

УДК 633.358:577.73

## НАФТАЛИН – НЕОБХОДИМЫЙ МЕТАБОЛИТ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА И ФТАЛАТОВ В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

© Л.Е. Макарова\*, А.А. Ищенко, П.А. Бизиков, И.Г. Петрова, Т.В. Копытина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,  
ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 (Россия), e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

N-фенил-2-нафтиламин и фталаты – известные соединения, синтезируемые в химической промышленности. Их относят к веществам негативного действия на живые организмы. В то же время N-фенил-2-нафтиламин обнаружен в растениях, фталаты – в растениях и в бактериях. В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные о путях синтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в растительных клетках. Наличие этих соединений ранее нами установлено в тканях корней и корневых экссудатов у бобовых культур. Цель представляемой работы – выяснить возможность использования нафталина растениями гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в качестве предшественника синтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов. Растительным объектом в экспериментах являлись корни этиолированных проростков гороха, росших в течение 24 ч на растворе  $10^{-4}$  М нафталина. Контролем служили корни проростков, росших на воде. Из фиксированных 95%-ным этанолом корней последовательно при помощи 80% этанола и этилацетата получали экстракты, содержащие ароматические соединения. В их составе методом ВЭЖХ определили содержание N-фенил-2-нафтиламина, диэтил-, дибутил- и бис(2-этилгексил)фталатов, и методом спектрофотометрии по реакции с  $AlCl_3$ , определяли общее содержание флавоноидов. Для подтверждения присутствия в экстрактах исследуемых соединений использовали их аутентичные образцы. Существенные увеличения, по сравнению с растениями контроля, содержания N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в корнях при росте на растворе нафталина указывают на его использование растением гороха в качестве необходимого метаболита для биосинтеза вышеназванных соединений. При действии нафталина обнаружено отсутствие изменений в содержании флавоноидов.

*Ключевые слова:* *Pisum sativum* L., N-фенил-2-нафтиламин, фталаты, флавоноиды.

*Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № 122041100050-6*

### Введение

N-фенил-2-нафтиламин и сложные эфиры орто-фталевой кислоты, или фталаты, преимущественно относят к веществам техногенного происхождения. Достаточно давно они производятся предприятиями химической промышленности и находят широкое применение в производственных технологиях. Так, N-фенил-2-нафтиламин был синтезирован лабораторно и известен в научной литературе с 1881 г. [1]. Этот алкалоид необычного строения [2] находит применение в производстве красителей и других органических химических веществ.

Макарова Людмила Евгеньевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник,  
e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Ищенко Алексей Александрович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник,  
e-mail: aspt25@yandex.ru

Бизиков Петр Александрович – ведущий инженер,  
e-mail: bizikov.piotr@mail.ru

Петрова Ирина Георгиевна – ведущий технолог,  
e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Копытина Татьяна Васильевна – кандидат биологических наук, ученый секретарь института,  
e-mail: kopytina@sifibr.irk.ru

Благодаря высоким антиоксидантным свойствам данное соединение используется в качестве антиокислителя резины, полимеров, в смазках, смазочных и трансформаторных маслах, в качестве стабилизатора в электроизоляционных эмалях. Фталаты имеют широкое применение в производстве пластмасс – в качестве пластификаторов, для получения косметических средств и др. [3, 4]. N-фенил-2-нафтиламин и фталаты относят к опасным для живых организмов веществам [2–5].

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Наряду с техногенными существуют и биогенные источники появления N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в биосфере. Биотическое происхождение N-фенил-2-нафтиламина доказано его присутствием в тканях нескольких видов наземных и двух представителей водных растений [6–10]. Фталаты выявлены у широкого ряда растительных культур [11] и у бактерий [12]. N-фенил-2-нафтиламин и фталаты обнаружены и у объекта наших исследований – растений гороха (*Pisum sativum* L.) – в тканях корней и в корневых экссудатах, в составе корневых экссудатов у бобов (*Vicia faba* L. var. *major* Hartz) и сои *Glycine max* L. MERR) [13].

Физиологическая роль N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в эндогенных процессах корней растений гороха не изучена, но показана возможность регуляции этими соединениями концентрации бактерий в их прикорневой зоне [14, 15]. У проростков гороха в составе корневых экссудатов N-фенил-2-нафтиламин и фталаты доминировали количественно относительно других представителей фенольных соединений [16], а в числе фталатов идентифицированы дибутил-, диоктил-, диэтилфталаты и небольшие количества гетероалкилфталатов [15].

Сведения о биосинтезе N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в клетках растений в литературе в настоящее время отсутствуют. Нет свидетельств синтеза N-фенил-2-нафтиламина и у бактерий, в то же время почвенные бактерии оказались способными деградировать это соединение с образованием фталатов [14, 15]. Деградиацию N-фенил-2-нафтиламина до фталатов могут выполнять и эндофитные бактерии растений гороха [17]. Следовательно, у растений гороха одним из источников появления фталатов в их тканях могут быть поселяющиеся в их органах бактерии, которые способны осуществлять деградиацию полициклических ароматических углеводов (ПАУ).

Для растений в настоящее время в научной литературе отсутствуют и данные о деградациии ПАУ до фталатов. В то же время существование фталатного пути деградациии ПАУ в клетках бактерий установлено в 70-х годах XX столетия [18], и в настоящее время у этих микроорганизмов катаболизм ПАУ по фталатному пути подробно исследован и известны ферменты, задействованные в этом процессе [19]. Выявленный у бактерий фталатный путь – только один из путей распада ПАУ, и он включает этап деградациии нафталиновых структур [18–21].

Цель наших исследований – выяснить участие нафталина как предшественника в биосинтезе фталатов и N-фенил-2-нафтиламина в корнях проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Показателем этого участия были изменения в содержании указанных соединений при экзогенном действии нафталина на корни их проростков. В тех же корнях было прослежено влияние нафталина на содержание флавоноидов, поскольку изменения в их биосинтезе могут сказаться при формировании бобово-ризобиального симбиоза [22].

### **Экспериментальная часть**

В работе использовали этиолированные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг, выращенные из семян в темноте, в термостатных условиях при температуре 21 °С, в кюветах, на фильтровальной бумаге, смоченной прокипяченной водопроводной водой. Исходным материалом служили 2-суточные проростки, средние размеры корней у которых составляли 30–35 мм. При проведении эксперимента эти проростки на 24 ч, в тех же условиях термостата, помещали на фильтровальную бумагу, смоченную  $10^{-4}$  М раствором нафталина или дистиллированной водой (в контроле). Указанная концентрация нафталина выбрана после предварительной проверки действия нафталина на рост корней проростков в концентрациях  $2.3 \times 10^{-4}$  М (максимальная растворимость в воде) и  $10^{-4}$  М. Концентрация нафталина  $10^{-4}$  М не вызывала существенных изменений в росте корней (табл. 1), поэтому была применена при изучении влияния данного соединения на содержание в корнях N-фенил-2-нафтиламина, фталатов и флавоноидов. Через 24 ч экспозиции устанавливали вызванные действием нафталина изменения, в сравнении с растениями контроля, содержания вышеназванных веществ, прироста длины и массы корня.

Для биохимических исследований использовали свежий растительный материал – 3-суточные проростки, у которых отделяли корни и фиксировали их горячим 96%-ным этанолом. Корни проростков, произраставших на растворе нафталина, перед фиксацией этанолом 3-кратно промывали дистиллированной водой для удаления с их поверхности нафталина.

Фенольные соединения экстрагировали 80%-ным этанолом из фиксированного 95%-ным этанолом и гомогенизированного растительного материала. После удаления этанола из экстракта с помощью роторного испарителя из водного остатка, подкисленного 2 н HCl до pH 3–4, фенольные соединения экстрагировали

этилацетатом. Этилацетатные экстракты упаривали в условиях затемнения в вакууме досуха, остатки растворяли в небольшом объеме 95%-ного метанола для определения в них содержания флавоноидов, N-фенил-2-нафтиламина, фталатов.

Содержание N-фенил-2-нафтиламина и фталатов определяли в экстрактах методом ВЭЖХ на хроматографе «Shimadzu LC-10ATyp» с УФ-детектором («Shimadzu», Япония). Разделение осуществляли на колонке (250×4.6 мм, 5 мкм) Perfect («MZ Analysentechnik», Германия). Для разделения компонентов экстрактов использовали два разных по составу системы растворителей. Для определения содержания N-фенил-2-нафтиламина, диэтил- и дибутил фталатов разделение проводили в системе 1 в возрастающем градиенте А:В от 30 до 90% в течение 80 мин при скорости 0.5 мл/мин, где А – ацетонитрил, В – 0.2 н перхлорат Li в 0.1% водном растворе трифторуксусной кислоты, рН 4.0. Для определения содержания диоктилфталата, имевшего близкое время удерживания с дибутилфталатом в системе 1, разделение осуществляли в системе 2, также в возрастающем градиенте – от 20–70% в течение 140 мин. при скорости 0.3 мл /мин, где А – ацетонитрил, В – 0.01% водный раствор трифторуксусной кислоты). Напуск (объем пробы) 5 мкл. Детектирование соединений проводили при 280 нм. Идентифицировали соединения в адсорбционных профилях по времени удерживания метчика, которое подтверждали УФ-спектрами, полученными в остановленном потоке элюента для метчика и для изучаемого вещества. Для идентификации и получения применявшегося для расчетов калибровочного графика использовали аутентичные образцы N-фенил-2-нафтиламина (коммерческий препарат, «Sigma», США), бис(2-этилгексил)фталата (синоним – диоктилфталат), диэтилфталата («Sigma–Aldrich», Германия) и дибутилфталата («Реахим», Россия). Данные для калибровочных графиков для диэтил-, дибутилфталатов и N-фенил-2-нафтиламина получали при использовании системы 1, для диоктилфталата – системы 2. Применение более длительной по времени хроматографии в системе 2 обусловлено необходимостью разделить пики для дибутил- и диоктилфталатов, которые оказывались близко расположенными на хроматограмме, полученной при хроматографии в системе 1. Количество N-фенил-2-нафтиламина, диэтил- и дибутилфталатов рассчитывали, используя хроматограммы для системы 1, а количество диоктилфталата – по данным хроматограмм, полученных для системы 2. Содержание перечисленных соединений рассчитывали в мкмоль/г сырой массы корней проростков гороха.

Содержание флавоноидов в экстрактах определяли по реакции с  $AlCl_3$  при 510 нм на спектрофотометре Specord S-100 (Германия). Реакционные смеси для количественных определений флавоноидов составляли по прописи из работы [23]. Для расчетов использовали калибровочные графики для катехина. Содержание флавоноидов рассчитывали как эквиваленты катехина, в мкг/г сырой массы корней проростков гороха.

Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Excel. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и стандартные отклонения для них, которые получены из трех независимых экспериментов.

### Результаты и их обсуждение

При получении данных по влиянию нафталина на содержание N-фенил-2-нафтиламина, фталатов и флавоноидов в тканях корней проростков гороха мы стремились не вызывать у них существенных изменений в ростовых процессах, но при этом получить четко выраженные показатели метаболизма вышеназванного субстрата. По приросту корня в длину и его массы было проверено действие на рост проростков нафталина в концентрациях  $2.3 \times 10^{-4}$  М и  $10^{-4}$  М. Данные таблицы 1 позволяют отметить более заметное угнетение роста корня  $2.3 \times 10^{-4}$  М нафталином.  $10^{-4}$  М нафталин за 24 ч экспозиции не вызвал существенных изменений в росте их корней. Наблюдали небольшое, но недостоверное, по сравнению с растениями контроля, снижение ростовых показателей (табл. 1). Поэтому данная концентрация нафталина далее использована для наблюдения его влияния на содержание изучаемых соединений.

Таблица 1. Влияние раствора нафталина на рост корней проростков гороха

Вариант выращивания проростков	Прирост корня за 24 ч, мм/проросток	Масса корня через 24 ч экспозиции, $10^{-3}$ г/корень
Контроль	24.5±3.6 <sup>a</sup>	80.9±1.6 <sup>a</sup>
+ $2.3 \times 10^{-4}$ М нафталин	19.7±0.8 <sup>b</sup>	74.6±1.8 <sup>c</sup>
+ $10^{-4}$ М нафталин	23.3±4.1 <sup>a</sup>	79.1±1.8 <sup>a</sup>

Контроль – рост на воде, + нафталин – рост на растворе нафталина. При сравнении данных для контроля и вариантов с нафталином латинские буквы b обозначают статистически значимые различия при  $P < 0.05$ , c – при  $P < 0.01$ .

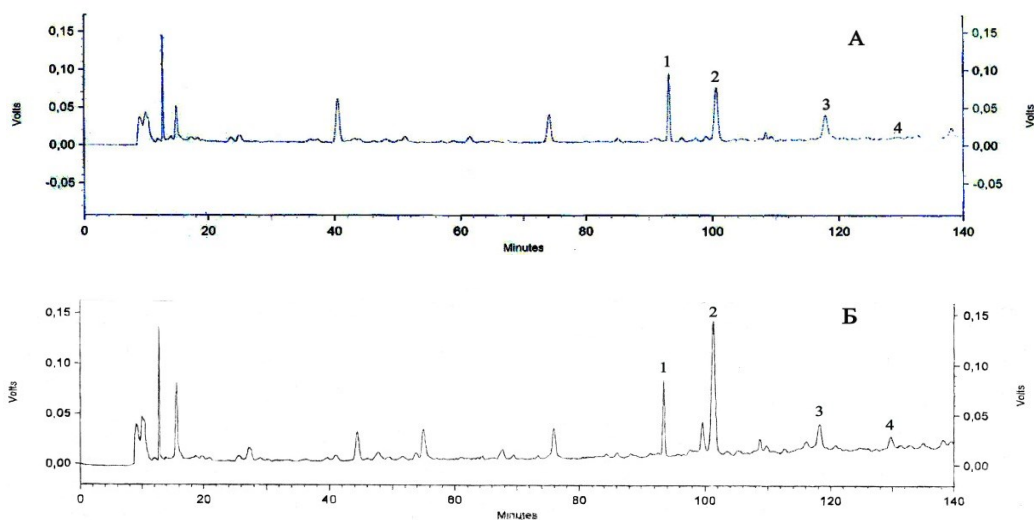
На присутствие N-фенил-2-нафтиламина и 3-х видов фталатов – диэтил-, дибутил- и диоктилфталата в составе этилацетатных экстрактов из корней проростков гороха показали результаты ВЭЖХ – анализа состава экстрактов из корней проростков гороха. Местоположения пиков, соответствующих перечисленным соединениям в экстрактах из растений контроля и произраставших на  $10^{-4}$ М нафталине, указаны на рисунке.

Наличие вышеперечисленных фталатов установили благодаря использованию аутентичных образцов этих соединений (см. экспериментальную часть). Перечисленные выше фталаты ранее идентифицировали и в составе корневых эксудатов гороха сорта Торсдаг методами ВЭЖХ-анализа, а также с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии [15], с привлечением данных из библиотеки масс-спектров «NIST» и полученных для аутентичных образцов.

При росте проростков на нафталине в корнях происходило существенное увеличение содержания N-фенил-2-нафтиламина – в 2.3 раза (табл. 2), что подтверждает наше предположение, что нафталин служит предшественником синтеза N-фенил-2-нафтиламина у растений гороха. Рост на нафталине вызвал в корнях проростков гороха 3-кратное увеличение общего содержания фталатов (табл. 2). При этом в наибольшей степени возросло содержание диоктилфталата. Примечательно, что доля этого вида фталата преобладала над количеством двух других видов фталатов и в контроле.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют об использовании нафталина клетками корней гороха для образования N-фенил-2-нафтиламина и фталатов. Каков у этих растений путь синтеза N-фенил-2-нафтиламина, равно как и путь образования фталатов из нафталина – остается неизвестным. Вызванное действием нафталина увеличение содержания фталатов в корнях показывают на существование у растений гороха деградации данного соединения по фталатному пути, возможно, аналогичного таковому у бактерий [18, 21]. Повышение содержания N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в корнях гороха при его росте на растворе нафталина дает основание говорить о наличии в их клетках ферментных систем, благодаря которым вышеназванные соединения синтезируются.

Для бобовых культур, которым присуще образование клубеньков, в которых поселяются азотфиксирующие бактерии из семейства Rhizobiaceae, особое значение в успешности прохождения симбиотических взаимодействий с этими бактериями отводят флавоноидам [22]. Флавоноидам отводят роль сигнальных молекул в процессах узнавания симбионтов и регуляторов гормонального статуса при инициации примордий клубеньков. Поэтому возможные сбои в биосинтезе этих соединений при действии экзогенного нафталина вполне могли бы отразиться на формировании бобово-ризобияльного симбиоза. В нашем эксперименте действие нафталина не повлияло на общее содержание флавоноидов (табл. 3). Это дает основание отметить отсутствие зависимости биосинтеза флавоноидов от биосинтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в корневых клетках гороха.



ВЭЖХ-хроматограмма соединений в экстрактах из корней проростков гороха, росших на воде (А) и на  $10^{-4}$  М растворе нафталина (Б). 1 – диэтилфталат; 2 – N-фенил-2-нафталин; 3 – дибутил фталат; 4 – диоктил фталат. Разделение происходило в системе 2 (см. Экспериментальную часть)

Таблица 2. Влияние нафталина на содержание N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в корнях проростков гороха

Вариант выращивания	Содержание, мкмоль/г сырой массы корня			
	N-фенил-2-нафтиламин	Диэтилфталат	Дибутилфталат	Диоктилфталат
Контроль	1.750±0.03	0.038±0.006	0.872±0.060	2.260±0.296
+ 10 <sup>-4</sup> М нафталин	4.010±0.033	0.056±0.004	2.173±0.171	7.505±0.679

Таблица 3. Влияние 10<sup>-4</sup>М нафталина на содержание флавоноидов в корнях проростков гороха

Вариант выращивания	Содержание, мкг/г сырой массы корня
Контроль	40.567±2.858
+ 10 <sup>-4</sup> М нафталин	40.927±5.678

Тем не менее следует ожидать, что установленные при действии экзогенного нафталина существенные повышения в содержании фталатов и N-фенил-2-нафтиламина неблагоприятно могут отразиться на физиолого-биохимических процессах у проростков гороха. На это показывают имеющиеся в литературе немногочисленные сообщения о некоторых возможных механизмах негативного действия исследуемых нами соединений у растений. Так, высокие липофильность, антиоксидантная активность и реакгенность N-фенил-2-нафтиламина дали основание авторам работы [5] полагать, что в результате свободного прохождения через мембраны и значительного накопления этого соединения в клетках может происходить нарушение структуры мембран, приводящее к необратимому урону для их функционирования. В работе [24], где изучали экзогенное действие на растения дибутилфталата и диоктилфталата, показан различный их эффект на ростовые процессы, на активность ПОЛ и содержание пигментов (хлорофиллов, каротиноидов) у 7 представителей высших растений. Из исследованных видов растений наиболее чувствительными к действию изучаемых фталатов оказались растения люцерны (*Medicago sativa* L.) и лука (*Allium cepa* L.). Авторы показали, что из двух фталатов более токсичным для этих растений оказался дибутилфталат.

При всем при том важным результатом представленных исследований является получение данных, указывающих на использование клетками корней гороха нафталина для биосинтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов и на существование у этого растения фталатного пути деградации ПАУ. При действии 10<sup>-4</sup>М нафталина существенное увеличение содержания N-фенил-2-нафтиламина и фталатов (табл. 2) не привело к заметному снижению показателей роста корней (табл. 1) и не сказалось на общем содержании флавоноидов (табл. 3). Следовательно, примененная в экспериментах концентрация нафталина 10<sup>-4</sup> М может быть использована для дальнейшего изучения у растений гороха биосинтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов, а также их участия в эндогенных процессах при формировании симбиоза с ризобиями.

### Выводы

1. Рост проростков гороха на 10<sup>-4</sup> М растворе нафталина приводит к незначительному ингибированию роста корней, что дает основание для применения данной концентрации нафталина в качестве субстрата для получения биохимических показателей, связанных с его метаболизмом в клетках растений гороха.

2. Вызванное действием нафталина существенное увеличение в корнях содержания N-фенил-2-нафтиламина (в 2.3 раза) и фталатов (в 3.1 раза) указывает на необходимость нафталина в качестве предшественника при образовании перечисленных соединений. Повышенное образование фталатов при росте на нафталине показывает на существование в корневых клетках растений гороха фталатного пути деградации ПАУ.

3. Рост на нафталине не влиял на содержание флавоноидов в корнях проростков гороха, что свидетельствует о независимости путей синтеза этих соединений от путей синтеза N-фенил-2-нафтиламина и фталатов.

### Список литературы

1. Словарь органических соединений / под ред. И.Н. Хейльброна, Г.М. Бэнбери. М., 1949. Т. 3. 977 с.
2. Yu R., Li B.-G., Ye Q., Zhang G.-l. A novel alkaloid *Mitrephora maingayi* // Natural Product Research. 2005. Vol. 19. N4. Pp. 359–362.
3. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health // Occup Environ Med. 2005. Vol. 62. N11. Pp. 806–818.
4. Mankidi R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates // Toxicology Letters. 2013. Vol. 217 (1). Pp. 50–58. DOI: 10/1016/j.toxlet2012.11.025.

5. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Groot M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Kürster E. On the Mode of Action of N-Phenyl-2-naphthylamine in Plants // *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40. N19. Pp. 6163–6169.
6. Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М. Фенил-β-нафтиламин из трех видов растений // *Химия природных соединений.* 1976. Т. 12. №3. С. 406.
7. Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г. N-фенил-2-нафтиламин из *Centaurea salonitana* // *Химия природных соединений.* 1977. №4. С. 582.
8. Жанаева Т.А., Кривошекова О.Е., Семенов А.А., Минаева В.Г. N-фенил-2-нафтиламин из цветов *Burleureum aureum* // *Химия природных соединений.* 1989. Т. 25. №3. С. 377.
9. Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., Fan X. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa* // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2005. Vol. 30. N5. Pp. 347–350.
10. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* and *Microcystis aeruginosa* // *Allelopathy Journal.* 2007. Vol. 20. N2. Pp. 327–338.
11. Еникеев А.Г., Семенов А.А., Пермяков А.В., Соколова Н.А., Гамбург К.З., Дударева Л.В. Биосинтез диалкиловых эфиров орто-фталевой кислоты в растениях и в культурах клеток // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. №3. С. 282–285. DOI: 10.1134/S0555109919020065.
12. Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Бояркина С.В., Еникеев А.Г., Максимова Л.А., Семенов А.А. Обнаружение эндогенных фталатов у бактериальных патогенов растений и животных // *Доклады Академии наук.* 2019. Т. 484. №1. С. 121–124.
13. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобиевого симбиоза // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. №4. С. 394–403.
14. Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А., Петрова И.Г., Семенов А.А., Дударева Л.В., Третьякова М.С., Сидоров А.В. Изучение деградации N-фенил-2-нафтиламина бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sp. *Sepedonicus* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. №2. С. 165–173. DOI: 10.31857/S0555109920010122.
15. Макарова Л.Е., Капустина И.С., Мориц А.С., Макаров С.С. Влияние инокуляции *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum* на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture.* 2021. Т. 13. №2. С. 162–184. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-162-184.
16. Макарова Л.Е., Дударева Л.В., Петрова И.Г., Васильева Г.Г. Выделение фенольных соединений в экссудаты корней проростков гороха при инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. №2. С. 217–222. DOI: 10.7868/S0555109916020094.
17. Макарова Л.Е., Маркова Ю.А., Мориц А.С., Карпова М.С., Сидоров А.В., Соколова Н.А. Изучение взаимодействия ризосферных бактерий с неризобийными эндофитными бактериями растений гороха (*Pisum sativum* L.), перемещающимися из их корней в прикорневую зону // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. №4. С. 394–401. DOI: 10.31857/S0555109921040103.
18. Kiyohara H., Nagao K., Nomi R. The catabolism of phenantrene and naphthalene by bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1978. Vol. 105. N1. Pp. 69–75.
19. Barnsley E.A. Phthalate Pathway of Phenantrene Metabolism: Formation of 2'-Carboxybenzalpyruvate // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. N1. Pp. 113–117.
20. Seo J.S., Keum Y.-S., Li Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2009. Vol. 6. N1. Pp. 278–309. DOI: 10.3390/ijerph6010278.
21. Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Карпов А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельных почвенных системах // *Микробиология.* 2008. №1. С. 11–20.
22. Reddy P.M., Rendón-Anaya M., de los Dolores Soto del Río M., Khandual S. Flavonoids as Signaling Molecules and Regulators of Root Nodule Development // *Dynamic Soil, Dynamic Plant.* 2007. Vol. 1(2). Pp. 83–94.
23. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals // *Food Chemistry.* 1999. Vol. 64. N4. Pp. 555–559.
24. Ma T., Teng Y., Christie P., Luo Y. Phytotoxicity in seven higher plant species exposed to di-n-butyl phthalate or bis(2-ethylhexyl) phthalate // *Front Environ. Sci. Eng.* 2015. Vol. 9(2). Pp. 250–268. DOI: 10.1007/s11783-014-0652-2.

Поступила в редакцию 10 августа 2022 г.

После переработки 29 сентября 2022 г.

Принята к публикации 29 октября 2022 г.

**Для цитирования:** Макарова Л.Е., Ищенко А.А., Бизиков П.А., Петрова И.Г., Копытина Т.В. Нафталин – необходимый метаболит для образования N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в растениях гороха (*Pisum sativum* L.) // *Химия растительного сырья.* 2023. №1. С. 127–133. DOI: 10.14258/jcrpm.20230111760.

Makarova L.Ye.\*, Ishchenko A.A., Bizikov P.A., Petrova I.G., Kopytina T.V. NAPHTHALENE IS ESSENTIAL METABOLITE FOR SYNTHESIS OF N-PHENYL-2-NAPHTHYLAMINE AND PHTHALATES IN PISUM SATIVUM L.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Lermontova st., 132, Irkutsk, 664033 (Russia),  
e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates are well known compounds, synthesized in chemical industry. These chemicals are known to be toxic for living organisms. At the same time N-phenyl-2-naphthylamine was found in plants, phthalates were found both in plants and bacteria. Currently, there are no data in scientific literature about the synthesis of N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates in plant cells. Previously, we have established the presence of these compounds in root tissues and root exudates in legumes. The aim of this study was to find the ability of *Pisum sativum* L. to utilize naphthalene as a precursor for the synthesis of N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates. As an object of study, roots of the etiolated pea seedlings, grown with  $10^{-4}$  M naphthalene for 24 h, were used. Roots of seedlings grown on water were used as a control. Extracts, containing aromatic compounds were obtained by successive extraction with 80% ethanol and ethyl acetate from root seedlings, fixated with 95% ethanol. Using HPLC the concentrations of N-phenyl-2-naphthylamine, diethyl-, dibutyl- and bis(2-ethylhexyl)phthalates were estimated. To confirm the presence of phthalates in extracts, standard samples of corresponding compounds were used. Significant increases of N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates concentrations in roots of pea plants, grown with naphthalene solution (compared to control plants), have shown that plant cells seem to use this compound as a necessary metabolite in biosynthesis of compounds mentioned above.

**Keywords:** *Pisum sativum* L., N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates, flavonoids.

## References

1. Slovar' organicheskikh soyedineniy [Dictionary of organic compounds], ed. I.N. Kheyl'bron, G.M. Benberi. Moscow, 1949, vol. 3, 977 p. (in Russ.).
2. Yu R., Li B.-G., Ye Q., Zhang G.-l. *Natural Product Research*, 2005, vol. 19, no. 4, pp. 359–362.
3. Hauser R., Calafat A.M. *Occup Environ Med.*, 2005, vol. 62, no. 11, pp. 806–818.
4. Mankidi R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. *Toxicology Letters*, 2013, vol. 217 (1), pp. 50–58. DOI: 10/1016/j.toxlet2012.11.025.
5. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Groot M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Kuster E. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, no. 19, pp. 6163–6169.
6. Sultankhodzhayev M.N., Tadzhibayev M.M. *Khimiya prirodnykh soyedineniy*, 1976, vol. 12, no. 3, p. 406. (in Russ.).
7. Yevstratova R.I., Zapesochayeva G.G. *Khimiya prirodnykh soyedineniy*, 1977, no. 4, p. 582. (in Russ.).
8. Zhanayeva T.A., Krivoshechekova O.Ye., Semenov A.A., Minayeva V.G. *Khimiya prirodnykh soyedineniy*, 1989, vol. 25, no. 3, p. 377. (in Russ.).
9. Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., Fan X. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2005, vol. 30, no. 5, pp. 347–350.
10. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. *Allelopathy Journal*, 2007, vol. 20, no. 2, pp. 327–338.
11. Enikeev A.G., Semenov A.A., Permyakov A.V., Sokolova N.A., Gamburg K.Z., Dudareva L.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2019, vol. 55, no. 3, pp. 282–285. DOI: 10.1134/S0555109919020065. (in Russ.).
12. Shafikova T.N., Omelichkina Yu.V., Boyarkina S.V., Enikeev A.G., Maksimova L.A., Semenov A.A. *Doklady Akademii nauk*, 2019, vol. 484, no. 1, pp. 121–124. (in Russ.).
13. Makarova L.Ye., Smirnov V.I., Klyba L.V., Petrova I.G., Dudareva L.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 394–403. (in Russ.).
14. Makarova L.Ye., Morits A.S., Sokolova N.A., Petrova I.G., Semenov A.A., Dudareva L.V., Tret'yakova M.S., Sidorov A.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2020, vol. 56, no. 2, pp. 165–173. DOI: 10.31857/S0555109920010122. (in Russ.).
15. Makarova L.Ye., Kapustina I.S., Morits A.S., Makarov S.S. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 162–184. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-162-184. (in Russ.).
16. Makarova L.Ye., Dudareva L.V., Petrova I.G., Vasil'yeva G.G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2016, vol. 52, no. 2, pp. 217–222. DOI: 10.7868/S0555109916020094. (in Russ.).
17. Makarova L.Ye., Markova Yu.A., Morits A.S., Karepova M.S., Sidorov A.V., Sokolova N.A. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2021, vol. 57, no. 4, pp. 394–401. DOI: 10.31857/S0555109921040103. (in Russ.).
18. Kiyohara H., Nagao K., Nomi R. *J. Gen. Microbiol.*, 1978, vol. 105, no. 1, pp. 69–75.
19. Barnsley E.A. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, no. 1, pp. 113–117.
20. Seo J.S., Keum Y.-S., Li Q.X. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009, vol. 6, no. 1, pp. 278–309. DOI: 10.3390/ijerph6010278.
21. Puntus I.F., Filonov A.Ye., Akhmetov L.I., Karpov A.V., Boronin A.M. *Mikrobiologiya*, 2008, no. 1, pp. 11–20. (in Russ.).
22. Reddy P.M., Rendón-Anaya M., de los Dolores Soto del Río M., Khandual S. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 2007, vol. 1(2), pp. 83–94.
23. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. *Food Chemistry*, 1999, vol. 64, no. 4, pp. 555–559.
24. Ma T., Teng Y., Christie P., Luo Y. *Front Environ. Sci. Eng.*, 2015, vol. 9(2), pp. 250–268. DOI: 10.1007/s11783-014-0652-2.

Received August 10, 2022

Revised September 29, 2022

Accepted October 29, 2022

**For citing:** Makarova L.Ye., Ishchenko A.A., Bizikov P.A., Petrova I.G., Kopytina T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 1, pp. 127–133. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.20230111760.

\* Corresponding author.

