

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.171.7
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-92-95>

Поступила в редакцию 26.11.2018
Received 26.11.2018

Н. А. Копылова, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Ламан

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИНА В КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Аннотация. Разработана воспроизводимая методика, позволяющая с достаточной степенью точности оценивать содержание кинетина в различных препаратах. Методика может быть использована для исследований в области физиологии и биохимии растений, в медицине и молекулярной биологии.

Ключевые слова: регуляторы роста, кинетин, высокоэффективная жидкостная хроматография

Для цитирования: Копылова, Н. А. Количественное определение кинетина в коммерческих препаратах методом ВЭЖХ / Н. А. Копылова, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Ламан // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. навук. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 92–95. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-92-95>

N. A. Kopylova, J. N. Kalatskaya, N. A. Laman

V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

QUANTITATIVE DETERMINATION OF KINETIN IN COMMERCIAL PREPARATIONS BY HPLC

Abstract. A reproducible method has been developed that allows for a sufficient degree of accuracy to estimate the kinetin content in various preparations. The technique can be used for research in the field of plant physiology and biochemistry, medicine, and molecular biology.

Keywords: growth regulators, kinetin, high performance liquid chromatography

For citation: Kopylova N. A., Kalatskaya J. N., Laman N. A. Quantitative determination of kinetin in commercial preparations by HPLC. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 92–95 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-92-95>

Введение. Исследование цитокининов, которые представляют собой важнейшую группу фитогормонов, является весьма значимой областью физиологии и биохимии растений. Цитокинины играют основополагающую роль в процессах деления и стимуляции дифференциации клеток, образования хлорофиллов, созревания семян, репродуктивного развития, снятия апикального доминирования и т. д. Одним из наиболее перспективных синтетических аналогов, который может быть использован в качестве компонента для создания эффективных регуляторов роста декоративных и сельскохозяйственных растений, а также фармацевтических и косметических препаратов, является кинетин, который обладает высокой цитокининовой активностью. Впервые он был обнаружен в автоклавированных препаратах ДНК и идентифицирован как N⁶-фурфуриламинопурин. Природные цитокинины также являются N⁶-замещенными производными аденина [1]. Имеются данные, свидетельствующие о способности кинетина и других цитокининов уменьшать рост некоторых видов опухолевых клеток человека [2, 3]. В последние годы кинетин широко применяют при производстве косметики, замедляющей старение кожи [4, 5].

Рост рынка производства регуляторов роста растений (биостимуляторов), перспектива использования цитокининов в терапии злокачественных опухолей, а также его применения в составе антивозрастных косметических средств обусловили необходимость разработки данной методики.

Цель исследования – разработка воспроизводимой методики, позволяющей с достаточной степенью точности оценивать содержание кинетина в различных препаратах.

Материалы и методы исследования. *Оборудование:* хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Германия) с насосом LPG-3400SD, автосамплером ACC-3000, детектором DAD-3000RS, C_{18} -колонкой Acclaim™120 (4,6×150 мм), размер частиц 5 мкм. Фильтры Whatman 0,2 мкм PP w/GMF 13 мм, картридж C_{18} Sep-Pak (Waters Ass., Milford).

Реактивы: стандарт кинетина (Sigma-Aldrich, чистота 99,0 %), метанол (LiChrosolv., Merck), вода I типа (система очистки Merck Millipore), ортофосфорная кислота (Sigma-Aldrich, чистота более 99,0 %).

Приготовление стандартов: 0,04 г стандарта кинетина растворяли в воде, подкисленной ортофосфорной кислотой до pH 3,0, и доводили до 100 мл. Данный раствор использовали как исходный для приготовления пяти стандартных растворов от 4 до 400 мкг/мл. Все стандартные растворы фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм и использовали для анализа методом ВЭЖХ.

Подготовка образцов: жидкий препарат МАКРОФИТУМ (Регулятор роста растений «МАКРОФИТУМ, ВС», ТУ ВУ 100029064.007-2018) фильтровали под вакуумом через мембрану с диаметром пор 0,2 мкм (CHMLab Group) для избавления от бактериальной суспензии, затем пропускали через картридж C_{18} Sep-Pak. Кинетин элюировали 10 мл смеси растворителей метанол:вода, подкисленная ортофосфорной кислотой до pH 3,0 (v/v 60:40), после чего пробу использовали для проведения анализа методом ВЭЖХ.

Условия ВЭЖХ-анализа. Для определения содержания кинетина использовали метод обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме. Состав подвижной фазы: метанол:вода, подкисленная ортофосфорной кислотой до pH 3,0 (v/v 40:60). Скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 30 °С, объем инъекционной петли – 20 мкл.

Пик кинетина идентифицировали по сопоставлению времени удерживания с пиком стандарта, а также спектров поглощения стандарта и предполагаемого пика кинетина. Концентрацию кинетина определяли методом абсолютной калибровки. Калибровочную зависимость определяли по 5 точкам (4, 40, 100, 240, 400 мкг/мл), для каждой точки выполнено по 5 измерений.

Результаты и их обсуждение. Разработанная методика позволяет идентифицировать и количественно оценивать содержание кинетина в составе препаратов-регуляторов роста растений и других препаративных формах, где присутствует кинетин. Аналитические характеристики методики приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Характеристики методики определения кинетина методом ВЭЖХ

Table 1. Characteristics of the method for kinetin determining by HPLC

| Время удерживания | | Уравнение калибровочного графика | R^2 | Диапазон линейности, мкг/мл | Предел детектирования, мкг/мл ($S/N = 3$) | Предел количественного определения, мкг/мл ($S/N = 10$) |
|-------------------|---------------------------|----------------------------------|--------|-----------------------------|---|---|
| Значение, мин | Отн. станд. отклонение, % | | | | | |
| 3,72 ± 0,024 | 0,17 | $y = 0,092x - 0,1185$ | 0,9998 | 4–400 | 0,1 | 1,0 |

Линейность отклика детектора оценивали, анализируя рабочие стандартные растворы различной концентрации. Пределы детектирования и количественного определения установлены путем подбора минимальных концентраций кинетина, при которых соотношения сигнал/шум (S/N) равны 3 и 10 соответственно.

В табл. 2 представлен анализ точности определения содержания кинетина методом добавок, когда к стандарту известной концентрации добавляется определенное количество того же вещества, после чего проводится анализ его суммарной концентрации. Известно, что аналитический метод является точным, если он дает правильное числовое значение для анализируемого вещества (масса или концентрация) и может быть описан как степень близости измерения к действительному значению [6].

Полученные данные свидетельствуют о пригодности данной методики, поскольку она позволяет с удовлетворительной степенью точности определять исследуемое вещество.

Т а б л и ц а 2. Метрологический анализ методики определения содержания кинетина методом добавок

T a b l e 2. Metrological analysis of technique of the kinetin content determination by the method of additives

| Добавлено кинетина, мкг | Должно быть найдено, мкг | Найдено, мкг | Стандартное отклонение | Стандартная ошибка | Отн. стандартное отклонение, % |
|-------------------------|--------------------------|--------------|------------------------|--------------------|--------------------------------|
| 50 + 0 | 50,0 | 50,86 | 0,56 | 0,25 | 1,0 |
| 50 + 85 | 135,0 | 135,53 | 2,16 | 0,97 | 1,5 |
| 50 + 195 | 245,0 | 243,54 | 2,23 | 0,99 | 1,0 |

Для оценки сходимости и воспроизводимости результатов были приготовлены три стандартных раствора различной концентрации. Результаты представлены в табл. 3. Для растворов с концентрациями 10, 35 и 100 мкг/мл сделано 14, 9 и 6 инъекций соответственно.

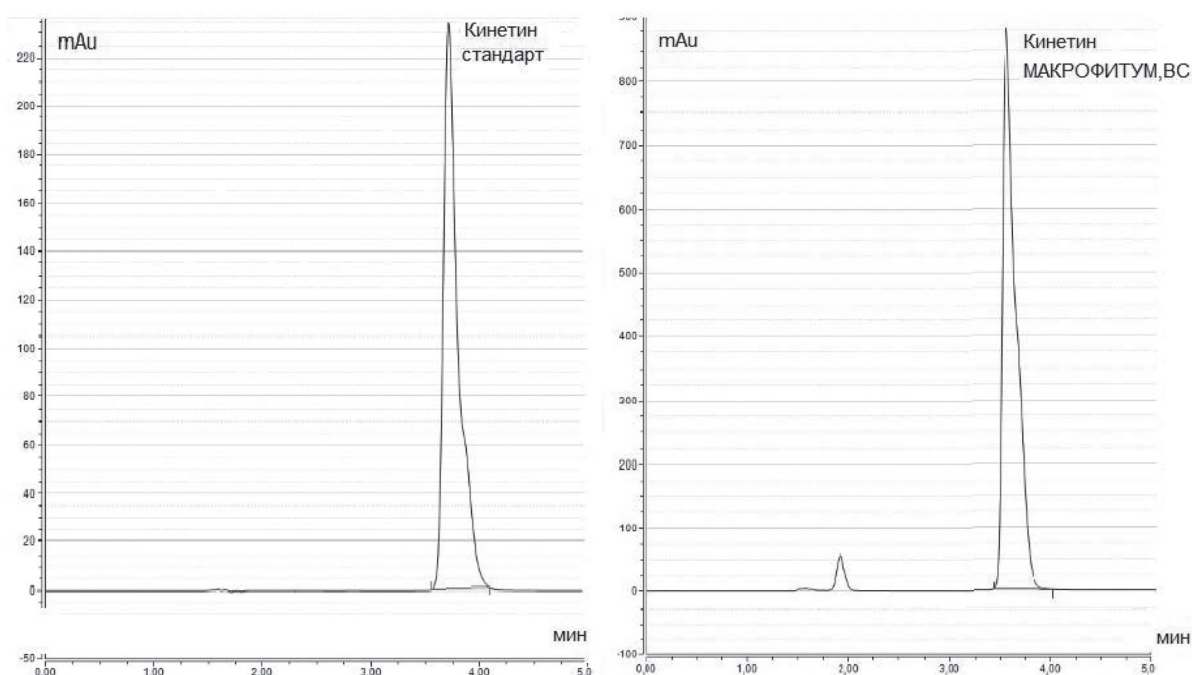
Т а б л и ц а 3. Воспроизводимость результатов анализа растворов стандарта кинетина различной концентрации

T a b l e 3. Reproducibility of results of analysis of standard kinetin solutions of different concentrations

| Концентрация, мкг/мл | Площадь пика, мAu·мин | Стандартное отклонение | Стандартная ошибка | Отн. стандартное отклонение, % |
|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------------------|
| 10 | 0,9706 | 0,0073 | 0,002 | 0,76 |
| 35 | 3,1192 | 0,0215 | 0,007 | 0,69 |
| 100 | 21,6559 | 0,06556 | 0,027 | 0,30 |

Относительное стандартное отклонение площадей пиков составило от 0,3 до 0,76 %, что соответствует требованиям, предъявляемым к точности биохимических анализов [7]. Для времени удерживания (t_R) стандарта кинетина эта величина составляет 0,17 % (см. табл. 1).

Анализ содержания кинетина в препарате МАКРОФИТУМ, ВС. Регулятор роста растений МАКРОФИТУМ, ВС (ТУ ВУ 100029064.007-2018) содержит ряд биологически активных соединений, одним из которых является кинетин. МАКРОФИТУМ предназначен для стимуляции роста и развития цветочных культур, увеличения количества бутонов и цветков на растении, усиления яркости и свежести окраски комнатных цветов, повышения декоративности цветущих клумб и газонов, ускорения зацветания и увеличения продолжительности цветения.



Хроматограммы стандарта кинетина и препарата МАКРОФИТУМ, ВС
The chromatograms of kinetin standard and drug MACROFITUM, VS

Нами проведен анализ препарата методом ВЭЖХ, идентифицирован пик кинетина по сопоставлению времени удерживания с пиком стандарта, а также спектров поглощения стандарта и предполагаемого пика кинетина. На рисунке представлены хроматограммы стандарта кинетина и препарата МАКРОФИТУМ, ВС.

Заклучение. В результате проведенных исследований разработана воспроизводимая методика, позволяющая с достаточной степенью точности оценивать содержание кинетина в различных коммерческих препаратах.

Исследования по созданию новых препаратов для растениеводства, медицины и косметологии будут продолжаться, поэтому разработка относительно несложной, быстрой и точной методики количественного анализа кинетина в различных коммерческих препаративных формах является актуальной задачей. Методика может быть использована в области агрохимии, физиологии и биохимии растений, медицине и молекулярной биологии.

Список использованных источников

1. Ботаника : учебник для вузов : в 4 т. / П. Зитте [и др.]. – М. : Академия, 2007–2008. – Т. 2 : Физиология растений / под ред. В. В. Чуба. – 2008. – 496 с.
2. Antiproliferative effect on plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases / K. Vermeulen [et al.] // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16, N 3. – P. 299–305. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402378>
3. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues / J. Veselý [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 224, N 2. – P. 771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>
4. Katz, B. E. Efficacy and tolerability of kinetin 0.1% cream for improving the signs of photoaging in facial and neck skin / B. E. Katz, M. S. Bruck // *Cosmet. Dermatol.* – 2006. – Vol. 19, N 12. – P. 736–741.
5. Kinetin containing lotion compared with retinol containing lotion: Comparable improvements in the signs of photoaging / M. S. Dickens [et al.] // *American Academy of Dermatology. 60th Annual Meeting*. – New Orleans, 2002. – P. 28.
6. Сычев, К. С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – М. : Техносфера, 2010. – 272 с.
7. Аналитическая хроматография / К. И. Сакодынский [и др.]. – М. : Химия, 1993. – 464 с.

References

1. Sitte P., Weiler E. W., Kadereit J. W., Bresinsky A., Körner K. *Strasburger Lehrbuch der Botanik. 35. Auflage*. Berlin, Spektrum akademischer verlag heidelberg, 2002. 1123 S. (Russ. ed.: Sitte P., Weiler E. W., Kadereit J. W., Bresinsky A., Körner K. *Botanik. Vol. 2. Pflanzenphysiologie*. Moscow, Akademiya Publ., 2008. 496 p.).
2. Vermeulen K., Strnad M., Kryštof V., Havlíček L., Lenjou M., Nijls G. [et al.]. Antiproliferative effect on plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia*, 2002, vol. 16, no. 3, pp. 299–305. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402378>
3. Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella D. A., Pinna L. [et al.]. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry*, 1994, vol. 224, no. 2, pp. 771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>
4. Katz B. E., Bruck M. S. Efficacy and tolerability of kinetin 0.1% cream for improving the signs of photoaging in facial and neck skin. *Cosmetic Dermatology*, 2006, vol. 19, no. 12, pp. 736–741.
5. Dickens M. S., Levy S. B., Helman M. D., Nucci J. E. Kinetin containing lotion compared with retinol containing lotion: Comparable improvements in the signs of photoaging. *American Academy of Dermatology. 60th Annual Meeting*. New Orleans, 2002, p. 28.
6. Sychev K. S. *A practical guide to liquid chromatography*. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2010. 272 p. (in Russian).
7. Sakodinskii K. I., Brazhnikov V. V., Volkov S. A., Zel'enskii V. Yu. *Analytical chromatography*. Moscow, Khimiya Publ., 1993. 464 p.

Информация об авторах

Копылова Наталья Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natal.kopylova.68@mail.ru

Калацкая Жанна Николаевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kalatskayaj@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Information about the authors

Natalia A. Kopylova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natal.kopylova.68@mail.ru

Joanna N. Kalatskaya – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kalatskayaj@mail.ru

Nikolai A. Laman – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com