

УДК 615.03:615.038  
EDN: UYWJUO  
<https://doi.org/10.15275/ssmj2104488>

Оригинальная статья

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АКТИВНОГО КОМПОНЕНТА ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (КУКУРБИТАЦИН В) МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Ю.А. Фомина<sup>1</sup>, Н.Б. Шестопалова<sup>1</sup>, Т.Ю. Калюта<sup>1</sup>, А.А. Кенжегулова<sup>1</sup>, Н.С. Попов<sup>2</sup>, И.С. Сивас<sup>2</sup>, А.С. Федонников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Россия

## DETERMINATION OF THE CONTENT OF THE ACTIVE COMPONENT OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L. EXTRACT CUCURBITACIN B BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY AFTER ADMINISTRATION TO LABORATORY ANIMALS

Yu.A. Fomina<sup>1</sup>, N.B. Shestopalova<sup>1</sup>, T.Yu. Kalyuta<sup>1</sup>, A.A. Kenzhegulova<sup>1</sup>, N.S. Popov<sup>2</sup>, I.S. Sivas<sup>2</sup>, A.S. Fedonnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

<sup>2</sup>Tver State Medical University Tver, Russia

Для цитирования: Фомина Ю.А., Шестопалова Н.Б., Калюта Т.Ю., Кенжегулова А.А., Попов Н.С., Сивас И.С., Федонников А.С. Определение содержания активного компонента экстракта аврана лекарственного (кукурбитацин В) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при введении экстракта лабораторным животным. Саратовский научно-медицинский журнал. 2025; 21 (4): 488–496. EDN: UYWJUO. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104488>.

**Аннотация.** Цель: разработка и валидация хроматомасс-спектрометрической методики количественного определения кукурбитацина В в плазме крови и гомогенатах печени, почек и сердца мышей и оценка содержания и динамики концентрации кукурбитацина В в крови животных при однократном пероральном введении. **Материал и методы.** Изучение фармакокинетики выполнено на 60 беспородных мышах мужского пола массой 28,0±3,0 г. Животные получали экстракт аврана лекарственного сухой в виде водного раствора. Для разработки методики количественного определения кукурбитацина В использовали высокоэффективную жидкостную хроматограф Agilent Technologies 1260 Infinity II и масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD. Хроматографическое разделение осуществляли на аналитической колонке Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 с градиентной подвижной фазой. Пробоподготовка плазмы крови мышей заключалась в осаждении белков метанолом. **Результаты.** На основании результатов определения кукурбитацина В в плазме крови мышей после однократного внутрижелудочного введения аврана лекарственного экстракта в дозе 220,0 мг/кг выявлено, что во всех анализируемых образцах уровень сигнала находится ниже уровня предела количественного измерения. **Заключение.** Разработана биоаналитическая методика определения кукурбитацина В в плазме крови мышей с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, подобраны параметры идентификации кукурбитацина В в плазме крови мышей после однократного внутрижелудочного введения аврана лекарственного экстракта.

**Ключевые слова:** кукурбитацин В, аврана лекарственного экстракт, фармакокинетика, масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография

For citation: Fomina YuA, Shestopalova NB, Kalyuta TYu, Kenzhegulova AA, Popov NS, Sivas IS, Fedonnikov AS. Determination of the content of the active component of *Gratiola officinalis* L. extract cucurbitacin B by liquid chromatography with tandem mass spectrometry after administration to laboratory animals. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2025; 21 (4): 488–496. (In Russ.) EDN: UYWJUO. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104488>.

**Abstract.** Objective: to develop and validate a chromatograph mass spectrometric method for the quantitative determination of cucurbitacin B in mouse plasma and liver, kidney, and heart homogenates, and to evaluate the blood cucurbitacin B levels and concentration dynamics following a single oral administration. **Material and methods.** An

Agilent Technologies 1260 Infinity II high-performance liquid chromatograph and an AB Sciex QTrap 3200 MD mass spectrometer were used to develop the method for the quantitative determination of cucurbitacin B. Chromatographic separation was performed on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 analytical column with a gradient mobile phase. Mouse plasma sample preparation consisted of protein precipitation with methanol. **Results.** To study the pharmacokinetics of the components of the Grapevine officinalis extract, a bioanalytical method for determining cucurbitacin B in mouse plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry was developed, and cucurbitacin B identification parameters were selected (lower limit of quantification). **Conclusion.** To determine the pharmacokinetic parameters of cucurbitacin B, it is necessary to search for other analytes – cucurbitacin B metabolites. Consequently, it is impossible to construct a pharmacokinetic curve for cucurbitacin B. The metrological characteristics of the method allow it to be used for the analytical portion of pharmacokinetic studies of both individual substances and plant extracts.

**Keywords:** cucurbitacin B, *Gratiola officinalis* L. extract, pharmacokinetics, mass spectrometry, high performance liquid chromatography

**Введение.** Экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), полученный на GMP производственной площадке АО «Фармцентр ВИЛАР» по опытно-промышленному регламенту, основанному на патенте ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, является единственной в мире разрабатываемой активной фармацевтической субстанцией на основе данного растения, перспективным противоопухолевым средством, показавшим свою противоопухолевую активность при уникальном механизме действия [1]. В качестве одного из активных компонентов, определяющих противоопухолевую активность данного экстракта, выступает соединение кукурбитацин В [2].

Кукурбитацины представляют собой класс тетрациклических тритерпеновых соединений, содержащихся в сырье растительного и животного происхождения [3]. Основными источниками получения кукурбитацинов и их производных являются растения семейств *Cucurbitaceae*, *Scrophulariaceae* и *Brassicaceae* [4]. Интерес к данным веществам обусловлен наличием у них большого разнообразия фармакологических эффектов [5]. Имеются данные о наличии у данных веществ противоопухолевой [6], противовоспалительной [7], антиоксидантной [7, 8], нейропротективной [9], противодиабетической [10], противовирусной [11], гепатопротективной [12] активности. Среди наиболее изученных представителей данного класса соединений выделяют кукурбитацин В [13]. Согласно многочисленным данным литературы, данное вещество проявило высокую противоопухолевую активность на культуре клеток рака легкого, желудка, толстой кишки, желчных протоков и др. [14–17]. Кроме этого, доказана активность кукурбитацина В *in vitro* в отношении угнетения продукции цитокинов, поляризации макрофагов, стимуляции регенеративных процессов [7, 15, 18, 19]. Учитывая перечисленные факты, актуальным является исследование биологической активности данного соединения *in vivo*, в том числе на экспериментальных моделях патологических состояний. Учитывая низкую биодоступность кукурбитацина В при пероральном применении [20], а также возможное использование данного вещества в форме различных гликозидов, содержащихся в растительном сырье и значительно влияющих на их фармакокинетику, требуется разработка и внедрение чувствительных и точных методик количественного определения кукурбитацина В с применением высокотехнологичных гибридных методов в различных органах и тканях лабораторных животных. Методика может быть использована для определения кукурбитацина В в

биологических жидкостях для оценки фармакокинетики данного компонента при его применении *in vivo*.

**Цель** – разработка и валидация хроматомасс-спектрометрической методики количественного определения кукурбитацина В в плазме крови и гомогенатах печени, почек и сердца мышей и оценка содержания и динамики концентрации кукурбитацина В в крови животных при однократном пероральном введении.

**Материал и методы.** Изучение фармакокинетики выполнено на 60 беспородных мышах мужского пола массой 28,0±3,0 г. Животные получали экстракт аврана лекарственного сухой в виде водного раствора в дозе 220,0 мг/кг. Из таблеток, содержащих аврана лекарственного экстракт, готовили формуляцию следующим образом: 6 таблеток с дозировкой экстракта аврана сухого 125 мг помещали в коническую стеклянную колбу (100 мл) и добавляли деионизированную воду в объеме 91 мл, перемешивали на шейкере до полного растворения. Таким образом, полученная формуляция содержала в 1 мл 8,24 мг экстракта, что при введении мышам массой 30,0 г 0,8 мл формуляции доза составила 220,0 мг/кг. При выполнении эксперимента соблюдались все условия, предусмотренные Хельсинской декларацией и ее редакцией (2024) и Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях, принятым 41-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1989), в которых регламентированы этические нормы проведения экспериментов на животных. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями ГОСТа 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТа 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Разработана и валидирована методика определения кукурбитацина В в биологических образцах лабораторных животных. В процессе разработки методики использовали аналитический стандарт кукурбитацина В (PhytoLab, Германия). В качестве внутреннего стандарта (IS) применяли будесонид («АстраЗенека АБ», Швеция; рис. 1).

В процессе хроматографического анализа и пробоподготовки образцов использовали следующее оборудование: аналитические весы ВЛ-124 («Госметр», Россия), одноканальные автодозаторы Research Plus (Eppendorf AG, Германия), центрифуга-вортекс Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия), термостатируемый шейкер TS-100C (Biosan, Латвия), центрифугу с охлаждением Sigma 1-14K (Sigma, Германия), морозильный шкаф -40°C MDF-136 (Sanyo, Япония), холодильник +4°C с морозильной камерой -20°C GA-B409UCA (LG, КНР).

**Ответственный автор** — Анастасия Анатольевна Кенжегулова  
**Corresponding author** — Anastasia A. Kenzhegulova  
E-mail: kotech@mail.ru

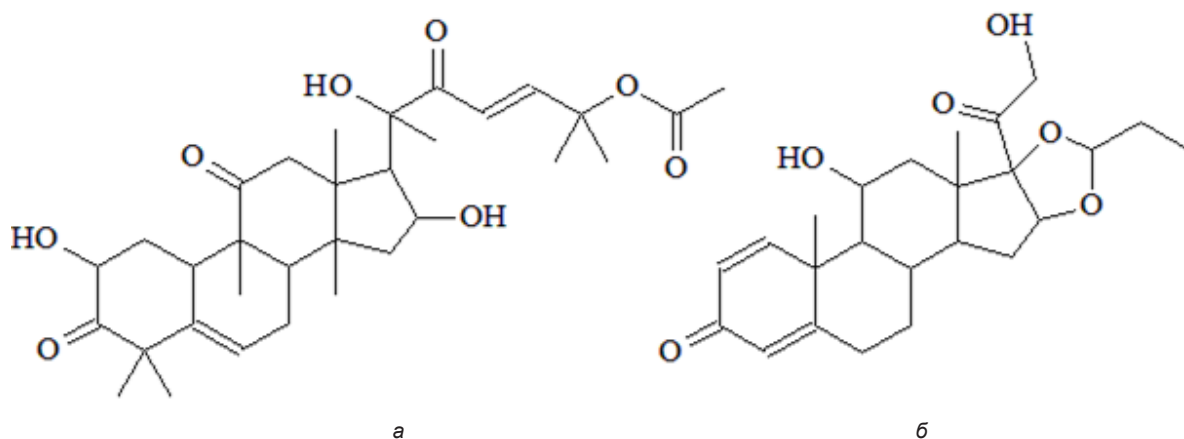


Рис. 1. Структурные формулы кукурбитацина *B* (а) и будесонида (б)

Плазму мышей получали путем центрифугирования цельной гепаринизированной крови при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гомогенаты внутренних органов (печени, почек, сердца) получали следующим образом: фрагмент каждой ткани промывали в физиологическом растворе, обсушивали фильтровальной бумагой и помещали в предварительно взвешенные на аналитических весах пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл. Определяли массу фрагмента ткани путем повторного взвешивания заполненной пробирки. Немедленно добавляли деионизированную воду из расчета на 100 мг ткани – 400 мкл. В пробирку добавляли бусину из кварцевого стекла диаметром 5 мм и подвергали колебаниям амплитудой 30 мм и частотой 50 Гц до полной гомогенизации.

Для изготовления 10-кратных рабочих растворов (серия разведений на ацетонитриле [Scharlau, Испания]) кукурбитацина *B* готовили исходный раствор на метаноле в концентрации 0,5 мг/мл. Рабочие растворы были использованы для приготовления калибровочных (к) и контрольных образцов (QC) на плазме крови и гомогенатах печени, почек и сердца мышей. Раствор IS (будесонида) готовили путем растворения суспензии (250 мкг/мл) в метаноле до достижения концентрации 5 мкг/мл.

С помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) в обращенно-фазовом режиме с использованием аналитической колонки Poroshell InfinityLab 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) в сочетании с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США) проводили количественное определение кукурбитацина *B*. Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и ацетонитрила с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (Fischer, Германия) в градиентном режиме.

Детектирование кукурбитацина *B* и будесонида при проведении хроматографического анализа осуществляли с помощью масс-спектрометра типа тройной квадруполь AB Sciex QTrap 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур) с электрораспылительным источником ионов. Подбор оптимальных параметров детекции проводили при непрерывном введении растворов кукурбитацина *B* и будесонида (растворитель – 50% метанол с добавлением 0,1% муравьиной кислоты) в источник ионов с помощью шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. На I этапе для анализа и внутреннего стандарта определяли массовое число ( $m/z$ ) депротонированных молекул или

соответствующих аддуктов, подбирали оптимальные значения потенциала декластеризации (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (CEP). Для детекции кукурбитацина *B* и будесонида в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) и обеспечения наилучшей чувствительности на II этапе работы подбирали оптимальные значения энергии столкновений (CE) и ускоряющего напряжения (CXP) для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектры второго порядка, выбирали характеристические ионы.

Пробоподготовку калибровочных и контрольных образцов осуществляли следующим образом: 90 мкл пулированной интактной плазмы крови или гомогената ткани мышей переносили в пробирки объемом 1,5 мл, добавляли 10 мкл соответствующего 10-кратного рабочего раствора кукурбитацина *B* и перемешивали на вортексе в течение 30 секунд. Затем добавляли 400 мкл раствора будесонида в метаноле (300 нг/мл), предварительно охлажденного до  $-10^{\circ}\text{C}$ , перемешивали на термостатируемом шейкере ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) в течение 2 мин. Пробы центрифугировали в течении 15 мин при 15 000 g, 50 мкл супернатанта переносили в полиэтиленовые вставки в хроматографические вials и использовали для последующего анализа посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) – ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовку исследуемых образцов осуществляли согласно с соответствующей методикой для калибровочных и контрольных образцов.

Первичные данные хроматомасс-спектрометрического анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения AB Sciex Analyst 1.6.3 (AB Sciex, США), для расчета значений валидационных параметров использовали пакет программ Microsoft Office Excel 365 (Microsoft Corp., США).

Разработанную методику валидировали по следующим параметрам: селективность, матричный эффект, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (lower limit of quantification – LLOQ), внутри- и межсерийная точность и прецизионность, стабильность на всех этапах анализа.

Концентрации аналитов рассчитаны с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 по калибровочным графикам зависимости площади хроматографического пика аналита, нормированной на площадь IS, от номинальной концентрации аналита.

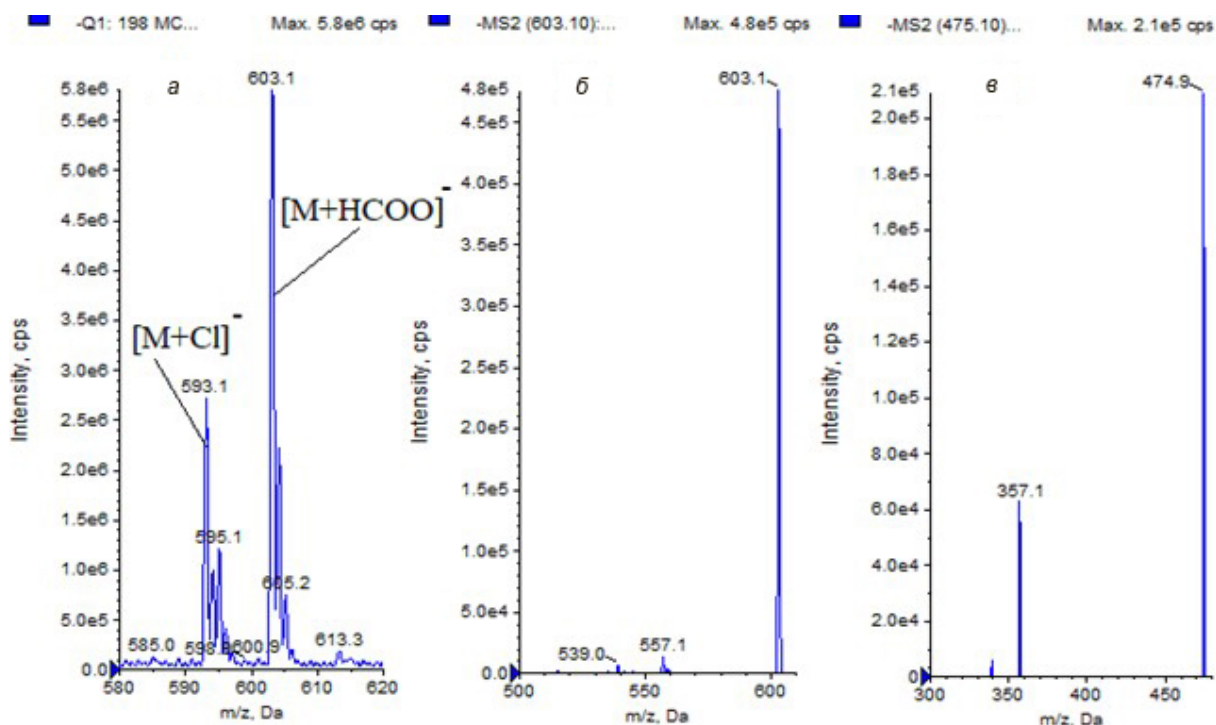


Рис. 2. Масс-спектры первого порядка аддуктов кукурбитацина В (а) и второго порядка – для кукурбитацина В (б) и будесонида (в) в режиме регистрации отрицательных ионов

Статистическая обработка данных проведена в программе Microsoft Office Excel 365. Рассчитывали среднее арифметическое значение, его стандартное отклонение, коэффициент вариации. В работе использован регрессионный анализ.

**Результаты.** На I этапе исследования для кукурбитацина В и будесонида получены масс-спектры первого и второго порядка, значения их m/z фрагментарных ионов сравнивали с данными литературы. Для аналита и внутреннего стандарта выбраны характеристические ионы-продукты, для которых были подобраны условия детектирования, обеспечивающие максимальный ионный ток (табл. 1). Масс-спектр ионов-предшественников аддуктов кукурбитацина В представлен на рис. 2, а, масс-спектры второго порядка для аналита и внутреннего стандарта представлены на рис. 2, б и в соответственно.

Хроматографическое определение кукурбитацина В осуществляли в обращенно-фазовом режиме смесью деионизированной воды (рис. 2, а) и ацетонитрила (рис. 2, б) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Программа градиента представлена в табл. 2. Время удерживания кукурбитацина В и будесонида (IS) составило 7,55 и 7,60 мин соответственно при общей продолжительности хроматографического анализа 10 мин.

Для определения метрологических характеристик разрабатываемой методики была приготовлена и проанализирована серия стандартных образцов с содержанием кукурбитацина В: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 500,0; 1000,0 и 2000,0 нг/мл в пересчете на плазму крови или гомогенат ткани. На основании результатов анализа были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость отношения площади пика кукурбитацина В (аналита) к площади пика будесонида

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрической детекции кукурбитацина В и будесонида в режиме MRM

Тип источника ионов		TurbolonSpray					
Режим ионизации		Отрицательный					
Температура источника ионов, °С		400,0					
Напряжение источника ионов, В		-4500,0					
Давление, psi							
газа завесы		20,0					
газа-распылителя		40,0					
газа-нагревателя		50,0					
Кукурбитацин В	MRM, m/z	Dwell, мсек	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
	603,1/603,1; 603,1/557,1						
Будесонид (IS)	475,1/357,1		-64,0		-21,0	-20,0	-2,5

Таблица 2

## Селективность ВЭЖХ-МС/МС методики кукурбитацина и IS (будесонида) в плазме крови и гомогенатах органов мышей

Вещество	Средняя площадь пика		Селективность, %
	в холостом образце (N=6)	образце LLOQ (N=6)	
Плазма крови			
Кукурбитацин В	134,43	1210,83	10,81
Будесонид (IS)	23,10	22850,00	0,10
Гомогенат печени			
Кукурбитацин В	25,48	1050,33	2,50
Будесонид (IS)	18,90	21066,67	0,09
Гомогенат почек			
Кукурбитацин В	136,82	1050,33	13,15
Будесонид (IS)	16,80	21066,67	0,08
Гомогенат сердца			
Кукурбитацин В	24,69	1097,83	2,71
Будесонид (IS)	12,60	21916,67	0,06

Таблица 3

## Матричный эффект при определении кукурбитацина В в плазме крови и гомогенатах органов мышей

Биологический материал и статистические параметры	Площадь пика			NMF
	аналита	IS	аналита/IS	
Плазма крови				
Среднее значение				
в solvent spike sample	6902,00	17400,00	0,40	–
post-spike sample	6394,00	16720,00	0,38	0,97
SD	424,89	370,14	0,03	0,08
CV, %	6,65	2,21	8,04	8,04
Гомогенат печени				
Среднее значение				
в solvent spike sample	6670,00	17400,00	0,38	–
post-spike sample	6222,00	16560,00	0,38	0,98
SD	412,64	391,15	0,02	0,06
CV, %	6,63	2,36	6,41	6,41
Гомогенат почек				
Среднее значение				
в solvent spike sample	6526,00	17080,00	0,38	–
post-spike sample	6636,00	16640,00	0,40	1,04
SD	60,25	391,15	0,01	0,03
CV, %	0,91	2,35	2,46	2,46
Гомогенат сердца				
Среднее значение				
в solvent spike sample	6942,00	17980,00	0,39	–
post-spike sample	6580,00	17500,00	0,38	0,97
SD	351,92	452,77	0,02	0,06
CV, %	5,35	2,59	6,08	6,08

Таблица 4

## Степень извлечения кукурбитацина В из плазмы крови и гомогенатов органов мышей

Биологический материал и статистические параметры	Площадь пика кукурбитацина В		Степень извлечения, %
	pre-spike sample	post-spike sample	
Плазма крови			
Среднее значение (N=6)	6854,00	6394,00	107,44
SD	681,56	424,89	11,00
CV, %	9,94	6,65	10,24
Гомогенат печени			
Среднее значение (N=6)	6806,00	6222,00	109,27
SD	745,14	412,64	6,94
CV, %	10,95	6,63	6,36
Гомогенат почек			
Среднее значение (N=6)	6680,00	6636,00	100,64
SD	780,54	60,25	11,42
CV, %	11,68	0,91	11,35
Гомогенат сердца			
Среднее значение (N=6)	6428,00	6580,00	97,92
SD	281,55	351,92	6,80
CV, %	4,38	5,35	6,94

(IS) от концентрации аналита в стандартном образце. Калибровочная зависимость представлена в виде уравнений линейной регрессии с нормированием  $1/x^2$ . За LLOQ принимали минимальную концентрацию кукурбитацина В, которая может быть определена с точностью 80–120% и прецизионностью не более  $\pm 20\%$ , при этом соотношение «сигнал/шум» на хроматограмме должно быть не менее 5:1.

Оценку селективности методики проводили путем анализа холостых проб (double blank) и проб с концентрацией кукурбитацина В 10,0 нг/мл, приготовленных на 6 индивидуальных образцах интактной плазмы крови и гомогенатов печени, почек и сердца мышей. Результаты определения кукурбитацина В и будесонида в холостых образцах ( $k_0$ ), холостых образцах с добавкой внутреннего стандарта и образцах LLOQ представлены в табл. 2. Средние значения селективности для аналита и внутреннего стандарта составили менее 15 и 0,1% соответственно, что свидетельствует о незначительном влиянии компонентов матрицы на количественное определение кукурбитацина В.

Оценку влияния матричного эффекта на определение кукурбитацина В проводили для концентрации 100 нг/мл в 6 индивидуальных образцах плазмы крови и гомогенатов органов мышей. Матричный эффект рассчитывали как отношение сигнала аналита в неэкстрагированном образце (post-spike sample) к усредненному значению сигнала аналита в чистом растворителе (solvent-spike sample, N=6). Нормированный матричный фактор (non-negative matrix factorization – NMF) рассчитывали как отношение нормированного на IS значения площади пика кукурбитацина В в биоматериале на усредненное значение отношения нормированного на будесонид значения площади пика аналита в стандартном растворе. Приемлемые значения относительного стандартного отклонения  $CV < 15\%$  для NMF (см. табл. 3) показывают, что используемый в качестве внутреннего стандарта будесонид эффективно компенсирует влияние матрицы на сигнал

кукурбитацина В и что присутствие матричных компонентов не будет отражаться на точности определения при анализе реальных образцов.

Определение степени извлечения кукурбитацина В проводили для концентрации 100 нг/мл в 6 индивидуальных образцах плазмы крови и гомогенатов органов мышей. Степень извлечения была рассчитана как отношение сигнала в экстрагированном образце (pre-spike sample) к сигналу в неэкстрагированном образце (post-spike sample). Результаты определения степени извлечения представлены в табл. 4. Средняя степень извлечения аналитов находится в пределах 97,92–109,27%, максимальный разброс (CV) 11,35%, что свидетельствует о практически количественном извлечении кукурбитацина В из биоматериала.

Оценку внутри-и межсерийной точности и прецизионности определения кукурбитацина В проводили в 3 независимых сериях путем анализа 5 контрольных образцов для 4 уровней концентрации: 10,0 (LLOQ); 22,5 (контрольный образец с низкой концентрацией аналита – LQC); 900,0 (контрольный образец со средней концентрацией аналита – MQC); 1800,0 (контрольный образец с высокой концентрацией аналита – HQC) нг/мл. Точность была определена как отношение рассчитанной концентрации в контрольном образце к номинальному значению, выраженное в процентах. Прецизионность определяли как CV между результатами определения кукурбитацина В в контрольных образцах, выраженное в процентах. Критериями приемлемости для концентрации на уровне LLOQ считали точность в диапазоне 80–120%, прецизионность –  $\pm 20\%$ ; для концентраций выше LLOQ – точность в диапазоне 85–115%, прецизионность –  $\pm 15\%$ . Полученные результаты показывают, что значения межсерийной точности и прецизионности соответствуют указанным критериям (табл. 5).

Для оценки переноса веществ во время хроматографического анализа сравнивали хроматограммы холостых проб, которые проанализированы после

6-кратного ввода образца с высокой концентрацией кукурбитацина В (2000 нг/мл), с хроматограммами образцов с содержанием аналита на уровне LLQC. По результатам анализа установлено, что отношения площадей пиков в холостых образцах к площадям

пиков в образцах LLQC был ниже максимально допустимого уровня (20% для аналита и 5% – для IS).

Результаты оценки стабильности подтвердили сохранность исходных и рабочих растворов кукурбитацина В и будесонида в течение 1 мес. Контрольные образцы, полученные путем добавления к плазме

Таблица 5

## Точность и прецизионность определения кукурбитацина В в плазме крови и гомогенатах органов мышей

Биологический материал и статистические параметры				
Плазма крови				
Аналитический диапазон, нг/мл		10,0–2000,0		
Уравнение регрессии; $r^2$		$y=0,0037x+0,0124$ ; 0,9990		
Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day)				
Образец	LLQC	LQC	MQC	HQC
Номинальная концентрация, нг/мл	10,0	22,5	900,0	1800,0
Среднее значение по 3 сериям, нг/мл	10,06	21,67	975,47	1854,67
SD	0,03	0,73	58,95	130,14
Точность, %	100,56	96,30	108,39	103,04
CV, %	0,27	3,37	6,04	7,02
Гомогенат печени				
Аналитический диапазон, нг/мл		10,0–2000,0		
Уравнение регрессии; $r^2$		$y=0,00409x-0,0165$ ; 0,9996		
Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day)				
Образец	LLQC	LQC	MQC	HQC
Номинальная концентрация, нг/мл	10,0	22,5	900,0	1800,0
Среднее значение по 3 сериям, нг/мл	9,97	22,42	965,93	1820,00
SD	0,18	1,07	45,02	131,15
Точность, %	99,67	99,64	107,33	101,11
CV, %	1,78	4,79	4,66	7,21
Гомогенат почек				
Аналитический диапазон, нг/мл		10,0–2000,0		
Уравнение регрессии; $r^2$		$y=0,00432x+0,00956$ ; 0,9986		
Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day)				
Образец	LLQC	LQC	MQC	HQC
Номинальная концентрация, нг/мл	10,0	22,5	900,0	1800,0
Среднее значение по 3 сериям, нг/мл	9,95	21,67	940,40	1812,00
SD	0,18	1,64	45,61	130,05
Точность, %	99,47	96,30	104,49	100,67
CV, %	1,82	7,58	4,85	7,18
Гомогенат сердца				
Аналитический диапазон, нг/мл		10,0–2000,0		
Уравнение регрессии; $r^2$		$y=0,00383x+0,0222$ ; 0,9979		
Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day)				
Образец	LLQC	LQC	MQC	HQC
Номинальная концентрация, нг/мл	10,0	22,5	900,0	1800,0
Среднее значение по 3 сериям, нг/мл	10,01	22,50	951,00	1804,00
SD	0,17	1,11	10,49	161,03
Точность, %	100,11	100,00	105,67	100,22
CV, %	1,71	4,95	1,10	8,93

крови и гомогенатам печени, почек и сердца мышей рабочих растворов до достижения высоких и низких концентраций кукурбитаина *B*, были стабильны в течение 8 ч при комнатной температуре. При повторном анализе таких образцов площадь хроматографических пиков не отличалась от первоначальных значений более чем на 15%. Оценка постпрепаративной стабильности подтвердила сохранность готовых для хроматографического анализа проб в течение 1 сут (максимальное время анализа всех образцов, находящихся в автосамплере хроматографа). Стабильность кукурбитаина *B* также была подтверждена после 3 циклов заморозки/разморозки образцов. Для низких и высоких концентраций изменение площади хроматографических пиков при повторном анализе таких образцов не вышло за пределы 15%.

Таким образом, на I этапе была разработана биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения кукурбитаина *B* в плазме крови и гомогенатах печени, почек и сердца мышей, которая полностью соответствует валидационным требованиям.

На II этапе данную методику применяли для оценки концентрации кукурбитаина *B* в крови мышей. На этом этапе проведена оценка содержания в крови лабораторных животных кукурбитаина *B*. На основании результатов определения кукурбитаина *B* в плазме крови мышей после однократного внутрижелудочного введения аврана лекарственного экстракта в дозе 220,0 мг/кг выявлено, что во всех анализируемых образцах уровень сигнала находится ниже LLOQ. Полученные данные не позволяют оценить фармакокинетику компонентов экстракта аврана модельным методом. Однако наличие сигналов от анализируемых веществ LLOQ, но превышающие предел детекции и отсутствие таковых в холостых образцах позволяет предположить абсорбцию этих веществ из желудочно-кишечного тракта мышей.

**Обсуждение.** На основании результатов определения кукурбитаина *B* в плазме крови и гомогенатах почек, печени и сердца мышей после однократного внутрижелудочного введения аврана лекарственного экстракта в дозе 220,0 мг/кг выявлено, что во всех анализируемых образцах для всех аналитов уровень сигнала находится ниже LLOQ [19]. Полученные данные не позволяют оценить фармакокинетику компонентов экстракта аврана с использованием модельных методов. Однако наличие сигналов от анализируемых веществ ниже LLOQ, но выше условного предела детекции (соотношение «сигнал/шум» более 3:1) и отсутствие таковых в холостых образцах позволяет сделать предположение об абсорбции этих веществ из желудочно-кишечного тракта мышей. Вероятно, применение экстракта аврана у мышей в дозах, значительно превышающих 220,0 мг/кг, позволит получить результаты количественного определения кукурбитаина *B*, пригодные для оценки фармакокинетики.

Так, анализ результатов скрининговой оценки содержания анализируемых компонентов экстракта аврана в плазме крови мышей через 1,5 ч после внутрижелудочного введения препарата в дозе 1000,0 мг/кг показал, что концентрации для кукурбитаина *B* в данных условиях не удалось достичь уровня хроматографического сигнала, превышающего таковой в пробе LLOQ.

**Заключение.** Для изучения фармакокинетики компонентов экстракта аврана лекарственного разработана биоаналитическая методика определения кукурбитаина *B* в плазме крови мышей с помощью ВЭЖХ-МС/МС, подобраны параметры идентификации

кукурбитаина *B*. Валидация включала определение внутрисерийной точности и прецизионности (в течение 1 аналитической серии с использованием 5 параллельных проб) и межсерийной точности и прецизионности (в течение 3 последовательных аналитических серий в разные дни). Для всех калибровочных стандартов и контрольных образцов отклонение от номинальной концентрации (точность) не превышало 15% (20% – для LLOQ). Значения внутри-и межсерийной прецизионности не превышали 15%, что демонстрирует приемлемую прецизионность метода ВЭЖХ-МС/МС. В рамках валидации также изучено влияние матрицы на определение и извлечение аналитов в плазме крови мышей путем анализа образцов, приготовленных в 5 различных источниках матрицы. Относительное стандартное отклонение нормированного матричного фактора (*CV*) и степени извлечения (*Recovery*) не превышало 15% для всех изученных матриц и аналитов, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния матрицы на точность и прецизионность определения и извлечения аналитов.

LLOQ для кукурбитаина *B* составил 10,0 нг/мл, при этом диапазон определяемых концентраций 10,0–2000,0 нг/мл.

Однако применение данной методики невозможно для количественного определения кукурбитаина *B* в крови в неизменном виде.

На основании результатов определения кукурбитаина *B* в плазме крови мышей после однократного внутрижелудочного введения аврана лекарственного экстракта в дозе 220,0 мг/кг выявлено, что во всех анализируемых образцах для всех аналитов уровень сигнала находится ниже LLOQ. Полученные данные не позволяют оценить фармакокинетику компонентов экстракта аврана с использованием модельных методов. Вместе с тем наличие сигналов от анализируемых веществ ниже LLOQ, но выше условного предела детекции (соотношение «сигнал/шум» более 3:1) и отсутствие таковых в холостых образцах. Именно поэтому для определения фармакокинетических параметров кукурбитаина *B* необходим поиск других аналитов – метаболитов кукурбитаина *B*, и, как следствие, констатируется отсутствие возможности построения фармакокинетической кривой кукурбитаина *B* для высоких концентраций кукурбитаина *B* при пероральном введении.

Метрологические характеристики методики позволяют использовать ее для проведения аналитической части фармакокинетических исследований как препаратов индивидуальных веществ, так и различных растительных экстрактов.

**Вклад авторов.** Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соответствие принципам этики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках тематики государственного задания «Разработка нового противоопухолевого препарата на основе Аврана лекарственного для дополнения к стандартной терапии при злокачественных новообразованиях мочеполювых органов III и IV стадий» Минздрава России №056-00059-25-02 от 31.03.2025.

## References (Список источников)

- Polukonova NV, Maslyakova GN, Navolokin NA, et al. Biological activity of extract from *Gratiola officinalis* and its components. Saratov: Saratov State Medical University, 2022; 354 p. (In Russ.) Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Наволокин Н.А. и др. Биологическая активность экстракта аврана лекарственного и его компонентов. Саратов: Сарат. гос. мед. ун-т, 2022; 354 с.
- Adhikary A, Das S, Bhattacharjee M. Terpenoids in cancer treatment, Chapter: 7. In: Roy DN (Ed.) Terpenoids against human diseases. Bota Racon: CRC Press, Taylor & Francis, 2019; p. 177-84.
- Ul Haq F, Ali A, Khan MN, et al. Metabolite profiling and quantitation of cucurbitacins in *Cucurbitaceae* plants by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Sci Rep. 2019;9(1):15992. DOI:10.1038/s41598-019-52404-1
- Jing S, Zou H, Wu Z, et al. Cucurbitacins: Bioactivities and synergistic effect with small-molecule drugs. J Functional Foods. 2020;72:104042. DOI:10.1016/j.jff.2020.104042
- Varela C, Melim C, Neves BG, et al. Cucurbitacins as potential anticancer agents: new insights on molecular mechanisms. J Transl Med. 2022;20(1):630. DOI:10.1186/s12967-022-03828-3
- Silvestre GFG, de Lucena RP, da Silva Alves H. Cucurbitacins and the immune system: Update in research on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory mechanisms. Curr Med Chem. 2022;29(21):3774-89. DOI:10.2174/0929867329666220107153253
- Tannin-Spitz T, Bergman M, Grossman S. Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. Biochem Biophys Res Commun. 2007;364(1):181-6. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.09.075
- Liu Z, Kumar M, Kabra A. Cucurbitacin B exerts neuroprotection in a murine Alzheimer's disease model by modulating oxidative stress, inflammation, and neurotransmitter levels. Front Biosci (Landmark Ed). 2022;27(2):71. DOI:10.31083/j.fbl2702071.
- Hernández Navia SE, Figueroa-Hernández JL, Rodríguez-Zavala JS, et al. Anti-diabetic effects of cucurbitacins from *Ibervillea lindheimeri* on induced mouse diabetes. J Chem. 2022;2022:1-15. DOI:10.1155/2022/3379557
- Kapoor N, Ghorai SM, Kushwaha PK, et al. Plausible mechanisms explaining the role of cucurbitacins as potential therapeutic drugs against coronavirus 2019. Inform Med Unlocked. 2020;21:100484. DOI:10.1016/j.imu.2020.100484
- Malik S, Rodriguez A, Sikander M, et al. Cucurbitacin D modulates the Nrf2 signaling pathway and protects against benzo[a]pyrene-induced liver injury. Canc Res. 2023;83(Suppl. 7):5264. DOI:10.1158/1538-7445.AM2023-5264
- Dai S, Wang C, Zhao X, et al. Cucurbitacin B: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics. Pharmacol Res. 2023;187:106587. DOI:10.1016/j.phrs.2022.106587
- Yuan R, Zhao W, Wang QQ, et al. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer *in vivo* and *in vitro* by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis. Pharmacol Res. 2021;170:105748. DOI:10.1016/j.phrs.2021.105748
- Zhang H, Zhao B, Wei H, et al. Cucurbitacin B controls M2 macrophage polarization to suppresses metastasis via targeting JAK-2/STAT3 signalling pathway in colorectal cancer. J Ethnopharmacol. 2022;287:114915. DOI:10.1016/j.jep.2021.114915
- Xu J, Chen Y, Yang R, et al. Cucurbitacin B inhibits gastric cancer progression by suppressing STAT3 activity. Arch Biochem Biophys. 2020;684:108314. DOI:10.1016/j.abb.2020.108314
- Klungsang S, Kukongviriyapan V, Prawan A, et al. Targeted modulation of FAK/PI3K/PDK1/AKT and FAK/p53 pathways by cucurbitacin B for the antiproliferation effect against human cholangiocarcinoma cells. Am J Chin Med. 2020;48(6):1475-89. DOI:10.1142/S0192415X2050072X
- Kusagawa E, Okuda C, Yamaguchi R, et al. Cucurbitacin B down-regulates TNF receptor 1 expression and inhibits the TNF- $\alpha$ -dependent nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. Int J Mol Sci. 2022;23(13):7130. DOI:10.3390/ijms23137130
- Cheng WX, Liu YZ, Meng XB, et al. PLGA/ $\beta$ -TCP composite scaffold incorporating cucurbitacin B promotes bone regeneration by inducing angiogenesis. J Orthop Translat. 2021;31:41-51. DOI:10.1016/j.jot.2021.10.002
- Xiao Y, Zhao Q, Wu Q, et al. A new sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of cucurbitacin B in rat plasma: application to an absolute bioavailability study. RSC Adv. 2018;8(54):30978-85. DOI:10.1039/c8ra05941a
- Hu G, Liu W, Li L. Identification and quantification of cucurbitacin in watermelon frost using molecular networking integrated with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Sep Sci. 2023;46(16):e2300019. DOI:10.1002/jssc.202300019

Статья поступила в редакцию 05.11.2025; одобрена после рецензирования 18.11.2025; принята к публикации 20.11.2025. The article was submitted 05.11.2025; approved after reviewing 18.11.2025; accepted for publication 20.11.2025.

## Информация об авторах:

**Юлия Андреевна Фомина** – заведующая кафедрой общей, биоорганической и фармацевтической химии, начальник лаборатории по исследованию и контролю качества лекарственных средств, доцент, кандидат химических наук, fominaya@mail.ru, ORCID 0000-0001-7853-0333; **Наталья Борисовна Шестопалова** – доцент кафедры общей, биоорганической и фармацевтической химии, доцент, кандидат химических наук, shestopalovanb@yandex.ru, ORCID 0000-0002-4254-9478; **Татьяна Юрьевна Калюта** – директор научно-образовательного центра клинических и биомедицинских исследований, доцент, кандидат медицинских наук, tatiyakaluta@yandex.ru, ORCID 0000-0003-3172-0804; **Анастасия Анатольевна Кенжегулова** – старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии, kotech@mail.ru, ORCID 0000-0002-8698-6135; **Никита Сергеевич Попов** – доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, кандидат фармацевтических наук, ns.popov@mail.ru, ORCID 0000-0002-1792-7414; **Ирина Сергеевна Сивас** – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, sivasis@tvgtu.ru, ORCID 0009-0000-8683-7319; **Александр Сергеевич Федонников** – проректор по научной работе, директор Института общественного здоровья, здравоохранения и гуманитарных проблем медицины, доцент, доктор медицинских наук, fedonnikov@mail.ru, ORCID 0000-0003-0344-4419.

## Information about the authors:

**Yulia A. Fomina** – Head of the Department of General, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry, Head of Laboratory for Research and Quality Control of Medicines, Associate Professor, PhD, fominaya@mail.ru, ORCID 0000-0001-7853-0333; **Natalia B. Shestopalova** – Assistant Professor of the Department of General, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry, Associate Professor, PhD, shestopalovanb@yandex.ru, ORCID 0000-0002-4254-9478; **Tatyana Yu. Kalyuta** – Director of the Scientific and Educational Center for Clinical and Biomedical Research, Associate Professor, PhD, tatiyakaluta@yandex.ru, ORCID 0000-0003-3172-0804; **Anastasia A. Kenzhegulova** – Senior Lecturer of the Department of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, kotech@mail.ru, ORCID 0000-0002-8698-6135; **Nikita S. Popov** – Assistant Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, PhD, ns.popov@mail.ru, ORCID 0000-0002-1792-7414; **Irina S. Sivas** – Junior Researcher of the Research Laboratory, Instructor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, sivasis@tvgtu.ru, ORCID 0009-0000-8683-7319; **Alexander S. Fedonnikov** – ViceRector for Research, Director of the Institute of Public Health and Humanitarian Problems of Medicine, Associate Professor, DSc, fedonnikov@mail.ru, ORCID 0000-0003-0344-4419.