

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWIUTLENIAJĄCE KWIATÓW *NIGELLA SATIVA* L.

DOMINIKA RADZIKOWSKA¹, PRZEMYSŁAW Ł. KOWALCZEWSKI², EWA WITKOWSKA-BANASZCZAK³

¹Katedra Agronomii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

²Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań

³Katedra Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Świecickiego 4, 61-781 Poznań

Synopsis. Wykorzystanie nasion z czarnuszki siewnej (*Nigella sativa* L.) jako surowca farmaceutycznego jest znane od lat. Jak dotąd mało jest jednak doniesień na temat właściwości bioaktywnych kwiatów i ziela. W niniejszej pracy przebadano wyciągi (wodny oraz metanolowy) z kwiatów *Nigella sativa* w celu oznaczenia w nich zawartości polifenoli i flawonoidów, a także potencjału przeciwutleniającego. Stwierdzono, że zawartość flawonoidów w kwiatach w przeliczeniu na hyperozyd wynosi 0,75 %. Suma polifenoli oznaczona metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu² wyniosła 1,35% w przeliczeniu na kwas kawowy. Zdolności antyoksydacyjne wyciągów z kwiatów analizowano metodą z rodnikiem DPPH i wykazano, że ekstrakt wodny z kwiatów *N. sativa* charakteryzuje się dwukrotnie wyższą aktywnością przeciwutleniającą, niż ekstrakt metanolowy.

Słowa kluczowe: czarnuszka siewna, flawonoidy, polifenole, DPPH

WSTĘP

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu człowieka zależy od wielu czynników, w tym od utrzymania na niskim poziomie reaktywnych form tlenu (ROS), generowanych w procesach metabolicznych, które muszą zostać wyeliminowane [Karoui-Kharrat i in. 2017]. ROS biorą udział w utlenianiu lipidów, białek, a nawet kwasów nukleinowych, które prowadzą do zmian w komórkach lub ich śmierci. Może to ostatecznie doprowadzić do wielu chorób [Gawlik-Dziki i in. 2013]. Stres oksydacyjny, czyli nagromadzenie dużej ilości ROS, można zmniejszyć przez dostarczenie organizmowi związków o działaniu przeciwutleniającym. Stwierdzono, że rośliny używane do produkcji tradycyjnych leków zawierają wiele związków fitochemicznych, które zmniejszają stres oksydacyjny i mogą być stosowane w leczeniu chorób przewlekłych [Bayliak i in. 2016]. Jedną z takich roślin jest czarnuszka siewna (*Nigella sativa* L.), która już od 2 tysięcy lat uważane jest za roślinę o właściwościach leczniczych. Pierwsze pisemne udokumentowanie znajduje się w Starym Testamencie, w Księdze Izajasza (Księga Izajasza 28: 25, 27). Nasiona *Nigella sativa* były używane już przez starożytnych Egipcjan, Greków i Rzymian. Opisano działanie wykrztuśne, stymulujące energię organizmu oraz leczące znużenie i przygnębienie. W krajach muzułmańskich uznawano ją za lek leczący wszelkie schorzenia-panaceum. Koran zalecał wiernym codzienne spożywanie porcji nasion czarnuszki dla ochrony przed chorobami i poprawy apetytu [Rumińska i Ożarowski 1990]. W Europie i USA zainteresowanie wykorzystaniem medycznym skoncentrowane są na właściwościach przeciwzapalnych [Marsik i in.

¹ Adres do korespondencji – *Corresponding address*: dominika.radzikowska@up.poznan.pl

2005], antyoksydacyjnych [Salem 2005, Ramadan i in. 2003], przeciwbakteryjnych [Aljabre i in. 2005, Salem 2005], przeciwwrzodowym oraz przeciwcukrzycowych [Wichtl 2004] oleju otrzymanego z nasion. Niemniej jednak niewiele jest jak dotąd danych literaturowych charakteryzujących kwiaty czarnuszki siewnej pod względem charakterystyki związków o działaniu przeciwutleniającym.

Celem pracy było oznaczenie zawartości sumy polifenoli i zawartości flawonoidów w kwiatach *Nigella sativa* L. (czarnuszki siewnej), a także analiza właściwości przeciwutleniających wyciągu z kwiatów.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono w laboratorium Katedry Farmakognozji, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w 2009 roku. Wysuszone i rozdrobnione kwiaty *Nigella sativa* (1 g), pozyskane z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytut Badawczego w Radzikowie, umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml i dodano 20 ml metanolu (Sigma-Aldrich, grupa Merck). Mieszaninę utrzymywano 30 min w łaźni wodnej z chłodnicą zwrotną, następnie przesączono przez wate. Osad wraz z watą umieszczono w kolbie, dodano 10 ml metanolu, utrzymywano 30 min na łaźni wodnej i ponownie przesączono. Po oddestylowaniu metanolu z otrzymanego ekstraktu, suchą pozostałość rozpuszczono w 2 ml metanolu. Ekstrakt wodny przygotowano analogicznie do metanolowego, używając do ekstrakcji wodę destylowaną.

Przy użyciu aparatu LINOMAG 5 naniesiono pasmowo po 0,01 ml wyciągów z kwiatów czarnuszki siewnej na dwie płytki aluminiowe z żelem krzemionkowym na długości 1 cm. Tak przygotowane, a następnie wysuszone płytki umieszczono w dwóch komorach chromatograficznych i rozwijano w układach rozpuszczalników A [octan etylu; kwas mrówkowy 80%; woda (10:2:3)] i B [octan etylu; kwas mrówkowy 98–100%; kwas octowy lodowy; woda (100:11:11:26)]. Po rozwinięciu chromatogramy analizowano pod lampą UV ($\lambda=366$ nm), a następnie spryskiwano 1% metanolowym roztworem odczynnika Naturstoff Reagent A (Carl Roth GmbH + Co. KG). Chromatogram fotografowano za pomocą aparatu Reprostar 3 (Camag, USA). Wizualizację oraz detekcję związków na płytkach TLC prowadzono przy użyciu wideoskanera Reprostar 3.

Oznaczenie zawartości flawonoidów w kwiatach *N. sativa* wykonano metodą Christa-Müllera zgodnie z metodyką opisaną w Farmakopea Polska XI [2017].

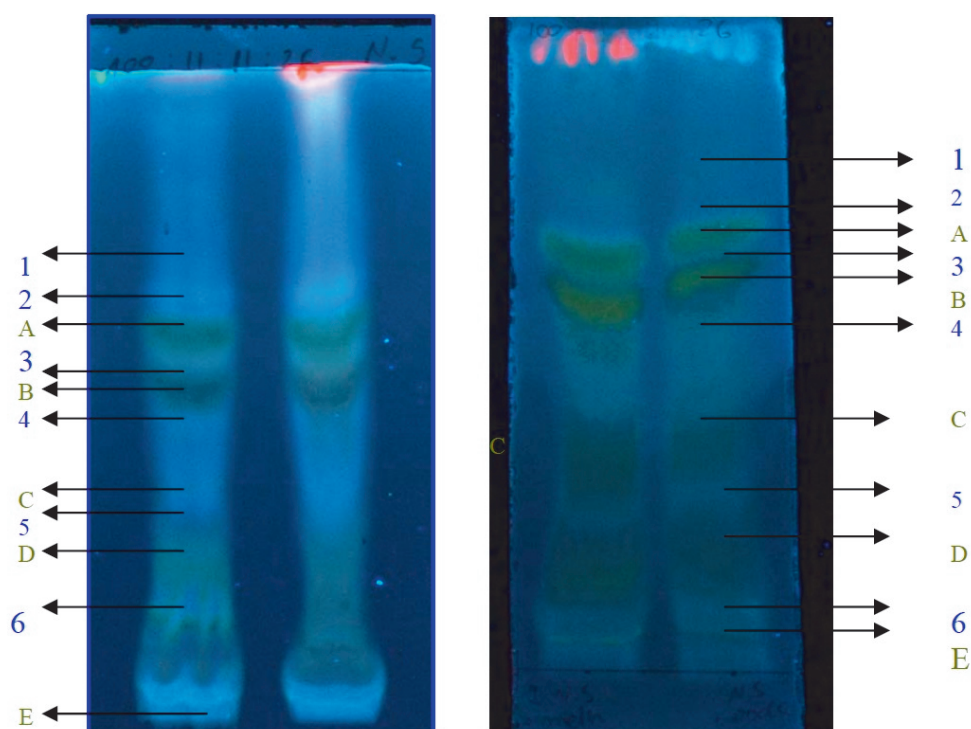
Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli przeprowadzono przy użyciu odczynnika Folin-Ciocalteu zgodnie z metodą opisaną przez Fanga i in. [2006]. Absorbancję mierzono przy długości fali 760 nm za pomocą spektrofotometru (UV/VIS Lambda 35 Elmer-Perkin). TPC (w %) obliczono z równania krzywej standardowej ($y = 0,093 \times 0,0287$; $R^2 = 0,9721$) dla kwasu kofeinyowego.

Aktywność przeciwutleniającą oznaczono jako zdolność do wygaszania rodnika DPPH zgodnie z metodą opisaną przez Mensor i in. [2001].

WYNIKI I DYSKUSJA

Rośliny, zarówno całe, jak i poszczególne ich części anatomiczne, używane były od wieków w medycynach ludowych do leczenia wielu chorób. Uznaje się także, że są źródłem wielu związków o charakterze bioaktywnym [Jeszka i in. 2010], na których ilość mogą mieć tak-

że warunki uprawy, zbioru, a nawet czynniki stresowe działające na roślinę podczas wzrostu [Witkowska-Banaszczak i in. 2018]. W celu potwierdzenia obecności związków o charakterze polifenoli, szczególnie kwasów fenolowych, ich estrów, oraz związków flawonoidowych, przeprowadzono analizę wyciągów z *N. sativa* metodą chromatografii cienkowarstwowej. Analizę wykonano na płytkach chromatograficznych pokrytych żel krzemionkowym [Wagner i Bładt 1996]. Stwierdzono, że w badanych wyciągach (zarówno metanolowym, jak i wodnym), występują związki o niebieskiej fluorescencji w UV $\lambda=366$ nm, przed i po wywołaniu odczynnikiem Naturstoffreagent A (oznaczone numerami 1–6), co wskazuje na obecność co najmniej sześć różnych kwasów fenolowych lub ich estrów, a także o brunatnej fluorescencji w UV $\lambda=366$ nm przed i żółtej do żółtopomarańczowej po wywołaniu odczynnikiem Naturstoffreagent A (oznaczone literami A–E), co potwierdza obecność co najmniej 5 różnych związków flawonoidowych (rys. 1 i 2). Stwierdzono ponadto, że zastosowanie różnych ekstrahentów nie spowodowało zmiany profilu związków i zarówno w wyciągu metanolowym, jak i wodnym jest on zbliżony (rys. 3 i 4).

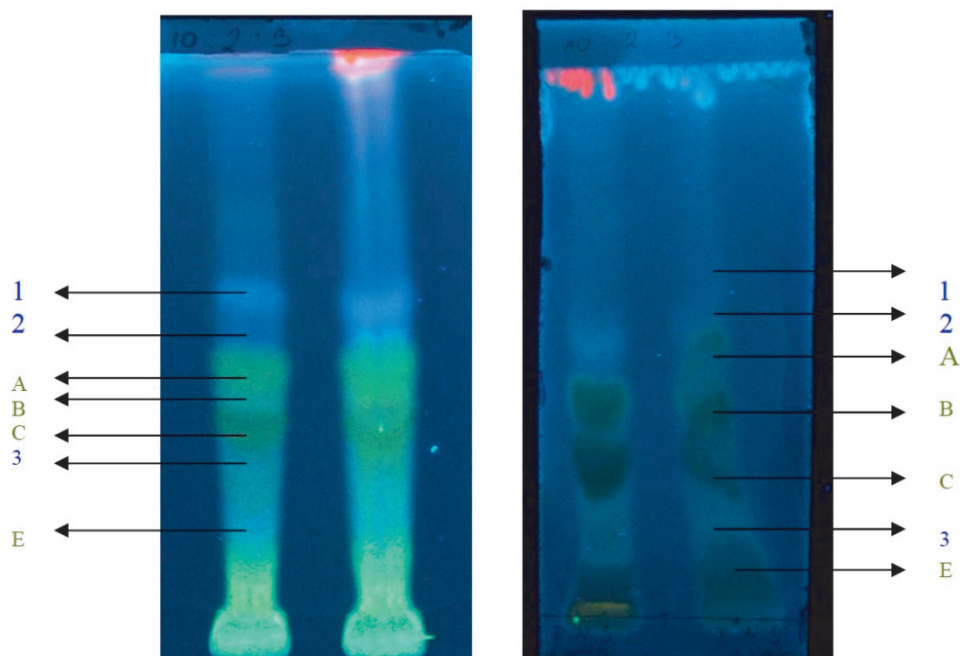


1-6 – różne kwasy fenolowe lub ich estry/various phenolic acids or their esters

A-E – różne związki flawonoidowe/various flavonoid compounds

Rys. 1. Fotografia rozdziału związków w układzie 100:11:11:26. Od lewej bez dodatku odczynnika Naturstoffreagent A, po prawej po wywołaniu odczynnikiem Naturstoffreagent A

Fig. 1. A photograph of the distribution of compounds in 100:11:11:26 system. From the left without the addition of Naturstoffreagent A reagent, to the right after being developed with Naturstoffreagent A reagent



1-3 – różne kwasy fenolowe lub ich estry/various phenolic acids or their esters
 A-C, E – różne związki flawonoidowe/various flavonoid compounds

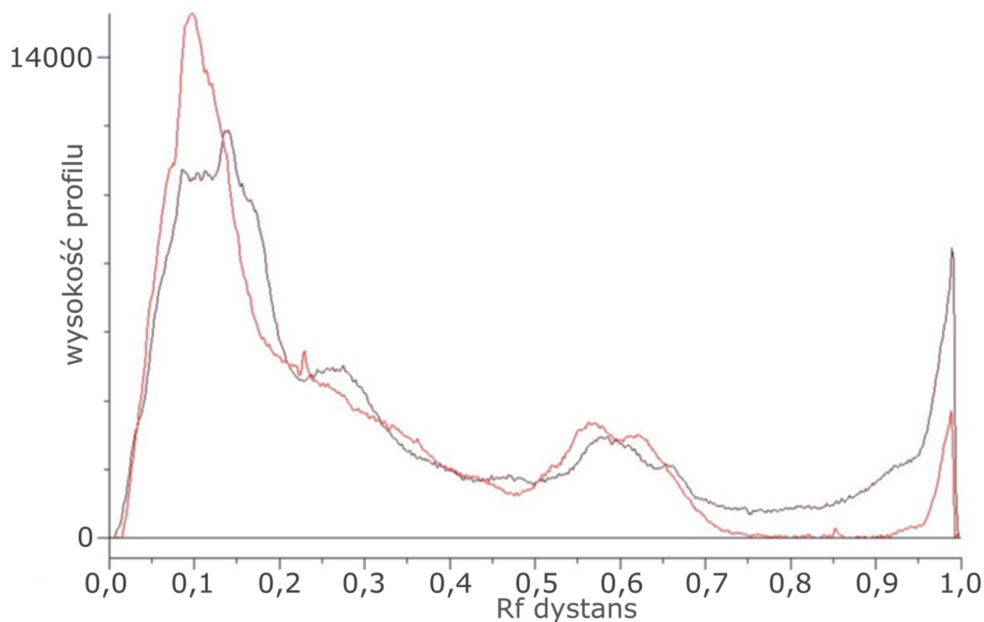
Rys. 2. Fotografia rozdziłu związków w układzie 10:2:3. Od lewej bez dodatku odczynnika Naturstoffreagent A, po prawej po wywołaniu odczynnikiem Naturstoffreagent A

Fig. 2. A photograph of the distribution of compounds in 100:11:11:26 system. From the left without the addition of Naturstoffreagent A reagent, to the right after being developed with Naturstoffreagent A reagent

Tabela 1. Wyniki analizy zawartości flawonoidów, polifenoli i całkowitej aktywności przeciwutleniającej kwiatów *Nigella sativa*

Table 1. Results of the analysis of the flavonoid content, polyphenols and total antioxidant activity of *Nigella sativa* flowers

Parametr Parameter	Ekstrakt metanolowy Methanol extract	Ekstrakt wodny Water extract
Zawartość flawonoidów The content of flavonoids	0,75 ± 0,02%	0,77 ± 0,01%
Zawartość polifenoli The content of polyphenols	1,35 ± 0,07%	1,36 ± 0,06%
Inhibicja rodnika DPPH Inhibition of the DPPH radical	5,67 ± 0,09%	11,72 ± 0,11%

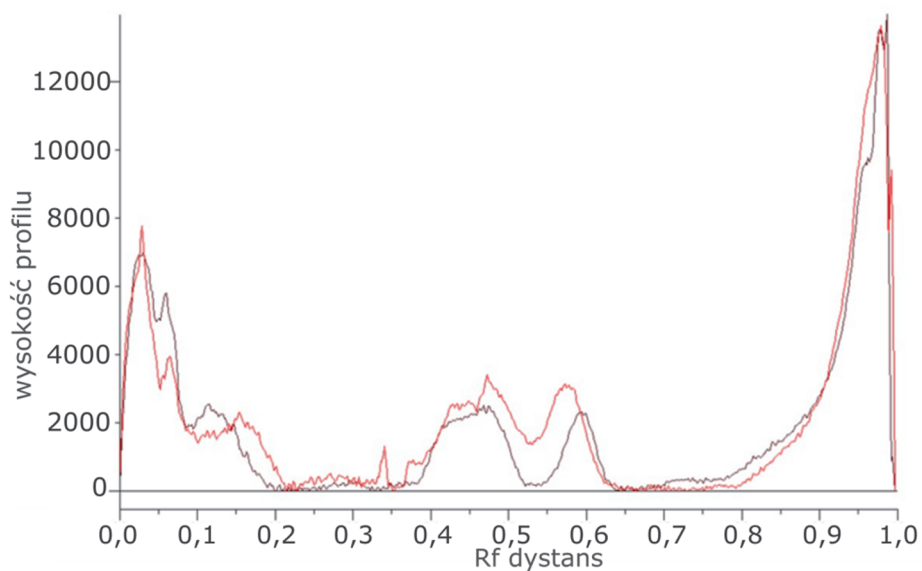


Rys. 3. Skan TLC układu octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda (100:11:11:26).

Linia czerwona – ekstrakt metanolowy; linia czarna – ekstrakt wodny

Fig. 3. TLC scan of the ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water system (100:11:11:26).

Red line – methanol extract; black line – water extract



Rys. 4. Skan TLC układu octan etylu-kwas mrówkowy-woda (10:2:3). Linia czerwona

– ekstrakt metanolowy; linia czarna – ekstrakt wodny

Fig. 4. TLC scan of the ethyl acetate-formic acid-water system (10:2:3). Red line

– methanol extract; black line – water extract

Z uzyskanych rezultatów wynika (tab. 1), że kwiaty *N. sativa* można zaliczyć do surowców flawonoidowych, ponieważ zawartość flawonoidów jest porównywalna z takimi surowcami leczniczymi jak: *Sambuci flos* 0,8%, czy *Solidaginis herba* 0,5–1,0% (FP VIII, 2008). W kwiatach oznaczano także sumę polifenoli. Polifenole są to związki zawierające, co najmniej dwie grupy OH. Grupy fenolowe występują, m.in.: w kwasach fenolowych, kumarynach, flawonoidach, chinonach, saponinach, antocyjanach, garbnikach, jednak związki te, ze względu na strukturę podstawowego szkieletu zaliczane są do odrębnych grup chemicznych [Jeszka i in. 2010]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zawartość sumy polifenoli w kwiatach wynosi 1,35% dla ekstraktu metanolowego oraz 1,36% dla wodnego.

Do analizy właściwości przeciwutleniających zastosowano metodę z rodnikiem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl), powszechnie przyjętą do pomiarów zdolności antyoksydacyjnych związków fenolowych wyciągów z surowców roślinnych. Polega na badaniu in vitro zdolności antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników, według mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET (ang. *Single elektron transfer*). Mieszaninę reakcyjną stanowią przeciwutleniacz i oksydant zmieniający barwę wskutek redukcji. Zmiana wartości absorbancji w funkcji stężenia przeciwutleniacza jest zależnością liniową, a nachylenie prostej przedstawia zdolność redukcji przeciwutleniacza. DPPH jest wolnym rodnikiem o dużej trwałości, jego metanolowy roztwór o purpurowej barwie wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali 515 nm. W czasie reakcji redukcji barwa roztworu zmienia się na żółtą, co można monitorować spektrofotometrycznie [Cybul i Nowak 2008]. Wykazano, że ekstrakt wodny z kwiatów *N. sativa* charakteryzuje się dwukrotnie wyższą aktywnością przeciwutleniającą, aniżeli ekstrakt metanolowy.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że nie tylko olej z czarnuszki charakteryzuje się atrakcyjnymi właściwościami bioaktywnymi. Wykazano, że kwiaty *Nigella sativa* charakteryzują się wysoką zawartością zarówno flawonoidów, jak i polifenoli, co przekłada się na wysoką aktywność przeciwutleniającą. Możliwe jest zatem zastosowanie kwiatów lub ekstraktów z nich otrzymanych w produkcji żywności prozdrowotnej o podwyższonych właściwościach antyoksydacyjnych.

PIŚMIENNICTWO

- Aljabre S.H.M., Randhawa M.A., Akhtar N., Alakloby O.M., Algurashi A.M., Aldossary A. 2005. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J. Ethnopharmacol.* 101: 116–119.
- Bayliak M.M., Burdyliuk N.I., Lushchak V.I. 2016. Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open Life Sci.* 11(1): 298–307.
- Cybul M., Nowak R. 2008. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica* 54: 68–77.
- Fang Z., Zhang M., Sun Y., Sun J. 2006. How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics. *J. Agric. Food Chem.* 54: 99–106.
- Farmakopea Polska, wyd. XI. 2017. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Warszawa.
- Gawlik-Dziki U., Świeca M., Sułkowski M., Dziki D., Baraniak B., Czyż J. 2013. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. *Food Chem. Toxicol.* 57: 154–160.

- Jeszka M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Dziedzic K. 2010. Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przyr. Technol.* 4(2), #19.
- Karoui-Kharrat D., Kaddour H., Hamdi Y., Mokni M., Amri M., Mezghani S. 2017. Response of antioxidant enzymes to cadmium-induced cytotoxicity in rat cerebellar granule neurons. *Open Life Sci.* 12(1): 113–119.
- Marsik P., Kokoska L., Landa P., Nepovim A., Soudek P., Vanek T. 2005. In vitro inhibitory effects of thymol and guinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1 and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* 71: 739–742.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., dos Santos T.C., Coube C.S., Leitão S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15(2): 127–130.
- Ramadan M.F., Kroh L.W., Mörsel J.T. (2003). Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J. Agric. Food Chem.* 51(24): 6961–6969.
- Rumińska A., Ożarowski A. 1990. Leksykon roślin leczniczych, PWRiL, Warszawa.
- Salem M.L. 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacology* 5(13–14): 1749–1770.
- Wagner H., Bladt S. 1996. Plant drug analysis. Springer-Verlag, Berlin, pp. 195–244.
- Wichtl M. 2004. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. MedPharm Scientific Publisher, Stuttgart.
- Witkowska-Banaszczak E., Radzikowska D., Ratajczak K. 2018. Chemical profile and antioxidant activity of *Trollius europaeus* under the influence of feeding aphids. *Open Life Sci.* 13: 312–318.

D. RADZIKOWSKA, P.Ł. KOWALCZEWSKI, E. WITKOWSKA-BANASZCZAK

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *NIGELLA SATIVA* L. FLOWERS

Summary

The use of seeds from *Nigella sativa* L. as a pharmaceutical raw material has been known for years. So far, however, there are only a few reports on the bioactive properties of flowers and herb. In this work, extracts (aqueous and methanol) from *Nigella sativa* flowers were tested to determine the content of polyphenols and flavonoids, as well as antioxidant potential. It was found that the content of flavonoids in flowers calculated as a hypericide is 0.75%. The sum of polyphenols determined with the Folin-Ciocalteu reagent method was 1.35%, calculated as caffeic acid. The antioxidant capacity of the flower extracts was analyzed by the DPPH radical method and the *N. sativa* aqueous flower extract was shown to have twice the antioxidant activity of the methanol extract.

Keywords: black cumin; flavonoids; polyphenols; DPPH

Zaakceptowano do druku – *Accepted for print:* 18.09.2019

Do cytowania – *For citation*

Radzikowska D., Kowalczewski P.Ł., Witkowska-Banaszczak E. 2019. Właściwości przeciwutleniające kwiatów *Nigella sativa* L. *Fragm. Agron.* 36(3): 52–58.