مقایسه روش‌های بروموکروزول گرین، تیتراسیون معکوس، واگنر و مایر حساسیت روش‌های مختلف برای ردیابی آلکالوئید در اسپیرولینا پلاتنسیس

محبوبه اکبری[۱]
مهناز هادی‌زاده[۲*]
حمیده افقی[۳]

۱. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۲. استادیار بیوشیمی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۳. دانشیار بیولوژی مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
hadizadehmahnaz@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۹
کد مقاله: ۱۳۹۷۰۴۰۶۱۸
این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

چکیده

ریز جلبک‌ها از منابع ارزشمند متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های زیستی متنوع هستند. از بین ترکیبات زیست فعال مختلف، آلکالوئیدها به دلیل داشتن خواص دارویی منحصربه‌فرد توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. روش‌های مختلفی جهت بررسی حضور آلکالوئید در منابع طبیعی وجود دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه حساسیت روش‌های مایر و واگنر با روش بروموکروزول گرین جهت ردیابی اولیه آلکالوئیدها در ریز جلبک‌ها بود. برای این منظور، در سال ۱۳۹۷ عصاره متانولی اسپیرولینا پلاتنسیس به‌عنوان مدل ریز جلبکی هیه گردید. با استفاده از دو روش استاندارد (مایر و واگنر) و روش رنگ سنجی بروموکروزول گرین، حضور آلکالوئیدها در این ریز جلبک بررسی شد. سپس کروماتوگرافی لایه‌نازک برای تأیید حضور آلکالوئیدها اجرا شد. محتوای آلکالوئید کل نیز با استفاده از روش تیتراسیون اسید- باز اندازه‌گیری شد. نتیجه‌ی ارزیابی عصاره متانولی اسپیرولینا پلاتنسیس برای حضور آلکالوئیدها توسط معرف‌های استاندارد، منفی بود؛ اما روش بروموکروزول گرین و کروماتوگرافی لایه‌نازک حضور آلکالوئید در ریز جلبک را نشان داد. میزان آلکالوئید کل به‌دست‌آمده از روش تیتراسیون اسید- باز، ۱۱/۴ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک ریز جلبک محاسبه شد که در مقایسه با مقدار به‌دست‌آمده از روش بروموکروزول گرین در سطح $P< ۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. درمجموع این مطالعه نشان داد که روش بروموکروزول گرین به دلیل سادگی، عدم نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و به‌خصوص حساسیت بالا، روش بهتری برای تعیین حضور آلکالوئیدها در زیست‌توده ریز جلبک‌ها است.

واژگان کلیدی: ریز جلبک، متابولیت ثانویه، مایر، واگنر، بروموکروزول گرین.

مقدمه

ریز جلبک‌ها یکی از باارزش‌ترین منابع طبیعی جهت تولید محصولاتی باقابلیت تجاری شدن مانند پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و رنگ‌دانه‌ها هستند (Caicedo *et al*., 2012; Batista *et al*., 2013). این موجودات فتوسنتز کننده علاوه بر تولیدات اصلی خود توانایی تولید انواع زیادی از متابولیت‌های ثانویه همچون آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استوژنین‌ها و... را دارند (Cuellar-Bermudez *et al*., 2015; Morais *et al*., 2015; Shanab *et al*., 2012).

از میان متابولیت‌های ثانویه مختلف شناسایی‌شده در ریزجلبک‌ها، آلکالوئیدها به‌خصوص به دلیل داشتن خواص دارویی منحصربه‌فرد توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند. آلکالوئیدها گروه متنوعی از ترکیبات پیچیده نیتروژن‌دار با وزن مولکولی پایین هستند که بر اساس منبع، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و پیش ماده‌های بیوسنتزی طبقه‌بندی می‌شوند (Pelletier, 1991). آلکالوئیدهای دارای حلقه هتروسیکلیک به‌عنوان متابولیت‌های

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

ثانویه نقش دفاعی در حفاظت از گیاهان در برابر آفات و عوامل بیماری‌زا را به عهده‌دارند. بسیاری از آلکالوئیدها علاوه بر نقش زیستی، دارای خواص دارویی بوده و از ارزش اقتصادی بسیاری برخوردار هستند. مورفین (ضد درد)، کودئین (ضدسرفه)، کوئینین (ضد مالاریا) و کولشی سین (ضد نقرس) نمونه‌هایی از داروهای با ساختار آلکالوئید هستند (Zdařilová *et al*., 2006).

گزارش‌های زیادی در ارتباط با استخراج و شناسایی آلکالوئیدها از گیاهان مختلف به‌عنوان منابع اصلی این متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Macabeo *et al*., 2005; Jenkins *et al*., 1996; Yuan *et al*., 2008; Wei *et al*., 2005; Dragull *et al*., 2003). از بین آلکالوئیدهای مختلف، آلکالوئیدهای تروپانی مانند آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین کاربرد پزشکی وسیعی دارند که می‌توان به مواردی از آن نظیر خنثی کردن سستی ماهیچه‌های صاف ناشی از ترکیبات فسفره آلی، کاهش علائم بیماری پارکینسون و کاهش ترشح عرق و اسید معده اشاره کرد. تولید صنعتی این آلکالوئیدهای دارویی امروزه با استفاده از روش‌های نوینی همچون کشت سلول و بافت گیاهی، کشت ریشه‌های مویین، هیبریداسیون سو ماتیکی، مهندسی متابولیک و به‌کارگیری بیوراکتورها انجام می‌شود ولی درمجموع بازده تولید آلکالوئیدها با روش‌های مذکور بسیار کم است و فقط در مورد متابوتیک‌های خیلی باارزش توجیه اقتصادی دارد (دهقان و همکاران، ۱۳۸۸).

علیرغم اینکه اخیراً ریز جلبک‌های فتوسنتتیک به‌عنوان منابع مهم تولید محصولات دارویی، غذایی، آرایشی، بهداشتی، صنعتی و سوختی توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند، اما در خصوص تولید آلکالوئیدها از آن‌ها، مطالعات کمی انجام‌شده است. ریز جلبک‌های سبز اصولاً به دلیل داشتن قرابت تکاملی با گیاهان عالی، مکانیسم‌های مولکولی مشابهی را جهت مقابله با استرس‌های محیطی به کار می‌برند. بر اساس این واقعیت، برخی گونه‌های جلبکی اساساً جهت تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه خاص، در شرایط استرسی ویژه‌ای در مقیاس وسیع کشت می‌شوند (Yu *et al*., 2015; Markou and Nerantzis, 2013).

روش‌های مختلفی برای بررسی وجود آلکالوئیدها در منابع طبیعی آن‌ها گزارش‌شده است که رایج‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از ۱) به‌کارگیری معرف‌های شیمیایی استاندارد مانند مایر (Mayer)، دراژندورف (Dragendorff)، واگنر (Wagner) و ارلیش (Erlich) ۲) انواع مختلف کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی لایه‌نازک، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Svendsen and Verpoorte, 1983) ۳) الکتروفورز بر روی کاغذ یا لایه‌نازک (Chen *et al*., 2008) و ۴) طیف‌سنجی ماوراءبنفش– مادون‌قرمز (Sreevidya and Mehrotra, 2003; Chan *et al*., 2007) اما زیست‌توده کم تولیدشده توسط ریز جلبک‌ها، ردیابی و شناسایی اولیه آلکالوئیدها در آن‌ها را در مقیاس کار آزمایشگاهی مشکل می‌سازد، بنابراین معرفی روشی ساده، سریع، ارزان و درعین‌حال با حساسیت بالا برای بررسی حضور آلکالوئیدها در ریز جلبک‌ها می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس یک ریز جلبک سبز–آبی رشته‌ای، چند سلولی و دارای شکل مارپیچی است که می‌تواند به‌خوبی هم در آب‌های شور و هم شیرین رشد کند. امروزه از این ریز جلبک به‌وفور در غنی‌سازی غذای انسان و حیوان استفاده می‌شود و از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا به‌عنوان غذای بی‌ضرر معرفی‌شده است (Kay and Barton, 1991; Narasimha *et al*., 1982; Maresca *et al*., 2013). این ریز جلبک دارای پروتئین بالا در حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک خود و طیف گسترده‌ای از ویتامین‌های مهم به‌استثنای ویتامین C، سطح بالایی از β کاروتن، اسیدهای چرب ضروری به‌ویژه لینولئیک اسید و عناصر معدنی مختلف مانند آهن و روی است. همچنین وجود متابولیت‌های ثانویه همچون آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و دارویی در اسپیرولینا ثابت‌شده است (Anbarasan *et al*., 2011).

بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر، مقایسه دقت و حساسیت روش‌های استفاده از معرف‌های مایر و واگنر با روش تشکیل کمپلکس با بروموکروزول گرین در شناسایی حضور آلکالوئید در ریز جلبک‌ها بود. برای این منظور از ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به‌عنوان یک مدل ریز جلبکی استفاده شد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار ۱۳۹۷ در پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران شروع شد. کلیه نمک‌های لازم جهت تهیه محیط کشت ریز جلبک اسپیرولینا از شرکت مرک خریداری شد. ترکیب محیط کشت زاروک مورداستفاده شامل سدیم بی‌کربنات به‌عنوان منبع کربنی و ترکیباتی مانند سدیم مولیبدات، سولفات مس، کلسیم کلراید، فروس سولفات به‌عنوان عناصر ضروری بود.

روش کشت بدین‌صورت بود که ابتدا ریز جلبک اسپیرولینا به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت زاروک استریل با pH برابر ۹ تلقیح شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۱۴ روز در معرض شدت نوری ۱۸۰ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و شرایط هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، در شیکر با دمای ۳۷ $^{\circ}C$ قرار گرفتند. پس‌ازاین مدت به‌منظور افزایش زیست‌توده ریز جلبکی، محتوای ارلن‌ها در ظرف پت ۲۰ لیتری و سپس حوضچه‌های ۲۵۰ لیتری تلقیح شدند (Shanab *et al.*, 2012). در شکل ۱ مراحل مختلف کشت ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس نشان داده‌شده است.

شکل ۱: مراحل مختلف کشت ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در الف) ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ب) ظروف پت ۲۰ لیتری و ج) حوضچه‌های ۲۵۰ لیتری.

برای استخراج آلکالوئید از ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، ابتدا عصاره متانولی یک گرم پودر این ریز جلبک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس عصاره خشک‌شده در اسیداستیک ۵ درصد حل‌شده و پس از عبور از صافی به آن ۲۰ میلی‌لیتر دی کلرومتان افزوده شد. از دو فاز تشکیل‌شده، فاز رویی (فاز آلی) کنار گذاشته شد و فاز زیرین (فاز آبی) با کمک سدیم بیکربنات قلیایی شد (pH = ۱۰). سپس دوباره با افزودن مقداری دی کلرومتان به محلول قلیای حاصل، دو فاز تشکیل شد که فاز بالایی به‌عنوان فاز حاوی آلکالوئید در آزمایش‌های بعدی استفاده شد (Hadi and Bremner, 2001).

روش بروموکروزول گرین: ابتدا برای آماده‌سازی معرف بروموکروزول گرین با غلظت ۱×۱۰^{-۴} مولار، ۶۹/۸ میلی‌گرم بروموکروزول گرین در ۱/۵ میلی‌لیتر سود ۰/۲ نرمال حل شد و با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسانده شد. سپس یک میلی‌گرم عصاره متانولی تغلیظ و خشک‌شده اسپیرولینا در دو میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال حل و محلول حاصل صاف شد. محلول به‌دست‌آمده برای رنگ‌زدایی چندین بار با کلروفرم شستشو داده شد و پس از حذف کامل رنگ از کلروفرم، محلول حاصله با افزودن مقداری سود خنثی شد. پس‌ازآن یک میلی‌لیتر از معرف بروموکروزول گرین با غلظت ۱×۱۰^{-۴} مولار، ۲ میلی‌لیتر بافر استات و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم به این محلول اضافه و به‌خوبی تکان داده شد. سپس اجازه داده شد تا دو فاز آبی و آلی از هم جدا شوند. وجود رنگ زرد در فاز آلی کلروفرمی حاکی از تشکیل کمپلکس بین بروموکروزول گرین و آلکالوئید موجود در نمونه است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

به‌منظور سنجش کمی آلکالوئید نیز، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف آلکالوئید استاندارد آتروپین خریداری‌شده از شرکت سیگما، رسم شد. به‌این‌ترتیب که ابتدا رقت‌های متوالی (۱۲۰ – ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) از آتروپین در آب مقطر تهیه شد و از هر رقت یک میلی‌لیتر در لوله‌های جداگانه ریخته شد، سپس یک میلی‌لیتر از محلول بروموکروزول گرین، ۵ میلی‌لیتر بافر استات و در آخر ۴ میلی‌لیتر کروفرم به لوله‌ها اضافه شد. پس از تکان دادن شدید لوله‌ها، اجازه داده شد تا فاز کلروفرمی جدا شود. چگالی نوری (OD) بخش کلروفرمی هر لوله در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و پس از رسم منحنی استاندارد، از فرمول خط حاصل برای محاسبه آلکالوئید تام در اسپیرولینا استفاده شد (Ajanal *et al*., 2012; Gamooshi *et al*., 2008).

روش مایر: جهت انجام روش معرف مایر، به عصاره خشک‌شده اسپیرولینا، اسیدکلریدریک ۲ درصد اضافه شد و برای حل شدن کامل عصاره در اسید، نمونه در حمام آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن، محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس چند قطره معرف مایر به محلول صاف‌شده اضافه شد. کدر شدن محلول یا تشکیل رسوب زردرنگ نشان‌دهنده حضور آلکالوئید در نمونه است. لازم به ذکر است که برای تهیه معرف مایر ابتدا ۱/۳۵۸ گرم $HgCl_2$ در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. پنج گرم KI نیز در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌طور جداگانه حل شد. درنهایت دو محلول آماده‌شده باهم مخلوط شده و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Bahatt and Dhyani, 2011).

روش واگنر: جهت انجام روش معرف واگنر، پس از حل کردن عصاره خشک‌شده اسپیرولینا در اسیدکلریدریک ۲ درصد و صاف کردن محلول حاصل، چند قطره معرف واگنر به محلول اضافه شد، تشکیل رسوب قرمز مایل به قهوه‌ای نشان‌دهنده وجود آلکالوئید در نمونه است. برای تهیه معرف واگنر، ۲ گرم ید و ۶ گرم یدید پتاسیم در مقداری آب مقطر حل شد و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Bahatt and Dhyani, 2011).

اعتبارسنجی روش بروموکروزول گرین با تعیین معیارهای خطی بودن (Linearity)، دقت (Precision)، صحت (Accuracy)، درصد بازیابی (Recovery) و حساسیت (Sensitivity) انجام شد. برای تعیین حساسیت روش، از دو معیار حد تشخیص (Limit of Detection; LOD) و حد تعیین مقدار (Limit of Quantification; LOQ) استفاده شد (Rangapriya, 2014).

کروماتوگرافی لایه‌نازک: برای انجام کروماتوگرافی لایه‌نازک از صفحات سیلیکا ژل ۶۰ نوع F254 ساخت شرکت مرک به‌عنوان فاز ثابت و از محلول اتیل استات، متانول و آب مقطر به نسبت (۱۰۰: ۱۶/۵: ۱۳/۵) به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. لکه‌گذاری با ۵ میکرو لیتر از عصاره متانولی اسپیرولینا پلاتنسیس انجام شد. با پاشیدن معرف دراژندورف و ظهور رنگ نارنجی مایل به قهوه‌ای حضور آلکالوئیدها در عصاره ریزجلبک اسپیرولینا تأیید می‌شود (Volk, 2008).

برای تعیین میزان آلکالوئید تام موجود در عصاره متانولی اسپیرولینا علاوه بر روش تشکیل کمپلکس با بروموکروزول گرین، از روش تیتراسیون معکوس نیز استفاده شد.

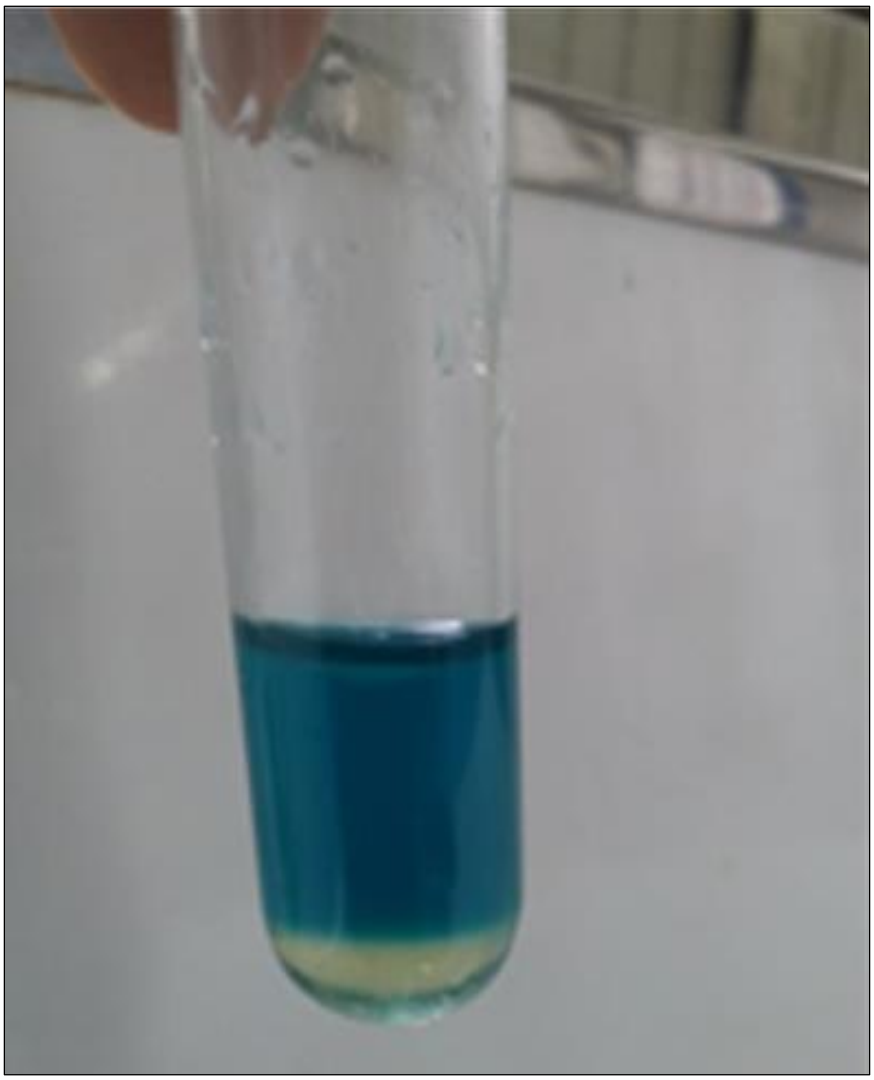
روش تیتراسیون معکوس: بدین ترتیب که ابتدا آلکالوئید استخراج‌شده از یک گرم اسپیرولینا در ۲ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد. سپس به محلول حاصل به‌تدریج ۲۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۰۲ نرمال اضافه شد. این محلول تا زمان حذف کامل کلروفرم، گرم شد. عمل تیتراسیون معکوس پس از سرد شدن محلول با استفاده از سود ۰/۰۲ نرمال و متیل رد به‌عنوان نشانگر انجام شد. هر میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۰۲ نرمال باقیمانده بعد از تیتراسیون کامل، معادل ۵/۷۸ میلی‌گرم آلکالوئید در نظر گرفته شد (Shanab *et al*., 2012).

تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج به‌دست‌آمده از روش بروموکروزول گرین و روش تیتراسیون معکوس با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد و مقایسه میانگین‌های به‌دست‌آمده با آزمون t-test با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

نتایج

در مطالعه حاضر وجود آلکالوئیدها در اسپیرولینا پلاتنسیس به‌عنوان یک مدل ریز جلبکی از طریق روش بروموکروزول گرین و مشاهده رنگ زرد در فاز کلروفرمی تأیید شد (شکل ۲). درحالی‌که نتیجه استفاده از معرف‌های مایر و همچنین واگنر جهت تشخیص آلکالوئیدها در این ریز جلبک منفی بود.



شکل ۲: تأیید حضور آلکالوئید در عصاره اسپیرولینا با ایجاد رنگ زرد حاصل از تشکیل کمپلکس بین بروموکروزول گرین و آلکالوئید.

با انجام کروماتوگرافی لایه‌نازک برای عصاره متانولی اسپیرولینا پلاتنسیس، همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، وجود آلکالوئید در این ریز جلبک تأیید شد. ظهور رنگ نارنجی متمایل به قهوه‌ای پس از اسپری کردن معرف دراژندورف، نشان‌دهنده حضور آلکالوئید در اسپیرولینا است. مقادیر R_f متفاوت (۰/۱۶، ۰/۳۵ و ۰/۶۵) نیز برای سه لکه مجزای مشاهده‌شده به دست آمد.

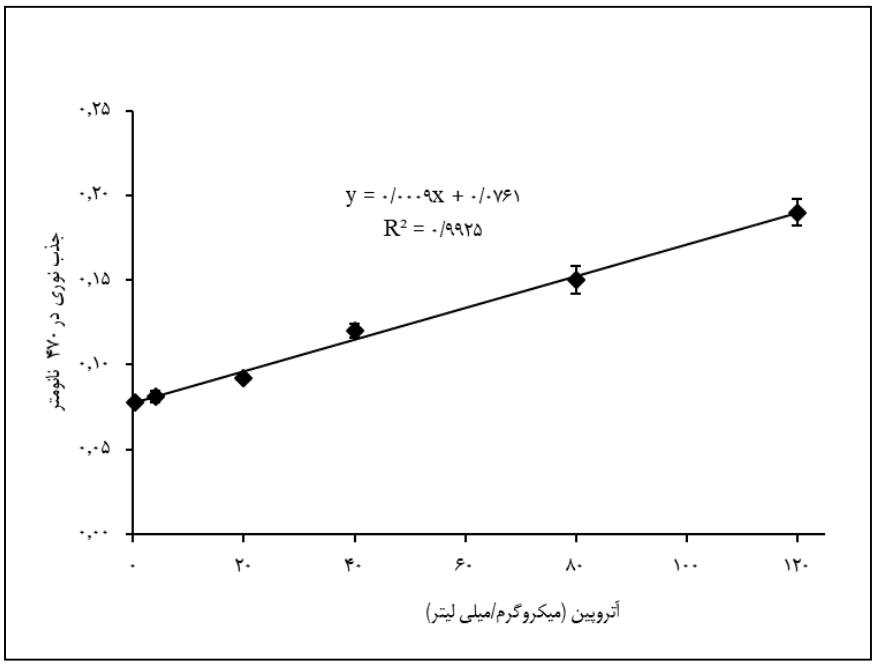
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

شکل ۳: کروماتوگرافی با لایه‌نازک عصاره متانولی اسپیرولینا پلاتنسیس.

سنجش مقدار آلکالوئید تام ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با روش تیتراسیون معکوس نشان داد که محتوای آلکالوئید این ریز جلبک در حد ۱/۸ درصد است. از طرف دیگر سنجش مقدار آلکالوئید اسپیرولینا پلاتنسیس با روش بروموکروزول گرین، نشان داد که به ازای هر گرم زیست‌توده خشک این ریز جلبک، ۱۱/۴ میلی‌گرم و به‌عبارت‌دیگر ۱/۱۴ درصد آلکالوئید وجود دارد که به مقدار تعیین‌شده توسط روش تیتراسیون معکوس بسیار نزدیک است.

رسم منحنی آلکالوئید استاندارد آتروپین نشان داد که رابطه خطی بین مقادیر آتروپین و چگالی نوری آن در کمپلکس با بروموکروزول گرین وجود دارد (شکل ۴).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]



شکل ٤: منحنی استاندارد برای آنالیز آتروپین.

به‌منظور بررسی دقت روش، جذب نوری ۳ نمونه در سه مقدار دربرگیرنده حد بالا، وسط و پایین منحنی استاندارد، هرکدام ۶ بار اندازه‌گیری شد. انحراف استاندارد (SD) و درصد انحراف استاندارد نسبی (%RSD) محاسبه شد. نتایج این بررسی در جدول ۱ گزارش شد.

جدول ۱: مطالعه دقت روش بروموکروزل گرین با اندازه‌گیری انحراف استاندارد و درصد انحراف استاندارد نسبی جذب نوری نمونه‌های حاوی آلکالوئید.

آتروپین (میکروگرم/میلی‌لیتر)	OD_1	OD_2	OD_3	OD_4	OD_5	OD_6	Average	SD	%RSD
۰/۴	۰/۰۷۸	۰/۰۷۵	۰/۰۷۷	۰/۰۷۴	۰/۰۷۵	۰/۰۷۹	۰/۰۷۶	۰/۰۰۱۹	۲/۵۰۰
۴۰	۰/۱۰	۰/۱۱۵	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰۵	۰/۱۱	۰/۱۱۷	۰/۰۰۴۱	۳/۵۰۴
۱۲۰	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۲۰	۰/۱۸۶	۰/۰۰۸۰	۴/۳۰۱

صحت روش یعنی نزدیکی نتایج به‌دست‌آمده برای مقدار آلکالوئید با مقادیر واقعی، به‌صورت تعیین درصد خطا محاسبه شد و نتایج حاصله در جدول ۲ گزارش شد.

جدول ۲: صحت روش بروموکروزول گرین در اندازه‌گیری آلکالوئید با تعیین درصد خطا.

آتروپین (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۰/٤	٤	۲۰	٤۰	۸۰	۱۲۰
درصد خطا	−۱/۵	−۰/۶	۳/۸	−۱/۳	۰/۳۲۸	−۲/۷۰

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

بررسی میزان بازیابی آلکالوئید با روش بروموکروزول گرین با افزودن مقادیر مشخصی از آلکالوئید استاندارد به سطوح مختلفی از نمونه انجام شد. نتایج این بررسی در جدول ۳ گزارش‌شده است. همان‌طور که نتایج نشان داد در تمام موارد میزان بازیابی آلکالوئید استاندارد آتروپین در محدوده ۵٪ ± ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۳: تأثیر تغییرات غلظت آتروپین در کارایی روش بروموکروزول گرین.

درصد انحراف استاندارد نسبی	انحراف استاندارد	میانگین در صد بازیابی	در صد بازیابی	آتروپین بازیابی شده (میکروگرم)	آتروپین اضافه‌شده (میکروگرم)
۴/۶۸۱۲	۴/۶۱۸۸۰۲	۹۸/۶۷	۹۶	۰/۴۸	۰/۵۰
			۱۰۴	۰/۵۲	۰/۵۰
			۹۶	۰/۴۸	۰/۵۰
۱/۴۸۸۶	۱/۳۶۳۴۸۴	۹۹/۷۲	۱۰۱/۳۵	۲۰/۲۷	۲۰
			۹۹/۳۵	۱۹/۸۷	۲۰
			۹۸/۴۵	۱۹/۶۹	۲۰
۴/۱۵۰۹	۴/۹۹۳۴۹۰	۹۸/۴۶	۹۶/۶۴	۷۷/۳۱	۸۰
			۱۰۳/۳۵	۸۲/۶۸	۸۰
			۹۵/۹۳	۷۶/۷۴	۸۰

برای تعیین حساسیت روش بروموکروزول گرین از دو معیار حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) استفاده شد. با استفاده از منحنی استاندارد مربوط به محدوده غلظت ۰/۵–۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که جزئیات آن در جدول ۴ آورده شده است، مقادیر LOD و LOQ به ترتیب ۶/۶۹ و ۲۲/۲۹ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

جدول ٤: مشخصات منحنی استاندارد آتروپین جهت تعیین LOD و LOQ.

ضریب همبستگی (R^2)	$SD_{intercept}$	Intercept	SD_{slope}	شیب	آتروپین (میکروگرم/میلی‌لیتر)
۰/۹۹۰۷	۰/۰۱۲۰۴	۰/۰۷۰۱	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۵۴	۰/۵–۴۰

Intercept: عرض از مبدأ، $SD_{intercept}$: انحراف استاندارد عرض از مبدأ، SD_{slope}: انحراف استاندارد شیب‌خط

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از معرف‌های استاندارد مایر و واگنر به‌عنوان رایج‌ترین روش‌های بررسی حضور آلکالوئیدها در گیاهان محسوب می‌شوند، اما این معرف‌ها فقط برای سنجش مقادیری در حد چند میلی‌گرم و بیش‌تر آلکالوئیدها مناسب هستند؛ بنابراین برای سنجش مقادیر جزئی‌تر آلکالوئیدها به روش‌هایی با حساسیت بیش‌تر نیاز است. این مطالعه نشان داد معرف‌های مایر و واگنر قادر به ردیابی حضور آلکالوئید در اسپیرولینا نیستند درحالی‌که با روش بروموکروزول گرین وجود آلکالوئید در این ریزجلبک ثابت می‌شود و روش‌های تیتراسیون معکوس و کروماتوگرافی لایه‌نازک نیز آن را تأیید می‌کنند.

معرف‌های مایر و واگنر درواقع معرف‌های عمومی برای شناسایی آلکالوئیدها هستند و آلکالوئیدها به دلیل داشتن خاصیت قلیایی می‌توانند در حضور این معرف‌ها در محیط اسیدی، نمک تشکیل دهند. نمک حاصله منجر به کدر شدن یا تغییر رنگ نمونه خواهد شد ولی در صورت وجود

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

مقادیر کم آلکالوئید در نمونه ممکن است تشکیل رسوب و یا تغییر رنگ نمونه قابل‌مشاهده نباشد. برعکس در روش تشکیل کمپلکس با بروموکروزول گرین، حضور مقادیر خیلی کم آلکالوئید در حد چند میکروگرم نیز قابل‌ردیابی است. اساس روش بروموکروزول گرین بر تشکیل جفت یون بین بروموکروزول گرین که در محیط اسیدی به شکل آنیون درآمده و نیتروژن با بار مثبت موجود در ساختار آلکالوئید استوار است. کمپلکس زردرنگ حاصله نیز توسط برخی حلال‌های آلی به‌خصوص کلروفرم به‌طور کامل قابل‌استخراج است (Li *et al*., 2015; Sasikala and Sundaraganapathy, 2017).

بسیاری از گزارش‌های موجود حاکی از حضور آلکالوئیدها در ریزجلبک‌های دریایی است (Alassali *et al*., 2016). اما در مورد حضور آلکالوئیدها در اسپیرولینا پلاتنسیس، گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. آگوستینی و همکارانش در یک مطالعه مقایسه‌ای که بر روی ترکیبات زیست فعال استخراج‌شده از نمونه تازه و خشک‌شده اسپیرولینا انجام دادند، عدم حضور آلکالوئیدها را در این ریز جلبک گزارش کردند (Agustini *et al*., 2015). درحالی‌که در تحقیق دیگری که بر روی اسپیرولینا پلاتنسیس انجام شد، حضور مقادیر کمی از آلکالوئید در این ریز جلبک تأیید شد (Sudha *et al*., 2011). قابل‌توجه است که در هر دو پژوهش فوق‌الذکر، از معرف مایر جهت شناسایی آلکالوئید استفاده‌شده بود؛ بنابراین گزارش عدم حضور آلکالوئید یا مقادیر کم آن می‌تواند به دلیل حساسیت پایین روش مورداستفاده باشد. چنانچه نتایج آزمایش‌های ما نیز با استفاده از معرف مایر در مورد حضور آلکالوئید در اسپیرولینا، منفی بود درحالی‌که روش تشکیل کمپلکس با بروموکروزول گرین برعکس نشان‌دهنده حضور آلکالوئید در این ریز جلبک بود؛ بنابراین برای اطمینان از نتیجه به‌دست‌آمده، حضور آلکالوئید با کروماتوگرافی لایه‌نازک نیز بررسی شد. نتایج این بررسی نشان‌دهنده وجود لکه‌های متعدد با مقادیر R_f متفاوت بود که می‌تواند بیانگر وجود انواع متعددی از آلکالوئید با ساختار متفاوت در این ریز جلبک باشد گرچه نوع آن‌ها در این مطالعه تعیین نشد (Volk, 2008; Polak and Rompała, 2007). در پژوهش انجام‌شده توسط کانان و همکارانش نیز نتیجه کروماتوگرافی لایه‌نازک عصاره الکلی اسپیرولینا پلاتنسیس، وجود یک لکه با R_f معادل ۰/۳۵ را نشان داد که با یکی از R_f های به‌دست‌آمده درآزمایشات ما مطابقت دارد (Kannan *et al*., 2014). وجود آلکالوئیدهای مختلف در ریز جلبک اسپیرولینا و نوع آن‌ها به شرایط محیط کشت، شرایط رشد و نیز زمان برداشت زیست‌توده ریز جلبک بستگی دارد (Chandrabhan *et al*., 2012).

در مطالعه حاضر مقدار آلکالوئید تام ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در حدود ۱ درصد به دست آمد، درحالی‌که میزان آلکالوئید تام تعیین‌شده با همین روش در عصاره آبی حاصل از یک گرم اسپیرولینا پلاتنسیس، ۰/۶۸ درصد گزارش‌شده است (Shanab *et al*., 2012). مقدار آلکالوئید بیش‌تر مشاهده‌شده توسط ما ممکن است مربوط به نوع عصاره‌گیری باشد. رائول و همکارانش با بررسی ترکیبات زیست فعال در جلبک سبز کائولرپا راسموسا (Caulerpa Racemosa) حضور مقادیر بیش‌تر آلکالوئیدها در عصاره الکلی جلبک را نسبت به عصاره آبی آن تأیید کرده‌اند (Rahul *et al*., 2014).

گرچه نتایج ما نشان داد که با روش تیتراسیون معکوس نیز می‌توان به حضور آلکالوئید در اسپیرولینا پی برد اما مزیت روش بروموکروزول گرین در مقایسه با روش تیتراسیون معکوس در این است که با استفاده از مقادیر خیلی کم عصاره خشک‌شده در حد یک میلی‌گرم که از ۰/۰۱ گرم ریز جلبک به‌دست‌آمده و با صرف زمان خیلی کم‌تر در حدود یک ساعت، می‌توان مقدار آلکالوئید موجود در نمونه را تعیین کرد.

از طرف دیگر روش بروموکروزول گرین در مقایسه با روش کروماتوگرافی با کارآیی بالا (HPLC) که نیاز به دستگاه‌ها و تجهیزات ویژه و گران‌قیمت دارد، بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر است (Ingle *et al*., 2017).

در این مطالعه، اعتبارسنجی روش بروموکروزول گرین نیز با تعیین معیارهای خطی بودن، دقت، صحت، درصد بازیابی و حساسیت موردبررسی و تأیید قرار گرفت. منحنی استاندارد رسم شده برحسب آتروپین و ضریب همبستگی بالای خط (R^2 = ۰/۹۹۲۵) نشان داد که این روش می‌تواند برای سنجش آلکالوئیدها در ریز جلبک اسپیرولینا ارزشمند باشد. محاسبه انحراف استاندارد (SD) و درصد انحراف استاندارد نسبی (%RSD) نشان می‌دهد که انحراف استاندارد نسبی در تمام موارد، کم‌تر از ۵ درصد است که بیانگر دقت این روش است. همچنین اندازه‌گیری مقدار جذب

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

نوری کمپلکس تشکیل‌شده بین آلکالوئیدهای موجود در غلظت ثابت و مشخصی از عصاره متانولی اسپیرولینا (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با بروموکروزول گرین که در ۶ تکرار انجام شد به دلیل کم‌تر از ۵ درصد بودن ضریب تغییرات مربوطه (۲/۰۶۷)، نشان‌دهنده دقت روش فوق بود. برای بررسی تکرارپذیری روش نیز میزان جذب نوری کمپلکس بروموکروزول گرین با غلظت ثابتی از آتروپین (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در فواصل زمانی ۲ ساعت، در پنج آزمایش جداگانه، اندازه‌گیری شد. مقدار انحراف استاندارد برابر ۰/۹۱۰ و درصد انحراف استاندارد نسبی کم‌تر از ۵ درصد و برابر با ۳/۲۸۶ درصد شد که نشان‌دهنده تکرارپذیری این روش بود. با توجه به مقدار درصد خطای محاسبه‌شده که در تمام موارد خیلی کم‌تر از ۵٪ بود نشان می‌دهد صحت روش آزمایش فوق مورد تأیید است.

البته لازم به ذکر است که روش بروموکروزول گرین دارای محدودیت‌هایی نیز هست بدین ترتیب که گرچه در این روش فقط آلکالوئیدها و نه سایر ترکیبات، بارنگ بروموکروزول گرین واکنش می‌کنند، ولی از آن فقط می‌توان برای سنجش آن دسته از آلکالوئیدهای که دارای اتم نیتروژن در حلقه هتروسیکل هستند، استفاده کرد و آلکالوئیدهای که نیتروژن در گروه‌های آمیدی و آمینی وجود دارد با این روش قابل‌بررسی نیستند (Amanlou *et al*., 2007; Sakai *et al*., 1991).

درمجموع نتایج این مطالعه نشان داد که روش بروموکروزول گرین قابلیت ردیابی حضور مقادیر جزئی‌تر آلکالوئید در حد میکروگرم را در ریز جلبک اسپیرولینا دارد. شیمی آلکالوئیدها به‌طور گسترده در گیاهان موردمطالعه قرارگرفته است، اما تعداد مطالعات انجام‌شده در ریز جلبک‌ها بسیار کم است؛ بنابراین معرفی روش بروموکروزول گرین به‌عنوان روشی ساده، سریع و به‌خصوص با حساسیت بالا، جهت بررسی اولیه حضور آلکالوئیدها در ریز جلبک‌ها که امروزه به‌عنوان کارخانه‌های طبیعی و بالقوه تولید ترکیبات زیست فعال توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند می‌تواند حائز اهمیت باشد. با توجه به تنوع بالای ریز جلبک‌ها و امکان رشد آن‌ها در شرایط مختلف محیطی و همچنین تولید مقادیر بالای زیست‌توده، این میکروارگانیسم‌ها ازلحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و می‌توانند به‌عنوان منابعی جهت استخراج آلکالوئیدها معرفی شوند. در مقایسه با گیاهان عالی که حاوی مقادیر زیادی سلولز و همی سلولز هستند، بخش بزرگ‌تری از زیست‌توده جلبکی می‌تواند مستقیماً از طریق فرآیندهای پایین‌دستی به سوخت زیستی یا سایر محصولات زیستی باارزش تبدیل شود. علاوه بر آن ریز جلبک‌ها دارای فتوسنتز و سرعت رشد بیشتر بوده و کشت آن‌ها تحت تأثیر مسائل زیست‌محیطی همچون شرایط خاک، تخریب زیستگاه گیاه و سایر فاکتورهای مؤثر بر رشد گیاه قرار نمی‌گیرد. بنابراین. با توجه به تنوع بالای ریز جلبک‌ها و امکان رشد آن‌ها در شرایط مختلف محیطی و همچنین تولید مقادیر بالای زیست‌توده، این میکروارگانیسم‌ها ازلحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و می‌توانند به‌عنوان منابعی جهت استخراج آلکالوئیدها معرفی شوند.

سپاسگزاری

نویسندگان سپاسگزاری خود را از حمایت‌های مالی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران اعلام می‌دارند.

منابع

دهقان، ا.، عبادی، م.، نقدی بادی، ح.، شهریاری، ف.، عزیزی، م. و اصغری، غ.، ۱۳۸۸. مروری بر تکنیک‌های نوین در تولید آلکالوئیدهای تروپانی. فصلنامه گیاهان دارویی، جلد ۳۳: ۱۶۴-۱۴۹.

Ajanal, M., Gundkalle M. B. and Nayak, S. U., 2012. Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. Ancient Science of Life, 31(4):198-201.

Agustini, T. W., Suzery, M., Sutrisnanto, D., Ma'ruf, W.F. and Hadiyanto, H., 2015. Comparative study of bioactive substances extracted from fresh and dried Spirulina sp. Procedia Environmental Sciences, 23: 282-289.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Alassali, A., Cybulska, I., Alkhori, A., Przemyslaw B. G., Farzanah, R. and Thomsen, M., 2016. Methods for upstream extraction and chemical characterization of secondary metabolites from algae biomass-a mini review. Advanced Techniques in A Biology and Medicine, 4(1): 1-16.

Amanlou, M., Khosravian, P., Souri, E., Ghorban-Dadrass, O., Dinarvand, R., Alimorad, M. M. and Akbari, H., 2007. Determination of buprenorphine in raw material and pharmaceutical products using ion-pair formation. Bulletin-Korean Chemical Society, 28(2): 183-190.

Anbarasan, V., Kumar, V. K., Kumar, P. S. and Venkatachalam, T., 2011. In vitro evaluation of antioxidant activity of blue green algae Spirulina platensis. International Journal of Pharmaceutical Sciences A, 2(10): 2616-2618.

Bahatt, S. and Dhyani, S., 2011. Preliminary phytochemical screening of ailanthus excelsa roxb. International Journal of Current Pharmaceutical Research, 4(1): 87-89.

Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M. and Raymundo, A., 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. Algal Research, 2(2): 164-173.

Caicedo, N. H., Kumirska, J., Neumann, J., Stolte, S. and Thöming, J., 2012. Detection of bioactive exometabolites produced by the filamentous marine cyanobacterium Geitlerinema sp. Marine Biotechnolgy, 14(4): 436-445.

Chan, C. O., Chu, C. C., Mok, D. K. and Chau, F. T., 2007. Analysis of berberine and total alkaloid content in Cortex Phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection. Analytica Chimica Acta, 592(2): 121–131.

Chandrabhan, S., Vijayarti, H. S., Verma, R., Seniya, S. P., Vyas, S. and Trivedia, S. S., 2012. Impact of Ag^{2+} stress on growth and phytochemical production by Spirulina platensis. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(12): 2250-2254.

Chen, J., Zhao, H., Wang, X., Lee, F. S., Yang, H. and Zheng, L., 2008. Analysis of major alkaloids in Rhizoma coptidis by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes. Electrophoresis, 29(10): 2135–2147.

Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A. and Parra-Saldivar, R., 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microbial Biotechnology, 8(2): 190-209.

Dragull, K., Yoshida, W. Y. and Tang, C. S., 2003. Piperidine alkaloids from Piper methysticum. Phytochemistry, 63(2): 193-198.

Gamooshi, R. A., Shamsa, F. and Esfahani, H. R. M., 2008. Visual identification of alkaloids in some medicinal plants: common alkaloid reagents versus romocresol green. Tehran University Medical Journal, 66(4): 237-241.

Hadi, S. and Bremner, J. B., 2001. Initial studies on alkaloids from lombok medicinal plants. Molecules, 6(1): 117-129.

Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A. Dudhare, M. S., Moharil, M. P. and Vaibhav C. K., 2017. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(1): 32-36.

Jenkins, A. J., Llosa, T., Montoya, I. and Cone., E. J., 1996. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. Forensic Science International, 77(3): 179-189.

Kannan, M., Pushparaj, A., Dheeba, B. and Nageshwari, K., 2014. Phytochemical screening and antioxidant activity of marine algae Gracilaria corticata and Spirulina platensis. Journal Chemical Pharmaceutical Research, 6(11): 312-318.

Kay, R. A. and Barton, L. L., 1991. Microalgae as food and supplement. Critical Reviews in Food Science Nutrition, 30(6): 555-573.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Li, L., Long, W., Wan, X., Ding, Q., Zhang, F. and Wan, D., 2015. Studies on quantitative determination of total alkaloids and berberine in five origins of crude medicine "Sankezhen". Journal of Chromatographic Science, 53(2): 307-11.

Macabeo, A. P., Krohn, K., Gehle, D., Read, R. W., Brophy, J. J., Cordell, G. A., Franzblau, S. G. and Aguinaldo, A. M., 2005. Indole alkaloids from the leaves of Philippine Alstonia scholaris. Phytochemistry, 66(10): 158–1162.

Maresca, N. R., Antunes, A. O., Ntunes, A. O. and Moraes R. O., 2013. *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 33(Supl. 1): 179-183.

Markou, G. and Nerantzis, E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. Biotechnology Advances, 31(8): 1532–1542.

Morais, M. G., Vaz Bda, S., de Morais, E. G. and Costa, J. A., 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. BioMed Research International, 2015(2015): 835761.

Narasimha, D. L., Venkataraman, G. S., Duggal, S. K. and Eggum, B. O., 1982. Nutritional quality of the blue-green alga Spirulina platensis geitler. Journal of food and agriculture, Sci Food Agric, 33(5): 456-460.

Pelletier, S. W., 1991. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Springer Verlag New York, Inc, pp.564.

Polak, B. and Rompała, A., 2007. Effect of acidic mobile phase additives on the TLC behaviour of some alkaloids. Acta Chromatorgraphica, 18: 24-35.

Rahul, M., Suresh, N. and Anil, T., 2014. Evaluation of physicochemical properties of seaweed Caulerpa Racemosa. International Journal of Research in Ayurveda and pharmacy, 5(4): 540-546.

Rangapriya, M., 2014. Validation of UV spectroscopy for simultaneous estimation of stavudine, lamivudine and nevirapine in tablet formulations. International Journal of Pharma Sciences and Research, 5(10): 655-664.

Sakai, T., Ohno, N., Sakai, H. and Hyuga, T., 1991. Extractionspectrophotometric determination of berberine in crude drugs by the formation of a new ion associate. Analytical Science, 7(1): 39-43.

Sasikala, M. and Sundaraganapathy, R., 2017. Qualitative Analysis of Alkaloids Exist in the Hydroalcoholic Extract of Ipomoea aquatica for SSK. in Tamil Nadu International. Journal of ChemTech research, 10(7): 446-454.

Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M. and Hertweck, C., 2012. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. FEMS Microbiology Reviews, 36(4): 761-785.

Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A. and Mahmoud, G. I., 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(8): 608-615.

Sreevidya, N. and Mehrotra, S., 2003. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. Journal of AOAC International, 86(6): 1124-1127.

Sudha, S. S., Karthic, R., Rengaramanujam, J. and Athulya., 2011. Antimicrobial activity of Spirulina platensis and Aphanothecesp on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. South Indian Journal of Biological Sciences 1(2): 87-98.

Svendsen, A. and Verpoorte, R., 1983. Chromatography of alkaloids, part A: thin-layer chromatography. Elsevier Scientific Pub Co., Science, pp.534.

Volk, R. B., 2008. Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indole alkaloid. Microbiological Research, 163(3): 307–313.

Wei, X., Sumithran, S. P., Deaciuc, A. G., Burton, H. R., Bush, L. P., Dwoskin, L. P. and Crooks, P. A., 2005. Identification and synthesis of novel alkaloids from the root system of Nicotiana tabacum: Affinity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Life Sciences, 78(5): 495–505.

Yu, X., Chen, L. and Zhang, W., 2015. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. Frontiers in Microbiology, 6: 56-66.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Yuan, D., Ma, B., Wu, C., Yang, J., Zhang, L., Liu, S., Wu, L. and Kano, Y., 2008. Alkaloids from the leaves of Uncaria rhynchophylla and their inhibitory activity on NO production in lipopolysaccharide-activated microglia. Journal of Natural Products, 71(7): 1271-1274.

Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J. and Šimánek, V., 2006. Quaternary isoquinoline alkaloids sanguinarine and chelerythrine. In vitro and in vivo effects. Chemicke Listy, 100(1): 30-41.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]