

مقایسه میزان اسانس و تیمو کینون تخلیص شده در ارقام مختلف *Nigella sativa* L. کشت شده در مناطق مختلف ایران و بررسی خواص ضدباکتریایی آن‌ها

اشکان حاجی نورمحمدی^۱، جمیل زرگان^{۱*}، میر مرتضی سادات ابراهیمی^۱

^۱مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام، تهران، ایران. ایمیل: jazrgan@ihu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴

چکیده

مقدمه: سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی دارویی است که در اقلیم‌های مختلف ایران کشت می‌شود. اهمیت سیاهدانه به دلیل وجود ترکیبات متنوع زیست‌فعال موجود در بذر آن است که استفاده آن به‌طور ویژه‌ای در طب سنتی اسلامی توصیه شده است. یکی از مهم‌ترین اجزا ضدباکتری سیاهدانه ترکیب تیمو کینون موجود در اسانس آن است.

اهداف: هدف از این مطالعه مقایسه میزان اسانس و تیمو کینون مستخرج از بذر ارقام متداول *N. sativa* L. کشت شده در زیست‌بوم‌های (bioecology) مختلف ایران و سنجش اثر ضدباکتریایی ارقام منتخب است.

مواد و روش‌ها: استخراج اسانس از بذر سیاهدانه طی دو مرحله انجام شد. ابتدا از روش سوکسله و با استفاده از حلال پترولیوم اتر، عصاره روغنی سیاهدانه گرفته و در ادامه با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری انجام شد. جداسازی و خالص‌سازی ترکیب تیمو کینون از اسانس با دستگاه کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) انجام گرفت. در ادامه برای سنجش اثر ضدباکتریایی نمونه و مقایسه آن‌ها، آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) انجام گرفت.

نتایج: ارقام ایرانی سمیرم (اصفهان) و تایباد (خراسان رضوی) بالاترین میزان اسانس را نشان دادند. نتایج حاصل از تجزیه کیفی داده‌های سنجش میزان تیمو کینون جداسازی شده از اسانس این دو نمونه توسط دستگاه HPLC نشان داد که اسانس ارقام سمیرم و تایباد به ترتیب دارای ۹۷/۹ و ۹۶/۹ درصد تیمو کینون بودند. میزان MIC اسانس استخراج شده در حدود غلظت ۳ درصد (درصد وزنی/وزنی) و MBC در غلظت ۶ درصد (درصد وزنی/وزنی) بر باکتری *Staphylococcus aureus* بود.

نتیجه‌گیری: ارقام منتخب سمیرم و تایباد دارای بیشترین میزان تیمو کینون هستند که لازم است در ساخت فرآورده‌های دارویی مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: سیاهدانه، تیمو کینون، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، ضدباکتریایی

۱. مقدمه

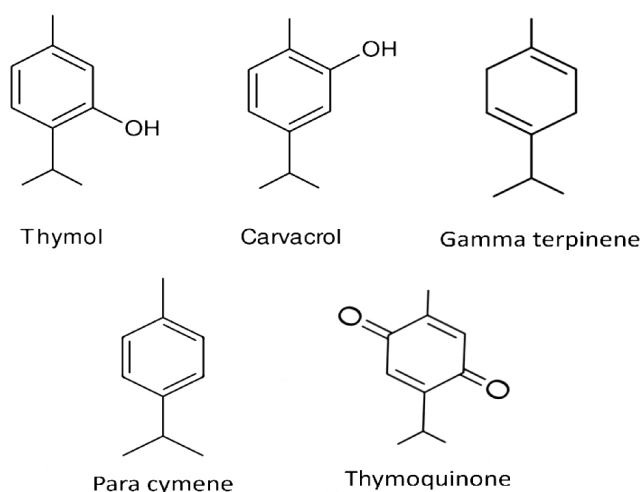
بسیاری از مراکز تحقیقاتی قرار گرفته است (۱، ۲). سیاهدانه (*N. sativa* L.) گیاهی یک‌ساله و علفی است که بومی نواحی مدیترانه، هند و خاورمیانه است (۳، ۴). بذرهای این گیاه از نظر دارا بودن ترکیبات مؤثره، اثرات دارویی و درمانی آن بسیار مورد توجه است. بذر سیاهدانه حاوی ۳۶ - ۳۰ درصد روغن ثابت، ۱/۲ - ۰/۵ درصد اسانس و همچنین پروتئین‌ها، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها، رزین، موسیلاژ، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و همچنین پتاسیم، فسفر، آهن، روی، کلسیم، منگنز و مس است (۵). اسانس آن نیز حاوی ترکیباتی است که بیشترین آن مونوترپن‌ها هستند (۶). از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به تیمو کینون، بتاپینن، آلفا لونگی‌فولن، کامفن، ترپینولن، ترپینن، میرسن،

بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در دنیا هستند. یکی از مشکلات جدی جامعه پزشکی در درمان بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی، مقاومت شدن بسیاری از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج است. این باکتری‌ها در حال تبدیل شدن به یک مشکل بالینی جدی در سراسر جهان هستند. بنابر یافته‌ها و شواهد موجود برای درمان افراد مبتلا به عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، معرفی انواع جدیدی از داروهای ضد میکروبی باید در دستور کار مراکز تحقیقاتی قرار گیرد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که شناسایی مولکول‌های مؤثر در درمان بیماری‌ها، از منابع مختلف زیستی مانند گیاهان و جانوران سمی مورد توجه

است و روغن اسانس آن نیز دارای خاصیت بازدارندگی رشد تومور است که می‌تواند در درمان بیماری‌های سرطانی مؤثر باشد (۱۲، ۱۳).

تیموکینون ترکیبی مونوترپنئیدی و از گروه کینون‌ها است و ساختار آن شامل یک حلقه بنزنی متصل به گروه کینون (Quinone) و یک زنجیره جانبی ایزوپروپیل است (تصویر ۱) که شاید به عنوان برجسته‌ترین ماده موجود در روغن اسانس سیاهدانه شناخته می‌شود (۹). تیموکینون یکی از اجزای حاصل از متابولیت‌های ثانویه گیاه است که به عنوان سیستم دفاعی گیاه ساخته می‌شود (۱۴).

آلفا-توجون اشاره نمود (۷، ۸). سیاهدانه سابقه‌ای طولانی در مصارف دارویی، درمانی و تغذیه‌ای دارد. در طب سنتی از سیاهدانه برای درمان انواع بیماری‌های مرتبط با سیستم تنفسی مانند آسم، برونشیت و درمان عفونت‌های انگلی در سیستم گوارش و همچنین افزایش عملکرد کلیه‌ها و یا برای افزایش تولید شیر در مادران و کاهش تب استفاده می‌شود (۹). از دیگر تأثیرات درمانی آن می‌توان کمک به کنترل قند خون، دفع سنگ کلیه، کمک به درمان بیماری‌های کلیوی، قلبی و عروقی، دیابت، آسم، میگرن، احتقان سینه، رماتیسم، فشارخون بالا و مشکلات گوارشی اشاره نمود (۱۰، ۱۱). همچنین سیاهدانه دارای خاصیت ضدتب، ضدتشنج و ضد درد



تصویر ۱. ساختار شیمیایی ترکیبات مؤثر در مسیر بیوسنتز تیموکینون

۲. اهداف

هدف از این تحقیق بررسی میزان روغن اسانس و تیموکینون موجود در این ارقام کشت‌شده در مناطق مختلف ایران است. علاوه بر این با علم به اینکه میزان تیموکینون در شهرهای کم‌آب و در حال تنش‌های محیطی بیشتر است، لذا نمونه‌ها از شهرهای خشک و نیمه‌خشک انتخاب و نمونه‌ای نیز از شهرهای پرآب کشور انتخاب شد.

۳. مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام با کد IR.IHU.REC.1399.1805 از باکتری‌های *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 جهت رشد آن‌ها از محیط‌های کشت مایع مولر هینتون برات (MHB, Quelab, Canada) استفاده گردید. رقم‌های مختلف سیاهدانه از جمله تایباد استان خراسان رضوی (واریته بذر ایرانی)، کردکوی استان گلستان

تحقیقات زیادی بر روی کینون‌ها و مشتقات آن در سیاهدانه صورت گرفته است که بسیاری از اثرات درمانی سیاهدانه به وجود این ترکیب و مشتقات کینون موجود در آن نسبت داده می‌شود. میزان تیموکینون موجود در سیاهدانه به عواملی نظیر کیفیت کشت، اقلیم جغرافیایی، ژنتیک گیاهی و روش استخراج بستگی دارد (۹-۱۱).

با توجه به اهمیت بسیار بالای این گیاه در مصارف دارویی و درمانی مختلف و همچنین تحت تأثیر قرار گرفتن مواد مؤثره دارویی در شرایط اکولوژیک و فیزیولوژیک و متغیر بودن عوامل محیطی، انجام آزمایش‌های زراعی مختلف برای دستیابی به عملکردهای کمی و کیفی بالاتر مانند شناسایی بیشترین درصد ماده مؤثره در هر گونه، ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که کشور ایران دارای تنوع اقلیمی مناسبی برای کشت این گیاه بوده است، بنابراین انجام این آزمایش‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در بررسی‌های اولیه مشخص شد که ارقام ایرانی و هندی گونه‌های متداول کشت در شهرهای مختلف هستند (۱۵).

بالن روتاری، محلول حاصل به درون بالن انتقال داده شد و توسط دستگاه روتاری تبخیر حلال تحت خلاصورت گرفت. در نهایت مجدداً با توزین دقیق بالن حاوی روغن و با تفاضل از وزن خالی آن، وزن خالص روغن ثبت گردید که با ایجاد تناسب بین وزن روغن به دست آمده و مقدار وزن خشک بذر درصد روغن محاسبه گردید. برای تمامی توده‌ها و تکرارهای آن‌ها مقدار ۱۰ گرم روغن حاصل از فرآیند سوکسله را توزین نموده و اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر در دمای اتاق به مدت سه ساعت صورت پذیرفت. اسانس‌ها پس از جمع‌آوری، توسط سولفات سدیم آبگیری گردید (۱۶).

۳.۳. آماده‌سازی نمونه جهت آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

برای آماده‌سازی، ۵ میکرولیتر از نمونه اسانس را وزن کرده (۲۱ میلی گرم) و در حلال آن هگزان به حجم یک میلی لیتر رسانده شد (غلظت تقریبی ۲۱۰۰۰ ppm) و ۰/۵ میلی گرم از نمونه استاندارد تیموکینون در اتانول حل و به حجم یک میلی لیتر رسانده شد (غلظت تقریبی ۵۰۰ ppm).

۴.۳. خالص‌سازی اجزای مؤثره دارای خواص دارویی (تیموکینون) توسط HPLC

برای جداسازی جز تیموکینون از دیگر مواد تشکیل دهنده از (Knauer, Germany) HPLC مجهز به پمپ‌های باینری و آشکارساز آرایه دیود و ستون C18 (Eurospher, 250×4.6 mm, 5 μ m, 100 Å) بر مبنای جداسازی قطبی/غیرقطبی استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد تری‌فلوئوروآستیک اسید (TFA) به عنوان حلال B و آب حاوی ۰/۱٪ TFA به عنوان حلال A بود. برنامه گرادیان با ۵ درصد حلال A اولیه شروع شد و به ۵۰ درصد برای ۲۰ دقیقه افزایش یافت، به مدت ۲۰ دقیقه ۵۰ درصد نگهداری شد و سپس در ۲ دقیقه بعدی با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه به شرایط اولیه تغییر کرد. طول موج مورد استفاده برای تشخیص آنالیزهای HPLC روی ۲۵۴ نانومتر تنظیم شد. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود (۱۷).

۵.۳. شناسایی (تجزیه کیفی) تیموکینون در ماتریس نمونه با CLPH

برای شناسایی کیفی شکل پیک مربوطه، ابتدا احتیاج به یک جداسازی مناسب ناخالصی‌ها از نمونه اصلی داریم که برای این کار از ستون C18 استفاده شد. جهت دستیابی

(واریتیه بذر هندی)، الشتر استان لرستان (واریتیه‌های بذر ایرانی و هندی) و سمیرم استان اصفهان (واریتیه بذر ایرانی) توسط شرکت طلایه‌داران نوین کشت آوان تهیه شدند. حلال‌های پترولیوم اتر (Petroleum ether, C.N. 8032)، استونیتریل (Acetonitrile, C.N. 75-05-8)، ان هگزان (n-Hexane, C.N. 110-54-3, HPLC grade) و اتانول (Ethanol, C.N. 67-17-5, HPLC grade) از Merck، تیموکینون (۹۸ درصد) از Sigma-Aldrich، آب مقطر مورد استفاده نیز توسط سیستم Millipore Milli-Q (Schwalbach, Germany) تهیه شدند. باکتری گرم منفی *E. coli* و باکتری گرم مثبت بیماری‌زا *S. aureus* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد.

۱.۳. تجهیزات

دستگاه سوکسله ۲۵۰ (استخراج‌کننده ۲۵۰ سی‌سی به همراه بالن ۵۰۰ سی‌سی) پیرکس ساخت شرکت گلدیس ایران، شوف بالون (هیتر منتیل) ۱۰۰۰ تک‌خانه مدل EM0500/CE (England, Electrothermal)، دستگاه کلونجر ساخت شرکت آزما تجهیز (کرج، ایران)، سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت Knauer (Berlin, Germany)، مجهز به دو پمپ مدل (Wellchrom-K1001) و آشکارساز PDA مدل (K2800) برای جداسازی و اندازه‌گیری به کار گرفته شد. ستون مورد استفاده نیز ساخت شرکت Eurospher و از نوع C18 (RP) با قطر داخلی ۴/۹ میلی متر و طول ۲۵۰ میلی متر بود. همچنین برای انتگرال‌گیری و محاسبه سطح زیر منحنی پیک دستگاه HPLC از نرم‌افزار EZChrome Elite (نسخه ۳،۲،۰) نصب‌شده روی سیستم عامل ویندوز استفاده شد.

۲.۳. اسانس‌گیری دومرحله‌ای از بذر سیاهدانه

استخراج روغن بذرهای سیاهدانه بر طبق روش حسینی و همکاران انجام گرفت بدین منظور از دستگاه سوکسله و حلال پترولیوم اتر به مقدار ۳۰۰ میلی لیتر استفاده شد مراحل کار به این صورت که ابتدا ۵۰ گرم بذر از هر نمونه با دستگاه آسیاب (Matheo, EG111S, Germany) پودر شده و مجدداً پس از توزین، (ME303, Mettler Toledo, Switzerland) دقت ۰/۰۰۱ ثانویه آن‌ها به دستگاه سوکسله انتقال داده شدند. پس از راه‌اندازی دستگاه و روشن شدن هیتر مدتی صبر کرده و پس از فرود اولین قطره از حلال توسط مبرد دستگاه روی نمونه‌های بذری، زمان شروع فرآیند ثبت و فرایند به مدت چهار ساعت ادامه یافت. در پایان فرآیند استخراج پس از سرد شدن محلول و توزین دقیق وزن خالی

۷.۳. تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

تیموکینون مستخرج از عصاره روغنی سیاهدانه

آزمایش‌های تعیین MIC (minimum inhibition concentration) و MBC (minimum bactericidal concentration) با استفاده از روش Kiralan و همکاران انجام گردید. در این روش از میکرو چاهک‌ها برای تعیین اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف تیموکینون و فرمولاسیون نهایی استفاده گردید. یک چاهک شاهد برای کنترل مثبت و یک چاهک شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت حاوی محیط کشت مولر هینتون برات و باکتری که ماده ضدباکتریایی به آن اضافه نشده است. همچنین شاهد منفی فقط حاوی محیط کشت بود. برای تعیین میزان دقیق MIC و MBC نمونه‌ها در مقابل هر باکتری، آزمایش‌های با رقت‌های مختلف ۵/۰، ۱، ۲، ۴، ۶ درصد تیموکینون انجام داده شد. سپس ۵ - ۲ میکرولیتر از محلول باکتری با غلظت نیم‌مک‌فارلند به همه چاهک‌ها (به جز کنترل منفی) اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۱۸ - ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شد. پس از طی زمان گرماگذاری، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. چاهکی با کمترین غلظت از آزمون که رشد باکتری در آن مشاهده شد، به عنوان MIC تعیین گردید. برای تعیین MBC تیموکینون و فرمولاسیون نهایی، از چاهک‌هایی که رشد در آن‌ها مشاهده نشده بود ۱۰ میکرولیتر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. بعد از گرماگذاری، پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت از آزمون در آن بود و رشد باکتری برابر یا کمتر از ۱۱ کلنی در آن مشاهده شد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی این مراحل زیر هود استریل انجام گردید (۲۰).

۸.۳. سنجش انتشار دیسک

مراحل آزمایش طبق روش Reller و همکاران طی مراحل زیر انجام گرفت. در پلیت‌های شیشه‌ای و استریل به قطر ۱۰ سانتی‌متر، محیط کشت مولر هینتون آگار به ضخامت ۴ میلی‌متر ریخته شد. پس از جامد شدن محیط کشت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم‌مک‌فارلند روی سطح پلیت ریخته و باکتری‌ها به روش کشت چمنی با لوپ شیشه‌ای سرکج استریل، کشت گردید. بعد از ۵ الی ۱۰ دقیقه که سوسپانسیون باکتری توسط محیط کشت جذب شد و با استفاده از پنس استریل، دیسک‌های بلانک بر اساس شکل روی سطح محیط کشت گذاشته شدند. بلافاصله ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده از بذر

به بهترین جداسازی از شویش گرادینانی استفاده شد. ناحیه شناسایی تیموکینون در ناحیه UV (نانومتر $\lambda_{max} = 254$) است. با انطباق زمان بازداری پیک اصلی در محلول خام و محلول نمونه تیموکینون استاندارد (با متد شویش مشابه) شناسایی گردید (۱۷).

۶.۳. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها و فرکشن‌های آن با استفاده از سنجش حداقل غلظت مهار

جهت تعیین میزان مهار رشد باکتری از آزمون غلظت مهار در چندین غلظت برای عصاره‌های بذر سیاهدانه و فراورده‌های مستخرج از آن‌ها روی دو گونه باکتری *S. aureus* (گرم مثبت) و *E. coli* (گرم منفی) استفاده شد.

جهت کشت باکتری از محیط کشت مایع مولر هینتون برات (MHB) شرکت Quelab کانادا و جهت مقایسه اثر عصاره با آنتی‌بیوتیک استاندارد از تتراسایکلین در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. پس از کشت شبانه باکتری در محیط مولر هینتون برات و تهیه ساب کالچر از کشت شبانه، میزان ۵ میکرولیتر از محیط کشت جدید باکتری با غلظت نیم‌مک‌فارلند در هر چاهک از پلیت استریل ۹۶ خانه کشت شد (۱۸). ضمن رساندن حجم نهایی هر چاهک با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هینتون برات) به ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سریال رقت، باکتری در تماس با غلظت‌های مختلف از عصاره خام قرار گرفت. میزان رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در شرایط *in-vitro* و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. طی فرآیند بررسی از هیچ ماده‌ای به عنوان ماده نشانگر اضافی استفاده نشد و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه پلیت ریدر (BioTek, USA, Elx800) اندازه‌گیری شد.

این آزمایش سه بار تکرار و در هر بار برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد. طی این فرایند، از تتراسایکلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت، محیط کشت حاوی باکتری به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان بلانک استفاده شد (۱۹).

درصد مهار باکتری‌ها بعد از تماس با غلظت‌های مختلف اسانس با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$\text{مهار (درصد)} = \left(1 - \frac{\text{OD بلانک} - \text{OD نمونه}}{\text{OD بلانک} - \text{OD منفی کنترل}} \right) \times 100$$

۱.۴. استخراج اسانس از سیاهدانه

میزان استخراج روغن خام، روغن ثابت و اسانس مطابق **جدول ۱**، **۲** و **۳** محاسبه شد. برای محاسبه درصد روغن و اسانس از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$100 \times (\text{وزن بذر اولیه} / \text{وزن روغن استخراجی}) = \text{درصد روغن}$$

موجود در بذر سیاهدانه

$$100 \times (\text{وزن روغن اولیه} / \text{وزن اسانس استخراجی}) = \text{درصد}$$

اسانس موجود در روغن سیاهدانه

سیاهدانه روی دیسک‌ها ریخته شد. دیسک آن‌تی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت تعیین شده و روی محیط کشت گذاشته شد. سپس بعد از ۱۰ دقیقه که محلول‌ها جذب محیط شدند، پلیت‌ها را با پارافیلیم مسدود کرده در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از آن نتایج بررسی گردید (۲۱).

۴. نتایج

جدول ۱. درصد روغن استحصال شده از ارقام سیاهدانه در مرحله اول فرایند

ارقام	ناحیه کشت (شهر/استان)	روغن خام استخراج شده
		وزن (گرم) / درصد وزنی / وزنی
ایرانی	تایباد/خراسان رضوی	۱۷/۹۳ / ۳۵/۸۶
	الشتر/لرستان	۱۵/۰۴ / ۳۰/۰۸
	سمیرم/اصفهان	۱۵/۲۹ / ۳۰/۵۸
هندی	کردکوی/گلستان	۱۸/۶۹ / ۹/۳۴
	الشتر/لرستان	۲۸/۴۶ / ۱۴/۲۳

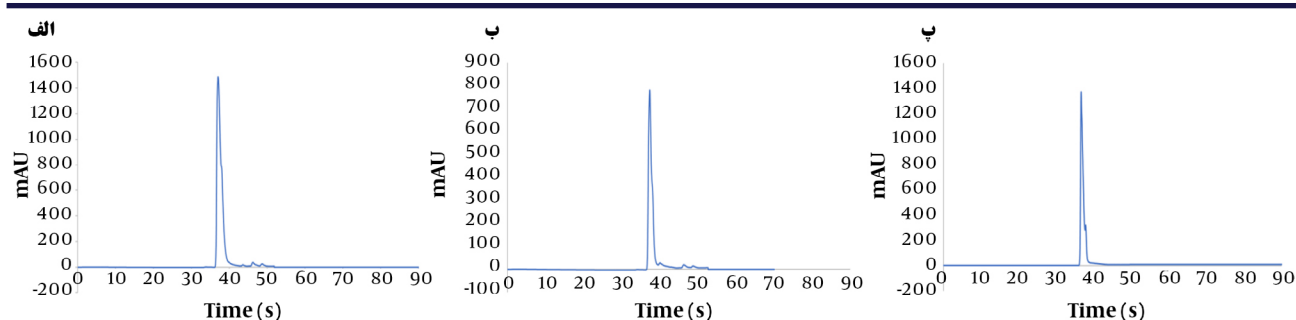
جدول ۲. درصد روغن ثابت و اسانس استحصال شده از روغن سیاهدانه در مرحله دوم فرایند

ارقام	ناحیه کشت (شهر/استان)	روغن ثابت درصد وزنی / وزنی	اسانس استخراج شده درصد وزنی / وزنی
ایرانی	تایباد/خراسان رضوی	۹۲/۲۸	۰/۷۲
	الشتر/لرستان	۹۱/۳۲	۰/۶۸
	سمیرم/اصفهان	۹۰/۲	۱/۱۷
هندی	کردکوی/گلستان	۸۹/۵۲	۰/۴۸
	الشتر/لرستان	۹۰	۰/۶۱

۲.۴. خالص سازی اجزای مؤثره دارای خواص دارویی توسط HPLC

نتایج حاصل از میزان تیموکینون موجود در نمونه‌های بذر

سیاهدانه ایرانی کشت شده در سمیرم و تایباد در **تصویر ۲** نشان داده شده است. به طوری که نمونه سمیرم حاوی ۹۷/۹ درصد و نمونه تایباد حاوی ۹۶/۹ درصد تیموکینون است.



تصویر ۲. کروماتوگرام مربوط به جداسازی تیموکینون (الف)؛ ماتریس رقم سمیرم (حاوی ۹۷/۹ درصد تیموکینون (ب)؛ رقم تایباد (حاوی ۹۶/۹ تیموکینون و نمونه مرجع تیموکینون (پ))

۳.۴. نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی روغن‌های مستخرج از بذر سیاهدانه با استفاده از آزمون انتشار دیسک

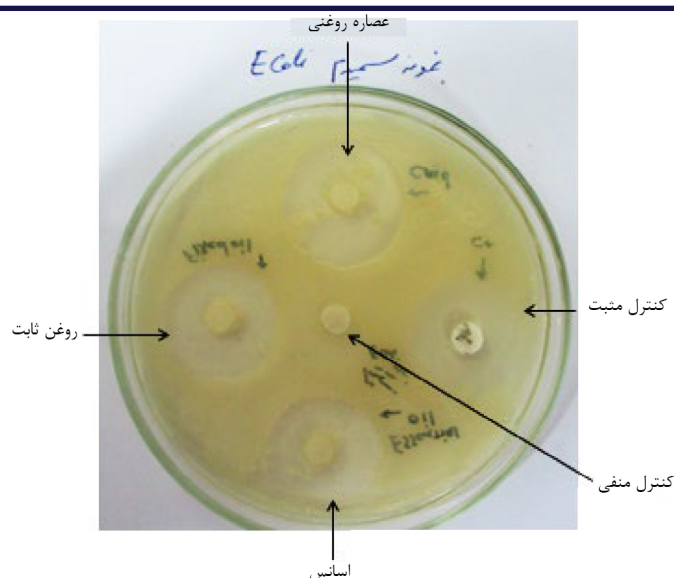
نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی روغن‌های مستخرج از بذرهای ارقام مختلف سیاهدانه با سنجش انتشار دیسک نشان داد که همه آن‌ها اثر مهاری بر باکتری‌های مورد مطالعه دارند (جدول ۳ و ۴)، (تصویر ۳).

جدول ۳. میزان مهار (میلی‌متر) از روغن خام، ثابت و اسانس (۲ درصد) نمونه‌های مختلف بذر سیاهدانه بر باکتری *Staphylococcus aureus*

هاله عدم رشد (mm)				ناحیه کشت - ارقام
روغن اسانس	روغن ثابت	روغن خام	آنتی‌بیوتیک	
۲۳	۲۲	۲۰	۲۴	تایباد-ایرانی
۲۵	۲۲	۲۴	۲۵	الشتر-ایرانی
۲۳	۱۵	۲۰	۲۴	سمیرم-ایرانی
۲۴	۱۸	۲۳	۲۵	کردکوی-هندی
۲۵	۲۲	۲۳	۲۵	الشتر-هندی
	۲۴		۱۵	تیموکیون

جدول ۴. میزان مهار (میلی‌متر) روغن خام، ثابت و اسانس (۲ درصد) نمونه‌های مختلف بذر سیاهدانه بر باکتری *Escherichia coli*

هاله عدم رشد (mm)				ناحیه کشت - ارقام
روغن اسانس	روغن ثابت	روغن خام	آنتی‌بیوتیک	
۲۲	۰	۱۵	۲۵	تایباد-ایرانی
۲۵	۰	۲۳	۲۷	الشتر-ایرانی
۲۵	۲۳	۲۵	۲۵	سمیرم-ایرانی
۲۴	۱۴	۲۴	۲۹	کردکوی-هندی
۲۵	۲۰	۲۵	۲۵	الشتر-هندی
	۲۶		۲۶	تیموکیون



تصویر ۳. آزمون انتشار دیسک برای عصاره‌های مستخرج از بذر سیاهدانه (واربته ایرانی سمیرم-باکتری *Escherichia coli*)

۴.۴. نتایج آزمایش‌های مهار بر رشد باکتری (MIC)

۱.۴.۴. میزان مهار رشد باکتری عصاره‌های خام، ثابت در غلظت‌های متفاوت

نتایج مهار باکتریایی ارقام مختلف عصاره‌های بذر سیاهدانه در **جداول ۵** و **۶** نشان داده شده‌اند.

جدول ۵. اثر مهاری روغن ثابت مستخرج از بذر سیاهدانه کشت‌شده در نواحی مختلف بر باکتری *Staphylococcus aureus* الف

ناحیه کشت	روغن ثابت در محیط کشت باکتری (میانگین بازدارندگی)								کنترل منفی	کنترل مثبت
	۰/۹۱	۰/۹۳	۰/۸۷	۱/۶۵	۳۱/۳	۶/۵۲	۲۱/۵	۵۲		
تایباد/ایرانی	۰	۱/۳	۲/۶	۳/۳	۴/۰	۴/۹	۵/۷	۶/۵	۰	۱۰۰
الشتر/ایرانی	۰	۴/۳	۵/۳	۸	۱۵/۳	۱۶/۱	۱۷/۳	۲۸	۰	۱۰۰
الشتر/هندی	۴	۴/۳	۴/۵	۵	۵/۶	۶	۹	۹/۳	۰	۱۰۰
سمیرم/ایرانی	۰	۰	۰	۱/۶	۲/۶	۷/۰	۸/۳	۲۴	۰	۱۰۰
کردکوی/هندی	۰	۰	۰/۶۶	۴/۳	۷/۳	۷/۶	۱۳/۳	۱۵	۰	۱۰۰

الف مقادیر به صورت تعداد (٪) نمایش داده شده‌اند.

جدول ۶. اثر مهاری روغن خام مستخرج از بذر سیاهدانه کشت‌شده در نواحی مختلف بر باکتری *Escherichia coli* الف

ناحیه کشت	روغن ثابت در محیط کشت باکتری (میانگین بازدارندگی)								کنترل منفی	کنترل مثبت
	۰/۹۱	۰/۹۳	۰/۸۷	۱/۶۵	۳۱/۳	۶/۵۲	۲۱/۵	۵۲		
تایباد/ایرانی	۰	۰/۳	۳	۳/۳	۳/۶	۴/۹	۵	۱۵	۰	۱۰۰
الشتر/ایرانی	۰	۰	۰	۰	۱/۶	۳	۶/۳	۷/۳	۰	۱۰۰
الشتر/هندی	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۳	۰/۶	۱	۰	۱۰۰
سمیرم/ایرانی	۰/۶	۱/۶	۲/۳	۵	۵/۳	۵/۳	۹	۲۱	۰	۱۰۰
کردکوی/هندی	۰	۰	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۵	۶/۷	۷/۳	۰	۱۰۰

الف مقادیر به صورت تعداد (٪) نمایش داده شده‌اند.

۲.۴.۴. میزان مهار رشد باکتری اسانس سیاهدانه در غلظت‌های متفاوت

نتایج مهار باکتریایی اسانس از ارقام مختلف در **جداول ۷** و **۸** نشان داده شده‌اند.

جدول ۷. اثر مهارکنندگی اسانس ارقام مختلف سیاهدانه و تیموکینون استاندارد بر باکتری *Staphylococcus aureus*

واربته سیاهدانه	غلظت اسانس در محیط کشت (μg/mL)			
	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰
سمیرم/ایرانی	۱۰۰	۹۸	۶۸	۴۶
تایباد/ایرانی	۱۰۰	۹۶	۶۵	۴۳
کردکوی/هندی	۹۱	۷۲	۵۰	۳۱
الشتر/ایرانی	۹۴	۸۵	۶۲	۳۸
الشتر/هندی	۱۰۰	۹۵	۶۴	۴۲
تیموکینون	۱۰۰	۱۰۰	۷۴	۴۷

جدول ۸. اثر مهارکنندگی اسانس ارقام مختلف سیاهدانه و تیموکینون استاندارد بر باکتری *Escherichia coli*

واریته سیاهدانه	غلظت اسانس در محیط کشت ($\mu\text{g/mL}$)			
	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
سمیرم/ایرانی	۰	۴	۲۰	۴۵
تایباد/ایرانی	۰	۳	۲۴	۴۲
کردکوی/هندی	۰	۰	۱۳	۲۱
الشتر/ایرانی	۰	۰	۱۸	۲۴
الشتر/هندی	۰	۰	۲۰	۲۸
تیموکینون	۰	۵	۲۵	۴۹

۵. بحث

با افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی ناشی از مصرف بی‌رویه آن‌ها، برای درمان بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها، استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است. گیاهان دارویی مزیت‌های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن و سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران را دارند. سیاهدانه سابقه‌ای طولانی در مصارف دارویی و درمانی دارد. در طب سنتی از سیاهدانه برای درمان انواع بیماری‌های مرتبط با سیستم تنفسی مانند آسم، برونشیت و درمان عفونت‌های انگلی در سیستم گوارش استفاده می‌شود (۹). همچنین سیاهدانه دارای خاصیت ضد تب و ضد درد بوده و اسانس آن نیز دارای خاصیت بازدارندگی رشد تومور (رده سلولی P815 و ICO1) است (۲۲). تیموکینون ترکیبی مونوترپنوئیدی در اسانس سیاهدانه است که شاید برجسته‌ترین ماده موجود در اسانس سیاهدانه شناخته می‌شود که بسیاری از اثرات درمانی سیاهدانه به وجود این ترکیب و مشتقات کینون موجود در آن نسبت داده می‌شود (۹). اثر ضدباکتریایی آن در حد قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین در باکتری‌های گرم مثبت است (۲۳). میزان تیموکینون موجود در سیاهدانه به عواملی نظیر کیفیت کشت، اقلیم جغرافیایی، ژنتیک گیاهی و روش استخراج بستگی دارد. از لحاظ کیفیت کشت به‌طور مثال نوع کود مؤثر به‌ویژه سطح نیتروژن و فسفر نقش مهمی در ترکیب شیمیایی اسانس دارد (۲۴، ۲۵). از لحاظ اقلیم جغرافیایی به‌عنوان نمونه در لهستان (شرق اروپا) عمده‌ترین اجزا اسانس عبارتند از ۶۰ درصد پاراسایمن و ۱۲ درصد گاما ترپینئول (۲۶). در ایران (غرب آسیا) عمده‌ترین اجزاء اسانس عبارتند از ۳۸/۵ درصد ترانس آنتول و ۱۵ درصد پاراسایمن و ۵/۵ درصد تیموکینون (۶). در تونس (شمال آفریقا) عمده‌ترین اجزا اسانس عبارتند از ۴۳/۵ درصد پاراسایمن و ۱۳/۷ درصد آلفا پینن و ۱/۶۵ درصد تیموکینون (۱۸). یکی دیگر از عوامل مؤثر در استخراج تیموکینون از سیاهدانه، مربوط به روش

عصاره‌گیری آن است. از روش‌های متداول برای عصاره‌گیری سیاهدانه می‌توان به استخراج حلالی (روش سوکسله)، تقطیر با آب و بخار آب، استخراج به کمک مایکروویو و استخراج با سیال فوق بحرانی اشاره نمود. در تحقیق Edris و همکاران سه روش استخراج تقطیر با بخار آب، تقطیر با آب و استخراج با سیال فوق بحرانی برای رقم ترکیه‌ای مقایسه شده است که روش استخراج با سیال فوق بحرانی توانسته بیشترین میزان تیموکینون را استخراج کند (۱۹). با توجه به تحقیق Ghahramanloo و همکاران برای دو رقم ایرانی و هندی، روش‌های استخراج حلالی (با دو حلال مختلف) و استخراج با سیال فوق بحرانی مقایسه شده است که نشان داده است روش استخراج حلالی برای هر دو رقم، میزان تیموکینون استخراجی بیشتری را نسبت به روش دیگر در پی داشته است (۱۵). همچنین در تحقیق حسینی و همکاران روش استخراج حلالی (متد سوکسله) برای رقم ایرانی کشت‌شده در دو حالت استخراج تک‌مرحله‌ای و دو مرحله‌ای مقایسه شده است. نتایج گزارش شده بدین گونه بود که در استخراج دو مرحله‌ای میزان تیموکینون استخراجی نسبت به استخراج تک‌مرحله‌ای سه برابر بیشتر بود (۱۶). در مطالعه حاضر تعداد دو رقم از بذره‌ای متداول سیاهدانه که در زیست‌بوم‌های مختلف ایران کشت می‌شوند شامل تایباد استان خراسان رضوی (رقم ایرانی)، کردکوی استان گلستان (رقم هندی)، الشتر استان لرستان (رقم ایرانی و هندی) و سمیرم استان اصفهان (رقم ایرانی) از نظر میزان روغن خام، روغن ثابت، اسانس و ترکیب باارزش تیموکینون موجود در اسانس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به میزان کل روغن استحصال‌شده از ارقام مورد مطالعه نشان داده شد که ارقام ایرانی درصد روغن خام بالاتری را نسبت به ارقام هندی دارند. بدین صورت که رقم ایرانی نمونه تایباد بیشترین میزان روغن خام و رقم هندی نمونه کردکوی کمترین میزان را دارد. رقم هندی نمونه کردکوی که در اقلیم معتدل و بارانی ایران کشت می‌شود نسبت به رقم هندی

و مشخص گردید که همه روغن‌ها دارای اثر مهاری بر رشد باکتری *E. coli* و *S. aureus* هستند.

میزان مهار رشد باکتری با اثر عصاره‌های خام، ثابت و اسانس سیاهدانه با سنجش MIC در غلظت‌های متفاوت نشان داد که میزان مهار باکتریایی در باکتری گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است. با توجه به نتایج مهار باکتریایی عصاره‌ها، حجم و مقدار تیمو کینون موجود در آن، آزمون‌های MIC و MBC روی اسانس ارقام سمیرم و تایباد انجام گرفت. تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس مستخرج از بذرهای تایباد و سمیرم سیاهدانه و نمونه تیمو کینون در باکتری‌های مورد نظر انجام شد. در هر سه نمونه، MIC در حدود غلظت ۳ درصد و MBC در غلظت ۶ درصد روی باکتری *S. aureus* بود. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان اثر اسانس بر باکتری *S. aureus* بیشتر از باکتری *E. coli* نشان داده شد که این نتیجه با منابع دیگر همخوانی دارد (۲۷، ۲۸).

۱.۵. محدودیت‌های پژوهش

از جمله محدودیت‌های مطالعه این موارد بودند که از آنجایی که عملکرد اسانس تابعی از درصد اسانس و عملکرد گیاه است لذا عوامل متعددی از جمله کاهش رطوبت خاک به دلیل تنش‌های آبی سال‌های اخیر تاثیر مستقیم بر رویش و عملکرد گیاه دارد. همانطور که در تحقیق نوروزپور و رضوانی نشان داده شده است با افزایش فواصل آبیاری، درصد اسانس و عملکرد دانه سیاهدانه کاهش داشته است (۲۹).

۲.۵. نتیجه‌گیری

با مقایسه میزان روغن استخراج شده از ارقام ایرانی و هندی در این مطالعه، این طور می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بذر سیاهدانه ارقام ایرانی کشت شده در شهرهای سمیرم، تایباد و الشتر ایران میزان درصد روغن بالاتری نسبت به بذر سیاهدانه ارقام هندی کشت شده در الشتر و کردکوی ایران دارند. همچنین بذرهای ارقام ایرانی مذکور درصد اسانس بالاتری را نسبت به بذرهای سیاهدانه ارقام هندی این مطالعه نشان دادند. رقم هندی نمونه کردکوی که در منطقه معتدل و بارانی قرار دارد نسبت به رقم هندی نمونه الشتر که در منطقه نیمه‌خشک قرار دارد، مطابق انتظار درصد پائینی از روغن را نشان داد و همین‌طور نسبت به سایر نمونه‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک. رقم هندی نمونه کردکوی همچنین نسبت به رقم هندی نمونه الشتر که در منطقه نیمه‌خشک قرار دارد، مطابق انتظار درصد پائینی از اسانس را داراست. بالاترین میزان تیمو کینون در وارپته ایرانی کشت شده در سمیرم اصفهان مشاهده شد. با توجه به نتایج ضدباکتریایی ترکیبات مستخرج از روغن سیاهدانه مانند تیمو کینون به نظر می‌رسد که این ترکیبات

نمونه الشتر که در اقلیم نیمه‌خشک قرار دارد، مطابق انتظار درصد کمتری از روغن را داراست و همچنین نسبت به سایر نمونه‌های مربوط به مناطق خشک و نیمه‌خشک. در میان ارقام مورد استفاده در این مطالعه رقم ایرانی از نظر میزان روغن ارجح بر رقم هندی بود، همچنین با توجه به میزان کل اسانس استخراج شده از ارقام ایرانی و هندی مشاهده شد که ارقام ایرانی به‌طور کلی درصد اسانس بالاتری نسبت به ارقام هندی دارند. در این میان رقم ایرانی نمونه سمیرم بالاترین میزان اسانس و رقم هندی نمونه کردکوی پایین‌ترین میزان اسانس را داراست. با مقایسه ارقام ایرانی و هندی مورد تحقیق در این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رقم هندی نمونه کردکوی که در منطقه خوش آب‌وهوا و بارانی قرار دارد نسبت به رقم هندی نمونه الشتر که در منطقه نیمه‌خشک قرار دارد، مطابق انتظار درصد پائینی از اسانس را داراست. زیرا این گیاه چندان در معرض تنش‌های محیطی از جمله کمبود نور، کمبود آب، شوری و موارد مشابه قرار نداشت، لذا سیستم دفاعی گیاه برای اینکه بتواند پاسخ ایمنی مناسبی را برای این تنش‌ها از خود ایجاد کند چندان تحریک نشده است؛ بنابراین شدت متابولیت‌های ثانویه در گیاه پایین است.

به‌طور جمع‌بندی شده در یک واحد بذر ۵۰ گرمی، میزان کل اسانس رقم ایرانی نمونه تایباد ۰/۳۶ گرم (۰/۱۸ درصد از کل بذر)، رقم هندی نمونه کردکوی ۰/۲۴ گرم (۰/۱۲ درصد از کل بذر)، رقم ایرانی نمونه الشتر ۰/۳۴ گرم (۰/۱۷ درصد از کل بذر)، رقم هندی نمونه الشتر ۰/۳۰۵ گرم (۰/۱۵ درصد از کل بذر) و رقم ایرانی نمونه سمیرم ۰/۵۸ گرم (۰/۲۹ درصد از کل بذر) مشاهده شد که از این بین رقم ایرانی نمونه سمیرم بالاترین میزان کل اسانس و رقم هندی نمونه کردکوی پایین‌ترین میزان کل اسانس را داشت.

با توجه به نتایج حاصل از استخراج اسانس و آنالیز کیفی اسانس، اقلیم‌هایی که میزان تیمو کینون استخراجی بالایی داشتند (تایباد و سمیرم) برای مرحله خالص‌سازی انتخاب شدند. رقم‌های ایرانی تایباد و سمیرم دارای میزان اسانس بیشتری نسبت به بقیه رقم‌ها بودند، پس این بذر برای جداسازی و خالص‌سازی توسط دستگاه کروماتوگرافی با عملکرد بالا در نظر گرفته شدند. پس از انطباق با کروماتوگرام استاندارد تیمو کینون مشخص گردید که رقم‌های سمیرم و تایباد به ترتیب دارای ۹۷/۹ درصد و ۹۶/۹ درصد تیمو کینون در ماتریس اسانس خود بودند.

نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی روغن‌های مستخرج از بذر سیاهدانه با استفاده از آزمون انتشار دیسک نشان داد غلظت ۲ درصد روغن‌های خام، ثابت و اسانس بذرهای مختلف سیاهدانه بر باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* با استفاده از روش‌های انتشار در دیسک در شرایط *in-vitro* مورد بررسی قرار گرفت

References

- Alipour Y. [Antibacterial effects of crude venom and their protein fractions of *Hottentotta saulcyi* scorpion]. *Koomesh*. 2022;**24**(3):376-87. Persian.
- Zargan J, Mirzaei nodushan M, Sobati H, Goodarzi H, Haji Noor Mohammadi A, Ebrahimi F. [Anti-cancer and anti-bacterial effects of crude venom of *Pseudocerastes persicus* snake]. *Koomesh*. 2020;**22**(3):518-28. Persian. <https://doi.org/10.29252/koomesh.22.3.518>.
- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as anti-bacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem*. 2015;**173**:339-47. [PubMed ID:25466031]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.042>.
- World Health Organization. World health statistics 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241563987>.
- Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Insects, arachnids and centipedes venom: A powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon*. 2017;**130**:91-103. [PubMed ID:28242227]. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.020>.
- Sefidkon F. [Extraction and identification of active ingredients of Iranian medicinal and aromatic plants]. *Iran Nature*. 2021;**6**(3):7-35. Persian. <https://doi.org/10.22092/irn.2021.124450>.
- Golparvar AR, Hadipanah A, Salehi S. Investigation of seed yield and oil quality of black cumin (*Nigella sativa* L.) ecotypes cultivated in Isfahan province. *Electronic J Biol*. 2014;**10**(1):7-13.
- Sharma NK, Ahirwar D, Jhade D, Gupta S. Medicinal and pharmacological potential of *nigella sativa*: a review. *Ethnobotanical leaflets*. 2009;**2009**(7):11.
- Darakhshan S, Tahvilian R, Colagar AH, Babolsar I. *Nigella sativa*: A plant with multiple therapeutic implications. *Int J Pharma*. 2015;**2**(5):190-214.
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2003;**58**(9-10):629-31. [PubMed ID:14577620]. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1004>.
- Akloul R, Benkaci-Ali F, Zerrouki M, Eppe G. Composition and biological activities of the essential oil of *Nigella sativa* seeds isolated by accelerated microwave steam distillation with cryogenic grinding. *Am J Essential Oils Natural Product*. 2014;**1**(3):23-33.
- Farag MA, El-Ahmady SH, Elian FS, Wessjohann LA. Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC-q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*. 2013;**95**:177-87. [PubMed ID:23902683]. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.003>.
- Moretti A, D'Antuono LF, Elementi S. Essential Oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seed. *J Essential Oil Res*. 2004;**16**(3):182-3. <https://doi.org/10.1080/104129>
- ظرفیت دارویی بالایی داشته و می توانند به عنوان ترکیبات مؤثر در داروهای آنتی بیوتیکی استفاده شوند.

مشارکت نویسندگان:

مفهوم و طراحی مطالعه: الف. ح. و م. م. س. ا.؛ جمع آوری داده ها: الف. ح. و م. م. س. ا.؛ تحلیل و تفسیر داده ها: ج. ز.؛ تهیه پیش نویس مقاله: الف. ح. و م. م. س. ا.؛ بازنگری انتقادی مقاله برای محتوای فکری مهم: الف. ح. و ج. ز.؛ تحلیل آماری: م. م. س. ا.؛ پشتیبانی اداری، فنی و مادی: الف. ح.؛ نظارت بر مطالعه: ج. ز.

تضاد منافع:

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی را اعلام نکرده اند.

باز یابی داده ها:

The dataset presented in the study is available on request from the corresponding author during submission or after publication.

کد اخلاق:

IR.IHU.REC.1399.1805.

حمایت مالی و معنوی:

این مطالعه با حمایت مالی (شماره ۳۲۸۵/۲۰۲۲) از دانشگاه امام حسین (ع) انجام شده است.

05.2004.9698690.

- Khader M, Eckl PM. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;**17**(12):950-7. [PubMed ID:25859298]. [PubMed Central ID:PMC4387230].
- Ghahramanloo KH, Kamalidehghan B, Akbari Javar H, Teguh Widodo R, Majidzadeh K, Noordin MI. Comparative analysis of essential oil composition of Iranian and Indian *Nigella sativa* L. extracted using supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Drug Des Devel Ther*. 2017;**11**:2221-6. [PubMed ID:28814830]. [PubMed Central ID:PMC5546729]. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S87251>.
- Hosseini SS, Nadjafi F, Asareh MH, Rezadoost H. Morphological and yield related traits, essential oil and oil production of different landraces of black cumin (*Nigella sativa*) in Iran. *Scientia Horticulturae*. 2018;**233**:1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.038>.
- Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharm Biomed Anal*.

- 1999;**19**(5):757-62. [PubMed ID:10698539]. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(98\)00300-8](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(98)00300-8).
18. Toma C-C, Simu GM, Hanganu D, Olah N, Vata FMG, Hammami C, et al. Chemical composition of the Tunisian *Nigella sativa*. Note I. Profile on essential oil. *Far-macia*. 2010;**58**(4):458-64.
19. Edris AE, Wawrzyniak P, Kalemba D. Subcritical CO₂ extraction of a volatile oil-rich fraction from the seeds of *Nigella sativa* for potential pharmaceutical and nutraceutical applications. *J Essential Oil Res*. 2017;**30**(2):84-91. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1391721>.
20. Kiralan M. Volatile compounds of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.) from microwave-heating and conventional roasting. *J Food Sci*. 2012;**77**(4):C481-4. [PubMed ID:22515239]. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02638.x>.
21. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009;**49**(11):1749-55. [PubMed ID:19857164]. <https://doi.org/10.1086/647952>.
22. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res*. 2007;**40**(6):839-47. [PubMed ID:17581684]. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006005000108>.
23. Mohammadpour P, Ahmadi MH, Niakan M, Rahimi F, Haghirasadat F. [Survey the synergistic effect of the cotrimoxazole and *Nigella sativa* extract on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteria]. *Daneshvar Med*. 2023;**31**(1):13-22. Persian. <https://doi.org/10.22070/daneshmed.2023.16718.1260>.
24. Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med*. 2012;**52**(1):46-58. [PubMed ID:22056908]. [PubMed Central ID:PMC3249484]. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.441>.
25. Kaatabi H, Bamosa AO, Lebda FM, Al Elq AH, Al-Sultan AI. Favorable impact of *Nigella sativa* seeds on lipid profile in type 2 diabetic patients. *J Family Community Med*. 2012;**19**(3):155-61. [PubMed ID:23230380]. [PubMed Central ID:PMC3515953]. <https://doi.org/10.4103/2230-8229.102311>.
26. Wajs A, Bonikowski R, Kalemba D. Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour Fragrance J*. 2008;**23**(2):126-32. <https://doi.org/10.1002/ffj.1866>.
27. Dhahir Mansour Al Sultani T, Ayad Fakhri S, Al-Zuhairi WHN. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Aqueous and Oil Extracts. *Iran J War Public Health*. 2021;**13**(4):305-11.
28. Mohammed SJ, Amin HHH, Aziz SB, Sha AM, Hassan S, Abdul Aziz JM, et al. Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Cytotoxicity Effect of Black Seed Oil. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;**2019**:6515671. [PubMed ID:31531117]. [PubMed Central ID:PMC6721493]. <https://doi.org/10.1155/2019/6515671>.
29. Nourouzpour G, Rezvani Moghadam P. [Effect of different irrigation intervals and plant density on yield and yield components of Black Cumin (*Nigella sativa*)]. *Iran J Field Crops Res*. 2005;**3**(2):305-15. Persian.

Research Article

Comparison of the Essential Oil and the Purified Thymoquinone in Different Varieties of *Nigella sativa* L. Cultivated in the Different Regions of Iran and Investigation of Their Antibacterial Activity

Ashkan Hajinourmohammadi ¹, Jamil Zargan ^{1,*}, Mir-Morteza Sadat Ebrahimi ¹

¹Research Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Research Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran. Email: jazrgan@ihu.ac.ir

Received 27/06/2024; Accepted 14/09/2024

Abstract

Background: Black seed (*Nigella sativa* L.) is a medicinal plant that is cultivated in different regions of Iran. The importance of plants is due to the presence of various bio-active compounds in the seeds, which are especially recommended in Islamic medicine. One of its important compounds of the seed is thymoquinone, which is in the essential oil.

Objectives: The purpose of this research is to compare the amount of the extracted essential oil and the thymoquinone in selective varieties of black seed in Iran and to investigate their antibacterial activity.

Methods: The extraction of essential oil from black seed was performed in a two-stage process. First, by the Soxhlet extruder method and using petroleum ether as eluent. The extract was obtained, and then the essential oil extraction was performed using Clevenger. Separation and purification of thymoquinone from essential oil were performed with high-performance liquid chromatography (HPLC). To investigate the antibacterial activity of the oils, the antibiogram test, the minimum inhibitory concentration (MIC), and the minimum bactericidal concentration (MBC) were performed.

Results: Iranian varieties of Semirom (Isfahan) and Taibad (Khorasan-Razavi) have the highest amount of essential oil. The results of the qualitative analysis of the thymoquinone amount extracted from the essential oils of these two varieties by HPLC showed that the essential oils of Semirom and Taibad contained 97.9 and 96.9 percent of thymoquinone, respectively. The MIC was around %3 (v/v%) and MBC was %6 (v/v%) on *Staphylococcus aureus* bacterium.

Conclusion: The selected varieties of Semirom and Taibad have the highest amount of thymoquinone, which could be taken into consideration in the manufacturing of pharmaceutical products.

Keywords: *Nigella sativa*, Thymoquinone, Chromatography, High Pressure Liquid, Anti-bacterial Agents