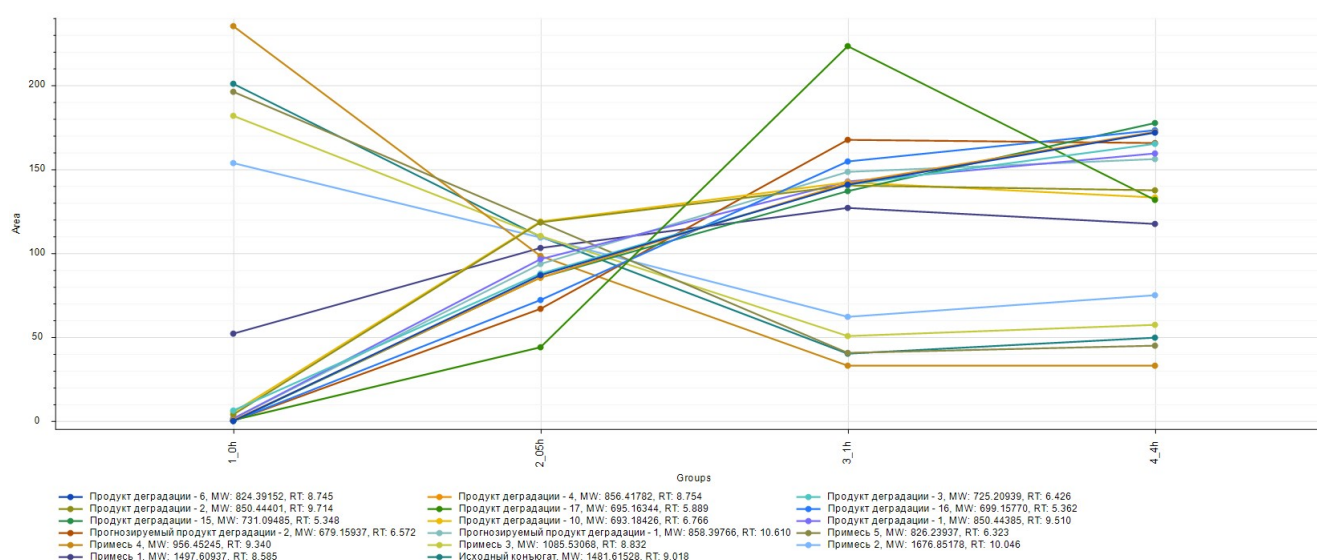


Рисунок 4. График изменения содержания исходного конъюгата, примесных соединений и продуктов их деградации при облучении электромагнитным излучением при 660 нм.

Из Таблицы 5 следует, что при облучении ФКД светом с длиной волны 660 нм наблюдается статистически значимое снижение содержания конъюгата и примесей, обнаруженных в исходном растворе. Относительное содержание исходного конъюгата через 4 ч облучения снизилось с 88 % до 11 %. Относительное содержание первого прогнозируемого продукта деградации через 4 ч облучения достигло 11 %. Относительное содержание второго прогнозируемого продукта

деградации через 4 ч облучения достигло 0,14 %. Значимым (относительное содержание более 2 %) наблюдалось образование следующих продуктов деградации, не предсказанных на этапе планирования эксперимента: 1-го - 18 %; 2-го - 4,8 %; 4-го - 18 %; 6-го - 19 %. Относительное содержание остальных обнаруженных, но также не предсказанных на этапе планирования эксперимента, продуктов деградации не превысило 2 %. На Рисунке 4 приведены графики изменения содержа-

ния исходного конъюгата, примесных соединений и продуктов деградации, образующихся после облучения раствора ФКД электромагнитным излучением с длиной волны 660 нм. Из рисунка видно, что содержание исходного конъюгата и его примесей снижается, а относительное содержание продуктов деградации увеличивается при облучении исходного раствора светом.

Групповая идентификация продуктов деградации ФКД

Перед установлением предполагаемой структуры неизвестных продуктов деградации исходного конъюгата проводили интерпретацию масс-спектров второго порядка прогнозируемых продуктов деградации, кото-

рые были обнаружены при проведении *in vitro* исследований. На Рисунках 5–7 приведены аннотированные масс-спектры второго порядка исходного конъюгата и ожидаемых продуктов деградации.

Из Рисунков 5–7 следует, что масс-спектры второго порядка исходного конъюгата и первого спрогнозированного продукта деградации, которые содержат в своей структуре тетрапиррольное кольцо, имеют набор характеристичных ионов-фрагментов с m/z 579,2971; 581,3129; 607,2926. В масс-спектре второго порядка второго спрогнозированного продукта деградации целового конъюгата наблюдаются ионы-фрагменты, характеризующие отщепление фрагментов линкера (m/z 80,9642; 152,0018; 264,0542) и фрагментов доксорубина (m/z 395,0777; 282,0647).

FB6-TK-DOX_4h-660nm#1 #1437 RT: 9.00 AV: 1 NL: 1.05E7
F: FTMS + c ESI d Full ms2 752.8058@hcd35.00 [103.6667-1555.0000]

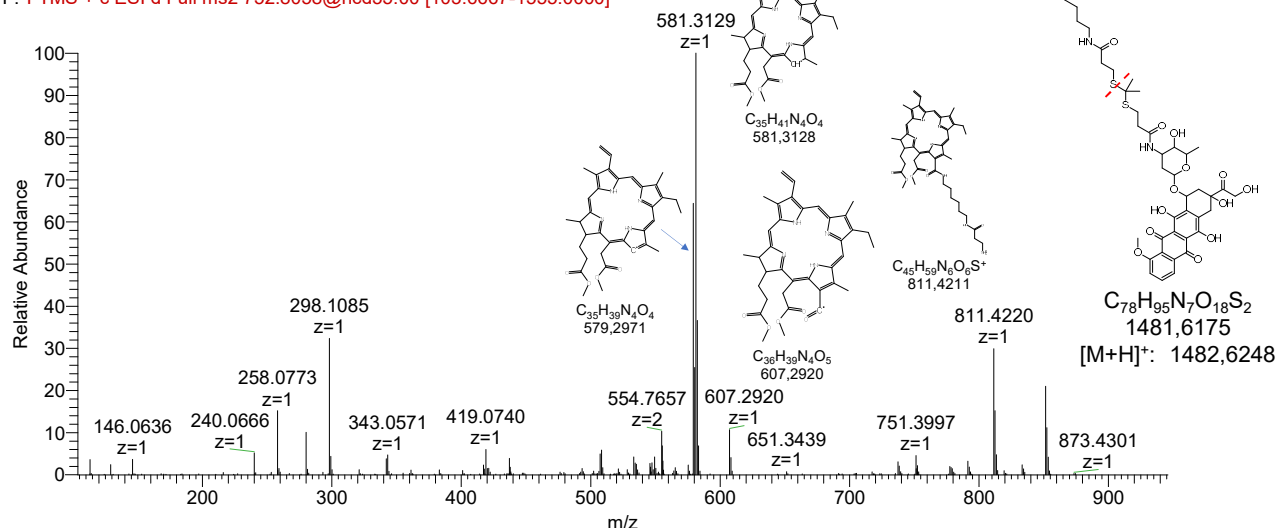


Рисунок 5. Аннотированный масс-спектр второго порядка исходного конъюгата

FB6-TK-DOX_4h-660nm#1 #1687-1732 RT: 10.49-10.69 AV: 2 NL: 6.80E5
F: FTMS + c ESI d Full ms2 859.4050@hcd35.00 [59.6667-895.0000]

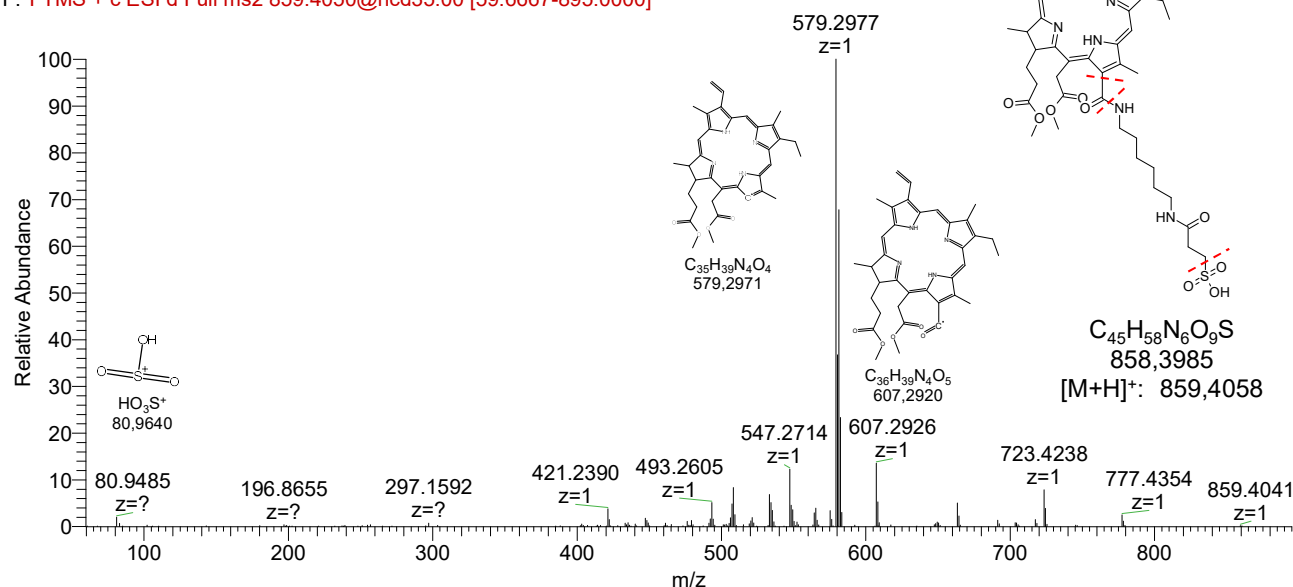


Рисунок 6. Аннотированный масс-спектр второго порядка первого прогнозированного продукта деградации

FB6-TK-DOX_4h-660nm#1 #1028 RT: 6.49 AV: 1 NL: 5.01E5
 F: FTMS - c ESI d Full ms2 678.1518@hcd35.00 [50.0000-710.0000]

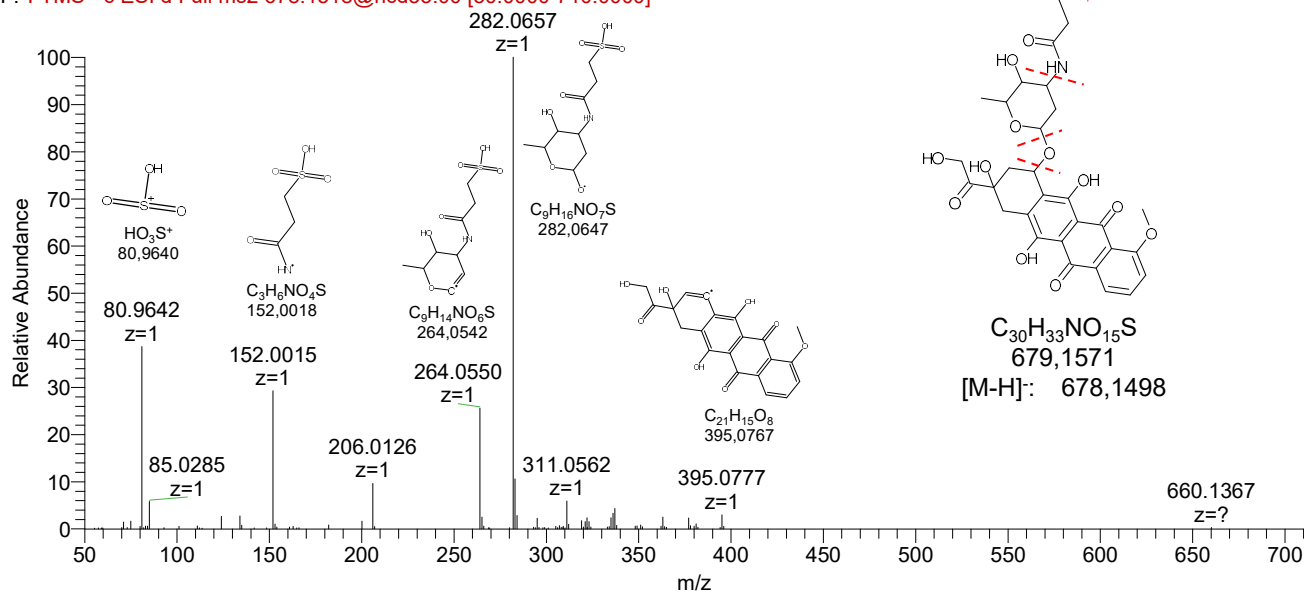


Рисунок 7. Аннотированный масс-спектр второго порядка второго прогнозированного продукта деградации.

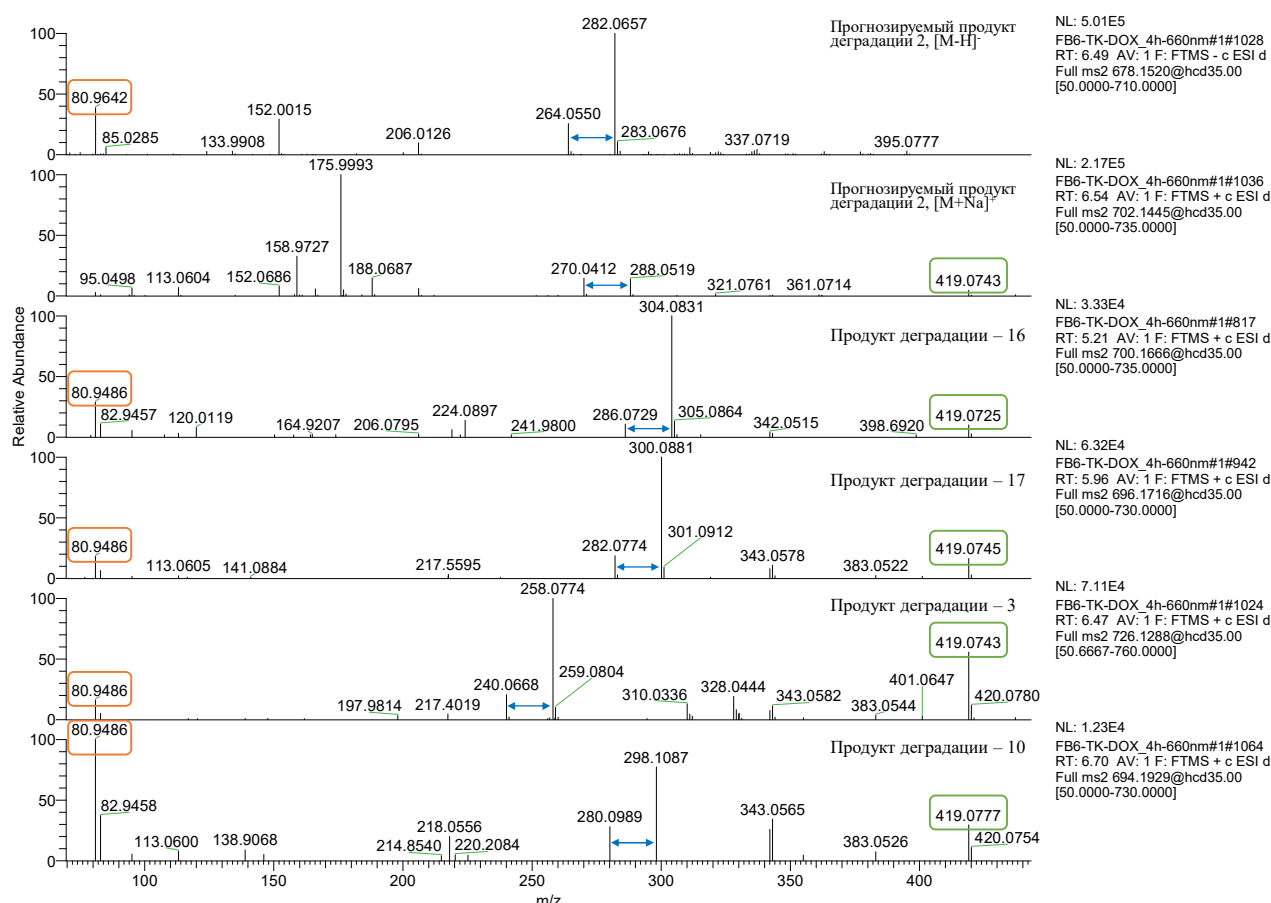


Рисунок 8. Масс-спектры второго порядка прогнозируемого продукта деградации – 1, 2, 4, 6

На следующем этапе группировали масс-спектры второго порядка обнаруженных продуктов фрагментации по сходству паттернов фрагментации. На Рисунке 8 приведены масс-спектры второго порядка эксперимен-

тально обнаруженных продуктов деградации исходного конъюгата. Относительное содержание данных продуктов трансформации превысило 2 % в ходе исследования. Из Рисунка 8 видно, что масс-спектры второго порядка

прогнозируемого продукта деградации 1, а также продуктов деградации 1, 2, 4, 6 имеют общие ионы-фрагменты ($m/z=579,2977$, $581,3130$, $607,2929$, $508,2834$, $421,2392$) и общий паттерн фрагментации. Наблюдаемое сходство рассмотренных масс-спектров второго порядка указывает на наличие в структурах сравниваемых продуктов деградации тетрапиррольного кольца.

На Рисунке 9 приведено сравнение масс-спектров второго порядка второго ожидаемого продукта трансформации исходного конъюгата (зарегистрирован в режиме отрицательно и положительно заряженных ионов) и обнаруженных продуктов деградации 16, 17, 3, 10, для которых характерно наличие одинаковых ионов-фрагментов и схожих паттернов фрагментации. Из Рисунка 9 следует, что для масс-спектров второго

порядка второго ожидаемого продукта трансформации исходного конъюгата и обнаруженных продуктов деградации 3, 10, 16, 17, характерно наличие одинаковых ионов-фрагментов ($m/z = 80,9486$, $419,0745$) и схожего паттерна фрагментации. Наблюдаемое сходство рассмотренных масс-спектров второго порядка указывает на наличие в структурах сравниваемых продуктов деградации доксорубина. Отличия в сравниваемых масс-спектрах второго порядка могут указывать на протекание различных механизмов разрушения линкера под действием АФК.

Учитывая особенности фрагментации сравниваемых соединений, предположили структуры обнаруженных продуктов трансформации исходного ФКД (Таблица 6).

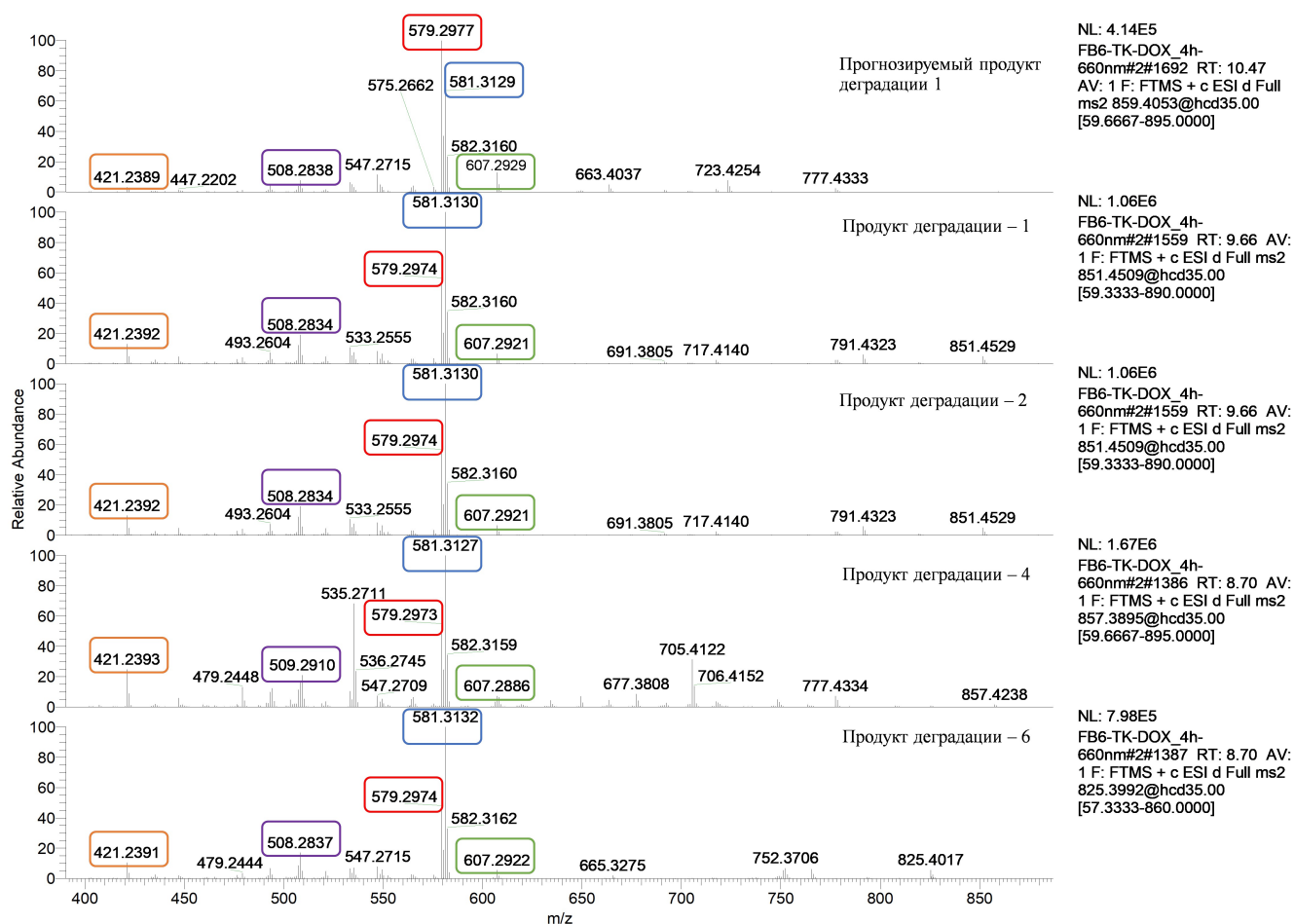


Рисунок 9. Масс-спектры второго порядка ожидаемого продукта деградации 2 (зарегистрирован в режиме отрицательно и положительно заряженных ионов) и продуктов деградации 16, 17, 3, 10, для которых характерно наличие одинаковых ионов-фрагментов и схожих паттернов фрагментации

Таблица 6. Предполагаемые структуры обнаруженных продуктов деградации исходного конъюгата.

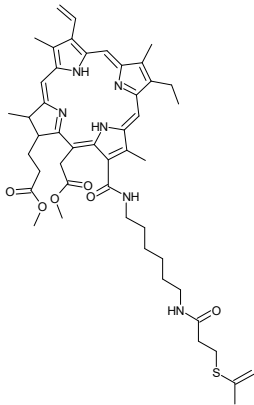
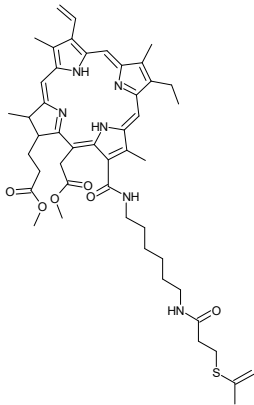
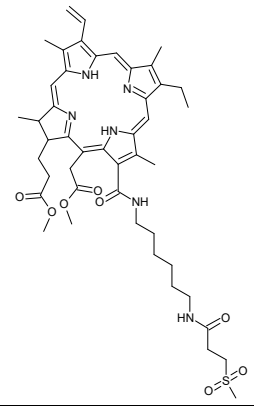
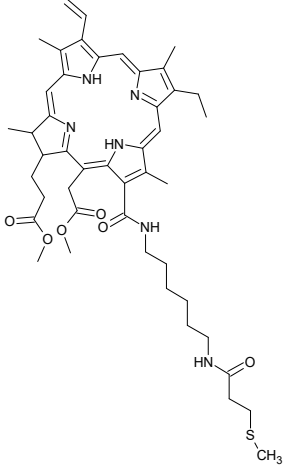
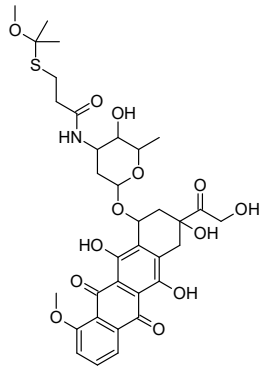
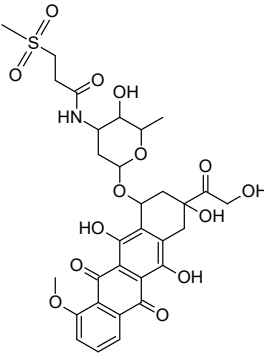
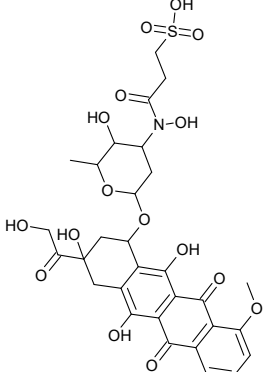
Соединение	Предполагаемая структура	Физико-химические характеристики
Продукт деградации 1		$C_{48}H_{62}N_6O_6S$ М.И.М.М. 850,4452 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 851,4524 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 849,4379 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 8,48 \pm 1,65$ у.е. Время удерживания 9,51 мин
Продукт деградации 2		$C_{48}H_{62}N_6O_6S$ М.И.М.М. 850,4452 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 851,4524 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 849,4379 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 8,48 \pm 1,65$ у.е. Время удерживания 9,71 мин
Продукт деградации 4		$C_{46}H_{60}N_6O_8S$ М.И.М.М. 856,4193 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 857,4266 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 855,4121 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 5,93 \pm 1,65$ у.е. Время удерживания 8,75 мин
Продукт деградации 6		$C_{46}H_{60}N_6O_6S$ М.И.М.М. 824,4295 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 825,4368 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 823,4222 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 7,66 \pm 1,65$ у.е. Время удерживания 8,75 мин

Таблица 6. Продолжение.

Продукт деградации 3		$C_{34}H_{41}NO_{13}S$ М.И.М.М. 703,2299 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 704,2371 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+Na]^+$: 726,2191 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 702,2226 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 3,96 \pm 1,35$ у.е. Время удерживания 6,43 мин
Продукт деградации 16		$C_{31}H_{35}NO_{14}S$ М.И.М.М. 677,1778 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 678,1851 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+Na]^+$: 700,1670 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 676,1705 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 1,55 \pm 1,31$ у.е. Время удерживания 5,36 мин
Продукт деградации 17		$C_{30}H_{33}NO_{16}S$ М.И.М.М. 695,1520 а.е.м. Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M+H]^+$: 696,1593 Прогнозируемый ион-предшественник m/z $[M-H]^-$: 694,1447 Рассчитанный коэффициент липофильности $\text{Log } P = 0,78 \pm 1,37$ у.е. Время удерживания 5,89 мин

Заключение

Экспериментально показано, что применение ВЭЖХ-МС ВР подходов групповой идентификации при *in vitro* исследованиях ФКД, основанных на ОФ разделении соединений, ионизации электростатическим распылением, записи масс-спектров первого и второго порядка в режиме информационно-зависимого способа регистрации данных и последующей комплексной обработкой масс-хроматограмм является эффективным инструментом для оценки стабильности ФКД и установления продуктов их деградации.

Установлено, что под действием АФК, генерируемых при облучении светом с длиной волны 660 нм, исходный ФКД разрушается в области дитиокетального линкера с образованием как прогнозируемых, так и не предсказанных на этапе планирования эксперимента продуктов деградации. Полученная информация в дальнейшем поможет установить механизм разрушения дитиокетального линкера под действием АФК.

Обнаружено, что в масс-спектрах второго порядка продуктов деградации ФКД, содержащих тетрапиррольное кольцо, образуются характеристичные ионы-фрагменты с определёнными значениями m/z (579,2971; 581,3129; 607,2926). В масс-спектрах второго порядка продуктов деградации ФКД без тетрапиррольного кольца также наблюдаются повторяющиеся ионы со значениями m/z (80,9486, 419,0745), характеризующие наличие доксорубина в структуре. Для масс-спектров второго порядка этих продуктов деградации характерно сохранение схожего паттерна фрагментации. Полученные результаты необходимо использовать при дальнейшем совершенствовании подходов ВЭЖХ-МС групповой идентификации соединений.

Учитывая структурное сходство впервые обнаруженных продуктов деградации с прогнозируемыми фрагментами исходного конъюгата, можно предположить, что их наличие оказывает положительное влияние на терапевтический эффект. Для подтверждения сделанного предположения необходимо проводить

дополнительные исследования, в рамках которых необходимо синтезировать обнаруженные соединения и провести оценку их цитотоксичности в *in vitro* условиях.

Предложенный подход групповой идентификации соединений с применением ВЭЖХ-МС ВР также целесообразно применять при исследованиях новых антимикробных препаратов на основе природных хлоринных фотосенсибилизаторов, проявляющих выраженный антимикробный эффект.^[9]

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-00727-25-05 от 20.03.2025 г.; FSFZ-2024-0013).

Вклад авторов. М. Н. Усачёв: разработка идеи, проектирование методологии, программное обеспечение, написание первоначального варианта, редактирование и рецензирование. Е. С. Нерябова: формальный анализ, проведение эксперимента, написание первоначального варианта, подготовка графического материала. П. В. Островерхов: формулировка задач исследования, проведение эксперимента, редактирование. Д. А. Минаков: формальный анализ, проведение эксперимента. Д. Ю. Медведев: формальный анализ, проведение эксперимента. Ю. А. Ефимова: предоставление материалов для проведения эксперимента, руководство. В. Ф. Таранченко: проверка, предоставление оборудования для проведения эксперимента, администрирование проекта. М. А. Грин: руководство, привлечение финансирования.

Литература

References

1. Mil'man B.L., Zhurkovich I.K. *J. Anal. Chem.* **2024**, 79(2), 119–137, doi: 10.31857/S0044450224020029.
2. Grin M.A., Ostroverkhov P.V., Suvorov N.V., Tikhonov S.I., Popov A.A., Shelyagina A.P., Kirin N.S., Nichugovskiy A.I., Usachev M.N., Bragina N.A., Plotnikova E.A., Pankratov A.A. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2023**, 27, 728–740, doi: 10.1142/s1088424623500761.
3. Grin M.A., Suvorov N.V., Ostroverkhov P.V., Pogorilyy V.A., Kirin N.S., Popov A.A., Sazonova A., Filonenko E.V. *Biophys. Rev.* **2022**, 14, 941–963, doi: 10.1007/s12551-022-00962-6.
4. Plotnikova E.A., Abramova O.B., Ostroverkhov P.V., Vinokurova A., Medvedev D.Yu., Tikhonov S.I., Usachev M.N., Shelyagina A.A., Efremenko A., Feofanov A.V., Pankratov A.A., Shegay P., Grin M.A., Kaprin A.D. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 7210, doi: 10.3390/ijms25137210.
5. Kirin N.S., Ostroverkhov P.V., Usachev M.N., Birin K.P., Grin M.A. *Fine Chemical Technologies* **2024**, 19(4), 310–326, doi: 10.32362/2410-6593-2024-19-4-310-326.
6. Lei Y., Zheng M., Ng C.S., Chen P., Seng N.C., Teck P.L., Xie P., Liu H. *ChemMedChem* **2025**, 20, e202500262, doi: 10.1002/cmdc.202500262.
7. Mathew J., Ru-Hung, Le T.N., Pham H., Kumar P., Lee C., Shunmugam R., Rao N.V. *Eur. Polym. J.* **2024**, 202, 112646, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112646.
8. Rinaldi A., Caraffi R., Grazioli M.V., Oddone N., Giardino L., Tosi G., Vandelli M.A., Calzà L., Ruozi B., Thomas D.J. *Polymers* **2022**, 14, 687, doi: 10.3390/polym14040687.
9. Kustov A.V. *ChemChemTech* **2023**, 66(12), 32–40, doi: 10.6060/ivkkt.20236612.6902.

Received 01.02.2026

Accepted 06.05.2026