

**3-O- $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSILFLAVONOIDES Y OTROS DERIVADOS  
FENÓLICOS DE HOJAS DE *Calliandra calothyrsus*.  
MEISSNER (MIMOSACEAE)**

**3-O- $\alpha$ -L-RHAMNOPYRANOSILFLAVONOIDS AND OTHER PHENOLICS  
COMPOUNDS FROM *Calliandra calothyrsus*.  
MEISSNER LEAVES (MIMOSACEAE)**

**3-O- $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSILFLAVONOIDES E OUTROS DERIVADOS  
FENÓLICOS DE FOLHAS DE *Calothyrsus de Calliandra*.  
MEISSNER (MIMOSACEAE)**

*Bárbara Moreno-Murillo*<sup>1</sup>, *Angélica Sánchez*<sup>1</sup>, *Rodolfo Quevedo*<sup>1</sup>,  
*Martha L. Pabón*<sup>1</sup>, *Juan E. Carulla F.*<sup>2</sup>

Recibido: 29/04/08 – Aceptado: 02/12/08

**RESUMEN**

El estudio químico del extracto polar de hojas de *Calliandra calothyrsus*. Meissner (Mimosaceae) (accesión CIAT 22316) condujo a la identificación de dos flavonoides glicosilados: 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona y 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona; sus estructuras fueron elucidadas por métodos espectroscópicos IR y RMN (1D y 2D).

Adicionalmente, por espectrometría de masas por las técnicas DART y ESI de alta resolución, se identificaron derivados fenólicos mayoritarios, tales como ácido gálico y su dímero (PM 339,032), dihidroxicumarina, trihidroxicumarina,

quercetina, dihidroquercetina, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona, 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona y un dímero de flavonoide como principales constituyentes químicos.

**Palabras clave:** *Calliandra calothyrsus*, Mimosaceae, glicósidos de flavonoides, DART, ESI.

**ABSTRACT**

Chemical investigation of the polar extract from *Calliandra calothyrsus*. Meissner (Mimosaceae) (accession CIAT 22316) leaves, afforded two known glycosylflavonoids: 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopi-

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, Colombia. bdmorenom@unal.edu.co

2 Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. jecarulla@unal.edu.co

ranosyl-7-metoxi-5,3',4'-trihydroxyflavone and 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone; their chemical identities were established by IR and 1D and 2D-NMR experiments. Furthermore gallic acid, dihydroxycumarine, trihydroxycumarine, dihydroquercetin, 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-7-methoxy-5,3',4'-trihydroxyflavone, 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, quercetin, a flavonol and a gallic acid dimmers were identified using high resolution mass spectrometry by DART and ESI methods.

**Key words:** *Calliandra calothyrsus*, Mimosaceae, glycosylflavonoids, DART, ESI.

## RESUMO

Os estudos químicos do extrato polar das folhas de *Calliandra calothyrsus* conduzem à identificação de dois flavonóides dos glicosilados: 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-triidroxiflavona e 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetraidroxiflavona; suas estruturas foram elucidadas pelos métodos de espectroscopia de absorção na região de infravermelho (IV) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN (1D e 2D).

Também, por espectrometria de massas pela técnica DART e ESI identificaram-se derivados fenólicos tais como: ácido gálico, diidroxycumarina, triidroxycumarina, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-triidroxiflavona, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetraidroxiflavona, quercetina, dihidroquercetina, um dímero do flavonóide e um dímero do ácido gálico como principais constituintes químicos.

**Palavras-chave:** *Calliandra calothyrsus*, Mimosaceae, glicosilflavonóide, DART, ESI.

## INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de mejorar la productividad en rumiantes, es importante identificar especies útiles como fuente de forraje de buena calidad para uso en periodos prolongados de sequía y disminuir sus efectos desfavorables en la producción animal. En esta búsqueda, las especies leguminosas arbóreas han despertado gran interés por su alto valor nutricional, como fuente de proteínas y energía (1). La familia de las leguminosas es de amplia distribución, muy común en los trópicos y las zonas templadas con excepción de las zonas glaciales, y poseen diversos tamaños que van desde hierbas hasta grandes árboles. A pesar de su valor nutricional, algunas de estas legumbres presentan concentraciones altas de taninos (12-20%), los cuales al ser ingeridos por los bovinos pueden tener efectos favorables, o dependiendo de su concentración pueden llegar a ser perjudiciales y tóxicos como consecuencia de su capacidad de ligar proteínas y formar complejos tanto reversibles por enlaces de hidrógeno, como irreversibles por oxidación de los compuestos fenólicos, afectando la digestibilidad del forraje (2, 3). Las leguminosas arbustivas, tales como *Calliandra calothyrsus*, se usan como suplemento dietario (fuente de nitrógeno) en sistemas productivos de ganado bovino. Sin embargo, la digestibilidad del material puede verse afectada de modo adverso por las concentraciones de taninos condensados (TC) y otros derivados fenólicos presentes en las hojas. En los rumiantes, los

complejos reversibles son estables a pH neutro y son liberados a pH ácido, siendo útiles para reducir la degradación de las proteínas en el rumen e incrementar la disponibilidad de nitrógeno en el intestino delgado, mejorando así la calidad del alimento dado al animal. La estabilidad del complejo tanino-proteína en el biomasa (cuarta cavidad que conforma el estómago de los rumiantes) parece estar relacionada con la estructura de los taninos (4).

La especie *C. calothyrsus*, conocida como “pelo de ángel”, es un árbol frondoso perteneciente a la familia Leguminosae, subfamilia Mimosaceae, originaria de Guatemala, pero distribuida por todo el mundo por sus múltiples usos. Esta planta tiene la facilidad de crecer en suelos empinados, secos, en tierras afectadas por erosión o fuego, en zonas dominadas por malezas e incluso en tierras ácidas (a pH 5.0); puede crecer en altitudes mayores a 1500 msnm, y la cantidad óptima de lluvia para su desarrollo está entre 2000 mm y 4000 mm anuales, pero se puede desarrollar en áreas de menor pluviosidad, con 2-4 meses de estación seca. Desde 1936 esta especie se utiliza para la producción de pulpa de madera debido a que posee un sólido sistema de defensa compuesto por gran cantidad de taninos inhibidores de crecimiento de larvas que hacen muy fuerte su tallo. *C. calothyrsus* es una leguminosa arbustiva potencialmente valiosa como suplemento forrajero en producción de ganado bovino; sin embargo, el uso de algunas accesiones está limitado por presentar algunos factores denominados como antinutricionales y diferentes grados de digestibilidad, lo cual

sugiere y estimula el estudio químico de estas accesiones (5, 6).

Químicamente los taninos son mezclas de polifenoles que están clasificados en dos grupos de acuerdo con su estructura: taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC). Los taninos hidrolizables son ésteres de ácidos fenólicos como ácido gálico o ácido hexahidroxi-difénico con un poliol usualmente derivado de glucosa, y los taninos condensados son polímeros de unidades, flavan-3-oles (catequinas) o flavan-3,4-dioles (epigalocatequinas o delfinidinas) unidos a través de enlaces tipo interflavanos entre C-4 y C-8, sin unidades de monosacárido. Diferentes combinaciones de unidades monoméricas y enlaces C-C producen cientos de estructuras posibles de taninos condensados (2, 7).

Algunos estudios han presentado evidencia de la forma como incide el tipo de estructura de los taninos presentes en leguminosas tropicales sobre la absorción de nitrógeno en rumiantes (4-7). Como parte del proyecto que estudia los efectos de los taninos en la nutrición animal, y con el fin de contribuir al conocimiento de la composición química y sus efectos potenciales en la nutrición de rumiantes se inició el estudio químico de la accesión 22316 de la especie *C. calothyrsus* desarrollada en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (Palmira, Valle del Cauca, Colombia). En este artículo se presenta el análisis estructural de algunos metabolitos secundarios, unidades monoméricas constituyentes de las grandes estructuras tánicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material vegetal

Las hojas secas y molidas de *C. calothyrsus* fueron suministradas por el CIAT, identificada bajo la accesión 22316, especie cultivada en Santander de Quilichao (Cauca, Colombia) en suelo fértil.

### Extracción

Una muestra de 1100 g de hojas de *C. Calothyrsus* (accesión CIAT 22316) se extrajo en licuadora por 20 minutos con una solución de etanol 70%, ácido fórmico 0,5% y ácido ascórbico 0,05%. El extracto alcohólico se decantó, filtró y concentró a presión reducida (8). La muestra concentrada se pasó a través de una columna de Sephadex LH-20 (M/A = 1/50) eluyendo con etanol al 96% hasta separar fenoles simples, flavonoides, pigmentos y monómeros de protoantocianidinas (**M-1**); el residuo retenido por la columna, constituido por compuestos de mayor peso molecular, se eluyó con una mezcla acetona: agua (1:1, v/v), se concentró a presión reducida y se liofilizó (**M-2**).

### Separación

Los compuestos mayoritarios presentes en la fracción **M-1** (1,5 g) se purificaron por medio de separaciones cromatográficas sucesivas, en columna de gel de sílice, eluyendo con mezclas de acetato de isopropilo (AcOIp): MeOH (9,5:0,5; v/v). Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa delgada (CCD) en gel de sílice (G60 F<sub>254, 366</sub>), con el sistema de elución AcOIp:MeOH (9,5:0,5); de acuerdo con su R<sub>f</sub>, absorción UV<sub>254,366</sub> y respuesta a la reacción de coloración con FeCl<sub>3</sub> (3%

en etanol), las fracciones se clasificaron en cuatro grupos (A – D). Los compuestos de la fracción mayoritaria (C) (0,43 g) fueron separados y purificados por aplicación de cromatografía en columna en forma sucesiva eluyendo con mezclas variables de AcOIp:MeOH hasta obtener 18 mg del compuesto denominado **E**.

### Análisis estructural

Las fracciones **C** y **M-2** se analizaron por medio de espectrometría de masas por las técnicas DART (análisis por desorción a presión atmosférica en tiempo real, con helio) (9) y ESI (espectrometría de ionización por electrospray en modo negativo) (10), y la fracción **E** se analizó por métodos espectroscópicos IR y RMN (1D y 2D).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento por medio de cromatografía repetitiva de la fracción **C** condujo a la separación del producto **E**, un sólido amorfo de color amarillo que revela de color café bajo la luz UV<sub>254</sub> y desarrolla una intensa coloración azul al contacto con FeCl<sub>3</sub>. El espectro FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) muestra la presencia de grupos hidroxilo de tipo fenólico a 3409 cm<sup>-1</sup>, de grupo carbonilo conjugado (1647 cm<sup>-1</sup>) y señales de aromaticidad. En los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se observan dos sistemas aislados que corresponden a una secuencia de señales repetidas originadas por una mezcla de dos compuestos con estructuras similares no diferenciables por métodos cromatográficos tradicionales.

El análisis de estos espectros permitió asociar las señales a más alto campo y menor intensidad de acuerdo con los va-

lores de integración, a un compuesto denominado **1**, y las señales restantes, de mayor intensidad, a un compuesto denominado **2** (Tabla 1).

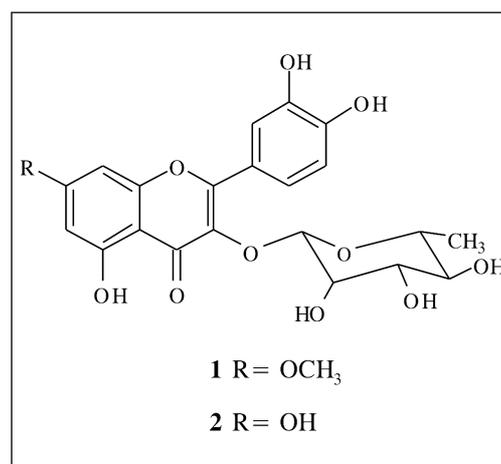
### Compuesto 1

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  presentan un patrón de señales típico de un derivado de quercetina con un residuo de monosacárido (11). El espectro RMN  $^1\text{H}$  presen-

**Tabla 1.** Desplazamiento químico en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **1** y **2** ( $\delta$  en ppm, DMSO- $d_6$ , 100 MHz).

Comp. 1	Comp. 2	Carbono
17,6	17,6	C6"
56,5	—	OCH <sub>3</sub>
70,4	70,3	C5"
70,7	70,6	C2"
70,9	70,9	C3"
—	71,0	C3"
71,6	—	C4"
92,6	94,3	C-8
98,2	99,7	C-6
102,1	102,2	C1"
103,5	105,4	C-10
115,9	116,0	C-6', C-5'
120,4	120,9	C-1'
121,3	121,5	C-2'
134,3	134,7	C-3
145,7	146,9	C-3'
149,1	149,7	C-4'
156,7	156,9	C-2
157,1	158,1	C-9
161,3	161,5	C-5
165,5	165,5	C-7
177,7	178,2	C-4

ta un singlete a  $\delta = 3,85$  ppm (3H) que en el registro de HMQC correlaciona con la señal a  $\delta = 56,5$  ppm del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  asignado a un grupo metoxilo. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muestran señales originadas por un residuo glicosídico donde sobresalen la señal correspondiente al hidrógeno anomérico a 5,29 ppm y una señal doble con  $J = 7$  Hz (3H) a 0,82 ppm que correlaciona con la señal de carbono a 17,8 ppm característica del grupo metilo de un residuo de ramnosa. Adicionalmente se observan correlaciones en el espectro HMBC entre el hidrógeno anomérico de la ramnosa y un carbono que aparece a 134,3 ppm (C-3); esta correlación demuestra la unión entre C-3 de la unidad de flavonoide y el carbono anomérico del residuo de ramnosa (12). La asignación completa de las señales por medio de los experimentos HMQC y HMBC junto con la comparación de datos espectroscópicos previamente publicados (13) permitieron concluir que el compuesto **1** corresponde a 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona conocido como 7-metoxiquercitrina o thujina (Figura 1).



**Figura 1.** Ramnósidos de flavonoles identificados en hojas de *Calliandra calothyrsus* (22316).

## Compuesto 2

Este compuesto presenta un comportamiento espectroscópico prácticamente idéntico al descrito para el compuesto **1** (Tabla 1). También presenta un residuo 3-O- $\alpha$ -L-ramnosa sobre el C-3 del núcleo flavonoide. El análisis espectroscópico y la comparación de datos previamente publicados permitieron concluir que el compuesto **2** es 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavona conocido como quercetina 3-O-ramnosido o quercitrina (Figura 1) (14).

## Análisis por espectrometría de masas

El análisis por espectrometría de masas por la técnica ESI en modo negativo, técnica de ionización suave que produce poca fragmentación, permitió determinar en la fracción **C** el peso molecular de los compuestos mayoritarios por la abundancia relativa del ión  $[M-1]^-$ .

En este espectro (Figura 2) se observa la señal de mayor intensidad a  $m/z = 447,3$  (79%) correspondiente a un peso molecular de 448,3 uma y fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{11}$ , la cual coincide con el peso molecular del compuesto **2**, aislado de la misma fracción e identificado como 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavona. También se observa una señal de menor intensidad a  $m/z = 461,3$  (48%), propio de un compuesto de peso molecular 462,3 uma y fórmula molecular  $C_{22}H_{22}O_{11}$  que

corresponde al compuesto **1** (3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihydroxiflavona). Aparece una tercera señal a un valor  $m/z = 629,4$  (53%) correspondiente a una fórmula molecular  $C_{32}H_{22}O_{14}$  y peso molecular 630,4 uma; esta señal es originada por la presencia de un derivado dimerico **3**, de la unidad de flavonol presente en **1**.

La fracción **M-2** fue sometida a análisis por espectrometría de masas por las técnicas ESI y DART. La técnica ESI arrojó un resultado similar al observado con la fracción **C** (Figura 3); en **M-2** se observan igualmente las señales asignadas a los compuestos **1**, **2** y **3** como componentes mayoritarios. La técnica DART permite generar iones desde una superficie sólida y es ampliamente utilizada en la identificación de componentes individuales dentro de una mezcla (15). Este análisis

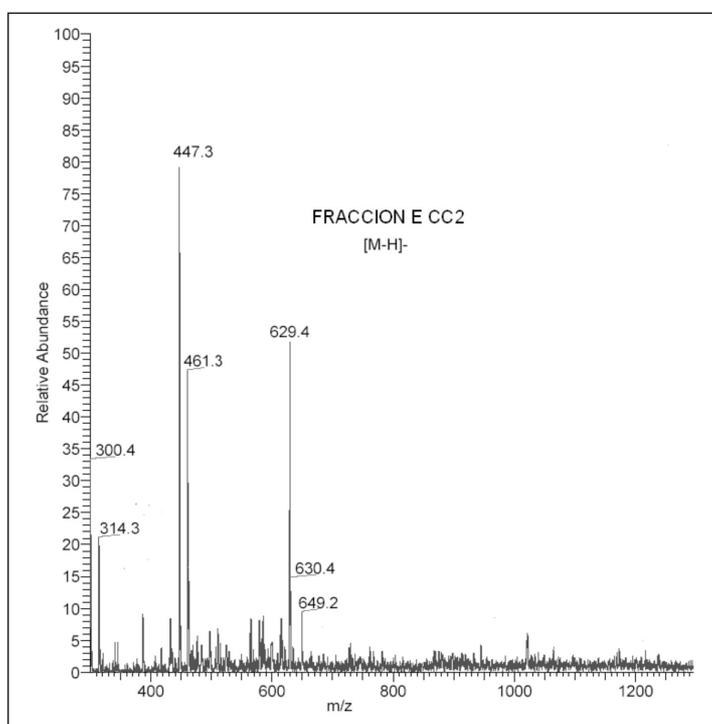


Figura 2. Espectro de masas (ESI) de la fracción C.

sis permitió determinar las masas exactas y calcular las fórmulas moleculares de los compuestos mayoritarios de bajo peso molecular (Tabla 2). En el espectro DART se observan señales a  $m/z = 169,01$  y a  $339,03$  de gran intensidad; dadas las condiciones suaves de la técnica DART, se puede proponer para los compuestos mayoritarios como estructuras probables el ácido gálico y su respectivo dímero (PM 339,032). Estas unidades monoméricas por diversas reacciones enzimáticas dan origen a las complejas estructuras tánicas presentes en *C. calothyrsus* y contribuyen según su concentración relativa a las propiedades astringentes y de digestibilidad de los suplementos dietarios bajo estudio.

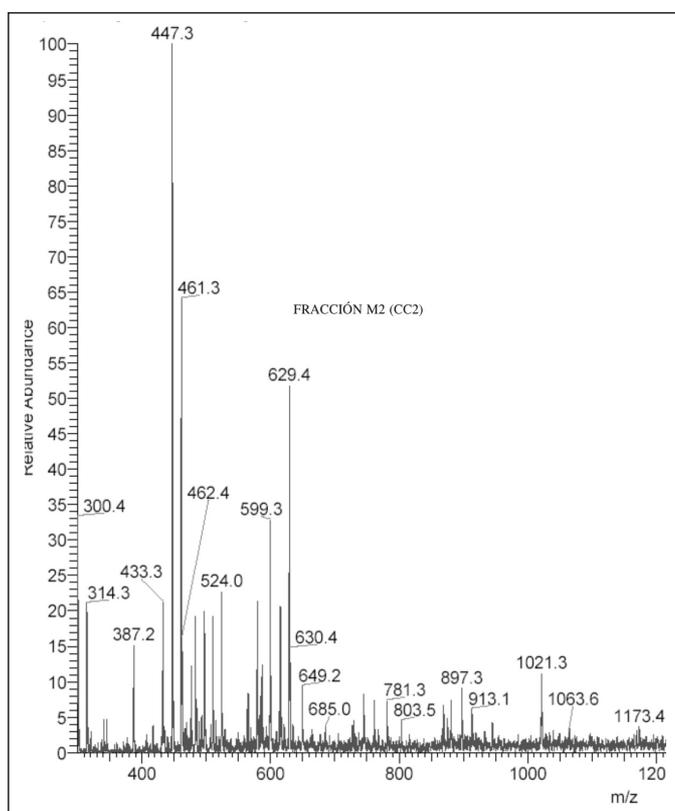
**Tabla 2.** Compuestos fenólicos mayoritarios de *Calliandra calothyrsus* identificados por espectrometría de masas de alta resolución (DART).

N°	Compuestos	[M-H] <sup>+</sup>	%
1	Ácido gálico	169,0136	70,1
2	Dihidroxycumarina	177,0203	0,795
3	Trihidroxycumarina	193,0377	0,303
4	Catequinas	289,0709	0,520
5	Quercetina	301,0348	0,655
6	Dihidroquercetina	303,0505	0,798
7	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>10</sub>	339,032	99,34

El compuesto **1** fue identificado previamente en hojas de *Ageratzna saltzllensz* (16); el compuesto **2** ha sido aislado de las hojas de plantas de la familia Annonaceae (17), de las hojas de *Alchornea glandulosa* de la familia Euphorbiaceae (13), y recientemente de las especies *Mimosa pigra* y *Mimosa invisa* (18), especies pertenecientes a la misma subfamilia de la especie en estudio (Mimosaceae). Este es el primer reporte de los compuestos **1** y **2** en el género *Calliandra*.

## CONCLUSIONES

El estudio químico del extracto polar de hojas de la accesión 22316 CIAT de *C. calothyrsus* condujo a la identificación de dos flavonoles glicosilados conocidos: 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihydroxiflavona y 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahydroxiflavona; este es el primer reporte



**Figura 3.** Espectro de masas (ESI) de la fracción M-2.

acerca de la presencia de estos metabolitos en el género *Calliandra*.

Por medio de espectrometría de masas por las técnicas de ionización suave DART y ESI se identificaron como mayoritarios el ácido gálico y su dímero (intensidad relativa de 70% y 99%, Tabla 2) y otros derivados fenólicos en menores concentraciones, como dihidroxicumarina, trihidroxicumarina, quercetina, dihidro-quercetina, 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-metoxi-5,3',4'-trihidroxiflavona, 3-O- $\alpha$ -L-ramno piranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, y un dímero de flavonol, como principales constituyentes químicos del extracto polar de la especie en estudio. La identificación de estos metabolitos se presenta como un acercamiento a la composición de los productos oligoméricos y taninos condensados presentes en diversas accesiones de la especie *C. calothyrsus*, cultivadas en diferentes condiciones climáticas y de fertilización.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, al doctor C. Lascano del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, por el suministro del material biológico, a la doctora Rosa Lebrón del CSIC de Madrid, España, por el registro de los espectros ESI, a Anditecnica Ltda., por el registro de los espectros DART, y a los doctores Hans Dieter y Tassilo Tieman del ETH, Zurich, Suiza, por el apoyo financiero otorgado al programa dentro del cual se desarrolló el presente trabajo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raaflaub, M.; Lascano, C. E. The effect of wilting and drying of intake rate and acceptability by sheep of the shrub legume *Cratylia argentea*. *Tropical Grasslands*. 1995. **29**: 97-101.
2. Fahey Jr., G.; Jung, H. Phenolic compounds in forages and fibrous feedstuffs, En: Toxicants of plant origin. Vol. IV. Boca de Ratón, FL: CRC Press. 1989. pp. 12-14.
3. Rakhmani, S.; Brooker, J. D.; Jones, G. P.; Palmer, B. Composition of condensed tannins from *Calliandra calothyrsus* and correlation with in sacco digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 2005. **121**: 109-124.
4. Cortés, J. E.; Moreno Murillo, B.; Pabón, M. L. Efectos de taninos de cuatro leguminosas sobre la digestión *in vitro* de proteína. En: Segundo taller Taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Memorias del evento. Bogotá. 2006. pp. 18-21.
5. Lascano, C. E.; Maass, B. L.; Keller, G. Forage quality of shrub legumes evaluated in acid soil. *NFTA y CATIE*. 1995. 228-236.
6. Jackson, F. S.; Barry, T. N.; Lascano, C. E.; Palmer, B. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical trees, shrub and forage legume. *J. Sci. Animal Prod.* 1996. **45**: 125.
7. Scarbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991. **30**: 3875-3883.

8. Carulla, J. E.; Lascano, C. E.; Klopfenstein, T. Reduction of taninn level in tropical legumes (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. *Archives Latin-American's of production animal*. 2001. **9**: 17-24.
9. Gertrud, M.; Yoshihisa, U. New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007. **1143**: 243-251.
10. Mendonc, J.; Franca, J.; Oliveira, S.; Nunes, M. Chemical characterisation of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chemistry*. 2008. **111**: 490-497.
11. Agrawal, P. K. NMR spectroscopy in elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992. **31**: 3307-3330.
12. Hasler, A.; Gross, G. A. Complex flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo Biloba*. *Phytochemistry*. 1992. **31**: 1391-1394.
13. Urrea Bulla, A. M.; Moreno Muriillo, B.; Suárez, M. Biological activity of phenolics compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia* 2004. **75**: 392-394.
14. Santos, D.; Salatino, M. Foliar flavonoids of *Annonaceae* from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*. 2000. **55**: 567-573.
15. Venter, A.; Nefliu, M.; Graham, R. Cooks Ambient desorption ionization mass Spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008. **27**: 284-290.
16. Saggong, Y.; Nianbai, F.; Tom, J. M. Flavonoids from *Ageratzna saltzllenszs*. *Phytochemistry*. 1986. **25**: 2684-2686.
17. Chang, F.; Wei, J. Anti-platelet aggregation constituents from *Annona pursuer*. *J. Nat. Prod.* 1998. **61**: 1457-1561.
18. Yusuf, U.; Abdullah, N.; Bakar, B.; Itam, K.; Abdullah, F.; Sukari, M. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003. **31**: 443-445.