ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 3, с. 282–285

УДК 581.192.2

БИОСИНТЕЗ ДИАЛКИЛОВЫХ ЭФИРОВ *орто*-ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТЕНИЯХ И В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

© 2019 г. А. Г. Еникеев[1], А. А. Семенов[1, *], А. В. Пермяков[1], Н. А. Соколова[1], К. З. Гамбург[1], Л. В. Дударева[1]

[1]*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033, Россия*

**e-mail: laps1936@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.04.2018 г.
После доработки 21.09.2018 г.
Принята к публикации 18.12.2018 г.

Исследовано наличие сложных эфиров орто-фталевой кислоты в интактных растениях, в растениях *in vitro*, и культурах клеток. Выявлено, что все исследованные растительные объекты продуцируют фталевые эфиры в значительных количествах. Таким образом, биосинтез этих веществ является общим свойством растительного мира. Попадая в окружающую среду, они создают природный фон, независимо от возможных техногенных загрязнений.

Ключевые слова: сложные эфиры *орто*-фталевой кислоты, биосинтез, растения, культуры клеток

DOI: 10.1134/S0555109919020065

Сложные эфиры орто-фталевой кислоты производятся химической промышленностью и широко используются во всем мире как пластификаторы пластических масс и ингредиенты косметических средств [1]. В то же время – это природные вещества, о нахождении которых в живых объектах сообщалось многими исследователями. Первое, известное авторам, сообщение об обнаружении фталатов в растениях датируется 1892 г., т.е. задолго до начала их промышленного производства [2]. К началу 70 гг. прошлого века эти соединения были обнаружены в винограде, маке, землянике, табаке, оливковом, кукурузном и эвкалиптовом маслах, грибах, рыбе, сердце и гипофизе быка [3]. Оптически активный ди-2R-этилгексилфталат присутствует в неочищенном тростниковом сахаре [4]. В последующие годы фталаты как вещества природного происхождения были неоднократно выделены из различных биологических объектов [5–7]. Орто-фталаты обладают широким спектром биологической активности [8–10], на их основе разработан ряд новых высокоэффективных лекарственных средств [11, 12]. Несмотря на наличие большого объема данных, подтверждающих биогенное происхождение фталатов, в современной экологической литературе доминирует мнение рассматривающее присутствие этих соединений в живых объектах исключительно как результат техногенного загрязнения [13–15].

Цель работы – анализ присутствия сложных эфиров орто-фталевой кислоты в растительных объектах различного происхождения и уровня организации (растения *in situ*, растения *in vitro*, культуры клеток) с целью подтверждения возможности биогенного происхождения данных соединений.

МЕТОДИКА

Растительный материал. Для исследования растительный материал заготавливался в летние месяцы в Иркутской обл. и на Южном побережье Крыма (Россия) вдали от возможных техногенных загрязнений. Использовали хвою и листья древесных растений, произвольно выбранные травянистые растения различных таксономических групп, а также растения *in vitro* и культуры клеток из коллекции ЦКП “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

Подготовка и очистка химических реактивов. Все используемые органические растворители и материалы проверялись на присутствие в них фталатов. В случае наличия таковых в растворителях производилась очистка путем обработки щелочью с последующей промывкой водой, высушиванием и перегонкой. Для материалов, не подлежащих такой обработке, проводились холостые опыты. Использовали только стеклянную химическую посуду. Исключался контакт с пластическими массами.

Количественный анализ содержания фталатов. В качестве вспомогательного материала для количественного определения фталатов (освобождение от хлорофилла) использовали “окислитель”, приготовляемый встряхиванием хроматографическо-

го оксида алюминия (40–50 мкм) с 1%-ным ацетоновым раствором перманганата калия в соотношении 1 : 10 до исчезновения окраски надосадочной жидкости. После фильтрования светло-коричневый порошок промывали хлороформом и высушивали на воздухе.

Точные навески воздушно-сухих образцов измельчали до размеров частиц <0.5 мм и исчерпывающе экстрагировали легким петролейным эфиром. Экстракт медленно пропускали без отсасывания через ~1–1.5 см слой окислителя, промывали хлороформом и объединенные элюаты упаривали досуха. Остаток от перегонки переносили с помощью стандартного раствора в градуированный пикнометр и доводили до метки. В качестве внутреннего стандарта использовали гексановый раствор динонилфталата точно известной концентрации.

Растения *in vitro* и освобожденные от среды фильтрованием культуры клеток высушивали лиофильно на установке “Иней 3-2” (Россия). Точные навески полученных таким способом образцов исчерпывающе экстрагировали легким петролейным эфиром и обрабатывали как указано выше.

Анализ образцов проводили методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра 7000QQQ/7890A (“Agilent Technologies”, США). Объем вводимой пробы 0.2 мкл. Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, температура детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 50–800 а. е. м. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м × 0.250 мм × 0.50 мкм), с фазой 5%-ного фенил-метил-полисилоксана, градиент температуры: от 70 до 280°C со скоростью 5°C/мин, затем выдерживание при 280°C в течение 10 мин. Газ-носитель – гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Разделение потоков 5 : 1. Масс-спектрометр – тройной квадруполь, способ ионизации – электронный удар (энергия ионизации 70 эВ). Анализ проводили в режиме поиска отдельных ионов. Для идентификации целевых соединений использовали сравнение их времен удерживания с временами удерживания стандартов, а также с библиотекой масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количество фталевых эфиров определяли сравнением площадей хроматографических пиков с площадью пика внутреннего стандарта.

Опыты проводили трижды. В таблицах приведены средние значения по трем опытам и средняя квадратичная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех собранных в природных условиях растительных образцах обнаружены дибутил-*орто*-фталат (**ДБФ**) и ди-*орто*-2-этилгексифталат (**ДЭГФ**) в разных количествах и соотношениях (табл. 1). Аналогичные результаты ранее неоднократно были получены другими авторами [16]. О биогенном происхождении *орто*-фталатов в растениях свидетельствуют значительные вариации соотношений ДБФ и ДЭГФ у разных видов. Как поллютанты фталаты попадают в растения путем диффузии, следовательно, у растений разных видов, собранных в пределах одного узкого ареала, относительное содержание различных фталатов должно быть одинаковым.

Для полного исключения возможности загрязнения растительных тканей фталатами извне в качестве объектов исследования использовали закрытые модельные системы – растения *in vitro* и культуры клеток. Все компоненты сред предварительно проверяли на наличие фталатов. Примеси фталатов обнаружены во всех проверенных образцах сахарозы, включая реактивы высшей степени очистки (“ХЧ” и “for cell culture”). Ранее наличие значительных количеств оптически активного ДЭГФ было обнаружено в “желтом” сахаре [4]. Вероятно, данное соединение является плохо отделяемой природной примесью, что обуславливает его наличие в сахарозе. Для исключения загрязнения пробирочные растения и культуры клеток до начала экспериментов не менее трех пассажей выращивали на средах с глюкозой, не содержавшей фталатов. Остальные компоненты сред фталатов не содержали.

Во всех исследованных пробирочных растениях и в культурах клеток обнаружены *орто*-фталаты, при этом их качественный состав идентичен растениям *in situ* (табл. 2). Единственным источником этих соединений в закрытых системах может быть только их биосинтез. Показано, что ДЭГФ из культуры клеток борца байкальского оптически активен [17]. Таким образом, можно утверждать, что бытующее мнение о фталатах исключительно как о техногенных поллютантах нуждается в коррекции. Эти вещества в изобилии поступают в окружающую среду из царства растений.

Физиологические функции *орто*-фталатов неизвестны. Имеются лишь несколько сообщений описывающих некоторые физиологические эффекты действия этих соединений. ДБФ из корневых экссудатов бобовых участвует в отрицательном аллопатическом взаимодействии с клубеньковыми бактериями [18]. При опрыскивании растений пшеницы 1% раствором ДБФ наблюдали ингибирование дыхательной цепи митохондрий и индукцию апоптоза [19]. Однако в этих экспериментах использовали очень высокую, выходящую за рамки физиологических значений,

Таблица 1. Содержание сложных эфиров *o*-фталевой кислоты в растениях *in situ*, мкг/г сухой массы ($n = 3$)

Вид	ДБФ	ДЭГФ
Pleurozium schreberi Willd. Ex Brid	98 ± 3	19 ± 1
Marchantia polymorpha L.	11 ± 7	67 ± 3
Equisetum sylvaticum L. (весенний побег)	11 ± 1	27 ± 2
Equisetum sylvaticum L. (летний побег)	14 ± 2	19 ± 1
Licopodium clavatum L.	8 ± 1	37 ± 1
Athyrium filix-femia Roth et Mert	19 ± 1	9 ± 1
Gymnocarpium dryopteris (L.) Newman	12 ± 2	13 ± 2
Abies sibirica Lodeb.	33 ± 1	45 ± 3
Juniperus communis L.	32 ± 2	39 ± 1
Larix sibirica Lodeb.	11 ± 2	27 ± 2
Picea obovata Lodeb.	9 ± 1	44 ± 3
Pinus sibirica Du Tour	14 ± 1	43 ± 2
Pinus sylvestris L.	16 ± 2	23 ± 2
Pinus nigra subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe*	60 ± 1	66 ± 3
Pinus brutia var. *stankewiczii* (Sukaczev) Frankis*	32 ± 2	39 ± 1
Alnus alnobetula subsp. fruticose (Rupr.) Raus.	23 ± 1	55 ± 3
Betula platyphylla Sukaczev	8 ± 1	14 ± 2
Fagus sylvatica L. *	23 ± 2	32 ± 3
Magnolia grandiflora L. *	118 ± 5	14 ± 2
Pistacia atlantica subsp. *Mutica* (Fisch&C.A.Mey.) Rech.F.*	173 ± 4	43 ± 2
Populus tremula L. (листья)	21 ± 3	23 ± 2
Populus tremula L. (кора)	8 ± 1	12 ± 1
Quercus pubescens Willd*	74 ± 3	23 ± 3
Vibumum rhytidophyllum Hemsl*	23 ± 2	25 ± 3
Elodea canadensis Michx	22 ± 1	120 ± 2
Linaria vulgaris Mill.,	13 ± 1	89 ± 5
Myriophyllum sibiricum Kom	38 ± 2	158 ± 5
Allium victorialis L.	13 ± 3	5 ± 1
Paris quadrifolia L.	765 ± 5	360 ± 6
Triticum aestivum L. (этиолир.проростки)	42 ± 2	36 ± 3
Veratrum lobelianum Bernh	219 ± 9	56 ± 3

* Растения, собранные в южных районах Крыма.

Таблица 2. Содержание сложных эфиров орто-фталевой кислоты в растениях *in vitro* и культурах клеток, мкг/г сухой массы

Вид	ДБФ	ДЭГФ
Растения *in vitro*		
Nicotiana tabacum L.	47 ± 7	100 ± 11
Oxytropis triphylla (Pallas) Pers.	9 ± 6	18 ± 1
Solanum tuberosum L. (сорт Луговской)	50 ± 1	63 ± 2
Культуры клеток		
Aconitum baicalense Turcz. ex Rapaics	24 ± 2	332 ± 20
Aconitum barbatum Patr. ex Pers.	10 ± 2	246 ± 3
Nicotiana tabacum L.	15 ± 2	76 ± 4
Saussurea controversa DS	9 ± 1	124 ± 11
Scorzonera hispanica L.	85 ± 3	82 ± 2
Solanum tuberosum L. (сорт Луговской)	13 ± 2	43 ± 2

концентрацию фталата, что могло вызвать неспецифический ответ.

Изучение физиологической роли орто-фталатов в растениях позволит расширить знания о биохимических механизмах регуляции растительного метаболизма и взаимодействии растений с другими организмами.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП "Биоаналитика" Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мазитова А.К., Аминова Г.К., Маскова А.Р., Буйлова Е.А.* // Нефтегазовое дело. 2015. Т. 13. № 3. С. 83–86.
2. *Parry E.J.* Monographs on Essential Oils, London: Scott, Greenwood and Inc. (Londres), 1892. V. 1. P. 212–230.
3. *Graham P.R.* // Environmental Health Perspectives. 1973. V. 3. P. 3–11.
4. *Черных Е.А, Семенов А.А.* // Химия природных соединений. 1980. № 2. С. 247–248.
5. *Babu B., Wu J.T.* // Sciense of the Total Environment. 2010. V. 408. № 21 P. 4969–4975.
6. *Husein A.I., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Jondi W.J., Zatar N.A.A.* // International J. Current Research and Academic Review. 2014. V. 2. № 9. P. 195–203.
7. *Tian C., Ni J., Chang F., Liu S., Xu N., Sun W., Xie Y., Guo Y., Ma Y., Yang Z., Dang C., Huang Y., Tian Z., Wang Y.* // Scientific Repots. 2016. V. 6. 19791. doi 10.1038/srep19791
8. *Lee K.H., Kim J.H., Lim D.S., Kim, C.H.* // J. Pharmacy and Pharmacology. 2000. V. 52. № 5. P. 593–598.
9. *El-Sayed M.H.* // World Applied Sciences J. 2012. V. 20. P. 1202–1212.
10. *Rameshthangam P., Ramasamy P.* // Virus Research. 2007. V. 126. № 1. P. 38–44.
11. *Николаева И.Г., Хобракова В.Б., Баторова С.М., Николаева Г.Г., Николаев, С.М., Горшков А.Г., Верещагин А.Л., Парьева К.В., Монголов Х.П.* // Химико-фармацевтический журн. 2005. Т. 39. № 8. С. 37–40.
12. *Семенов А.А, Громова А.С., Луцкий В.И., Неретина О.В., Плотникова Ю.К., Малов И.В., Лязин А.Б.* 2008. Патент РФ. № 2322975.
13. *Азарова И.Н., Парфенова В.В., Барам Г.И., Теркина И.А., Павлова О.Н., Суслова М.Ю.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 6. С. 665–669.
14. *Крылов В.А., Волкова В.В.* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2014. № 1–2. С. 210–213.
15. *Niu L., Xu Y., Xu C., Yun L., Liu W.* // Environmental Pollution. 2014. V. 195. P. 16–23.
16. *Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Parvathaneni S.P., Koude D., Sripadi P., Misra S., Amanchy R., Upadhyayula S.M.* // EXCLI J. 2017. V. 16. P. 375–387.
17. *Семенов А.А., Еникеев А.Г., Снеткова Л.В., Пермяков А.В., Соколова Н.А., Дударева Л.В.* // Докл. РАН. 2016. Т. 471. № 3. С. 366–367.
18. *Макарова Л.Е., Дударева Л.В., Петрова И.Г., Васильева Г.Г.* // Прикл. биохимия микробиология. 2016 Т. 53. № 2. С. 217–222.
19. *Воробьев А.Л., Смирнова Е.Г., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С.* // Докл. РАН. 2005. 405. № 3. 412–415.

Biosynthesis of Ortho-Phtalic Acid Esters in the Plant and Cell Cultures

A. G. Enikeev[a], A. A. Semenov[a, *], A. V. Permyakov[a], N. A. Sokolova[a], K. Z. Gamburg[a], and L. V. Dudareva[a]

[a] *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch RAS, Irkutsk, 664033 Russia*

**e-mail: laps1936@mail.ru*

Received April 5, 2018; revised September 21, 2018; accepted December 18, 2018

It is investigated the biosynthesis of ortho-phtalic acid alkyl esters by the intact plants, *in vitro* plants and cell cultures. It is ascertained all of investigated objects produce phtalic esters in considerable quantities. Thus the biosynthesis of those substances is the common quality of the plant world. They are secreted in the environment and create the background of phthalate pollution independently of the possible technologic sources.

Keywords: ortho-phtalic acid esters, biosynthesis, plants, cell cultures