

УДК 581.5:[541.144:543.42]

## ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ

© 2017 В.М. Колдаев

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты  
Восточной Азии ДВО РАН, г. Владивосток

Статья поступила в редакцию 29.03.2017

Интегральные показатели интенсивности поглощения (ПИП) для экстрактов из зеленых листьев определяли методом спектрофотометрии как площадь под контуром полосы в пределах абсцисс точек перегиба абсорбционного спектра, используя формулу Симпсона. Показано, что в процессе вегетации значения ПИП сначала возрастают, достигают максимальных значений в фазах цветения и плодоношения, а затем резко снижаются при диссеминации. Выявлена наиболее сильная корреляционная связь ПИП с фазами вегетации и менее сильная с температурой воздуха и продолжительностью светового дня. Самые значительные ПИП имеют экстракты из листьев растений с наиболее высокими максимумами в диапазоне 430–450 нм. Полученные ПИП характеризуют высокочувствительные к внешним воздействиям фотосинтетические процессы и могут использоваться в качестве простых и достаточно точных тестов для экспресс-анализа, контроля и мониторинга состояния растительных ресурсов.

Ключевые слова: фотосинтез, пигмент, интенсивность поглощения, спектрофотометрия, мониторинг

Важнейшими показателями состояния растений служат фотосинтетические процессы [1]. Фоторецепторная система зеленого листа включает каротино-хлорофилловый комплекс (КХК) химически разнообразных соединений с максимумами поглощения в видимой части фотосинтетически активной солнечной радиации [2]. В поглощении света участвуют и имеющиеся в составе листьев другие пигменты (ДП) антоцианы, флавоноиды с хромофорными группами, поглощающими обычно в ультрафиолетовом диапазоне. Соотношения поглощений молекулами КХК и ДП зеленого листа дают представления об утилизации световой энергии и могут использоваться для характеристики фотосинтетических процессов. Сравнительно простым и достаточно точным методом определения указанных соотношений служит молекулярная спектрофотометрия извлечений из зеленого листа [3]. Как ранее нами было показано [4], растения по абсорбционным показателям спиртовых экстрактов подразделяются на три спектрофотометрических группы в зависимости от длины волны наиболее высокого максимума (НВМ) поглощения. В спектрах поглощения (СП) экстрактов растений одной группы НВМ находятся в диапазоне 250–300, 2-й группы – от 310 до 360 и 3-й – от 410 до 450 нм, соответственно, и коэффициенты относительной фотоабсорбции распределены по группам в возрастающей последовательности [5, 6]. Безусловно, заслуживает внимания сопоставление поглощательных свойств различных хромофоров листа, показателем чего служит интегральная интенсивность поглощения, что имеет практическое значение, например, при оценке влияния среды на состояние растительных ресурсов. Однако относительная интенсивность

поглощения хромофоров из листьев растений Приморья изучена недостаточно полно.

**Цель работы:** спектрофотометрические исследования интегральной интенсивности поглощения экстрактов из листьев растений Приморья в зависимости от фаз вегетации, факторов среды и принадлежности растений к спектрофотометрическим группам.

**Материалом исследований** служили листья черной (*Ribes nigrum* L.) сорта «Чемпион Приморья» и красной (*Ribes rubrum* L.) сорта «Ранняя сладкая» смородины, боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida* Bunge.), мааки амурской (*Maackia amurensis* Rupr.), калужницы болотной (*Caltha palustris* L.), а также 22 растений (табл. 2) из разных спектрофотометрических групп, произрастающих на территории юга Приморского края. Наблюдения проводили с апреля по сентябрь. Для исследований от каждого вида растений брали по 5 независимых проб в 14–16 час в сухую солнечную погоду. Для сезонных исследований пробы брали по 20-м числам каждого месяца.

В одну пробу включали 8–10 неповрежденных листьев от 3–5 визуально здоровых растений одного вида, затем методом случайных чисел отбирали три листа. Дальнейшие манипуляции выполняли в затененном помещении. Из отобранных листьев немедленно на специальном планшете керамическим ножом вырезали в средней трети симметрично центральной жилке по два фрагмента 1×1 см, которые тотчас тщательно растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, небольшой добавкой углекислого магния и 10 мл 95%-го этанола. После 2–3-х минутного настаивания экстракты фильтровали через бумажный фильтр во флаконы темного стекла. Спектры поглощения регистрировали на цифровом спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне 220–710 нм с шагом 1 нм не позднее, чем

Колдаев Владимир Михайлович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственных растений. E-mail: kolvm42@rambler.ru

через 18-24 часа после приготовления экстрактов. Обработку и нормировку спектров, определение точек перегиба, температуры воздуха (ТВ) и продолжительности светового дня (ПСД), а также обозначение фаз вегетации (ФВ) производили по описанной ранее методике [5, 7].

Интегральную интенсивность поглощения, численно равную площади между осью абсцисс и контуром полосы [8], вычисляли по квадратурной формуле Симпсона, использующейся обычно при численном интегрировании сложных кривых в заданных пределах [9]. В качестве пределов интегрирования брали точки перегиба контура полосы поглощения. Например, в СП экстракта из листьев маакии амурской (рис. 1) участок между точками перегиба 1 и 2 соответствует поглощению ДП листа. Площадь  $S_{ДП}$  (горизонтальная штриховка) под контуром полосы в пределах абсцисс точек перегиба от  $\lambda_1$  до  $\lambda_2$  брали как численно равную их интегральной интенсивности поглощения в условных единицах (у.е.).

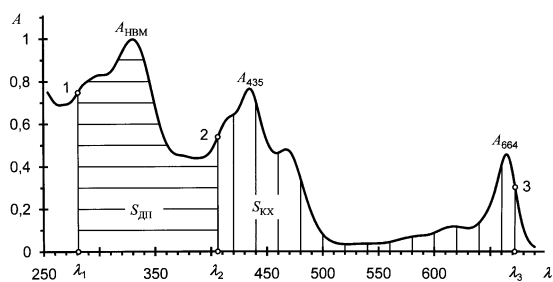


Рис. 1. Нормированный СП экстракта в 95%-м этаноле из листьев маакии амурской:

1, 2 и 3 – точки перегиба контура полосы,  $A_{НВМ}$  – ордината наиболее высокого максимума,  $A_{435}$  и  $A_{664}$  – экстинкции каротиноидов и хлорофилла. Пояснения в тексте. По горизонтали – длина волны  $\lambda$  в нм, по вертикали – экстинкция  $A$  в отн. ед.

Аналогично участок между точками перегиба 2 и 3 соответствует поглощению КХК ( $A_{435}$  и  $A_{664}$ ), а площадь  $S_{КХ}$  (вертикальная штриховка) под контуром полосы брали как интегральную интенсивность его поглощения в пределах абсцисс точек перегиба от  $\lambda_2$  до  $\lambda_3$ . Общую интегральную интенсивность поглощения ( $S_{общ}$ ), или площадь под контуром полосы между точками перегибов 1 и 3 в пределах абсцисс от  $\lambda_1$  до  $\lambda_3$  определяли как сумму:

$$S_{общ} = S_{ДП} + S_{КХ}.$$

Показателями интенсивности поглощения (ПИП) служили доля ( $F$ , в %) поглощения КХК в общем поглощении:

$$F = 100S_{КХ}/S_{общ},$$

и коэффициент  $K_{отн}$ , относительного поглощения КХК по сравнению с ДП:

$$K_{отн} = S_{КХ}/S_{ДП}.$$

Экспериментальные данные обрабатывали статистически методами малой выборки и линейной парной корреляции [10].

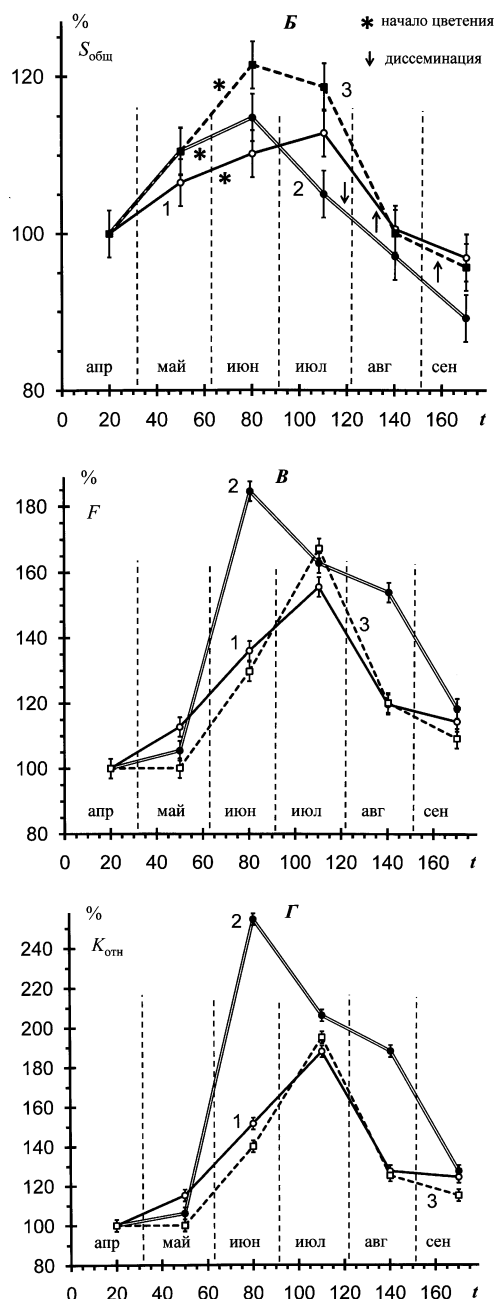


Рис. 2. Сезонные изменения (в %) спектрофотометрических показателей поглощения спиртовых экстрактов из листьев боярышника (1), красной (2) и черной (3) смородины. Пояснения в тексте

Полученные результаты показывают (рис. 2), что  $S_{общ}$  для СП экстрактов листьев красной смородины, зацветающей во второй половине мая, возрастает, достигая максимума в фазе плодоношения в июне, а затем в конце июля – начале августа, в периоде диссеминации, снижается. Похожая динамика  $S_{общ}$  наблюдается и для СП экстрактов из листьев других исследованных растений, но ее максимумы и спады наблюдаются несколько позже, в связи с более поздними сроками цветения и диссеминации черной смородины и особенно боярышника (рис. 2Б). Аналогично изменяются и ПИП ( $F$  и  $K_{отн}$ ): показатели нарастают по мере развития растений в

начале вегетации, достигая максимальных значений во время цветения и начала плодоношения, а затем в период диссеминации резко снижаются (рис. 2В и 2Г). В фазах цветения – начала плодоношения отмечается наибольшее возрастание показателя  $K_{отн}$ , в 1,89-2,52, показатель  $F$  увеличивается в средней степени в 1,55-1,85 и наименьший прирост имеет  $S_{общ}$ , всего в 1,11-1,19 раза по сравнению с «апрельскими» величинами. Значительные приросты

доли КХК в общем поглощении и относительного поглощения его молекул по сравнению с другими хромофорами свидетельствует о существенной активации фотосинтетических процессов в периоды плодоношения, что согласуется с положениями общей теорией физиологии растений [2]. Таким образом, ПИП  $K_{отн}$  и  $F$  дают представления о напряженности фотосинтетических и, по-видимому, могут служить для их характеристики.

**Таблица 1.** Коэффициенты корреляции ( $R$ ) показателей интегральной интенсивности поглощения СП экстрактов из листьев растений с фазами вегетации (ФВ), температурой воздуха (ТВ) и продолжительностью светового дня (ПСД)

Показатель	Фактор	Растения				Среднее
		калужница	смородина черная	смородина красная	боярышник	
		$R$				
$S_{общ}$	ФВ	0,97	0,93	0,97	0,63	0,87±0,08*
	ТВ	0,04	0,70	0,33	0,68	0,44±0,16
	ПСД	0,60	0,91	0,89	0,93	0,83±0,08*
$F$	ФВ	0,72	0,95	0,59	0,91	0,79±0,08*
	ТВ	0,61	0,94	0,87	0,85	0,82±0,07*
	ПСД	0,11	0,66	0,69	0,58	0,51±0,13
$K_{отн}$	ФВ	0,69	0,92	0,62	0,89	0,78±0,06*
	ТВ	0,67	0,92	0,62	0,84	0,76±0,07
	ПСД	0,17	0,61	0,72	0,56	0,51±0,12

Примечания: \* – достоверно при  $p < 0,05$

**Таблица 2.** Показатели интегральной интенсивности поглощения абсорбционных спектров экстрактов из листьев растений по спектрофотометрическим группам ( $\Gamma$  [4]) и длина волны ( $\lambda$ ) наиболее высоких максимумов

$\Gamma$	Наименование растений	$\lambda$ (нм)	Показатели ИИП		
			$S_{общ}$ (y.e)	$F$ (%)	$K_{отн}$
250 – 300 нм	Аконит Кузнецова, <i>Aconitum kusnezoffii</i> Rchb.	268	135,6±11,2	31,59±1,41	0,46±0,03
	Актинидия аргута, <i>Actinidia arguta</i> (Siebold et Zucc.) Planch ex Miq.	280	111,8±10,6	25,09±1,11	0,33±0,02
	Береза плосколистная, <i>Betula platyphylla</i> Sukacz.	266	134,3±11,3	28,29±1,14	0,39±0,03
	Венерин башмачок обыкновенный, <i>Cypripedium calceolus</i> L.	268	88,5±7,56	22,90±1,12	0,30±0,02
	Вероника длиннолистная, <i>Veronica longifolia</i> L.	280	79,7±5,64	19,65±0,92	0,24±0,01
	Лиственница сибирская, <i>Larix sibirica</i> Ledeb.	271	79,3±5,78	22,63±1,12	0,29±0,02
	Малина обыкновенная, <i>Rubus idaeus</i> L.	257	117,1±10,2	28,84±1,16	0,41±0,03
	среднее значение		106,8±9,6	24,68±1,12	0,33±0,02
310 – 360 нм	Амброзия, <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	331	132,8±11,4	36,68±1,18	0,58±0,04
	Вейгела ранняя, <i>Weigela praecox</i> (Lemoine) Bailey	331	136,3±11,6	38,22±2,11	0,62±0,05
	Виноград амурский, <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	335	158,1±12,3	36,12±2,01	0,57±0,05
	Гореч почечуйный, <i>Polygonum persicaria</i> L.	333	168,8±12,8	31,14±1,19	0,45±0,03
	Горчица сарептская, <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	341	128,8±10,2	43,08±3,12	0,76±0,06
	Иссоп лекарственный, <i>Hyssopus officinalis</i> L., Sp., Pl.	327	152,6±12,6	33,48±2,16	0,50±0,03
	Лапчатка гусиная, <i>Potentilla anserina</i> L.	329	182,0±16,4	31,57±2,13	0,46±0,02
	Одуванчик лекарственный, <i>Taraxacum officinale</i> Wigg.	333	135,7±11,1	36,45±2,17	0,57±0,03
	Среднее значение		149,4±12,1	35,84±1,89	0,56±0,03

		Продолжение таблицы 2			
410 – 450 нм	Галинзога мелкоцветковая, <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	434	167,8±14,2	53,59±3,14	1,15±0,09
	Гулявник лекарственный, <i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.	434	173,8±14,7	48,21±2,16	0,93±0,08
	Кабачок, 'Суха', <i>Cucurbita pepo</i> ssp. <i>pepo</i>	433	167,7±14,6	51,56±4,12	1,06±0,09
	Настурция большая, <i>Tropaeolum majus</i> L.	434	205,6±18,3	41,88±3,15	0,72±0,05
	Пырей ползучий, <i>Elytrigia repens</i> (L.) Desv. Ex Nevsk	434	199,7±17,8	42,41±2,98	0,74±0,05
	Хоста подорожниковая, <i>Hosta plantaginea</i> (Lam.) Asch.	434	184,4±15,6	46,31±2,78	0,86±0,05
	Чемерица даурская, <i>Veratrum dahuricum</i> (Turcz.) Loes.	434	166,8±14,5	50,01±4,11	1,00±0,09
Среднее значение			180,8±15,2	47,71±3,64	0,92±0,08

Связь полученных показателей с факторами среды и фазами вегетации проявляется в разной мере. Для всех показателей выявлена высокая положительная достоверная корреляция с фазами вегетации (табл. 1). С факторами среды достоверные значения коэффициентов корреляции обнаружены только для показателя  $S_{\text{общ}}$  с ПСД и для показателя  $F$  с ТВ. Связи других показателей с исследованными факторами малозначимы и недостоверны. Приведенные корреляционные взаимоотношения подтверждают ведущую роль ФВ в сезонной изменчивости фотосинтетических процессов. Приведенные результаты не противоречат литературным данным [10, 11], полученным при изучении структурно-функциональных сдвигов фотосинтетического аппарата, ультраструктуры клеток мезофилла и пигментного комплекса хлоропластов на примере лиственницы сибирской.

Представляло интерес определение значений ПИП для СП экстрактов из листьев растений, принадлежащих к выявленным нами ранее спектрофотометрическим группам [4, 5] в зависимости от положения НВМ в оптическом диапазоне. Интегральные показатели интенсивности поглощения определяли на их максимуме, в фазах цветения – начала плодоношения (табл. 2). Следует заметить, что значения показателей разного рода отличаются в несколько раз. Например, для СП экстракта из листьев аконита Кузнецова  $S_{\text{общ}}$  и  $F$  различаются в 3,7, а  $S_{\text{общ}}$  и  $K_{\text{отн}}$  в 294,8 раза. В связи с этим для наглядности и удобства значения ПИП в группах целесообразно было для сопоставления выразить в процентах относительно первой спектрофотометрической группы (рис.3).

В первой группе растений с НВМ в СП экстрактов из листьев в коротковолновой части ультрафиолетового диапазона 250-300 нм выявлены наиболее низкие значения ПИП. В третьей группе, с НВМ в видимом (синем) диапазоне 410-450 нм,  $S_{\text{общ}}$  в 1,69,  $F$  в 1,93 и  $K_{\text{отн}}$  в 2,78 раза больше по сравнению с аналогичными показателями растений 1-й группы. Во второй группе ПИП имеют промежуточные значения между показателями первой третьей групп (рис. 3).

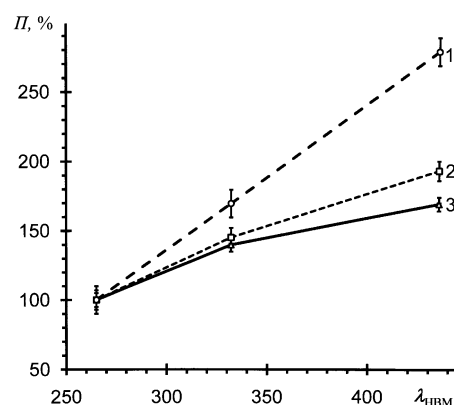


Рис. 3. Зависимость коэффициента относительного поглощения (1), доли поглощения (2) и общего поглощения (3) от длины волны наиболее высокого максимума. По вертикали – показатели в %, по горизонтали – длина волны НВМ в нм

**Выводы:** результаты работы дополняют представления о вариабельности фотосинтетических процессов на различных этапах вегетации и могут служить основой при разработке методов оценки устойчивости растений в условиях изменяющейся среды обитания. Полученные значения интегральных ПИП отображают напряженность фотосинтетических процессов. Ведущими факторами в сезонной изменчивости ПИП экстрактов из листьев являются ФВ и ПСД. Описанная методика определения относительной поглощательной способности КХК по сравнению с хромофорами других пигментов зеленого листа довольно проста и мало трудоемка, что немаловажно в полевой практике, при этом достаточно точная. Интегральные ПИП можно использовать в качестве спектрофотометрического теста состояния фотосинтетических процессов при экспресс-анализе, контроле, мониторинге растений и решении вопросов экологии растительных ресурсов, связанных с фотосинтетическими проблемами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Меньшакова, М.Ю. Изменчивость фотосинтетического аппарата растений: boreальные и субарктические экосистемы. – М.: Наука, 2008. 117 с.

2. *Алехин, Н.Д.* Физиология растений / *Н.Д. Алехин, Ю.В. Банюкин, В.Ф. Гавриленко* и др. – М.: Академия, 2007. 640 с.
3. *Шмидт, В.* Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. – М.: Техносфера, 2007. 368 с.
4. *Колдаев, В.М.* Разновидности абсорбционных спектров этанольных извлечений из листьев растений / Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16, № 5(3). С. 1793-1795.
5. *Колдаев, В.М.* Сезонная динамика относительной фотоабсорбции в зеленых листьях растений / Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2016. Т. 18, № 2. С. 101-104.
6. *Колдаев, В.М.* Спектрофотометрический фотоабсорбционный тест как экологическая оценка состояния зеленых растений / Экологические проблемы природопользования и охрана окружающей среды в азиатско-тихоокеанском регионе: Сред. формы жизни, их охрана и восстановление. – Владивосток: Дальнаука, 2016. С. 55-59.
7. *Колдаев, В.М.* Фотометрические параметры абсорбционных спектров экстрактов из растений / *В.М. Колдаев, В.В. Ващенко, Г.Н. Бездетко* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 3. С. 49-51.
8. *Пиняжко, Р.М.* Методы УФ-спектрофотометрии в фармацевтическом анализе / *Р.М. Пиняжко, Т.Г. Каленюк*. – Киев: «Здоров'я», 1976. 256 с.
9. Математическая энциклопедия. Т. 4. Ок – Сло / Гл. ред. И.М. Виноградов. – М.: Советская энциклопедия, 1984. 1216 стб.
10. *Зайцев, Г.Н.* Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1984. 424 с.
11. *Цельникер, Ю.Л.* Анализ влияния факторов среды на фотосинтез хвойных Предбайкалья / *Ю.Л. Цельникер, М.Д. Корзунин, Г.Г. Суворова* и др. // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. 2007. Т. 21. С. 265-292.
12. *Загирова, С.В.* Структура, содержание пигментов и фотосинтез хвои лиственницы сибирской на северном и приполярном Урале // Лесоведение. 2014. № 3. С. 3-10.

## INTEGRATED INDEXES OF ABSORPTION SPECTRUMS FROM GREEN LEAVES EXTRACTS

© 2017 V.M. Koldayev

Federal Scientific Center of East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok

The integrated indexes of absorption intensity (IAI) for extracts from green leaves were determined by spectrophotometry method as the area under a strip contour within abscissa of inflection points of absorbing range, using Simpson's formula. It is shown that in the course of IAI value vegetation at first increase, reach the maximum values in phases of blossoming and fructification, and then sharply decrease at a dissemination. The strongest correlation communication of IAI with phases of vegetation and less strong with the air temperature and duration of light day is revealed. The most considerable IAI have extracts from leaves of plants with the highest of a maximum in the range of 430-450 nanometers. The received IAI characterize photosynthetic processes, highly sensitive to external influences, and also enough exact tests for the express analysis, control and monitoring of a condition of vegetable resources can be used as simple.

Key words: *photosynthesis, pigment, intensity of absorption, spectrophotometry, monitoring*