

ВЛИЯНИЕ УРБАНИЗАЦИИ НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (PINUSSYLVESTRIS L.)

Шавнин С.А.¹, Колтунов Е.В.¹, Яковлева М.И.¹

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук (620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202а), e-mail: kev@uran.ru

Методом хроматографического анализа (ВЭЖХ) изучено влияние аэротехногенного загрязнения от автотранспорта на состав и содержание фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Установлено, что вблизи автомагистрали содержание фенольных соединений у 53,7% фракций заметно возрастает, у 37,9% - снижается, и у 3,7% не изменяется. По идентифицированным фенольным соединениям получены сходные результаты. Активизация синтеза наблюдалась у 58,33% фракций, ингибирование - у 33,33%, нейтральная реакция - у 8,3%. В составе соединений с выраженным возрастанием активности синтеза преобладали фенолкарбоновые, гидроксикоричные кислоты и флавоноиды. В целом полученные нами результаты однозначно показали, что в зоне сильного аэротехногенного загрязнения (вблизи городских автомагистралей) биохимическая подсистема антиоксидантной защиты сосны обыкновенной, включающая низкомолекулярные фенольные соединения, функционирует достаточно эффективно, вследствие чего активность синтеза большей части этих соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, возрастает. Детально изучен состав фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), которые сохраняют высокую антиоксидантную активность в условиях аэротехногенного загрязнения.

Ключевые слова: хроматография, сосна обыкновенная, аэротехногенное загрязнение, фенольные соединения

THE INFLUENCE OF URBANIZATION ON THE COMPOSITION AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE NEEDLES OF PINUS SYLVESTRIS L.

Shavnin S.A.¹, Koltunov E.V.¹, Yakovleva M.I.¹

¹Botanical Garden Ural Department of Russian Academy of sciences (620144, Yekaterinburg, 8 march St., 202a), e-mail: kev@uran.ru

The effect of aerotechnogenic pollution from vehicles on the composition and content of phenolic compounds in the needles of *Pinus sylvestris* L. is studied with chromatographic analysis (HPLC). It was established that content of phenolic compounds near the highways in 53.7% fraction increases considerably from 37.9% - decrease, and 3.7% is not changed. Among the identified phenolic compounds we had similar results. Activation of the synthesis was observed in 58.33% of fractions, inhibition - at 33.33%, neutral reaction - at 8.3%. In compounds with a pronounced increase in the activity of synthesis prevailed phenolcarboxylic, hydroxycinnamic acids and flavonoids. Overall, our results clearly show that in the zone of strong contamination (near of urban highways) biochemical antioxidant protection *Pinus sylvestris* subsystem, including low molecular weight phenolic compound functions effectively, whereby the activity of the synthesis of most of these compounds have antioxidant properties, is increased. The composition of phenolic compounds in the needles of Scots pine *Pinus sylvestris* L., which preserve the high antioxidant activity in terms aerotechnogenic pollution studied in detail.

Keywords: chromatography, *Pinus sylvestris* L., aerotechnogenic pollution, phenolic compounds

Уровень антропогенного воздействия на городскую среду обитания постоянно возрастает. Это обусловлено ростом доли аэротехногенного загрязнения городской среды автомобильным транспортом, количество которого быстро возрастает, а также, сети автомобильных дорог. По этим причинам экологические условия для древесных растений в урбанизированной среде промышленных городов становятся все менее благоприятными [3,10,14,15].

Известно, что сорбция древесными растениями загрязняющих соединений в урбанизированной среде сопровождается их активной аккумуляцией и развитием

окислительного стресса у растений, который сопровождается интенсивной генерацией в клетках активных форм кислорода (АФК) [2,6,8,9,11,13,19-21,26].

Важным механизмом устойчивости в условиях промышленного загрязнения является активизация биохимической системы антиоксидантной защиты, включающая высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты. К высокомолекулярным антиоксидантам относится ряд ферментов, среди которых основная роль в элиминации АФК принадлежит супероксиддисмутазе (СОД), каталазе, пероксидазе. Низкомолекулярные антиоксиданты представлены разнообразными веществами, к числу которых относятся фенольные соединения (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и др.), и органические кислоты [4,17,20,24,25, 27, 29]. Они являются важнейшим компонентом антиоксидантной системы и в ряде случаев способны более эффективно осуществлять защиту организма от образующихся АФК.

Несмотря на то, что внимание исследователей к этой проблеме постоянно возрастает, до сих пор многие особенности функционирования антиоксидантной системы растений в условиях техногенного воздействия остаются неясными. В частности, остается невыясненной роль отдельных фенольных соединений в механизмах антиоксидантной защиты, так как многие авторы изучали изменения содержания общего количества всех фенольных соединений спектрофотометрическими методами, а не отдельных фенольных соединений [5,12]. Кроме того полученные результаты противоречивы. Исследование изменений состава и содержания различных фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной в условиях аэротехногенного загрязнения и было основной целью исследований.

Материалы и методы

Для хроматографического анализа проводился сбор хвои сосны обыкновенной, растущей вблизи наиболее загруженных автотранспортом городских автомагистралей г. Екатеринбурга (5 м). Контрольные пробы взяты в сосняках в 60 км от города в сходных лесорастительных условиях. Взятие каждой пробы осуществлялось от нескольких деревьев. Затем пробы смешивались для получения средней пробы. Сразу после сбора хвою высушивали при 60°C, затем размалывали. После этого навеску с 2 г смешивали с 20 мл 95% этанола. Экстракцию фенольных соединений из хвои проводили в обратном холодильнике на водяной бане в течение 30 мин при кипении раствора. После этого суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим УФ-детектором. Детектирование элюента осуществляли одновременно на двух полосах поглощения: 254 и 360 нм на хроматографической колонке PerfectSil Target ODS-3 5 мкм с обращенной фазой,

размерами 250 x 4,6 мм. Градиентное элюирование проводилось в диапазоне 10–50% со скоростью 1 мл в мин при температуре 40°C. Элюент А – ацетонитрил – 0,05 М фосфатный буферный раствор (pH=3,0); элюент В – ацетонитрил-вода (9:1). Продолжительность хроматографического анализа – 45 мин при 40°C. Из них от 0 до 30 мин проводилось градиентное элюирование в диапазоне 10-50%, затем в течение 15 мин - при концентрации 50%. Для идентификации фенольных соединений использовали вещества-свидетели фирмы Sigma, Aldrich, Fluka: кверцетин, изокверцетин, кафтаровая к-та, арбутин, салицин, гиперозид, галловая к-та, гидрохинон, рутин, кофейная к-та, феруловая к-та, аскорбиновая к-та, 4-кофеоилхинная к-та, 5-кофеоилхинная к-та, кемпферол, мирицетин.

Результаты

Градиентный хроматографический анализ (ВЭЖХ) образцов хвои сосны обыкновенной, взятых как в урбанизированной среде, так и за пределами импактной зоны, выявил 64-67 фенольных соединений (рис. 1). Из общего количества нами идентифицировано 12 фенольных соединений. Список идентифицированных фенольных соединений представлен в табл. 2. По химическому составу это были флавоноиды, фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты.

Для анализа основных, доминирующих тенденций в реакции фенольных соединений на техногенное загрязнение нами проведен как тотальный сравнительный количественный попарный анализ всех выявленных при хроматографии пиков, так и анализ идентифицированных нами фенольных соединений.

Тотальный попарный сравнительный анализ образцов хвои сосны из загрязненной городской среды (вблизи автомагистрали) и контрольных древостоев (за пределами импактной зоны) (пиков с идентичным t_R и спектральным соотношением (S_{360} / S_{254})) убедительно продемонстрировал, что эти образцы значительно отличались между собой (табл. 1). В образцах хвои сосны обыкновенной вблизи автомагистрали наблюдается значительное преобладание фракций с заметным возрастанием содержания соединений в пике (53,7%), фракций со снижением содержания фенольных соединений отмечено 38,9%, фракций, содержание которых не изменялось, было лишь 7,4%. При этом обращает внимание значительный уровень изменения содержания этих соединений (табл. 1). Таким образом, можно заключить, что, несмотря на интенсивное загрязнение воздушной среды в непосредственной близости от автомагистралей, в клетках хвои сохраняется повышенная активность более половины фенольных соединений, что свидетельствует как об интенсивных процессах оксидативного стресса сосны в этих экологических условиях среды, так и высокой антиоксидантной активности этих соединений.

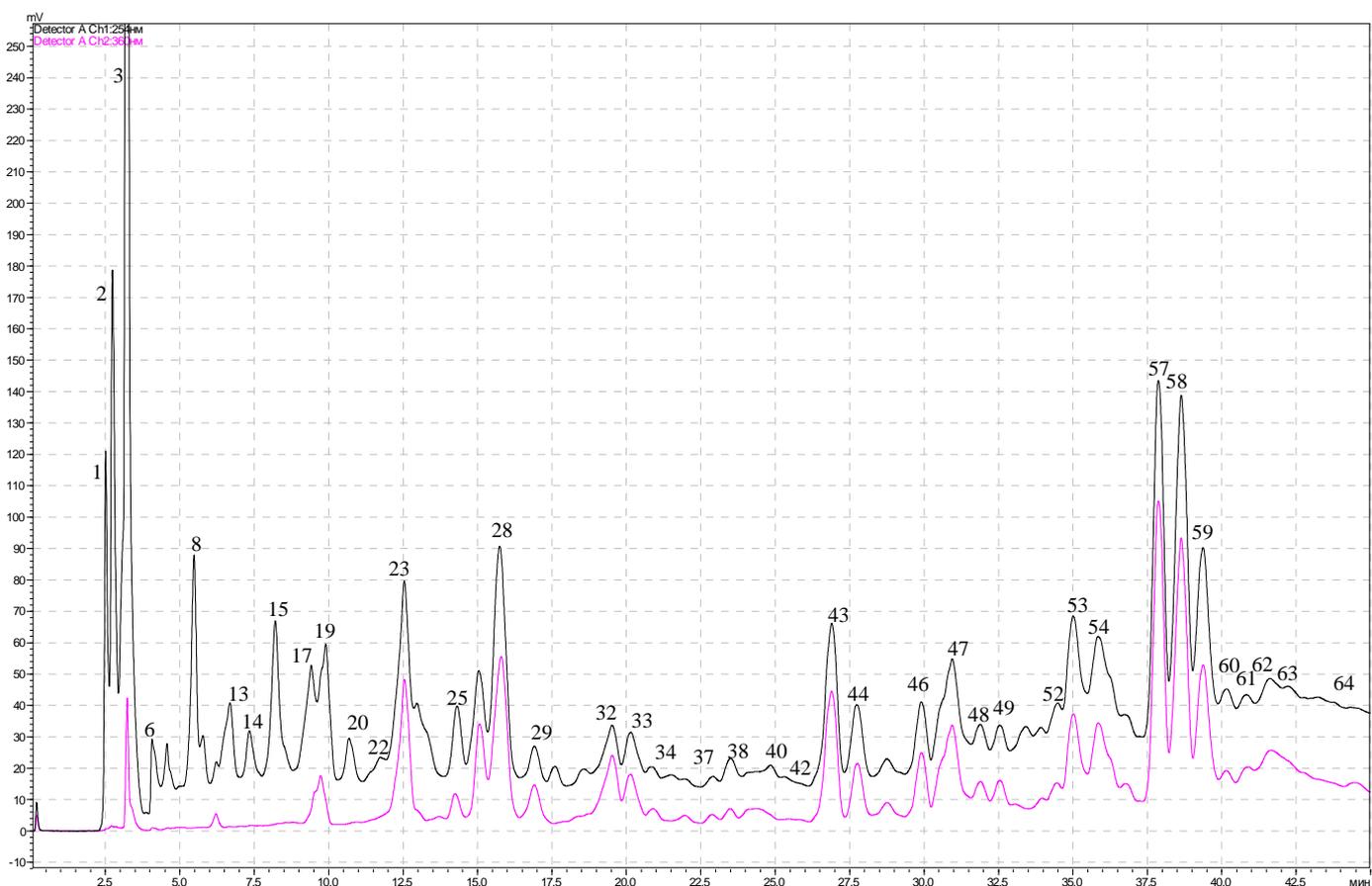


Рис. 1. ВЭЖХ фенольных соединений хвои сосны обыкновенной в условиях урбанизации (вблизи автомагистрали). По оси абсцисс- t_r (время удерживания), ординат-оптическая плотность. Примечания: 2-аскорбиновая к-та;3-галловая к-та; 6-кафтаровая к-та; 8- гидрохинон; 11-4-кофеилхинная к-та; 17-рутин; 19-5- кофеилхинная к-та; 22-феруловая к-та; 23-изокверцетин; 29-мирицетин; 40-кверцетин;45- кемпферол

Для более глубокого анализа компенсационных процессов, происходящих в клетках хвои сосны обыкновенной в условиях техногенного загрязнения, было целесообразно проанализировать тенденции реакций идентифицированных нами на хроматограммах фенольных соединений, так как функции ряда из них хорошо известны.

Как показали результаты, при сравнительном попарном анализе идентифицированных фенольных соединений нами выявлен примерно такой же спектр тенденций, как и при анализе тотального спектра. Количество идентифицированных фенольных соединений, содержание которых возрастало, составляло 58,33%, количество соединений, содержание которых снижается, значительно меньше: 33,33% (табл. 2). Нейтральную реакцию проявляли 8,3% фенольных соединений. В составе соединений с резко выраженным возрастанием активности синтеза преобладали фенолкарбоновые, гидроксикоричные кислоты и флавоноиды.

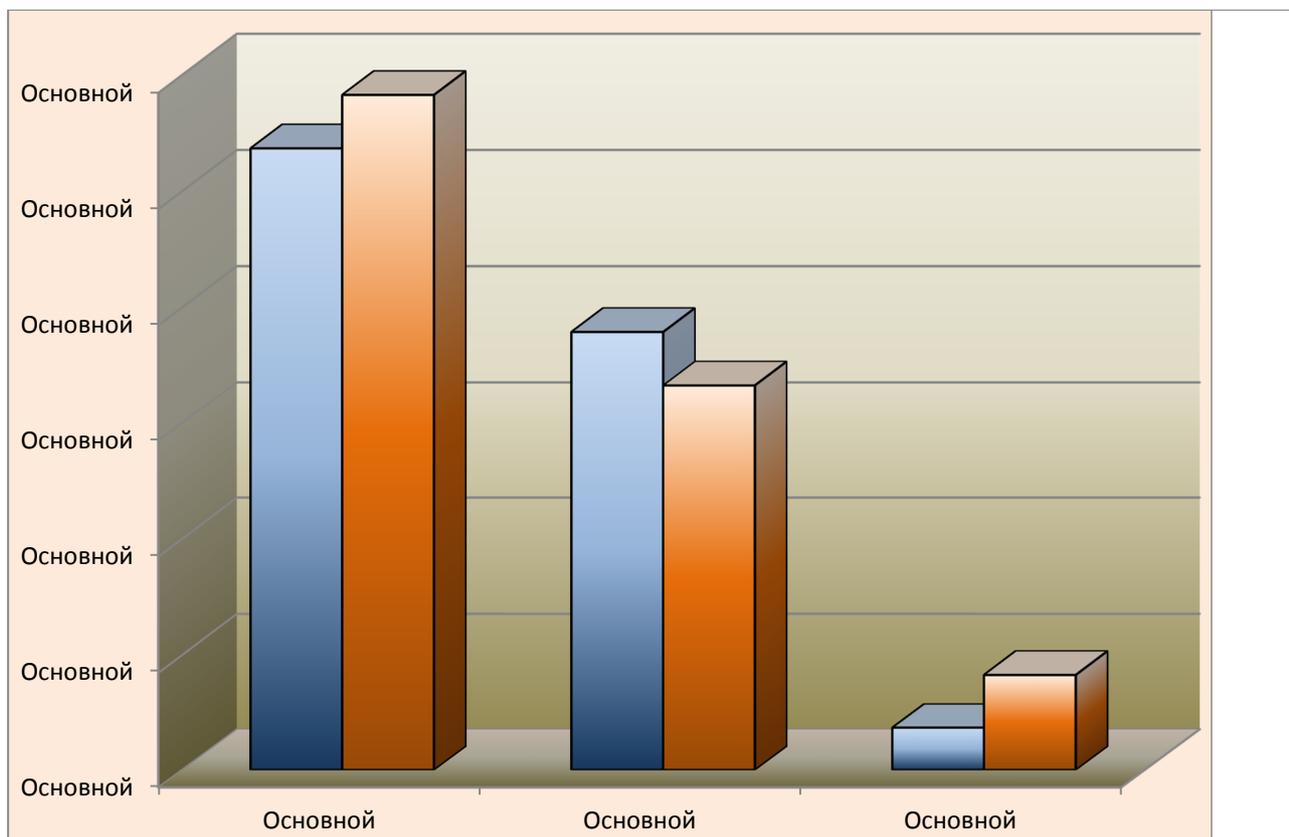


Рис. 2. Влияние интенсивного техногенного загрязнения (выбросами автотранспорта) на содержание фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной. 1- Кол-во фенольных соединений с возрастанием активности; 2- то же со снижением активности; 3- то же с отсутствием реакции. По оси ординат – кол-во фенольных соединений (%). Слева – от общего кол-ва пиков на хроматограмме, справа – от кол-ва идентифицированных соединений.

Таблица 2

Влияние интенсивного техногенного загрязнения (выбросами автотранспорта) на содержание идентифицированных фенольных соединений

Наименование соединения	Сосна. Контроль		Сосна. Загрязнение			S_{360}/S_{254}
	№ фракции	Абсорбция 254нм(mv)	Абсорбция 254нм (mv)	Измен. содерж. фенол. соед.(%)	T_r	
Аскорбиновая к-та	2	224,0±28,11	273,0±29,14	+21,88	2,81	0,0065
Галловая к-та	4	203,1±17,31	350,0±28,18	+72,33	3,5	0,0024
Кафтаровая к-та	6	25,73±21,14	23,26±1,97	-9,59	4,12	0,052
Гидрохинон	8	18,38±20,15	73,96±8,17	+302,39	5,0	0,040
4-Кофеоилхинная к-та	11	15,44±11,28	7,29±0,66	-52,78	6,2	0,307
Рутин	17	24,07±2,55	37,5±2,91	+55,79	9,31	0,284
5- кофеоилхинная к-та	19	64,46±5,36	43,90±3,48	-31,89	10,25	0,287
Феруловая к-та	22	5,67±0,39	7,89±0,68	+39,15	11,95	0,33

Изокверцетин	23	109,23±12,18	62,76±0,54	-42,54	11,82	0,718
Мирицетин	29	20,09±3,12	13,85±1,52	-31,06	17,3	0,902
Кверцетин	40	4,17±0,37	6,94±0,52	+66,43	25,0	0,705
Кемпферол	45	2,57±0,18	5,51±0,41	+114,39	28,75	1,20

Таким образом, преобладающей реакцией на заметный окислительный стресс у сосны обыкновенной в условиях значительного техногенного загрязнения было заметное повышение активности синтеза фенольных соединений (табл. 2). Это галловая кислота, гидрохинон, кверцетин, кемпферол, рутин, феруловая кислота, а также аскорбиновая кислота. Как показали результаты, в наибольшей степени уровень активности возрастал у кемпферола, кверцетина, рутина, галловой кислоты и гидрохинона. Содержание ряда других фенольных соединений в листьях, наоборот, заметно снижалось. Это 4-кофеилхинная кислота, 5-кофеилхинная кислота, изокверцетин, мирицетин. Можно предполагать, что названные фенольные соединения, значительно снижающие активность при значительном уровне техногенного воздействия, являются недостаточно устойчивыми.

Выявленное нами в зоне интенсивного техногенного загрязнения, преимущественно, возрастание активности синтеза фенольных соединений, по нашему мнению, свидетельствует о том, что интенсивность их синтеза у сосны обыкновенной сохраняется даже при достаточно высоком уровне техногенного загрязнения воздушной среды вблизи городских автомагистралей.

Обсуждение

Как уже отмечалось выше, многие фенольные соединения обладают антиоксидантной активностью. Поэтому мы исходим из предположения о том, что изменение активности синтеза этих фенольных соединений в условиях интенсивного техногенного воздействия непосредственно связано с антиоксидантной активностью. Следовательно, дифференциация их по типу реакции может быть обусловлена тем, что фенольные соединения, активность которых ингибируется в условиях интенсивного техногенного загрязнения среды, неэффективно функционируют в этих условиях, тогда как у группы фенольных соединений, активность которых возрастает, она сохраняется и в этих условиях. Можно предполагать, что их антиоксидантная активность наиболее высока из всей группы изученных нами фенольных соединений.

Исходя из этого, наиболее высокоактивными в условиях интенсивного техногенного загрязнения были: кемпферол, кверцетин, рутин, галловая к-та, гидрохинон, феруловая и аскорбиновая к-ты (табл. 2). Интересно отметить, что в их составе как флавоноиды, так и фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты. Антиоксидантная активность кверцетина, кемпферола, галловой, аскорбиновой и феруловой кислот известна [7,16,22,23]. Наоборот, 4-

КФК, 5-КФК, изокверцетин и мирицетин отличались заметным ингибированием антиоксидантной активности в этих экологических условиях. Сравнительный анализ полученных результатов ВЭЖХ с данными, полученными нами ранее на березе повислой [18] показал, что полученные данные совпадают лишь частично. В условиях максимального загрязнения отличается как состав фенольных соединений, сохраняющих высокую активность при значительном техногенном загрязнении, так и не сохраняющих ее. В первом случае это были кафтаровая к-та, мирицетин, салицин, во втором - галловая и феруловая к-ты, гиперозид, кемпферол и изокверцетин. Совпадает лишь характер реакции 4-КФК, 5-КФК, изокверцетина [18]. У ряда фенольных соединений наблюдалось сходство в характере реакции между сосной и вариантом с умеренным загрязнением березы (аскорбиновая к-та, рутин, кверцетин). Мы предполагаем, что, в основном, различия могли быть обусловлены как разной интенсивностью поглощения загрязняющих соединений из воздушной среды, так и различными путями реализации биохимических механизмов антиоксидантной активности у лиственных и хвойных древесных растений. Частично несовпадение было обусловлено и тем, что в составе фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной некоторые соединения, выявленные в листьях березы, не были обнаружены.

Сравнительный анализ полученных нами результатов ВЭЖХ с данными других авторов, которые, преимущественно, изучали динамику содержания суммарного количества фенольных соединений, показал, что они совпадают. В целом общей доминирующей тенденцией в реакции фенольных соединений на окислительный стресс в клетках древесных растений является возрастание активности синтеза этих соединений [1,12,24,25,28,29]. В условиях техногенного загрязнения суммарное содержание фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной также возрастает [5,12]. Увеличивается, также активность пероксидазы [12]. Ряд исследователей предполагает, что эта реакция имеет двухфазный характер [1]. Автором показано, что в импактной зоне (вблизи источника загрязнения) синтез ряда фенольных соединений, обладающих сильной антиоксидантной активностью, заметно снижается [1]. Далее, в зоне умеренного загрязнения, он, наоборот, возрастает. Сходные результаты по водорастворимым антиоксидантам получены также и другими авторами [17]. К настоящему времени пока не совсем ясно, каким образом происходит тонкая регуляция этой многокомпонентной системы клеточной защиты от окислительного стресса. Есть предположение, что в зависимости от интенсивности стрессового воздействия включаются те или иные компоненты антиоксидантной системы защиты. При низких концентрациях техногенных загрязнений может активироваться низкомолекулярная компонента защиты – увеличение синтеза фенольных соединений, а при более высокой – высокомолекулярная,

когда возрастает активность СОД и стимулируются процессы накопления антоциановых пигментов [17].

В целом, полученные нами результаты однозначно показали, что в зоне сильного аэротехногенного загрязнения (вблизи городских автомагистралей) биохимическая подсистема антиоксидантной защиты сосны обыкновенной, включающая низкомолекулярные фенольные соединения, функционирует достаточно эффективно, вследствие чего активность синтеза большей части этих соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, возрастает. Детально изучен состав фенольных соединений в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), которые активно выполняют антиоксидантную функцию в условиях урбанизированной среды.

Проект выполнен при финансовой поддержке Интеграционного проекта УрО РАН (проект 12-И-4-2057).

Список литературы

1. Артёмкина Н.А. Низкомолекулярные фенольные соединения древесной зелени ели европейской (*Picea abies* L.): автореф. дисс. ... канд. хим. наук. - СПб, 2001. - 18 с.
2. Гарифзянов А.Р., Иванищев В.В., Музафаров Е.Н. Оценка устойчивости *Betula pendula* Roth. при произрастании на техногенно загрязненных территориях // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. Вып. 2. - 2011. - С. 315-324.
3. Гетко Н.В. Растения в техногенной среде: структура и функция ассимиляционного аппарата. – Минск: Наука и техника, 1989. - 208 с.
4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. - М.: Наука, 1993. - 272 с.
5. Иванова Е.Ю. Оценка состояния атмосферного воздуха города Нововоронежа биологическими методами // Вестник ВГУ, Серия: ГЕОГРАФИЯ. ГЕОЭКОЛОГИЯ, 2013, № 1, с. 157-162
6. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. - № 1. - С. 2-7.
7. Медведев Ю.В. Исследование содержания фенолокислот в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ : автореф. дисс. ... к.ф.н. – М., 2010. - 18 с.
8. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. - 1989. - Т. 6. - 167с.

9. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский образовательный журнал. Биология. – 1999. - С. 127-134.
10. Николаевский В.С., Неверова О.А. Экологическая оценка загрязнения атмосферного воздуха г. Кемерово методами фитоиндикации // Экология, мониторинг и рациональное природопользование. - М.: МГУЛ, 2000. - С. 13-20 (Науч. тр. МГУЛ; Вып. 302 (1)).
11. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: Изд-во КДУ, 2007. –140 с.
12. Прожерина Н.А. Морфофизиологическая диагностика состояния хвойных в условиях аэротехногенного загрязнения (на примере Архангельского промышленного узла) // автореф. дисс.... к.б.н.. Архангельск, 2001, 20 с.
13. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский образовательный журнал. - 1996. - № 3. - С. 4-10.
14. Фролов А.К. Окружающая среда крупного города и жизнь растений в нем. - СПб. : Наука, 1998. - 327 с.
15. Чуваев П.П., Кулагин Ю.З., Гетко Н.В. Вопросы индустриальной экологии и физиологии растений. – Минск: Наука и техника, 1973. - 56 с.
16. Чупахина Г.Н. Система аскорбиновой кислоты растений. - Калининград : Изд-во КГУ, 1997. - 120 с.
17. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрипник Л.Н., Бессережнова М.И. Реакция пигментной и антиоксидантной систем растений на загрязнение окружающей среды г. Калининграда выбросами автотранспорта // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - № 2 (18). - С. 171–185.
18. Шавнин С.А., Колтунов Е.В., Яковлева М.И. Влияние техногенного загрязнения на содержание фенольных соединений в листьях березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях урбанизации // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 2. С. 520.
19. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 1999, P. 601–639.
20. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review // *Annals of Botany*. 2003. V. 91. P. 179-194.
21. Bouvier F., Backhaus R.A., and Camara B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress // *J. Biol. Chem.* 273, 1998, P. 30651–30659.
22. Grace S. C., Logan B.A., Adams W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens* // *Plant, Cell and Environment* 1998. 21б P. 513-521.
23. Larson R.A. The antioxidants of higher plants // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. P. 969-978.

24. Loponen J., Ossipov V., Lempa K., Haukioja E., Pihlaja K. Concentrations and among-compound correlations of individual phenolics in white birch leaves under air pollution stress // *Chemosphere*. V. 37. №8. 1998. Pp. 1445–1456.
25. Loponen J., Lempa K., Ossipov V., Kozlov M.V., Girs A., Hangasmaa K., Haukioja E., Pihlaja K. Patterns in content of phenolic compounds in leaves of mountain birches along a strong pollution gradient // *Chemosphere*. V. 45. №3. 2001. Pp. 291–301.
26. Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. V. 49, 1998, P. 249–279
27. Prasad P. Pardha Saradhi, P. Sharmila. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *ENVIR EXP B*, 42(1), 1999, pp. 1-10.
28. Saleem A., Loponen J., Pihlaja K., Oksanen E. Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* ROTH) // *Journal of Chemical Ecology*. V. 27. N5. 2001. P. 1049–1062.
29. Turunen M., Heller W., Stich S., Sandermann H., Sutinen M.L., Norokorpi Y. The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic // *Environmental Pollution*. V. 106. №2. 1999. Pp. 219–228.

Рецензенты:

Усольцев В.А., д.с.-х.н., профессор, профессор Уральского государственного лесотехнического университета, г. Екатеринбург;

Менщиков С.Л., д.с.-х.н., заведующий лабораторией экологии техногенных растительных сообществ ФГБУН Ботанический сад Российской Академии наук, г. Екатеринбург.