

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40>
УДК 615.322:547.567.2



Оригинальная статья / Research article

Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.)

А. К. Уэйли³, Е. В. Бурцева^{1,2}, Е. В. Кулдыркаева¹, А. С. Новосад¹, Н. Л. Бабак¹,
Е. В. Жохова³, А. О. Уэйли³, М. Ю. Гончаров³, И. И. Тернинко³✉, Г. П. Яковлев³

¹ Акционерное Общество «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод», 298500, Россия, Республика Крым, г. Алушта, ул. 15-го Апреля, д. 37

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (КФУ им. В. И. Вернадского), 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Тернинко Инна Ивановна. E-mail: inna.terninko@pharminnotech.com

ORCID: А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Е. В. Бурцева – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>;
Е. В. Кулдыркаева – <https://orcid.org/0000-0003-0864-476X>; А. С. Новосад – <https://orcid.org/0000-0001-7167-4609>;
Н. Л. Бабак – <https://orcid.org/0000-0002-2127-2457>; Е. В. Жохова – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>;
А. О. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; М. Ю. Гончаров – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Г. П. Яковлев – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>.

Статья поступила: 04.04.2023

Статья принята в печать: 11.08.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

Резюме

Введение. Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) – кристаллическое вещество растительного происхождения, которое образуется в результате процесса окисления тимогидрохинона. Тимохинон – компонент эфирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), для которого установлен значительный спектр фармакологической активности. Учитывая липофильность данного соединения и его способность накапливаться в маслах, целесообразно предложить способ выделения тимохинона из жирного масла семян тмина для оценки его избирательного накопления и возможности применения масла в качестве источника получения.

Цель. Разработать способ выделения индивидуального соединения – тимохинона – из масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), доказать его структуру и определить степень чистоты полученного вещества.

Материалы и методы. Для подтверждения подлинности сырья проводили изучение морфолого-анатомических диагностических признаков. Количественную оценку содержания тимохинона в семенах тмина и изучение оптимальности процесса выделения проводили методом ВЭЖХ. Пробоподготовку проводили метанолом путем: 1) трехкратной экстракции на кипящей водяной бане; 2) сонификации; 3) настаивания. Структуру выделенного соединения подтверждали по спектральным характеристикам методом ИК-спектроскопии путем сравнения полученного ИК-спектра с данными базы NIST и одномерной ЯМР-спектроскопии.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного морфолого-анатомического анализа была подтверждена подлинность семян *N. sativa*. Методом ВЭЖХ проанализированы полученные различными способами пробоподготовки извлечения из семян тмина черного. Отмечено, что способ получения извлечения не оказывает значительного влияния на выход тимохинона, содержание которого в семенах тмина черного составляет $0,25 \pm 0,02$ %, что достаточно для целей выделения. Результаты оценки различных способов выделения тимохинона из семян тмина черного – экстракция спиртом и *n*-гексаном из измельченных семян, жидкость-жидкостная экстракция из жирного масла, перегонка масла с водяным паром – показали, что оптимальным способом получения тимохинона является перегонка масла семян тмина черного с водяным паром [соотношение масло:вода (1:1)] на песчаной бане в течение 3 часов. Выход тимохинона из масла *N. sativa* при этом составляет 398 мг из 150 мл масла (0,26 %). Идентичность тимохинона доказана по спектральным характеристикам в сравнении с базой данных NIST.

Заключение. Показана возможность выделения тимохинона из жирного масла семян *Nigella sativa* L. с хроматографической чистотой (метод ВЭЖХ) более 97 % и сопоставимостью спектральных характеристик, которые подтверждают идентичность полученного соединения. Предложенный экспрессный и экономичный способ выделения тимохинона методом перегонки с водяным паром обеспечивает выход целевого компонента 0,26 %. Данный способ может быть применен на производственных площадках предприятий по заготовке и переработке семян тмина черного для получения природного тимохинона.

Ключевые слова: *Nigella sativa* L., тимохинон, выделение индивидуального соединения, перегонка с водяным паром, спектральные методы анализа, жирное масло

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. К. Уэйли отвечал за дизайн эксперимента, обработку и интерпретацию полученных данных. А. О. Уэйли и М. Ю. Гончаров осуществили выделение тимохинона из масла семян тмина черного и проведение спектральных испытаний для установления структуры полученного соединения. Е. В. Жохова и Г. П. Яковлев осуществили проведение микроскопического исследования семян тмина и обработку полученного материала. И. И. Тернинко провела литературный поиск методики количественной оценки тимохинона в семенах тмина черного. Е. В. Кулдыркаева, А. С. Новосад и Н. Л. Бабак осуществили получение объектов исследования, подготовку проекта рукописи, литературный поиск по научному направлению и редакторские правки. Е. В. Бурцевой принадлежит научная идея и окончательная корректура статьи.

© Уэйли А. К., Бурцева Е. В., Кулдыркаева Е. В., Новосад А. С., Бабак Н. Л., Жохова Е. В., Уэйли А. О., Гончаров М. Ю., Тернинко И. И., Яковлев Г. П., 2023

© Whaley A. K., Burtseva Y. V., Kuldyrkaeva E. V., Novosad A. S., Babak N. L., Zhokhova E. V., Whaley A. O., Goncharov M. Yu., Terninko I. I., Yakovlev G. P., 2023

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Уэйли А. К., Бурцева Е. В., Куддыркаева Е. В., Новосад А. С., Бабак Н. Л., Жохова Е. В., Уэйли А. О., Гончаров М. Ю., Тернинко И. И., Яковлев Г. П. Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):29–40. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40>

A Method for the Isolation of Thymoquinone from Black Caraway Seed Oil (*Nigella sativa* L.)

Andrey K. Whaley³, Yelena V. Burtseva^{1,2}, Ekaterina V. Kuldyrkaeva¹, Alexander S. Novosad¹, Nikolay L. Babak¹, Elena V. Zhokhova³, Anastasiya O. Whaley³, Mikhail Yu. Goncharov³, Inna I. Terninko³✉, Gennadiy P. Yakovlev³

¹ JSC "Alushta essential oil state farm-plant", 37, April 15th str., Alushta, Republic of Crimea, 298500, Russia

² V. I. Vernadsky Crimean Federal University, 4, Academician Vernadsky avenue, Simferopol, Republic of Crimea, 295007, Russia

³ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Inna I. Terninko. E-mail: inna.terninko@pharminnotech.com

ORCID: Andrey K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Yelena V. Burtseva – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; Ekaterina V. Kuldyrkaeva – <https://orcid.org/0000-0003-0864-476X>; Alexander S. Novosad – <https://orcid.org/0000-0001-7167-4609>; Nikolay L. Babak – <https://orcid.org/0000-0002-2127-2457>; Elena V. Zhokhova – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>; Anastasiya O. Whaley – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Mikhail Yu. Goncharov – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Gennadiy P. Yakovlev – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>.

Received: 04.04.2023

Revised: 11.08.2023

Published: 25.08.2023

Abstract

Introduction. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) is an organic compound of plant origin, which is formed as a result of the oxidation of thymohydroquinone. Thymoquinone is a component of the essential oil of black caraway seeds (*Nigella sativa* L.) and is known to possess a significant spectrum of pharmacological activity. Due to the lipophilicity of thymoquinone and its ability to accumulate in oils, we proposed a method to isolate thymoquinone from the fatty oil of caraway seeds in order to assess its selective accumulation and the possibility of using the oil as a source for the compounds production.

Aim. Method development for the isolation of thymoquinone as an individual compounds from black caraway (*Nigella sativa* L.) seed oil, to confirm its structure and determine the degree of purity of the obtained substance.

Materials and methods. To confirm the authenticity of the raw materials, analysis of key morphological and anatomical diagnostic features was performed. Quantitative assessment of thymoquinone content in black caraway seeds and control of the isolation process were performed through HPLC analysis. Sample preparation was carried out with methanol by: 1) triple extraction on a boiling water bath; 2) sonification; 3) maceration. The structure of the isolated compound was confirmed through the analysis spectral characteristics using IR spectroscopy by comparing the obtained IR spectrum with the data from the NIST database and one-dimensional NMR spectroscopy.

Results and discussion. As a result of the morphological and anatomical analysis, the authenticity of *N. sativa* seeds was confirmed. Extracts from black caraway seeds obtained by various sample preparation methods were analyzed with HPLC. As a result, it was noted that the method of obtaining the extract does not significantly affect the yield of thymoquinone, the content of which in black caraway seeds is 0.25 ± 0.02 %, which is sufficient for isolation purposes. Through the evaluation of various isolation methods for thymoquinone from black caraway seeds – maceration with alcohol and n-hexane from crushed seeds, liquid-liquid extraction from fatty oil, steam distillation of oil – showed that the best way to obtain thymoquinone is through the distillation of black caraway seed oil with water steam [oil: water ratio (1:1)] in a sand bath for 3 hours. The yield of thymoquinone from *N. sativa* oil is 398 mg from 150 ml of oil (0.26 %). The structure of thymoquinone was confirmed by spectral characteristics in comparison with the NIST database and literature data.

Conclusion. The possibility of isolating thymoquinone from *Nigella sativa* L. seed fatty oil with a chromatographic purity (HPLC) of more than 97 % along with the comparison of the isolated compounds spectral characteristics with literature data, which confirm the identity of the obtained compound, was shown. The proposed express and efficient method for the isolation of thymoquinone through steam distillation provides a yield of the target component of 0.26 %. This method can be applied at reduction sites that harvest and process of black caraway seeds to obtain natural thymoquinone.

Keywords: *Nigella sativa* L., thymoquinone, individual compound isolation, steam distillation, spectral methods of analysis, fatty oil

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Andrey K. Whaley was responsible for the design of the experiment, processing and interpretation of the data obtained. Anastasiya O. Whaley and Mikhail Yu. Goncharov carried out the isolation of thymoquinone from black caraway seed oil and spectral tests to establish the structure of the resulting compound. Elena V. Zhokhova and Gennadiy P. Yakovlev carried out microscopic examination of caraway seeds and processed the material obtained. Inna I. Terninko conducted a literature search for the technique a quantitative assessment of thymoquinone in black caraway seeds. Ekaterina V. Kuldyrkaeva, Alexander S. Novosad and Nikolay L. Babak carried out the acquisition of plant material, the preparation of the draft manuscript, search of scientific literature, and editorial corrections. Yelena V. Burtseva generated the research idea and performed the final proofreading of the article.

Funding. The results of the work were obtained using equipment the Core Shared Research Facilities "Analytical Center" of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-685; dated 26 July 2021 on the provision of the Federal budget grants).

For citation: Whaley A. K., Burtseva Y. V., Kuldyrkaeva E. V., Novosad A. S., Babak N. L., Zhokhova E. V., Whaley A. O., Goncharov M. Yu., Terninko I. I., Yakovlev G. P. A method for the isolation of thymoquinone from black caraway seed oil (*Nigella sativa* L.). *Drug development & registration*. 2023;12(3):29–40. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40>

ВВЕДЕНИЕ

Выделение биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья как с целью его маркирования и последующей персонифицированной стандартизации, так и для получения фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) на сегодняшний момент приобретает все большее значение [1–2] ввиду, с одной стороны, ориентира потребителей на растительные субстанции и, с другой – необходимости подтверждения соответствия качества растительного объекта по индивидуальному соединению.

Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) – кристаллическое вещество с молекулярной формулой $C_{10}H_{12}O_2$, молекулярной массой 164,201 г/моль и с температурой плавления 45–46 °С, которое представляет собой природное соединение растительного происхождения, относящееся к классу монотерпеноидов (производное 1,4-бензохинона). Биосинтетически тимохинон образуется в результате процесса окисления молекулы-предшественника тимогидрохинона, который синтезируется из тимола или карвакрола. Описано содержание тимохинона (как компонента эфирного масла) в растениях *Monarda didyma* L., *Monarda media* Wild., *Monarda menthifolia*, *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L., *Thymus pulegioides* L., *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* L. и *Nigella sativa* L. [3].

Тимохинон – компонент эфирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), которые традиционно используются в странах Ближнего Востока и Юго-Восточной Азии в качестве пищевой культуры и, по данным Р. М. Paarakh с соавт. [4], является мажорным соединением данного растения, тем самым обуславливая его выбор в качестве источника получения. Для тимохинона установлен значительный спектр фармакологической активности, включая противовоспалительную [5], антиоксидантную [6], антигистаминную [7], противоопухолевую [8], обезболивающую [9], гепатопротекторную [10], нейропротекторную [11], антибактериальную [12], инсектицидную [13], антиишемическую [14], лейшманицидную [15] и радиозащитную [16]. Есть данные о положительном влиянии тимохинона на течение болезни Альцгеймера [17]. Ряд исследователей [18–20] выявили молекулярные пути клеточных механизмов терапевтического действия тимохинона при лечении различных типов злокачественных опухолей. Тимохинон воздействует на множество молекулярных мишеней различными путями, а также проявляет свое действие через многие клеточные механизмы, такие как ингибирование пролиферации, индукция апоптоза, продукция активных форм кислорода (АФК), предотвращение ангиогенеза и клеточного метастазирования.

Существует ряд исследований [12, 18], посвященных вопросам выделения тимохинона из растительных объектов. Однако, учитывая липофильность данного соединения и его способность накапливаться в

маслах, целесообразно было предложить способ выделения тимохинона из жирного масла семян тмина для оценки его избирательного накопления и возможности применения масла в качестве источника получения.

Цель работы: разработать способ выделения индивидуального соединения – тимохинона – из масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), доказать его структуру и определить степень чистоты полученного вещества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена тмина черного заготавливали в период полной зрелости (август 2022 года) от культивированных на опытных участках-полях АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод (АЭСЗ)» (Россия) растений. Жирное масло получали способом холодного прессования на производственной площадке АО «АЭСЗ».

Для подтверждения подлинности сырья проводили изучение морфолого-анатомических диагностических признаков. Внешние признаки семян изучали на сухом материале, рассматривая их невооруженным глазом, а также с помощью лупы 10х и стереомикроскопа (8х, 16х, 32х) в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ, ОФС.1.5.1.0008.15 «Семена». Изучение анатомо-диагностических признаков проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [21]. Препараты рассматривали при увеличении 80х, 200х и 800х на микроскопе цифровом тринокулярном Levenhuk D740T (Levenhuk, США). Микрофотографии препаратов были получены с помощью цифровой камеры Levenhuk 800M PLUS (максимальное разрешение 3264 × 2448 пикс., число мегапикселей – 8) и программного обеспечения LevengukLite (версия: x64, 4.11.18709.20210403).

Количественную оценку содержания тимохинона в семенах тмина проводили методом ВЭЖХ с использованием оборудования LC-20 (Shimadzu, Япония). Пробоподготовку проводили 3 способами.

1. Около 1,0 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина подвергали трехкратной экстракции метанолом на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Полученный раствор объединяли в мерной колбе объемом 50 мл, доводили до метки метанолом, фильтровали через фильтр «синяя лента». 1,0 мл раствора помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили до метки растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).
2. К 0,5 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина добавляли последовательно 10, 10, 5 мл метанола, каждый раз обрабатывали извлечение на УЗ-бане (ООО «Сапфир», Россия) в течение 20 мин. Извлечение фильтровали через

фильтр «синяя лента», объединяли в мерной колбе объемом 25 мл, разбавляли в 10 раз растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).

3. К 0,5 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина добавляли 10 мл метанола, перемешивали 10 мин, раствор фильтровали через фильтр «синяя лента», доводили до метки в мерной колбе объемом 25 мл и затем разбавляли в 10 раз растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).

Для количественной оценки тимохинона использовали метод внешнего стандарта (тимохинон, аналитический стандарт, Supelco, кат № 031416, без указания срока годности) с концентрацией стандартного раствора 10 мкг/мл. Анализ проводили в следующих хроматографических условиях:

Колонка	InterSil C18 (250×4.6, 5 μ) (Intersil Corporation, США)
Подвижная фаза (ПФ)	Вода/ацетонитрил 50/50 (ацетонитрил, HPLC grade, Fisher Chemical (США), п. 2170053, срок годности не установлен)
Режим	Изократический
Скорость потока	1 мл/мин
Объем пробы	20 мкл
Детектор	Диодная матрица, 254 нм

Изучение оптимальности процесса выделения проводили методом ВЭЖХ в следующих хроматографических условиях:

ПФ	В – ацетонитрил, с 0,1 % по объему трифторуксусной кислоты (PanReas, Испания) А – вода очищенная, с 0,1 % по объему трифторуксусной кислоты
Режим	Градиентный: 0–5 мин 5 % В, 5–45,75 мин от 5 до 100 % В, 45,75–50 100 % В, 50–60 мин от 100 до 5 % В, 60–65 мин 5 % В
Объем пробы	10 мкл

Структуру выделенного соединения подтверждали по спектральным характеристикам методом ИК-спектроскопии (ИК-фурье-спектрометр Spectrum 3 с НПВО-приставкой (PerkinElmer, США) путем сравнения полученного ИК-спектра с данными базы NIST и одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макро- и микроскопический анализ семян *N. sativa*. Форма семени яйцевидная, трех- или четырехгранная, длина семян 2,8–3 мм, ширина 1,6–1,8 мм, характер поверхности шероховатый. При рассмотрении в стереомикроскоп видно, что поверхность семян сетчато-ячеистая, продольно-морщинистая, ребра граней прямые или неровные, одна из граней обычно выпуклая, иногда семена могут иметь «смя-

тую» форму. Также следует отметить, что для некоторых трехгранных семян могут быть характерны слабо выступающие ребра на двух широких гранях, формируя неясно пятигранную структуру (что более отчетливо заметно на поперечных срезах при проведении микроскопического исследования) (рисунок 1). Семенная кожура плотная, твердая, рубчик не выражен, семена с эндоспермом в качестве питательной ткани, зародыш занимает центральное положение и имеет на поперечном срезе овальную форму, наиболее отчетливо в его структуре заметны две листовидные семядоли. Цвет семян черный, запах своеобразный, вкус водного извлечения горький.



Рисунок 1. Поперечный срез семени тмина черного (80х):

1 – семенная кожура; 2 – эндосперм; 3 – зародыш; 4 – ребро семени

Figure 1. Cross section of the seed of *Nigella sativa* (80x):

1 – seed testa; 2 – endosperm; 3 – embryo; 4 – seed rib

При рассмотрении поперечного среза семени видны: кожура в виде коричнево-черной полосы, эндосперм и зародыш (см. рисунок 1). При большом увеличении различаются слои семенной кожуры. Первый слой – однослойный эпидермис, состоящий из крупных, плотно сомкнутых клеток с равномерно утолщенными стенками (рисунок 2). Часть клеток радиально вытянута и имеет сосочковидную форму (в местах расположения морщинок), часть – прямоугольную. Под эпидермисом располагается паренхимный слой, состоящий по граням семени из одного слоя клеток, а по ребрам – из деформированных сжатых элементов, утративших свой клеточный характер и формирующих бесструктурный слой. Третий слой семенной кожуры – пигментный, состоящий из тангентально вытянутых клеток, имеющих неравномерные утолщения клеточной стенки и содержащих коричневый пигмент. Клетки эндосперма многоугольные, тонкостенные, содержат алеироновые зерна и капли жирного и эфирного масла (рису-

нок 3). Реакция с раствором судан III положительная, с раствором Люголя – отрицательная. Ткань семядолей отличается более мелкими клетками. При рассмотрении семенной кожуры с поверхности к анатомо-диагностическим признакам можно отнести особенности строения эпидермиса и пигментного слоя семенной кожуры (рисунки 4–7).

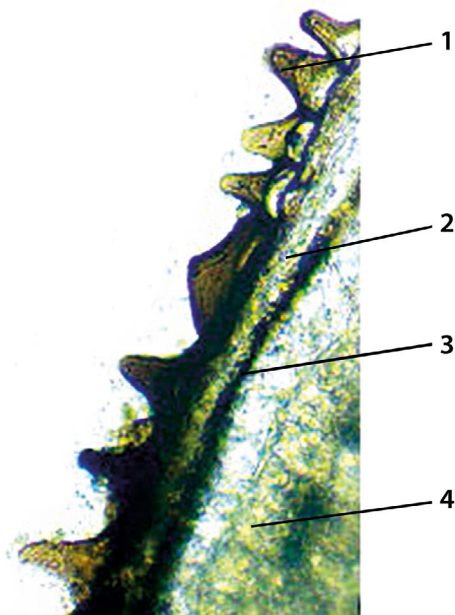


Рисунок 2. Поперечный срез семени тмина черного (200х):
1 – эпидермис; 2 – паренхимный слой; 3 – пигментный слой;
4 – эндосперм

Figure 2. Cross section of *Nigella sativa* seed (200х):
1 – epidermis; 2 – parenchymal layer; 3 – pigment layer;
4 – endosperm

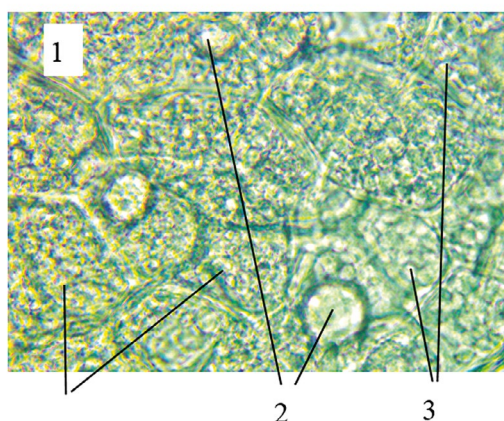


Рисунок 3. Поперечный срез семени тмина черного (800х):
1 – клетки эндосперма; 2 – капли жирного и эфирного масла;
3 – алейроновые зерна

Figure 3. Cross section of *Nigella sativa* seed (800х):
1 – endosperm cells; 2 – drops of fatty and essential oils; 3 – aleurone grains

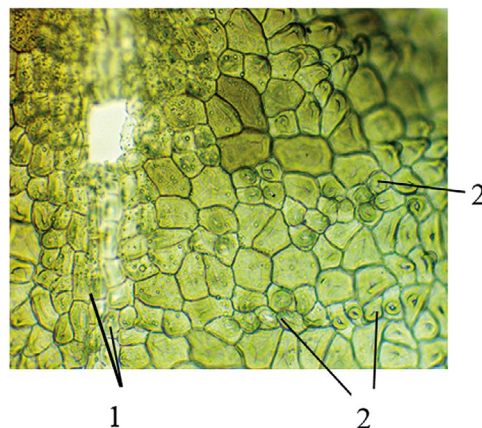


Рисунок 4. Препарат семенной кожуры с поверхности (200х):
1 – сосочковидный эпидермис ребра семени; 2 – сосочковидный эпидермис, формирующий продольные морщинки

Figure 4. Seed testa surface (200х):
1 – "papillary" epidermis of the seed rib; 2 – "papillary" epidermis forming longitudinal wrinkles

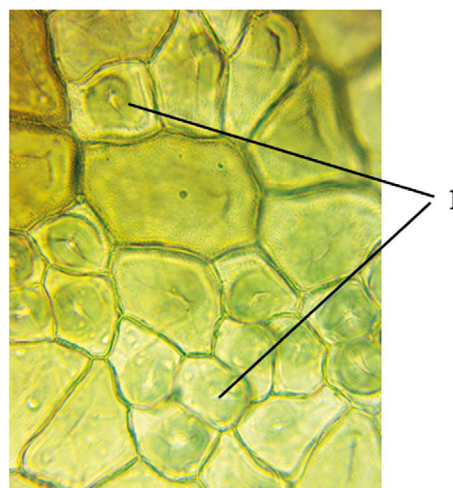


Рисунок 5. Препарат семенной кожуры с поверхности (800х):
1 – сосочковидный эпидермис (вид сверху)

Figure 5. Seed testa (800х):
1 – "papillary" epidermis (top view)

В результате проведенного морфолого-анатомического анализа была подтверждена подлинность семян *N. sativa*, а результаты микроскопии дают возможность заключить, что эфирное и жирное масла локализованы в эндосперме семени, благодаря чему процесс отжима масла сопровождается одновременной эффективной сопутствующей экстракцией компонентов эфирного масла в жирное масло.

Количественная оценка содержания тимохинона в семенах тмина. Методом ВЭЖХ проанализированы полученные различными способами про-

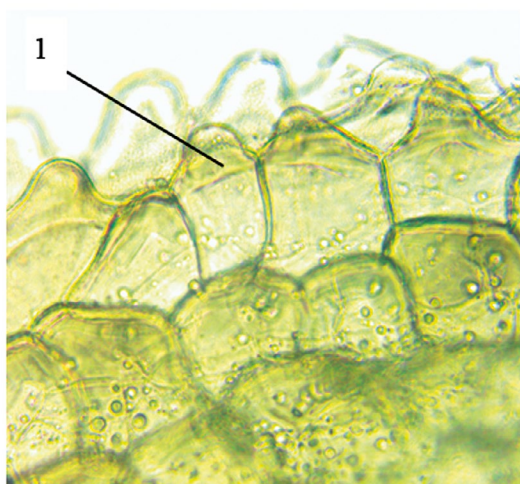


Рисунок 6. Препарат семенной кожуры с поверхности (800х):
1 – сосочковидный эпидермис (вид сбоку)

Figure 6. Seed testa (800х):

1 – "papillary" epidermis (side view)

боподготовки извлечения из семян тмина черного. Хроматограммы стандартного раствора тимохинона и испытуемого раствора приведены на рисунках 8 и 9 соответственно.

Совпадение времен удерживания и спектров пиков (рисунок 10) дает основания заключить, что пик на хроматограмме испытуемого раствора является тимохиноном.

Результаты количественного определения тимохинона в семенах тмина черного при различных способах пробоподготовки представлены в таблице 1.

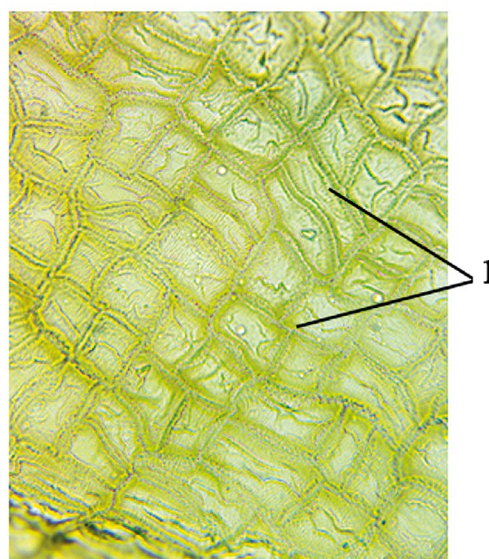


Рисунок 7. Препарат семенной кожуры с поверхности (800х):
1 – пигментный слой

Figure 7. Seed testa (800х):

1 – pigment layer

Из полученных результатов можно заключить, что способ получения извлечения не оказывает значительного влияния на выход тимохинона, содержание которого в семенах тмина черного составляет $0,25 \pm 0,02$ %, что достаточно для целей выделения.

Выделение тимохинона из *N. sativa*. Для выделения тимохинона из семян *N. sativa* методом мацерации в качестве экстрагентов использовали 96%-й этанол (АО «Гатчинский спиртовой завод», срок год-

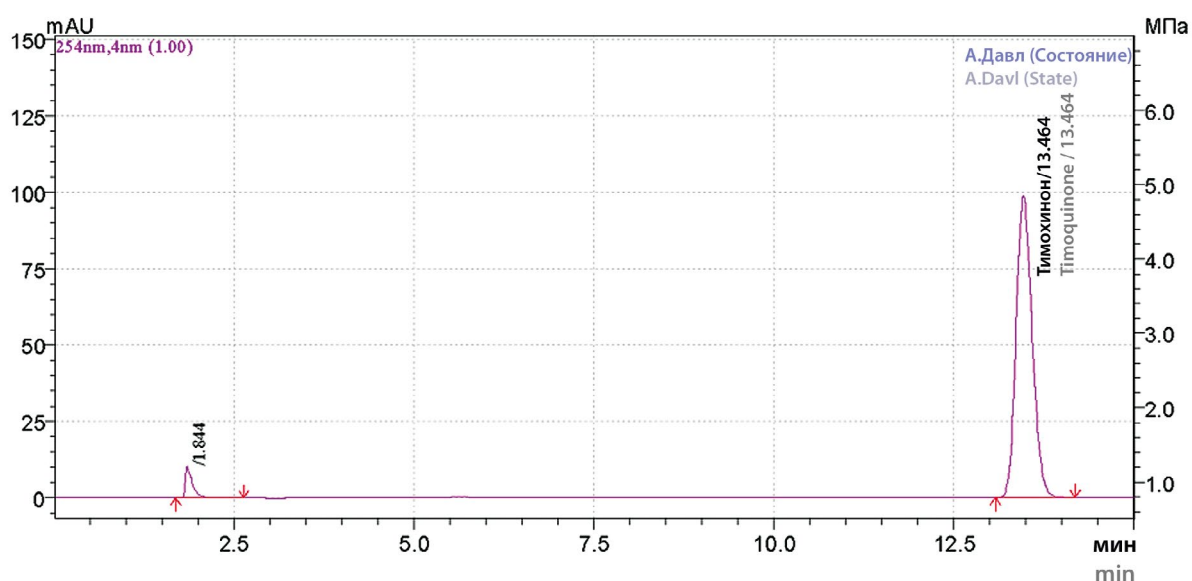


Рисунок 8. Типичная хроматограмма стандартного раствора тимохинона с концентрацией 10 мкг/мл

Figure 8. Chromatogram of a 10 µg/mL thymoquinone standard solution

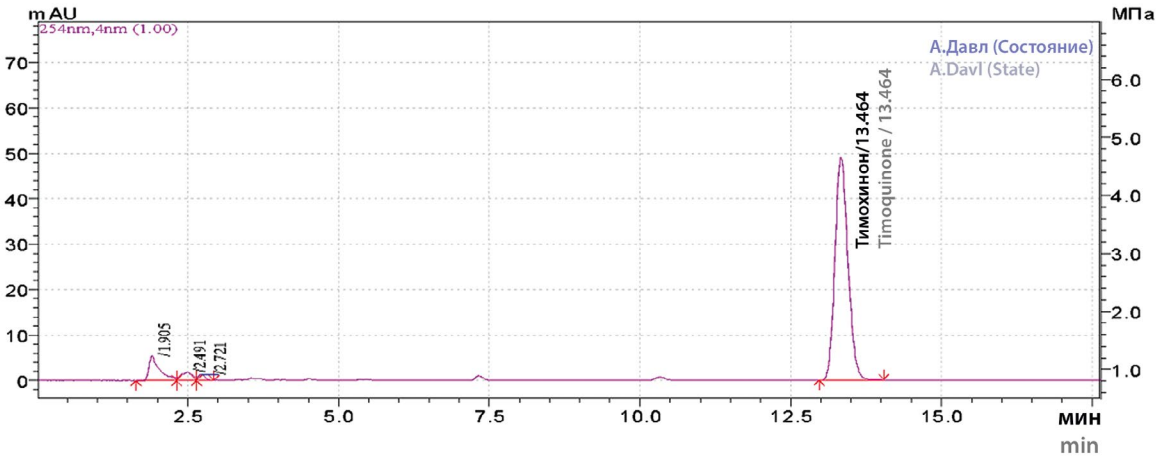


Рисунок 9. Типичная хроматограмма испытуемого раствора

Figure 9. Test solution chromatogram

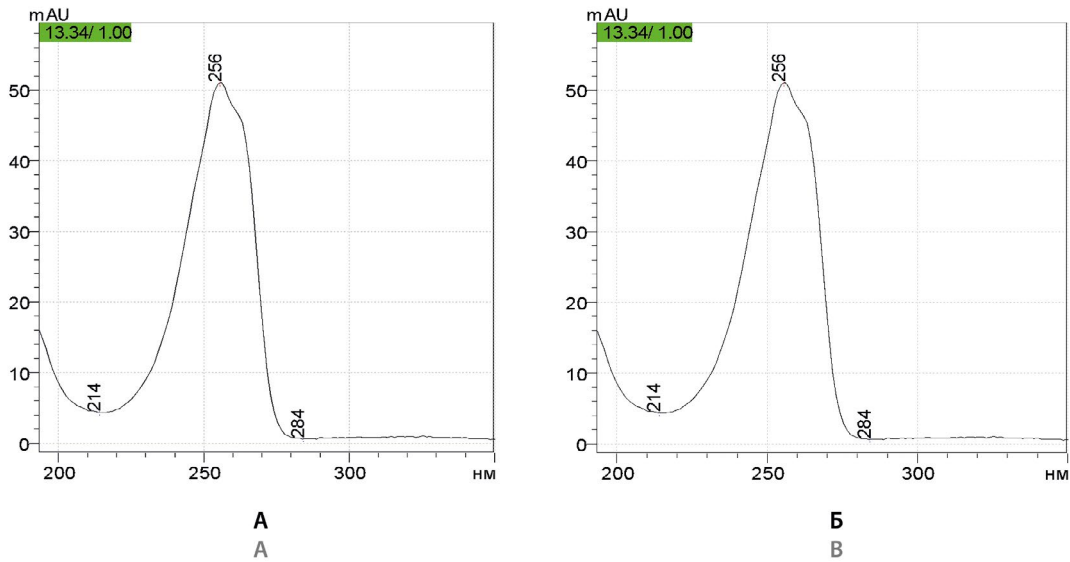


Рисунок 10. Спектры пиков основных веществ на хроматограмме стандартного раствора (А) и испытуемого раствора (Б)

Figure 10. Peak spectra of the main substances in the chromatogram of the standard solution (A) and the test solution (B)

ности не обозначен) и *n*-гексан (х.ч., АО «Вектон», годен до 09.2023). Экстракцию проводили методом мацерации при комнатной температуре с последующим анализом методом ВЭЖХ. На хроматограмме этанольного извлечения семян *N. sativa* тимохинон был мажорным пиком, но наряду с ним в экстракте присутствовало множество сопутствующих полярных соединений (рисунок 11).

Необходимо отметить, что гексановое извлечение было окрашено в зеленый цвет из-за присутствия хлорофиллов, наличие которых подтверждали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе БУВ (*n*-бутанол :уксусная кислота ледяная : вода) в соотношении 4:1:2 по характерной красной флуоресценции пятен.

Таблица 1. Результаты количественного определения тимохинона в семенах тмина черного, полученного различными способами экстракции

Table 1. Results of quantitative determination of thymoquinone in black cumin seeds obtained by various extraction methods

Способ экстракции Extraction method	Результат, % (n = 3) Results, % (n = 3)
Трехкратная экстракция метанолом на кипящей водяной бане Threefold extraction with methanol on a boiling water bath	0,26 ± 0,01
Экстракция с использованием сонификации (УЗ-баня) Extraction using sonification (ultrasonic bath)	0,25 ± 0,02
Однократное перемешивание с метанолом Single extraction with methanol	0,24 ± 0,02

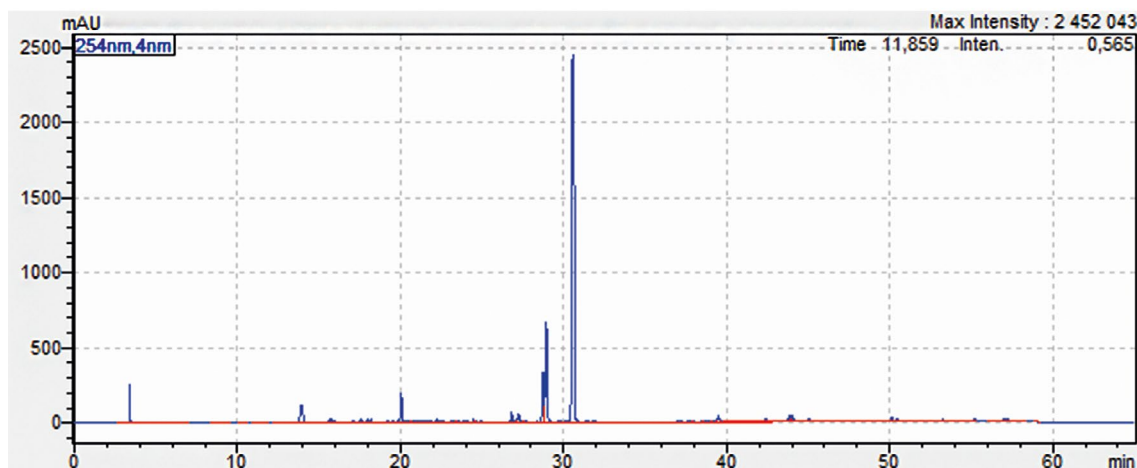


Рисунок 11. Хроматограмма этанольного извлечения семян *N. sativa*

Figure 11. Chromatogram of *N. sativa* seed ethanol extract

Хроматографическая чистота тимохинона, рассчитанная методом внутренней нормализации, составила 54,9 %.

На хроматограмме *n*-гексанового извлечения семян *N. sativa* тимохинон был почти единственным пиком с хроматографической чистотой 91,0 % (рисунок 12).

Для удаления хлорофиллов из растительных экстрактов используются различные приемы (хроматография, экстракция, сорбция), которые в той или иной степени приводят к уменьшению выхода целевых веществ. Наиболее простой метод – это адсорбция хлорофиллов активированным углем. К отфильтрованному экстракту добавляли 10,0 активированного угля (ООО «Фармстандарт-Лексредства», годен до 04.2025). Спустя 24 часа после добавления активированного угля экстракт фильтровали. Полное удаление хлорофиллов сопровождалось уменьшением содержания тимохинона в 2,2 раза вследствие процесса его частичной сорбции на активированном

угле. Хроматографическая чистота получаемого тимохинона после процесса сорбции составила 92,7 %.

Дальнейшие способы повышения чистоты тимохинона, получаемого из плодов, сопровождались значительными потерями целевого компонента и по выходу и чистоте уступали разработанной технологии выделения тимохинона из жирного масла *N. sativa*.

Учитывая, что тимохинон является липофильным соединением и локализуется в жирном масле эндоспермия семян, мы предположили, что его содержание в масле *N. sativa* на порядок больше чем в *n*-гексановом извлечении.

Принимая во внимание, что тимохинон растворяется в спирте, в то время как жирные масла не смешиваются с 96%-м этанолом, была проведена жидкость-жидкостная экстракция равных объемов жирного масла *N. sativa* с 96%-м этанолом. Полученный спиртовой раствор анализировали методом ВЭЖХ. На полученной хроматограмме идентифицировали мажорный пик тимохинона наряду с присутст-

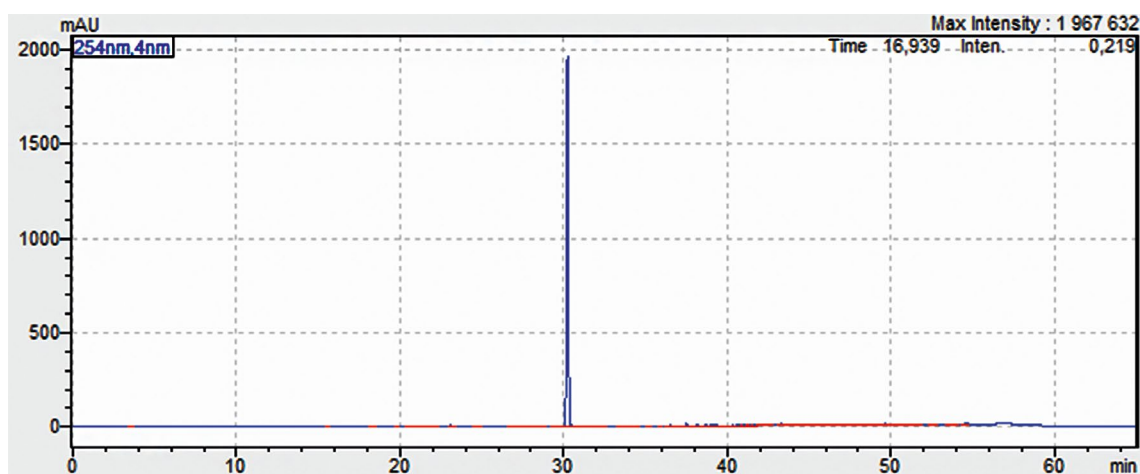


Рисунок 12. Хроматограмма *n*-гексанового извлечения семян *N. sativa*

Figure 12. Chromatogram of *n*-hexane extract of *N. sativa* seeds

вующими на хроматограмме пиками неполярных компонентов из масла, вероятнее всего представленными высшими жирными кислотами и их производными (рисунок 13).

Учитывая, что тимохинон является летучим термостабильным соединением, использовали способ перегонки с водяным паром для его выделения.

К маслу прибавлялся равный объем воды очищенной и при перемешивании проводили отгонку на песчаной бане. В течение перегонки (2–3 часа) с водяным паром были обнаружены две фракции. Первая фракция представляла собой маслянистую жидкость с плотностью меньше единицы. ВЭЖХ-анализ данной фракции показал присутствие мажорного пика тимохинона наряду с пиками других неполярных соединений, вероятнее всего представленных свободными ненасыщенными высшими жирными кислотами и другими компонентами эфирного и жирного масла, способными перегоняться с водяным паром (рисунок 14).

Вторая фракция представляла собой тимохинон с хроматографической чистотой 97,4 % (рисунок 15), который самопроизвольно кристаллизовался в желто-оранжевые кристаллы характерной формы.

Таким образом, показано, что оптимальным способом получения тимохинона является перегонка масла семян тмина черного с водяным паром (соотношение масло:вода 1:1) на песчаной бане в течение 3 часов. Выход тимохинона из масла *N. sativa* при этом составляет 398 мг из 150 мл масла (0,26 %).

Анализ структуры тимохинона, выделенного из *N. sativa*. Выделенный из масла *N. sativa* тимохинон представляет собой оранжевое кристаллическое вещество с температурой плавления 45–47 °С, нерастворимое в воде, растворимое в спиртах (метанол, 96%-й этанол) и органических растворителях (ацетон, дихлорметан, *n*-гексан).

В ¹H-ЯМР-спектре тимохинона наблюдаются характерные сигналы олефиновых протонов H-3 (δH 6,72 (1H, d, J = 1,5 Hz)) и H-6 (δH 6,58 (1H, d, J = 1,0 Hz)), алифатических протонов метильной группы

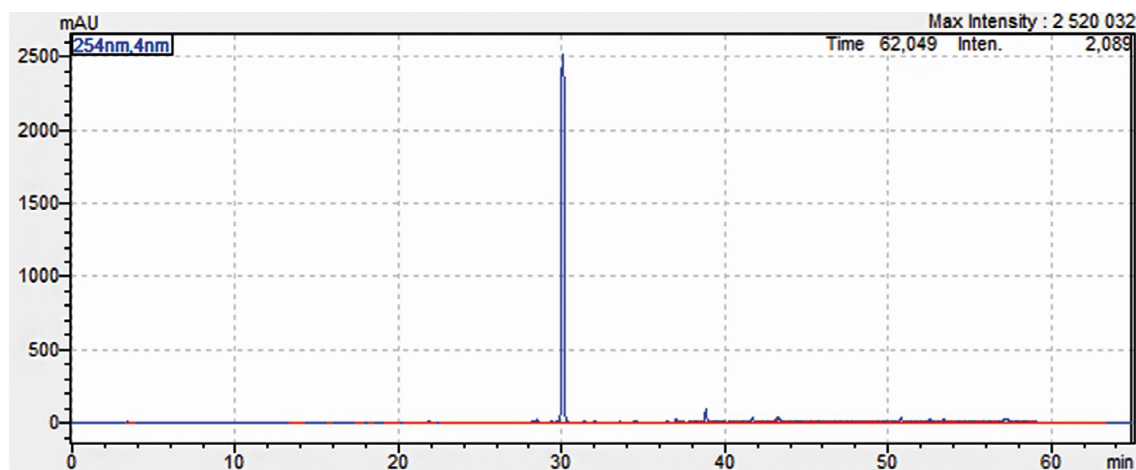


Рисунок 13. Хроматограмма этанольной фракции, полученной путем жидкость-жидкостной экстракции из масла *N. sativa*

Figure 13. Chromatogram of the ethanol fraction obtained by liquid-liquid extraction from *N. sativa* oil

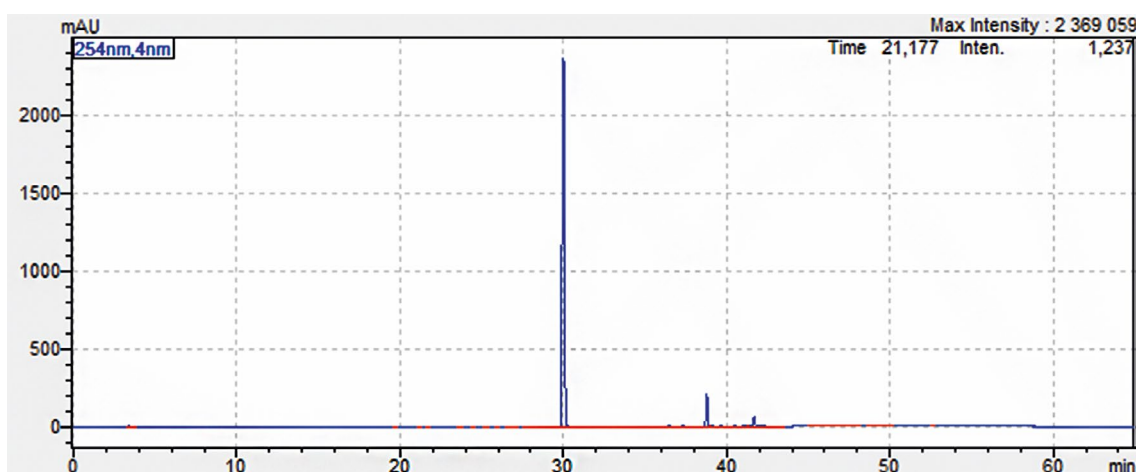


Рисунок 14. Хроматограмма первой фракции, полученной путем перегонки с водяным паром масла *N. sativa*

Figure 14. Chromatogram of the first fraction obtained by steam distillation of *N. sativa* oil

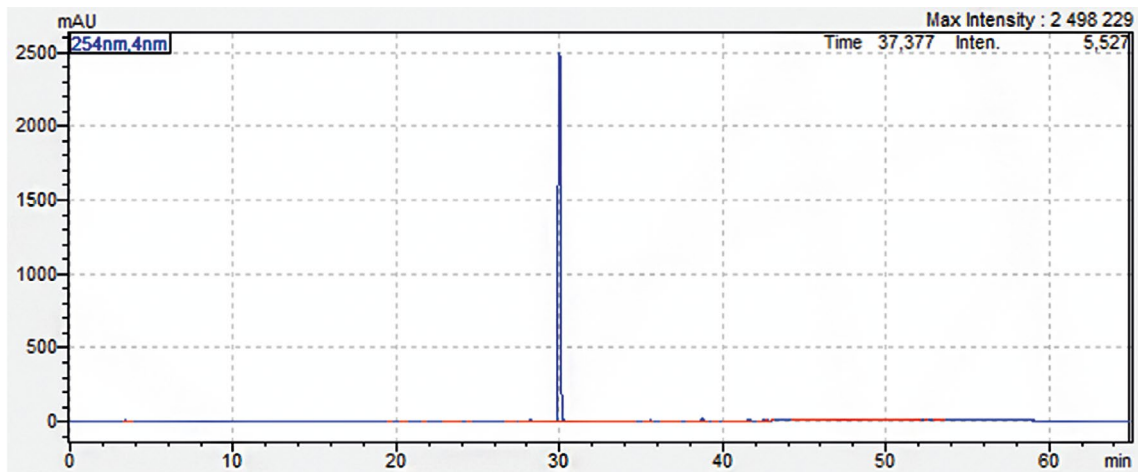


Рисунок 15. Хроматограмма второй фракции, полученной путем перегонки с водяным паром масла *N. sativa*
Figure 15. Chromatogram of the second fraction obtained by steam distillation of *N. sativa* oil

H-7 (δ H 1,95 (3H, d, $J = 1,5$ Hz)) и алифатических протонов изопропильной группы H-8 (δ H 2,90 (1H, hd, $J = 6,8, 1,0$ Hz)), H-9 (H-10) (δ H 1,08 (6H, d, $J = 6,8$ Hz)). Анализ ^1H -ЯМР-спектра показал, что тимохинон, выделенный из масла *N. sativa*, по своим спектральным характеристикам полностью совпадает с данными о тимохиноне из литературных источников [22]. На ЯМР-спектре также наблюдаются незначительные пики примесей, которые могут относиться к продуктам распада/превращения тимохинона и сопутству-

ющим компонентам, получаемым при выделении вещества из масла *N. sativa*.
ИК-спектр выделенного тимохинона (рисунок 16) совпадает с ИК-спектром тимохинона, приведенным в базе данных NIST (рисунок 17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана возможность выделения тимохинона из жирного масла семян *Nigella sativa* L. с хроматографической чистотой (метод ВЭЖХ) более

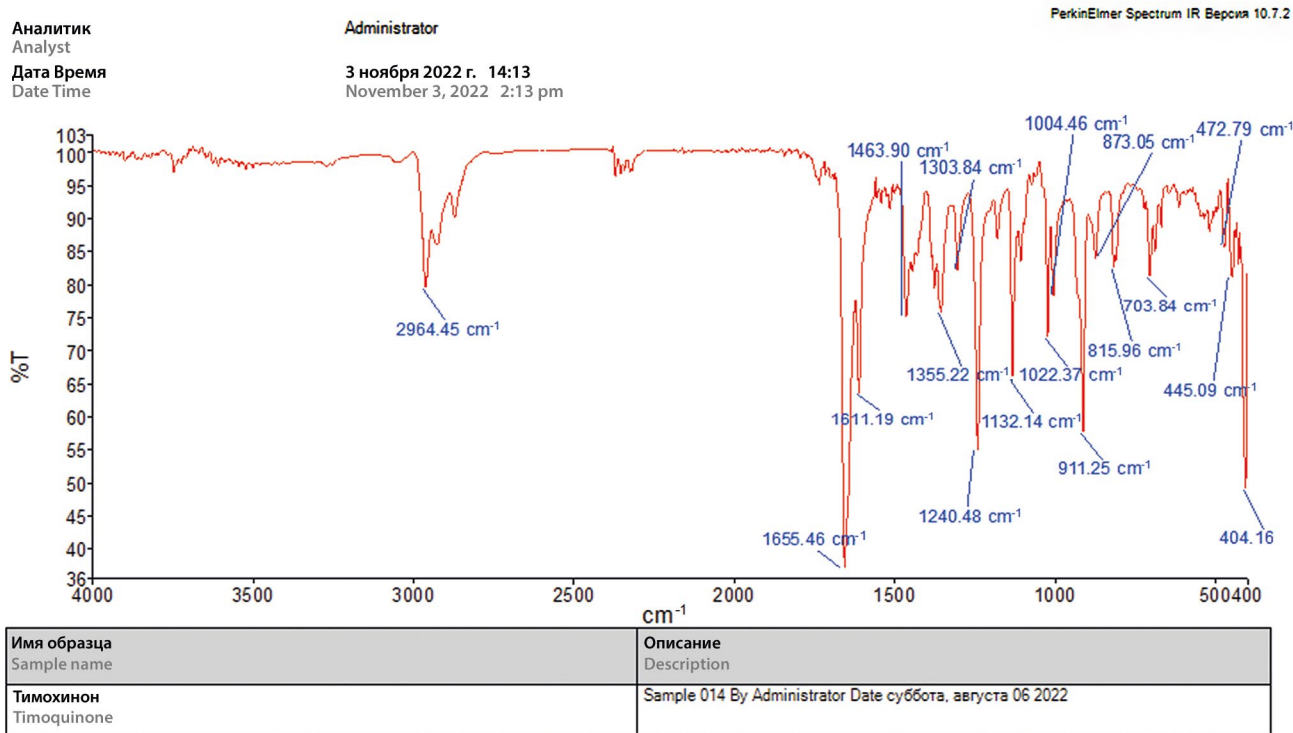


Рисунок 16. ИК-спектр выделенного тимохинона
Figure 16. IR spectrum of the isolated thymoquinone

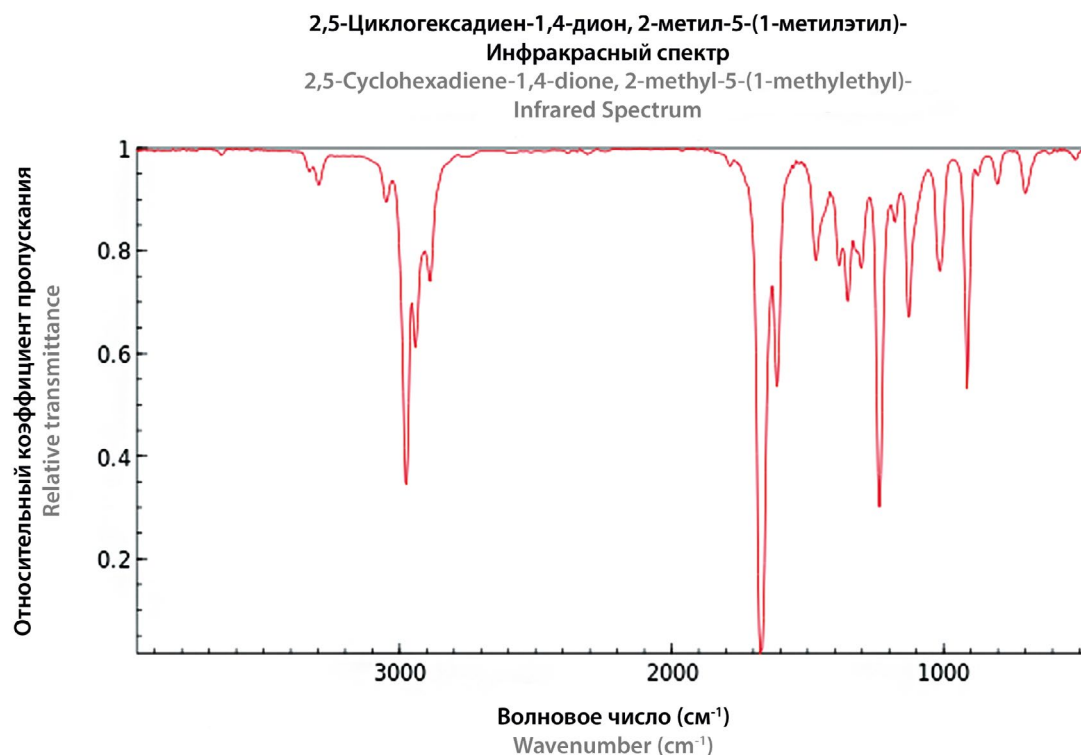


Рисунок 17. ИК-спектр тимохонона из базы данных NIST

Figure 17. IR spectrum of timochonone from the NIST database

97 % и сопоставимостью спектральных характеристик, которые подтверждают идентичность полученного соединения.

Обоснована нецелесообразность использования семян тмина для прямого выделения тимохинона, и показано, что извлечения из семян содержат значительное число сопутствующих компонентов, что снижает чистоту полученного продукта. Применение способа очистки углем приводит к значительным потерям выхода целевого компонента.

Предложенный экспрессный и экономичный способ выделения тимохинона методом перегонки с водяным паром обеспечивает выход целевого компонента 0,26 %.

Предложенный способ может быть применен на производственных площадках предприятий по заготовке и переработке семян тмина черного для получения природного тимохинона.

ЛИТЕРАТУРА

- Понкротова А.О., Уэйли А.К., Орлова А.А., Смирнов С.Н., Серебряков Е.Б., Лужанин В.Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
- Лужанин В.Г., Уэйли А.К., Понкротова А.О., Гришуква Е.А., Сулоев И.С., Смирнов С.Н., Серебряков Е.Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
- Taborsky J., Kunt M., Kloucek P., Lachman J., Zeleny V., Kokoska L. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, and *Ranunculaceae* families. *Open Chemistry*. 2012;10(6):1899–1906. DOI: 10.2478/s11532-012-0114-2.
- Paarakh P. M. *Nigella sativa* Linn. – A comprehensive review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2010;1:409–429.
- Taka E., Mendonca P., Mazzio E. A., Reed S. D., Reams R., Soliman K. F. Molecular targets underlying the anti-inflammatory effects of thymoquinone in LPS activated BV-2 Cells. *FASEB J*. 2018;32(15):40–42. DOI: 10.1096/fasebj.2018.32.1.
- Armutcu F., Akyol S., Akyol O. The interaction of glutathione and thymoquinone and their antioxidant properties. *Electronic Journal of General Medicine*. 2018;15(4):em59. DOI: 10.29333/ejgm/89493.
- Kanter M., Coskun O., Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology*. 2006;80(4):217–224. DOI: 10.1007/s00204-005-0037-1.
- Majdalawieh A. F., Fayyad M. W., Nasrallah G. K. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(18):3911–3928. DOI: 10.1080/10408398.2016.1277971.
- Amin B., Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica*. 2015;82(01/02):8–16. DOI: 10.1055/s-0035-1557838.
- Noorbakhsh M.-F., Hayati F., Samarghandian S., Shaterzadeh-Yazdi H., Farkhondeh T. An overview of hepatoprotective effects of thymoquinone. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 2018;9(1):14–22. DOI: 10.2174/2212798410666180221105503.
- Rasheed Z., Altorbag A. A., Al-Bossier A. S., Alnasser N. A., Alkharraz O. S., Altuwayjiri K. M., Alobaid A. S., Alsaif A. K., Alanazi Y. H., Alghidani B. A., Alduayji M. A., Bu Mozah A. A., Alsuhailani S. A. Protective potential of thymoquinone against peroxynitrite induced modifications in histone H2A: *in vitro* studies. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.

- tional Journal of Biological Macromolecules. 2018;112:169–174. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.157.
12. Habib N., Choudhry S. HPLC Quantification of Thymoquinone Extracted from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) Seeds and Antibacterial Activity of Its Extracts against *Bacillus* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;6645680. DOI: 10.1155/2021/6645680.
13. Scott M. L., Adams M. F., Karchesy J. J., McAllister J. C. Insecticidal Activity of Thymoquinone and Related Compounds Against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. 2017;54(3):785–787. DOI: 10.1093/jme/tjw181.
14. Bouhlel A., Mosbah I. B., Abdallah N. H., Ribault C., Viel R., Mannai S., Corlu A., Abdennebi H. B. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:964–973. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.018.
15. Mahmoudvand H., Tavakoli R., Sharififar F., Minaie K., Ezatpour B., Jahanbakhsh S., Sharifi I. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(7):1052–1057. DOI: 10.3109/13880209.2014.957784.
16. Akyuz M., Taysi S., Baysal E., Demir E., Alkis H., Akan M., Binici H., Karatas Z. A. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. *Head & Neck*. 2017;39(10):2027–2035. DOI: 10.1002/hed.24861.
17. Cascella M., Bimonte S., Barbieri A., Del Vecchio V., Muzio M. R., Vitale A., Benincasa G., Ferriello A. B., Azzariti A., Arra C., Cuomo A. Dissecting the potential roles of *Nigella sativa* and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00016.
18. Butt A. S., Nisar N., Ghani N., Altaf I., Aziz Mughal T. Isolation of Thymoquinone from *Nigella sativa* L. and *Thymus vulgaris* L., and Its Anti-Proliferative Effect on HeLa Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2019;18(1):37. DOI: 10.4314/tjpr.v18i1.6.
19. Singh S. K., Mishra M. K., Lillard J. W., Singh R. Thymoquinone enhanced the tumoricidal activity of NK Cells against Lung Cancer. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):124.5. DOI: 10.4049/jimmunol.200.Supp.124.5.
20. Barkat M. A., Harshita, Ahmad J., Khan M. A., Beg S., Ahmad F. J. Insights into the targeting potential of thymoquinone for therapeutic intervention against triple-negative breast cancer. *Current Drug Targets*. 2018;19(1):70–80. DOI: 10.2174/1389450118666170612095959.
21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. В 4 томах. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018.
22. Ahmad A., Mishra R. K., Vyawahare A., Kumar A., Rehman M. U., Qamar W., Khan A. Q., Khan R. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(8):1113–1126. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.09.008.
23. Armutcu F., Akyol S., Akyol O. The interaction of glutathione and thymoquinone and their antioxidant properties. *Electronic Journal of General Medicine*. 2018;15(4):em59. DOI: 10.29333/ejgm/89493.
24. Kanter M., Coskun O., Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology*. 2006;80(4):217–224. DOI: 10.1007/s00204-005-0037-1.
25. Majdalawieh A. F., Fayyad M. W., Nasrallah G. K. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(18):3911–3928. DOI: 10.1080/10408398.2016.1277971.
26. Amin B., Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica*. 2015;82(01/02):8–16. DOI: 10.1055/s-0035-1557838.
27. Noorbakhsh M.-F., Hayati F., Samarghandian S., Shaterzadeh-Yazdi H., Farkhondeh T. An overview of hepatoprotective effects of thymoquinone. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 2018;9(1):14–22. DOI: 10.2174/2212798410666180221105503.
28. Rasheed Z., Altorbag A. A., Al-Bossier A. S., Alnasser N. A., Alkharraz O. S., Altuwayjiri K. M., Alobaid A. S., Alsaif A. K., Alanazi Y. H., Alghidani B. A., Alduayji M. A., Bu Mozah A. A., Alsuhailani S. A. Protective potential of thymoquinone against peroxynitrite induced modifications in histone H2A: *in vitro* studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;112:169–174. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.157.
29. Habib N., Choudhry S. HPLC Quantification of Thymoquinone Extracted from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) Seeds and Antibacterial Activity of Its Extracts against *Bacillus* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;6645680. DOI: 10.1155/2021/6645680.
30. Scott M. L., Adams M. F., Karchesy J. J., McAllister J. C. Insecticidal Activity of Thymoquinone and Related Compounds Against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. 2017;54(3):785–787. DOI: 10.1093/jme/tjw181.
31. Bouhlel A., Mosbah I. B., Abdallah N. H., Ribault C., Viel R., Mannai S., Corlu A., Abdennebi H. B. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:964–973. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.018.
32. Mahmoudvand H., Tavakoli R., Sharififar F., Minaie K., Ezatpour B., Jahanbakhsh S., Sharifi I. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(7):1052–1057. DOI: 10.3109/13880209.2014.957784.
33. Akyuz M., Taysi S., Baysal E., Demir E., Alkis H., Akan M., Binici H., Karatas Z. A. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. *Head & Neck*. 2017;39(10):2027–2035. DOI: 10.1002/hed.24861.
34. Cascella M., Bimonte S., Barbieri A., Del Vecchio V., Muzio M. R., Vitale A., Benincasa G., Ferriello A. B., Azzariti A., Arra C., Cuomo A. Dissecting the potential roles of *Nigella sativa* and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00016.
35. Butt A. S., Nisar N., Ghani N., Altaf I., Aziz Mughal T. Isolation of Thymoquinone from *Nigella sativa* L. and *Thymus vulgaris* L., and Its Anti-Proliferative Effect on HeLa Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2019;18(1):37. DOI: 10.4314/tjpr.v18i1.6.
36. Singh S. K., Mishra M. K., Lillard J. W., Singh R. Thymoquinone enhanced the tumoricidal activity of NK Cells against Lung Cancer. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):124.5. DOI: 10.4049/jimmunol.200.Supp.124.5.
37. Barkat M. A., Harshita, Ahmad J., Khan M. A., Beg S., Ahmad F. J. Insights into the targeting potential of thymoquinone for therapeutic intervention against triple-negative breast cancer. *Current Drug Targets*. 2018;19(1):70–80. DOI: 10.2174/1389450118666170612095959.
38. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. In 4 volumes. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
39. Ahmad A., Mishra R. K., Vyawahare A., Kumar A., Rehman M. U., Qamar W., Khan A. Q., Khan R. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(8):1113–1126. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.09.008.

REFERENCES