فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۷

بررسی فیتوشیمیایی، سنجش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه گیاه وتیور *(Chrysopogon zizanioides)*

فرخنده پنبه‌کار[۱]، بابک مختاری[۱]، سعادت رستگارزاده[۱]، مریم کلاهی[۲*]

[۱] گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه چمران اهواز، اهواز، ایران.
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه چمران اهواز، اهواز، ایران.

[*] Email: m.kolahi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۲۰

چکیده

گیاه وتیور با نام علمی *Chrysopogon zizanioides* از خانواده گندمیان، سازگاری بالایی در شرایط مختلف از خود نشان می‌دهد. این گیاه توسط بانک جهانی به عنوان Vetiver Grass Technologyیا VGT معرفی شده و جهت حفاظت از محیط زیست در دنیا ترویج می‌شود. هدف از این تحقیق شناسایی فیتوشیمیایی ترکیبات تشکیل دهنده ریشه وتیور، سنجش برخی متابولیت‌های ثانویه و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ اتانولی آن بود. به منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در ریشه، از آزمون‌های فیتوشیمیایی مختلف و دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی استفاده شد. میزان متابولیت‌های ثانویه مانند فنل، فلاونوئید و فلاونول ریشه ویتور به روش اسپکتروسکپی سنجیده شد. نتایج آزمایش‌های فیتوشیمیایی اولیه و طیف سنجی جرمی نشان داد که عصاره ریشه وتیور دارای ترکیبات گیاهی فعال زیستی متعلق به خانواده‌های مختلف مانند تانن، گلیکوزید، آلکالوئید، فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و غیره می‌باشد. در آزمایشات انجام شده با افزایش غلظت عصاره ریشه وتیور، میزان فنل، فلاونوئید، فلاونول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با اختلاف معنی‌داری افزایش یافت. میزان بالای ترکیبات فنیل پروپانوییدی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا در ایجاد سازگاری گیاه تحت شرایط نامساعد کشت بسیار حائز اهمیت است. براساس این نتایج، وتیور می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، در جداسازی ترکیبات فعال و ساخت داروها برای درمان بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنلی، فیتوشیمیایی، وتیور، GC-MS.

مقدمه

گیاه وتیور با نام علمی *Chrysopogon zizanioides* و نام انگلیسی Vetiver از رده غلات و خانواده گندمیان است که بومی جنوب هند می‌باشد. این گیاه دارای ریشه‌ای منشعب و در هم پیچیده است که طول آن به ۲ متر می‌رسد. برگ‌های سوزنی این گیاه نسبتا

محکم و طویل هستند، طول این برگ‌ها بین ۱۵ تا ٤٥ سانتی‌متر و پهنای آن‌ها کم تر از یک سانتی متر است [۱۸]. گیاه وتیور سازگاری بالایی در شرایط مختلف از خود نشان می‌دهد. سرما و گرمای هوا را از ١٤- تا ٥٥ درجه سانتی‌گراد تحمل کرده و با طیف وسیعی از اسیدیته خاک در محدوده ۳ تا ۱۲ سازگار و در مقابل آفت کش‌ها مقاومت بالایی دارد. وتیور با به دام انداختن آلاینده‌ها نقش محافظتی در خاک‌های زراعی ایفا می‌کند. ریشه‌ی عمیق و حجیم این گیاه باعث مقاومت گیاه در برابر سیلاب‌ها شده و در عین مصرف کم آب محافظ خاک بوده و در تمام مناطق از جمله دامنه‌های شیب‌دار از فرسایش خاک جلوگیری می‌کند. کاشت وتیور به صورت پرچین در کنار رودخانه از عریض شدن و گسترش آن جلوگیری کرده و مرز رودخانه و ساحل را حفظ کرده و مانع گسترش و هدررفت آب به زمین‌های اطراف می‌شود. کاشت این گیاه در وسط رودخانه مانند سد طبیعی از شدت آب کاسته و مانع سیلاب شده ضمن اینکه کار تصفیه آب را هم تا مقادیر قابل توجهی انجام می‌دهد [۲۵]. از دیگر کاربردهای گیاه وتیور استفاده از ریشه آن، به عنوان خوشبو کننده آب آشامیدنی وشربت و همچنین صنعت عطرسازی است. ساقه خشک شده آن برای سقف‌های حصیری و کارهای هنری نظیر سبد بافی وکلاه حصیری کاربرد دارد. قسمت‌های مختلف گیاه وتیور خواص درمانی مخصوص به خود را دارد، جوشانده ریشه وتیور پایین آورنده تب و درمان بیماری‌های جنسی است. از خمیر ریشه آن در درمان اسهال خونی و سردرد استفاده می‌شود [۱۸]. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در سه خانواده مولکولی بزرگ ترکیبات نیتروژن دار، ترپن‌ها و فنلی‌ها در نظر گرفته می‌شوند [۲۰]. آلکالوئیدها زیر مجموعه ترکیبات نیتروژن‌داراند که به عنوان متابولیت ثانویه نقش دفاعی در حفاظت گیاه در برابر عوامل تنش، علف‌خواران و عوامل بیماری‌زا را بر عهده دارند. ترپن‌ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت ثانویه را در گیاهان شامل می‌شوند. متنوع‌ترین ترکیبات گیاهی ترپن‌ها هستند که اغلب در آب غیرمحلول‌اند و از واحدهای ۵ کربنی ایزوپرن (۲ و ۵ بوتا دی ان) مشتق می‌شوند. این گروه از متابولیت ثانویه عامل ایجاد بو هستند. رایج‌ترین گروه از خانواده متابولیت‌های ثانویه ترکیبات فنلی هستند. با توجه به تنوع شیمیایی، فنل‌ها نقش‌های گوناگونی را در گیاه ایفاء می‌کنند و بسیاری از آنها به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا به کار می‌روند. از دیگر نقش‌های ترکیبات فنلی پشتیبانی مکانیکی، جلب گرده افشان‌ها، جذب اشعه مضر فرابنفش و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رشد گیاهان رقیب مجاور را می‌توان نام برد [۲۳]. اهمیت زیاد متابولیت‌های ثانویه گیاهان به عنوان داروهای پزشکی، عوامل طعم‌دهنده، رنگ‌ها، روغن‌ها و عطرها و... آن‌ها را برای استفاده انسان‌ها جالب توجه کرده‌اند [۵]. هدف از این تحقیق شناسایی فیتوشیمیایی ترکیبات تشکیل دهنده ریشه وتیور، سنجش متابولیت‌های ثانویه، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی و مطالعه بافت‌شناسی آن بود. به منظور بررسی ارتباط عملکردی و ویژگی‌های سازش پذیری گیاه وتیور در شرایط مختلف و نامساعد محیطی ازجمله پایداری در شرایط غرقابی و تحمل فلزات سنگین، مطالعه تشریحی ریشه گیاه برای درک بهتر ویژگی‌های سازگار شده ریشه انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه

گیاه وتیور در آبان ماه سال ۹٤ از منطقه خوزستان شهررامهرمز با مشخصات جغرافیائی N °۳۱ و E°٤۹ جمع‌آوری شد. شناسایی گونه گیاه توسط بخش گیاه‌شناسی گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. ریشه‌ی گیاه را پس از خشک کردن آسیاب کرده و از الک ۲۵۰ میکرون عبور داده تا کاملا یکنواخت گردد.

عصاره‌گیری از ریشه وتیور

با حلال اتانول که بیشترین میزان استخراج انواع متابولیت ثانویه را در تحقیقات از خود نشان داده است، عصاره‌گیری به مدت ۷ ساعت با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. سپس عصاره بدست آمده توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد[۲٤] .

راندمان عصاره‌گیری

راندمان عصاره‌گیری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{راندمان عصاره گیری} = \frac{\text{مقدار پودر گیاه خام بر حسب گرم} - \text{مقدار تفاله گیاه بر حسب گرم}}{\text{مقدار پودر گیاه خام بر حسب گرم}} \times 100$$

آزمون‌های فیتوشیمیایی

آزمون‌های فیتوشیمیایی به شرح زیر بر روی عصاره ریشه وتیور جهت تشخیص مواد موثره گیاه استفاده شد.

شناسایی پروتئین: شناسایی پروتئین با استفاده از معرف بیوره صورت گرفت. تشکیل رنگ بنفش ارغوانی تاییدی بروجود پروتئین است [۲۷]. **شناسایی ساپونین:** شناسایی ساپونین با استفاده از آزمون کف کنندگی انجام شد [۲٦] .

همچنین این شناسایی توسط آزمون همولیز خون، و تشکیل لخته صورت گرفت[۲۹] .

شناسایی آلکالوئید: به منظور شناسایی ترکیبات آلکالوئیدی موجود در عصاره‌ی گیاه از دو معرف مایر و واگنر استفاده شد [۲٤،۲٦].

شناسایی فلاونوئید: برای شناسایی فلاونوئیدها در روش اول از واکنشگر آمونیاک استفاده شد. در روش دیگر با استفاده از واکنشگر سود و چند قطره اسید کلریدریک رقیق آزمون شناسایی فلاونوئید صورت گرفت [۲٦] .

شناسایی تانن: با استفاده از محلول اتانولی فریک کلریدریک شناسایی تانن انجام شد. در روش دیگر با اضافه کردن استات سرب بر عصاره، رسوبی سفید رنگ بر جای ماند [۱۵] .

شناسایی کاردیک گلیکوزید: تشکیل رسوب کریستالی سفید نارنجی با استفاده از پیکریک اسید اساس این آزمون بود [۹] .

شناسایی استروئید: این آزمون با استفاده از کلروفرم و اسید سولفریک اسید غلیظ انجام شد[۱۵] .

شناسایی ترپنوئید: آزمون سالوسکی با استفاده از کلروفرم و چند قطره اسید سولفوریک غلیظ برای شناسایی ترپنوئید انجام شد[۱۵] .

تجزیه عصاره در روش GC-MS

به منظور شناسایی ترکیبات، عصاره‌های بدست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GCMS) مدل Agilent 19091S-433 تزریق شد. گستره‌ی طیف جرمی از ۵۰ تا ۵۵۰ m/z می‌باشد، گاز حامل، هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه انتخاب گردید. از مقایسه طیف‌های

جرمی، ترکیبات پیشنهادی با استفاده از الگوی قطعات یونی شناسایی شد.

تعیین میزان فنل عصاره‌ی ریشه‌ی وتیور

پس از تهیه غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ٤۰۰۰ از عصاره، میزان فنل در عصاره‌ها به روش فولین- سیوکالتیو انجام شد. به منظور تعیین میزان گروه فنلی، از اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید[١٤] .

تعیین میزان فلاونوئید عصاره‌ی ریشه‌ی وتیور

میزان فلاونوئید عصاره‌ی با استفاده از روش کلرید آلومینیوم و کربنات سدیم انجام شد. جذب محلول‌ها در طول موج nm ٤۲۰ ثبت شد. سپس به کمک منحنی استاندارد کوئرستین، میزان فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید [۲۱] .

تعیین میزان ترکیبات فلاونولی عصاره ریشه‌ی وتیور

تعیین میزان ترکیبات فلاونولی در عصاره‌های با غلظت‌های مختلف تهیه شده، با استفاده از استات سدیم انجام شد. جذب محلول‌ها در طول موج nm ٤٤۰ ثبت شد. با کمک منحنی استاندارد کوئرستین، محتوای فلاونولی عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید [۲۱] .

تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه وتیور

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر اساس احیای رادیکال ۲، ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل سنجیده شد. جذب محلول‌ها در طول موج nm ۵۱۵ ثبت شد و با استفاده از منحنی میزان IC_{50} بدست آمد [۲۱] .

بافت شناسی ریشه گیاه وتیور

در این مطالعه از روش رنگ‌آمیزی مضاعف کارمن زاجی - آبی متیل به منظور تشخیص و تمایز سلول‌ها و بافت‌ها استفاده شد. در این نوع رنگ‌آمیزی دو دسته اصلی مواد سازنده دیواره سلولی (بافت‌های چوبی و سلولزی) از هم متمایز می‌شوند، کارمن زاجی باعث رنگ‌آمیزی دیواره نازک سلولزی و آبی متیل باعث رنگ‌آمیزی چوب، چوب پنبه و کوتین می‌شود. از ریشه گیاه برش‌های عرضی به روش دستی با ضخامتی در حدود میکرون تهیه شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به مدت یک هفته در محلول فیکساتور F.A.A (۲ میلی‌لیتر فرمالدهید ۳۷٪، ۱۷ میلی‌لیتر اتانول ۹٦٪ و ۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید خالص) قرار گرفتند. برش‌گیری به روش دستی و از فاصله ۱۰Cm راس ریشه گیاه انجام شد. در مرحله بعدی برش‌های تهیه شده با استفاده از رنگ‌آمیزی مضاعف کارمن‌زاجی متیل‌بلو رنگ‌آمیزی شد [۱۱] .

آنالیز ایدکس از ریشه گیاه وتیور

به منظور تشخیص نوع و میزان عناصر موجود در ریشه گیاه وتیور از پودر خشک ریشه وتیور آنالیز EDS گرفته شد. بدین منظور از دستگاه طیف سنجی تفکیک انرژی EDSمدل بروکر ساخت آلمان استفاده گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS انجام گردید، مقایسهٔ میانگین داده‌ها با روش دانکن و شفه انجام شد. نمودارهای مقایسه میانگین با نرم‌افزار Excel (۲۰۱۳) رسم شدند.

نتایج

نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی و میزان بازده وزنی- وزنی عصاره

نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی در جدول (۱) ارائه شده است.

میزان بازده وزنی- وزنی عصاره‌گیری با حلال اتانول بروش سوکسله ۱/۰۵ ±۹/۸۷ درصد بود.

آنالیز عصاره به روش GCMS

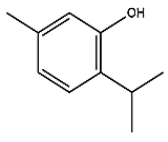
با تحلیل الگوهای شکستگی طیف‌های جرمی، ترکیبات زیر شناسایی شدند (شکل ۱).

نتایج سنجش محتوای فنلی عصاره‌ی ریشه‌ی وتیور

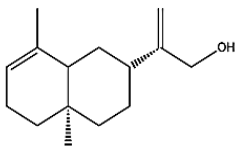
همانطور که در شکل ۲ مشخص است با افزایش غلظت عصاره، میزان محتوی فنلی افزایش می‌یابد و میزان محتوای فنلی در غلظت‌های متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارد و بیشترین میزان فنل در غلظت ٤۰۰۰ ppm مشاهده شد (شکل ۲) ($p < ۰/۰۵$).

جدول (۱): نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی بر روی عصاره اتانولی ریشه گیاه وتیور

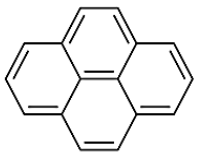
مواد موثره	آلکالوئید	فلاونوئید		ساپونین	ترپنوئید	تانن	اگزالات	پروتئین	گلیکوزید	استروئید
آزمون‌های فیتوشیمیایی	آزمون مایر	آزمون واگنر	آزمایش آمونیاک	آزمون سدیم هیدروکسید	آزمون کف کنندگی	آزمون همولیز خون	آزمون سالکوسکی	آزمون سرب استات	آزمون کلروفریک	استیک اسید گلاسیال	معرف بیوره	پیکریک اسید	**سولفریک اسید**
نتیجه آزمون	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+



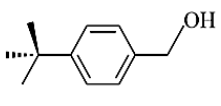
۵- متیل ۲- ایزوپروپیل فنول (تیمول)



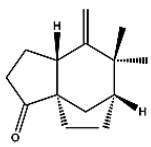
کاستول



پاپرن



٤- ترشیو- بوتیل بنزیل الکل



خوزیمون

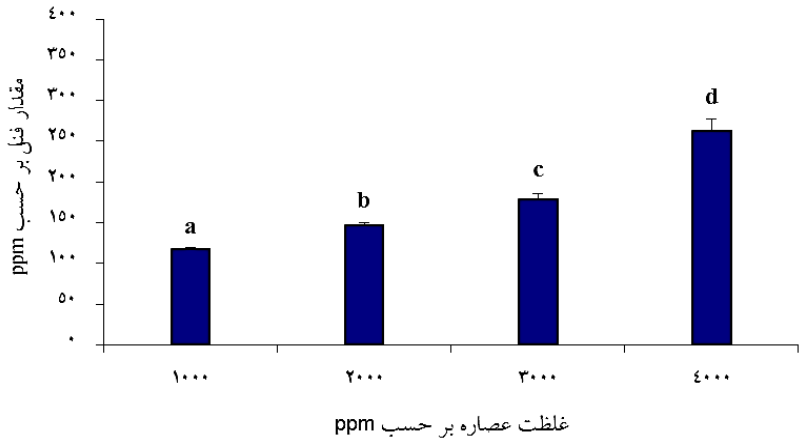
شکل ۱

نتایج سنجش محتوای فلاونوئید عصاره‌ی ریشه‌ی وتیور

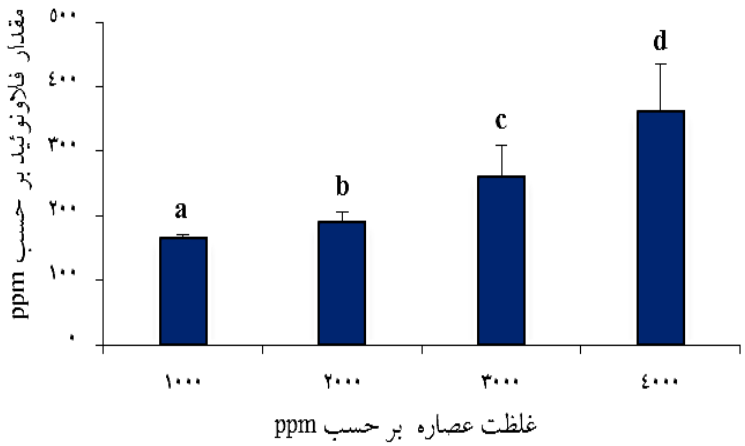
نتایج سنجش میزان فلاونوئید نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، میزان فلاونوئید افزایش می‌یابد و میزان فلاونوئید در غلظت‌های متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت. بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ppm ٤٠٠٠ مشاهده شد(شکل ۳) ($p < ۰/۰۵$).

نتایج سنجش محتوای فلاونولی عصاره ریشه‌ی وتیور

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره، میزان فلاونول افزایش می‌یابد و میزان آن در غلظت‌های متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارد. بیشترین میزان فلاونول در غلظت ppm ۴۰۰۰ مشاهده شد (شکل ٤) ($p < ۰/۰۵$).

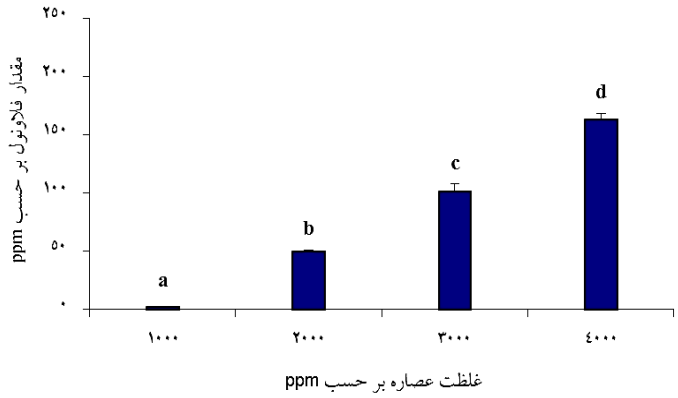


شکل ۲. میزان فنل عصاره‌ی اتانولی وتیور در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ٤٠٠٠ را نشان می‌دهد. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



شکل ۳. میزان فلاونوئید عصاره‌ی اتانولی وتیور در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ٤٠٠٠ را نشان می‌دهد.

حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



شکل ٤. میزان فلاونول عصاره‌ی اتانولی وتیور در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ٤۰۰۰ را نشان می‌دهد. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری در سطح $p < ۰/۰۵$ است.

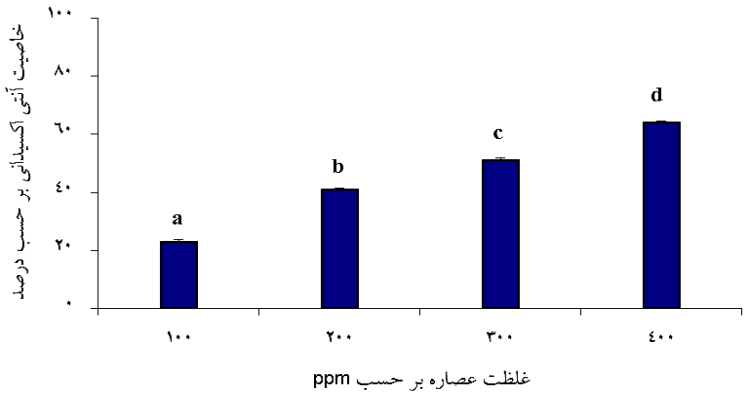
نتایج سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه وتیور

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH محاسبه شد و بر اساس منحنی استاندارد $mg\ L^{-1}$ IC_{50} = ۲۸۹/٤۷٤ به دست آمد، در واقع در این غلظت، ۵۰٪ از رادیکال ۲، ۲– دی فنیل–۱– پیکریل هیدرازیل توسط عصاره احیا می‌شود. با افزایش غلظت عصاره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد زیرا ترکیبات موثر گیاه نیز افزایش یافته است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های متفاوت، غلظت معنی‌داری با یکدیگر دارند. و بیشترین میزان خصلت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ٤۰۰ ppm مشاهده شد (شکل ۵) ($p < ۰/۰۵$).

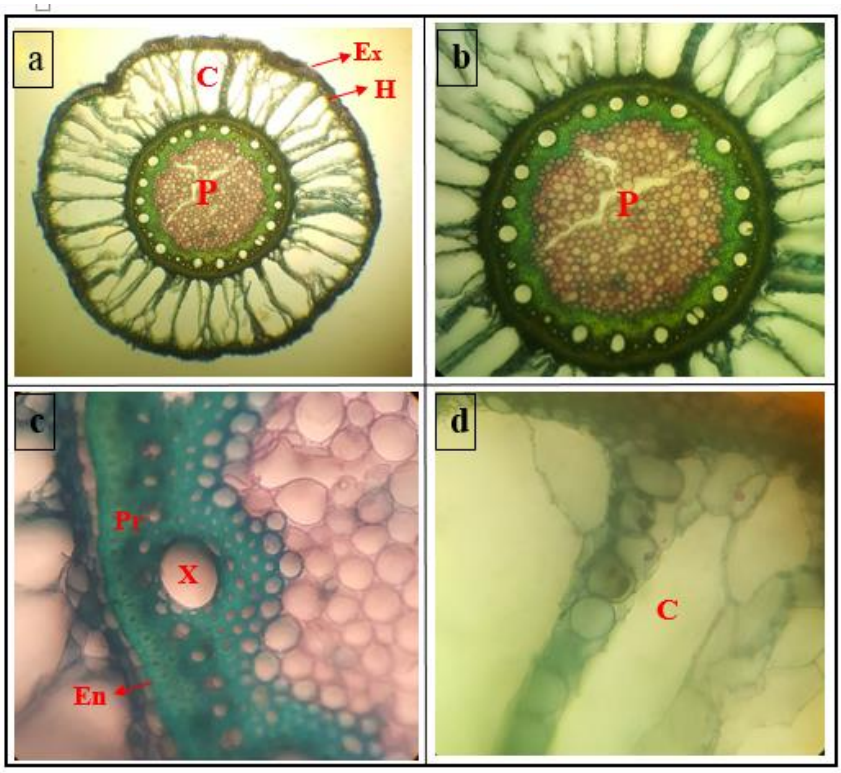
نتایج بافت شناسی ریشه وتیور

خارجی‌ترین لایه ریشه که از یک لایه سلول مستطیلی منظم تشکیل شده، اگزودرم می‌باشد. این لایه با نقش حفاظتی، بافت‌های درونی را از آسیب حفظ می‌کند. انباشته شدن چوب پنبه در بخش خارجی دیواره سلول‌های اگزودرم جهت محافظت بیش‌تر ریشه دیده می‌شود. در زیر اگزودرم، لایه هیپودرم که از یک تا دو لایه سلول با دیواره‌های ضخیم تشکیل شده، واقع است.کورتکس، متشکل از بافت پارانشیم هوادار در زیر هیپودرم قرار گرفته است. بافت پارانشیم هوادار یک پاسخ به کمبود اکسیژن است و در واقع یک نوع سازگاری به شرایط غرقابی است. در اطراف استوانه مرکزی یک لایه سلول آندودرم مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد دیواره سلول‌های اندودرم در این گیاه به شدت سوبرینی شده و باعث افزایش سازش پذیری به شرایط غرقابی و نفوذ پذیری نسبت به فلزات سنگین و مواد محلول در آب می‌گردد. در زیرآندودرم لایه پریسیکل دیده می‌شود که از دیواره ضخیم و چوبی تشکیل شده و ورود مواد به داخل سلول را کنترل می‌کند. درون استوانه آوندی تعداد متعددی از دسته جات آوند چوبی که به صورت یک در میان با دسته‌جات آوند آبکش قرار گرفته اند، دیده می‌شود. هر دسته آوندی چوب شامل یک آوند چوب مشخص است که توسط چند عنصر چوب کوچک‌تر احاطه شده است. آوندهای چوبی در گیاه وظیفه انتقال املاح معدنی از ریشه به اندام بالایی گیاه و آوند آبکش وظیفه جابجایی محصول فتوسنتز را برعهده دارند. آوندهای چوبی در این رنگ‌آمیزی سبز رنگ دیده می‌شوند. در

بین دسته جات آوند چوب، آوندهای آبکش با اندازه کوچک‌تر نسبت به آوند چوب و با رنگ صورتی – بنفش دیده می‌شوند. در مرکز ریشه بافت مغز دیده می‌شود، بخش درونی آن از سلول‌های پارانشیمی تشکیل شده که اغلب حاوی مواد ذخیره‌ای است. در اطراف سلول‌های پارانشیم، سلول‌های اسکلرانشیمی با دیواره ضخیم وچوبی دیده می‌شود که اطراف دسته جات آوندی را احاطه کرده‌اند و باعث افزایش مقاومت و استحکام در ریشه می‌شوند[۷] .



شکل ۵. نمودار میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی وتیور در روش DPPH. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



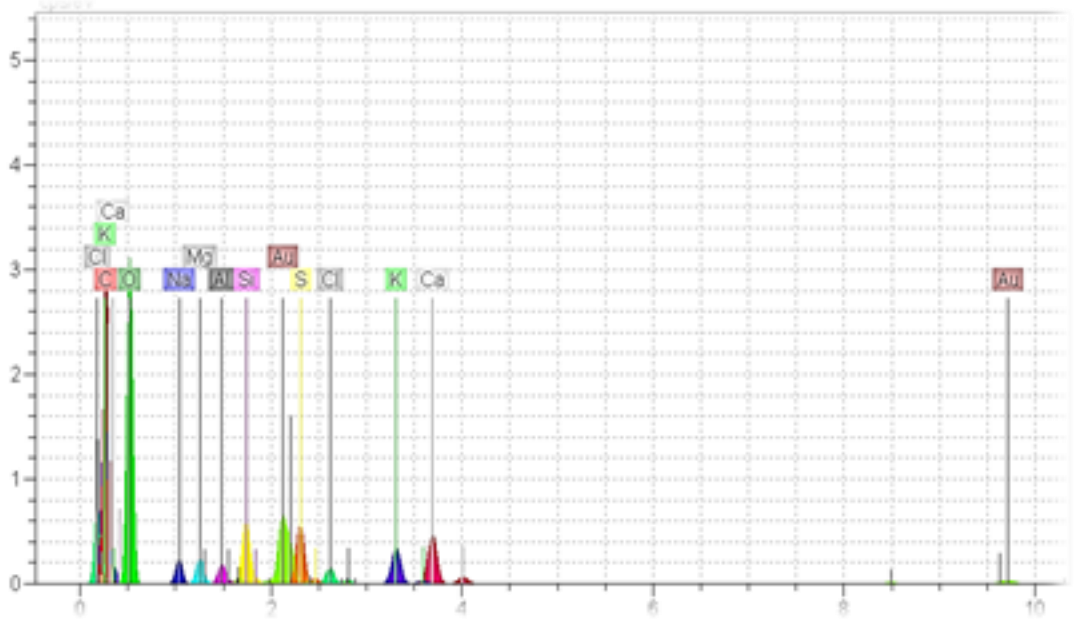
شکل ۶: مطالعه بافت‌شناسی ریشه وتیور، a: نمایی کلی از برش عرضی ریشه با بزرگ نمایی 4X. b: برش عرضی ریشه با بزرگ نمایی 10X . c: برش عرضی ریشه با بزرگ نمایی 40X. d: برش عرضی ریشه با بزرگ نمایی 100X . P = مغز ریشه، Ex = اگزودرم، H = هیپودرم،X = دسته جات آوندی، En = اندودرم، Pr = پریسیکل، C = کورتکس

نتایج آنالیز ایدکس از ریشه گیاه وتیور

حدود ۱ گرم از پودر خشک ریشه وتیور در آنالیز ایدکس مورد استفاده قرار گرفت. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود، درصد بالای کربن و اکسیژن نشان از وجود پلی‌ساکاریدهای موجود در بافت ریشه می‌دهد که این پلی‌ساکاریدها در جذب فلز توسط گیاه نقش مهمی دارند. پکتین، سلولز و همی‌سلولز و گلیکوپروتئین از عمده‌ترین مواد سازنده دیواره سلولی هستند که با گروه‌های عاملی موجود در سطح خود شامل OH, SH, COOH با یون‌های فلزی پیوند برقرار کرده و فلز را سریعا جذب دیواره می‌کند و مانع ورود فلز به داخل سلول می‌شود [۱۳].

جدول۲: میزان عناصر موجود در آنالیز ایدکس

ردیف	عنصر	درصد جرمی عناصر	درصد اتمی عناصر
۱	کربن	۳۱/۲۵	٤۲/۸۹
۲	اکسیژن	٤۸/۱۹	٤۹/٦٥
۳	گوگرد	۲/۳۷	۱/۲۲
٤	سیلیسیم	۲/۰٤	۱/۲۰
٥	پتاسیم	۲/۱۳	۰/۹۰
٦	کلسیم	۳/٥۰	۱/٤٤
۷	سدیم	۱/۰۱	۰//۷۲
۸	منیزیم	۰/۸۷	۰/٥۹
۹	کلر	۰/۸۳	۰/۳۸



شکل ۷. آنالیز ایدکس از ریشه گیاه وتیور

بحث

در سال‌های گذشته اهمیت گیاه وتیور در زمینه‌هایی از جمله کنترل فرسایش و رسوب در سواحل و حواشی رودخانه‌ها، حاصلخیزی اراضی، افزایش نفوذپذیری خاک، اصلاح اراضی شور و قلیا، اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین و سمی (گیاه پالایی)، احیاء اراضی باتلاقی و تخریب شده، مقاومت در برابر آتش‌سوزی، کاهش اثرات تخریبی سیل، رانش و لغزش زمین، تثبیت شیب‌های ناپایدار و تند، مستهلک کننده انرژی آب در رودخانه‌هایی با شیب تند، حفظ رطوبت خاک، تصفیه فیزیکی و شیمیایی آب و کنترل گرد و خاک و فرسایش بادی به اثبات رسیده است. از سال ۱۹۸۰ گیاه وتیور توسط بانک جهانی به عنوان *Vetiver grass technology. VGT* معرفی شده و این گیاه را جهت حفاظت از محیط زیست در دنیا ترویج می‌کند. شناسایی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های این ترکیبات و نقش آنها در ایجاد سازگاری گیاه در شرایط گوناگون کشت، می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد[۲۵] . این مطالعه به منظور بررسی شناسایی ترکیبات شیمیایی، تعیین میزان متابولیت‌های ثانویه و خواص آنتی‌اکسیدانی ریشه گیاه ویتور انجام شد. این یافته‌ها حاکی از آن است که گروه‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه در ریشه وتیور قابل شناسایی است و میزان ترکیبات فنیل پروپانوییدی آن قابل ملاحظه می‌باشد که باعث ایجاد سازگاری به شرایط مختلف نامساعد کشت گیاه و ویژگی آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌گردند. اهمیت این یافته‌ها آن است که با شناسایی دقیق ترکیبات و تعیین مقادیر آنها می‌توان مکانیسم‌های مقاومت و سازگاری این گیاه را شناسایی و مورد بررسی قرار داد، سپس در مطالعات کاربردی بیوتکنولوژی و اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار داد. استفاده از روش‌های شناسایی ترکیبات از جمله آزمون‌های فیتوشیمیایی و روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی جهت شناسایی دقیق ترکیبات در این مطالعه ضروری به‌نظر می‌آمد.

آزمون‌های فیتوشیمیایی انجام شده بیانگر وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، تانني، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و کاردیاک گلیکوزید درعصاره‌ی اتانولی ریشه وتیور بود. مطالعات سونی و داهیا بر روی ویژگی‌های فیتوشیمیایی وتیور نشان داد که عصاره متانولی این گیاه دارای فلاونوئید، تانن، ساپونین، کاردیاک گلیکوزید، آلکالوئید و هیدرات کربن احیا شده می‌باشد [۲۲] . عصاره آبی برگ وتیور نیز توسط محققان مورد ارزیابی فیتوشیمیایی قرار گرفت و نشان داد ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، تانني، فنلی و تری‌ترپنوئیدی و فیتواسترول در این گیاه موجود می‌باشد [۱] . در تست‌های فیتوشیمیایی انجام شده بر عصاره اتانولی وتیور، وجود آلکالوئیدها با دو معرف مایر و واگنر تشخیص داده شد. با توجه به اینکه آلکالوئیدها نوعی ترکیبات نیتروژن‌دار هستند، در طیف GCMS بلهاسن نیز وجود ترکیبات نیتروژن دار به اثبات رسیده است که این موید نتیجه آزمایش فیتوشیمیایی آلکالوئیدهاست [۳] . تحقیق جامع در مورد اسانس ریشه وتیور، از وجود ترکیبات سکوئی ترپنی در آن حکایت می‌کند. سکوترپن‌ها از سه واحد ایزوپرن تشکیل شده‌اند که عامل ایجاد بو هستند، در پژوهشی با استفاده از طیف GCMS اسانس ریشه وتیور، بیش از سیصد مولکول گزارش شده که عمدتا ساختار ترپنی دارند. یکی از ترکیبات کشف شده در عصاره وتیور ترکیب Khusimoneاست [۳] . تجزیه و تحلیل اسانس وتیور از لحاظ ترکیبات معطر، تنوع

بالایی از ترکیبات خوشبو را نشان می‌دهد، خوزیمون به عنوان معطرترین ترکیب وتیور شناخته شده است [۸] ترکیب خوزیمون در طیف GCMS عصاره اتانولی ریشه وتیور در این مطالعه تایید شده‌است.

پیلات و همکاران نیز ترکیبات خوزیمون را در اسانس ریشه وتیور به عنوان ترکیبات معطر شناسایی کردند که تائید کننده نتایج GCMS این مطالعه می‌باشد [۱٦]. پریپدیونچ و همکاران نشان دادند که روش‌های مختلف استخراج بر عملکرد فیزیکی و شیمیایی خواص اسانس ریشه وتیور تاثیر می‌گذارد. در این مطالعه ٦٤ ترکیبات فرار توسط GC-MS مشخص شد. روش GC x GC-MS توانست ۲٤٥ ترکیب را به خوبی شناسایی کند که از این بین، ٤۳ ترکیب آن بسیار فرار بودند. در مقایسه روش‌های مختلف شناسایی، GC x GC-MS توانایی بیشتری برای بدست آوردن ترکیبات اسانس، از شرایط متنوع استخراج ترکیبات فرار را نشان داد [۱۷] . کیم و همکاران ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس وتیور را با دو روش ارزیابی رادیکال‌های آزاد DPPH وکاهش یون آهن سنجیدند و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی را در مقایسه با استاندارد آنتی‌اکسیدان‌ها، مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن وآلفا–توکوفرول نشان دادند. در ادامه این تحقیق ترکیبات β-vetivenene, β-vetivone و α- vetivone با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا با روش‌های کروماتوگرافی نظیر: ستونی، GCMS و HPLC جداسازی شدند [۱۲]. اولین مشتقاتی که از وتیور استخراج شد، کتون‌هایی نظیر وتیون بود[۳]. طبق جدول ۱ عصاره اتانولی ریشه وتیور شامل حدود ۵٪ ترکیب خوشبو وتیون است که از فراوان‌ترین اجزاء عصاره می‌باشد. محققان وتیون را منشا خاصیت آنتی‌اکسیدانی وتیور و خوزیمون را دافع حشرات دانسته‌اند [۳] .

وجود ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کارهای تحقیقاتی دیگر محققان به اثبات رسیده‌است که تائیدی بر آزمایش انجام گرفته در این پژوهش است [۱۹] .از جمله فراوان‌ترین فنلی موجود در وتیور Thymol است. پراجنا و همکاران در عصاره وتیور فراکسیون‌های محلول و قندی اسیدهای فنلی متصل به دیواره سلولی را جداسازی کردند و مقدار µM/g ۱,۲ ± ۲,٦۲ اسید فنلی از عصاره آبی آن بدست آوردند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بیانگر وجود اسیدهای فنلی است. شناسایی ترکیبات p - کوماریک اسید، p - دی هیدروکسی بنزوئیک اسید و فرولیک اسید در عصاره بروش HPLC بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره است که همسو با مقادیر فنلی بدست آمده در این مطالعه است [٦]. پژوهش‌گران فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی قوی وتیور را به علت وجود سرشار ترکیبات پلی‌فنلی و اسیدهای فنلی در ریشه مرتبط دانسته اند که طیف GCMS عصاره ریشه وتیور با داشتن ترکیب‌های اسید فنلی و پلی‌فنلی فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی را داراست [۲] . مطابق نتایج ایدکس، درصد بالای کربن و اکسیژن نشان از وجود پلی ساکاریدهای موجود در بافت ریشه می‌دهد که این پلی‌ساکاریدها در جذب فلز توسط گیاه نقش مهمی دارند[۱۰] . همچنین وجود عنصر گوگرد به عنوان یک باز، باعث جذب کاتیون‌های فلزی می‌شود. طبق مطالعات انجام شده پکتین، سلولز و همی‌سلولز و گلیکوپروتئین از عمده‌ترین مواد سازنده دیواره سلولی هستند که با گروه‌های عاملی موجود در سطح خود شامل OH, SH, COOH با یون‌های فلزی پیوند برقرار کرده و فلز را سریعا جذب دیواره می‌کند و مانع ورود فلز به داخل

سلول می‌شود. همچنین در آنالیز ایدکس در ریشه گیاه وتیور عناصر اکسیژن وگوگرد یافت می‌شود [۱۳].

مطالعات نشان می‌دهد که اولین مانع ورودی در مقابل تنش یون‌های فلزی سنگین مانند کادمیم در ریشه گیاهان توسط کربوهیدرات‌های دیواره سلولی و کربوهیدرات‌های خارج سلولی مانند موسیلاژ و کالوز اعمال می‌شود. به نظر می‌رسد این ترکیبات باعث عدم تحرک یون فلزی کادمیم می‌شوند. یون‌های کادمیم در ریشه و برگ گیاهان تحت تنش، بیش‌ترین پیوند را با جایگاه‌های پکتیکی (بعنوان نوعی کربوهیدرات) و گروه‌های هیستیدیلی دیواره سلولی تشکیل می‌دهد [٤].

تغییرات آناتومی و فیزیولوژی گیاهان در پاسخ به شرایط زیست محیطی باعث سازش‌پذیری برای بقای بیشتر در شرایط نامساعد می‌شود. توسعه دیواره پسین در سلول‌ها، تشکیل حلقه‌های کاسپاری به دنبال انباشته شدن چوب‌پنبه (سوبرین) و افزایش میزان سلولز در لایه‌های دیواره از ویژگی‌های شاخص گیاهان تک لپه در سازگاری نسبت به فلزات سنگین است. افزایش ضخامت دیواره‌های سلولی در منطقه اگزودرم و آندودرم مانع انتقال فلزات سنگین از مسیرهای آپوپلاستی می‌شود [۱۰].

اکثر فلزات سنگین متصل به دیواره بر حسب میل ترکیبی یون فلزی با پلی گلاکترونیک اسیدها پیوند برقرار می‌کنند. جذب فلزات سنگین در گیاهان تحت تنش، اغلب در بخش‌های آپوپلاستی (بخش‌های غیر زنده سلولی مانند دیواره) صورت می‌گیرد [۲۸].

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج آزمایش‌های فیتوشیمیایی اولیه وGC-MS نشان داد که عصاره ریشه وتیور دارای ترکیبات گیاهی فعال زیستی متعلق به خانواده‌های مختلف مانند تانن، گلیکوزید، آلکالوئید، فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و غیره می‌باشد. ترکیب خوزیمون در عصاره ریشه وتیور با استفاده از طیف‌های GCMS، شناسایی شد. میزان بالای ترکیبات فنیل پروپانوییدی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا در ایجاد سازگاری گیاه تحت شرایط نامساعد کشت، می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. براساس این نتایج ریشه وتیور می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها، در جداسازی ترکیبات فعال و ساخت داروها برای درمان بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع و مآخذ

[1] Arunachalam, K.D. and Annamalai, S.K. 2013. Chrysopogon zizanioides aqueous extract mediated synthesis, characterization of crystalline silver and gold nanoparticles for biomedical applications. International journal of nanomedicine, 8, 2375.

[2] Bais, H.P., Walker, T. S., Schweizer, H. P. and Vivanco, J.M. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of Ocimum basilicum. Plant Physiology and Biochemistry. 40(11): 983-995.

[3] Belhassen, E., Filippi, J. J., Brévard, H., Joulain, D. and Baldovini, N. 2015. Volatile constituents of vetiver: a review. Flavour and Fragrance Journal. 30(1):26-82.

[4] Benavides, M. P., Gallego, S.M. and Tomaro, M. L. 2005. Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17(1): 21-34.

[5] Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants, 24: 1250-1319.

[6] Dipjyoti, C. 2013. HPLC quantification of phenolic acids from *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and its antioxidant and antimicrobial activity. Journal of pharmaceutics, 2013:1-6

[7] Fahn, A. 1990. Plant Anatomy, Pergamon Press, Oxford. 4th. Edition.

[8] Filippi, J.J., Belhassen, E., Baldovini, N., Brevard, H. and Meierhenrich, U.J. 2013. Qualitative and quantitative analysis of vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography *A*. 1288:127-148.

[9] Francisco, I.A. and Pinotti, M.H.P. 2000. Cyanogenic glycosides in plants. Brazilian Archives of Biology and Technology, 43(5):487-492.

[10] Gomes, M.P., Marques, T.C., e Melo, S., Nogueira, M.D., Castro, E.M., and Soares, Â.M. 2011. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in Brachiaria decumbens. Scientia Agricola. 68(5): 566-573.

[11] Jensen, W.A. 1962. Botanical Histochemistry: Principles and Practice. San Francisco: Freeman and Company

[12] Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., Chung, H. Y., Jin, Z. 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry.53(20): 7691-7695.

[13] Li, T., Tao, Q., Shohag, M.J.I., Yang, X., Sparks, D.L. and Liang, Y. 2015. Root cell wall polysaccharides are involved in cadmium hyperaccumulation in Sedum alfredii. Plant and Soil. 389(1-2) :387-399.

[14] Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the university of chemical technology and metallurgy. 40(3):255-260.

[15] Nasrabadi, M., Halimi, M. and Nadaf, M. 2013. Phytochemical Screeningand Chemical Composition of Extract of Muscari neglectum. Middle-East Journal of Scientific Research. 14(4): 566-569.

[16] Paillat, L., Périchet, C., Pierrat, J. P., Lavoine, S., Filippi, J. J., Meierhenrich, U., & Fernandez, X. 2012. Purification of vetiver alcohols and esters for quantitative high-performance thin-layer chromatography determination in Haitian vetiver essential oils and vetiver acetates. Journal of Chromatography A, 1241, 103-111.

[17] Pripdeevech, P., Wongpornchai, S. and Marriott, P.J. 2010. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatile constituents in Thai vetiver root oils obtained by using different extraction methods. Phytochemical Analysis. 21(2): 163-173.

[18] Rao, R. R. and Suseela, M. R. 2000. *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash–a multipurpose eco-friendly grass of India. National Botanical Research Institute Lucknow, Thailand, 439-442.

[19] Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M. and Latha, L.Y., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 8(1):1-10

[20] Saufi, A. 2007. Lignans in (*Phaleria macrocarpa* Scheff.) Boerl. and in Linum flavum var. compactum L. Phd Thesis. Heinrich-Heine University, Düsseldorf, German, 95p

[21] Sharma, R.K., Chatterji, S., Rai, D.K., Mehta, S., Rai, P.K., Singh, R.K., Watal, G. and Sharma, B. 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some Indian medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research. 3(11) :944-948.

[22] Soni, A., Dahiya, P., 2015. Screening of phytochemicals and antimicrobial potential of extracts of Vetiver zizanoides and Phragmites karka against clinical isolates International Journal of Applied Pharmaceutics. 7(1): 22-24.

[23] Taiz L. and E. Zeiger., 2006. Plant Physiology. Sinauer Assoc. Inc. Publ. Massachusetts. pp .35-348

[24] Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. Internationale pharmaceutica sciencia, 1(1): 98-106.

[25] Truong, P., Van, T.T. and Pinners, E., 2008. Vetiver System Application:A Technical Reference Manual. The Vetiver Network International. 107 p.

[26] Ugochukwu, S.C., Uche, A. and Ifeanyi, O., 2013. Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of Dennetia tripetala G. Baker. Asian Journal of Plant Science and Research. 3(3): 10-13.

[27] Willett, W.C., Koplan, J.P., Nugent, R., Dusenbury, C., Puska, P. and Gaziano, T.A., 2006. Prevention of chronic disease by means of diet and lifestyle changes. Published by Oxford University Press, New York, 64 p.

[28] Xing, B., Nascimento, C. W. A., 2006. Sci. Agric. 63 299-311.

[29] Yusuf, A. Z., Zakir, A., Shemau, Z., Abdullahi, M. and Halima, S. A., 2014. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of Paullinia pinnata linn. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 6(2): 10 – 16.