

УДК 581.1

ФЛАВОНОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ РОДА *Nigella* L.

© 2023 г. С. Н. Шиш^а, *, П. С. Шабуня^б, С. А. Фатыхова^б,
В. Н. Решетников^а, Е. В. Спиридович^а, **

^аЦентральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

^бГосударственное научное учреждение “Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси”,
Минск, Республика Беларусь

*e-mail: svetlana.shysh@gmail.com

**e-mail: a.spirydovich@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Фенольные соединения у растений рода *Nigella* представлены различными группами флавоноидов, галлокатахинами, производными коричной и кофейной кислот. Определяли содержание флавоноидных гликозидов в листьях чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.), чернушки посевной (*N. sativa* L.) и чернушки восточной (*N. orientalis* L.) методом ВЭЖХ-МС. Установлена видоспецифическая зависимость накопления флавоноидных гликозидов. Показано, что основными флавоноидами в листьях исследованных объектов являлись гликозиды кверцетина и кемпферола, при этом гликозидов кверцетина в изучаемых экстрактах было в 1.40–1.97 раза больше, чем кемпферола. Листья *N. sativa* имели повышенный состав флавоноидных гликозидов по отношению к другим изучаемым видам. Качественный состав флавоноидных гликозидов *N. damascena* был подобен *N. sativa*, тогда как по общему содержанию этой группы соединений он близок к *N. orientalis*. Суммарное количество флавоноидных гликозидов в экстрактах листьев *N. sativa* было в 4 раза выше, чем в экстрактах других видов чернушки. Стоит отметить, что виды *N. sativa* и *N. damascena* имеют наибольшее фенотипическое сходство и более устойчивы к условиям произрастания в Беларуси, в то время как вид *N. orientalis* отличается внешне и более требователен к условиям культивирования. Было установлено, что в листьях *N. orientalis* разнообразие флавоноидных гликозидов меньше, при отсутствии высокомолекулярных и ацилированных форм. Возможно отсутствие ацилированных производных и меньшее разнообразие флавоноидных гликозидов сказывается на низкой устойчивости *N. orientalis* к абиотическим факторам и снижает его адаптационный потенциал.

Ключевые слова: *Nigella damascena* L., *Nigella orientalis* L., *Nigella sativa* L., гликозиды, листья, флавоноиды

DOI: 10.31857/S001533032360078X, EDN: ZQOXKH

ВВЕДЕНИЕ

Растения рода чернушка (*Nigella* L.) характеризуются синтезом разнообразных биологически активных соединений, относящихся к различным химическим классам: летучие соединения терпеновой природы, сапонины, алкалоиды, жирные кислоты, фенольные кислоты и флавоноиды. Род чернушка насчитывает более 20 видов, но наибольшее внимание привлекают чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*N. sativa* L.) и чернушка восточная (*N. orientalis* L.).

Семена *N. sativa* известны в мире под названием черный тмин. Они обладают перечным вкусом и мускатным запахом благодаря наличию эфирных масел и тимохинона, и широко используются в народной медицине [1].

N. damascena родом из Северной Африки. В настоящее время ее выращивают в Европе, Ма-

лой Азии и Индии как декоративное и пряно-ароматическое растение [2, 3]. Семена чернушки дамасской отличаются сильным ароматом с оттенком земляники и широко применяются в Юго-Восточной Азии в качестве пряности [4], надземная биомасса (верхушки генеративных побегов, листья, цветки и семена) являются сырьем для пищевой и фармацевтической промышленности [5].

N. orientalis произрастает в Малой Азии и на Кавказе, встречаясь там в посевах и по горным склонам [6]. Используется как декоративное растение в мавританских газонах, цветниках, для срезки в букеты и как флористический материал для летне-осенних и зимних композиций [7–9].

Фитохимический состав семян *N. sativa* довольно разнообразен и широко изучен [10–13], в то время как другая надземная часть растения ис-

следуется не так часто. Учеными биотехнологического центра Туниса был установлен качественный состав фенольных соединений чернушки посевной, который включал фенольные кислоты (галловую, *p*-гидроксibenзойную, хлорогеновую и др.) и флавоноиды (эпикатехин, кверцетин, апигенин и др.) [5].

У *N. damascena* подробно определен качественный и количественный состав полифенолов семян и проведено его сравнение с таковым семян чернушки посевной [4]. Отмечена схожесть качественного состава соединений фенольной природы у двух видов чернушки: основными соединениями являются гидроксибензойная и кофейная кислоты. Также обнаружены ванилиновая, сиреневая, галловая, *n*-кумаровая кислоты, катехин и отмечены незначительные количества коричной кислоты и кверцетина. Несмотря на идентичность качественного состава фенольных соединений семян чернушки посевной и дамасской авторы указали на количественные различия в биосинтезе отдельных соединений.

У *N. orientalis* достаточно хорошо изучены эфирные масла семян [7–9], в то время как экстракты листьев — недостаточно.

Учитывая литературные данные и результаты наших исследований по содержанию фенольных соединений в семенах растений рода *Nigella*, был проведен скрининг общего пула фенольных соединений в листьях и траве [14]. Было установлено, что листья разных видов чернушки содержали от 1.16 до 1.77 г/100 г сухого веса фенольных соединений, в то время как семена — от 0.55 до 1.26 г/100 г сухого веса. Относительно высокое содержание фенольных соединений в листьях позволяет предложить их использование в качестве источника биологически активных веществ. В связи с этим, актуально было проведение сравнительного анализа качественного и количественного состава фенольных соединений в листьях разных видов чернушки, и установление взаимосвязи между характером их ростовых процессов и накоплением флавоноидных гликозидов.

Целью данной работы было изучение группы флавоноидных гликозидов в листьях растений рода *Nigella*, выращенных в условиях Центральной Беларуси. Мы полагаем, что определение качественного и количественного состава флавоноидных гликозидов и установление наличия видоспецифических зависимостей накопления этих веществ позволит установить взаимосвязь между содержанием отдельных флавоноидных гликозидов и особенностями ростовых процессов у разных видов чернушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили растения трех видов: чернушка дамасская (*Nigella dama-*

scena L.), чернушка восточная (*N. orientalis* L.) и чернушка посевная (*N. sativa* L.), выращенные на экспериментальном участке лаборатории прикладной биохимии Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Для количественного и качественного определения состава флавоноидных гликозидов использовали листья, собранные в фазу цветения, и высушенные до воздушно-сухого состояния. Растения выращивали в условиях мелкоделяночного полевого опыта рядовым способом, в одинаковых условиях по увлажнению, составу почвы и агротехническим мероприятиям. Экспериментальная выборка состояла из 100 растений, с каждого растения были взяты по 2 листа, высушены и гомогенизированы, полученный порошок использован для экстракции.

Получение экстрактов для анализа. Для экстракции использовали воздушно-сухое измельченное сырье, масса навески 2 г (точная навеска). Соотношение образца и экстрагента (г/мл) составляло 1 : 80. Экстракцию образцов проводили двумя способами. Первый способ включал двухступенчатую (по 40 мин) экстракцию 70% этанолом на водяной бане при 80°C, тогда как второй — экстракцию 2М HCl и 96% этанолом (соотношение 1 : 1) на водяной бане при 80°C в течение 120 мин.

По первому способу — полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр. Аликвоты (1 мл) экстрактов без гидролиза фильтровали через шприцевой мембранный фильтр в хроматографические вials и использовали для ВЭЖХ-МС анализа.

По второму способу — экстракты после кислотного гидролиза дополнительно гидролизовали при следующих условиях: 800 мкл образцов с HCl + 200 мкл конц. HCl (конечная концентрация в растворе около 3 М), затем инкубировали 2 ч в плотно закрытой хроматографической вiale при температуре 98°C.

Описание ВЭЖХ-МС метода анализа. Для идентификации и количественного анализа фенольных соединений использовали метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке Agilent Zorbax XDB C18 (4.6 × 150 мм, 5.0 мкм) при температуре 40°C на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., USA). Подвижная фаза состояла из двух растворителей: А — 0.1% муравьиная кислота (об/об) в воде и В — 0.1% муравьиная кислота (об/об) в ацетонитриле. Для анализа негидролизированных образцов использовали следующий градиент режима элюирования: процент растворителя В в подвижной фазе увеличивался от 5 до 25% за 20 мин, затем за следующие 10 мин — до 40%, а в 35 мин составлял 90%. Для гидролизированных образцов процентный состав растворителей в по-

Таблица 1. Содержание кверцетина и кемпферола в экстрактах листьев различных видов чернушки после кислотного гидролиза

Агликон	Содержание, г/100 г сухого веса		
	<i>N. sativa</i>	<i>N. damascena</i>	<i>N. orientalis</i>
Кверцетин	0.055* ± 0.001	0.043* ± 0.0008	0.057* ± 0.001
Кемпферол	0.039* ± 0.0007	0.027* ± 0.0006	0.029* ± 0.001

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей. Звездочка “*” означает, что значения достоверно отличаются при $P \leq 0.05$.

движной фазе изменялся за первые 10 мин от 5 до 25% растворителя В, увеличивался до 40% за 5 мин и оставался таким же в следующие 3 мин, в 25 мин составил 90%. Скорость потока элюента — 0.5 мл/мин. Детекция велась при длине волны 270 нм. Объем инъекции — 10 мкл (для количественного анализа) и 20 мкл (для качественного анализа). Температура в автосамплере 15°C. Хроматограф был онлайн сопряжен с tandemным масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad (тройной квадруполь) (Agilent Technologies Inc., USA). В качестве интерфейса ионизации электрораспылением использовался Agilent G1948B API-ES (Agilent Technologies Inc., USA) в режиме отрицательных и положительных ионов. Для идентификации использовали режимы общего сканирования ионов в диапазоне масс от 100 до 1500 Д (MS2 Scan) и получения дочерних ионов (Product ion) из ионов с m/z , соответствующим $[M + H]^+$ для молекулярных масс соединений в изучаемых экстрактах. Энергия в ячейке соударений при получении дочерних ионов варьировала от 15 до 45 В. Параметры работы масс-детектора: температура осушающего газа 350°C, скорость потока осушающего газа 7 л/мин, давление на распылителе 40 psi, напряжение на капилляре 4000 В, напряжение на фрагменторе 135 В (положительные ионы) и 200, 220 В (отрицательные ионы). Обработку хроматограмм с УФ- и масс-детекторов проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 и Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., USA).

Растворы стандартов кемпферола ($\geq 97\%$, Sigma), кверцетин дигидрат ($\geq 99\%$ HPLC, Extrasynthese) готовили в концентрациях 0.3–0.4 мг/мл в метаноле. Растворы для калибровочной кривой был в диапазоне концентраций от 7.5 до 150 мкг/мл. Для количественного анализа агликонов в образцах после гидролиза и фенольных соединений в негидролизированных образцах использовали хроматограммы с УФ-детектора. Содержание кемпферола и кверцетина рассчитывали по калибровочной кривой для соответствующих стандартов, флавоноидные гликозиды — по калибровочной кривой для кверцетина.

Математическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Проверка гипотезы о равенстве двух средних проводилась с помощью t -критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений 3 биологических повторностей и их стандартных ошибок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенольные соединения у растений рода *Nigella* представлены различными группами флавоноидов, галлокатехинами, производными коричной и кофейной кислот. При этом для *N. sativa* и *N. glandulifera* было отмечено присутствие разнообразных по составу и строению гликозидов кверцетина и кемпферола в экстрактах семян и надземных частей растения [5, 11, 15–18]. ВЭЖХ-МС анализ метанольных экстрактов листьев чернушки трех изучаемых видов позволил предварительно идентифицировать гликозиды кверцетина и кемпферола. Для подтверждения наличия в составе гликозидов именно этих агликонов был проведен кислотный гидролиз и последующий ВЭЖХ-МС анализ. Кемпферол и кверцетин в гидролизированных образцах были идентифицированы путем сравнения со стандартами этих веществ (времена выхода и масс-спектры), их количественная оценка в экстрактах представлена в табл. 1.

На рис. 1 представлена хроматограмма с УФ-детектора при $\lambda = 270$ нм для негидролизованного экстракта чернушки посевной (проинтегрированы пики основных флавоноидных гликозидов). Анализ масс-спектров в пиках на хроматограммах общего ионного тока в режиме генерации отрицательных и положительных ионов позволил предположить возможные молекулярные массы (мол. м.) и фрагменты основных соединений (табл. 2, 3).

Пики, приведенные в табл. 2, с временами удерживания (RT — retention times) 14.8, 15.3, 16.3, 16.7, 20.2 и 20.6 мин характеризуются одинаковой мол. м. 950 Д. В режиме генерации отрицательных ионов в масс-спектрах этих пиков были найдены ионы с m/z 949 = $[M - H]^-$, в режиме положительных ионов $-m/z$ 973 = $[M + Na]^+$, m/z 789 = $[M + H - 162]^+$, m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 162]^+$ (табл. 3). Потеря фрагмента 162 Д характерна при отщеплении

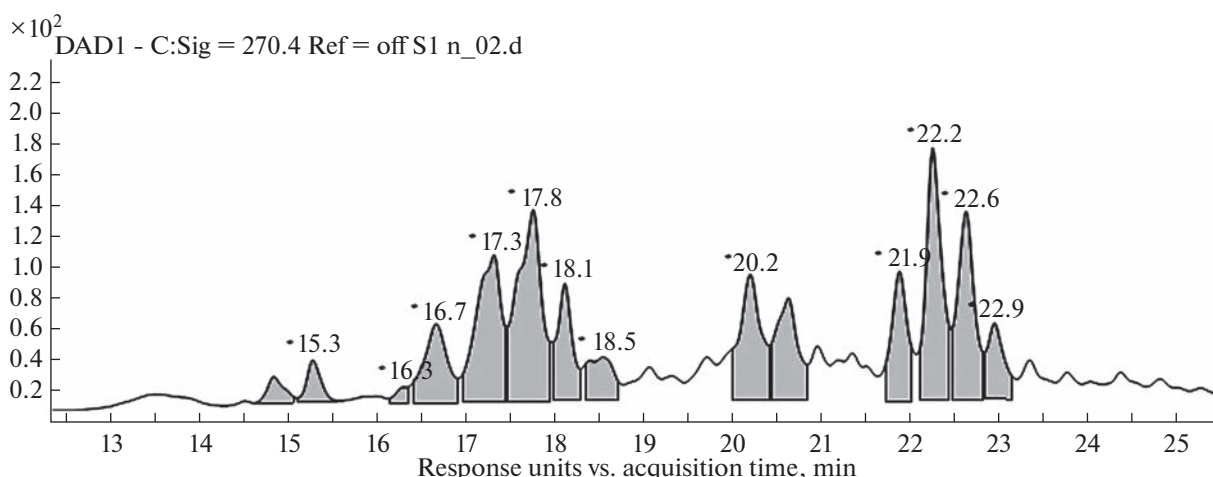


Рис. 1. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella sativa* L.

дегидратированной гексозы. Масс-спектр дочерних ионов при положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 627 = $[M + H-162-162]^+$, m/z 465 = $[M + H-162-162-162]^+$, m/z 303 = $[M + H-162-162-162-162]^+$. Фрагмент с величиной m/z 303 соответствовал остатку агликона кверцетина, что было дополнительно подтверждено обнаружением кверцетина в гидролизированных об-

разцах. Присутствующие в масс-спектрах ионы с m/z 325 = $[162 + 162 + H]^+$ и m/z 163 = $[162 + H]^+$ представляли собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Таким образом, эти соединения являются гликозидами кверцетина и 4 гексоз.

Пики с временами удерживания 17.3, 17.8 и 18.1 мин соответствовали веществам с одинаковой

Таблица 2. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella sativa* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
14.8	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.08 ± 0.008
15.3	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.03 ± 0.002
16.3	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.18 ± 0.002
16.7	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.34 ± 0.01
17.3	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.41 ± 0.01
17.8	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.17 ± 0.003
18.1	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	1.25 ± 0.006
18.5	Гликозид кемпферола и 3 гексоз	772	0.29 ± 0.003
20.2	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.21 ± 0.003
20.6	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.20 ± 0.006
21.9	Гликозид кверцетина и 3 гексоз и рамнозы	934	0.21 ± 0.003
22.3	Гликозид кверцетина и 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	
	Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	0.35 ± 0.005
22.6	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	
	Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	0.28 ± 0.009
22.9	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	0.02 ± 0.001
	Сумма		4.02

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Масс-спектрометрическая характеристика основных флавоноидных гликозидов

Название	мол. м., Д	Основные m/z в пике	
		ESI Negative	ESI Positive
Гликозид кемпферола и 2 гексоз	610	609, 483	633, 449, 287
Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	625, 300	649, 627, 465, 303, 163, 145
Гликозид кверцетина	712	667, 689, 300	713, 735, 303
Гликозид кемпферола и 3 гексоз	772	771	795, 450, 287, 163
Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	771, 300	773, 795, 303
Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	787, 625	789, 811, 465, 325, 303, 163
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	873	875, 713, 465, 303
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	933, 301, 271	957, 465, 309, 303, 163, 147
Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	949	973, 789, 465, 325, 303, 163
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	963	987, 501, 465, 339, 303, 177
Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	993	844, 531, 465, 369, 303, 207
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	1079, 300	1081, 449, 309, 303
Гликозид кверцетина, 4 гексоз и рамнозы	1096	1095, 300	1119, 1097, 949, 633, 471, 465, 309, 303, 301, 165, 147
Гликозид кверцетина, 4 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	1126	1125	1127, 1149, 303, 465

мол. м. 788 Д. В масс-спектрах этих соединений, полученных при отрицательной ионизации, присутствовали ионы с m/z 787 = $[M-H]^-$, m/z 625 = $[M-H-162]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 811 = $[M+Na]^+$, m/z 789 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162]^+$. Масс-спектр дочерних ионов при положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 627 = $[M+H-162]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162]^+$ (рис. 2а). Учитывая характерную фрагментацию с отщеплением фрагмента с мол. м. 162 Д и наличие иона агликона (мол. м. 303 Д), можно предположить, что эти соединения представляют собой гликозиды кверцетина и трех гексоз.

Пик с RT 18.5 мин содержал вещество с мол. м. 772 Д, что подтверждается наблюдаемыми в масс-спектрах ионами с m/z 771 = $[M-H]^-$ (отрицательная ионизация) и m/z 795 = $[M+Na]^+$ (положительная ионизация). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 449 = $[M+H-162-162]^+$, m/z 287 = $[M+H-162-162-162]^+$. Фрагмент с величиной m/z 287 соответствовал остатку агликона кемпферола, что было дополнительно подтверждено его обнаружением в гидролизированных образцах. Таким образом, это соединение – гликозид кемпферола и трех гексоз (табл. 2).

Пики с временами удерживания 21.9, 22.3 и 22.6 мин соответствовали соединениям с одинаковой мол. м. 934 Д. В режиме отрицательных

ионов были получены ионы с m/z 933 = $[M-H]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 957 = $[M+Na]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M+H-162-162-146]^+$ и m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146]^+$. Потеря фрагмента 162 Д характерна при отщеплении дегидратированной гексозы. Фрагмент молекулы с нейтральной потерей 146 Д может образовываться при отщеплении рамнозы ($-H_2O$). Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$, m/z 325 = $[162+162+H]^+$, m/z 163 = $[162+H]^+$, m/z 147 = $[146+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида (табл. 3). Учитывая характерную фрагментацию с отщеплением фрагмента с мол. м. 162 Д и 146 Д и наличие иона агликона (303 Д), можно предположить, что эти соединения представляют собой гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной рамнозы.

Надо отметить, что пики с временами удерживания 22.3 и 22.6 мин являются смесью не разделившихся веществ, поэтому, помимо соединений с мол. м. 934 Д в этих же пиках присутствуют вещества с мол. м. 964 Д, которые есть и в пике с RT 22.9 мин. В режиме отрицательных ионов в масс-спектрах этих соединений обнаружены ионы с m/z 963 = $[M-H]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 987 = $[M+Na]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-176]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в

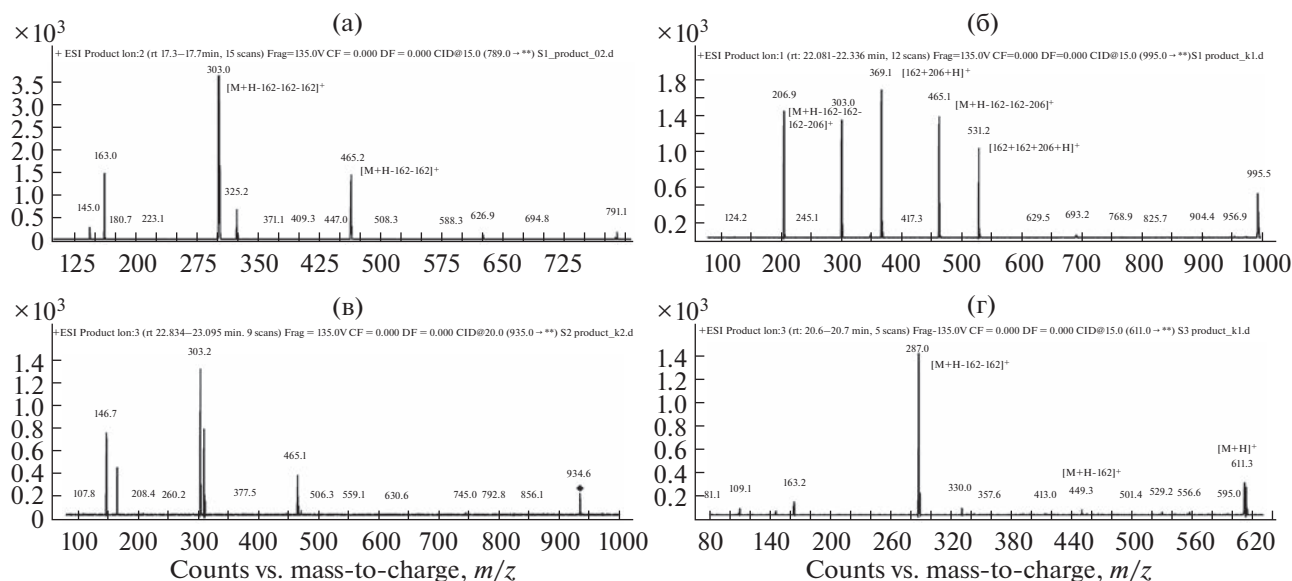


Рис. 2. Масс-спектры в режиме получения дочерних ионов: а — из m/z 789 для *Nigella sativa*; б — из m/z 995 для *Nigella sativa*; в — из m/z 935 для *N. damascene*; г — из m/z 611 для *N. orientalis*.

положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M + H - 162 - 162 - 176]^+$ и m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 176]^+$. Потеря фрагмента 176 Д может происходить при отщеплении либо остатка феруловой ($-H_2O$), либо остатка глюкуроновой кислоты ($-H_2O$). Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Ионы с m/z 339 = $[176 + 162 + H]^+$, m/z 501 = $[162 + 162 + 176 + H]^+$; m/z 177 = $[176 + H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации остатков сахаров и кислот, входящих в состав гликозида. Поэтому можно предположить, что эти соединения — гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты. Также в пиках с временами удерживания 22.3 и 22.6 мин присутствовали вещества с мол. м. 994 Д, что подтверждается наличием ионов с m/z 993 = $[M - H]^-$ (отрицательная ионизация) и m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 206]^+$ (положительная ионизация). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M + H - 162 - 162 - 206]^+$, m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 206]^+$ (рис. 2б). Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Ионы с m/z 369 = $[162 + 206 + H]^+$, m/z 531 = $[162 + 162 + 206 + H]^+$, m/z 207 = $[206 + H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида (табл. 3). Полученные результаты согласуются с работой исследователей Технического университета в Лиссабоне [19]. Потеря фрагмента с m/z 206 соответствует ацильной группе, представленной синаповой кислотой. Таким образом, это соединение представляет собой ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и

трех гексоз. Наши данные согласуются с литературными, так в экстрактах чернушки различных видов исследователями из Туниса, Италии, Боснии и Герцеговины, а также Чехии отмечено присутствие феруловой и синаповой кислот [5, 11, 15].

Для экстракта *N. damascena* на рис. 3 представлена хроматограмма с УФ-детектора при $\lambda = 270$ нм, на которой проинтегрированы пики основных флавоноидных гликозидов. Анализ масс-спектров пиков в режиме генерации отрицательных и положительных ионного тока позволил определить молекулярные массы и фрагменты основных соединений (табл. 2–4).

Пик с RT 16.1 мин соответствовал соединению с мол. м. 950 Д, с фрагментацией, аналогичной описанной для гликозидов кверцетина и четырех молекул гексоз в *N. sativa*. Вещества с временами удерживания 17.3, 22.5 и 22.9 мин имеют одинаковую мол. м. 934 Д и фрагментацию как гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной рамнозы (рис. 2в). Для вещества с временем удерживания 18.4 мин и мол. м. 788 Д характерна фрагментация как для гликозидов кверцетина и трех гексоз в *N. sativa*. Соединения с временами удерживания 22.9 и 23.2 мин и мол. м. 964 Д имели масс-спектры аналогичные гликозиду кверцетина, трех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты, как в экстракте *N. sativa*.

Пики с временами удерживания 17.3 и 17.7 мин (табл. 4) содержали вещества с одинаковой мол. м. 772 Д, и были предположительно идентифицированы как гликозиды кверцетина, двух гексоз и одной рамнозы, т. к. в режиме отрицательной ионизации были зарегистрированы ионы с m/z 771 =

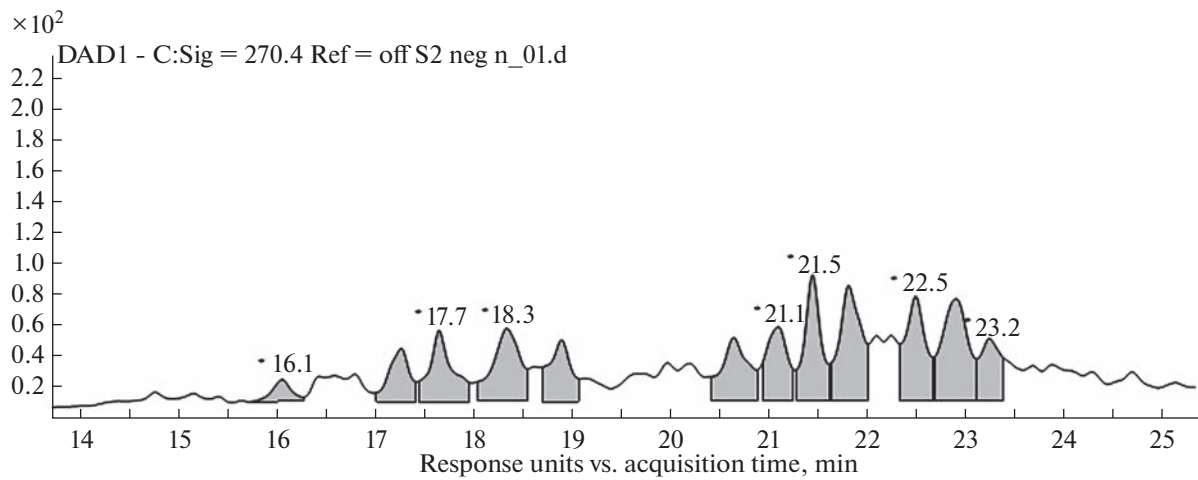


Рис. 3. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella damascena* L.

= [M–H][–], а в режиме положительной – m/z 795 = [M + Na]⁺, m/z 773 = [M + H]⁺, m/z 303 = [M + H-162-162-146]⁺. Агликон соответствовал кверцетину (m/z 303).

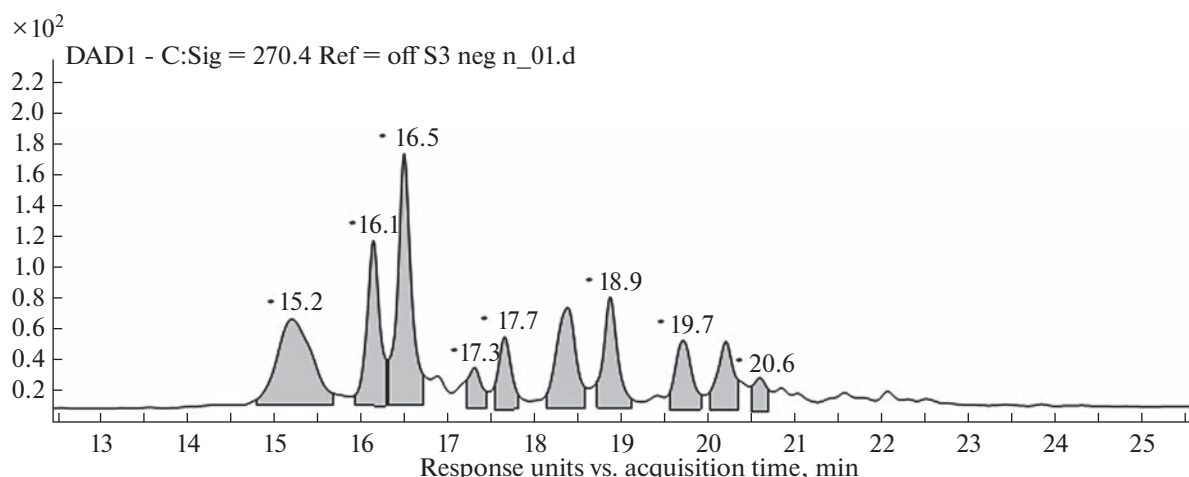
Соединения с временами удерживания 184 и 18.9 мин имели мол. м. 626 Д. В режиме отрица-

тельных ионов были зарегистрированы ионы с m/z 625 = [M–H][–], в режиме положительных ионов – m/z 649 = [M + Na]⁺, m/z 627 = [M + H]⁺, m/z 465 = [M + H-162]⁺, m/z 303 = [M + H-162-162]⁺. Агликон соответствовал кверцетину (m/z 303) и можно предположить, что эти соединения – гликозиды кверцетина и двух гексоз.

Таблица 4. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella damascena* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
16.1	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.04 ± 0.001
17.3	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	0.05 ± 0.005
17.7	Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	0.06 ± 0.001
18.4	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	
	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.09 ± 0.002
18.9	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.06 ± 0.002
20.7	Гликозид кверцетина, 4 гексоз и рамнозы	1096	0.08 ± 0.002
21.1	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	
	Гликозид кверцетина, 4 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	1126	0.09 ± 0.001
21.5	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.13 ± 0.003
21.8	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.16 ± 0.004
22.5	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	0.13 ± 0.002
22.9	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	964	0.17 ± 0.001
23.2	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	964	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.11 ± 0.003
	Сумма		1.17

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.


 Рис. 4. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella orientalis* L.

Вещества с временами удерживания 21.1; 21.5 и 21.8 мин характеризовались одинаковой мол. м. 1080 Д, что подтверждается полученными в режиме отрицательной ионизации ионами с m/z 1079 = $[M-H]^-$ и m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-146-146]^-$; в режиме положительной ионизации — m/z 1081 = $[M+H]^+$, m/z 465 = $[M+H-162]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146-146]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 611 = $[M+H-162-162-146]^+$, m/z 449 = $[M+H-162-162-162-146]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162-146-146]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146-146]^+$. Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$ и m/z 147 = $[146+H]^+$ представляли собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Агликон соответствует кверцетину. Предположительно эти вещества — гликозиды кверцетина, трех гексоз и двух рамноз.

Вещество с мол. м. 1096 Д имело время удерживания 20.7 мин. Присутствовали ионы с m/z 1095 = $[M-H]^-$, m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-146]^-$ в режиме отрицательной ионизации и m/z 1119 = $[M+Na]^+$, m/z 1097 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-146]^+$ в режиме положительной ионизации. Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M+H-162-162-162-146]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-146]^+$. Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$, m/z 147 = $[146+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Таким образом, это соединение представляет собой гликозид кверцетина, четырех гексоз и одной рамнозы.

В масс-спектре вещества с временем удерживания 21.1 мин в режиме отрицательных ионов

присутствовали ионы с m/z 1125 = $[M-H]^-$, m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-162-176]^-$, а в режиме положительных ионов — m/z 1149 = $[M+Na]^+$, m/z 1127 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-176]^+$, и соответственно, его молекулярная масса составляет 1126 Д. Агликоном является кверцетин. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 664 = $[M+Na-162-162-162]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162-162-176]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-176]^+$. Ионы с m/z 339 = $[176+162+H]^+$, m/z 501 = $[162+162+176+H]^+$; m/z 177 = $[176+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Потеря фрагмента с m/z 176 соответствует либо глюкуроновой кислоте, либо ацильной группе, представленной феруловой кислотой. Поэтому данное соединение может являться гликозидом кверцетина, четырех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты.

На рис. 4 представлена УФ-хроматограмма ($\lambda = 270$ нм) основных флавоноидных гликозидов для экстракта листьев *N. orientalis*. Анализ масс-спектров пиков в режиме генерации отрицательных и положительных ионов на хроматограммах общего ионного тока позволил определить молекулярные массы и фрагменты основных соединений (табл. 3, 5).

Вещества с временами удерживания 15.2, 16.1 и 16.5 мин имели мол. м. 788 Д и фрагментацию аналогичную для соединений с такой же массой, обнаруженных в *N. sativa* и *N. damascene*. Предположительно эти соединения — гликозиды кверцетина и трех молекул гексоз. Вещества с одинаковой мол. м. 626 Д и временами удерживания 18.4 и 18.9 мин являются гликозидами кверцетина и двух гексоз с масс-спектрами аналогичными для такого же вещества в *N. damascene*.

Таблица 5. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella orientalis* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
15.2	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.27 ± 0.005
16.1	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.19 ± 0.001
16.5	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.31 ± 0.01
17.3	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	0.04 ± 0.003
17.7	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	0.09 ± 0.002
18.4	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.15 ± 0.005
18.9	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.12 ± 0.003
19.7	Гликозид кверцетина	712	0.08 ± 0.007
20.2	Гликозид кверцетина	712	0.07 ± 0.002
20.6	Гликозид кемпферола и 2 гексоз	610	0.02 ± 0.001
	Сумма		1.07

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.

В пиках с временами удерживания 17.3 и 17.7 мин присутствовали вещества с одинаковой мол. м. 874 Д, что подтверждается обнаруженными ионами с m/z 873 = $[M-H]^-$ (режим отрицательной ионизации) и m/z 875 = $[M+H]^+$ (режим положительных ионов). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 713 = $[M+H-162]^+$, m/z 551 = $[M+H-162-162]^+$; m/z 465 = $[M+H-162-162-86]^+$; m/z 303 = $[M+H-162-162-162-86]^+$. Агликон (m/z 303) соответствует кверцетину. Потеря фрагмента с m/z 86 соответствует ацильной группе, представленной малоновой кислотой [19]. Таким образом, это соединение представляет собой гликозид кверцетина, трех гексоз и молекулы малоновой кислоты. Соединения с одинаковой мол. м. 712 Д имели времена удерживания 19.7 и 20.2 мин. В режиме положительной ионизации зарегистрированы ионы с m/z 713 = $[M+H]^+$, m/z 735 = $[M+Na]^+$, m/z 751 = $[M+K]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал ион агликона кверцетина: m/z 303 = $[M+H-сахара]^+$. Это соединение представляет собой гликозид кверцетина.

В масс-спектре вещества с мол. м. 610 Д и временем удерживания 20.6 мин в режиме отрицательной ионизации присутствовали ионы с m/z 609 = $[M-H]^-$, в режиме положительной ионизации — m/z 633 = $[M+Na]^+$, m/z 611 = $[M+H]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 449 = $[M+H-162]^+$; m/z 287 = $[M+H-162-162]^+$ (рис. 2г). Агликон с m/z 287 соответствует кемпферу. Соединение является гликозидом кемпферола и двух гексоз.

Суммарное количество флавоноидных гликозидов в экстрактах листьев *N. sativa* был в 4 раза выше, чем в экстрактах двух других видов чернушки (табл. 2, 4, 5). При этом следует отметить, что в листьях всех исследованных видов чернушки преобладали гликозиды кверцетина, что также подтверждается суммарным содержанием агликона кверцетина в гидролизированных экстрактах. Несмотря на то, что содержание кемпферола в образцах после гидролиза всего в 1.40–1.97 раза меньше (табл. 1), чем кверцетина, нам удалось обнаружить на хроматограммах лишь два его гликозида. Учитывая наблюдаемое разнообразие состава гликозидов кверцетина, можно предположить, что растения рода чернушка также способны синтезировать и накапливать различные по составу и строению производные кемпферола. По-видимому, из-за возможного разнообразия соединений кемпферола, его более низкого содержания и анализа грубого экстракта без предварительных фракционирования, очистки и концентрирования, мы не смогли идентифицировать на хроматограммах и в масс-спектрах все гликозиды кемпферола.

Таким образом, установлено что листья *N. sativa* в условиях Центральной Беларуси имеют наиболее богатый состав флавоноидных гликозидов по отношению к другим изучаемым видам. По качественному составу флавоноидных гликозидов вид *N. damascene* наиболее близок к *N. sativa*, тогда как по общему содержанию этой группы соединений — к *N. orientalis*. Стоит упомянуть, что виды *N. sativa* и *N. damascene* имеют наибольшее фенотипическое сходство и более устойчивы к условиям произрастания в Беларуси (на основании 9-летних полевых экспериментов на территории Цен-

трального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси). Отмечено, что вид *N. orientalis* отличается внешне и более требователен к условиям культивирования. Полевые испытания изучаемых видов чернушки показали, что *N. sativa* и *N. damascene* стабильно дают жизнеспособные семена, всхожесть которых колеблется в пределах 60–80%, в то время как семена *N. orientalis* имели всхожесть 20–45% и были отмечены 2 года, когда семена не успели вызреть. Также следует отметить различия в габитусе растений: виды *N. sativa* и *N. damascene* отличаются большей высотой и кустистостью с количеством побегов первого порядка 5–9 шт., тогда как вид *N. orientalis* формировал 2–3 побега первого порядка. Было установлено, что в листьях *N. orientalis* разнообразие флавоноидных гликозидов меньше, при отсутствии высокомолекулярных и ацилированных форм. Известно [20], что гликозилирование и ацилирование позволяет улучшать растворимость, химическую стабильность флавоноидов, их участие в активном мембранном транспорте и защите от УФ-излучения, повышая способность к его поглощению и нейтрализации АФК. Возможно отсутствие ацилированных производных и меньшее разнообразие флавоноидных гликозидов сказывается на низкой устойчивости *N. orientalis* к абиотическим факторам и снижает его адаптационный потенциал. Опираясь на данные по мультилокусному ДНК-маркированию 3 видов рода *Nigella* [21] можно предположить генетическую обусловленность состава флавоноидных гликозидов у видов этого рода. Так, вид *N. orientalis* занимает отдельный кластер на дендрограмме, отражающей степень генетического сходства (на основе 235 маркеров (RAPD и ISSR)), в то время как виды *N. sativa* и *N. damascene* относятся к одному кластеру.

Работа выполнена при финансовой поддержке задания 06.02 Государственной программы научных исследований “Природные ресурсы и окружающая среда”, подпрограмма “Биоразнообразие, биоресурсы, экология” (2021–2025).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович и С.Н. Шиш выдвинули и разработали схему эксперимента. Образцы для анализа были подготовлены С.Н. Шиш. Авторы П.С. Шабуня и С.А. Фатыхова провели ВЭЖХ-МС экстрактов на содержание флавоноидных гликозидов, а также расчеты содержания веществ с описанием их идентификации. Авторы С.Н. Шиш, П.С. Шабуня и Е.В. Спиридович участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении и изложении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дудченко Л.Г., Козьяков А.С., Кривенко В.В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. Справочник. Киев: Наукова думка. 1989. 304 с.
2. Прохоров В.Н. Нигелла — ценная хозяйственно-полезная культура (обзор литературы) // Овощи России. 2021. Р. 111.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-111-123>
3. Datta A.K., Saha A. Cytomorphological studies and seed protein characterization of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. // Cytologia (Tokyo). 2003. V. 68. P. 51.
4. Benazzouz-Smail L., Achat S., Brahmi F., Bachir-Bey M., Arab R., Lorenzo J.M., Benbouriche A., Boudiab K., Hauchard D., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K. Biological properties, phenolic profile, and botanical aspect of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. seeds // Molecules. 2023. V. 28. P. 571.
<https://doi.org/10.3390/molecules28020571>
5. Bourguou S., Riadh K., Amor B., Ines S., Hanen F., Brahim M. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots // C. R. Biol. 2008. V. 331. P. 48.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.11.001>
6. Исакова А.Л., Прохоров В.Н., Исаков А.В. Нигелла в Беларуси. Горки: БГСХА, 2021. 118 с.
7. Kokoska L., Havlik J., Valterova I., Nepovim A., Rada V., Vanek T. Chemical composition of the essential oil of *Nigella orientalis* L. seeds // Flavour Fragr. J. 2005. V. 20. P. 419.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1449>
8. Kökdil G., Tamer L., Ercan B., Celik M., Atik U. Effects of *Nigella orientalis* and *N. segetalis* fixed oils on blood biochemistry in rats // Phytother. Res. 2006. V. 20. P. 71.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1809>
9. Ait Eldjoudi D., Ruiz-Fernandez C., González-Rodríguez M., Ait Atmane S., Cordero-Barreal A., Farrag Y., Pino J., Sineiro J., Lago F., Conde-Aranda J., Khettal B., Gualillo O. Analgesic and antiinflammatory effects of *Nigella orientalis* L. seeds fixed oil: pharmacological potentials and molecular mechanisms // Phytother. Res. 2022. V. 36. P. 1372.
<https://doi.org/10.1002/ptr.7400>
10. Gueffa A., Gonzalez-Serrano D.J., Christodoulou M.C., Orellana-Palacios J.C., Lopez S., Ortega M., Ould-moumna A., Zohra Kiari F., Ioannou G.D., Kapnissi-Christodoulou C.P., Moreno A., Hadidi M. Phenolics from defatted black cumin seeds (*Nigella sativa* L.): ultrasound-assisted extraction optimization, comparison, and antioxidant activity // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 1311.
<https://doi.org/10.3390/biom12091311>
11. Topcagic A., Zeljkovic S.C., Karalija E., Galijasevic S., Sofic E. Evaluation of phenolic profile, enzyme inhibitory and antimicrobial activities of *Nigella sativa* L. seed extracts // Bosn. J. Basic Med. Sci. 2017. V. 17. P. 286.
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.2049>
12. Akram Khan M., Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: part 2 recent advances // Inflammopharmacology. 2016. V. 24. P. 67.
<https://doi.org/10.1007/s10787-016-0262-7>

13. Hameeda S., Imrana A., un Nisaa M., Arshada M.S., Saeeda F., Umair Arshada M., Khan M.A. Characterization of extracted phenolics from black cumin (*Nigella sativa* linn), coriander seed (*Coriandrum sativum* L.), and fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) // Int. J. Food Prop. 2019. V. 22. P. 714.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1599390>
14. Шииш С.Н., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А. Растения рода *Nigella* как источник ценных биологических веществ для биотехнологии // Материалы Международной научной конференции “Настоящее и будущее биотехнологии растений”, г. Минск, 2023. С. 98.
15. Ansary J., Regolo L., Machi M., Salinari A. Cianciosi D. Evaluation of the *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds of black cumin (BARI-1 cumin) methanolic extract // eFood. 2022. V. 3:e15.
<https://doi.org/10.1002/efd2.15>
16. Parveen A., Farooq M.A., Kyunn W.W. A new oleanane type saponin from the aerial parts of *Nigella sativa* with anti-oxidant and anti-diabetic potential // Molecules. 2020. V. 25. P. 2171.
<https://doi.org/10.3390/molecules25092171>
17. Dalli M., Bekkouch O., Azizi S., Azghar A., Gseyra N., Kim B. *Nigella sativa* L. phytochemistry and pharmacological activities: a review (2019–2021) // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 20.
<https://doi.org/10.3390/biom12010020>
18. Liu Y.M., Liu Q.H., Chen B.Q. A new flavonol glycoside from the seeds of *Nigella glandulifera* // Nat. Prod. Res. 2011. V. 25. P. 1334.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534470>
19. Pinheiro P.F., Justino G.C. Structural analysis of flavonoids and related compounds – a review of spectroscopic applications // Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health / Ed. V. Rao. InTech. 2012. P. 33.
<https://doi.org/10.5772/29152>
20. Alseekh S., Perez de Souza L., Benina M., Fernie A.R. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function // Phytochem. 2020. V. 174. P. 112347.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112347>
21. Юхимук А.Н., Тхань Л.Н., Спиридович Е.В. Молекулярно-генетический анализ некоторых видов рода чернушка (*Nigella* L.) // Сборник материалов II международной научно–практической конференции “Биотехнология: достижения и перспективы развития”. Пинск. 2017. С. 53.