

تعیین مقدار و جداسازی هایپرسین‌ها در گیاه گل راعی مزرعه‌ای خوزستان به روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش مرئی

نسرين عاقل^{1*}، زهرا رضانی²، هانیه جلالی طلب³

چکیده

زمینه و هدف: هایپرسین یک نفتودی آنترون با اثرات متعدد فارماکولوژیکی می‌باشد. گیاه گل راعی مزرعه‌ای با نام علمی *Hypericum triquetrifolium Turra* گیاهی است علفی، چند ساله و متعلق به خانواده *Hypericaceae* می‌باشد. این گونه گیاهی در استان خوزستان به شکل خودرو می‌روید. هدف، جداسازی و تعیین مقدار هایپرسین‌ها از برگ، گل و ساقه گیاه گل راعی مزرعه‌ای و نیز تعیین بهترین اندام جهت استخراج است. **روش بررسی:** پس از جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه (گل، برگ و ساقه)، عصاره متانولی به کمک دستگاه سوکسله تهیه شد. برای تشخیص هایپرسین‌ها طیف جذبی در ناحیه ۶۲۰-۵۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Visible گرفته و با طیف استاندارد مقایسه شد. تعیین مقدار هایپرسین‌ها به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از منحنی استاندارد هایپرسین در طول موج ۵۹۰ nm انجام شد. **یافته‌ها:** میزان هایپرسین‌ها در ۱۰۰ گرم پودر خشک برگ، گل و ساقه به ترتیب ۳۱۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم تعیین گردید. طبق این نتایج، میزان هایپرسین‌ها در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است. **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که میزان هایپرسین‌ها در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است. **کلید واژگان:** گل راعی مزرعه‌ای، هایپرسین‌ها، اسپکتروفتومتری ماورای بنفش مرئی.

۱- دانشیار گروه فارماکونوزی.
۲- استادیار گروه شیمی دارویی.
۳- دکتر داروساز.

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲- گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳- داروساز.

* نویسنده مسؤول:

نسرين عاقل؛ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکونوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۶۰۰۳۲۲۸

Email: aghelnas@yahoo.com

مقدمه

(۱۰). عصاره متانولی گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی است

(۱۱).

جمع‌آوری گیاه گل راعی بهتر است در ابتدای زمان گل دادن صورت بگیرد، زیرا که میزان هایپرپیرین در اندام‌های مختلف در ابتدای شکفتن به حداکثر میزان خود می‌رسد (۱۲).

با توجه به اثرات درمانی قابل توجه هایپرپیرین‌ها تصمیم گرفته شد تا در این کار تحقیقاتی ابتدا هایپرپیرین‌ها از اندام‌های مختلف گیاه گل راعی مزرعه‌ای رویش‌یافته در استان خوزستان جداسازی و سپس در برگ، گل و ساقه تعیین مقدار شود و پس از آن بهترین اندام برای استخراج هایپرپیرین‌ها مشخص گردد.

روش بررسی

جمع‌آوری و خشک کردن گیاه

برگ، گل و ساقه گیاه گل راعی مزرعه‌ای در اواخر بهار و اوایل تابستان سال ۱۳۸۷ از مزارع گندم اطراف روستای باران‌گرد از توابع شهرستان ایذه (شمال استان خوزستان) جمع‌آوری گردید. نام علمی آن (*Hypericum triquetrifolium Turra*) توسط بخش گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات استان خوزستان تعیین و نمونه هر باریومی گیاه در هر باریوم گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی نگهداری شد. اندام‌های مختلف گیاه در دمای اتاق و در سایه به مدت ۱۴ روز خشک و پس از آسیاب کردن تا هنگام آزمایش در ظروف کدر و در جای خنک و خشک نگهداری شدند.

استخراج مواد مؤثره گیاه

مقدار ۵۰ گرم از ساقه، برگ و گل‌های گیاه آسیاب‌شده را به‌طور جداگانه وزن شد و با حلال هیدروالکلی متانول V/V ۵۰ درصد و دستگاه سوکسله به مدت ۵ ساعت عصاره‌گیری انجام شد. عصاره‌ها پس از صاف کردن، توسط

گیاه *Hypericum triquetrifolium Turra* با نام محلی گل راعی فردار یا گل راعی مزرعه‌ای از تیره *Hypericaceae* می‌باشد که گیاهی پایا، بدون کرک، سبز مات یا سبز متمایل به آبی، پرساقه و انبوه، دارای برگ‌های مثالی - سر نیزه‌ای و گل‌های زرد رنگ به طول ۱-۲ میلی - متر و میوه کپسول تخم‌مرغی به طول ۳-۵ میلی‌متر می‌باشد (۱).

در کشور ما این گیاه در استان‌های فارس، کردستان و خوزستان پراکنده است. گل راعی مزرعه‌ای به‌صورت علف هرز در مزارع زراعی گندم استان خوزستان در مناطق باغملک، ایذه و دهلز می‌روید (۲).

کینون‌های موجود در گیاه گل راعی مزرعه‌ای شامل هایپرپیرین و پسودوهایپرپیرین می‌باشد که قسمت اعظم آنها را هایپرپیرین تشکیل می‌دهد، بدین منظور هایپرپیرین‌ها را تحت عنوان هایپرپیرین نیز می‌نامند (شکل ۱). هایپرپیرین یک نفتودی آنترون با فعالیت فتودینامیک می‌باشد که دارای اثر ضد ویروسی بر علیه گستره وسیعی از رترو ویروس‌ها شامل *HSV-1* و *HSV-2* و *CMV* و *HIV-1* می‌باشد (۳-۴). هایپرپیرین همچنین دارای اثر ضد کم‌خونی، ضد افسردگی، ضد سرطان، ضد استفراغ، حشره‌کشی، لاروکشی و ضد میکروبی می‌باشد (۵-۷). حیواناتی که این گیاه را می‌خورند، به‌علت تجمع آن در پوست نسبت به نور حساس می‌شوند.

تحقیقات نشان داده است که عصاره گل راعی مزرعه‌ای و هایپرپیرین موجود در آن دارای خاصیت ضد میکروبی بر علیه گونه استافیلوکوکوس می‌باشد (۸). بعضی از فرآورده‌های حاوی هایپرپیرین در درمان اختلالات عصبی مثل نگرانی و دلواپسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).

اثر ضد دردی عصاره گل راعی مزرعه‌ای و هایپرپیرین موجود در آن در موش به اثبات رسیده است که این فعالیت مربوط به مهار بازجذب سروتونین و نورآدرنالین می‌باشد

تهیه استاندارد

استاندارد هایپرسیین (فرمول مولکولی $C_{30}H_{16}O_8$ و با جرم مولکولی $M_w=504.43$) به مقدار ۱ میلی‌گرم از شرکت Roth آلمان تهیه شد.

رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

غلظت‌های متفاوتی از نمونه استاندارد (محلول‌هایی با غلظت ۰/۰۰۰۶، ۰/۰۰۱۵، ۰/۰۰۲۸، ۰/۰۰۵۸، ۰/۰۰۷۵، ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌متر) تهیه و طیف آنها در ناحیه ۶۲۰-۵۰۰ نانومتر بعد از صفر کردن دستگاه با اتانول به‌عنوان شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SHIMADZU (ژاپن) ثبت گردید.

تعیین بازیافت

برای تعیین صحت اندازه‌گیری روش، طبق دو فرمول زیر بازدهی روش محاسبه شد.

$$\text{بازیافت درصد (b)} = \frac{\text{مقدار هایپرسیین تعیین شده}}{\text{مقدار هایپرسیین واقعی}}$$

$$\text{بازیافت درصد (a)} = \frac{\text{مقدار هایپرسیین تعیین شده}}{\text{مقدار هایپرسیین اضافه شده}}$$

تکرارپذیری (دقت)

برای تعیین دقت روش، میزان جذب غلظت ml ۰/۰۰۲۸ استاندارد در چهار روز متوالی و هر روز پنج بار با دستگاه خوانده و CV (Coefficient of Variation) آنها تعیین شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به وزن عصاره خشک مربوط به هر کدام از اندام‌ها، میزان هایپرسیین‌ها در برگ، گل و ساقه در ۱۰۰ گرم پودر خشک، بازیافت روش اسپکتروفتومتری، تعیین تکرارپذیری روش و مقایسه ضریب تغییرات بین روزها و درون روزها در جداول ۱ تا ۵ آورده شده است.

نتایج طیف‌های اسپکتروفتومتری ماورای بنفش مربوط به هایپرسیین استاندارد و نمونه‌های برگ، گل و ساقه گیاه گل

دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند.

استخراج هایپرسیین

جداسازی هایپرسیین طبق روش Dodge و Knox انجام شد (۱۳). به‌طور خلاصه، به ۵ گرم از هر یک از عصاره اندام‌ها، مخلوط حلال آب: استون (۱۰: ۹۰) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی همزده شد. عصاره استونی پس از صاف کردن به قیف دکانتور منتقل و با ۲۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر، عمل جداسازی کاروتنوئیدها و کلروفیل انجام شد. عصاره استونی نهایی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تحت خلأ تغلیظ گردید.

به‌منظور اثبات حضور هایپرسیین‌ها در عصاره‌های به دست‌آمده، بر روی صفحه‌های TLC، عصاره هر یک از اندام‌ها با هایپرسیین استاندارد مقایسه شد و بر اساس آزمایشات اولیه صورت‌گرفته، مخلوط کلروفرم- متانول (۱:۳) به‌عنوان حلال برگزیده شد.

مراحل تخلیص هایپرسیین‌ها با TLC تهیه‌ای

۵۰ میلی‌گرم از عصاره‌های برگ، گل و ساقه به‌صورت جداگانه روی صفحه‌های TLC لکه‌گذاری و عمل جداسازی اجزای عصاره‌ها با پیش‌روی حلال کلروفرم - متانول (۱:۳) انجام شد. نوارهای قرمز رنگ مربوط به هایپرسیین‌ها تراشیده و در اتانول ۵۰ v/v درصد حل شد. برای جدا کردن سیلیکاژل نمونه‌ها، از سانتریفیوژ با دور پایین استفاده شد. به‌منظور اطمینان از جدا شدن کامل هایپرسیین‌ها از سیلیکاژل، آن را در ستون شیشه‌ای با اتانول شسته و سپس حلال حاوی هایپرسیین به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد.

همچنین سیلیکاژل در حلال انتخابی TLC قرار داده شد و جذب آن را با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده و مشخص شد که خود سیلیکاژل به عنوان شاهد اثری در جذب ندارد.

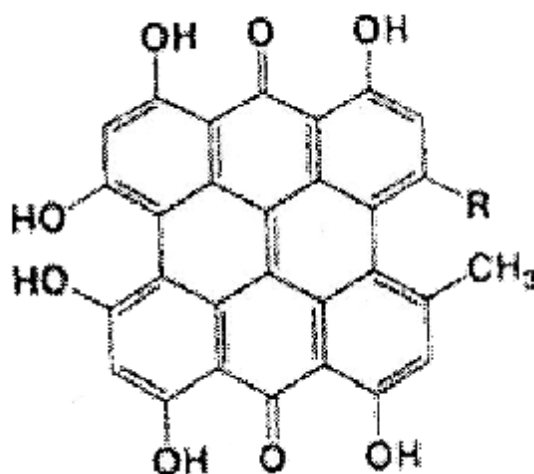
طول موج ۵۹۰ نانومتر در حلال اتانول (۷/۷ v/v) ۵۰ درصد) رسم گردید (نمودار ۲).

راعی مزرعه‌ای (در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر) به ترتیب در شکل‌های ۳-۶ آمده است.

پس از تعیین جذب‌های مربوط به غلظت استاندارد، منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۶ تا ۷/۵ ppm در

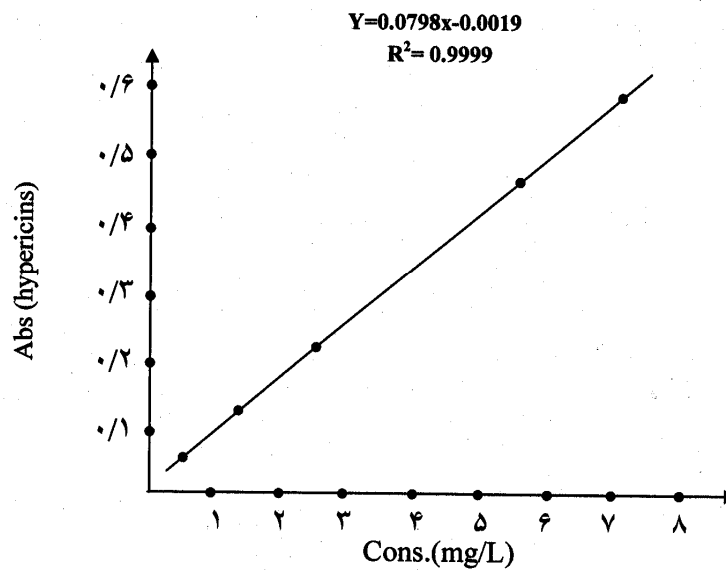
جدول ۱: مقادیر درصد عصاره خشک به دست آمده از برگ گل و ساقه گیاه بر حسب گرم

اندام گیاه	درصد (w/w)
برگ	۲۳/۴۸
گل	۲۲/۲۳
ساقه	۱۶/۴



R=CH₃, Hypencin
R=CH₂OH, Pseudohypericin

شکل ۱: ساختمان شیمیایی هیپرسین و پزودوهیپرسین



نمودار 2: منحنی خط کالیبراسیون هایپرسین در ناحیه غلظتی 0/6 تا 7/5 ppm

جدول 2: مقادیر هایپرسین در برگ، گل و ساقه در 100 گرم پودر خشک در هر یک از اندامها (میانگین 3 بار اندازه گیری)

اندام	میلی گرم هایپرسین ها در 100 گرم پودر خشک
برگ	310 ± 0.051
گل	230 ± 0.028
ساقه	150 ± 0.022

جدول 3: نتایج بازیافت روش UV-Visible در تعیین مقدار هایپرسین ها

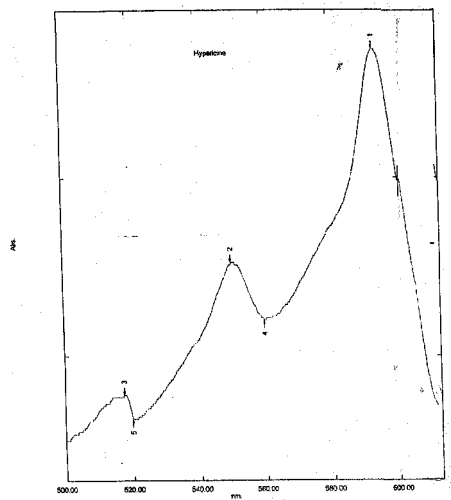
اندام	درصد بازیافت
برگ	102/10
گل	102/20
ساقه	96/75

جدول 4: نتایج مربوط به تعیین دقت (تکرارپذیری) برای غلظت 0/0028 mg/ml

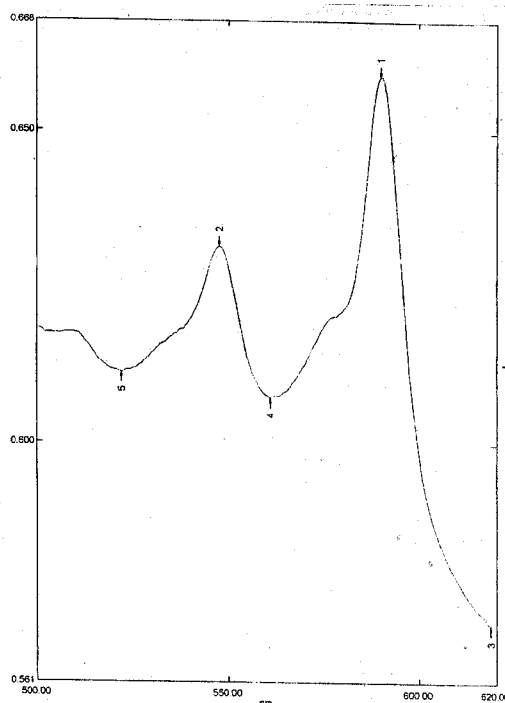
منبع	میانگین غلظت (mg/L)	درصد ضریب تغییرات
روز اول	2/79	0/014
روز دوم	3/13	0/006
روز سوم	3	0/010
روز چهارم	3/14	0/006

جدول 5: نتایج مقایسه ضریب تغییرات بین روزها و درون روزها برای غلظت 0/0028 mg/ml

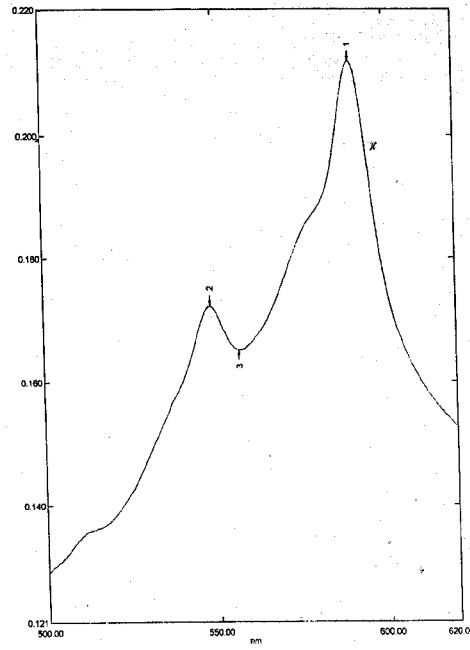
منبع	ضریب تغییرات
بین روزها	۰/۰۳۶
درون روزها	۰/۰۰۹



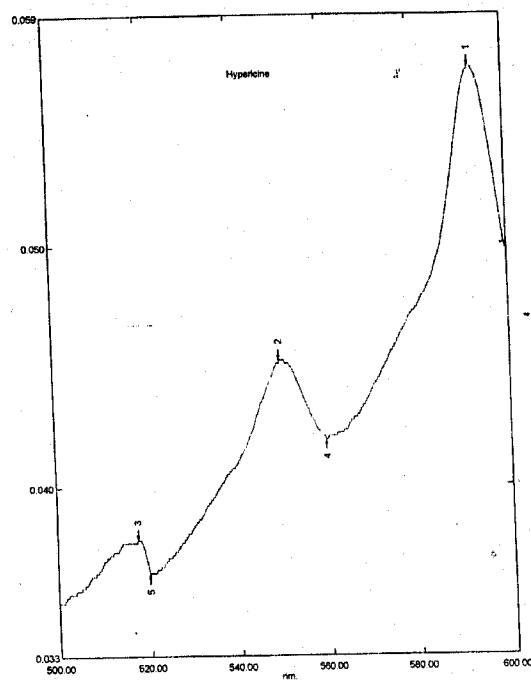
نمودار 3: طیف اسپکتروفتومتری ماوراءبنفش هایپرین استاندارد در ناحیه 620-500 نانومتر



نمودار 4: طیف ماورای بنفش هایپرین برگ *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه 620-500 نانومتر



نمودار 5: طیف ماورای بنفش هایپر سین گل *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه 620-500 نانومتر



شکل 6: طیف ماورای بنفش هایپر سین ساقه *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه 620-500 نانومتر

بحث

زایشی و ساقه‌ها غلظت‌های بالاتری از این ترکیبات نفتودی آنترون داشته است (۱۴).

مطالعه بر روی مقادیر هایپرسیین‌های اندام‌های مختلف و در مراحل مختلف رشد گیاه *Hypericum triquetrifolium* موجود در جزیره کرت (یونان) نشان داد که در شروع گل‌دهی بالاترین و در هنگام تشکیل میوه کمترین مقدار هایپرسیین ثبت گردیده بود (۱۵).

تحقیقات قبلی در جهت تعیین مقدار هایپرسیین در گیاه گل‌راعی مزرعه‌ای نشان داده است که میزان هایپرسیین در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است و حدوداً برگ دارای ۳۶۰ میلی‌گرم هایپرسیین در ۱۰۰ گرم پودر خشک می‌باشد (۱۶).

نتیجه‌گیری

نتایج اولیه بدست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که گیاه گل‌راعی مزرعه‌ای خصوصاً برگ‌های آن، می‌تواند منبع مناسب، ارزان و در دسترس جهت جداسازی هایپرسیین‌ها مورد توجه قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتری جهت رسیدن به مراحل جداسازی انبوه این ترکیبات از منبع گیاهی مورد نیاز است.

پیشنهاد می‌شود با کار بیشتر روی فاکتورهای موثر در استخراج و جداسازی هایپرسیین‌ها، با افزایش راندمان استخراج و کاهش ناخالصی‌ها، روش بهینه‌سازی شود.

قدردانی

تحقیق حاضر از طرح تحقیقاتی مصوب از پایان‌نامه دانشجویی استخراج شده است و بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز که حمایت مالی طرح را بر عهده داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

در سال‌های اخیر آنتراکینون‌ها، خصوصاً هایپرسیین توجه بسیاری از محققین را در زمینه علوم دارویی و تغذیه به خود جلب کرده است. تاکنون اثرات مختلفی برای هایپرسیین به اثبات رسیده است. از آن جمله می‌توان به اثرات ضد افسردگی، ضد میگرن، اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان، ضد باکتری و ضد التهاب اشاره کرد. گیاه گل‌راعی مزرعه‌ای حاوی هایپرسیین می‌باشد و می‌توان آن را به‌عنوان یک منبع فراوان، در دسترس و ارزان قیمت برای هایپرسیین به‌شمار آورد.

همانند هر ترکیب گیاهی دیگر، نخستین گام جهت تهیه مقرون به‌صرفه این ماده دارویی، شناسایی و تعیین مقدار این ترکیب از منابع گیاهی آنها است. لذا در این تحقیق با روشی ساده، ارزان و تکرارپذیر اقدام به جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار هایپرسیین از اندام‌های مختلف گیاه گل‌راعی مزرعه‌ای شد.

نتایج اندازه‌گیری نشان داد که مقدار هایپرسیین در ۱۰۰ گرم پودر خشک برگ، گل و ساقه به ترتیب ۳۱۰ میلی‌گرم، ۲۳۰ میلی‌گرم و ۱۵۰ میلی‌گرم می‌باشد که بر طبق این نتایج میزان هایپرسیین در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است.

مقایسه نتایج طیف UV استاندارد هایپرسیین با هایپرسیین‌های استخراج شده از گیاه گل‌راعی مزرعه‌ای نشان داد مقدار کمی ناخالصی در این اندام‌ها وجود دارد که به‌نظر می‌رسد میزان آن در ساقه بیشتر است.

تغییرات مقادیر هایپرسیین‌های اندام‌های مختلف *Hypericum triquetrifolium* در مراحل مختلف رشد گیاه رشد کرده در ترکیه مورد مطالعه قرار گرفته بود. نتایج تحقیق نشان داده است که میزان هایپرسیین‌های برگ و اندام‌های زایشی در هنگام گل‌دهی و تشکیل میوه بیشترین مقدار را داشته است؛ در حالی که مقدار این مواد با افزایش رشد گیاه در ساقه‌ها کاهش می‌یابد. برگ‌ها در مقایسه با اندام‌های

منابع

- 1-Ghahraman A. Color Atlas of Iranian Flora. Research Institute of Forest and Rangelands publishing; 1996. p. 3071.
- 2-Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhang Moaser; 1996. p. 137.
- 3-Xu Y, Lu C. Raman spectroscopic study on structure of human immunodeficiency virus (HIV) and hypericin-induced photosensitive damage of HIV. *Sci China C Life Sci* 2005;48:117-32.
- 4-Miskorsty P. Hypericin--a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets* 2002;3:55-84.
- 5-Blank M, Lavie G, Mandel M, Hazan S, Orenstein A, Meruelo D, et al. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. *Int J Cancer* 2004; 111:596-603.
- 6-Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 2001;34:116-8.
- 7-Carpenter S, Fehr MJ, Kraus GA, Petrich JW. Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: a molecular flashlight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 12273-7.
- 8-Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, et al. Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001;45:517-24.
- 9-Sarris J, Kavanagh DJ. Kava and St. John's Wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. *J Altern Complement Med* 2009;15:827-36.
- 10-Couladis M, Baziou P, Verykokidou E, Loukis A. Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytother Res* 2002;16:769-70.
- 11-Apaydin S, Zeybek U, Ince I, Elgin G, Karamenderes C, Ozturk B, et al. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *J Ethnopharmacol* 1999;67:307-12.
- 12-Bruni R, Sacchetti G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 2009;14:682-725.
- 13-Knox JP, Dodge AD. Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin. *Plant Cell Environment* 1985;8:19-25.
- 14-Ayan AK, Cirak C. Variation of hypericins in *Hypericum triquetrifolium* Turra growing in different locations of Turkey during plant growth. *Nat Prod Res* 2008;22:1597-1604.
- 15-Xenophontos M, Stavropoulos E, Avramakis E, Navakoudis E, Dornemann D, Kotzabasis K. Influence of the developmental stage on the (proto)-hypericin and (proto) pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete. *Planta Med* 2007;73:1309-15.
- 16-Alali F, Tawaha K, Al-Eleimat T. Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra (*Hypericaceae*) growing wild in Jordan . *Nat Prod Res* 2004;18:147-51.

Isolation and Determination of Hypericins from Different Parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra Grown in Khozestan by UV/Visible Spectrophotometry

Nasrin Aghel^{1*}, Zahra Ramezani², Haniyeh Jalalitalab³

1-Associate Professor of Pharmacognosy.

2-Assistant Professor of Medicinal Chemistry.

3-Pharmacist.

1-Department of Pharmacognosy, Medicinal Plant Research Center, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2-Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3-Pharmacist.

*Corresponding author:

Nasrin Aghel; Department of Pharmacognosy, Medicinal Plant Research Center, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +98916003228
Email: aghelnas@yahoo.com

Abstract

Background & Objective: Hypericin is a naphthodianthrone with multiple pharmacologic actions. *Hypericum triquetrifolium* Turra grows in different part of Iran. The aim of the present study was to isolate and determine the quantity of hypericins in different parts (leaf, flower and stem) of this plant grown in Khozestan province.

Materials & Methods: Different parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra (leaf, flower and stem) were collected and extracted with methanol 50% using soxhlet apparatus. Hypericin was determined using UV/Visible spectrophotometer at 590 nm.

Results: The percents of hypericin in leaves, flowers and stems were 310, 210 and 150 mg/100g, respectively.

Conclusion: Leaves and flowers of *Hypericum triquetrifolium* Turra have considerable amounts of hypericin.

Keywords: *Hypericum triquetrifolium* Turra, Hypericin, UV/Visible spectrophotometry.

►Please cite this paper as:

Aghel N, Ramezani Z, Jalalitalab H. Isolation and Determination of Hypericins from Different Parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra Grown in Khozestan by UV/Visible Spectrophotometry. *Jundishapur Sci Med J* 2012;11(3):285-294

Received: Apr 28, 2010

Revised: May 4, 2011

Accepted: Jan 21, 2012