ترکیبات اسانس، خاصیت ضدباکتریایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اکوتیپ‌های مختلف *Nigella sativa* L. در رویشگاه‌های مختلف ایران

ندا محمدی ده‌چشمه[۱]، عبداله قاسمی پیربلوطی*[۲]، بهزاد آقابراری[۳]، بهزاد حامدی[۲]

[۱] کارشناس‌ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲] دانشیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۳] استادیار پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۳/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۵

چکیده

سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) با داشتن ترکیباتی از جمله آلکالوئید، فلاونوئید و تانن یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌رود. به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی، خاصیت آنتی‌باکتریال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی توده‌های مختلف این گیاه در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد اجرا گردید. در این آزمایش بذر این گیاه از رویشگاه‌های زراعی آن (لردگان، شهرضا، سمیرم، فلاورجان، مشهد، کاشمر و سبزوار) جمع‌آوری گردید. تهیه اسانس به روش تقطیر با آب و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه (GC/MS) انجام گرفت. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از روش DPPH ارزیابی و با آنتی‌اکسیدان BHT مقایسه گردید. آزمون ضدباکتریایی به‌روش رقت‌سازی و علیه باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر آئروژینوزا* و باکتری‌های گرم منفی، *پرتئوس ولگاریس*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* صورت گرفت. نتایج نشان داد که مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شامل آلفا-توجن، آلفا-پینن، بتا-پینن، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، آلفا-ترپینئول و تیموکینون بوده که دو ترکیب تیموکینون (١٤/٦٦ درصد) و پارا-سیمن (٤٤/٣٧ درصد) در دو منطقه سمیرم و لردگان بیشترین مقدار را نشان دادند. همچنین توده‌های مشهد و کاشمر بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند و به‌ترتیب باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *آنتروباکتر آئروژینوزا*، *پرتئوس ولگاریس* و *استا فیلوکوکوس اورئوس* از حساسترین باکتری‌های این تحقیق، نسبت به عصاره گیاه بودند و توده کاشمر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی و همچنین مهارکنندگی و کشندگی قابل ملاحظه‌ای نسبت به سایر توده‌ها از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پاراسیمن، تیموکینون، سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)، رویشگاه

*نویسنده مسئول: Ghasemi955@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* L. بومی جنوب اروپای، آفریقای شمالی و آسیا است و از قدیم‌الایام از دانه سیاه‌دانه برای درمان سردرد، احتقان بینی، آسم، آلرژی، تقویت سیستم ایمنی، درد دندان و کرم‌های روده‌ای و به عنوان دیورتیک برای القاء قاعدگی و افزایش تولید شیر مورد استفاده قرار می‌گرفت (Salehi Surmaghi, 2008; Goreja, 2003). مواد موثره عصاره آبی این گیاه شامل تیموکینون، دی تیموکینون، تیموهیدروکینون و تیمول دارای خاصیت تقویت کنندگی سیستم ایمنی بدن، ضد سرطان و همچنین ضد تشنج است (Morikawa et al., 2004). دانه‌های سیاه‌دانه حاوی اسانس است که پارا-سیمین[1] اصلی‌ترین ترکیب آن است (Geng et al., 2009). همچنین دانه‌های آن حاوی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین و کربوهیدرات، همچنین ترکیبات دیگری مانند فسفولیپیدها، کاروتن، کلسیم، آهن و پتاسیم است (Nickavar et al., 2003; Ramadan and Morsel, 2002). طی بررسی‌های متعدد خواص آنتی‌اکسیدانی، ضددردی و ضدالتهاب، ضدسرطان، ضدمیکروبی و ضدانگلی، ضدتشنج و اثر بر روی سیستم قلب و عروق، گوارش، خون، سیستم ایمنی، عضلات صاف، دیابت، کلیه و کبد و سمیت حاد و مزمن برای سیاه‌دانه بیان شده است (Ziaee and Amir, 1960).

تنش اکسیداتیو در ساختارهای بسیاری از بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان وجود دارد. مهار عملکرد سلول‌های ایمنی در اثر شیمی درمانی و رادیوتراپی به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن صورت می‌گیرد که موجب اثرات جانبی متعددی می‌گردد (Richard et al., 2001). در مطالعات متعدد اثرات ضداکسیداتیوی روغن و عصاره سیاه‌دانه گزارش شده است. کاربرد درون تنی شاخص‌های استرسی اکسایشی در خون موش‌های مصرف‌کننده عصاره سیاه‌دانه تحت تماس با تشعشعات باردار، کاهش یافته بود. همچنین تزریق روغن سیاه‌دانه به موش در فاز اسکیمی موجب خون‌رسانی مجدد و بهبود عملکرد و سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شد (Bayrak et al., 2008; Cemek et al., 2006). عصاره آبی سیاه‌دانه باعث ممانعت از اثرات اسکیمی همولتیک زهرمار و عقرب ناشی از تنش اکسیداتیو و از اریتروسیت ها در برابر پراکسیداسیون لیپید، افزایش خاصیت اسموتیک ایجاد شده به واسطه H_2O_2 محافظت می‌کند و تولید نیترات را نیز کاهش می‌دهد (Suboh et al., 2004). تیموکینون، ترکیبات کارواکرول، تی آنتول و ٤-ترپینئول موجود در سیاه‌دانه اثرات آنتی اکسایشی دارند (Burits and Bucar, 2000). تیموکینون موجود در سیاه‌دانه به واسطه فعالیت ضداکسایشی و هم‌چنین از طریق دست بردن در ترکیب DNA و تغییرات آن اثرات خود را اعمال می‌کند که تغییر DNA به افزایش فرایند سم‌زدایی سلول‌های سرطانی منجر می‌شود (Tohid, 2006).

روغن سیاه‌دانه دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی علیه ویروس‌های اکسایشی است (Su et al., 2001; Salem and Hossain, 2000). تاثیر روغن سیاه‌دانه علیه میکروارگانیسم‌های *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* و ماده دی تیموکینون موجود در روغن فرار دانه گیاه بر ضد باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است. همچنین عصاره آبی سیاه‌دانه علیه باکتری‌های مقاوم مثل *Vibrio cholerae*، *Escherichia coli* و *Shigella dysenteriae* موثر بود (Khan et al., 2003;

1. P-cymen

Archive of SID

www.SID.ir

Morsi, 2000). نتایج مطالعات نشان داده شده است که باکتری *Staphylococcus aureuss* مقاوم به متی سیلین به عصاره سیاه‌دانه با غلظت ۱ میلی‌گرم با حداقل غلظت مهار کننده‌گی ۰/۲ تا ۰/۵ گرم حساس است (Hannan et al., 2008). در مطالعه دیگر اثرات ضدتشنجی ماده تیموکینون، با استفاده از آزمون تشنجی پنتیلن تترازول مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان می‌دهد که تیموکینون می‌تواند در رفع تشنج تونیک کلونیک کارایی داشته باشد (Parvardeh and Hosseinzadeh, 2007).

مهم‌ترین عوامل مؤثر بر ترکیبات شیمیایی ثانویه گیاهان: عوامل ژنتیکی اثرات متقابل آن‌ها است. همچنین از عوامل محیطی و اکولوژیکی می‌توان دما، بارندگی، طول روز، نور خورشید، تبخیر و تعرق و باد، همچنین ارتفاع از سطح دریا، درصد شیب و جهت آن، عرض جغرافیایی، پوشش اراضی و نزدیکی به منابع آبی را نام برد که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به واسطه تأثیر بر سایر عوامل بوم‌شناسی بر سنتز ترکیبات ثانویه به خصوص اسانس گیاهان مؤثر هستند (Ghasemi Pirblouti, 2008). فانی (Fani, 2008). کمیت و کیفیت مواد مؤثره اسانس تحت شرایط آب و هوایی، ارتفاع و شیب می‌تواند متغیر باشد، با توجه به مطالب بیان شده، هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات اسانس توده‌های مختلف سیاه‌دانه و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدباکتریایی این اسانس متاثر از تغییرات جغرافیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به منظور مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس سیاه دانه و خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه صورت گرفت. بذر توده‌های جمع آوری شده از مزارع مورد استفاده در این مطالعه از مناطق مانند لردگان (استان لرستان)، شهرضا (اصفهان)، سمیرم (شهرکرد)، فلاورجان (اصفهان)، کاشمر (خراسان رضوی) و سبزوار (خراسان شمالی) تهیه مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش نمونه‌ها برای استخراج اسانس به آزمایشگاه منتقل و برای اسانس‌گیری آماده گردید. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه روش تقطیر با آب انجام شد.

شناسایی ترکیبات فرار: جهت تجزیه ترکیبات فرار در اسانس از GC و GC/MS استفاده شد. تجزیه GC، توسط دستگاه Agilent 7890 A و نوع ستون ۵٪ HP-5 MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ستون ۲۵ میکرومول، قطر بیرونی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ۸۰ میلی‌لیتر بر دقیقه جریان داشت. دمای اولیه ستون ٦۰ درجه سانتی‌گراد و دمای نهایی ستون ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. افزایش دما تا ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد. جهت تزریق نمونه‌ها از میزان ۰/۱ میکرولیتر اسانس با استفاده از سرنگ همیلتون استفاده شد. تجزیه GC/MS توسط دستگاه Agilent 5975 C انجام شد. انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت انتخاب شد. طیف جرمی از ۵۰-m/z۵۵۰ بود. شاخص‌های بازداری (IR) برای تمام اجزا با استفاده از یکسری هومولوگ از ان-الکان‌ها (C5 - C25) که در شرایط مشابه نمونه‌ها تزریق شدند، محاسبه گردید. شناسایی اجزای اسانس بر اساس مقایسه دفعات بازداری آن‌ها با دفعات بازداری استانداردهای معتبر نیز با مقایسه الگوهای تجزیه‌ای طیفی جرم آن‌ها انجام شد (Adams, 1984).

تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH: فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های گیاهی توسط اسپکتوفتومتر و در حضور DPPH به روش گاوران و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (Gaworan et al., 2012) انجام شد. در این روش زمانی که آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد را از طریق دادن هیدروژن غیرفعال می‌نمایند محلول DPPH کم رنگ می‌شود. با استفاده از این روش می‌توان ظرفیت و میزان آنتی‌اکسیدان اسانس و عصاره گیاهان را بر اساس درصد غیرفعال‌سازی (کاهش یا مهار) رادیکال DPPH و بر مبنای غلظت مهار کننده ۵۰ درصد یا همان IC_{50} در واحد میلی‌گرم بر گرم ماده خشک تعیین نمود. لازم به توضیح است که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره با IC_{50} رابطه عکس دارد. در این روش برای تهیه محلول استوک (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) DPPH، ۱۳ میلی‌گرم از DPPH را وزن کرده و پس از حل کردن در متانول، دربالن ژوژه ۵۰۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد. سپس ۳/۹ میلی لیتر از DPPH استوک ساخته شده را داخل کوت ریخته و جذب آن توسط دستگاهUV در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس اضافه و جذب آن در همین طول موج هر یک دقیقه یک بار به مدت ۳۰ دقیقه خوانده شد (Othman et al., 2010). برای مقایسه‌ی عصاره‌ها از نظر قدرت آنتی‌اکسیدانی از IC_{50} استفاده شد. بدین منظور ابتدا درصد مهار DPPH را توسط رابطه زیر محاسبه کرده و نمودار آن را در مقابل غلظت عصاره رسم گردید و IC_{50} که همان غلظتی از عصاره است که باعث مهار ۵۰ درصد رادیکال DPPH می‌شود، محاسبه شد.

$$\text{مهار درصدDPPH} = \left[1 - \frac{A_A}{A_B}\right] \times 100$$

A_A= جذب نمونه، A_B=جذب شاهد= جذب اولیه DPPH به تنهایی

مطالعه اثر ضدباکتریایی: برای مقایسه خاصیت ضدباکتریایی اسانس سیاه‌دانه، ۶ نوع باکتری *اشرشیاکلی، پسودوموناس آئروژینوسا، باسیلوس سرئوس، آنتروباکتر آئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس* و *استافیلوکوکوس ارئوس* که با انجام کشت جداسازی، خالص‌سازی و از طریق PRC شناسایی‌شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. ۲۴ ساعت قبل از انجام هر مرحله از آزمایش و با استفاده از محیط‌های کشت ذخیره، مبادرت به تهیه کشت تازه‌ایی شد که به آن کشت ۲۴ ساعته گویند. به‌طوری‌که قبل از شروع تلقیح با استفاده از یک سواپ استریل مقداری از کلونی های سطح محیط کشت BHI به لوله حاوی نوترین براث انتقال داده شد. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با استفاده از محلول استاندارد ۱ مک‌فارلند بررسی شد. تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی 10^7 عدد باکتری خواهد بود. برای تهیه این محلول، ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کلرید باریم یک درصد به ۹/۹ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک یک درصد اضافه و خوب تکان داده شد. محلول به‌دست آمده دارای کدورت معینی بود. برای تعیین میزان کدورت محلول OD آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ قرائت شد. سپس جمعیت باکتری‌ها براساس میزان OD به‌دست آمده از این طریق، تنظیم گردید.

جهت بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاهان مورد استفاده از روش رقت‌سازی استفاده می‌شود. این روش یکی از دقیق‌ترین روش‌های تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی به شمار می‌رود. با کمک این روش حداقل غلظت مهارکنندگی ماده ضدمیکروبی[1] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی[2] (MBC) تعیین می‌گردد. MBC حداقل غلظتی است که توانایی کشتن ۹۹/۹٪ از میکروارگانیسم‌ها را دارد. برای همین منظور از محیط کشت (پپتون واتر) با غلظت‌های

Archive of SID

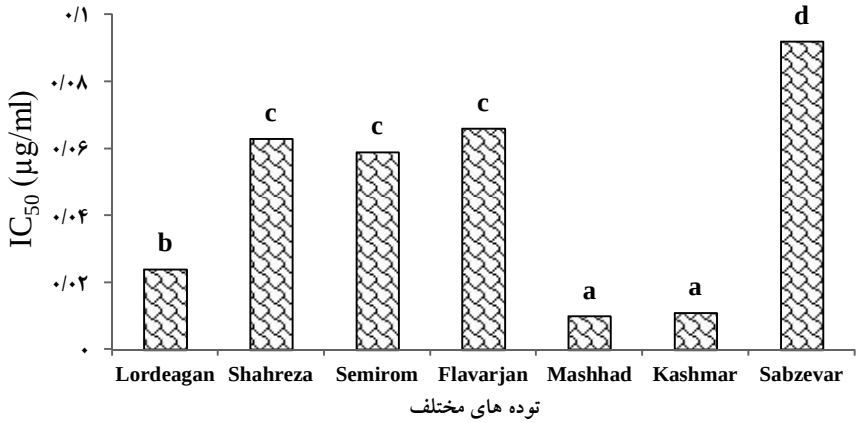
www.SID.ir

۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ٦۲، ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس استفاده شد. غلظت‌های با استفاده از دی متیل‌سولفوکساید تهیه شدند (Zampini et al., 2005).

نتایج

استخراج اسانس و شناسایی ترکیبات: نتایج تجزیه فیتوشیمیایی اسانس سیاه‌دانه از توده‌های مختلف نشان داد که ۲۳ ترکیب در حدود ۸۲ درصد از کل اسانس این گیاه را شامل می‌شوند. از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در این گیاه می‌توان به آلفا-پینن، بتا-پینن، آلفا-توجن، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، آلفا-ترپینئول و تیموکینون اشاره کرد؛ که ترکیب آلفا-توجن و پارا-سیمن جزء بیش‌ترین ترکیبات سیاه‌دانه بودند. مقدار این دو ماده بسته به توده مورد نظر متفاوت بود. در بین توده‌های مورد مطالعه توده سبزوار و مشهد با میانگین ۱٦/۲۳ و ۱۵/۷۷ درصد بالاترین مقدار آلفا-توجن و توده لردگان نیز بالاترین مقدار پارا-سیمن را به خود اختصاص داد (جدول ۱). همچنین بالاترین درصد آلفا-پینن به میزان (٦/۱۲ درصد) بتا-پینن به میزان (٦/۰٤ درصد) از جمعیت سبزوار به‌دست آمد. هم‌چنین بالاترین میزان گاما-ترپینن به میزان (٦/۳۷ درصد) و آلفا-ترپینئول به میزان (۹/۹۸) از جمعیت مشهد و بالاترین میزان پارا-سیمن میزان (٤٤/۳۷ درصد) از جمعیت لردگان به دست آمد (جدول ۱).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی: داده‌های حاصل از خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای اسانس گیاه سیاه‌دانه در شکل ۱ نشان داد که بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (کمترین IC_{50}) مربوط به اسانس سیاه‌دانه جمع‌آوری شده از مشهد و کاشمر با میانگین‌های ۲۳ و ۳٦ بود که هر دو گونه در یک کلاس آماری قرار داشتند. کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی (بالاترین IC_{50}) نیز مربوط به توده سبزوار بود که با همه‌ی گونه‌ها از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس توده‌های مختلف سیاه‌دانه استفاده از روش DPPH.

www.SID.ir

جدول ۱. مقایسه ترکیبات مختلف اسانس دانه توده های مختلف سیاهدانه

شماره	ترکیبات	RT (min)	RI-cal	لردگان	لردگان ۲	کاشمر	سبزوار	مشهد	فلاورجان	سمیرم	شهرضا
۱	α-thujene	٥/١٨	٩٢٨/٢٣	١٥/٦١	١٤/٩٧	١٦/١١	١٦/٢٣	١٥/٧٧	١١/٣١	١٢/٢١	١١/٨٧
٢	α-pinene	٥/٣٣	٩٣٥/١٢	٤/٢٣	٥/٢١	٥/٧٦	٦/١٢	٥/٣٢	٤/٦٤	٤/٠٩	٤/٣٢
٣	camphene	٥/٦٦	٩٤٩/٦٢	٠/١	٠/٢١	٠/١١	٠/٢١	٠/١٣	٠/١١	٠/٠٩	-
٤	sabinene	٦/٢٢	٩٧٤/٤٧	٢/٧٨	٢/٣٤	١/٣٢	١/٢١	١/٠٩	١/١١	١/٠٢	١/٤٣
٥	β-pinene	٦/٣٠	٩٧٨/٣٩	٤/٩٧	٥/١١	٥/٧٨	٦/٠٤	٥/٤٣	٤/١٧	٣/٩٩	٤/٠٩
٦	myrcene	٦/٥٨	٩٩٠/٨٤	٠/١٣	٠/٢١	٠/٠٩	٠/١١	٠/٠٨	٠/١	٠/٠٩	٠/١١
٧	α-phellandrene	٦/٩٧	١٠٠٧/٨٢	٠/١١	٠/٠٩	٠/١	٠/١١	٠/١٢	٠/٢١	٠/٢٣	٠/٣٢
٨	α-terpinene	٧/٣٢	١٠٢٣/٣٨	١/٢٣	١/١١	١/٠١	١/٢١	٠/٩٧	١/١١	١/٠٩	٠/٩٩
٩	***p*-cymene**	٧/٦٨	١٠٣٠/٩٠	٤٤/٣٧	٤٣/٣٢	٣٩/٩٨	٣٨/٧٦	٣٩/٠٣	٣٦/١١	٣٦/٦١	٣٧/٠١
١٠	limonene	٧/٧٢	١٠٣٢/٢٩	٢/٥٧	٢/٤٣	١/٩٢	١/٨٧	١/٧٧	١/١١	١/٠٩	١/٣٢
١١	1,8-cineole	٧/٧٨	١٠٣٤/٣٩	٠/١٧	٠/١٤	٠/٠٩	٠	٠/٠٣	-	٠/٠٣	-
١٢	γ-terpinene	٨/٥٣	١٠٦٠/٥٥	٥/٠٨	٤/٩٨	٥/٨٤	٥/٩٢	٦/٧٣	٤/٠٩	٣/٩٨	٤/٠١
١٣	β-ocimene <e>	٧/٩٠	١٠٣٨/٥٧	١/٥٦	١/٤	١/٠٩	١/٠١	٠/٩٨	٠/٧٦	٠/٨١	٠/٨٧
١٤	linalool	٩/٦٩	١١٠٠/٩٠	٠/١٠	٠/٠٨	٠	٠	٠	٠/٢٣	٠/٣٣	٠/٢٣
١٥	α-terpinolene	١٠/٣٤	١١٢١/٢٣	٧/٩٧	٨/١١	٩/٦٧	٩/٣٢	٩/٨٩	٨/٠٢	٧/٩٩	٧/١١
١٦	z-citral	١٤/٢١	١٢٤١/٤٩	٠/٢١	٠/١٩	٠/٣٢	٠/٤١	٠/٤٣	٠	-	-
١٧	**thymoquinone**	١٤/٥١	١٢٥٠/٧٠	-	-	-	-	-	١٣/٤٦	١٤/٦٦	١٤/٢١
١٨	thymol	١٥/٨٩	١٢٩٣/٠٩	٠/١١	٠/١٣	٠/١١	٠/٠٩	٠/١٤	٠/٠٩	٠/١١	٠/٠٤
١٩	carvacrol	١٦/٢	١٣٠٢/٦٩	١/٠٩	١/٢١	١/١١	١/٠١	١/٣٤	١/١١	١/١٢	١/٤٣
٢٠	β-caryophyllene	١٩/٩٣	١٤٢١/٩٣	٠/٤١	٠/٣٣	٠/٧٨	٠/٦٧	٠/٦٦	١/٠٩	٠/٧٧	١/٣٢
٢١	α-humulene	٢٠/٩٨	١٤٥٦/٢٦	٠/٠٩	٠/٠٨	-	-	-	٠/٠٩	-	-
٢٢	germacrene d	٢١/٨٢	١٤٨٣/٦٧	٠/٢١	٠/٢٤	٠/١١	٠/٢١	٠/٣٢	٠/٣٢	٠/١١	٠/٢٣
٢٣	caryophyllene oxide	٢٤/٨٤	١٥٨٦/٨٤	٠/٢٣	٠/١٧	٠/١١	٠/١٢	٠/١١	٠/٢١	-	٠/١١

www.SID.ir

جدول ۲: مقایسه اثر ضد باکتریایی اسانس توده‌های مختلف سیاه‌دانه بر جمعیت‌های مختلف باکتری (µg/ml).

باکتری	نوع گرم	لردگان	شهرضا	سمیرم	فلاورجان	مشهد	کاشمر	سبزوار
		MIC						
اشرشیاکلی	منفی	۱۲۵	۲۵۰	۱۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰
پسودوموناس آئروژینوزا	منفی	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
باسیلوس سرئوس	مثبت	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۵۰۰	۲۵۰	۲۵۰
انتروباکترآئروژینوسا	مثبت	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰
استا فیلوکوکوس ارئوس	مثبت	۱۲۵	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
پرتئوس ولگاریس	منفی	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰
		MBC						
اشرشیاکلی	منفی	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
پسودوموناس آئروژینوزا	منفی	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	۵۰۰	>۵۰۰
باسیلوس سرئوس	مثبت	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	>۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
انتروباکترآئروژینوسا	مثبت	>۵۰۰	>۵۰۰	۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	۲۵۰	>۵۰۰
استا فیلوکوکوس ارئوس	مثبت	۲۵۰	>۵۰۰	>۵۰۰	۵۰۰	>۵۰۰	۵۰۰	>۵۰۰
پرتئوس ولگاریس	منفی	۵۰۰	>۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	>۵۰۰	۲۵۰	>۵۰۰

خاصیت ضدباکتریایی: خاصیت ضدباکتریایی اسانس توده‌های مختلف سیاه‌دانه در مقابل ٦ نوع پاتوژن (*اشرشیاکلی پسودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس، انتروباکترآئروزینوزا، استافیلوکوکوس ارئوس، پرتئوس ولگاریس*) مشخص شد، اسانس‌های سیاه‌دانه فعالیت‌های مهاری نسبی در مقابل پاتوژن‌های آزمایش شده از خود نشان دادند. در مورد حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری *اشرشیا کلی*، در بین توده‌های سیاه‌دانه، توده لردگان و سمیرم، در مورد *پسودوموناس آئروژینوزا*، توده کاشمر، باکتری *باسیلوس سرئوس* توده‌های لردگان، شهرضا، سمیرم و فلاورجان، باکتری *انتروباکترآئروژینوزا*، توده کاشمر، باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* توده لردگان و باکتری *پرتئوس ولگاریس* توده کاشمیر و سمیرم حداقل مقادیر را نشان دادند. به‌طورکلی اسانس نمونه کاشمر فعالیت مهاری (MIC, MBC) خوبی در مقابل ٦ گونه باکتری و خصوصاً باکتری‌های *انتروباکترآئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس ارئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در مقایسه با عوامل ضد میکروبی از خود نشان داد، به‌طوری‌که در غلظت‌های پایین تر توانسته بود میزان ۵۰ درصد از باکتری را کنترل کند (جدول ۲).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد، مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در این گیاه شامل آلفا-پینن، بتا-پینن، آلفا-توجن، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، آلفا-ترپینئول و تیمو-کینون می‌باشد؛ که ترکیب آلفا-توجن و پارا-سیمن جزء بیش‌ترین ترکیبات موجود در اسانس سیاه‌دانه بودند که عملکرد آنتی‌اکسیدانی و مقدار این دو ترکیب بسته به توده مورد نظر متفاوت بود. در بین توده‌های مورد مطالعه توده سبزوار و مشهد بالاترین مقدار آلفا-توجن (۲۳/۱۵ درصد) و توده لردگان نیز بالاترین مقدار پارا-سیمن (۳۳/٤٤ درصد) را به خود اختصاص داد. در مطالعه دیگری که بر روی سیاه‌دانه صورت گرفت شد، بیان نمودند که مهم‌ترین و بیش‌ترین ترکیبات سیاه‌دانه شامل آلفا-توجن (۲۳/٤٤

Archive of SID

www.SID.ir

درصد) و آلفا-پینن (۱۶/۲۸ درصد) می باشد. فانی (Fani, 2008) بیان نمود میزان و نوع ماده مؤثره موجود در اسانس‌ها متاثر از شرایط آب و هوایی، ارتفاع و شیب می‌تواند متغیر باشد. نتایج این مطالعه نیز وجود رابطه مستقیم بین ترکیبات اسانس با ارتفاع مناطق مورد نظر که توده آن‌ها بررسی گردید وجود دارد. به‌طوری‌که با افزایش ارتفاع از سطح دریا میزان تیموکینون در گیاه افزایش یافته و با کاهش ارتفاع از سطح دریا میزان آلفا-توجن، آلفا-پینن (از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در اسانس گیاه می‌باشند که به‌عنوان اساسی‌ترین ترکیبات مهم در درمان سرطان شناخته شده‌اند) در گیاه افزایش یافته است. در مطالعه دیگر به وسیله فراوانی و همکاران (Faravani et al., 2006) بر روی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه سیاه‌دانه از استان خراسان نشان داد که مهم‌ترین ترکیبات شامل آلفا-توجن، آلفا و بتا-پینن، پارا-سیمن و تیموکینون بود. از مقایسه نتایج ما با این گزارشات می‌توان تفاوت ترکیبات فرار ماده گیاهی را به منشأ جغرافیایی گیاه و شیمیوتیپ نسبت داد.

همچنین مشاهده شد بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به اسانس سیاه‌دانه جمع‌آوری شده از مشهد و کاشمر با بود. همچنین کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز مربوط به توده سبزوار بود. با توجه به نتایج تجزیه اسانس سیاه‌دانه مشاهده می‌شود که توده‌های مشهد و کاشمر دارای بالاترین میزان آلفا-توجن، آلفا-ترپنوئید و پارا-سیمین می‌باشند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این دو توده می‌تواند ناشی از این مواد باشد. در مطالعه‌ای که توسط غلام زاده و همکاران (Gholamzade et al., 2012) صورت گرفت گزارش شد که عصاره زیره سیاه و سیاه‌دانه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بود که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه‌های زیره سیاه را می‌توان به مقادیر فراوان ترکیبات فنولیک و ترکیباتی مانند گاما-ترپنین، کومین آلدهید و بتا-سیمن و در دانه‌های سیاه‌دانه ترکیباتی مانند مونوترپن پارا-سیمن، گاما-ترپنین، لیمونن، تانن و بتا-پینن نسبت دادند (Oroojalian et al., 2010; Bourgou et al., 2010).

اسانس نمونه کاشمر فعالیت مهاری (MIC, MBC) خوبی در مقابل ٦ گونه باکتری و خصوصاً باکتری‌های انتروباکترآئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس ارئوس و پسودوموناس آئروژینوسا در مقایسه با عوامل ضدمیکروبی از خود نشان داد. مطالعات (Amir and Ziaee, 1965) خاصیت ضدباکتریایی سیاه‌دانه را تأیید می‌کند. آنها در تحقیقات خود بیان نمود که اسانس سیاه‌دانه بر روی باکتری پرتئوس ولگاریس و باسیلوس سرئوس اثر قابل ملاحظه مهار رشد و تا حدودی کشندگی دارد. اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های جمعیت‌های مختلف برداشت شده سیاه‌دانه با توجه به دمای نقاط جمع‌آوری شده متفاوت است. فعالیت ضدباکتری اسانس‌ها می‌تواند با خاصیت مونوترپن‌های موجود در روغن توضیح داده شود (Cristani et al., 2007). مونوترپن‌ها با تخریب دیواره سیتوپلاسمی میکروبی عمل می‌کنند که باعث از دست رفتن نفوذناپذیری جداره برای پروتون‌ها و یون‌های بزرگ‌تر می‌شود. نسبت دادن این عمل به یک ترکیب خاص یا مشخص مشکل است زیرا اسانس مخلوطی از ترکیبات شیمیایی متفاوت است (Lopes-Lutz et al., 2008). نتایج مطالعات دیگر نشان داد که اسانس سیاه دانه دارای خاصیت ضدمیکروبی است که این خاصیت را نیز به وجود ماده هیدروکینون و تیموکینین مرتبط دانستند که این تاثیر در حد قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک آموکسی سیلین می‌باشد (Kouidhi et al., 2011; Halavani, 2009). در مطالعه‌ای چایب و همکاران (Chaieb et al., 2011) انجام گرفت، خواص ضدباکتریایی تیموکینین که ماده مؤثره

Archive of SID

www.SID.ir

ضدباکتریایی روغن سیاه‌دانه است علیه باکتری‌های دهانی از جمله استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سالیواریوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی شد. توده کاشمر مورد استفاده در این مطالعه نیز دارای بالاترین تیموکینین بود به همین خاطر موثرترین توده در کنترل رشد باکتری‌ها شناخته شد. مطالعات بیان کننده حساسیت باکتری‌ها به تیموکینین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک است و پیشنهاد شده است که در مواقع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان از سیاه‌دانه به عنوان منبع ضدباکتریایی طبیعی استفاده نمود (Chaieb et al., 2011). تیموکینون به عنوان یک ماده فعال موجود در سیاه‌دانه تاثیر مهار صد درصدی بر روی قارچ آسپرژیلوس میجر در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داشت (Al-Jaber et al., 2003).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج این مطالعه مشاهده می‌شود که توده‌های مختلف سیاه‌دانه دارای ترکیبات اسانس مختلفی می‌باشد که این ترکیبات به‌طورکلی شامل آلفا-پینن، بتا-پین، آلفا-توجن، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، آلفا-ترپینئول و تیموکینون بود. همچنین مشاهده شد که درصد این ترکیبات بسته به گونه متفاوت بوده که می‌تواند بر اکثر خواص دارویی این گیاه از قبیل آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی تاثیر بگذارد. در بین توده‌های مورد بررسی، توده مشهد و کاشمر دارای بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی و توده سبزوار دارای کمترین خواص آنتی‌اکسیدانی است که می‌توان این خواص را به ترکیبات بیشتر پارا-سیمن، گاما-ترپنین و لیمونن در این توده‌ها نسبت داد که تغییرات این ترکیبات با توجه به موقعیت جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا متفاوت می‌باشد. همچنین توده کاشمر فعالیت مهاری (MIC, MBC) خوبی در مقابل ٦ گونه باکتری و خصوصاً باکتری‌های *انتروباکترآئروژینوزا*، *پروتئوس ولگاریس*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *پسودوموناس آئروژینوسا* در مقایسه با عوامل ضد میکروبی از خود نشان داد که مربوط به ماده هیدروکینون و تیموکینین می‌باشد.

References

1. Adams, R.P. 1984. Dynorphin reduces voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurons. Neuropept, 253-256.
2. Al-Jaber, S., Al-Akloby, O.M., Al-Qurashi, A.R., Akhtar, N., Al-Dossary, A. and Randhawa, M.A. 2003. Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. Pakistan Journal of Medical Research, 42 (3): 56-71.
3. Bayrak, O., Bavbek, N., Karatas, O.F., Bayrak, R., Catal, F., Cimentepe, E., Akbas, A., Yildirim, E., Unal, D. and Akcay, A. 2008. *Nigella sativa* protects against, ischaemia reperfusion injury in rat kidneys. Nephrology Dialysis Transplantation, 23 (7): 2206-2212.
4. Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B. and Legault, J. 2010. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. South African Journal of Botany, 76 (2): 210-216.
5. Burits, M. and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 14 (5): 323-328.
6. Cemek, M., Enginar, H., Karaca, T. and Unak, P. 2006. In vivo radio protective effects of *Nigella sativa* L. oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. Photochemical Photobiology, 82(6): 1691-1696.
7. Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2011. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation BMC Complement. Alternative Medicine, 13: 11-29.
8. Cristani, M., Darrigo, M. and Mandalari, G. 2007. Interaction of four monoterpens

Archive of SID

www.SID.ir

contained in essential oil with model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 18-4.

9. Fani, B. 2008. The relationship between water and soil, and crops of buckwheat. University of Mashhad.18 p. (In Persian).
10. Faravani, M., Razavi, S.A. and Farsi, M. 2006. In some agronomic traits and anatomical variation in local mass Nigella. Khorasan. Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 22 (3): 197-193. (In Persian).
11. Gaworan, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. and Ozkan, H. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Nigella sativa* L. Food Chemistry, 234: 49-56.
12. Geng, D., Zhang, S. and Lan, J. 2009. Analysis on chemical components of volatile oil and determination of thymoquinone from seed of *Nigella glandulifera*. China Journal of Chinese materia medica, 34 (22): 2887-2890.
13. Ghasemi Pirbalouti, A. 2008. Medicinal and Aromatic Plants (identifying and studying their effects). Shahrekord Branch, Islamic Azad University Press, 541 p. (In Persian).
14. Gholamzade, M., Hossine, H., Askandari, S., Hossine, A. and Gholamzade, H. 2012. Study the effects of antioxidant extracts of black cumin, caraway and integrate them chemical changes and sensory properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Food Hygiene, 4(3): 22-11. (In Persian).
15. Goreja, W.G. 2003. Black Seed: Nature's Miracle Remedy. New York, NY7 Amazing Herbs Press. pp: 46.
16. Halavani, E. 2009. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. Advances in Biological Research. 3 (5-6): 148-152.
17. Hannan, A., Saleem, S., Chaudhary, S., Barkaat, M. and Arshad, M.U. 2008. Anti-bacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ayub Medical College Abbottabad, 20(3): 72-74.
18. Khan, M.A., Ashfaq, M.K., Zuberi, H.S., Mahmood, M.S. and Gilani, A.H. 2003. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. Phytotherapy Research,17: 183-186.
19. Kouidhi, B., Zmantar, T., Jrah, H., Souiden, Y., Chaieb, K. and Mahdouani, K. 2011. Antibacterial and resistance-modifying activities of thymoquinone against oral pathogens. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 27: 10-29.
20. Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Kolodziejcyk, P.P. 2008. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: Elucidation of the mechanism of action. General Pharmacology, 24: 1123-1131.
21. Morikawa, T., Xu, F., Kashima, Y., Matsuda, H., Ninomiya, K. and Yoshikawa, M. 2004. Novel dolabellanetype diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. Organic Letters, 6: 869-872.
22. Morsi, N.M. 2000. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics resistant bacteria. Acta Microbiologica Polonica, 49:63-74.
23. Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K. and Amoli, M.A. 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. Zeitschrift fur Naturforschung A, 58: 629-631.
24. Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami, M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on foodborne pathogens. Food Chemistry, 120 (3):765-770.
25. Othman, M., Hafedh, H., Fethi, B.N., Emira, N., Mejdi, S. and Amina, B. 2010. Antinociceptive effects of *Nigeflla sativa* oil and its major component,

Archive of SID

www.SID.ir

thymoquinone, in mice. European Journal of Pharmacology, 400: 89-97.
26. Parvardeh, S. and Hosseinzadeh, H. 2007. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. Phytomedicine, 12: 73-106.
27. Ramadan, M.F. and Morsel, J.T. 2002. Characterization of phospholipids composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. The Journal Nahrung, 46: 240-244.
28. Richard, B., Weinberg Barbara, S., Vander Werken R.A., Anderson, J., Stegner Michael, E. and Thomas, J. 2001. Pro-oxidant effect of vitamin e in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 21:1029-1033.
29. Salehi Surmaghi, M.H. 2008. *Nigella Sativa* in Herbal Medicine and Herbal Therapy, volum 2, Donyay Taghziah press. Tehran Iran. pp: 216.
30. Salem, M.L. and Hossain, M.S. 2002. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. International Journal of Immunopharmacology, 22 (9): 729-740.
31. Su, H.C., Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Ruzek, M.C., Dalod, M.Y. and Biron, C.A. 2001. Cell functions restrain T cell responses during viral infections. European Journal of Immunology, 31: 3048-3055.
32. Suboh, S.M., Bilto, Y.Y. and Aburjai, T.A. 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidative stress human erythrocytes. Phytotherapy Research, 18: 280-284.
33. Tohid, A. 2006. Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. Journal of Ethnopharmacology, 52: 23-26.
34. Zampini, I.C., Vattuone, M.A. and Isla, G. 2005. Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* on the spontaneously hypertensive rat. Therapie, 55: 379-382.
35. Ziaee, G. and Amir, F. 1960. Effectiveness of '*Nigella*' in Asthma. Alexandria Journal of Medicine, 6: 543-547.

Archive of SID

www.SID.ir