

کلیات: برای شناسایی گیاهان از روش های مختلف میکروسکوپی و ماکروسکوپی و روش های مولکولی استفاده می گردد. روش های میکروسکوپی به بررسی ویژگی هایی از گیاهان می پردازد که اساسا با چشم غیر مسلح قابل دیدن یا تمیز دادن نیستند. این روش ها عمدتا به دو گروه تقسیم می شوند:

- ۱- مقطع شناسی: در این روش برشهای بسیار باریک از بافت های گیاهی به کمک میکروتوم های دستی یا اتوماتیک تهیه می شود و پس از رنگ آمیزی بافت ها، ویژگی آنها توسط میکروسکوپ با درشت نمایی ۴۰ تا ۱۰۰ بررسی می گردد. نوع رنگ آمیزی بر اساس اهداف مورد نظر متفاوت هست و با این روش می توان به ساختارهای سلولی سازنده اندام ها، محل ذخیره مواد مختلف نظیر نشاسته، روغن ها، وجود یا عدم وجود لیگنین، کانالهای ترشحاتی، کرک ها و ... پی برد.
- ۲- پودر شناسی یا خرده نگاری: در این روش مقدار اندکی از پودر اندام مورد نظر در قطره ای از اب شناور گردیده و در زیر میکروسکوپ با درشت نمایی ۱۰ تا ۴۰ بررسی می گردد. پر واضح است که در این روش نیازی به رنگ آمیزی های زمان گیر و پرهزینه نیست و عین سادگی نتایج رضایت بخشی حاصل می گردد. با اینحال بایستی اضافه نمود که برای مشاهده برخی بافت ها و یا قطعات به روش خرده نگاری، عملیات رنگ آمیزی قابل اجرا گاه مفید می باشد.

روش های ماکروسکوپی بیشتر بر شناسایی صفات ظاهری (مورفولوژیک) گیاهان به کمک کلیدهای گیاهشناسی استوار است که در جلسات آتی با این روش ها آشنا خواهید شد. روش های مولکولی در این درس آموزش داده نخواهند شد.

خرده نگاری

گیاهان مختلف دارای ویژگی های منحصر به فردی هستند که سبب تمایز آنها از یکدیگر می شوند. از جمله این ویژگی ها می توان به خواص اورگانولپتیک (عطر، طعم، رنگ) و صفات آناتومیک (شکل روزنه ها، نوع و شکل کرک ها، نوع و شکل سلول های اپیدرمی، پارانشیمی، شکل دانه های گرده و ...، حضور کریستال های مختلف اگزالات و کربنات و ... اشاره نمود. این ویژگی ها هم در گیاه کامل و دست نخورده و هم در پودر آن گیاهان قابل مشاهده و ردیابی می باشند. بی شک دو گونه گیاهی

متفاوت با صفات میکروسکوپی یکسان را نخواهیم یافت. با توجه به منابع قابل دسترس و مطالعات منتشر شده، اغلب صفات ظاهری و درونی گیاهان بویژه انواع پر کاربرد در اختیار محققین می باشند و این افراد با کمی ممارست به سادگی می توانند با مقایسه صفات پودر مورد بررسی با الگوهای منتشر شده به ماهیت آن پی ببرند. در شناسایی پودرها ویژگی های ارگانولپتیک گیاهان مثل بو، طعم، رنگ و شکل ظاهری نیز از اهمیت برخوردار است. بطور کلی معیارهای انسانی جهت تشخیص نظیر حس های بویایی، چشایی، بینایی و لامسه خیلی حساس و قابل توجه بوده و بر خلاف معیارهای تشخیص مکانیکی این حواس وقتی بهتر می تانند تشخیص دهند که ممارست آشنایی زیادی با داروهای گیاهی داشته باشند. از جمله آزمایشات مقدماتی که می تواند کمک زیادی به تشخیص و شناسایی پودرها نماید، آزمایش بو می باشد. اگر حدود ۱۰۰ میلی گرم از گرد مورد آزمایش را بین دو انگشت و یا کف دست ها مالش دهید در صورت معطر بودن گرد، با این عمل بوی آن ظاهر گشته و استنشام خواهد شد. با این روش می توان ضعیف یا قوی بودن یا نداشتن بو را مشخص نمود. همچنین با این آزمایش می توان نوع بو مثل بوی خوش، بوی گنبدگی، بوی الودگی قارچی، بوی ترشیدگی و غیره را تشخیص داد و با بوهای استاندارد مقایسه نمود. به عنوان مثال با این روش به راحتی می تان حضور زنجبیل، هل، رازیانه، نعنا فلفلی، میخک و ... را در پودر تشخیص داد.

روش خرده نگاری یا میکروسکوپی به دلیل سادگی، کم هزینه بودن و قابلیت اجرا با حداقل امکانات آزمایشگاهی و کم ترین مقدار اندام گیاهی در صنایع داروسازی و پزشکی قانونی از کاربرد زیادی برخوردار است. خرده نگاری یک روش فارماکوپه ای ساده برای تشخیص گیاهان مورد استفاده در صنایع داروسازی و کنترل تقلبات صورت گرفته در مراحل مختلف از تولید و عرضه گیاه تا فرمولاسیون می باشد. در پزشکی قانونی نیز از ویژگی های گیاهان و یا اجزای گیاهی نظیر دانه های گرده برای تشخیص جرایم نظیر دزدی ها، زهر آگینی های عمدی با گیاهان و به ویژه کشف منشاء مواد مخدر طبیعی استفاده می شود. دانشجویان عزیز برای اطلاع از این کاربردها شیوه استفاده از آنها در کشف جرایم می توانند به منابع زیر مراجعه نمایند:

1-David W. Hall, Jason H. Byrd . Forensic Botany: A Practical Guide Wiley-Blackwell 2012

2-Heather Miller Coyle. Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework [1 ed.] CRC Press, 2004

3-Jane H Bock, David O. Norris. Forensic Plant Science [1 ed.], Academic Press, 2016

نکته:

تکنیک خرده نگاری از ارزش ویژه ای در مطالعات باستانشناسی برخوردار است و گروه های مختلف باستانشناس با آنالیز بقایای بجا مانده از تمدن های قدیمی توانسته اند به شیوه تغذیه، نوع گیاهان مورد استفاده و نیز سیر تحول کشت گیاهان پی ببرند.

در اغلب فارماکوپه ها بخش زیادی از مونوگراف های مربوط به گیاهان رسمی ذکر شده به مباحث خرده نگاری تخصیص داده شده است (مثل فارماکوپه کشورهای چین، هند، آلمان، سوئیس، فرانسه ، انگلیس و امریکا).

جهت سادگی کار پودرهای پر کاربرد در صنایع داروسازی گیاه درمانی را می توان به چند دسته تقسیم کرد:

1- پودرهای حاوی نشاسته:

الف- پودرهایی که فقط از نشاسته تشکیل شده اند: این پودرها به عنوان اکسیپیان در داروسازی استفاده می شوند مثل نشاسته برنج و گندم (نشاسته سیب زمینی ارزان است) شناسایی این پودرها بر اساس ویژگی گرانول های نشاسته صورت می گیرد.

ب- پودرهایی که حاوی نشاسته هستند اما شناسایی آنها علاوه بر ویژگی گرانول ها به کمک سایر قطعات (سلول های اولئورزینی -آوند -سلول های چوب پنبه ای و ...) هم صورت می گیرد مثل زنجبیل.

ج- پودر های حاوی نشاسته که شناسایی با توجه به سایر اجزا صورت می گیرد مثل گیاه کولا که بعنوان stimulant استفاده می شود. نشاسته های موجود در دانه های کولا ویژه نیست و برای شناسایی کاربرد ندارد.

۲- پودرهای فاقد نشاسته: این پودرها یا نشاسته ندارند و یا مقدار نشاسته خیلی کم است و شناسایی این پودرها با توجه به ویژگی سایر قطعات انجام می شود مثل:

الف- روزنه ها (شکل روزنه ها، توزیع روزنه ها، نحوه قرارگیری سلول های همراه) انواع روزنه از لحاظ اتصال سلول های همراه:

۱. Paracytic

- ۲. Diacytic
- ۳. Anisocytic
- ۴. Anomocytic

- ب- کرک ها Trichome (ترشحي :پايه يک سلولي سر يک سلولي، پايه چند سلولي سر يک سلولي، پايه يک سلولي سر چند سلولي، پايه چند سلولي سر چند سلولي - محافظ :يک سلولي، چند سلولي يک ردیفه، چند سلولي مجتمع يا مرکب)
- ج- کریستال اگزالات کلسیم داخل يا خارج سلولي (که به اشکال مختلف نظير رافيد Raphide يا سوزنی که باعث آسیب شديد مخاطی و تورم می شود مثل گیاه گل شپووری يا کالا، ديفن باخيا- خوشه ای Cluster يا ستاره ای يا ماکل Macle (با Mackle اشتباه نشود) - مکعب مستطیل يا منشوری Prism در سلول های همراه فيبر ها و آوند و نهايتا آمورف يا بی شکل که شبیه دانه های شن دیده می شوند گاه به سلول های حاوی آنها سلول های آسابل گفته می شود) و کریستال کربنات کلسيم (که سيستوليت ناميده می شوند).
- د- قطعات آوندی: چوب، آبکش، ناقص يا کامل
- ه- قطعات اپی درم
- و- پارانشيم اسفنجی
- ز- اسکلريد: سلول های مرده حاوی ديواره چوبی ضخيم . مانند گیاه چای و گیاه آکونیتوم ناپلوس. اگر گیاه اخير در دشت رشد کرده باشد فاقد اسکلريد و اگر در ارتفاع رشد کرده باشد دارای اسکلريد خواهد بود.

❖ شناسایی پودرهایی که تنها حاوی نشاسته هستند:

یادآوری-۱

ساختار نشاسته: Starch (Amylum)
 نشاسته از دو جزء تشکیل می شود: آمیلوز و امیلوپکتین. امیلوز بیشتر از امیلو پکتین در اب محلول است. معمولاً 20 تا 30 درصد نشاسته از امیلوز مابقی از امیلوپکتین ساخته می شود. نشاسته برخی واریته های ذرت و برخی غلات، تماماً از امیلوپکتین تشکیل می یابد. از طرف دیگر نشاسته برخی واریته های نخود که سطح نا صاف و چرکیده دارند ممکن است بیش از 98% امیلوز داشته

باشند. امیلوز و امیلوپکتین هر دو از تراکم واحدهای الف-د- گلوکپیرانوز تشکیل می‌بایند. امیلوز از زنجیره خطی گلوکوز که به شکل مارپیچی ارایش یافته اند بوجد می‌آید و در هر دور مارپیچ 6 گلوکز شرکت می‌کند واحدهای متوالی گلوکز با اتصال 1 به 4 به هم متصل می‌شوند. زنجیره راست امیلوز ممکن است حاوی 200 تا 1000 واحد گلوکز باشد. آمیلوپکتین دارای تعداد انبوهی از واحدهای گلوکز (2000 تا 200000) است. این ترکیب علاوه بر زنجیر خطی دارای زنجیرهای جانبی متعدد در ساختار خود است که هرکدام نیز می‌توانند مجددا منشعب گردند. شاخه دار شدن معمولا در حد فاصل بین 25 واحد گلوکز صورت می‌گیرد. در محل ایجاد انشعاب، اتم شماره 6 کربن انتهایی با پیوند الفا به کربن شماره 1 اولین واحد گلوکز در زنجیر جانبی متصل می‌شود (همچنین اتصال 1 به 3 نیز گزارش شده است).

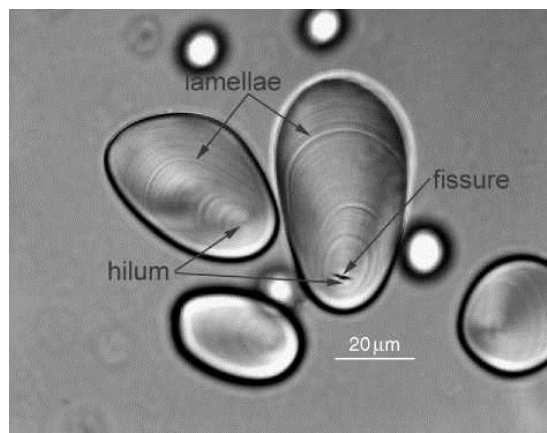
تست رنگی:

آمیلوز به کمک محلول ید به رنگ ابی مایل به سیاه و آمیلوپکتین به رنگ قرمز مایل به بنفش در می‌آید.

یادآوری-۲

نشاسته با محلول‌های حاوی املاح ید (نظیر تنتور ید یا محلول لوگول) کمپلکس آبی رنگی را تشکیل می‌دهد. از این روش می‌توان برای شناسایی حضور نشاسته در محیط نظیر کشف تقلب در شیراستفاده نمود. اما این قادر نیست نوع نشاسته موجود را مشخص نماید. تشخیص نوع نشاسته با بررسی ویژگی‌های دانه‌های نشاسته به کمک میکروسکوپ (تحت نور معمولی و پولاریزه) امکان پذیر است.

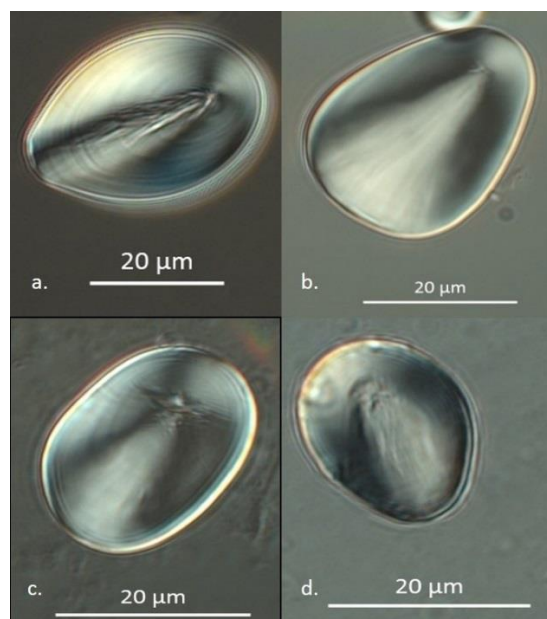
مورفولوژی دانه های نشاسته



دانه هر نشاسته منحصر به فرد دارای ویژگی های زیر است:

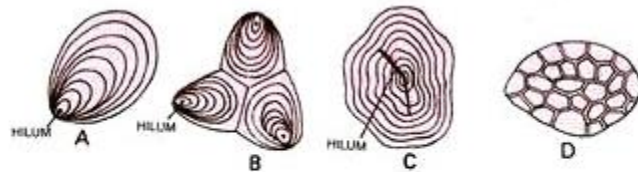
۱- ناف Hilum : مرکز شکل گیری دانه

شکاف Fissures : شکاف عمیق و طولی در دانه های نشاسته برخی گیاهان وجود دارد.



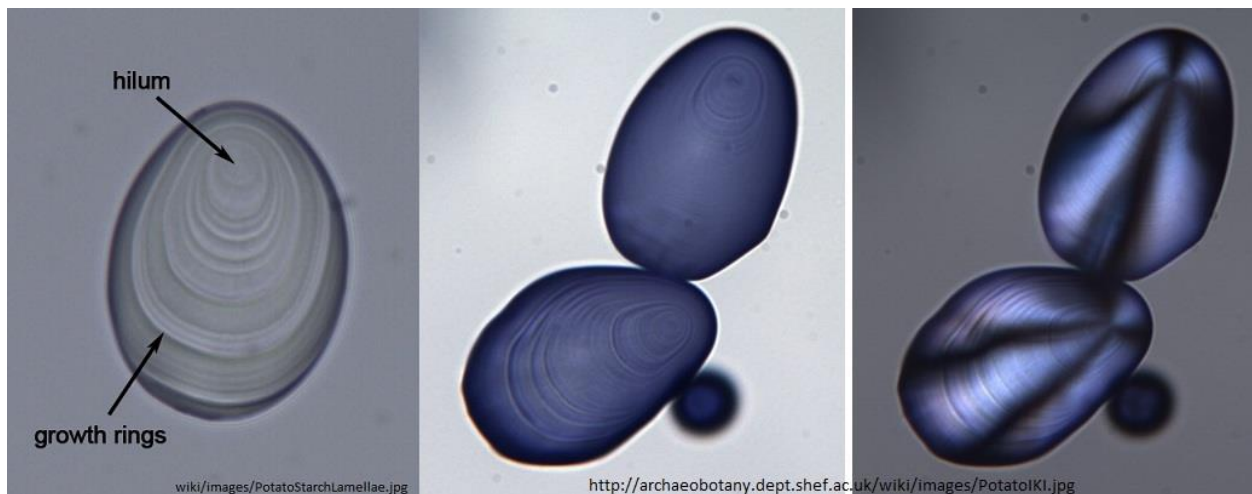
The four starch grains studied in Louderback's paper, each showing a distinct longitudinal fissure. Photos: Lisbeth Louderback

- ۲- صفحات Lamellae: لایه های رشد دانه نشاسته.
- ۳- خطوط متحدالمركز، حفرات، فرورفتگی: فقط در برخی نشاسته های مشاهده می شود.
- ۴- صلیب نهفته Extinction cross یا Maltese Cross : الگوی صلیبی شکل یا متقاطع تیره رنگ و چرخنده ای هستند که فقط به کمک نور پولاریزه قابل مشاهده اند.
- گونه های متلف گیاهی دانه های نشاسته متفاوتی از نظر شکل ظاهری را تولید می کنند. این تفاوت ها از جنبه های مختلف قابل مشاهده اند به عنان مثال:
- نوع گرانول : به شکل ساده، یا مرکب دیده می شود.



Types of starch grains. A, simple starch grain of Potato. B, compound starch grain of Potato. C, a simple starch grain of Maize. D, a compound starch grain of Rice.

- اندازه شکل: گستره وسیعی از اندازه و شکل در میان گرانول های نشاسته مشاهده می شود. انهایی که غنی از رشته امیلوز هستند بسیار کشیده تر و نامنظم تر هستند. اندازه آنها از 1 تا 100 میکرون (گاهی بیشتر) متفاوت است. محل ذخیره و سن گرانول ها بر شکل آنها تاثیر گذار است.



Left: before staining with iodine, middle: after staining with iodine, right: same under polarizing light (Extinction cross) .

ویژگی هایی که امکان شناسایی دانه های نشاسته را ممکن می سازد شامل موارد زیر است:

- حضور ناف
- لایه لایه بودن
- چرخش نوری و صلیب نهفته

گرچه گونه های متفاوت دانه های نشاسته اختصاصی تولید می کنند با اینحال نباید تغییرات درون گونه های را از نظر دور داشت. از اینرو دسترسی به مرجع جامعی از نمونه ها برای مقایسه ضروری است.

- توجه داشته باشید که دانه های همه نشاسته ها حاوی ناف می باشند اما این ناف در دانه های نشاسته برخی گیا هان به کمک میکروسکوپ های نوری قابل مشاهده نیست.
- ذرات نشاسته بدست آمده از غده های زیرزمینی، پیازها و ریزوم ها دارای ناف غیر مرکزی هستند.
- ذرات نشاسته دانه ها(غلات) و میوه ها مرکزی هستند.
- ذرات نشاسته غده های زیرزمینی، پیازها و ریزوم ها معمولا دوکی یا تخم مرغی ، بیضوی یا صدفی شکلند و ذرات نشاسته دانه ها(غلات) و میوه ها معملا چند وجهی، چند وجهی مایل به گرد یا گردند.

توجه:

نشاسته رسمی (Amylum, B.P.) از گندم *Triticum sativum* ، ذرت *Zea Mays* و برنج *Oryza sativa* تهیه می شود.

بخش عملی :

برای بررسی ویژگی پودر ها به کمک میکروسکوپ مراحل زیر را انجام می دهیم.

- ۱- اندام مورد مطالعه را ابتدا به صورت پودر نرم آسیاب می کنیم.
- ۲- مقداری از پودر را در یک شیشه ساعت یا ظرف مناسب دیگر مثل پلیت میکروبیولوژی می ریزیم و برای یکنواخت شدن توزیع قطعات در آن، پودر را کاملا مخلوط می کنیم .

- ۳- برای جلوگیری از الوده شدن پودر با اجسام خارجی توصیه می شود از دستکش بدون تالک هنگام کار استفاده نموده و از انتقال پودر ها با یک اسپاتول واحد پرهیز نمایید.
- ۴- به منظور برطرف کردن چربیهای روی لام که از مرحله ساخت در کارخانه بجا می مانند، آنها را با اتانول یا مخلوط اب و اتانول شستشودهید. از هرلام فقط یکبار استفاده کنید.
- ۵- یک یا دو قطره اب مقطر را در وسط لام بریزید و با گوشه لامل یا اسپاتول مقدار اندکی از پودر (نه خیلی زیاد و نه خیلی خیلی کم) را بر روی اب منتقل کنید
- ۶- یک لبه لامل را با قطره اب و پودر شناور در ان تماس دهید و با زاویه ۴۵ درجه اب و محتویات را توسط ان بر روی لام به جلو عقب حرکت دهید تا هم پودر کاملا پخش شود و هم به صورت یک لایه نازک بر روی لام گسترش یابد. سپس لام را به آرامی طوری که حباب هوا در زیر ان به دام نیفتد بر روی سطح بخوابانید.
- ۷- لام را در زیر یکرسکپ ابتدا با درشت نمایی ۴ و سپس ۱۰ و در صورت نیاز ۴۰ بررسی کنید. فراموش نکنید که کم و زیاد کردن نور و تغییر دادن عمق میدان با میکرومتر شرط اساسی برای دیدن قطعات و صفات ظاهری آنها می باشد.
- ۸- کل میدان را جهت دیدن قطعات مختلف بررسی کنید و بدین منظور کاملا منظم و به صورت رفت و برگشت (زیگزاگ) از یک طرف میدان شروع به جستجو نمایید.
- ۹- هرگز سطح لام و لامل را با انگشتان خود لمس نکنید.

ویژگی نشاسته سیب زمینی Potato Starch

این نشاسته را از غده های زیر زمینی گیاه *Solanum tuberosum* (Solanaceae) تهیه می کنند :

تختصاصات این نشاسته در زیر میکروسکوپ به شرح زیر است:

1- دانه ها یا گرانول های نشاسته بصورت بیضی شکل گاهی متمایل به گرد، تخم مرغی شکل یا صدفی شکل و بزرگ اند.

2- ناف Hilum نقطه ای غیر مرکزی در باریک ترین قسمت گرانول دیده می شد.

3- خطوط متحدالمركز به دور ناف مشاهده می گردد.

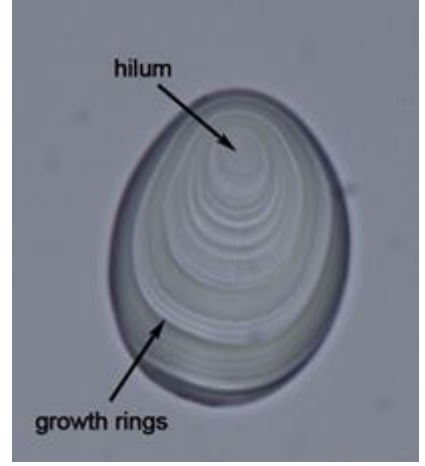
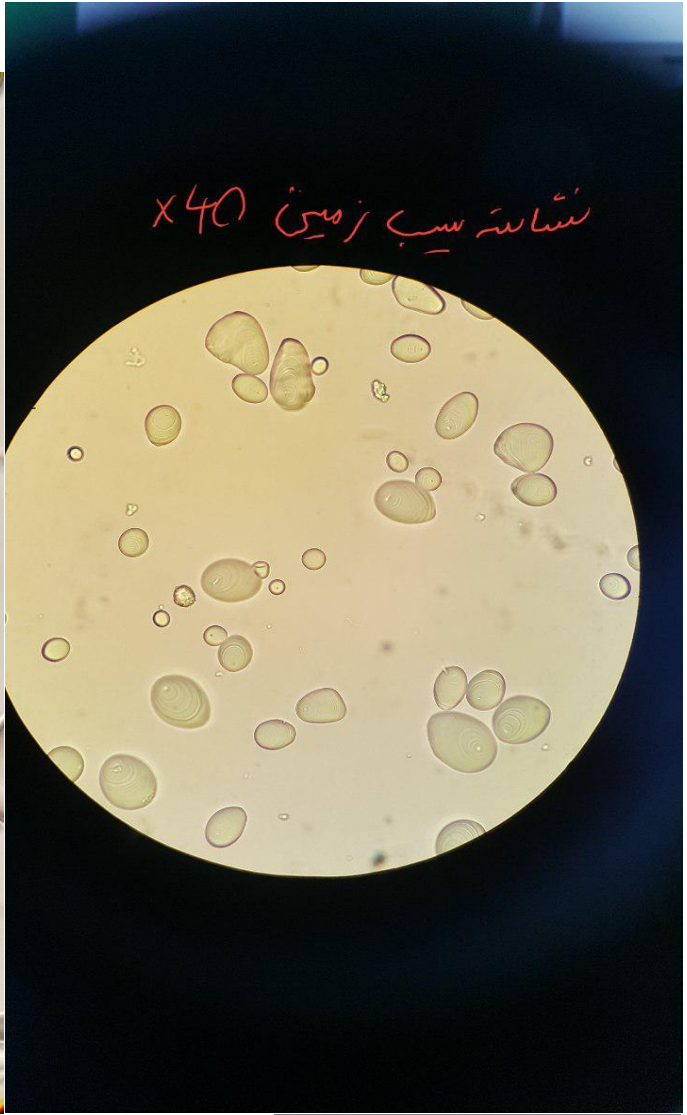
4- گرانول های نشاسته ساده (منفرد) و ندرتا مرکب (دوتایی یا چندتایی اند).

5- اندازه گرانول ها خیلی درشت بوده و در محدوده 75 تا 100 (گاهی تا 150) میکرومتر قرار می گیرند.

نشاسته سیب زمینی

1- فیبر ندارد

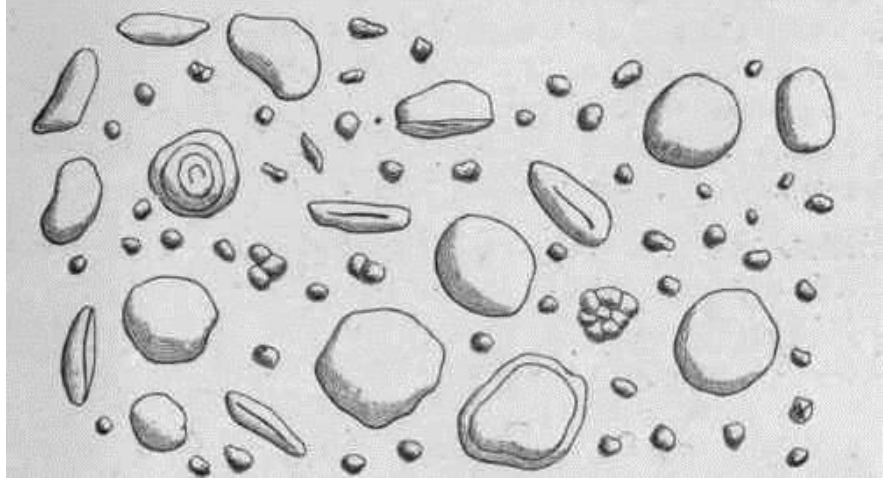
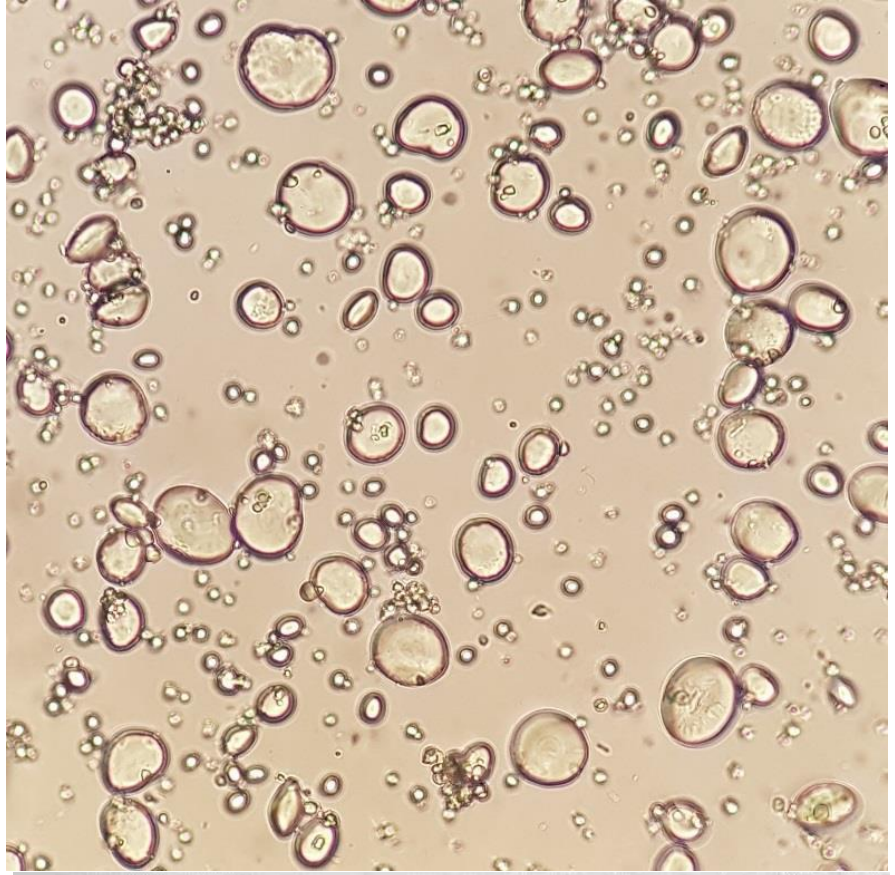
2- آوند ندارد



نشاسته گندم : (wheat starch)

نشاسته گندم از دانه های گیاه *Triticum aestivum* (Poaceae) بدست می آید. این نشاسته دارای یژگی های زیر است:

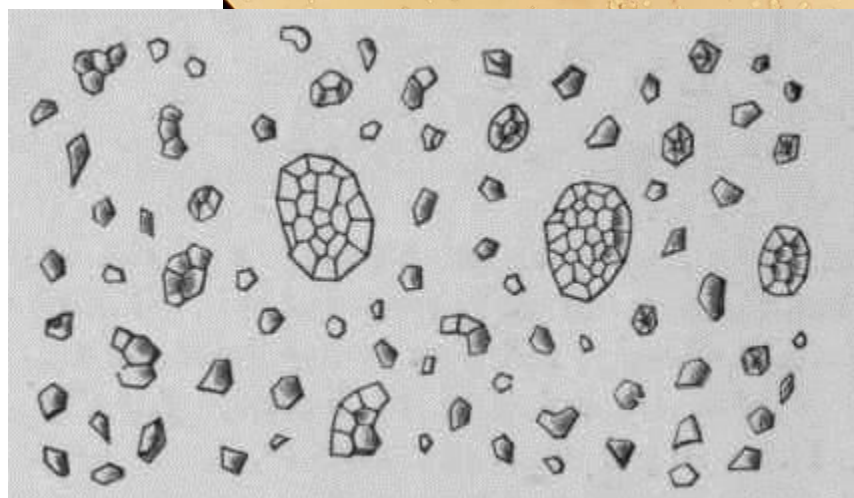
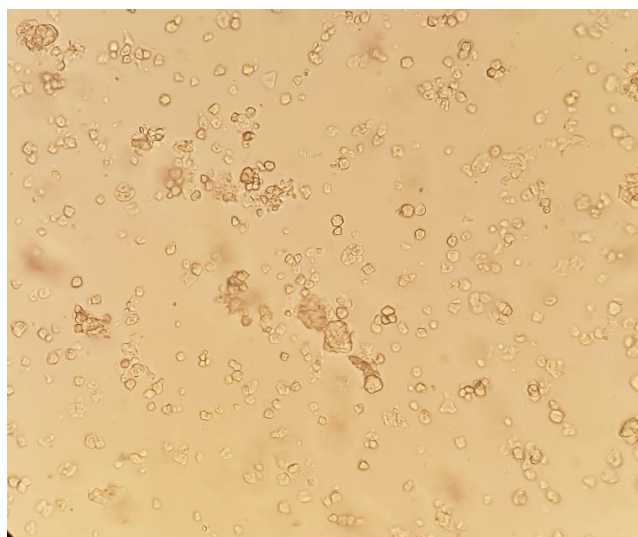
- 1- اولین چیزی که در زیر میکروسکوپ به چشم میخورد دوسته گی در اندازه ذرات (گرانول ها) ست. دسته اول بسیار کوچکتر بوده و اندازه آنها 10 تا 15 میکرومتر و دسته دوم درشت تر بوده و اندازه آنها 35 تا 45 میکرومتر می باشد.
- 2- گرانول ها منفرد و ندرتا مرکب، گرد تا تقریبا گرد بوده و در منظره جانبی به شکل لیمو (Biphasic) یا بیضی شکل با دو برآمدهگی در طرفین) ، عدسی و یا همشکل دانه گندم دیده می شوند.
- 3- ناف نقطه ای مرکزی است که در دید جانبی به صورت خطی دیده خواهد شد.
- 4- در برخی از دانه های نشاسته خطوط متحدالمركز بسیار باریک و نا واضح دور ناف مشاهده می شود.
- 5- قطعات لیمویی یا عدسی شکل برای تشخیص از اهمیت برخوردارند و ویژه می باشند (Characteristic). قطعات گرد ارزش تشخیصی زیاد ندارند و برای اطمینان از وجود نشاسته گندم باید در هر میدان دید حداقل چندین قطعه لیمویی یا عدسی و یا گندم شکل را مشاهده نمود



نشاسته برنج Rice starch

نشاسته برنج را از دانه های گیاه *Oriza sativa* (Poaceae) بدست می آرند. ویژگی های این نشاسته به شرح زیر است:

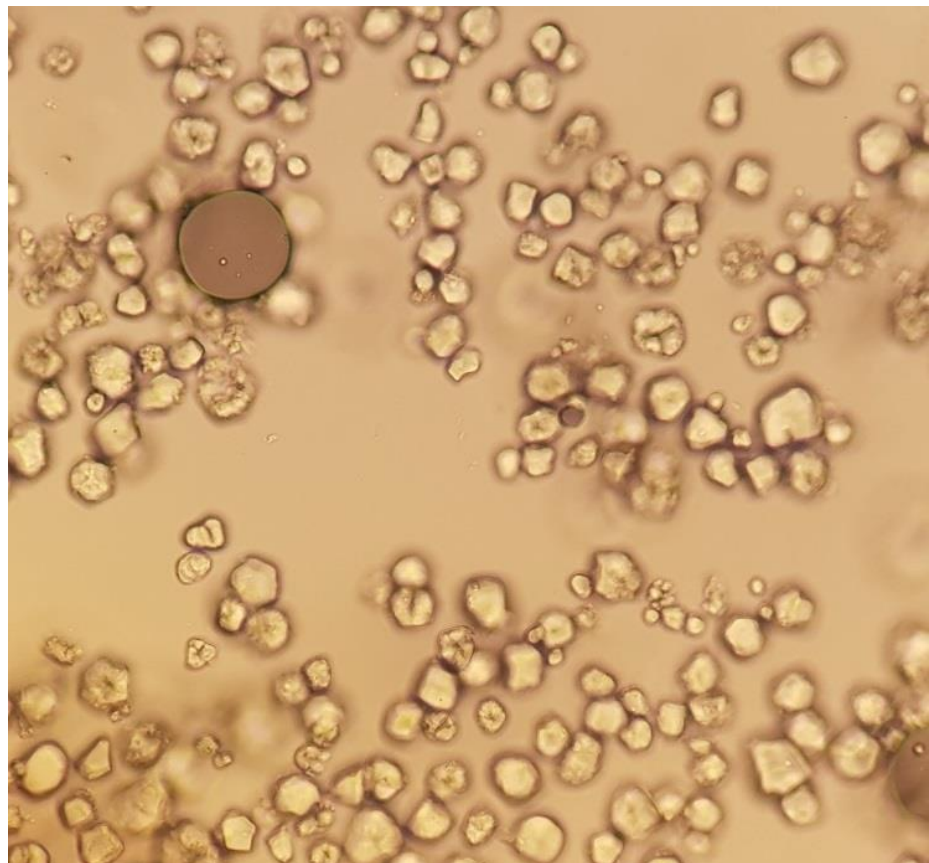
- ۱- اندازه ذرات یا گرانول ها بسیار کوچک بوده و حدود ۲ تا ۱۰ میکرومتر می باشند .
- ۲- ذرات غالباً مرکب (گاهی متشکل از ۱۰۰ دانه نشاسته) و گاهی منفردند .
- ۳- ذرات چند وجهی نامنظم یا گرد متمایل به چند وجهی هستند .هم منفرد و هم مجتمع
- ۴- گرانول ها فاقد ناف و خطوط متحدالمركز هستند.



نشاسته ذرت (Maize starch یا Corn starch)

این نشاسته از دانه های گیاه *Zea mays* (Poaceae) بدست می آید. گرانول های نشاسته ذرت دارای ویژگی های زیرند:

- 1- به شکل گرد تا چند وجهی نامنظم مایل به گرد دیده می شوند و عمدتاً منفرد هستند.
- 2- حد 40 تا 55 میکرومتر قطر دارند.
- 3- دارای ناف مرکزی ستاره ای شکل با 3 تا 5 شعاع می باشند (شکافهای عمیق)
- 4- خطوط متحدالمركز معمولاً قابل مشاهده نیستند.



رفرانسها:

- 1- Roy Upton , Alison Graff , Georgina Jolliffe , Reinhard Länger, Elizabeth Williamson **American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy - Microscopic Characterization of Botanical Medicines 1st Edition.**
- 2- Shailendra S. Gurav , Nilambari S. Gurav **Indian Herbal Drug Microscopy, 2014.**

- 3- Betty P Jackson, **Powdered vegetable drugs;: An atlas of microscopy for use in the identification and authentication of some plant materials employed as medicinal agents**, Unknown Binding – January 1, 1974

با تشکر از دانشجویان عزیز سالهای قبل که در تهیه عکس ها بنده را یاری
نموده اند.