

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و اثر عصاره‌های آبی، الکلی و هیدروالکلی گیاه بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) بر غیرفعال کردن پروتواسکولکس‌های اکینوکوکوس گرانولوزوس در شرایط آزمایشگاهی

میلاذ قربانی پور^۱، زینب صادقی دهکردی^۲، علیرضا سازمند^۳، امیر دارابی گرمه‌خانی^۴، عباسعلی ساری^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. پست الکترونیکی: z.sadeghidehkordi@basu.ac.ir

۳- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۴- دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده فنی و منابع طبیعی تویسرکان، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۵- استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: عصاره‌ی بن‌سرخ و عصاره‌ی بهینه‌ی آن دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این مطالعه با هدف بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ، بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی حاصل از آن و نیز خاصیت کُشنندگی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ در غلظت‌های مختلف اتانول ۰، ۵۰ و ۱۰۰٪ و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استخراج گردید. بهترین شرایط استخراج عصاره‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ تعیین و عصاره‌ی تهیه‌شده در شرایط بهینه برای آزمایشات انتخاب شد. در نهایت غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm از عصاره‌ی استخراجی تهیه و تأثیر آن‌ها بر پروتواسکولکس‌ها در مدت زمان مواجهه ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه بررسی گردید.

یافته‌ها: افزایش زمان استخراج با میزان ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ارتباط مستقیم و افزایش غلظت اتانول با این پارامترها رابطه عکس داشت. ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره‌ی بن‌سرخ (۶۳/۹۰ دقیقه) در غلظت آبی خالص توانست در زمان ۳۰ دقیقه ۱۰۰٪ پروتواسکولکس‌ها را غیرفعال نماید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد عصاره‌ی آبی گیاه بن‌سرخ، می‌تواند سبب غیرفعال شدن پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی شود.

واژگان کلیدی: عصاره بن‌سرخ، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، هیداتیدوزیس، بهینه‌سازی، اسکولکس‌کش

• مقدمه

نوشیدن آب آشامیدنی، مصرف سبزیجات خام یا از طریق دست آلوده مبتلا می‌شود (۱). این بیماری در ایران اندمیک بوده و از نظر بهداشتی و اقتصادی، سالانه خسارات زیادی وارد می‌کند (۲-۳). بیماری در اکثر افراد فاقد علائم بالینی است و به صورت تصادفی هنگام معاینه تشخیص داده می‌شود. علائم بالینی

بیماری هیداتیدوزیس ناشی از آلودگی انسان به مرحله لاروی اکینوکوکوس گرانولوزوس است که به عنوان یکی از مهم‌ترین عفونت‌های کرمی مشترک بین انسان و حیوان شناخته می‌شود. چرخه‌ی زندگی این انگل بین سگ‌ها به عنوان میزبان نهایی و دام‌ها به عنوان میزبان واسط برقرار است. انسان از طریق بلع تخم‌های دفع شده همراه با مدفوع سگ در محیط،

استفاده به عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی و نیز توانایی کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا را دارد (۱۵).

غلامی و همکاران (۱۳۹۵)، با بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های گیاه بن‌سرخ، نشان دادند که عصاره‌ی آبی نسبت به عصاره‌ی متانولی تأثیر بیشتری دارد (۱۳).

مشیری روشن و همکاران (۲۰۲۰)، با بررسی شرایط استخراج عصاره‌ی دانه‌ی زینان، نشان دادند که راندمان استخراج و عصاره‌گیری با افزودن آب به عصاره‌ها و همچنین افزایش زمان استخراج، باعث افزایش استخراج میزان ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۱۶).

شعبانیان و همکاران (۲۰۲۱)، با بهینه‌سازی عصاره‌های اتانولی پوست سبز گردو، نشان دادند که غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی بهینه‌ی این ماده، قادر به کاهش اکسیداسیون در تیمارهای مختلف می‌باشد؛ در نتیجه می‌توان از عصاره‌ی پوست سبز گردو به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و مؤثر استفاده نمود (۱۷).

جمشیدی و همکاران (۱۳۸۹)، با مقایسه‌ی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هفت گونه از گیاهان بومی مازندران، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدان و بیشترین میزان فنول‌ها را در گیاه *Marrubium vulgare* گزارش کردند. همچنین نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای تام رابطه‌ی مستقیم دارد (۱۸).

از آنجا که اثر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی بن‌سرخ و عصاره‌ی بهینه‌ی آن بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید قبلاً مطالعه نشده است، بنابراین هدف این تحقیق، دستیابی به بهترین شرایط استخراج عصاره‌ی بن‌سرخ (آبی، هیدروالکلی و الکلی)، غلظت و زمان استخراج با توجه به شاخص آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی، تعیین میزان کشندگی پروتواسکولکس‌ها با استفاده از عصاره‌ی بهینه و دستیابی به حداقل زمان تماس عصاره به منظور کشندگی پروتواسکولکس‌ها بود.

• مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات

به منظور انجام مطالعه، گیاه بن‌سرخ از بازار فرآورده‌های دارویی با منشأ گیاهی شهر همدان خریداری شد. مواد شیمیایی مصرفی شامل حلال اتانول، معرف فولین سیوالتو، کربنات سدیم، اسید گالیک، تری‌کلرواستیک اسید، کلرید آهن سه ظرفیتی، معرف DPPH، بافر فسفات، فری‌سیانید پتاسیم، مولیبدات آمونیوم، اسید سولفوریک و فسفات سدیم بودند.

شرکت مرک و شرکت‌های داخلی مواد شیمیایی و حلال‌ها را با بالاترین خلوص تهیه کردند. همچنین دستگاه‌ها و

متغیر است و به عواملی مانند ارگان درگیر (ریه، کبد، مغز استخوان)، تعداد و محل قرارگیری کیست‌ها بستگی دارد.

درمان کیست هیداتید از طریق جراحی، درمان دارویی و یا ترکیبی از هر دو انجام می‌شود. البته جراحی به عنوان درمان اصلی باعث از بین رفتن کامل کیست‌ها می‌شود، اما امکان بروز عوارض جانبی مانند پارگی کیست حین عمل جراحی و بیرون ریختن مقدار کمی از محتویات کیست هیداتید وجود دارد که سبب عود مجدد بیماری خواهد شد و واکنش‌های ایمنولوژیک نظیر آسم و شوک‌های آنافیلاکسی را به دنبال دارد (۴). از معضلات دیگر عمل جراحی، جداره‌ی نازک کیست، نزدیکی به سیستم بطنی و چسبندگی‌های کوچک به پارانشیم مغز است. حفره‌ای که بعد از عمل جراحی باقی می‌ماند، می‌تواند باعث افتادگی (کلاپس) شدید کورتکس، افزایش غیر عادی درجه‌ی حرارت بدن، ادم مغزی و نارسایی قلبی-عروقی گردد؛ لذا، محققان به دنبال داروهایی مؤثرتر با عوارض جانبی کمتر هستند (۵).

معمولاً از نمک هایپرتونیک و فرمالین، به عنوان اسکولکس‌کش در جراحی استفاده می‌شود که عوارضی مانند کلاتریت اسکروزان، تنگی مجاری صفراوی و نکروز کبدی را سبب می‌شود (۶، ۷). لذا نیاز به یافتن یک عامل اسکولکس‌کش گیاهی با تأثیر بیشتر و عوارض کمتر به عنوان جایگزین ضرورت پیدا می‌کند.

سابقه‌ی استفاده از گیاهان دارویی در سراسر جهان برای درمان و پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها، به سال‌های خیلی دور برمی‌گردد. اثرات اسکولکس‌کشی گیاهان مختلف مانند سیر، زنجبیل، درمنه و آویشن شیرازی به فراوانی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۸-۱۰). گیاه بن‌سرخ با نام علمی *Allium jesdianum*، یک گیاه گل‌دار خودرو، متعلق به خانواده‌ی لیلیاسه و بومی ایران است (۱۱). این گیاه حاوی اسانس فلاونوئید، سولفور و پلی‌سولفور آلیل و آلیل پروپیل است که دارای خواص دارویی و درمانی مختلف و نیز خواص ضد میکروبی بالا می‌باشد (۱۲). همچنین ترکیبات سولفیدی و تریپنوئیدی، بخش اصلی اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند (۱۳). این گیاه دارای استفاده‌های غذایی گوناگون بوده و به طور سنتی در درمان و کاهش دردهای روماتیسمی و گوارشی و دفع سنگ کلیه به کار برده می‌شود (۱۴) و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز می‌باشد.

حجتی و علی‌زاده (۱۴۰۰)، با بررسی ویژگی‌های ضد اکسایشی و ضد میکروبی عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ، به این نتیجه رسیدند که وجود ترکیبات فنولی تنها عامل مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نمی‌باشد؛ همچنین این عصاره قابلیت

شد. عصاره‌های استخراجی با کاغذ واتمن شماره ۴۰ صاف، با دستگاه اپراتور چرخشی تغلیظ و در درون ظروف استریل در دمای یخچال نگهداری شدند.

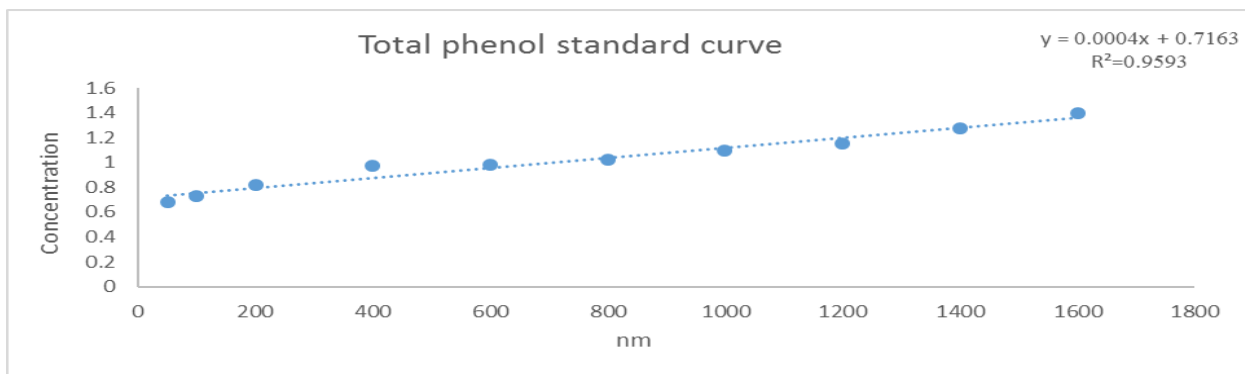
آزمایش‌های انجام‌شده روی عصاره‌ها

میزان ترکیبات فنولی کل: میزان ترکیبات فنولی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو ارزیابی شد (۲۰-۱۹). بدین صورت که ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. سپس با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین و قرار دادن در محیط تاریک به مدت ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ به محلول اضافه گردید. سپس لوله‌ها به بن‌ماری ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه منتقل شدند. دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج ۷۶۰ نانومتر جذب نمونه‌ها را خوانش کرد. با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک در گرم نمونه، مقادیر ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها محاسبه گردید.

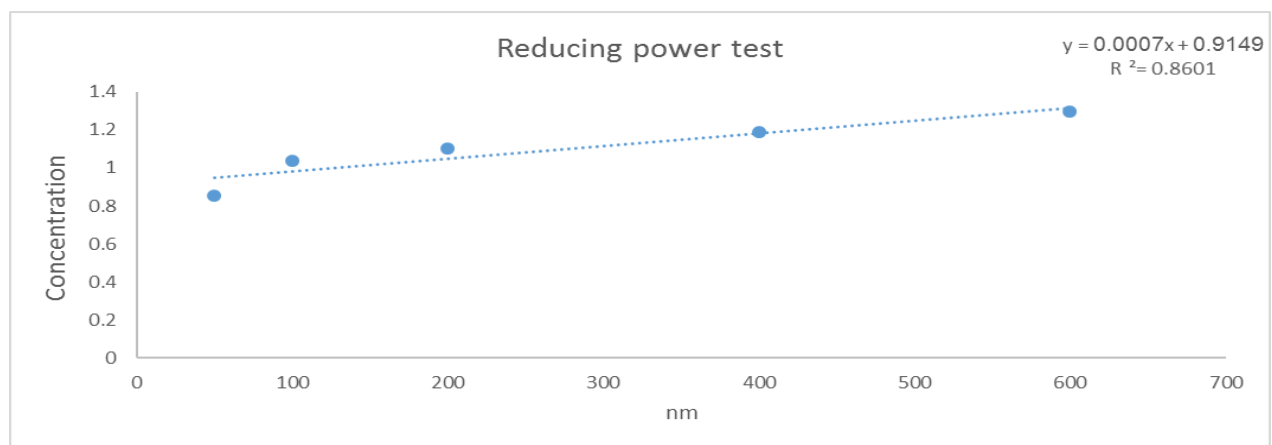
تجهیزاتی مانند مخلوط‌کن خانگی (سانی، ایران)، آون (فن آزما گستر، ایران)، ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ (سارتوریوس، آلمان)، دستگاه اسپکتروفوتومتر دو پرتویی ماوراءبنفش-مرئی (پی‌جی اینسترومنت، انگلستان)، سانتریفیوژ آزمایشگاهی (سیگما، آلمان)، دستگاه تبخیرکننده‌ی چرخشی (ای‌کا آ آر وی ۱۰، آلمان)، pH متر (دنور، آلمان)، دستگاه بن‌ماری (فن آزما گستر، ایران) و شیکر لوله (لایبکو پارس خزر، ایران) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش تهیه‌ی عصاره‌ی بن‌سرخ

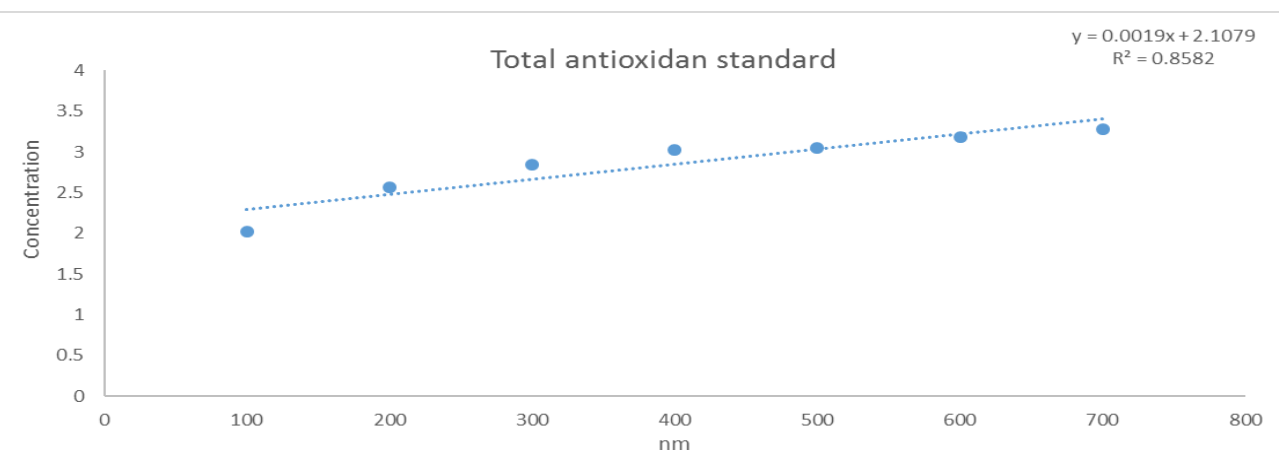
در مرحله‌ی اول، برگ و ساقه‌ی گیاه بن‌سرخ پس از تمیز کردن آسیاب شد. حلال‌های آب خالص، اتانول خالص و مخلوط آب و اتانول (۵۰٪) با نسبت ۵ به ۱ برای تهیه‌ی عصاره آماده شدند. مخلوط‌های حلال و گیاه بن‌سرخ در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی هیتر شیکردار با دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و در طول آزمایش، سطح حلال با اضافه کردن حلال تازه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته



شکل ۱. منحنی استاندارد اسید گالیک در آزمون ترکیبات فنولی کل



شکل ۲. منحنی استاندارد اسید گالیک در آزمون احیاءکنندگی آهن



شکل ۳. منحنی استاندارد اسید گالیک در آزمون آنتی‌اکسیدانی کل

محلول معرف مخلوط و به بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ دقیقه منتقل شد. قرائت جذب نمونه‌ها به وسیله‌ی اسپکتوفوتومتر در طول موج ۶۹۵ نانومتر، مستلزم سرد شدن محلول تا دمای اتاق است. در نهایت از گالیک اسید برای تهیه‌ی نمودار استاندارد استفاده شد (۲۳).

بررسی اثر عصاره‌های تولیدی بر پروتواسکولکس‌های اکتینوکوکوس گرانولوزوس

به منظور جمع‌آوری ارگان‌های آلوده به کیست هیداتید مانند ریه و کبد گوسفندان آلوده، از تاریخ شهریورماه لغایت دی‌ماه ۱۴۰۰، طی چندین نوبت مراجعه به کشتارگاه صنعتی شهرستان همدان، نمونه‌ها اخذ و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا منتقل شد. در شرایط استریل، محتویات کیست‌ها با سرنگ به درون لوله‌های فالتکون منتقل و پس از ایجاد برش عرضی و تخلیه‌ی مایع کیست، با پنس استریل، غشای زایا جدا و درون پتری‌دیش قرار گرفت. سپس غشای زایا با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد تا میزان پروتواسکولکس بیشتری به دست آید. به منظور تعیین باروری و یا عدم باروری کیست‌ها، مایع کیست زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید. سپس همه‌ی لوله‌ها با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا تمامی پروتواسکولکس‌ها رسوب کنند. مایع رویی دور ریخته شد. در نهایت شستشوی پروتواسکولکس‌های ته‌نشین شده، دو مرتبه با سرم فیزیولوژی انجام شد و درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها با مشاهده‌ی حرکت آن‌ها و استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین تعیین شد. بدین ترتیب که روی یک اسلاید شیشه‌ای، ۲۰ میکرولیتر مایع حاوی پروتواسکولکس به ۲۰ میکرولیتر رنگ ائوزین ۰/۱ درصد اضافه گردید و با قرار دادن لامل زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. پروتواسکولکس‌های مرده به دلیل از دست دادن نفوذپذیری

آزمون قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP): فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی، مطابق با روش بیلدریم و همکاران (۲۱) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۱ میلی‌لیتر عصاره به ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم اضافه و مخلوط گردید. این محلول در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید اضافه گردید. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد، محلول رویی جدا گردید، با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن سه ظرفیتی مخلوط و با دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب آن قرائت شد. در نهایت از استاندارد اسید گالیک برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد (۲۰).

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال فعال DPPH انجام شد. بدین‌گونه که ابتدا یک میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH با ۳ میلی‌لیتر از عصاره‌ها مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک قرار گرفت. سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و در نهایت، فعالیت بر حسب درصد مهار DPPH طبق رابطه‌ی (۱) محاسبه گردید (۲۲).

رابطه (۱)

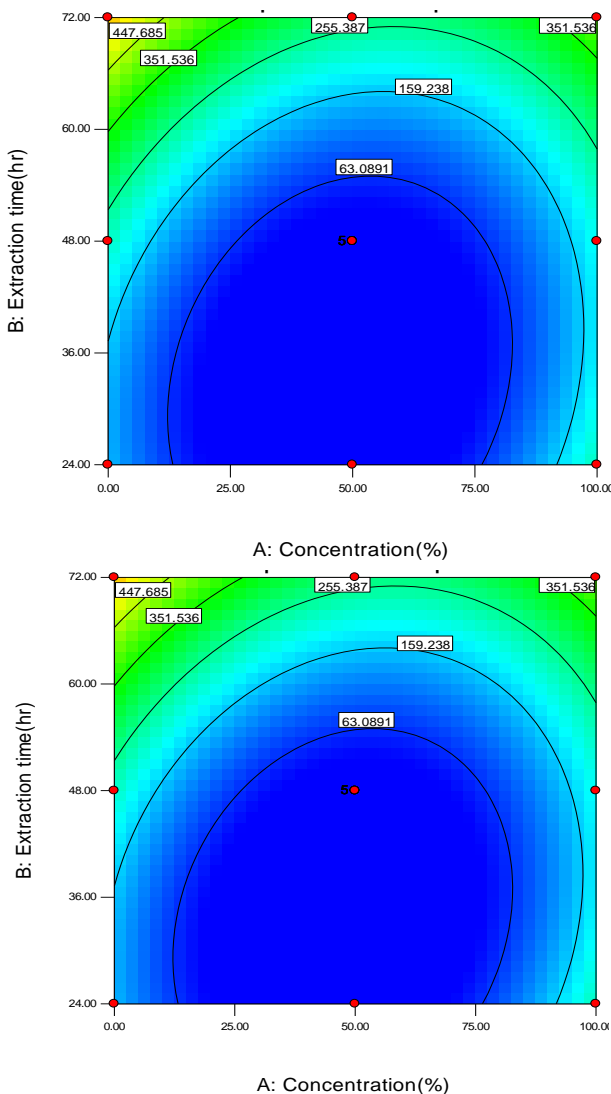
$$\% \text{ مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{جذب محلول DPPH حاوی عصاره‌ها - جذب محلول DPPH (شاهد)}}{\text{جذب محلول DPPH (شاهد)}} \times 100$$

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: برای انجام اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، ابتدا آماده‌سازی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول معرف (مخلوط اسید سولفوریک، فسفات سدیم و مولیبدات آمونیوم) حایز اهمیت است. بدین صورت که ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۵ میلی‌لیتر

• یافته‌ها

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاه بن‌سرخ

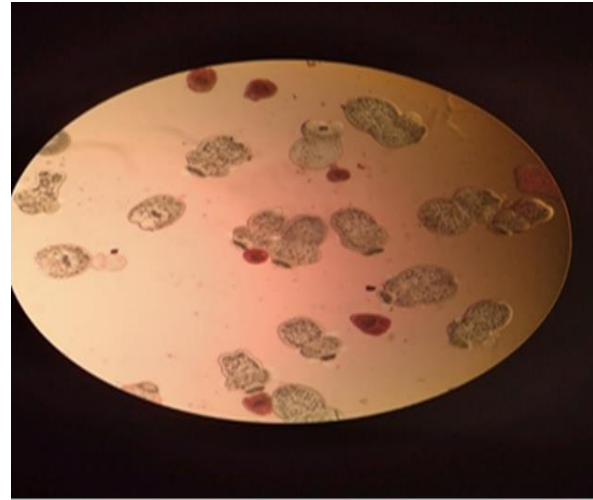
ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی: روند تغییرات ترکیبات فنولی کل عصاره‌های گیاه بن‌سرخ، تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) در شکل ۵ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزایش زمان استخراج، میزان ترکیبات فنولی کل روند افزایشی را طی می‌کند؛ در حالی که با افزایش غلظت حلال اتانول، میزان ترکیبات فنولی استخراجی کاهش می‌یابد.



شکل ۵- نمودار دوبعدی (کنتور) و سه‌بعدی تغییرات میزان ترکیبات فنولی کل (میلی گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم گیاه بن‌سرخ) عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ تحت تأثیر غلظت حلال اتانولی و زمان استخراج (دمای استخراج ۴۰ درجه سانتی‌گراد)

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی کل، برای عصاره‌ی

انتخابی غشاء، نسبت به رنگ نفوذپذیرند و قرمز رنگ می‌شوند؛ ولی پروتواسکولکس‌های زنده به دلیل عدم نفوذ رنگ اتوزین، بی‌رنگ هستند (۲۴).



شکل ۴: پروتواسکولکس‌های کیست هیدانتیک پس از رنگ‌آمیزی اتوزین (پروتواسکولکس‌های مرده و زنده به ترتیب قرمز رنگ و بی‌رنگ هستند)

تجزیه و تحلیل آماری و بهینه‌سازی

از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD^1)، با ۳ سطح و ۵ تکرار در نقطه‌ی مرکزی برای بررسی تأثیر غلظت حلال و زمان استخراج بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل استفاده شد (+۱، ۰، -۱). در این تحقیق، محدوده‌ی متغیرهای مستقل غلظت حلال مورد استفاده (X_1) و زمان استخراج عصاره (X_2) از آزمون‌های اولیه استنتاج گردید (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی با منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده، به صورت تصادفی درآمدند. برای رسم نمودارهای سه‌بعدی و بهینه‌سازی داده‌ها، از نرم‌افزار Design Expert 6.0.2 استفاده شد. همچنین نتایج پروتواسکولکس‌کشی عصاره‌ها بر اساس طرح پایه، به صورت کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات، از نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱) استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین صفات اندازه‌گیری شده، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید.

جدول ۱. متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده برای بهینه‌سازی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ تحت شرایط مختلف استخراج

متغیرهای مستقل	سطوح متغیرها		
	+۱	۰	-۱
زمان استخراج (hr)	۷۲	۴۸	۲۴
غلظت حلال (v/v)	۱۰۰	۵۰	۰

حلال (v/v) و B زمان استخراج (ساعت) می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه‌ی رگرسیون و در صورت استفاده از رابطه‌ی ۲، می‌توان میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها را با دقت ۸۶/۰۱ درصد پیش‌بینی نمود.

اتانولی با مدل آماری درجه‌ی دوم در سطح آماری ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه‌ی واریانس جدول ۲ و ضرایب رگرسیونی حاصل جدول ۳ معادله‌ی درجه‌ی دوم، مدل آماری جهت محاسبه‌ی میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ی اتانولی در رابطه‌ی ۲ آورده شده است؛ در این معادله، A غلظت

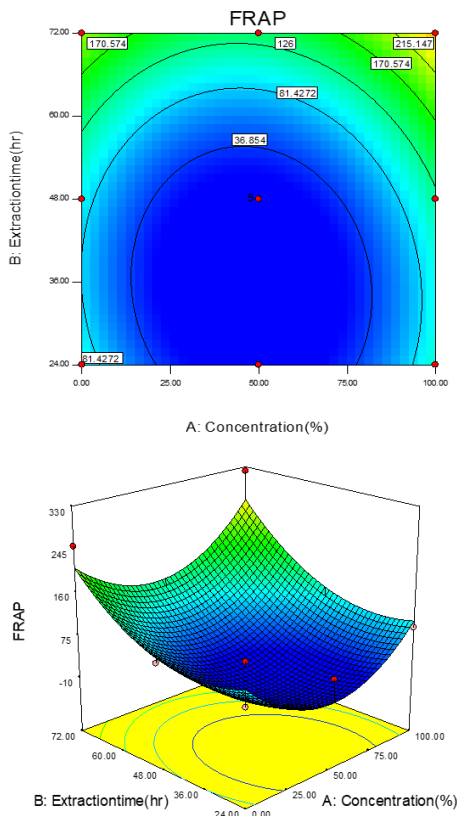
جدول ۲. تجزیه واریانس ضرایب رگرسیونی مدل‌های چندگانه و خطی برای پیش‌بینی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه بن‌سرخ تحت شرایط مختلف استخراج

پاسخ	منبع	مجموع مربعات	DF	میانگین مربعات	F-value	p-value	معنی داری
ترکیبات فنولی کل	مدل	۳.۷۲۶E+۰۵	۵	۷۴۵۲۳.۱۱	۵.۰۸	۰.۰۲۷۷	*
	A-غلظت حلال	۱۰۹۱.۳۴	۱	۱۰۹۱.۳۴	۰.۰۷۴	۰.۷۹۳۰	
	B- زمان استخراج	۱.۲۶۶E+۰۵	۱	۱.۲۶۶E+۰۵	۸.۶۳	۰.۰۲۱۸	
	AB	۱۱۹۹۳.۷۵	۱	۱۱۹۹۳.۷۵	۰.۸۲	۰.۳۹۶۰	
	A ²	۱.۱۰۰E+۰۵	۱	۱.۱۰۰E+۰۵	۷.۵۰	۰.۰۲۹۰	
	B ²	۳۹۰۹۵.۲۶	۱	۳۹۰۹۵.۲۶	۲.۶۶	۰.۱۴۶۷	
	باقی‌مانده‌ها	۱.۰۲۷E+۰۵	۷	۱۴۶۷۵.۸۳			
	عدم برازش مدل	۱.۰۲۷E+۰۵	۳	۳۴۲۳۳.۵۷	۱.۶۱۸E+۰۰۶	< ۰.۰۰۰۱	**
	خطای خالص	۰.۰۰۸۵	۴	۰.۰۲۱			
	مجموع	۴.۷۵۳E+۰۵	۱۲				
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل	مدل	۴.۴۵۳E+۰۵	۵	۸۹۰۶۰.۷۱	۴.۹۱	۰.۰۳۰۱	*
	A-غلظت حلال	۲۴۲.۱۵	۱	۲۴۲.۱۵	۰.۰۱۳	۰.۹۱۱۳	
	B- زمان استخراج	۱.۶۶۵E+۰۵	۱	۱.۶۶۵E+۰۵	۹.۱۷	۰.۰۱۹۱	
	AB	۳۰۳۱.۳۶	۱	۳۰۳۱.۳۶	۰.۱۷	۰.۶۹۵۰	
	A ²	۱.۱۱۴E+۰۵	۱	۱.۱۱۴E+۰۵	۶.۱۴	۰.۰۴۲۴	
	B ²	۶۱۲۳۷.۷۲	۱	۶۱۲۳۷.۷۲	۳.۳۷	۰.۱۰۸۹	
	باقی‌مانده‌ها	۱.۲۷۱E+۰۵	۷	۱۸۱۵۱.۸۳			
	عدم برازش مدل	۱.۲۷۱E+۰۵	۳	۴۲۳۵۴.۲۶	۳.۹۵۳E+۰۰۶	< ۰.۰۰۰۱	**
	خطای خالص	۰.۰۰۴۳	۴	۰.۰۱۱			
	مجموع	۵.۷۲۴E+۰۵	۱۲				
FRAP	مدل	۸۵۳۸۹.۲۵	۵	۱۷۰۷۷.۸۵	۵.۳۳	۰.۰۲۴۵	*
	A-غلظت حلال	۱۱۳۴.۳۸	۱	۱۱۳۴.۳۸	۰.۳۵	۰.۵۷۰۷	
	B- زمان استخراج	۲۶۴۱۷.۳۹	۱	۲۶۴۱۷.۳۹	۸.۲۴	۰.۰۲۴۰	
	AB	۴۶۶.۴۳	۱	۴۶۶.۴۳	۰.۱۵	۰.۷۱۴۲	
	A ²	۲۵۷۰۳.۰۳	۱	۲۵۷۰۳.۰۳	۸.۰۲	۰.۰۲۵۴	
	B ²	۱۰۷۰۴.۲۷	۱	۱۰۷۰۴.۲۷	۳.۳۴	۰.۱۱۰۴	
	باقی‌مانده‌ها	۲۲۴۴۲.۳۹	۷	۳۲۰۶.۰۶			
	عدم برازش مدل	۲۲۴۴۲.۳۹	۳	۷۴۸۰.۷۹	۹.۰۴۷E+۰۰۵	< ۰.۰۰۰۱	**
	خطای خالص	۰.۰۰۳۳	۴	۸.۲۶۹E+۰۰۳			
	مجموع	۱.۰۷۸E+۰۵	۱۲				
DPPH	مدل	۱۵۰.۱۷	۲	۷۵.۰۸	۱.۸۱	۰.۲۱۲۹	ns
	A-غلظت حلال	۱۴۰.۸۴	۱	۱۴۰.۸۴	۳.۴۰	۰.۰۹۵۰	
	B- زمان استخراج	۹.۳۳	۱	۹.۳۳	۰.۲۳	۰.۶۴۵۳	
	باقی‌مانده‌ها	۴۱۴.۱۹	۱۰	۴۱.۴۲			
	عدم برازش مدل	۴۱۴.۱۲	۶	۶۹.۰۲	۳۹۰۶.۱۰	< ۰.۰۰۰۱	**
	خطای خالص	۰.۰۰۷۱	۴	۰.۰۱۸			
مجموع	۵۶۴.۳۶	۱۲					

جدول ۳. ضرایب رگرسیونی مدل‌های چندگانه و خطی برای پیش‌بینی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه بن‌سرخ تحت شرایط مختلف استخراج

پاسخ	فاکتور	ضرایب	R ²	R ² تعدیل یافته
رژیم‌های فنولی کل	Intercept	۱۵۸.۷۸	۰.۸۶۰۱	۰.۷۶۰۲
	غلظت حلال A-	-۱۳.۴۹		
	زمان استخراج B-	۱۴۵.۲۷		
	AB	-		
	A ²	-		
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی	Intercept	-۳.۱۸	۰.۹۶۲۸	۰.۹۳۶۲
	غلظت حلال A-	۶.۳۵		
	زمان استخراج B-	۱۶۶.۵۹		
	AB	-۲۷.۵۳		
	A ²	۲۰۰.۸۱		
FRAP	Intercept	۱۰.۰۹	۰.۷۱۵۴	۰.۵۱۲۱
	غلظت حلال A-	۱۳.۷۵		
	زمان استخراج B-	۶۶.۳۵		
	AB	۱۰.۸۰		
	A ²	۹۶.۴۷		
DPPH	Intercept	۲۵.۰۶	۰.۳۳۵۲	۰.۲۰۲۲
	غلظت حلال A-	-۴.۸۵		
	زمان استخراج B-	-۱.۲۵		

رابطه (۲) $Total\ phenolic\ compounds = +158.78 - 13.49 A + 145.27 B$



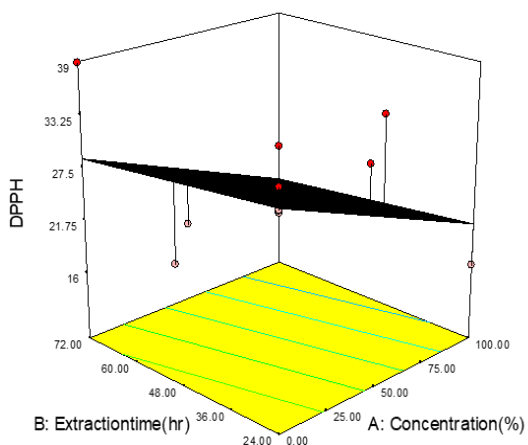
قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌های استخراجی: شکل ۶
 منحنی‌های سه‌بعدی و دوبعدی روند تغییرات قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ، تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزایش زمان استخراج، میزان قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌ها روند افزایشی را طی می‌کند.
 معادله‌ی درجه‌ی دوم، مدل آماری جهت محاسبه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب میزان قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌های استخراجی در رابطه‌ی ۳ ارائه شده است. در این معادله، A غلظت حلال (v/v) و B زمان استخراج (ساعت) می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه‌ی رگرسیون، در صورت استفاده از رابطه‌ی (۳) می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب میزان قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌های استخراجی را با دقت ۷۱/۵۴ درصد پیش‌بینی نمود (جدول ۳).

رابطه (۳)

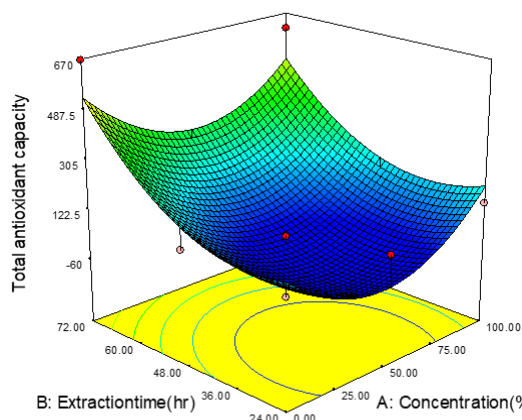
$$FRAP = +10.09 + 13.75 A + 66.35 B + 10.80 AB + 96.47 A^2 + 62.25 B^2$$

شکل ۶. نمودار دوبعدی (کنتور) و سه‌بعدی تغییرات میزان قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ تحت تأثیر غلظت حلال اتانولی و زمان استخراج (دمای استخراج ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد)

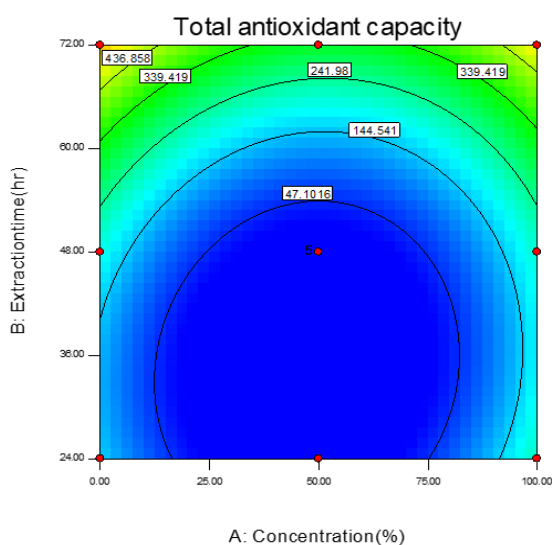
با افزایش غلظت حلال اتانول تا ۵۰ درصد، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی روند نزولی دارد و سپس با افزایش غلظت حلال اتانول، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های افزایش می‌یابد. با افزایش زمان استخراج، میزان انتقال جرم در فرآیند استخراج افزایش یافته و ترکیبات مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهتر از داخل سلول‌ها خارج می‌شوند.



B: Extractiontime(hr) 36.00 24.00 0.00 A: Concentration(%)



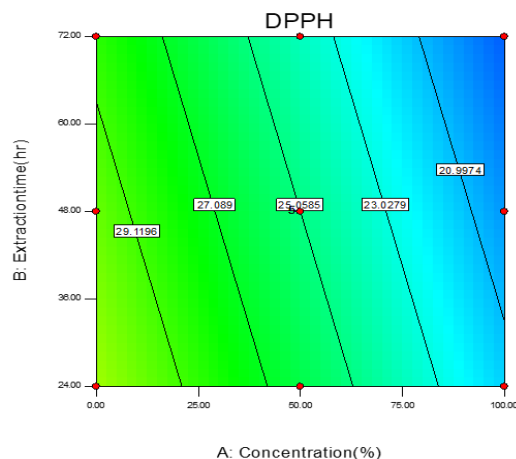
B: Extractiontime(hr) 36.00 24.00 0.00 A: Concentration(%)



A: Concentration(%)

شکل ۸. نمودار دوبعدی (کنتور) و سه‌بعدی تغییرات میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ تحت تأثیر غلظت حلال اتانولی و زمان استخراج (دمای استخراج ۴۰ درجه سانتی‌گراد)

خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی: منحنی‌های دوبعدی و سه‌بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های الکلی گیاه بن‌سرخ، تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) در شکل ۷ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت اتانول، میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های اتانولی حاصل کاهش می‌یابد. همچنین با افزایش زمان استخراج، خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند ثابت دارد.



A: Concentration(%)

شکل ۷. نمودار دوبعدی (کنتور) و سه‌بعدی تغییرات میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ تحت تأثیر غلظت حلال اتانولی و زمان استخراج (دمای استخراج ۴۰ درجه سانتی‌گراد)

رابطه‌ی ۴ مدل آماری خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی را نشان می‌دهد. همان‌طور که از نتایج جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی، رابطه‌ای خطی داشت که از دقت کافی برای پیش‌بینی برخوردار نیست و در صورت استفاده از این رابطه، می‌توان تنها ۳۳/۵۲٪ انتظار دقت داشت. رابطه ۴)

$$DPPH = +25.06 - 4.85 A - 1.25 B$$

خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استخراجی: منحنی‌های دوبعدی (کنتور) و سه‌بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های اتانولی گیاه بن‌سرخ، تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان‌های مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) در شکل ۸ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزایش زمان استخراج، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های اتانولی افزایش می‌یابد؛ اما

دستیابی به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حفظ ترکیبات فعال و به حداقل رساندن خسارت حرارتی در زمان‌های طولانی استخراج می‌باشد، بنابراین همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، متغیرهای مستقل غلظت حلال در محدوده‌ی اعمال شده (۰-۱۰۰٪) و زمان استخراج جهت کاهش تأثیر نامطلوب حرارت بر ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی حداقل در نظر گرفته شده است. همچنین متغیرهای وابسته‌ی نظیر مقدار ترکیبات فنولی کل، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH و میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها حداکثر در نظر گرفته شده است. در فرآیند بهینه‌سازی به تمامی پارامترهای مستقل، وزن و اهمیت یکسان داده شد. با توجه به شرایط مورد نظر، راه‌حل دارای بالاترین مطلوبیت، مناسب‌ترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه‌حل اول (با شرایط: زمان استخراج ۶۳/۹۰ دقیقه و غلظت حلال اتانولی ۰) به عنوان بهترین شرایط جهت دستیابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد. در صورت اعمال شرایط راه‌حل اول، خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از گیاه بن‌سرخ به صورت بهینه حفظ می‌شود (شکل ۹).

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل برای عصاره‌ی اتانولی، با مدل آماری درجه‌ی دوم در سطح آماری ۰.۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه‌ی واریانس جدول ۲ و ضرایب رگرسیونی حاصل جدول (۳)، معادله‌ی درجه‌ی دوم مدل آماری جهت محاسبه‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ی هیدروالکلی بن‌سرخ در رابطه‌ی (۵) آورده شده است. در این معادله، A غلظت حلال (v/v) و B زمان استخراج (ساعت) می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه‌ی رگرسیون، در صورت استفاده از رابطه‌ی (۵) می‌توان میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها را با دقت ۹۶/۲۸٪ پیش‌بینی نمود.

رابطه (۵)

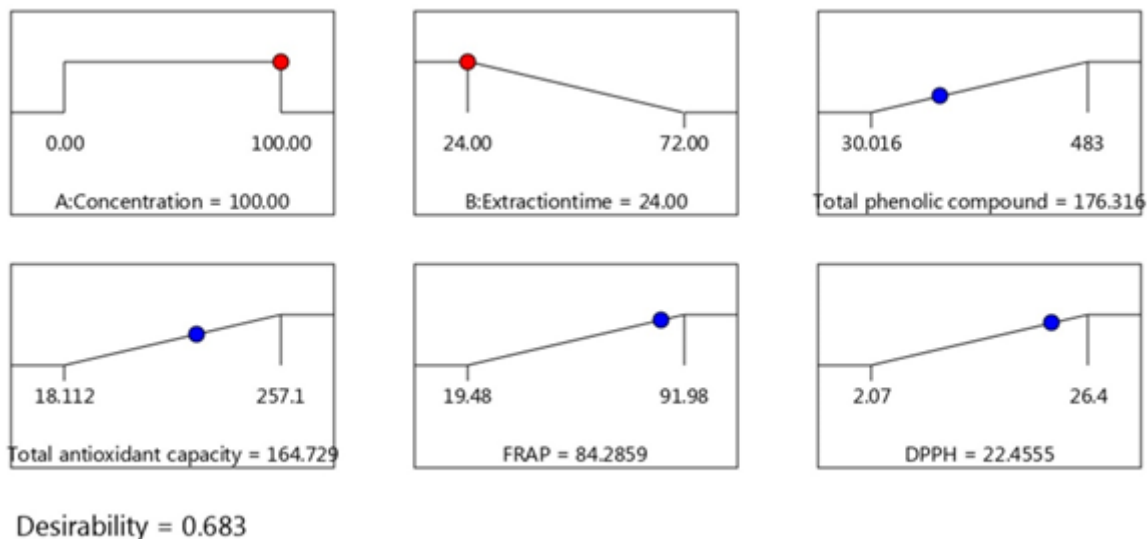
$$\text{Total antioxidant capacity} = -3.18 + 6.35 A + 166.59 B - 27.53 AB + 200.81 A^2 + 148.90 B^2$$

بهینه‌سازی فرآیند استخراج عصاره از گیاه بن‌سرخ تحت شرایط مختلف استخراج با حلال

جدول ۳ شرایط تعیین شده برای متغیرهای مستقل جهت بهینه‌سازی استخراج عصاره از گیاه بن‌سرخ و شرایط بهینه‌شده را نشان می‌دهد. از آنجا که در فرآیندهای استخراج، هدف

جدول ۴. ضوابط مورد استفاده برای بهینه‌سازی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی گیاه بن‌سرخ تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج

فاکتور	هدف	حد پایین	حد بالا
A: غلظت	در محدوده	۰	۱۰۰
B: زمان استخراج	حداقل	۲۴	۷۲
ترکیبات فنولی کل	حداکثر	۳۷.۴۷	۶۷۵.۰۰
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل	حداکثر	۲۳.۵۷	۶۶۵.۷۴
FRAP	حداکثر	۲۱.۵۲	۳۲۰.۶۲
DPPH	حداکثر	۱۶.۸۰	۳۸.۸۷



شکل ۹. نتایج حاصل از بهینه‌سازی استخراج عصاره از گیاه بن‌سرخ با استفاده از حلال اتانولی

اثر کشندگی عصاره‌ی بهینه‌ی بن‌سرخ بر پروتواسکولکس‌های اکینووکوس گرانولوزوس

در مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی آبی ۱۰۰٪ گیاه بن‌سرخ درصد کشندگی بالایی در زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه داشت؛ به طوری که درصد کشندگی این عصاره به طور میانگین در هر سه زمان و هر ۴ بار تکرار آزمایش به ترتیب ۹۰/۲۷، ۹۸/۳۳ و ۱۰۰٪ بود. همچنین این در حالی است که در مطالعه‌ی دیگر، عصاره‌ی متانولی و آبی بن‌سرخ بر تمامی باکتری‌های گرم مثبت و منفی آزمایش تأثیر مثبتی نشان داد (۱۳). نتایج دو مطالعه همخوانی نزدیکی با یکدیگر دارند، اما از تفاوت‌های آن‌ها می‌توان به استفاده از غلظت ثابت در این مطالعه و غلظت متغیر در مطالعه‌ی دیگر اشاره کرد.

• بحث

گیاهان با دارا بودن ترکیبات فنولی و زیست فعال مختلف، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فراوانی نیز دارند که می‌توان با اعمال شرایط مناسب استخراج به عصاره‌ی با بالاترین ترکیبات زیست فعال و خواص آنتی‌اکسیدانی دست یافت. همان‌طور که نتایج ارزیابی ترکیبات فنولی کل و خواص آنتی‌اکسیدانی نشان داد، با افزایش غلظت حلال اتانولی به علت اینکه از قطبیت حلال استخراجی (میزان آب حلال) کاسته می‌شود، حلال نمی‌تواند ترکیبات قطبی و فنولی بیشتری را استخراج نماید. از طرف دیگر، زمان استخراج تأثیر مهمی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی کل دارد، زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند تا به بافت گیاهی نفوذ کند و ترکیبات فنولی فرصت کافی برای جدا شدن از سوبسترای خود و ورود به حلال اطراف را دارند که با نتایج به‌دست‌آمده توسط مورلو و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت (۲۵). شعبانیان و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که با افزایش زمان استخراج، میزان جرم در فرآیند استخراج افزایش یافته و ترکیبات مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر از داخل سلول‌ها خارج می‌شوند (۱۷). نتایج مطالعه‌ی اخیر نشان داد که با افزایش غلظت حلال اتانول و به علت کاهش قطبیت حلال استخراجی، میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراجی روند نزولی داشته که منجر به کاهش مقدار قدرت احیاء‌کنندگی عصاره‌ها می‌شود (۲۶). افزایش میزان قدرت احیاء‌کنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، با افزایش زمان استخراج نیز می‌تواند به علت افزایش میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها تحت شرایط استخراج طولانی مدت باشد.

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که غلظت حلال، تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت.

همچنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH وابسته به غلظت حلال بوده و با افزایش غلظت حلال، قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره افزایش می‌یابد. از آنجا که رابطه‌ی مستقیمی بین فعالیت گیرندگی رادیکال با میزان ترکیبات فنولی در میوه‌ها وجود دارد (۲۸، ۲۷)، بنابراین با افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراج‌شده، انتظار می‌رود که درصد مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها افزایش یابد؛ ولی در تحقیق حاضر علی‌رغم افزایش مقدار ترکیبات فنولی، با افزایش زمان استخراج، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های حاصل کاهش یافت که با نتایج سایر محققین متفاوت است.

مطالعه حاضر اثر پروتواسکولکس‌کشی قابل توجه عصاره آبی خالص بن‌سرخ را نشان داد. مطالعات گذشته از جمله پژوهش حجتی و علی‌زاده (۱۴۰۰) نشان دادند که عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ دارای ویژگی‌های ضد‌اکسایشی و ضد میکروبی بوده و می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی جهت جلوگیری از اکسیداسیون غذاهای حاوی اسیدهای چرب غیرا شباع و هم‌چنین کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد مؤثر باشد (۱۵). به علاوه اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی گیاه بن‌سرخ به اثبات رسیده است. به علاوه اثرات ضد قارچی که عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ بر روی جدایه‌های *تریکوفایتون منتاگروفایتیس* مشخص شده است (۲۸). اگرچه تاکنون اثر گیاه بن‌سرخ بر روی مراحل تکاملی سستوده‌های بیماری‌زا بررسی نشده است اما بررسی سیستماتیک گیاهان دارویی مورد استفاده علیه *اکینووکوس گرانولوزوس*، نشان داد که ۵۲ گونه‌ی گیاهی متعلق به ۲۲ خانواده در سراسر جهان، دارای خاصیت اسکولکس‌کشی *اکینووکوس گرانولوزوس* هستند که پرمصرف‌ترین آن‌ها متعلق به خانواده‌های *Lamiaceae* و *Apiaceae* و ترکیبات گیاهی حاوی بربرین، تیمول و تیموکینون است (۱۰). در مطالعات مذکور، نتایج اثرات اسکولکس‌کشی اسانس گیاهان مختلف، نشان داد که اثر بخشی آن‌ها در محیط آزمایشگاه، پس از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه و با آسیب به لایه‌ی زیای کیست هیداتید اتفاق می‌افتد. فیضی و همکاران (۱۳۹۴) پس از بررسی اثر ضد پروتواسکولکسی عصاره گیاه درمنه بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید نشان دادند که عصاره متانولی درمنه فاقد اثر پروتواسکولکس‌کشی بود (۲۴). مطالعه رحیمی اسبونی (۲۰۱۶) اثر اسکولکس‌کشی بالای عصاره اولتراسونیک سیر را نشان داده است (۲۹). محمودوند و همکاران (۱۳۹۸) با بررسی اثر عصاره گیاه بلوط بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید، نشان دادند که در اثر

پروتواسکولکسها را از بین ببرد (۳۵). مقایسه‌ی نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر نشان می‌دهد که عصاره‌ی بن-سرخ، فعالیت ضد پروتواسکولکسی مطلوبی دارد. مطالعات هدفمند آتی در جهت تجزیه تفکیکی ترکیبات گیاه بن‌سرخ و دست‌یابی به بهترین ماده مؤثره در توقف حیات پروتواسکولکس‌های کیست هیداتید پیشنهاد می‌شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثرات افزایشی استخراج میزان ترکیبات فنولی از حلال‌های مورد مطالعه، رابطه‌ی مستقیم با اضافه کردن آب دارد. علاوه بر آن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل با اضافه کردن آب، افزایش می‌یابد که علت آن بالا رفتن قطبیت حلال است.

به طور کلی به نظر می‌رسد که می‌توان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی پیشنهاد نمود. از طرف دیگر، نتایج آزمایشات برون‌تنی (in vitro) نشان داد که عصاره‌ی آبی خالص گیاه بن‌سرخ، کاندید مناسب اسکولکس‌کشی کیست هیداتید در محیط‌های درون‌تنی (in vivo) می‌تواند باشد؛ زیرا عصاره‌ی گیاه در مدت زمان ۳۰ دقیقه قادر است تمام پروتواسکولکس‌ها را از بین ببرد. در حالی که با تهیه‌ی رقت از عصاره، مدت زمان بیشتری برای کشتن پروتواسکولکس‌ها لازم است. لذا به نظر می‌رسد که عصاره‌ی گیاه بن‌سرخ، فعالیت ضد میکروبی و ضدانگلی کمتری دارد.

مواجهه غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه بلوط، میزان کشندگی پروتواسکولکس‌ها پس از ۵ دقیقه ۱۰۰ درصد بوده است (۳۰). برخی اسانس‌ها مانند اسانس آویشن شیرازی، سبب کاهش وزن و اندازه کیست می‌گردد، اما به طور کامل کیست را از بین نمی‌برد (۱۱). در مطالعه ملکی فرد و همکاران (۱۳۹۷)، عصاره خرنوب در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بعد از گذشت ۳۰ دقیقه موجب از بین رفتن تمام پروتواسکولکس‌ها شد (۳۱). در مطالعه بهرامی و همکاران (۱۳۹۴)، اسانس ترتیزک در غلظت ۱۵ میلی‌گرم پس از ۶۰ دقیقه، همه پروتواسکولکس‌ها را از بین برد (۳۲). در مطالعه فیضی و همکاران (۱۳۹۶)، مخلوط عصاره‌های زنجبیل و اکالیپتوس بعد از ۱۵ و ۳۰ دقیقه مواجهه به ترتیب ۹۷/۲۴ و ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها را از بین بردند (۳۳) همچنین حسینی و همکاران (۱۳۹۶)، بیان کردند که در مواجهه اسانس درمنه با پروتواسکولکس‌ها پس از ۱۲۰ دقیقه، ۹۹/۳ درصد پروتواسکولکس‌کشی گزارش شد (۳۴). همان‌طور که ملاحظه می‌شود در مطالعات قبلی در زمان مواجهه ۳۰ دقیقه عصاره یا اسانس با کیست، پروتواسکولکس‌ها به طور کامل از بین نرفته و یا در زمان مواجهه طولانی بالاتر (۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه)، ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها از بین رفته‌اند. در تحقیقی دیگر عصاره خوشاریزه حاصل از ۲۴ ساعت استخراج با اتانول خالص (۱۰۰٪) در زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه توانست ۱۰۰ درصد

• References

- Darabi F, Bakhtiari M, Matini S, Matini M. Seroepidemiology of *Hydatid cyst* in outpatients attending health centers in Arak city, Iran. *AJCM* 2022; 102(28): 238-243.
- Junghanss T, Da Silva AM, Horton J, Chiodini PL, Brunetti E. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 301-311.
- Mcmanus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *The Lancet* 2003; 362: 1295-1304.
- Gouran M, Yousefi MR, Abuhosseini M. Evaluation of manthol and nanomethol scolicidal effect compare to albendazole *Echinococcus granulosus* protoscolex invitro. *Vet Mic* 2022; 17: 1-12 (in Persian).
- Anvari M, Amirjamshidi A, Abbassioun K. Gradual and complete delivery of a *Hydatid cyst* of the brain through a single burr hole, a wrong happening. *Child Nerv Sys* 2009; 25(12): 1639-42.
- Kayaalp C, Balkan M, Aydin C, Ozgurtas T, Tanyuksel M, Kirimlioglu V, et al. Hypertonic saline in hydatid disease. *World J Surg* 2001; 25: 975-9.
- Abbassi dezfuly A, Sheesheene P, Shadmeh MB, Ghaffari Nejad MH. Experimental study of the effects of scolicidal agents on liver bile ducts. *Res Med* 1991; 15(3 And 4): 26-31 (in Persian)
- Muller R, Robin Bker R. *Medical Parasitology*. Lippincott; 1990. p. 136-148.
- Arfaa F. *Medical Helminthology*. CBS Publiser and Distributors P Ltd; 2012. p. 251-258.
- Ali R, Khan S, Khan M, Adnan M, Ali I, Khan TA, et al. A systematic review of medicinal plants used against *Echinococcus granulosus*. *Plos One* 2020; 15: e0240456.
- Khaksaria M, Meshkatosadat MH, Farazifard R, Safarpour F. Investigation of the analgesic effects of the essence and extract *Allium jesdianum* herb across different types of pain. *Yafteh* 2008; 9: 21-26 (in Persian).
- Karimi N, Behbahani M, Dini GH, Razmjou A. Green synthesis of ZnO nanoparticles using extract of edible and medicinal plant (*Allium jesdianum*). *RJMS* 2018; 25(9): 1-7 (in Persian).
- Gholami A, Arabestani M R, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of *Allium Jesdianum* plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. *Pajouhan Sci J* 2016; 14 (4): 18-26.
- Amiri H. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Allium jesdianum* Boiss & Buhse from Iran. *J Med Plants* 2007; 26:39-44 (in Persian).

- 15- Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. Iranian Food Sci Tech Res J 2021; 17 (1:8391) (in Persian).
16. Moshiri Roshan A, Sari AA, Aghajani N, Daraei Garmakhany A. Ajowan seed ethanolic extract: extract optimization, phenolic compounds and antioxidant properties. Iranian J Food Sci Tech 2020; 104(17): 51-64 (in Persian).
17. Shabaniyan M, Sari A, Daraei Garmakhani A. Optimization of ethanolic extracts of walnut green peel extracted by microwave and investigation of their antioxidant properties. Iranian J Food Sci Tech 2021; 115(18): 283-298 (in Persian).
18. Jamshidi M, Ahmadi-Ashtiani HR, Rezazadeh Sh, Fathiazad F, Mazandarani A, Khaki D. Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. J Med Plants 2010; 9(34): 177-182 (in Persian).
19. Shahdadi F, Mirzaei HO, Daraei Garmakhany A. Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. J Food Sci Tec 2015; 52: 1814-1819.
20. Azari-Anpar M, Payeinmahali H, Daraei Garmakhany A, Sadeghi Mahounak A. Physicochemical, microbial, antioxidant, and sensory properties of probiotic stirred yoghurt enriched with Aloe vera foliar gel. J Food Process Preserv 2017; 41(5): e13209.
21. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. J Agr Food Chem 2001; 49, 4083-4089.
22. Madani A, Choobkar N, Daraei Garmakhany A. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity of Iranian *Allium sativum* controversum extracts and their antimicrobial properties in fresh sausages. Food Sci Nutr 2022; doi.org/10.1002/fsn3.3059.
23. Shahdadi F, Mirzaei HO, Daraei Garmakhan A, Mirzaei H, and Ghafari Khosroshahi A. Effect of drying process on antioxidant properties of date palm fruits. Minerva Biotechnol 2013; 25(4): 235-243.
24. Feizi F, Moradkhani SH, Matini M, Parandin F, Roushan A, Fallah M. Study the solicial effects of the extracts of *Ginger (Zingiber officinale)* and *Artemisia (Artemisia aucheri)* on protoscoleces of *Hydatid Cyst* in vitro. AMUJ 2015; 18(101): 45-52 (in Persian).
25. Morello JR, Motilva MJ, Tovar MJ, Romero M.P. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage with special emphasis on the phenolic fraction. Food Chem 2004; 85, 357-364.
26. Spigno G, Tramelli D, Favari MD. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. J Food Eng 2007; 81: 200-208.
27. Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Bahloul N, Lognay G, Drira NE. Date seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. J Food Lipids 2004; 11:251-265.
28. Razzaghi Khezezlo S, Sharifzadeh A, Soltani M, Shokri H, Khosravi A. Determination of genetic diversity and susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* isolates against antifungal effects of ethanolic extract of *Allium jesdianum*. Iranian Vet J 2017; 13(3): 56-66 (in Persian).
29. Rahimi -Esboei B, Ebrahimzadeh M, Fathi H & Rezaei Anzahaei F. Scolicidal effect of *Allium sativum* flowers on *hydatid cyst* protoscolices. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016; 20: 129-132.
30. Mahmoudvand H, Mirzaei M, Khatami M, Mahmoudvand H, Kheirandish F, Niazi M, Sepahvand M, Nadri S. In vitro and ex vivo effects of *Quercus infectoria* extract on *hydatid cyst* protoscolecs. Yafteh 2019; 21(3): 144-152.
31. Malekifard F, Keramati F. Investigation of the effects of *Ceratonia siliqua* extract on protoscoleces of *Hydatid cyst* in vitro. Armaghane-danesh, Yasuj University Med Sci J (YUMSJ) 2018; 21 (1): 69-79.
32. Bahrami S, RaziJalali MH, Ramezani Z , Pourmehdi Boroujeni M, Toeimepour F. Invitro scolicial effect of *Lepidium sativum* essential oil. J Ardabil Uni Med Sci 2015; 15(4): 395 – 403.
33. Faizi F, Parandin F , Moradkhani SH , Rezaee N , sardar M , Roushan A, Fallah M. Scolicidal effects of mixture of *Artemisia*, *Eucalyptus* and *Ginger* extracts on *Hydatid cyst* protoscolices. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (157): 83 - 91 (Persian)
34. M JHosseini , MR Youssefi , M. Abouhosseini .Comparison of the effect of *Artemisia Sieberi* essential Oil and albendazole drug on protoscolices of *Hydatid cyst* under in vitro conditions . J Babol Univ Med Sci 2017; 19 (12): 63 - 8.
35. Ghorbanipour M, Sadeghi Dehkordi Z, Sazmand AR, Daraei Garmakhany A, Falah M, Sari AA. Optimizing the extraction conditions (solvent concentration and extraction time) of aqueous, alcoholic and hydroalcoholic extracts of *Echinophora platyloba*: antioxidant properties and its lethal effect on *hydatid cyst* Protoscoleces in vitro condition. J Food Sci Technology (Iran) (in Persian).

Investigation of Antioxidant Characteristics and *In Vitro* Protoscolicidal Effects of Aqueous, Alcoholic and Hydroalcoholic Extracts of *Allium Jesdianum* Against Protoscoleces of *Echinococcus granulosus*

Ghorbanipour M¹, Sadeghi Dehkordi Z^{2*}, Sazmand A³, Daraei Garmakhany A⁴, Sari A⁵

1- Msc graduated Student of Parasitology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- *Corresponding author: Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tuyserkan Faculty of Engineering and Natural Resources, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

5- Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received 3 Jan, 2023

Accepted 24 Apr, 2023

Background and Objectives: *Allium jesdianum* and its extract include antioxidant effects. The aim of this study was to optimize extraction conditions of *Allium jesdianum* to assess antioxidant characteristics of the extracts and its phenolic compounds as well as assessing *in vitro* protoscolicidal effects of the extracts.

Materials & Methods: Extracts of *Allium jesdianum* were prepared using various ethanol concentrations of 0, 50 and 100% at various extraction times of 24, 48 and 72 h. The optimal extract conditions were estimated using response surface methodology and the optimized extract was chosen for the experiments. Then, concentrations of 200, 400 and 600 ppm were prepared to assess their protoscolicidal effects after the parasite exposure for 5, 15 and 30 min.

Results: Increases in the extraction time were positively correlated with increases in phenolic compound concentrations and antioxidant characteristics of the extracts. However, increasing ethanol concentrations included inverse effects on the two parameters. Moreover, 100 µl/ml aqueous extract of *Allium jesdianum* (63.90 min) inactivated 100% of protoscoleces after 30 min of exposure.

Conclusion: Results showed that aqueous extracts of *Allium jesdianum* could inactive protoscoleces of hydatid cysts *in vitro*.

Keywords: Hydatidosis, *Allium jesdianum*, Optimum extraction, Scolicide