پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۳ فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۸۷ (۳۶-۲۸)

بررسی کمی و کیفی فلاونوییدهای موجود در اندام‌های هوایی، گل و میوه گیاه عطر سنگ Varthemia Persica (Var.persica) DC

امیر سیاهپوش (Ph.D.) *+ **نصرا... قاسمی** (Ph.D.)**

غلامرضا اصغری (Ph.D.)** **محمدرضا شمس اردکانی** (Ph.D.)***

چکیده

سابقه و هدف: گیاه عطرسنگ گیاهی معطر از خانواده کاسنی و انحصاری فلات ایران می‌باشد. این گیاه حاوی روغن‌های فرار بوده، در بررسی روغن فرار گیاه مشخص گردید که اصلی‌ترین مواد متشکله روغن فرار سزکویی ترپن‌ها (Sesquiterepens) می‌باشد. تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در زمینه فلاونوییدهای این گیاه منتشر نشده است.

مواد و روش‌ها : از پودر گل، میوه و اندام هوایی که توسط فریز درایر خشک گردیده بود توسط متانول آبکی ۵۰ درصد و اسیدکلریدریک، ۱/۲ مولار عصاره تهیه شده و توسط HPLC فلاونوییدها شناسایی و مقدار آنها تعیین شد.

یافته‌ها : فلاونوییدهای میرستین، کوئرستین، لوتئولین، آپی ژنین و کامپفرول در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی شناسایی و اندازگیری شد.

استنتاج : نتایج بررسی فلاونوییدها نشان می‌دهد که گل حاوی هر ۵ فلاونویید فوق بوده، میوه‌ها و اندام‌های هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی حاوی کامپفرول، لوتئولین، کوئرستین می‌باشد. این گیاه غنی از فلاونوییدها بوده و می‌تواند مورد مناسبی برای بررسی‌های فارماکولوژیک باشد.

واژه های کلیدی : فلاونوییدها، عطر سنگ، HPLC ، Varthemia persica

مقدمه

ایران با داشتن بیش از ۸۰۰۰ گونه گیاهی که تعداد قابل توجهی از آنها آندمیک (endemic) می‌باشند، می‌تواند جایگاه ویژه و با ارزشی در زمینه گیاهان دارویی داشته باشد. نیل به این هدف نیاز مند مطالعات وسیع و گسترده بر روی گیاهان بومی ایران به خصوص گیاهان اندمیک می‌باشد.

گیاه عطرسنگ با نام‌علمیVarthemia Persica DC، گیاهی معطر از خانواده کاسنی و منحصر به فلات ایران

+ مولف مسئول: دکتر امیر سیاهپوش- اهواز، جاده گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، E-mail : Amirsiahpoosh@yahoo.com

* متخصص فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

** متخصص فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان *** متخصص فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت : ۸۵/۱۰/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۵/۱۲/۲۳ تاریخ تصویب: ۸۷/۲/۴

www.SID.ir

می‌باشد و تنها گونه موجود از این جنس در ایران است. این گیاه پایا، ایستاده و محکم، سبز متمایل به کبود یا زردفام، پر ساقه، در پایه چوبی، پوشیده از غده‌های بدون پایه، در لمس کمی زبر و خشن، به طول ۵۰-۲۰ سانتی‌متر می‌باشد(۱) و دارای ۳ واریته persica ، squarrosula و stenocephala Bornm. Ex Rech.f. می‌باشد(۲). بر روی این گیاه تاکنون مطالعه فارماکولوژیک صورت نگرفته است ولی برای گونه‌های دیگر این جنس اثرات ضد باکتری و ضد قارچ، ضد اسپاسم وکاهش دهنده قندخون گزارش شده است(۴،۳). بررسی فلاونوییدهای گونه Varthemia iphionoides نشان می‌دهد که این گیاه حاوی فلاونوییدهای کوماتاکنین[1] گزانتومیکرول[2]، جاسیدین[3] و گلیکوزیدهای متیل کوئرستین می‌باشد(۴). آنالیز روغن فرار حاصل از این گیاه نشان می‌دهد که روغن فرار حاوی ۳/۲۸ درصد مونوترپن، ۱/۸۲ درصد مونوترپن اکسیژنه، ۴۴/۹۱ درصد سزکویی ترپن و ۳۶/۴۹ درصد سزکویی‌ترپن اکسیژنه می‌باشد وبیشترین ترکیبات روغن فرار شامل کادینن[4] (۹/۷ درصد)، سلین-۱۱-ان-۴-ال[5] (۵/۳ درصد)، ژرماکرن دی[6] (۴/۹ درصد) می‌باشد(۵) تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی فلاونوییدهای این گیاه انجام نگرفته است.

فلاونوییدها از ترکیبات مهم در درمان می‌باشند که به منظور شناسایی کیفی و کمی آنها تحقیقات فراوانی انجام شده است(۷،۶) گزارش شده است که مصرف روزانه فلاونوییدهای مرکبات باعث کاهش عبور اریتروسیت‌های خطرناک از جفت در خلال حاملگی می‌شوند(۸).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد در افرادی که میزان مصرف فلاونوییدها بالا می‌باشد خطر بیماری‌های قلبی عروقی و مغزی- عروقی کاهش پیدا می‌کند(۹). میزان ورود فلاونوییدها به بدن به طور قابل قبولی با میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های کرونر ارتباط معکوس داشته و نیز ارتباط معکوس با شیوع آنفارکتوس میوکارد کشنده و غیرکشنده دارد(۱۱،۱۰).

در مطالعه بر روی سالمندان نشان داده شده است که میزان فلاونوییدهای آپی ژنین، کامپفرول، لوتئولین، میرستین و کوئرستین با بیماری‌های قلبی ارتباط معکوس دارد(۱۲). در این تحقیق ۵ فلاونویید شامل کوئرستین، میرستین و کامپفرول از دسته فلاونول‌ها، آپی ژنین و لوتئولین از دسته فلاون‌ها که دارای اثرات ضدسرطانی و ضد موتاژنی در درون تستی(Invivo) و برون(Invitro) تستی می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت(۱۴،۱۳).

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی

گیاه Varthemia persica DC در دو فصل گل‌دهی (اواخر شهریور- اوایل مهرماه) و میوه‌دهی (اواخر آبان- اوایل آذر) سال ۱۳۸۰ از دامنه شمالی کوه‌های کرکس در روستای طامه از توابع شهرستان نطنز (استان اصفهان) در ارتفاع ۲۴۰۰-۲۲۰۰ جمع‌آوری گردید و توسط مهندس مهرگان شناسایی و نمونه هرباریوم گیاه در هرباریوم دانشکده داروسازی اصفهان با شماره ۱۲۷۸ به ثبت رسید. گیاهان جمع‌آوری شده توسط فریزدرایر خشک و سپس به صورت پودر درآورده شده و در فریز نگهداری گردیدند.

روش استخراج

باتوجه به اینکه شناسایی گلیکوزید فلاونوییدها در گیاهان به دلیل فقدان استانداردهای آنها و وجود بیش از ۵۰ گلیکوزید مختلف از آگلیکون فلاونوییدهای معمول در گیاهان بسیار مشکل می‌باشد، هیدرولیز تمام

1. Kumatakenin
2. Xanthomicrol
3. Jaceidine
4. Cadinen
5. Selin-11-en-4-ol
6. Germacrene D

Archive of SID
www.SID.ir

گلیکوزیدها به آگلیکون آنها یک نوع روش عملی و نسبتاً آسان برای شناسایی فلاونوییدها می‌باشد(۱۱). بدین منظور ۴۰ میلی لیتر متانول آبکی۶۲/۵ درصد (حاوی ۰/۱ درصد بوتیل هیدروکسی تولوئن به عنوان آنتی‌اکسیدان) را به ۰/۵ گرم پودر گیاهی فریزدرای شده اضافه نموده، به آن ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار افزوده و به دقت هم زده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد با هم‌زدن رفلاکس شد. بعد از سرد شدن صاف گردیده و توسط متانول به حجم ۱۰۰ رسانیده شد و به مدت ۵ دقیقه در سونیکاتور (Hawashin: powersonic 410, Korea) قرار داده شد. حدود ۲ میلی‌لیتر از آن را از خلال فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر مخصوص حلال‌های آلی (PTFE, Pall Corporation) برای تزریق به HPLC صاف گردید(۱۱).

تهیه محلولهای استاندارد

برای تهیه استانداردهای کوئرستین، میرسین، کامپفرول، آپی ژنین و لوتئولین (Roth, Germany) مطابق زیر عمل شد.

ابتدا یک استوک از استانداردها با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از آن با ۲۰ میلی‌لیتر محلول متانول آبکی ۶۲/۵ درصد (حاوی ۰/۱ درصد بوتیل هیدروکسی تولوئن) و ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار افزوده و با متانول به حجم ۵۰ رسانده شد(۱۲،۱۱).

آنالیز با HPLC

آنالیز کروماتوگرافی با ستون: Nova-Pack C_{18} (Waters Associaion, Milford, MA) به مشخصات (۴ µm، ۱۵۰ mm × ۳/۹)، ستون محافظ[1]: (۴۰-۳۰ µm، ۴۰× ۳/۹) و HPLC با مشخصات لوپ: ۲۰ µL، دتکتور PDA[2] (2996, Waters)، پمپ (515, Waters) و برنامه نرم‌افزاری Millennium و Millennium PDA انجام گرفت(۱۱).

دو سیستم حلال به صورت ایزوکراتیک مورد استفاده قرار گرفت، سیستم حلال I: محلول ۲۵ درصد استونیتریل در دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) (۰/۰۲۵ مولار) با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و سیستم حلال II: محلول ۴۵ درصد متانول در دی-هیدروژن فسفات پتاسیم (۰/۰۲۵ مولار) با سرعت جریان ۰/۲ میلی لیتر بر دقیقه. تعیین مقدار فلاونوییدها براساس سیستم حلال I بوده و از سیستم حلال II برای اثبات خلوص پیکها و هنگامی که هر فلاونوییدهای کوئرستین و لوتئولین وجود دارد، برای جدا سازی و تعیین مقدار آنها استفاده گردید. مقایسه پیکها با استاندارد بر اساس زمان بازداری، شکل طیف ماوراء بنفش (UV) (۴۵۰-۲۲۰ نانومتر) و نقاط جذب ماکزیمم انجام گرفت. برای تعیین حضور فلاونوییدهای مورد نظر، مقایسه با استانداردها بر اساس زمان بازداری، شکل طیف UV (۴۵۰-۲۲۰ نانومتر) و نقاط جذب ماکزیمم با استفاده از نقاط جذب ماکزیمم با استفاده از برنامه نرم افزاری Millennium PDA انجام گردید (شکل شماره ۳) (۱۲،۱۱).

تعیین مقدار فلاونوییدها

بدین منظور منحنی استاندارد برای هر استاندارد به طور جداگانه رسم گردیده و سطح زیر منحنی نمونه‌ها براساس آن تعیین گردید. سطح زیرمنحنی (شدت پیک) و خلوص توسط برنامه Millennium PDA تعیین و بررسی برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید. اختلاف بیش از ۱۵ درصد بین نتایج قابل قبول نبود و در این صورت دوباره آزمایش‌ها تکرارگردید. لازم به ذکر است جذب پیک‌ها در ۳۷۰ نانومتر بررسی شد(۱۲،۱۱). با توجه به نیاز از آزمون ANOVA و تست Duncan با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS var 12 استفاده گردید.

1. Guard Column
2. Photo Diode Array

Archive of SID

www.SID.ir

تنظیم منحنی استاندارد

بدین منظور از استاندارد فلاونوییدها (میرستین، لوتئولین، کوئرستین، آپی‌ژنین، کامپفرول) غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰/۵ میکروگرم بر لیتر (منحنی استاندارد فلاونوییدها معمولا در محدود ۲۵-۰/۵ میکروگرم بر لیتر خطی می‌باشد) *تهیه گردید* و میزان جذب (۳ بار) توسط HPLC و سیستم حلال I تعیین و منحنی استاندارد توسط برنامه نرم‌افزاری Excel رسم گردید. در صورتی که R^2 کمتر از ۰/۹۹۹۵ بود ساخت استاندارد دوباره انجام گرفت (۱۵،۱۱).

یافته ها

شناسایی فلاونوییدها

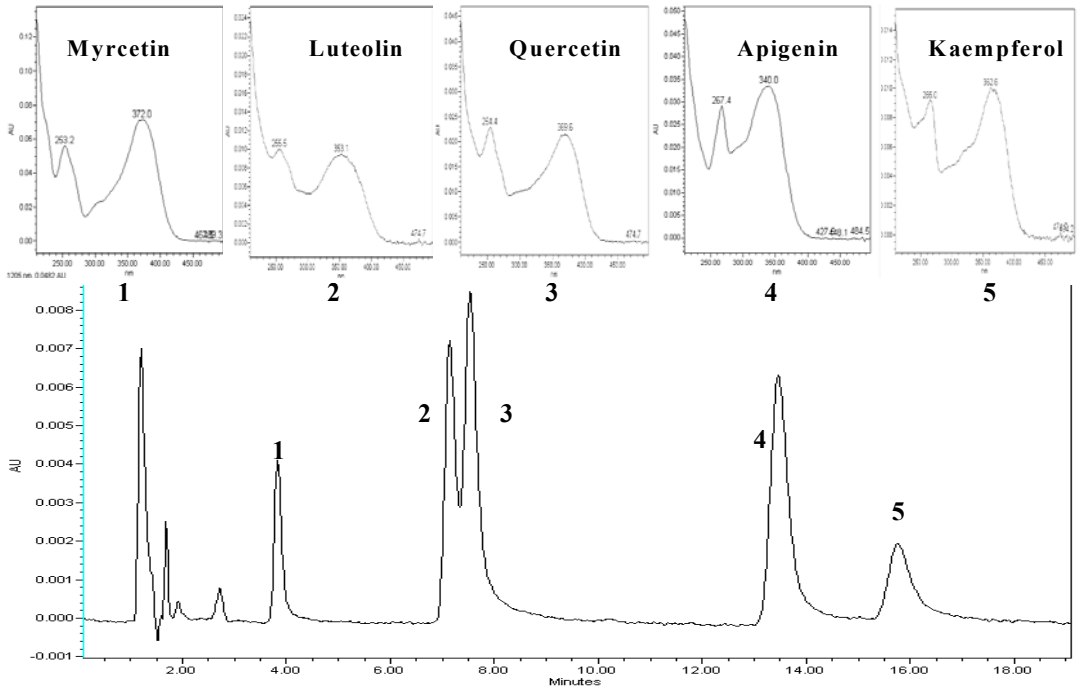
۵ فلاونویید شامل کوئرستین، میرستین و کامپفرول از دسته فلاوونول‌ها، آپی ژنین و لوتئولین از دسته فلاون‌ها در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی شناسایی شدند. زمان بازداری استانداردهای فلاونوییدهای فوق در هر دو سیستم حلال مورد استفاده در HPLC در جدول شماره ۱ و شکل‌های شماره ۱ و ۲، نمونه طیف HPLC نمونه گیاهی در شکل شماره ۳ و نتایج وجود فلاونوییدهای مورد نظر در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه دهی در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره۱: زمان بازداری فلاونوییدهای مورد استفاده در دو سیستم حلال HPLC

فلاونوییدها	زمان بازداری** (سیستم حلال II، min)	زمان بازداری* (سیستم حلال I، min)
Myricetin	۳/۹۸	۳/۷۸
Luteolin	۵/۰۲	۷/۰۷
Quercetin	۵/۵۹	۷/۴۱
Apigenin	۶/۷۹	۱۳/۴۶
Kaempferol	۷/۳۵	۱۵/۷۶

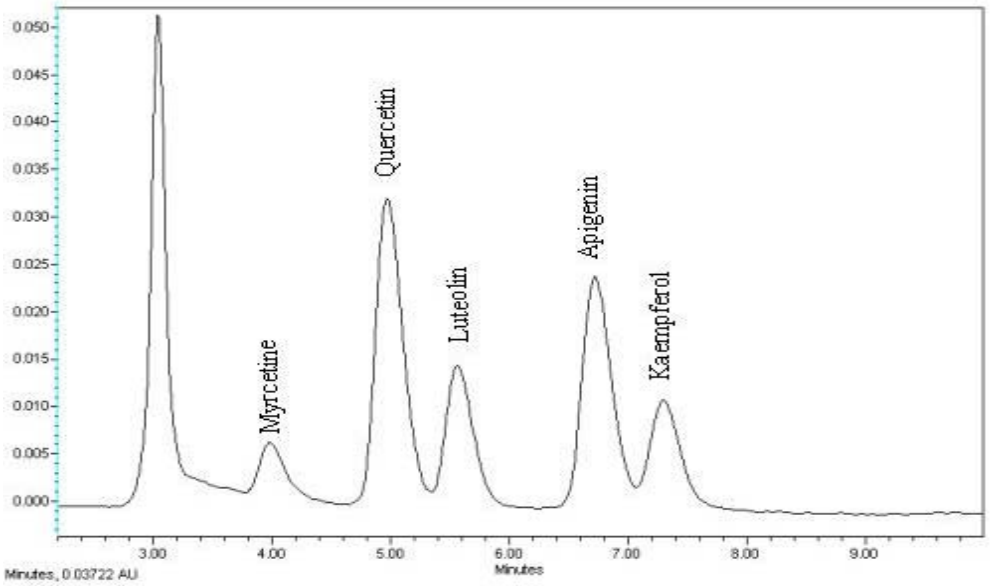
*: محلول ۲۵ درصد استونیتریل در KH_2PO_4 (۰/۰۲۵ مولار) با سرعت جریان ۱ ml/min

**: محلول ۴۵ درصد متانول در KH_2PO_4 (۰/۰۲۵ مولار) با سرعت جریان ۰/۲ ml/min

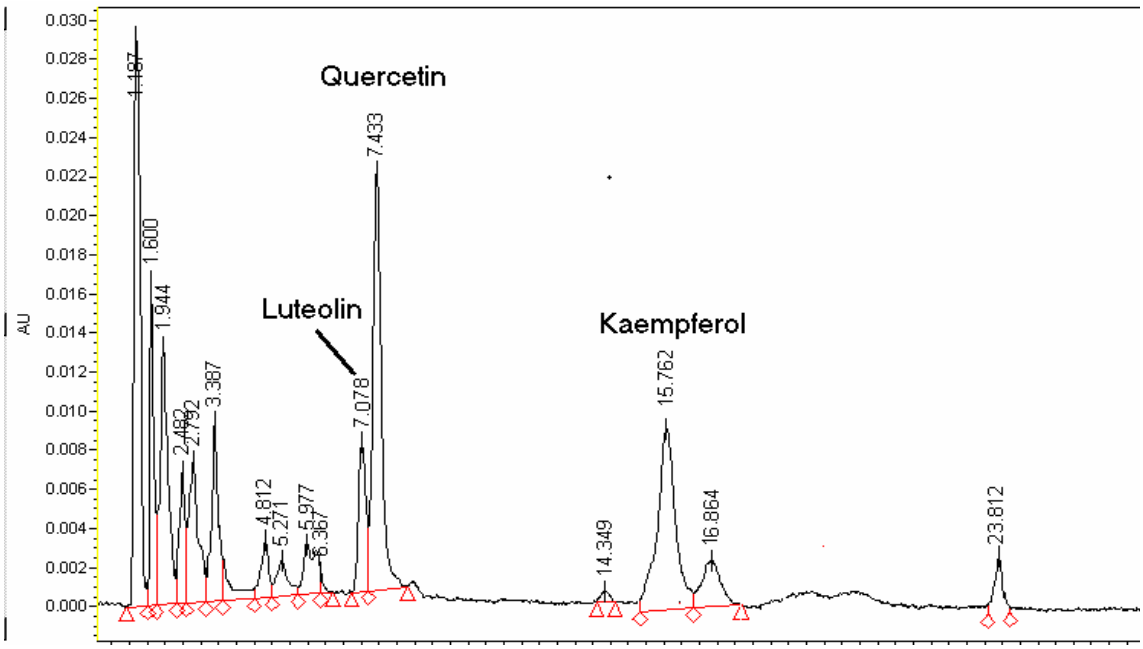


شکل شماره ۱: کروماتوگرام HPLC استانداردهای فلاونوییدها درطول موج ۳۷۰nm درسیستم حلال I و طیف UV آنها (گرفته شده توسط دتکتور PDA)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۲: کروماتوگرام HPLC استانداردهای فلاونوییدها در طول موج ۳۷۰ nm در سیستم حلال II



شکل شماره ۳: کروماتوگرام HPLC فلاونوییدهای اندام هوایی در فصل گل دهی در سیستم حلال I

www.SID.ir

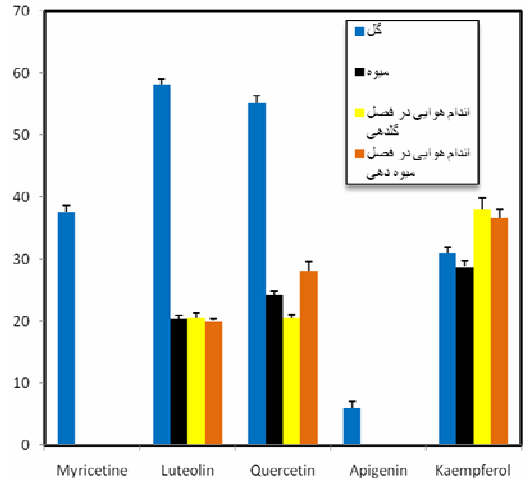
جدول شماره ۲ : مقایسه وجود فلاونوییدها در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل دهی و میوه دهی

فلاونوییدهای بررسی شده	گل	میوه	اندام هوایی در فصل گل دهی	اندام هوایی در فصل میوه دهی
Myricetine	+	–	–	–
Luteolin	+	+	+	+
Quercetin	+	+	+	+
Apigenin	+	–	–	–
Kaempferol	+	+	+	+

+: وجود ترکیب –: عدم وجود

تعیین مقدار فلاونوییدها

به منظور تعیین مقدار فلاونوییدها ابتدا بر اساس غلظت‌های‌مختلف استانداردها وسطح زیرمنحنی‌پیک‌ها، منحنی استاندارد رسم گردیده، سپس بهترین خط با R^2 بزرگتر از ۰/۹۹۹۵ رسم و براساس معادله خط غلظت فلاونوییدها تعیین گردید (۱۱،۷). میزان فلاونوییدهای یافت شده در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی در شکل شماره۴ آورده شده است.



شکل شماره ٤ : میزان فلاونوییدهای یافت شده در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل دهی و میوه‌دهی

*: نتایج به صورت Mean±SD مربوط به ۳ بار تکرار می‌باشد.

*: غلظت بر اساس میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه

بحث

با مراجعه به نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود که بیشترین تجمع فلاونوییدها در گل بوده که با توجه به این‌که رنگ زرد گل‌ها بیشتر به دلیل وجود فلاونوییدها و کاروتنوییدها است، قابل توجیه می‌باشد(۱۶تا۱۸). میرستین و آپی ژنین فقط در گل تولید شده است. اختصاصی‌بودن بعضی از فلاونوییدها به بافت‌های خاص در گیاه عناب (Zizyphus mistol) نیز گزارش شده است(۱۹). میزان کوئرستین و لوتئولین در گل به مراتب از میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی بیشتر است و این اختلاف با احتمال P<۰/۰۵ از لحاظ آماری قابل قبول می‌باشد. نکته جالب این‌که بین میزان کامپفرول در ۴ نمونه اختلافی وجود ندارد. فلاونویید مذکور به رویشگاه خاص یا بافت خاصی از گیاه عطر سنگ وابسته نمی‌باشد. در حالی‌که در گیاه کاسیا (Cassia alata) نشان داده شده است که کامپفرول بیشتر در برگ و کمتر در گل وجود دارد(۲۰). ضرورت حضور برخی از فلاونوییدها که نقش دفاعی در گیاه دارند تاکید شده است(۲۱). در گیاه سیاه گیله (Vaccinium myrtills) کوئرستین چنین نقشی دارد و میزان آن در اندام‌های مختلف گیاه یکسان است(۲۲). مقایسه فلاونوییدها نشان می‌دهد که فلاونوییدهای اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی بیشترین شباهت را داشته و فلاونوییدهای گل بیشترین تفاوت را با فلاونوییدهای ۳ دسته دیگر دارد. به نظر می‌رسد که نقش اندام در تجمع فلاونوییدها در گیاه عطرسنگ بیشتر از تاثیر مرحله رویشی باشد. در گیاه ایزوکما (Isocoma acradenia) و گیاه نعناع (Mentha × piperita) تغییری در میزان ۵ فلاونویید مذکور مشاهده نشده است(۲۴،۲۳). در گیاه شبه رز (Cistus laurifolius) میزان کوئرستین در بافت جوان و میرستین دربافت رسیده بیش‌تراست(۲۵). میزان آپی‌ژنین،

Archive of SID

www.SID.ir

کوئرستین و لوتئولین در گیاه عطر سنگ با افزایش سن از مرحله گل‌دهی به میوه دهی تفاوتی نداشت ولی در برگ‌های هویج (Daucus carota)، مسن‌تر شده باعث کاهش میزان فلاونوییدها شده است(۲۶). این‌گونه تغییرات در گیاه درمنه (Artemisia tridentate) نیز گزارش شده است(۲۷). با شناخت نوع فلاونویید و میزان آن در گیاه عطرسنگ زمینه انجام امکان بررسی‌های فارماکولوژی این گیاه فراهم شده است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده که بدینوسیله از معاونت مزبور تشکر می‌گردد.

Reference

1. Ghahreman A. Flora de l'Iran en couleurs naturelles.institut de Recherches des forêts et pasturages Téhéran Iran. 2002; 1746.
2. Riedl H. Flora Iranica 1st ed. Rechinger KH. Academische Druck-verlagsantalt, ***Graz*** 1963; 145: 107.
3. Afifi F, Saket M, Jaghabir M, Aleisaw D. Effect of Varthemia iphionoides on blood glucose level of normal rats and rats with streptozocin- induced diabetes mellitus. ***Cur Ther Res*** 1997; 58(11): 888-892.
4. Aburjai T, Darwish RM, Al-Khalil S, Mahafzah A, Al-Abbadi A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of Pseudomonas aeruginosa. ***J Ethnopharmacol*** 2001; 76: 39-44.
5. Ghasemi N, Asghari G, Shams Ardakani M, Siahpoosh A. Characterization af volatile constituents from aerial parts of Varthemia persica DC. (var. persica). ***Iranian J Pharm Res*** 2003; 241-243.
6. Solar A, Colaric M, Usenik V, Stampar F.Seasonal variations of selectedflavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (Juglans regia L.). ***Plant Sci*** 2006; 170: 453-461.
7. Erlund I. Review of flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. ***Nutr Res*** 2004; 24: 851-874.
8. Havsteen GH. The biochemistry and medical significance of flavonoids. ***Pharmacol Therapeut*** 2002; 96: 67-202.
9. Prior RL, Cao G. Flavonoid: diet and health relationships. ***Nutr Clin Care*** 2000; 3(5): 279-288.
10. Hollman PCH, Hertog MGI, Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. ***Food Chem*** 1996; 57: 43-46.
11. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly

Archive of SID

www.SID.ir

study. ***Am J Clin Nutr*** 1997; 65: 1489-1494.

12. Hertog MGL, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diesease: the Zutphen Elderly study. ***Lancet*** 1993; 342: 1007-1011.
13. Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithin decarboxylase and skin tumor promotion in mice. ***Cancer Res*** 1990; 50: 499-502.
14. Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA, Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and N-Nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. ***Cancer Res*** 1988; 48: 5754-5788.
15. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackbum H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in seven countries study. ***Arch Intern Med*** 1995; 155: 381-386.
16. Bruneton J. ***Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants.*** London, Lavoisier publishing, 1995: 227-299.
17. Mikanagi Y, Yokoi M, Ueda Y, Saito N. Flower flavonols and anthocyanin distribution in subgenus Rosa. ***Biochem Syst Ecol*** 1995; 23: 183-200.
18. Kazuma K,Noda N, Suzuki M. Flavonoid composition related to petal color in different lines of Clitoria ternatea. ***Phytochemistry*** 2003; 64: 1133-1141.
19. Pellotto JP, Maria A, Martinez DP. Flavonoid variation with the plant age inzyzyphus mistol leaves. ***Biochem Syst Ecol*** 1993; 2: 645-646.
20. Moriyama H, Lizuka T, Nagai M, Murata Y. HPLC quantification of kaempferol -3-O-gentiobioside in Cassia alata. ***Fitoterapia*** 2003; 74: 425-430.
21. Witzell G, Gref R, Nasholm T. Plant-Part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (Vaccinium myrtillus) plants. ***Biochem Syst Ecol*** 2003; 31: 115-127.
22. Vvedenskaya IO, Vorsa N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American canberry. Vaccinium macrocarpon Ait. ***Plant Sci*** 2004; 167: 1043-1054.
23. Lisa E, Clark LE, Clark WD. Seasonal Variation in leaf exudates flavonoids of Isocoma acradenia (Asteraceae). ***Biochem Syst Ecol*** 1990; 14: 145-148.
24. Voirin B, Saunois A, Bayet C. free flavonoids aglycones from Mentha piperita: Developmental, chemotaxonomical and physiological aspects. ***Biochem Syst Ecol*** 1999; 22: 95-99.
25. Vogt T, Gerhard P. Accumulation of flavonoids during leaf development in Cistus laurifolius. ***Phytochemistry*** 1994; 36: 591-597.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Brooks JS, Paul Feeny PM. Seasonal variation in Daucus carota leaf-surface and leaf-Tissue chemical profiles. ***Biochem Syst Ecol*** 2004; 32: 769-782.

27. Wilt FM, Miller GC. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentration in persistent leaves of Wyoming Big Sagebrush (Artemisia tridentate ssp. Wyuomingensis: Asteraceae). ***Biochem Syst Ecol*** 1992; 20: 53-67.

Archive of SID

www.SID.ir