



FLAVONOÏDES DES PARTIES AÉRIENNES DE *Daucus maritimus* L.

S. Miladi, R. Jarraya, M. Damak*

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Faculté des Sciences de Sfax, BP. 802, 3018 Sfax, Tunisie

(Reçu le 5 Janvier 2004, accepté le 29 Juin 2005)

RÉSUMÉ : Six flavonoïdes glucosides connus ont été isolés pour la première fois des parties aériennes sèches de la plante *Daucus maritimus* L.. Leurs structures ont été identifiées par les techniques spectroscopiques et des corrections de déplacements chimiques en RMN ont été rapportées. De plus, nous avons étudié l'activité antioxydante de quatre composés suivant la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH[•]).

Mots clés : *Daucus maritimus* ; Ombellifères ; flavonoïdes glucosides ; activité antioxydante.

ABSTRACT : Six known glucosid flavonoids have been isolated for the first time from the aerial part of *Daucus maritimus* L. Their structures were elucidated by spectroscopic methods and some correction of NMR's chemical shifts were reported. The 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH[•]) scavenging activity of four compounds was realised.

Key words : *Daucus maritimus* ; Umbelliferae ; glucosid flavonoids ; antioxydant activity.

1. INTRODUCTION

Le genre *Daucus maritimus* fait partie de la famille des Ombellifères. Il comprend plusieurs espèces [1,2,3] telles que *D. crinitus*, *D. carota*,...

L'espèce étudiée, *Daucus maritimus*, est une sous espèce de *D. carota*. A notre connaissance, elle n'a donné lieu à aucun travail chimique antérieur. Notre travail décrit l'isolement et l'identification des flavonoïdes moyennant les différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques : UV, LC-MS et RMN du ¹H et du ¹³C (1D et 2D). Pour les quatre flavonoïdes majoritaires, nous avons mesuré leurs activités antioxydantes moyennant la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH[•]) et par comparaison avec deux antioxydants de référence : l'acide caféique et l'acide férulique.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La chromatographie sur colonne de silice de l'extrait butanolique suivie de la chromatographie sur papier whatman 3MM, a permis d'isoler pour la première fois de *Daucus maritimus* six flavonoïdes tous identifiés à des produits connus. Les spectres de RMN 2D (HMQC, HMBC, H-H COSY) réalisés pour la première fois pour ces flavonoïdes nous ont permis, à travers les couplages C-H, d'intervertir quelques déplacements chimiques rapportés par la littérature [8, 12, 13].

2.1 Composé 1 : C'est un composé amorphe jaune. Son spectre UV est caractéristique d'un flavonoïde. Sa formule brute C₂₇H₃₀O₁₅ a été établie grâce à ses spectres de masse LC-MS et de RMN du ¹³C (Tableau I). Le spectre de masse montre un pic à m/z : 595 [M+H]⁺ et un fragment à m/z : 287 correspondant à la lutéoline. Les fragments à m/z : 449 [M+H-146]⁺ et à m/z : 287 [M+H-146-162]⁺ correspondent successivement à l'élimination d'un rhamnose et d'un glucose.

* correspondant, e-mail : mohamed.damak@fss.rnu.tn



L'étude des spectres UV et les modifications apportées à ces spectres par divers réactifs montrent la présence des groupements hydroxyles en position 5, 3' et 4' de la lutéoline [4,5]. Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C à 2D (HMQC, HMBC et H-H COSY) réalisés sur le composé **1**, nous ont permis d'attribuer sans ambiguïté les déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplage aux protons et carbones correspondants. Ce qui nous a permis d'identifier le composé **1** à la lutéoline-7-O- α -L-rhamnosyl (1^{'''}→6^{''})- β -D-glucoside.

Tableau I : Déplacements chimiques du ^1H et ^{13}C des composés **1** et **4**

Composés n°	1		4	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
Partie aglycone				
2	164,5		156,5	
3	102,9	6,67 s	133,2	
4	182,5		177,2	
5	161,0		161,1	
6	99,5	6,44 d (2,2)	98,8	6,18 d (2,0)
7	162,5		164,6	
8	94,7	6,72 d (2,2)	93,6	6,37 d (2,0)
9	157,5		156,4	
10	105,5		103,7	
1'	121,0		121,0	
2'	113,3	7,40 d (2,3)	116,2	7,52 d (2,2)
3'	145,5		144,8	
4'	150,0		148,5	
5'	115,9	6,91 d (8,1)	115,2	6,83 d (8,3)
6'	119,0	7,41 d (8,1 et 2,3)	121,6	7,53 dd (8,3 et 2,2)
7-O-glucose				
1 ^{''}	100,0	5,04 d (7,3)	-	-
2 ^{''}	73,0	3,28 dd (9,0 ; 7,3)	-	-
3 ^{''}	76,2	3,31 dd (9,0 ; 9,0)	-	-
4 ^{''}	69,5	3,18 m	-	-
5 ^{''}	75,5	3,58 ddd (9,6 ; 6,1 ; 1,4)	-	-
6 ^{''}	66,0	3,85 dd (11,6 ; 1,4) 3,48 dd (11,6 ; 6,1)	-	-
Rhamnose (1 ^{'''} →6 ^{''})				
1 ^{'''}	100,4	4,56 d (1,6)	100,7	4,38 d (1,5)
2 ^{'''}	70,2	3,66 dd (1,6 ; 3,6)	70,5	3,29 m
3 ^{'''}	70,7	3,48 dd (9,3 ; 3,6)	70,3	3,39 m
4 ^{'''}	72,0	3,16 dd (9,3 ; 9,3)	71,8	3,07dd (9,1 ; 9,4)
5 ^{'''}	68,2	3,43 qd (6,2 ; 9,2)	68,2	3,27 m
6 ^{'''}	17,6	1,07 d (6,2)	17,7	0,99 d (6,2)
3-O-glucose				
1 ^{''}	-	-	101,2	5,33 d (7,4)
2 ^{''}	-	-	74,1	3,23 m
3 ^{''}	-	-	76,4	3,21 m
4 ^{''}	-	-	69,9	3,05 dd (9,7 ; 9,4)
5 ^{''}	-	-	75,9	3,26 m
6 ^{''}	-	-	66,9	3,70 d (11,3) 3,28 m

2.2 Composé 2 : Il est amorphe et de couleur jaune. Ses spectres UV présentent la même allure que celle du composé **1**. L'étude des spectres LC-MS et RMN du ^1H nous ont permis de proposer la structure de la lutéoline-7-O- β -D-glucoside à ce composé. La comparaison des déplacements

chimiques en RMN du ^1H de la partie aglycone avec ceux de la littérature [6, 7] confirme cette proposition. Néanmoins, une étude approfondie des spectres de RMN du ^1H et H-H COSY de la partie glucosidique a montré que les déplacements chimiques des protons H-2'' et H-3'' du glucose doivent être intervertis par rapport aux données de la littérature [8], ils sont respectivement de 3,27 et de 3,30 ppm.

2.3 Composé 3 : Il est amorphe et de couleur jaune. L'étude de ses spectres UV, LC-MS et RMN du ^1H et du ^{13}C nous a permis d'identifier ce composé à la quercétine-3-O- β -D-glucoside. La comparaison des données spectroscopiques de ce composé avec celles de la littérature [9, 10] confirme bien cette proposition.

2.4 Composé 4 : C'est un composé amorphe et jaune, son spectre UV est en faveur d'un flavonoïde 3-O-glucoside. Son spectre de masse montre un pic à m/z : 611 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et un fragment à m/z : 303 correspondant à la quercétine ; les fragments à m/z : 465 $[\text{M}+\text{H}-146]^+$ et à m/z : 303 $[\text{M}+\text{H}-146-162]^+$ correspondent successivement à l'élimination d'un rhamnose et d'un glucose. L'étude des spectres UV et les modifications apportées à ces spectres par divers réactifs montrent la présence des groupements hydroxyles en position 5, 7, 3' et 4' de la quercétine [4, 11]. Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C ainsi que les spectres HMQC, HMBC et H-H COSY du composé 4 confirment bien la présence de la quercétine comme aglycone (Tableau I). La présence de deux doublets à $\delta=5,33$ ($J=7,4$ Hz, H-1'') et à $\delta=4,38$ ($J=1,5$ Hz, H-1''') montre que le composé 4 est celui de la quercétine-3-O- α -L-rhamnosyl (1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside. Il est à signaler que les déplacements chimiques des carbones C-5' et C-2' doivent être intervertis par rapport aux attributions mentionnées dans la littérature [12, 13]. En effet, le spectre HMQC montre bien que H-2' ($\delta=7,52$) et H-5' ($\delta=6,83$) sont couplés respectivement avec les carbones résonnants à $\delta=116,2$ et $\delta=115,2$ et non l'inverse.

2.5 Composé 5 et 6 : Ces deux produits ont été identifiés respectivement au kaempférol-3-O-glucoside et l'apigénine-7-O-rhamnoglucoside par comparaison de leurs caractéristiques spectrales (UV, CLHP-UV et CL-SM) avec les données bibliographiques [14] ainsi que par comparaison avec des échantillons authentiques.

2.6 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des quatre produits majoritaires a été étudiée selon la méthode de piégeage des radicaux libres par le DPPH' [14]. En effet, le radical DPPH' peut fixer un radical H' arraché à l'antioxydant AH. Son absorbance à 517 nm diminue et on calcule, après établissement de l'état stationnaire de la réaction, la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% du radical DPPH' [15]. Ceci nous permet de déterminer la concentration efficace CE_{50} (voir partie expérimentale).

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau II suivant :



Tableau II : Concentrations efficaces CE_{50} des produits testés selon la méthode de piégeage des radicaux libres par le radical DPPH'

Composé	CE_{50}	
	g/l	μM
Lutéoline 7-O- α -L-rhamnosyl (1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside <u>1</u>	$19,3 \cdot 10^{-3}$	32,5
Lutéoline-7-O- β -D-glucoside <u>2</u>	$19,2 \cdot 10^{-3}$	42,8
Quercétine-3-O- β -D-glucoside <u>3</u>	$8,8 \cdot 10^{-3}$	18,9
Quercétine-3-O- α -L-rhamnosyl (1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside <u>4</u>	$5,4 \cdot 10^{-3}$	8,8
Acide caféique	$3,5 \cdot 10^{-4}$	1,9
Acide férulique	$8,8 \cdot 10^{-4}$	4,5

La comparaison des activités anti-oxydantes des composés testés à celles de deux anti-oxydants de référence, l'acide caféique et l'acide férulique, a montré que la quercétine-3-O- α -L-rhamnosyl (1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside 4 présente une activité anti-oxydante appréciable. L'activité antioxydante des produits testés décroît dans l'ordre suivant : composé 4, composé 3, composé 1, composé 2.

3. PARTIE EXPÉRIMENTALE

3.1 Matériel végétal

La plante *Daucus maritimus* a été récoltée au mois de Juin 1999 dans la région de Sfax. Un échantillon d'herbier a été identifié et conservé dans le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Sfax (Tunisie) sous la référence LCSN 109.

3.2 Extraction des flavonoïdes

200 g des parties aériennes préalablement séchées et broyées ont été stabilisés dans un mélange d'acétone-eau (1-1, v/v) à la température ambiante pendant 48 h. Après filtration et évaporation de l'acétone, la phase aqueuse a été extraite plusieurs fois avec le butanol. L'extrait butanolique obtenu a été concentré sous vide pour donner un résidu sec (7,3g) correspondant aux flavonoïdes totaux des parties aériennes sèches de cette plante.

3.3 Séparation des flavonoïdes

7g des flavonoïdes totaux ont été chromatographiés sur colonne de gel de silice, en utilisant comme éluant le dichlorométhane et le méthanol avec une polarité croissante. Les fractions obtenues ont été rassemblées en lots après contrôle par CCM, ensuite elles ont été purifiées par chromatographie préparative sur papier whatman 3MM suivie d'une chromatographie sur colonne de séphadex LH-20. Ce qui nous a permis d'obtenir quatre composés majoritaires : la lutéoline-7-O- α -L-rhamnosyl (1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside 1, la lutéoline-7-O- β -D-glucoside 2, la quercétine-3-O- β -D-glucoside 3 et la quercétine-3-O- α -L-rhamnosyl (1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside 4 ainsi que deux autres flavonoïdes minoritaires : le kaempférol-3-O-glucoside 5 et l'apigénine-7-O-rhamnoglucoside 6 qui ont été identifiés par CLHP-UV, CL-SM et par comparaison avec des échantillons authentiques. D'autres flavonoïdes ont été isolés également mais leurs structures n'ont pu être élucidées faute de quantités suffisantes.



3.4 Activité antioxydante

On prépare une solution éthanolique de DPPH' de concentration $0,6 \cdot 10^{-4}$ molaire et des solutions de différentes concentrations des produits à tester. Dans des flacons bien bouchés, on met 2ml de la solution de DPPH' et 2 ml de la solution à analyser. On agite et on laisse reposer pendant 30 minutes à l'obscurité.

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm par rapport à un blanc constitué d'éthanol pur. Tous les tests sont effectués trois fois avant de calculer une valeur moyenne de la DO_{essai} .

On mesure aussi l'absorbance d'une solution contenant uniquement 2 ml de DPPH' et 2 ml d'éthanol ($DO_{100\%}$) pour pouvoir calculer ensuite le pourcentage d'inhibition (PI) et tracer les courbes de variation du $PI = f(c)$.

$$PI = [1 - (DO_{essai} / DO_{100\%})] \times 100$$

La concentration correspondante à un $PI = 50\%$ est appelée CE_{50} : concentration efficace qui correspond à la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% du radical DPPH'.

3.5 Appareillage utilisé

Les spectres de RMN du 1H et du ^{13}C 1D et 2D ont été enregistrés sur un spectromètre Brucker "AMX-400". Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au T.M.S pris comme référence interne et le D.M.S.O est utilisé comme solvant. Les constantes de couplages sont indiquées en Hz.

Les spectres UV ont été enregistrés dans le méthanol sur un spectrophotomètre "Shimadzu UV-2100".

Les spectres de masse LC-MS ont été enregistrés sur un spectromètre Finnigan MAT-LCQ, colonne : Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm (d.i.) x 5 μ m, débit : 1 ml/mn, Merck.

La C.L.H.P couplée à un détecteur photodiode-array, a été réalisée sur colonne Lichrospher 100RP-18, 250 mm x 4 mm(d.i.) Merck. Température de la colonne : 30°C.

La colonne de fractionnement a été préparée avec du gel de silice (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm (Merck) Art. 7754). Le papier chromatographique utilisé est un papier whatman 3MM.

Les mesures des densités optiques ont été réalisées dans des cuves de 1 cm dans un spectrophotomètre pharmacia biotech model 80-2088-64.

3.6 Données spectrales des flavonoïdes

3.6.1 Lutéoline 7-O- α -L-rhamnosyl (1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucoside 1 : produit amorphe et jaune. UV : λ_{max}^{MeOH} (nm) : 255, 267, 347 ; (+NaOMe) 269, 298, 404 ; (+AlCl₃) 273, 297, 330, 427 ; (+AlCl₃ + HCl) 273, 294, 358, 389 ; (+NaOAc) 267, 320, 414 ; (+NaOAc +H₃BO₃) 260, 372. Les déplacements chimiques des spectres de RMN du 1H et du ^{13}C sont indiqués dans le tableau I. CL-SM : (m/z) = 595 [M+H]⁺, 449 [M+H-rhamnose]⁺, 287 [M+H-rhamnose-glucose]⁺.

3.6.2 Lutéoline-7-O- β -D-glucoside 2 : produit amorphe et jaune. UV : λ_{max}^{MeOH} (nm) : 252, 266, 349 ; (+NaOMe) 265, 401 ; (+AlCl₃) 272, 297, 324, 425 ; (+ AlCl₃ + HCl) 273, 296, 358, 386 ; (+NaOAc) 266, 415 ; (+NaOAc +H₃BO₃) 261, 373. CL-SM : (m/z) = 449 [M+H]⁺, 287 [M+H-glucose]⁺. RMN du 1H dans DMSO- d_6 (δ en ppm) = 6,66 (1H, s, H-C₃) ; 6,42 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-C₆) ; 6,77 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-C₈) ; 7,39 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-C_{2'}) ; 6,87 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-C_{5'}) ; 7,40 (1H, dd, J= 2,0 Hz ; J= 8,3 Hz, H-C_{6'}) ; 5,02 (1H, d, J= 7,3 Hz, H-C_{1''}) ; 3,27 (1H, dd, J= 7,3 Hz ; J= 9,7 Hz, H-C_{2''}) ; 3,30 (1H, dd, J= 9,7 Hz ; J= 9,4 Hz, H-C_{3''}) ; 3,18 (1H, dd, J= 9,4



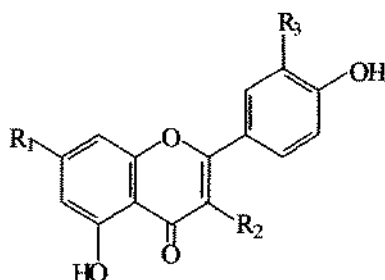
Hz ; J= 9,1 Hz, H-C_{4''}) ; 3,44 (1H, m, H-C_{5''}) ; 3,71 (1H, brd, J= 11,5 Hz, H-C_{6''}) ; 3,49 (1H, m, H-C_{6''}).

3.6.3 Quercétine-3-O-β-D-glucoside 3 : produit amorphe et jaune. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm) : 257, 356 ; (+NaOMe) 272, 330, 409 ; (+AlCl₃) 274, 332, 433 ; (+AlCl₃ + HCl) 271, 364, 401 ; (+NaOAc) 273, 320, 394 ; (+NaOAc + H₃BO₃) 261, 377. CL-SM: (*m/z*) = 465 [M+H]⁺, 303 [M+H-glucose]⁺. RMN du ¹H dans DMSO-d₆ (δ en ppm) = 6,13 (1H, d, J=1,8 Hz, H-C₆) ; 6,33 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-C₈) ; 6,83 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-C₅) ; 7,56 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-C₂) ; 7,54 (1H, dd, J = 2,0 Hz et J=8,3 Hz, H-C₆) ; 5,38 (1H, d, J = 7,4 Hz, H-C_{1''}) ; 3,26 (1H, t, J = 8,7 Hz, H-C_{2''}) ; 3,23 (1H, t, J=9,6 Hz, H-C_{3''}) ; 3,12 (1H, t, J = 9,6 Hz, H-C_{4''}) ; 3,10 (1H, m, H-C_{5''}) ; 3,57 (1H, dd, J = 1,9 Hz ; J=11,7 Hz, H-C_{6''}) ; 3,34 (1H, dd, J = 5,1 Hz ; J = 11,7 Hz, H-C_{6''}). RMN du ¹³C (BB) (δ en ppm) = 156,5 (C₂) ; 133,3 (C₃) ; 177,1 (C₄) ; 161,0 (C₅) ; 99,1 (C₆) ; 165,8 (C₇) ; 93,8 (C₈) ; 156,0 (C₉) ; 103,3 (C₁₀) ; 121,0 (C_{1'}) ; 115,2 (C_{2'}) ; 144,8 (C_{3'}) ; 148,7 (C_{4'}) ; 116,1 (C_{5'}) ; 121,5 (C_{6'}) ; 101,3 (C_{1''}) ; 74,1 (C_{2''}) ; 76,5 (C_{3''}) ; 69,6 (C_{4''}) ; 77,3 ; (C_{5''}) ; 61,0 (C_{6''}).

3.6.4 Quercétine-3-O-α-L-rhamnosyl (1'''→6'')-β-D-glucoside 4 : produit amorphe et jaune. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm) : 257, 265, 301, 358 ; (+NaOMe) 272, 329, 410 ; (+AlCl₃) 273, 303, 421 ; (+AlCl₃ + HCl) 270, 299, 364, 400 ; (+NaOAc) 273, 323, 398 ; (+NaOAc + H₃BO₃) 262, 379. CL-SM : (*m/z*) = 611 [M+H]⁺, 465 [M+H-rhamnose]⁺, 303 [M+H-rhamnose-glucose]⁺. Les déplacements chimiques en RMN du ¹H et du ¹³C sont indiqués sur le tableau I.

3.6.5 Kaempférol-3-O-glucoside 5 : produit amorphe et jaune. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm) : 267, 350 ; (+NaOMe) 275, 326, 400 ; (+AlCl₃) 273, 303, 349, 394 ; (+AlCl₃ + HCl) 274, 345, 394 ; (+NaOAc) 274, 310, 389 ; (+NaOAc + H₃BO₃) 268, 354. CL-SM : (*m/z*) = 449 [M+H]⁺, 287 [M+H -glucose]⁺.

3.6.6 Apigénine-7-O-rhamnoglucoside 6 : produit amorphe et jaune. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm) : 268, 331 ; (+NaOMe) 270, 300, 388 ; (+AlCl₃) 275, 299, 344, 384 ; (+AlCl₃ + HCl) 275, 298, 340, 384 ; (+NaOAc) 267, 391 ; (+NaOAc + H₃BO₃) 268, 340. CL-SM : (*m/z*) = 579 [M+H]⁺, 433 [M+H-rhamnose]⁺, 271 [M+H-rhamnoglucose]⁺.



1 : R ₁ = O-rhamnoglucoside	R ₂ = H	R ₃ = OH
2 : R ₁ = O-glucoside	R ₂ = H	R ₃ = OH
3 : R ₁ = OH	R ₂ = O-glucoside	R ₃ = OH
4 : R ₁ = OH	R ₂ = O-rhamnoglucoside	R ₃ = OH
5 : R ₁ = H	R ₂ = O-glucoside	R ₃ = H
6 : R ₁ = O-rhamnoglucoside	R ₂ = H	R ₃ = H



Remerciements

Nous remercions, Madame Marie-Thérèse Martin, Ingénieur de recherche à l'institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif Sur-Yvette, France, pour la réalisation des spectres de RMN ainsi que le Professeur Mohamed Chaieb, Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie, pour l'identification botanique de la plante étudiée.

Références

- [1] G. Potier-Alapetite, *Flore de la Tunisie Angiospermes-Dicotyledones Apétale Dialypétales*, Ouvrage publié par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique et le Ministère de l'agriculture, 1979, p.618.
- [2] L'abbé H. Coste, *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des Contrées limitrophes*, Imprimerie de la Manutention à Mayenne, 1983, Tome II, p.157.
- [3] T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters et D.A. Webb, *Flora europaea*, Cambridge university press, London, 1981, p.374.
- [4] K.R. Markham, *Techniques of flavonoid identification*, Academic press, London, 1982, pp. 42-45.
- [5] T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*, Springer,verlag, New york, 1970, p.96.
- [6] M. Wang, J.Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. La voie, T.C. Huang and C. T. Ho, *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 1998, 46, 4869.
- [7] J. B. Harborne, *The flavonoids advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, 1994, p.450.
- [8] R. Norbaek, J. K. Nielsen, T. Kondo, *Phytochemistry*, 1999, 51, 1139.
- [9] P. K. Agrawal, *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids*, Elsevier science, Amsterdam, 1989, p. 73.
- [10] R. Norbaek, J. K. Nielsen, T. Kondo, *Phytochemistry*, 1999, 51, 1113.
- [11] T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*, Springer-verlag, New york, 1970, p.130.
- [12] P. K. Agrawal, *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids*, Elsevier science, Amsterdam, 1989, p. 74.
- [13] P. K. Agrawal, *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In : studies in Organic Chemistry*, Elsevier science, Amsterdam, 1989, Vol 39, p.342.
- [14] T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*, Springer,verlag, New york, 1970, p.82.
- [15] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier et C. Berset, *Lebensm. Wissen. Technol.*, 1995, 28, 25.