



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

امیر سیاهپوش⁺ (Ph.D.) نصر... قاسمی^{**} (Ph.D.)
غلامرضا اصغری^{**} (Ph.D.) محمدرضا شمس اردکانی^{***} (Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف: گیاه عطر سنگ 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 سزکویی‌ترین‌ها (Sesquiterpens) می‌باشد. تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در زمینه فلاونویدهای 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 اسید کلریدریک، ۱/۲ مولار عصاره تهیه شده و توسط HPLC فلاونویدها شناسایی و مقدار آنها تعیین شد.

یافته‌ها: فلاونویدهای میرستین، کوئرستین، لوتولین، آپی ژنین و کامپفرول در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی شناسایی و اندازه‌گیری شد.

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

واژه‌های کلیدی: فلاونویدها، عطر سنگ، HPLC، *Varthemia persica*

مقدمه

وسیع و گسترده بر روی گیاهان بومی ایران به خصوص گیاهان اندمیک می‌باشد.

گیاه عطر سنگ با نام علمی *Varthemia Persica DC*، گیاهی معطر از خانواده کاسنی و منحصر به فلات ایران

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

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

^{*} متخصص فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
^{**} متخصص فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
^{***} متخصص فارماکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

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

می‌کند(۹). میزان ورود فلاونوئیدها 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(۱۰،۱۱). در مطالعه بر روی سالمندان نشان داده شده است که میزان فلاونوئیدهای آپی ژنین، کامپفرول، لوتولین، میرستین و کوئرستین با بیماری‌های قلبی ارتباط معکوس دارد(۱۲). در این تحقیق ۵ فلاونوئید شامل کوئرستین، میرستین و کامپفرول از دسته فلاونولها، آپی ژنین و لوتولین از دسته فلاونها که دارای اثرات ضدسرطانی و ضد موتاژنی در درون تستی (Invivo) و برون (Invitro) تستی می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت(۱۳،۱۴).

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 نظنر (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 فلاونوئیدها در گیاهان به دلیل فقدان استانداردهای آنها و وجود بیش از ۵۰ گلیکوزید مختلف از آگلیکون فلاونوئیدهای معمول در گیاهان بسیار مشکل می‌باشد، هیدرولیز تمام

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 زیر و خشن، به طول ۵۰-۲۰ سانتی‌متر می‌باشد(۱) و دارای ۳ وارسته *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 و کاهش دهنده قندخون گزارش شده است(۳،۴). بررسی فلاونوئیدهای گونه *Varthemia iphionoides* نشان می‌دهد که این گیاه حاوی فلاونوئیدهای کوماتاکنین^۱ گزانتومیکرول^۲، جاسیدین^۳ 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 سزکوییترین و ۳۶/۴۹ درصد سزکوییترین اکسیژنه می‌باشد و بیشترین ترکیبات روغن فرار شامل کادینن^۴ (۹/۷ درصد)، سلین-۱۱-ان-۴-آل^۵ (۵/۳ درصد)، ژرماکرن دی^۶ (۴/۹ درصد) می‌باشد(۵) تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی فلاونوئیدهای این گیاه انجام نگرفته است.

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

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد در افرادی که میزان مصرف فلاونوئیدها بالا می‌باشد خطر بیماری‌های قلبی عروقی و مغزی-عروقی کاهش پیدا

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

نرم افزاری 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 فلاونوئیدها بر اساس سیستم حلال I بوده و از سیستم حلال II برای اثبات خلوص پیکها و هنگامی که هر فلاونوئیدهای 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 فلاونوئیدهای 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 فلاونوئیدها

بدین منظور منحنی استاندارد برای هر استاندارد به طور جداگانه رسم گردیده و سطح زیر منحنی نمونه‌ها بر اساس آن تعیین گردید. سطح زیر منحنی (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 تکرار گردید. 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.

گلیکوزیدها به آگلیکون آنها یک نوع روش عملی و نسبتاً آسان برای شناسایی فلاونوئیدها می‌باشد (۱۱). بدین منظور ۴۰ میلی لیتر متانول آبکی ۶۲/۵ 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 میلی لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار افزوده و به دقت هم زده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد با هم زدن رفلکس 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر از آن با ۲۰ میلی لیتر محلول متانول آبکی ۶۲/۵ درصد (حاوی ۰/۱ درصد بوتیل هیدروکسی تولوئن) و ۵ میلی لیتر 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 Association, Milford, MA) به مشخصات (۳/۹ × ۱۵۰ mm، ۴ μm) ستون محافظ^۱: (۳۰-۴۰ μm) و HPLC با مشخصات لوپ: ۲۰ μL، دتکتور PDA^۲ (2996, Waters)، پمپ (515, Waters) و برنامه

1. Guard Column
2. Photo Diode Array

تنظیم منحنی استاندارد

بدین منظور از استاندارد فلاونویدها (میرستین، لوتولین، کوئرستین، آپی ژنین، کامپفرول) غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰/۵ میکروگرم بر لیتر (منحنی استاندارد فلاونویدها معمولا در محدود ۰/۵-۲۵ 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).

میوه‌دهی شناسایی شدند. زمان بازداری استانداردهای فلاونویدهای 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 فلاونویدهای مورد نظر در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۱: زمان بازداری فلاونویدهای مورد استفاده در دو

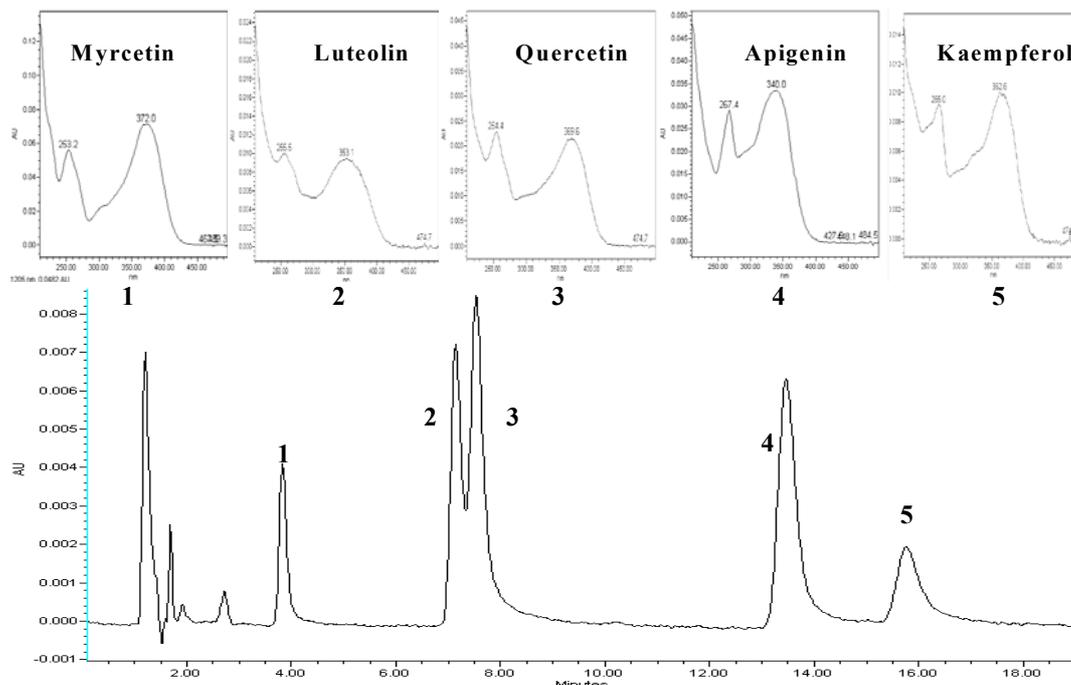
سیستم حلال HPLC		
فلاونویدها	زمان بازداری** (سیستم حلال I, min)	زمان بازداری* (سیستم حلال II, min)
Myricetin	۳/۹۸	۳/۷۸
Luteolin	۵/۰۲	۷/۰۷
Quercetin	۵/۵۹	۷/۴۱
Apigenin	۶/۷۹	۱۳/۴۶
Kaempferol	۷/۳۵	۱۵/۷۶

*: محلول ۲۵ درصد استونتریل 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

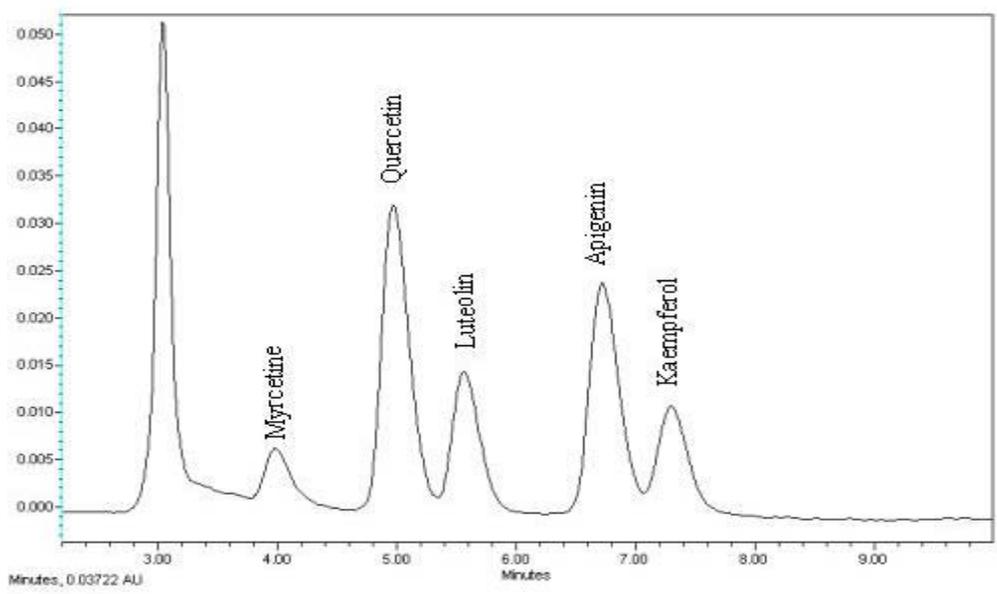
یافته‌ها

شناسایی فلاونویدها

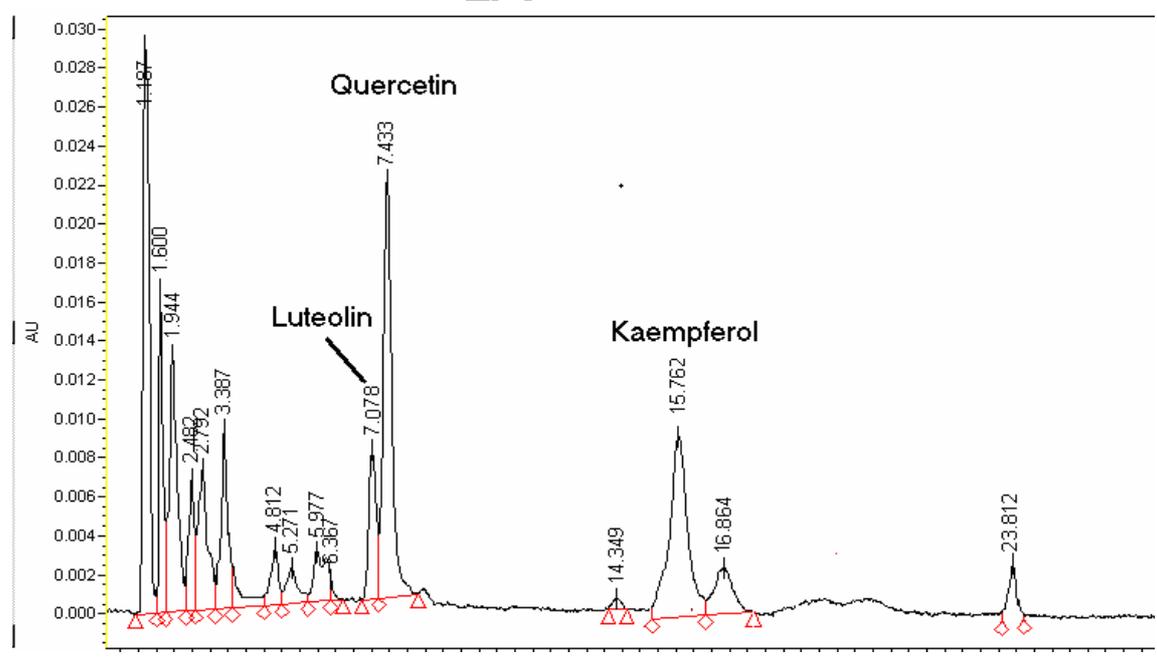
۵ فلاونوید شامل کوئرستین، میرستین و کامپفرول از دسته فلاونونول‌ها، آپی ژنین و لوتولین از دسته فلاون‌ها در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و



شکل شماره ۱: کروماتوگرام HPLC استانداردهای فلاونویدها در طول موج ۳۷۰ nm در سیستم حلال I و طیف UV آنها (گرفته شده توسط دکتور PDA)



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



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

[Downloaded from jmuums.mazums.ac.ir on 2024-09-18]

بحث

با مراجعه به نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود که بیشترین تجمع فلاونوئیدها در گل بوده که با توجه به این که رنگ زرد گل‌ها بیشتر به دلیل وجود فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها است، قابل توجه می‌باشد (۱۸ تا ۱۶). میرستین و آپی ژنین فقط در گل تولید شده است. اختصاصی بودن بعضی از فلاونوئیدها به بافت‌های خاص در گیاه عناب (*Zizyphus mistol*) نیز گزارش شده است (۱۹). میزان کوئرستین و لوتولین در گل به مراتب از میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی بیشتر است و این اختلاف با احتمال $P < 0.05$ از لحاظ آماری قابل قبول می‌باشد. نکته جالب این که بین میزان کامپفرول در ۴ نمونه اختلافی وجود ندارد. فلاونوئید مذکور به رویشگاه خاص یا بافت خاصی از گیاه عطر سنگ وابسته نمی‌باشد. در حالی که 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 فلاونوئیدها 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 فلاونوئیدها نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی بیشترین شباهت را داشته و فلاونوئیدهای گل بیشترین تفاوت را با فلاونوئیدهای ۳ دسته دیگر دارد. به نظر می‌رسد که نقش اندام در تجمع فلاونوئیدها در گیاه عطر سنگ بیشتر از تاثیر مرحله رویشی باشد. در گیاه ایزوکما (*Isocoma acradenia*) و گیاه نعناع (*Mentha × piperita*) تغییری در میزان ۵ فلاونوئید مذکور مشاهده نشده است (۲۴، ۲۳). در گیاه شبه رز (*Cistus laurifolius*) میزان کوئرستین در بافت جوان و میرستین در بافت رسیده بیش تراست (۲۵). میزان آپی ژنین،

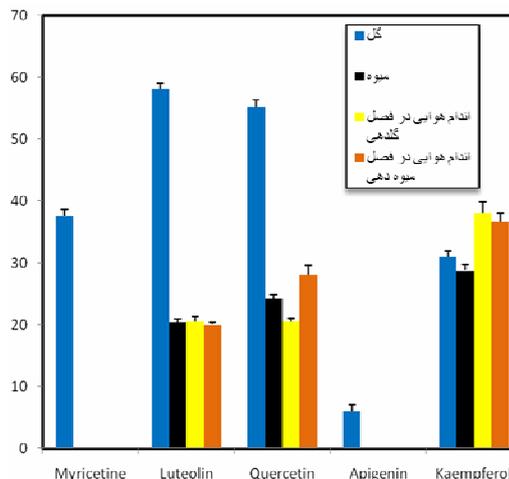
جدول شماره ۲: مقایسه وجود فلاونوئیدها در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی

فلاونوئیدهای بررسی شده	گل	میوه	اندام هوایی در فصل گل‌دهی	اندام هوایی در فصل میوه‌دهی
Myricetine	+	-	-	-
Luteolin	+	+	+	+
Quercetin	+	+	+	+
Apigenin	+	-	-	-
Kaempferol	+	+	+	+

+ : وجود ترکیب - : عدم وجود

تعیین مقدار فلاونوئیدها

به منظور تعیین مقدار فلاونوئیدها ابتدا بر اساس غلظت‌های مختلف استاندارد و سطح زیرمنحنی پیک‌ها، منحنی استاندارد رسم گردیده، سپس بهترین خط با R^2 بزرگتر از ۰/۹۹۹۵ رسم و براساس معادله خط غلظت فلاونوئیدها تعیین گردید (۱۱، ۷). میزان فلاونوئیدهای یافت شده در گل، میوه و اندام هوایی در مراحل رویشی گل‌دهی و میوه‌دهی در شکل شماره ۴ آورده شده است.



شکل شماره ۴: میزان فلاونوئیدهای یافت شده در گل، میوه و اندام هوایی در فصل گل‌دهی و میوه‌دهی
* : نتایج به صورت $Mean \pm SD$ مربوط به ۳ بار تکرار می‌باشد.
* : غلظت بر اساس میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه

آن در گیاه عطرسنگک زمینه انجام امکان بررسی‌های فارماکولوژی این گیاه فراهم شده است.

سیاسگزاری

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

کوئرستین و لوتولین در گیاه عطر سنگک با افزایش سن از مرحله گل‌دهی به میوه‌دهی تفاوتی نداشت ولی در برگ‌های هویج (*Daucus carota*)، مسن‌تر شده باعث کاهش میزان فلاونوئیدها شده است (۲۶). این‌گونه تغییرات در گیاه درمنه (*Artemisia tridentate*) نیز گزارش شده است (۲۷). با شناخت نوع فلاونوئید و میزان

Reference

- Ghahreman A. Flora de l'Iran en couleurs naturelles. institut de Recherches des forêts et pasturages Téhéran Iran. 2002; 1746.
- Riedl H. Flora Iranica 1st ed. Rechingen KH. Akademische Druck-verlagsantalt, Graz 1963; 145: 107.
- 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.
- 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.
- Ghasemi N, Asghari G, Shams Ardakani M, Siahpoosh A. Characterization of volatile constituents from aerial parts of *Varthemia persica* DC. (var. *persica*). *Iranian J Pharm Res* 2003; 241-243.
- Solar A, Colaric M, Usenik V, Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci* 2006; 170: 453-461.
- Erlund I. Review of flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* 2004; 24: 851-874.
- Havsteen GH. The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 2002; 96: 67-202.
- Prior RL, Cao G. Flavonoid: diet and health relationships. *Nutr Clin Care* 2000; 3(5): 279-288.
- Hollman PCH, Hertog MGI, Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* 1996; 57: 43-46.
- Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly

- 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 disease: 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, Blackburn 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 in *zyzyphus 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.

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