The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Ser.69, Autumn 2021, p. 9-26
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۳، پیاپی ۶۹، پاییز ۱۴۰۰، ص ۹-۲۶
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۳۱

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2021.35237.1411

مطالعه فیتوشیمیایی گونه‌های *Plantago major* و *Plantago lanceolata* در شمال ایران[1]

سیده سمیرا امینی‌نسب[1]، آرمان محمودی اطاقوری[2]، احسان نظیفی[3*]

چکیده

Plantago major L. و *Plantago lanceolata* L. از گونه‌های فراوان جنس بارهنگ در شمال ایران بوده که به‌عنوان گونه‌های دارویی با ارزش شناخته شده‌اند. از اینرو، در این پژوهش، هشت جمعیت از این دو گونه از مناطق مختلف شمال کشور جمع آوری و از لحاظ فیتوشیمیایی بررسی شدند. نتایج نشان داد به طور میانگین میزان متابولیت‌های سنجش شده در گونه *P. lanceolata* بیشتر از گونه *P. major* بود. تفاوت میانگین‌ها برای فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول از لحاظ آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. آنالیز اسانس جمعیت‌های ماسوله نشان داد که ترکیبات شاخص گونه *P. major* شامل پولگون و پالمیتیک اسید و ترکیبات شاخص گونه *P. lanceolata* شامل دی-کارون و آدیپیک اسید دی‌اُکتیل‌استر بودند. این نتایج به انتخاب گونه‌ها و جمعیت‌های دارای محتوای متابولیتی بیشتر و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کمک شایانی خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بارهنگ، پولگون، دی-کارون، متابولیت‌های گیاهی

۱-کارشناسی ارشد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
*(نویسنده مسئول: nazifiehsan@yahoo.com / e.nazifi@umz.ac.ir)

[1] این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو سیده سمیرا امینی‌نسب با راهنمایی دکتر آرمان محمودی و دکتر احسان نظیفی اعضای هیئت علمی دانشگاه مازندران بوده است.

مقدمه

گیاهان جنس بارهنگ (*Plantago* L.) در کشاورزی و کشت جهت مصارف دارویی قدمتی طولانی دارند. همچنین بارهنگ به دلیل خواص پایدارکنندگی، سوسپانسیونی و امولسیون کنندگی در صنایع آرایشی-بهداشتی، نساجی، کاغذ سازی، چاپ و تهیه واکس بسیار مورد توجه است (Velasco-Lezama *et al*., 2006; Beara *et al*., 2012).

شمال ایران، به عنوان یک ذخیره‌گاه ژنتیکی و زیست محیطی، گنجینه گران‌بهایی از گونه‌های دارویی با خواص منحصربه‌فرد است. دو گونه فراوان از جنس بارهنگ (*Plantago* L.) در شمال ایران، گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* بوده که همه بخش‌ها شامل برگ، ریشه و دانه آنها مصارف دارویی دارند، از این رو به‌عنوان گونه‌های دارویی با ارزش دارای اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی شناخته شده‌اند (Patzak & Rechinger, 1965; Tutel, 1982; Samuelsen, 2000; Mohsenzadeh *et al*., 2007; Beara *et al*., 2012; Karakaş *et al*., 2012; Gonçalves & Romano, 2016; Aminian *et al*., 2018; Amiri *et al*., 2018; Hassemer, 2018).

بارهنگ کبیر (*Plantago major* L.) گیاهی چند ساله، کوتاه یا متوسط تا بلند به ارتفاع ۳۱-۱۴ سانتی‌متر و گاهی تا ۷۰ سانتی‌متر، بدون ساقه مشخص و دارای ریزوم است. برگ‌ها طوقه‌ای، خیزان یا افراشته و دمبرگ‌دار بوده، پهنک بیضی یا تخم مرغی یا دایره‌ای با حاشیه صاف یا کمی کنگره‌ای-دندانه‌ای، دارای ۷-۳ رگبرگ مشخص، فاقد کرک یا دارای کرک‌های اندک است. دمگل آذین افراشته، سنبله استوانه‌ای باریک، میوه کپسول تخم مرغی و دارای ۱۰-۶ و ندرتا تا ۳۰ دانه کوچک و سیاه رنگ بوده و زمان گلدهی آن از اواسط بهار تا اواخر تابستان است (Tutel, 1982; Janighorban, 1995).

بارهنگ سرنیزه‌ای با نام علمی *Plantago lanceolata* L. گیاهی چند ساله به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر، بدون ساقه‌ای مشخص و دارای ریزوم کوتاه بدون انشعاب یا انشعابات کم است. برگ‌ها طوقه‌ای، افراشته ودمبرگ‌دار بوده، پهنک نوک تیز یا بیضی باریک، از قاعده باریک شونده، حاشیه صاف یا دارای دندانه‌های کوچک، دارای پنج رگبرگ مشخص، با کرک‌های پراکنده یا بدون کرک است. دم گل آذین افراشته با کرک‌های پراکنده سفید، سنبله استوانه‌ای مخروطی کوتاه یا تقریبا کروی-متراکم، میوه کپسول تخم مرغی و دارای دو دانه قهوه‌ای روشن و بزرگتر از بارهنگ کبیر بوده و زمان گلدهی آن در بهار تا اوایل تابستان است (Tutel, 1982; Janighorban, 1995).

مطالعات فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف جنس بارهنگ اغلب به محتوای فنولی، فلاونوئیدی، فنیل پروپانوئید گلیکوزیدی، ایریوئیدی و اثرات دارویی آنها پرداخته است. همچنین برخی مطالعات به حضور ترپن‌ها، آلکالوئیدها، لیپیدها و قندها در این جنس پرداخته‌اند (Nostro *et al*., 2000; Gálvez *et al*., 2005; Stiles *et al*., 2007; Makhmudov *et al*., 2011; Janković *et al*., 2012; Beara *et al*., 2012; Ferrazzano *et al*., 2015). در یک بررسی نشان داده شد که گونه *P. major*،

میزان فنول کل کمتری از گونه‌های *P. holosteum*، *P. maritima*، *P. media* و فلاونوئید کمتری از گونه‌های *P. argentea*، *P. holosteum*، *P. major*، *P. maritima*، *P. media* دارد (Beara *et al.*, 2009). مقایسه ترکیبات پلی فنولی در برخی گونه‌های جنس بارهنگ نشان داد که گونه *P. lanceolata*، بیشترین میزان فنول، فنیل پروپانوئید گلیکوزید و استوزید را در مقایسه با گونه‌های *P. schwarzenbergiana*، *P. reniformis*، *P. atrata*، *P. coronopus* و *P. holosteum* داشته در حالیکه گونه *P. holosteum* بیشترین مقدار فلاونوئید و ایریوئید را داشته است (Janković *et al.*, 2012). مقایسه گونه‌های *P. afra*، *P. coronopus*، *P. lagopus*، *P. lanceolata* و *P. serraria* نشان داد که گونه *P. lagopus* بیشترین میزان فنول و گونه *P. afra* بیشترین میزان فلاونوئید، فنیل پروپانوئید گلیکوزید و ایریوئید را داشته است (Gálvez *et al.*, 2005).

تحقیقات اندکی در رابطه با تنوع فیتوشیمیایی اجزای اسانس و مقایسه متابولیت‌های موجود در گونه‌های جنس بارهنگ صورت گرفته (Chung *et al.*, 2008; Karakaş *et al.*, 2012; Seifi *et al.*, 2014; Bajer *et al.*, 2016) و در مورد برخی گونه‌ها مانند *P. major*، گزارشی از آنالیز اسانس مشاهده نشده است. متابولیت‌های متنوعی از خانواده ترپنوئیدها، اسیدهای چرب، الکل‌های چرب و آلکان‌ها در اغلب اسانس‌های حاصل از گونه‌های مختلف گزارش شده است. بطوریکه نتایج ترکیبات ارزشمندی مانند تیمول و ۲و۴-دکادِینال از بذرهای گونه *P. ovata* (Seifi *et al.*, 2014)، ۳-متیل‌آندکان و ۱-اتیل-۲-متیل‌سیکلوهگزانول در گونه *P. amplexicaulis* (Al-Mazroa *et al.*, 2012)، ۳-پروپ-۲-اِنیل بایسکلو(۲و۲و۱)هپتان، ۱-دودکان-۳-اُل، ۳-اتیل‌فنول و نوناکوزان در گونه *P. boissieri* (Al-Mazroa *et al.*, 2012) و لینالول، منتن-۲و۳-دیول و فنچول در گونه *Plantago asiatica* (Chung *et al.*, 2008) را نشان داد. اسیدهای چربی نظیر لینولئیک اسید و اولئیک اسید در گونه *P. ovata* (Seifi *et al.*, 2014) و پالمیتیک اسید و میریستیک اسید در گونه *P. amplexicaulis* (Al-Mazroa *et al.*, 2012) نیز گزارش شدند.

از آنجائیکه *P. major* و *P. lanceolata* از گونه‌های فراوان جنس بارهنگ در شمال ایران بوده که مصارف دارویی دارند، لذا مطالعه فیتوشیمیایی آنها جهت مصارف غذایی و دارویی حائز اهمیت است. از اینرو مطالعه حاضر، برای اولین بار به مقایسه فیتوشیمیایی جمعیت‌های دو گونه *P. major* و *P. lanceolata* از لحاظ میزان فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین، ساپونین، کلروفیل a و b، کاروتنوئید، قندهای محلول، پروتئین کل و متابولیت‌های موجود در اسانس آنها پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد هشت جمعیت از گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* از رویشگاه‌های طبیعی آن‌ها در هشت منطقه از شمال کشور در شهریور ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید (جدول ۱). با استفاده از کلیدهای رایج گیاه‌شناسی شامل فلورا ایرانیکا (Patzak & Rechinger, 1965) و فلور ایران (Janighorban, 1995)، هویت گونه‌های مورد نظر تایید و برای انجام مطالعات مورد استفاده قرار

گرفتند. جهت حفظ ساختار شیمیایی متابولیت‌های موجود، همه نمونه‌های جمع آوری شده به صورت یکسان، در شرایط تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد خشک و تا زمان استفاده در پاکت‌های مخصوص و در یخچال نگهداری شدند.

جدول ۱: مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata*

گونه گیاهی	رویشگاه	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	ارتفاع (متر)
P. major	لفور	۵۶′۱۲°۳۶″	۱۸′۴۹°۵۲″	۳۶۱
P. lanceolata				
P. major	ساری	۵۸′۱۵°۳۶″	۳۹′۱۳°۵۳″	۳۷۰
P. lanceolata				
P. major	زیارت	۳۳′۴۳°۳۶″	۱۲′۲۹°۵۴″	۸۱۴
P. lanceolata				
P. major	ماسوله	۲۰′۰۹°۳۷″	۱۵′۵۹°۴۸″	۱۰۱۷
P. lanceolata				
P. major	زردگل	۳۵′۵۸°۳۵″	۳۵′۰۱°۵۳″	۱۰۲۰
P. lanceolata				
P. major	ورسک	۳۲′۵۵°۳۵″	۱۶′۵۹°۵۲″	۱۳۷۸
P. lanceolata				
P. major	پلپا	۰۶′۵۸°۳۵″	۳۰′۰۲°۵۳″	۱۴۲۴
P. lanceolata				
P. major	شوراب	۳۸′۵۱°۳۵″	۵۸′۵۷°۵۲″	۲۰۵۱
P. lanceolata				

در این پژوهش میزان فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین، ساپونین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و قندهای محلول کل در برگ و میزان پروتئین کل در بذر با روش اسپکتروفتومتری (با دستگاه UV-VIS Spectrophotometer SU 6100) در همه جمعیت‌ها اندازه‌گیری گردید. آنالیز اسانس اندام هوایی با روش کروموتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (با دستگاه GC Agilent 7890 A-MS Agilent 5975 C) در مورد جمعیت ماسوله انجام شد.

سنجش فنول و فلاونوئید کل

پس از تهیه عصاره متانولی ۸۰ درصد از برگ‌ها، فنول کل بر اساس روش رنگ سنجی Folin-ciocalteu و فلاونوئید کل بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شدند. جهت سنجش فنول، به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۱/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و پس از ۳۰ دقیقه توقف در تاریکی، جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومترخوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف گالیک اسید، میزان فنول کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) برگ بیان گردید (Ainsworth & Gillespie, 2007). جهت تعیین میزان فلاونوئید، ابتدا به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه توقف در

تاریکی، جذب هر نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف روتین، میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}$ DW) برگ بیان گردید (Akkol *et al.*, 2008).

سنجش آنتوسیانین کل

ابتدا عصاره‌گیری برگ‌های گیاه با متانول اسیدی (متانول و کلریدریک اسید ۱:۹۹) انجام شد و بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، محلول رویی به‌مدت یک شب در تاریکی و در دمای یخچال قرار داده شد. پس از اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، از ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ $mol^{-1}\ cm^{-1}$ برای محاسبه غلظت آنتوسیانین استفاده شد (Masukasu *et al.*, 2003).

سنجش ساپونین کل

طبق روش وانیلین-اسید سولفوریک، ابتدا عصاره اتانولی ۲۰ درصد از برگ‌های گیاه تهیه و با دی اتیل اتر مخلوط و فاز پایینی حاوی آب جداسازی و با n- بوتانل مخلوط شد. سپس فاز بالایی حاوی n- بوتانل جداسازی و با کلرید سدیم ۵ درصد مخلوط گردید. در نهایت فاز بالایی حاوی n-بوتانل جمع‌آوری و خشک شد. بعد از حل نمودن عصاره در متانول، به ۲۰۰ میکرولیتر از آن، ۲۰۰ میکرولیتر وانیلین ۸ درصد و یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۴ نانومتر خوانده شد. جهت تعیین میزان ساپونین کل از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف دیوسژنین استفاده و نتیجه بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}$ DW) بیان شد (Hiai *et al.*, 1976; Madland, 2013).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

پس از عصاره‌گیری برگ‌ها با استون ۸۰ درصد و صاف نمودن آنها، جذب هر نمونه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر، ۶۴۵ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید کل محاسبه و در نهایت بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}$ DW) برگ بیان گردید (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

Chlorophyll *a* = $(12.7 * A_{663}) - (2.69 * A_{645})$

Chlorophyll *b* = $(22.9 * A_{645}) - (4.68 * A_{663})$

Carotenoids = $[(1000 * A_{470}) - (1.82 * chl.\ a) - (85.02 * chl.\ b)]/198$

سنجش قندهای محلول کل

پس از عصاره‌گیری برگ‌ها با بافر فسفات پتاسیم (۰/۱ مولار و pH ۶/۸) از روش رنگ سنجی فنول-اسید سولفوریک جهت تعیین میزان قندهای محلول استفاده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. بعد از خنک شدن مخلوط واکنش، جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف گلوکز، میزان قندهای محلول بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}$ DW) برگ بیان گردید (Dubois, 1956).

سنجش پروتئین کل

برای سنجش پروتئین از بذرهای جمعیت‌های جمع‌آوری شده استفاده شد. استخراج پروتئین با استفاده از بافر Tris-HCl(pH ۸) و PMSF (۰/۱ مولار) انجام و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، محلول رویی برداشته شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره حاصل با یک میلی‌لیتر از محلول برادفورد مخلوط و جذب هر یک از نمونه‌ها پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۴۴ نانومتر خوانده شد. با استفاده از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (BSA) نمودار استاندارد تهیه گردید و در نهایت میزان پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}$ DW) بذر بیان شد (Bradford, 1976).

بررسی اسانس اندام هوایی

اندام هوایی جمعیت‌های *P. major* و *P. lanceolata* جمع‌آوری شده از منطقه ماسوله با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند. به این منظور از ۱۰ گرم نمونه خشک پودر شده به‌همراه ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. بعد از حدود سه ساعت عمل تقطیر، مقدار اندک اسانس بدست آمده به همراه آب تقطیر شده جمع‌آوری و با حلال آلی n-هگزان ورتکس گردید. پس از جدایی کامل این دو فاز، بخش n-هگزانی جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شد. آنالیز و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS دارای ستون DB5 با طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر انجام شد. دمای ستون به این صورت بود که در چهار دقیقه ابتدایی در۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت، سپس با سرعت شش درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و در ادامه با سرعت چهار درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در نهایت ۲۰ دقیقه در این دما باقی ماند. از هلیوم به‌عنوان گاز حامل و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق، منبع یونی و Quadrupole بترتیب ۲۷۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و پتانسیل یونیزاسیون دستگاه Mass برابر با ۷۰ الکترون ولت بود. شناسایی ترکیبات

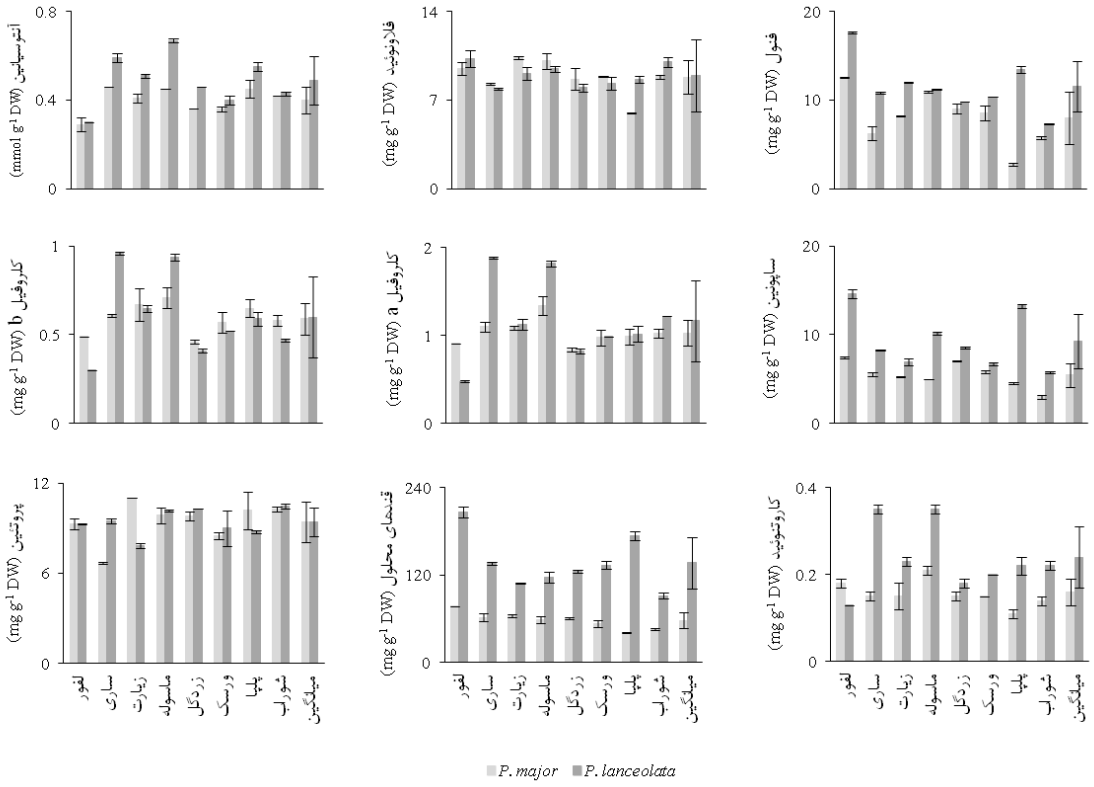
تشکیل دهنده اسانس با بررسی طیف‌های جرمی و مسیر فراگمانتاسیون آنها و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد در بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه (Nist08 & Wiley7n) انجام گرفت (Adams, 2007; Yahyaabadi *et al.*, 2019).

آنالیزهای آماری

داده‌های حاصل از سنجش‌های اسپکتروفتومتری با روش آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) برای مقایسه میانگین بین جمعیت‌ها و با روش آزمون t گروه‌های مستقل برای مقایسه میانگین بین گونه‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد و با استفاده از نرم افزارSPSS-18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در این پژوهش، هشت جمعیت از گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* از مناطق مختلف در شمال ایران شامل لفور، ساری، زیارت، ماسوله، زردگل، ورسک، پلپا و شوراب از لحاظ میزان برخی متابولیت‌های گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و مقایسه شدند.



شکل ۱: مقایسه متابولیت‌های *P. major* و *P. lanceolata* در جمعیت‌های مختلف و مقایسه میانگین جمعیت‌های هر گونه.

مقایسه متابولیت‌های گیاهی گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* در مناطق مورد مطالعه نشان داد که همه جمعیت‌های گونه *P. lanceolata* میزان فنول، آنتوسیانین، ساپونین و قندهای محلول بیشتری از جمعیت‌های گونه *P. major* دارند. مقایسه کارتنوئید کل نیز نشان داد که در اغلب جمعیت‌ها، گونه *P. lanceolata* حاوی میزان بیشتری از این متابولیت نسبت به گونه *P. major* است (جدول ۲ و ۳، شکل ۱).

جدول ۲: مقایسه میزان متابولیت‌ها در جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata*

نام گونه	منطقه	فنول	فلاونوئید	آنتوسیانین	ساپونین
P. major	لفور	۱۲٫۵۷±۰٫۰۶^{c}	۹٫۴۹±۰٫۵۰^{bc}	۰٫۲۹±۰٫۰۳^{i}	۷٫۴۰±۰٫۱۲^{e}
P. lanceolata		۱۷٫۶۳±۰٫۱۴^{a}	۱۰٫۲۸±۰٫۶۵^{a}	۰٫۳۰±۰٫۰۰^{i}	۱۴٫۶۲±۰٫۵۴^{a}
P. major	ساری	۶٫۲۶±۰٫۸۲^{j}	۸٫۲۸±۰٫۰۵^{efg}	۰٫۴۶±۰٫۰۰^{e}	۵٫۵۴±۰٫۲۲^{gh}
P. lanceolata		۱۰٫۸۰±۰٫۱۲^{de}	۷٫۹۰±۰٫۰۶^{g}	۰٫۵۹±۰٫۰۲^{b}	۸٫۲۵±۰٫۰۶^{d}
P. major	زیارت	۸٫۲۲±۰٫۰۳^{h}	۱۰٫۳۴±۰٫۱۱^{a}	۰٫۴۱±۰٫۰۲^{g}	۵٫۲۶±۰٫۰۴^{hi}
P. lanceolata		۱۲٫۰۱±۰٫۱۱^{c}	۹٫۱۰±۰٫۵۰^{cd}	۰٫۵۱±۰٫۰۱^{d}	۶٫۹۰±۰٫۳۷^{f}
P. major	ماسوله	۱۰٫۹۴±۰٫۱۵^{de}	۱۰٫۱۰±۰٫۶۱^{ab}	۰٫۴۵±۰٫۰۰^{ef}	۴٫۹۷±۰٫۰۴^{i}
P. lanceolata		۱۱٫۲۰±۰٫۰۳^{d}	۹٫۴۷±۰٫۲۳^{bc}	۰٫۶۷±۰٫۰۱^{a}	۱۰٫۱۲±۰٫۱۶^{c}
P. major	زردگل	۹٫۰۴±۰٫۵۷^{g}	۸٫۶۷±۰٫۸۵^{def}	۰٫۳۶±۰٫۰۰^{h}	۷٫۰۴±۰٫۰۴^{f}
P. lanceolata		۹٫۸۲±۰٫۰۱^{f}	۷٫۹۸±۰٫۳۰^{fg}	۰٫۴۶±۰٫۰۰^{e}	۸٫۵۷±۰٫۰۸^{d}
P. major	ورسک	۸٫۵۸±۰٫۸۲^{gh}	۸٫۸۵±۰٫۰۵^{cde}	۰٫۳۶±۰٫۰۱^{h}	۵٫۸۱±۰٫۱۵^{g}
P. lanceolata		۱۰٫۳۵±۰٫۰۱^{ef}	۸٫۳۱±۰٫۵۰^{efg}	۰٫۴۰±۰٫۰۲^{g}	۶٫۶۹±۰٫۱۵^{f}
P. major	پلپا	۲٫۷۴±۰٫۱۳^{k}	۶٫۰۲±۰٫۰۴^{h}	۰٫۴۵±۰٫۰۴^{ef}	۴٫۵۳±۰٫۱۱^{j}
P. lanceolata		۱۳٫۴۴±۰٫۳۶^{b}	۸٫۶۶±۰٫۲۹^{def}	۰٫۵۵±۰٫۰۲^{c}	۱۳٫۲۴±۰٫۲۰^{b}
P. major	شوراب	۵٫۷۸±۰٫۱۷^{j}	۸٫۸۵±۰٫۱۷^{cde}	۰٫۴۲±۰٫۰۰^{fg}	۲٫۹۷±۰٫۱۸^{k}
P. lanceolata		۷٫۳۲±۰٫۰۱^{i}	۱۰٫۰۳±۰٫۳۹^{ab}	۰٫۴۳±۰٫۰۱^{fg}	۵٫۸۰±۰٫۱۱^{g}

مقادیر، میانگین ± انحراف معیار سه اندازه‌گیری هستند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه با هم اختلاف ندارند. فنول، فلاونوئید و ساپونین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) برگ و آنتوسیانین بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن خشک ($mmol\ g^{-1}\ DW$) برگ بیان شدند.

اهمیت دارویی گیاهان جنس بارهنگ بویژه گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* در سراسر دنیا شناخته شده است. گزارش‌ها اشاره دارند به اینکه ارزش دارویی این گیاهان در ارتباط با ترکیبات فعال زیستی موجود در آنها نظیر ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، ایریدوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و ... است (Samuelsen, 2000; Bazzaz & Harirzadeh, 2003; Ferrazzano *et al.*, 2015; Gonçalves & Romano, 2016; Matini *et al.*, 2017; Adom *et al.*, 2017; Aminian *et al.*, 2018).

جدول ۳: مقایسه میزان متابولیت‌ها در جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata*

نام گونه	منطقه	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	قندهای محلول	پروتئین
P. major	لفور	۰٫۹۱±۰٫۰۰ gh	۰٫۴۹±۰٫۰۰ g	۰٫۱۸±۰٫۰۱ e	۷۷٫۲۰±۰٫۲۷ h	۹٫۲۹±۰٫۳۵ defg
P. lanceolata		۰٫۴۸±۰٫۰۱ i	۰٫۳۰±۰٫۰۰ i	۰٫۱۳±۰٫۰۰ f	۲۰۶٫۴۶±۷٫۲۹ a	۹٫۲۹±۰٫۰۱ defg
P. major	ساری	۱٫۱۰±۰٫۰۶ de	۰٫۶۱±۰٫۰۱ cde	۰٫۱۵±۰٫۰۱ f	۶۲٫۲۰±۵٫۳۰ i	۶٫۷۰±۰٫۰۹ i
P. lanceolata		۱٫۸۹±۰٫۰۱ a	۰٫۹۶±۰٫۰۱ a	۰٫۳۵±۰٫۰۱ a	۱۳۶٫۳۹±۲٫۳۶ c	۹٫۵۰±۰٫۱۵ cdef
P. major	زیارت	۱٫۰۹±۰٫۰۲ de	۰٫۶۷±۰٫۰۹ bc	۰٫۱۵±۰٫۰۳ f	۶۴٫۳۹±۲٫۴۶ i	۱۱٫۰۱±۰٫۰۰ a
P. lanceolata		۱٫۱۳±۰٫۰۶ cd	۰٫۶۵±۰٫۰۲ cd	۰٫۲۳±۰٫۰۱ b	۱۰۹٫۲۳±۰٫۷۰ f	۷٫۸۶±۰٫۱۷ h
P. major	ماسوله	۱٫۳۴±۰٫۱۱ b	۰٫۷۱±۰٫۰۶ b	۰٫۲۱±۰٫۰۱ bc	۵۸٫۸۲±۵٫۲۵ ij	۹٫۸۷±۰٫۵۲ bcde
P. lanceolata		۱٫۸۲±۰٫۰۳ a	۰٫۹۴±۰٫۰۲ a	۰٫۳۵±۰٫۰۱ a	۱۱۷٫۳۸±۷٫۷۷ e	۱۰٫۱۸±۰٫۰۸ abcd
P. major	زردگل	۰٫۸۴±۰٫۰۲ h	۰٫۴۶±۰٫۰۱ gh	۰٫۱۵±۰٫۰۱ f	۶۰٫۷۵±۱٫۳۹ ij	۹٫۸۱±۰٫۲۸ bcde
P. lanceolata		۰٫۸۲±۰٫۰۳ h	۰٫۴۱±۰٫۰۱ h	۰٫۱۸±۰٫۰۱ de	۱۲۵٫۲۰±۲٫۶۳ d	۱۰٫۳۱±۰٫۰۰ abc
P. major	ورسک	۰٫۹۸±۰٫۰۹ fg	۰٫۵۷±۰٫۰۶ ef	۰٫۱۵±۰٫۰۰ f	۵۳٫۴۶±۴٫۲۹ jk	۸٫۴۸±۰٫۲۴ gh
P. lanceolata		۰٫۹۹±۰٫۰۰ fg	۰٫۵۲±۰٫۰۰ fg	۰٫۲۰±۰٫۰۰ cd	۱۳۳٫۹۸±۵٫۵۲ c	۹٫۰۱±۱٫۲۰ efg
P. major	پلپا	۰٫۹۹±۰٫۰۹ fg	۰٫۶۵±۰٫۰۵ cd	۰٫۱۱±۰٫۰۱ g	۴۰٫۸۲±۰٫۶۴ l	۱۰٫۱۹±۱٫۲۵ abcd
P. lanceolata		۱٫۰۲±۰٫۰۹ ef	۰٫۵۹±۰٫۰۴ de	۰٫۲۲±۰٫۰۲ b	۱۷۴٫۱۶±۶٫۱۶ b	۸٫۷۵±۰٫۱۰ fg
P. major	شوراب	۱٫۰۳±۰٫۰۵ ef	۰٫۵۸±۰٫۰۳ de	۰٫۱۴±۰٫۰۱ f	۴۶٫۳۹±۱٫۶۱ kl	۱۰٫۲۶±۰٫۱۷ abc
P. lanceolata		۱٫۲۲±۰٫۰۰ c	۰٫۴۷±۰٫۰۱ gh	۰٫۲۲±۰٫۰۱ b	۹۱٫۹۳±۴٫۱۸ g	۱۰٫۴۹±۰٫۱۸ ab

مقادیر، میانگین ± انحراف معیار سه اندازه‌گیری هستند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، از نظر آماری با آزمون دانکن (در نرم افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه با هم اختلاف ندارند. کلروفیل a و b، کاروتنوئید و قندهای محلول بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) برگ و مقادیر پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) بذر بیان شدند.

ترکیباتی نظیر فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین و کاروتنوئیدها، که در مطالعه حاضر نیز بررسی شده‌اند، دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد هستند (Mirzaei *et al.*, 2011). بررسی‌ها نشان داده که مطالعات زیادی به حضور چنین ترکیباتی بویژه ترکیبات فنولی و رابطه مستقیم آنها با اثرات آنتی اکسیدانی در گونه‌های جنس بارهنگ اشاره داشته است (Samuelsen, 2000; Nostro *et al.*, 2000; Pourmorad *et al.*, 2006; Beara *et al.*, 2009; Ferrazzano *et al.*, 2015). مطالعات زیادی نیز به اثرات آنتی باکتریال و ضد توموری گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* اشاره داشته‌اند (Kobeasy *et al.*, 2011; Kolak *et al.*, 2011; Dalar *et al.*, 2012; Karakaş *et al.*, 2012; Mehni & Shahdadi, 2014). در این پژوهش نیز مقادیر قابل ملاحظه‌ای از این ترکیبات در این دو گونه گزارش شده که گونه *P. lanceolata* به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری از این ترکیبات را تولید می‌نماید (جدول ۴). مطالعات پیشین و نتایج این پژوهش اشاره دارد به اینکه گونه *P. lanceolata* را می‌توان به‌عنوان یک منبع مهم و سرشار از ترکیبات فنولی، آنتوسیانینی، ساپونینی و کاروتنوئیدی معرفی نمود که به واسطه حضور این ترکیبات، احتمالا پتانسیل آنتی اکسیدانی و ارزش دارویی بالایی خواهند داشت؛ اگرچه بررسی‌های دقیق‌تری جهت شناسایی متابولیت‌های شاخص موجود در این گونه‌ها و اثرات آنها مورد نیاز است.

جدول ۴: مقایسه میانگین مقدار متابولیت‌ها در گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata*

متابولیت‌های گیاهی	*P. major*	*P. lanceolata*	تفاوت میانگین‌ها	p value
فنول	۸٫۰۲±۲٫۹۷	۱۱٫۵۷±۲٫۸۸	۳٫۵۵±۰٫۸۵	۰٫۰۰۰*
فلاونوئید	۸٫۸۲±۱٫۳۳	۸٫۹۶±۰٫۹۳	۰٫۱۴±۰٫۳۳	۰٫۶۷۴
آنتوسیانین	۰٫۴۰±۰٫۰۶	۰٫۴۹±۰٫۱۱	۰٫۰۹±۰٫۰۳	۰٫۰۰۱*
ساپونین	۵٫۴۴±۱٫۳۴	۹٫۲۷±۳٫۰۵	۳٫۸۳±۰٫۶۸	۰٫۰۰۰*
کلروفیل a	۱٫۰۳±۰٫۱۵	۱٫۱۷±۰٫۴۶	۰٫۱۴±۰٫۱۰	۰٫۱۷۴
کلروفیل b	۰٫۵۹±۰٫۰۹	۰٫۶۰±۰٫۲۳	۰٫۰۱±۰٫۰۵	۰٫۸۳۹
کاروتنوئید	۰٫۱۶±۰٫۰۳	۰٫۲۴±۰٫۰۷	۰٫۰۸±۰٫۰۲	۰٫۰۰۰*
قندهای محلول	۵۸٫۰۰±۱۱٫۰۹	۱۳۶٫۸۴±۳۵٫۵۴	۷۸٫۸۴±۷٫۶۰	۰٫۰۰۰*
پروتئین	۹٫۴۵±۱٫۳۵	۹٫۴۲±۰٫۹۳	۰٫۰۳±۰٫۳۳	۰٫۹۳۵

مقادیر آنتوسیانین با واحد میلی‌مول بر گرم وزن خشک ($mmol\ g^{-1}\ DW$) برگ، مقادیر پروتئین با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) بذر و سایر متابولیت‌ها با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) برگ اندازه‌گیری شدند.

* تفاوت میانگین‌ها از لحاظ آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌داری هستند.

گیاهان این جنس از نظر محتوای قندی نیز مهم هستند که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Gonçalves & Romano, 2016). نتایج حاصل از بررسی ۱۶ گونه از این جنس شامل *P. major* و *P. lanceolata* نشان داد که کربوهیدرات عمده آنها، سوربیتول بوده است (Rønsted *et al.*, 2003). مطالعه دیگری روی گونه *P. lanceolata* نیز نشان داد که قندهای مهم این گونه، سوربیتول و بعد مانیتول هستند که در طی تنش‌های خشکی و شوری به‌عنوان تنظیم کننده‌های اسمزی نقش کلیدی دارند (Stewart, 1996). در این پژوهش، مقادیر قندهای محلول کل برای جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* اندازه گیری شد که گونه *P. Lanceolata* به‌طور میانگین و به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری از این ترکیبات را نشان داد (جدول ۳ و ۴، شکل ۱). از اینرو، با توجه به تولید میزان بیشتری از قندهای محلول در گونه *P. lanceolata* و با توجه به نقش‌های چندگانه این ترکیبات، می‌توان این گونه را جهت استفاده‌های خاص در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد نمود.

میانگین میزان متابولیت‌های گیاهی در جمعیت‌های دو گونه *P. major* و *P. lanceolata* تفاوت معنی‌داری را در فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول کل نشان داد (جدول ۴). میانگین و انحراف معیارهای محاسبه شده بترتیب در گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* برای فنول ۸٫۰۲±۲٫۹۷ و ۱۱٫۵۷±۲٫۸۸، ساپونین ۵٫۴۴±۱٫۳۴ و ۹٫۲۷±۳٫۰۵، کاروتنوئید ۰٫۰±۱۶٫۰۳ و ۰٫۲۴±۰٫۰۷، قندهای محلول ۵۸٫۰۰±۱۱٫۰۹ و ۱۳۶٫۸۴±۳۵٫۵۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و آنتوسیانین ۰٫۰±۴۰٫۰۶ و ۰٫۴۹±۰٫۱۱ میلی‌مول بر گرم وزن خشک برگ بوده که این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بودند ($p<0.05$)؛ بطوریکه گونه *P. lanceolata* در همه موارد مقادیر بیشتری از این ترکیبات را نشان داد. اگرچه گونه *P. lanceolata* در مورد سایر متابولیت‌ها شامل فلاونوئید، کلروفیل a و b نیز مقادیر بیشتری را نشان داد اما این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌داری نبودند (جدول ۴).

مقایسه‌های فیتوشیمیایی زیادی در مورد سایر گونه‌های جنس بارهنگ انجام شده است. مقایسه گونه‌های *P. argentea*، *P. holosteum*، *P. major*، *P. maritima*، *P. media* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف صربستان نشان داد که گونه *P. major* در مقایسه با سایر گونه‌ها، فنول و فلاونوئید کل کمتری دارد (Beara *et al.*, 2009). مقایسه گونه‌های *P. afra*، *P. coronopus*، *P. lagopus*، *P. lanceolata* و *P. serraria* از اسپانیا نشان داد که گونه *P. lanceolata* بیشترین میزان فنیل پروپانوئید گلیکوزیدها را تولید نموده و بعد از گونه *P. serraria* بیشترین میزان فنول کل و بعد از گونه *P. lagopus* بیشترین میزان فلاونوئید کل را داراست (Gálvez *et al.*, 2005). مقایسه گونه‌های *P. schwarzenbergiana*، *P. reniformis*، *P. atrata*، *P. coronopus*، *P. holosteum* و *P. lanceolata* نیز نشان داد که گونه *P. lanceolata* بیشترین میزان ورباسکوزید، فنیل پروپانوئید گلیکوزیدها و فنول کل را داشته است (Janković *et al.*, 2012). مقایسه ترکیبات پلی فنولی گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* جمع‌آوری شده از ازبکستان نشان داد که گونه *P. lanceolata* مقادیر بیشتری از این ترکیبات را تولید می‌کند (Makhmudov *et al.*, 2011). مطالعه حاضر نیز نشان داد که به‌طور میانگین گونه *P. lanceolata* مقادیر بیشتری از ترکیبات فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول را نسبت به گونه *P. major* تولید می‌کند که این تفاوت در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۴). تفاوت میانگین این متابولیت‌ها در این دو گونه برای فنول ۳/۵۵±۰/۸۵ میلی‌گرم، آنتوسیانین ۰/۰۹±۰/۰۳ میلی‌مول، ساپونین ۳/۸۳±۰/۶۸ میلی‌گرم، کاروتنوئید ۰/۰۸±۰/۰۲ میلی‌گرم و قندهای محلول ۷۸/۸۴±۷/۶۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده است (جدول ۴). به نظر می رسد در بین گونه‌های جنس بارهنگ، *P. major* از گونه‌های با محتوای متابولیتی پایین و *P. lanceolata* از گونه‌های با محتوای متابولیتی بالا باشد. از این رو می‌توان گونه *P. lanceolata* را جهت استفاده‌های خاص در زمینه‌های دارویی، بهداشتی و تغذیه‌ای پیشنهاد نمود.

علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی نظیر خاک، دما، رطوبت، نور و ارتفاع از سطح دریا از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه هستند (Hemmati *et al.*, 2012). نقش رویشگاه به عنوان عامل تاثیر گذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه بسیار با اهمیت بوده و از اینرو در مطالعه حاضر، جهت به حداقل رساندن عوامل محیطی، از بین جمعیت‌های فراوان جمع‌آوری شده، تنها جمعیت‌هایی از *P. major* و *P. lanceolata* که رویشگاه یکسانی شامل لفور، ساری، زیارت، ماسوله، زرد گل، ورسک، پلپا و شوراب داشتند، انتخاب (جدول ۱) و از لحاظ متابولیت‌های گیاهی (جدول ۲، ۳ و ۶) مقایسه شدند. مقایسه این دو گونه نشان داد که علی‌رغم تفاوت ارتفاع رویشگاه‌های مورد مطالعه، گونه *P. lanceolata* در همه رویشگاه‌ها فنول، ساپونین و قندهای محلول بیشتری و در اغلب رویشگاه‌ها فلاونوئید، آنتوسیانین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین بیشتری را نسبت به گونه *P. major* تولید کرده است (جدول ۲ و ۳، شکل ۱). در بین همه جمعیت‌های جمع‌آوری شده، جمعیت *P. lanceolata* لفور با ارتفاع ۳۶۱ متر، بیشترین میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول، جمعیت *P. lanceolata* ساری با ارتفاع ۳۷۰ متر،

بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، جمعیت *P. lanceolata* ماسوله با ارتفاع ۱۰۱۷ متر، بیشترین میزان آنتوسیانین و جمعیت *P. major* زیارت با ارتفاع ۸۱۴ متر، بیشترین میزان فلاونوئید و پروتئین را نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که هر دو گونه *P. major* و *P. lanceolata* منطقه لفور، با کمترین میزان ارتفاع در بین مناطق مورد مطالعه (جدول ۱)، در مقایسه با سایر جمعیت‌های خود، بیشترین میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول را داشتند (جدول ۲ و ۳، شکل ۱). نتایج بدست آمده می‌تواند در شناسایی جمعیت‌های برتر با بازده تولید بیشتر انواع مختلف متابولیت‌های گیاهی، جهت استفاده در موارد گوناگون دارویی، بهداشتی و تغذیه‌ای مهم و مورد استفاده باشند.

از آنجائیکه ارتفاع یکی از عوامل مهم در میزان متابولیت‌های گیاهی است جهت بررسی اسانس گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* از جمعیت ماسوله که دارای ارتفاع تقریباً حدواسط در بین جمعیت‌ها بود، استفاده شد. نتایج نشان داد که متابولیت‌های ۴،۲،۱-تری‌کلروبِنزن و فیتون با درصد حضور متفاوتی در هر دو گونه مشترک بودند. همچنین متابولیت‌های شاخصی در هر یک از گونه‌ها شناسایی شدند. بترتیب زمان بازداری، در گونه *P. major* ترکیبات ۴،۲،۱-تری‌کلروبِنزن با ۳۸/۱۶ درصد، پولگون با ۲۱/۰۵ درصد، فیتون با ۷/۸۹ درصد، پالمیتیک اسید با ۱۴/۴۷ درصد و تری‌بوتیل استیل‌سیترات با ۱۰/۵۳ درصد و در گونه *P. lanceolata* ترکیبات ۴،۲،۱-تری‌کلروبِنزن با ۱/۳۰ درصد، دی-کارون با ۸/۱۴ درصد، پیپریتِنون اکساید با ۲/۱۶ درصد، ترانس-کاریوفیلن با ۱/۱۳ درصد، فیتون با ۰/۹۵ درصد، آدیپیک اسید دی‌اُکتیل استر با ۸۲/۵۶ درصد و اسکوآلِن با ۱/۹۰ درصد شناسایی شدند (جدول ۵).

جدول ۵: ترکیبات شیمیایی اسانس گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* جمع‌آوری شده از منطقه ماسوله

گونه	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیب شیمیایی	حضور در اسانس (درصد)
P. major	۱۹/۲۶۱	1,2,4-trichlorobenzene	۳۸/۱۶
	۲۰/۷۱۳	Pulegon	۲۱/۰۵
	۳۳/۷۳۹	Phytone	۷/۸۹
	۳۶/۱۹۶	Palmitic acid	۱۴/۴۷
	۴۱/۸۶۹	Tributyl acetylcitrate	۱۰/۵۳
P. lanceolata	۱۹/۲۶۱	1,2,4-trichlorobenzene	۱/۳۰
	۲۰/۷۳۸	D-Carvone	۸/۱۴
	۲۳/۴۷۴	Piperitenone oxide	۲/۱۶
	۲۵/۳۴۸	Trans-caryophyllene	۱/۱۳
	۳۳/۷۳۹	Phytone	۰/۹۵
	۴۴/۸۹۹	Adipic acid, dioctyl ester	۸۲/۵۶
	۵۴/۵۰۶	Squalene	۱/۹۰

نتایج بدست آمده از آنالیز اسانس گونه‌های مختلف جنس بارهنگ، ترکیبات شیمیایی متفاوتی را گزارش کرده‌اند. ترکیبات شیمیایی مهم موجود در اسانس گونه *P. ovata* شامل تیمول، ۲و۴-دکادِینال، لینولئیک اسید و اولئیک اسید بودند (Seifi *et al.*, 2014). ترکیبات شیمیایی عمده موجود در اسانس گونه *P. asiatica* شامل لینالول، منتن-۲و۳-دیول، اوژنول، بایسیکلوژرماکِرن و فنچول بودند (Chung *et al.*, 2008). عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی در آنالیز اسانس گونه *P. amplexicaulis* شامل پالمیتیک اسید، ۳-متیل‌آندکان، ۱-اتیل-۲-متیل‌سیکلوهگزانول و ۲و۹-دی‌متیل‌دکان و در گونه *P. boissieri* شامل ۳-پروپ-۲-اِنیل بایسکلو (۲و۲و۱) هپتان، ۱-دودکان-۳-اُل، ۳-اتیل‌فنول و نوناکوزان بودند (Al-Mazroa *et al.*, 2012). آنالیز اسانس گونه *P. lanceolata* نشان داد که عمده‌ترین گروه‌های ترکیبات شیمیایی شامل اسیدهای چرب، مونوترپن‌های اکسید شده، آلدهیدها-کتون‌ها و الکل‌ها بودند که بیشترین ترکیب هر گروه به‌ترتیب شامل پالمیتیک اسید، لینالول، پِنتیل‌وینیل‌کتون و ۱-اُکتِن-۳-اُل بودند. ترکیباتی نظیر دی-کارون، ترانس‌کاریوفیلن و فیتون نیز در این گونه گزارش شدند که از جمله ترکیبات مشترک با مطالعه حاضر روی گونه *P. lanceolata* بودند (Bajer *et al.*, 2016). در این پژوهش، پولگون از ترکیبات شاخص موجود در اسانس گونه *P. major* بود درحالی که دی-کارون، پیپریتنون‌اکساید، اسکوآلِن و ترانس-کاریوفیلن از ترکیبات شاخص گونه *P. lanceolata* بودند (جدول ۵). نتایج اشاره دارد به اینکه اسانس گونه‌های مختلف این جنس متابولیت‌های متفاوتی را نشان می دهند که می‌توان از این داده‌ها در مطالعات کموتاکسونومی گونه‌های این جنس استفاده نمود؛ اگرچه مطالعاتی وسیع‌تر و از مناطق اکولوژیکی متفاوت ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

بنابراین، نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* از لحاظ فیتوشیمیایی متفاوت هستند. بررسی اسانس حاصل از اندام هوایی این دو گونه، متابولیت‌های شاخص متفاوتی نظیر پولگون را برای گونه *P. major* و دی-کارون، پیپریتِنون اکساید، اسکوآلِن و ترانس-کاریوفیلن را برای *P. lanceolata* نشان داد. همچنین بررسی عصاره‌های اندام هوایی نشان داد که به‌طور میانگین گونه *P. lanceolata* بترتیب میزان قندهای محلول، ساپونین، فنول، آنتوسیانین و کاروتنوئید کل بیشتری نسبت به گونه *P. major* دارد. با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که علاوه بر تفاوت‌های ریخت شناسی این دوگونه، تفاوت‌های فیتوشیمیایی آنها بویژه تفاوت در میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول صفات مهمی هستند که می‌توانند در مطالعات کموتاکسونومی این دو گونه مورد استفاده قرار گیرند. همچنین مقایسه جمعیت‌های مختلف نشان داد که هر دو گونه در منطقه لفور، بیشترین مقدار از متابولیت‌های ارزشمندی مانند فنول، ساپونین و قندهای محلول را داشتند. این نتایج در انتخاب گونه‌ها و جمعیت‌های برتر با بازده تولید متابولیت‌های بیشتر و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کمک شایانی خواهد نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا بدین وسیله از سرکار خانم دکتر نجمه احمدیان جهت راهنمایی‌های ایشان در مراحل انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Corporation 804 Pp. Illinois.

Adom, M.B., Taher, M., Mutalabisin, M.F., Amri, M.S., Kudos, M.B.A., Sulaiman, M.W.A.W., Sengupta, P. and Susanti, D. (2017). Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 96: 348–360.

Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols, 2: 875–877.

Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M. and Başer, K.H.C. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry, 108: 942–949.

Al-Mazroa, S.A., Al-Wahaibi, L.H., Mousa, A.A., and Al-Khathlan, H.Z. (2015). Essential oil of some seasonal flowering plants grown in Saudi Arabia. Arabian Journal of Chemistry, 8: 212–217.

Aminian, R., Mardani, M. and Davoodnia, B. (2018). The effect of hydro alcoholic extract of *Plantago majo*r and *Astragalus hamosus* on some gram-positive and gram-negative bacteria. Iranian Journal of Plant Researches, 31: 956–967. (In Persian)

Amiri, M.S., Saeidi Mehrvarz, Sh. and Memariani, F. (2018). *Plantago lagocephala* (Plantaginaceae), a new record for the flora of Iran. Nova Biologica Reperta, 5: 320–323.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1–15.

Bajer, T., Janda, V., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A. and Ventura, K. (2016). Chemical composition of essential oils from *Plantago lanceolata* L. leaves extracted by hydrodistillation. Journal of Food Science and Technology, 53: 1576–1584.

Bazzaz, B.S.F. and Harirzadeh, G. (2003). Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology, 41: 573–583.

Beara, I.N., Lesjak, M.M., Jovin, E.D., Balog, K.J., Anackov, G.T., Orcić, D.Z. and Mimica-Dukić, N.M. (2009). Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 9268–9273.

Beara, I.N., Lesjak, M.M., Orčić, D.Z., Simin, N.Đ., Četojević-Simin, D.D., Božin, B.N. and Mimica-Dukić, N.M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. LWT - Food Science and Technology, 47: 64–70.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Chung, M., Park, K.W., Kim, K.H., Kim, C., Baek, J.P., Bang, K., Choi, Y. and Lee, S. (2008). Asian plantain (*Plantago asiatica*) essential oils suppress 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A reductase expression *in vitro* and *in vivo* and show hypocholesterolaemic properties in mice. British Journal of Nutrition, 99: 67–75.

Dalar, A., Türker, M. and Konczak, I. (2012). Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. Journal of Herbal Medicine, 2: 42–51.

Dubois, M., Gilles, k.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350–356.

Ferrazzano, G.F., Cantile, T., Roberto, L., Ingenito, A., Catania, M.R., Roscetto, E., Palumbo, G., Zarrelli, A. and Pollio, A. (2015). Determination of the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity on salivary Streptococci and Lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a *Plantago lanceolata* infusion. Biomed Research International, 2015: 1-8.

Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J. and Ayuso, M.J. (2005). Antioxidant Activity of Methanol Extracts Obtained from *Plantago* Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1927–1933.

Gonçalves, S. and Romano, A. (2016). The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). Industrial Crops and Products, 83: 213–226.

Hassemer, G. (2018). Notes on the montane Indo-Iranian species in *Plantago* subgenus *Plantago* (Plantaginaceae). Phytotaxa, 336: 59–68.

Hemmati, K.H., Ghasemnejad, A., Mashayekhi, K. and Bashiri-Sadr, Z. (2012). Site effect on some important flavonoid compounds of Linden tree (*Tilia platifolia* L.). Journal of Plant Production Research, 19: 141-148. (In Persian)

Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins with vanillin and sulfuric acid. Planta Medica, 29: 116–122.

Janighorban, M. (1995). Plantaginaceae. Pages 1–53 in Assadi *et al*., eds. Flora of Iran, Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands.

Janković, T., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakušić, D., Stešević, D. and Šavikin, K. (2012). Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. Biochemical Systematics and Ecology, 42: 69–74.

Karakaş, F.P., Yildirim, A. and Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turkish Journal of Biology, 36: 641–652.

Kobeasy, M.I., Abdel-Fatah, O.M., El-Salam, S.M.A. and Mohamed, Z.E.M. (2011). Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. International Journal of Biodiversity and Conservation, 3: 83–91.

Kolak, U., Boğa, M., Uruşak, E.A. and Ulubelen, A. (2011). Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities. Turkish Journal of Chemistry, 35: 637–645.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350–382.

Madland, E. (2013). Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from *Herniaria incana*. Master's thesis. Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, Pp 67.

Makhmudov, R.R., Abdulladzhanova, N.G. and Kamaev, F.G. (2011). Phenolic compounds from *Plantago major* and *P. lanceolata*. Chemistry of Natural Compounds, 47: 288–289.

Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Science, 164: 259–265.

Matini, M., Bakhtiarnejad, S., Dastan, D., Maghsood, A.H. and Fallah, M. (2017). *In-Vitro* efficacy of *Plantago lanceolata* L. extracts on *Trichomonas vaginalis*. Journal of Arak University of Medical Sciences, 20: 74–82. (In Persian)

Mehni, A.M. and Shahdadi, F. (2014). Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran. International Journal of Biosciences, 4: 224–228.

Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N. and Mirzaei, M. (2011). The Antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 1: 160–167. (In Persian)

Mohsenzadeh, S., Nazeri, V. and Mirtadzadini, A.S. (2007). *Plantago lachnantha* Bge. (Plantaginaceae), a new record for flora of Iran. The Iranian Journal of Botany, 13: 107–108.

Nostro, A., Germanò, M.P., D'angelo, V., Marino, A. and Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology, 30: 379–84.

Patzak, A. and Rechinger, K.H. (1965). Plantaginaceae. Pages 1–21 in Rechinger KH, ed. Flora Iranica, Graz: Academische Druck und Verlagsantalt.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5: 1142–1145.

Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P. Jaroszewski, J.W. and Jensen, S.R. (2003). Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. Plant Systematics and Evolution, 242: 63–82.

Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology, 71: 1–21.

Seifi, H., Masoum, S., Seifi, S. and Ebrahimabadi, E.H. (2014). Chemometric resolution approaches in characterisation of volatile constituents in *Plantago ovata* seeds using gas chromatography-mass spectrometry: methodology and performance assessment. Phytochemical Analysis, 25: 273–81.

Stewart, A.V. (1996). Plantain (*Plantago lanceolata*) a potential pasture species. Proceedings of the New Zealand Grassland Association, 58: 77–86.

Stiles, E.A., Cech, N.B., Dee, S.M. and Lacey, E.P. (2007). Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*. Physiologia Plantarum, 129: 756–765.

Tutel, B. (1982). *Plantago* L. Pages 505–521 in Davis PH, ed. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh: Edinburgh University Press.

Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., and Pérez-Gutiérrez, M. S. (2006). Effect of *Plantagomajor* on cell proliferation in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 103: 36–42.

Yahyaabadi, Y., Mahmoudi Otaghvari, A. and Nazifi, E. (2019). Phytochemical and palynological study of several species of *Mentha* L. in north of Iran. Iranian Journal of Plant Researches, 33: 843–853. (In Persian)

Phytochemical study of *Plantago major* and *Plantago lanceolata* in north of Iran

S.S. Amininasab[1], A. Mahmoudi Otaghvari[2], E. Nazifi[3*]

Received:2021.02.23
Accepted:2021.4.20

Abstract

Plantago major and *Plantago lanceolata* are abundant species of Plantago family in the north of Iran which are recognized as valuable medicinal plants. In this study, eight populations of these species were collected from different regions of north of Iran and studied phytochemically. The results on average showed that *P. lanceolata* had more metabolites than *P. major*. The mean differences for phenols, anthocyanins, saponins, carotenoids, and soluble sugars were statistically significant at the level of 0.05. Analysis of the essential oil of Masuleh populations showed that the pulegon and palmitic acid were main components of *P. major* whereas the D-carvone and adipic acid, dioctyl ester were main components of *P. lanceolata*. These findings help to select species and populations with higher metabolic content followed by optimal use in food, pharmaceutical and health industries.

Keywords: *D-carvone, Essential oil, Plantago, Plant metabolites, Pulegon*

1- MSc. of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.
2- Associate Prof., Department of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.
3- Assistant Prof., Department of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.
*(Corresponding author: nazifiehsan@yahoo.com / e.nazifi@umz.ac.ir)