جداسازی و تعیین ساختمان مولکولی ترکیبات فلاوونوییدی موجود در عصاره متانولی گیاه *Achillea conferta* DC.

سودابه سعیدنیا[۱]*، نرگس یاسا[۲]، احمدرضا گوهری[۳]، عباس شفیعی[٤]

۱- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

٤- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* آدرس مکاتبه: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

صندوق پستی: ٤٨١٧٥-٨٦١، تلفن: ٦- ٣٣٤٣٠٨٣ (٠١٥٢)، نمابر ٣٣٤٣٠٨٢ (٠١٥٢)

پست الکترونیک: soodabehsaeidnia@hotmail.com

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۲۸

چکیده

مقدمه: جنس بومادران اگرچه در ایران پراکندگی وسیعی دارد ولی گونه‌های اندکی از آن مورد مطالعه فیتوشیمیایی قرار گرفته است. این جنس به دلیل داشتن فلاوونوییدهای متوکسیله و نیز C – گلیکوزیله مورد توجه است [۱].

هدف: در بررسی اخیر به جداسازی و شناسایی مهمترین ترکیبات فلاوونوییدی موجود در عصاره متانولی گونه *Achillea conferta* - که در ایران می‌روید- پرداخته شده است. در نتیجه یافته‌های موجود با ترکیبات فلاوونوییدی جداسازی شده از دیگر گونه‌های مشابه – که در مناطق دیگری می‌رویند- مقایسه گردیده است.

روش تحقیق: گونه *Achillea conferta* در این مطالعه از منطقه طالقان جمع‌آوری شده و عصاره متانولی آن با استفاده از روش کروماتوگرافی کاغذی نزولی تفکیک شده است. از سیستم‌های حلال حاوی مقادیر متفاوتی از اسید استیک و نیز BAW برای خالص‌سازی هر چه بیشتر بهره برده‌ایم.

یافته‌ها: اجسام خالص‌شده با استفاده از طیف‌های ماورای بنفش، تشدید مغناطیسی هسته پروتون و طیف جرمی شناسایی و در مقایسه با منابع موجود تایید گردیدند. این اجسام عبارتند از کریزواریول (٣′ – متوکسی لوتئولین)، لوتئولین و کوئرستین.

نتیجه‌گیری: فلاوونوییدهای به دست آمده با نمونه‌هایی که قبلاً در خارج کشور جداسازی شده کاملا متفاوت است [۱،۲]. گونه ایرانی فاقد فلاوونوییدهای بسیار متوکسیله نظیر آرتمتین و سالویژنین می‌باشد.

گل‌واژگان: *Achillea conferta*، بومادران، لوتئولین، کریزواریول، کوئرستین

مقدمه

جنس *Achillea* یا بومادران از تیره Compositae یا کاسنی شامل تعداد بسیار زیادی از گیاهان پایای علفی است که بومی اروپا، آسیا و آمریکای شمالی می‌باشند [۳]. بومادران در طب سنتی دارای اثرات ضدتشنج، قاعده‌آور،رفع بواسیر، بندآورنده خون و التیام‌دهنده زخم‌ها و جراحات است [٤،٥،٦]. گیاه بومادران سرسان یا انبوه با نام علمی *Achillea conferta* DC. گونه‌ای است که پراکندگی وسیعی در ایران دارد و علاوه بر ایران در عراق، آناتولی، سوریه، قفقاز، ترکمنستان، افغانستان، آسیای جنوب غربی و مرکزی نیز می‌روید [۷]. اگر چه این گونه تاکنون در ایران مورد مطالعه فیتوشیمیایی قرار نگرفته است ولی بررسی منابع نشان می‌دهد که گونه عراقی حاوی فلاوونوییدهای بسیار متوکسیله نظیر آرتمتین می‌باشد که با روش‌های کروماتوگرافی ستونی و نازک لایه جداسازی شده‌اند [۲].

فلاوونوییدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، آنتی مدیاتوری و متعادل‌کننده سیتم ایمنی هستند. همچنین تعدادی از فلاوونوییدها خواص مفید ضدالتهاب و محافظت‌کننده کبدی دارند [۸]. فلاوونوییدهای متوکسیله به دست آمده از این جنس نیز اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند [۲]. در بررسی اخیر به جداسازی و شناسایی مهمترین ترکیبات فلاوونوییدی موجود در عصاره متانولی این گیاه پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

گونه *Achillea conferta* DC. (تیره Compositae)، از ارتفاعات طالقان نزدیک گته ده در بهار سال ۱۳۷۹ جمع‌آوری شده است. گیاه توسط مهندس ایرج مهرگان شناسایی و یک نمونه هرباریومی از آن در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره AC- 02- 001 نگهداری می‌شود.

عصاره‌گیری

سرشاخه‌های هوایی گل‌دار گیاه مورد نظر در دمای اتاق و سایه خشک و سپس پودر شده است. از مقدار ٦۰۰ گرم پودر حاصل به وسیله متانول و با روش پرکولاسیون عصاره‌گیری به عمل آمده است. عصاره‌گیری به طور مداوم به مدت یک هفته تا منفی شدن تست سیانیدین که برای شناسایی فلاوونوییدها به کار رفته است ادامه داشته و عصاره حاصل در دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ شده است. بازدهی روش عصاره‌گیری حدود ۱۰ درصد وزنی – وزنی می‌باشد. عصاره حاصل ابتدا با استفاده از حلال اتردوپترول و سپس کلروفرم شستشو داده شده تا بسیاری از چربی‌ها و پیگمان‌های رنگی مزاحم حذف شوند. در نهایت مقدار ۵۰ گرم از عصاره شسته شده به دست آمده است.

جداسازی

مقدار ۲ گرم از عصاره نهایی را در متانول تقطیر شده حل و آن را بر روی تعدادی کاغذ مخصوص کروماتوگرافی (واتمن شماره ۱) کاشته و آنگاه در تانک نزولی ویژه کروماتوگرافی کاغذی قرار داده و از حلال اسید استیک ۲ درصد برای به حرکت در آوردن لکه‌های کاشته شده استفاده به عمل آمده است. پس از گذشت ٢٤ ساعت کاغذها را از تانک خارج کرده، در زیرهود خشک نموده و بار دیگر در تانک قرار داده و از سیستم حلال BAW به نسبت ٤:١:٥ به مدت ۱۲ ساعت استفاده شده است. برای بررسی لکه‌های جدا شده، نور ماورای بنفش با طول موج ٣٦٦ نانومتر و نیز معرف Natural Product مورد استفاده قرار گرفته است. سه لکه اصلی در (A) Rf = ۰/۸، (B) Rf = ۰/۷ و (C) Rf = ۰/٦ ردیابی شدند. این لکه‌ها در مجاورت بخار آمونیاک به رنگ زرد در می‌آمدند. برای خالص‌سازی بیشتر، محل هر یک از لکه‌ها را با دقت بریده و در متانول استخراج کرده آنگاه مجدداً تغلیظ و کروماتوگرافی نمودیم. این‌بار از اسیداستیک ۱۵ درصد به مدت ۸ ساعت استفاده شد. با مشاهده در زیر نور ماوری بنفش با طول موج بلند از فراکشن A لکه‌ای به رنگ ارغوانی در Rf =۰/۰۷، از فراکشن B لکه‌ای به رنگ بنفش در Rf = ۰/۱ و بالاخره از فراکشن C لکه‌ای به رنگ زرد در Rf = ۰/۰٤ ردیابی شد. اجسام اخیر بوسیله متانول از کاغذ استخراج، سپس تغلیظ و نهایتاً در دسیکاتور خلا به مدت ٢٤ ساعت خشک گردید. آنگاه تا زمان تهیه طیف‌های مورد نیاز در یخچال

نگهداری شدند. جسم A به میزان ۲۰ میلی‌گرم، جسم B به مقدار ٤٥ میلی‌گرم و جسم C حدود ۱۲ میلی‌گرم به دست آمد.

شناسایی

به منظور شناسایی این اجسام ابتدا مقدار ٥ میلی‌گرم از هر جسم را در متانول مخصوص اسپکتروسکوپی حل کرده و سپس در حضور شاهد متانولی جذب ماورای بنفش- مریی آن در طیف‌سنج Shimadzu بررسی گردید. آنگاه از معرف‌های شیفت‌دهنده نظیر سدیم متیلات، سدیم استات، آلومینیم کلراید، اسیدکلریدریک و اسید بوریک نیز استفاده نمودیم و طیف‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی‌های پیشرفته‌تر ۱۰ میلی‌گرم از هر جسم را در حلال DMSO دوتره حل کرده و طیف رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H- NMR) در اسپکترومتر Varian، با قدرت ٤٠٠ مگاهرتز به دست آمد. از اسپکترومتر جرمی Finigan-mat , EI- MS نیز برای تعیین جرم مولکولی استفاده گردید.

نتایج

الف – مشخصات طیف ماورای بنفش جسم A

محلول متانولی (λ بر حسب nm): ٢٦٨ شولدر، ٣٥٦

محلول متانولی + سدیم متیلات: ٢٦٧، ٤٠٧

محلول متانولی + کلرور آلومینیم: ٢٦١ شولدر، ٢٧١، ٢٩٣شولدر، ٣٦٠شولدر، ٤٠١

محلول متانولی + کلرور آلومینیم + اسید کلریدریک: ٢٥٧ شولدر، ٢٧٧، ٢٩٣ شولدر، ٣٥٧، ٣٩١

محلول متانولی + سدیم استات: ٢٦٩، ٣٢٢ شولدر، ٣٦٥

محلول متانولی + سدیم استات + اسید بوریک: ٢٦٠، ٢٩٣ شولدر، ٣٧٠، ٤٢٥ شولدر

ب – مشخصات طیف ماورای بنفش جسم B

محلول متانولی (λ بر حسب nm): ٢٤٢ شولدر، ٢٥٣، ٢٦٧، ٢٩١ شولدر، ٣٤٩

محلول متانولی + سدیم متیلات: ٢٦٦ شولدر، ٣٢٩ شولدر، ٤٠١

محلول متانولی + کلرور آلومینیم: ٢٧٤، ٣٠٠ شولدر، ٣٢٨، ٤٢٦

محلول متانولی + کلرور آلومینیم + اسید کلریدریک: ٢٦٦ شولدر، ٢٧٥، ٢٩٤ شولدر، ٣٥٥، ٣٨٥

محلول متانولی + سدیم استات: ٢٦٩، ٣٢٦ شولدر، ٣٨٤

محلول متانولی + سدیم استات + اسید بوریک: ٢٥٩، ٣٠١ شولدر، ٣٧٠، ٤٣٠ شولدر

ج – مشخصات طیف ماورای بنفش جسم C

محلول متانولی (λ بر حسب nm): ٢٥٦، ٢٩٩ شولدر، ٣٧٠

محلول متانولی + سدیم متیلات: ٢٦١ ، ٣٠٣ شولدر، ٤٢٦ تخریب پس از ٥ دقیقه

محلول متانولی + کلرور آلومینیم: ٢٧١، ٢٩٢ شولدر، ٤٤٨

محلول متانولی + کلرور آلومینیم + اسید کلریدریک: ٢٧٠، ٢٩٣ شولدر، ٤٢٥،٣٦٠

محلول متانولی + سدیم استات: ٢٧٠، ٢٩٢ شولدر، ٣٦٠

محلول متانولی + سدیم استات + اسید بوریک: ٢٦١، ٢٩٩ شولدر، ٣٨١

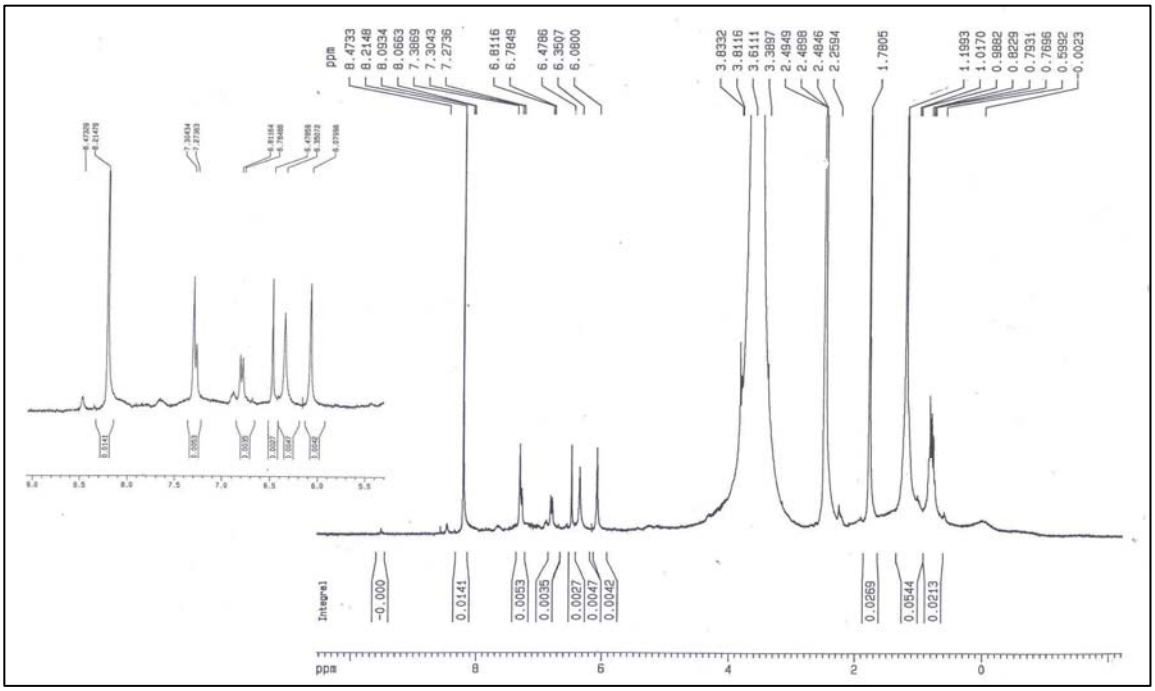
د –نتایج مربوط به طیف H- NMR اجسام A، B و C در زیر خلاصه شده است (δ بر حسب ppm می باشد) (شکل‌های ۱، ۲ و ۳)

A: H-3 (6.48 s); H-6 (6.07 brs); H- 8 (6.36 brs); H-2′(7.30 brs); H-5′(6.78, d, J= 8.1 Hz); H- 6′(7.27, d, J= 8.1Hz); OCH3(3.83 s)
B: H-3 (6.50 s); H-6 (6.09 brs); H- 8 (6.39 brs); H-2′(7.30 brs); H-5′(6.80, d, J= 7.9 Hz); H- 6′(7.29, d, J= 7.9Hz)
C: H-6 (6.19 brs); H- 8 (6.40 brs); H- 2′(8.02 brs); H-5′(6.88, d, J= 8.4 Hz); H- 6′(7.59, d, J= 8.4Hz)

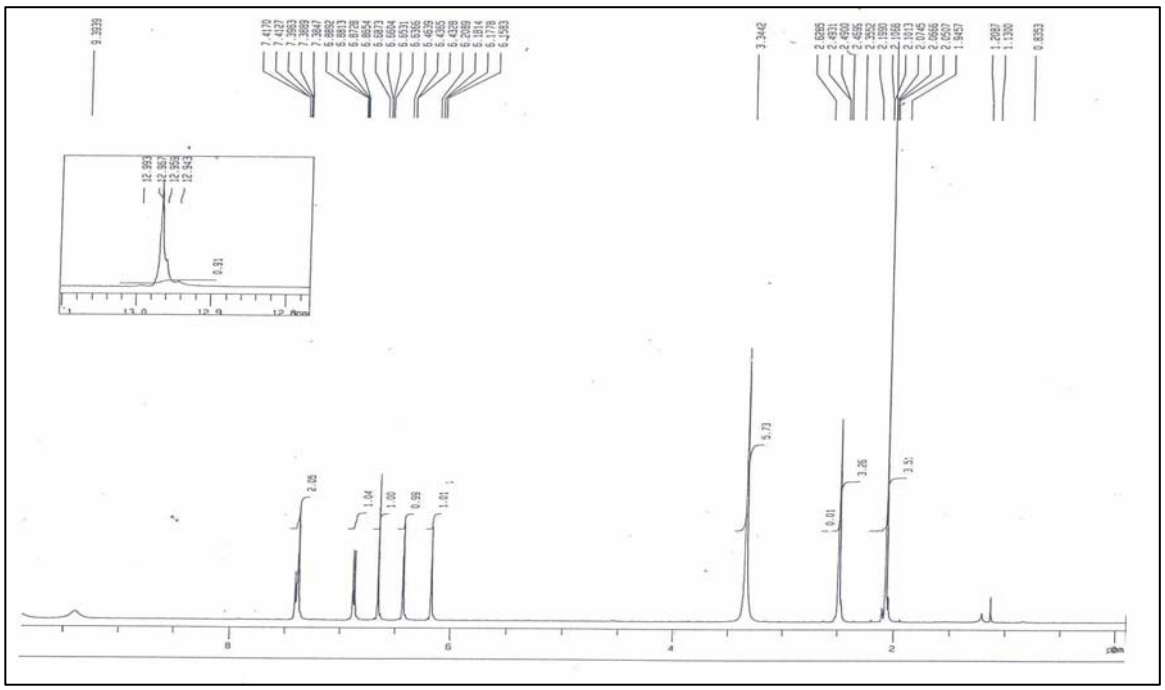
ه – نتایج و مشخصات طیف جرمی هر یک از اجسام A، B و C در زیر خلاصه شده است (شکل‌های شماره ٤، ٥ و ٦)

A: m/z (%): 300(17); 286(70); 151(18); 152.8(30); 134(20); 148(10)
B: m/z (%): 286(90); 152(10); 134(15)
C m/z (%): 302(100); 273(10); 153(10); 137(18)

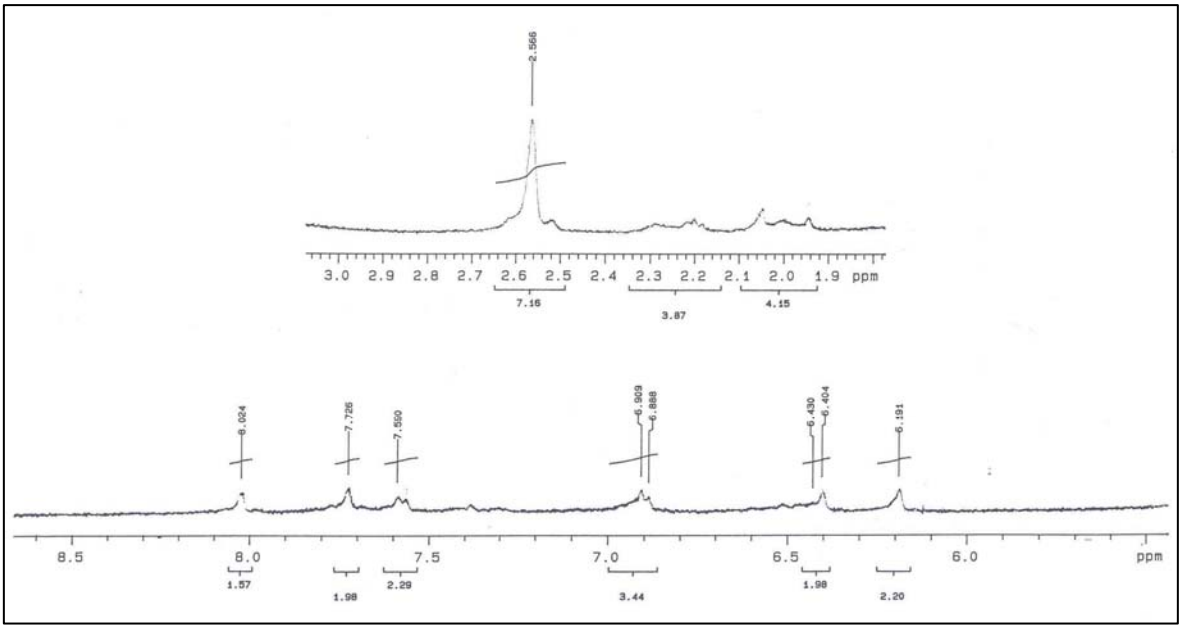
شناسایی و تایید جسم A: بررسی طیف ماورای بنفش محلول متانولی این جسم که نمایانگر باند ۱ (٣٥٦ نانومتر) و باند ۲ (٢٥٨ نانومتر) است موید ساختار فلاوونی آن می‌باشد. شیفت باثوکرومیک به میزان ۱۱ نانومتر در باند ۲ پس از افزودن سدیم



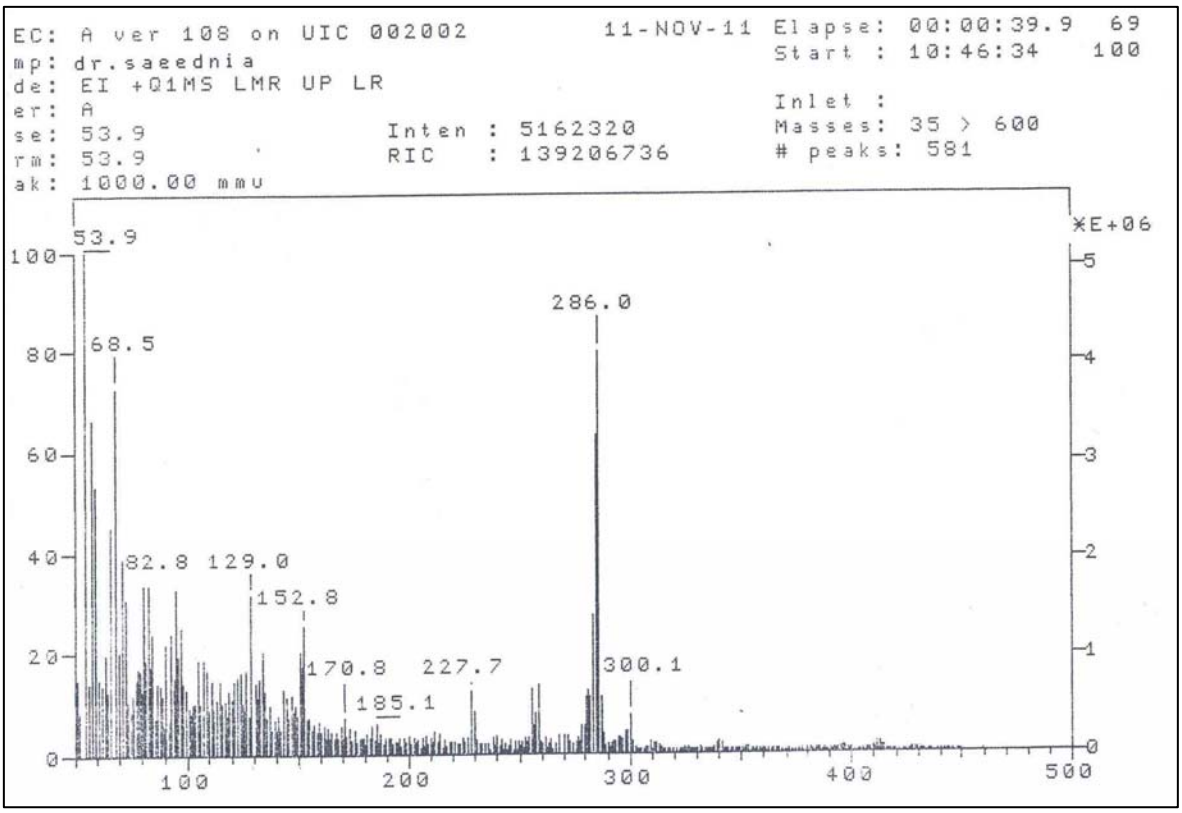
شکل شماره ۱– طیف H- NMR جسم A با طیف‌سنج ۳۰۰ مگاهرتز



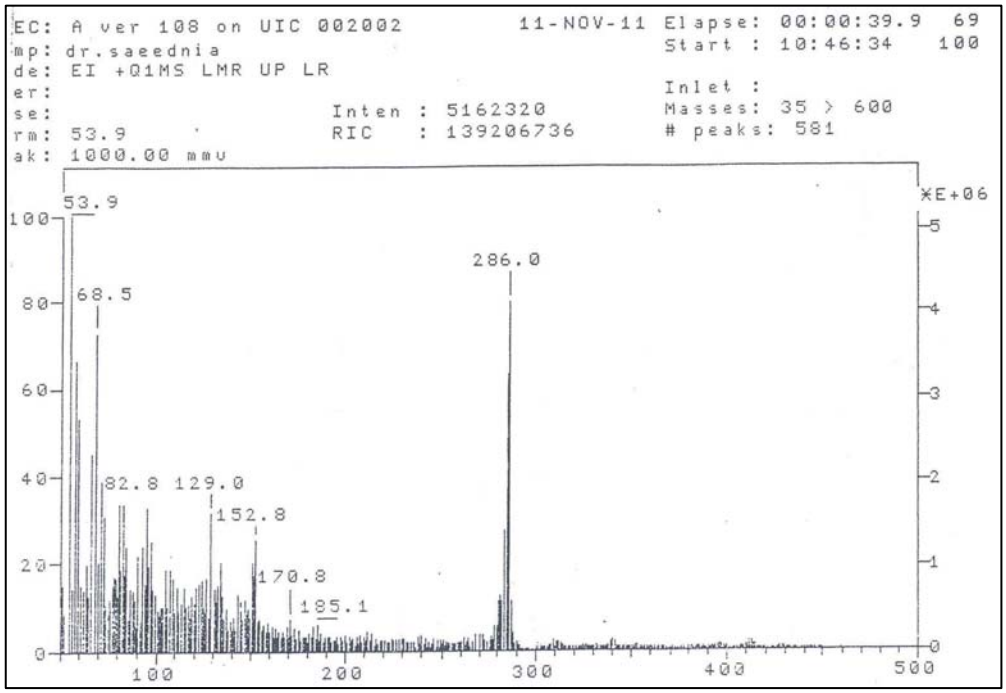
شکل شماره ۲ – طیف H-NMR جسم B با طیف‌سنج ۵۰۰ مگا هرتز



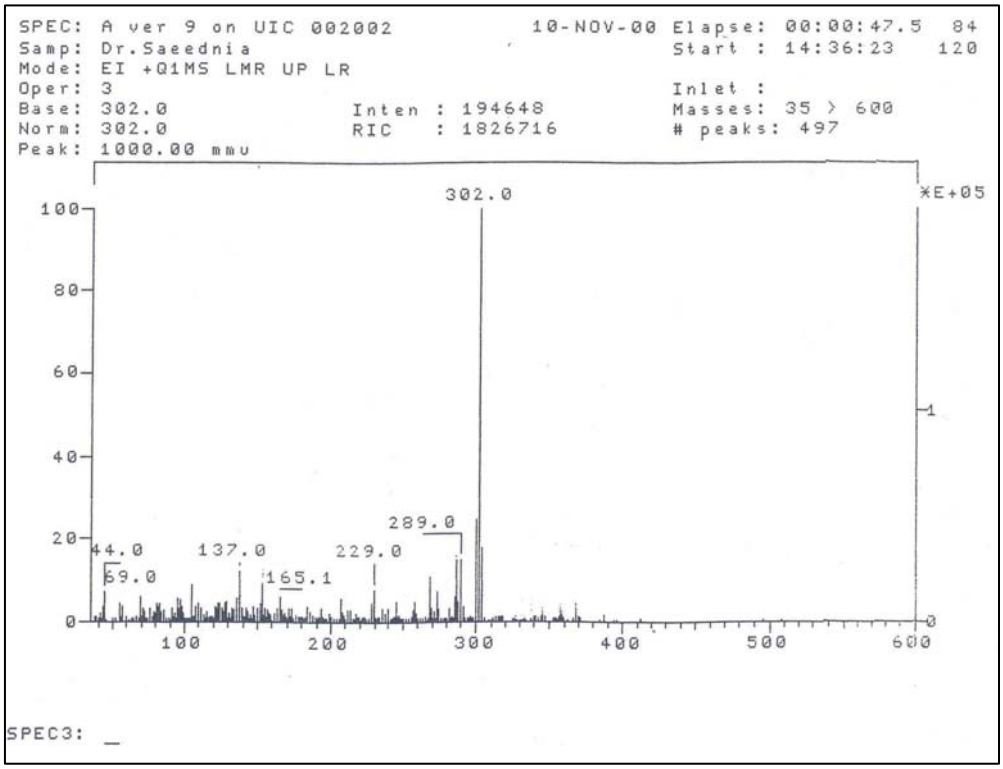
شکل شماره ۳- طیف H_NMR جسم C با طیف‌سنج ٤٠٠ مگاهرتز



شکل شماره ٤- طیف EI-Mass جسم A



شکل شماره ۵- طیف EI-Mass جسم B



شکل شماره ٦ – طیف EI-Mass جسم C

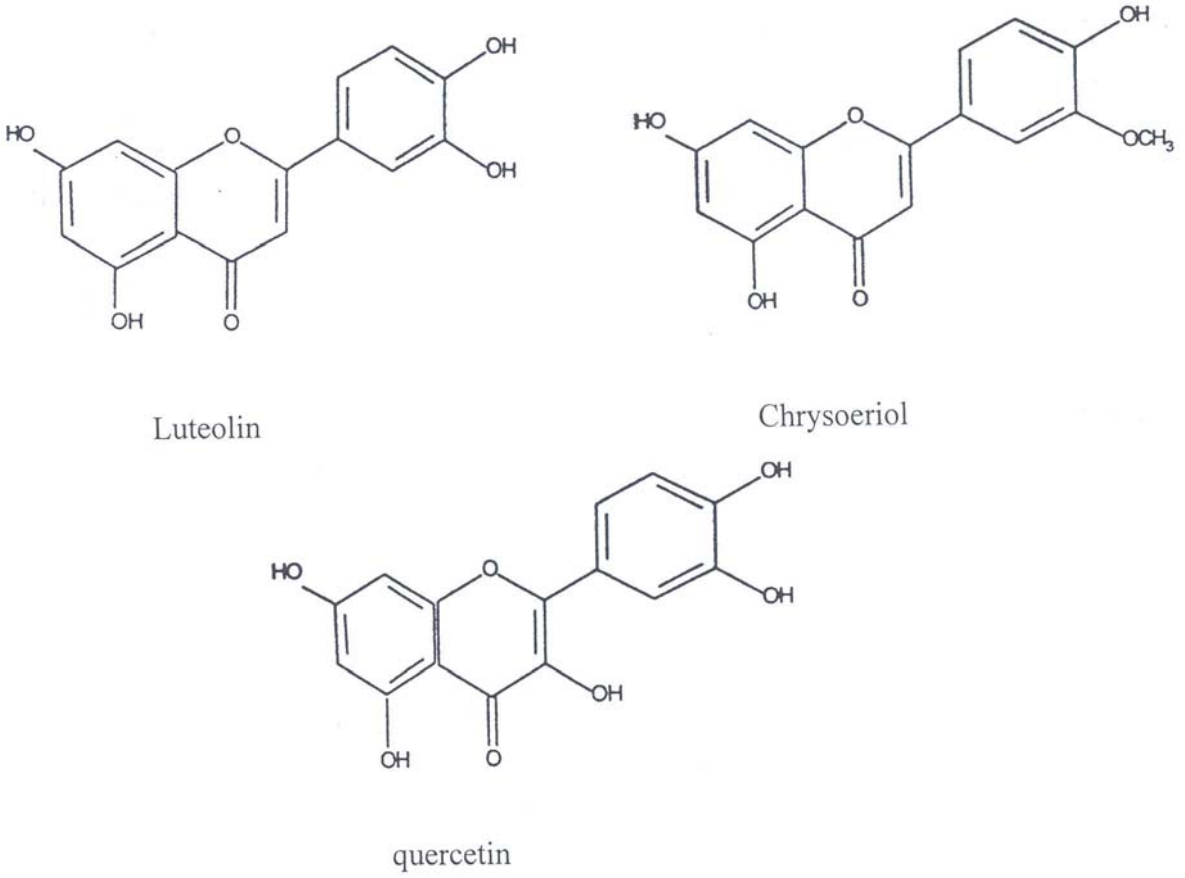
استات مؤید گروه هیدروکسیل آزاد ناحیه ۷ است. شیفت باثوکروم معادل ۵۱ نانومتر در باند ۱ پس از افزودن سدیم متیلات که بازی قوی ست به همراه افزایش شدت جذب مؤید گروه هیدروکسی آزاد ناحیه ´٤ می‌باشد. شیفت باثوکرومیک معادل ٤٥ نانومتر پس از استفاده از معرف آلومینیم کلراید نشانه ایجاد کمپلکس با هیدروکسی آزاد ناحیه ۵ است. عدم مشاهده شیفت باثوکروم در باند ۱ پس از استفاده از معرف اسید بوریک/ سدیم استات نشان می‌دهد که گروه‌های اورتو دی‌هیدروکسی آزاد در حلقهB این فلاوون وجود ندارد و نتیجه منطقی اینکه احتمالاً ناحیه ´۳ توسط گروه متوکسی – که حضورآن در طیف پروتون (۳/۸۳ ppm) تایید می‌شود – اشغال شده است. در طیف جرمی مشاهده می‌شود که پیک مولکولی قطعه‌ای به جرم ۱۵ از دست می‌دهد که آن‌هم تاییدکننده وجود گروه متوکسی است. عدم گروه‌های اورتودی‌هیدروکسی آزاد در حلقه B پس از افزودن معرف اسید کلریدریک به محلول متانولی حاوی آلومینیم کلراید نیز تایید می‌گردد. بررسی طیف پروتون مؤید پروتون‌های ناحیه ٦و ۸ (در موقعیت متا نسبت به هم) در حلقه A است که به صورت تک شاخه پهن مشاهده می‌شوند. دو پیک دو شاخه با ثابت اثر اسپین معادل ۸/۱ هرتز در ٦/۷۸ ppm و ۷/۲۷ ppm به ترتیب نشانه حضور پروتون‌های´ ۵ و´ ٦ در حلقه B می‌باشد. پیک تک شاخه پهن در ۷/۳۰ ppm مربوط به پروتون ´۲ است. در نهایت با تایید طیف جرمی به دلیل پیک مولکولی در m/z= ۳۰۰ جسم مورد نظر فلاوونی به نام کریزواریول یا ´۳ – متوکسی لوتئولین شناسایی گردید (شکل شماره ۷) [۸،۹].

شناسایی و تایید جسم B : بررسی طیف ماورای بنفش محلول متانولی این جسم موید ساختار فلاوونی آن می‌باشد. شیفت باثوکرومیک به میزان ۱۵ نانومتر در باند ۲ پس از افزودن سدیم استات مؤید گروه هیدروکسیل آزاد ناحیه ۷ است. شیفت باثوکروم معادل ۵۲ نانومتر در باند ۱ پس از افزودن سدیم متیلات مؤید گروه هیدروکسی آزاد ناحیه ´٤ می‌باشد. شیفت باثوکرومیک معادل ۷۷ نانومتر در باند ۱ پس از استفاده از معرف آلومینیم کلراید نشانه ایجاد کمپلکس با هیدروکسی آزاد ناحیه ۵ است. حضور گروه‌های اورتو دی هیدروکسی آزاد در حلقه B این فلاوون را می‌توان با مشاهده شیفت‌های باثوکروم قابل توجه در باند ۱ به دنبال افزودن معرف‌های آلومینیم کلراید و نیز اسید بوریک/ سدیم استات و نیز تغییر مکان هیپسوکروم (۵۱ نانومتر) در باند ۱ پس از افزودن اسید کلریدریک به اثبات رسانید. نهایتاً با بررسی طیف پروتون، پروتون‌های ٦، ۸، ´۳، ´۲، ´۵ و ´٦ نظیر آنچه در جسم قبلی بحث شد اثبات شده و طیف جرمی نیز، پیک مولکولی در m/z = ۲۸٦ را نشان می‌دهد که ساختمان فلاوونی لوتئولین را متصور می‌سازد (شکل شماره ۷) [۹،۱۰].

شناسایی و تایید جسم C : بررسی طیف ماورای بنفش محلول متانولی این جسم مؤید ساختار فلاوونولی (باند ۱ در۳۷۰ نانومتر و باند ۲ در ۲۵٦ نانومتر) آن می‌باشد. شیفت باثوکرومیک به میزان ۲۱ نانومتر در باند ۲ پس از افزودن سدیم استات مؤید گروه هیدروکسیل آزاد ناحیه ۷ است. .شیفت باثوکروم معادل ۵۵ نانومتر در باند ۱ پس از افزودن سدیم متیلات به همراه افزایش شدت جذب مؤید گروه هیدروکسی آزاد ناحیه ´٤ می‌باشد. تغییر شکل باند ۱ که پس از گذشت زمان اندکی اتفاق می‌افتد نشانه سیستم تری هیدروکسیله (´٤،´۳ و ۳) است. شیفت باثوکرومیک معادل ۹۵ نانومتردر باند ۱ پس از استفاده از معرف آلومینیم کلراید نشانه ایجاد کمپلکس با هیدروکسی آزاد ناحیه ۵ است. حضور گروه‌های اورتو دی‌هیدروکسی آزاد در حلقه B این فلاوون را می‌توان با مشاهده شیفت‌های باثوکروم قابل توجه در باند ۱ به دنبال افزودن معرف‌های آلومینیم کلراید و نیز اسید بوریک/ سدیم استات و نیز تغییر مکان هیپسوکروم در باند ۱ پس از افزودن اسید کلریدریک به اثبات رسانید. نهایتاً با بررسی طیف پروتون، پروتون‌های ٦، ۸، ´۲، ´۵ و ´٦ اثبات شده و طیف جرمی نیز، پیک مولکولی در m/z = ۳۰۲ را نشان می‌دهد که ساختمان فلاوونولی کوئرستین را متصور می‌سازد (شکل شماره ۷) [۹،۱۱].

بحث

جنس بومادران شامل بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی است که بیشتر در نیمکره شمالی زمین رویش دارد. مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته نشان می‌دهد که فلاوون‌های C- گلیکوزیدی، فلاوونول‌های ۳- O- گلیکوزیدی و نیز فلاوون‌های ۷- O- گلیکوزیدی در گیاهان این جنس به وفور یافت



شکل شماره ۷- ساختمان مولکولی فلاوونوییدهای جداسازی شده از گیاه *Achillea conferta*

می‌شود. آگلیکون‌های آزاد فلاوونوییدی از برگ گونه‌های *A. spinulifolia*، *A. ptarmica*، *A. umbellata* و *A. grandifolia* گزارش شده است. این آگلیکون‌ها در بخش‌های خارجی برگ‌ها و ساقه‌ها به همراه دیگر ترکیبات لیپوفیل تجمع می‌یابند [۱].

آگلیکون‌های فلاوونوییدی بسیار متوکسیله نظیر کریزوسپلنتین، پندولتین، هیسپیدولین و کریزیلئول از گونه *A. ageratum* جداسازی و شناسایی شده است [۱۲]. گونه بومادران هزاربرگ[1] که از دوران باستان به عنوان گیاه دارویی کاربردهای فراوانی داشته نیز حاوی فلاوونوییدهای متوکسیله نظیر آرتمتین، ۵ـ هیدروکسی ـ۳، ٦، ۷، ٤´ ـ تترامتوکسی‌فلاوون و کاستیسین می‌باشد [۱۳]. از گیاه *A. conferta* تنها گزارش موجود مربوط به نمونه عراقی می‌باشد که فلاوونوییدهای بسیار متوکسیله نظیر آرتمتین، و ۵ـ هیدروکسی ـ۳، ٦، ۷، ٤´ ـ تترامتوکسی‌فلاوون را از سرشاخه‌های هوایی این گیاه جداسازی و شناسایی نموده‌اند [۲]. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد هیچ‌یک از فلاوونول‌ها و فلاوون‌های یافت شده در دیگر پژوهش‌ها در گونه ایرانی یافت نشد. به نظر می‌رسد که کریزواریول تنها فلاوون متوکسیله موجود در گونه ایرانی می‌باشد. آگلیکون فلاوونی‌لوتئولین و نیز آگلیکون فلاوونولی کوئرستین که فاقد گروه‌های متیل‌اتری هستند تاکنون به طور آزاد در گونه مورد مطالعه گزارش نشده است. خواص ضدمیکروبی جالب توجهی از فلاوونوییدهای بسیار متوکسیله موجود در گونه عراقی مشاهده شده است اما از آنجا که این آگلیکون‌های متیل‌اتری هیچ‌یک در گونه ایرانی یافت نشد احتمال اثرات ضدمیکروبی از این گیاه کاهش می‌یابد ولی جای تعمق و مطالعه بیشتر دارد [۲].

[1] *A. millefolium*

تشکر و قدردانی

از همکاری نزدیک آقای مهندس ایرج مهرگان در جمع‌آوری و شناسایی گیاه و نیز سرکار خانم جاویدنیا و جناب آقای دالوندی در تهیه طیف‌های NMR و Mass که همگی ما را صمیمانه یاری رسانیدند سپاسگزاریم.

منابع

1. Wollenweber E, Valant- Vetschera KM, Ivancheva S and Kusmanov B. Flavonoids aglycones from the leaf surfaces of some *Achillea* species. *Phytochemistry*. 1987; 26 (1): 181-182.

2. Nadir MT, Hatam NAR, Abdoul- khaaliq N and Yousif N. The Contituents of *Achillea conferta*: Phytochemical and Antimicrobial Studies. *Int. J. Pharmacogn.* 1991; 29 (2): 89-93.

3. Simon J, Chaadvick AF and Craker LE. *Herbs: An Indexed Bibilography.* Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. 1980; pp: 101-102.

4. With H. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals.* 2nd ed. CRC Press. New York. 2001, pp: 342-344.

5. Kuhn MN, Wiston D. *Herbal Therapy and Supplements, A Supplements, A Scientific Traditional Approach.* Lippin Cott, New York. 2000, pp: 347-350.

٦. زرگری علی، *گیاهان دارویی*، چاپ پنجم، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۵، جلد سوم، صفحات ۱۱۱–۱۰۹.

7. Huber Morath A. *Achillea* In: Rechinger KH. Flora Iranica. No. 158, Ackademiche Druck – U. Verlagsansfalt. Graz. 1989, PP: 57-58.

8. Harborn JB, Baxter H. *The Handbook of Natural Flavonoids.* Chichester: John Wiley and Sons. 1999.

9. Mabry TJ, Markham KR and Thomas MB. *The Systematic Identification of Flavonoids.* Springer- Verlage. New York. 1970.

10. Gohari AR, Saeidnia S, Matsuo K, Uchiyama N, Yagura T, Ito M, Kiuchi F and Honda G. Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschyi* growing in Iran and their trypanocidal activity. *Natural Medicines* 2003; 57 (6): 250-252.

11. Harborn JB. *The flavonoids advances in research since 1986.* Chapman and Hall. London. 1993, pp: 450-451.

12. Viera LM, Kijoa A, Pereira JA, Gedrist E and Herz W. Germacrenolide and flavonoids from *Achillea ageratum*. *Phytochemistry* 1997; 45 (1): 111-115.

13. Falk AJ, Smolanski AJ, Bouer L and Bell CL. Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. *J. Pharmarmaceutical Sci.* 1975; 64 (11): 1838-1842.