

¹ ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, e-mail: svetlana.shysh@gmail.com

² ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13

✉ svetlana.shysh@gmail.com, (017) 284-14-64, (017) 284-17-05

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВИДОВ *NIGELLA* L. И ИХ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОБРАБОТКЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Растения рода чернушка (*Nigella* L.) – однолетние травянистые растения семейства лютиковых (*Ranunculaceae*), которые традиционно используются в странах Юго-Восточной и Западной Азии, Африки в качестве лекарственных ввиду их высокой биологической активности, связанной с присутствием в семенах ряда ценных соединений фенольной, терпеновой и липидной природы [1–5]. Самыми распространенными видами являются чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*Nigella sativa* L.), а также чернушка восточная (*Nigella orientalis* L.) [1], которые были оценены с точки зрения накопления целевых веществ при культивировании в Беларуси.

В последние годы особую актуальность приобрели исследования влияния электромагнитных полей на семена растений, которые могут привести к повышению качества растительного сырья. Для этих целей используются электромагнитные излучения миллиметрового диапазона (ЭМИ) разных экспозиций для выявления наиболее оптимального воздействия, способствующего максимальной реализации генетических программ развития лекарственных растений и повышения агрономического качества семян.

Цель настоящей работы – сравнительная оценка состава биологически активных соединений перспективных для Беларуси видов *Nigella* L. и определение специфики влияния ЭМИ на структуру и содержание триацилглицеридов и некоторых летучих веществ семян.

Материалы и методы

Семена подвергались обработке микроволновым ЭМИ в различных частотных режимах: режим 1 (частота обработки 53,57–78,33 ГГц, время обработки 20 минут); режим 2 (частота обработки 64,0–66,0 ГГц, время обработки

12 минут) и режим 3 (частота обработки 64,0–66,0 ГГц, время обработки 8 минут).

Для анализа были взяты семена *N. orientalis*, *N. damascena* и *N. sativa*, собранные с растений, выращенных на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Для количественного определения содержания масла экстракцию проводили из 1 г семян. Для ЯМР-спектроскопии использовали навеску 50 мг измельченных семян, их заливали 1 мл дейтерированного хлороформа (CDCl_3) и в закрытой емкости выдерживали в течение 12 часов. Перед записью спектров ЯМР растворы фильтровали. Готовили экстракты и записывали спектры для нескольких образцов каждого вида.

Спектры ЯМР растворов в CDCl_3 записывали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 и 126 МГц для ядер ^1H и ^{13}C , соответственно. Запись проводилась при температуре 293 К в 5 мм стандартных ампулах. Накопление сигналов для протонных спектров осуществлялось в течение 10 минут, а для углеродных – в течение 12 часов. В качестве внутреннего стандарта в случае ядер ^1H использовали сигнал CHCl_3 (примесь в CDCl_3 , $\delta = 7,27$ м.д.), для ядер ^{13}C – сигнал растворителя ($\delta = 77,7$ м.д.). Все экспериментальные данные получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN – NMR 3.5. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ M. Excel и Stadia 8.0.

Результаты и обсуждение

Установлено содержание масла в семенах, которое составило для *N. orientalis* – 17,0%, *N. damascena* – 13,4% и *N. sativa* – 15,1%. Также проведена оценка количественного и качественного состава этих масел. Содержание веществ, выраженное в мольных процентах, приведено в табл. 1.

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

Соединение	Линолевая кислота	Олеиновая кислота	Эйкоза-диеновая кислота	Насыщенные кислоты	п-Цимол	Тимохинон
<i>N. orientalis</i>	60,7	12,4	3,9	20,2	–	–
<i>N. damascena</i>	50,8	33	4,2	6,3	1,6	–
<i>N. sativa</i>	55,4	13,6	3,8	21,4	2,3	0,6

Примечание. * – относительная ошибка измерений не превышала 5%.

В маслах преобладала линолевая кислота, в меньшем количестве присутствовали олеиновая и эйкозадиеновая. Общее количество ненасыщенных жирных кислот составляло для *N. orientalis* – 77%, *N. damascena* – 88%, *N. sativa* – 72,8%. Присутствие тимохинона установлено только в семенах *N. sativa*, тогда как п-цимол обнаружен как в чернушке посевной, так и в чернушке дамасской.

На рис. представлены спектры ЯМР хлороформенного экстракта семян чернушки посевной: а – ^1H , б – ^{13}C , в – ^{13}C (область двойных связей).

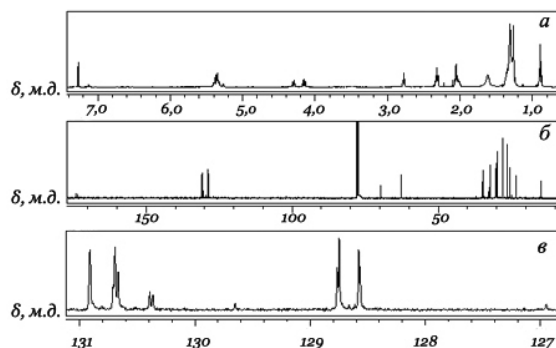


Рис. Спектры ЯМР CDCl_3 -экстракта семян чернушки посевной: а – ^1H , б – ^{13}C , в – ^{13}C (область двойных связей)

Из рис. видно, что основные компоненты экстракта – триацилглицериды. Химические сдвиги (δ , м.д.) сигналов протонов двойных связей: $5,30 \div 5,43$ м.д., метинового протона глицериновой части – $5,27$ м.д., метиленовые протоны глицериновой части поглощают при $4,30$ м.д. и $4,16$ м.д. Протоны метиленовых групп, расположенных между двойными связями, имеют сигнал при $2,78$ м.д., соседствующих с карбоксильными группами – $2,33$ м.д., алифатических цепочек жирных кислот – $1,30 \div 2,10$ м.д. Протоны метильных групп всех жирных кислот поглощают при $0,90$ м.д.

Кроме приведенных сигналов, принадлежащих протонам триглицеридов, наблюдаются сигналы и других соединений. Идентифицировано наличие п-цимола, его сигналы: d_{CH} (ароматика) = $7,12, 7,13$ м.д., метиновый протон при $2,88$ м.д. и протоны метильных групп с химическими сдвигами $2,33$ и $1,20$ м.д. Кроме п-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.

Протонные спектры экстрактов семян чернушки дамасской и восточной подобны рассмотренному спектру. Однако п-цимол и тимохинон не обнаружены в спектрах *N. orientalis*.

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 $128 \div 131$ м.д. наблюдаются резонансы олефиновых С-атомов, метиновый углерод глицериновой части поглощает при $69,57$ м.д., а углеродные атомы CH_2 -групп – при $62,79$ м.д., метиленовые углероды алифатических цепочек всех жирных кислот резонируют в области $23 \div 38$ м.д., а метильные углероды – при $14,76$ м.д. Кроме того, наблюдается поглощение р-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.

Необходимо отметить, что в заметных количествах в углеродном спектре в области поглощения олефиновых углеродов присутствуют четыре синглета одинаковой интенсивности с $d = 128,61; 128,66; 130,81$ и $130,89$ м.д. Согласно работе [2] они, по-видимому, принадлежат эйкозадиеновой 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.

Таблица 2

Содержание компонентов в семенах *Nigella sativa L.*, подвергшихся воздействию ЭМИ (%)*

Соединение	Режим 1		Режим 2		Режим 3	
	моль %	% к контролю	моль %	% к контролю	моль %	% к контролю
Линолевая кислота	63,4	114	60,4	109	64	116
Олеиновая кислота	13,7	101	11,1	82	14,5	107
Эйкозодиеновая кислота	3,5	92	2,9	76	3,5	92
Насыщенные ЖК	16,4	77	22,6	106	14,9	70
Пара-цимол	0,1	4	0,1	4	0,1	4
Тимохинон	–		–		–	

Примечание. * – относительная ошибка измерений не превышала 5%.

Таблица 3

Отношение содержания ненасыщенных жирных кислот, присоединенных к боковым гидроксильным группам глицерина, к содержанию идентичных кислот, присоединенных к центральной гидроксильной группе глицерина у масла семян *Nigella sativa L.*

Соединение	Контроль	Режим 1	Режим 2	Режим 3
Линолевая кислота	1,46	1,27	1,49	1,64
Олеиновая кислота	1,27	1,24	1,39	1,35

Установлены отличия в составе биологически активных семян растений чернушки посевной под воздействием ЭМИ. Так, под влиянием обработок ЭМИ происходит изменение количества ненасыщенных жирных кислот в сторону их увеличения (табл. 2).

В результате наших исследований показано, что обработка ЭМИ приводит к исчезновению тимохинона в семенах *Nigella sativa*.

С использованием спектров ^{13}C (рис., 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.

Полученные данные (табл. 3) показывают, что обе ненасыщенные кислоты предпочитают

находиться в центральном положении остатка глицерина (особенно олеиновая).

Следовательно, насыщенные кислоты должны преимущественно присоединяться к боковым гидроксильным группам. Для режима 1 наблюдается снижение содержания линолевой кислоты в 1, 3 положениях триглицерида по отношению к линолевой кислоте, присоединенной в положении 2. Для режима 3, наоборот, возрастает количество ненасыщенных жирных кислот в 1, 3 положениях триглицерида.

Выводы

Растения рода *Nigella* при выращивании в Беларуси содержат достаточное количество биологически активных соединений в семенах, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного лекарственного и пряно-ароматического сырья. ЯМР анализ хлороформных экстрактов семян различных видов чернушки позволил установить их жирнокислотный состав, обнаружить наличие в них п-цимола и тимохинона. Установлено, что при обработке ЭМИ снижается количество тимохинона и увеличивается количество ненасыщенных жирных кислот в семенах *N. sativa*.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ Б16-02-006.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гогуз Д.О. Влияние солевого стресса на рост и некоторые физиологические показатели растений рода *Nigella* // Вестник РУДН, серия агрономия и животноводство. – 2013. – № 2. – С. 12–19.
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. – 21, № 4. – P. 1533–1537.
3. Лебедева А.Ф. Лекарственные растения. – М.: АСТ – пресс книга, 2004. – 907 с.
4. Нурмагомедова П.М., Омариева М.Г. Обзор статей. Свойства чернушки посевной (*Nigella sativa*) // Материалы II междунар. науч. конф. «Медицина и здравоохранение», май 2014 г. – Уфа: Лето, 2014. – С. 62–65.
5. Гогуз Д.О., Сидоров Р.А., Цыдендамбиев В.Д., Холодова В.П., Кузнецов В.В. Жирнокислотный состав липидов вегетативных органов чернушки при разном уровне засоления среды // Изв. РАН. Серия биол. – 2014. – № 3. – С. 264–270.

SHYSH S.N.¹, SKAKOVSKII E.D.², TYCHINSKAYA L.YU.², SHUTAVA H.G.¹, SPIRIDOVIZH E.V.¹

¹ Central Botanical Garden, NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2v, e-mail: svetlana.shysh@gmail.com

² Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus,

Belarus, 220072, Minsk, Surganova str., 13

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF PERSPECTIVE *NIGELLA* L. SPECIES AND THEIR CHANGES UNDER ELECTROMAGNETIC RADIATION

Aim. The evaluation of biologically active compounds of seeds of three *Nigella* species cultivated in Belarus and their changes under the influence of electromagnetic radiation. **Methods.** 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 EMR 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. **Results.** Fatty acid composition of the extract was evaluated; linoleic and oleic acids are the most abundant among triglycerides. The presence of thymoquinone in the extracts was proven. The content of unsaturated fatty acids in the lipid fraction of the *Nigella sativa* seeds increases by 10–13% after the treatment with electromagnetic radiation in Regime 1 (53.57–78.33 GHz, 20 min) and Regime 3 (64.0–66.0 GHz, 8 min). The influence of EMR on the presence of thymoquinone in the seeds is shown. **Conclusions.** The variation of fatty acids composition of three different *Nigella* species has been shown. The specificity of *N. damascena* is the highest content of eicosadienoic acid in the seed extracts, while those of *N. orientalis* contains the highest amount of linoleic acid. *N. sativa* is the leader in thymoquinone accumulation. The changes of fatty acids composition and structure of *N. sativa* triacylglycerides that occur under the influence of EMR are determined.

Keywords: seeds, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Nigella orientalis*, nuclear magnetic resonance, fatty acids.