



بهینه سازی شرایط استخراج (غلظت حلال و زمان استخراج) عصاره آبی، الکلی و هیدورالکلی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*)، خصوصیات آنتی اکسیدانی و اثر کشندگی آن بر پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی

میلاد قربانی پور<sup>۱</sup>، زینب صادقی دهکردی<sup>۲\*</sup>، علیرضا سازمند<sup>۳</sup>، امیر دارایی گرمه خانی<sup>۴</sup>، محمد فلاح<sup>۵</sup>، عباسعلی ساری<sup>۵</sup>

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

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

۳-دانشیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی تویسرکان دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۴-استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

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

| اطلاعات مقاله                                                             | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| تاریخ های مقاله :                                                         | اکینوкокوزیس سیستمیک (هیداتیدوزیس) یک بیماری مهم و شایع مشترک بین انسان و حیوان است که توسط مرحله لاروی سستودهای جنس/اکینوкокوس ایجاد می گردد. اگرچه در بسیاری از موارد بیماری در انسان، درمان انتخابی جراحی است ولی به طور ثانویه ممکن است در مرحله تخلیه کیست باعث انتشار نوزادان انگل (پروتواسکولکس ها) و مسبب رشد کیست های جدید شود. در حال حاضر از محلول هایی نظیر نمک های پیرتونیک و نترات نقره برای غیر فعال کردن محتویات کیست استفاده می شود که عوارض جانبی برای بیماران به همراه دارند. بنابراین نیاز به یافتن ترکیبات پروتواسکولکس کش جدید با تأثیر بیشتر و عوارض کمتر همیشه مورد توجه بوده است. هدف از این تحقیق، بهینه سازی شرایط استخراج عصاره گیاه خوشاریزه و بررسی ویژگی های آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی حاصل از آن و نیز خاصیت کشندگی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط آزمایشگاهی بود. برای این هدف، ابتدا عصاره هیدورالکلی گیاه خوشاریزه تحت تأثیر غلظت های ۰، ۵۰ و ۱۰۰٪ اتانول و طی مدت زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت استخراج گردید. برای تعیین بهترین شرایط استخراج عصاره ها از روش سطح پاسخ استفاده گردید و عصاره گیری در شرایط بهینه صورت گرفت. نهایتاً از عصاره های استخراجی در شرایط بهینه غلظت های ppm ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ تهیه گردید و تأثیر آن ها بر پروتواسکولکس های زنده استحصال شده از کیست های هیداتید کبد گوسفند و بز از کشتارگاه همدان بررسی گردید. نتایج نشان داد عصاره خوشاریزه حاصل از ۲۴ ساعت استخراج با اتانول خالص (۱۰۰٪) در زمان های ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه می تواند ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها را از بین ببرد. نتایج آزمایشات بیرون تنی ( <i>in vitro</i> ) حاضر پیشنهاد می دهد که عصاره اتانولی گیاه خوشاریزه می تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت استفاده در محیط های درون تنی ( <i>in vivo</i> ) استفاده شود. |
| کلمات کلیدی:                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| کیست هیداتید، خوشاریزه، عصاره بهینه، پروتواسکولکس کش.                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DOI: 10.22034/FSCT.19.132.313<br>DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.23.6 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| * مسئول مکاتبات:                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| dehkordisz@gmail.com<br>z.sadeghidehkordi@basu.ac.ir                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## ۱- مقدمه

هیداتیدوزیس بیماری زئونوز با انتشار جهانی است که توسط مرحله لاروی کرم‌های نواری کمپلکس /کینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود [۱]. بیماری در ایران هایپراندمیک بوده و جوامع درگیر را از نظر بهداشتی و اقتصادی محتمل خسارات زیادی می‌کند [۲]. تخمین زده می‌شود که خسارت اقتصادی ناشی از این بیماری در کشور سالانه حدود ۲۳۲ میلیون دلار باشد [۳]. سگ‌سانان میزبان نهایی انگل هستند و انسان به عنوان میزبان تصادفی، با خوردن آب، سبزیجات و مواد غذایی آلوده به تخم انگل مبتلا می‌شود [۴]. درمان کیست هیداتید در انسان دارای پیچیدگی‌های متعددی است. اگرچه روش عمل جراحی جهت خارج کردن کیست‌های انگل از بدن بیمار یکی از کارآمدترین روش‌ها می‌باشد، اما به علت وجود کیست‌های دور از دسترس برای جراحی، عدم خارج کردن کامل لایه زایای کیست در حین جراحی و خطر عود بیماری، محققان به دنبال ترکیبات اسکولکس کش با تأثیر بیشتر و عوارض جانبی کمتر هستند. استفاده از نمک هایپرتونیک به عنوان عامل پروتواسکولکس کش به صورت گسترده در جراحی، سبب بروز عوارضی مانند کلانژیت اسکروزان و تنگی مجاری صفراوی شده است [۵]. عوارض جانبی فرمالین نسبت به سایر ترکیبات شیمیایی، بیشتر شایع است زیرا تماس فرمالین با مجاری صفراوی، سبب انهدام یاخته‌های اپی‌تلیال و در نهایت نکروز کبدی می‌گردد [۶]. با این وجود نیاز به یافتن پروتواسکولکس کش گیاهی با تأثیر بیشتر و عوارض کمتر به عنوان جایگزین همیشه مورد توجه قرار گرفته است.

گیاهان سال‌های زیادی است که در سراسر جهان برای درمان و پیشگیری از بعضی بیماری‌ها استفاده می‌شوند. به صورت خاص مطالعات متعددی در زمینه اثرات پروتواسکولکس کشی گیاهان مختلف مانند عصاره خرنوب [۷]، اسانس ترتیزک [۸]، مخلوط عصاره زنجبیل و اکالیپتوس [۹]، اسانس درمنه [۱۰] صورت گرفته است. در یک مطالعه‌ی مروری سیستماتیک، ۵۲ گونه‌ی گیاهی متعلق به ۲۲ خانواده به عنوان عامل اسکولکس کش /کینوکوکوس گرانولوزوس معرفی شدند که

پرمصرف‌ترین آن‌ها متعلق به خانواده Lamiaceae (۲۵ درصد) و Apiaceae (۱۱/۳ درصد) و ترکیبات گیاهی بربرین، تیمول و تیموکینون بوده است [۱۱]. در مطالعه مذکور، نتایج اثرات اسکولکس کشی اسانس گیاهان مختلف، نشان داد که اثر بخشی آن‌ها در محیط آزمایشگاه، پس از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه و با آسیب به لایه زایای کیست هیداتید اتفاق می‌افتد. 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 میلی گرم در میلی‌لیتر بعد از گذشت ۳۰ دقیقه موجب از بین رفتن تمام پروتواسکولکس‌ها شد [۷]. در مطالعه بهرامی و همکاران ۱۳۹۴، اسانس ترتیزک در غلظت ۱۵ میلی گرم پس از ۶۰ دقیقه، همه پروتواسکولکس‌ها را از بین برد [۸]. 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 [۹]. در مطالعه حسینی و همکاران (۱۳۹۶)، مواجهه اسانس درمنه با پروتواسکولکس‌ها پس از ۱۲۰ دقیقه، ۹۹/۳ درصد پروتواسکولکس کشی گزارش شد [۱۰]. 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.

گیاه خوشاریزه با نام علمی *Echinophora platyloba* از خانواده چتریان و از گیاهان انحصاری ایران بوده و به عنوان چاشنی غذایی و معطر کردن غذا استفاده می‌شود. این گیاه به نام‌های محلی خوشاروز، خوشاروزه، تیغ توراغ و کشندر معروف است [۱۱]. خوشاریزه از خانواده آمبلیفرا و یک گیاه دائمی در مناطق مدیترانه‌ای و همچنین در استان‌های مرکزی و غربی ایران است [۱۲]. انتهای برگ‌ها خاردار است و از خرداد ماه تا شهریور ماه شکوفه می‌روید. در ایران بخش‌های هوایی و خشک شده برخی از گونه‌ها، به عنوان چاشنی به پنیر و ماست اضافه می‌شود. همچنین گونه‌های مربوط به *Echinophora* در پزشکی سنتی به منظور بهبود زخم و درمان زخم معده به سبب ویژگی ضد قارچی و ضد نفخ استفاده می‌شود [۱۲].

آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ (سارتوریوس آلمان)، دستگاه اسپکتروفوتومتر دو پرتویی ماوراء بنفش- مرئی (پی جی اینسترومنت، انگلستان)، سانتریفیوژ آزمایشگاهی (سیگما، آلمان)، دستگاه تیخیر کننده چرخشی (ای کا آ آر وی ۱۰ آلمان)، pH متر (دنور آلمان)، دستگاه بن ماری (فن آزما گستر ایران)، شیکر لوله (لابینکو پارس خزر، ایران) بود.

## ۲-۲- روش تهیه عصاره خوشاریزه

پس از تمیز کردن گیاه خوشاریزه، برگ و ساقه گیاه جداسازی و آسیاب شد. به منظور تهیه عصاره، از حلال‌های آب خالص، اتانول خالص ۱۰۰ درصد و مخلوط آب و اتانول (۵۰٪) به نسبت ۵ به ۱ استفاده شد. مخلوط‌های حلال و گیاه خوشاریزه در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی هیتر همزن- دار با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در طول آزمایش، سطح حلال با اضافه کردن حلال تازه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. پس از زمان‌های مختلف استخراج، عصاره‌ها با کاغذ واتمن شماره ۴۰ صاف و با دستگاه اوپراتور چرخشی تغلیظ و تا زمان آزمایش (حداکثر ۴ روز) درون ظروف استریل در دمای یخچال نگهداری شدند.

## ۲-۳- آزمایش‌های انجام شده روی عصاره‌ها

### ۲-۳-۱- میزان ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتو ارزیابی شد [۱۸]. بدین منظور ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین به آن اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در محیط تاریک، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد به محلول اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه درون بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. مقادیر ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک در گرم نمونه محاسبه گردید.

مطالعات قبلی نشان داد این گیاه دارای ترکیبات ساپونین، فلاونوئید و آلکالوئید بوده و عصاره‌ی متانولی خوشاریزه بر رشد باکتری و قارچ اثر مهارکننده دارد [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگر، اثرات ضد درد عصاره هیدروالکلی گیاه خوشاریزه در موش صحرایی نر، به ترکیبات فلاونوئید و آلکالوئید نسبت داده شده است [۱۳]. همچنین، فعالیت ضد سرطان، اثرات ضد میکروبی و محافظت از کبد در برابر سمیت حاصل از استامینوفن توسط این گیاه نشان داده شده است [۱۲]. از سوی دیگر، این ترکیبات به دلیل ساختار فنولی می‌توانند جایگزین موثری برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی باشند [۱۴] چرا که آنتی اکسیدان‌های طبیعی علاوه بر داشتن خواص آنتی اکسیدانی، در کاهش سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی و سایر بیماری‌های مرتبط با پیری موثر هستند [۱۵]. با توجه به اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی [۱۶، ۱۷] گیاه خوشاریزه دست- یابی به شرایط بهینه برای استخراج عصاره آن که دارای حداکثر ترکیبات مؤثره موجود در گیاه باشد ضروری است. بنابراین این مطالعه با بررسی شرایط موثر بر استخراج عصاره‌های گیاهی نظیر نوع و غلظت حلال مورد استفاده و زمان استخراج عصاره به منظور بهینه سازی شرایط استخراج عصاره جهت دست یابی به عصاره‌ای با بالاترین ترکیبات مؤثره و اقتصادی- ترین روش عصاره‌گیری انجام شد. در بخش دوم تحقیق حاضر، از آنجا که در زمینه بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره خوشاریزه و تعیین عصاره بهینه جهت اثر اسکولکس- کشی تحقیقی صورت نگرفته است، اثر عصاره‌ی بهینه بر پروتواسکولکس‌های /کینوکوکوس/گرنولوزوس مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد و تجهیزات

در این تحقیق گیاه خوشاریزه از بازار گیاهان دارویی شهر همدان خریداری شد. همه مواد شیمیایی از شرکت مرک و حلال‌ها از شرکت‌های داخلی با بالاترین خلوص تهیه شدند. همچنین دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده شامل مخلوط کن خانگی (سانی، ایران)، آون (فن آزما گستر، ایران)، ترازوی

DPPH طبق روش ارائه شده [۱۹] انجام شد. به این صورت که ابتدا یک میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH با ۳ میلی‌لیتر از عصاره‌ها مخلوط شد و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و در نهایت، فعالیت بر حسب درصد مهار DPPH طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\% \text{ مهار رادیکال آزاد DPPH} =$$

$$100 \times \frac{\text{جذب محلول DPPH حاوی عصاره‌ها - جذب محلول DPPH (شاهد)}}{\text{جذب محلول DPPH (شاهد)}}$$

(جذب محلول DPPH شاهد)

## ۲-۳-۴- تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل [۱۸]، ابتدا ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول معرف (مخلوط اسیدسولفوریک، فسفات سدیم، مولیبدات آمونیوم) آماده شد. نیم میلی‌لیتر عصاره با ۵ میلی‌لیتر محلول معرف مخلوط گردید، سپس به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن تا دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر قرائت شد. برای تهیه نمودار استاندارد از گالیک اسید استفاده شد [۱۸].

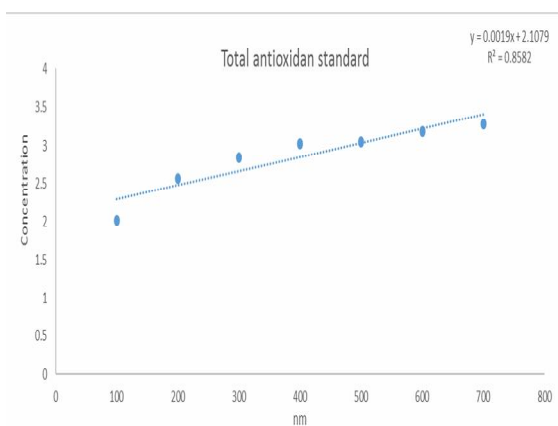


Fig 3 Standard gallic acid curve in total antioxidant test

## ۲-۴- بررسی اثر عصاره‌های تولیدی بر

### پروتواسکولکس های اکینوкокوس گرانولوزوس

از شهریور تا دی ماه ۱۴۰۰، ریه و کبد‌های گوسفندان آلوده به کیست هدا تید از کشتارگاه صنعتی شهرستان همدان، طی ۲۰ نوبت جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا منتقل شد. در شرایط

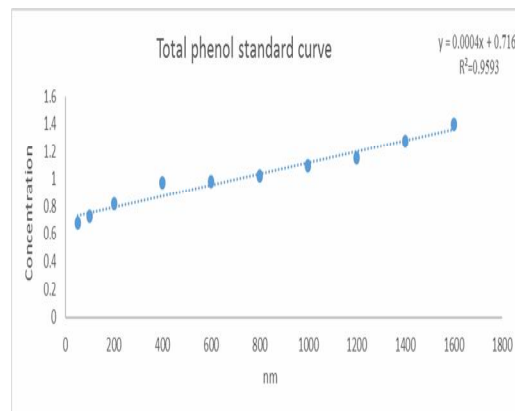


Fig 1 Standard gallic acid curve in total phenolic compounds test

## ۲-۳-۲- آزمون قدرت احیاء کنندگی آهن (FRAP)

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی با استفاده از روش ییلدریم و همکاران [۱۸]، انجام شد. در این روش، یک میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم مخلوط گردید. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید به مخلوط اضافه گردیده و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتی‌فیوژ شدند. سپس، از-محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۳ مخلوط شده و جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری قرائت شد. برای رسم نمودار استاندارد از استاندارد اسید گالیک استفاده گردید.

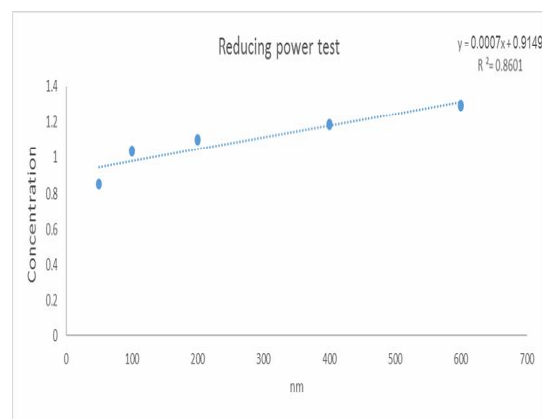


Fig 2 Standard gallic acid curve in FRAP test

## ۲-۳-۳- اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد

### DPPH

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال فعال

مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. برای رسم نمودارهای سه بعدی و بهینه سازی داده ها از نرم افزار 11.0.2 Design Expert استفاده شد. همچنین نتایج پروتواسکولکس کشی عصاره ها بر اساس طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار (۲۰۰۱) SAS استفاده شد. مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید [۲۰].

**Table 1** Independent variables and levels used to optimize the antioxidant properties of ethanolic extracts of *Echinophora platyloba* extract under different extraction conditions.

| Independent variables       | Levels and limits of variables |    |     |
|-----------------------------|--------------------------------|----|-----|
|                             | -1                             | 0  | +1  |
| Extraction time (hr)        | 24                             | 48 | 72  |
| Solvent concentration (v/v) | 0                              | 50 | 100 |

### ۳- نتایج و بحث

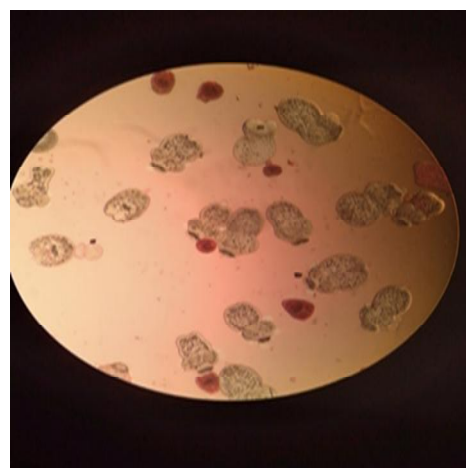
#### ۳-۱- بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ترکیبات

##### فنولی عصاره های گیاه خوشاریزه

##### ۳-۱-۱- ترکیبات فنولی کل عصاره های استخراجی

روند تغییرات ترکیبات فنولی کل عصاره های گیاه خوشاریزه تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج شامل زمان استخراج و غلظت های مختلف حلال اتانولی در شکل ۵ ارائه شده است. همان طور که ملاحظه می شود با افزایش زمان استخراج، میزان ترکیبات فنولی کل روند افزایشی را طی می کند در حالیکه با افزایش غلظت حلال اتانول میزان ترکیبات فنولی استخراجی کاهش می یابد. پیش از این نشان داده شده است که با افزایش غلظت حلال اتانولی از قطبیت حلال استخراجی (میزان آب حلال) کاسته می شود و بنابراین حلال نمی تواند ترکیبات قطبی و فنولی بیشتری را استخراج نماید [۲۳].

استریل، محتویات کیست ها با سرنگ به درون لوله های فالتکون منتقل و پس از برش عرضی و تخلیه مایع کیست، با استفاده از پنس استریل، غشای زایا درون پلیت منتقل شد. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی غشای زایا شستشو داده شد تا پروتواسکولکس بیشتری به دست آید. مایع کیست در زیر میکروسکوپ مشاهده و بارور بودن و یا نبودن مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۲۰ میکرولیتر مایع حاوی پروتواسکولکس با ۲۰ میکرولیتر رنگ اتوزین ۰/۱ درصد روی لام میکروسکوپی، مخلوط شد و زیر میکروسکوپ مشاهده شد. پروتواسکولکس های مرده به رنگ قرمز و پروتواسکولکس های زنده بی رنگ باقی می ماند [۸].

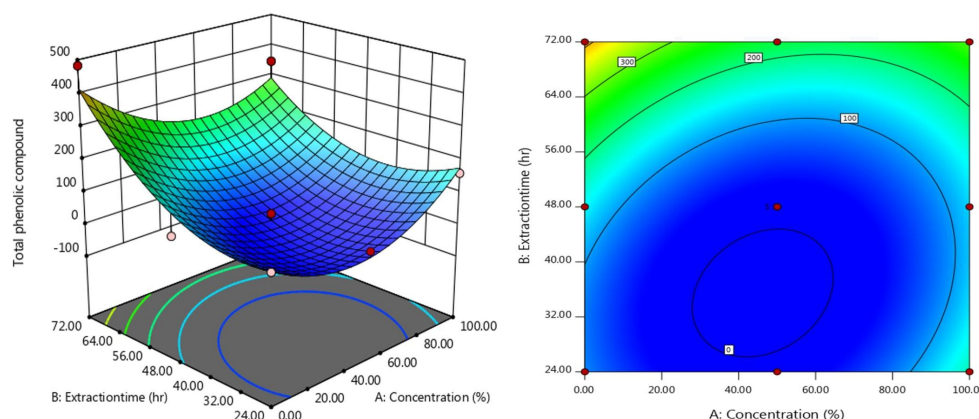


**Fig 4** Protoscolices expoused with eosin (after exposure to the stain, dead protoscolices absorbed eosin and colored red, alive protoscolices remained colorless).

#### ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری و بهینه سازی

به منظور بهینه سازی شرایط استخراج عصاره های گیاه خوشاریزه تحت تأثیر غلظت حلال و زمان استخراج از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی (CCD)<sup>۱</sup> با ۳ سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی برای بررسی تأثیر شرایط استخراج بر خواص آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل مورد استفاده قرار گرفت (+۱، ۰، -۱). در این تحقیق محدوده ی متغیرهای مستقل غلظت حلال مورد استفاده ( $X_1$ ) و زمان استخراج عصاره ( $X_2$ ) از آزمون های اولیه استنتاج گردید (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش بینی نشده در پاسخ های

1. Central Composite Design



**Fig 5** 3D and 2D diagram of changes in total phenolic compounds (mg Gallic acid per 100 g of *Echinophora platyloba*) of ethanolic extracts of a *Echinophora platyloba* under the influence of ethanol solvent concentration and extraction time (extraction temperature of 40°C).

بیانگر افزایش راندمان استخراج عصاره گیری با افزودن آب به عصاره ها بود همچنین مشخص شد با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی بالاتری استخراج می شود اما در دماهای بالاتر به علت تخریب حرارتی ترکیبات فنولی خواص آنتی اکسیدانی عصاره ها کاهش یافت [۱۸].

شعبانیان و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه ای عصاره ی پوست سبز گردو با حلال اتانول (در غلظت های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد) در توان های مختلف ماکروویو (۹۰، ۴۵۰، ۹۰۰ وات) و فواصل زمانی متفاوت (۱، ۸ و ۱۵ دقیقه) را استخراج کردند و به منظور تعیین عصاره ی بهینه جهت افزودن به روغن، میزان کل ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش های قدرت احیاء کنندگی، مهار رادیکال فعال DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را اندازه گیری نمودند. نتایج بیانگر افزایش استخراج ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی با افزایش توان مایکروویو و زمان استخراج بود در حالیکه با افزایش غلظت اتانول (استفاده از اتانول خالص) میزان استخراج ترکیبات فنولی کل به علت کاهش قطبیت حلال در مقایسه با عصاره هیدروالکلی کاهش یافت. همچنین در توان های بالای مایکروویو با طولانی شدن زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی کل و خواص آنتی اکسیدانی کاهش یافت که می تواند به دلیل اثر تخریبی حرارت تولیدی بر ترکیبات فنولی طی زمان های طولانی استخراج باشد [۲۲].

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از تجزیه ی واریانس داده های حاصل از اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی کل برای عصاره ی اتانولی با مدل آماری درجه ی دوم در سطح آماری ۰/۵٪ معنی دار بود (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) و

همچنین طبق نتایج مطالعه ی حاضر و همسو با مطالعات گذشته از جمله مورلو و همکاران (۲۰۰۴) زمان استخراج تأثیر مهمی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی کل داشت [۱۲]. دلیل این مشاهده می تواند ناشی از این موضوع باشد که با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می کند تا به بافت گیاهی نفوذ کند و ترکیبات فنولی فرصت کافی برای جدا شدن از سوبسترای خود و ورود به حلال اطراف را دارند [۲۲]. از طرفی اعمال استخراج توأم با حرارت به راحتی می تواند اجزای گیاهی را تخریب کند و ترکیبات گیاهی به درون محیط وارد شوند [۲۵]. به همین دلیل با اعمال فرایند استخراج هیدروترمال میزان ترکیبات فنولی استخراج شده روند صعودی دارد. در کل روش های حرارتی به ویژه آن هایی که در محیط مرطوب انجام می پذیرد از طریق شکستن دیواره سلولی باعث آزاد شدن هرچه بیشتر ترکیبات فنولی می شوند [۱۸]. لذا این روش جهت تحقیقات آینده پیشنهاد می شود.

هوشمند و مهدیان (۱۳۹۳) امکان استخراج عصاره گیاه خوشاریزه با امواج فراصوت را مورد مطالعه قرار دادند و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های تولیدی را به روش RFAP بررسی کردند. نتایج نشان داد که با افزایش دما و زمان فرایند مقدار قدرت احیاء کنندگی آهن عصاره افزایش می یابد اما در دما و زمان های بالا روند استخراج کاهش یافته است [۲۱].

در مطالعه مشیری و همکاران (۱۳۹۹)، عصاره دانه زنیان تحت شرایط مختلف استخراج با حلال اتانول در غلظت های (۰، ۵۰، ۱۰۰٪)، مدت زمان استخراج (۱۲، ۲۴ ساعت) و دمای استخراج (۵۰، ۲۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد تهیه شد. نتایج

$+109.37 B - 52.07 AB + 121.39 A^2 + 108.50 B^2$   
 با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون با استفاده از رابطه ۲ می‌توان  
 میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها را با دقت ۸۶/۰۱٪ پیش بینی  
 نمود.

ضرایب رگرسیونی حاصل (جدول ۳) معادله‌ی درجه‌ی دوم  
 مدل آماری جهت محاسبه‌ی میزان ترکیبات فنولی کل  
 عصاره‌ی اتانولی در رابطه‌ی شماره ۲ آورده شده است، در این  
 معادله، A معادل غلظت حلال (v/v) و B زمان استخراج بر  
 حسب ساعت می‌باشد.

$$\text{Total phenolic compounds} = +12.73 - 9.01 A$$

**Table 2** The analysis, variance of the regression coefficients of predicted linear and quadratic polynomial models for predicting antioxidant properties of *Echinophora platyloba* extract under different extraction conditions.

| Response                   | Source           | Sum of Squares | DF | Mean of Squares | F-value   | p-value  | significance    |
|----------------------------|------------------|----------------|----|-----------------|-----------|----------|-----------------|
| Total phenolic compounds   | Model            | 2.012E+05      | 5  | 40233.35        | 8.61      | 0.0067   | significant     |
|                            | A-Concentration  | 486.90         | 1  | 486.90          | 0.1042    | 0.7563   |                 |
|                            | B-Extractiontime | 71769.47       | 1  | 71769.47        | 15.36     | 0.0058   |                 |
|                            | AB               | 10844.10       | 1  | 10844.10        | 2.32      | 0.1715   |                 |
|                            | A <sup>2</sup>   | 40700.52       | 1  | 40700.52        | 8.71      | 0.0214   |                 |
|                            | B <sup>2</sup>   | 32514.76       | 1  | 32514.76        | 6.96      | 0.0335   | significant     |
|                            | Residual         | 32717.14       | 7  | 4673.88         |           |          |                 |
|                            | Lack of Fit      | 32717.11       | 3  | 10905.70        | 1.363E+06 | < 0.0001 |                 |
|                            | Pure Error       | 0.0320         | 4  | 0.0080          |           |          |                 |
|                            | Cor Total        | 2.339E+05      | 12 |                 |           |          |                 |
| Total antioxidant capacity | Model            | 82247.08       | 5  | 16449.42        | 36.21     | < 0.0001 | significant     |
|                            | A-Concentration  | 5489.53        | 1  | 5489.53         | 12.08     | 0.0103   |                 |
|                            | B-Extractiontime | 24249.73       | 1  | 24249.73        | 53.38     | 0.0002   |                 |
|                            | AB               | 5176.00        | 1  | 5176.00         | 11.39     | 0.0118   |                 |
|                            | A <sup>2</sup>   | 23574.74       | 1  | 23574.74        | 51.90     | 0.0002   |                 |
|                            | B <sup>2</sup>   | 7059.22        | 1  | 7059.22         | 15.54     | 0.0056   | significant     |
|                            | Residual         | 3179.89        | 7  | 454.27          |           |          |                 |
|                            | Lack of Fit      | 3179.73        | 3  | 1059.91         | 26303.74  | < 0.0001 |                 |
|                            | Pure Error       | 0.1612         | 4  | 0.0403          |           |          |                 |
|                            | Cor Total        | 85426.97       | 12 |                 |           |          |                 |
| FRAP                       | Model            | 6095.52        | 5  | 1219.10         | 3.52      | 0.0657   | not significant |
|                            | A-Concentration  | 58.88          | 1  | 58.88           | 0.1700    | 0.6925   |                 |
|                            | B-Extractiontime | 0.1727         | 1  | 0.1727          | 0.0005    | 0.9828   |                 |
|                            | AB               | 771.95         | 1  | 771.95          | 2.23      | 0.1792   |                 |
|                            | A <sup>2</sup>   | 3685.14        | 1  | 3685.14         | 10.64     | 0.0138   |                 |
|                            | B <sup>2</sup>   | 185.47         | 1  | 185.47          | 0.5353    | 0.4881   | significant     |
|                            | Residual         | 2425.22        | 7  | 346.46          |           |          |                 |
|                            | Lack of Fit      | 2424.72        | 3  | 808.24          | 6410.16   | < 0.0001 |                 |
|                            | Pure Error       | 0.5043         | 4  | 0.1261          |           |          |                 |
|                            | Cor Total        | 8520.74        | 12 |                 |           |          |                 |
| DPPH                       | Model            | 178.23         | 2  | 89.11           | 2.52      | 0.1299   | not significant |
|                            | A-Concentration  | 17.44          | 1  | 17.44           | 0.4934    | 0.4984   |                 |
|                            | B-Extractiontime | 160.79         | 1  | 160.79          | 4.55      | 0.0588   |                 |
|                            | Residual         | 353.51         | 10 | 35.35           |           |          | significant     |
|                            | Lack of Fit      | 353.51         | 6  | 58.92           | 1.178E+05 | < 0.0001 |                 |
|                            | Pure Error       | 0.0020         | 4  | 0.0005          |           |          |                 |
|                            | Cor Total        | 531.74         | 12 |                 |           |          |                 |

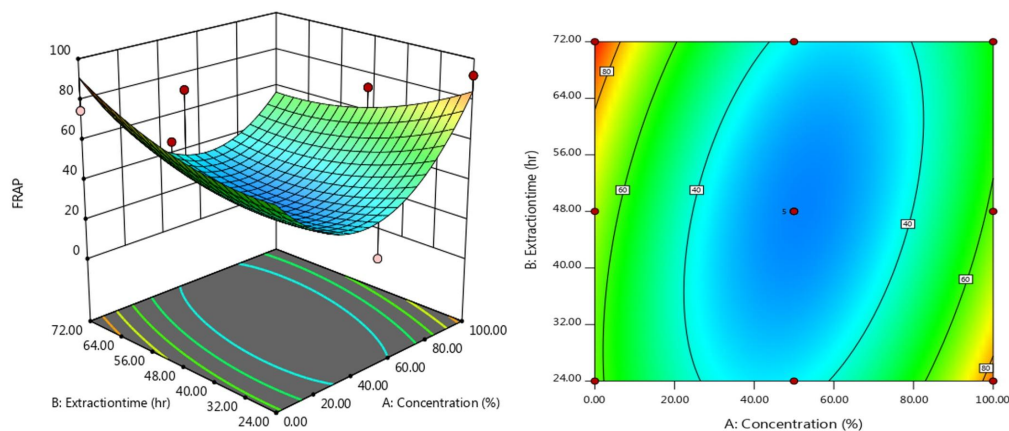
**Table 3** The regression coefficients of predicted quadratic polynomial and liner models for predicting different antioxidant activity of *Echinophora platyloba* extract under different extraction conditions.

| Response                   | Factor            | coefficients | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> adjusted |
|----------------------------|-------------------|--------------|----------------|-------------------------|
| Total phenolic compound    | Intercept         | 12.73        | 0.8601         | 0.7602                  |
|                            | A-Concentration   | -9.01        |                |                         |
|                            | B-Extraction time | 109.37       |                |                         |
|                            | AB                | -52.07       |                |                         |
|                            | A <sup>2</sup>    | 121.39       |                |                         |
|                            | B <sup>2</sup>    | 108.50       |                |                         |
| Total antioxidant capacity | Intercept         | 19.14        | 0.9628         | 0.9362                  |
|                            | A-Concentration   | 30.25        |                |                         |
|                            | B-Extractiontime  | 63.57        |                |                         |
|                            | AB                | -35.97       |                |                         |
|                            | A <sup>2</sup>    | 92.39        |                |                         |
|                            | B <sup>2</sup>    | 50.56        |                |                         |
| FRAP                       | Intercept         | 28.97        | 0.7154         | 0.5121                  |
|                            | A-Concentration   | -3.13        |                |                         |
|                            | B-Extractiontime  | 0.1697       |                |                         |
|                            | AB                | -13.89       |                |                         |
|                            | A <sup>2</sup>    | 36.53        |                |                         |
|                            | B <sup>2</sup>    | 8.19         |                |                         |
| DPPH                       | Intercept         | 15.57        | 0.3352         | 0.2022                  |
|                            | A-Concentration   | 1.70         |                |                         |
|                            | B-Extractiontime  | -5.18        |                |                         |

تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) را نشان می‌دهد.

### ۳-۱-۲- قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های استخراجی

شکل ۶ منحنی‌های سه بعدی و دو بعدی روند تغییرات قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های هیدرو-اتانولی گیاه خوشاریزه تحت



**Fig 6** 3D and 2D diagram of changes in reducing power of ethanolic extracts of a *Echinophora platyloba* under the influence of ethanol solvent concentration and extraction time (extraction temperature of 40°C).

عصاره‌های استخراجی با افزایش غلظت حلال اتانول روند نزولی داشت [۲۶] و قدرت احیاء کنندگی رابطه مستقیمی با میزان ترکیبات فنولی دارد [۲۷، ۲۸]. افزایش میزان قدرت احیاء کنندگی با افزایش زمان استخراج نیز می‌تواند به علت افزایش میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها تحت شرایط استخراج طولانی مدت باشد [۲۹].

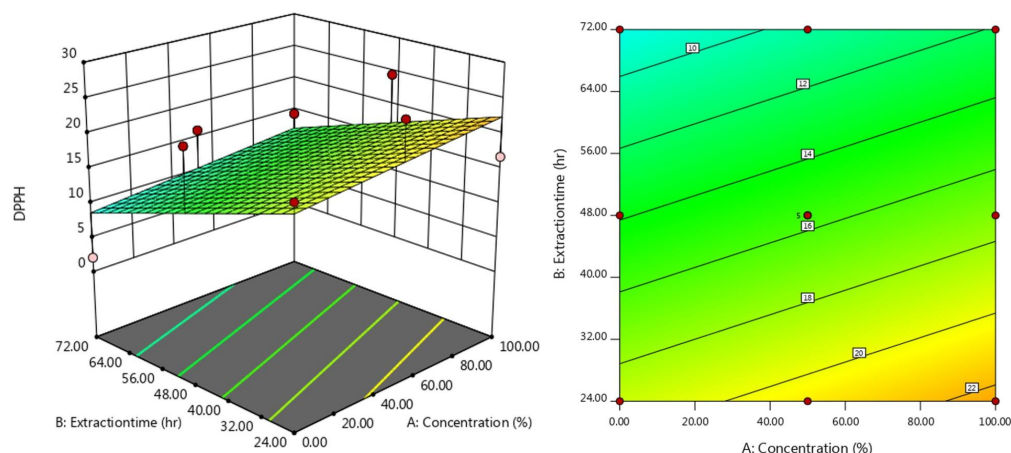
معادله‌ی درجه‌ی دوم مدل آماری جهت محاسبه‌ی فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های

همان طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اتانول تا ۵۰ درصد میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های استخراجی روند نزولی دارد و سپس با افزایش غلظت حلال اتانول میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها روند افزایشی نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌شود با افزایش زمان استخراج میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها روند تقریباً ثابت و توأم با افزایشی را طی می‌کند. با افزایش غلظت حلال اتانول مقدار قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها کاهش می‌یابد زیرا میزان ترکیبات فنولی

### ۳-۱-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال

#### DPPH عصاره‌های استخراجی

همان طور که در منحنی‌های سه بعدی و دو بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های الکلی گیاه خوشاریزه تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان استخراج و غلظت‌های مختلف حلال اتانولی) شکل ۷ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اتانول میزان خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های اتانولی حاصل افزایش می‌یابد.



**Fig 7** 3D and 2D diagram of changes in antioxidant properties of DPPH activated radical inhibition of ethanolic extracts of a *Echinophora platyloba* under the influence of ethanol solvent concentration and extraction time (extraction temperature of 40°C).

افزایش زمان استخراج، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های حاصل کاهش یافت که با نتایج سایر محققین متفاوت است. تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف به میزان ترکیبات فنولی هیدروفیل و هیدروفوب موجود در عصاره ارتباط دارد اساساً آزمایش DPPH فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی محلول در آب را اندازه گیری می‌کند. چن و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که عصاره آبی و متانولی به میزان ۸۰ تا ۸۲ درصد سبب مهار DPPH می‌شود [۳۱].

رابطه ۴ مدل آماری خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی رابطه‌ای خطی بود که از دقت کافی برای پیش بینی برخوردار نیست و در صورت استفاده از این رابطه می‌توان تنها ۳۳/۵۲٪ انتظار دقت

استخراجی در رابطه‌ی (۳) ارائه شده است، در این معادله، A معادل غلظت حلال (v/v) و B زمان استخراج بر حسب ساعت می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون در صورت استفاده از رابطه ۳ می‌شود با استفاده از رابطه ۳ می‌توان فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های استخراجی را با دقت ۷۱/۵۴٪ پیش بینی نمود (جدول ۳).

$$\text{FRAP} = +28.97 - 3.13 A + 0.1697 B - 13.89 AB + 36.53 A^2 + 8.19 B^2$$

بالاترین مقدار خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH (۲۶/۴۰) در محدوده زمان استخراج ۲۴ ساعت و غلظت ۵۰٪ حلال الکلی مشاهده شد. همچنین با افزایش زمان استخراج خاصیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند نزولی دارد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد، غلظت حلال تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت. همچنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت حلال بوده و با افزایش غلظت حلال فعالیت جذب رادیکال‌های آزاد آن‌ها افزایش می‌یابد. از آنجا که رابطه مستقیمی بین فعالیت گیرندگی رادیکال با میزان ترکیبات فنولی در میوه‌ها وجود دارد [۲۷، ۳۰]، بنابراین با افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراج شده انتظار می‌رود که درصد مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها افزایش یابد ولی در تحقیق حاضر علی‌رغم افزایش مقدار ترکیبات فنولی تحت تأثیر

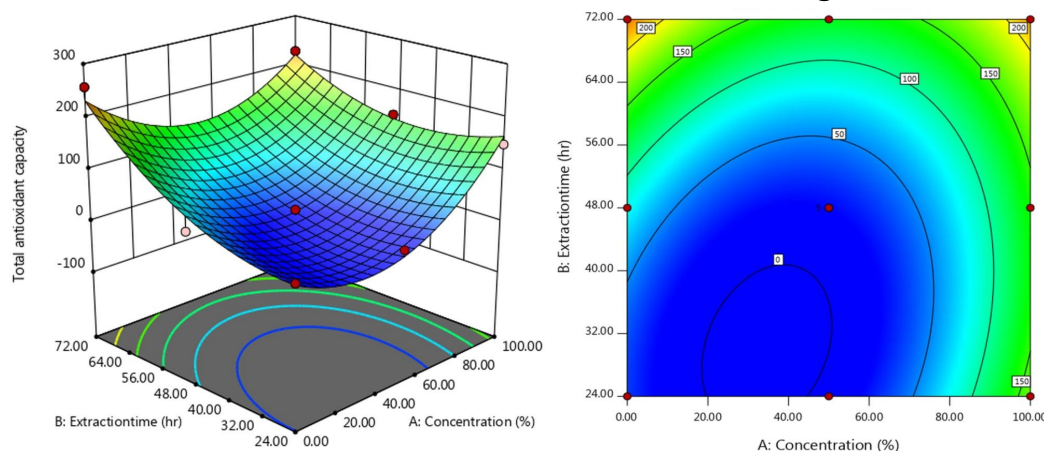
داشت.

$$\text{DPPH} = +15.57 + 1.70 A - 5.18 B$$

۳-۱-۴- خاصیت آنتی اکسیدانی کل عصاره های

استخراجی

همان طور که منحنی های دو بعدی (کنتور) و سه بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی کل عصاره های اتانولی گیاه خوشاریزه تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان های مختلف استخراج و غلظت های مختلف حلال اتانولی) نشان می دهند با افزایش زمان استخراج، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی



**Fig 8** 3D and 2D diagram of changes in total antioxidant capacity of ethanolic extracts of a *Echinophora platyloba* under the influence of ethanol solvent concentration and extraction time (extraction temperature of 40°C).

### ۳-۲- بهینه سازی فرآیند استخراج عصاره از گیاه خوشاریزه تحت شرایط مختلف استخراج با حلال

جدول ۳ شرایط تعیین شده برای متغیرهای مستقل جهت بهینه سازی استخراج عصاره از گیاه خوشاریزه و شرایط بهینه شده را نشان می دهد. از آنجا که در فرآیندهای استخراج هدف دستیابی به بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و حفظ ترکیبات فعال و به حداقل رساندن خسارت حرارتی در زمان های طولانی استخراج می باشد، بنابراین همان طور که در جدول ۴ مشاهده می شود متغیرهای مستقل غلظت حلال در محدوده اعمال شده (۱۰۰-۰٪) و زمان استخراج جهت کاهش تأثیر نامطلوب حرارت بر ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی حداقل در نظر گرفته شده است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی کل برای عصاره ای اتانولی با مدل آماری درجه ی دوم در سطح آماری ۰.۰۵٪ معنی دار شد (جدول ۲). با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) و ضرایب رگرسیونی حاصل (جدول ۳) معادله ی درجه ی دوم مدل آماری جهت محاسبه ی خاصیت آنتی اکسیدانی کل عصاره ای اتانولی در رابطه ی (۵) آورده شده است. در این معادله، A معادل غلظت حلال (v/v) و B زمان استخراج بر حسب ساعت می باشد. با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون در صورت استفاده از رابطه ۵ می شود می توان میزان خاصیت آنتی اکسیدانی کل عصاره ها را با دقت ۹۶/۲۸٪ پیش بینی نمود.

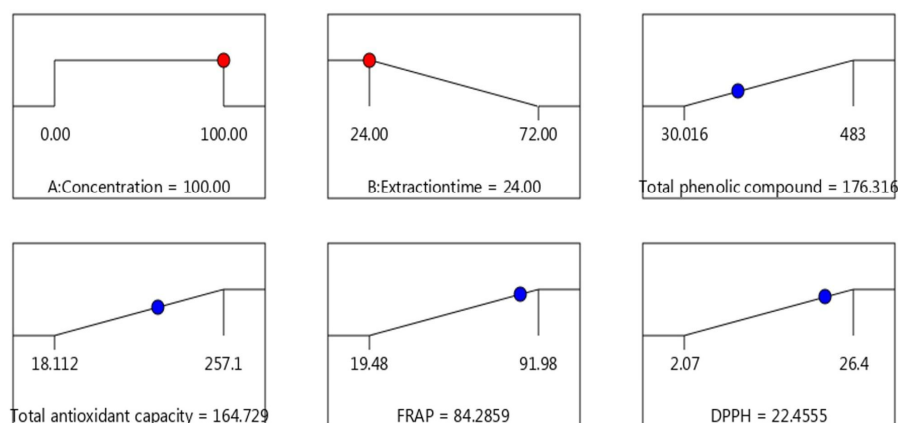
$$\text{Total antioxidant capacity} = +19.14 + 30.25 A + 63.57 B - 35.97 AB + 92.39 A^2 + 50.56 B^2$$

**Table 4** The constrain used to optimize the antioxidant properties of ethanolic extracts of *Echinophora platyloba* under the influence of different extraction conditions

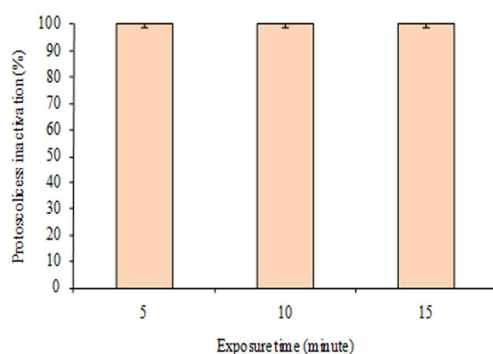
| name                       | Goal        | Lower limit | Upper limit |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| A:Concentration            | is in range | 0           | 100         |
| B:Extractiontime           | minimize    | 24          | 72          |
| Total phenolic compound    | maximize    | 30.016      | 483         |
| Total antioxidant capacity | maximize    | 18.112      | 257.1       |
| FRAP                       | maximize    | 19.48       | 91.98       |
| DPPH                       | maximize    | 2.07        | 26.4        |

مناسب‌ترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه حل اول با شرایط زمان استخراج ۲۴ ساعت و غلظت حلال اتانولی ۱۰۰٪ به عنوان بهترین شرایط جهت دستیابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد. در صورت اعمال شرایط راه حل اول خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از گیاه خوشاریزه به صورت بهینه حفظ می‌شود (شکل ۹).

همچنین متغیرهای وابسته‌ای نظیر مقدار ترکیبات فنولی کل، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH و میزان قدرت احیاء کنندگی 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 راه حل دارای بالاترین مطلوبیت،



Desirability = 0.683

**Fig 9** Results of optimizing the extraction of ethanolic extracts of *Echinophora platylob***Fig 10** Effect of *Echinophora platylob* extract on protoscolices inactivation (%)

### ۳-۳- اثر کشندگی عصاره بهینه بر

#### پروتواسکولکس‌های اکینو‌کوکوس گرانولوزوس

در مطالعه‌ی حاضر، عصاره اتانولی ۱۰۰ درصد گیاه خوشاریزه درصد کشندگی بالایی در زمان‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ داشت به طوری که درصد کشندگی این عصاره به طور میانگین در هر سه زمان و هر ۴ بار تکرار آزمایش ۱۰۰ درصد بود (شکل ۱۰).

- Trop Dis., 6(11), e1915, 1-10.
- [4] Eckert J., Deplazes P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev., 17, 107-135.
- [5] Kayaalp C., Balkan M., Aydin C., Ozgurtas T., Tanyuksel M., Kirimlioglu V., Akoglu M. Oner K. (2001). Hypertonic saline in hydatid disease. World J Surgery, 25, 975-979.
- [6] Abbasi Dezfouli A., Sheesheene P., Behkam Shadmehr M., Ghaffarinegad M.H. (1991). Experimental study of the effects of scolical agents on liver bile ducts. Res Med., 15 (3, 4), 26-31.
- [7] Malekifard F., Keramati F. (2017). Investigation of the effects of *Ceratonia Siliqua* extract on protoscolices of Hydatid cyst invitro. Armaghane-danesh, Yasuj Uni Med Sci J., 23(1), 69-79.
- [8] Bahrami S , Razi Jalali MH , Ramezani Z , Pourmehdi Boroujeni M , Toeimepour F . 2016, Invitro Scolical Effect of *Lepidium sativum* Essential Oil. J Ardabil Univ Med Sci., 15(4), 395-403.
- [9] Faizi F., Parandin F., Moradkhani Sh., Rezaee., Sardar M ., Roushan A ., Fallah M. (2018). Scolical effects of mixture of *Artemisia*, *Eucalyptus* and *Ginger Extracts* on Hydatid cyst protoscolices. J Mazandaran Univ Med Sci ., 27 (157), 83-91.
- [10] Hosseini M.J., Youssefi M.R., Abouhosseini M. (2017). Comparison of the effect of *Artemisia Sieberi* essential oil and *Albendazole Drug* on protoscolices of Hydatid cyst under invitro conditions. J Babol Univ Med Sci., 19 (12), 63-8.
- [11] Ali R., Khan S., Khan M., Adnan M., Ali I., Khan T.A., Haleem S., Rooman M., Norin S., Khan S. N. (2020). A systematic review of medicinal plants used against *Echinococcus granulosus*. PLOS ONE., <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240456> 6 15, e0240456.
- [12] Morello J.R., Motilva M.J., Tovar M.J., Romero M.P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage with special emphasis on the phenolic fraction. Food Chem., 85, 357-364.
- [13] Asgari Nematian M., Mohammadi S. (2016). The analgesic effect of *Echinophora Platyloba* hydroalcoholic extract in male rats. J Babol Univ Med Sci., 18(5), 31-7.
- [14] Shahdadi F, Mirzaei HO, Daraei

در مطالعات قبلی اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی گیاه مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر مثبت آن نشان داده شده است. به طور مثال اثر ضد قارچی عصاره گیاه خوشاریزه بر درماتوفیت های شایع تریکوفیتون شوئن لاین و تریکوفیتون ورورکوزوم در غلظت های ۳۵، ۵۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داده شد [۳۳]. در مطالعه ای دیگر، تأثیر مهارکنندگی قابل توجه عصاره متانولی خوشاریزه علیه سوش نوکاردیای بیماری زا گزارش شد [۳۴]. همچنین تأثیر ضد باکتریایی قوی اسانس خوشاریزه بر باکتری های /استافیلوکوکوس /رئوس گزارش شده است [۳۵]. به نظر می رسد فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد پروتواسکولکس کشی خوشاریزه مرتبط با وجود آلکالوئیدها و فلاونوئیدهای موجود در این گیاه باشد [۱۴، ۲۸].

#### ۴- نتیجه گیری کلی

تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که با افزودن آب به حلال های مورد مطالعه کارایی آن ها در استخراج ترکیبات فنولی افزایش یافته و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل افزایش می یابد که به علت افزایش قطبیت حلال می باشد. در مجموع می توان چنین بیان کرد که می توان از آنتی اکسیدان های طبیعی به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی استفاده نمود. همچنین نتایج آزمایشات بیرون تنی (in vitro) نشان داد که می توان از عصاره اتانولی ۱۰۰ درصد گیاه خوشاریزه به عنوان یک کاندیدای مناسب در محیط های درون تنی (in vivo) استفاده نمود. بدین منظور ارزیابی کارایی این عصاره در مدل تجربی آلودگی با کیست هیداتید و نیز بررسی آثار جانبی احتمالی در حیوانات و متعاقباً انسان پیشنهاد می شود.

#### ۵- منابع

- [1] Abunna F., Fentaye S., Megersa B., Regassa A. (2012). Prevalence of bovine hydatidosis in Kombolcha Elfora abattoir, north eastern Ethiopia. J Anim Sci., 2, 281-286.
- [2] Junghanss T., Da Silva A. M., Horton J., Chiodini P.L. Brunetti E. (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. Am J Trop Med Hyg., 79, 301-311.
- [3] Fasihi Harandi M., Christine M., Budke Rostami S. (2012). The Monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. PLOS Negl

- Date seed oil: phenolic, tocopherol and sterol profiles. *J Food Lipids.*, 11, 251-265.
- [25] Clifford M.N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates -Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric.*, 80, 1033-1043 .
- [26] Shantha N.C., Decker E.A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int.*, 77(2), 421-424.
- [27] Somsu W., Kongkachuichai R., Sungpuag P., Charoensiri R. (2008). Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *J Food Comp Anal.*, 21, 187-197.
- [28] Spigno G., Tramelli L., De Faveri M.D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng.*, 81, 200-208.
- [29] Kumaran A., Karunakaran R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Sci Technol.*, 40(2), 344-352.
- [31] Chun S.S., Vatter D.A., Lin Y.T., Shetty K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*, 40, 809-816.
- [32] Hojjati M., Alizadeh Behbahani B. (2021). Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. *Iran Food Sci Technol Res.*, 17 (1), 83-91.
- [33] Avigegan M., Saadat M., Nilforushzadeh M.A., Hafizi M. (2006). Antifungal activity of *Echinophora platyloba* against dermatophytes. *J Med Plants.*, 18, 10-16.
- [34] Eshraghi S., Amin G.H., Othari A. (2009). Evaluation of antibacterial properties and review of 10 medicinal herbs on preventing the growth of pathogenic *Nocardia* species. *J Med Plants.*, 8(32), 60-78.
- [35] Pass M., Rashidipour M., Talei G.R., Doosti B. (2012). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of *Echinophora cinerea* essential oils. *J Med Herb.*, 3(2), 67-74.
- Garmakhany A. (2015). Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *J Food Sci Technol.* 52(3): 1814-1819. doi: 10.1007/s13197-013-1177-6.
- [15] Negi P.S. (2012). Review plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.*, 156, 7-17.
- [16] Abbasi N., Mahdavi S. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of *Echinophora Platyloba* essential oil and extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Innov Food Sci Technol.*, 8(3), 129-130.
- [17] Safari R., Shahhoseini S.R., Javadian S.R. (2018). Antibacterial and antioxidant effects of the echinophora cinerea extract on bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillet during two storage conditions. *J Aqua Caspian Sea.*, 3(2), 13-24.
- [18] Moshiri Roshan A., Sari A.A., Aghajani N., Daraei Garmakhany A. (2020). Ajowan seed ethanolic extract: extract optimization, phenolic compounds and antioxidant properties. *Iran J Food Sci Technol.*, 104(17), 51-64.
- [19] Rezai E.S., Jafari S.M., Khomeiri M., Bayat H. (2012). Antioxidant activity of toyserkani variety of walnut husk and comparison of its antiradical activity with synthetic antioxidants. *J Food Res (University of Tabriz).*, 22, 39-50.
- [20] Alikhani-Kupaei, M., and Daraei Garmakhany. A. 2012. Effect of microencapsulated essential oils on storage life and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* cv. *Camarosa*). *Qual Assur Saf Crop Foods.*, 4 (2): 106-112.
- [21] Houshmand M., Mehdian E. (2015). Ultrasound-assisted antioxidant activity of *Echinophora Platyloba* with FRAP 2. The Second National Conference on Agriculture and Sustainable Natural Resources., Tehran.
- [22] Shabanian M., Sari A., Daraei Garmakhani A. (2021). Optimization of ethanolic extracts of walnut green peel extracted by microwave and investigation of their antioxidant properties. *Iran J Food Sci Technol.*, 115(18), 283-298.
- [23] Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Bahloul N., Lognay G., Drira N.E. (2004).



## 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 *Protoscolex* in laboratory condition

Ghorbanipour, M. <sup>1</sup>, Sadeghi Dehkordi, Z. <sup>2\*</sup>, Sazmand, A. <sup>2</sup>,  
Daraei Garmakhany, A. <sup>3</sup>, Falah, M. <sup>4</sup>, Sari, A. <sup>5</sup>

1. Msc graduated student of Parasitology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2. Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Tuyserkan Faculty of Engineering and Natural Resources, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
4. Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan.
5. Assistant professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2022/ 11/ 14

Accepted 2023/ 01/ 04

#### Keywords:

Hydatid cyst,  
*Echinophora platyloba* ,  
Optimum extraction ,  
Scolicide.

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.313

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.23.6

\*Corresponding Author E-Mail:  
dehkordisz@gmail.com  
z.sadeghidehkordi@basu.ac.ir

### ABSTRACT

Cystic echinococcosis (hydatidosis) caused by the larval stage of cestodes of the genus *Echinococcus* is an important and prevalent zoonotic disease. In human patients, surgical removal of the cysts is the treatment of choice in many cases however, leakage of the larva (protoscoleces) during the surgery and formation of new cysts is a concern. Presently, different solutions such as hypertonic saline and silver nitrate are used to inactivate the cyst-dwelling protoscoleces but each have some side-effects hence searching for novel protoscolicide formulations with high efficacy and low side-effects has been always in the focus. The aim of this study was to optimize the extraction conditions of *Echinophora platyloba*, to evaluate antioxidant properties of the extracts and to assess their protoscolicidal effects *in vitro*. For this purpose, hydroalcoholic extracts of *Echinophora platyloba* were extracted in ethanol concentrations of 0, 50 and 100% and during 24, 48 and 72 hours. Response surface methodology (RSM) was performed to estimate optimal extract conditions. Finally, 200, 400 and 600 ppm concentrations of optimized extracts were tested on live protoscoleces from sheep and goat livers collected from Hamedan abattoir. Results showed that *Echinophora platyloba* extract prepared with absolute ethanol in 24 hours could inactivate 100% of protoscoleces after 5, 15 and 30 minutes of exposure. This *in vitro* study suggests that ethanolic extract of *Echinophora platyloba* can potentially be applied *in vivo*.

