

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>
УДК 615.322



Оригинальная статья/Research article

Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L.

С. В. Горяинов¹, С. Эспарса¹, В. А. Ивлев¹, Д. И. Писарев^{1*}, Г. Бакореза¹, Р. А. Абрамович¹, О. О. Новиков¹, О. Г. Потанина¹, С. Лазар¹, А. В. Хромов¹, Н. Н. Бойко²

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
2 – Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

*Контактное лицо: Писарев Дмитрий Иванович. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: С. В. Горяинов – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; С. Эспарса – <https://orcid.org/0000-0002-8200-6208>; В. А. Ивлев – <https://orcid.org/0000-0001-9664-9506>; Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Г. Бакореза – <https://orcid.org/0000-0001-7083-704X>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; О. Г. Потанина – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; С. Лазар – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>; А. В. Хромов – <https://orcid.org/0000-0002-6355-5615>; Н. Н. Бойко – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>.

Статья поступила: 25.03.2020. Статья принята в печать: 30.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

Резюме

Введение. Семена чернушки посевной – *Nigella sativa* L. широко известны как источник жирного масла с весьма редким компонентом – тимохиноном. Терапевтический потенциал биологически активных соединений семян растения охватывает положительное влияние на желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистую и иммунную систему. Кроме того, у тимохинона обнаружены гипогликемическое, антиоксидантное, противоопухолевое, онкопротекторное, иммуномодулирующее действие. Помимо жирного масла и тимохинона в семенах присутствует ряд других значимых соединений, также составляющих собственный фармакологический актив.

Цель. Разработка технологической схемы переработки и анализ липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L.

Материалы и методы. В качестве аналитических методов использованы: газожидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектором – для анализа стероидов и тритерпенов; хромато-масс-спектрометрия (газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием) – для исследования эфирного масла; хромато-масс-спектрометрия (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием) – для изучения флавоноидов. Для получения отдельных фракций биологически активных соединений семян *N. sativa* L. использована дробная экстракция.

Результаты и обсуждения. Была разработана схема выделения липофильных и гидрофильных компонентов, которая заключается в экстракции всего липидного комплекса семян *n*-гексаном, с последующим удалением экстрагента. Сгущенное гексановое извлечение обрабатывают спиртом этиловым, извлекающим неомыляемые соединения – терпены, хиноны, стерины и не растворяющим триацилглицериды. Шрот семян, оставшийся после гексановой экстракции, обрабатывают спиртом этиловым 70%-ым, в который переходят гидрофильные молекулы, а конкретно флавоноиды.

Заключение. В липофильной фракции омыляемых липидов после переэтерификации идентифицировано 5 соединений, доминирующими являются линолевая и олеиновая кислоты. Характерной особенностью данной фракции является присутствие *цис*-11,14-эйкозадиеновой кислоты, которая может выступать в роли маркерного элемента жирного масла семян *N. sativa* L. В неомыляемой фракции обнаружены стерины и тритерпены. Мажорным компонентом данной фракции является β -ситостерин. Помимо указанного стерина присутствуют кампестерин и стигмастерин. Тритерпены представлены циклоартенолом и его производными. В эфиромасличном комплексе найдены простые фенолы, хиноны и монотерпены, преобладают *n*-цимол, тимохинон и α -туйен. В состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. входят флавоноиды метоксилированного ряда флавонов и гликозиды кемпферола.

Ключевые слова: семена чернушки посевной, тимохинон хроматография, триацилглицериды, стерины, флавоноиды.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, Н. Н. Бойко, С. Лазар разработали схему выделения липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L. С. В. Горяинов, В. А. Ивлев, С. Эспарса, Д. И. Писарев, О. О. Новиков, А. В. Хромов и О. Г. Потанина провели аналитическое исследование выделенных фракций семян *N. sativa* L., обработку данных и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

Для цитирования: Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):137–141. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>

A Technology for Isolation and Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Biologically Active Components from *N. sativa* L. Seeds

Sergey V. Goryainov¹, Cesar Esparza¹, Vasily A. Ivlev¹, Dmitry I. Pisarev^{1*}, Gohara Bacorese¹, Rimma A. Abramovich¹, Oleg O. Novikov¹, Olga G. Potanina¹, Simon Lazar¹, Arkidiy V. Khromov¹, Nikolay N. Boyko²

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
2 – Belgorod National Research University, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

*Corresponding author: Dmitry I. Pisarev. E-mail: juniper05@mail.ru

© Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н., 2020

© Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N., 2020

ORCID: Sergey V. Goryainov – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Cesar Esparza – <https://orcid.org/0000-0002-8200-6208>; Vasily A. Ivlev – <https://orcid.org/0000-0001-9664-9506>; Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Gohara Bacorese – <https://orcid.org/0000-0001-7083-704X>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Olga G. Potanina – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Simon Lazar – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>; Arkidiy V. Khromov – <https://orcid.org/0000-0002-6355-5615>; Nikolay N. Boyko – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>.

Received: 25.03.2020. Revised: 30.07.2020. Published: 28.08.2020

Abstract

Introduction. Seeds of *Nigella sativa* L. are widely known as a source of fatty oil with a very rare component-thymoquinone. The therapeutic potential of biologically active compounds of plant seeds covers a positive effect on the gastrointestinal tract, cardiovascular and immune systems. In addition, hypoglycemic, antioxidant, antitumor, oncoprotective, immunomodulating effects were found in thymoquinone. In addition to fatty oil and thymoquinone, a number of other significant compounds are present in the seeds, which also make up their own pharmacological asset.

Aim. Study was to develop a processing flow chart and analyze the lipophilic and hydrophilic components of the seeds of *N. sativa* L.

Materials and methods. The following methods were used as analytical methods: gas-liquid chromatography with a flame ionization detector – for the analysis of sterols and triterpenes; chromatography-mass spectrometry (gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection) – for the study of essential oil; chromatography-mass spectrometry (high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection) – to study flavonoids. To obtain individual fractions of biologically active compounds of seeds of *N. sativa* L., fractional extraction was used.

Results and discussion. The principle of this approach in this case is to extract the entire lipid complex of seeds with n-hexane, followed by removal of the extractant. The thickened hexane extract is treated with ethyl alcohol, which extracts unsaponifiable compounds – terpenes, quinones, sterols and does not dissolve triacylglycerides. The seed meal remaining after hexane extraction is treated with ethyl alcohol 70 %, into which hydrophilic molecules, in particular flavonoids, pass.

Conclusion. After transesterification, 5 compounds were identified in the lipophilic fraction of saponifiable lipids, the linoleic and oleic acids being dominant. A characteristic feature of this fraction is the presence of cis-11,14-eicosadiene acid, which can act as a marker element of the fatty oil of the seeds of *N. sativa* L. Sterols and triterpenes were found in the unsaponifiable fraction. The major component of this fraction is β -sitosterol. In addition to the indicated sterol, campesterol and stigmaterol are present. Triterpenes are represented by cycloartenol and its derivatives. Simple phenols, quinones and monoterpenes were found in the essential oil complex, p-cymol, thymoquinone and α -thuyen predominate. The hydrophilic fraction of the seeds of *N. sativa* L. includes flavonoids of the methoxylated series of flavones and kempferol glycosides.

Keywords: *N. sativa* L., thymoquinone chromatography, triacylglycerides, sterols, flavonoids.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Nikolay N. Boyko, developed a scheme for the isolation of lipophilic and hydrophilic components of seeds of *N. sativa* L. Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Arkidiy V. Khromov, and Olga G. Potanina conducted an analytical study of the isolated fractions of *N. sativa* L. seeds, data processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. This work was supported by Program 5-100.

For citation: Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):137–141. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>

ВВЕДЕНИЕ

Чернушка посевная – *Nigella sativa* L. является ценным растением, семена которого содержат ряд уникальных соединений, перспективных в терапевтическом плане [1, 2]. Принято считать, что наиболее репрезентативными компонентами указанного объекта являются составные липидного комплекса, включающие жирное масло, стерины [3], а также маркерный компонент – тимохинон [4, 5]. Однако в семенах, помимо липофильных, содержатся и гидрофильные компоненты, представленные флавоноидами. Такой разноплановый состав семян *N. sativa* L. может обладать перспективностью для получения компонентов с разной полярностью и, соответственно, имеющих поливалентный фармакологический потенциал [6–8].

Целью настоящего исследования явилась разработка технологической схемы выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов семян *N. sativa* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разделение метиловых эфиров высших жирных кислот проводили на хроматографе Agilent 7890A (Agilent Technologies, США): колонка капиллярная

VF-23 ms (Agilent Technologies, США, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина фазы 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость потока газа-носителя 1,5 мл/мин; температура инжектора 280 °С. Режим программируемых температур –50 °С (изотерма 2 мин), подъём температуры –10 °С/мин до 180 °С (выдержка 5 мин), затем до 240 °С со скоростью 5 °С/мин. Общее время анализа – 32 мин. Пробу инжестировали в Split режиме (деление потока 1:10). Детектор – пламенно-ионизационный.

Неомыляемую составляющую масла *N. sativa* L. определяли на хроматографе Agilent 6890N (Agilent Technologies, США): колонка капиллярная VF-5MS (Agilent Technologies, США) (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость газа-носителя 1,5 мл/мин. Температура инжектора 280 °С, начальная температура печи хроматографа – 60 °С, затем – изотерма в течение 3 мин, после чего нагрев со скоростью 10 °С/мин. до 290 °С, выдержка при 290 °С в течение 20 мин. Общее время анализа – 46 мин. Режим регистрации масс-спектров: магнитно-секторный масс-детектор JMS GC Mate II (JEOL, Япония), энергия ионизации 70 эВ, температура источника 270 °С, сканирование в диапазоне 40–400 Да со скоростью 2 скан/с. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Полифенольный комплекс анализировали методом ОФ ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

В работе использовали хроматограф Agilent 1290 (Agilent Technologies). Детекторы: диодная матрица и тандемный квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6430 (Agilent Technologies, США). Использовали два варианта хроматографического разделения. Условия № 1: хроматографическая колонка Brownlee SPP C₁₈ 2,1 × 150 мм, 2,7 мкм, подвижная фаза – 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Скорость подачи элюента – 0,25 мл/мин, в градиентном режиме. Условия № 2: хроматографическая колонка Brownlee SPP C₁₈ 2,1 × 150 мм, 2,7 мкм, подвижная фаза – 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Скорость подачи элюента – 0,25 мл/мин, в градиентном режиме. Объем вводимой в инжектор пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длинах волн, характеристичных для большинства флавоноидов: λ = 290,0 и λ = 340,0 нм, а также в режиме ионизации электрораспылением (регистрация отрицательных ионов); поток газа-осушителя – 10 л/мин; температура газа-осушителя – 320 °С; напряжение на фрагменторе – 135 В, на капилляре – 4000 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Липидный комплекс из анализируемого сырья выделяли с помощью циркуляционной экстракции в аппарате «Soxlet». В качестве экстрагента использовался *n*-гексан. Гексановое извлечение сгущали на ро-

тационном испарителе ИР-1МЗ. Сгущенный остаток обрабатывали спиртом этиловым 96%-ым. При этом в спиртовой слой переходят эфирные масла, тритерпены и стерины, в остатке триацилглицериды.

Качественный состав жирных кислот в составе триглицеридов определялся методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) после предварительной переэтерификации и полученные метиловые эфиры подвергали хроматографированию.

На рисунке 1 представлена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот семян *N. sativa* L.

На хроматограмме видно, что в состав триглицеридов семян *N. sativa* L. входит 5 компонентов. Доминирующим компонентом является линолевая кислота ~60,0 %, в меньшем количестве – олеиновая ~23,0 %. Около 12,0% приходится на пальмитиновую кислоту, ~3,0 % на стеариновую кислоту. Характерной особенностью масла семян *N. sativa* L. является присутствие *цис*-11,14-эйкозадиеновой кислоты.

Спиртовое извлечение после обработки гексановой фракции сгущали и тестировали на предмет наличия неомыляемых липофильных компонентов методом ГХ/МС.

Результаты хроматографирования неомыляемой фракции липидного комплекса семян *N. sativa* L. методом ГХ/МС представлены на рисунке 2.

На представленной хроматограмме видно, что в составе неомыляемой фракции входит 14 компонентов стериновой и тритерпеновой природы. Доминирующими соединениями является стерины, причём в наибольшем количестве обнаружен β-ситостерин (на

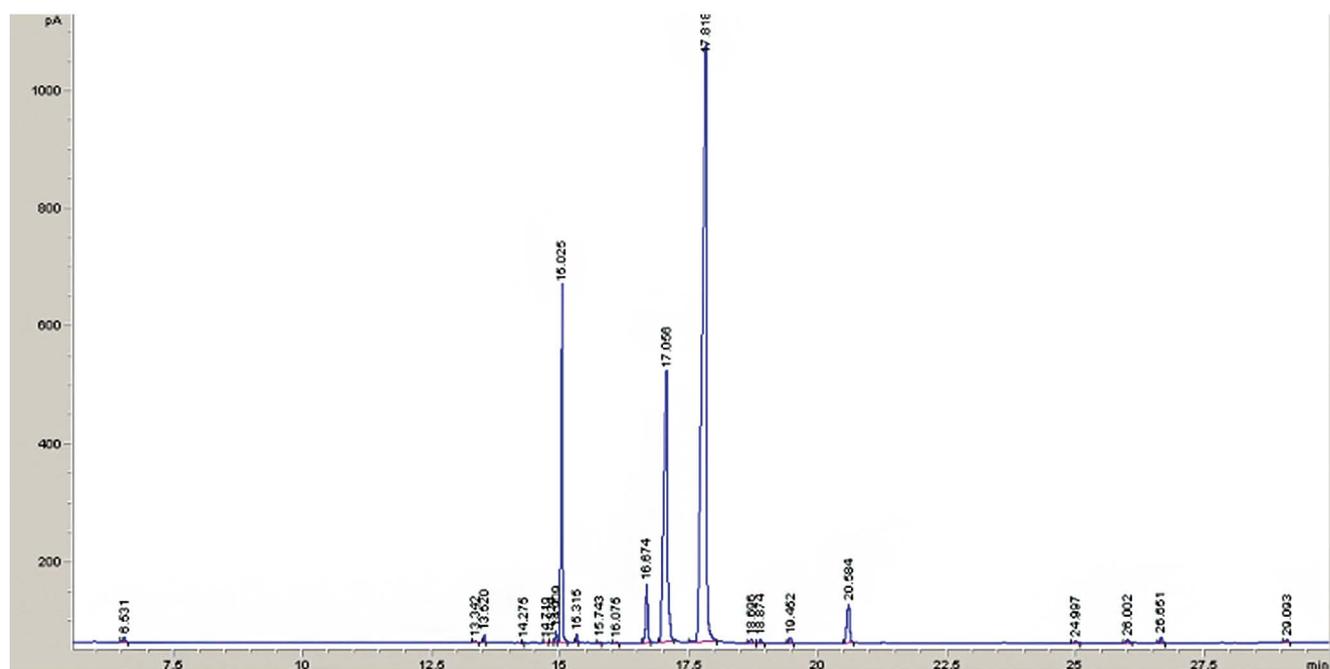


Рисунок 1. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот из липидного комплекса семян *N. sativa* L.

Figure 1. Chromatogram of methyl esters of fatty acids from the lipid complex of seeds of *N. sativa* L.

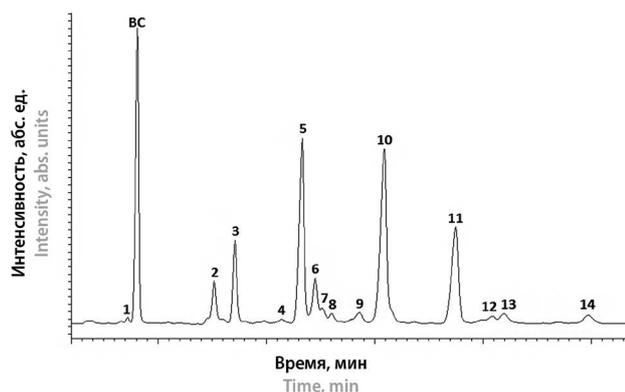


Рисунок 2. Хроматограмма неомыляемой фракции семян *N. sativa* L.

Figure 2. Chromatogram of unsaponifiable fraction of seeds of *N. sativa* L.

хроматограмме обозначен под № 5), в меньших количествах – кампестерин и стигмастерин (на хроматограмме № 2 и 3 соответственно). Из тритерпенов преобладают циклоартенол и 24-метиленциклоартанол (на хроматограмме № 10 и 11 соответственно).

Хроматограмма низкомолекулярной фракции неомыляемого комплекса семян *N. sativa* L. представлена на рисунке 3.

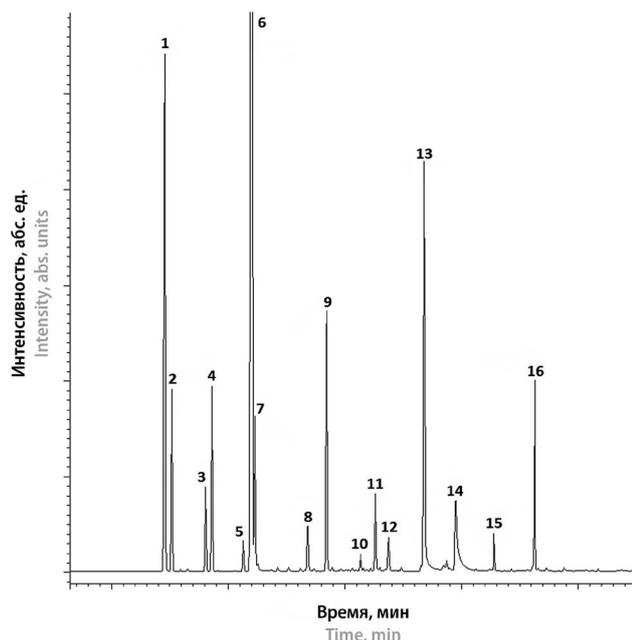


Рисунок 3. Хроматограмма низкомолекулярной неомыляемой фракции семян *N. sativa* L.

Figure 3. Chromatogram of a low molecular weight unsaponifiable fraction of seeds of *N. sativa* L.

В низкомолекулярной фракции неомыляемых компонентов обнаружено 16 соединений, среди которых монотерпены, фенолы и хиноны, основными являются: *n*-цимол ~50,0 % (на хроматограмме № 6),

timoхинон ~20,0 % (на хроматограмме № 13) и α -туйен ~10,0 % (на хроматограмме № 1).

Далее определялся состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. Для этого использовался шрот семян после экстракции *n*-гексаном, который высушивали и экстрагировали методом мацерации спиртом этиловым 70%-ым. Полученное спиртовое извлечение фильтровали и хроматографировали методом хромато-масс-спектрометрии (ОФ ВЭЖХ/МС).

Хроматограмма спиртового извлечения из шрота семян *N. sativa* L. представлена на рисунке 4.

Результаты хроматографирования показали, что основными компонентами гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. являются флавоноиды, среди которых метоксилированные формы флавонов, а именно: тетраметоксифлавоны (время удерживания на хроматограмме – 7,4 мин); мирицетин (время удерживания – 7,7 мин), однако доминирует монозид кемпферола (время удерживания – 8,1 мин).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена технология комплексной переработки семян *N. sativa* L., обеспечивающей фракционное получение липидных комплексов омыляемых и неомыляемых компонентов, а также гидрофильного комплекса. Разработан спектр методик идентификации биологически активных соединений семян *N. sativa* L. с применением ряда современных хроматографических методов анализа. В составе триацилглицеридов семян обнаружено 5 компонентов, среди которых линолевая и олеиновая кислоты – 80,4 до 83,9 %. Важным компонентом является *cis*-11,14-эйкозодиеновая кислота, этот компонент можно рассматривать как один из маркеров подлинности масла из семян *N. sativa* L. Определён состав неомыляемой липидной фракции, в которой доминирующим компонентом является β -ситостерин. В состав лёгкой фракции неомыляемых липидов входят монотерпены, фенолы и хиноны, три из которых – *n*-цимол, α -туйен и тимохинон доминируют. Состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. формируют в основном флавоноиды, включающие метоксилированные формы флавонов и гликозиды кемпферола. Следующим этапом исследований в русле комплексного изучения семян *N. sativa* L. является определение фармакологической активности выделенных фракций.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCE

1. Gali-Muhtasib H., El-Najjar H. Schneider-Stock R. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Advances in Phytomedicine*. 2006;2:133–153. Doi: 10.1016/S1572-557X(05)02008-8.
2. Kooti W., Hasanzadeh-Noohi Z., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2016;14(10):732–745. Doi: 10.1016/S1875-5364(16)30088-7.

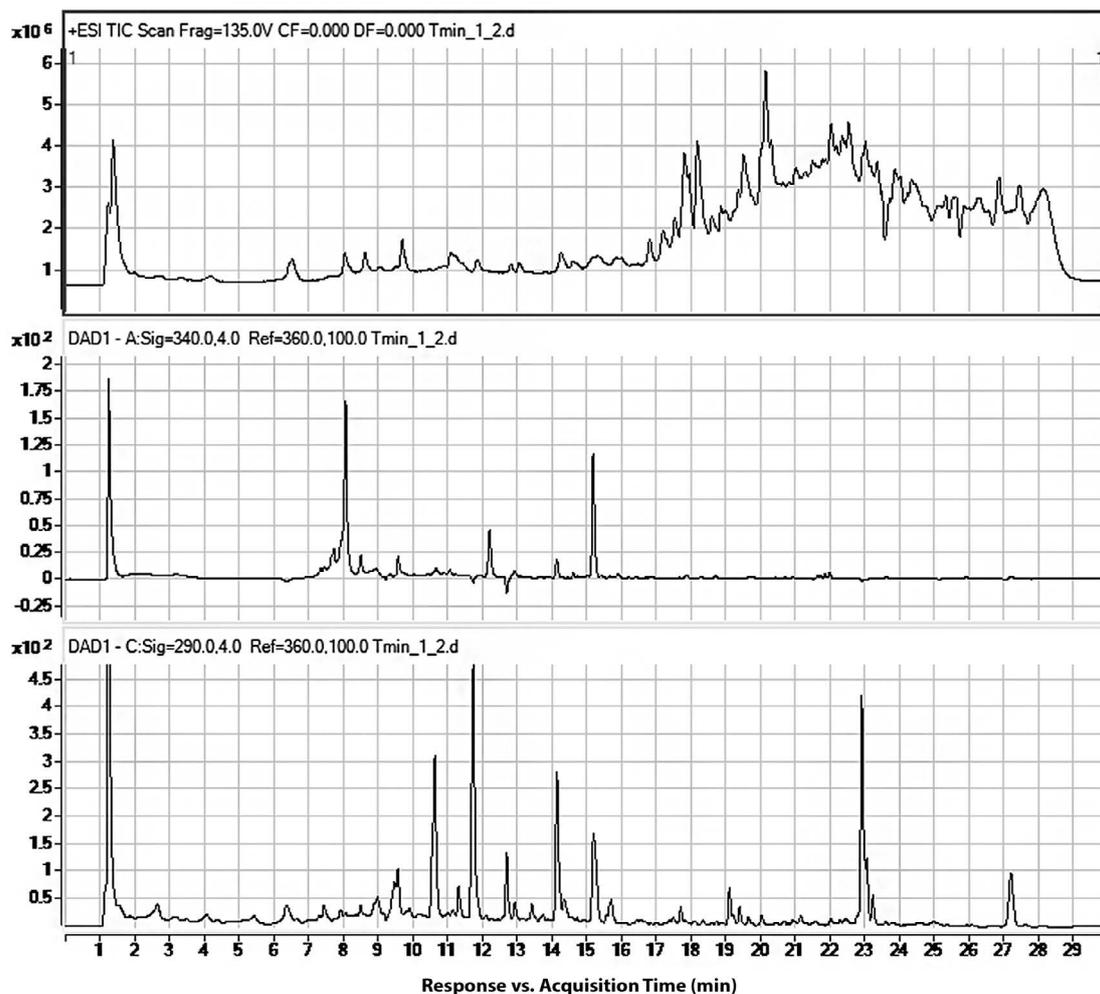


Рисунок 4. Хроматограмма этанольного извлечения из шрота семян *N. sativa* L.

Figure 4. Chromatogram of ethanol extraction from seed meal *N. sativa* L.

3. Ceikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 2007;101(2):673–681. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.022.
4. Chaieb K., Kouidhi B., Jrah H. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial bio film formation. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011;11:29–34. Doi: 10.1186/1472-6882-11-29.
5. Yehualashet B., Ermias D. HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella Sativa* Linn) and identification of thymoquinone conversion with Uv-Vis. *Journal of drug delivery & Therapeutics*. 2014;4(4):1–5. Doi: 10.1186/1472-6882-11-29.
6. El-Dakhakhny M., Mady N., Lember N., Ammon H. P. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Medica*. 2002;68(5):465-466. Doi: 10.1055/s-2002-32084.
7. Mansour M. A., Nagi M. N., El-Khatib A. S., Al-Bekairi A. M. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: A possible mechanism of action. *Cell Biochem. Funct*. 2002;20(2):143–151. Doi: 10.1002/cbf.968.
8. Salem M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 2005;5:1749–1770. Doi: 10.1016/j.intimp.2005.06.008.