

УДК 543.429.23 : 547.426.23

Е. Д. Скаковский<sup>1</sup>, Л. Ю. Тычинская<sup>1</sup>, С. Н. Шиш<sup>2</sup>, А. Г. Шутова<sup>2</sup>,  
С. А. Ламоткин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси

<sup>2</sup>Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси

<sup>3</sup>Белорусский государственный технологический университет

### ЯМР АНАЛИЗ ХЛОРОФОРМЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ СЕМЯН ЧЕРНУШКИ

Проведен сравнительный ЯМР анализ хлороформных экстрактов семян трех видов рода *Nigella* (*Nigella damascena* L. (чернушка дамасская), *Nigella sativa* L. (чернушка посевная), *Nigella orientalis* L. (чернушка восточная) и изучено влияние различных видов помола семян на состав компонентов. Для исследования использовались семена растений, культивируемых на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

ЯМР анализ хлороформных экстрактов семян различных видов чернушки позволил установить их жирнокислотный состав, обнаружить наличие в них *n*-цимола и тимохинона. Показано, что линолевая и олеиновая кислоты в триацилглицеридах преимущественно занимают центральное положение. Установлено, что тщательный размол семян приводит к появлению в экстракте дополнительных веществ, по-видимому содержащихся в оболочке, и к разрушению триацилглицеридов.

Выявлены отличия в жирнокислотном составе разных видов чернушки. Отличительной особенностью для *Nigella damascena* является присутствие в экстрактах семян в наибольшем количестве эйкозодиеновой кислоты, экстракт семян *Nigella orientalis* содержит наибольшее количество линолевой кислоты, а *Nigella sativa* лидирует по накоплению *n*-цимола и тимохинона.

**Ключевые слова:** семена, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Nigella orientalis*, ядерный магнитный резонанс, хлороформные экстракты, жирные кислоты, тимохинон.

E. D. Skakovskiy<sup>1</sup>, L. Yu. Tychinskaya<sup>1</sup>, S. N. Shish<sup>2</sup>, A. G. Shutova<sup>2</sup>, S. A. Lamotkin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus

<sup>2</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

<sup>3</sup>Belarusian State Technological University

### NMR ANALYSIS OF CHLOROFORM EXTRACTS OF *NIGELLA* SEEDS

A comparative NMR analysis of chloroform extracts of three species of the *Nigella* family (*Nigella damascena* L., *Nigella sativa* L., *Nigella orientalis* L.) has been carried out and the influence of seeds grinding on the extract composition has been investigated. The seeds were obtained from plants cultivated on the experimental site of the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden NAS of Belarus.

Fatty acid composition of the extract was evaluated; linoleic and oleic acids are the most abundant among triglycerides. The presence of *p*-cymene and thymoquinone in the extracts was proven. A severe grinding of the seeds results in the extraction of additional compounds from the seed shell, and decomposition of triacylglycerols.

The difference of fatty acids composition of three different *Nigella* species has been shown. The specificity of *Nigella damascena* is the highest content of eicosadienoic acid in the seeds extracts, while *Nigella orientalis* contains the highest amount of linoleic acid. *Nigella sativa* is the leader in *p*-cymene and thymoquinone accumulation.

**Key words:** seeds, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Nigella orientalis*, nuclear magnetic resonance, chloroform extracts, fatty acids, thymoquinone.

**Введение.** Растения рода чернушка (*Nigella* L.) – однолетние травянистые растения семейства лютиковых (*Ranunculaceae*) высотой до 0,7 м, произрастают в Западной Европе, Северной и Западной Африке, Юго-Восточной и Западной Азии. Самыми распространенными видами являются чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*Nigella sativa* L.), а также чернушка восточная (*Nigella orientalis* L.) [1].

С античных времен чернушка используется как важное медицинское растение и как приправа для овощей, бобовых и различных типов пекарских продуктов [2]. Отвар семян чернушки в современной медицине используют как ветрогонное, снотворное, болеутоляющее средство при зубной боли, применяют при лечении панкреатитов, гепатитов, холециститов. Экстракты семян чернушки обладают гепатопротекторными

и антиоксидантными свойствами [3]. Антиоксидантные свойства чернушки защищают слизистую желудка от повреждающего воздействия алкоголя и других агрессивных агентов [4]. Считается, что чернушка является лекарством от всех болезней за исключением смерти [2].

Высокая биологическая активность этого растения обязана наличию в нем масел: как ацилглицеридов, так и эфирных, которые содержатся в различных его вегетативных органах [2, 5]. Их состав изучался преимущественно хроматографическими методами, которые, несмотря на свою универсальность, имеют ряд недостатков. Во-первых, для разных классов соединений требуются различные колонки. Во-вторых, не во всех случаях наблюдается разделение пиков присутствующих соединений, и, в-третьих, необходимы соединения, которые предполагается анализировать в маслах или наличие соответствующей базы данных. Кроме того, в случае триацилглицеридов жирных кислот нужна предварительная пробоподготовка – получение метиловых эфиров этих кислот. В этом плане метод ЯМР имеет ряд преимуществ и находит все большее применение для анализа как эфирных масел, так и ацилглицеридов.

Цель настоящей работы – сравнительный ЯМР анализ хлороформенных экстрактов семян различных видов чернушки, а также изучение влияния различных видов помола семян перед экстракцией на состав компонентов.

**Основная часть.** Для анализа были взяты семена *N. orientalis*, *N. damascena* и *N. sativa*, собранные с растений, выращенных в 2014 г. на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботани-

ческого сада НАН Беларуси. Перед тем как проводить экстракцию, семена измельчали одним из двух способов. Первый заключался в том, что их растирали в агатовой ступке, во втором – семена мололи в кофемолке в течение 90 с. При этом образцы заметно нагревались. Затем 50 мг измельченных семян заливали 1 мл дейтерированного хлороформа ( $\text{CDCl}_3$ ) и в закрытой емкости выдерживали в течение 12 ч. Перед записью спектров ЯМР растворы фильтровали. Готовили экстракты и записывали спектры для нескольких образцов каждого вида. Для количественного определения содержания масла экстракцию проводили из 1 г семян. Содержание масла в семенах *N. orientalis* составило 17,0%, *N. damascena* – 13,4% и *N. sativa* – 15,1%. Относительная ошибка измерения составляла 5%.

Спектры ЯМР растворов в  $\text{CHCl}_3$  записывали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 и 126 МГц для ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соответственно. Запись проводилась при температуре 293 К в 5 мм стандартных ампулах. Накопление сигналов для протонных спектров осуществлялось в течение 10 мин, а для углеродных – в течение 12 ч. В качестве внутреннего стандарта в случае ядер  $^1\text{H}$  использовали сигнал  $\text{CHCl}_3$  (примесь в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 7,27$  м. д.), для ядер  $^{13}\text{C}$  – сигнал растворителя ( $\delta = 77,7$  м. д.). Все экспериментальные данные получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN – NMR 3.5.

На рис. 1 представлены спектры ЯМР хлороформенного экстракта семян чернушки посевной (первый способ измельчения): а- $^1\text{H}$ , б- $^{13}\text{C}$ , в- $^{13}\text{C}$  (область двойных связей).

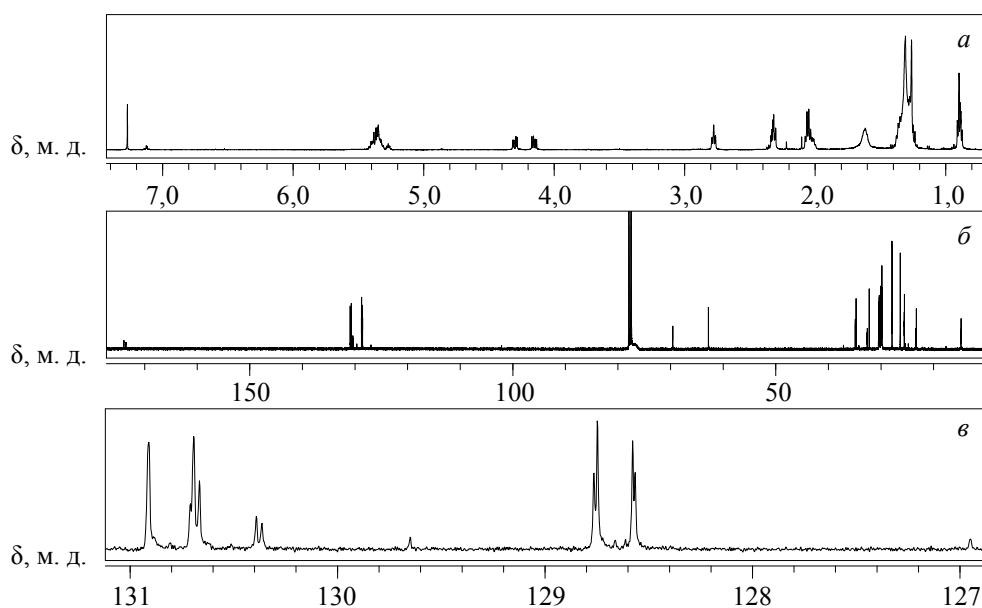


Рис. 1. Спектры ЯМР  $\text{CDCl}_3$ -экстракта семян чернушки посевной: а- $^1\text{H}$ ; б- $^{13}\text{C}$ ; в- $^{13}\text{C}$  (область двойных связей)

Кроме приведенных сигналов, принадлежащих протонам триглицеридов, наблюдаются сигналы и других соединений. Идентифицировано наличие *p*-цимола, его сигналы:  $\delta_{\text{СН}}$  (ароматика) = 7,12; 7,13 м. д., метиновый протон при 2,88 м. д. и протоны метильных групп с химическими сдвигами 2,33 и 1,2 м. д. По-видимому, данное соединение было экстрагировано из оболочек семян. Кроме *p*-цимола в заметных количествах в экстракте присутствует и тимохинон: олефиновые протоны регистрируются при 6,51 и 6,58 м. д., метиновый протон – 3,01 м. д. и метильные протоны – 1,12; 2,03 м. д.

Необходимо отметить, что тимохинон способен ингибировать окислительные процессы в лейкоцитах и мембранных липидах, он также обладает противосудорожным эффектом.

Протонные спектры экстрактов семян чернушки дамасской и восточной подобны рассмотренному спектру. Однако *p*-цимол и тимохинон в заметных количествах не обнаружены.

Углеродный спектр экстракта *N. Sativa* по идентифицированным соединениям хорошо коррелирует с протонным спектром. Так, углеродные атомы карбоксильных групп триацилглицеридов поглощают 173,53 и 173,54 м. д., в области 128–131 м. д. наблюдаются резонансы олефиновых С-атомов, метиновый углерод глицериновой части поглощает при 69,57 м. д., а углеродные атомы СН<sub>2</sub>-групп – при 62,79 м. д., метиленовые углероды алифатических цепочек всех жирных кислот резонируют в области 23–38 м. д., а метильные углероды – при 14,76 м. д. Кроме того, наблюдается поглощение *p*-цимола: ароматические углероды – 126,95; 129,63; 135,79 и 146,52 м. д., метиновый углерод – 34,40 м. д. и метильные углероды – 21,64 и 24,80 м. д. Из сигналов тимохинона в данном случае отчетливо наблюдается поглощение атомов углерода метильных групп – 22,06 м. д.

С использованием спектров <sup>13</sup>С (рис. 1, в) можно оценить относительное содержание ненасыщенных жирных кислот, а также их распределение в триацилглицеридах. Так, олефиновые С-атомы жирных кислот имеют следующие химические сдвиги: олеиновая – 130,36; 130,39; 130,69; 130,71 м. д., линолевая – 128,57; 128,58; 128,75; 128,77; 130,67; 130,69; 130,91 м. д. Все сигналы являются дублетами (кроме последнего), отличие в химических сдвигах обусловлено местом присоединения кислотных остатков к концевым или центральной гидроксильным группам глицерина. Сравнение интегральных интенсивностей линий в этих дублетах позволяет оценить предпочтительное присоединение кислотных остатков к глицерину. Если таковое отсутствует, отношение равно 2:1.

Необходимо отметить, что в заметных количествах в области поглощения олефиновых углеродов присутствует четыре синглета одинаковой интенсивности с  $\delta = 128,61; 128,66; 130,81$  и  $130,89$  м. д. Согласно работе [2] они, по-видимому, принадлежат эйкозодиеновой кислоте (С 20:2, *n* 11, 13). Поскольку наблюдающиеся линии не имеют дублетной структуры, то указанная кислота в экстракте, скорее всего, присутствует в свободном виде, а не входит в состав триацилглицеридов.

Содержание веществ, выраженное в мольных процентах, приведено в табл. 1.

Таблица 1

**Содержание компонентов в хлороформенных экстрактах семян различных видов чернушки (%)**

Соединение	<i>N. orientalis</i>	<i>N. damascena</i>	<i>N. sativa</i>
Линолевая кислота	60,7	50,8	53,4
Олеиновая кислота	12,4	33	20,9
Эйкозодиеновая кислота	3,9	4,2	2,1
Насыщенные кислоты	20,2	6,3	7,7
<i>p</i> -Цимол	–	1,6	8,5
Тимохинон	–	–	4,3

Из табл. 1 видно, что наибольшее количество линолевой кислоты содержится в экстракте чернушки восточной (60,7%), но если рассматривать только триацилглицериды, то по этому показателю (по содержанию линолевой кислоты в жирах) чернушка посевная превосходит восточную (61,6%). Считается, что наиболее полезной из установленных кислот является эйкозодиеновая. В наибольшем количестве она присутствует в чернушке дамасской.

Необходимо отметить, что кроме триацилглицеридов в экстрактах в заметных количествах присутствует *p*-цимол. В *N. sativa* его 8,5%. В этом же образце есть и тимохинон – 4,3%.

В табл. 2 приведено отношение содержания линолевой и олеиновой кислот, присоединенных к боковым гидроксильным группам глицерина к содержанию этих же кислот, присоединенных к центральной гидроксильной группе глицерина.

Приведенные цифры показывают, что обе ненасыщенные кислоты предпочитают находиться в центральном положении глицерина. Особенно это характерно для олеиновой кислоты. Следовательно, ненасыщенные кислоты присоединяются преимущественно к боковым гидроксильным группам.

Спектры ЯМР хлороформенного экстракта чернушки посевной, семена которой размолоты в кофемолке, приведены на рис. 2.

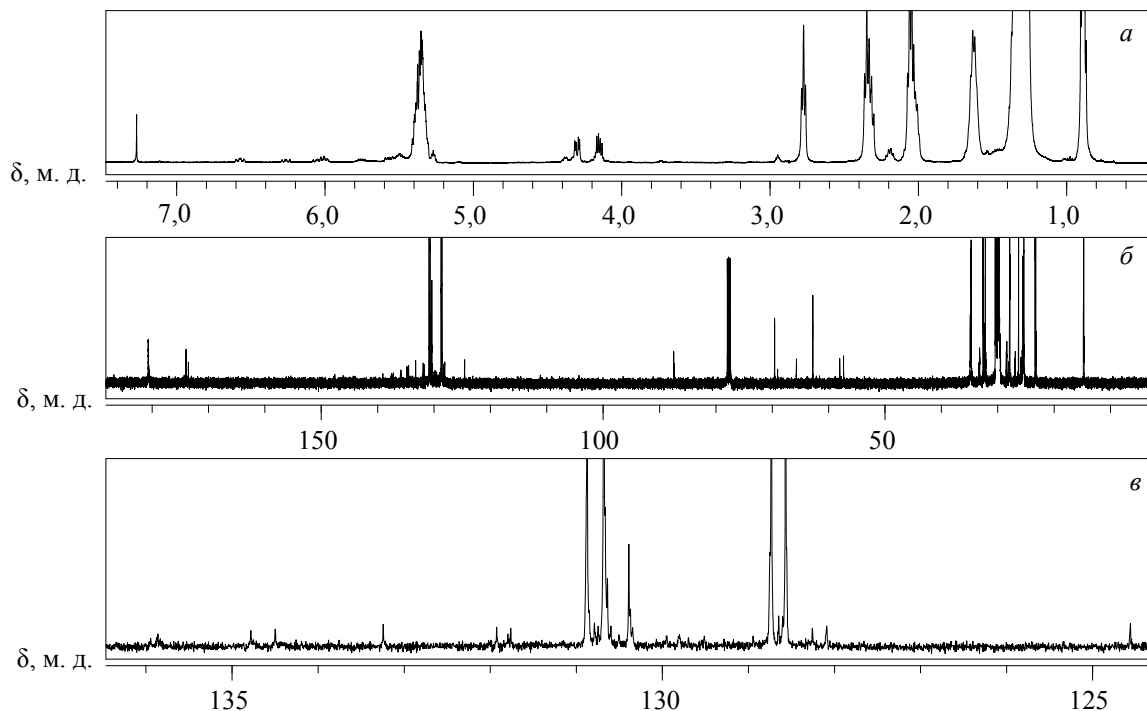


Рис. 2. Спектры ЯМР CDCl<sub>3</sub>-экстракта семян чернушки посевной (второй способ измельчения):  
 а – <sup>1</sup>H; б – <sup>13</sup>C; в – <sup>13</sup>C (область двойных связей)

Таблица 2  
**Отношение содержания ненасыщенных жирных кислот, присоединенных к боковым гидроксильным группам глицерина, к содержанию идентичных кислот, присоединенных к центральной гидроксильной группе глицерина, у масла семян различных видов чернушки**

Кислоты	<i>N. orientalis</i>	<i>N. damascena</i>	<i>N. sativa</i>
Линолевая	1,54	1,48	1,62
Олеиновая	1,20	1,23	1,22

Необходимо отметить, что протонные спектры (рис. 1, а и 2, а) различных экстрактов заметно отличаются. Так, в спектре экстракта семян, размолотых в кофемолке, наряду с рассмотренными компонентами появилось много дополнительных линий, которые логично отнести к линиям соединений, эффективно экстрагируемых из оболочки семян. В области поглощения глицериновых протонов наблюдаются линии, свидетельствующие о разложении триацилглицеридов и образовании диацилглицеридов. Кроме того, уменьшилась интегральная интенсивность метиленовых протонов ( $\delta = 2,78$  м. д.) линолевой и

эйкозадиеновых кислот, что связано либо с полимеризацией, либо с их окислением.

Углеродный спектр (рис. 2, б) хорошо согласуется с протонным. Здесь, при  $\delta = 180,68$  м. д. появился интенсивный синглет, принадлежащий карбоксильной группе свободных жирных кислот. В области глицериновых углеродов присутствуют две линии:  $\delta_{CH} = 68,99$  м. д. и  $\delta_{CH_2} = 65,7$  м. д., соответствующие Sn-1,3-диацилглицеридам в количестве ~11% от содержания триацилглицеридов [6]. Sn-1,2-диацилглицериды в заметных количествах не обнаружены. Анализ олефиновой части спектра (рис. 2, в) показывает, что он заметно отличается от аналогичного (рис. 1, в) для первого вида экстракта. Это проявляется в том, что сигналы в данном случае представляют собой преимущественно синглетные линии, в предыдущем случае – дублеты. Таким образом, наряду с появлением дополнительных сигналов после тщательно измельчения семян, что, по-видимому, связано с лучшей экстракцией веществ из оболочки семян, наблюдается разрушение триацилглицеридов и образование диацилглицеридов и свободных жирных кислот. Аналогичное явление мы наблюдали при анализе экстрактов злаков и муки из них [7].

**Заключение.** ЯМР анализ хлороформных экстрактов семян различных видов чернушки позволил установить их жирнокислотный состав,

обнаружить наличие в них *p*-цимола и тимонона. Показано, что линолевая и олеиновая кислоты в молекулах триацилглицеридов преимущественно занимают центральное положение.

Установлено, что тщательный размол семян приводит к появлению в экстракте дополнительных веществ, по-видимому принадлежащих оболочке, и к разрушению триацилглицеридов.

### Литература

1. Гогуэ Д. О., Холодова В. П., Кузнецов В. В. Влияние солевого стресса на рост и некоторые физиологические показатели растений рода *Nigella* // Вестник РУДН. Серия агрономия и животноводство. 2013. № 2. С. 12–19.
2. Gas chromatographic coupled mass spectroscopic study of fatty acids composition of *Nigella sativa* L. (Kalonji) vil commercially available in Pakistann / A. K. Aftab [et al.] // International Food Research Journal. 2014. Vol. 21. No. 4. P. 1533–1537.
3. Лекарственные растения / А. Ф. Лебедеа [и др.]. М.: АСТ-Пресс Книга, 2004. 907 с.
4. Нурмагомедова П. М., Омариева М. Г. Обзор статей. Свойства чернушки посевной (*Nigella sativa*) // Медицина и здравоохранение: материалы II Междунар. науч. конф., Уфа, май 2014 г. Уфа: Лето, 2014. С. 62–65.
5. Жирнокислотный состав липидов вегетативных органов чернушки при разном уровне засоления среды / Д. О. Гогуэ [и др.] // Изв. РАН. Серия биол. 2014. № 3. С. 264–270.
6. Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. H and C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview // Magnetic Resonance in chemistry. 1997. Vol. 35. P. 133–145.
7. Анализ экстрактов зерна злаковых культур и муки из их методом ЯМР / О. А. Гайдукевич [и др.] // Труды БГТУ Сер. IV, Химия и технология в-в. 2007. Вып. 15. С. 235–239.

### References

1. Gogue D. O., Kholodova V. P., Kuznetsov V. V. Influence of the salinity stress on growth and some physiological characteristics of plants *Nigella* species. *Vestnik RUDN. Seriya agronomiya i zhivotnovodstvo* [Bulletin of People's Friendship University of Russia. Ser. Agriculture and Livestock], 2013, no. 2, pp. 12–19 (in Russian).
2. Aftab A. K., Mahesar S. A., Khaskheli A. R., Sherazi S. T. H. Sofia Q., Zaki K. Gas chromatographic coupled mass spectroscopic study of fatty acids composition of *Nigella sativa* L. (Kalonji) vil commercially available in Pakistann. *International Food Research Journal*, 2014, vol. 21, no. 4, pp. 1533–1537.
3. Lebeda A. F., Dzhurenko N. I., Isaykina A. P., Sobko V. G. *Lekarstvennye rasteniya* [Drug Plants]. Moscow, AST-Press Kniga Publ., 2004, 907 p.
4. Nurmagomedova P. M., Omarieva M. G. [Review articles. Properties of *Nigella sativa*] (*Nigella sativa. Materialy II Mezhdunar. nauch. konf. (Meditsina i zdravookhranenie)*) [Materials of the II International Scientific Conference (Medicine and Health)]. Ufa, 2014. pp. 62–65 (in Russian).
5. Gogue D. O., Sidorov R. A., Tsydendambiev V. D., Kholodova V. P., Kuznetsov V. V. Fatty acid lipid composition of vegetations organs of *Nigella* at different salinity of media. *Izv. RAN. Seriya biol.* [Proceeding of Russian Academy of Scienses. Series biol.], 2014, no. 3, pp. 264–270 (in Russian).
6. Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. H and C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magnetic Resonance in chemistry*, 1997, vol. 35, pp. 133–145.
7. Gaydukevich O. A., Skakovskiy E. D., Tychinskaya L. Yu., Kulakova A. N., Lamotkin S. A. Analysis of gramineous crops extracts and flour form them by NMR. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series IV, Chemistry and Organic Substances Technology, 2007, issue XV, pp. 235–239 (in Russian).

### Информация об авторах

**Скаковский Евгений Доминикович** – кандидат химических наук, заведующий лабораторией физико-химических методов исследования. Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13, Республика Беларусь). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by

**Тычинская Людмила Юльевна** – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования. Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13, Республика Беларусь). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by

**Шиш Светлана Николаевна** – аспирант, младший научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии растений. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: cazonovacv@mail.ru

**Шутова Анна Геннадьевна** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, Республика Беларусь). E-mail: anna\_shutova@mail.ru

**Ламоткин Сергей Александрович** – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: jossby@rambler.ru

#### Information about the authors

**Skakovskiy Evgeniy Dominikovich** – Ph. D. Chemistry, Head of the Laboratory of Physico-chemical Methods of Research. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganova str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by

**Tychinskaya Lyudmila Yul'yevna** – Ph. D. Chemistry. Laboratory of Physico-chemical Methods of Research. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganova str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by

**Shish Svetlana Nikolaevna** – graduate student, junior researcher, Department of Biochemistry and Plant Biotechnology. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2b, Sarganova str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cazonovacv@mail.ru

**Shutova Anna Genad'yevna** – Ph. D. Biology, leading researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2b, Sarganova str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna\_shutova@mail.ru

**Lamotkin Sergey Aleksandrovich** – Ph. D. Engineering, associate professor, Department of Physical-chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: jossby@rambler.ru

*Поступила 20.02.2015*